

高等研究院

フォーラム

報告書

高等研究院フォーラムを開催

ーライフサイエンスのフロンティアを目指してー

高等研究院では、11月25日(木)、学内外の研究者・大学院生を対象としたフォーラム「ライフサイエンスのフロンティアを目指して」を野依学術交流館カンファレンスホールにおいて開催しました。今回は急速に変化しつつある生命科学分野をとりあげ、本学生命科学分野の若手教員（高等研究院流動教官や生命科学系の21世紀COEのメンバー）の研究を中心に、10年後の生命科学をリードする研究の方向性やアプローチを討議し、様々な方法論の融合を模索することを目的としました。また学外から上田泰己氏（理化学研究所・発生再生科学総合研究センター・システム生物学）にも参加頂きました。

フォーラムは3部構成でプログラムが進行されました。各プログラムでは、最初に座長からこの分野の概論や今後の研究の方向性についての15分程度の説明があり、引き続き3～4名の方が話題提供者として研究成果の報告を行いました。

【プログラム概要】

Program 1 「生命科学とはなにか---基礎生命科学」（座長 松本邦弘理学研究科教授）

Program 2 「生命科学の次なる扉を拓く」（座長 町田泰則理学研究科教授）

Program 3 「生命科学の新たな発展」

（座長 松岡 信生物機能開発利用研究センター教授、高橋雅英医学系研究科教授）

当日は、約120名の参加があり、7時間30分に及ぶ長いフォーラムでしたが、予定時間を超えての質疑や、コーヒブレイクで参加者が活発に議論する姿が見受けられ、大変有意義なフォーラムとなりました。特に日頃、同じキャンパス内でありながら、機会の少なかった若手研究者の研究に触れることができる貴重な企画であったという意見が多く寄せられました。この報告書はその記録ですが、多忙な研究者に時間をとらせないよう新たに報告を書いてもらうことは避け、おもに当日の発表スライドを中心に構成されています。この報告書が当日の熱い議論が思い起こす助けになれば幸いです。また講演と議論の録画も保存されています。これらは当面公開の予定はありませんが、ご希望があれば、演者の諒解を確認した後ごらん頂くことも可能ですので、高等研究院までお知らせください。

なお、高等研究院での研究成果を広く学内外に発信するため、今後も流動教員（高等研究院所属）を中心とした講師陣による講演会形式ないしはシンポジウム形式の公開研究フォーラム（高等研究院フォーラム）を年1回程度開催する予定です。

高等研究院フォーラム企画実行委員 近藤孝男（理学研究科）

名古屋大学高等研究院フォーラムプログラム

「ライフサイエンスのフロンティアを目指して」

高等研究院ではその研究成果を広く学内・外に発信するため、流動教員を中心とした高等研究院フォーラムを計画しております。今年度は名古屋大学の生命科学分野の若手教員の研究に焦点をあて、今後の生命科学をリードする研究の方向性やアプローチを討議し、様々な方法論の融合を模索したいと考えています。

日時 平成16年11月25日(木) 10時から
場所 野依記念学術交流館「カンファレンスホール」

高等研究院長挨拶

後藤俊夫

Program 1 生命科学とはなにか―基礎生命科学 (10:00-12:00)

座長 松本邦弘・理学研究科

線虫行動の研究から脳のしくみを解き明かす

森 郁恵(理学研究科・生命理学専攻) 1

ゼブラフィッシュを用いた神経初期発生機構の解明

伊藤素行(理学研究科・生命理学専攻) 6

糖鎖の謎に挑む

北島 健(生物機能開発利用研究センター) 11

Lunch Break

Program 2 生命科学の次なる扉を拓く(13:00-15:30)

座長 町田泰則・理学研究科

動的で複雑な生命現象のシステム生物学

上田泰己(理化学研究所・発生再生科学総合研究センター) 17

ソフトマシンとしての蛋白質

笹井理生(情報科学研究科) 22

ソフトリソグラフィーを駆使したメカノバイオロジーの研究

成瀬恵治(医学系研究科細胞情報医学・細胞生物物理学) 27

発生を制御する原理とは

近藤 滋(理学研究科・生命理学専攻) 32

Coffee Break

Program 3 生命科学の新たな発展 (16:00-18:30)

座長 松岡信 (生物機能開発利用研究センター)・高橋雅英 (医学系研究科)

骨髄細胞を用いた血管新生療法と内皮前駆細胞の診断的役割室原

室原豊明 (医学系研究科) 37

球脊髄性筋萎縮症の病態に基づく治療法開発

勝野雅央、祖父江元 (医学系研究科・神経内科) 48

ゲノム情報を利用した穀物育種

芦苅基行 (生物機能開発利用研究センター) 53

病態に関連した生理活性脂質のケミカルバイオロジー

内田浩二 (生命農学研究科) 58

懇親会 19:00-20:30

高等研究院フォーラム企画実行委員会

委員長 田上英一郎 (副院長)

近藤 孝男 (理学研究科)

中村 研三 (生命農学研究科)

高橋 雅英 (医学系研究科)

Program 1 生命科学とはなにか --- 基礎生命科学

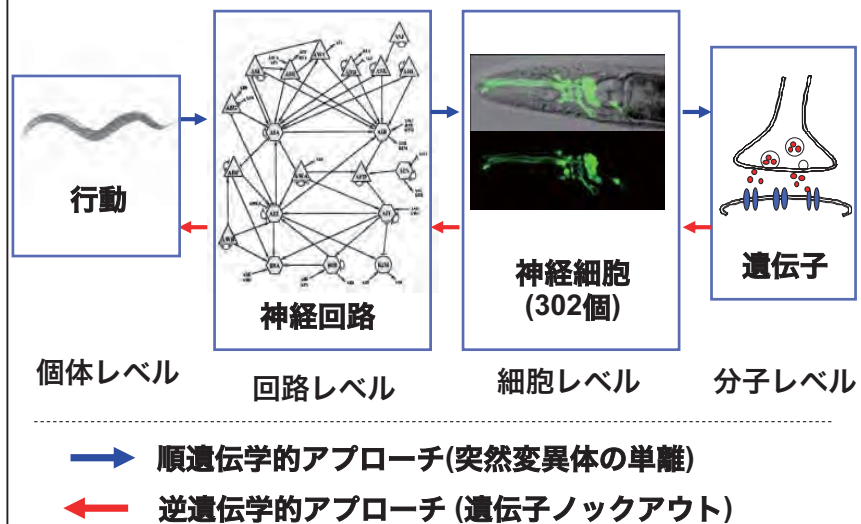
線虫行動の研究から脳のしくみを解き明かす

森 郁恵（理学研究科・生命理学専攻）

動物がどのようにして多種多様な刺激を受容・識別し、それらを記憶するのかという問題は、現在の神経生物学において、最も基本的な問題の1つである。多くの国内外の研究者が競って研究しているにも関わらず、これらの問題についての本質的な答えは、まだ、きちんと解き明かされていない。線虫 *C. elegans* は、あらゆる生命現象の分子遺伝学的解析に適したモデル動物である。私たちは、この *C. elegans* を実験材料として、これらの問題を解くために研究を進めている。*C. elegans* は、体長約1ミリの線虫で、寄生性がなく、通常、土壌でバクテリアを餌として生育している。*C. elegans* の神経系は、わずか302個の神経細胞から形成されているが、触覚、味覚、嗅覚、温度感覚など、哺乳類全般に備わっている感覚を持っていて、どの刺激をどの感覚神経細胞で受容しているかが明らかにされている。さらに、刺激を受けた感覚神経細胞からの神経シグナルが、介在神経細胞に伝達されて中枢神経系を形成し、シグナル情報の統合や処理が行なわれていると考えられている。この中枢神経系は、哺乳類の脳に相当する。

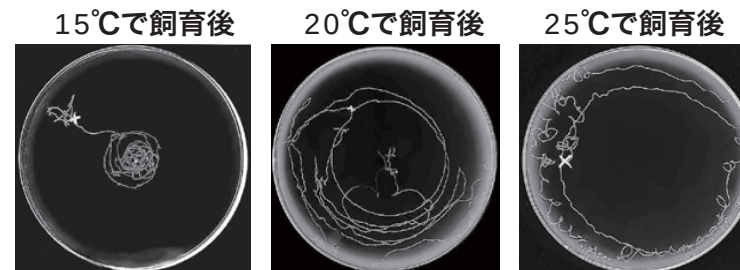
C. elegans は、飼育された環境の温度情報と餌環境を受容し、この飼育温度と餌状態という2つの情報を関連付けて記憶する性質を持っている。この行動は、温度走性とよばれ、温度勾配上で、餌を与えられて飼育されていた温度へ移動し、飢餓を体験していた温度を避けるように移動する行動として観察することができる。したがって、温度走性は、*C. elegans* において最も直接的かつ多面的に、神経系の可塑性を反映している行動である。約10年前に、生きた線虫の神経細胞を、レーザー照射によって、1つ1つ破壊して行動を調べるという一連の実験を行ない、温度走性を成り立たせている根本的に重要な神経回路を明らかにした。この神経回路に基づき、温度走性に異常を持つ変異体を解析して、温度走性に関わる遺伝子を同定することにより、温度走性の神経回路では、どのようなシグナル伝達経路が関係しているかについても、研究を進めている。最近になって、温度走性行動に必要な餌と飼育温度との連合学習に重要な遺伝子もわかってきた。さらに、神経細胞の活動を可視化するシステムにより、温度を感じる感覚神経細胞では、どのように温度を感じているのかも、大まかにわかってきた。線虫 *C. elegans* の温度走性が、分子、細胞、神経回路、行動という4つの異なる階層全てにおいて解析ができる、全生物を通じて、おそらく唯一の行動システムであることを利用してどのようなことがわかってきたか、私たちの研究の現状を報告し、将来の展望についても議論したい。

線虫 *C. elegans* の分子神経遺伝学



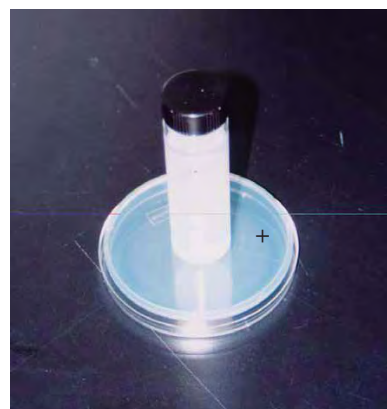
I - 温度走性は過去の飼育温度によって変化する

餌を十分与えられて飼育された場合

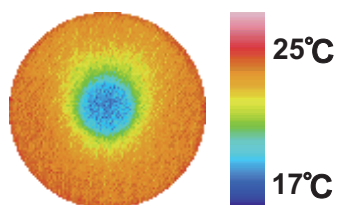


温度勾配上で飼育温度に移動する

線虫の温度走性 (Thermotaxis)



温度走性テスト
(Hedgecock and Russell, 1975)

