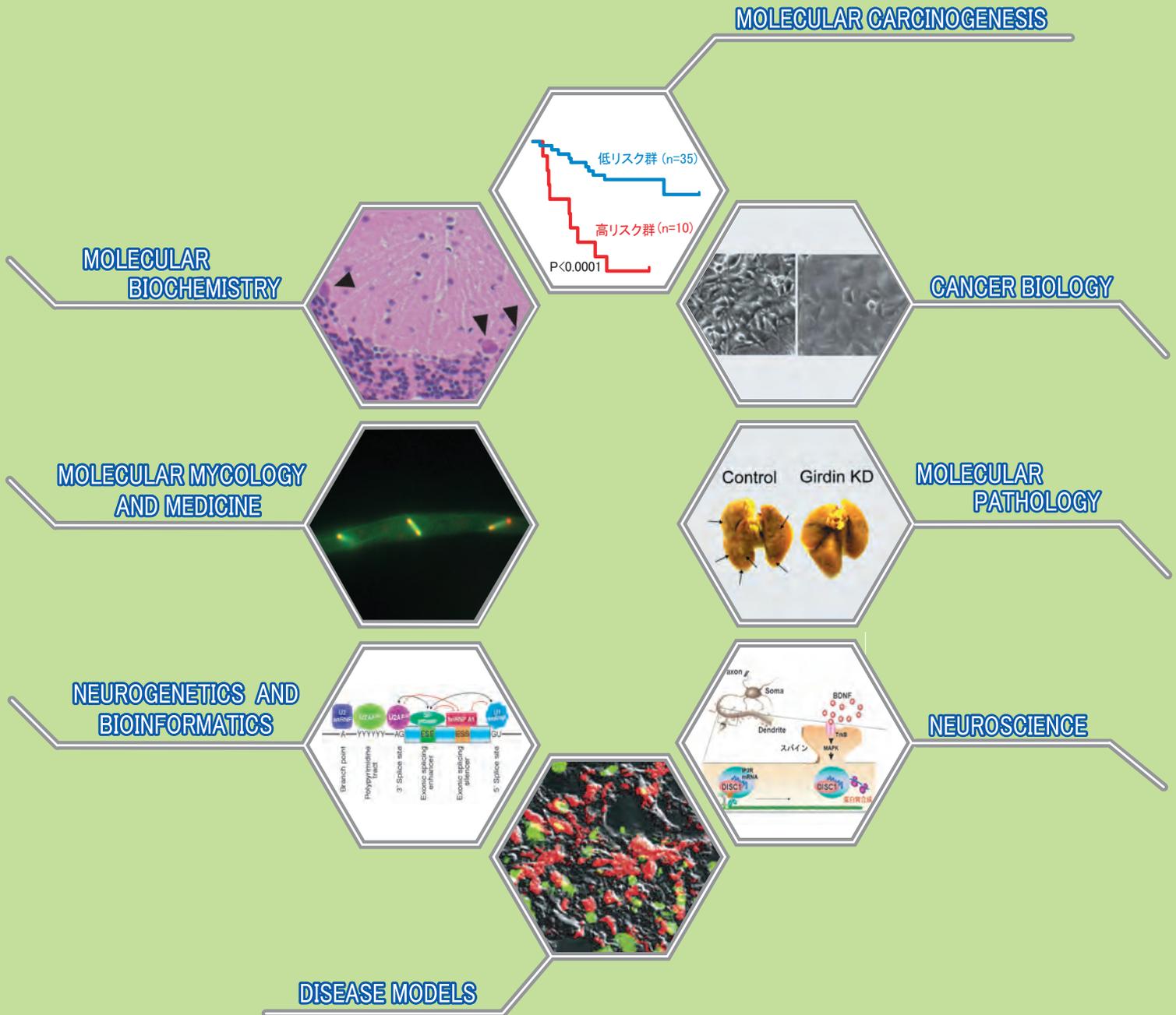


CENTER FOR NEUROLOGICAL DISEASES AND CANCER



名古屋大学・大学院医学系研究科附属

神経疾患・腫瘍分子医学研究センター

2009-2010



神経疾患・腫瘍分子医学研究センター年報 (2009－2010版)の発刊にあたって

センター長 高橋 雅 英

神経疾患・腫瘍分子医学研究センターも発足して8年が経過しました。このセンターのミッションは神経疾患とがん研究においてオリジナリティーの高い基礎研究から新たな診断・治療法の開発をめざすトランスレーショナルリサーチを統合的に推進することにあります。またグローバルCOEプログラム「機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点」と連携し、多くの大学院教育プログラムを通じて、独創性、国際性を兼ね備えた次世代の研究者の育成に



力を入れています。特に人材育成については、近年基礎医学を志す医学部出身者が減少し、全国的に基礎医学系教室の教員の中に占める医学部出身者の割合が急激に低下している問題がクローズアップされつつあります。この点については本年度から東京大学を中心に名古屋大学、京都大学、大阪大学の4大学で、医学部の学生を基礎医学研究に引きつけるための取り組みを始めることになり、第1回の会合が2月に東京大学で開催されました。このプロジェクトについては文部科学省から5年間予算がつくことになり、まずは4大学で基礎医学研究者育成のための取り組みを情報交換しながら、この8月に東京大学で4大学の医学部学生の交流会（1泊2日のリトリート）を行うことになりました。ぜひ学内の多くの先生方にもこのプロジェクトの意義を理解していただき、ご支援をお願いしたいと思っております。

またこの2年間、補正予算等により機器センターの共通機器の充実をはかり、研究基盤の充実に力をいれてきました。これにより基礎教室と臨床教室の交流がさらに進み、さまざまな共同研究が展開されることを心より願っております。わたしたちの研究センターは10年を時限としていますので、これまで積み上げてきた多くの研究成果をもとに、これから議論を重ね、新たな研究センターへと衣替えをし、発展させていきたいと考えております。研究センターのスタッフ一同、医学系研究科の研究推進力として、また研究者育成の場としてさらに力を発揮していく所存でありますので、皆様のご支援をひきつづきよろしく願いいたします。

Center for Neurological Diseases and Cancer

神経疾患・腫瘍分子医学研究センター Center for Neurological Diseases and Cancer (CNDC)

● 腫瘍病態統御部門 (Department of Oncology)

● 分子腫瘍学分野 (Division of Molecular Carcinogenesis)

教授 高橋 隆

● 腫瘍生物学分野 (Division of Cancer Biology)

准教授 千賀 威

● 発生・再生医学部門 (Department of Development)

● 分子病理学分野 (Division of Molecular Pathology)

教授 高橋 雅英

● 神経情報薬理学分野 (Division of Neuroscience)

教授 貝淵 弘三

● 先端応用医学部門 (Department of Advanced Medical Science)

● 機能分子制御学分野 (Division of Molecular Biochemistry)

教授 古川 鋼一

● 分子標的治療学分野 (Division of Molecular Mycology and Medicine)

准教授 中川 善之

● 神経遺伝情報学分野 (Division of Neurogenetics and Bioinformatics)

教授 大野 欽司

● 疾患モデル解析学分野 (Division of Disease Models)

准教授 武井 佳史

● 客員部門 (Guest Department)

● ポストゲノム疾患解析学分野 (Division of Post-Genomics and Disease)

客員教授 岡野 栄之

腫瘍病態統御部門

今やわが国において癌のために亡くなる人は、3人に1人になろうとしている。腫瘍病態統御部門においては、死亡原因の第一位である癌の征圧を目指し、その本態の解明を目指した基礎的研究から革新的な治療法開発にいたるまで、幅広く先端的研究を展開する。分子腫瘍学分野は、ヒト癌の発症と進展の分子機構の解明と得られた成果の革新的医療開発へのトランスレーションを目指し、とくにヒトゲノムに関する知見の集積を最大限に活用した研究を進める。腫瘍生物学分野は、癌細胞に特異的な増殖制御機構の解明や癌関連遺伝子遺産物の持つ生物活性の解明を進めるとともに、癌細胞の浸潤転移に関わる分子機構についても主な研究対象とする。

発生・再生医学部門

パーキンソン病を代表とする神経変性疾患や神経損傷に対する治療法の開発において、再生医学は大きな期待を集めている分野である。発生・再生医学部門は、神経細胞の正常な発生・分化の分子機序や神経損傷後の修復の分子機序の解明を推進することにより、神経系疾患の再生医療の開発を支える分子基盤の解明を目指す。また同時に、腎不全に苦しむ多くの患者のための新たな治療開発を目指して、腎臓という複雑な組織構築を有する臓器の発生の分子機序についても基礎的研究を進める。分子病理学分野では、神経栄養因子 GDNF とそのレセプターである RET チロシンキナーゼを介した神経細胞の生存・分化機構、腎臓の発生に関する研究及び神経変性疾患の治療法の開発研究を行う。神経情報薬理学分野では、神経細胞の軸索形成やシナプス形成、軸索ガイダンスの分子機構、損傷後神経修復の分子機構に関する研究を推進する。

先端応用医学部門

分子生物学、生化学、生理学、分子遺伝学の基礎研究を基盤とした悪性腫瘍・神経疾患の新たな診断法並びに治療法の開発を目指す。悪性腫瘍の発生と進展、神経変性などの病理的プロセスに普遍的に絡んでいる細胞増殖と分化及び死のシグナル調節の分子機構を解明し、その成果をふまえて難治性疾患の新規診断法や治療法の戦略を構築し応用化を実現する。種々の機能分子を siRNA によるノックダウンしたり、そのトランスジェニックおよびノックアウトマウスを樹立してモデル動物の利用を可能にしたりすると共に、その解析・応用により、シグナル分子の機能解明と悪性腫瘍・神経疾患の病態解明、ならびに診断法と治療法の開発を行う。トポイソメラーゼ、微小管、mRNA スプライソームを標的とした薬剤作用機構の解明と薬剤耐性機構を解明すると共に、癌関連糖鎖やその下流のシグナル分子を標的とする治療薬、新規抗癌剤、神経疾患治療薬の開発を目指す。また、悪性腫瘍・神経疾患の発症機構の解析結果をふまえて、生体内遺伝子導入・発現の制御に基づく新規治療のパラダイムを形成する。

分子腫瘍学分野

Division of Molecular Carcinogenesis

分子腫瘍学分野は、肺癌を中心に難治癌の発生・進展のメカニズムの解明を目指すとともに、革新的な診断・治療へのトランスレーションを目指して、多角的に研究を進めています。

