

Research Activities 2011

平成 23 年度研究成果報告

Division of Neuroscience

神經部門

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	In situ imaging of neural cells and their function 神経細胞機能の in situ イメージング		
P.I.	Hisao Yamada, 山田久夫	E-mail	yamada@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Regenerative NeuralMedicine, 神経機能再生医学（解剖学第1）講座		
Collaborators	若林毅俊、森徹自、高森康晴、平原幸恵、小池太郎		
Keywords	brain, glia, lamin, neuron, rat, retina, stem cell		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Lamins are intermediate filament proteins that form nuclear lamina, which are divided into A/C-, B1- and B2-isotypes. Lamins are thought to play important roles in normal morphogenesis and cell-differentiation. In the nervous system, their abnormality causes neurodegenerative diseases such as peripheral neuropathy, leukodystrophy, lissencephaly *etc.* We have been immunohistochemically investigating the expression patterns of lamin isotypes in the adult rat neural tissues. In the neurogenic regions of adult rat brain, GFAP-positive neural stem cells showed lamin A/C (++) , B1 (++) and B2 (++) , PSA-NCAM-positive progenitor cells showed lamin A/C (-) , B1 (+++) and B2 (+) , and mature neurons showed lamin A/C(++), B1 (+) and B2 (+++), while mature oligodendrocytes and astrocytes showed lamin B2 (+). In the adult rat retina, most of retinal neurons also expressed lamin B1, B2 and C. However, horizontal cells and a subpopulation of retinal ganglion cells also possessed lamin A; and photoreceptor cells possessed neither lamin A nor C. The neural cells in the brain and retina dominantly expressed lamin C protein among the lamin A/C gene products,. These results suggest that lamins are involved in cell-differentiation and expression of cell-specific genes in individual neural cells.

核膜ラミナに存在するラミン（Lamin）というタンパク質は、選択的スプライシングによる A および C、異なる遺伝子に由来する B1 および B2 と言ったイソタイプをもつ。これらの遺伝子の変異は、早老症、成人発症型白質ジストロフィーをはじめとする神経筋疾患でみられる。このような疾患に関わる lamin または核ラミナをイメージング法でとらえ、そのイソタイプごとの分布を解析する研究を展開している。正常成獣ラットおよびマウスの海馬歯状回や側脳室周囲帯では、神経系幹細胞が A/C タイプおよび B1/B2 タイプに陽性で、やや分化した神経前駆細胞では A/C タイプが陰性になり B1 タイプが増加し B2 タイプが減少するが、成熟ニューロンでは A/C タイプが再び陽性で、B1 タイプと B2 タイプの密度が逆転し、B2 タイプ優位になることを報告した。一方、オリゴデンドロサイトやアストロサイトと言った成熟マクログリアでは B2 タイプの濃度がニューロンよりやや薄いことなどを明らかにした。さらに、網膜の成熟ニューロンでは B1 タイプと B2 タイプがほぼ同等に分布すること、それに加えて、水平細胞やごく一部の神経節細胞では、A/C タイプも含有し、視細胞には A/C のどちらのタイプも存在しない事も証明した。脳や網膜の神経組織では laminA/C 遺伝子産物のうち、C タイプ優位であることが、他の組織と異なる。これらを総合すると、ラミンは細胞種特異的にそのイソタイプ構成を変化させながら、各細胞の分化に関わっていくと考えられる。

2. List of Publications

Original Articles

1. Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Koike T, Kubota Y, Takamori Y, Yamada H
Nuclear lamins are differentially expressed in retinal neurons of the adult rat retina.
Histochem Cell Biol, 136(4):427-436, 2011.8 ([PDF N1-1](#))

Proceedings

1. 若林毅俊, 森徹自, 平原幸恵, 小池太郎, 高森康晴, 山田久夫
成獣ラットの網膜ニューロンにおけるラミンの発現パターン
第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 甲府, 2012.3
2. 紅林秀治, 森徹自, 若林毅俊, 山田久夫
海馬歯状回における神経細胞の増殖に影響を与える生育環境—『豊かな環境』を定量化した解析—
第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 甲府, 2012.3
3. Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Kurokawa K, Yamada H
The effects of seizures induced by pentylenetetrazole on cell cycle progression of adult subependymal zone precursors.
Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, Washington D.C., USA, 2011.11
4. 高森康晴, 森徹自, 若林毅俊, 平原幸恵, 小池太郎, 山田久夫
成獣ラットの脳の各種グリア細胞におけるラミン・サブタイプ構成の多様性
第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9
5. 森徹自, 若林毅俊, 平原幸恵, 高森康晴, 小池太郎, 黒川清, 山田久夫
てんかん発作が成獣脳室下帯の神経前駆細胞に与える影響
第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 2011.9

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Striatal neurons highly expressing GAD1 mRNA are populated in the lateral striatum マウス線条体における calbindin-poor 領域の空間配置と GABA ニューロン		
P.I.	Tetsuo Sugimoto, 杉本哲夫	E-mail	sugimoto@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Anatomy and Brain Science, 脳構築学 (解剖学第 2) 講座		
Collaborators	Trifonov Stefan、山下雄司、宝谷剛志、丸山正人、加瀬政彦、清水順一		
Keywords	calbindin, GABA neuron, lateral striatum		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

GAD1 and GAD2 are universally contained in GABAergic neurons in the CNS. The two isoforms are almost identically expressed throughout the brain and spinal cord. By using in situ hybridization, we found that the mouse lateral striatum concentrates medium-sized projection neurons with high-level expression of GAD1, but not of GAD2, mRNA. These findings were confirmed with different types of riboprobe including those directed to 5'-noncoding region, 3'-noncoding region and coding region from mouse or rat genes. Immunohistochemical localization of GAD1 also revealed the predominant localization of the enzyme in the same striatal region. The lateral region of the mouse striatum, harboring such neurons, is ovoid in shape and extends between interaural +4.8 and +2.8, and at lateral 2.8 and dorsoventral 2.0. This intriguing region corresponds to the area that receives afferent inputs from the primary motor and sensory cortex that are presumably related to mouth and forelimb representations. The lateral striatum is included in the basal ganglia-thalamocortical loop and is most vulnerable to various noxious stimuli in the neurodegeneration processes involving the basal ganglia. The GAD1 mRNA distribution in the mouse lateral striatum partially resembled those of GPR155 and cannabinoid receptor type 1 mRNAs, suggesting functional cooperation in some neurons. Next, it was examined by calbindin immunostaining whether this intriguing region corresponds to the area fully included in the calbindin-poor zones. The calbindin-poor zones were seen laterally and dorsolaterally in the striatum, while predominant calbindin-rich matrix structures containing calbindin-poor patches were seen in the central and ventromedial parts of the striatum. We found that the locations of cell groups characterized by a high level of GAD1 mRNA correspond to the part of the lateral striatum characterized as calbindin-poor zones.

線条体の外側部は感覚運動皮質から強い投射を受ける。この領域は、Calbindin D-28K 免疫染色で出現する Calbindin-poor compartment にほぼ一致することが知られている。しかしながらこれまで Calbindin-poor compartment の organization は判然としていない。一方、われわれの研究を含むこれまでの研究から、線条体の外側部に比較的強く発現するマーカー物質が知られている。本研究では、マーカー物質として、外側部ニューロンに強く発現している GAD1 mRNA と Cannabinoid type 1 receptor (CB1) mRNA を用いて、それぞれの分布域をマウス線条体 Calbindin-poor compartment 内に特定した。その結果、(1) Calbindin-poor compartment は、大きく Anterior, Middle, Posterior の 3つの領域に区分される。(2) GAD1 mRNA は Middle region にとくに強く発現する。(3) CB1 mRNA は 3つの領域に広く発現する。(4) Anterior region と Posterior region は、線条体の腹側部で合流する。背側部で拡散する。全体として、Middle region をなかに挟んだ V 字型を描く。以上の (1) - (4) が判明した。Compartment のこのユニークな形態は、おそらく背腹方向に分布する同一の皮質対応部位の情報処理に関し、背側部と腹側部で機能が相当異なっていることを形態から示唆しているものと考えられた。

2. List of Publications

Original Articles

1. Stefan Trifonov, Takeshi Houtani, Masahiko Kase, Kazunori Toida, Masato Maruyama, Yuji Yamashita, Jun-ichi Shimizu and Tetsuo Sugimoto. Lateral regions of the rodent striatum reveal elevated glutamate decarboxylase 1 mRNA expression in medium-sized projection neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 35 (5): 711-722, Feb. 15, 2012. ([PDF N2-1](#))
2. Satoko Hamada, Stefan Trifonov, Takeshi Houtani, Masahiko Kase, Yuji Yamashita, Kazuyasu Baba, Jun-ichi Shimizu, Masato Maruyama, Koichi Tomoda, Toshio Yamashita and Tetsuo Sugimoto. Cholinergic Fibers and Muscarinic Receptors in the Central Auditory System. *J. Kansai Med. Univ.*, in press, 2012.

Proceedings

1. 山下雄司, Stefan Trifonov, 宝谷剛志, 丸山正人, 加瀬政彦, 杉本哲夫. マウス線条体外側部マーカー物質のV字型縞構造への局在. 第117回日本解剖学会・全国学術集会, 甲府, 2012年3月.
2. 山下雄司, Stefan Trifonov, 宝谷剛志, 丸山正人, 加瀬政彦, 杉本哲夫. マウス線条体のV字型構造. 第87回日本解剖学会近畿支部学術集会, 西宮, 2011年12月.
3. 山下雄司, Stefan Trifonov, 宝谷剛志, 丸山正人, 加瀬政彦, 清水順一, 杉本哲夫. マウス線条体外側部 calbindin-poor 領域の空間配置. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 2011年9月.

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Imaging of disease-related molecules and cells 病因細胞および分子のイメージング		
P.I.	Hiroko Matsuda, 松田博子	E-mail	matsudah@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Cellular and Molecular Physiology, 細胞分子生理学（生理学第1）講座		
Collaborator	松田博子、岡田誠剛、武藤恵、林三樹夫		
Keywords	ion channel, proteolysis, virus vector, visualization		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Protein expression is regulated by synthesis as well as degradation, but little is known about the degradation of inwardly rectifying K⁺ channel (Kir2.1). We developed two in vivo applicable methods for the examination of protein degradation using fluorescent proteins, i.e., SNAP-tag and fluorescent timer (FT). We constructed the SNAP-Kir2.1 and FT-Kir2.1 fusion proteins and revealed that the degradation of Kir2.1 is regulated through the current. Pulse-chase experiments showed that the half-life of SNAP-Kir2.1 is shortened in high expression cells, the blockade of Kir current elongated the half-life, and the half-life of hyper-conductive mutant Kir2.1 is shorter than that of wild-type. The fluorescence of FT changes spontaneously and slowly from green to red; thereby the green/red ratio allows us detect the changes in the half-life of the FT-fused protein. We constructed of FT-Kir2.1 fusion protein and confirmed the slowed degradation by the current blockade.

High titer of viral vector is essential for the efficiency of the study. We found that the titer of the lentiviral vector, which expresses Kir2.1, is increased by the blockade of Kir2.1 current during viral production. Reportedly, cellular ATP-level is critical for the viral vector production, therefore we measured the ATP level of the viral vector producing cells. Expectedly, the ATP level was decreased by the overexpression of Kir2.1, and the decrease was restored by the blockade. Interestingly, the blockade did not increase the titer of other lentiviral vectors that express voltage-dependent K⁺ channels, i.e., Kv1.4, Kv4.2, and HERG. These results suggest the increase in the titer is dependent on the voltage-dependency of the K⁺ channels.

Conventional assay for ion channels is time-consuming and requires the skill of patch-clamping or costly patch-clamping robot. We developed a labor-saving assay for Kir2.1, based on the toxic effect of excessive K⁺ current and coexpressed GFP fluorescence. This method enables us high-through-put assays for blocker and opener of Kir2.1. Using this method, we started the screening of the venom of Mexican scorpions, which is a promising source for the blocker and opener of ion channels.

To construct a viral vector which specifically expresses a gene in somatotrophs, we constructed lentiviral vectors, which express GFP under the control of promoter of growth hormone gene, and injected into the rat pituitary. The lentiviral vector robustly expressed the GFP in a somatotroph-specific way. The expression of GFP in upregulated by GHRH and a IGF-1 receptor blocker, showing the retention of transcriptional control. Furthermore, the expression of GFP was reduced by mental stress, which is reported to reduce the human growth. Next, for the examination of the development of somatotroph, we constructed the Moloney retroviral vector of similar construct. The retroviral vector expressed GFP in the newborn somatotrophs. The GFP-positive cell tended to form clusters. Our cluster analyses suggest preceding determination of somatotrophs and delayed expression of growth hormone.

GFP was transiently expressed by lactotrophs, suggesting a similarity in the transcriptional control.

To examine the ion channels involved in the secretion of HCO_3^- from the duct cell in the pancreas, we established the monolayer and oriented culture of Capan-1 cells on a membrane filter. This oriented culture recapitulates the apical and basolateral structures of the duct. We found the apical distribution of $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$, $\text{Kv}7.1$, CFTR, Adenosine2A receptor, and the basolateral expression of $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ and secretin receptor. We confirmed the similar expression pattern in the mouse pancreas. Secondly, to express a gene of interest in a duct cell-specific way, we constructed a lentiviral vector that express GFP under the control of secretin receptor gene. This lentiviral vector successfully expressed the GFP in the Capan-1 cells.

- ① 特定のタンパクの分解速度の変化を、蛍光タンパクを用いた方法を開発し、それを用いて内向き整流性 K^+ チャンネル(Kir2.1)の分解が K^+ 電流に応じて調節されることを明らかにした。
- ② Kir2.1 を発現するレンチウイルスベクターの調製時に、同チャンネル電流を遮断すると、タイターが上昇することが見出した。
- ③ 過剰な K^+ 電流による毒性と、共発現させた GFP 蛍光を用いて、Kir2.1 電流の High-through-put なアッセイ系を開発した。これを用いて、これまでに他のイオンチャンネル遮断薬、開口薬が発見されているメキシコ産サソリ毒のスクリーニングを開始した。
- ④ 成熟および新生ソマトトロフをラベルし、ストレスに対する反応、および分化を検討するために、成長ホルモン(GH)プロモーターを用いたレンチ及びレトロウイルスベクターを作成し、ソマトトロフ特異的なレポーター遺伝子(GFP)の発現を認めた。GFP 発現はストレスによって低下した。
- ⑤ 膵導管細胞の HCO_3^- 分泌に関与するイオンチャンネルを明らかにするため、1) 膵癌 Capan-1 細胞をフィルター上で単層培養し、上皮細胞モデルを作製した。KCa3.1, Kv7.1, CFTR、アデノシン 2A 受容体の管腔側の発現、セクレチン受容体の側底膜側の発現を認めた。マウス膵導管において、同様の発現パターンを認めた。2) 導管細胞特異的な遺伝子発現を可能にするため、セクレチン受容体プロモーターを用いたレンチウイルスベクターを作成し、Capan-1 細胞でレポーター遺伝子(GFP)の発現を認めた。

2. List of Publications

Proceedings

1. 林美樹夫、ノバック・イヴァナ・マウス膵導管微小灌流標本における静止膜電位・日本生理学会、松本・2012年3月30日
2. 武藤恵、松田博子・海馬自発性電流の修飾・日本生理学会・松本・2012年3月29日

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	The role of serotonin and dopamine for cognitive processes in the primate. 霊長類におけるセロトニン・ドパミンによる認知機能の制御		
P.I.	Kae Nakamura, 中村加枝	E-mail	nakamkae@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Cognitive Neuroscience, 高次認知脳科学（生理学第2）講座		
Collaborators	松崎竜一、則武厚、林和子		
Keywords	dopamine, dorsal raphe nucleus, hypothalamus, monkey, reward, serotonin		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Decision making based on reward and punishment is critical for animals' survival. While many brain areas have been implicated in the process, exactly which area is computing which aspect of reward or punishment has not been well understood. To this end, we recorded single neuronal activity of neurons in the dorsal raphe nucleus (DRN), the major source of serotonin, and the lateral hypothalamic area (LHA), one of the main source of dopamine neuronal activity which encodes reward predication error, while monkeys performed (1) saccade tasks with biased reward schedule and (2) Pavlovian conditioning task.

In the DRN, we found that many neurons responded stronger either for rewards and punishments. However, the response was markedly stronger for the tasks with actions (i.e. saccade tasks) rather than the passive task (i.e. Pavlovian conditioning task). Thus the DRN appeared to be involved in integration of value and action.

In the LHA, we found many neurons showed modulation in activity depending on the reward predictability. Some neurons also showed stronger response to aversive events. Thus the LHA carries enough information to compute positive and negative value. We will further investigate how these areas communicate each other commnuicate to integrate the information, by pharmacological and electrophysiological approaches.

報酬とそれを得るためのコスト・嫌悪刺激の情報を計算して行動を選択することは、生物の生存に決定的な影響を与える。報酬や嫌悪刺激の情報処理にかかわる脳領域は多く報告されているが、どの領域が報酬情報の中でも具体的に何を計算しているのか、情報がどのように統合されて最終的な行動に至るのかいまだによくわかっていない。この疑問に答えるためには、同じ個体、同じ行動課題で、異なる領域から神経活動を記録する方法が有効である。そこで我々は、カニクイザル計3頭において、報酬量を変化させた眼球運動課題と、パブロフ型の条件付け課題、さらに go nogo 課題を訓練し、セロトニン細胞の存在する背側縫線核 (DRN)、ドパミン系に強い投射がある視床下部外側部 (LHA) から単一神経細胞外記録を行った。それぞれの領域では異なる形で報酬や嫌悪刺激情報が表現されていることがあきらかになった。DRN: パブロフ型の条件付け課題において、報酬に対しては予測される報酬よりも、予測されない報酬に対して、しばしば強く応答した。嫌悪刺激に対しては、一般に反応は弱かった。これらの結果は、DRN 細胞はドパミン神経と同様に報酬予測において重要な役割を担う可能性を示唆する。LHA: 従来は正の報酬に応答すると考えられていたが、正のみならず負の報酬に応答するものがあり、さらに報酬確率をコードしている細胞群も見つかった。これらのことは、LHAが正負報酬の統合

処理を行うに十分な情報量をもっていることを意味する。

2. List of Publications

Original Articles

1. Okada K, Nakamura K, Kobayashi Y • A neural correlate of predicted and actual reward-value information in monkey pedunclopontine tegmental and dorsal raphe nucleus during saccade tasks. • Neural Plasticity • Volume 2011, Article ID 579840 • 2011 • 1-21 ([PDF N4-1](#))

Proceedings

1. Atsushi Noritake, Kae Nakamura • Neuronal modulation in appetitive and aversive contexts in the primate lateral hypothalamus • 日本神経科学大会 • パシフィコ横浜 (神奈川県) • 2011年9月
2. Kazuko Hayashi, Atsushi Noritake, Kae Nakamura • Cognitive control of response inhibition in the primate • 日本神経科学大会 • パシフィコ横浜 (神奈川県) • 2011年9月
3. Kae Nakamura • APPETITIVE AND AVERSIVE CODING BY THE PRIMATE DORSAL RAPHE NUCLEUS • 11th International Conference on Cognitive Neuroscience • Mallorca, Spain • 2011年9月
4. Atsushi Noritake, Kae Nakamura • Comparison of neuronal signals for reward value in appetitive and aversive contexts in the primate lateral hypothalamus area • Society for Neuroscience Meeting • Washington, DC, USA • 2011年11月
5. Kazuko Hayashi, Kazuko Nakao, Ryuichi Matsuzaki, Ken-ichi Okada, Yasushi Kobayashi, Kae Nakamura • Neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus encodes positive and negative value • Society for Neuroscience Meeting • Washington, DC, USA • 2011年11月

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Elucidation of pathogenesis and development of diagnosis and treatment of intractable neural diseases 難治性神経疾患の病態解明と診断治療法の開発		
P.I.	Seiji Ito, 伊藤誠二	E-mail	ito@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Molecular and Functional Biology, 分子生体機能学 (医化学) 講座		
Collaborators	松村伸治、矢尾育子、下條正仁、片野泰代、西田和彦		
Keywords	gene-engineered mice, imaging mass spectrometry, neurodegenerative diseases, nocistatin, pain		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

These 10 years we prepared neuropathic pain model in many gene-engineered mice, and have been engaged in the elucidation of its pathogenesis and search of target molecules in the spinal cord. We found that neural plasticity mediated by glutamate receptors, especially NMDA subtypes is involved in the generation and maintenance of chronic pain and that there is a similarity in neural plasticity and molecules between central sensitization observed in the spinal cord and long-term potentiation in the hippocampus. On the other hand, while candidates of causative genes and proteins are known in neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis and Huntington disease, their effective treatments have not been developed. In addition to conventional research with molecular, biochemical, and immunochemical procedures, we study normal neuronal transmission *in vivo* and elucidation of pathogenesis and search of target molecules with state-of-the-art imaging systems, including by multi-photon microscopy and imaging mass spectrometry. Furthermore, we have started to prepare gene-engineered mice for target molecules searched by us and clarify a mechanism of diseases with patients' iPS cells.

