システム免疫学統合研究センター

Research Center for Systems Immunology

情報生物学分野
Division of Bioinformatics

教　授：須山　幹太
Professor：Mikita Suyama, Ph.D.

情報生物学分野では，計算機を用いたバイオインフォマティクス解析，特に，ゲノム配列やエピゲノムについてのデータの比較解析から，遺伝子の発現制御機構やその異常による疾患発症機序を解明することを目的にして研究を進めている．具体的には，がんゲノムコンソーシアムやエピゲノムコンソーシアムの進展により蓄積している生命医科学ビッグデータを積極的に活用し，がんの予後関連因子の探索や疾患関連遺伝子発現制御機構の解析を行っている．また，マイクロアレイや次世代シーケンサーといったハイスループットな技術革新に伴い，生命医科学全般においてバイオインフォマティクス解析，すなわち計算機を用いた大規模なデータ解析が必須となってきている．このような現状においては，実験生物学者と情報生物学者の連携が重要であり，そのため当研究室では積極的に共同研究を行うとともに，データ解析技術の普及にも務めている．

2020 年度（令和 2 年度）は，須山幹太（教授），菊竹智恵（助教），吉原美奈子（特任助教），久保田直人（学術研究員）吉村香（テクニカルスタッフ）に加え，大学院生 5 名，学部学生 3 名の体制で研究を進めた．2020 年 6 月に学術研究員の久保田直人が助教となった．

Ａ．非コード領域におけるがんドライバー変異の探索

がんは細胞の成長や増殖，細胞周期の調節不全を伴う細胞集団のことである．様々な要因により遺伝子上に変異が生じ，そして蓄積していくことでやがてがんが発症する．がんの進化過程では数多くの遺伝子変異が生じるが，その中でも特にがんの発生や進行に直接関与する遺伝子変異はがん治療における薬剤ターゲットとなりうるため，これまで数多くのがん関連遺伝子変異，すなわちがんドライバー変異が同定されてきた．しかし，このような変異情報によってがんについての十分な情報が得られたとは言い難い．なぜなら，これまでに同定された変異は主としてゲノム全長の約 2%を占めるコード領域における変異であり，残りの 98%を占める非コード領域における変異もまたがんの要因となり得るにもかかわらず非常に多くの変異を含むためにあまり研究が進んでいないからである．

そこで本研究では，非コード領域におけるがん関連変異を探索するため，変異のホットスポットに着目した．独立な複数のサンプルにおいてランダムに変異が生じると仮定した場合，同一箇所に変異が生じる可能性は極めて低い．したがって，ホットスポットを含む領域は，遺伝子の発現制御をはじめとする何らかの機能を持っていると考えられる．COSMIC データベースと TCGA データベースを用いて，非コード領域に存在す

る 21,574 のホットスポット変異を抽出した．この中から，エピゲノムデータおよびクロマチン立体構造データを用いて 580 のがん関連非コードホットスポット変異候補を同定した．この変異の 1 つは，*TEAD1* プロモーターと相互作用すると考えられている RREB1 結合部位に位置していた．本研究により，この変異が RREB1 の候補エンハンサー領域への結合を破壊し，TEAD1 発現レベルを増加させる可能性があることが示唆された（原著論文 4）．

B．免疫系疾患の発症リスクと関連する制御変異の探索

ヒト疾患の多くは一塩基変異（Single Nucleotide Variants: SNVs）などの複数の遺伝的要因の積み重ねによって引き起こされる多因子疾患である．これまで，SNVs と疾患との関連を調べる手法であるゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study: GWAS）が様々な疾患に対して実施されており，多くのリスク SNVs が同定されているが，報告されている SNVs はマーカーに過ぎず，実際に影響を及ぼしている機能変異の多くは未だ不明なままである．分子病態の詳細を理解するためには，機能変異を同定した上でそれぞれが遺伝子機能にどのような影響を及ぼしているのか，その作用機序を明らかにする必要がある．

本研究では，国際プロジェクトである ENCODE によって産生された血球系細胞の DNase I-seq データから予測された転写因子結合部位（TF footprints）と複数の量的形質座位（QTL）のデータ（eQTL: expression QTL, caQTL: chromatin accessibility QTL, bQTL: TF binding QTL, hQTL: histone modifications QTL）を統合することで，転写制御機構を変調させる変異（制御変異）の網羅的な探索を行い，免疫系疾患の発症リスクとの関連を解析した．その結果，免疫系疾患の発症リスクと関連する可能性がある制御変異候補を複数同定した．制御変異が存在するゲノム領域のクロマチン状態を解析したところ，制御変異は血球系細胞のエンハンサー領域に強くエンリッチしていた．さらに，特定の免疫系疾患と関連する制御変異が特定の細胞種および TF に強くエンリッチすることも明らかになった．また，多発性硬化症（multiple sclerosis）の発症リスクと関連する可能性のある変異 rs2291668 が，*TNFSF14* 遺伝子の第 2 エクソン内にある CD8 陽性 T 細胞特異的な転写因子 ZNF449 の結合部位に存在することを発見した．この結果は，非コード領域と同様に，コード領域も転写制御を変調させる変異を有しており，疾患発症リスクに影響を与える可能性を示唆している．以上より，これまで見過ごされていた制御変異と免疫系疾患の発症リスクとの関連が明らかになった．

C．In silico 解析による pseudo-exon activation の網羅的探索

遺伝性疾患の主な原因として，アミノ酸をコードするエクソン領域に変異が入ることが知られている．しかし，最近，アミノ酸をコードしていないイントロン領域に変異

が入ることで偶然，新規のスプライス部位を形成し異常なエクソン（pseudo-exon）が産生されて疾患の原因となる事例が報告されている．我々はこの pseudo-exon が健常者においても一定の頻度で見られる現象であると仮説をたて解析を行った．1000 人ゲノムプロジェクトより得られた個人の変異データと対応する個人の末梢血トランスクリプトームデータ 235 人分のデータを使用し解析を行った．その結果，今まで疾患の原因として散発的に報告されていた pseudo-exon activation という現象が，疾患の有無に拘わらず少なくとも個人当たり 10 個程度生じるものであることを明らかにした（原著論文 3）．

D．マイナースプライソソーム変異を有する疾患で生じる U12 型イントロンのスプライシング異常の同定とその機能解析

スプライシングは，U2 型（メジャー）イントロン，および U12 型（マイナー）イントロンが除去される 2 種類のタイプに分類される．U12 型イントロンは全イントロンの 0.5%以下であるため，これまではあまり着目されてこなかった．しかしながら近年，複数の神経変性疾患に対するマイナースプライソソーム構成因子の変異の関与が報告され始めている．これらの疾患では，スプライソソーム因子の変異がスプライシング異常をもたらすことが明らかになったが，実際に疾患発症へどのように関与しているのか詳細は不明である．そこで，マイナースプライソソーム構成因子の変異が生じる 2 つの神経変性疾患（FUS 変異を伴う筋萎縮性側索硬化症［ALS］，ZRSR2 変異を伴う骨髄異形成症候群［MDS］）において，スプライシングの指標である Percent Spliced In(PSI)を用いた解析によって，U12 型イントロンのスプライシング異常を同定した．次に，スプライシング異常の生じた遺伝子の翻訳産物に対して，アミノ酸翻訳変化，タンパク質ドメイン解析，Gene Ontology enrichment 解析を行うことでイントロン retention の翻訳産物への影響を調べた．スプライシング異常の同定では，ALS と MDS それぞれでイントロン保持を 21 個および 381 個同定し，それらの多くは未成熟終止コドン（PTC）や重要な機能ドメインへの挿入が生じることを明らかにした．また，イントロン保持が生じる遺伝子が，ALS や MDS 分子病態に関与すると考えられている遺伝子にエンリッチしていたことから，マイナースプライソソーム変異によって，ALS や MDS の病態関与遺伝子の多くにイントロン保持が生じることが疾患病態に関与している可能性が示唆された．