それによって、難治癌の分子病態を一つの疾患として統合的に理解し、

得られた成果を難治癌の克服につなげていくことを目指しています。

当研究室の特徴の一つは、新しい研究分野やアプローチにも、

臆せず積極果敢に取り組む攻めの姿勢を取り続けているところです。

今後は、癌の分子病態を“システム”の異常として捉えることも目指していこうとしています。

●●● 構 成 員 ●●●

教 授 高橋 隆

講 師 鈴木 元

特任講師(高等研究院併任) 柳澤 聖

助 教 山口知也

GCOE特任助教 有馬千夏

研究補助員 島田友香子、富田たづ子、荒川未和、

堀田直恵、平岡道代

大学院生(博士課程)

黄勤森、西川恵理、曹科、松山恭士(消内)、田中繁(呼内)、加藤省一(病態診断)、細野祥之(胸外)、河原健夫(腫瘍外)、Hosseini Hedayatollah、Tai MeiChee

大学院生(修士課程)

杉山龍治、水谷栄梨

●●● 研究テーマの詳細 ●●●

I) ヒト肺癌の分子病態の解明を目指して：

i) 癌のリネッジ特異的な生存シグナル依存

肺の分化に必須な TTF-1 転写因子が、肺腺癌の発生と進展に大きく関与していることを世界に先駆けて明らかとし、現在さまざまな角度からその生存シグナルの全貌解明を目指しています。革新的な分子標的の同定と創薬開発にもつながるものと大いに期待しています(図1)。

ii) マイクロRNAの発現異常

私たちは世界に先駆けてマイクロRNAの発現異常が肺癌に高頻度に検出され、その生存・増殖や臨床病態に関わることを報告してきました。さらに、マイクロRNAとmRNAが織りなす複雑で精緻な制御ネットワークの全貌解明を目指した研究も進めています(図2)。

iii) 浸潤・転移の分子機構

極めて高い血行性及びリンパ行性転移能を持つヒト肺癌細胞亜株(LNM35株)を樹立し、それを用いて新規癌転移関連遺伝子として、ERストレス応答に関わるCIMや、細胞膜蛋白のCLCP1を同定し、その機能解析を進めています。

iv) ゲノム不安定性の獲得

DNAの複製と修復を担いゲノム安定性の維持に密接に関わるDNAポリメラーゼデルタの構成分子のPOLD4が、ヒト肺小細胞癌において異常な発現低下を示すことを発見し、その役割の解明を進めています(図3)。

II) 臨床現場へのトランスレーションを目指して：

i) ゲノミクス解析を基盤とする展開

肺腺癌の病型分類改訂に寄与したり、外科切除後の再発予測を可能としたり、遺伝子発現解析の臨床応用を進めています。さらに、マイクロRNAを含むノン

リネッジ特異的癌遺伝子TTF-1の
標的遺伝子Xは、格好の分子標的！

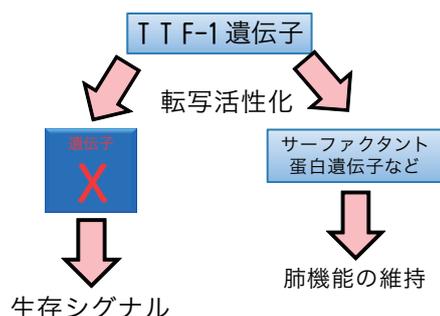


図1. 肺腺癌のリネッジ特異的生存シグナルへの依存の発見及び、その分子機序解明と応用



図2. がんにおけるマイクロRNAなどのノンコーディングRNAの異常の探索と、その役割のシステム的な理解

コーディングRNAのトランスクリプトーム解析とその応用を目指した研究を進めています。

ii) プロテオミクス解析を基盤とする展開

最新のプロテオミクス解析技術を駆使して、癌の発生・進展に関わる蛋白や、早期発見や薬剤感受性予測に有用なマーカー蛋白群の網羅的な探索・同定を進めています。

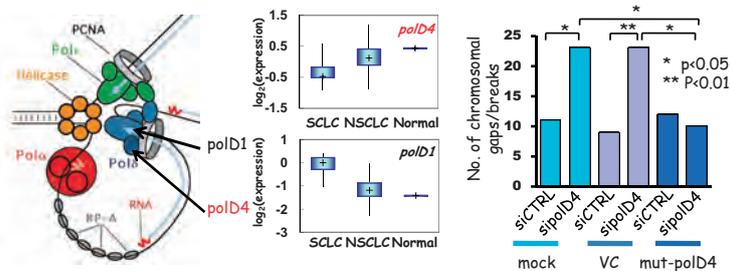


図3. 小細胞癌特異的なPOLD4発現低下と染色体異常の惹起

●●● 主な発表論文 ●●●

2009年

1. Tomida, S., Takeuchi, T., Shimada, Y., Arima, C., Matsuo, K., Mitsudomi, T., Yatabe, Y., and Takahashi, T. Relapse-related molecular signature in lung adenocarcinomas identifies patients with dismal prognosis. *J. Clin. Oncol.* 27:2793-2799, 2009.
2. Ebi, H.*, Tomida, S.*, Takeuchi, T., Arima, C., Sato, T., Mitsudomi, T., Yatabe, Y., Osada, H., and Takahashi, T. Relationship of deregulated signaling converging onto mTOR with prognosis and classification of lung adenocarcinoma shown by two independent in silico analyses. *Cancer Res.* 69: 4027-2035, 2009 (*equal contributors).
3. Ebi, H.*, Sato, T.*, Sugito, N., Hosono, Y., Suzuki, M., Yamaguchi, T., Yatabe, Y., Osada, H., and Takahashi, T. Counterbalancing influence of miR-17-92 overexpression on adverse effects of RB inactivation in lung cancers. *Oncogene* 28:3371-3379, 2009. (*equal contributors)
4. Suzuki M, Niimi A, Limsirichaikul S, Tomida S, Huang QM, Izuta S, Usukura J, Itoh Y, Hishida T, Akashi T, Nakagawa Y, Kikuchi A, Pavlov Y, Murate T, and Takahashi T. PCNA Mono-ubiquitination and Activation of Translesion DNA Polymerases by DNA Polymerase α . *J. Biochem.* 146:13-21, 2009.

2010年

1. Yanagisawa K, Konishi H, Arima C, Tomida S, Takeuchi T, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Osada H, and Takahashi T. Novel metastasis-related gene CIM functions in the regulation of multiple cellular stress response pathways. *Cancer Res.* 70:9949-58, 2010.
2. Huang, Q.A., Tomida, S., Masuda, Y., Arima, C., Cao, K., Kishahara, T., Osada, H., Yatabe, Y., Kamiya, K., Takahashi, T., and Suzuki, M. Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. *Cancer Res.* 70:8407-8416, 2010.
3. Tanaka, S., Cao, K., Niimi, A., Limsirichaikul, S., Huang, Q., Nakamura, N., Murate, T., Hasegawa, Y., Takahashi, T. and Suzuki M. Functions of base selection step in human DNA polymerase alpha. *DNA Repair* 9:534-541, 2010.
4. Matsuyama, Y., Suzuki, M., Arima, C., Huang, Q.M., Tomida, S., Takeuchi, T., Sugiyama, R., Itoh, Y., Yatabe, Y., Goto, H. and Takahashi, T. Proteasomal non-catalytic subunit PSMD2 as a potential therapeutic target in association with various clinicopathologic features in lung adenocarcinomas. *Mol. Carcinogenesis* (in press).
5. Huang, Q.A., Akashi, T., Matsuda, Y., Kamiya, K., Takahashi, T. and Suzuki, M. Roles of POLD4, smallest subunit of DNA polymerase δ , in nuclear structures and genomic stability of human cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 391:542-546, 2010.

●●● 競争的資金 ●●●

2009年度～2010年度

1. 文部科学省 特定領域研究 ヒト肺がんの個性解明と個別的分子診断・治療への展開(代表者：高橋隆 2009)
2. 日本学術振興会 基盤研究(A) 血中全蛋白MRM・MS解析とマイクロRNA網羅解析の革新と難治癌病態診断への応用(代表者：高橋隆 2009, 2010)
3. 文部科学省 新学術領域 ノンコーディングRNAによる発現統御ネットワークの解明に基づくがんの個性の描出(代表者：高橋隆 2010)
4. 文部科学省 グローバルCOEプログラム 機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点(代表者：祖父江元、分担者：高橋隆, 2009, 2010)
5. 厚生労働省 科学研究費 第3次対がん総合戦略研究事業 肺がんの浸潤・転移を抑制可能な分子標的の同定に基づく革新的テーラーメイド治療法の開発(代表者：高橋隆 2010)
6. 文部科学省 新学術領域 遺伝的揺らぎと孤発癌

- 発生機序解明のための双方向性研究(代表者：鈴木元 2009, 2010)
7. 日本学術振興会 基盤研究(C) がんの発生と悪性化に関わるゲノムINSTAビリティー関連遺伝子の単離(代表者：鈴木元, 2009, 2010)
8. 文部科学省 基盤研究(C) 血中分子シグネチャ解析法の開発と難治性呼吸器腫瘍診断への応用(代表者：柳澤聖 2010)
9. 日本学術振興会 若手研究(B) ヒト肺がんの発生・進展プロセスに関わる新たなりネジ特異的生存シグナル制御機構の解明(代表者：山口知也 2009)
10. 日本学術振興会 若手研究(B) ヒト肺がんの発生・進展過程におけるリネジ特異的シグナルの統御メカニズムの解明(代表者：山口知也 2010)
11. 日本学術振興会 スタートアップ 網羅的発現データを用いた肺癌機能機序の解明(代表者：有馬千夏 2009, 2010)



出し、研究を進めている。例えば、Supervillin (SVIL) というタンパク質は、分裂期に Central spindle と呼ばれる部位にモータータンパク質により運ばれ、そこでリン酸化されることにより、アクチンとミオシンからなる収縮環の形成を制御する。SVIL の発現を抑制すると、収縮環は十分に形成されず、収縮の途中において収縮環が崩壊する。SVIL 以外にも我々は SHCBP1 というタンパク質が分裂に必須であることを見出して

いる。SHCBP1 は分裂時に midbody に局在し、細胞分裂の最終段階である細胞膜の切断に重要である。また、SHCBP1 は Centralspindlin という複合体と結合し、その安定化を介して細胞分裂を制御していると推測される。我々はこれらのタンパク質の機能解析を通し、細胞分裂の複雑な制御機構の一端を解明し、これらの制御異常と癌の形成との関連について研究を深めたいと考えている。

●●● 主な発表論文 ●●●

2009年

1. Characterization of interaction between CLP36 and palladin. Maeda M, Asano E, Ito D, Ito S, Hasegawa Y, Hamaguchi M, Senga T. *FEBS J.* 276(10):2775-85.
2. A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells. Hasegawa H, Senga T, Ito S, Iwamoto T, Hamaguchi M. *Exp Cell Res.* 315(8):1384-92.
3. Phosphorylation of histone H3 at Ser10: its role in cell transformation by v-Src. Tange S, Ito S, Senga T, Hamaguchi M. *Biochem Biophys Res Commun.* 386(4):588-92.

