

ゲノム機能制御学部門
Department of Molecular Genetics

ゲノム病態学分野

Division of Molecular and Clinical Genetics

教授：谷 憲三郎

Professor : Kenzaburo Tani, M.D., Ph.D.

当分野では、血液・腫瘍性疾患患者を対象に臨床ならびに基礎研究を行っている。具体的には、新規治療法開発を目的に、A. 悪性腫瘍に対する遺伝子・免疫細胞治療の基礎および臨床研究、B. 再生医療等開発研究を行っている。これらの基礎ならびに臨床研究を積極的に進めることで、特に腫瘍性疾患に対するより効果的かつ安全な治療法を開発できるものと考えている。なお、われわれの研究内容を含めた九州大学で開発された新規医療技術を難病で苦しんでいる患者さんへ円滑かつ早期に還元していくためには、九州大学病院内での新システムの構築が極めて重要である。九州大学病院が平成 20 年 12 月に全国 TR（トランスレーショナルリサーチ）拠点の 1 つに認定されて以来、当研究分野の臨床部門である先端分子・細胞治療科は九州大学病院高度先進医療センターならびに各診療部門の協力を得ながら、九州大学病院内での TR 機構構築に邁進するとともに、悪性腫瘍に対する新規治療法の開発研究を実施している。

A. 悪性腫瘍に対する遺伝子・免疫細胞治療の基礎および臨床研究

癌に対する治療は手術療法，化学療法，放射線療法が主だが治療抵抗例や再発例に対しては有効な治療法はなく，症状緩和療法主体の対症療法に留まっているのが現状である。従って新しい治療法を開発することが強く望まれ，第 4 の治療法としての免疫療法の可能性をいくつかの方法を用いて検討している。

a. 進行・再発固形腫瘍（消化器がん・肺がん・子宮頸がん）に対するシクロホスファミド併用新規腫瘍関連抗原由来エピトープペプチドカクテルを用いた腫瘍特異的強化ワクチン療法第 I 相臨床試験 (Yamada, K., Hijikata Y, Murahashi, M., Tani, K. *et al.*)

本臨床試験では他に有効な標準治療法のない消化器癌，肺癌患者で HLA-A*2402 を有する患者を対象とし，CY 投与後，HLA-A*2402 拘束性で腫瘍抗原由来エピトープペプチド DEPDC1, KOC1, MPHOSPH1, TTK, CO16(URLC10)5 種を 1 回/週、計 4 回の皮下接種を 1 コースとして施行した。さらに適応基準を満たす患者には IL-2 の投与を行い，本治療法の安全性を検証する第 I 相臨床試験である。6 患者コホートの シクロホスファミド 3 段階用量漸増試験とし，副次目的として，投与された患者の細胞性免疫および液性免疫反応誘導の可否および臨床効果についても検討した。これまでに適応患者 18 例への投与が完了し，現段階ではその安全性に問題は認められず、抗腫瘍免疫誘導の所見を認めている。本臨床試験は終了し結果は投稿中であるが、投与された患者中

1名は放射線療法との併用により寛解に入ったため、長期に同療法を継続している。さらに、現在、各患者組織検体における上記各腫瘍抗原の発現検索などを病理部との共同研究で行っている。

b. RNF43 ペプチドパルス樹状細胞ならび RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第一相臨床試験 (Hijikata, Y., Tanaka Y., Tani, K. *et al.*)

本臨床試験は、他に有効な治療法のない進行固形腫瘍患者を対象に、23040 個の遺伝子情報から DNA マイクロアレイ法により tumor-associate antigen(TAA)として同定された新規腫瘍抗原のひとつである Ring finger protein 43(RNF43)を用いた強化養子免疫療法の臨床試験を開始した。

本試験は他に有効な治療法のない進行固形腫瘍患者で、HLA-A*2402 または HLA-A*0201 を有し、かつ腫瘍に RNF43 が高発現している患者を対象とする。対象患者からアフレーシスにより末梢血単核球を分離し末梢血単核球由来樹状細胞(DC)を作成する。RNF43 ペプチドをパルスした DC と患者末梢血リンパ球と共培養することにより RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を誘導する。免疫寛容関連因子の排除を目的とした少量シクロホスファミド投与後、この活性化リンパ球および RNF43 ペプチドパルス DC の併用投与を行なう腫瘍特異的強化養子免疫療法の安全性および抗腫瘍免疫誘導効果を検討する第 I 相臨床試験である。RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球数の 2 群(各群 5 例、合計 10 例)に分けた容量漸増試験として計画した。Good Manufacturing Practice(GMP)に準拠した Cell Processing Center 施設で厳重な品質管理の下、細胞調製を行い、レベル 1、レベル 2 を完遂した。現在、本療法の安全性評価および免疫反応誘導、対象患者の生存期間、抗腫瘍効果を含む臨床評価を行っている。

c. 既治療不応進行胆道癌患者を対象としたカクテルペプチド癌ワクチン OCV-C01 療法第 II 相医師主導治験 (Tsuruta, T., Yamada, K., Tani, K., *et al.*)

悪性腫瘍(がん)は日本人の死亡原因の第 1 位を占めている(2011 年にはがんによる死亡数は 357,305 人)が、胆道癌(肝外胆道癌、胆嚢癌、乳頭部癌)は男女合わせたがん死亡原因において、肺癌、胃癌、肝臓癌(肝内胆管癌を含む)、結腸癌、膵癌について第 6 位(2011 年には 18,186 人が胆道癌で死亡)となっている。臨床的には肝内外胆道癌、胆嚢癌、乳頭部癌の 4 種を胆道癌として取り扱われる。胆道癌の第一の治療法は外科的切除療法であるが、肝内外胆管癌では約 25%、胆嚢癌では約 30%、乳頭部癌では約 10%、が診断時に切除不能な進行癌であり、5 年相対生存率も 20~25%であることから予後不良/難治性のがんの一つである。近年、切除不能胆道癌や再発胆道癌に対する化学療法としてはゲムシタビンやシスプラチンを含む化学療法が用いられ、有効な結果が得られているが、同薬剤が無効な場合、二次的な治療法は定まっていない。本研究では VEGFR-1、2 および KIF20A を標的とした HLA-A*24:02 拘束性カクテル

ペプチドがんワクチン OCV-C01 を用いた第Ⅱ相医師主導治験を行い、既治療不応進行胆道癌に対する二次的な治療法となり得るかを確かめる。本治験は既治療不応進行胆道癌患者を対象として、OCV-C01 週一回皮下投与を病勢の悪化などの投与中止基準に達するまで最高 365 日間継続する。主要評価項目は全生存期間 (OS) であるが、副次的評価項目として同療法の有効性 (腫瘍縮小効果、奏効率、病勢コントロール率) と安全性 (有害事象発生割合、重篤な有害事象発生割合) を検討する。さらに、探索的研究として各ペプチド特異的 CTL の誘導を従来の ELISPOT 法にて検索する。さらに、各ペプチド特異的抗体 Dextramer を用いたリンパ球解析を用い、より詳細な CTL の誘導等の解析を予定している。被験者登録期間は平成 26 年 3 月～平成 27 年 12 月を予定しており、平成 25 年 12 月 18 日に治験届を行い、平成 26 年 4 月より被験者募集を開始した。

d. GM-CSF 遺伝子導入腫瘍ワクチン療法の抗腫瘍効果における形質細胞様樹状細胞の役割 (pDC) の解明 (Narusawa, M. , Inoue, H. , et al.)

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は、種々の固形癌を対象とした腫瘍免疫療法の臨床研究において、抗腫瘍免疫効果を誘導する有効な刺激性サイトカインとして用いられてきた。GM-CSF が樹状細胞 (DC) による T 細胞プライミングを促進することで抗腫瘍免疫効果を示すことは先行研究から示唆されるが、その分子学的メカニズムは不明な点が多い。本研究では T 細胞プライミング時における GM-CSF 感作 DC の重要因子の同定を目的とし、以下の実験を施行した。GM-CSF 遺伝子搭載非伝播型センドライウイルスベクター (SeV/GM) により GM-CSF を遺伝子導入したマウス肺癌 LLC 細胞 (LLC/SeV/GM) を C57/BL6 マウスの右側腹部に皮下接種し腫瘍形成を観察した際、LLC/SeV/GM 接種群 (GM 群) では対照群と比較し有意に腫瘍形成が抑制された。また、GM-CSF 感作 DC は共刺激因子である CD86, CD80 分子の発現が高く、この DC の T 細胞プライミング能の経時変化を、リンパ球混合培養反応試験を用いて比較解析した結果、GM 群における感作 DC の T 細胞刺激能は腫瘍接種から 2 日後 (day 2) で最大であった。以上の結果より、day 2 で GM-CSF 感作 DC による T 細胞プライミング能が最大となると考えられた。次に、T 細胞プライミングに関わる重要因子を同定するため、前述の所属リンパ節における GM-CSF 感作 DC を用いて DNA マイクロアレイによる網羅的比較解析を行った。この結果、GM 群において、対照群と比較し免疫応答関連分子 (ケモカイン、転写因子等)、細胞間相互作用、細胞運動に関わる各遺伝子群の有意な発現変動を認めた。その中でも I 型 IFN 関連のシグナル伝達経路に関する遺伝子群が特に上昇しており、抗ウイルス免疫応答の際に中心的役割を担っている I 型 IFN 産生形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC : pDC) の同抗腫瘍免疫応答における役割に注目し、gain of function 或いは loss of function 実験を行い、これらの遺伝子の抗腫瘍効果への影響を検討した。同 LLC/SeV/GM 腫瘍細胞による腫瘍形成試験において、pDC を欠失したマウスでは上記抗腫瘍効果の減弱及び二次的 LLC 細胞再接種時における記憶免疫応答の減弱を認めた (loss of function)。さらに、pDC に特異的に発現する TLR7

を刺激し活性化する目的で、LLC/SeV/GM 細胞接種時に TLR7 リガンド Imiquimod を共投与（皮下接種）した結果、LLC/SeV/GM 細胞拒絶の増強を認めた。また、同 LLC/SeV/GM 細胞を放射線照射し腫瘍ワクチンを作成し（ir.LLC/SeV/GM）、LLC 同系担癌マウスモデルにおける ir.LLC/SeV/GM 及び Imiquimod 併用投与による治療的ワクチン効果を検証した結果、ir.LLC/SeV/GM 単独投与マウス群と比較し Imiquimod 併用マウス群において有意に高い抗腫瘍効果及び安全性を認めた（gain of function）。各種免疫学的解析の結果、同併用マウス群の腫瘍所属リンパ節において抗腫瘍効果に重要と考えられている CD9 陽性 pDC 分画の増強を認め、抗腫瘍効果増強への関与が示唆された。さらに、T 細胞及び NK 細胞欠失実験により Imiquimod 併用ワクチン治療の抗腫瘍効果増強の減弱を認めた。以上の結果より、我々は GM-CSF 遺伝子導入自家腫瘍ワクチン治療において pDC が重要な役割を果たしており、Imiquimod 併用により pDC 活性化を介した自然及び適応免疫系の増強による抗腫瘍効果を高めることを明らかにした。

e. Coxsackievirus B3 を用いた固形癌に対する新規腫瘍溶解性ウイルス療法の開発 (Miyamoto, S., Sagara, M., Inoue, H., et al.)