E．個人間で確認された exon-mediated activation of transcription starts (EMATS)

哺乳類の遺伝子では，スプライシングが転写とほぼ同時に起こる場合があり，これを共転写的スプライシングという．この状況下では，転写装置とスプライシング装置が空間的に近接するため，スプライシングが転写にフィードバックする可能性がある．

ごく最近，exon-mediated activation of transcription starts（EMATS）という現象が報告された．これはエクソンの inclusion が近接した転写開始点の活性を上昇させる転写促進機構である．EMATS について，ヒト個体間（個人間）に着目した研究はまだなされていない．ヒトは個人間で使われ方が異なるエクソンを持つことから，個人間で EMATS が起こり，発現量が変動することで個人の形質の差異を生み出す可能性があると仮説を立てた．この仮説を検証するために，我々は 1000 人ゲノムプロジェクトより得られた個人の変異データと対応する個人の末梢血トランスクリプトームデータ 235 人分のデータを使用し，個人間で EMATS が生じているかどうかについて解析を行った．その結果，EMATS が生じる可能性のある，転写開始点とエクソンのペアを 423 箇所同定した．また，一例として *ITPRIPL1* 遺伝子座の詳細な解析を行い，個人間で EMATS が起こりうることを示した．今後，個人の形質や疾患リスクと関連する EMATS を，網羅的に探索することが可能になれば，臨床医学への応用も期待できる．

業績目録

原著論文

1. Akatsuka S., Li G.H., Kawaguchi S., Takahashi T., Yoshihara M., Suyama M., Toyokuni S. (2020, Apr)
   Augmented oxidative stress increases 8-oxoguanine preferentially in the transcriptionally active genomic regions.
   Free Radic Res. *in press*.
2. Inada H., Udono M., Matsuda-Ito K., Horisawa K., Ohkawa Y., Miura S., Goya T., Yamamoto J., Nagasaki M., Ueno K., Saitou D., Suyama M., Maehara Y., Kumamaru W., Ogawa Y., Sekiya S., Suzuki A. (2020, Oct)
   Direct reprogramming of human umbilical vein- and peripheral blood-derived endothelial cells into hepatic progenitor cells.
   Nat Commun. 11:5292.
3. Sakaguchi N., Suyama M. (2021, Mar)
   In silico identification of pseudo-exon activation events in personal genome and transcriptome data.
   RNA Biol. 18:382-390.
4. Kikutake C., Yoshihara M., Suyama M. (2021, Mar)
   Pan-cancer analysis of non-coding recurrent mutations and their possible involvement in cancer pathogenesis.
   NAR Cancer. 3:zcab008.

学会発表

1. Chie Kikutake, Mikita Suyama. (2020, 10/1-3)
   Pan-cancer analysis for mutation hotspots in non-coding elements.
   第 79 回日本がん学会学術総会，広島（オンライン）.
2. 菊竹 智恵，須山 幹太．(2020, 12/2-4)
   Pan-cancer analysis for mutation hotspot in non-coding elements.
   第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン.
3. 坂口 愛美，須山 幹太．(2020, 12/2-4)
   個人ゲノムデータ及び RNA-Seq データを用いた偽エクソン活性化の網羅的探索.
   第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン.
4. Hyeon-jeong Kim, Minako Yoshihara, Mikita Suyama. (2020, 12/2-4)
   Comparative genomic analysis of inbred rat strains reveals the existence of ancestral polymorphisms.
   第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン.
5. 中村 香保莉，須山 幹太．(2020, 12/2-4)
   FUS 変異を伴う筋萎縮性側索硬化症によって引き起こされるマイナーイントロンスプライシング異常の同定.
   第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン.
6. 築山 菜緒，坂口 愛美，久保田 直人，須山 幹太．(2020, 12/2-4)
   Identification of exon-mediated activation of transcription starts (EMATS) in human individuals.
   第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン.
7. 内山 友哉，須山 幹太．(2020, 12/2-4)
   Transcriptome-wide analysis of alternative splicing in the long-lived Drosophila.
   第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン.
8. 木村 碧樹，須山 幹太．(2020, 12/2-4)
   RNA-seq を用いた遺伝子発現解析と HLA タイピングにより全身性エリテマトーデスを分類する.
   第 43 回日本分子生物学会年会，オンライン.

粘膜防御学分野

Division of Mucosal Immunology

教　授：澤　新一郎

Professor：Shinichiro Sawa, M.D., Ph.D.

粘膜組織は生体防御の最前線であり，感染症やアレルギーなど免疫が関与する種々の疾患の主座になりうる．当分野では，粘膜組織に局在する３型自然リンパ球(ILC3)や機能的間葉系細胞に注目し，宿主免疫系と共生微生物との双方向性活性化機構や平衡維持を担う原理原則の解明，免疫組織形成機構の解明を目指している．現在はマウス遺伝学と網羅的遺伝子発現解析を技術的な両輪とし，粘膜関連リンパ組織における細胞―細胞間ネットワークや腸管細胞―微生物間ネットワークの解明を進めている．これらの基礎的な研究が炎症性腸疾患や食物アレルギーなど，ヒトの粘膜組織を主座とする様々な疾患の病態解明へとつながると想定している．

令和２年度は科研費の基盤研究 B，日本医療研究開発機構 AMED 委託事業,科学技術振興機構 JST 委託事業などの研究費による支援をうけ，ILC3 の生体内機能解明，リンパ組織形成機構の解明，胎生期における骨髄形成機構の解明を行うとともに，ウイルス感染からの生体防御機構の解明に着手した．

Ａ．３型自然リンパ球による腸管粘膜制御機構の解明

ａ．3 型自然リンパ球特異的欠損マウスモデルの作出

自然リンパ球(Innate Lymphoid Cell=ILC)は T 細胞や B 細胞，NK 細胞とも起源を異にし，抗原受容体を有さないリンパ球群の総称である．このうち３型自然リンパ球(ILC3)は我々が 2008 年に発見し，腸管リンパ組織形成や腸管粘膜バリア機能の維持に極めて重要な役割を果たすことを報告した（Satoh-Takayama et al., Immunity, 2008; Sawa et al, Science, 2010）．ILC3 のうち，ckit^{high} CCR6 陽性分画はパイエル板や Cryptopatch などのリンパ組織に局在し，LTi-like 細胞と呼ばれている．しかし，腸管における LTi-like 細胞の役割は完全には明らかになっていない．我々は ILC3 特異的にジフテリア毒素受容体(DTR)を発現するマウスモデル(ILC3-iDTR マウス)の作出に成功し，ジフテリア毒素投与後の腸管 ILC3 分画の数的変化を詳細に解析した．その結果，ジフテリア毒素 1 回投与による LTi-like 細胞除去作用は極めて高く，数ヶ月単位で減少状態が維持されていた．