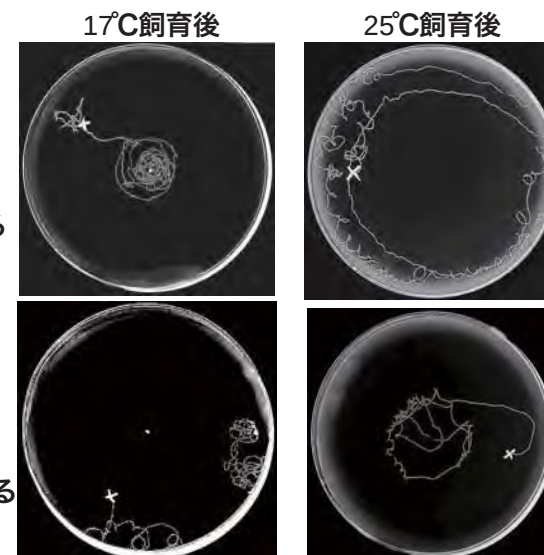


Thermography TVS-610

II - 温度走性は飢餓体験によって変化する

餌が十分
与えられた場合

餌体験温度に移動する



飢餓を
体験した場合

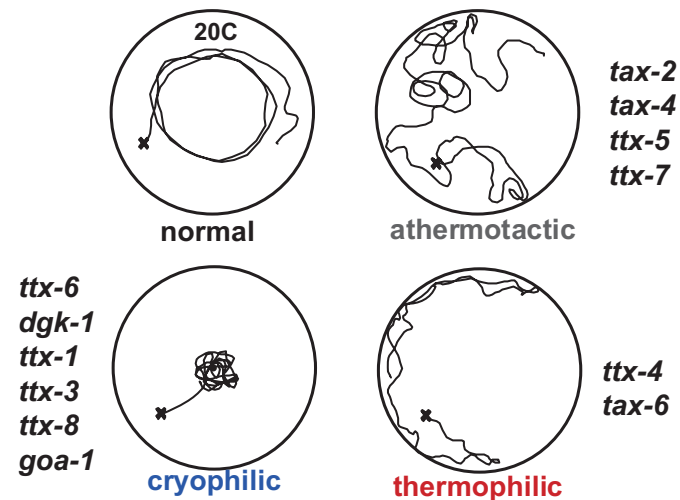
飢餓体験温度を避ける

線虫の温度走性

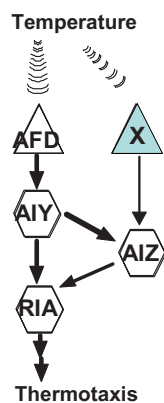


温度受容と学習・記憶の研究に適する
行動パラダイム

温度走性行動が異常な突然変異体： 単離、クローニング、さまざまな解析



温度走性の神経回路: Mori and Ohshima model(1995)



AFD: メジャーな温度受容ニューロン

X: マイナーな温度受容ニューロン

AIY: 高温への移動に必要な介在ニューロン

AIZ: 低温への移動に必要な介在ニューロン

RIA: 高温と低温への移動に必要な介在ニューロン



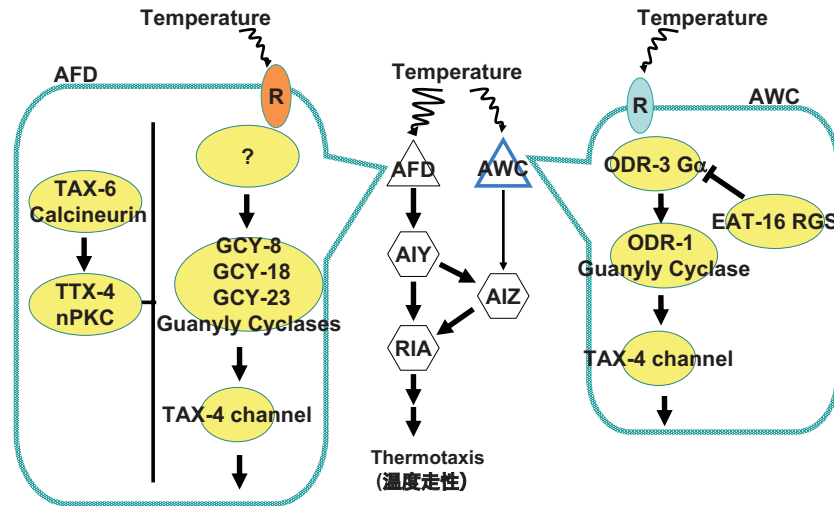
AIY and AIZ: 神経回路上で拮抗的に働く

RIA: AIYとAIZからの神経シグナルの統合処理に重要

温度受容シグナル伝達経路の解析

➡ 動物は異なる刺激をどうやって識別するのか？

分子遺伝学的解析に基づく温度受容のメカニズム



aho-2 mutantsは連合学習が異常である

エサ経験温度へ移動する

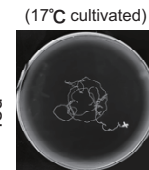


飢餓を体験したにもかかわらず、飼育温度へ移動する

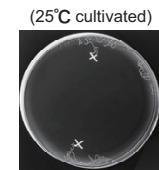


エサの認識は正常

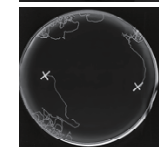
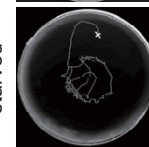
aho-2(*nj32*)
(20°C cultivated)



fed



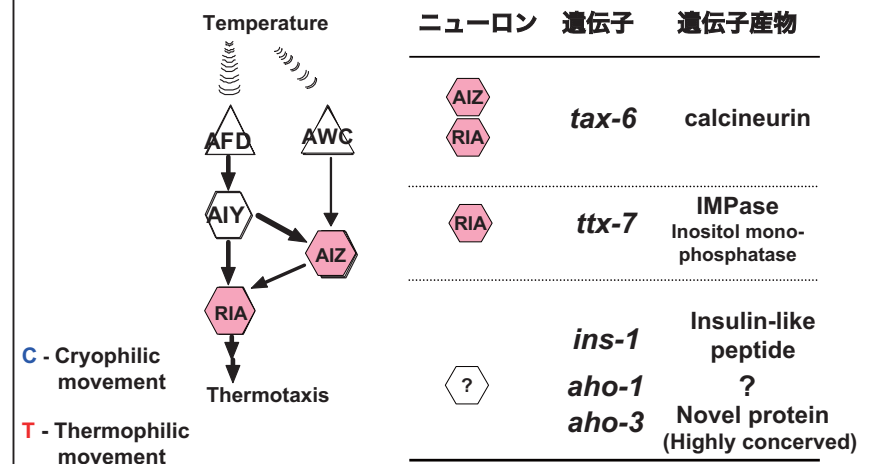
starved



学習・記憶のメカニズム

➡ 動物は、なぜ、そう行動するのか？

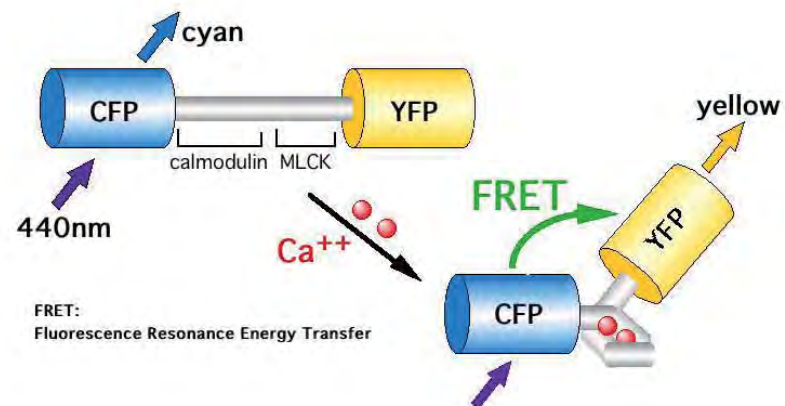
介在ニューロンネットワークの機能解析



中枢神経系（脳）の生理学

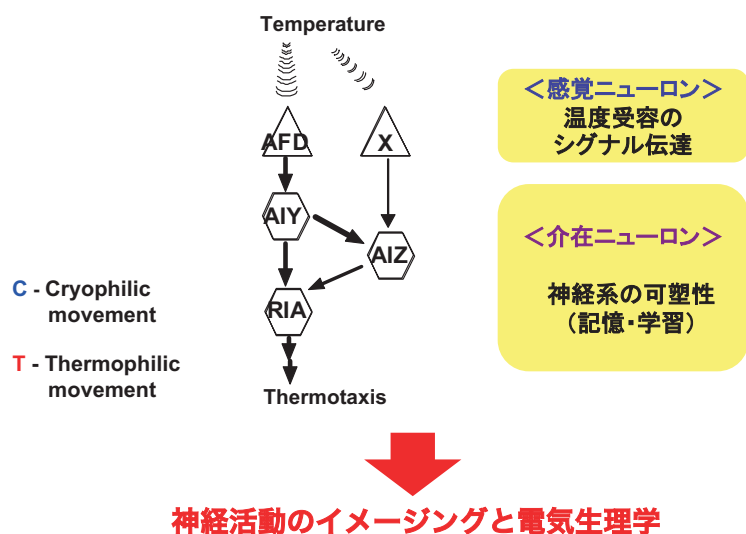
→ 動物のこころをさぐるか？

Cameleon: a genetically encodable Ca^{2+} sensor

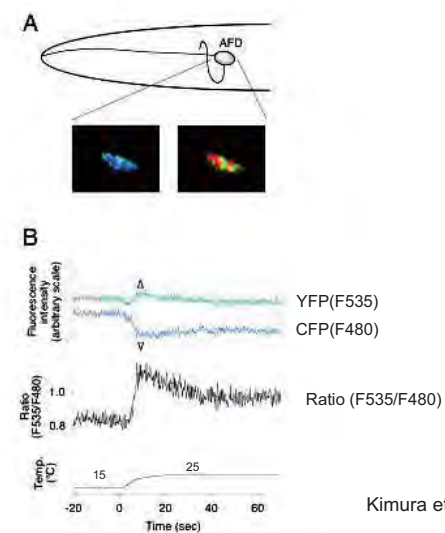


Developed by Atsushi Miyawaki (RIKEN)

現状と展望



AFD thermosensory neuron responds to warming



Kimura et al. (2004)

ゼブラフィッシュを用いた神経初期発生機構の解明

伊藤 素行（理学研究科・生命理学専攻）

我々が研究の材料として用いているゼブラフィッシュには哺乳類にはない、いくつかの利点がある。体外で受精し発生すること、初期胚が透明であること、産卵数が多いこと、などから発生期の成長が顕微鏡下で容易に観察できる。また、脊椎動物であり、ヒトとの遺伝子相同性も有意に認められ、近年では疾患モデルや薬物のスクリーニングにも利用されてきている。我々はこのような利点のあるゼブラフィッシュをモデル動物として用い、神経細胞の発生、特に神経細胞がどうして決まった場所に決まった数だけ出来るのかという問題に取り組んでいる。神経細胞が発生過程でどのようにして生み出されるのかという問いは神経発生研究分野での重要な課題であるとともに再生医療へ向けての基礎的知見になりうるであろう。我々は、場所を決める遺伝子として、ホメオボックス型転写因子である *iroquois* を、数を決める遺伝子として *mind bomb* 遺伝子に注目して研究を進めてきており、その成果を紹介したい。