Major research activities in 2011 are as follows.

- 1) Elucidation of mechanism of inflammatory and neuropathic pain in model animals (N5-4, -8, -11)
- 2) Identification of a target protein of nocistatin and confirmation by its knockout mice (N5-12)
- 3) Role of transcription factors in development and differentiation (N5-2, -10)
- 4) Synthesis of ¹¹C-labeled kainoid for PET and its functional analysis (N5-6)
- 5) Development of software and application of imaging mass spectrometry (N5-1, -12, -15)
- 6) Development of novel strategy of the control of postoperative pain by analgesic hydrogel (N5-14)

この10年間、様々な遺伝子改変マウスで神経障害性疼痛モデルを作製し、その病態解明と標的分子の探索を脊髄で行ってきた。その結果、(1) グルタミン酸受容体の可塑的变化とその下流の分子が慢性疼痛に関与すること、(2) 脊髄での神経可塑的变化は、海馬など上位中枢で見られる長期増強の可塑的变化と共通性があることがわかった。一方、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病などの神経変性疾患では、その原因遺伝子・タンパク質が見つかっているが、有効な診断治療法はない。従来の共焦点顕微鏡に加えて、PET、多光子励起顕微鏡、質量顕微鏡等の最新の分子イメージングシステムを用いて、正常な神経系での情報伝達機構とその病態の解明と標的分子の探索を行っている。探索した標的分子のノックアウトマウスを作製する一方、患者 iPS 細胞を用いた病態解明も進めている。

平成 23 年度の主な成果は以下のとおりである。

- 1) モデル動物を用いた炎症性、難治性疼痛の発症・維持機構の解明 (N5-4, N5-8, N5-11)
- 2) ノシスタチン標的分子 NIPSNAP1 の同定とノックアウトマウスでの検証 (N5-12)
- 3) 転写因子の神経発生・細胞分化の役割の解明 (N5-2, N5-10)
- 4) PET 用 ^{11}C カイニン酸誘導体の合成と機能解析 (N5-6)
- 5) 質量顕微鏡のソフトウェアの開発と応用 (N5-1, N5-12, N5-15)
- 6) 生体吸収性ゲルの手術創埋め込みによる新しい術後鎮痛法の開発 (N5-14)

2. List of Publications

Original Articles

1. Hayasaka, T., Goto-Inoue, N., Ushijima, M., Yao, I., Yuba-Kubo, A., Wakui, M., Kajihara, S., Matsuura, M. and Setou, M. Development of imaging mass spectrometry (IMS) dataset extract software. *Anal. Bioanal. Chem.* **401**, 183-193, 2011.
2. Shimojo, M. RE1-silencing transcription factor (REST) and REST-interacting LIM domain protein (RILP) affect P19CL6 differentiation. *Genes Cells* **16**, 90-100, 2011. ([PDF N5-2](#))
3. Ohnaka, M., Okuda-Ashitaka, E., Kaneko, S., Ando, A., Maeda, M., Furuta, K., Suzuki, M., Takahashi, K., and Ito, S. Induction of arginase II mRNA by nitric oxide using an in vitro model of gyrate atrophy of choroid and retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 1493-1500, 2011. ([PDF N5-3](#))
4. Katano, T., Nakazawa, T., Nakatsuka, T., Watanabe, M., Yamamoto, T. and Ito, S. Involvement of spinal phosphorylation cascade of Tyr1472-NR2B, Thr286-CaMKII, and Ser831-GluR1 in neuropathic pain. *Neuropharmacol.* **60**, 609-616, 2011.
5. Yao, I., Takao, K., Miyakawa, T., Ito, S. and Setou, M. Synaptic E3 Ligase SCRAPPER in Contextual Fear Conditioning; Extensive Behavioral Phenotyping of Scrapper Heterozygote and Overexpressing Mutant Mice. *PLoS ONE* **6**, e17317, 2011. ([PDF N5-5](#))
6. Kanazawa, M., Furuta, K., Doi, H., Mori, T., Minami, T. and Ito, S. Synthesis of an acromelic acid A analog-based ^{11}C -labeled PET tracer for exploration of the site of action of acromelic acid A in allodynia induction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 2017-2020, 2011.
7. Chizaki, R., Yao, I., Katano, T., Matsuda, K. and Ito, S. Restricted expression of Ovol2/MOVO in XY body of mouse spermatocytes at the late pachytene stage. *J. Androl.* **33**, 2, 2011.
8. Lu, J., Katano, T., Okuda-Ashitaka, E., Oishi, Y., Urade, S. and Ito, S. Rapid S-nitrosylation of actin by NO-generating donors and in inflammatory pain model mice. *Mol. Pain*, **7**, 101, 2011. ([PDF N5-8](#))
9. Okazaki, T., Otani, H., Shimazu, T., Yoshioka, K., Fujita, M., Katano, T., Ito, S. and Iwasaka, T. Reversal of inducible nitric oxide synthase uncoupling unmasks tolerance to ischemia/reperfusion injury in the diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* **50**, 534-44, 2011.
10. Nishida, K., Nakayama, K., Yoshimura, S. and Murakami, F. Role of Neph2 in pontine nuclei formation in the developing hindbrain. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**, 662-670. 2011.
11. Nishiyori, M., Uchida, H., Nagai, J., Araki, K., Mukae, T., Kishioka, S. and Ueda, H. Permanent relief from intermittent cold stress-induced fibromyalgia-like abnormal pain by repeated intrathecal administration of antidepressants. *Mol Pain.* **7**, 69, 2011. ([PDF N5-11](#))
12. 伊藤誠二, 南敏明 (2011) 医薬品開発のための慢性疼痛発生・維持機構の考え方. 医薬

品医療機器レギュラトリーサイエンス, 第42巻, 第5号, 392-399頁.

13. 南敏明、伊藤誠二 (2011) 医薬品開発のためのペインクリニックの現状 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 第42巻 第6号, 474-480頁
14. 伊藤誠二、下條正仁、松村伸治 (2011) 痛みの可塑性と慢性化 脊椎脊髄ジャーナル特集痛みとしびれのサイエンス—基礎と臨床, 第24巻 第5号, 341-347頁
15. 芦高恵美子、伊藤誠二 (2012) ノシセプチンとノシスタチン Clinical Neuroscience 月刊臨床神経科学2月号, 第30巻 第2号, 148-151頁

Proceedings

1. Ito, S. Mechanism of maintenance of neuropathic pain in the spinal cord, as a model of neural plasticity. The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases in Toyama, Toyama, August 3, 2011.
2. Ito, S., Kunori, S., Matsumura, S., Katano, T., Urade, Y. and Okuda-Ashitaka, E. Blockade of microglial migration in the spinal cord by prostaglandin E2 via EP2. The 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, November 12-16, 2011.
3. Yao, I., Katano, T., Miyakawa, T., Ito, S. and Setou, M. Synaptic E3ligase SCRAPPER is crucial for hippocampus-dependent fear memory formation. The 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, November 12-16, 2011.
4. Katano, T., Ito, S. The activation of NR2B-NMDAR by phosphorylation of Tyr1472-NR2B triggers phosphorylation cascade in neuropathic pain. The 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, November 12-16, 2011.
5. 向真樹、片岡達彦、大谷晃宏、久保幹、山田久夫、伊藤誠二、木原裕. 医薬理工融合型ライフサイエンス分野における高度人材育成教育プログラムの創成 第43回日本医学教育学会大会、ポスター発表、広島、2011、7月
6. 荒木吉朗、海堀昌樹、松村伸治、伊藤誠二、權雅憲. 生体吸収性ハイドロゲルの手術創埋込みによる鎮痛薬の徐放効果を用いた革新的な術後鎮痛法の開発 日本ペインクリニック学会第45回大会、ポスター発表、松山、2011、7月

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Analysis of intracytoplasmic inclusions of neurodegenerative diseases by imaging mass spectrometry 質量顕微鏡を用いた神経変性疾患細胞内封入体の研究		
P.I.	Hirofumi Kusaka, 日下博文	E-mail	kusaka@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Neurology, 神経内科学講座		
Collaborators	金子鋭、和手麗香、藤田賢吾、朝山真哉		
Keywords	amyotrophic lateral sclerosis, inclusion body, neurodegenerative disease, progressive supranuclear palsy		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Before we start analysis of human brain section by imaging mass spectrometry, we performed immunohistochemical studies of intracytoplasmic inclusions of neurodegenerative diseases to obtain further preliminary findings.1)

We investigated a family manifesting amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with a heterozygous E478G mutation in the optineurin (OPTN) gene. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)-positive neuronal intracytoplasmic inclusions were reactive with anti-ubiquitin and anti-p62 antibodies, but negative for anti-OPTN antibody. Immunoreactivity of nuclear TDP-43 was reduced in inclusion-bearing cells. Fragmentation of Golgi apparatus was identified in 70% of the anterior horn cells. The presence of anterior horn cells with preserved nuclear TDP-43 and a fragmented Golgi apparatus indicates that patients with the E478G OPTN mutation would manifest fragmentation of Golgi apparatus before loss of nuclear TDP-43.2)

Immunohistochemical analysis revealed that all the basophilic inclusions (BIs) were positive for OPTN, Fused in sarcoma (FUS) and myosin VI in sporadic basophilic inclusion body disease (BIBD) patients and familial ALS with FUS mutation. However, the BIs showed no immunoreactivity for TDP-43 or SOD1. Therefore, OPTN associates with each of the 3 major ALS-related proteins, i.e., TDP-43, SOD1, and FUS. FUS is known to act as a co-activator of NF- κ B, and OPTN negatively regulates NF- κ B activation. Therefore, sequestration of both FUS and OPTN in BIs may induce dysregulation of NF- κ B activation, leading to neurodegeneration. Moreover, OPTN and myosin VI play a role in the maintenance of Golgi apparatus. Their sequestration in BIs may be an underlying pathomechanism of fragmented Golgi apparatus.3)

We demonstrated for first time that Smad ubiquitination regulatory factor-2 (Smurf-2) is co-localized in the phosphor-tau inclusions in progressive supranuclear palsy (PSP). As Smurf-2 is an E3 ligase of Smad2, intracellular signaling component of TGF β , dysregulation of TGF β /Smad signaling may be an underlying pathomechanism of PSP.4) Protein disulfide isomerase (PDI) is a member of the thioredoxin superfamily and is believed to accelerate the folding of disulfide-bonded proteins by catalyzing the disulfide interchange reaction. We demonstrated that PDI is co-localized in cytoplasmic inclusions of familial and sporadic ALS. Sequestration of PDI may result in accumulation of misfolded proteins in ALS.

質量顕微鏡を用いた神経変性疾患細胞内封入体の解析を行うのに先立ち、これまでの研究成果を元に平成 23 年度は神経変性疾患の封入体構成タンパク質について、神経病理学的検討を進めてきた。

- 1) Optineurin (OPTN) E478G 変異を有する家族性 ALS の神経病理学的検討を行った。TDP-43 陽性封入体は ubiquitin や p62 に陽性であったが OPTN には陰性であった。TDP-43 陽性封入体を持つ脊髄前角細胞では核の TDP-43 染色性が低下していた。Golgi 装置の断片化は 70% の前角細胞に観察された。核の TDP-43 染色性が保たれているのに Golgi 装置が断片化している神経細胞も多く見られたことから、核の TDP-43 染色

性低下に先行して Golgi 装置の障害が生じる可能性が示唆された。

- 2) FUS 変異を有する ALS や BIBD の好塩基性封入体(basophilic inclusion, BI)において、OPTN, FUS および myosin IV が共存することを見いだした。一方 TDP-43 や SOD1 は BI と共存していなかった。これまでの結果とあわせて OPTN は TDP-43, SOD1 および FUS という 3 つの ALS の関連タンパク質すべてと相互作用することが明らかになった。FUS は NF- κ B の co-activator であり、OPTN は NF- κ B の活性化を抑制することが知られている。FUS や OPTN が BI に補足されることにより NF- κ B の制御障害を来し、神経細胞変性に至る可能性がある。また OPTN と myosin IV は Golgi 装置の安定化に関わっており、これらの障害により Golgi 装置の断片化が生じて神経細胞死を来す可能性がある。
- 3) 進行性核上性麻痺(progressive supranuclear palsy, PSP)のリン酸化 tau 陽性封入体に Smad ubiquitination regulatory factor-2 (Smurf2)が共存していることを初めて見いだした。Smurf2 は Smad タンパクの ubiquitination を行う E3 ligase であることから、PSP の病態に TGFbeta/Smad シグナル伝達系の異常が関与していることが示唆された。

Protein disulfide isomerase (PDI)が家族性および孤発性 ALS の封入体に共存しており、PDI の機能異常が ALS でのタンパク質ミスフォールディングに関与している可能性が示唆された。

2. List of Publications

Original Articles

1. Ito H, Nakamura M, Komure O, Ayaki T, Wate R, Maruyama H, Nakamura Y, Fujita K, Kaneko S, Okamoto Y, Ihara M, Konishi T, Ogasawara K, Hirano A, Kusaka H, Kaji R, Takahashi R, Kawakami H. Clinicopathologic study on an ALS family with a heterozygous E478G optineurin mutation. Acta Neuropathol. 2011 Aug;122(2):223-9. ([PDF N6-1](#))
2. Honjo Y, Kaneko S, Ito H, Horibe T, Nagashima M, Nakamura M, Fujita K, Takahashi R, Kusaka H, Kawakami K. Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler. 2011 Nov;12 (6):444-50.

Proceedings

1. Nakamura M, Kaneko S, Ito H, Asayama S, Nishii M, Fujita K, Wate R, Kusaka H Smad ubiquitination regulatory factor-2 accumulates in TAR DNA binding protein-43 positive cytoplasmic inclusions in spinal cord but not in hippocampus of sporadic amyotrophic lateral sclerosis 87th Annual Meeting of the American Association of Neuropathologists, Seattle WA USA 2011/6/25

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Elucidation of pathogenesis of psychiatric disorder 精神障害の病態研究		
P.I.	Toshihiko Kinoshita, 木下利彦	E-mail	kinoshit@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Neuropsychiatry, 精神神経科学講座		
Collaborator	加藤正樹、齊藤幸子、嶽北佳輝、坂井志帆、高野悟史		
Keywords	bipolar disorder, obsessive-compulsive disorder, schizophrenia		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>Recently, biological background was found to contribute to the most of psychiatric disorder. Among others, in schizophrenia, bipolar disorder and obsessive-compulsive disorder as well as the developmental diseases such as autism and the attention deficit/hyperactivity disorder, biological factor was reported to have large contribution. (Burmeister, 2008). Morbidity and heritability are 1% and 70-85% in schizophrenia, 1% and 60-85% in bipolar disorder, 1.6 % and 60-70% in obsessive-compulsive disorder, respectively. Therefore, we wanted to touch getting a head start of the pathological elucidation in psychiatric disorder by using molecular imaging technique. At the present, the progress of this study for the each disease is as follows.</p> <p>1. Schizophrenia We perform two following studies for the pathological elucidation of patients with schizophrenia. a. Mirror neuron abnormalities in patients with first-episode schizophrenia We succeed a three-dimensional construction of the mirror neuron using diffusion tensor image analysis in 2011. The purpose in the future is to identify and to evaluate mirror neuron integrity in patients with schizophrenia compared with healthy controls. b. Open label randomized trial of treatment by second generation antipsychotics for schizophrenia patients considering the drug susceptibility gene We completed the recruiting of the patients that it was thought that it was necessary in this study in 2011. We will continue the analysis of obtained data in future.</p> <p>2. Bipolar disorder We plan a study aiming at the pathological elucidation of patients with Japanese bipolar disorder and a construction of the treatment algorithm. Now, we prepare for the multicenter study in this field and conduct adjustments of the protocol.</p> <p>3. Obsessive-compulsive disorder We plan a study aiming at the pathological elucidation of patients with Japanese obsessive-compulsive disorder and a construction of the treatment algorithm.</p> <p>近年、精神障害の多くには生物学的背景が存在することが明らかになっている。Burmeister (2008) らの報告では、精神科領域において、自閉症や注意欠陥多動性障害などの先天的に発症が認められる発達障害を除くと、最も生物学的背景との関連が強く認められる疾患は統合失調症、双極性障害、強迫性障害の3疾患であることが示されている。それぞれの罹患率と遺伝率は、統合失調症：1%/70～85%、双極性障害：1%/60～85%、強迫性障害：1.6%/60～70%とされている。</p> <p>今回我々はこれらの生物学的背景が他の精神疾患と比較して強いと考えられる疾患の病態について、分子イメージング手法を利用することで病態解明の先鞭を付けたいと考えた。</p> <p>現時点での各疾患に対する本研究の進行状況は以下の通りである。</p> <p>1. 統合失調症 統合失調症患者の病態解明に向けて以下の2つの研究を行っている。</p> <p>①ミラーニューロンの形態変化：拡散テンソル画像解析による精神科治療効果判定 ②統合失調症の個別化治療アルゴリズム構築に向けた第2世代抗精神病薬の無作為比較試験</p>			

①については拡散テンソル画像解析を用いて、社会的認知と関与が深いとされているミラーニューロンの三次元構築を試み、平成 23 年度に成功している。今後はどのような治療がミラーニューロンに作用し、患者の社会的認知の回復につながっているかについて検討を行っていく。

②については平成 23 年度は本研究において必要と考えられた患者のリクルートを終了した。今後は得られたデータの解析を継続して行っていく。

2. 双極性障害

日本人双極性障害患者の病態解明及び治療アルゴリズムの構築を目指した研究を予定している。本分野では多施設共同試験を予定しており、現在その施行に向けたプロトコールの調整等を行っている。

3. 強迫性障害

日本人強迫性障害患者の病態解明及び治療アルゴリズムの構築を目指した研究を予定している。

2. List of Publications

Books

1. 加藤正樹、木下利彦 (樋口輝彦、野村総一郎、加藤忠史); 第 11 章 うつ病の薬物療法. うつ病の事典 うつ病と双極性障害がわかる本; 106-114, 日本評論社 2011 164 頁
2. 加藤正樹; [I .統合失調症] 4.薬物遺伝学からみた合理的な薬物選択は?. EBM 精神疾患の治療 2011-2012;28-33, 中外医学社 2011 388 頁

Proceedings

1. 加藤正樹; 治療抵抗性うつ状態 predict, prevent and treat. 第 30 回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 2011.7(京都)
2. 齊藤幸子・Mirror neuron abnormalities in Patients with First-Episode Schizophrenia 広島精療精神医学研究会・広島・2011.10
3. 齊藤幸子、大塚達以、木下利彦、Shenton Martha・ミラーニューロンと共感～拡散テンソル画像解析によるミラーニューロンの三次元構築の試み～・第 13 回日本サイコセラピー学会・大阪・2012.3
4. 齊藤幸子、大塚達以、木下利彦、Shenton Martha・拡散テンソル画像解析によるミラーニューロンの三次元構築の試み・第 128 回 関西医科大学学内学術集談会・大阪・2012.3
5. 嶽北佳輝、加藤正樹、坂井志帆、諏訪梓、分野正貴、奥川学、木下利彦; 日本人統合失調症患者に対する perospirone と aripiprazole のオープンラベル無作為割付比較試験. 第 21 回日本臨床精神神経薬理学会, 第 41 回日本神経精神薬理学会合同年会 2011.10(東京)
6. Takekita Y, Kato M, Wakeno M, Sakai S, Suwa A, Nishida K, Okugawa G, Kinoshita T; A Open-label, Randomized Comparative Study of Perospirone and Aripiprazole in Japanese Schizophrenia Patients. 2nd Congress of AsCNP 2011.9(Seoul)
7. Takekita Y, Kato M, Sakai S, Suwa A, Okugawa G, Kinoshita T; Comparison of Perospirone and Aripiprazole: A 12 weeks, Randomized Open-label Study in Japanese Schizophrenia Patients. 24th ECNP Congress 2011.9(Paris)

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Possible role of propofol's cyclooxygenase-inhibiting property in alleviating dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra in an MPTP-induced murine model of Parkinson's disease プロポフォールの活性化ミクログリア依存性神経細胞傷害に及ぼす影響		
P.I.	Koh Shingu, 新宮興	E-mail	shingu@hirakata.kmu.ac.jp
Affiliation	Medical Control of Stress Response, 侵襲反応制御学(麻酔科学)講座		
Collaborators	稲田武文、久保古寿江		
Keywords	intravenous anesthesia, microglia, neurodegenerative disorders, Parkinson's disease, propofol		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Propofol is an intravenous anesthetic widely used for sedation and general anesthesia. We investigated the effect of propofol on prostanoid production by activated microglia.