ｂ．腸管における 3 型自然リンパ球機能の解明

ジフテリア毒素を腹腔内に1回投与したILC3-iDTRマウスではLTi-like細胞のみならずパイエル板や腸間膜リンパ節におけるT細胞やB細胞数も激減した．パイエル板のリンパ濾胞の構造が崩壊していた．また，新生仔期よりLTi-like細胞を継続的に除去し続けたマウスでは離乳後に腸炎が自然発症した．これらの結果は，LTi-like細胞は成体リンパ組織の維持に極めて重要な役割を果たしていること，LTi-like細胞が腸管バリア機能の維持に中心的役割を担う ILC3 であることを強く示唆する内容である（現在論文投稿準備中）．

Ｂ．RANKL陽性間葉系細胞による免疫組織形成機構の解明

免疫系に重篤な欠損がある個体は新生児期の生体防御機構が働かず，生き延びることができない．特に粘膜組織は出生時に微生物が侵入する経路となるため，腸管上皮や粘膜関連リンパ組織（Gut-Associated Lymphoid Tissue=GALT）は個体の生死を分ける重要な免疫防御網として機能する．そこで，本分野では腸管免疫を担うパイエル板や腸管膜リンパ節，全血球系細胞の起源である骨髄が形成されるメカニズムを間葉系細胞に注目して解明する．

ａ．リンパ節形成機構の解明;リンパ節オーガナイザー細胞の同定

TNF ファミリーサイトカインの一種である RANKL はリンパ節形成に必須の分子であることが1990年代後半から知られていたが，リンパ節形成におけるRANKLの役割や産生細胞については不明な点が多かった．これまで我々はリンパ管内皮への RANKL 刺激がリンパ節形成に必須であることを証明している（Onder et al., Immunity, 2017）．今年度は，RANKL レポーターマウスや細胞系列特異的な RANKL 欠損マウスを用いた実験から，胎児期に RANKL を発現する間葉系細胞がリンパ節形成に必須の細胞であることを明らかにした．これまで，LTi 細胞と呼ばれるリンパ球とオーガナイザー細胞と呼ばれる間葉系細胞の双方向性活性化がリンパ節形成に重要であると提唱されてきたが，オーガナイザー細胞の実態は明らかでなく，リンパ節形成現象を時空間的に紐解くことは不可能であった．本研究結果は RANKL 陽性間葉系細胞こそが真のオーガナイザー細胞であることを世界に先駆けて提唱する貴重な内容である（現在論文投稿準備中）．

ｂ．パイエル板成熟機構の解明；MCi 細胞の時期特異的標識・追跡系の確立

パイエル板などの粘膜関連リンパ組織には上皮細胞の一種であるMicrofold細胞（M細胞）が存在し，管腔側から抗原を直接取り込む．我々はこれまでM細胞分化に必須の間葉系細胞（M cell inducer=MCi細胞）の同定に成功し，MCi細胞に発現する膜型サイトカインRANKLの重要性を明らかにしてきた（Nagashima et al., Nat Immunology,

2017）．M 細胞を欠損するパイエル板では B 細胞濾胞が低形成であり，腸内細菌特異的 IgA 産生が低下し，腸内細菌叢の構成が変容する．一方，M 細胞は無菌マウスにも存在するため，MCi 細胞の出現は腸内細菌非依存的で遺伝的にプログラムされた現象と考えられた（Nagashima et al., Biochem Biophys Res Commun., 2017）．しかし，MCi 細胞が個体発生のどの時期に出現し，M 細胞分化誘導を開始するか明らかでなかった．本年度は時期特異的な RANKL 発現細胞の標識・追跡が可能な RANKL-tTA;LC1;tdTomato マウスの作出に成功し，MCi 細胞が出生直後から 1 週間以内に出現することを明らかにした．新生児早期における MCi 細胞出現は腸内細菌の選択的定着や免疫系の成熟過程におけるターニングポイントと考えられるため，今後は MCi 細胞の起源や再生プロセスを解明してゆきたい．

ｃ．骨髄腔形成機構の解明；Fetal Osteoclast inducer 細胞の同定

野生型マウスの骨髄は出生時に形成され，造血を開始している．一方，RANKL を先天的に欠損するマウスは骨髄腔が狭小化し，骨髄外の組織で造血が行われる．新生児期以降の微生物生着に備え，粘膜バリア機能を維持するためには，骨髄造血を正常に行い，免疫細胞を粘膜組織に恒常的に供給する必要がある．マウスの大腿骨では胎生 15 日ごろから破骨細胞の作用による肥大軟骨の吸収と空洞形成が開始し，血管内皮と間葉系細胞から構成される骨髄が腔内に形成される．しかし，どのような分子メカニズムで胎児期の骨髄が形成されるか明らかになっていない．我々は胎生 15 日の RANKL レポーターマウスの大腿骨を組織学的に観察し，骨中央部に RANKL 陽性細胞が集積することを見出した．これらの RANKL 発現細胞を特異的に欠損させると破骨細胞分化誘導と骨髄腔形成が障害され，新生児期の骨髄が低形成になることが明らかになった．我々はこれらの RANKL 発現細胞を fetal Osteoclast inducer（fOci）細胞と命名し，マウス骨髄形成に不可欠な間葉系細胞として提唱した．遺伝子発現解析や細胞系譜解析の結果，fOCi は成体骨組織に存在する骨芽細胞，骨膜細胞，骨髄ストローマ細胞の共通前駆細胞に相当する細胞であることが明らかになった．

また，東京大学との共同研究により，関節リウマチの骨破壊には RANKL を産生する骨髄形質細胞が重要な役割を果たすことも報告した（原著論文 2）．

ｄ．胸腺髄質を構成する繊維芽細胞の同定

胸腺は自己と非自己が識別可能な T 細胞を教育，選択する免疫組織である．そのうち，髄質は自己反応性の T 細胞を除去する場所であり，自己抗原提示を行う髄質上皮細胞の研究がこれまで精力的に行われてきた．令和２年度は東京大学との共同研究により，胸腺髄質を構成する PDFGR 陽性 gp38 陽性 DPP4 陰性の線維芽細胞を同定した．

これらの線維芽細胞にはLTbRが高発現しており，自己応答性T細胞の負の選択に深く関わることを報告した（原著論文１）．

業績目録

原著論文

1. Nitta T., Tsutsumi M., Nitta S., Muro R., Suzuki E.C., Nakano K., Tomofuji Y., Sawa S., Okamura T., Penninger J.M., Takayanagi H. (2020, Oct)
   Fibroblasts as a source of self-antigens for central immune tolerance.
   Nat Immunol. 21(10):1172-1180.
2. Komatsu N., Win S., Yan M., Cong-Nhat Huynh N., Sawa S., Tsukasaki M., Terashima A., Pluemsakunthai W., Kollias G., Nakashima T. and Takayanagi H. (2021, Mar)
   Plasma cells promote osteoclastogenesis and periarticular bone loss in autoimmune arthritis.
   J Clin Invest. 131(6). *in pres*s.
3. Ito-Kureha T., Miyao T., Nishijima S., Suzuki T., Kozumi S.-I., Villar-Brioness A., Takahashi A., Akinama N., Morita M., Nagura I., Ishikawa H., Ichijo H., Akinama T., Yamamoto T. (2020, Dec)
   The CCR4-NOT deadenylase complex safeguards thymic positive selection by down-regulating aberrant pro-apoptotic gene expression.
   Nat Commun. 11(1):6169.

総説

1. 澤 新一郎.　(2020年8月)
   免疫組織線維芽細胞.
   実験医学　増刊号「線維化 慢性疾患のキープロセス」. 38(12):1982-1986.
2. 渡部 貴秀，澤 新一郎.　(2020年9月)
   自然リンパ球とサイトカイン.
   医学のあゆみ　別冊「サイトカインのすべて」. 123-129.