1) 神経予定領域を決定する転写因子 *iroquois* の機能

Iroquois(*Iro*) 遺伝子は背側外胚葉領域の一部に発現する転写因子である。この領域は将来の中脳・後脳境界領域、神経冠細胞、三叉神経節などを含んでいる。過剰な Wnt シグナル活性化が認められるようなゼブラフィッシュ変異体、*Headless* では *iro1*, *iro7* 遺伝子の発現が前方へ広がっており、呼応して中脳・後脳境界領域、神経冠細胞、三叉神経節の形成が通常では見られない前方でも見られた。*Iro1*, *7* の機能を知るためにアンチセンスオリゴでその機能をノックダウンした結果、これら 3 種類の神経組織の形成に異常が認められた。この結果は *iro* 遺伝子が Wnt シグナルの下流で働き、その発現領域内で将来形成される神経のための場所を提供するのに重要であることを示している。

2) 神経細胞数を制御するユビキチンリガーゼ *mib* 遺伝子の機能

神経前駆細胞群では、発生過程で一部の細胞だけ最終的に神経細胞に分化する。この神経細胞分化選択過程で働くメカニズムは側方抑制といわれ、Notch シグナルがその重要な働きを担っている。我々は、Notch シグナル伝達経路に異常のあるゼブラフィッシュ変異体 *mind bomb* (*mib*) 変異体の原因遺伝子を同定した。同定された *mib* 遺伝子は C 末端に RING finger domain を有するユビキチンライゲースで、Notch のリガンドである膜蛋白 *delta* をユビキチン化することがわかった。*mib* は *delta* をユビキチン化し、膜上の *delta* を細胞内に取り込むのを促進することで、隣接する細胞の notch 細胞外領域を *delta* 発現細胞側へ引き抜き、notch の細胞内領域の核内移動を効率化するという機構を提唱した。

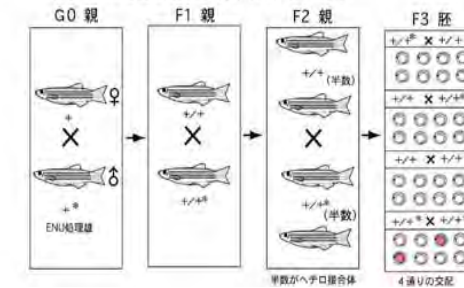
神経細胞の成り立ちをゼブラフィッシュを使って知る

神経細胞はどうして決まった場所に決まった数だけしかできないの
だろうか？

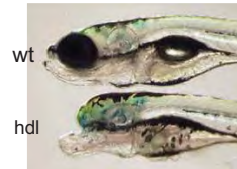
～ 神経発生分野での分子シグナルのシステム学的理解へ ～

COE客員助教授 伊藤素行

(A) ENUを使った突然変異体のスクリーニング



Headless (hdl) 変異体は
野生型 (wt) にくらべて
頭が欠損している



神経細胞ができる場所、数の
問題は個体を用いた解析でないと不可能

なぜゼブラフィッシュなの？

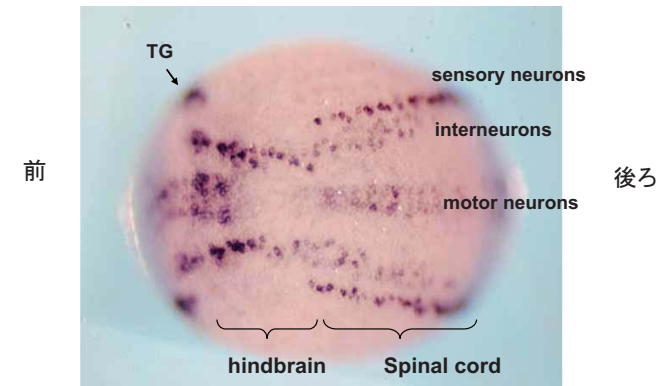
1. 脊椎動物である。ヒトへの応用可能なモデルとして。
2. 発生が体外で進行し、受精後すぐ観察できる。
3. 多産である。
4. 成長が早い：24時間で体のほとんどができる
5. 突然変異体を容易に作り出せる。
(脊椎動物では始めて大規模なスクリーニングがなされた)
6. 遺伝子の強制発現、ノックダウン（アンチセンス）が可能

⇒ 大量解析、システム学的解析に向いている。
つまり、手っ取り早く個体レベルで解析可能！

神経発生分野での分子シグナルのシステム学的理解へ

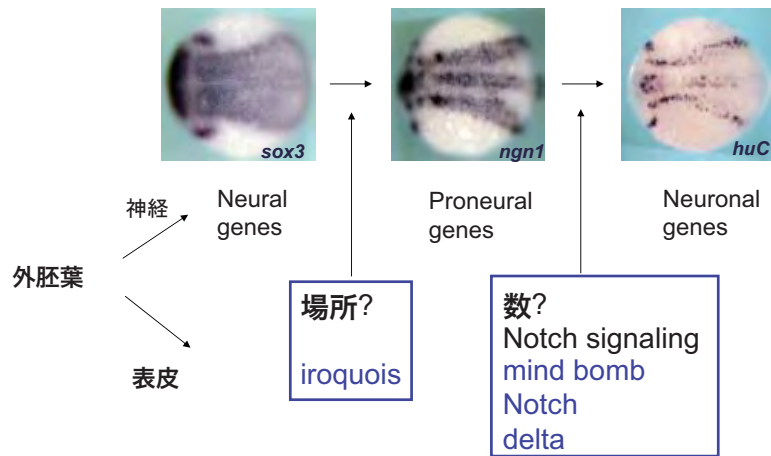
モデル：どのように神経細胞がみえるか？

huC の発現をin situ hybridizationにて可視化

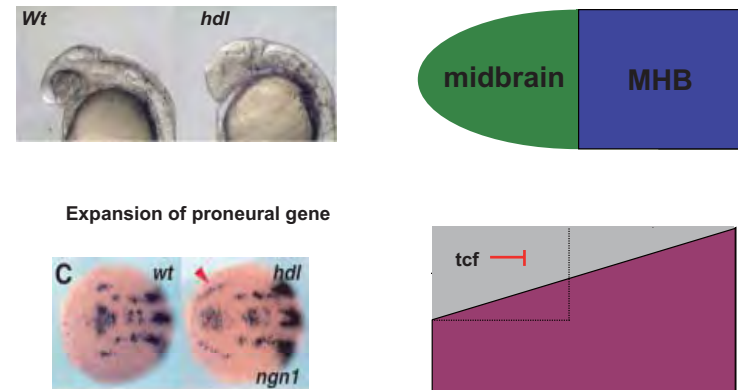


受精後11時間（3体節期）のゼブラフィッシュ胚

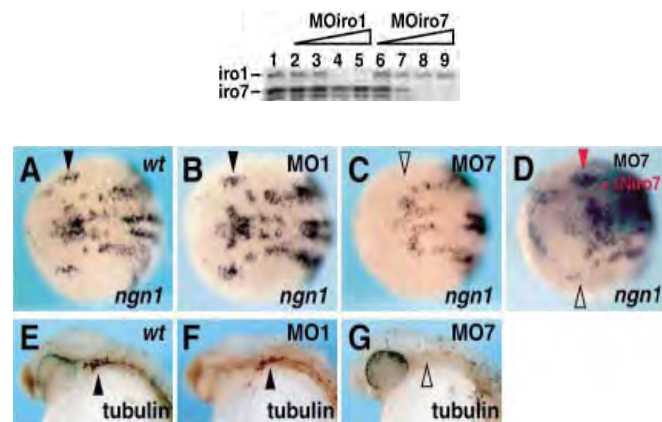
ゼブラフィッシュにおける中枢神経の発生過程



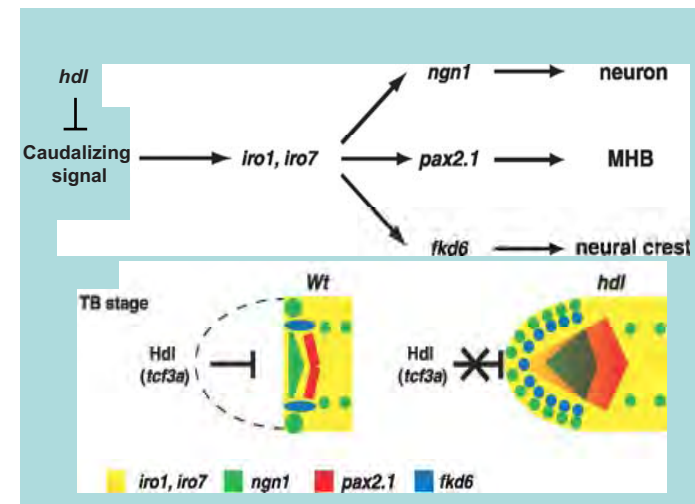
Anterior expansion of proneural domain in *hdl* (*tcf3a*) mutants



Inhibition of Iro7 function leads to a loss specific domains of neurogenin1 expression and to a loss of trigeminal neurons



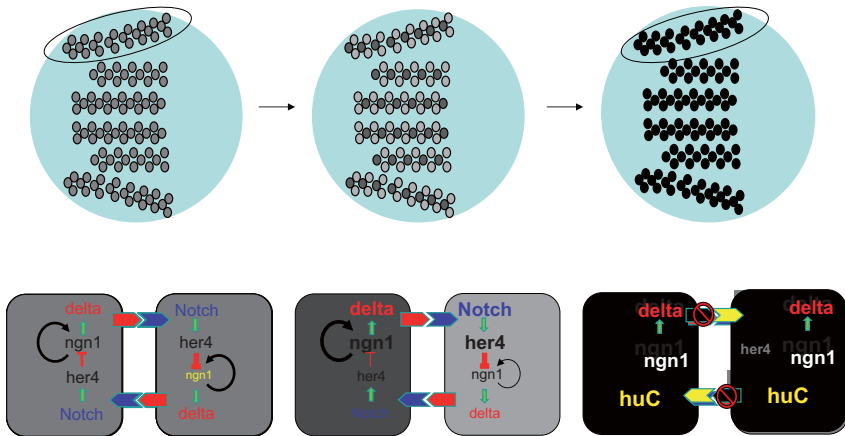
Summary of *iro1* and *iro7* functions



神経細胞は側方抑制というメカニズムによって一部の細胞のみが選ばれる。
Notchシグナルは側方抑制を担うコンポーネントである

神経になりうる細胞集団

一部しか選ばれない → 全部神経になった



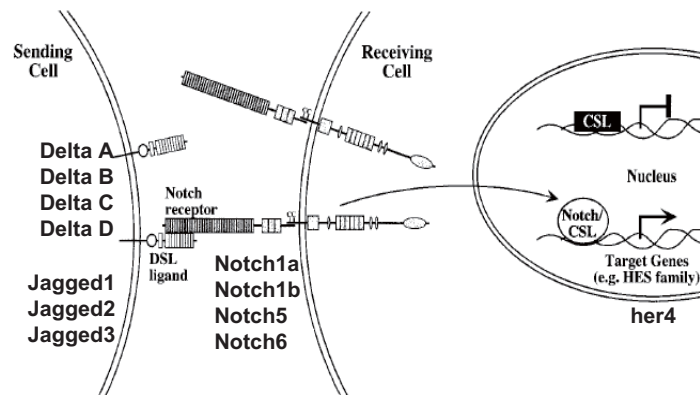
Mind bomb (mib)- ゼブラフィッシュ突然変異体

1. 神経過剰形成
2. 体節形成異常

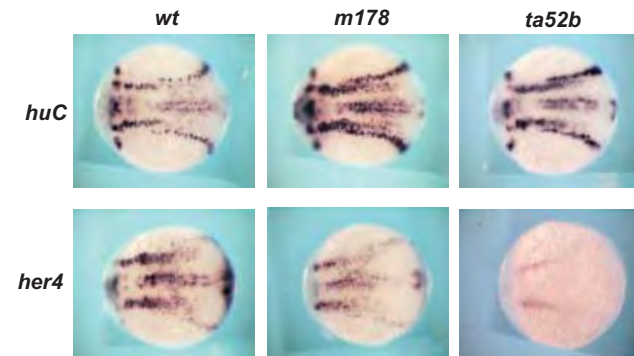
deadly seven (notch1a), *after eight (deltaD)*と類似している