肺癌は本邦の癌死亡原因の第一位であり、既存の標準治療である手術療法、薬物療法及び放射線療法に対して不応な症例に対する新規治療法の開発が望まれている。近年、ウイルス自身の腫瘍溶解性を利用した腫瘍溶解性ウイルス療法が注目され、様々な臨床試験が施行されている。

今回、我々は新規腫瘍溶解性ウイルス療法の開発を目的に、宿主ゲノムへの変異誘導による癌化リスクのない RNA ウイルスであるピコルナウイルス科エンテロウイルス属に着目した。1 次スクリーニングとして 28 種の各野生型ウイルス株を各種ヒト癌細胞株に *in vitro* で感染させ、3 種類の Coxsackievirus B (CVB) 群が肺癌に対して顕著な腫瘍溶解活性を呈することを明らかにした。次に 2 次スクリーニングの結果、この中で特に CVB3 が 9 種類中 8 種類の非小細胞肺癌細胞株を非常に低い感染力価 (MOI = 0.001) で殺傷することを見出した。一方で 2 種の正常肺線維芽細胞に対する細胞溶解性は極めて低かった (MOI = 1)。以上の CVB3 による殺癌細胞効果は CVB3 受容体 (CAR、DAF) の発現量と相関性を認め、CAR を siRNA により欠失させた癌細胞においてその抗腫瘍効果が大幅に減少した。また、各種阻害実験結果より、同ウイルスの肺癌細胞における細胞傷害性において、アポトーシス機構が亢進しカスパーゼ群が部分的に寄与していること、PI3K/Akt 及び MEK/ERK シグナル伝達経路が関与することを明らかにした。次にヒト肺癌 A549 細胞を用いた皮下担癌ヌードマウスモデルにおいて、CVB3 の腫瘍内投与により原発巣及び対側の遠隔転移モデル病巣（未治療側）に対しても有意な腫瘍退縮を認め、それぞれの治療系において生存率の有意な延長を認め、未治療腫瘍内での CVB3 の存在を確認することで同ウイルスの systemic oncolytic effect が証明された。本治療後経過観察中において CVB3 投与による致死的な副作用は観察されなかった。また、CVB3 腫瘍内投与後の腫瘍浸潤免疫細胞アッセイにて、CVB3 投与により著明な自然免疫細胞（NK 細胞，顆粒球 マクロファージ，活性化樹状細胞）の腫瘍内

浸潤を認めた。NK 細胞、顆粒球を欠失させたマウスモデルにおいて、その抗腫瘍効果が減弱したことから自然免疫細胞の活性化が同抗腫瘍効果に synergistic な効果を誘導することが証明された。さらに、CVB3 が非小細胞肺癌細胞感染後の腫瘍崩壊時に免疫刺激性物質として知られる Calreticulin (CRT) の細胞膜外暴露、核内 HGMB1 タンパクの細胞質移行及び ATP の細胞外放出を促進することを明らかにした。以上の *in vitro* 及び *in vivo* 実験結果より本研究において、CVB3 の非小細胞肺癌に対する特異的かつ免疫刺激性を有する腫瘍溶解性及び従来のコクサッキーウイルス (CVA21) と比較し高い安全性が証明された。さらに、標準治療抵抗性肺癌幹細胞である A549-SP (Side Population) 細胞分画や転移に関わる上皮間葉移行 (EMT) 癌細胞 (A549-EMT)、あるいはその他の固形癌として複数のヒト悪性中皮腫や標準治療抵抗性のトリプルネガティブ乳癌細胞株に優れた殺腫瘍細胞効果を有することを明らかにした。

f. 臓器特異的 microRNA 相補配列挿入遺伝子改変 CVB3 の作製及び安全性向上の検証 (Miyamoto, S., Inoue, H., et al.)

上記のように、CVB3 は複数の標準治療抵抗性癌を含む固形癌に有効であるが、マウス投与時にウイルス性心筋炎や膵炎を引き起こし、ヒトにおいてもウイルス性心筋炎あるいは膵炎を生じうる可能性が指摘されている。そこで、我々は CVB3 を用いた腫瘍溶解性ウイルス療法の実用性を高める目的で遺伝子改変を加えた CVB3 の開発を行った。具体的には CVB3 の正常膵臓及び筋肉組織への感染を回避するために、各組織に特異的に発現する micro RNA の相補配列 (miR-1T, miR-217T) を搭載した CVB3-miRT を作製した。その結果、野生型 CVB3 接種マウスでは膵炎、心筋炎を生じるのに対し、CVB3-miRT 接種マウスでは抗腫瘍効果は保持したまま、膵、肝機能の正常化、病理学組織検査上、心筋炎、膵炎の消失を認め、飛躍的な安全性の向上が確認できた。さらに、CVB3-miRT の密度勾配超遠心法による精製法も確立できた。今後これらの新規遺伝子改変 CVB3 を用いた臨床応用を最終目的とし小動物モデルを用いた基礎研究の実施を検討中である。

g. 癌幹細胞を標的とした特異的免疫遺伝子治療法の開発に向けた基礎的研究 (Sakamoto, C., Inoue, H., et al.)

癌幹細胞説では、腫瘍の形成と増殖は自己複製能と多分化能を持った少数の幹細胞様の癌細胞によるものと考えられている。それらの癌幹細胞はいくつかの表面マーカーの有無や Side Population (SP) と呼ばれる薬剤排出能を指標とした方法によって同定されている。現在の癌治療戦略において、抗癌剤抵抗性や高い腫瘍免疫寛容誘導能を有する癌幹細胞は重要な新規ターゲットとなる可能性が高い。また、近年、GM-CSF を中心としたサイトカインや腫瘍抗原遺伝子等を免疫担当細胞や腫瘍細胞に遺伝子導入後、ワクチンとして患者に投与することにより抗腫瘍効果を得ようとする *ex vivo* 免疫遺伝子治療が欧米を中心に試みられている。以上の背景より、我々は、癌幹細胞を標的とした特異的免疫療法の前臨床研究モデルを作成することを目指した。BALB/c マウス由来乳癌細胞株 4T1 から、癌幹細胞として SP 分画を分離し、SP 分画にセンダ

ウイルスベクター (SeV) を用いて顆粒球・マクロファージ刺激因子 (GM-CSF) 遺伝子を遺伝子導入した SP/GM 細胞を作製した。本研究によって得られた SP 分画は non-SP 分画と比較し、*in vitro* においてより多くのコロニーを形成し、免疫寛容に関する抑制性共刺激因子 B7-H1 (PD-L1:CD274) を高く発現することが示された。また、*in vivo* においても、高い腫瘍形成能を示した。これらの結果から、本研究で得られた SP が癌幹細胞様の性質を保持していることが確認された。また、センダイウイルスベクターを用いて GFP 或いは GM-CSF 遺伝子を SP へ遺伝子導入することができる事を確認した後、これらの細胞を野生型マウスの右側腹部へ皮下接種した。その結果、non-SP/GM 細胞と同様、SP/GM 細胞接種マウスが対照群 (SP 接種群及び SP/GFP 接種群) と比較し、有意にそれらの腫瘍形成を抑制した。その抗腫瘍免疫効果の誘導メカニズムを明らかにする目的で各免疫担当細胞 (CD4+T 細胞, CD8+T 細胞, NK 細胞) の *in vivo* 欠失実験を施行したところ、CD8+T 細胞が BLT-KO マウスにおける長期的抗腫瘍効果に関与していることが明らかとなった。上記細胞を用いて作製した腫瘍ワクチン細胞による治療 (SP/GM) が、4T1-SP 担癌マウスモデルにおいて有意な抗腫瘍効果を誘導することを明らかにした。さらに、同治療法は non-SP/GM ワクチン治療群と比較し強い抗腫瘍効果を呈した。これまで、癌幹細胞は腫瘍免疫を回避するための抑制機構が高いとされており考えられており、実際に我々の検討においても、4T1-SP 細胞において抑制性サイトカインのひとつである VEGF 及び細胞内 STAT3 活性の増強が認められた。以上の結果より、癌幹細胞を標的とした GM-CSF 遺伝子導入癌幹細胞を用いたワクチン治療法は、4T1-SP 細胞が免疫寛容の形質を有するにも関わらず未知の癌抗原を含んだ癌幹細胞関連腫瘍抗原に対しても十分な免疫応答を誘導し、高い抗腫瘍効果を得られる可能性が示唆された。以上の結果より癌幹細胞をワクチン源として利用した新規腫瘍免疫療法の開発は有望である可能性が示唆された。

h. GM-CSF 遺伝子導入自家 iPS 細胞ワクチンを用いた新規腫瘍免疫療法の開発 (Watanabe, A., Inoue, H. et al.)

