

様式

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

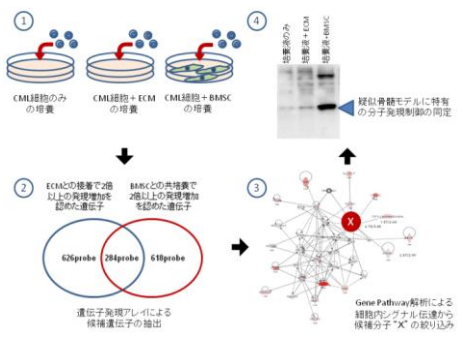
	（所 属）	（職 名・学 年）	（氏 名）
研究者	京都府立医科大学大学 院医学研究科 視覚機能再生外科学	助 教	上野 盛夫
研究の 名称	線維柱帯マーカーの同定と ヒト胚性幹細胞（ヒトES細胞）から線維柱帯細胞の創出		
研究のキ ーワード	緑内障・多能性幹細胞・再生医療		
研究の 概要	<p>原発開放隅角緑内障では線維柱帯細胞が減少していることより、線維柱帯細胞の細胞移植により房水流出主ルートの機能・構造再生することは原発開放隅角緑内障の根本的な治療となると考えられる。線維柱帯移植治療の細胞ソースとなることを最終目標に、申請者は線維柱帯細胞の分子マーカーレベルを解明し、その知見をもとに <i>in vitro</i> でヒトES細胞からヒト線維柱帯細胞を分化誘導することを目的とする。</p>		
研究の 背景	<p>原発開放隅角緑内障では線維柱帯細胞が減少していることより、線維柱帯細胞の細胞移植により房水流出主ルートの機能・構造再生することは原発開放隅角緑内障の根本的な治療となると考えられる。</p>		
研究手法	<p>神経堤由来組織を不可逆的に蛍光標識する遺伝子改変マウスの胎生8.5日目から出生後12日目まで72時間ごとのステージの胚または新生仔を用いた。中脳領域から眼にかけての組織をトリプシン処理で細胞レベルに分離した後にflowcytometryを用いてGFP陽性分画を集積することにより線維柱帯細胞へ分化途上の細胞を得た。さらに野生型マウス成体より線維柱帯細胞を摘出した。それぞれの細胞より型どおりにRNA抽出、cDNA作成を行い、DNAマイクロアレイを用いて中脳神経堤細胞から線維柱帯細胞にいたるまでの分化過程における遺伝子発現プロファイルを得た。</p>		

	<p>線維柱帯前駆細胞と考えられる中脳領域の神経堤細胞にごく早期に発現している転写因子の活性をGFPの活性に置き換えたノックインES細胞を用いて研究を行った。ES細胞から中脳神経堤細胞の分化誘導系を用いて <i>in vitro</i>でマウスES細胞から中脳神経堤細胞の分化誘導研究を行った。マウスES細胞は<i>in vivo</i>では胚盤胞内の内部細胞塊（胎生3.5日目）に相当すると考えると、中脳神経堤細胞が誘導されるのは胎生8.5日目である。これに一致してES細胞を分化誘導条件で5日間培養するとGFP陽性の中脳神経堤細胞が誘導された。次にflowcytometryを用いてGFP陽性細胞の検出およびソーティングを行いマウスES細胞由来中脳神経堤細胞を得た。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>遺伝子改変マウスを用いて、神経堤細胞から眼組織へ分化する課程をトレースし、その遺伝子発現プロファイルを明らかにした。また遺伝子改変ES細胞を用いて、マウスES細胞由来中脳神経堤細胞を得た。</p> <p>ES細胞を用いて再生医療を見据えた分化誘導研究を行う際には、マウス個体の発生過程を模倣することが必須である。そしてマウス由来ES細胞を用いて、効率のよい分化誘導法を確立し、その誘導法をヒト由来ES細胞へ応用することが重要である。本研究では、ヒトES細胞から開放隅角緑内障の再生医療に有用な線維柱細胞を分化誘導する上で礎となる、神経堤細胞から眼組織への分化課程に遺伝子発現プロファイルとマウスES細胞由来神経堤細胞を得た。これらの成果は、ヒトES細胞由来線維柱細胞の創出に極めて有用なツールとなると考えている。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>ES細胞を用いた研究については、京都府立医科大学眼科学教室のホームページに掲載している。</p>
今後の期待	<p>本研究成果によりヒトES細胞から線維柱帯細胞の創出に大きく前進した。今後はヒトES細胞を用いたヒトES細胞由来線維柱帯細胞の高効率の分化誘導をめざして研究が発展するものと考えている。</p>
研究発表	なし