ノッチシグナルにおける正の制御因子

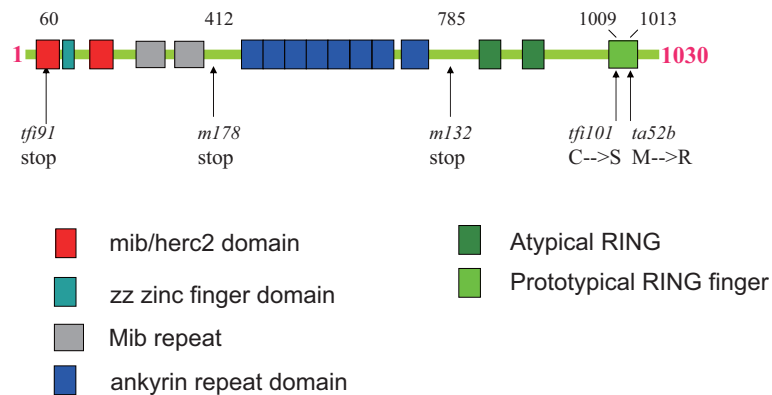
Core Notch Signaling Pathway



Mib変異体の*ta52b* アレルは表現型がもっとも強い

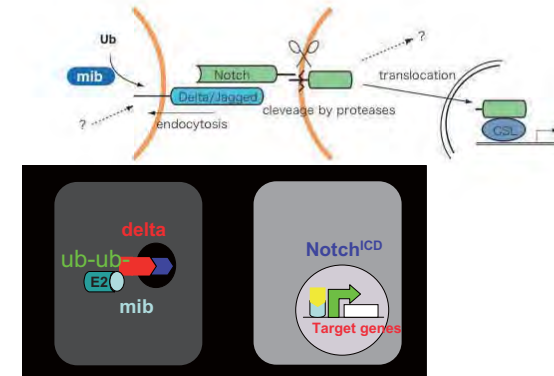


The RING domains suggest Mib might function as an E3 ubiquitin ligase



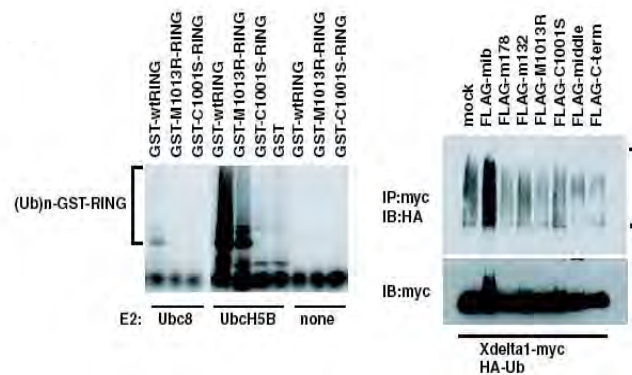
Mind bomb (mib)はNotchシグナルを正に制御する

Mibはユビキチンリガーゼをコードする
リガンドDeltaのエンドサイトーシスを促進する
=> Notchの細胞内ドメインの切り離しを促進

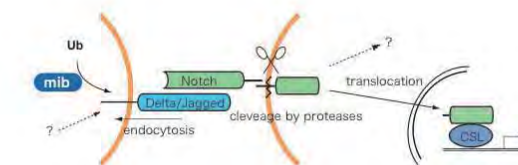


1. ゼブラフィッシュを用いてNotchシグナルの新規コンポーネントが発見された
2. Notchシグナル活性化には、リガンドであるDelta側の調節機構が重要である

mib is an E3 that ubiquitinates Delta



神経発生分野での分子シグナルのシステム学的理解へ
～これからの研究の方向性～



神経細胞選択の過程でNotchシグナルに関与するどんなパラメーターが存在するのか？

現段階：パラメーターを集める

どうやってパラメーターを集める？

1. mRNAレベル：神経細胞選択時のターゲット遺伝子はなにか？ マイクロアレイを用いた網羅的解析
2. 蛋白質レベル：既知のNotchシグナル関連分子に結合するものを探索 two-hybrid法など
Delta細胞内ドメインの結合蛋白質
3. 個体レベル：Notchシグナルに異常のあるゼブラフィッシュ突然変異体の網羅的な探索

将来：パラメータを入力し、神経発生をシミュレーションすることで、システムとして理解する

糖鎖の謎に挑む

北 島 健（生物機能開発利用研究センター）

生物を形づくる細胞は物質でできていて、その主要なものは、脂質、核酸、タンパク質、糖質（糖鎖）である。脂質は、それが集合して細胞を外界と区別する境界（細胞膜）を形成する。他の3つは高分子化合物で、それらは生命情報を担う分子として特に重要である。1つめは、ヌクレオチドという単位が重合する核酸（DNA、RNA）で、生物の設計図である遺伝情報の本体である。2つめは、アミノ酸が重合するタンパク質で、生物を形成し生命活動を実際に駆動させる機能情報分子である。そして3つめは、単糖が重合する糖鎖である。糖鎖は細胞の集合化による組織や臓器の形成、外界から侵入する細胞の認識や排除など、いわば細胞社会のコミュニケーションに関わる重要な生命情報分子である。

核酸とタンパク質は単量体が規則正しく直鎖状に配列する構造をもつが、糖鎖は単量体が多様に連結、枝分かれして配列するなど複雑な構造をもつ。また、核酸やタンパク質が均一で厳格な構造をもつのに対して、糖鎖は不均一で曖昧な構造をもつ。核酸やタンパク質は、その構造の正確さや高い再現性ゆえに、生物が種を保存しながら子孫を残す上で優良な情報分子であるが、糖鎖構造がもつ不均一性は、正確さが問われるような情報としては不良である。しかし、糖鎖が少なくとも細胞同士のコミュニケーションにおける情報提供分子として機能していることは確かであり、その実体を解明することは重要である。糖鎖が関与する生物学的現象は無数にあるが、糖鎖という一見不良な情報分子をもつことが生物にとってどんなメリットがあるのかは謎で、この課題は生物学における根元的問題に触れる思いがある。つまり、核酸やタンパク質の研究と違って、今、糖鎖研究には指導原理がない。道なき道を歩くには、学生を含め研究者ひとりひとりが、こだわりをもって立ち向かうことが大切で、その総力として、謎多き糖鎖という大きな壁を崩すことにつながると信じている。

すべての細胞の表面は例外なく糖鎖で覆われており、その糖鎖の構造は想像を絶するほど複雑で、受精、発生、器官形成（例えば、神経細胞、血球細胞、脂肪細胞、乳腺）、免疫、神経機能などの高次生命現象における様々な過程（細胞間相互作用、情報伝達など）に関与している。現在、我々は2つのことにこだわって研究している。ひとつは、「ユニークな構造をもつ糖鎖を研究する」ことである。ユニークな構造は、そのきわだった特徴ゆえに意味が捕らえやすいものと期待される。中でも、局在部位、性質、多様性においてユニークな特徴をもつシアル酸という糖に着目している。もうひとつは、「糖鎖が密集するような細胞上の領域や分子集合構造を研究する」ことである。糖鎖が別の分子と結合する場合に、糖鎖が密集するとその結合が増強される性質がある。それならば、そのような集合構造を生体内から取り出して、その精密な構造を見て仕組みを知ろうという発想である。この関連で、我々は、細胞表面に存在する生体膜マイクロドメイン（ラフト）に着目し、それが糖鎖を介する細胞接着を媒介する部位として機能することを、受精と初期発生において初めて証明してきた。

糖鎖の謎に挑む

糖鎖の謎 : 構造多様性と不均一性

糖鎖の謎 (本質) を解明する研究

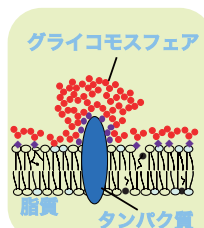
(1) 糖鎖の多様性 : 高度な構造多様性をもつシアル酸に着目

→ シアル酸の構造多様性は重要 !

(2) 糖鎖の不均一性 : 糖鎖が集合する場を探究
～生体膜マイクロドメインに着目

→ 新しい糖鎖を介する相互作用の発見

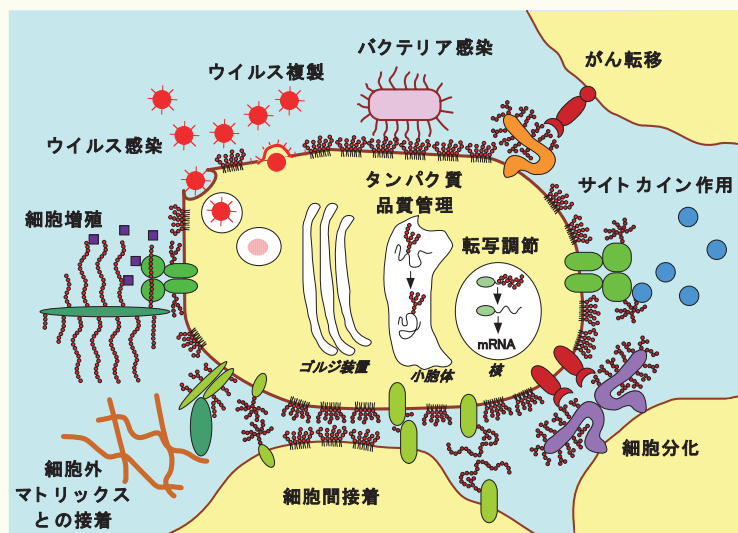
→ 糖鎖を介する相互作用は普遍的に存在
糖鎖が機能的「場・雰囲気」を形成
= グライコスフェア仮説の提唱