2010年

1. Recovery of Anoikis in Src-Transformed Cells and Human Breast Cancer Cells by Restoration of the SIRP α /SHP-2 Signaling System. Hara K, Senga T, Biswas MH, Hasegawa H, Ito S, Hyodo T, Hirooka Y, Niwa Y, Goto H, Hamaguchi M. *Cancer Res.* In press
2. The roles of two distinct regions of PINCH-1 in the

- regulation of cell attachment and spreading. Ito S, Takahara Y, Hyodo T, Hasegawa H, Asano E, Hamaguchi M, Senga T. *Mol. Biol. Cell.* 23:4120-9
3. PI3K/Akt signaling is involved in the disruption of gap junctional communication caused by v-Src and TNF-alpha. Ito S, Hyodo T, Hasegawa H, Yuan H, Hamaguchi M, Senga T. *Biochem Biophys Res Commun.* 400:230-5
4. Cas utilizes Nck2 to activate Cdc42 and regulate cell polarization in response to wound healing. Funasaka K, Ito S, Hasegawa H, Goldberg GS, Hirooka Y, Goto H, Hamaguchi M, Senga T. *FEBS J.* 277:3502-13
5. Silencing of Tausled-like kinase 1 sensitizes cholangiocarcinoma cells to cisplatin-induced apoptosis. Takayama Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, Ito S, Nagino M, Hamaguchi M, Senga T. *Cancer Lett.* 296:27-34
6. S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion. Rahman MA, Senga T, Ito S, Hyodo T, Hasegawa H, Hamaguchi M. *J. Biol. Chem.* 285:3806-14

●●● 競争的資金 ●●●

1. 文部科学省 基盤研究 (C) 細胞質分裂に必須な遺伝子である Supervillin (SVIL) の機能解析 (研究代表者 千賀威)
2. 文部科学省 基盤研究 (C) 細胞分裂における Mink1 の機能解析 (研究代表者 伊藤聡子)
3. 文部科学省 基盤研究 (A) Nek2 を標的にした包括的癌治療法の開発とそのトランスレーショナ

- ルリサーチ (研究分担者 千賀威)
4. 佐川がん研究助成金 卵巣癌の上皮間葉形質転換、浸潤転移を制御する新たな分子機構の解析 (研究代表者 千賀威)
5. 共財団医学研究奨励助成金 細胞分裂における新たな制御因子の解析 (研究代表者 伊藤聡子)

分子病理学分野

Division of Molecular Pathology

分子病理学分野では種々の受容体型チロシンキナーゼおよびその下流で働く細胞内シグナル伝達因子の機能、特に細胞運動の制御機構について研究を行っている。最近われわれの研究室で新たに同定したAktキナーゼの基質でアクチン結合蛋白であるGirdinおよびそのファミリー蛋白の機能について、細胞レベル、個体レベルでの研究を推進し、がんの浸潤・転移、血管新生、神経新生における役割の解明を中心テーマとしている。

●●● 構 成 員 ●●●

教 授 高橋雅英

准教授 浅井直也

GCOE 特任講師 浅井真人

大学院 (博士課程)

三井伸二、高岸麻紀、王 芸、岩越朱里、翁 良、服部行紀、北村彩、松下悦史 (循環器内科)、斎藤尚二 (腎臓内科)、小原圭 (消化器内科)、櫻井麻衣子 (産婦人科)、

山村由美子 (循環器内科)、坂倉寛紀 (口腔外科)、宮地紘樹 (血管外科)

《共同研究ユニット》

腫瘍病理学准教授 村雲芳樹

腫瘍病理学助教 加藤琢哉

高等研究院講師 榎本 篤

●●● 研究テーマの詳細 ●●●

Girdinのノックアウトマウスを作製し、表現型の解析を行った。ノックアウトマウスは生後4週間以内に死亡するが、その原因は現時点では不明である。ノックアウトマウスの組織学的な解析を中枢神経系に注目し解析した結果、海馬歯状回と嗅球の形態に異常があることが判明した(図1)。海馬歯状回ではdoublecortin陽性の神経前駆細胞の位置異常が見られた。正常マウスでは神経前駆細胞は海馬歯状回のsubgranular zone (以下SGZ)に一層から数層に限局して存在するのに対し、ノックアウトマウスでは顆粒層の中やそれを超えた分子層に局在していた(図1)。Girdinのshort hairpin RNAをレトロウイルスベクターに組み込み、海馬歯状回の神経前駆細胞に発現させたところ、ノックアウトマウスで観察されたように、神経細胞の位置異常を生

じた。また嗅球の形成異常については、脳室周囲の脳室下帯(subventricular zone, 以下SVZ)から産生される神経前駆細胞が嗅球に向かって移動する過程において、遅延を生じていることが原因であった。そのためその経路であるrostral migratory system (RMS)の幅が著しく拡大していた(図1)。この結果はGirdinが生後の海馬や嗅球の形成における神経前駆細胞の移動や位置決定に重要な役割を有する分子であることを示唆している。

Girdinとの結合蛋白を解析した結果、統合失調症や双極性障害(躁うつ病)の脆弱因子として最近注目されているDISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1)と分子複

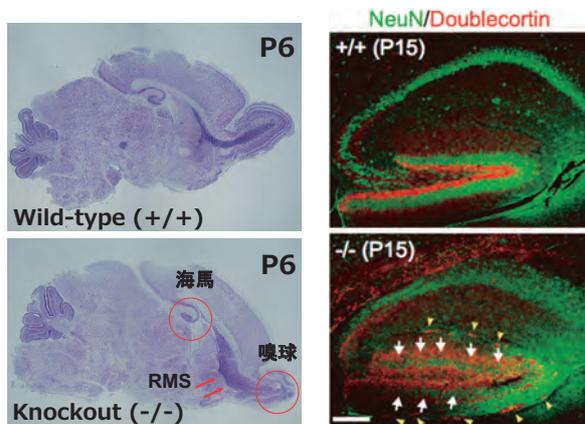


図1. Girdinノックアウトマウスでは海馬、RMS、嗅球の異常がみられる(左下図) 海馬歯状回ではdoublecortin陽性の神経前駆細胞(赤)の位置異常が生じる(右下図)

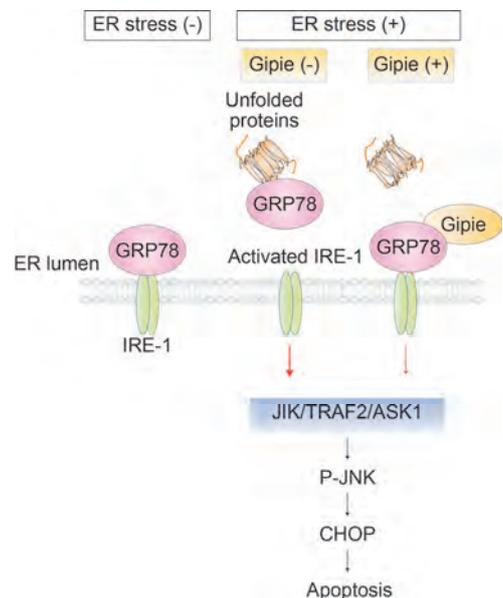


図2. Girdinファミリー蛋白GipieのERストレス反応の調節

合体を形成し、海馬における神経前駆細胞の移動と分化を制御している可能性を示す結果を得た。ラットの海馬を培養し、Girdinの発現をノックダウンした結果、神経突起の長さや数が有意に減少したことから、海馬神経細胞の神経突起の形成や成熟に関与しているもと考えられた。この結果と一致して、Girdinノックアウトマウスでは歯状回の顆粒層から海馬のCA3領域へ投射される軸索であるmossy fiberの形成が著しく障害されていた。今後さらにGirdinを介したこれらの神経系の形成の分子機序を結合蛋白の同定などを通して、より詳細に解析する予定である。

Girdinのファミリー蛋白でGipie (GRP78-interacting protein induced by ER stress) と名付けた蛋白の機能解析を行った。Gipieは1476アミノ酸からなる蛋白をコードし、おもに血管内皮細胞とマクロファージに発現していた。細胞内ではERとゴルジ体に発現しており、種々のERストレス負荷により発現が増強した。機能解析の結果、GipieはERストレスに参与するGRP78とIRE1の結合を安定化させることによりIRE1によるJNK活性を抑制し、ERストレスによる細胞死を抑制した(図2)。よって、GipieはERストレス反応の調節因子であり、細胞保護作用を有すると考えられた。

●●● 代表的論文 ●●●

1. Kato, T., Shimono, Y., Hasegawa, M., Jijiwa, M., Enomoto, A., Asai, N., Murakumo, Y. and Takahashi, M. Characterization of the HDAC1 complex that regulates the sensitivity of cancer cells to oxidative stress. *Cancer Res.* 69: 3597-3604 (2009).
2. Chi, X., Michos, O., Shakya, R., Riccio, P., Enomoto, H., Licht, J.D., Asai, N., Takahashi, M., Ohgami, N., Kato, M., Mendelsohn, C. and Costantini, F. Ret-dependent cell rearrangements in the Wolffian duct epithelium initiate ureteric bud morphogenesis. *Dev. Cell* 17: 199-209 (2009).
3. Enomoto, A., Asai, N., Namba, T., Wang, Y., Kato, T., Tanaka, M., Tatsumi, H., Taya, S., Tsuboi, D., Kuroda, K., Kaneko, N., Sawamoto, K., Miyamoto, R., Jijiwa, M., Murakumo, Y., Sokabe, M., Seki, T., Kaibuchi, K. and Takahashi, M. Roles of Disrupted-in-Schizophrenia 1-interacting protein Girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 63: 774-787 (2009).
4. Tsukamoto, H., Kato, T., Enomoto, A., Nakamura, N., Shimono, Y., Jijiwa, M., Asai, N., Murakumo, Y., Shibata, K., Kikkawa, F. and Takahashi, M. Expression of Ret finger protein correlates with outcomes in endometrial cancer. *Cancer Sci.* 100: 1895-1901 (2009).
5. Lu, B., Cebrian, C., Chi, X., Kuure, S., Kuo, R., Bates, C.M., Arber, S., Hassell, J., MacNeil, L., Hoshi, M., Jain, S., Asai, N., Takahashi, M., Schmidt-Ott, K., Barasch, J., D'Agati, V. and Costantini, F. Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis. *Nature Genet.* 41: 1295-1302 (2009).
6. Hagiwara, S., Murakumo, Y., Mii, S., Shigetomi, T., Yamamoto, N., Furue, H., Ueda, M. and Takahashi, M. Processing of CD109 by furin and its role in the regulation of TGF-beta signaling. *Oncogene* 29: 2181-2191 (2010).
7. Kurotsuchi, A., Murakumo, Y., Jijiwa, M., Kurokawa, K., Itoh, Y., Kodama, Y., Kato, T., Enomoto, A., Asai, N., Terasaki, H. and Takahashi, M. Analysis of DOK-6 function in downstream signaling of RET in human neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 101: 1147-1155 (2010).
8. Ohgami, N., Ida-Eto, M., Shimotake, T., Sakashita, N., Sone, M., Nakashima, T., Tabuchi, K., Hoshino, T., Shimada, A., Tsuzuki, T., Yamamoto, M., Sobue, G., Jijiwa, M., Asai, N., Hara, A., Takahashi, M. and Kato, M. c-Ret-mediated hearing loss in mice with Hirschsprung disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 13051-13056 (2010).
9. Miyamoto, R., Jijiwa, M., Asai, M., Kawai, K., Ishida-Takagishi, M., Mii, S., Asai, N., Enomoto, A., Murakumo, Y., Yoshimura, A. and Takahashi, M. Loss of Sprouty2 partially rescues renal hypoplasia and stomach hypoganglionosis but not intestinal aganglionosis in Ret Y1062F mutant mice. *Dev. Biol.* 349: 160-168 (2011).
10. Matsushita, E., Asai, N., Enomoto, A., Kawamoto, Y., Kato, T., Mii, S., Maeda, K., Shibata, R., Hattori, S., Hagikura, M., Takahashi, k., Sokabe, M., Murakumo, Y., Murohara, T. and Takahashi, M. Protective role of Gipie, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cell. *Mol. Biol. Cell.* in press.