様式

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	内科学 血液・腫瘍内 科部門	学内講師	黒田純也
研究の 名称	造血器悪性腫瘍における腫瘍環境由来治療抵抗性獲得の分子メカニズム解明と新規分子標的の探索		
研究のキ ーワード	慢性骨髄性白血病、骨髄腫瘍環境、Galectin-3		
研究の 概要	<p>近年、造血器悪性腫瘍における疾患特異的な分子異常を標的とした様々な新規分子標的薬が開発され、治療成績は飛躍的に改善した。慢性骨髄性白血病(CML)では、原因遺伝子異常である Bcr-Abl 融合チロシンキナーゼを分子標的とした特異的阻害剤(TKIs)の開発と臨床導入により著しく治療予後は改善された。しかしながら、現有の分子標的治療薬による完治はいまだに困難であり、更なる分子標的の探索と薬剤の開発は喫緊の課題である。</p> <p>造血器腫瘍細胞は生体内で棲息する骨髄間質細胞や骨芽細胞、破骨細胞などとの接着、ケモカイン、サイトカインなどの骨髄微小環境による刺激、低酸素環境による代謝や分子発現調節などの普遍的構成要素である骨髄環境構成因子の支持・庇護のもとに生存・増殖しており、これらによる細胞生存促進シグナルの活性化、抗癌剤抵抗性獲得が注目されてはじめた。本研究では主たる腫瘍環境構成因子である骨髄間質細胞、細胞外マトリクス(ECM)との相互作用によって造血器腫瘍の治療抵抗性を特異的に促進する分子メカニズムを網羅的に探索・解明と、その制御法による新規の分子標的治療法の確立を目指す。</p>		
研究の 背景	<p>研究者らはこれまでCMLにおけるBcr-Abl TKIによるアポトーシス誘導における責任分子Bimの同定(PNAS 2006, <i>Cell Death Differ</i> 2007)やオートファジーの意義(<i>Cell Death Differ</i> 2008),TKI治療における骨髄腫瘍環境の低酸素状態がもたらす意義(<i>Cell Death Differ</i> 2010)、骨芽細胞の役割 (<i>Leuk Res</i> 2010) などについて研究を重ねてきた。これらの研究成果を礎に、完治を目指す分子標的治療の確立に向けて、更に骨髄腫瘍環境がCML細胞に及ぼす分子制御と病態形成、治療抵抗性との関連を明らかにすることの重要性が示唆されるにいたった。</p>		

<p>研究手法</p>	<p>本研究は下記の①-④について段階的に研究を進める。</p> <p>① <i>In vitro</i> 骨髓環境モデルでの造血器腫瘍細胞における骨髓微小環境誘導性特異的分子制御の網羅的検討と、薬剤耐性獲得をもたらす分子制御メカニズムの候補の同定</p> <p><i>In vitro</i> 疑似骨髓モデル、すなわち骨髓間質細胞 (bone marrow stromal cell; BMSC) や細胞外マトリクス(extracellular matrix: ECM) 存在下での CML 細胞における遺伝子発現プロファイル、分子制御を網羅的に検討する。既にわれわれは予備的検討において、<i>in vitro</i> での通常培養液による細胞培養条件と比較して、BMSC との共培養した場合や、ECM であるフィブロネクチンに接着させた条件下において、白血病細胞での遺伝子発現プロファイルを通常の培養液のみでの培養条件での同一細胞のそれと比較したところ、ECM との接着、BMSC との共培養において2倍以上の発現上昇を認めた遺伝子をそれぞれ 890、902 個ずつ認め、両条件において重複、かつより増幅する遺伝子を 284 個認めた。一方、0.5 倍以下に発現低下を認めた遺伝子は前者において 550 個、後者において 563 個認め、両条件において重複、かつさらに低下する遺伝子を 215 個認めた。ECM、ならびに BMSC は骨髓微小環境の構成において共存、かつ、不可欠な因子であることから、上記の両培養条件において共通して発現変化を認め、かつ相加・相乗的な発現上昇・低下といった支配を受ける遺伝子群 (すなわち前者として 284 遺伝子、後者として 215 遺伝子) を抽出し、それぞれの相関関係を細胞内シグナルパスウェイ検索で解析したところ、複数のシグナル経路の関与が明らかになっている (図)。</p>  <p>② ①で抽出された標的候補分子の機能と薬剤耐性獲得における意義の検討</p> <p>標的候補分子の遺伝子導入、RNA 干渉、阻害剤などによる検討を行い、その薬剤耐性、ならびに腫瘍環境による制御の意義を細胞死アッセイなどにより検討する。</p> <p>③ ②で同定された標的分子の <i>in vivo</i> での造血器腫瘍細胞における機能的意義の検討</p> <p>マウス疾患モデルの検討により標的候補分子の <i>in vivo</i> 機能について明らかにする。具体的には標的遺伝子の導入細胞、あるいはノックダウン細胞の免疫不全マウスへの移植生着効率、ならびにマウス疾患モデルでの薬剤感受性について検討する。</p>
-------------	---

	<p>④ 患者検体の検討による本研究で同定された標的分子の治療における臨床的意義の検討</p> <p>臨床検体における本研究の標的分子の発現を検討し、臨床経過との対比を行うことで臨床的意義を明らかにする。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>上記研究方法に示した①—③が完了した。本研究によりCML細胞において腫瘍環境結誘導性にGalectin-3の発現が誘導され、細胞増殖、多剤抵抗性、骨髄での棲息、造血成長因子への細胞遊走など多彩な細胞機能を促進する中心分子として機能することが明らかになった。現在、④について研究をさらに継続中である。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>現段階では直接的な地域への研究成果の還元には至っていない。本研究では、Galectin-3の治療分子標的としての意義を明らかにすることが期待できるので、将来的に新たな治療法開発をもたらすべく広く社会に還元できるよう、さらに研究を継続中である。</p>
今後の期待	<p>CMLのTKI治療におけるGalectin-3の生物学的マーカーとしての有用性、ならびに治療抵抗性克服のための新規治療標的分子としての意義の確立が期待される。</p>
研究発表	<p>2011年3月現在、論文投稿中である。</p> <p>また、以下のごとく学会発表、研究会発表をすでに行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yamamoto M, Kuroda J, Nagoshi H, Kobayashi T, Sasaki N, Shimura Y, Horiike S, Taniwaki M. Galectin-3 in leukemia microenvironment-mediated drug resistance in MYL cells, a leukemic cell line. 第72回日本血液学会学術集会. 2010年9月24-26日(横浜) 2. 黒田純也. Towards the cure of CML. 第6回福井血液疾患カンファレンス. 平成22年10月18日(福井)(2010)