Primary microglial culture was obtained from the brains of neonatal C57BL/6 mice. The microglia were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) in the presence of propofol. Propofol suppressed the LPS-induced production of prostaglandin E₂ and thromboxane B₂. Cyclooxygenase (COX) protein expression and arachidonic acid release were not affected by propofol, while COX enzyme activity was significantly inhibited by propofol. The COX-inhibiting activity was also observed with purified enzymes, with COX-2 inhibition being significantly greater than COX-1 inhibition.

Next, we studied whether the COX-inhibiting activity of propofol resulted in dopaminergic neuroprotection in a 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) murine model of Parkinson's disease, in which COX inhibitors, such as non-steroidal anti-inflammatory drugs, are reported to be neuroprotective. C57BL/6 mice received intraperitoneal injections of MPTP with or without propofol treatment, and the dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) were examined immunohistochemically by observing the tyrosine hydroxylase-positive cells. The number of dopaminergic neurons in the SNpc was significantly reduced by MPTP treatment, while the MPTP-induced neuronal loss was minimal upon treatment with propofol or the selective COX-2 inhibitor, NS-398. These results indicate that propofol might be beneficial in mitigating MPTP-induced dopaminergic neurons, possibly via its COX-inhibiting activity.

In this era of longer life spans, the number of patients afflicted by neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease has been increasing, as has the number of surgeries performed on such patients. There are two kinds of general anesthesia technique: one uses inhalational anesthetic and the other intravenous anesthetic. Propofol is one of the intravenous anesthetics. Until now, the choice of anesthetic is largely dependent on the anesthesiologist's preference, and not necessarily on the patient's neurodegenerative disorders. Our findings might be taken into account when considering what anesthetic is indicated during a surgical procedure.

プロポフォールは現在世界で最も広く使用されている麻酔薬の一つである。また近年高齢化の影響もあり、アルツハイマー病やパーキンソン病などといった中枢神経変性疾患を患った人々が増加しておりそれに伴い同名疾患を抱えた患者の手術麻酔件数も増加して

きている。われわれは中枢神経変性疾患での炎症メディエーター産生細胞としてのミクログリアに注目し、プロポフォールが活性化ミクログリアからのプロスタグランジンE₂ (PGE₂) の産生を抑制することを見出した。

つぎに PGE₂ 合成の重要な酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) に注目し、プロポフォールがCOX の活性を直接抑制することを見出した。したがって、プロポフォールには非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) 様の効果もあるようである。

また NSAID がアルツハイマー病やパーキンソン病などの中枢神経変性疾患の予防効果があることからプロポフォールとパーキンソン病との関係を調べた。具体的には MPTP 誘発性パーキンソン病モデルマウスを用いて、プロポフォールの COX 活性抑制作用が黒質ドパミン神経保護作用を示すかどうかを調べた。プロポフォールならびに COX-2 選択的阻害薬は、神経傷害を有意に抑制した。さらにプロポフォールは COX-2 選択的阻害薬と同様に黒質の MPTP 誘発性のミクログリアの活性化を抑制した。その結果プロポフォールは COX 活性抑制を介し、MPTP 誘発性黒質ドパミン神経傷害を抑制する可能性があることがわかった。

麻酔薬にドパミン神経保護作用があることは、これまで知られておらず、中枢神経変性疾患の麻酔薬の選択の際の一つの指標となりうるものと考えられる。

2. List of Publications

Original Articles

1. Kubo K, Inada T, Shingu K. Possible role of propofol's cyclooxygenase-inhibiting property in alleviating dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra in an MPTP-induced murine model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1387, 2011, 125-133 ([PDF N8-1](#))

Proceedings

1. 久保古寿江、稲田武文、新宮興 パーキンソン病患者の麻酔にプロポフォールは有用か？日本臨床麻酔学会第31回大会 沖縄コンベンションセンター 2011年11月3日

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Analysis of the Brain Digitalislike Substance Underlying HYPERTENSION 高血圧の病態解明のための脳内内因性ジギタリスの局在分析		
P.I.	Hakuo Takahashi, 高橋伯夫	E-mail	takahash@hirakata.kmu.ac.jp
Affiliation	Clinical Sciences and Laboratory Medicine, 臨床検査医学講座		
Collaborators	小宮山豊、吉賀正亨、横井豊彦		
Keywords	central nervous system, endogenous digitalis, hypertension, hypothalamus, sympathetic nerve activity		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

We have been searching for the endogenous digitalis as a cause of hypertension related to excess intake of sodium for many years. It is well known that the endogenous digitalis is produced upon sodium loading not only in rats but also in humans. When we used anti-ouabain or -digoxin antibody to stain the immunoreactive substances in the brain, those were clearly demonstrated in the paraventricular and supraoptic nuclei in the hypothalamus. Those nerve fibers extended into posterior pituitary. Therefore, endogenous digitalis may be produced in the hypothalamus, and would be released by sensing accumulation of sodium in the body. This is our working hypothesis based on the earlier findings obtained mainly by us. To prove this hypothesis, we are aiming to figure up the whole story of mechanisms of hypertension in special reference to endogenous digitalis.

Recently, we found that bufadienolides are existed in the adrenal medulla and cortex, and the release was regulated by the renin-angiotensin axis. Since the adrenal medulla is of neural crest origin, marinobufagenin and/or marinobufotoxin may also exist in the central nervous system. Although we explored the existence of marinobufagenin-like immunoreactivity in the hypothalamus, it wasn't clear to visualize so far. Metabolism of ouabain in the brain is also suggested to be regulated via renin-angiotensin-aldosterone system. A cell line, N1 cells, originated from the paraventricular nucleus in the hypothalamus is now available. By using this immortalized cell line, we explored the possible mechanism of the production and release of ouabain; addition of aldosterone in the culture medium, dose-dependently increased the release of ouabain from N1 cells under the serum-free culture environment. This response was blunted by addition of eplerenone, a mineralocorticoid receptor blocker, in the culture medium. Therefore, aldosterone will be the direct agonist for secretion of ouabain.

Ouabain, digoxin and marinobufagenin, all are small molecules suitable for mass-spectrometric analysis. We have been using this method to identify these steroids. Rapid progress in imaging mass spectrometry may assist us to clarify the definite intracellular localization of endogenous digitalis in the brain. We are now aiming at the project by using the novel device.

平成 18 年以前から、この研究テーマに取り組んでいて、数多くの成果を挙げている。その結論は、交感神経調節の上位中枢である視床下部で、食塩負荷により産生されるウアバインやマリノブファゲニンなどの内因性ジギタリス様物質が交感神経活動を亢進させることで高血圧がもたらされるとするものである。ただし、この事実については、ヒトでは証明されていないだけでなく、実験動物においてもその詳細な点では、未だ明確とはいえない。例えば、ウアバイン、ジゴキシン、マリノブファゲニン以外のブファジェノライドのいずれが主体的に役割を演じているのかは定かではない。ここ数年の間に、我々の研究グループは、平成 18 年～19 年に、世界で初めてマリノブファゲニンにスベロイルアルギニンが付いたマリノブフォトキシシン (MBT) を脊椎動物 (ラット) で発見し、これに

昇圧作用があることを明らかにした。また、下垂体由来の細胞株 GH3 培養系にて MBT の分泌動態を調べたが明らかな変化はなかった。しかし、副腎皮質細胞由来の Y-1 細胞培養系では、MBT を産生していることを明らかにした。また、特筆すべきは、副腎髄質由来細胞株である PC12 細胞培養系でも MBT を産生していることを質量分析系を用いて明らかにしている。平成 20 年には、Y-1 細胞培養系で、MBT の産生と放出にアンジオテンシン II が関与することを AT-1 受容体拮抗薬 (ARB) を用いて明らかにした。そこで、自然発症高血圧ラット (SHR) を用いて、食塩負荷し、MBT の産生に及ぼすレニン-アンジオテンシン (RA) 系の関与を検討した。その結果、食塩負荷で MBT は血圧とともに著明に増加し、ARB は昇圧を明らかに抑制するが、MBT の産生に関してはやや減少傾向はあるものの食塩負荷による増加を完全には抑制しなかった。したがって、MBT の vivo での産生における RA 系の関与は不明である。

2. List of Publications

Original Articles

1. Takahashi H, Yoshika M, Komiyama Y, Nishimura M. The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the renin-angiotensin-aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. *Hypertension Res.* 34(11);2011:1147-1160. ([PDF N9-1](#))
2. Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H. An ouabain-like factor is secreted from immortalized hypothalamic cells in an aldosterone-dependent manner. *Neurochemistry international* 59(2);2011:104-108.
3. Yoshika M, Komiyama Y, Takahashi H. Isolation of marinobufotoxin from the supernatant of cultured PC12 cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology.* 38(5);2011:334-337.

Proceedings

1. 吉賀正亨, 小宮山豊, 高橋伯夫: 高血圧発症機序における内因性ジギタリスの臨床検査学的研究. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会. 岡山、2011 年 11 月
2. 高橋伯夫: 内因性ジギタリスを中心とした血圧の中枢性調節と高血圧発症機序. 第 15 回日本心血管内分泌代謝学会総会. 大阪、2011 年 11 月

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Studies on cell treatment for complete spinal cord injury 脊髄損傷に対する細胞治療の実験的研究		
P.I.	Toshio Nakatani, 中谷壽男	E-mail	nakatant@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Spinal cord Regeneration, 脊髄再生医学 (救急医学科)		
Collaborators	岩瀬正顕、前田裕仁、齊藤福樹、津田雅庸		
Keywords	bone marrow stromal cells, cell infusion therapy, spinal cord regeneration, spinal cord injury		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

We have been studied experimental and clinical research for the treatment of spinal cord injury. This year, we have made our effort to summarize and publish our recent clinical work as follows: To determine whether intrathecal administration of cultured autologous bone marrow stromal cells (BMSCs) is safe and feasible for treatment of subacute spinal injury. Five patients with complete tetraplegia due to cervical spinal injury on admission were included. A small amount of bone marrow was obtained during surgery for spinal fusion. BMSCs were cultured, reaching 107-108 cells. The properties and functional efficacy of the BMSCs were verified with surface marker analysis and a neurite extension test. BMSCs were administered by lumbar puncture. The patients were closely observed for 6 months, and the Committee on Effectiveness and Safety of Clinical Treatment (CESCT) evaluated safety. No adverse responses were observed in biochemical and radiographic examinations. The CESCT did not recognize any harmful effects of the transplantation, and concluded it was safe for treatment. The patients were further followed up for 1 to 4 years with no adverse responses. The recovery of American Spinal Injury Association Impairment Scale (AIS) B and C patients at transplantation was rapid and remarkable, but gradual or limited in AIS A patients. This study demonstrated that intrathecal administration of cultured autologous BMSCs is safe and feasible for treatment of spinal cord injury. The above study report has been accepted for publication. In our next step, we are planning to administer bone marrow mononuclear cells of the patient without incubation and proliferation. We also planning an experimental study to continue our clinical trials.

我々は、従来より脊髄損傷の治療に向けての実験的研究、臨床試験を行ってきた。今年度はそれらのうち、臨床試験の成果をまとめ、公表することに精力を注いだ。

我々がこれまで行ってきた培養自己骨髄間質細胞の髄液内投与による脊髄損傷治療の安全性と実現性について検討するために、頸髄損傷による四肢完全麻痺の5症例に実施した臨床試験成績をまとめて見た。試験に於いては受傷後の頸椎固定手術に際して、少量の骨髄海綿骨を採取し、培養して間質細胞を 10^7 乃至 10^8 に増殖させ、その細胞の質に関しては表面マーカーと突起伸長試験を経て確認した後に、患者の髄液内に投与して、移植細胞を損傷脊髄に到達せしめ6ヶ月の試験期間、及びそれ以降も経過を追跡し、外部委員を含む効果安全性評価委員会が安全性について評価した。血液生化学検査にて、或いは画像診断にて追跡しているが、これまでのところ最長4年間を経過しているが、何ら骨髄細胞移植によると思われる有害反応は無く、機能的には一症例で歩行可能、一症例で装具にて起立保持可能、2例にて車椅子の自己操縦可能となり、American Spinal Injury Association Impairment Scale にても motor score は従来の治療を行った症例に比べて、著しい改善を認

めた。ただし、1例のみは無効であった。本臨床試験は安全であり、かつ実現性が可能なものと考えている。

現在、我々は本治療法を確立するためにはより多施設での臨床試験が必要と考え、そのためには骨髄細胞を培養することなく、分離後直ちに移植する方法での臨床試験を行うべく、動物実験を経て臨床試験の準備を行っている。

2. List of Publications

Original Articles

1. Saito, F., Nakatani, T., Iwase, M., Maeda, Y., Murao, Y., Suzuki, Y., Fukushima, M., Ide, C. Administration of cultured autologous bone marrow stromal cells into cerebrospinal fluid in spinal injury patients: a pilot study. *Restor. Neurol. Neurosci.* 30: 127-136, 2012. ([PDF N10-1](#))

Division of Cancer

がん部門

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Dynamics of adult tissue specific stem cells by multi-color lineage tracing method 多色細胞系譜追跡法を用いた幹細胞の維持機構の解析		
P.I.	Hiroo Ueno, 上野博夫	E-mail	hueno@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Stem Cell Pathology, 幹細胞病理学講座		
Collaborators	比舎弘子、神田晃、槇政彦、田中敏宏、駒井資弘、矢内洋次、大町太一、大江秀一		
Keywords	development, regeneration, stem cell		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>We have developed a novel method for lineage tracing by using the cre-loxp-mediated multicolor mosaic system (2010 Nature, Red-Horse and Hiroo Ueno, 2011 Nature, Yuval Rinkevich and Hiroo Ueno). On the other hand, it has been reported that there are two kinds of stem cells in intestinal crypt, long-term slow growing stem cells, and short-term rapidly proliferating stem cells. We have already got cre-knockin mice that can detect these stem cell populations. We have also succeeded in establishing the <i>in vitro</i> culture method of intestinal epithelial cells. By combining these techniques, we are currently analyzing dynamics of two kinds of intestinal stem cells by time lapse imaging on various conditions.</p> <p>事業推進者はマルチカラー細胞系譜追跡法を開発して消化管上皮細胞の発生、成体腸幹細胞の維持機構について解析を行って来た。現在、大腸がん発症モデルを用い、そのがん化過程における正常成体腸幹細胞の維持機構の破綻について imaging を行っている。</p> <p>大腸がんの前がん病変である大腸腺腫の発症にはがん抑制遺伝子である adenomatous polyposis coli (Apc) 遺伝子の変異が深く関与している事が知られている。ヒト大腸がんにおいて Apc 遺伝子の変異または欠失が高頻度に認められ、また家族性ポリポーシスの家系に Apc 遺伝子の生殖細胞系列変異が報告されており、マウスにおいても Apc に点突然変異を持つ Apc^{min} マウスなどが家族性ポリポーシスモデルマウスとしてよく知られている。Apc 遺伝子産物は腸幹細胞の増殖シグナル伝達経路の一つである Wnt シグナル伝達経路の抑制因子であり、その変異により Wnt シグナルが異常に活性化される事が腸幹細胞の異常増殖につながり、腺腫の発症に関与すると考えられている。現在これらのモデルマウスを用いて、幹細胞を多色標識し、その動態について詳細にイメージングを行っている。</p> <p>イメージング技術の向上により研究効率が上昇した。3D ソフトウェアにより画像の立体像が解析出来る様になり、幹細胞の動態が正確に把握できるようになった。オールインワン顕微鏡の導入により Time lapse imaging が可能となり、単一幹細胞由来の細胞集団を時間経過とともに追える様になった。</p> <p>2. List of Publications</p> <p>Original Articles</p> <p>1. Rinkevich Y., Lindau P., Ueno H., Longaker, M., Weissman IL., Germ layer and lineage restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. Nature, 476, 409-413. (PDF C1-1)</p> <p>Proceedings</p> <p>1. 上野博夫・多色細胞系譜追跡法による成体幹細胞解析法・日本病理学会・横浜・2011</p> <p>2. 上野博夫・マルチカラー細胞系譜追跡法を用いた幹細胞・発生研究の現状・日本サイトメトリー学会・京都・2011</p>			

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Analysis of ATL development in HTLV-1 infected humanized mouse model HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた ATL 発症過程の解析		
P.I.	Jun-ichi Fujisawa, 藤澤順一	E-mail	fujisawa@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Viral Oncology, ウイルス腫瘍学 (微生物学) 講座		
Collaborators	竹之内徳博、田中正和、上野孝治、手塚健太、恩額日楽、荀潤澤		
Keywords	ATL, HTLV-1, humanized mice, leukemia stem cell		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Humanized mice (huNOG) established by the intra-bone marrow transplantation of NOG-SCID mouse with CD133+ hematopoietic stem cells purified from human cord blood were infected with HTLV-1 in vivo by peritoneal injection of γ -ray-irradiated MT-2 cells in 3 to 4 months after transplantation.

While normal differentiation of human T lymphocytes was observed in the spleen of uninfected huNOG mouse, HTLV-1 infection increased the number of CD25+ CD4+ T- lymphocytes and resulted in the splenomegaly within several months. In the late period of infection, where almost all of the blood cells in the mouse were composed of infected human T-lymphocytes, cells with highly lobulated or flower-shaped nuclei appeared in the peripheral blood.

Inverse PCR analysis of provirus integration sites revealed the polyclonal infection in the early phase of infection and the oligoclonal expansion of infected T cells mostly in the population of CD25+ CD4+ T- cells in the late phase. Since substantial amount of anti-Gag antibodies and Tax-specific CTLs were detected in the serum and the spleen of infected mice, respectively, the involvement of immune system against HTLV-1 was suggested in the clonal selection of HTLV-1 infected T-cells in this system.

When CD4+ T- cells in a spleen of infected mouse were divided into CD25+ and CD25- populations, common infected cell clones in terms of provirus integration site were identified in two populations and the percentage of the most abundant clone was larger in CD25+ cells than in CD25- cells, indicating that the conversion from CD25- to CD25+ in infected CD4+ T-cells is associated with the selective growth in the late phase of infection. Furthermore, expression of Tax, an oncogenic protein of HTLV-1, was observed in CD25- population but not in CD25+ population. These results suggest that some epigenetic change in the infected CD25- cells results in the expression of CD25 and the suppression of Tax, leading to the selective growth of infected T-cell.

Thus, the HTLV-1 infected huNOG mouse model should provide a valuable system for the analysis of ATL pathogenesis and the development of treatments against various HTLV-1 associated diseases. Effect of in vivo administration of various anti-tumor or anti-viral drugs on the overgrowth of infected T-cells should be assessed in future.