●●● 競争的資金 ●●●

2009年度

1. 基盤研究(A) Aktの新規基質Girdinとそのファミリー分子の機能多様性と病態における役割(研究代表者 高橋雅英)
2. 特定領域研究(がん特性)受容体型チロシンキナーゼによる増殖シグナルの制御機構(研究代表者 高橋雅英)
3. 基盤研究(C) Retチロシンキナーゼによって誘導されるアポトーシスの解析と病態における役割(研究代表者 浅井直也)
4. グローバルCOEプログラム 機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点(研究代表者 祖父江元)

2010年度

1. 基盤研究(A) Aktの新規基質Girdinとそのファミリー分子の機能多様性と病態における役割(研究代表者 高橋雅英)
2. 新学術領域研究(修飾シグナル病) Aktキナーゼによるアクチン結合蛋白Girdinのリン酸化修飾と疾患(研究代表者 高橋雅英)
3. 基盤研究(C) Retチロシンキナーゼによって誘導されるアポトーシスの解析と病態における役割(研究代表者 浅井直也)
4. グローバルCOEプログラム 機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点(研究代表者 祖父江元)

神経情報薬理学分野

Division of Neuroscience

細胞は固有の機能を果たすために高度に極性化している。
神経細胞は1本の軸索と複数の樹状突起という極性を持ち、
方向性を持った情報の流れを作り出している。遊走細胞は前後軸を形成し効率的に移動する。

我々の研究室では神経細胞および遊走細胞を用いて
細胞が極性を確立する分子メカニズムの解明を目指している。
さらに、重篤な精神疾患である統合失調症の発症機序を細胞レベル、
分子レベルで明らかにする研究を進めている。

●●● 構 成 員 ●●●

教授 貝淵弘三
准教授 天野陸紀
講師 森 大輔
助教 西岡朋生、坪井大輔、難波隆志
PDF 飯塚幸彦

大学院生
伊藤教道、黒田啓介、浦口淳子、飯塚美知郎、中牟田信一、佐藤和秀、船橋靖広、舟橋祐介、藤野泰孝、掛布真愛、松沢健司、松井利憲、濱口友成、原田英典、瀧健太郎、藤末慎、横井敬子、桑田亮、加藤勝洋(循環器内科)

●●● 研究テーマの詳細 ●●●

1) 統合失調症の発症機構の解明

統合失調症は全人口の約1%が発症する重篤な精神疾患である。統合失調症の発症には遺伝的背景が大きく関与する。統合失調症の病態は神経伝達物質の産生や受容体の機能異常によるものとされていたが、現在では神経の発生・発達段階における障害が大きく関与していると考えられている。

我々は、神経発達に関連する統合失調症発症脆弱性因子(DISC1、Dysbindin、Neuregulin-1、CRMP-2など)に焦点を当て、その生理機能や分子間ネットワークを解明することにより、統合失調症の分子病態を明らかにすることを試みている。これまでに、Nudel複合体、Kinesinモーター、Girdin、HZF(mRNA結合蛋白質)、Neuregulin-1、Kalirinなどを含む122種類のDISC1結合蛋白質を同定した。DISC1はNudel複合体、GirdinをKinesinモーターに繋ぐカーゴアダプターとして働き、それら分子の細胞内輸送を制御することを示した。

また、HZFと協調して特定のmRNA(IP3受容体のmRNA)の樹状突起への輸送とスパインにおけるBDNF依存的局所翻訳を制御していることを見出した(図1)。これらの結果は、DISC1がscaffold蛋白質として、神経回路形成やシナプス可塑性に重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、DISC1のノックアウトマウスの作製に成功し、DISC1が不安や感覚情報処理に関与することを見出している。

2) 小胞・分子輸送と極性形成

伸長する軸索や遊走する細胞では、突起先端や遊走先端に向かって膜を伸長させ、様々な受容体や接着分子を供給している。このために、極性を有し、かつ選択的な小胞輸送が必要とされる。我々は海馬初代培養細胞において、CRMP-2がSlp1/Rab27を介して神経栄養因子の受容体であるTrkBと結合することを見出した。CRMP-2がカーゴアダプターとしてKinesin-1によるTrkBを含む小胞の軸索遠位方向への輸送を調節していることを示し、このことが神経突起の極性化(軸索の運命決定)に寄与すると考えている(図2)。

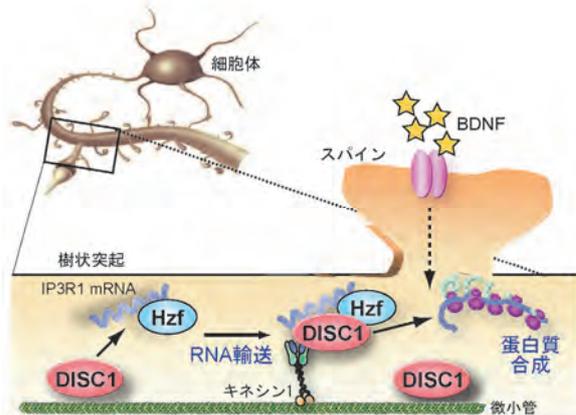


図1. 成熟海馬神経におけるDISC1の分子機能モデル

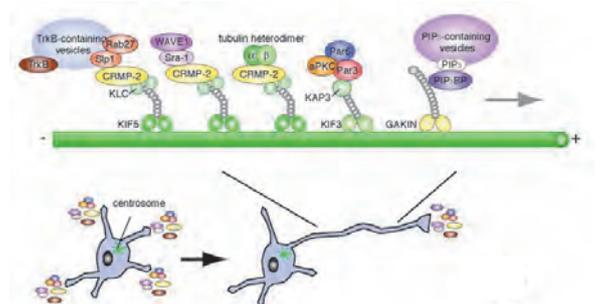


図2. CRMP-2を介した選択的蛋白質・小胞輸送

3) Rho-キナーゼと極性を制御するプロテインキナーゼの基質探索

キナーゼは多種多様な生命現象において重要な役割を担っており、キナーゼの基質を同定することはその分子基盤を明らかにするために必要であるが、未だに簡便かつ効率良く基質を同定することは困難である。我々はRho-キナーゼや極性を制御するキナーゼ (aPKC, MARK等) に注目し、その触媒領域に相互作用する蛋白質を網羅的に同定することで効率よく基質のスクリーニングを行うことに成功しつつある(図3)。この方法によりRho-キナーゼの新規基質として Doublecortin, AP180, Amyloid precursor proteinなどを同定した。

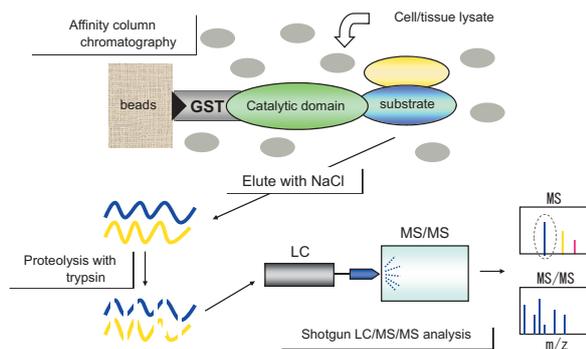


図3. インタラクトームを基盤としたキナーゼの基質の探索

●●● おもな発表論文 ●●●

2009年

1. Arimura, N., Kimura, T., Nakamuta, S., Taya, S., Funahashi, Y., Hattori, A., Shimada, A., Menager, C., Kawabata, S., Fujii, K., Iwamatsu, A., Segal, R. A., Fukuda, M., and Kaibuchi, K. Anterograde transport of TrkB in axons is mediated by direct interaction with Slp1 and Rab27. *Dev Cell* 16, 675-686
2. Watanabe, T., Sato, K., and Kaibuchi, K. Cadherin-mediated Intercellular Adhesion and Signaling Cascades Involving Small GTPases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a003020
3. Hikita, T., Taya, S., Fujino, Y., Taneichi-Kuroda, S., Ohta, K., Tsuboi, D., Shinoda, T., Kuroda, K., Funahashi, Y., Uraguchi-Asaki, J., Hashimoto, R., and Kaibuchi, K. Proteomic analysis reveals novel binding partners of dysbindin, a schizophrenia-related protein. *Journal of neurochemistry* 110, 1567-1574
4. Mori, K., Amano, M., Takefuji, M., Kato, K., Morita, Y., Nishioka, T., Matsuura, Y., Murohara, T., and Kaibuchi, K. Rho-kinase Contributes to Sustained RhoA Activation through Phosphorylation of p190A RhoGAP. *The Journal of biological chemistry* 284, 5067-5076
5. Watanabe, T., Noritake, J., Kakeno, M., Matsui, T., Harada, T., Wang, S., Itoh, N., Sato, K., Matsuzawa, K., Iwamatsu, A., Galjart, N., and Kaibuchi, K. Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3beta regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *Journal of cell science* 122, 2969-2979