様式

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所属)	(職名・学年)	(氏名)															
研究者	化学教室	講師(学内)	服部 恭尚															
研究の名称	アルツハイマー病治療薬創製を目指したBACE阻害剤の開発																	
研究のキーワード	BACE、アミロイドβペプチド、基質特異性、非天然型アミノ酸																	
研究の概要	<p>アルツハイマー病治療薬創製を目的として、アミロイドβペプチド(Aβ)産生を抑制できるβ-セクレターゼ (Beta-site Amiloid precursor protein Cleaving Enzyme: BACE) 阻害剤の開発を行った。</p> <p>BACE本来の基質認識配列 (Swedish mutant) に非天然型側鎖構造を導入した各種基質ペプチドアナログの切断効率を比較検討した結果、下図の通り、最もBACEに認識されやすい基質側鎖構造を見出した。活性評価にはrecombinant BACE (rBACE) を用いた。</p> <table border="1"> <caption>Graph Data: Substrate (%) vs Time (h)</caption> <thead> <tr> <th>Time (h)</th> <th>Swedish mutant (%)</th> <th>rBACE1 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>~95</td> <td>~45</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>~90</td> <td>~15</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>~85</td> <td>~10</td> </tr> </tbody> </table>			Time (h)	Swedish mutant (%)	rBACE1 (%)	0	100	100	1	~95	~45	3	~90	~15	6	~85	~10
Time (h)	Swedish mutant (%)	rBACE1 (%)																
0	100	100																
1	~95	~45																
3	~90	~15																
6	~85	~10																
研究の背景	<p>高齢化社会を迎えアルツハイマー病患者は世界中でますます増加しており、国内においても現在160万人をこえる患者がいるとされる。しかしながら、未だに有効な治療薬は開発されておらず、さまざまなアプローチによる治療薬開発が試みられている。</p> <p>アルツハイマー病は、アミロイド前駆体蛋白質 (Amiloid Precursor Protein: APP) からBACEとγ-セクレターゼの作用で生成するAβが脳内に蓄積することが原因とされる。従って、Aβ産生を抑制できるBACE阻害剤はきわめて有望なアルツハイマー病治療薬候補の一つである。</p>																	

研究手法	<p>若年性アルツハイマー病患者は、BACEによる切断を受けやすい家族性変異APPを持つ。この変異型APP基質構造をもとにP₁₋₄サイトおよびP_{1'}サイトの側鎖構造を変換し、BACEに対して高い親和性を示す基質アナログ配列を探索する。特に疎水性相互作用あるいは水素結合を形成しやすい非天然型側鎖構造を中心に探索を行い、最適構造を特定する。合成基質アナログの評価には、多検体を短時間・高効率で検定できるLC-MS/MS法を活用する。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>変異型APP基質構造(Ile-Ser-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-NH₂)について、P₁₋₄サイトおよびP_{1'}サイト(斜字体部分)の側鎖構造を変換した。種々の天然型および非天然型アミノ酸を導入することで側鎖構造を変換し、活性試験を行った結果、(Ile-Ser-Glu-Ile-Thi-Thi-Nva-Ala-Glu-Phe-Arg-His-NH₂)という最適構造を見出した。この成果は論文にまとめ、<i>Bioorganic Medicinal Chemistry</i>誌に投稿し、受理されたところである。また、1件の国際学会を含む、2件の学会発表も行った。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>本研究は未だ道半ばであり、地域に対して研究成果を還元するまでには至っていない。しかしながら、本研究が完成した際にはアルツハイマー病治療薬開発への道が開ける。</p> <p>アルツハイマー病の治療薬が完成すれば、本学で可能な早期診断との相乗効果により、効果的な早期発見・早期治療を提供可能となる。従って、本研究をさらに進展させることでアルツハイマー病の治療薬につながり、地域社会へ大きく寄与できるものとする必要がある。</p>
今後の期待	<p>現在、アルツハイマー病の診断とその進行を遅らせる対応は可能であるが治療薬はない。本学では早期診断が可能な体制が整備されており、治療薬の開発が喫緊の課題となっている。本研究で行おうとしている阻害剤候補化合物とBACEとの共結晶作成・構造解析は、アルツハイマー病治療薬開発の極めて重要なステップで、臨床応用をめざす各分野の研究者の共有基盤となることが期待される。</p>
研究発表	<p><発表論文></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kakizawa, T.; Sanjoh, A.; Kobayashi, A.; Hattori, Y.; Teruya, K.; Akaji, K. Evaluation of superior BACE1 cleavage sequences containing unnatural amino acids, <i>Bioorg. Med. Chem.</i> in press. <p><学会発表></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kakizawa, T.; Hattori, Y.; Teruya, K.; Sanjoh, A.; Akaji, K. 5th International Peptide Symposium, Abstract Paper, P1-101, Kyoto, Japan, December, 2010. 2. 柿澤多恵子、服部恭尚、照屋健太、三城明、赤路健一、第29回メディシナルケミストリーシンポジウム、講演要旨集2P-69、2010年11月、京都