糖鎖の特徴

- ◇ 細胞を覆う全生物に共通かつ必須な物質
- ◇ 糖鎖は無視できない実体がある
- ◇ 単糖が重合した鎖
- ◇ 多様性をもつ
 - ・ 単糖の種類(約十数種)
 - ・ 結合位置、立体配置、枝分かれ
- ◇ 不均一性をもつ = 糖鎖構造の「あいまい」性
- ◇ 糖鎖には相互作用する分子が存在する

細胞は糖鎖で覆われている



糖鎖の謎とは

多様性の意味は何か？

- ・ 糖鎖の多様性が、生物においてどのように認識されているかを探る

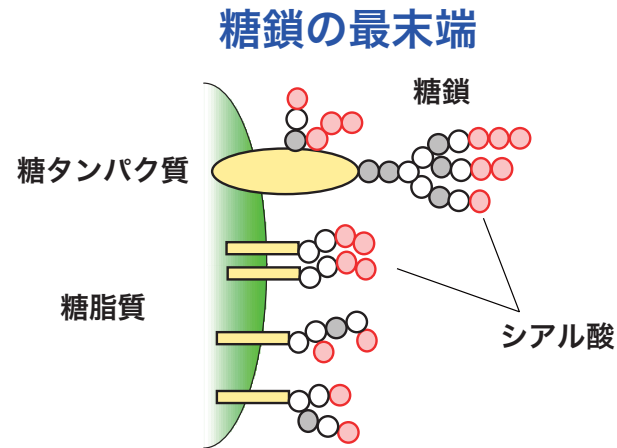
→ シアル酸の構造多様性とその機能解明

不均一性の意味は何か？

- ・ 不均一性は生物の本質
- ・ 「不均一性」を位置づける生物学の指導原理を模索する：糖鎖研究の醍醐味

→ 糖鎖が集合する場所である
生体膜マイクロドメインに着目

(1) 多様性の意味を探る：シアル酸研究の重要性

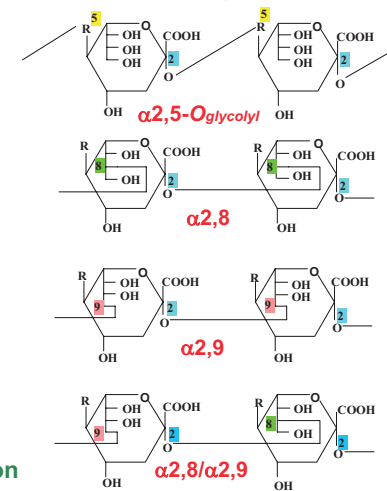


ポリシアル酸構造はさらに多様である

Sia species

Neu5Ac : R = -NHCOCH₃
 Neu5Gc : R = -NHCOCH₂OH
 KDN : R = -OH

Linkage



Modification

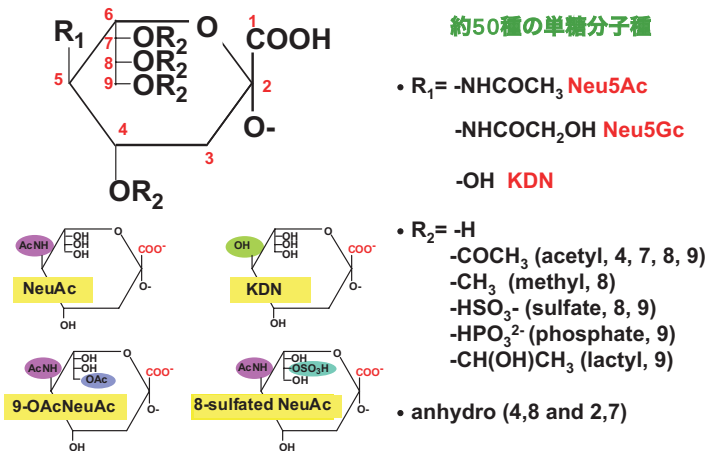
O-acetylation
 O-lactylation
 O-methylation
 O-sulfation
 Lactonization

Chain length

polySia: DP ≥ 8
 oligoSia: DP = 3-7
 diSia: DP = 2

DP: Degree of polymerization

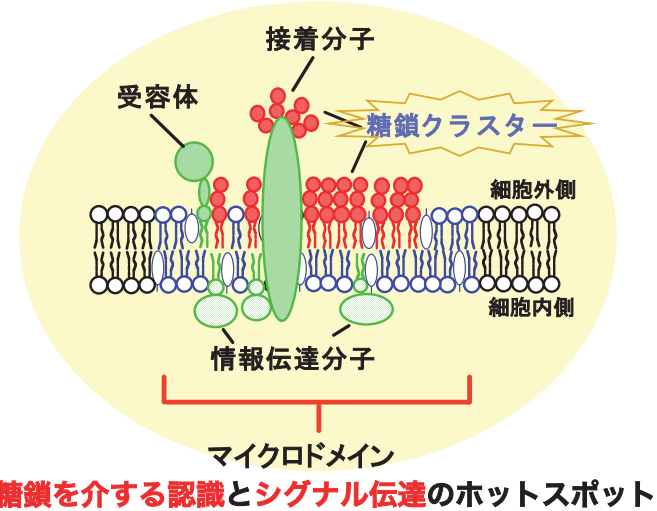
シアル酸は多様な単糖構造をもつ



ポリシアル酸の探索と機能解明

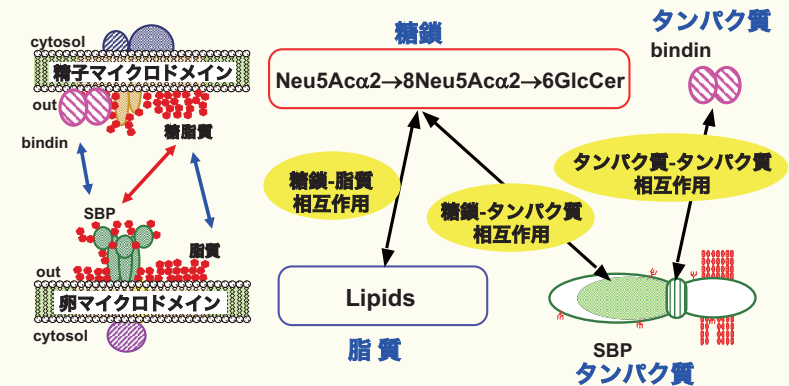
Glycoprotein	Origin	Linkage	References
<PolySia: DP 8 and greater>			
fish egg PSGP	fish egg	O-, 2-8Neu5Gc	Inoue & Iwasaki, 1978
NCAM	brain	N-, 2-8Neu5Ac	Finne, 1982
fish KDN-gp	fish ovarian fluid	O-, 2-8KDN	Kanamori et al., 1989
Na channel α -subunit	brain, eel organ	N-, 2-8Neu5Ac	Zuber et al., 1992
sea urchin PolySia-gp	egg-coats	O-, 2-5Og Neu5Gc	Kitazume et al., 1994
CD36	milk	O-, 2-8Neu5Ac	Yabe et al., 2003
echinoid 40-80kDa-gp	sperm flagellum	O-, 2-9Neu5Ac	Miyata et al., 2004
<di/oligoSia: DP 2-7>			
chromogranin	adrenal medulla	O-, 2-8Neu5Ac	Kiang et al., 1982
Band-3	erythrocytes	O-, 2-8Neu5Ac	Fukuda et al., 1984
glycophorin	erythrocytes	O-, 2-8Neu5Ac	Fukuda et al., 1987
megalyn	kidney	O-, 2-8KDN	Ziak et al., 1999
ceruloplasmin	various organs	O-, 2-8KDN	Ziak et al., 1999
NCAM	brain	N-, 2-8Neu5Ac	Finne, 1982, Sato et al., 2000
CD166	brain, lymphocytes	O-, 2-8Neu5Ac	Sato et al., 2002
integrin $\alpha 5$ subunit	melanoma cell	N-, 2-8Neu5Ac	Nadanaka et al., 2001
fetuin	serum	N-, 2-8Neu5Ac	Kitajima et al., 1999
$\alpha 2$ -macroglobulin	serum	N-, 2-8Sia	Kitajima et al., 1999
adiponectin (adipoQ)	serum	O-, 2-8Neu5Ac	Sato et al., 2001

② 不均一性の意味を探る：細胞膜マイクロドメイン



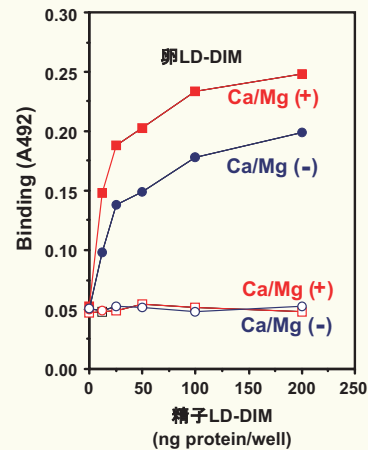
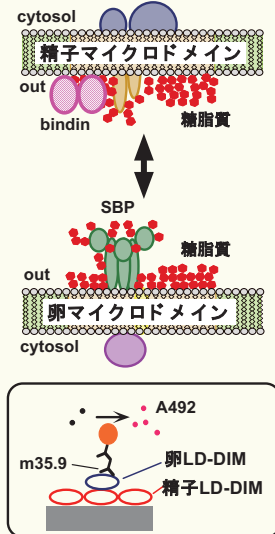
受精とマイクロドメイン2