近年、腫瘍発生あるいは再発の原因として考えられる少数の癌幹細胞に対する治療戦略が固形癌治療において極めて重要であると考えられている。胚性幹 (ES: embryonic stem) 細胞は、いわゆる癌幹細胞とも共通する幹細胞関連抗原を発現していることが知られており、癌幹細胞を標的とした新たな細胞ワクチン療法としての有効性が期待できる。しかし ES 細胞を本目的で用いた場合、その使用による倫理的課題が問題となり得る。近年、同課題を克服する目的で ES 細胞に極めて類似した遺伝子発現様式を有する人工多能性幹細胞 (iPS: induced pluripotent stem) が、体細胞に初期化因子遺伝子を導入することにより樹立可能になった。そこで、我々は癌幹細胞関連腫瘍抗原を標的とした新規腫瘍免疫療法の開発を目的に、iPS 細胞の新規抗腫瘍ワクチン療法への応用の可能性を検討した。先ず、GM-CSF 遺伝子導入 iPS ワクチン (iPS/GM-CSF) 細胞を樹立する目的で、非伝播型センダイウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った結果、ワクチン細胞作製時の放射線照射の有無に関わらず、*in vitro* において抗

腫瘍効果を誘導するために必要とされる十分量の GM-CSF を産生 (200~ ng/10⁶ 個/ 24 hrs) することを確認した。また、iPS/GM-CSF 細胞には GM-CSF 遺伝子非導入 iPS 細胞と同様の形態学的所見および幹細胞関連マーカー発現を認め、幹細胞性が維持されていることが示唆された。低免疫原性マウス肺癌細胞 (LLC) 同系担癌マウスモデルを用いた予防ワクチン系及び治療ワクチン両実験系において、未治療マウス群と比較し有意な予防的抗腫瘍効果を認めた (p<0.05)。一方、同治療経過中、重篤な有害事象を認めなかった。また、予防ワクチン系における生化学所見において、肝腎機能障害を認めず、各 T 細胞分画欠失実験結果より CD4 及び CD8 陽性 T 細胞が同抗腫瘍効果に関与することが明らかとなった。以上の結果より正常皮膚細胞由来 GM-CSF 遺伝子導入自家 iPS 細胞ワクチン療法が、癌幹細胞を標的とした新規癌免疫療法として有望である可能性が示唆された。

B. 再生医療等開発研究

難治性疾患に対する治療法には遺伝子治療法の他に組織幹細胞を用いた再生医療があり、現在集中的に検討がなされてきている。本研究部では特に細胞療法の観点からいくつもの新しい治療法開発に向けた基礎ならびに臨床的取り組みを行ってきている。

a. ヒト胚性幹細胞を用いた高効率造血細胞分化誘導法の検討 (Miura, Y., Kawano, H., Tani, K., et al.)

胚性幹細胞 (Embryonic stem cell; ES 細胞) は、全能性多分化能を有する培養細胞であり、近年樹立された人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) とともに、将来的な再生医療における主要な移植細胞源として期待を集めている。しかしながら実際の臨床応用までには、ES/iPS 細胞から目的とした機能性分化細胞へ高効率かつ再現性良く分化誘導を行う系の開発が急務であり、また得られた分化細胞の生体内における安全性と有効性に関する慎重な前臨床研究の蓄積が必要である。このような背景のもと、本研究では血液細胞に焦点を当て、新しい造血幹細胞移植療法開発を目指して、ヒト ES 細胞を用いた高効率造血細胞分化誘導法の検討を行った。

これまでに我々が小型霊長類コモンマーモセット (CM) ES 細胞からマウス由来造血ストローマ細胞の非存在下で造血細胞への誘導能をもつことを明らかにした Ta11/Sc1 遺伝子導入法と、ヒト胎児肝臓 cDNA 発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いた CM ES 細胞への遺伝子導入後、コロニー形成の誘導を指標とした一次スクリーニング、これにより得られた候補遺伝子ベクターを用いて *in vitro* での再現性を CM ES 細胞にて確認する二次スクリーニング法を経て選択したヒト造血・血球分化誘導候補遺伝子について、CM ES 細胞を用いた胚葉体 (EB) 形成法により CD34 陽性細胞出現率を指標にヒト ES/iPS 細胞からの造血再構築能を検討している。造血分化への関与が既に知られている数種の遺伝子についてはレンチウイルスベクターにて CM ES 細胞に遺伝子導入を行い、CD34 陽性細胞の割合を FACS にて確認したところ、Ly11 遺伝子を用いた場合に多くの CD34 陽性細胞を得る事ができた。これら CD34 陽性細胞は様々な血液細胞への分化能を有し、また限定的ながら *in vivo* における造血再構築にも成功した。Ta11/Sc1 遺伝子については理化学研究所との共同研究により、Ta11/Sc1 遺伝子恒常発

現 iPS 細胞株を同室で樹立し、それらの造血幹/前駆細胞への分化誘導能をストローマ細胞との共培養法により確認している。今後免疫不全マウス in vivo において長期造血構築能を検討する予定である。

b. 新規遺伝子導入ベクターを用いたヒト iPS 細胞の樹立技術の開発 (Hiramoto, T., Miura, Y., Tani, K. et al.)

ヒト iPS (induced pluripotent stem cells) 細胞の開発により線維芽細胞を始めとする自己細胞を用いた再生医療の実現が極めて現実的になってきており、改良や応用技術開発が急速に進んできつつあるものの、安全面および効率面で克服すべき課題が多いことも事実である。九州大学医学研究院ウイルス学教室との共同研究として、麻疹ウイルスベクターを用いたヒト iPS 細胞樹立技術の開発を行っている。麻疹ウイルスは遺伝子操作が簡便で、ウイルス学教室において既にウイルスゲノムの分節化技術が確立されており、一つのベクターで複数の遺伝子搭載が可能で、導入遺伝子発現の効率化が期待できる。さらに麻疹ウイルスには中和抗体、感染阻害ペプチド、効果的なワクチンが存在するなど、臨床応用に向けての基盤を有するウイルスである。複数遺伝子搭載型新規麻疹ウイルスベクターを用いた安全かつ効率的な iPS 細胞樹立技術開発を行い、臨床応用可能な iPS 細胞の樹立を目標としている。

c. iPS 細胞作製時に派生した胚性癌細胞の特徴付け (Yamaguchi, S., Marumoto, T et al.,)

2006年、山中教授らにより人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cells, 以下 iPS 細胞) が樹立された。iPS 細胞は癌化の可能性と未だ前臨床試験の主体はマウスであり、得られたデータはヒトでは再現できないという問題がある。そこで、血液系や免疫系がマウスよりヒトに近いコモンマーモセット (CM) から iPS 細胞の作製を試みた。CM は小型で繁殖し易いことから、モデル動物とされている。本研究においても CM iPS 細胞を誘導する課程で得られた iPS 様細胞は未分化マーカーを発現していたが、問題視されている通りマウス生体に移植した際に腫瘍形成が起こった。次に、この腫瘍の特徴付けを行った。胚性癌細胞に類似し、iPS 細胞誘導課程で導入した遺伝子が未だに発現しているという特徴を示した。また、iPS 細胞誘導因子を抑制すると、細胞の増殖が抑制されることが明らかとなり、他の癌と同様に放射線治療や抗癌剤治療などの治療が可能であることが確認した。iPS 細胞が生体内に移植された際、不幸にも癌形成が起こった場合にどのような治療が有効か今後も検討していく予定である。

d. p53 変異をもつ非ヒト霊長類コモンマーモセット個体の作製 (Nagai, Y., Tani, K. et al.)

Zinc finger nucleases (ZFNs) は、近年霊長類細胞において遺伝子破壊を行うことのできる新たな方法として非常に注目されてきている。

我々は、ZFNsを用いて、腫瘍抑制遺伝子であるp53に変異をもつコモンマーモセット個体の作製を行うことを目的とした研究を進めている。これまでの実験で、我々が新たにデザインしたp53遺伝子を標的とするZFNsがp53を破壊する活性をもつことが明らかとなった。今後はこれらのZFNsをコモンマーモセットの受精卵に注入し、p53変異をもつ個体作製を行う予定である。

e. コモンマーモセット ES 細胞の自己複製促進及び維持機構の解析 (Nii, T., Marumoto, T. et al.)

小型霊長類コモンマーモセットはその幾つかの優れた特性からこれまでに前臨床モデル動物としてさまざまな方面で利用されてきている。そこで、CM 胚性幹細胞 (ES 細胞) はヒト ES 細胞を用いた再生医療の有効性と安全性を確認するための細胞ソースとして期待されている。CM ES 細胞は我々、及び他のグループより樹立されているが、自己複製能の維持に必要な増殖因子やその下流のシグナル経路は解明されていない。本論文では CM ES 細胞はフィーダー細胞上で培養中において basic fibroblast growth factor (bFGF) を加えることで自己複製能を促進させることができることを明らかにし、bFGF の下流の経路は phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-protein kinase B (AKT) 経路であることを明らかにした。さらに CM ES 細胞はフィーダーフリー条件下において bFGF と transforming growth factor β (TGF- β) が自己複製能の維持に重要であることを明らかにした。私達の発見は CM ES 細胞の培養技術の改善につながり、CM ES 細胞を用いたヒト再生医療の前臨床研究を推進すると考えられる。

f. Wnt3aは重症好中球減少症患者より樹立した人工多能性幹細胞由来の障害好中球を成熟させる (Hiramoto, T., Tani, K. et al.)

遺伝性疾患患者より樹立した人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は疾患の病因研究や治療のための創薬研究のための新たなツールとして注目されている。重症先天性好中球減少症 (SCN) は出生後より好中球減少を呈する重篤な疾患である。本疾患の原因として最も高頻度に検出されているのは好中球エラスターゼをコードする ELANE 遺伝子のヘテロ接合性変異である。しかし適切なモデル動物が存在しないため、本疾患の好中球分化異常機構に関する詳細な解析はなされていない。本研究では、SCN 患者体細胞より iPS 細胞 (SCN-iPS 細胞) を樹立し、その造血能について解析を行った。その結果、SCN-iPS 細胞由来顆粒球分化過程において好中球分化障害が発生し、これら好中球は好中球刺激因子 (G-CSF) への感受性が低く、in vitro において SCN の病態を再現することができた。SCN-iPS 細胞と対照 iPS 細胞の顆粒球造血の分子機構について解析を行ったところ、Wnt3a/ β -catenin 経路に関係する遺伝子群 (例: Lymphoid enhancer binding factor-1 (LEF-1)) の発現低下が確認され、Wnt3a タンパクの添加により LEF-1 遺伝子の発現が上昇し、SCN-iPS 細胞由来好中球前駆細胞の成熟を認めた。以上の結果より、SCN-iPS 細胞は SCN の病因を解析する優れた疾患モデルであり、Wnt3a/ β -catenin 経路の活性化は ELANE 遺伝子異常 SCN の有効な治療法である可能性が強く示された。

g. 新規再生医療および遺伝子治療法開発のためのトランスレーショナルリサーチ実施に必須の GMP 準拠試験物作製を可能とする九州大学病院分子・細胞調整センター (KU-MCPC) の開設に向けた基礎および臨床的検討 (Okazaki, T., Tani, K. et al.)