様式

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	生体構造科学	准教授	松田 賢一
研究の 名称	ストレス関連障害のエピジェネティック制御についての検証		
研究のキ ーワード	ストレス関連障害、エピジェネティクス		
研究の 概要	<p>近年、ストレス関連障害が社会的にも認知されるようになってきており、その病態の理解と、より効果的な治療法の開発の必要性が増している。本研究では、エピジェネティック変化により長期にわたり特定遺伝子の発現が変化し、その結果として脳機能が阻害されることが、ストレス関連障害の病態の本体であるとの仮説を立て、その検証を行う。ストレス関連障害のラットモデルにおけるエピジェネティック変化を継時的に解析し、ストレス関連障害の分子基盤を明らかにすることを目的とし、ストレス応答に関わる脳部位における遺伝子プロモーターのエピジェネティック変化を解析、遺伝子発現変化との相関を調べる。ストレス関連障害のラットモデルを用いて、エピジェネティック変化に関わる修飾酵素を選択的阻害薬投与により阻害した場合、ストレス障害を予防あるいは軽減できるかを、行動学的手法を用いて検証する。</p>		
研究の 背景	<p>ストレス関連障害とは、臨床的に診断される適応障害、急性ストレス障害および心的外傷後ストレス障害(PTSD)がこれに含まれる。また、うつ病もストレス曝露が発症の原因となる頻度が高い障害で、広義のストレス関連障害といえる。近年、ストレス関連障害が社会的にも認知されるようになってきており、その病態の理解と、より効果的な治療法の開発の必要性が増しているが、それぞれの障害において、脳内で具体的にどのような変異がおきているのかについては、詳細が明らかになっていない。最近、ヒストンアセチルやDNAのメチル化といったエピジェネティック制御を介した遺伝子発現の制御が脳機能に深く関与していることが、次々に示されている。本研究では、エピジェネティック変化により長期にわたり特定遺伝子の発現が変化し、その結果として脳機能が阻害されることが、ストレス関連障害の病態の本体であるとの仮説を立てた。</p>		

研究手法	<p>【分子レベル】ストレス曝露後のラットから、ストレス応答に関わる脳領域を継時的に回収し、ストレス応答遺伝子について、①リアルタイム PCR 法により、mRNA の発現量の変化を解析、②クロマチン免疫沈降法により、プロモーターのアセチル化・メチル化の程度の変化を解析、③ bisulfite-sequencing 法により、プロモーターのメチル化状態の変化を解析する。</p> <p>【個体レベル】ストレス曝露前後のラットにヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(TSA)、DNA メチル化酵素阻害薬(Aza)あるいは修飾酵素のアンチセンス DNA を腹腔内・脳室内投与し、ストレス応答の行動学的解析、ACTHおよびコルチコステロンの血清中濃度測定による内分泌学的解析を行う。</p> <p>(以上の研究は、本学実験動物委員会による承認を得て行った。)</p>
研究の進捗状況と成果	<p>心的外傷後ストレス障害(PTSD)のラットモデルを用いて、脳のストレス応答に関与する領域におけるエピジェネティック制御に関わる分子の発現・分布変化を継時的に解析した。さらに、精神機能病態学部門との共同研究により、同モデルにおいて、ストレス応答遺伝子(BDNF、CRH、バソプレッシン、オキシトシン)の発現・分布に変化が生じることを明らかにし、この変化がエピジェネティック機構を介している可能性を示唆した。また、ストレス関連障害同様に社会的に注目されている脳の性差についても、エピジェネティック機構の関与の可能性について研究を展開した。この研究についても一定の結果を得、ストレス関連障害の研究を遂行するうえで、正の効果を与えた。以上の成果を、学術論文誌および国際・国内学会において公表した。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>研究者は、研究成果を研究室のインターネットホームページにおいて、随時公表してきた。</p> <p>研究者は、2011年2月8日に本学において第1回日本行動神経内分泌研究会関西支部会を主催した。関西在住の当該研究領域の研究者に加え、本学の神経科学研究に携わる研究者からも演題を募り、研究者間の交流をはかり、将来の研究成果の地域への還元を見据え、行動神経内分泌研究会の周知を行った。</p>
今後の期待	<p>ストレス関連障害の病態解明は、基礎脳科学見地からだけでなく、臨床的・社会的見地からも極めて重要である。本研究は、ストレス関連障害の包括的かつ本質的理解につながり、本大学研究者のみならず、精神医学、神経科学領域研究者に多大な影響を与えると考える。当該研究が継続され、エピジェネティック変化に関わる修飾酵素の阻害薬がストレス障害を予防・軽減できたならば、全く新しいカテゴリーの治療薬としての可能性について、重大な基礎的情報を提供すると思われる。本研究は、精神機能病態学部門の研究者と連携し、ひとへの応用を見据えた研究を展開していくための礎となったと考える。</p>