2010年

1. Terawaki, S., Kitano, K., Mori, T., Zhai, Y., Higuchi, Y., Itoh, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. The PHCCEX domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module. *The EMBO journal* 29, 236-250
2. Nakano, A., Kato, H., Watanabe, T., Min, K. D., Yamazaki, S., Asano, Y., Seguchi, O., Higo, S., Shintani, Y., Asanuma, H., Asakura, M., Minamino, T., Kaibuchi, K., Mochizuki, N., Kitakaze, M., and Takashima, S. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nature cell biology* 12, 583-590
3. Itoh, N., Nakayama, M., Nishimura, T., Fujisue, S., Nishioka, T., Watanabe, T., and Kaibuchi, K. Identification of focal adhesion kinase (FAK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) as Par3 partners by proteomic analysis. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 297-308
4. Amano, M., Tsumura, Y., Taki, K., Harada, H., Mori, K., Nishioka, T., Kato, K., Suzuki, T., Nishioka, Y., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. A proteomic approach for comprehensively screening substrates of protein kinases such as Rho-kinase. *PloS one* 5, e8704
5. Namba, T., and Kaibuchi, K. Switching DISC1 function in neurogenesis: Dixdc1 selects DISC1 binding partners. *Dev Cell* 19, 7-8

●●● おもな研究費 ●●●

1. 特定領域研究(分子脳) 神経細胞の極性形成機構の解明. 貝淵弘三. H17-21
2. CREST 神経発達関連因子を標的とした統合失調症の分子病態解明. 貝淵弘三. H19-24
3. 基盤S 遊走細胞と神経細胞の極性形成を制御する分子ネットワーク. 貝淵弘三. H20-24
4. 学術フロンティア推進事業 脳とこころの発達における神経科学的・心理学的アプローチ. 金田典雄. H19-23
5. 基盤C Rhoファミリーシグナル伝達分子を対象とした疾患関連因子の探索と解析. 天野陸紀. H20-22

機能分子制御学分野

Division of Molecular Biochemistry

機能分子制御学分野では、細胞増殖、分化、死を制御している細胞膜および細胞内の機能分子の同定および作用機構を解明するとともに、その成果をふまえて癌や炎症および神経変性疾患の新しい治療法の開発をめざしている。

●●● 構 成 員 ●●●

教授 古川鋼一
 准教授 岡島徹也
 助教 山内祥生
 助教 浜村和紀
 外国人特別研究員 章 青 (2010年3月まで)
 受託研究派遣研究員 徳田典代
 機関研究員 松原 毅
 非常勤講師 古川圭子 (中部大学)、田島織絵 (中部大学)
 客員研究者 橋高大二、土田明子 (野口研)、薫 宇 (2010年)

大学院 (博士課程)
 大海雄介、近藤裕史 (2009年まで、その後研究員 (GCOE、科研))、安藤玲子、範暁燕、橋本登、森敦史、大川祐樹、松本康之、堀田宏司、渋谷英伸、伊力哈木江沙比提、堺谷祐太
 大学院 (修士課程)
 齋藤千佳、尾高由佳、稲垣邦江、伊藤静香、伊藤麻紀子、松浦愛子 (生命農学研究科から)、森亮太、富安真史、金子慶、佐々木裕哉

●●● 研究テーマの詳細 ●●●

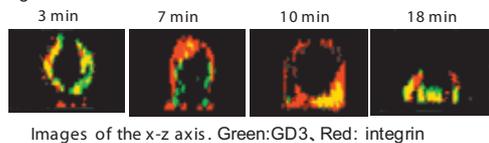
糖タンパク質、糖脂質などの複合糖質の糖鎖の、細胞増殖、分化、死等の細胞運命の決定における重要な役割につき、糖鎖合成系遺伝子の単離、合成糖鎖構造の同定、反応分子の同定を進め、糖鎖の作用機序と役割の解明および、その治療応用を志向してきた。

悪性黒色腫におけるガングリオシドGD3の、増殖および接着シグナルの増強機構、アダプタータンパク質を標的としたRNAi治療の試み、GD3近傍の相互作用分子のEMARS法による同定を行い、脂質ラフトにおける糖鎖のシグナル調節機能が明らかになった (図

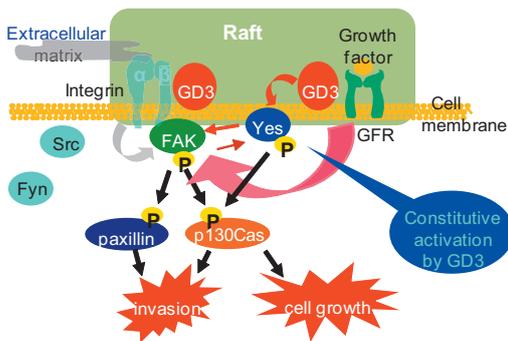
1)。また、糖脂質糖鎖の欠損マウスを用いた機能解析を行い、ガングリオシドによる補体と炎症の制御機能、とくにラフトの制御による神経組織の健全性の維持機能 (図2)、グロボ系糖脂質によるLPSシグナルの制御機構が明らかになった。

Notchなどのタンパク質の細胞外ドメインの0-GlcNAc構造を合成する酵素遺伝子の同定と、その基質特異性、修飾タンパク質の検討を進めている。ショウジョウバエにおける接着機能が示され、様々な局面での役割をマウスを中心に解析中である (図3)。

型コラーゲンに対してメラノーマ細胞が接着する時の、IntegrinとガングリオシドGD3との共局在の経時的変化

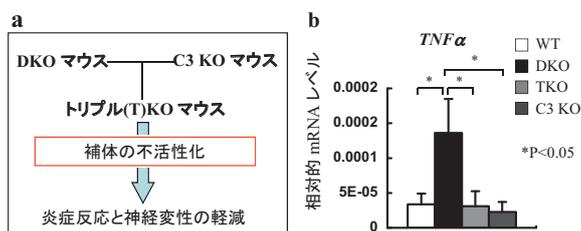


Images of the x-z axis. Green:GD3, Red: integrin

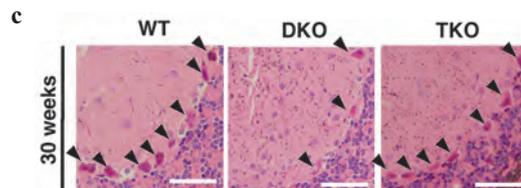


GD3によるインテグリンシグナルの増強とSrcファミリーYesの恒常的な活性化。Yesのキナーゼ活性を細胞膜再構築系により測定。

図1. 癌関連糖脂質による悪性シグナルの増強機構



シアル酸含有スフィンゴ糖脂質 (ガングリオシド) を欠損するDKOマウスで補体系の活性化が炎症を惹起し神経変性に至ることが示唆された。そこで補体C3欠損マウスをDKOに交配しTKOを作成したところ、炎症性サイトカインの発現が正常化した。



TKOで脳の変性も回復した。ガングリオシド欠損による神経変性への補体系の関与が判明。これらの所見は、アルツハイマー病等の神経変性の機序に共通する。

図2. シアル酸含有糖脂質欠損では補体系の活性化が脳の炎症を招き神経変性を起こす

糖鎖欠損変異マウスを癌細胞由来の糖脂質で免疫し、腎癌、肺癌、卵巣癌などに対する200クローン以上の新規モノクローナル抗体を樹立して、認識糖鎖の構造を解明した。さらに、マウスLewis肺癌細胞の高転移性亜株を用いた転移関連分子の同定と作用機構の解明、癌幹細胞マーカーCD133の機能解析とN-グリカンの構造解析による真の癌幹細胞マーカー検出のプロトコル開発を行った。

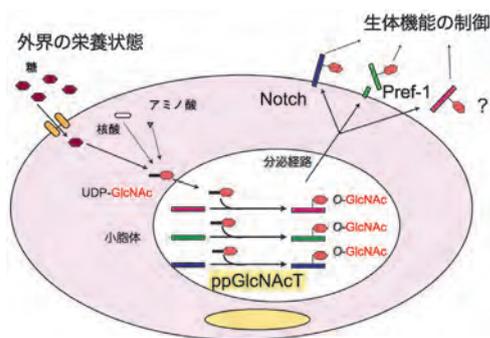


図3. 細胞外O-GlcNAc修飾の生理機能と病態との関連

●●● おもな発表論文 ●●●

1. Ohmi, Y., Tajima, O., Ohkawa, Y., et al.: Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 22405-22410, 2009
2. Kondo, Y., Tokuda, N., Fan, X., et al.: Glycosphingolipids are not pivotal receptors for Subtilase cytotoxin in vivo: Sensitivity analysis with glycosylation-defective mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378, 179-81, 2009
3. Tajima, O., Egashira, N., Ohmi, Y., et al.: Reduced motor and sensory functions and emotional response in GM3-only mice: emergence from early stage of life and exacerbation with aging. *Behav Brain Res.* 198, 74-82, 2009
4. Ban, R., Matsuzaki, H., Akashi, T., et al.: Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases. *J. Biol. Chem.* 284, 28367-28381, 2009
5. Greenshields, K.N., Halstead, S.K., Zitman, F.M., et al.: The neuropathic potential of anti-GM1 autoantibodies is regulated by the local glycolipid environment in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 595-610, 2009
6. Li, Y., Thapa, P., Hawke, D., et al.: Immunologic glycosphingolipidomics and NKT cell development in mouse thymus. *J. Proteome Res.* 8, 2740-2751, 2009
7. Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Hamamura, H., et al.: Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glycolipid-enriched microdomains. *J. Biol. Chem.* 285, 27213-27223, 2010
8. Dong, Y., Ikeda, K., Hamamura, K., et al.: GM1/GD1b/GA1 synthase expression results in the reduced cancer phenotypes with modulation of composition and raft-localization of gangliosides in a melanoma cell line. *Cancer Sci.* 101, 2039-2047, 2010
9. McGonigal R, Rowan EG, Greenshields KN, et al.: Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. *Brain* 133, 1944-1960, 2010
10. Inoko, E., Nishiura, Y., Tanaka, H., et al.: Developmental stage-dependent expression of a trisialic acid unit on glycoproteins in mouse brain as revealed by mAb.A2B5. *Glycobiology* 20, 916-28, 2010