各種基準書および手順書からなるGMP (Good manufacturing practice) 文書体系の作製が完了し平成22年12月1日付けで正式にKU-MCPCの運用を開始した。これによりGMP準拠の試験物製造が可能となった。第I相臨床研究「RNF43ペプチドパルス樹状細胞ならびにRNF43ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法：第一相臨床研究」のGMP準拠細胞製剤の製造を開始した。また再生医療として先進医療ならびに治験申請を目的とする脂肪幹細胞を用いた構造体の作製を開始した。次世代の無菌管理システムであるアイソレーターユニットを用いたGMP準拠樹状細胞製剤の製造に向けたプロセスバリデーションを行い、本製剤を用いた臨床研究実施に向けたマスタープランを作成した。KU-MCPCで製造される細胞製剤の品質検査として、九州大学病院に設けられた安全性検証ユニットの円滑なる運営のための助言と連携を取りまとめ、製造ユニットと品質管理ユニットとの有機的な機能連携を図った。さらに各種の教育計画書を作成した。すなわち利用者ならびに一般研修希望者を対象としたGMP教育を開催し、実務者への個別講習として無菌管理、環境菌検査（浮遊菌／付着菌／落下菌）ならびに施設特殊機器の使用講習会を行った。また品質検査のうちFACS Canto IIについて、基礎から実務までの使用者講習会を実施した。九州大学病院中央検査部安全性検証ユニットと共同し日本薬局方準拠マイコプラズマ検査法を確立した。また将来的な新規標準化（薬局方改定）を目指した検査方法の確立に向けた検証試験を企業参加のもと開始した。また将来的に、MCPC機能の充実により得られるであろう多大な知見を基に、今後の臨床開発が大きく期待される遺伝子治療実現に向けた、各種遺伝子導入用ベクター作製時に問題となりうる核酸の完全除去を目的に、新たな核酸分解も可能な新規滅菌器機開発を産官学連携のもと開始した。

業績目録

原著論文

1. Hiramoto, T., Ebihara, Y., Mizoguchi, Y., Nakamura, K., Yamaguchi, K., Ueno, K., Nariai, N., Mochizuki, S., Yamamoto, S., Nagasaki, M., Furukawa, Y., Tani, K., Nakauchi, H., Kobayashi, M., Tsuji, K. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3023-3028, 2013.
2. Kobayashi, S., Tian, Y., Ohno, N., Yuji, K., Ishigaki, T., Isobe, M., Tsuda, M., Oyaizu, N., Watanabe, E., Watanabe, N., Tani, K., Tojo, A., Uchimaru, K., The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I. *PLoS ONE* 8:e53728, 2013.

3. Liao, J., Marumoto, T., Yamaguchi, S., Okano, S., Takeda, N., Sakamoto, C., Kawano, H., Nii, T., Miyamoto, S., Nagai, Y., Okada, M., Inoue, H., Kawahara, K., Suzuki, A., Miura, Y., Tani, K. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. *Mol Ther* 21:1242-1250, 2013
4. Kurita, R., Suda, N., Sudo, K., Miharada, K., Hiroyama, T., Miyoshi, H., Tani, K., Nakamura, Y. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS ONE* 8:e59890, 2013.
5. Chen, M-H., Soda Y., Izawa K., Kobayashi S., Tani, K., Maruyama, K., Tojo, A., Asano, S. A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials. *Int J Pharm* 454:478-485, 2013
6. Yamaguchi S, Marumoto T, Nii T, Kawano H, Liao J, Nagai Y, Okada M, Takahashi A, Inoue H, Sasaki E, Fujii H, Okano S, Ebise H, Sato T, Suyama M, Okano H, Miura Y, Tani K. Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors. *Cancer Sci.* 2014 (in press)
7. Nii, T., Marumoto, T., Kawano, H., Yamaguchi, S., Liao, J., Okada, M., Sasaki, E., Miura, Y., Tani, K. Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. *FEBS Open Bio.* 2014 (in press)
8. Narusawa M, Inoue H, Sakamoto C, Matsumura Y, Takahashi A, Inoue T, Watanabe A, Miyamoto S, Miura Y, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue M, Takayama K, Okazaki T, Hasegawa M, Nakanishi Y, Tani K. TLR7 ligand augments GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunol Res.* 2014 (in press)
9. Fei Ye, Yibei Zhang, Yue Liu, Kazunari Yamada, Jonathan L. Tso, Jimmy C. Menjivar, Jane Y. Tian, William H. Yong, Dörthe Schaeue, Paul S. Mischel, Timothy F. Cloughesy, Stanley F. Nelson, Linda M. Liau, William McBride, Cho-Lea Tso. Protective properties of radio-chemoresistant glioblastoma stem cell clones are associated with metabolic adaptation to reduced glucose dependence. *PLoS One* 8 (11): e80397, 2013

総説等

1. 横田 洋介、井上 博之、谷 憲三朗. Trends in Hematological Malignancies. LTB4/BLT1 シグナル伝達欠失は免疫機構を増強することで長期的抗腫瘍免疫記憶を促進する 2013年6月30日発行(第5巻 第2号) p16-19 メディカルレビュー社
2. 井上 博之、高山 浩一、中西 洋一. 癌ワクチン療法 (Cancer vaccine therapy) 日本臨床最新肺癌学 (基礎と臨床の最新研究動向) 71巻 増刊号6 p242-247, 2013年11月
3. 野崎 要、井上 博之、高山 浩一、中西 洋一、谷 憲三朗. 遺伝子治療 (Gene therapy) 日本臨床最新肺癌学 (基礎と臨床の最新研究動向) 71巻 増刊号6 p276-281, 2013年11月
4. Inoue-Yokoo, T., Tani, K., Sugiyama, D. Mesodermal and hematopoietic differentiation from ES and iPS cells. *Stem Cell Rev.* 9:422-434, 2013.
5. Inoue, H., Tani, K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ.* 21:39-49, 2013

学会発表

国際学会

1. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. A novel cancer cell vaccine using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF elicits substantial antitumor immunity in a syngeneic mouse model. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013
2. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Dual microRNA-regulated oncolytic coxsackievirus B3 infection displays antitumor activity with attenuated pathogenicity in mice. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013
3. Takafumi Hiramoto, Yasuhiro Ebihara, Yoko Mizoguchi, Kazuhiro Nakamura, Kiyoshi Yamaguchi, Kazuko Ueno, Shinji Mochizuki, Naoki Nariai, Shohei Yamamoto, Masao Nagasaki, Yoichi Furukawa, Kenzaburo Tani, Hiromitsu Nakauchi, Masao Kobayashi, and Koichiro Tsuji. The activation of the Wnt3a/ β -catenin pathway induced maturation of impaired neutrophils as well as the endoplasmic reticulum stress in induced pluripotent stem cell derived from a Severe Congenital Neutropenia patient with ELANE mutation. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013
4. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Combination use of TLR7 ligand with GM-CSF gene-transduced tumor vaccines provides substantial antitumor immunity against poorly immunogenic mouse lung cancer cells. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013
5. Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. CVB3 infection elicits potent oncolytic activity against lung cancer stem cells. The 16th Annual Meeting of American Society of Gene and Cell Therapy. Salt Lake City, UT, May 15-18, 2013
6. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Gene expression profiling identifies plasmacytoid dendritic cells as positive regulators in GM-CSF-induced antitumor immunity. The 4th Japanese Society of Hematology International Symposium 2013, Matsuyama, Japan, May 24-25, 2013
7. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani: Efficient hematopoietic differentiation of common marmoset embryonic stem cells by the inhibition of their self-renewal pathway. International Society for Stem Cell Research, Boston, MA, June 12-15, 2013
8. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013. Fukuoka, Japan, November 4-6, 2013
9. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. MicroRNA-regulated coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity. The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013. Fukuoka, Japan, November 4-6, 2013

10. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 infection markedly reduces its toxicity without losing its original oncolytic activity. Therapeutics Discovery Symposium Asia Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting On 'RNA Regulation to Delivery, Programming to Pluripotency & Therapeutics'. Tokyo, Japan, November 25-26, 2013
11. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Hiramoto, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF confers potent T cells-mediated antitumor immunity. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 7-10, 2013
12. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yumiko Matsumura, Atsushi Takahashi, Ayumi Watanabe, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand potentiates GM-CSF-initiated antitumor immunity through activation of plasmacytoid dendritic cells. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 7-10, 2013
13. Hirotaka Kawano, Tomotoshi Marumoto, Takafumi Hiramoto, Michiyo Okada, Tomoko Inoue, Takenobu Nii, Jiyuan Liao, Saori Yamaguchi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. Induced hematopoietic differentiation of Common Marmoset Embryonic Stem Cells by LYL1 can give rise to Hematopoietic Stem Cells having the Enhanced Bone Marrow Reconstitution capability. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, December 7-10, 2013

国内学会

1. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. 肺癌幹細胞を標的とした新規遺伝子改変麻疹腫瘍溶解性ウイルス療法. 第53回日本呼吸器学会学術講演会, 東京, 2013
2. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells genetically engineered to secrete GM-CSF provides substantial antitumor immunity in immunocompetent syngeneic mouse models. 第19回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013
3. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. Plasmacytoid dendritic cells play an essential role in GM-CSF-induced antitumor immunity. 第19回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013
4. Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Differential susceptibility of cancer stem cells and cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition to oncolysis by CVB3 infection. 第19回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013
5. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Infection with dual microRNA-targeted coxsackievirus B3 abrogates its pathogenicity retaining oncolytic activity. 第19回日本遺伝子治療学会, 岡山, 2013
6. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Beibei Wang, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi

- Nakanishi and Kenzaburo Tani. Infection with Echovirus 4 elicits potent oncolytic activity against cisplatin-resistant esophageal carcinoma. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
7. Miyako Sagara, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Chika Sakamoto, Yuki Nakano, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. CVB3 infection displays different oncolytic activities against cancer stem cells and cancer cells undergoing EMT. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
 8. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccine with GM-CSF gene-transduced cancer stem cells inhibits tumor growth and metastasis of breast cancer. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
 9. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Miyako Sagara, Beibei Wang, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. MicroRNA-targeted coxsackievirus B3 infection markedly reduces its pathogenicity retaining oncolytic activity. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
 10. Toshihisa Tsuruta, Yasuo Aihara, Kazunari Yamada, Hiroyuki Inoue, Yasuki Hijikata, Tomotoshi Marumoto, Yoshikazu Okada, Kenzaburo Tani. Akt gene activation via VEGFR as a prognostic factor of pediatric low-grade glioma. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
 11. Yasuki Hijikata, Toshihiko Okazaki, Tomotoshi Marumoto, Hiroyuki Inoue, Toshihisa Tsuruta, Kazunari Yamada, Mutsunori Murahashi, Takuya Tsunoda, Kenzaburo Tani. A phase I clinical study of a novel immunotherapy combined chemotherapy in patients with advanced solid tumors. 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
 12. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Vaccination with irradiated induced pluripotent stem cells elicits substantial antitumor immunity. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013
 13. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Tomoko Inoue, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani. TLR7 ligand overcomes therapeutic resistance to GM-CSF-gene transduced tumor vaccination. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013
 14. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani: Efficient hematopoietic differentiation of common marmoset ES cells by inhibition of self-renewal. 第 75 回日本血液学会学術集会, 札幌, 2013
 15. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Takafumi Hiramoto, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Therapeutic iPS cell vaccination induces effective antitumor immunity in a syngeneic mouse model. 第 54 回日本肺癌学会総会, 東京, 2013
 16. Saori Yamaguchi, Tomotoshi Marumoto, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Hiroshi Fujii, Shinji Okano, Yoshie Miura and Kenzaburo Tani. Characterization of dysgerminoma like tumors arisen in the process of generating common marmoset induced pluripotent stem cells. 第 3 回日本マーモセット研究会, 福岡, 2013
 17. Hirotaka Kawano, Tomotoshi Marumoto, Takafumi Hiramoto, Michiyo Okada, Takenobu Nii, Jiyuan Liao, Saori Yamaguchi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Yoshie Kametani, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. LYL1, a basic helix-loop-helix transcription factor, induces hematopoietic stem cell from common marmoset embryonic stem cell. 第 3 回日本マーモセット研究会, 福岡, 2013

18. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Erika Sasaki and Kenzaburo Tani. Transient inhibition of PI3K-AKT pathway promotes hematopoietic differentiation in common marmoset embryonic stem cells. 第3回日本マーマーモセット研究会, 福岡, 2013.
19. Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Takafumi Hiramoto, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. A novel cell vaccination using irradiated induced pluripotent stem cells induces potent T cells-mediated antitumor immunity. 第11回日本免疫治療学研究会学術集会, 東京, 2014.
20. Chika Sakamoto, Hiroyuki Inoue, Megumi Narusawa, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Therapeutic vaccination with GM-CSF gene-transduced breast cancer stem cells effectively suppress tumor growth and lung metastasis. 第11回日本免疫治療学研究会学術集会, 東京, 2014
21. Yasuki Hijikata, Toshihiko Okazaki, Yoshihiko Tanaka, Shinichi Kobayashi, Kazunari Yamada, Tomotoshi Marumoto, and Kenzaburo Tani. A phase I study of adoptive immunotherapy using autologous dendritic cell pulsed with a RNF43 peptide in patients with advanced solid tumors. 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会, 名古屋, 2013.
22. Yasuki Hijikata, Toshihiko Okazaki, Yoshihiko Tanaka, Shinichi Tanaka, Kazunari Yamada, and Kenzaburo Tani. A phase I clinical study of a novel immunotherapy for advanced solid tumors. 第51回日本癌治療学会学術集会, 横浜, 2013
23. Kyosuke Kobayashi, Koichi Kawahara, Akira Suzuki, Kenzaburo Tani, Atsushi Takahashi. Functions of FEAT tumor promoter in ES cells. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013
24. Yan Li, Kyosuke Kobayashi, Kenzaburo Tani, Atsushi Takahashi. Identification of proteins that interact with FEAT tumor promoter. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013

シンポジウム

フォーラム

1. 井上 博之, 王 倍倍, 中野友紀, 安成 啓佑, 宮本 将平, 高山 浩一, 中西 洋一, 谷 憲三朗. ヒトエンテロウイルスを用いた新規腫瘍溶解性ウイルス療法. 文部科学省 [橋渡し研究加速ネットワークプログラム] TR 推進合同フォーラム ―アカデミアの活力と実力を社会へ―, 福岡, 2013.
2. 小林 恭介, 李 妍, 河原 康一, 鈴木 聡, 谷 憲三朗, 高橋 淳. 腫瘍促進タンパク FEAT を用いた癌早期発見への応用. 文部科学省 [橋渡し研究加速ネットワークプログラム] TR 推進合同フォーラム ―アカデミアの活力と実力を社会へ―, 福岡, 2013
3. 土方 康基 当科における難治性悪性腫瘍に対する免疫療法臨床試験の現状 第11回日本免疫治療学会研究会学術集会, 東京, 2013.

エピゲノム制御学分野

Division of Epigenomics and Development

教授：佐々木 裕之

Professor : Hiroyuki Sasaki, M.D., Ph.D.

平成 25 年度の当分野は、主幹教授・佐々木裕之、准教授・佐渡敬、助教・一柳健司、助教・鶴木元香、特任講師・藤英博の体制で研究・教育に臨んだ。佐々木は所長およびエピゲノムネットワーク研究センター長を務めている。これらの教員に加え、学術研究員 1 名、研究生 2 名（うち国費留学生 1 名）、博士課程学生 11 名（うち日本学術振興会特別研究員 1 名）、修士課程学生 3 名、生命科学科 4 年生 1 名、ミシガン大学からの留学生 1 名、テクニカルスタッフ 2 名、秘書 2 名の計 28 名が研究活動に参加した。

当分野は哺乳類の生体恒常性維持やリプログラミングに重要なエピジェネティクスおよびエピゲノムの制御機構の解明を中心的な研究テーマに据え、とくに生殖細胞におけるゲノムインプリンティングのリプログラミング、X 染色体不活性化の機構、エピジェネティクスによるゲノム安定性維持、エピゲノムと種間・種内多様性、ヒトのエピゲノム異常に基づく疾患の解明などを目的として研究している。

平成 25 年度は戦略的創造研究推進事業、新学術領域研究、基盤研究などの補助金による支援を受け、また 3 年間の九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクト（A タイプ）による大規模エピゲノム解析の基盤整備を完了した。

A. 生殖細胞系列におけるゲノム刷り込みのリプログラミング機構

ゲノム刷り込み（インプリンティング）は、哺乳類の精子・卵子のゲノムが異なるエピジェネティックな修飾を受け、その結果として子の遺伝子の一部が父由来または母由来アレルに特異的な発現を示すことをいう。インプリンティングを受ける遺伝子は生物学的に重要で、ヒトの雄核発生、単為発生がそれぞれ完全胞状奇胎、卵巣奇形腫に終わるのはこのためであり、またインプリンティング異常はさまざまな先天性疾患、がんなどを引き起こす。我々はマウスを用いて、このインプリンティングが世代毎にリプログラムされる機構を研究している。これまでに、父母由来を区別するエピジェネティックな修飾（以下インプリント）の実体が DNA メチル化であること、雌雄の配偶子形成過程でインプリントを確立する de novo DNA メチル化酵素は Dnmt3a であることなどを明らかにしてきた。

今年度は、核移植クローンマウスにおけるインプリント異常を網羅的 RNA-seq により同定し、報告した（原著論文 Okae et al. Hum. Mol. Genet. 2014）。また、DNA メ

チル化酵素のノックアウトマウスの解析から、卵子におけるインプリンティング過程に DNA メチル化以外のエピジェネティックな修飾が関与するという知見を得て、現在投稿準備を進めている。

B. 生殖細胞系列における piRNA の生合成機構の研究

Piwi-interacting RNA (piRNA) は一本鎖 RNA から未知の機構で生成される生殖細胞特異的な小分子 RNA で、Piwi ファミリータンパク質と結合して、主にレトロトランスポゾンのサイレンシングに関わる。piRNA にはプロ精原細胞（ゴノサイトとも呼ばれる）で産生されるものとパキテン期精母細胞で産生されるものがある。我々は以前、フォスフォリパーゼ D/ヌクレアーゼファミリーのメンバーである MitoPLD/Zucchini/Pld6 蛋白質が精巣内生殖細胞における piRNA の合成、Rasgrf1 遺伝子のメチル化、及び正常な精子形成に必須であることを報告した。しかし MitoPLD をノックアウトした雌マウスは正常な妊性を示し、肉眼的な異常は見つかっていなかった。今回、MitoPLD ノックアウト卵子の詳細な解析を行ったところ、レトロトランスポゾン的一种である L1 由来の piRNA の生成が著しく阻害されていることが判明した。現在、さらに詳しい解析を行っている。

C. エピジェネティクス異常に基づく遺伝病の解析

ICF 症候群は、免疫不全、セントロメア不安定性、顔貌異常を主徴とする劣性遺伝病で、de novo DNA メチル化酵素のひとつである DNMT3B の遺伝子変異で生じる。しかしながら、ICF 症候群には DNMT3B 遺伝子に変異のない一群の症例が存在することがわかっていた（2型 ICF 症候群）。この新規原因遺伝子同定に向けて網羅的なエクソーム解析を行ったところ、日本の 2 家系と海外の 1 家系で ZBTB24 遺伝子に変異が同定されたので、その詳細を報告した（フランスとの共同研究、原著論文 Nitta et al. J. Hum. Genet. 2013）。ZBTB24 は転写抑制作用を持つ一群の核内タンパク質のメンバーであるが、その機能の詳細は不明である。そこで、この遺伝子のノックアウトマウスを作成し、その詳細な解析を行っている。

D. メチローム解析・エピゲノム解析

微量サンプルに適用可能な post-bisulfite adaptor tagging 法 (PBAT 法) (東大・伊藤隆司らが開発) を用いて、マウスの生殖細胞や初期胚のゲノム網羅的な DNA メチル化解析 (メチローム解析) を行なった。すなわち、京大・斎藤通紀らとの共同研究により培養下で胚性幹細胞から作成された生殖細胞様細胞及びそこに至る途中の細胞、横浜市大・大保和之らとの共同研究により精子幹細胞と前駆細胞のメチローム解析を行なった (後者は投稿準備中)。最後に、科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業

の支援を受け国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) に貢献するため、東北大・有馬隆博，成育医療センター・秦健一郎，及び当研究所情報生物学分野・須山幹太との共同研究により，ヒトの胎盤や子宮内膜から数種類の細胞を純化しメチロームを含めてそれらのエピゲノム解析を決定するプロジェクトを継続中である。

E. 配列特異的な DNA メチル化可視化法の開発

東大・岡本晃充らが開発した inter-strand complexes formed by osmium and nucleic acids (ICON) プローブを利用して，高度に直列型に反復した配列であるサテライト DNA のメチル化状態を配列特異的に可視化する方法を開発した。この方法では，まず fluorescence in situ hybridization (FISH) により ICON プローブを標的配列にハイブリダイズし，オスミウムを介してプローブ中のビピリジンとメチル化されたシトシンを特異的に架橋する。架橋されなかったプローブを除去・洗浄するとメチル化されたシトシンのみシグナルが得られる。我々はこの方法を MeFISH と名付け，実際の応用例とともに論文として発表した(原著論文 Li et al. Nucl. Acids Res. 2013)。