研究発表	<p>【総説】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・松田賢一、河田光博. 脳の性分化とエピジェネティック機構. <i>京都府立医科大学雑誌</i>. 119:779-787 (2010) <p>【原著】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Mori H., Matsuda K. I., Tsukahara S., Kawata M. Intrauterine position affects estrogen receptor α expression in the ventromedial nucleus of the hypothalamus via promoter DNA methylation. <i>Endocrinology</i> 151:5775-5781 (2010) <p>【国際学会】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Matsuda K. I., Mori H., Nugent B. M., McCarthy M. M., Kawata M. Histone deacetylase activity is involved in the masculinization of the developing rodent brain. <i>The 7th International Congress of Neuroendocrinology</i>. July 11, 2010, Rouen, France. <p>【国内学会】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・松田賢一、森浩子、B. M. Nugent、M. M. McCarthy、河田光博. 脳の雄性化におけるヒストン脱アセチル化酵素の影響. 第33回日本神経科学会. 2010年9月2日. 神戸 ・橋本隆、松田賢一、河田光博. PTSDモデルラットの脳内におけるストレス関連因子の発現変化. 第33回日本神経科学会. 2010年9月2日. 神戸 ・松田賢一. エピジェネティック機構を介した脳の性分化制御. 第13回日本行動神経内分泌研究会. 2010年9月14日. 古河 ・松田賢一、森浩子、B. M. Nugent、M. M. McCarthy、D. W. Pfaff、河田光博. 脳の雄性化における新生期ヒストン脱アセチル化の関与. 第37回日本神経内分泌学会. 2011年10月22日. 京都 ・松田賢一、森浩子、河田光博. 脳の性分化におけるヒストンアセチル化とDNAメチル化の相互作用の可能性について. 第1回日本行動神経内分泌研究会関西支部会. 2011年2月8日. 京都 ・吉井崇喜. PTSD モデルストレスによる下垂体後葉系への影響. 第1回日本行動神経内分泌研究会関西支部会. 2011年2月8日. 京都 ・松田賢一、森浩子、B. M. Nugent、M. M. McCarthy、河田光博. 雄性性行動を制御するエストロゲン受容体 α 発現ニューロンの発達におけるヒストン脱アセチル化酵素の関与. 第116回日本解剖学会. 2011年3月30日. 横浜 ・橋本隆、松田賢一、河田光博. PTSDモデルラットの脳内における関連因子の発現変化. 第116回日本解剖学会. 2011年3月29日. 横浜 ・森浩子、松田賢一、塚原伸司、河田光博. 子宮内環境がラット視床下部VMH領域におけるエストロゲン受容体の分布に及ぼす影響について. 第116回日本解剖学会. 2011年3月30日. 横浜
------	--

様式

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	分子生化学	助教	横田 明日美
研究の名称	AML1/Runx1の翻訳後修飾による機能制御メカニズム		
研究のキーワード	AML1、造血、リン酸化		
研究の概要	<p>胎生期における造血幹細胞の正常な発生、成体内での血球分化、また白血病発症にも関わる重要な転写因子であるAML1/Runx1は、最近、リン酸化やアセチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることが明らかにされてきた。これらはRunx1の転写活性調節において重要な役割を果たしているとの報告があり、注目されているものの、実際どのようにRunx1の機能に関与しているのか、またどういった分子がRunx1の翻訳後修飾に関わっているのかなど、詳細については未だ不明な点が多い。本研究において、我々は特にリン酸化修飾に焦点をおき、<u>Runx1の機能にRunx1分子のリン酸化がどのような影響を与え得るかについて、細胞レベル、分子レベルで検討すると共に、遺伝子改変マウスの作製・その表現型解析を通して個体レベルでも検討を行い、包括的視点からRunx1による造血制御の新規分子メカニズム解明を目指すことをその目的としている。</u></p> <div style="text-align: center;"> <pre> graph TD A[サイトカインなど 細胞外微小環境からのシグナル] --> B[キナーゼ活性化] B --> C[Runx1リン酸化修飾] C --> D[In vitro 細胞レベル] C --> E[In vivo マウス個体レベル] D --- D_list["転写活性化能 DNA結合能 共役因子との親和性 タンパク安定性 細胞内局在 血球系細胞への分化"] E --- E_list["胎生期の造血発生 成体での造血制御"] E --- E_goal["Runx1のリン酸化を促進、抑制するシグナルの解明、 リン酸化によるRunx1制御の分子メカニズム、 生体内の造血制御における役割の解明を目指す"] </pre> </div>		
研究の背景	<p>Runx1は、急性骨髄性白血病で高頻度に見られるt(8;21)染色体相互転座の転座切断点の分子クローニングを通じて同定された転写因子でありGM-CSF受容体、M-CSF受容体など造血に関わる重要な標的遺伝子群の転写調節に関与する。また、Runx1のこの作用がAorta, Gonads, Mesonephros</p>		