ヒト臍帯血由来造血幹細胞の NOG-SCID マウスへの骨髄内骨髄移植により作製したヒト化マウスの腹腔内に HTLV-1 産生細胞株を移入することにより、マウス個体内ヒト T 細胞への HTLV-1 感染と感染 T 細胞の異常増殖および脾腫・肝臓への転移等、ATL 様病態の誘導に成功した。感染数ヶ月の末梢血において、ATL 細胞特異的な花弁様分様核を持ったリンパ球の出現も再現された。

感染 T 細胞表面抗原の解析から、感染初期では CD25(-)CD4(+)T 細胞の異常増殖が観察されたが、感染後期においては ATL 腫瘍細胞と同様の CD25(+)CD4(+)T 細胞が感染細胞の大部分を占めるようになった。さらに HTLV-1 プロウイルス組み込み部位の解析から、感染の経過とともに、特定の感染クローンの選択的な増殖が観察され、白血病細胞の選択過程が再現されていると考えられた。

感染個体内における腫瘍細胞の選択的増殖の主要な原因として考えられる抗 HTLV-1 宿主免疫を解析したところ、感染ヒト化マウス血清中には抗 HTLV-1 Gag 抗体が、また、脾

臓内には感染細胞の排除に関与していることが既に示されている抗 Tax CTL の存在が確認された。

次に感染細胞の増殖と選択過程における HTLV-1 遺伝子発現の関与を解析したところ、CD25(-)CD4(+)T 細胞では HTLV-1 の発がん遺伝子 tax の有意な発現が観察されたが、CD25(+)CD4(+)T 細胞においては tax の発現は抑制されていた。Tax 蛋白の細胞トランスフォーム能と細胞増殖促進能は既に証明されていることから、感染初期では Tax の機能を介した CD25(-)CD4(+)T 細胞の異常増殖が考えられたが、感染後期においては tax 遺伝子の発現抑制と同期した CD25 の発現活性化を含む何らかの遺伝子発現の変化が CD25(+)CD4(+)T 細胞の選択的増殖に関与していることが強く示唆された。さらに、同一感染個体中の CD25(-)CD4(+)T 細胞群と CD25(+)CD4(+)T 細胞群における、感染クローンの解析を行ったところ、両群に共通の感染クローンの存在が示され、かつ最大クローンは CD25(+)CD4(+)T 細胞群により高い占有率を示したことから、単一の感染 CD4(+)T 細胞クローンが CD25(-)から CD25(+)に転換したことが明らかとなり、腫瘍細胞の選択過程における遺伝子のエピジェネティック変異の可能性が強く示唆された。

2. List of Publications

Original Articles

1. Tanaka M, Nitta T, Sun B, Fujisawa J, Miwa M. The route of primary HTLV-1 infection regulates HTLV-1 distribution in reservoir organs of infected mice. *Exp. Thr. Med.*, 2, 2011, 89-94. ([PDF C2-1](#))

Proceedings

1. Takaharu Ueno, Kenta Tezuka, Runze Xun, Mami Tei, Masakazu Tanaka, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi Fujisawa : Infection of defective virus correlated with the induction of CD25 positive CD4 T-cell during early phase of infection in humanized mouse model. The XV International Congress of Virology, 札幌, 9月12日, 2011年
2. Kenta Tezuka, Runze Xun, Mami Tei, Takaharu Ueno, Masakazu Tanaka, Norihiro Takenouchi, Jun-ichi Fujisawa: Inverse correlation between tax and CD25 expressions in HTLV-1 infected CD4+ T-cells *in vivo*. The XV International Congress of Virology, 札幌, 9月13日, 2011年
3. Masakazu Tanaka, Naoki Wada, Iwao Hashimoto, Sho Hasegawa, Hiroyuki Tsuda, Masanao Miwa, Jun-ichi Fujisawa: Anti-tumor effects of bovine lactoferrin to lymphoma cells expressing HTLV-1 Tax. 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、10月5日、2011年
4. 手塚健太、上野孝治、荀潤澤、竹之内徳博、田中正和、藤澤順一 : HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける欠損型プロウイルスの解析
第70回日本癌学会学術総会、名古屋、10月5日、2011年

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Identification of embryonic stem cell-like tissue committed stem cells and elucidation of their differentiation pathway: An application to cell therapy and regenerative medicine ES 細胞様組織幹細胞の同定と分化経路の解明 ：細胞移植・再生医療への応用		
P.I.	Yoshiaki Sonoda, 菌田精昭	E-mail	sonoda@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Stem Cell Biology, 幹細胞生物学(衛生学)講座		
Collaborators	佐々木豊、中塚隆介、岩城隆二、高橋昌也		
Keywords	ES cells, regenerative medicine, tissue stem cells, VSEL		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

The aim of this study is to identify embryonic stem cell-like tissue committed stem cells from various murine and human tissues and to apply them for the cell therapy and regenerative medicine in the near future. This year, we identified novel mouse dental pulp stem cell (DPSC) and analyze their functional properties (1). Next, we developed a new method for effective isolation of mouse very small embryonic-like stem cell (VSEL) (2).

1) Identification of mouse dental pulp stem cells (DPSCs)

Using an enzymatic treatment, we succeeded to identify novel mouse dental pulp stem cells (DPSCs), which expressed PDGFR α and Sca-1. These DPSCs exhibited a high growth potential and an ability to differentiate into mesenchymal cell lineages. Proliferation and differentiation potentials of DPSCs were improved by hypoxic culture condition. Moreover, these DPSCs could support human primitive hematopoietic stem cells.

2) Development of a new isolation method for mouse very small embryonic-like stem cells (VSELS)

We tried to isolate VSELS from murine bone marrow cells according to the reported method. We could isolate substantial number of VSELS, which were under 10 μ m in a diameter. However, the isolation efficiency was very low. Then we developed a new isolation method using murine bone tissues and enzymatic preparations. Using our new isolation method, we could constantly collect much larger numbers of VSELS for subsequent experiments.

These isolated VSELS expressed ES cell markers, including Oct4, Nanog, Rex1, and Dppa3. The in vivo dynamics of VSELS in liver injury and the change of VSELS in aged mice are interesting. Now we are proceeding the functional analysis of these VSELS.

本研究では、マウス及びヒト由来の各種組織より、ES 細胞様組織幹細胞を同定し、近未来の細胞移植・再生医療への応用を目指している。今年度は、まず、マウスを用いて、1) 歯髄由来の未分化組織幹細胞の同定と機能解析、2) very small embryonic-like stem cell (VSEL)として報告されている未分化な組織幹細胞の同定と効率的な分離方法の開発に着手した。

1) に関する成果

マウス切歯歯髄から酵素処理法を用いて細胞を分取した。これらの細胞より、Sca-1+PDGFR α +歯髄幹細胞 (dental pulp stem cell, DPSC) を予期的に分離することに成功した。DPSC は、高い増殖能力を持ち、骨、軟骨、脂肪細胞への分化能を有していた。さらに、低酸素培養が DPSC の増殖・維持に有用であること、歯髄由来の間葉系幹細胞 (MSC) と同様に、未分化な造血幹細胞を維持することも明らかにしている。今後、DPSC の未分化性に関して、さらに解析を進める予定である。

2) に関する成果

既報の方法により、マウス骨髄より VSEL の分離を試みた。報告されているように、直径 10 μ m 以下の非常に小型で核細胞比の大きな VSEL が分離可能であったが、その採取効率は低く、定量的な解析は困難であった。そこで、種々の方法を試みる過程で、マウス骨と酵素処理法などを工夫することにより、既報に比べて格段に分離効率のよい新たな方法の開発に成功した。

新たな方法で採取した組織幹細胞は、直径 10 μ m 以下の非常に小型で核細胞比の大きな細胞であり、Oct4, Nanog, Rex1, Dppa3 などを発現していた。現在、本細胞の機能解析を進めているが、肝障害時の *in vivo* 動態、加齢による変化など、興味ある結果を得ている。

2. List of Publications

Proceedings

1. 中塚隆介、松岡由和、岩城隆二、高橋雅也、佐々木豊、藪田精昭：歯形成端に存在する新規マウス歯髄幹細胞の予期的分離と特性の解析。第 21 回日本サイトメトリー学会総会、京都、2011 年 6 月 26 日
2. 中塚隆介、松岡由和、岩城隆二、高橋雅也、佐々木豊、藪田精昭：マウス切歯由来歯髄幹細胞によるヒト造血幹細胞の *in vitro* 支持能の検討。第 73 回日本血液学会総会、名古屋、2011 年 10 月 14 日
3. 中塚隆介、松岡由和、岩城隆二、高橋雅也、佐々木豊、藪田精昭：マウス組織に由来する間葉系幹細胞と歯髄幹細胞機能比較～ヒト造血幹細胞の *in vitro* 支持能に関して、第 34 回日本造血細胞移植学会総会、大阪、2012 年 2 月 25 日

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Functional analysis of overexpressing genes in tissue stem cells and relationship with cancer stem cells 組織幹細胞に高発現する遺伝子の機能解析とがん幹細胞との共通性の検討		
P.I.	Seiji Kanda, 神田靖士	E-mail	kandas@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Public Health, 公衆衛生学講座		
Collaborators			
Keywords	auditory pathway, cancer stem cell, pituitary, side population cells, tissue stem cell		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

We focused on the tissue stem cells in pituitary and auditory pathway. In our previous study, we identified the tissue stem/progenitor cells in pituitary gland and cochlear nuclei of auditory pathway in vivo. In this study, we tried to characterize these tissue stem/progenitor cells and analyze the gene expression.

Pituitary: Three days age of mice were injected BrdU to the hypodermic at 2 times/day for 3 days continuously, and sacrificed after 10 weeks to identify the slow-cycling cells suggested the possibility of stem cells. The results of immunohistochemistry showed that a few cells were identified as BrdU+ and Bcrp1+ double positive cells in the section of pituitary gland. Furthermore, we assumed that it was possible to purify stem cells as side population (SP) cells. Pituitary cells were isolated from 6 weeks age of mice and stained with Hoechst 33342. After staining, SP cells were sorted as a negative fraction. The population of SP cells was about 1% of total pituitary cells. Furthermore, in order to analyze the gene expression of these cells, we used microarray techniques by Mouse oligo Microarray (Agilent technologies). The results showed that the upregulated genes in SP cells were included some specific markers of stem cells, Bcrp1 and Sca-1 etc. These cells also had the sphere forming ability. Currently we are going to study whether these cells have the multipotential ability as stem cells.

Furthermore, we found some pituitary specific genes by microarray and this was one of the oncogenes. Some reports showed that tissue stem cells have common points with cancer stem cells, and this is a possibility to become a cancer from normal tissue stem cells in vivo. Currently we are going to analyze the functions of these genes in vitro.

Auditory pathway: Slow cycling cells were localized in cochlea nuclei (CN) by the same methods of pituitary. Bromodeoxyuridine (BrdU)-injected mice were prepared and detected by flowcytometry. The cells were detected 1% as BrdU positive cells in CN. SP cells were detected at a frequency of 4.4% and expressed stem/progenitor markers, Abcb1b, Abcg2, Sca-1, Notch1, Notch4, Hes1 and Jag1 with microarray. CN stem cells also had a self-renewal ability in order to be able to form spheres continuously. Furthermore, expressions of Abcb1b, Abcg2, Sca1, Oct3/4 and Sox2 as determined by RT-PCR were supported the data of microarray. CN cells were also had the activity of sphere formation in young mice, but this activity was decreased by aging. It is possible that tissue stem cells are localized in CN. Currently we are going to study whether these cells have the multipotential ability as stem/progenitor cells.

下垂体幹細胞の特徴付けと癌幹細胞との関連の検討

下垂体細胞を Hoechst33342 で染色した後、FACS にて SP 細胞としてソーティングした

ところ約1%存在し、マイクロアレイ解析にてその発現遺伝子のプロファイリングを行ったところ、幹細胞に共通して発現しているマーカー遺伝子が高発現していることを見いだした。また、その中に下垂体に特異的に発現している遺伝子が数種類見つかри、これらの一つが下垂体腫瘍細胞に特異的に発現する遺伝子であることを突き止めた。その遺伝子のいくつかは *oncogene* であることがわかった。近年、組織幹細胞とガン幹細胞の共通点を有するという報告があり、今後はその遺伝子の機能解析を行う予定である。

聴覚伝導路における組織幹細胞の同定と特徴付け

本研究の結果から3週齢マウスの蝸牛神経核に約1%の *slow cycling cell* が存在し、マイクロアレイの結果から *Sca1*、*Oct3/4*、*Sox2*、*Notch signal*、*Hes1*、*Jag1* など未熟な細胞に共通でみられる遺伝子の発現が MP 細胞と比較して高発現していた。中でも、*Ndrp* や *Ntf* (*neurotrophin*) 3 など *neuron* と分化に関連のある遺伝子が検出されたことから新規組織幹細胞のマーカーとなる可能性が考えられた。さらに蝸牛神経核の SP 細胞は *sphere* 形成能を有し、この活性は加齢とともに低下した。これらのことから聴覚伝導路における蝸牛神経核には組織特異的な幹細胞または前駆細胞が存在する可能性が示唆された。

2. List of Publications

Original Articles

1. Ooka, H., Kanda, S., Okazaki, H., Suzuki, H., Mishima, K., Saito, I., Yagi, M., Tomoda, K., Nishiyama, T. Characterization of side population (SP) cells in murine cochlear nucleus. *Acta Oto-Laryngologica*, 2012 (in press)
2. Osumi, Y., Shibata, S. B., Kanda, S., Yagi, M., Ooka, H., Shimano, T., Mikiya A., Kawamoto, K., Kuriyama, H., Inoue, T., Nishiyama, T., Yamashita, T., Tomoda, K. Downregulation of N-methyl-D-aspartate receptor $\zeta 1$ subunit (*GluN1*) gene in inferior colliculus with aging. *Brain Research* 2012 (in press).

Proceedings

1. S Kanda, H Ooka, H Okazaki, H Suzuki, T Nishiyama. Preparation and characterization of pituitary stem progenitor cells in mouse. 9th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research (Tront, Canada). 平成 23 年 6 月
2. H Ooka, S Kanda, T Nishiyama, K Tomoda, H Okazaki. Identification of tissue specific Stem/Progenitor Cells in Auditory Pathway. 9th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research (Tront, Canada). 平成 23 年 6 月

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Molecular mechanism of lymphocyte trafficking リンパ節のホーミングの分子機構に関する研究		
P.I.	Tatsuo Kinashi, 木梨達雄	E-mail	kinashi@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Molecular Genetics, 附属生命医学研究所 分子遺伝学部門		
Collaborators	片貝智哉、植田祥啓、羽廣克嘉、富山尚、安田鐘樹		
Keywords	antigen receptor, cell migration, chemokine, integrin		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Immune cell trafficking plays important roles in host defense and immunological diseases. Intracellular signaling of small GTPases Rap1 through RAPL and Mst1 regulates adhesive processes during lymphocyte trafficking mediated by integrins. Lymphocyte interactions with high endothelial venules is mediated by the adhesion cascade. Using knockout and knockdown approach, we demonstrate requisite involvement of Rap1 in the arrest step, which is stabilized within several seconds by RAPL and Mst1 as well as talin. Two-photon microscopy is powerful tool to dissect lymphocyte behaviors after entry into lymphoid tissues. So far most of the study to examine T cell migration within LN is to observe T cells transferred intravenously before two-photon imaging. The major caveat of these study is that the same chemokines and integrins (CCL19/CCL21 and CCR7 or LFA-1 and ICAM-1) are also required for entry into LN. In addition, T cells derived from knockout mice deficient for integrins and chemokines is potentially problematic, since deficiencies for these molecules impair not only trafficking but also T cell homeostasis, often leading to immune diseases. To circumvent these issues, we developed the lymph node tissue slice method, so that lymphocytes can be directly applied to the LN parenchyma and evaluate acute effects of blocking of integrins and chemokine signaling with antibodies and chemical inhibitors. Two-photon imaging demonstrates a distinct role of LFA-1 and ICAM-1 of lymphocyte migration within LN. ICAM-1 is expressed on fibroblastic reticular cells (FRC) that constitute the T cell zone, and required for rapid, directional migration of T cells. Mst1-deficient T cells or LFA-1 blockade exhibited slow migration with unstable interactions with FRC network. Mst1-deficient T cells exhibited slow migration within LN. When encountered with antigen-presenting cells, Mst1-deficient cells did not stop efficiently and exhibited unstable association. Thus, Mst1 is required for stable interactions with antigen-presenting dendritic cells, which is consistent that LFA-1 and ICAM-1 is required in T-APC interactions.

The process of thymocyte selection and development is regulated by not only affinity of TCR but also cell trafficking and cell-cell contact. Recently We have found Mst1 deficiency impairs thymocyte selection as well as generation of FoxP3⁺Treg in the thymus. To identify the roles for integrins and Mst1 in thymocyte trafficking and selection process, we are currently examining thymocyte trafficking within thymic tissues with 2-photon microscopy.

低分子量Gタンパク質 Rap1 と Rap1 結合分子 RAPL、およびその下流エフェクター分子として作動する Ste20-like キナーゼ Mst1 による接着分子 LFA-1 の制御と免疫系細胞の移動について 2 光子顕微鏡を用いたイメージングを行った。これまでノックアウトマウスの解析などによって Rap1 シグナルがもつ免疫細胞の動態調節の重要性として、リンパ節内のリンパ球移動や抗原提示細胞との相互作用が考えられることから、in vitro や組織スライスを用いた研究をおこなった。これらの系を用いた解析から、従来リンパ球移動における役割が不明確であった間葉系の細網細胞 (fibroblastic reticular cells, FRC) がリンパ節内の移動において重要な役割を持つことが明らかになった。また、Mst1 がリンパ球が抗原提示細胞に遭遇し、抗原受容体によって異物由来抗原に結合すると、免疫シナプスを形成するが、Mst1 欠損リンパ球ではその接着が不安定であることを明らかにした。Mst1 欠損マウスでは自己免疫様病態が加齢とともに顕著になるが、胸腺の選択に異常があることが明らかになった。胸腺組織スライスを用いて胸腺細胞の組織内動態を観察する手法を確立し、細胞移動や組織特異抗原を発現する胸腺上皮細胞との相互作用を現在、2 光子顕微鏡等を活用して調べている。

2. List of Publications

Original Articles

1. Harada, Y., Tanaka, Y., Terasawa, M., Pieczyk, M., Habiro, K., Katakai, T., Hanawa-Suetsugu, K., Kukimoto-Niino, M., Nishizaki, T., Shirouzu, M., Duan, X., Uruno, T., Nishikimi, A., Sanematsu, F., Yokoyama, S., Stein, J.V., Kinashi, T., Fukui, Y. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood*. In press.(2012) ([PDF C5-1](#))
2. Hnanawa-Suetsugu, k., Kukimoto-Niino, M., Mishima-Tsumagari, C., Akasaka, R., Ohsawa, N., Sekine, S., Ito, T., Tochio, N., Koshiba, S., Kigawa, T., Terada, T., Shirouzu, M., Nishikimi, A., Uruno, T., Katakai, T., Kinashi, T., Kohda, D., Tukui, Y., Yokoyama, S. Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELMO1 from their autoinhibited forms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 28:109 (9) :3305-10 (2012) ([PDF C5-2](#))
3. Kinashi, T. Overview of integrin signaling in the immune system. *Methods Mol. Biol.* 757:261-78 (2012)