F. X 染色体の活性制御機構の研究

a. X 染色体不活性化をモデルとしたヘテロクロマチン形成機構の解析

哺乳類の雌は 2 本の X 染色体の片方を不活性化することで，X 染色体を 1 本しかもたない雄との間の遺伝子量の不均衡を是正する。Xist は不活性 X 染色体から特異的に転写される非コード RNA で，X 染色体不活性化の開始に必須なことが示されているが，これがどのようにして染色体ワイドの不活性化を引き起こすかについて詳しいことはよくわかっていない。私たちは Xist RNA がどのようにクロマチン凝縮を引き起こし，遺伝子発現を抑えるのかを知るために，ジーンターゲットングによって作製したアレルから発現する変異 Xist RNA が招く X 染色体不活性化の異常を個体・細胞レベル，および分子レベルで解析している。そのうちのひとつの変異アレルから発現される変異 Xist RNA はほとんど不活性化を引き起こせないにもかかわらず，不活性 X 染色体に特徴的なヒストンのエピジェネティック修飾は野生型 Xist RNA と同等に構築できることがわかった。さらにこの変異アレルを持つメス胚から胚性幹 (ES) 細胞を樹立し，その分化誘導系を利用して，ヒストン修飾の異常の有無を ChIP-seq によって詳細に調べることに着手した。変異型 Xist RNA が招く X 染色体不活性化の異常を詳細に調べることで，どのようなエピジェネティック制御がヘテロクロマチン形成に寄与しているか明らかにしていきたいと考えている。

b. 不活性 X 染色体に局在する蛋白質の解析

不活性 X 染色体に局在する蛋白質やそれを含む複合体に着目し，それらが Xist RNA

の機能発現, すなわち X 染色体への局在やそのヘテロクロマチン化にどのような効果をもつか調べている. そのような蛋白質の一つである SmcHD1 は, その機能欠損が X 染色体不活性化の維持機構の異常を引き越し, メス特異的に胎生致死となることが報告されている唯一のものである. SmcHD1 の機能欠損が, ヒストン修飾や染色体複製に影響をおよぼすかについて, 染色体ワイドに調べるため, ChIP-seq により詳細に調べている.

G. レトロトランスポゾンの機能制御の解析

SINE や LINE といったレトロトランスポゾンは哺乳類ゲノムの 40% を占める転移因子であり, 宿主のゲノム多様性をもたらす主役因子である一方, ゲノム機能の制御にも深く関与している. 我々は SINE 配列周辺領域の DNA メチル化状態, ヒストン修飾状態を解析し, SINE がクロマチン状態を区画化し近傍遺伝子の発現を制御していることを明らかにした (投稿準備中, 総説 Ichiyangi Genes Genet. Sys. 2013).

一方, 雄性生殖細胞でのレトロトランスポゾンの発現制御機構は因子ごとに多様であることを遺伝学的解析から明らかにした (投稿準備中). さらに, 遺伝学的な解析から, 分子シャペロンである熱ショック蛋白質が PIWI 蛋白質群と piRNA の複合体の安定化に関わり, piRNA 産生を通して LINE の活性を制御していることを明らかにした (投稿中).

H. 哺乳類におけるエピゲノムの種内および種間多型の解析

エピジェネティックな状態の個体差が生物の多様性や進化にどのような影響を与えるのかを明らかにするため, 高速シーケンサーを用いてヒト科 4 種 (ヒト, チンパンジー, ゴリラ, オランウータン) およびニホンザルの DNA メチル化エピゲノムの比較解析を行っている. これまでに 1 kb 以下の小さな領域での種間メチル化差は転写因子結合部位や CpG 密度の変化などによって生じることを明らかにした (原著論文 Fukuda et al. J. Hum. Genet. 2013). さらに, 精子と体細胞では種間でメチル化が異なる領域が全く異なり, 興味深いことに, ヒト精子だけで特異的に低メチル化しているサブメガベースレベルの大きなドメインが多数あることを明らかにした (投稿準備中).

I. 新規ヒストン修飾「水酸化」の生理的意義の解析

我々は UHRF1 をメチル化 DNA 認識タンパクとして同定して以来, このタンパク質の機能解析を続けており, UHRF1 がリジン水酸化酵素 JMJD6 と結合する事を見出した. UHRF1 はヒストン近傍で機能しているため, UHRF1 複合体に含まれる JMJD6 がヒストンタンパク質のリジン残基を水酸化するかどうかを検討した. *In vitro* で JMJD6 はヒストンタンパク質のリジン残基を水酸化し, この水酸化はヒストンのアセチル化修飾及

びメチル化修飾と拮抗する事が分かった。免疫遺伝学分野の福井宣規主幹教授から御提供頂いた Jmjd6 ノックアウトマウス胎仔を用いた検討で、Jmjd6 がヒストンのリジン残基の水酸化をおこなっていることを証明した。現在、Jmjd6 が水酸化するヒストンのリジン残基の特定を質量解析にて進めている（理研との共同研究）。ヒストンのリジン残基の水酸化は新規のヒストン修飾であり、エピジェネティックな転写制御機構の更なる理解につながると考えている。

J. Uhrf1 が生殖細胞形成過程におけるリプログラミングに果たす役割の解明

Uhrf1 は DNA メチル化を親鎖から娘鎖へ伝達する上で重要な役割を果たしており、Uhrf1 のコンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死であることから、Uhrf1 はマウスの初期発生に重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、生殖細胞形成過程における Uhrf1 の役割は不明である。そこで、私たちは卵子特異的および始原生殖細胞特異的に Cre を発現する Uhrf1 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。卵子特異的に Uhrf1 をノックアウトした卵子と野生型の精子を受精させると、ほとんどの胚は着床前に致死となった。また始原生殖細胞特異的に Uhrf1 をノックアウトした雄マウスの精巣には生殖細胞が認められず、Uhrf1 は精子形成過程においても重要な働きをしていることが示唆された。現在、Uhrf1 が雌雄生殖細胞の形成過程で、どのような役割を担っているのかを DNA メチローム解析、ヒストン修飾解析、核置換実験（理研との共同研究）、発生動態解析（阪大との共同研究）を通して解明を進めている。

K. 初期発生に関わる KRAB-zinc finger タンパク質の同定と機能解析

KRAB-zinc finger タンパク質である Zfp57 は、初期発生においてメチル化されたインプリンティング制御領域（ICR）に局在し、受精直後のリプログラミング時に起こるゲノムワイドな DNA 脱メチル化から ICR のメチル化を保護する上で重要な役割を担っていることが報告されている。しかしながら、Zfp57 がすべての ICR のメチル化を保護する訳ではなく、その他の KRAB-zinc finger タンパク質がこの機構に含まれる可能性がある。私たちは過去に発表されたマイクロアレイデータを利用し、卵子および受精卵で発現が高い KRAB-zinc finger タンパク質を 11 個同定した。現在、これらのタンパク質がメチル化および非メチル化 ICR に結合するか、またこれらのタンパク質をノックアウトした場合に初期発生に影響を与えるかを検討中である。現在までに CRISPR/Cas9 システムにて、3 種類の KRAB-zinc finger タンパク質のノックアウトマウスの作製に成功している。また Zfp57 のノックアウト ES 細胞の網羅的発現解析から、Zfp57 がインプリンティング遺伝子のみならず、その他の片アレル性発現を示す遺伝子の発現制御に関与することを見出した。現在詳細な分子機構を解析中である。

業績目録

原著論文

1. Fukuda, K., Ichiyangi, K., Yamada, Y., Go, Y., Udono, T., Wada, S., Maeda, T., Soejima, H., Saitou, N., Ito, T. & Sasaki, H. 2013
Regional DNA methylation differences between humans and chimpanzees are associated with genetic changes, transcriptional divergence and disease genes.
J. Hum. Genet. 58, 446-454
2. Nitta, H., Unoki, M., Ichiyangi, K., Kosho, T., Shigemura, T., Takahashi, H., Velasco, G., Francastel, C., Picard, C., Kubota, T. & Sasaki, H. 2013
Three novel ZBTB24 mutations identified in Japanese and Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients.
J. Hum. Genet. 58, 455-460
3. Nozawa, R., Nagao, K., Igami, K., Shibata, S., Shirai, N., Nozaki, N., Sado, T., Kimura, H. & Obuse, C. 2013
Human inactive X chromosome is compacted through a polycomb-independent SMCHD1-HBiX1 pathway governed by XIST RNA.
Nat. Mol. Struc. Biol. 20, 566-573
4. Umemori, J., Mori, A., Ichiyangi, K., Uno, T. & Koide, T. 2013
Identification of both copy number variation-type and constant-type core elements in a large segmental duplication region of the mouse genome.
BMC Genomics 14, 455
5. Li, Y., Miyanari, Y., Shirane, K., Nitta, H., Kubota, T., Ohashi, H., Okamoto, A. & Sasaki, H. 2013
Sequence-specific microscopic visualization of DNA methylation status at satellite repeats in individual cell nuclei and chromosomes.
Nucl. Acids Res. 41, e186
6. Okae, H., Matoba, S., Nagashima, T., Mizutani, E., Inoue, K., Ogonuki, N., Chiba, H., Funayama, R., Tanaka, S., Yaegashi, N., Nakayama, K., Sasaki, H., Ogura, A. & Arima, T. 2014
RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice.
Hum. Mol. Genet. 23, 992-1001

7. Shinagawa, T., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Huynh, L. M., Sivaraman, P., Kumarevel, T., Inoue, K., Nakato, R., Katou, Y., Sado, T., Takahashi, S., Ogura, A., Shirahige, K. & Ishii, S. 2014
Histone Variants Enriched in Oocytes Enhance Reprogramming to Induced Pluripotent Stem Cells.
Cell Stem Cell 14, 217-27
8. Kagawa, N., Hori, T., Hoki, Y., Hosoya, O., Tsutsui, K., Saga, Y., Sado, T. & Fukagawa, T. 2014
The CENP-O complex requirement varies among different cell types.
Chrom. Res. (in press)