	<p>(AGM) 領域から造血幹細胞が生み出される段階で機能していることや、成体における血小板造血や胸腺T細胞の増殖制御においてもRunx1が重要な役割を果たしていることなども示されている。これらRunx1の機能がどのような細胞内外のシグナルによって制御されているのか、その機構を解明することが次の大きな課題となっている。</p> <p>一方、Runx1分子はリン酸化、アセチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることが分かっており、これらによりRunx1の細胞内局在、分解、転写活性化能、DNA結合能などが調節されるものと考えられている。従って、翻訳後修飾によるRunx1の機能制御は、正常造血や白血病等の疾患に関連する細胞内外からのシグナルの効果点となっている可能性が示唆されるが、その詳細については多くの不明な点が残されている。</p>
研究手法	<p>マウスRunx1分子内のリン酸化を受けるセリンもしくはスレオニン残基をアラニン（脱リン酸化状態を模倣する）またはアスパラギン酸（リン酸化状態を模倣する）に置換するようRunx1変異体を作製する。野生型Runx1またはこれら変異体を発現させた細胞株において、Runx1の転写活性能やDNA結合能、細胞増殖、細胞周期への影響について、レポーターアッセイや細胞周期解析やウェスタンブロッティング法によって解析する。並行して、Runx1欠損マウスES細胞に変異型Runx1を導入し、Runx1欠損ES細胞の<i>in vitro</i>での血球系細胞への分化障害を解除し得るかについて、造血サイトカイン添加条件下にて分化誘導培養を行い評価する。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>マウスRunx1分子内のリン酸化標的となるセリン、スレオニン残基9箇所について、全て、または1箇所ずつをアラニン、またはアスパラギン酸に置換した変異体を作製した。これらについて、転写活性化能を検討したところ、9箇所全てをアラニンに置換した変異体（9A）は野生型（WT）と比較してM-CSFRプロモーター転写活性化能は2～3倍程度高くなっており、逆にアスパラギン酸に置換した変異体（9D）はWTの半分程度に低下していた。また、1箇所ずつをアラニンまたはアスパラギン酸に置換した変異体についても同様に検討を行ったが、9Aと9Dの転写活性化能の変化はこれら9箇所による変化の相加的現象であると考えられた。</p> <p>WT、9A、9Dの蛋白レベルの解析より、変異体の転写活性化能の変化はRunx1蛋白の安定性の変化による可能性も考えられたことから、それぞれの蛋白半減期を³⁵S-Methionine標識により詳細に検討するため準備中である。また、リン酸化状態による細胞内局在の変化によって転写活性化能が変化していることも考えられるため、WT、9A、9Dを発現させた細胞の蛍光免疫染色を行い、観察する予定である。</p> <p>9A、9Dの2つの変異体は、Runx1欠損マウスES細胞への導入を行っているところであり、造血サイトカイン添加条件下における<i>in vitro</i>での血球系統への分化誘導、ならびにマウス個体作製に進む予定である。</p>

地域への研究成果の還元状況	現時点では社会に還元できる段階には至っていないが、造血制御の詳細なメカニズムについて明らかにし、その破綻による造血器疾患についてより深い理解と共に治療法の開発に発展できるよう、今後研究成果を学会発表等を通して社会に発信し、還元することを目指している。
今後の期待	Runx1のリン酸化状態によって、造血に関与するプロモーターの転写活性化能が有意に変化することから、Runx1変異体を導入したマウスES細胞の血球系統分化誘導、またこのES細胞より作製するマウス個体の造血発生や造血制御に関する解析においても、基礎のみならず臨床医学の発展にも寄与する貴重な知見を得られることが期待される。
研究発表	研究の背景については、「横田明日美、他. 造血発生制御メカニズムの今日的理解. 京都府立医科大学雑誌、119(10); 681-693, 2010.」に記載した。

様式

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	血液・腫瘍内科学	大学院生 4年	古林 勉
研究の 名称	ガレクチン9による多発性骨髄腫に対する新規治療法の開発		
研究のキ ーワード	ガレクチン9、多発性骨髄腫、アポトーシス		
研究の 概要	<p>難治性血液腫瘍である多発性骨髄腫に対するガレクチン9の抗腫瘍効果について検討した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ガレクチン9の骨髄腫細胞に対する増殖抑制効果の検討 ・ガレクチン9の抗骨髄腫効果の発現メカニズムの検討 ・ガレクチン9の骨髄腫に対する新規治療薬としての可能性についての検討。 		
研究の 背景	<p>多発性骨髄腫は、形質細胞を起源とする造血器腫瘍であり、従来の化学療法あるいは自家末梢血幹細胞移植を併用した大量化学療法による平均生存期間は3-5年と予後不良であった。近年、プロテアソーム阻害剤や免疫修飾薬などの新規薬剤によりその治療成績は改善傾向にあるが、今なお治癒困難な難治性疾患であり新規治療法の開発は喫緊の課題である。</p> <p>ガレクチンはβガラクトシドに結合特異性をもつ動物レクチンの一種であり、発生、分化誘導、アポトーシス、炎症、シグナル伝達制御などに関与する多彩な機能を有することが知られている。ガレクチン9は免疫抑制効果やアレルギー反応調節に関わることが知られていたが、近年その抗腫瘍効果が明らかになりつつある。</p> <p>そこで我々は難治性疾患である多発性骨髄腫に対するガレクチン9の効果について検討した。</p>		