精子と卵のマイクロドメイン間の結合に関与する相互作用



受精とマイクロドメイン1

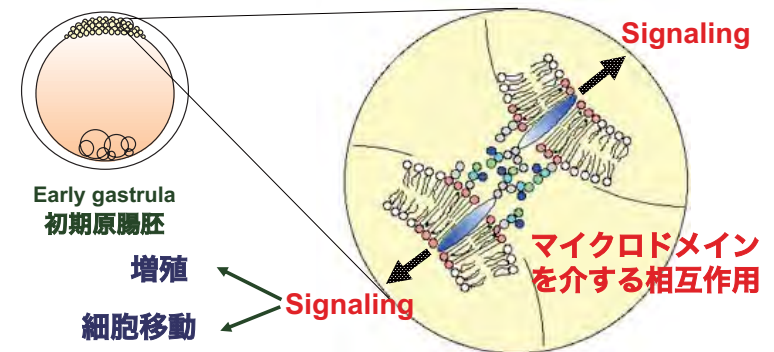
精子と卵のマイクロドメイン (LD-DIM)同士は結合する



初期発生とマイクロドメイン1

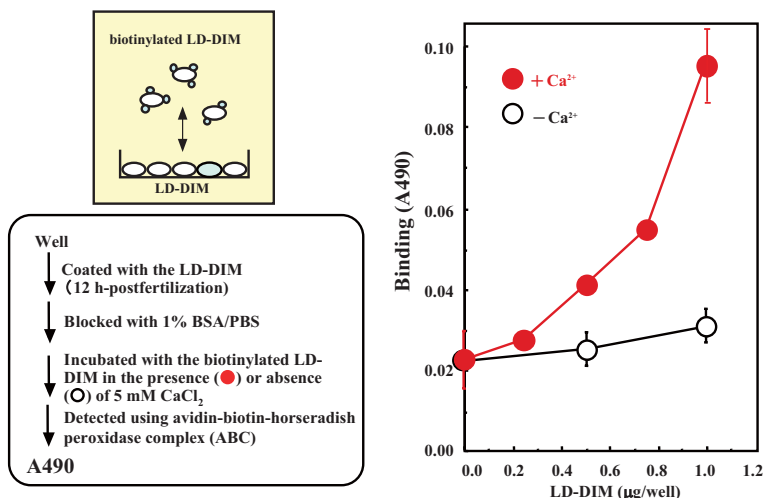
初期発生におけるマイクロドメイン仮説

初期胚における細胞移動と増殖はマイクロドメイン間相互作用およびその後のシグナル伝達によって媒介される



初期発生とマイクロドメイン2

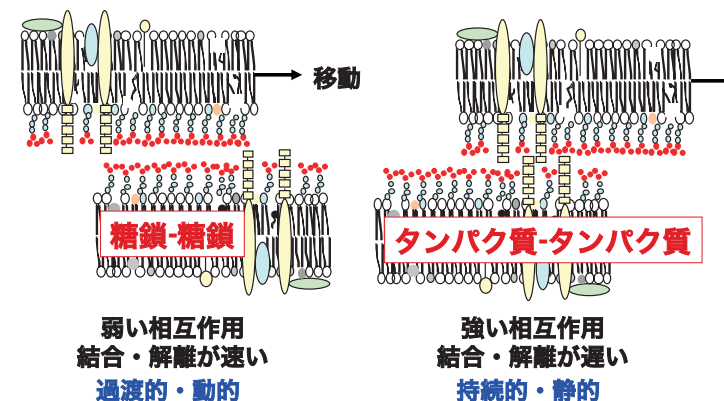
マイクロドメイン同士はCa²⁺依存的に結合する



初期発生とマイクロドメイン4

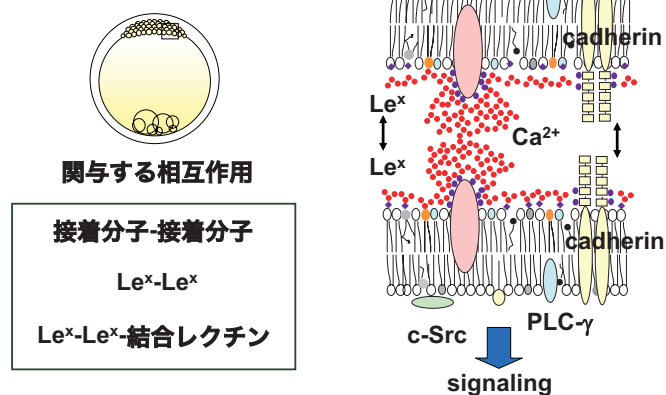
マイクロドメインにおける糖鎖の役割

糖鎖はタンパク質の厳密な認識に可塑性を付与



初期発生とマイクロドメイン3

メダカ初期胚マイクロドメイン間の相互作用



名古屋大学・生物機能開発利用研究センター
及び大学院生命農学研究科及び高等研究院
北島グループ(2004)

高等研究院共同研究者
ヅ/オリゴ(ポリシアル酸)
助手 佐藤 ちひろ

受精とラフトチーム
D2 宮田 真路
D2 原田 陽一郎
D1 山川 奈緒
M1 薛 蓮

発生とラフトチーム
D2 足立 朋子
M2 原 弘明
M2 前田 絵里
B4 萩谷 啓太

新規糖鎖構造探索チーム
(ポリシアル酸・硫酸化糖
・サイクリックシアル酸)

PD 岩田 章子
D3 矢部 宇一郎
D3 安川 然太
D2 遊佐 亜希子
M2 久美田 紘信
M2 松本 しの
M1 山田 治代
B4 藤田 洋
B4 陳 志華

シアル酸生合成チーム

D3 朝比奈 慎二
D2 郷 慎司
D2 殷 軍
D1 藤田 明子

共同研究者

名大院・生命農学

松田 幹

静岡大学農学部

鳥山 優

碓氷 泰市

村田 健臣

戸谷 一英

東京医科歯科大学

秋吉 一成

基礎生物学研究所

柴田 安司

北海道大学理学系研究科

鈴木 範男

SUNY Stony Brook, USA

Noritaka Hirohashi

William J. Lennarz

UCSD, Scripps, USA

Victor D. Vacquier

Ottawa Health Res

Inst, Canada

Nongnuij Tanphaichitr

Program 2 生命科学の次なる扉を拓く

動的で複雑な生命現象のシステム生物学

上田泰己* (理化学研究所・発生再生科学総合研究センター)

2003年のヒトゲノム配列の完全解読をはじめとして数多くの生物のゲノム配列が次々と解読され、DNAチップをはじめとしてゲノム規模の情報・マテリアルを活用した実験技術の開発が進んでいます。このようなゲノムプロジェクトに基づくゲノム規模の研究資源（情報・マテリアル・技術）を背景として、生命を理解する枠組み（パラダイム）が大きく変わろうとしています。システム生物学という新分野は、ダイナミックで複雑な生命現象を「システム」として理解することを目的として形成されつつある生命科学分野で、生命現象を「分子」の言葉で理解しようとする分子生物学の次を担う生命科学として期待されている分野です。特にゲノム規模の研究資源（情報・マテリアル・技術）を、どのように動的で複雑な生命現象のシステムの理解に役立てていくのか、さらには医学・創薬といった応用へと高めていくのか、いま問われています。講演では、システム生物学の現在について哺乳類の体内時計をモデル系とした試みについてお話させていただきます。

私達が体内時計をモデル系として選んだのは、①フィードバックやタイミングが重要な直感的理解が困難な動的で複雑な生命現象であること、②一周期が24時間とタイムスケールが長く転写・翻訳が重要な働きを担っているためゲノム配列情報・ゲノムワイドな転写発現情報を生かすことが可能であること、③時間的には複雑だが空間的には均一な系であるため現在の技術レベルで包括的なシステムダイナミクスの取得が可能であること、といった三つの理由があります。

私達は①経時的且つ包括的な遺伝子発現解析による概日振動遺伝子の抽出、②これら概日振動遺伝子のヒト相同遺伝子を対象とする包括的な転写開始点決定、③バイオインフォマティクスによる転写開始点近傍の推定プロモーター上の転写因子応答配列と概日発現振動との相関関係の探索、④*in vitro*実験系による時計制御因子応答配列の決定、の4つの技術を用いて哺乳類体内時計のシステム同定に取り組んでおり、これまでに体内時計を構成する転写ネットワークを明らかにしてきました。講演では現在までの成果を紹介すると共に、以上のようなシステム同定の手法を体内時計とは異なった生命現象にどのようにして応用していくのかについても議論したいと考えています。また時間が許せば、ヒト体内時計研究の基礎となるDNAチップを用いた体内時刻・リズム障害診断法についてもお話ししたいと考えています。

参考文献：

Hiroki R. Ueda et al. "A transcription factor response element for gene expression during circadian night" *Nature*, 418, 534-539, 2002.

Hiroki R. Ueda et al. "Molecular-Timetable Methods for Detection of Body Time and Rhythm Disorders from Single-time-point Genome-wide Expression Profiles" *PNAS*, 101, 11227-11232, 2004.

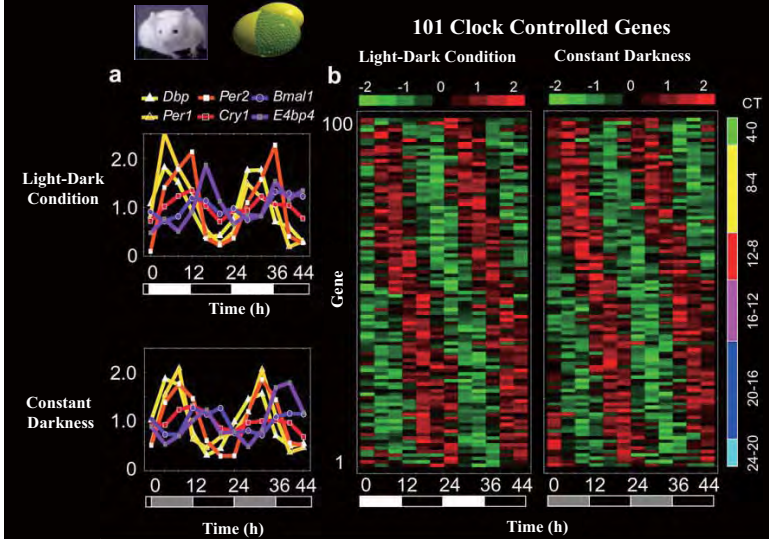
* (Hiroki R. Ueda uedah-tky@umin.ac.jp)

動的で複雑な生命現象の システム生物学

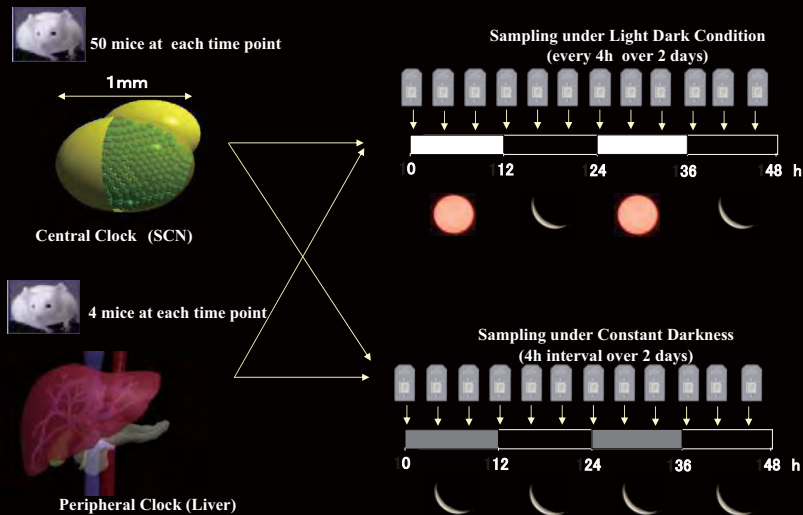
 上田泰己 (Hiroki R. Ueda)
uedah-tky@umin.ac.jp