総説

1. Ichiyanagi, K. 2013
Transposable elements in eukaryotic genomes: epigenetic regulation by the host and functionalization for the host.
Genes Genet. Syst. 88, 1
2. Ichiyanagi, K. 2013
Epigenetic regulation of transcription and possible functions of mammalian short interspersed elements, SINEs.
Genes Genet. Syst. 88, 19-29
3. Sado, T. & Sakaguchi, T. 2013
Species-specific differences in X chromosome inactivation. *Reproduction* 146, R131-R139
4. 鵜木元香, 新田洋久, 佐々木裕之. 2013
DNA メチル化酵素異常症
遺伝子医学 MOOK 25 エピジェネティクスと病気 (佐々木裕之監修, 中尾光善・中島欽一編集), 210-216
5. 坂口武久, 佐渡敬. 2013
ノンコーディング RNA とエピジェネティクス
遺伝子医学 MOOK 25 エピジェネティクスと病気 (佐々木裕之監修, 中尾光善・中島欽一編集), 43-49
6. 佐々木裕之(監修). 2013
エピジェネティクスと病気
遺伝子医学 MOOK 25 エピジェネティクスと病気
7. 白根健次郎, 佐々木裕之. 2013
第2章: 哺乳類の生殖細胞と初期胚におけるエピゲノム制御

実験医学 31(増刊)ゲノム 医学・生命科学研究 総集編 (榊佳之・菅野純夫・辻省次・服部正平編集), 100-104

著書

1. 佐渡敬. 2013
第2部-1: X染色体不活性化 エピジェネティクスキーワード事典 (牛島俊和, 真貝洋一編), 100-108 羊土社
2. 鶴木元香, 佐々木裕之. 2013
第2部-4: 生殖・発生 エピジェネティクスキーワード事典 (牛島俊和, 真貝洋一編), 123-129 羊土社
3. 佐々木裕之. 2013
2章: エピジェネティクス-DNAメチル化酵素の重要性 英語論文セミナー: 21世紀の分子生物学 (渡辺公綱, 桂勲編), 22-36 講談社
4. 佐渡敬. 2013
6章6.3節 X染色体の不活性化, エピジェネティクス (田嶋正二編集), DOJIN BIOSCIENCE シリーズ, 185-202 化学同人
5. 佐渡敬. 2013
第15章 エピジェネティクス (東中川徹, 大山隆, 清水光弘編), ベイシックマスター分子生物学 (第2版), 349-371 オーム社
6. 佐渡敬. 2013
4-7「特殊なRNA」および8-5「性染色体」, 遺伝学図鑑, 80-81, 178-179 悠書館

学会発表 (口演のみ)

1. 佐々木裕之 (2013. 4. 19)
エピジェネティクスの過去・現在・未来
エピゲノム/エピジェネティクス JST・NEDO 公開シンポジウム～生命の適応戦略としての
エピジェネティクスとその破綻による疾患, 東京
2. 佐々木裕之 (2013. 5. 25)
卵子のエピゲノムと遺伝子発現制御ネットワーク
第54回日本卵子学会, 東京
3. Sasaki, H. (2013.07.14-19)
Epigenetic events in mammalian germ-cell development
Gordon Research Conference on Germinal Stem Cell Biology, Hong Kong

4. 佐々木裕之 (2013.8.11)
エピジェネティクスと生命の多様性と恒常性維持
第2回エビデンスに基づく統合医療研究会 (eBIM 研究会), 大阪
5. 一柳健司 (2013.08.17)
霊長類進化におけるゲノムとエピゲノムの相互作用
国立遺伝学研究所研究集会「新機能獲得の分子進化」, 静岡
6. 佐々木裕之 (2013.8.29)
哺乳類生殖細胞のエピゲノム制御と小分子 RNA
第25回高遠・分子細胞生物学シンポジウム in 比叡山—生物学の新天地—, 京都
7. 佐々木裕之 (2013.9.21)
メチローム解析から見た哺乳類の非 CG メチル化
日本遺伝学会第85回大会, 神奈川
8. 福田溪, 一柳健司, 井口志洋, 佐々木裕之 (2013.9.21)
トランスポゾンによる霊長類エピゲノムの進化
日本遺伝学会第85回大会ワークショップ「転移因子と宿主の相互作用」, 神奈川
9. 一柳健司, 一柳朋子, 平福啓一伍, 井上晃太, 福田溪, 佐々木裕之 (2013.9.21)
マウス B2 SINE の DNA メチル化制御機構とクロマチンバウンダリー機能
日本遺伝学会第85回大会, 神奈川
10. 中島達郎, 保木裕子, 佐々木裕之, 佐渡敬 (2013.9.21)
部分的機能欠損 Xist RNA によるエピジェネティック制御異常
日本遺伝学会第85回大会, 神奈川
11. 酒田祐佳, 保木裕子, 佐々木裕之, 佐渡敬 (2013.9.21)
変異 Xist RNA がもたらす X 染色体クロマチンドメインの変化
日本遺伝学会第85回大会, 神奈川
12. 井上晃太, 福田溪, 一柳健司, 佐々木裕之 (2013.9.21)
マウス雄性生殖細胞でのレトロトランスポゾン制御における DNA メチル化と piRNA の役割
日本遺伝学会第85回大会, 神奈川
13. 佐々木裕之 (2013.10.5)
エピジェネティクスと生体恒常性維持
日本体質医学会, 久留米
14. 一柳健司 (2013.10.10-11)
マウス SINE 配列による近傍遺伝子制御
国立遺伝学研究所研究集会「転写因子と宿主の相互作用による生命機能」, 静岡
15. 佐渡敬 (2013.10.17-18)

マウス初期胚における Xist の非対称的発現の制御

国立遺伝学研究所研究集会「クロマチンによる遺伝情報のエピジェネティック制御機構」,
静岡

16. Sasaki, H. (2013.11.6-8)
Genomic imprinting and the epigenome of mammalian germ cells
8th Annual Conference of Asia Epigenome Alliance, 2nd Taipei Epigenetics and Chromatin Meeting, Taipei, Taiwan
17. Sasaki, H. (2013.11.10-12)
DNA methylation profiles in mammalian germ cell development
Annual Meeting & Science Days IHEC 2013, Berlin, Germany
18. 佐々木裕之 (2013.11.14-15)
マウス新生仔精原細胞における奇妙な DNA メチル化のふるまいの解明
新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第1回公開シンポジウム, 大阪
19. 久保直樹 (2013.11.14-15)
マウス新生仔期の精原幹細胞の分化における全ゲノム DNA メチル化解析
新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第1回公開シンポジウム, 大阪
20. 佐々木裕之 (2013.11.21-22)
エピゲノムとヒトの発生・生殖
日本人類遺伝学会第58回大会, 仙台
21. 佐渡敬 (2013.12.3-6)
哺乳類 X 染色体のエピジェネティクス
第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「染色体不活性化のエピジェネティクス」,
神戸
22. 佐々木裕之 (2013.12.7)
ゲノムインプリンティングの基礎と生殖医療
第18回日本生殖内分泌学会, 東京

ゲノム腫瘍学分野

Division of Cancer Genetics

教授：鈴木 聡

Professor : Akira Suzuki, M.D., Ph.D.

がんは死因の第1位であり、かつ依然増加の一途をたどり、人類にとって最も脅威な疾患である。我々は分子生物学、細胞生物学・発生工学等の技術を駆使して、「がん関連遺伝子の機能とその異常による疾患解明」の研究を行っている。

多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常は、がんの発症進展のみならず、がん以外の多くの主要な疾患の発症や、個体の発生分化にも深く関わっていることが分かってきた。このことから、がん関連遺伝子研究は生活習慣病等の多くの疾患の治療法開発につながることを期待される。

私たちはこれらがん関連遺伝子の中でも、がん抑制遺伝子の代表格である p53 や PTEN、また最近注目されつつある Hippo 経路の機能やその制御機構を解析し、新規治療薬開発にも取り組んでいる。

我々の研究によって、がんを含む多くの疾患の発症・進展機構が解明されるとともに、新規治療薬を開発して、医療に貢献したい。

2013年度の人事異動としては、2014年3月に修士課程の大石達也君が卒業し就職した。また2013年4月からは修士課程の遠藤麻弥さんが参画した。さらに生命科学科・学部学生としてはゲノム腫瘍学を専攻した高野勇助君、研究補助にきてくれていた竹之下憂祐君が卒業した。

A. Hippo 経路遺伝子群の機能解析研究

細胞間コミュニケーションには、液性因子起因性シグナルと細胞接触起因性シグナルが大切である。液性因子シグナルはこれまで飛躍的に解析されてきたものの、細胞接触シグナルはまだ不明な点が多い。特に隣の細胞との接触によって細胞増殖が抑制される接触抑制現象（コンタクトインヒビション）は古くから知られていたものの、その分子機構は未だ殆ど不明であった。近年接触抑制シグナルの鍵経路として Hippo キナーゼ経路が脚光を浴びている。

Hippo 経路はショウジョウバエにおいて初めて見出され、接触抑制、細胞増殖、細胞死、細胞競合、幹細胞維持、上皮間葉転換、器官サイズの制御シグナルとして注目されている。生化学的には細胞接触やストレス刺激後に、MST キナーゼが活性化された後、LATS キナーゼが活性化され、活性化した LATS キナーゼは、細胞増殖に正に働く転写共役因子 YAP1/TAZ をリン酸化して、核から排除し、或いは蛋白質崩壊に導くことによっ

て、主に細胞増殖に作用する標的遺伝子の転写を負に制御する。しかしながら哺乳類では Hippo 経路各分子の相同分子が極めて多い為、Hippo キナーゼ経路上のどの分子がどの作用に最も大切であるかを明らかにすることが急務である。さらにこれまでに作製された Hippo 経路遺伝子欠損マウスの多くは胎生早期に致死であったため、成体における Hippo 経路各分子の生理的役割やその破綻による腫瘍発症の有無の多くが不明である。そこで我々は接触抑制の鍵経路である Hippo キナーゼ経路に興味を持ち、この経路の4つのコアコンポーネントの1つである MOB1 の機能を解明するために、その欠損マウスを作製し、(1)MOB1 全身完全欠損マウスは着床直後に死亡すること、(2)MOB1 全身部分欠損マウスでは皮膚外毛根鞘がん・骨肉腫・線維肉腫などの発症をみることに、さらに(3)ヒト外毛根鞘がんの半数以上の症例で MOB1 蛋白質の発現の著減や YAP1 蛋白質の活性化をみたことから、これまで原因が不明であった外毛根鞘がんの原因遺伝子経路を特定することができた。次に我々は肝臓、肺、子宮、骨、脂肪組織などでも MOB1, LATS1/2, YAP1, TAZ を欠損させ、Hippo 経路のこれら組織における表現型を見出している。