学会発表

1. 澤 新一郎.　(2020, 9/16-18)
   リンパ節形成を開始する細胞とは？
   第58回日本生物物理学会年会，群馬／オンライン.
2. 澤 新一郎.　(2020, 9/11-12)
   胎児期における免疫組織形成機構の解明
   第31回日本生体防御学会学術集会，熊本／オンライン.

アレルギー防御学分野
Division of Allergy and Immunology

准　教　授：伊藤　美菜子
Associate Professor：Minako Ito, Ph.D.

当分野は，中枢神経系疾患における免疫応答制御に関する研究進めている．多発性硬化症や抗 NMDA 受容体抗体脳炎などの自己免疫疾患だけでなく，パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患，さらには自閉症や統合失調症のような精神疾患においても免疫系の関与が示唆されている．脳内免疫においてはこれまではミクログリアを中心とした自然免役細胞が主な研究対象であったが，T 細胞や B 細胞などの獲得免役細胞も脳内に浸潤して脳内細胞を制御していることが明らかになりつつある．当研究分野では，脳梗塞マウスモデルを中心に，多発性硬化症・アルツハイマー病・統合失調症などの様々な中枢神経系疾患のマウスモデルを用いて病態の発症・収束・組織修復における免疫細胞の意義を解明することを目指している．具体的には，一細胞 RNA シークエンスや免疫染色などを用いて詳細に脳内免疫細胞の動態や意義を調べている．これらの解析を通じて脳内神経炎症にかかわる免疫系の共通原理を発見し，全く新しい治療法の開発につなげたいと考える．

当分野は令和 2 年 2 月 1 日に新設された分野で，令和 2 年度は伊藤美菜子（准教授），野口淑子（テクニカルスタッフ）によって研究を進めた．

Ａ．中枢神経系疾患における制御性 T 細胞の意義の解析

脳梗塞急性期，亜急性期にはマクロファージを中心とした自然免疫細胞が脳内に浸潤して炎症の遷延化，神経症状の悪化を引き起こす．また，脳梗塞慢性期における獲得免疫系の意義についても解析を行い，脳梗塞発症後２週間以上を経過したマウスの脳内には急性期よりもはるかに多くの T 細胞が浸潤しており，特に制御性 T 細胞（Treg）が大量に蓄積することを明らかにした．また脳 Treg は Areg や IL-33 受容体を発現するなど組織 Treg の性質も有しているが，脳特異的な性質も示していることを以前に報告している（Nature 2019）．多発性硬化症モデル（EAE）やアルツハイマーモデルマウスにおいても同様の性質を示す Treg の存在を確認することができた．EAE モデルは脊髄と脳の両方に病態を形成するが，同個体でも脊髄と脳に存在する Treg のフェノタイプは異なっており，脳に存在する Treg は脳梗塞の脳内に浸潤した Treg の特徴に近かった．これらの結果より，組織 Treg は病態よりも局在する組織の環境によって性質を獲得している可能性が示唆された．また脳 Treg の TCR レパトア解析から，脳 Treg は脳梗塞による組織障害によって放出される何らかの抗原を認識して活性化すると考えられるが，脳由来の自己抗原は未だ不明である．現在，抗原や抗原に対する抗体の同

定のために，脳梗塞後における脳内免疫細胞一細胞レベルでの TCR・BCR レパトアと遺伝子発現解析を行っており，抗原によるワクチン療法や抗体療法を目指している．

Ｂ．脳梗塞後の泡沫化細胞の解析

泡沫化細胞はアテローム性動脈硬化症の特徴である脂肪蓄積したマクロファージである．マクロファージが酸化された LDL などの脂質を貪食することで生じる．脳組織は脂質の多い組織であるため，脳梗塞後によって死んだ脳細胞や残骸をマクロファージやミクログリアが貪食し，その結果として，脳梗塞慢性期の脳梗塞巣に大量の泡沫化細胞が出現することを見出した．T 細胞と泡沫化細胞の関連を調べるために，T 細胞や Treg を欠損するマウスを用いて脳梗塞を作製したところ，T 細胞や Treg を欠損すると梗塞巣に泡沫化細胞や脂肪滴が残存しやすいことが分かった．脳に浸潤した Treg は，ABC（ATP-binding cassette）タンパクで，HDL コレステロールの産生に必須のトランスポーターである Abca1 や Abcg1 を高発現していることがわかった．また，脳 Treg は脂肪滴を細胞内に取り込んでいることが明らかになった．脳 Treg が直接的，もしくは間接的に脳に溜まった脂質の除去と泡沫化マクロファージの制御に関与することが示唆された．この現象は EAE マウスの Treg では認められず，脳梗塞後の脳 Treg 特異的であった．今後は，泡沫化細胞内に含まれる脂質の解析や，ミクログリアやマクロファージを特異的に除去することで泡沫化細胞の意義を解析することで，組織修復の促進を促すメカニズムの解明を目指す．

業績目録

原著論文

1. Imura Y., Ando M., Kondo T., Ito M., Yoshimura A. (2020, Jul)
   CD19-targeted CAR regulatory T cells suppress B cell pathology without GvHD.
   JCI Insight. 5(14):e136185.
2. Sakai R., Ito M., Yoshimoto K., Chikuma S., Kurasawa T., Kondo T., Suzuki K., Takeuchi T., Amano K., Yoshimura A. (2020, Oct)
   Tocilizumab monotherapy uncovered the role of the CCL22/17-CCR4+ Treg axis during remission of crescentic glomerulonephritis.
   Clin Transl Immunology. 9(11):e1203.
3. Sakai R., Ito M., Komai K., Iizuka-Koga M., Matsuo K., Nakayama T., Yoshie O., Amano K., Nishimasu H., Nureki O., Kubo M., Yoshimura A. (2020, Sep)
   Kidney GATA3+ regulatory T cells play roles in the convalescence stage after antibody-mediated

renal injury.

Cell Mol Immunol. *in press.*

総説

1. 伊藤 美菜子． (2020, Jul)
   脳梗塞後の神経症状回復を促す脳特異的制御性 T 細胞.
   医学のあゆみ．273(10):980-984.
2. 伊藤 美菜子，吉村 昭彦． (2020, Oct)
   脳内制御性 T 細胞による脳梗塞慢性期の神経修復.
   感染・炎症・免疫．50(2):84-93.
3. 伊藤 美菜子． (2020, Oct)
   組織 Treg における免疫リプログラミング.
   医学のあゆみ．275(1):108-112.
4. 伊藤 美菜子，大谷木 正貴，山本 伸一，吉村 昭彦． (2020, Nov)
   制御性 T 細胞と IL-33.
   臨床免疫・アレルギー科．74(5):470-476.

学会発表

1. 伊藤 美菜子． (2020, 9/10-12)
   Analysis of the dynamics of immune cells after stroke.
   第 63 回日本神経化学会，Web 開催.
2. 伊藤 美菜子． (2020, 9/15-17)
   脳梗塞後の免疫細胞の動態と炎症抵抗性の解明.
   第 93 回日本生化学会大会，Web 開催.
3. 伊藤 美菜子． (2020, 9/25-27)
   脳梗塞後の免疫細胞の動態と炎症抵抗性獲得機構の解明.
   第 20 回日本抗加齢医学会総会，東京.
4. 伊藤 美菜子． (2021, 1/24)
   神経精神疾患の発症における免疫細胞の意義の解明.
   第１１回日本自閉症学研究会，Web 開催.
5. 伊藤 美菜子． (2021, 3/26-28)
   Analysis of the Phenotype of Tregs after Ischemic Stroke, and the Interaction between Treg and Foam Cells.
   JCS2021 Secretariat/第 85 回日本循環器学会学術集会，Web 開催.