Laboratory for Systems Biology, RIKEN CDB

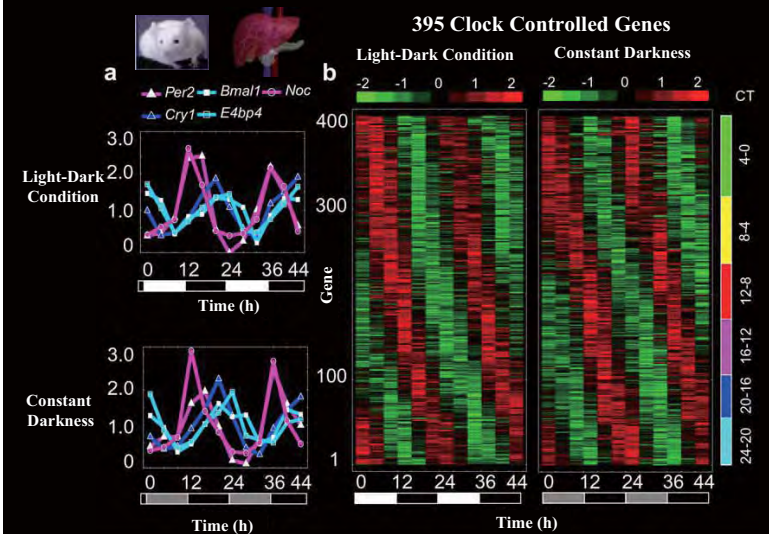
ゲノムスケールの発現データ

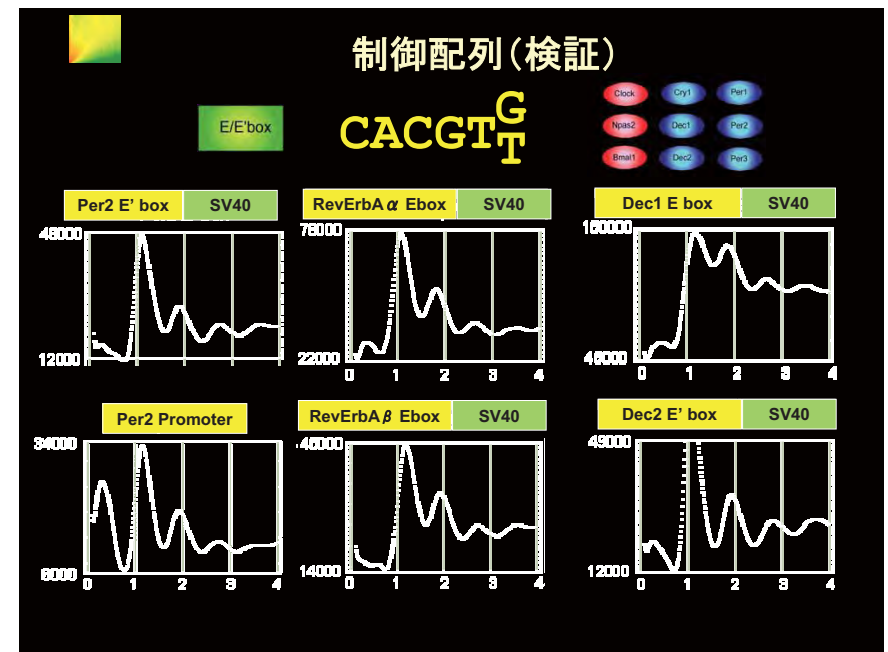
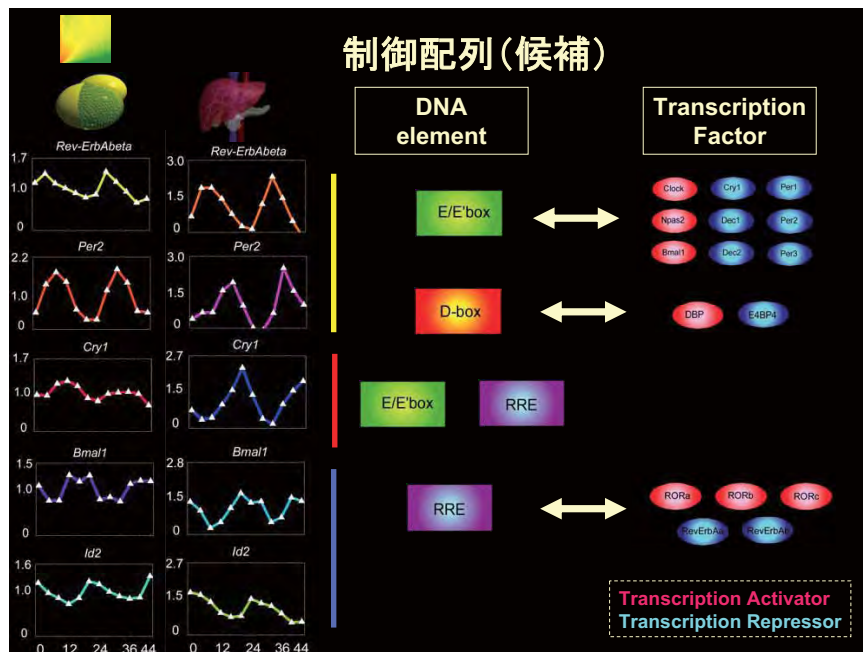
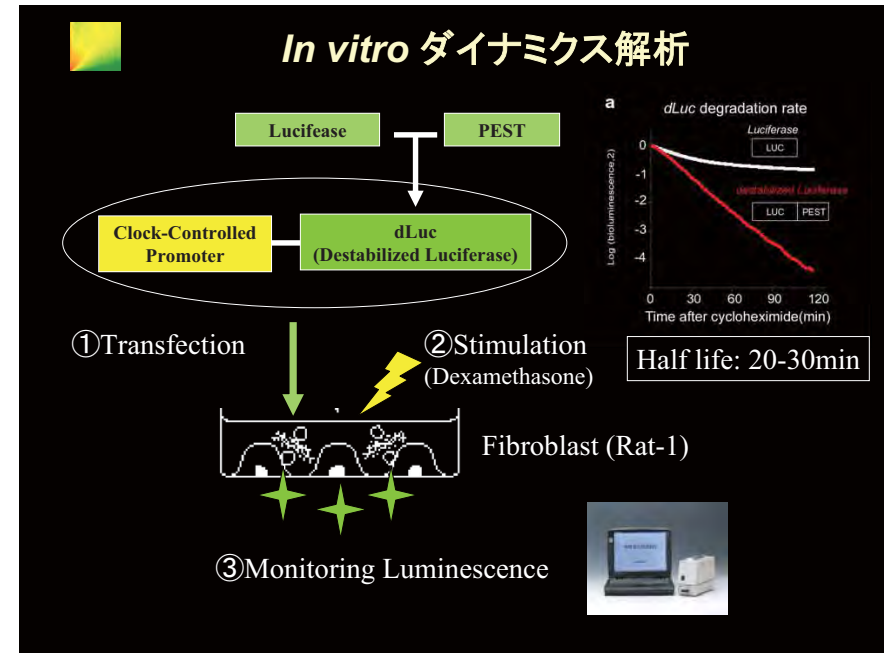
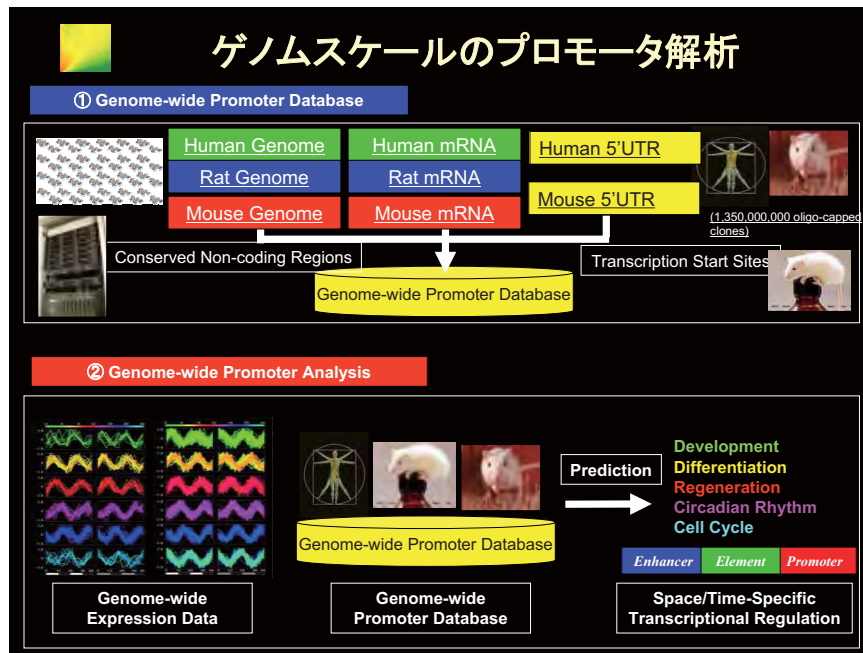


ゲノムスケールの発現解析



ゲノムスケールの発現データ





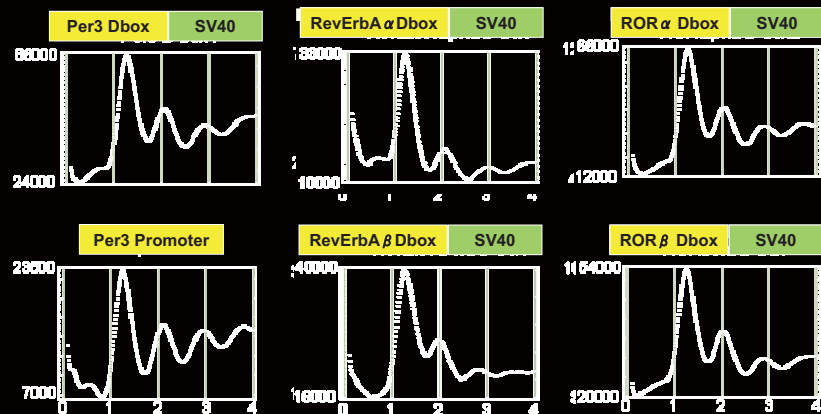
制御配列 (検証)

D-box

TTATGTAA

DBP

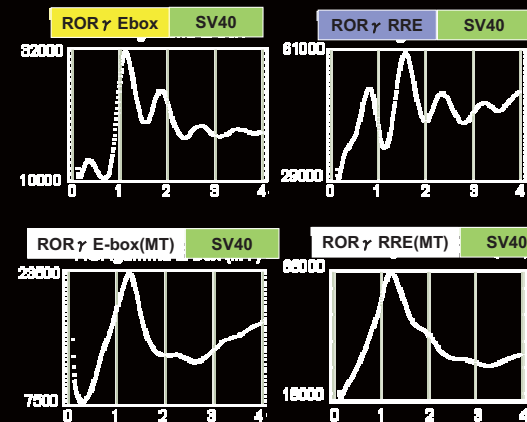
E4BP4



制御配列 (検証)

E/E'box

RRE



制御配列 (検証)