Proceedings

1. 木梨達雄 Rap1 シグナルによるリンパ球動態の制御機構 新学術研究「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」第1回 公開シンポジウム 「動く細胞と場を読む」2012年1月 名古屋
2. Kinashi Tatsuo. Regulation of immune cell trafficking and antigen recognition through Rap1 signaling The 21st Hot Spring Harbor Symposium jointly with 9th Global COE International Symposium: Cell Migration in Biology and Medicine, Fukuoka Japan, Jan 2012.
3. Kinashi Tatsuo Regulation of thymocyte trafficking and antigen recognition within thymic tissues through integrins and Rap1 effector Mst1. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Chemokines and Leukocyte Trafficking in Homeostasis and Inflammation, Breckenridge USA, Jan 2012
4. 木梨達雄, 片貝智哉, 植田祥啓, 羽廣克嘉 イメージングによるリンパ球組織内移動の調節とその破綻の解析 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月 東京
5. Katakai Tomoya, Tatuso Kinashi, High-speed interstitial T cell migration within lymph node parenchyma involves LFA-1-dependent and -independent motility modes. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Chiba Japan, Nov. 2011
6. Ueda Yoshihiro, Katagiri Koko, Tomiya Takashi, Yasuda Kaneki, Habiro Katsuyoshi, Katakai Tomoya, Ikehara Susumu, Kinashi Tatsuo, Mst1 regulates thymocyte trafficking and antigen recognition within thymic tissues. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Chiba Japan, Nov. 2011
7. Habiro Katsuyoshi, Katakai Tomoya, Kinashi Tatsuo, Two-step model of T cell-DC primary contacts and roles of integrin-regulatory Mst1. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Chiba Japan, Nov. 2011
8. 木梨達雄 接着制御シグナルの破綻と自己免疫疾患 CREST「免疫機構 領域 第二回シンポジウム 2011年9月 東京
9. Kinashi, T., Katagiri, K., Katakai T., Ueda, Y., Habiro, K. Crucial roles of Mst1 and RASSF5 in lymphocyte adhesion and proliferation. 2nd International RASSF Symposium, Oxford UK, July 2011
10. Kinashi, T., Katagiri, K., Katakai T., Ueda, Y., Habiro, K. Cell migration and antigen recognition within lymph nodes and thymus. London Research Institute Cancer Research UK,

London UK, July 2011

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Generation and image analysis of a gene-modified animal model 疾患モデル動物の作製およびイメージング		
P.I.	Sung-il Lee, 李成一	E-mail	silee@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Model Animals, モデル動物部門		
Collaborators	小沢まどか		
Keywords	gene-engineered animals		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>In the immune system, cell adhesion molecules enhance the efficiency of specific receptor-dependent lymphocyte-accessory cell and lymphocyte-target cell interactions; they are also important in leukocyte-endothelial cell interactions and lymphocyte recirculation. The LFA-1 which is one of the adhesion molecules, is controlled by small GTPase Rap1, RAPL (the Rap1 counterpart molecule), and its downstream effector molecule, Mst1. Previous studies using their gene knockout mice, suggested a critical role for LFA-1-associated signaling pathways in lymphocyte migration or their arrest. Actually, we observed that Rap1 adhesion activity to ICAM-1 was suppressed in MST1-deficient and RAPL-deficient dendritic cells, by image analysis of cell-adhesion molecule interactions. We built the targeting vector construction for Rap1-deficient, and the construct was carried out to embryonic stem cell originated from C57BL/6 mouse origin, which newly established by our laboratory. These generated chimera mice were brown to obtain offspring that are heterozygous for the Rap1 knockout allele. In present, we are just going to perform the germ-line transmission ability of these chimera mice.</p> <p>The import approach of the immune cells from a vein passes through two steps of a lymph vessel to lymph nodes and to lymph vessel from a high endothelial venules. In this case, it is difficult for specify the stage which influenced by change of the dynamic state of the Rap1-deficient cells. As a future schedule, we have to analyze the phenotype of the obtained Rap1-deficient mouse using molecular biological, biochemical and histological methods, for our knowledge of Rap1-associated immune cell dynamic events in vivo. Also, we will try the introduction of the Rap1-labeled immune cells from a vein of mice, and are due to be observed that the motion of the lymphocyte within lymph nodes by imaging using 2 photon laser microscope.</p> <p>免疫機構は、リンパ節内のリンパ球の移動や抗原提示との相互作用などの、免疫細胞の動態の調節を基盤にして作動している。接着分子のひとつである LFA-1 は、低分子量 G たんぱく質 Rap1 と Rap1 結合分子 RAPL、その下流エフェクター分子として作動する Mst1 によって制御されており、これらのシグナル経路は今までのノックアウトマウスの解析などから、免疫細胞の動態調節に重要であることがわかっている。実際、MST1 や RAPL が欠損している樹状細胞では、ICAM-1 との接着の際に Rap1 の活性化が落ちる傾向にあることを、イメージングを用いた実験で観察している。</p> <p>今後の予定として、得られた Rap1 遺伝子欠損マウスの表現型を分子生物学的・生化学的・組織学的に解析し、in vivo での Rap1 遺伝子の働きを特定する。またリンパ球、樹状細胞などの免疫細胞をラベルして静脈から導入し、リンパ管からリンパ節への組織移動を、2光子レーザー顕微鏡を用いたイメージングで観察する予定である。</p>			

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Identification of causative material of small-bowel obstruction from histopathological sections by MALDI-imaging mass spectrometry 質量顕微鏡法を用いた病理標本解析による腸管内腔閉塞原因物質の同定と発症機構の解明		
P.I.	A-Hon Kwon, 権雅憲	E-mail	kon@hirakata.kmu.ac.jp
Affiliation	Surgery, 外科学講座		
Collaborators	海堀昌樹、山田正法		
Keywords	intestinal obstruction (ileus), imaging mass spectrometry		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>Bowel obstruction or intestinal obstruction is a mechanical or functional obstruction of the intestine that prevents the normal transit of digested materials. It can occur at any levels distal to the duodenum of the small intestine and is typically considered to represent a medical emergency. The case in this study, surgery was needed to remove the necrotic tissue and causative materials. Laparoscopic operation was performed to excise the inflamed small intestine and the obstructive material. For imaging MS analysis, the surgically isolated intestinal portion and the foreign body were fixed and paraffin embedded as performed routinely at Kansai Medical University Hospital. Even after the materials were removed, the cause and the identity of the materials were not clarified. To obtain the information of the extirpated materials, imaging mass spectrometry (IMS) technique was employed.</p> <p>Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-mass spectrometry (MS) provides the means for <i>in situ</i> molecular analysis of a wide variety of biomolecules. This technology, IMS, allows measurement of biomolecules in their native biological environments without the need for target-specific reagents such as antibodies. In this study, we applied the IMS technique to formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples to identify a substance(s) responsible for the intestinal obstruction caused by an unidentified foreign body. In advance of IMS analysis, some pre-treatments were applied. After deparaffinization of sections, samples were subjected to enzyme digestion. The sections co-crystallized with matrix were desorbed and ionized by a laser pulse with scanning. With IMS Convolution software which we developed, we could automatically extract meaningful signals from IMS datasets. The representative peak values were m/z 1013, 1175, 1337, 1499, 1661, 1823, and 1985. Thus it was revealed that the material was polymer with 162 Da unit size, calculated from the even intervals. In comparison with mass spectra of the histopathological specimen and authentic materials, the main component coincided with amylopectin, rather than amylose. Tandem MS (MS/MS) analysis proved that the main component were oligosaccharides. Finally, we confirmed the identification of amylopectin by staining with periodic acid-Schiff (PAS) and iodine. These results for the first time show the advantages of MALDI-IMS in combination with enzyme digestion for direct analysis of oligosaccharides as a major component of histopathological samples.</p>			

Conclusion:

With direct MALDI-TOF MS imaging, we identified *mochi* as the obstructing material in a small intestinal obstruction. The results in this study indicate that IMS is a very rapid and accurate technique with high sensitivity for direct analysis for histopathological samples. This is the first case of identification of oligosaccharides as a main component of histopathological samples using direct MS analyses. MALDI-TOF MS in combination with enzyme digestion will be a support for the histopathological study (Yamada et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 1921-1930, 2012).

質量顕微鏡法を用いて腸閉塞の原因となった異物の成分を同定した。

1)質量顕微鏡法を用い外科手術で摘出された異物の病理組織標本から位置情報と質量スペクトルを同時取得する。

食餌性異物による腸閉塞・穿孔性腹膜炎を併発した症例に対して、食餌性異物を含む病理標本パラフィンブロックから 4 μ m 厚の切片を作製し、脱パラフィン処理後、適当な消化酵素を用い、標本中の分子を切断し、前処理を標本上で行った。前処理したサンプルを質量顕微鏡法により解析した。

2)質量顕微鏡法で画像化された分子種の同定を行う。

質量顕微鏡法で得られた情報から物質の成分を推定した。ポリマーのユニット構造を予想したところ多糖類であることが予想された。更に、多段階質量分析 MS/MS 測定を用いて病理組織標本を解析した結果、グルコースをユニットとするアミロペクチンであることが判明した。これは餅の成分であることが知られている。

3)各種の特殊病理染色法を用い検証する。

病理検査で行われている各種の特殊染色法で組織標本の染色を行った。異物の病理標本を作製し、特殊染色を施した結果、糖原か炭水化物の可能性を示唆する PAS 染色で陽性の結果を得た。S-100 蛋白染色による腫瘍検出、Kossa 染色によるカルシウム検出、及び Dylon・Congo red でのアミロイド検出はすべて陰性であった。また CD68 染色も陰性であり、生体内での異物反応は認めなかった。

以上の結果より、腸閉塞の原因物質が餅であることが明らかとなった。

2. List of Publications

Original Articles

1. Yamada, M., Yao, I., Hayasaka, T., Ushijima, M., Matsuura, M., Takada, H., Shikata, N., Setou, M., Kwon, A-H and Ito, S. Identification of oligosaccharides from histopathological sections by MALDI imaging mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 1921-1930, 2012.

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Search and Identification of head and neck cancer-related factors by imaging mass spectrometry 質量顕微鏡による頭頸部がん関連因子の探索・同定		
P.I.	Koichi Tomoda, 友田幸一	E-mail	tomodak@hirakata.kmu.ac.jp
Affiliation	Otolaryngology, 耳鼻咽喉学講座		
Collaborators	岡崎はるか、神田靖士、大岡久司		
Keywords	ABCG2, auditory center, Sca1, side population cell, stem cell		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>To investigate the keys of treatments for the deaf patients that have auditory damages, we tried to isolate stem/progenitor cells from the auditory pathway and analyzed the cell characterization and gene expressions. We assumed that it was possible to purify stem cells as side population (SP) cells, cochlear nuclei and inferior colliculus cells were isolated from 2-4 weeks age of mice and stained with Hoechst 33342. We analyzed the gene expression of SP cells by microarray techniques and RT-PCR and the specific markers of stem/progenitor cells, such as ABCG2 and Sca1, were over-expressed in SP cells compared with main population (MP) cells. Spheroid formation was not detected when the SP cells from cochlear nuclei and inferior colliculus were grown in serum-free, non-adherent culture.</p> <p>①マウス蝸牛神経核・下丘において SP 細胞、MP 細胞の遺伝子発現を DNA Microarray にて検討した結果、MP 細胞に比べて SP 細胞において BCRP1/ABCG2 などの遺伝子発現が強くみられた。この結果から SP 分画は幹細胞に富む分画であることが示唆された。次に、Microarray の結果より SP 細胞において強発現していた Sca1、ABCG2 の発現は、SP 細胞において MP 細胞より強い事が確認された。</p> <p>②幹細胞の自己複製能を検討するため、C57BL/6 GFP+マウス、C57BL/6 WT マウスを用いて SP 細胞を neural stem cell medium (containing neurobasal-A medium, GlutaMAX supplement, B27 supplement, Penicillin/Streptomycin, EGF and FGF)を用いて培養を行っているが、現在までに sphere の形成は確認できていない。</p> <p>③現在実験に用いている C57BL/6 マウスが早期難聴を来すマウスであるためスイス系マウスなど早期難聴を来さないマウスとの比較検討も行っている。現在のところ、生後 1 週の BALB/c マウスの蝸牛神経核、下丘を単細胞に分離し、Hoechst 33342 にて染色後、FACS にて分析したところ全細胞中に SP 細胞を約 1%認めている。</p> <p>2. List of Publications</p> <p>Original Articles</p> <p>1. Ooka, H., Kanda, S., Okazaki, H., Suzuki, H., Mishima, K., Saito, I., Yagi, M., Tomoda, K., Nishiyama, T. Characterization of side population (SP) cells in murine cochlear nucleus. <i>Acta Oto-Laryngologica</i>, 2012 (in press)</p>			

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Examination of application of IBM-BMT to intractable diseases of the nervous system 難治性神経疾患に対する骨髄内骨髄移植の適用の検討		
P.I.	Susumu Ikehara, 池原進	E-mail	ikehara@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Stem Cell Disorders, 幹細胞異常症学 (共同研究講座)		
Collaborators	李銘、李清、石明		
Keywords	autoimmune disease, IBM-BMT, thymus		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Our research clearly shows that currently incurable diseases with aging-associated symptoms are linked to abnormalities of the immune system, and that both IBM-BMT and thymus transplantation are effective interventions in the treatment of these diseases.

These diseases are also characterized by abnormalities in bone marrow mesenchymal stem cells, but not hematopoietic stem cells.

We collaborated with the First Department of Medicine and Department of Orthopedic Surgery for clinical application.

1) 研究の背景と目的

我々が開発した新しい骨髄内骨髄移植(IBM-BMT)の技術はヒト同種 BMT の主要な問題点を解決する革新的技術であり、造血幹細胞の異常に基づく白血病や自己免疫疾患のみならず、間葉系幹細胞の異常に伴って発症する難治性の自己免疫疾患や加齢に伴って発症する種々の難病（アルツハイマーや肺気腫や骨粗鬆症等）の根治療法の開発につながる。難病のモデル動物の実験に基づき、いかなる難病が新技術で治療可能かを明らかにして、ヒトへの応用を目的とする。

2) 結果

加齢に伴って発症する難病には、免疫の異常が関与しており、骨髄内骨髄移植だけでなく胸腺の移植の併用が重要であることを明らかにした（文献②，⑤，⑦，⑨）。

さらに、加齢に伴って発症する疾患は、骨髄の造血幹細胞ではなくて、間葉系の幹細胞の異常に起因することを見出した（文献⑦）。

新しい骨髄移植のヒトへの応用を目指して、第一内科と整形外科との共同研究を開始している。

2. List of Publications

Original Articles

1. 池原 進

革新的移植方法 — 灌流法 + 骨髄内骨髄移植法

医学のあゆみ「造血幹細胞移植の最新動向：造血幹細胞移植のトピックス」 240 (5): 465-469, 2012.

2. Zhang Y, Hosaka N, Cui Y, Shi M, and Ikehara S.

Effects of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation plus thymus transplantation on malignant tumors: Comparison between fetal, newborn, and adult mice.

Stem Cells Dev. 20: 599-607, 2011. ([PDF C9-2](#))

3. Oe K, Kushida T, Okamoto N, Umeda M, Nakamura T, Ikehara S, and Iida H.

New strategies for anterior cruciate ligament partial rupture using bone marrow transplantation in rats. *Stem Cells Dev.* 20: 671-679, 2011.

4. Shi M, Lian Z, Zhang Y, Yanai S, Shima C, Imai Y, and Ikehara S.
Combination of intra-bone marrow-bone marrow transplantation and subcutaneous donor splenocyte injection diminishes risk of GVHD and enhances survival rate.
Stem Cells Dev. 20: 759-768, 2011. ([PDF C9-4](#))
5. Ikehara S.
Thymus transplantation for treatment of cancer: lessons from murine models.
Expert Rev. Clin. Immunol. 7: 205-211, 2011.
6. Mori S, Fujita S, Yamamoto Y, Li M, Fukuhara S, Nomura S, and Ikehara S.
Perfusion method for bone marrow cell collection in poor mobilizer lymphoma patient.
Int. J. Hematol. 93: 822-824, 2011.
7. Ikehara S.
A novel BMT technique for treatment of various currently intractable diseases.
Best Pract. Res. Clin. Haematol. 24: 477-483, 2011.
8. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, and Ikehara S.
Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells.
J. Gastroenterol. In press. 46: 1368-1381, 2011. ([PDF C9-8](#))
9. Zhang Y, Hosaka N, Cui Y, Shi M, Li M, Li Q, and Ikehara S.
Effects of intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus adult thymus transplantation on survival of mice bearing leukemia.
Stem Cells Dev. In press. ([PDF C9-9](#))

Proceedings

1. Susumu Ikehara.
Autoimmune diseases as stem cell disorders: Rationale for normal stem cell transplantation for their treatment. The 5th Autoimmunity Congress Asia (ACA 2011). 招聘講演 November 17-19, 2011 (Singapore)
2. LI Ming, SHI Ming, IKEHARA Susumu.
骨髓と胸腺の同時移植による2型糖尿病の治療/Treatment of type 2 diabetes mellitus in db/db mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus thymus transplantation. 第40回日本免疫学会学術集会 平成23年11月27日~29日 (千葉)
3. 保坂直樹, 崔雲澤, 石明, 李銘, 李清, 高橋伯夫, 池原進.
白血病担癌マウスにおける成体胸腺移植を併用した IBM-BMT の効果/Effects of IBM-BMT plus adult thymus transplantation on mice bearing leukemia.
第40回日本免疫学会学術集会 平成23年11月27日~29日 (千葉)

**Division of
Metabolic Disorders**

代謝部門

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Study of fibril formation in the extracellular matrix 細胞外マトリックス線維形成の加齢変化に関する研究		
P.I.	Tomoya Akama, 赤間智也	E-mail	akamat@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Neuropharmacology, 神経病態薬理学 (薬理学講座)		
Collaborators	赤間智也、東淳子、野田和男、井上唯史、木村あすな		
Keywords	elastic fibers, extracellular matrix, gene-engineered mice		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>Tissue elasticity depends on formation of elastic fibers in the extracellular matrix of the tissue. Malformation or degradation of elastic fiber results in stiff, inflexible tissues, such as tortuous artery, lung emphysema and wrinkled skins. We are studying on formation of elastic fibers in vivo using gene knockout mice, and have found several key molecules for the fiber organization.</p> <p>Latent TGFβ binding protein 4 (LTBP4) is one of the LTBP family proteins, which bind to TGFβ to be inactivated and store it in the extracellular matrix until additional signals such as proteases release TGFβ. We found that amount of LTBP4 protein was greatly decreased in skin samples of an old human donor than that of a young donor, suggesting LTBP4 protein is involved in elastic fiber formation in vivo. We then analyzed LTBP4-mutant mice and found that the homozygous mutant mice had stiff, tortuous artery with inelastic property, strongly indicating important functions of LTBP4 on elastic fiber formation in vivo. By fiber formation assay on primary cultured human dermal fibroblasts, we knocked down gene expression of LTBP4 in the fibroblast cells by siRNA and found that loss of LTBP4 expression completely diminished formation of elastic fiber meshwork in the extracellular matrix formed on the surface of the cultured cells. Conversely, we included recombinant LTBP4 protein in the culture medium of fibroblast cells with suppressed LTBP4 expression and found restoration of elastic fiber meshwork formation in the cells. Since production of elastic fiber meshwork was increased by addition of LTBP4 protein in a dose-dependent manner, we concluded that LTBP4 protein is a rate-limiting factor for elastic fiber formation in the cultured cells.</p> <p>Because LTBP4 is a family protein of LTBPs, which are involved in TGFβ signaling pathway, there was a speculation that enhancing effect of LTBP4 for elastic fiber formation is due to TGFβ molecules attached to recombinant LTBP4 protein. To clarify molecular function of LTBP4 protein on elastic fiber formation, we prepared recombinant LTBP4 protein that holds no active TGFβ molecule and tested this TGFβ-free LTBP4 protein for elastic fiber formation assay on cultured cells. Surprisingly, TGFβ-free LTBP4 showed promoting effect for elastic fiber formation as strong as normally prepared recombinant LTBP4 protein that held the minimal amount of TGFβ molecules, indicating promoting effect of LTBP4 protein for elastic fiber formation is an independent function from TGF signaling pathway. By solid-phase binding assay, we found that LTBP4 protein binds to tropoelastin molecule in presence of fibulin-5, which is another extracellular matrix protein known to be involved in elastic fiber formation. From these findings, We hypothesized that LTBP4 works as a scaffold of the elastin molecules on microfibrils made of fibrillins, and tropoelastin/fibulin-5 complex localize on microfibrils by binding to LTBP4 as a marker. Accumulated elastins are subsequently crosslinked and matured to be functional elastic fibers. We discovered that LTBP4 is a key molecule at the early step of elastic fiber formation.</p> <p>細胞外マトリックスの一つである弾性線維は固く丈夫なコラーゲン線維とは異なり、柔らかく伸び縮みする線維である。弾性線維は肺や大動脈、皮膚といった伸縮性のある組織の細胞外マトリックスに存在し、機能している。我々は弾性線維形成機構の解明に向けて研究を進めており、遺伝子改変マウスや培養細胞系を用いて弾性線維形成に必須な遺伝子群とその役割の解析を行なっている。</p> <p>弾性線維の主な構成成分はエラスチン重合体であり、細胞によって合成、分泌されたエラスチン単量体は同じく細胞外マトリックスの構成成分であるフィブリリン1・2からなる微小線維上に沈着し、リシルオキシダーゼ群の酵素活性により酸化的に架橋され、最終産物のエラスチン重合体となり弾性線維として機能する。しかしながらこれらの弾性線維</p>			