研究手法	<p>1. In vitroにおける骨髄腫細胞株に対するガレクチン9の増殖抑制効果の検討</p> <p>2. ガレクチン9の抗骨髄腫効果発現メカニズムの検討</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ガレクチン9の細胞膜結合と効果の相関 ・Gene Expression Profileによるの遺伝子発現制御の検討 <p>3. ガレクチン9による新規治療法開発の可能性に関する検討</p> <ul style="list-style-type: none"> ・患者由来骨髄腫細胞に対するガレクチン9の効果の検討 ・In vivoにおけるガレクチン9の抗骨髄腫効果の検討
研究の進捗状況と成果	<p>ガレクチン9は骨髄腫細胞に対して増殖抑制効果を示し、その効果はJNKおよびp38 MAPKを介したアポトーシスの誘導であることを突き止めた。また患者由来骨髄腫細胞に対して効果を示し、in vivoにおいても抗骨髄腫効果を有することがわかった。</p> <p>以上の結果は第51回米国血液学会において口頭発表演題に採択され、また学術誌「LEUKEMIA」にも掲載された。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>本研究成果をきっかけに難治性造血器腫瘍の新たな治療法開発がなされ、将来的に地域に還元されることを期待する。</p>
今後の期待	<p>本研究の結果より、ガレクチン9の多発性骨髄腫に対する新規治療法としての開発が期待される。またガレクチン9の細胞表面の標的分子の解析により、さらなる分子標的の同定が期待される。</p>
研究発表	<p>Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Terui Y, Oomizu S, Yamamoto M, Taniyama A, Matsumoto Y, Horiike S, Hatake K, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki M. Anti-myeloma activity of modified galectin-9 through JNK and p38 MAPK pathways. 51st ASH Annual Meeting. Dec. 8, 2009; New Orleans</p> <p>Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Oomizu S, Terui Y, Taniyama A, Adachi S, Takagi T, Yamamoto M, Sasaki N, Horiike S, Hatake K, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki M. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. <i>Leukemia</i> 2010; 24: 843-850.</p>

様式

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	循環器内科学	大学院4年生	星野 温
研究の名称	p53を介したミトコンドリアQuality Controlによる心不全治療研究		
研究のキーワード	ミトコンドリア、品質管理、ミトファジー、心不全		
研究の概要	<p>心筋梗塞後の心不全予防に対し、心筋細胞の抗アポトーシス治療の有効性が報告されている。ミトコンドリアはエネルギーを産生するとともに細胞死をコントロールする細胞内小器官である。このミトコンドリアの品質管理が心筋細胞死抑制とどのように関連しているかを検討した。p53は癌抑制因子として知られているが、心不全の病態にも大きく関与している。遺伝子改変動物を用いて解析したところ、p53KOマウスは心筋梗塞においてアポトーシスが減少しており、さらにそれが心筋梗塞後の心機能維持に関係していた。更にミトコンドリアの状態を詳しく検討したところ野生型マウスの虚血心では障害を受けたミトコンドリアの蓄積が見られたがp53KOマウスの虚血心では障害を受けたミトコンドリアの蓄積が有意に減少しており、さらにオートファゴゾームに取り込まれたミトコンドリア、すなわちミトファジーの像が有意に増加していた。このミトファジーを薬剤にて阻害したところp53KOマウスで認めたアポトーシス減少や心機能低下抑制効果は消失したため、p53はミトファジーを抑制しミトコンドリアの品質管理を傷害する事で心筋細胞のアポトーシスを誘導していると考えられた。</p>		
研究の背景	<p>心疾患は現在日本の死因の第二位であり、その大部分を占める虚血性心疾患の克服が大きな課題となっている。心筋梗塞に対しては現在までに再還流治療が確立され急性期の死亡は大きく減少したが、その後の心機能低下による心不全は増加の一途で急務の課題となっている。現在までに抗アポトーシス治療が心筋梗塞後の心不全抑制に有効であることが報告されている。またアポトーシス制御の上で大きな役割を果たすのがミトコンドリアという細胞内小器官であるが、このミトコンドリアの品質が高度に管理されるメカニズムが現在明らかになりつつある。われわれは遺伝子改変マウスとしてp53KOマウスを用いてミトコンドリアの品質管理が心筋梗塞後の心不全にどのようにかかわっているかを検討した。</p>		

研究手法	<p>遺伝子改変動物としてp53KOマウスを用いて、マウス心の前下行枝結札による心筋梗塞モデルを使用した。心筋梗塞作成後、経時的に心臓超音波検査にて心機能を評価した後に心臓を摘出し免疫染色、mRNA、蛋白の経時的な発現、高速液体クロマトグラフィーを用いた高エネルギーリン酸化合物測定を行った。またミトコンドリアの質的評価として電子顕微鏡によるミトコンドリアの構造評価、PCRを用いたミトコンドリアDNA障害の定量評価を行った。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>心筋梗塞においてp53がミトコンドリア品質管理システムを傷害する事で心筋細胞死とそれに引き続く心不全の進行を引き起こすことを明らかにした。またそのメカニズムとしてTIGAR(TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator)の発現亢進、ミトファジー調節因子であるBnip3の不活性化が関係していることを明らかにした。現在論文投稿中。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>国内および国際学会で研究内容を報告することにより、地域社会へ研究成果を還元できるように取り組んでいる。</p>
今後の期待	<p>ミトコンドリアの品質管理は虚血性心疾患にとどまらず、老化現象や癌、神経変性疾患、糖尿病等にも関係している。またp53も同様にこれらの病態への関連が報告されている。ミトコンドリア品質管理に対するアプローチがこれらの病態改善につながることを期待され現在研究を進めている。</p>
研究発表	<p>1) <u>星野温</u>、<u>的場聖明</u>、<u>金井恵理</u>、<u>松原弘明</u> 心筋虚血においてp53はミトファジーを抑制し心筋障害を増大する 第19回日本Cell Death学会学術集会 2010年8月名古屋</p> <p>2) <u>Hoshino A</u>, <u>Matoba S</u>, <u>Iwai-Kanai E</u>, <u>Matsubara H</u>. p53-mediated decrease in ROS signal reduces mitophagy via inactivation of Bnip3 to aggravate cardiac damage after ischemic injury. AHA scientific sessions 2010年11月 米国</p>