●●● おもな研究費 ●●●

2009～2010年度

1. 学術振興会(基盤研究B) 生体内の脂質ラフトの構築と制御におけるスフィンゴ糖脂質の機能重複性と階層性。(代表:古川鋼一)2009-2010
2. バイオテクノロジー開発技術研究組合 糖鎖欠損マウスを用いた高性能モノクローナル抗体の作製と癌関連糖脂質の同定技術の開発。(代表:古川鋼一)2009-2010
3. CREST IgGシアル酸付加の生理・病理的意義「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」「液性免疫制御による新しい治療法の開発」(代表:黒崎知博, 分担:古川鋼一)2009-2010
4. 新学術領域「自然炎症」非感染性慢性炎症を招く糖脂質とリガンド分子の相互反応機構の解明。(代表:古川鋼一)2010
5. HFSP研究助成金 Control of Notch receptor structure and function by glycosyltransferases.(代表:岡島徹也)2009-2010
6. 学術振興会(若手研究B) 上皮成長因子様ドメインに特徴的な新規翻訳後修飾の同定と修飾機構の解析(代表:岡島徹也)2009-2010
7. 学術振興会(若手研究B) 酸性糖脂質によって活性化される脂質代謝経路の解析とそのメラノーマ治療戦略への応用。(代表:山内祥生)2009
8. 学術振興会(基盤研究C) スフィンゴ糖脂質による口腔癌の悪性形質制御機構。(代表:浜村和紀)2009-2010
9. 学術振興会(若手研究B) がん及び神経変性疾患関連スフィンゴ糖脂質の細胞内輸送システムの独自性と普遍性。(代表:山内祥生)2010
10. 学術振興会(若手研究B) In vivoにおける糖脂質糖鎖による脂質ラフトの制御機構。(代表:徳田典代)2009-2010

分子標的治療学

Molecular Mycology and Medicine

真菌は最も単純な真核生物として、私たちの体を構成している細胞の基本的特徴を備えている。また真菌の中には、ヒトなどへ感染を起こして様々な疾患の起因菌ともなる病原性真菌も存在する。

当分野では真菌を材料として、細胞骨格、ストレス応答、臨床分離株のタイピングなどをテーマにさまざまな角度からアプローチを行っている。

医療の高度化、難治化に伴い今後真菌感染は増加すると予想されており、真菌を通して得られ、発信される情報は重要さを増すと考えられている。

当分野の研究の発展と継続が真菌研究をリードしブレイクアウトすることをめざし、鋭意研究を進めている。

●●● 構 成 員 ●●●

准教授 中川善之

講 師 神戸俊夫

助 教 紅 朋浩

大学院生

(皮膚科) 足立秀禎(2007. 4~2010. 3)、清水和栄(2007. 4~)

(愛知学院大学歯学部) 高木雄基(2008. 4~)

客員研究者 小川昌則(2009. 1~2011. 3)

●●● 研究テーマの詳細 ●●●

I. 病原性微生物が生体内に侵入して感染を成立させるためには、免疫系細胞から放出される活性酸素による殺菌から免れることが必須条件である。代表的な抗酸化酵素であるカタラーゼを中心にして、活性酸素による宿主からの攻撃と細胞内レドックスバランスの破綻が及ぼす影響を、酵母の病原性との関わりから解析を進めている。特にこの酵母のカタラーゼ遺伝子破壊株が菌糸成長能力を失うことから、活性酸素レベルが細胞内シグナルとして増殖様式の変換を阻害しているとの仮説を立て、検証を進めている。また近年、高齢化社会の進展とともに老人保健施設や特別養護老人ホームなど高齢者の福祉をめざした施設が増加している。高齢者は免疫力の低下した易感染患者の予備軍でもあり、施設内での微生物感染や伝播は容易に起こりうる懸念される。そのような環境で特異に分離される真菌の存在が知られるようになってきた。このような真菌がどんな特性を有し、どのように環境と関わっているのかについて検討を始めている。

II. カンジダ症の多くは *C. albicans* によるが、近年、抗真菌薬に低感受性を示すカンジダ種がカンジダ症の原因となる例が増加している。さらに、カンジダ属酵

母による院内感染も注目されるようになってきた。これらの状況に対応するため、的確なカンジダ症の治療に必要なカンジダ属酵母の特異的・迅速同定法を確立してきた。さらに、マイクロサテライトおよびRPSなどの反復配列の多様性に基づいた genotype 解析を *C. albicans* を中心に進め、株レベル識別による感染経路の特定や genotype と感染発症(表在性感染と深在性感染)との関係を調べる。

III. 真菌を材料に、分子遺伝学的なアプローチを利用して細胞の増殖や成長における細胞骨格の多面的機能を解析している。これまで、チューブリン・微小管系を中心に、チューブリンや関連する分子の普遍性と種特異性を明らかにしてきた。現在は、微小管系のモーター分子として知られるキネシンを中心に、細胞骨格による細胞内の時空間制御の一端を解き明かすべく、遺伝学的手法に加え、イメージング技術を組み合わせた研究を進めている。これらの分子には細胞の増殖と深く関わっているものが多く、抗ガン剤、および種特異的な性質を利用した抗真菌剤の標的として注目している。

●●● おもな発表論文 ●●●

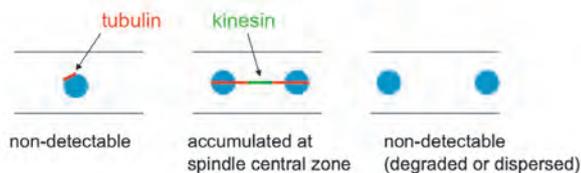
2009年度

1. Okamura K, Kanbe T, Hiraishi A. *Rhodoplanes serenus* sp. nov., a purple non-sulfur bacterium isolated from pond water. *Int. J. Syst. Microbiol.*, 59: 531-535.
2. Okamura K, Hisada T, Kanbe T, Hiraishi A. *Rhodovastum atsumiense* gen. nov., a phototrophic

alphaproteobacterium isolated from paddy soil. *J. Gen. Microbiol.*, 55: 43-50.

3. Adachi H, Shimizu K, Hattori H, Tanaka R, Chibana H, Takagi Y, Tomita Y, Kanbe T. Genotyping of *Candida albicans* by fragment analysis of microsatellites combined with 25S rDNA and RPS-based strategies. *Jpn. J. Med.*

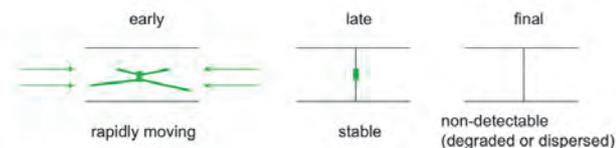
核分裂時



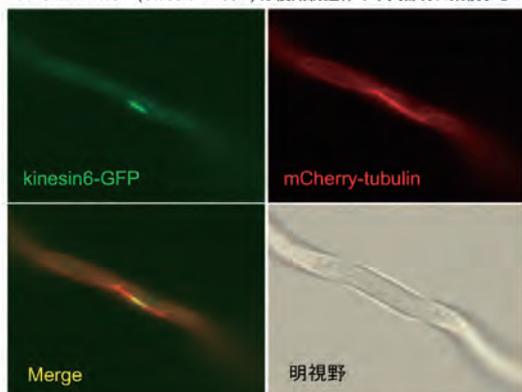
Pro - Meta

Ana - Telo

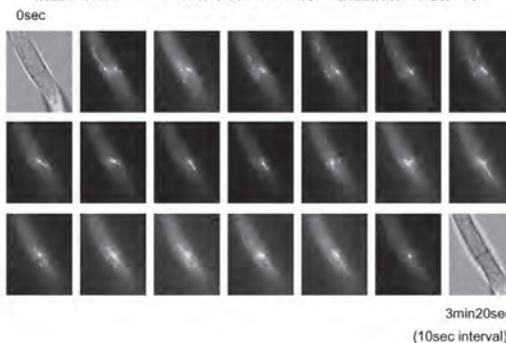
核分裂後の隔壁形成時(細胞質分裂)



AN3124 kinesin (Class 6 kinesin) は後期紡錘体の中央部分に集積する



隔壁形成時、kinesin 6は微小管に沿って現れ、隔壁領域に集積する。



Behavior of class 6 kinesin in *Aspergillus nidulans*

Mycol., 50: 167-174.

- Suzuki M, Niimi A, Limsirichaikul S, Tomida S, Miao Huang Q, Izuta S, Usukura J, Itoh Y, Hishida T, Akashi T, Nakagawa Y, Kikuchi A, Pavlov Y, Murate T, Takahashi T. PCNA mono-ubiquitination and activation of translesion DNA polymerases by DNA polymerase alpha. *J Biochem.* 146: 13-21.
- Ban R, Matsuzaki H, Akashi T, Sakashita G, Taniguchi H, Park SY, Tanaka H, Furukawa K, Urano T. Mitotic regulation of the stability of microtubule plus-end tracking protein EB3 by ubiquitin ligase SIAH-1 and Aurora mitotic kinases. *J Biol Chem* 284: 28367-28381.

2010年度

- Indah S, Tantular, Matsuoka H, Kasahara Y, Pasarawati S, Kanbe T, Tuda JSB, Kido Y, Dachlan YP, Kawamoto, F. *Acta Med. Okayama*, 64: 367-373.
- Huang QM, Akashi T, Masuda Y, Kamiya K, Takahashi T, Suzuki M. Roles of POLD4, smallest subunit of DNA polymerase delta, in nuclear structures and genomic stability of human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 542-546.
- Huang QM, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kasahara TA, Osada H, Yatabe Y, Akashi T, Kamiya K, Takahashi T, Suzuki M. Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. *Cancer Res.* 70: 8407-8416.

●●● 競争的研究資金 ●●●

- 基盤研究 (B) 2007 - 2009年度
「新型熱帯熱マラリア原虫の分子疫学的研究と生殖母体の培養の試み」(分担 神戸)
- 基盤研究 (B) 2009年度 -
「地域の保健医療施設に対する院内感染対策の向上をめざす支援プログラムの開発と評価」(分担 中川)
- 基盤研究 (B) 2009年度 -
「中央アジアにおける文化人類学的観点からみたヒト常在菌の遺伝子調査」(分担 神戸)
- 基盤研究 (B) 2009年度 -
「東南アジアの大陸部と嶋嶼部に分布する熱帯熱マラリア原虫の細胞学的・分子疫学的研究」(分担 神戸)
- 独立行政法人科学技術振興機構 (JST) 2009 - 2011年度
「IMSによる土壌由来カビ検出データベースの構築」(分担 紅)

神経遺伝情報学分野

Division of Neurogenetics and Bioinformatics

当研究室では、(1) 各種神経筋疾患の pre-mRNA splicing 病態・制御研究、
(2) 先天性筋無力症候群をはじめとする単一遺伝子病の病態・制御研究、
(3) 分子状水素の作用機構の研究を行なっている。

DNA・RNA・タンパク・培養細胞・モデル動物を用いた
形態学的・生化学的・生理学的な研究手法に加えて、
プロジェクトに応じてバイオインフォマティクス研究手法を融合させた解析を行っている。

●●● 構 成 員 ●●●

教授 大野欽司
助教 増田章男、伊藤(笹谷)美佳子
GCOE 特任助教 大河原美静
大学院(博士)
付 源、Rahman Mohammad Alinoor、Habibul Bari
Shozib、Sayeed Shurovi、Farhana Nasrin、金子浩