構成成分を培養細胞中に発現させても弾性線維が合成されることはなく、上記タンパク質以外にも弾性線維形成に関わる未知のタンパク質の存在が予想されていた。

我々はこれまで弾性線維合成に必須である細胞外マトリックスタンパク質を発見し、その遺伝子変異マウスが弾性線維形成にかかわることを示してきた。LTBP4 (latent-TGFβ binding protein 4)は TGFβ を不活性化状態に維持して細胞外マトリックス内に留め置くタンパク質である LTBP ファミリーの一つであるが、我々は弾性が減少した老人の皮膚組織には若年者の皮膚組織に比べ LTBP4 の存在量が大きく減少していること、LTBP4 欠損マウスが大動脈の硬化を示すことを発見し、LTBP4 が弾性線維構築に重要な機能を担っていることを示した。さらには精製 LTBP4 タンパク質をヒト皮膚線維芽細胞の培養液に加えることにより、培養細胞上に弾性線維様の網目状線維構造を形成させることができ、この線維構造は LTBP4 の添加量に比例して増加したことから、LTBP4 の発現量が弾性線維形成の律速となっていることが示唆された。更なる解析にて LTBP4 はエラスチン/fibulin-5 複合体を微小線維上に誘導する機能を有していることがわかり、LTBP4 の弾性線維形成における新たな役割が明らかとなった。

2. List of Publications

Original Articles

1. Otani, H., Yoshioka, K., Nishikawa, H., Inagaki, C., Nakamura, T., Involvement of Protein Kinase C and RhoA in Protease-Activated Receptor 1-Mediated F-Actin Reorganization and Cell Growth in Rat Cardiomyocytes. *J. Pharmacol. Sci.* 115 (2011) 135-143. ([PDF D1-1](#))
2. Ohara, H., Akatsuka, S., Nagai, H., Liu, Y., Jiang, L., Okazaki, Y., Yamashita, Y., Nakamura, T., Toyokuni, S., Stage-specific roles of fibulin-5 during oxidative stress-induced renal carcinogenesis in rats. *Free Radic. Res.* 45 (2011) 211-220.
3. Tamura, N., Sugihara, K., Akama, T.O., Fukuda, M.N., Trophinin-mediated cell adhesion induces apoptosis of human endometrial epithelial cells through PKC-delta. *Cell Cycle*10 (2011) 135-143. ([PDF D1-3](#))
4. Parfitt, J.G., Pinali, C., Akama, T.O., Young, R.D., Nishida, K., Quantock, A.J., Knupp, C., Electron tomography reveals multiple self-association of chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycans in Chst5-null mouse corneas. *J. Struct. Biol.*174 (2011) 536-541.
5. Hatakeyama, S., Sugihara, K., Shibata, K.T., Nakayama, J., Akama, T.O., Tamura, N., Wong, S-M., Bobkov, A.A., Takano, Y., Ohyama, C., Fukuda, M., Fukuda, M.N., Targeted drug delivery to tumor vasculature by a carbohydrate mimetic peptide. *Proc., Natl. Acad. Sci. USA.*108 (2011) 19587-19592. ([PDF D1-5](#))
6. Shibata, T.K., Matsumura, F. Wang, P., Yu, S., Choo, C.C., Khoo, K.H., Kitayama, K., Akama, T.O., Sugihara, K., Kanayama, N., Kojima-Aikawa, K., Seeberger, P.H., Fukuda, M., Suzuki, A., Aoki, D., Fukuda, M.N., Identification of mono- and di-sulfated N-acetyllactosaminyl oligosaccharide structures as epitopes specifically recognized by humanized monoclonal antibody HMOCC-1 raised against ovarian cancer. *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 6592-6602. ([PDF D1-6](#))

Proceedings

1. Nakamura, T., The essential role of LTBP4 in elastic fiber assembly. Invited talk at Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber, Biddeford, U.S.A., July 24-28, 2011
2. Noda, K., Takagi, K., Horiguchi, M., Inoue, T., Akama, T.O., Melchner, v. H., Hyytiäinen, M., Suzuki, S., Nakamura, T., The essential role for LTBP4 in elastic fiber assembly. Poster presentation at Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber, Biddeford, U.S.A., July 24-28, 2011 and selected oral presentation at Gordon Research Seminar on Elastin and Elastic Fiber, Biddeford, U.S.A., July 23-24, 2011

3. Inoue, T., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Kusumoto, K., Hirai, M., Nakamura, T., The role of LTBP-2 in eye development. Poster at Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber, Biddeford, U.S.A., July 24-28, 2011 and selected oral presentation at Gordon Research Seminar on Elastin and Elastic Fiber, Biddeford, U.S.A., July 23-24, 2011
4. Akama, T. O., Fukuda, M., Fukuda, M.N., Nakamura, T., Distinct roles of b1,3-N-acetylglucosaminyltransferases and carbohydrate 6-O sulfotransferases on corneal keratan sulfate production, 21st International Symposium on Glycoconjugates, Vienna, Austria, August 21-26, 2011
5. Akama, T. O., Fukuda, M., Fukuda, M.N., Nakamura, T., Study of corneal keratan sulfate biosynthesis in vivo using sulfotransferase gene knockout mice, Annual Conference of the Society for Glycobiology, Seattle, U.S.A., November 9-11, 2011

Patents

1. 欧州特許登録 (EPC) 出願番号 05720545.2
件名：切断型DANCE、DANCE複合体、及びこれらを用いる方法
登録日：2011. 10. 19
登録番号：1762610
権利者：学校法人関西医科大学
発明者：中邨智之 平井希俊

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Analysis of signal transduction molecules involved in proliferation, development and stemness がん幹細胞の機能・分化に関わるシグナル分子の解明		
P.I.	Satoshi Matsuda, 松田達志	E-mail	matsudsa@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Cell Signaling, 生体情報部門		
Collaborators	大谷真志		
Keywords	cell proliferation, mTOR, PI3K		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Members of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) family are important for the differentiation, proliferation, and survival of a variety of cells, including immune cells. The basic activity of these enzymes is to phosphorylate the third position of the hydroxyl group in the inositol ring of phosphatidylinositol. There are four subclasses of the PI3K family; among these, class IA PI3K, composed of a catalytic subunit (p110 α , β , or δ) and a regulatory subunit (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , or p55 γ), works downstream of receptors such as T cell receptor (TCR) and CD28 in T cells whose signaling pathways involve protein tyrosine kinases and Ras. In many cell types, PI3K signals through mammalian target of rapamycin complex1 (mTORC1) consisting of mTOR, raptor, and mLST8. For instance, it has been shown that PI3K-mTORC1 axis regulates the nuclear translocation of IRF7 for the production of type I interferon (IFN) in plasmacytoid dendritic cells. Production of IL-12 and IL-10 in conventional dendritic cells is also regulated by molecules downstream of PI3K including mTORC1. In CD4⁺ T cells, the PI3K-Akt-mTORC1 axis contributes to the activation, survival, and proliferation upon stimulation through TCR and CD28. In collaboration with Koyasu Laboratory in Keio University School of Medicine, we found that the suppression of this axis by deletion of p85 α or PI3K/mTORC1 inhibitors as well as T cell-specific deletion of raptor, an essential component of mTORC1, impaired Th17 differentiation in vitro and in vivo in a S6K1/2-dependent fashion. Inhibition of PI3K-Akt-mTORC1-S6K1 axis impaired the downregulation of Gfi1, a negative regulator of Th17 differentiation. We further found that S6K2, a nuclear counterpart of S6K1, was induced by the PI3K-Akt-mTORC1 axis, bound ROR γ , and carried ROR γ to the nucleus. These results point toward a pivotal role of PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis in Th17 differentiation.

PI3K-mTOR 経路は細胞の増殖・分化・生存を制御する細胞内シグナル伝達経路であり、種々のがん組織においてその異常が報告されている。本研究では、PI3K-mTOR 経路に関わる各種分子の遺伝子改変マウスを対象に、これらシグナル伝達経路の活性の増減が各種血球系細胞の分化・増殖過程に及ぼす影響の解析を試みた。

本年度は、クラス IA PI3K の制御サブユニットである p85 α を欠失したマウス (以下、p85 α -KO マウス)、クラス IB PI3K の触媒サブユニットである p110 γ を欠失したマウス (以下、p110 γ -KO マウス)、両者を共に欠失した p85 α /p110 γ 二重欠損マウス (以下、DKO) を用いて解析を行った。対象として、T 細胞、B 細胞、マスト細胞、樹状細胞、マクロファージの分化に関して解析を行ったところ、p85 α -KO マウスにおいて B 細胞ならびに腸管マスト細胞の分化異常が確認されると同時に、ごく一部の未熟胸腺 T 細胞の分化過程にも異常が確認された。p110 γ -KO マウスにおいては、胸腺 T 細胞の分化過程に部分的な異常が観察される一方、B 細胞やマスト細胞の分化に目立った異常は認められなかった。DKO においては、単独の PI3K の欠失では認められない胸腺 T 細胞数の著しい減少と、分化異常が観察された。すなわち、クラス IA PI3K とクラス IB PI3K 経路が、胸腺 T 細胞の分化過程において、互いに冗長なシグナル伝達経路を構成していることが強く示唆された。興味深いことに、PI3K の下流で機能する mTOR 経路の中でも、mTORC1 シグナルに必須の Raptor 分子を T 細胞系列特異的に欠失させたマウスにおいては、そのような胸腺

細胞数の減少は認められず、末梢の T 細胞機能に部分的な異常が観察されるにみであった。一方、マスト細胞の細胞数に関して、DKO と p85 α -KO マウスの間で著名な差は認められなかったものの、*in vitro* におけるマスト細胞の分化誘導系を用いたところ、DKO マウス由来の血球系幹細胞を用いた際には、明らかな分化の遅れが観察された。すなわち、クラス IA PI3K 経路が腸管におけるマスト細胞の分化・生存に必須な役割を果たすと同時に、血球系幹細胞からの効率的なマスト細胞分化誘導にクラス IA・クラス IB PI3K 経路が協調的に関わっていることが強く示唆された。

2. List of Publications

Original Articles

1. Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S., and Koyasu, S. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi-1 expression and nuclear translocation of ROR γ . Cell Reports (2012) in press
2. Yokoyama, T., Matsuda, S., Takae, Y., Wada, N., Nishikawa, T., Amagai, M., and Koyasu, S. Antigen-independent development of Foxp3+ regulatory T cells suppressing autoantibody production in experimental pemphigus vulgaris. Int. Immunol • 23 • 2011 • 365-373. ([PDF D2-2](#))

Proceedings

1. Yamana, A., Yamashita, A., Suzuki, M., Matsui, Y., Watanabe, T., and Matsuda, S. Forced expression of a constitutively active form of p110 δ results in decrease of double positive thymocytes during thymocyte development. 第 34 回分子生物学会総会・横浜・2011 年 12 月
2. Matsuda, S. and Ohtani, M. Role of the mTORC1 signaling pathway in T cell development. 第 40 回日本免疫学会学術集会・幕張・2011 年 11 月
3. Ohtani, M. and Matsuda, S. Role of mTORC1 in immune function of dendritic cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会・幕張・2011 年 11 月
4. Nagai, S., Kurebayashi, Y., Baba, Y., Matsuda, S., and Koyasu, S. PI3K-Akt-mTORC1 axis controls Th17 differentiation by regulation of Gfi-1 and ROR γ t. 第 40 回日本免疫学会学術集会・幕張・2011 年 11 月
5. Fujii, H., Matsuda, S., Ohtani, M., and Koyasu, S. Role of class IA PI3K in regulatory T cell function. 第 40 回日本免疫学会学術集会・幕張・2011 年 11 月
6. 松田達志、大谷真志、星居孝之、平尾敦 T細胞分化過程における mTORC1 シグナルの役割 第 21 回 Kyoto T Cell Conference・京都・2011 年 6 月
7. 藤猪英樹、小安重夫、松田達志 抑制性 T 細胞機能における PI3K の役割 第 21 回 Kyoto T Cell Conference・京都・2011 年 6 月

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Development of novel therapeutic strategy and elucidation of functional basis for intractable diseases by human dendritic cell research ヒト樹状細胞によるさまざまな病態関連応答の解明と 新たな難病治療戦略の開発		
P.I.	Tomoki Ito, 伊藤量基	E-mail	itot@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Internal Medicine 1, 内科学第一講座		
Collaborators	野村昌作、安室秀樹、宮本理恵、杉本博是、中西孝尚		
Keywords	autoimmune disease, dendritic cells, interferon- α , platelet, statin, TSLP		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>1. Systemic lupus erythematosus (SLE) is a severe and intractable autoimmune disease characterized by chronic activation of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and production of autoantibodies against nuclear self-antigens. Neutrophils are also implicated in disease pathogenesis; however, the mechanisms involved are unknown. Here, we identified in the sera of SLE patients immunogenic complexes composed of neutrophil-derived antimicrobial peptides and self-DNA. These complexes were produced by activated neutrophils in the form of neutrophil extracellular traps (NETs) and efficiently triggered innate pDC activation via TLR9. Circulating neutrophils from SLE patients released more NETs than those from healthy donors; this was further stimulated by the antimicrobial autoantibodies.</p> <p>In addition, our study identified that both BAY11 (agent for NFκB inhibitor) and statins (HMG-CoA reductase inhibitors) have the ability to inhibit nuclear translocation of IRF7 and IFN-α production in human pDCs. We also found that these agents inhibited both in vitro IFN-α production induced by the SLE serum and the in vivo serum IFN-α level induced by injecting mice with TLR ligand. These findings suggest that BAY11 and statins have the therapeutic potential to attenuate the IFN environment by regulating the pDC function and thus provide the novel foundation for the development of an effective immunotherapeutic strategy against autoimmune disorders such as SLE.</p> <p>2. TSLP strongly activates human DCs and then induces robust expansion of not only naïve CD4+ T cells but also naïve CD8+ T cells. Based on these findings, we hypothesized TSLP is a good adjuvant of expansion of CTL response in DC-mediated immune process by enhancing the effect of BCG. Although BCG-stimulated DCs induced CD8+ T cell production of IFN-γ but not strong cell expansion, TSLP-stimulated DCs induced robust CD8+ T cell expansion but not high quantities of IFN-γ production. We here found that DCs stimulated with both BCG and TSLP induced robust expansion of CD8+ T cells that produce a large amount of IFN-γ with a potent cytolytic activity related to the expression of granzyme B and TIA-1. Our data suggest that TSLP is potent adjuvant in both quantitatively and qualitatively enhancing the CTL effect by BCG immunotherapy through DC activation, and therefore provide a novel strategy for antitumor immune-based therapy.</p> <p>3. We newly demonstrated that TRAP (thrombin receptor agonist peptide)-activated platelets expressed RANKL, which promoted the CD86 expression on DCs. We further clarified that the activated platelets enhanced the production of CCL17 induced by the DC stimulated with TSLP. Thus, platelets have the ability to enhance the DC-mediated Th2 response and may contribute to the allergic inflammation. In conclusion, our study may provide new insights of platelet function into the possible mechanism of allergic response that stems from DCs.</p> <p>1. 近年、様々な炎症性疾患の病態発症・進展に、免疫システムの中枢に位置する樹状細胞 (dendritic cell:DC) が重要な働きをすることが示唆されている。</p> <p>自己免疫疾患は、本来抑制されるはずの自己成分に対する免疫応答に基づく病態の基盤である。特に、全身性エリテマトーデス (SLE)などの自己免疫疾患においては、樹状細胞の一亜群 (形質細胞様樹状細胞 plasmacytoid DC:pDC) が自己核酸に応答して、I型インターフェロン (IFN) 産生を誘導することが、病態に関与していることが示唆されている。し</p>			

かしながら、その詳細なメカニズム、すなわち自己免疫疾患では自己核酸に対する制御が如何に破綻し、IFN 産生を誘導しているのか、という点が不明であった。我々はその病態発症のメカニズム、免疫破綻の機序を解明し、さらに SLE に対して、pDC と I 型 IFN 産生を標的とした新たな治療戦略としての薬剤を検討した。

a.SLE では、自己の DNA の放出を、pDC が検知する際に、組織由来の抗菌ペプチド LL37 およびヒト好中球ペプチド human neutrophil peptides (HNP) が DNA と複合体を形成することで安定化される。この現象は、好中球が障害を受ける時に、蜘蛛の巣状の形状を示す核内 DNA を含んだ neutrophil extracellular traps (NETs) という成分を放出することで起きる。また、SLE 患者で認められる自己抗体が、この好中球による pDC の活性化において、助長する。これらの応答が SLE 患者では持続的に起きているため、慢性的に pDC から I 型 IFN が産生され、SLE における病態の悪循環が形成されることを同定した。

b.この観点から、何らかの薬剤により、この pDC の持つ自己 DNA に対する I 型 IFN の産生機能を阻害することが出来るならば、SLE における病態形成の悪循環を断ち切る新たな治療戦略に繋がると期待される。我々は種々の薬剤をスクリーニングし、NF- κ B 阻害剤 BAY11-7082 と高脂血症治療薬 (HMG-CoA 還元酵素阻害剤：スタチン) を候補として考え、これらが pDC からの I 型 IFN 産生を阻害する活性をヒトならびにマウスにおいて見出した。この pDC 機能阻害活性は新規の知見であり、BAY11-7082 やスタチンのこの抑制的効果は、今後 SLE をはじめとする全身性自己免疫性疾患に対する新たな治療戦略に寄与すると考えられる。

2. 樹状細胞(DC)は抗原提示細胞として HLA 関連適応免疫応答において、

重要な役割を果たす。CD4⁺T 細胞のみならず、CD8⁺T 細胞に対しても HLA-クラス I を介して抗原提示し naïve CD8⁺T 細胞を、cytotoxic T 細胞 (CTL) に分化誘導することによって抗腫瘍免疫応答に寄与すると考えられている。一方、上皮由来サイトカインである胸腺間質リンパ球増殖因子 (TSLP) によって活性化した DC は、CD4⁺T 細胞に対してのみならず、CD8⁺T 細胞に対しても非常に強力な増殖誘導能を有することが明らかにされている。また従来より、Bacillus of Calmette and Guerin (BCG)は CTL 誘導能を示し、腫瘍免疫に有用なアジュバントと考えられている。今回我々は、TSLP と BCG を組み合わせることにより、TSLP 活性化 DC の持つ CD8⁺T 細胞増殖誘導能と BCG の持つ IFN- γ 産生 CTL 分化誘導能とを併せ持つことが可能であり、これらが今後、抗腫瘍免疫療法の治療戦略において有力な免疫アジュバントであると考えられた樹状細胞免疫療法の可能性を検討した。

3.樹状細胞と活性化血小板の相互作用に関する研究を行っている。我々は新たに、活性化血小板が RANK リガンドを発現することを同定した。RANKL は TNF スーパーファミリーの一つである。RANKL 発現の活性化血小板によって、DC の持つ CD86 は発現増強し、さらに TSLP と同時に活性化血小板を添加することによって、DC から産生される CCL17 は増加することも明らかにした。したがって、血小板は DC による Th2 免疫応答を増強し、アレルギー性の炎症を増幅させる可能性が示唆された。すなわち DC に由来するアレルギー応答において、血小板による新たな増幅機序の可能性が考えられた。