様式

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	循環器内科学	大学院4年生	星野 温
研究の名称	p53を介したミトコンドリアQuality Controlによる心不全治療研究		
研究のキーワード	ミトコンドリア、品質管理、ミトファジー、心不全		
研究の概要	<p>心筋梗塞後の心不全予防に対し、心筋細胞の抗アポトーシス治療の有効性が報告されている。ミトコンドリアはエネルギーを産生するとともに細胞死をコントロールする細胞内小器官である。このミトコンドリアの品質管理が心筋細胞死抑制とどのように関連しているかを検討した。p53は癌抑制因子として知られているが、心不全の病態にも大きく関与している。遺伝子改変動物を用いて解析したところ、p53KOマウスは心筋梗塞においてアポトーシスが減少しており、さらにそれが心筋梗塞後の心機能維持に関係していた。更にミトコンドリアの状態を詳しく検討したところ野生型マウスの虚血心では障害を受けたミトコンドリアの蓄積が見られたがp53KOマウスの虚血心では障害を受けたミトコンドリアの蓄積が有意に減少しており、さらにオートファゴゾームに取り込まれたミトコンドリア、すなわちミトファジーの像が有意に増加していた。このミトファジーを薬剤にて阻害したところp53KOマウスで認めたアポトーシス減少や心機能低下抑制効果は消失したため、p53はミトファジーを抑制しミトコンドリアの品質管理を傷害する事で心筋細胞のアポトーシスを誘導していると考えられた。</p>		
研究の背景	<p>心疾患は現在日本の死因の第二位であり、その大部分を占める虚血性心疾患の克服が大きな課題となっている。心筋梗塞に対しては現在までに再還流治療が確立され急性期の死亡は大きく減少したが、その後の心機能低下による心不全は増加の一途で急務の課題となっている。現在までに抗アポトーシス治療が心筋梗塞後の心不全抑制に有効であることが報告されている。またアポトーシス制御の上で大きな役割を果たすのがミトコンドリアという細胞内小器官であるが、このミトコンドリアの品質が高度に管理されるメカニズムが現在明らかになりつつある。われわれは遺伝子改変マウスとしてp53KOマウスを用いてミトコンドリアの品質管理が心筋梗塞後の心不全にどのようにかかわっているかを検討した。</p>		

研究手法	<p>遺伝子改変動物としてp53KOマウスを用いて、マウス心の前下行枝結札による心筋梗塞モデルを使用した。心筋梗塞作成後、経時的に心臓超音波検査にて心機能を評価した後に心臓を摘出し免疫染色、mRNA、蛋白の経時的な発現、高速液体クロマトグラフィーを用いた高エネルギーリン酸化合物測定を行った。またミトコンドリアの質的評価として電子顕微鏡によるミトコンドリアの構造評価、PCRを用いたミトコンドリアDNA障害の定量評価を行った。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>心筋梗塞においてp53がミトコンドリア品質管理システムを傷害する事で心筋細胞死とそれに引き続く心不全の進行を引き起こすことを明らかにした。またそのメカニズムとしてTIGAR(TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator)の発現亢進、ミトファジー調節因子であるBnip3の不活性化が関係していることを明らかにした。現在論文投稿中。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>国内および国際学会で研究内容を報告することにより、地域社会へ研究成果を還元できるように取り組んでいる。</p>
今後の期待	<p>ミトコンドリアの品質管理は虚血性心疾患にとどまらず、老化現象や癌、神経変性疾患、糖尿病等にも関係している。またp53も同様にこれらの病態への関連が報告されている。ミトコンドリア品質管理に対するアプローチがこれらの病態改善につながることを期待され現在研究を進めている。</p>
研究発表	<p>1) <u>星野温</u>、<u>的場聖明</u>、<u>金井恵理</u>、<u>松原弘明</u> 心筋虚血においてp53はミトファジーを抑制し心筋障害を増大する 第19回日本Cell Death学会学術集会 2010年8月名古屋</p> <p>2) <u>Hoshino A</u>, <u>Matoba S</u>, <u>Iwai-Kanai E</u>, <u>Matsubara H</u>. p53-mediated decrease in ROS signal reduces mitophagy via inactivation of Bnip3 to aggravate cardiac damage after ischemic injury. AHA scientific sessions 2010年11月 米国</p>