史(整形外科)、山本隆一郎(整形外科)、三島健一(整形外科)、中田智彦(小児科)、中島宏彰(整形外科)、松下雅樹(整形外科)
客員研究者 高 開屏、伊藤雅史、東 慶輝
技術補佐員 板野恵子
事務補佐員 三谷 郁、宮崎あゆ美

●●● 研究テーマの詳細 ●●●

I. Pre-mRNA splicing 病態・制御研究

限られた数の遺伝子から多様なタンパク質を作るために、ヒトは組織特異的・発達段階特異的な alternative splicing を行っている。alternative splicing は各遺伝子上の splicing *cis*-elements と、それらに結合する組織特異的・発達段階特異的に発現する splicing *trans*-factors によりコントロールされている。当研究室では、以下の4種類の mRNA 代謝研究を行っている。(1) splicing *cis*-elements を破断する遺伝子変異を同定し、その *cis*-element に結合する *trans* factor を同定している。(2) splicing *trans*-element の発現調節異常が疾患の本態である筋強直性ジストロフィーにおいて、splicing 異常を受ける遺伝子の網羅的な解析を Affymetrix Exon Array を用いて行い、その解析ソフトを自主開発している。(3) branch point, polypyrimidine tract, 3' and 5' splice sites などの古典

的な splicing *cis*-elements はヒトでは degenerative であり、その degeneracy の splicing *cis*-elements の遺伝子変異に対する tolerance の包括的な定量化を行っている。(4) 筋強直性ジストロフィーをはじめとする splicing *trans*-factor の発現異常が病態に関わる神経筋疾患において次世代シーケンサを用いた high throughput sequencing of cross linking immunoprecipitation (HITS-CLIP) 法による splicing *trans*-factor の標的 RNA 配列の網羅的解析を行っている(図1)。

II. 先天性筋無力症候群をはじめとする単一遺伝性疾患の病態・制御研究

先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndromes, CMS) は、神経筋接合部情報伝達の障害により病的な筋力低下と易疲労性が生じる疾患群であ

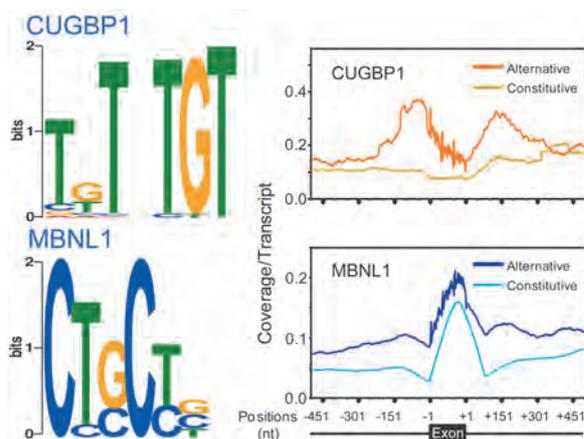


図1. HITS-CLIP 法により同定した CUGBP1 と MBNL1 の *in vivo* binding motifs

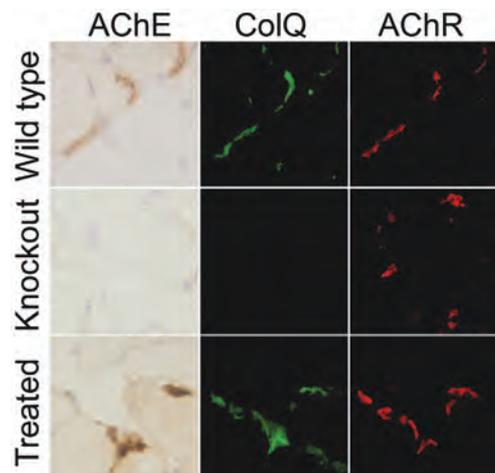


図2. AAV8-COLQ による protein anchoring therapy



る。(1) 本邦CMSの遺伝子変異を同定し、その分子病態機構の解明を行っている。(2) Collagen Q (ColQ) はacetylcholinesterase (AChE) をシナプス基底膜にanchoringをする細胞外マトリックス分子であり、ColQの欠損にて終版AChE欠損症を惹き起こす。ColQがシナプス基底膜にanchoringをするシグナルを有する細胞外分子であることを利用して、Colqノックアウトマウスのシナプス基底膜へのヒトColQの選択的なanchoringが行なわれることを利用したprotein-anchoring therapyが有効であることを実証している(図2)。さらに、protein-anchoring therapyの他の細胞外マトリックスタンパク欠損症への応用研究を行っている。(3) メンデル遺伝形式を取る各種神経筋骨格疾患の次世代シーケンサを用いたresequencing解析により新規原因遺伝子変異の同定ならびに解析を行っている。

Ⅲ. 分子状水素の作用機構研究

分子状水素は各種の酸化ストレス病態・炎症病態に対して顕著な効果を示すこと27種類の病態モデル動物において2007年以降報告されてきている。当研究室ではパーキンソン病モデル動物に対する分子状水素含有水の自由飲水の顕著な効果を実証し、分子状水素の作用機構の解明を行っている(図3)。

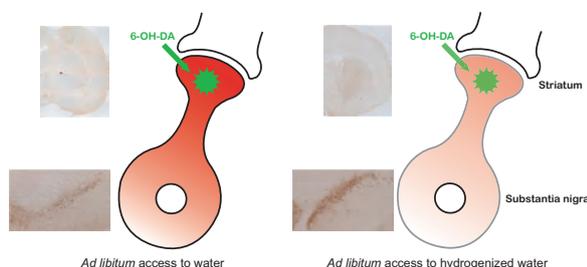


図3. 分子状水素のドーパミン神経細胞死抑制効果

●●● おもな発表論文 ●●●

2009年

1. Fu Y et al. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* 2009, 453: 81-85.
2. Bian Y et al. Tannic acid facilitates expression of the polypyrimidine tract binding protein and alleviates deleterious inclusion of *CHRNA1* exon P3A due to an hnRNP H-disrupting mutation in congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 2009, 18: 1229-1237.
3. Almeida T et al. Ancestral origin of the ATTCT repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 10 (*SCA10*). *PLoS ONE* 2009, 4: e4553.
4. Milone M et al. Myasthenic syndrome due to defects in rapsyn: Clinical and molecular findings in 39 patients. *Neurology* 2009, 73: 228-235.

5. Kurosaki T et al. Alu-mediated acquisition of unstable ATTCT pentanucleotide repeats in the human *ATXN10* gene. *Mol Biol Evol* 2009, 26: 2573-2579.
6. Itoh T et al. Molecular hydrogen suppresses FcepsilonRI-mediated signal transduction and prevents degranulation of mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 389: 651-656.

2010年以降

1. Selcen D et al. Myasthenic syndrome caused by plectinopathy. *Neurology* 2011, 76:327-336.
2. Fu Y et al. AG-dependent 3' splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Research* in press.

●●● 競争的資金 ●●●

2009年度～2010年度

1. 特定領域研究・ゲノム4領域・生命システム情報「In silico解析とin vitro解析によるRNAスプライシング機構の研究」(研究代表者: 大野欽司)
2. 国立精神・神経医療研究センター厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「先天性筋無力症候群の分子病態解明と治療法開発研究(分担研究者: 大野欽司)」
3. 科学技術振興機構 地域イノベーション創出総合支援事業 重点地域研究開発推進プログラム 平成21年度「シーズ発掘試験」 A(発掘型)「分子状水素の抗酸化作用分子機構の解明と新規生理活性分子の同定による神経変性疾患発症予防法の開発」(研究代表者: 大野欽司)
4. 基盤研究(B)(一般)「神経筋接合分子欠損症におけるmRNA病態研究と治療法開発研究」(研究代表者: 大野欽司)
5. 科学技術振興機構 戦略的国際科学技術協力推進

- 事業 日本(JST) -デンマーク(DASTI) 研究交流「神経筋疾患におけるスプライシング異常(Aberrant splicing in neuromuscular diseases)」(研究代表者: 大野欽司)
6. 科学技術振興機構 研究成果最適展開支援事業 A-STEPフィージビリティスタディ(シーズ顕在化)「筋強直性ジストロフィーのスプライシング異常を補正する既認可薬オフラベル薬効の患者培養細胞・動物実験における検証」(研究責任者: 大野欽司)
7. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「先天性筋無力症候群の診断・病態・治療法開発研究」(研究代表者: 大野欽司)
8. 科学技術振興機構 革新的細胞解析研究プログラム(セルイノベーション)「網羅的スプライシング暗号解析に基づくRNA病の期亜目井と治療技術の探索(研究分担者: 大野欽司)」

疾患モデル解析学分野

Division of Disease Models

我々は遺伝子ノックアウト法などの手法により、癌や炎症性疾患のモデル動物を作成し、その発症機序の解明や治療法を探求し、創薬への応用を目指している。

これまでに、RNA干渉を誘導する合成 siRNA 分子の in vivo delivery 技術の創製に注力し、生体高分子アテロコラーゲンを介した siRNA の全身性投与による疾患治療において成果を上げてきた。

近年、miRNA にも標的の範囲を広げ、siRNA/miRNA による標的遺伝子制御を基盤とした分子標的治療の実現を目指している。

●●● 構 成 員 ●●●

准教授 武井佳史

機関研究員 名取貴光 (2008年10月~)

大籠友博 (2010年4月~)

大学院生 (博士)

Ping Mu (2009年3月修了)、稲葉慎一郎 (腎臓内科)、

小出直史 (日本学術振興会特別研究員DC1)、Dongliang Cao

大学院生 (修士) 林 妙 (2009年3月修了)

研究補助員 林 妙 (同講座医学修士課程修了後、採用)

●●● 研究テーマの詳細 ●●●

I. 癌転移を制御する miRNA の同定と癌転移抑止への応用

miRNA は18-25塩基からなる低分子RNAであり、標的mRNAに結合してタンパク質産生を負に制御する。我々は癌転移を制御するmiRNAを網羅的に探索し、スキルス胃癌の腹膜転移機構に関して、以下に示す知見を得た。

図1の如く、スキルス胃癌患者より個別に樹立した親株 (HSC-44PEとHSC-58) と高転移性株 (44As3と58As9) について、miRNA発現アレイを行い、腹膜播種性転移を高頻度に起こす高転移性株において特異的な発現変化を示すmiRNA群を見出した。44As3と58As9の両方の株で発現が有意に低下するmiR-516a-3pについて、同miRNA発現ベクターを導入した安定発現株 (Stable overexpression; 44As3-miR-516a-3p) を作成した。同安定発現により、44As3の細胞増殖・細胞運動・浸潤が有意に抑制された。安定発現株をスキッドマウス胃壁に同所性に移植すると、マウス個体の腹水貯留の頻度と腹膜転移の有無において、顕著な差が顕れ、担癌マウス個体の生存率が有意に延長した (図2)。一方、正常胃組織においては同miRNAの発現が極めて高いことが分かった。以上より、同miRNAは