腫瘍防御学分野

Division of Cancer Genome Regulation

准　教　授：野島　孝之

Associate Professor：Takayuki Nojima, Ph.D.

当該分野は，ゲノムから転写されたばかりの RNA（新生 RNA）を調べることによって，ゲノム作動原理を明らかにすることを目標とする．具体的には，独自に開発した Pol II 転写装置-新生 RNA 解析法である mNET 法（Nojima et al., *Cell* 2015, Nojima et al., Nat Protocols 2016, Nojima et al., Mol Cell 2018a, Nojima et al., Mol Cell, 2018b）やその応用法 POINT 法（Sousa-Luis et al., Mol Cell 2021）を主なアプローチとし，転写中に生じる RNA プロセシングや転写終結，非コード RNA 遺伝子の転写制御機構の解明に取り組む．がん細胞でのゲノム作動機構破綻にも注目し，その分子機構解明から医療への応用にも貢献したい．

当該分野は，2021 年 2 月からスタートした新しい分野である．現在，准教授のみの研究室で令和 2 年度は研究室のセットアップに注力した．令和 3 年度からは，科研費帰国発展研究と JST 創発研究がスタートする．これらの研究費を中心にゲノム作動原理の解明に向けて以上に述べた研究を行う．

業績目録

原著論文

1. Sousa-Luís R., Dujardin G., Zukher I., Kimura H., Weldon C., Carmo-Fonseca M., Proudfoot N.J., Nojima T. (2021, Mar)
   POINT technology illuminates the processing of polymerase-associated intact nascent transcripts.
   Mol Cell. *in press.*
2. Larke M.S.C., Schwessinger R., Nojima T., Telenius J., Beagrie R.A., Downes D.J., Oudelaar A.M., Truch J., Graham B., Bender M.A., Proudfoot N.J., Higgs D.R. and Hughes J.R. (2021, Mar)
   Enhancers predominantly regulate gene expression during differentiation via transcription initiation.
   Mol Cell. 81(5):983-997.e7.
3. Tellier M., Zaborowska J., Caizzi L., Mohammad E., Velychko T., Schwalb B., Ferrer-Vicens I., Blears D., Nojima T., Cramer P. and Murphy S. (2020, Aug)
   CDK12 globally stimulates RNA polymerase II transcription elongation and carboxyl-terminal domain phosphorylation.

Nucleic Acids Res. 48(14):7712-7727.

学会発表等

1. Takayuki Nojima. (2020, 12/2)
   The orchestration of transcription and coupled RNA processing. [Invited Talk]
   第 43 回日本分子生物学会年会フォーラム「RNA が鍵となる遺伝子発現制御の未解決問題解明への挑戦」，オンライン.
2. Takayuki Nojima. (2020, 5/12-16)
   Intact nascent RNA-seq reveals RNA cleavage-mediated transcription termination. [Talk]
   Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, USA (Virtual).
3. Takayuki Nojima. (2020, 4/2)
   Gene regulation in brain tumor. [Invited Talk]
   CRUK-CBTCE Cambridge Seminar, UK (Virtual).

その他

1. Melina Casadio, Dan Simo. (2021, Mar)
   Interviewing for a PI position-the pandemic way.
   J Cell Biol. 220(4):e202102149.

防御分子構築学分野
Division of Molecular Design

Ⅰ．客員教授：山﨑　晶　Professor：Sho Yamasaki, Ph.D.

当分野では，免疫受容体を介した異物認識機構解明をテーマに研究を進めている．特に，T 細胞受容体及びレクチン受容体を対象とし，我々の免疫系が様々な「危機」から体を守るメカニズムの解明を目指すと共に，効率的な免疫賦活化，並びに，過剰な免疫応答に伴う疾患の治療に繋げる研究を続けている．

Ａ．免疫受容体による自己認識機構と免疫応答

生体は，様々な外敵から宿主を守るため，様々な免疫受容体を獲得してきた．免疫受容体としては，迅速で単純な応答を惹起する自然免疫受容体，複雑な応答を誘導する獲得免疫受容体が知られていた．一方，近年，その中間的な性質を有する受容体，インバリアント T 細胞受容体，レクチン受容体ファミリーが明らかとなってきた．当分野では，これらの受容体が交差認識する自己分子にも着目し，そのリガンドの同定と意義の解明，正常な認識機構の解明と破綻に基づく免疫疾患発症機序の理解を進めると共に，これらの研究成果に基づく新たな免疫賦活法，制御法の開発を目指している．

業績目録

原著論文

1. Timmer M.S.M., Teunissen T.J., Kodar K., Foster A.J., Yamasaki S., Stocker B.L. (2021, Mar)
   Cholesteryl glucosides signal through the carbohydrate recognition domain of the macrophage inducible C-type lectin (mincle).
   Org Biomol Chem. 19(10):2198-2202.
2. Shiga M., Miyazaki J., Tanuma K., Nagumo Y., Yoshino T., Kandori S., Negoro H., Kojima T., Tanaka R., Okiyama N., Fujisawa Y., Watanabe M., Yamasaki S., Kiyohara H., Watanabe M., Sato T.A., Tahara H., Nishiyama H., Yano I. (2021, Feb)
   The liposome of trehalose dimycolate extracted from M. bovis BCG induces antitumor immunity via the activation of dendritic cells and $CD8^+$ T cells.
   Cancer Immunol Immunother. *in press.*
3. Matsuoka T., Motozono C., Hattori A., Kakeya H., Yamasaki S., Oishi S., Ohno H., Inuki S. (2021,

Feb)
The effects of 5-OP-RU stereochemistry on its stability and MAIT-MR1 axis.
Chembiochem. 22(4):672-678.