2. List of Publications

Original Articles

1. Ito T, Arima K: Cellular and molecular mechanisms of TSLP function in human allergic disorders--TSLP programs the "Th2 code" in dendritic cells--. Allergy International, 61, 35-43, 2012([PDF D3-1](#))
2. Ito T. Plasmacytoid dendritic cells and type I interferon as therapeutic cellular and molecular targets of autoimmune diseases
Cytometry Research 22:37-46,2012
3. Nomura S, Fujita S, Nakanishi T, Yokoi T, Shimamoto K, Miyamoto R, Ito T: Platelet-derived

- microparticles cause CD154-dependent activation of dendritic cells. *Platelets*,23,81-82,2011
4. Roberto Lande, Dipyaman Ganguly, Valeria Facchinetti, Loredana Frasca, Curdin Conrad, Josh Gregorio, Stephan Meller, Georgios Chamilos, Rosalie Sebasigari, Valeria Ricciari, Roland Bassett, Hideki Amuro, Shirou Fukuhara, Tomoki Ito, Yong-Jun Liu, Michel Gilliet
Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA–Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus
Sci Transl Med 2011: Vol. 3, p. 73ra19
 5. 伊藤量基 形質細胞様樹状細胞をターゲットとした自己免疫疾患治療の新たな治療戦略, *臨床血液*. 52.2011:p521-530
 6. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, Ikehara S.
Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells.
J Gastroenterol. 2011 46:1368-81([PDF D3-6](#))
 7. Katashiba Y, Miyamoto R, Hyo A, Shimamoto K, Murakami N, Ogata M, Amakawa R, Inaba M, Nomura S, Fukuhara S, Ito T.
Interferon- α and interleukin-12 are induced, respectively, by double-stranded DNA and single-stranded RNA in human myeloid dendritic cells.
Immunology 2011 :132 :165-173([PDF D3-7](#))
 8. Nomura S, Fujita S, Ozasa R, Nakanishi T, Miyaji M, Mori S, Ito T, Ishii K.
The correlation between platelet activation markers and HMGB1 in patients with disseminated intravascular coagulation and hematologic malignancy.
Platelets. 2011, 22:396-397
 9. Nomura S, Ozasa R, Nakanishi T, Fujita S, Miyaji M, Mori S, Yokoi T, Ito T, Ishii K.
Can recombinant thrombomodulin play a preventive role for veno-occlusive disease after haematopoietic stem cell transplantation?
Thromb Haemost. 2011 105:p1118-1120.
 10. Shosaku Nomura, Takahisa Nakanishi, Ryotaro Ozasa, Shinya Fujita, Michihiko Miyaji, Shinichiro Mori, Takashi Yokoi, Kazuyoshi Ishii, and Tomoki Ito
Dynamic role of cell-derived microparticles in hematopoietic stem cell transplantation
Current Trends in Immunology 2011 2011 12 : 21-27

Proceedings

1. 伊藤量基 全身性エリテマトーデスにおける重症度マーカーとしての血清 HMGB1 と LL37 日本血液学会総会・名古屋
2. 野村昌作 Preventive effects of recombinant thrombomodulin for veno-occlusive disease after allogeneic stem cell transplantation 日本血液学会総会・名古屋
3. 野村昌作 Recombinant thrombomodulin may play a preventive role for veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation 国際血栓止血学会・京都

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Invention of cardiac regeneration therapy using molecular imaging techniques 分子イメージングによる心筋再生療法の開発		
P.I.	Hajime Otani, 大谷肇	E-mail	otanih@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Internal Medicine 2, 内科学第二講座		
Collaborators	宮坂陽子、岩崎真佳、藤田昌哲		
Keywords	cardiac infarction, microRNA, regenerative medicine		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>Background: MicroRNA-92a is a small noncoding RNA that has been shown to regulate angiogenesis in a variety of normal tissues and tumors. We investigated whether controlled release of antagomir designed to inhibit microRNA-92a leads to enhanced blood vessel growth and functional recovery after myocardial infarction (MI) in rats.</p> <p>Methods and Results: MI was created by ligation of the left coronary artery in rats. Gelatin hydrogel microspheres-incorporated patch impregnated with antagomir-92a was placed on the surface of the infarct area of the left ventricle (LV) at the time of MI. There was no difference in LV wall motion assessed by echocardiography between rats with the antagomir-92a patch and the patch alone 1 hour after MI. However, myocardial thinning was inhibited, and LV wall motion was improved 3 days after MI in rats with the antagomir-92a patch. Myocardial fibrosis in the infarct area was reduced by the antagomir-92a patch 14 days after MI. Angiogenesis as evaluated by the number of capillaries and small vessels within the infarct area was increased by the antagomir-92a patch associated with enhanced cardiomyogenesis. The patch alone or the patch impregnated with antagomir-Co had no effect on LV wall motion, myocardial fibrosis, angiogenesis and cardiomyogenesis after MI.</p> <p>Conclusions: Controlled release of antagomir-92a using gelatin hydrogel microspheres-incorporated patch is an effective tool for cardiac regeneration therapy after MI.</p> <p>目的: 本研究の目的は心筋梗塞ラットモデルにおいてマイクロ RNA 92a に拮抗するアンタゴミア-92a 含有生体吸収性ゼラチンハイドロゲルパッチの心筋再生効果に関する検討を行うことである。心筋再生療法として血管増殖因子やケモカインを用いた分子治療が進められてきたが、単一のタンパクや遺伝子を標的とした分子治療には限界がある。そこで我々は心筋において血管新生を統合的に抑制していることが知られているマイクロ RNA 92a のアンタゴミアを用いて心筋再生を試みた。</p> <p>方法: ラットの左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作成し、梗塞巣にアンタゴミア 92a 含有生体吸収性ゼラチンハイドロゲルパッチ(Ant-92a パッチ)を逢着した。Bromodeoxyuridine (BrdU)を取り込んだ CD31⁺内皮細胞、c-kit⁺心筋幹細胞および α-actinin⁺心筋細胞数を測定して血管新生と心筋再生の程度を評価した。心筋梗塞 14 日後に超音波心エコーによって心機能を評価し、梗塞サイズを測定した。</p> <p>結果: Ant-92a パッチはパッチ単独または Ant-92a のスクランブルオリゴヌクレオチドを含有したパッチと比較して梗塞巣において著明な血管新生を促した。それに伴い、心筋幹細胞の梗塞巣への集積と再生心筋細胞の有意な増加が認められた。その結果、梗塞サイズは有意に縮小し、左室機能は有意に改善した。</p> <p>結論: Ant-92a パッチは心筋梗塞後の心筋再生療法として有用であることが示唆された。</p>			

2. List of Publications

Proceedings

1. Fujita M, Otani H, Shimazu T, Yoshioka K, Okazaki T, Satoh D, Iwasaki M, Iwasaka T. Controlled release of antagomir-92a using gelatin hydrogel microspheres-incorporated patch promotes cardiac regeneration after myocardial infarction in rats. Fujita M, 第75回日本循環器学会学術集会. 横浜. 2011年8月.
2. Fujita M, Otani H, Shimazu T, Yoshioka K, Iwasaki M, Iwasaka T, Tabata Y. Inhibition of microRNA-92a enhances angiogenesis and cardiomyocyte regeneration through integrin α 5-dependent accumulation of cardiac stem cells into the infarcted myocardium. Fujita M, American Heart Association Scientific Sessions 2011. アメリカオーランド. 2011年11月

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Molecular imaging in the development of carcinogenesis and tissue regeneration in inflammatory diseases of the digestive organs. 炎症性消化器疾患の発癌と再生における分子イメージング解析		
P.I.	Kazuichi Okazaki, 岡崎和一	E-mail	okazaki@hirakata.kmu.ac.jp
Affiliation	Internal Medicine 3, 内科学第三講座		
Collaborators			
Keywords	inflammation, immunity in digestive organs, pSmad2/3L-Thr antibody, regeneration, stem cell		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>We studied Molecular imaging in the development of carcinogenesis and tissue regeneration in inflammatory diseases of the digestive organs as follows.</p> <p>1) In the upper alimentary tract, the gastric corpus and antrum are believed to contain epithelial stem cells in the isthmus. However, the lack of useful markers has hindered studies of their origin. We identified the significant expression of phosphorylation at specific linker threonine residues (pSmad2/3L-Thr) in specific epithelial cells of the murine stomach and have suggested these cells to be epithelial stem cells.</p> <p>2) In the lower alimentary tract, PIR-A/B(med) dendritic cells (DCs) serve as regulators by inducing self-tolerance in the intestine and increase in number during the final stages of inflammation, which suggested that PIR-A/B DCs can be used to treat colitis via an IDO-dependent mechanism. In the development of colitic cancer, oncogenic Smad3 signaling, altered by chronic inflammation and eventually somatic mutations, promotes UC-associated neoplastic progression by upregulating growth-related protein.</p> <p>3) In the hepato-bilio-pancreas, patients with autoimmune pancreatitis (AIP) characteristically show elevated serum levels of immunoglobulin G4 (IgG4) and abundant infiltration of IgG4-positive plasmacytes in the involved organs such as the bile duct. We identified the IgG4/IgG1 ratio in the liver may be a useful marker for differential diagnosis of IgG4-related sclerosing cholangitis (IgG4-SC) and primary sclerosing cholangitis (PSC). In IgG4-SC, abundant infiltration of regulatory T cells (Tregs) may affect the switching of B cells to IgG4-producing plasmacytes, and there is a possibility that the function of Tregs is different in IgG4-SC and other liver diseases (PSC, AIH, and PBC). In the development of hepatic malignancy, fibro-carcinogenic signaling via phospho-Smad during progression of chronic viral liver diseases such as viral hepatitis.</p> <p>本研究は、消化器領域の炎症性疾患として <i>H.pylori</i> 感染胃・十二指腸疾患、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎やクローン病など）、膵炎（急性／慢性／自己免疫性膵炎）、肝炎（ウイルス性、自己免疫性肝炎）を対象としている。研究期間において炎症と再生および発癌における炎症細胞と幹細胞の動態解析を各種抗体を用いたイメージング解析により、炎症と発癌ならびに臓器再生における分子機序を明らかにするとともに、これら疾患のバイオマーカーの開発を行ってきており、具体的な成果は以下のとおりである。</p> <p>1) 上部消化管：セリン残基 smad3 リンカー部リン酸化抗体を用いて、胃粘膜上皮幹細胞の候補を同定し、<i>H.pylori</i> 感染やアルコールによる傷害胃粘膜の再生過程における細胞動態とチオレドキシンによるレドックス機構による防御機構を明らかにした。</p> <p>2) 下部消化管：スレオニン残基 smad3 リンカー部リン酸化抗体を用いて、炎症性腸疾患における再生と癌化過程の分子機序を明らかにした。さらに、PIR-A/B 抗体を用いて制御性樹状細胞を同定し、動物モデルを用いて炎症性腸疾患の新規治療法の開発の可能性を示した。</p>			

3)肝胆膵：抗 FoxP3 抗体を用いて、自己免疫性肝疾患、IgG4 関連硬化性胆管炎、自己免疫性膵炎における ICOS 陽性制御性 T 細胞と IL-10 による病態制御機構の存在を明らかにした。さらにスレオニン残基 smad 3 リンカー部リン酸化抗体を用いて、B 型および C 型ウイルス性肝炎における発癌機構におけるバイオマーカーとしての意義を見いだした。

2. List of Publications

Original Articles

1. Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, Ikehara S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J Gastroenterol.* 2011;46(12):1368-81. ([PDF D5-1](#))
2. Kusuda T, Uchida K, Miyoshi H, Koyabu M, Satoi S, Takaoka M, Shikata N, Uemura Y, Okazaki K. Involvement of inducible costimulator- and interleukin 10-positive regulatory T cells in the development of igg4-related autoimmune pancreatitis. *Pancreas.* 2011;40(7):1120-30.
3. Watanabe T, Yamashita K, Fujikawa S, Sakurai T, Kudo M, Shiokawa M, Kodama Y, Uchida K, Okazaki K, Chiba T. Activation of toll-like receptors and NOD-like receptors is involved in enhanced IgG4 responses in autoimmune pancreatitis. *Arthritis Rheum.* 2011 doi: 10.1002/art.33386([PDF D5-3](#))
4. Nakase H, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T, Okazaki K. Involvement of mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in TNF- α production from macrophage: possible link between MAP and immune response in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(11):E140-2. doi: 10.1002/ibd.21750. ([PDF D5-4](#))
5. Ikeura T, Takaoka M, Uchida K, Shimatani M, Miyoshi H, Kusuda T, Kurishima A, Fukui Y, Sumimoto K, Satoi S, Ohe C, Uemura Y, Kwon AH, Okazaki K. Autoimmune pancreatitis with histologically proven lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis with granulocytic epithelial lesions. *Intern Med.* 2012;51(7):733-7([PDF D5-5](#))
6. Nakajima A, Fukui T, Takahashi Y, Kishimoto M, Yamashina M, Nakayama S, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Yodoi J, Okazaki K. Attenuation of indomethacin-induced gastric mucosal injury by prophylactic administration of sake yeast-derived thioredoxin. *J Gastroenterol.* 2012 [Epub ahead of print] ([PDF D5-6](#))

Proceedings

1. Kazushige Uchida, Takeo Kusuda, Yutaku Sakaguchi, Katsunori Yoshida, Toshiro Fukui, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki. Possible role of ICOS and IL-10 Positive Regulatory T Cells in the Development of IgG4-related Autoimmune Pancreatitis. American Pancreatic Association Meeting. 2011/11. Chicago, USA.
2. Kazushige Uchida, Takeo Kusuda, Yutaku Sakaguchi, Katsunori Yoshida, Toshiro Fukui, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki. Possible role of ICOS and IL-10 Positive Regulatory T Cells in the Development of IgG4-related Autoimmune Pancreatitis. American Pancreatic Association Meeting. 2011/11. Chicago, USA.
3. Kazuichi Okazaki, Kimi Sumimoto, Tsukasa Ikeura, Kazushige Uchida, Makoto Takaoka. HOW to recognize the mimickers of pancreas cancer in AIP? Japanese experience. Joint Meeting of the 4th Asian- Oceanic Pancreas Association and 2011 Annual Congress of the Korean Pancreatobiliary Association 2011/09. Jeju, Korea

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Clarification of skin and soft tissue aging and tissue regeneration and application in diagnosis and treatment using molecular imaging. 皮膚・軟部組織の加齢変化、組織再生における分子イメージングによる病態解明と診断治療への応用		
P.I.	Kenji Kusumoto, 楠本健司	E-mail	kusumoto@hirakata.kmu.ac.jp
Affiliation	Plastic and Reconstructive Surgery, 形成外科学講座		
Collaborators	鈴木健司、竹本剛司、堀尾修、日原正勝、覚道奈津子等 18 名		
Keywords	blood vessel, bone, cartilage, cell, nerve, reconstruction, regeneration, skin, tissue, wound healing		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

In our research of 2011, bone regeneration, adipose-derived stem cells, and platelet-rich plasma are in main studied.

Bone regeneration: Against critical sized calvarial bone defects of rats, bone morphogenetic protein (BMP), hydroxyapatite (HAP), and the mixture (BMP/HAP) are implanted. Four weeks after the implant, the regenerative bony areas are estimated radiologically and histologically using molecular imaging and image analyzer. After subtraction technique of implanted HAP granules, in the groups BMP/HAP, BMP, HAP, and control in this order, more massive regenerative bony tissue are investigated. Within 4 weeks, the mixed BMP/HAP group showed the highest level of bone induction.

Adipose-derived stem cells (ASCs): It is investigated that ASCs cytoskeletal changes induced by the addition of C3 employing immunofluorescence staining, changes in alpha-smooth muscle actin (α -SMA) gene expression, and the Rho-inhibitory effect. C3 significantly reduced stress fiber disruption and α -SMA expression 24hs after its addition at a concentration of 1 μ g/ml, and it also reduced the Rho activity level. While the correlation of the occurrence can be assumed, it requires further examination to verify it. C3 may be an effective inhibitor of intracellular signal transmission in ASCs cytoskeletal control involving Rho.

Platelet-rich Plasma (PRP): Autologous platelet-rich plasma provides multiple growth factors after activation. A half-side test between the platelet-rich plasma (PRP)-treated and control (untreated) sides of a split-thickness skin graft donor site, and compared the number of days until epithelialization and pain during gauze change. On day 13 after surgery, PRP promotes epithelialization and angiogenesis of split-thickness skin graft donor sites.

On the other hand, in culture study α -SMA and gel contracture are shown with PRP. Then PRP is thought that it contribute to wound healing promoting α -SMA producing thick epithelization and scar contracture.

形成外科学講座では、創傷の生理的ならびに病的治癒過程を病態分子イメージングでとらえ、さらに種々の組織再生因子の負荷により病的創傷治癒が生理的創傷治癒に近づける過程を病態分子イメージングとしてとらえることで、明らかな改善、治癒に関与するエビデンスを出すことを目指している。この病態分子イメージングにより創傷治癒、組織再生における基礎研究を治療学、再建学につなげる大きな役割を果たすものと考えている。

平成 23 年度は、骨再生、脂肪組織由来幹細胞、多血小板血漿 (PRP) で、それぞれの成果を挙げた。

骨再生: ラット頭蓋骨の規格化した限界的骨欠損を作成し、骨形成タンパク (BMP) 単独、あるいは hydroxyapatite (HAP) 単独、両者併用で埋入した。この結果、骨欠損部の修復再生が生じるが、これを X線画像、組織学的所見での画像解析を行った。これにより、BMP が HAP より優れ、BMP+HAP 併用が最も骨欠損修復再生に効果的であることが明らか

かとなった。

脂肪組織由来幹細胞(ASCs) 細胞内に低分子量 G タンパク質 Rho が存在するが、exoenzyme C3 transferase が Rho inhibitor である。今回、C3 を加えることによる ASC cytoskeleton の変化を観察した。C3 負荷によりストレスファイバーや α -SMA の発現も抑制された。C3 は ASCs の細胞内伝達の抑制因子である可能性が示唆された。

多血小板血漿(PRP) 均一採皮創で、PRP をハーフサイドで上皮化を比較検討した。術後 1 3 日目に組織生検を行い PRP 群で、有意に表皮が厚く、血管数と α SMA が多かった。PRP の有意なる創傷治癒促進効果と判断した。また、PRP は有意に α SMA の増加と瘢痕拘縮を生じることを明らかにした。

2. List of Publications

Original Articles

1. Notodiharjo FZ, Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Kusumoto K: Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. Journal of cranio-maxillo-facial surgery. 40:287-291,2012.
2. Kakudo N, Kushida S, Minakata T, Suzuki K, Kusumoto K.: Platelet-rich plasma promotes epithelialization and angiogenesis in a splitthickness skin graft donor site. Medical molecular morphology 44(4):233-236,2011.
3. Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Matsumoto N, Kusumoto K.: The effect of C3 transferase on human adipose-derived stem cells. Human cell 24(4):165-169,2011.
4. Kushida S, Kakudo N, Suzuki K, Kusumoto K.:Effects of platelet-rich plasma on proliferation and myofibroblastic differentiation in human dermal fibroblasts. Ann Plast Surg in press ([PDF D6-4](#))

Proceedings

1. Kusumoto Kenji, Suzuki Kenji, Fukuda Satoshi, Miyake Yoshikazu, Kakudo Natsuko, Tanaka Yoshihito, Sasao Takashi, Kushida Satoshi, Katsube Motoki, Valentin Priscilla, Ogura Tsunetaka: Autologous Platelet-rich Plasma(PRP) and the Applications for wrinkle care and ulcer treatment. The 21st Japan-China Joint Congress on Plastic Surgery, Fukuoka city, 2011/11