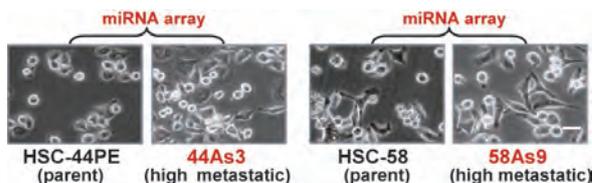


図1. スキルス胃癌樹立細胞株におけるmiRNA発現アレイ
スキルス胃癌患者より、細胞株を樹立 (HSC-44PEとHSC-58)、スキッドマウス胃壁に同所移植、in vivoにてselectionを行い、腹膜転移頻発する株をそれぞれ単離した (44As3と58As9)。細胞株の樹立: 共同研究者、柳原ら (国がんせ・研) による

腹膜転移に対して抑制的に働くanti-metastatic miRNAといえる。

同安定発現株を用いて、iTRAQ試薬 (ABI) とLC-MS/MSを組み合わせたプロテオミクス解析により、miR-516a-3pの標的を網羅的に同時同定した。同定した標的のうち、細胞外sulfatase1 (SULF1) の発現はmiR-516a-3pの発現と逆相関を示し、かつLuciferaseレポーターアッセイにより、miR-516a-3pがSULF1 mRNAと結合することを示した。高転移性株44As3では、miR-516a-3pの発現が下がることで、標的SULF1の発現が脱抑制されており、これにより、Wntリガンドの培地中への遊離量が増加した (図3)。同miRNAの標的遺伝子群、及びその関連pathwayが腹膜転移抑止の標的となりうる事を証明した。CE-MS

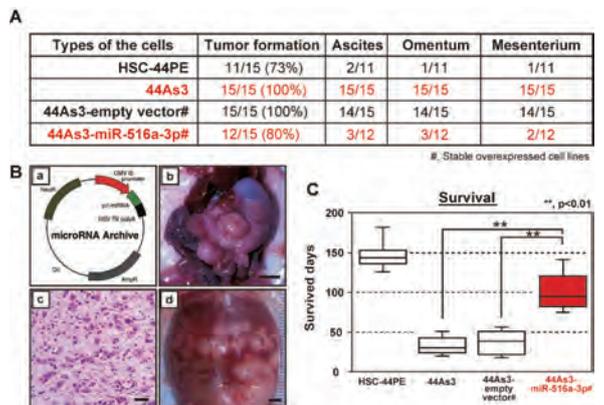


図2. miR-516a-3pの安定発現株の in vivo phenotype
A. 腹膜転移株44As3にmiR-516a-3pを強制発現させると、腹水貯留・大網や腸間膜への癌転移が抑制される。
B. (a) miRNA発現ベクター (b) 44As3の胃壁移植癌と腹膜転移の典型像 (c) 原発癌のH&E染色像 (d) 44As3胃壁同所移植マウスの腹水貯留
C. 44As3-miR-516a-3p等の胃壁同所移植後のマウス個体の生存率

法によるメタボローム解析を並行して施行し、癌転移に特徴的な代謝物質の同定も行っている。

II. 二本鎖RNAの持つ免疫賦活性をマスクする siRNA 全身DDS法

血中に投与された siRNA などの二本鎖 RNA は樹状細胞 (pDC) 等の Toll-like receptor などの自然免疫網に感知されると、I 型 IFN や炎症性サイトカインを誘導する。本副作用は siRNA による標的遺伝子の発現抑制を基盤とした真の分子標的治療の妨げとなる。siRNA・アテロコラーゲン複合体は、自然免疫系に感知されることなく、癌や炎症部位に特異的に delivery される。一方、陽イオン性脂質と複合体化した siRNA は自然免疫系によって必ず感知され、IFN が誘導される事を証明した。

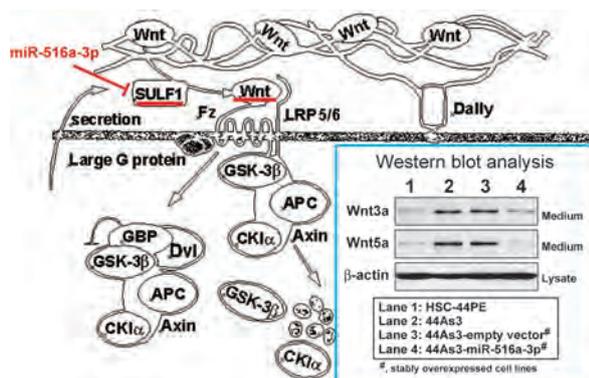


図3. miR-516a-3pはExtracellular sulfatase1を標的とするSULF1は細胞膜上のヘパラン硫酸プロテオグリカン鎖の硫酸基を分解し、かつ、同細胞外マトリックスに結合したWntリガンドを遊離させる。miR-516a-3pの安定発現株ではSULF1発現が常に抑制されるため、培地中へのWnt3a、Wnt5aの遊離量が減少する (inset, Western blot解析)。

●●● おもな発表論文 ●●●

2009年度

1. Sakamoto I, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Sawai A, Tanaka A, Maruyama S, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S. Lymphatic vessels develop in tubulo-interstitial fibrosis. *Kidney Int*, 75:828-838 (2009).
2. Ohgomori T, Funatsu O, Nakaya S, Morita A, Ikekita M. Structural study of the N-glycans of intercellular adhesion molecule-5 (telencephalin). *Biochim Biophys Acta*, 1790: 1611-1623 (2009).
3. Mu P, Nagahara S, Makita N, Tarumi Y, Kadomatsu K, Takei Y. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bcl-xL and cisplatin against prostate cancer. *Int J Cancer*, 125:2978-2990 (2009).

2010年度

1. Nagano A, Ohno T, Shimizu K, Hara A, Yamamoto T, Kawai G, Saitou M, Takigami I, Matsushashi A, Yamada K, Takei Y. EWS/Fli-1 chimeric fusion gene up-regulates vascular endothelial growth factor-A. *Int J Cancer*, 126:2790-2798 (2010).
2. Mihara K, Yanagihara K, Takigahira M, Kitanaka A, Chihaya I, Bhattacharyya J, Kubo T, Takei Y, Yasunaga S, Takihara Y, Kimura A. Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*, 151:37-46 (2010).

3. Sawai A, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Toda S, Ito I, Hattori R, Matsukawa Y, Gotoh M, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S. Peritoneal macrophage infiltration is correlated with baseline peritoneal solute transport rate in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, in press.
4. Kohno S, Murata T, Koide N, Hikita K, Kaneda N. Establishment and characterization of a noradrenergic adrenal chromaffin cell line, tsAM5NE, immortalized with the temperature-sensitive SV40 T-antigen. *Cell Biol Int*, 35: 325-334 (2011).
5. Kubo T, Yanagihara K, Takei Y, Mihara K, Morita Y, Seyama T. Palmitic acid-conjugated 21-nt siRNA enhances gene-silencing activity. *Molecular Pharmaceutics*, in press.
6. Sakamoto K, Bu G, Chen S, Takei Y, Hibi K, Kodera Y, McCormick LM, Nakao A, Noda M, Muramatsu T, Kadomatsu K. The premature ligand-receptor interaction during biosynthesis limits the production of growth factor midkine and its receptor LDL receptor-related protein 1 (LRP1). *J Biol Chem*, 286: 8405-8413 (2011).
7. Takei Y*, Takigahira M, Mihara K, Tarumi Y, Yanagihara K. The metastasis-associated microRNA miR-516a-3p is a novel therapeutic target for inhibiting peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancer. *Cancer Res*, 71: 1442-1453 (2011). *, corresponding author.

●●● おもな研究費 ●●●

2009年度～2010年度

1. 日本学術振興会 基盤研究 (C) インターフェロン応答を回避可能な siRNA 全身デリバリー法 (研究代表者: 武井佳史)
2. 共同研究 大日本住友製薬・高研 核酸医薬へのアテロコラーゲンの適用研究 (研究代表者: 武井佳史)
3. 共同研究 大日本住友製薬・高研 siRNA/アテロコラーゲン製剤技術を活用した新規抗癌療法の研究 (研究代表者: 武井佳史)
4. 共同研究 アテロコラーゲンをを用いた miRNA デリバリー技術を基にした新規癌治療法の開発 (研究代表者: 武井佳史)
5. 広島大学・原爆放射線医科学研究所 共同利用・共同研究拠点研究費 原爆被爆者血液塗抹検体及び細胞における MicroRNA の発現解析 (研究代表

- 者: 武井佳史)
6. 日本学術振興会 基盤研究 (B) 神経再構築における成長因子とマトリックス (研究分担者: 武井佳史)
 7. 日本学術振興会 基盤研究 (C) CAPD 患者の腹膜機能不全に対する血管・リンパ管新生を中心とした病態解明と対策 (研究分担者: 武井佳史)
 8. (独) 医薬基盤研究所 抗原提示細胞内の MIF を標的とする DDS 技術を用いた炎症性腸炎治療薬の開発 (研究分担者: 武井佳史)
 9. (独) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 核酸多糖複合体を用いた核酸医薬 DDS 製剤へのイノベーション化 (研究分担者: 武井佳史)
 10. 厚生労働省 長寿医療研究委託費 歯髄幹細胞を用いた象牙質・歯髄再生医療によるウ蝕・歯髄疾患等のための治療技術の開発 (研究分担者: 武井佳史)

名古屋大学大学院医学系研究科 神経疾患・腫瘍分子医学研究センター

所在地 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65

- | | | | |
|----------|-------------------|--|--|
| 1 | 分子腫瘍学分野 | TEL: 052-744-2454
FAX: 052-744-2457 | http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10230.html |
| 2 | 腫瘍生物学分野 | TEL: 052-744-2463
FAX: 052-744-2464 | http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10231.html
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/molecularpathology/index.html |
| 3 | 分子病理学分野 | TEL: 052-744-2093
FAX: 052-744-2098 | http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10269.html
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/sen_hp/ |
| 4 | 神経情報薬理学分野 | TEL: 052-744-2075
FAX: 052-744-2083 | http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10223.html
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Yakuri/ |
| 5 | 機能分子制御学分野 | TEL: 052-744-2070
FAX: 052-744-2069 | http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10202.html
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochemII/index.html |
| 6 | 分子標的治療学分野 | TEL: 052-744-2460
FAX: 052-744-2459 | http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10212.html
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/mm/index.html |
| 7 | 神経遺伝情報学分野 | TEL: 052-744-2447
FAX: 052-744-2449 | http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10213.html
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/ |
| 8 | 疾患モデル解析学分野 | TEL: 052-744-2064
FAX: 052-744-2065 | http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/102/p10214.html
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1879/1887/link_shikkanmodelkaiseikigaku.html |