さらに Hippo 経路を標的とする薬剤が、今後新規癌治療薬になる可能性が高いことから、そのスクリーニング系を立ち上げ、一次スクリーニングを終えた。

また Hippo 上流に位置する NF2 には、Hippo 非依存性な miRNA 経路によって細胞増殖制御を行うことも新たに見出した。

B. リボソーム-p53 経路（核小体ストレス経路）制御分子の機能解析研究

我々は、PICT1 (GLTSCR2) がリボソーム蛋白質 L11 (RPL11) と結合して、RPL11 を核小体につなぎとめること、すなわち PICT1 欠損によって、RPL11 が核小体から移動し、核質で MDM2 と結合して MDM2 の機能を顕著に抑制し p53 を強く活性化することを見出し、PICT1 は p53 を活性化する「核小体ストレス経路」の重要な制御因子であることを報告した (Nat Med, 2011)。そこで、PICT1 と RPL11 との結合阻害剤が、p53 を活性化させるがん治療薬となる可能性が高いことから、大規模低分子化合物スクリーニングにむけたアッセイ系を現在構築中である。さらに、PICT1 の発現量測定が胃がん患者の予後予測に有用であることを報告した。

C. PTEN の機能解析研究

PTEN のホスファターゼ活性を増強し AKT を抑制する分子とその相同分子を単離し、これら分子の遺伝子欠損マウスの作製を共に完了した。各遺伝子欠損マウスは互いに他の欠損を代償したことから、現在これら2分子の二重欠損マウスを作製中である。

業績目録

原著論文

1. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, Yamamoto M
Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers
Mol. Cell. Biol. 34(5), 900-13, 2014
2. Sugimachi K, Yokobori T, Inuma H, Ueda M, Ueo H, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Suzuki A, Maehara Y, Mori M, Mimori K
Aberrant Expression of Plastin-3 Via Copy Number Gain Induces the Epithelial-Mesenchymal Transition in Circulating Colorectal Cancer Cells.
Ann. Surg. Oncol. in press
3. Dong Y, Sui L, Yamaguchi F, Kamitori K, Hirata Y, Hossain MA, Noguchi C, Katagi A, Nishio M, Suzuki A, Tokuda M.
The expression of PTEN in the development of mouse cochlear lateral wall.
Neuroscience 258(1), 263-9, 2014
4. Uchi R, Kogo R, Kawahara K, Sudo T, Yokobori T, Eguchi H, Sugimachi K, Maehama T, Mori M, Suzuki A, Komune S, Mimori K.
PICT1 regulates TP53 via RPL11 and is involved in gastric cancer progression.
Br. J. Cancer 109(8), 2199-206, 2013
5. Liao J, Marumoto T, Yamaguchi S, Okano S, Takeda N, Sakamoto C, Kawano H, Nii T, Miyamoto S, Nagai Y, Okada M, Inoue H, Kawahara K, Suzuki A, Miura Y, Tani K.
Inhibition of PTEN Tumor Suppressor Promotes the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells.
Mol. Therapy 21(6),1242-50, 2013
6. Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, Ueo H, Uchi R, Matsumura T, Takano Y, Sawada G, Takahashi Y, Mima K, Kurashige J, Akiyoshi S, Iwaya T, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Suzuki A, Wakabayashi G, Mori M, Mimori K.
Clinical Significance of PICT1 in Patients of Hepatocellular Carcinoma with Wild-Type TP53.
Ann. Surg. Oncol, Suppl 3, S537-44, 2013
7. Takasuga S, Horie Y, Sasaki J, Sun-Wada GH, Kawamura N, Iizuka R, Mizuno K, Eguchi S, Kofuji S, Kimura H, Yamazaki M, Horie C, Odanaga E, Sato Y, Sato Y, Chida S, Kotani K, Harada A, Katada T, Suzuki A, Wada Y, Ohnishi H, Sasaki T.
Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine.
Proc. Natl Acad. Sci USA 110(5); 1726-31,2013

総説論文

1. Nishio M, Otsubo K, Maehama T, Mimori K, Suzuki A
Capturing the Mammalian Hippo: Elucidating Its Role in Cancer
Cancer Sci 104(10), 1271-1277, 2013
2. 西尾美希、河原康一、佐々木雅人、前濱朝彦、佐々木雄彦、三森功士、森 正樹、鈴木 聡
核小体を起点とし p53 を制御する新規分子 PICT1 による細胞増殖制御機構
実験医学増刊号 31 (2) 127-134, 2013
3. 西尾美希、三森功士、森 正樹、板見 智、鈴木 聡
Hippo 経路分子 MOB1 によるがん発症・進展制御とがん治療戦略
次世代がん戦略研究 update がん基盤生物学ー革新的シーズ育成に向けてー南山堂 p200-5,
2013

学会発表等

1. 西尾美希、鈴木 聡
遺伝子改変マウスを利用したがん抑制遺伝子の機能解析研究
群馬大学生調研セミナー 2014年03月05日 前橋
2. 鈴木 聡
DNA 損傷応答に関わるがん抑制遺伝子の制御機構とその破綻による発がん機構
ゲノムシステム研究会 2014年02月21日 京都
3. 前濱 朝彦, 西尾 美希, 鈴木 聡
核小体ストレスに応答した癌制御因子 PICT1 のプロテアソーム依存性・ユビキチン非依存性分解
日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会講演 2014年02月20日 津
4. 藤 庸子、西尾美希、田代浩徳、片渕秀隆、鈴木 聡
子宮・乳腺組織における Mob1A/B ノックアウトマウスの解析
宮崎サイエンスキャンプ ポスター 2014年02月14-16日 宮崎
5. 大坪孝平、西尾美希、中西洋一、鈴木 聡
肺の発生および気管支肺胞幹細胞制御における MOB1 の機能解析
宮崎サイエンスキャンプポスター2014年02月14-16日 宮崎 ~Best Presentation Award~
6. 西尾 美希、濱田 浩一、河原 康一、佐々木 雅人、佐々木 雄彦、三森 功士、森 正樹、鈴木 聡
遺伝子改変マウスを利用したがん抑制遺伝子の破綻病態研究
個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ特別招聘講演 2014年02月18日 大津
7. 日笠弘基、鈴木 聡
リボソーム RNA 合成阻害剤は Hippo 経路エフェクター YAP/TAZ を活性化する

- 第 36 回日本分子生物学会年会ポスター 2013 年 12 月 05 日 神戸
8. 鈴木 聡
がん抑制遺伝子変異による皮膚疾患モデルマウス
北大皮膚科セミナー特別講演 2013 年 12 月 04 日 札幌
 9. Yoko To, Miki Nishio, Akira Suzuki
Functions of MOB1A/1B in murine uterus and mammary glands
The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013
Poster, 2013 年 11 月 05 日 福岡
 10. Kohei Ohtsubo, Miki Nishio, Yoichi Nakanishi, Akira Suzuki
Functions of MOB1A/1B in murine lung
The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Stem Cell Biology 2013
Poster, 2013 年 11 月 05 日 福岡～Best Presentation Award～
 11. 小林恭介、河原康一、鈴木聡、谷憲三郎、高橋淳
腫瘍促進因子 FEAT の ES 細胞における機能
第 72 回日本癌学会学術総会 講演 2013 年 10 月 03 日 横浜
 12. Miki Nishio, Jia Wang, Takumi Morikawa, Kohei Ohtsubo, Yoko Toh, Hiroki Hikasa, Satoshi Itami,
Keishu Sugimachi, Koshi Mimori, Akira Suzuki
Functions of the Mob1A/1B in mice
第 72 回日本癌学会学術総会シンポジウム がん研究とモデル動物 英語講演 2013 年 10 月
05 日 横浜
 13. 佐々木 雄彦, 高須賀 俊輔, 佐々木 純子, 鈴木 聡
Dual specificity phosphatases acting on acidic phospholipids
第 86 回日本生化学会大会シンポジウム 酸性リン脂質研究の最前線 講演 2013 年 09 月 12
日 神戸
 14. 前濱 朝彦, 河原 康一, 西尾 美希, 鈴木 聡, 花田 賢太郎
核小体ストレスに応答した癌制御因子 PICT1 のプロテアソーム依存性・ユビキチン非依存
性分解
第 86 回日本生化学会大会 細胞応答-II 講演 2013 年 09 月 12 日 神戸
 15. Youyi Dong, Li Sui, Fuminori Yamaguchi, Kazuyo Kamitori, Akram Hossain, Yuko Hirata, Akira
Suzuki, Masaaki Tokuda
The role of PTEN in the development of interdental cells in mouse postnatal cochlea
第 86 回日本生化学会大会 ポスター 2013 年 09 月 12 日 神戸
 16. 藤 庸子, 田代 浩徳, 西尾 美希, 三森 功士, 片渕 秀隆, 鈴木 聡
子宮・乳腺組織特異的 Mob1A/B ノックアウトマウスの解析
第 86 回日本生化学会大会 ポスター 2013 年 09 月 13 日 神戸

17. 鈴木 聡
癌抑制遺伝子シグナル研究によるヒト疾患・病態の開発と治療薬開発
国立がんセンターセミナー 2013年07月25日 東京
18. 鈴木 聡
Hippo 経路による腫瘍制御
九州大学別府病院外科セミナー 2013年07月03日 別府
19. 藤 庸子、田代浩徳、西尾美希、片渕秀隆、鈴木 聡
プロゲステロンレセプター発現組織特異的 Mob1A/B ノックアウトマウスの解析
第12回日本婦人科がん分子標的研究会講演 2013年07月5日 奈良
20. Miki Nishio, Akira Suzuki
Roles of Mob1A and Mob1B in the hair follicles and their disorders
上皮管腔組織形成第1回国際会議ポスター 2013年06月22-23日 札幌
21. 鈴木 聡
Hippo 経路によるがん微小環境制御
がん微小環境平成25年度第1回公開シンポジウム 2013年06月21日 東京
22. 鈴木 聡
癌抑制遺伝子シグナル研究によるヒト疾患・病態の解明と治療薬開発
上原記念生命科学財団特定研究革新的医療を創生する医学研究 2013年06月09-10日 下田
23. Miki Nishio, Koichi Hamada, Kensaku Mizuno, Nirikazu Yabuta, Hiroshi Nojima, Yutaka Hata, Hiroshi Nishina, Satoshi Itam, Akira Suzuki
Increased cancer susceptibility and embryonic lethality associated with double mutation of the Mob1A and Mob1B in mice
Keystone symposium 'The Hippo Tumor Suppressor Network: From Organ Size Control to Stem Cells and Cancer' Poster 2013年05月21日 Montelely