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Cellular function <i>imaging</i> by x-ray microscopy 軟X線顕微鏡による細胞内機能イメージング		
P.I.	Hiroshi Kihara, 木原裕	E-mail	kihara@makino.kmu.ac.jp
Affiliation	Physics, 物理学講座		
Collaborators	楠本（竹本）邦子、新庄正路、松村義隆、市村薫		
Keywords	carboxysome, cryogenic observation, folding, protein, soft X-ray microscopy, X-ray slution scattering		
<p>1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS</p> <p>1. X-ray microscopy imaging</p> <p>(1) <i>X-ray microscopic examinations of carboxysome</i></p> <p>It is known that <i>Leptolyngbya tenuis</i> (<i>Phormidium tenue</i>) is a blue-green alga producing musty odor in Lake Biwa. <i>L. tenuis</i> was cultured from the water of Lake Biwa and the cells have been observed by soft x-ray microscope. Cell suspension without chemical fixation or staining was dropped onto a polyimide thin film and air-dried. Two wavelengths, 2.0 nm and 2.4 nm (below and above the wavelength of K-absorption edge of oxygen, 2.28 nm), were used for the x-ray observation. Granules were also confirmed by 2.0 nm observations clearly. The diameter of granules was about 500 nm. However the granules were not observed by 2.4 nm observations. These results show that oxygen is most important constituent element for the granule. To identify the granules, the transmission electron microscope (TEM) and the indirect fluorescent-antibody technique (IFA) were done. IFA and TEM are effective methods to study of phytoplankton. By TEM, carboxysomes, thylakoids and polyphosphate granules were observed in <i>L. tenuis</i> cells. The carboxysomes were spatially ordered in a linear fashion in the cells. By IFA, the carboxysomes were also spatially ordered in a linear fashion in the cells. Carboxysomes are proteinaceous biochemical compartments of the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism. The organelles catalyze HCO₃⁻ dehydration and photosynthetic CO₂ fixation. As a result, there is a high possibility that the granules are the carboxysome.</p> <p>(2) Development of a new cryogenic sample chamber</p> <p>A new x-ray cryogenic sample chamber was developed. Temperature stability was improved by introducing non-contact cooling system with the use of liquid nitrogen and oxygen gas. The lowest sample chamber temperature reached -170 °C. Alleviation of radiation damage in polystyrene latex spheres at cryogenic temperatures was verified. The new cryogenic sample chamber also successfully made experimental observation of cyanobacteria at cryogenic temperature.</p> <p>2. Protein folding process</p> <p>SrcSH3 forms α-helix-rich intermediate in the early stage of folding pathway. Refolding experiments were done by circular dichroism and X-ray solution scattering. Molecular structure of the folding intermediate was calculated by SAXS_MD program with considering helix-coil transition theory. Obtained structure well satisfies experimental results of X-ray solution scattering and circular dichroism.</p> <p>hNck2 SH3 domain was also studied. This protein takes β-structure rich conformation at native condition. It is known that hNck2 SH3 domain takes equilibrium α-helix-rich intermediate at acidic pH. In our study, it is suggested that the protein takes monomer at acidic pH, and the protein changes from monomer to mixture of monomer and dimer with the increase of pH. From concentration dependence experiment, protein forms monomer at low protein concentration and forms dimer at high protein concentration.</p>			

1. 軟 X 線顕微鏡による細胞内機能イメージング

①カルボキシソームの X 線顕微イメージング

カルボキシソームは、ルビスコを集積したタンパク質の小構造体で、シアノバクテリアや一部の化学合成独立栄養細菌の細胞質に存在する。カルボキシソームは、細胞質に濃縮される重炭酸イオンを CO_2 に局所的に変換してルビスコに供給し、炭酸固定反応を助ける働きをする。染色や薄片化していない微小シアノバクテリアの細胞内微細構造を軟 X 線顕微鏡で、酸素の K 吸収端の前後のエネルギーで観察することにより、カルボキシソームと思われる構造体を可視することができた。

②軟 X 線顕微鏡用クライオ試料ステージの開発

液体窒素と酸素ガスを用いることでクライオガスを用いた間接冷却法を開発することで、短時間に試料を試料槽温度で -170°C に冷却することができた。ポリスチレンラテックス球を用い冷却による放射線損傷の軽減を確認し、シアノバクテリアのクライオ観察に成功した。

2. X 線溶液散乱による蛋白質のフォールディング過程の追跡

SH3 ドメインのフォールディング過程の追跡を行った。これまで src SH3, PI3K SH3, Fyn SH3 ドメインのような天然構造で β 構造優位な蛋白質においても、フォールディングの初期に非天然な α -helix を形成して巻き戻る事を見出してきた。

今回、src SH3 に関して、フォールディング過程に現れる α -helix に富んだ中間体の構造を明らかにする事が出来た。円偏光二色性、X 線溶液散乱、helix-coil 転移計算、SAXS_MD 等の手法を組み合わせて、実験結果を満たすフォールディング中間体の構造を求めた。

hNck2 SH3 ドメインに関して新たに研究をスタートした。他の SH3 と同様、フォールディング過程初期に α -helix を形成して巻き戻る事が期待されたが、リフォールディングの実験からははっきりと分かる α -helix バースト相は確認できなかった。このタンパクは酸性 pH 環境下で構造変化をおこし α -helix に富んだ構造をとる事が知られており、円偏光二色性の実験にて我々も確認した。又、酸性 pH で単量体だったタンパク分子が、pH 上昇に伴い単量体と二量体の混合状態になる事、低タンパク濃度では単量体だが、タンパク濃度 1mg/ml 以上の領域では二量体を形成しているであろう事を X 線溶液散乱の結果から見出している。

2. List of Publications

Original Articles

1. K. Takemoto, M. Kimura, K. Usui, T. Ohigashi, H. Fujii, K. Nakanishi, H. Namba and H. Kihara, Observations of biological specimens at cryo-temperatures with soft X-ray microscope at the SR center of Ritsumeikan University AIP Conference Proceedings, 1365 (2011) 419-422. ([PDF D7-1](#))
2. K. Takemoto, I. Narumi, K. Satoh, T. Ohigashi, H. Namba and H. Kihara, New approach for x-ray micro-imaging of live cells in carbon window region at subzero temperatures with the use of antifreeze AIP Conference Proceedings, 1365 (2011) 415-418. ([PDF D7-2](#))
3. Kuniko Takemoto, Satoshi Ichise, Takuji Ohigashi, Hidetoshi Namba and Hiroshi Kihara, X-ray Imaging of Mucilaginous Sheath of Phytoplankton in Lake Biwa by Soft X-ray Microscope AIP Conference Proceedings, 1365 (2011) 373-376. ([PDF D7-3](#))
4. T. Ohigashi, H. Fujii, K. Usui, H. Namba, H. Mizutani, K. Takemoto, and H. Kihara, Development of Computer Tomography System for the Soft X-ray Microscope at Ritsumeikan University AIP Conference Proceedings, 1365 (2011) 124-127. ([PDF D7-4](#))
5. 竹本邦子, 一瀬諭, 大東琢治, 池谷仁里, 難波秀利, 木原裕, 軟 X 線顕微鏡を用いた微小植物プランクトンの観察 日本水処理生物学会誌, 47 (2011) 131-135.
6. Yoshitaka Matsumura, Masaji Shinjo, Nobuyuki Okishio and Hiroshi Kihara, Time-resolved

kinetic refolding of PI3K SH3 in the presence of 45% ethylene glycol at pH 6 Photon Factory Activity Report, 28:247. ([PDF D7-6](#))

7. Zie-jie Qin, Yoshitaka Matsumura, Masaji Shinjo, Hiroshi Kihara, Structural analysis of α -helix rich intermediate of bovine β -lactoglobulin on its folding pathway Photon Factory Activity Report, 28 (2011) 246. ([PDF D7-7](#))
8. Yoshitaka Matsumura, Masaji Shinjo, Anjali Mahajan, Ming-Daw Tsai and Hiroshi Kihara, Time-resolved SAXS on Ki67 FHA domain refolding at cryo conditions Photon Factory Activity Report , 28 (2011) 245. ([PDF D7-8](#))
9. Yoshitaka Matsumura, Masaji Shinjo, Nobuyuki Okishio and Hiroshi Kihara, Unfolding of PI3K SH3 in the presence of 45% ethylene glycol at pH 6 Photon Factory Activity Report, 28 (2011) 248. ([PDF D7-9](#))
10. Yoshitaka Matsumura, Masaji Shinjo, Anjali Mahajan, Ming-Daw Tsai and Hiroshi Kihara, Time-resolved SAXS on FHA1 domain of Rad53 refolding at cryo conditions Photon Factory Activity Report , 28 (2011) 244. ([PDF D7-10](#))
11. Masaji Shinjo, Yasumasa Morimoto, Masaki Kojima, Jinsong Li, Xianju Jin, Yoshitaka Matsumura, Hiroshi Kihara, Structural analysis of srcSH3 intermediate on its folding pathway Photon Factory Activity Report, 28 (2011) 242. ([PDF D7-11](#))
12. Kishin Usui, Takuji Ohigashi, Hidetoshi Namba, Kuniko Takemoto, Hiroshi Kihara, Development of the New Sample Cooling System for the Full-field Imaging Soft X-ray Microscope Memoirs of the SR Center, Memoirs of the SR Center, Ritsumeikan University, 13 (2011) 207-209.
13. K. Takemoto, S. Ichise, T. Ohigashi, H. Namba, H. Kihara, Soft x-ray imaging of *Leptolyngbya tenuis* (*Phormidium tenue*) in Lake Biwa Memoirs of the SR Center, Memoirs of the SR Center, Ritsumeikan University, 13 (2011) 205-206.
14. Takuji Ohigashi, Hidetoshi Namba, Kuniko Takemoto, Hiroshi Kihara, Improvement of Illumination Optics of the Full-field Imaging Soft X-ray Microscope, Memoirs of the SR Center, Ritsumeikan University, 13 (2011) 201-204. ([PDF D7-14](#))
15. Hiroki Fujii, Takuji Ohigashi, Hidetoshi Namba, Kuniko Takemoto, Hiroshi Kihara, Study of quantitative analytical method for soft X-ray nanotomography at BL-12 Memoirs of the SR Center, Memoirs of the SR Center, Ritsumeikan University, 13 (2011) 197-200. ([PDF D7-15](#))

Proceedings

1. Masaji Shinjo, Yasumasa Morimoto, Masaki Kojima, Jinsong Li, Xianju Jin, Yoshitaka Matsumura, Hiroshi Kihara, Structural analysis of α -helix-rich intermediate of *src* SH3 on its folding pathway, 日本蛋白質科学会, 吹田市, 2011 年 6 月.
2. Yoshitaka Matsumura, Nobuyuki Okishio and Hiroshi Kihara, Multiple folding intermediates of three SH3 domains (*src*, Fyn and PI3K) , , 日本蛋白質科学会, 吹田市, 2011 年 6 月.
3. 臼井規真, 大東琢治, 難波秀利, 竹本邦子, 木原裕, 結像型軟 X 線顕微鏡ビームラインの現, 立命館大学 SR センター成果報告会, 草津市, 2011 年 6 月.
4. 竹本邦子, 一瀬論, 大東琢治, 難波秀利, 木原裕, 軟 X 線顕微鏡による植物プランクトン *Leptolyngbya tenuis* (*Phormidium tenue*) の顆粒の観察, 立命館大学 SR センター成果報告会, 草津市, 2011 年 6 月.
5. 鳴海一成, 佐藤勝也, 大東琢治, 竹本邦子, 難波秀利, 木原裕, 軟 X 線顕微鏡による *Deinococcus radiodutans* の観察, 立命館大学 SR センター成果報告会, 草津市, 2011 年 6 月. Yoshitaka Matsumura, Masaji Shinjo, Jinsong Li, Xianju Jin, Kaoru Ichimura and Hiroshi

- Kihara, Time-Resolved Study on Folding Landscapes of SH3 Domain Proteins, PF シンポジウム, つくば市, 2011 年 7 月.
6. 新庄正路, Zhi-jie Qin, 松村義隆, Jinsong Li, 木原裕, Structural analysis of α -helix rich intermediate of bovine β -lactoglobulin on its folding pathway, PF シンポジウム, つくば市, 2011 年 7 月.
 7. Yoshitaka Matsumura, Xianju Jin, Jinsong Li, Masaji Shinjo, and Hiroshi Kihara, Radiation protection effect of ethylene glycol and glycerol on proteins, PF シンポジウム, つくば市, 2011 年 7 月.
 8. 新庄正路, 森本康幹, 小島正樹, Jinsong Li, Xianju Jin, 松村義隆, 木原裕, srcSH3 ドメインにおける初期フォールディング中間体の構造解析, バイオイメージング学会, 千歳市, 2011 年 9 月.
 9. 森本康幹, 小島正樹, 新庄正路, 木原裕, srcSH3 ドメインにおける初期フォールディング中間体のイメージング, バイオイメージング学会, 千歳市, 2011 年 9 月.
 10. 竹本邦子, 山本章嗣, 大東琢治, 一瀬諭, 難波秀利, 木原裕, 軟 X 線顕微鏡による植物プランクトン *Leptolyngbya tenuis* (*Phormidium tenue*) の細胞内顆粒の観察, バイオイメージング学会, 千歳市, 2011 年 9 月.
 11. 大東琢治, 臼井規真, 難波秀利, 竹本邦子, 木原裕, 立命館大学 SR センター結像型軟 X 線顕微鏡の高度化, X 線結像光学研究会, 仙台市, 2011 年 11 月.
 12. 竹本邦子, 山本章嗣, 大東琢治, 一瀬諭, 難波秀利, 木原裕, 軟 X 線顕微鏡による植物プランクトン *Phormidium tenue* の観察, 日本水処理生物学会, 草津市, 2011 年 11 月.
 13. Masaji Shinjo, Yasumasa Morimoto, Masaki Kojima, Jinsong Li, Xianju Jin, Yoshitaka Matsumura, Hiroshi Kihara, Structural Analysis of alpha-Helix-Rich Intermediate of src SH3 on its Folding Pathway by SAXS_MD, The 5th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Nara, Japan, 2012 年 1 月.
 14. Yoshitaka Matsumura, Kaoru Ichimura, Jianxing Song, Hiroshi Kihara, Folding of hNck2 SH3 Domain, The 5th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Nara, Japan, 2012 年 1 月.
 15. 臼井規真, 竹本邦子, 吉村真史, 大東琢治, 木原裕, 難波秀利, 結像型軟 X 線顕微鏡における低ドリフト試料冷却装置の改良と試料観察, 日本放射光学会, 鳥栖市, 2012 年 1 月.
 16. 竹本邦子, 山本章嗣, 大東琢治, 一瀬諭, 難波秀利, 木原裕, 軟 X 線顕微鏡による植物プランクトン *Leptolyngbya tenuis* の細胞内微細構造の観察と同定, 日本放射光学会, 鳥栖市, 2012 年 1 月.

Annual Report 研究成果報告書

Title of Project	Molecular imaging of pathophysiology of kidney and neurodevelopmental disorders 腎不全とてんかん・発達遅滞に関わる疾患遺伝子の病態分子イメージングの開発		
P.I.	Hiroyasu Tsukaguchi, 塚口裕康	E-mail	tsukaguh@takii.kmu.ac.jp
Affiliation	Medical Informatics, 医療情報部		
Collaborators			
Keywords	disease-specific iPS, molecular imaging, neuron, PET, podocyte		

1. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

[Background] A neuron and glomerular podocyte share a common biological feature of terminally differentiated cells that exert their function through formation of specialized cell-cell junctions (i.e., synapse and slit diaphragm). Galloway-Mowat syndrome (GMS, MIM 251300) is a rare congenital disorder that affects these two cellular lineages simultaneously.

Clinically, it is recognized by co-occurrence of malformation in cerebral cortex and renal glomeruli. The GMS patients typically suffer from nephrotic syndrome with progression to end stage renal disease and from psychomotor retardation with epilepsy. The pathogenesis might be ascribed to defective cellular functions shared by neuronal and renal mesenchymal lineages, i.e., migration, proliferation. However, the disease genes have yet to be identified.

[Purpose] The aim of this study is, (1) to identify as-yet-undefined disease genes of GMS, (2) to generate an experimental disease model of mice and iPS cells, and (3) to create a functional imaging system that visualize the pathogenic events in vivo.

[Results & Methods]

(1) Genetic analysis: We searched the disease genes of 10 Asian GMS families by combination of cytogenetic microarray (300K CytoSNP-12, Illumina) and next generation sequencing of whole exomes (4-5Gb, 75bp-paired ends with x30-50 depth). After filtering against SNP databases (1000 genomes), there were several potential candidate genes. We are now on the process of verifying their significance in terms of segregation and tissue localization.

(2) Disease-specific iPS cells: The iPS cells were successfully generated from the patient's skin fibroblasts through transfection of defined Yamanaka four factors by Sendai-virus vectors (Fusaki N, 2009). The cells are now being tested to induce the differentiation states towards neuronal and renal progenitors.

[Conclusions]

Discovery of the GMS genes will lead to a better understanding of pathophysiology regarding neuron and podocyte development, thereby enabling the earlier diagnosis and more targeted therapy onto this rare syndromic disorder. Identification of GMS genes, the first step of this project, will allow the generation of probes (fluorescence or radionucleotides) that could monitor a spatiotemporal expression of the causative molecules. We will then proceed with developing non-invasive, real-time imaging system that envisions the pathogenic events resulting from the GMS genes, at both cellular (iPS) and rodent models (transgenic mice). This new technology will hopefully improve the treatment for more common diseases, i.e., chronic kidney disease (CKD) and epilepsy.

中枢(精神発達遅滞、てんかん)と腎糸球体(ネフローゼ、腎不全)障害を主徴候とする原因不明の稀少難病 Galloway-Mowat 症候群の責任遺伝子を同定し、生体内で原因分子

および疾患にともなう病態変化を可視化する画像診断技術の基盤を構築する。

[背景・準備状況] 主研究者らは、Galloway-Mowat 症候群の全国調査と検体収集を行い、疾患遺伝子の探索を行っている（平成 22 年厚労省難治性疾患克服研究事業）。

[目的] Galloway-Mowat 症候群は、ニューロンと糸球体上皮ポドサイトに共通する分化・発育因子の異常に起因する脳・糸球体異形成であるが、原因分子は不明である。次世代シーケンサを用いたエクソーム解析で責任遺伝子を同定する。疾患分子の情報を基に、腎疾患、てんかん・発達障害の病態診断・治療に役立つ新しい生体分子イメージング技術(PET 等)を開発する。

[成果]

- 1) 患者調査・疾患遺伝子探索 患者情報を収集するとともに 10 症例の SNP マイクロアレイと次世代シーケンサを用いた全エクソーム解析を行い、疾患遺伝子を解析中である（塚口、金子）。
- 2) 疾患モデル幹細胞の作成 Galloway-Mowat 症候群患者で、iPS 細胞を樹立した（江良、仲里）。現在、神経細胞や腎前駆細胞（中間中胚葉）への誘導を試み、病態モデルとしての評価を行っている。

[意義]

- 1) 学術的独創性・新規性 ニューロンとポドサイトの分化・発育、組織構築に必須の分子の実体は不明であり、本プロジェクトにより新たな生命現象の解明と、研究領域の創生が期待できる。
- 2) 医学的貢献 脳神経や腎糸球体の発達経過と病態を、非侵襲的、経時的に可視化できる病態分子イメージング技術は、早期診断、治療効果判定、創薬開発に役立ち、臨床の現場に貢献できる。
- 3) 社会的貢献 成果は難治性てんかん、発達障害、進行性腎障害（有病率 1%）の治療開発に役立ち、広く社会に貢献する。

2. List of Publications

Original Articles

1. 塚口裕康 腎臓病学「ゲノムからみた腎臓病学」 細胞 5月号 2012
2. 塚口裕康 Galloway-Mowat 症候群(脳・腎糸球体異形成) 別冊 日本臨床 腎臓症候群(上): page 411-419

Proceedings

1. 塚口裕康、仲里仁史、服部元史、伊藤秀一、小崎里華、飯島一誠 Galloway-Mowat 症候群(脳腎糸球体異形成) の全エクソーム解析、第 56 回日本人類遺伝学会 千葉幕張 2011 年 11 月 13 日
2. 塚口裕康、遺伝性・症候性ネフローゼ症候群の遺伝子解析 第 115 回小児科学会学術集会、シンポジウム 福岡国際会議場 2012 年 4 月 21 日
3. 塚口裕康、分子病態理解に基づく難治性ネフローゼ克服へのアプローチ、第 47 回小児腎臓病学会学術集会、教育講演 東京都市センターホテル 2012 年 6 月 29 日