4. Nagata M., Toyonaga K., Ishikawa E., Haji S., Okahashi N., Takahashi M., Izumi Y., Imamura A., Takato K., Ishida H., Nagai S., Illarionov P., Stocker B.L., Timmer M.S.M., Smith D.G.M., Williams S.J., Bamba T., Miyamoto T., Arita M., Appelmelk B.J., Yamasaki S. (2021, Jan)
Helicobacter pylori metabolites exacerbate gastritis through C-type lectin receptors.
J Exp Med. 218(1):e20200815.
5. Jin S., Vu H.T., Hioki K., Noda N., Yoshida H., Shimane T., Ishizuka S., Takashima I., Mizuhata Y., Beverly Pe K., Ogawa T., Nishimura N., Packwood D., Tokitoh N., Kurata H., Yamasaki S., Ishii K.J., Uesugi M. (2021, Jan)
Discovery of Self-Assembling Small Molecules as Vaccine Adjuvants.
Angew Chem Int Ed Engl. 60(2):961-969.
6. Reijneveld J.F., Holzheimer M., Young D.C., Lopez K., Suliman S., Jimenez J., Calderon R., Lecca L., Murray M.B., Ishikawa E., Yamasaki S., Minnaard A.J., Moody D.B., Van Rhijn I. (2021, Jan)
Synthetic mycobacterial diacyl trehaloses reveal differential recognition by human T cell receptors and the C-type lectin Mincle.
Sci Rep. 11(1):2010.
7. Nguyen T., Hosono Y., Shimizu T., Yamasaki S., Williams S.J. (2020, Dec)
Candida albicans steryl 6-*O*-acyl-α-D-mannosides agonize signalling through Mincle.
Chem Commun (Camb). 56(95):15060-15063.
8. Hollwedel F.D., Maus R., Stolper J., Khan A., Stocker B.L., Timmer M.S.M., Lu X., Pich A., Welte T., Yamasaki S., Maus U.A. (2020, Dec)
Overexpression of Macrophage-Inducible C-Type Lectin Mincle Aggravates Proinflammatory Responses to S*treptococcus pneumoniae* with Fatal Outcome in Mice.
J Immunol. 205(12):3390-3399.
9. Smith D.G.M., Ito E., Yamasaki S., Williams S.J. (2020, Oct)
Cholesteryl 6-*O*-acyl-α-glucosides from diverse *Helicobacter* spp. signal through the C-typelectin receptor Mincle.
Org Biomol Chem. 18(39):7907-7915.
10. Sato Y., Sato K., Yamamoto H., Kasamatsu J., Miyasaka T., Tanno D., Miyahara A., Kagesawa T., Oniyama A., Kawamura K., Yokoyama R., Kitai Y., Umeki A., Ishizuka S., Takano K., Shiroma R., Nakahata N., Kawakami K., Kanno E., Tanno H., Yamasaki S., Hara H., Ishii K., Kawakami K. (2020, Oct)
Limited Role of Mincle in the Host Defense against Infection with Cryptococcus deneoformans.

Infect Immun. 88(11):e00400-20.

11. Tanaka M., Saka-Tanaka M., Ochi K., Fujieda K., Sugiura Y., Miyamoto T., Kohda H., Ito A., Miyazawa T., Matsumoto A., Aoe S., Miyamoto Y., Tsuboi N., Maruyama S., Suematsu M., Yamasaki S., Ogawa Y., Suganami T. (2020, Nov)
    C-type lectin Mincle mediates cell death-triggered inflammation in acute kidney injury.
    J Exp Med. 217(11):e20192230.
12. Nasu J., Uto T., Fukaya T., Takagi H., Fukui T., Miyanaga N., Nishikawa Y., Yamasaki S., Yamashita Y., Sato K. (2020, Sep)
    Pivotal role of the carbohydrate recognition domain in self-interaction of CLEC4A to elicit the ITIM-mediated inhibitory function in murine conventional dendritic cells in vitro.
    Int Immunol. 32(10):673-682.
13. Arai Y., Torigoe S., Matsumaru T., Yamasaki S., Fujimoto Y. (2020, May)
    The key entity of a DCAR agonist, phosphatidylinositol mannoside Ac^1PIM^1: its synthesis and immunomodulatory function.
    Org Biomol Chem. 18(19):3659-3663.
14. Holzheimer M., Reijneveld J.F., Ramnarine A.K., Misiakos G., Young D.C., Ishikawa E., Cheng T.Y., Yamasaki S., Moody D.B., Van Rhijn I., Minnaard A.J. (2020, Jul)
    Asymmetric Total Synthesis of Mycobacterial Diacyl Trehaloses Demonstrates a Role for Lipid Structure in Immunogenicity.
    ACS Chem Biol. 15(7):1835-1841.
15. Braganza C.D., Motozono C., Sonoda K.H., Yamasaki S., Shibata K., Timmer M.S.M., Stocker B.L. (2020, May)
    Agonistic or antagonistic mucosal-associated invariant T (MAIT) cell activity is determined by the 6-alkylamino substituent on uracil MR1 ligands.
    Chem Commun (Camb). 56(39):5291-5294.
16. Smith D.G.M., Hosono Y., Nagata M., Yamasaki S., Williams S.J. (2020, Apr)
    Design of potent Mincle signalling agonists based on an alkyl β-glucoside template.
    Chem Commun (Camb). 56(31):4292-4295.
17. Omahdi Z., Horikawa Y., Nagae M., Toyonaga K., Imamura A., Takato K., Teramoto T., Ishida H., Kakuta Y., Yamasaki S. (2020, Apr)
    Structural insight into the recognition of pathogen-derived phosphoglycolipids by C-type lectin receptor DCAR.
    J Biol Chem. 295(17):5807-5817.
18. Watanabe M., Omahdi Z., Yamasaki S. (2020, Apr)
    Direct Binding Analysis Between C-Type Lectins and Glycans Using Immunoglobulin Receptor

Fusion Proteins.

Methods Mol Biol. 2132:119-128.

19. Toyonaga K., Yamasaki S. (2020, Apr)

Recognition of Mycobacteria by Dendritic Cell Immunoactivating Receptor.

Curr Top Microbiol Immunol. 429:103-115.

学会発表

1. 山崎 晶. (2020, 12/20)

脂質認識免疫受容体を標的としたワクチンアジュバントの開発.

第 24 回日本ワクチン学会シンポジウム，Web 開催.

2. 山崎 晶. (2021, 1/5)

自然免疫 T 細胞による抗原認識と疾患.

2020 年度徳島大学先端酵素学研究所・共同利用共同研究拠点成果報告会，Web 開催.

3. 山崎 晶. (2021, 3/24)

Helicobacter pylori による宿主脂質の病原因子への変換.

第 94 回日本細菌学会総会，Web 開催.

II．客員准教授：揚妻　正和　Associate Professor：Masakazu Agetsuma, Ph.D.

当部門では，「光学技術（光神経活動イメージング，光遺伝学など)」を開発・応用することで，情動を司る脳内情報処理様式の解明，そしてそこから精神疾患治療への新たな応用法の提案を目指している．本年度は昨年度に引き続き，情動記憶に関わる *in vivo* 神経活動イメージング，およびそれにより得られたデータの数理解析を中心に展開した．加えて，それら観察により検知された特徴的な変化の因果性を検証するために，光遺伝学をベースにした新たな光学系の構築と改良を推進した．

A．情動記憶に関する *in vivo* 神経活動イメージングと光遺伝学的活動操作

マウスの「内側前頭前野（mPFC)」はヒトの前頭前野背外側部に相当すると言われ，報酬記憶・嫌悪記憶といった様々な情動に関する記憶の管理を担う．

大脳皮質での情報処理においては，神経細胞集団は全体として精密に制御されなければならないことがこれまでに示唆されている．一方，実際どのような制御が脳機能の達成に重要であるかについては，情報論的な概念や仮説が提唱されるにとどまっている場合が多い．当部門ではこれまで，2 光子神経活動イメージング技術によりこの問題に着手し，さらに光遺伝学的な神経活動操作を同時に行う手法を確立することで，大脳皮質での神経集団による情報コーディング（population coding）の基盤について明らかにしてきた（Agetsuma et al., Cerebral Cortex, 2018）．現在はこれらの技術を応用し，擬似自由行動中のマウスにおける神経集団活動の経時的な計測と操作を行うことで，神経細胞集団による情動記憶の情報処理基解明を目指している．

観察対象部位としては，恐怖記憶との関連が指摘され，トップダウン的に恐怖反応を引き起こすと考えられている mPFC に着目している．多数の神経細胞からの活動記録を実現するために，2 光子神経活動イメージングを行った．すでに導入されているオリンパス社の多光子励起レーザー走査型顕微鏡 FVMPE-RS を利用し，レゾナントスキャナにより～200Hz の速度での観察を実現した．

過去の研究で，mPFC の一部，前辺縁皮質（PL）では，学習依存的な恐怖反応に伴って，神経活動の上昇が報告されている．すなわち，音と電気ショックの組み合わせで恐怖条件付けを行った場合，条件刺激である音に対しての神経活動は，学習の成立に伴い増加する（Sotres-Bayon and Quirk, Curr. Opin. Neurobiol., 2010）．一方，本能的なすくみ行動には関係がないことが知られており，学習依存的に PL での情報処理様式が変化し，そしてその「出力結果」として恐怖反応を引き起こしていると考えられる．それを受け，深部イメージングを行うための光学系・実験手法を確立し，PL を中心とした mPFC からの神経活動観察を進めた．遺伝子コード型カルシウムセンサーの利用により，長期的に細胞を標識し，同一の神経細胞群における学習経過を通じた神経発火パターンの変化についてのデータ取得を取得した．

さらにそこから，機械学習やグラフィカルモデルなどを利用した，イメージングデータの新規解析手法を確立し，神経細胞集団として恐怖記憶を制御するメカニズムに着目した研究を展開している．

その先には，ホログラムと光遺伝学を組み合わせた手法により，特定の神経細胞集団による恐怖記憶特異的な神経活動パターンの因果的な検証を進める．この目的のための新たな顕微鏡が本年度で概ね完成しており，論文化を進めると共に，上記解析から見出した要素の検証への応用も目指す．

B．全脳広域イメージングに向けた新規技術開発

脳は全体で一つの回路として様々な情報を並行処理している．そのため，その機能を理解する上では，より広範囲の細胞を同時に観察する技術が求められている．

そこで，根本研究室との共同研究を通じて，新規ナノ材料の高分子超薄膜（ナノシート）を頭蓋骨の代替物として活用し，上記 2 光子イメージング技術と融合させることで脳のより広域からの神経活動観察を実現するための手法を開発した（Takahashi et al., iScience, 2020）．

ナノシートとは，高分子を素材とする厚さ 100 nm 程度の薄膜であり，高い柔軟性，接着性，透明性を有する．従来用いられていたフッ素系樹脂ナノシートの表面に親水化処理が施され，生体組織に接着しやすいなどの特徴があり，脳表面の出血や炎症を抑制しながら，頭頂部のほぼ全域を透明なナノシートで覆うことが可能となる．本研手法により，麻酔をかけたハツカネズミの大脳皮質全層の神経細胞の詳細な構造を広範囲で観察できた．

今後は更に神経活動の詳細な記録へと，応用を進めていく．

業績目録

原著論文

1. Takahashi T., Zhang H., Kawakami R., Yarinome K., Agetsuma M., Nabekura J., Otomo K., Okamura Y., Nemoto T. (2020, Sep)
   PEO-CYTOP fluoropolymer nanosheets as a novel open-skull window for imaging of the living mouse brain.
   iScience, 23:101579.

総説

1. 揚妻 正和． (2021 年 3 月 25 日発刊)
   不安・恐怖・孤独の脳機構．

最新精神医学 〜特集「不安の精神医学」. 26(2):105-116.

学会・国際会議での発表（口頭）

1. Agetsuma M., Sato I., Tanaka Y., Kasai A., Arai Y., Yoshitomo M., Hashimoto H., Nabekura J., Nagai T. (2021, 3/30)
   光と数理による恐怖記憶における前頭前野情報処理機構の解明.
   第 98 回日本生理学会大会 / 第 126 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会，Web 開催.
   シンポジウム「大脳皮質局所神経回路構築と学習記憶によるリモデリング」にて招待講演.
2. Masakazu Agetsuma. (2021, 3/22)
   Optical and computational dissection of prefrontal neural ciruit for fear memory.
   第５回極みプロジェクト国際シンポジウム（オンライン参加）にて招待講演.
3. Agetsuma M., Sato I., Tanaka Y., Kasai A., Arai Y., Yoshitomo M., Hashimoto H., Nabekura J., Nagai T. (2021, 3/9)
   Optical and computational dissection of prefrontal neural circuit for fear memory.
   日本薬理学会第 94 回年会，札幌 / オンライン開催.
   シンポジウム「脳活動計測の新技術と数理解析の融合による情動研究の新展開」にて招待講演.

防御システム再生学分野

Division of Regeneration Biology

客員教授：松本　雅記

Professor：Masaki Matsumoto, Ph.D.

生命システムは核酸やタンパク質，さらには代謝物よりなる極めて複雑な分子ネットワーク構造の上に成り立っており，これら分子ネットワーク構造の破綻は，がんを始めとする多くの疾患の発症の要因になると考えられる．分子ネットワークの性質や動作原理を理解するためには，その主な構成因子であるタンパク質を正確に計測する必要がある．われわれは，これまでにタンパク質の発現量や翻訳後修飾，さらにはタンパク質間相互作用を網羅的かつ定量的に計測する様々な技術を開発してきた．特に，われわれが独自に開発した大規模なターゲットプロテオミクスのためのプラットフォームである iMPAQT（in vitro proteome assisted MRM for protein absolute quantification）は，任意の興味あるタンパク質の存在量を一斉に絶対定量可能な汎用的なタンパク質研究ツールである．これまでに，がん化や悪性進展において生じている代謝ネットワークにおける変化を iMPAQT を用いて精密定量することで, がん特有の代謝状態が生み出される機構やその意義を明らかにしてきた．さらに，現在，より簡単かつ正確に多数のタンパク質を精密絶対定量できる新技術の開発を進めている．これらのプロテオミクスの技術を複合的に利用することで，様々な疾患を分子ネットワーク構造の観点から理解することを目指している．

Ａ．精密定量プロテオーム解析技術による代謝研究

生体内で生じたがん細胞は様々な生体内環境に対して適応することで生き残り，より悪性度の高いがん細胞へと進化する．がん細胞において解糖系の亢進など代謝ネットワーク構造変化（＝代謝リモデリング）が生じていることは古くから知られており，環境適応によるがんの生存戦略に一役かっている可能性が高い．しかしながら，がん悪性進展と代謝リモデリングの関係性に関する研究は，１）代謝リモデリングを総体的・定量的に捉える手法の不足，２）がん悪性進展の途中過程を捉えることができないこと，によって大きく遅れてきた．我々は，独自のプロテオーム解析技術と悪性進展モデルを利用することでこれらの問題点を解消し，がん悪性進展における代謝リモデリングの意義を明らかにすることを目指している．本目的のために，我々は全タンパク質の絶対定量を可能とする画期的なプロテオーム解析法（iMPAQT 法：in vitro proteome assisted protein absolute quantification）を開発しており, 代謝リモデリングの全体像を正確に捉えることが可能である【Matsumoto et al. ***Nature Methods*** 2017】．ヒトの胎児肺に由来する線維芽細胞である TIG-3 は hTERT/SV40/cMyc でトランスフォームさせると（TSM 細胞），通常の２次元培養での増

殖能は著しく増加するが，足場非依存増殖能（コロニー形成能）は決して高くない．また，ヌードマウスでの造腫瘍能もほとんど有さないことがわかっている．この細胞を前がん状態細胞と仮定し，この細胞を試験管内で悪性進展させる方法を模索した．その結果，足場非依存培養を行うことで生き残った（コロニー形成した）細胞は親クローンに比べて高いコロニー形成能を有していることを見出した．この効果は足場非依存培養を繰り返すことでさらに増加し，造腫瘍能の高い細胞（Anchorage-independent growth: AIG 細胞）へと変化した．これら一連の悪性進展モデル細胞を対象に代謝酵素に対する iMPAQT 解析を実施したところ，グルタミンから核酸前駆体の合成にかかわる酵素 PPAT が悪性進展過程で増加していることを見出した．一方，グルタミンからグルタミン酸を産生する酵素である GLS1 が減少していた．そこで，これらの酵素の発現を人為的に操作したところ，予想通り PPAT/GLS の比率に応じて AIG 細胞の足場非依存増殖が変化した．この結果より，グルタミン代謝のバランスが悪性進展に重要な役割を担っていることが明らかとなった．
また，がんの対局にある細胞表現型として細胞老化があるが，ここでも代謝経路の再編成が生じていると思われる．老化細胞における代謝酵素の発現を iMPAQT を用いて正常細胞と比較したところ，GLS 1 の発現が著しく増加していることが明らかとなった．GLS1 の発言は老化細胞の生存に必須であり，これを抑制すると老化細胞を死滅させることが可能であることが判明した【Johmura Y, et al. ***Science*** 2021】．

B．タンパク質動態研究

タンパク質の発現量は大まかに mRNA の発現と相関するが，一部のタンパク質は mRNA の発現パターンと相関しないものも存在し，その量は多数の因子で規定されている．また，タンパク質の活性はその発現量だけでなく，安定性，複合体形成，翻訳後修飾，細胞内局在などによって制御されている．このようなタンパク質が発現してから機能を発揮するまでの一連の過程をタンパク質動態と呼ぶ．プロテオーム情報から細胞システムの状態を理解するには，このタンパク質動態およびその制御を定量的に俯瞰する必要がある．このような背景から，我々はタンパク質の翻訳後修飾や複合体解析を定量的に解析する手法を多数開発し，シグナル伝達やタンパク質分解制御の研究に応用してきた．その発展として，現在，細胞核内プロテオーム動態の解析法の構築を進めている．例えば，細胞を低張処理，ヌクレアーゼ処理，さらには高張処理を順次行うことで，細胞質タンパク質，ユークロマチン結合タンパク質，ヘテロクロマチン結合タンパク質を生化学的に分離する方法を確立した．この方法を正常細胞とその不死化株のプロテオームに適用したところ，不死化細胞ではクロマチンに結合しているプロテアソームの量が著減していることが明らかとなった【Kito Y., et al. ***Sci. Rep.*** 2020】．現在，インスリンなどのシグナル伝達によって生じるクロマチン画分のプロテオーム動態の解析を進めているところである．

C．プロテオミクス技術開発研究

iMPAQT は精密なタンパク質定量が可能なプラットフォームであるが，事前準備の煩雑さや，他の生物種への展開，さらにはデータ解析の手間など解消すべき技術的問題点が残っていた．そこで，異なる遺伝子産物に由来する高感度ペプチドだけを集積した人工遺伝子をデザインし，これをリジン・アルギニン要求性の大腸菌変異株中で安定同位体標識リジン・アルギニン存在下で発現させることで低コストかつ迅速に内部標準ペプチドを得ることができる仕組みを構築した．さらに，iMPAQT で用いる測定手法や解析ソフトウェア等も一新することでより大規模かつ容易にタンパク質の絶対定量を可能とする新たなプラットフォームである iMPAQT ver.2 を構築した．さらに，微量な試料からプロテオーム解析を可能とする手法である，iSPEC（in-line sample preparation for efficient cellular proteomics）法を構築した【Hata K., et al. ***Anal. Chem.*** 2020】．現在，これをさらに発展させ，よりスループットや感度の高い解析プラットフォームの構築を進めているところである．

業績目録

原著論文

1. Egami R., Kokaji T., Hatano A., Yugi K., Eto M., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K., Uematsu S., Terakawa A., Bai Y., Pan Y., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Uda S., Kubota H., Suzuki Y., Matsumoto M., Nakayama K.I., Hirayama A., Soga T., Kuroda S.* (2021, Feb)
   Trans-omic analysis reveals obesity-associated dysregulation of inter-organ metabolic cycles between the liver and skeletal muscle.
   iScience. 24(3):102217.
2. Johmura Y., Yamanaka T., Omori S., Wang T., Sugiura Y., Matsumoto M., Suzuki N., Kumamoto S., Yamaguchi K., Hatakeyama S., Takami T., Yamaguchi R., Shimizu E., Ikeda K., Okahashi N., Mikawa R., Suematsu M., Arita M., Sugimoto M., Nakayama K.I., Furukawa Y., Imoto S., Nakanishi M.* (2021, Jan)
   Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders.
   Science. 371(6526): 265-270.
3. Kokaji T., Hatano A., Ito Y., Yugi K., Eto M., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K.I., Egami R., Terakawa A., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Uda S., Kubota H., Suzuki Y., Ikeda K., Arita M., Matsumoto M., Nakayama K.I., Hirayama A., Soga T., Kuroda S.* (2020, Dec)
   Transomics analysis reveals allosteric and gene regulation axes for altered hepatic glucose-responsive metabolism in obesity.
   Sci Signal. 13(660):eaaz1236.

4. Tsukiyama T.*, Zou J., Kim J., Ogamino S., Shino Y., Masuda T., Merenda A., Matsumoto M., Fujioka Y., Hirose T., Terai S., Takahashi H., Ishitani T., Nakayama K.I., Ohba Y., Koo B.K. and Hatakeyama S. (2020, Sep)
   A phospho-switch controls RNF43-mediated degradation of Wnt receptors to suppress tumorigenesis.
   Nat Commun. 11(1):4586.
5. Fang Y., Akimoto M., Mayanagi K., Hatano A., Matsumoto M., Matsuda S., Yasukawa T.*, Kang D. (2020, Jul)
   Chemical acetylation of mitochondrial transcription factor A occurs on specific lysine residues and affects its ability to change global DNA topology.
   Mitochondrion. 53:99-108.
6. Nakagawa T., Hattori S., Nobuta R., Kimura R., Nakagawa M., Matsumoto M., Nagasawa Y., Funayama R., Miyakawa T., Inada T., Osumi N., Nakayama K.I., Nakayama K.* (2020, Apr)
   The Autism-Related Protein SETD5 Controls Neural Cell Proliferation through Epigenetic Regulation of rDNA Expression.
   iScience. 23(4):101030.
7. Kito Y., Matsumoto M.*, Hatano A., Takami T., Oshikawa K., Matsumoto A., Nakayama K.I.* (2020, Apr)
   Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin.
   Sci Rep. 10(1):5801.
8. Eguchi T.*, Sogawa C., Ono K., Matsumoto M., Tran M.T., Okusha Y., Lang B.J., Okamoto K., Calderwood S.K. (2020, Mar)
   Cell Stress Induced Stressome Release Including Damaged Membrane Vesicles and Extracellular HSP90 by Prostate Cancer Cells.
   Cells. 9(3):755.

学会発表等

1. 松本 雅記. (2021, 2/19)
   タンパク質の精密定量による生命システムの定量的描出.
   生体コモンスペース研究会，Web 開催. (特別講演)
2. 松本 雅記. (2020, 10/27)
   ペプチド先導型プロテオミクス～精密で信頼性の高いタンパク質定量技術～.
   CBI 学会 2020 年大会，Web 開催. (シンポジウム)
3. 松本 雅記. (2020, 8/17)
   多重ターゲットプロテオミクスを用いたタンパク質動態解析.
   第 93 回日本生化学会大会，Web 開催. (シンポジウム)