RRE

TAATNTAGGTCA

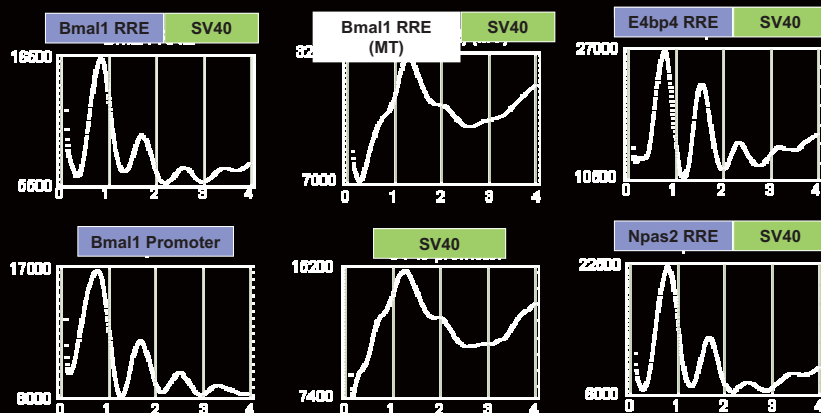
RORα

RORβ

RORγ

RevErbAα

RevErbAβ



体内時計システムの転写制御機構

RRE

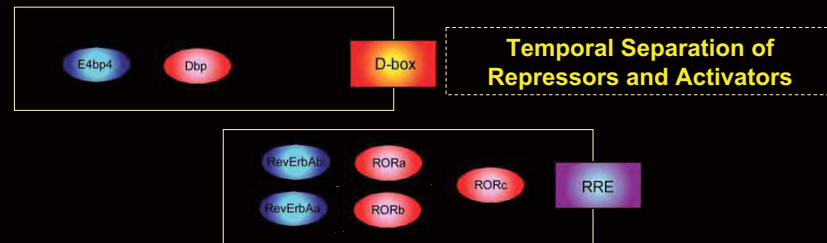
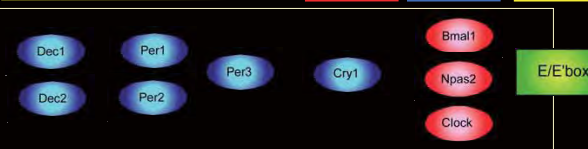
E/E'box

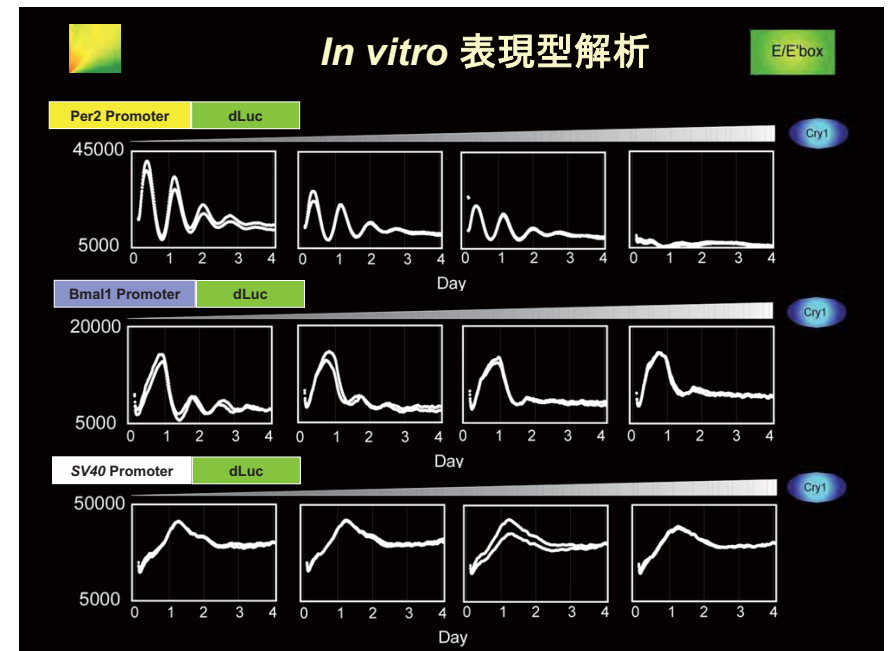
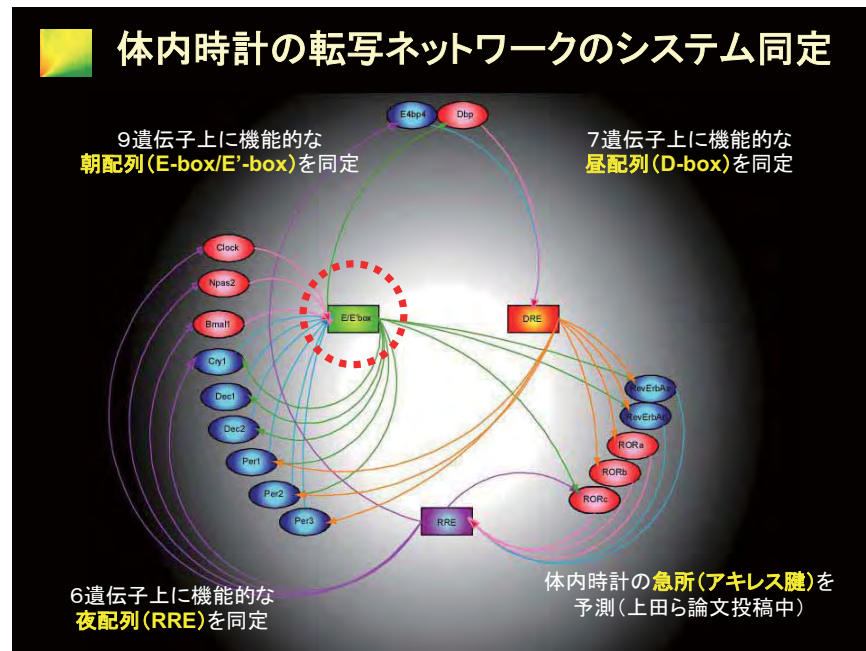
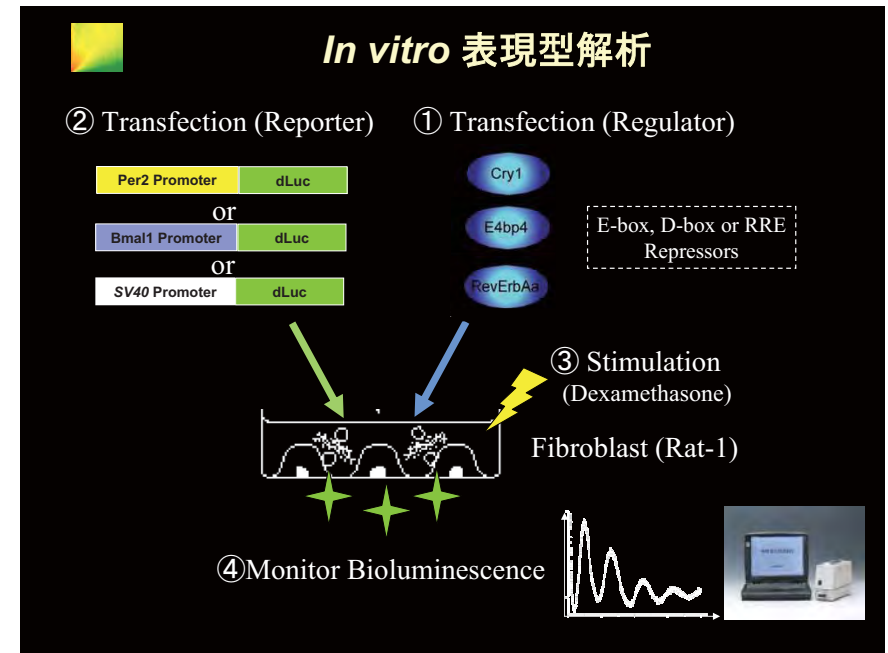
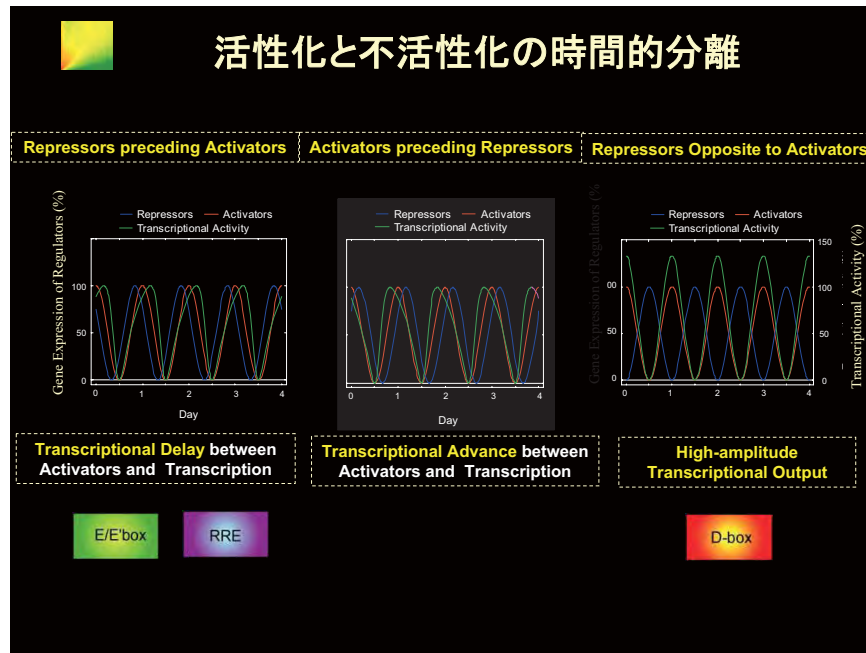
E/E'box

E/E'box

RRE

E/E'box





ソフトマシンとしての蛋白質

笹井理生（情報科学研究科）

蛋白質は人間の作る機械のように間違いなく動く固い装置ではなく、水や膜の中で強い熱揺らぎにさらされて揺らぐナノメートルサイズの分子である。蛋白質の機能が熱揺らぎによってどのような影響を受けるか？という問題については、すでに多くの研究が重ねられ、とりわけ分子動力学計算を用いるノーマルモード解析は大きな成果を挙げた。この方法は蛋白質の最安定構造のまわりのバネ振動のようなゆらぎを「モード」という言葉で記述する方法である。しかしながら、以下のような事情を考えると、モードの概念を超えて、さらに大振幅の揺らぎを扱う必要があるかもしれない。

モードという概念がふさわしい分子振動は 10^{-10} 秒程度の時間間隔の現象であるが、多くの生理的機能はそれよりずっと遅い過程として現れる。例えば、分子モーターによるエネルギー変換、蛋白質どうしが複合体を作ることによるシグナル伝達、遺伝子発現の制御などは、しばしば 10^{-3} 秒、あるいはそれ以上の時間のかかる過程である。さらに、ATP加水分解、リガンドの結合・解離などに際しての自由エネルギー変化は温度エネルギーの10~20倍の程度であることが多い。こうした時間・エネルギースケールは蛋白質が折れたたんだり、ばらばらにほどけたりする現象におけるスケールと同程度であることを考えると、局所的にほどけたり、まき戻ったりするような大規模な構造変化が機能発現と同時に起きていても不思議ではない。例えば、光シグナル伝達を行う Photoactive Yellow Protein(PYP)では、蛋白質に付随した色素が光を吸収することにより、蛋白質全体の構造に乱れが生じることが知られている。また、最近急速に進歩した1分子計測は、アクトミオシンなどの分子モーターが柔軟で確率的な動作を示している。「蛋白震(proteinquake)」、「機能ファネル(functional funnel)」などの新しい概念を導入して、柔軟かく変形しながら特異的な機能を発揮するソフトマシンとしての蛋白質の描像について議論したい。

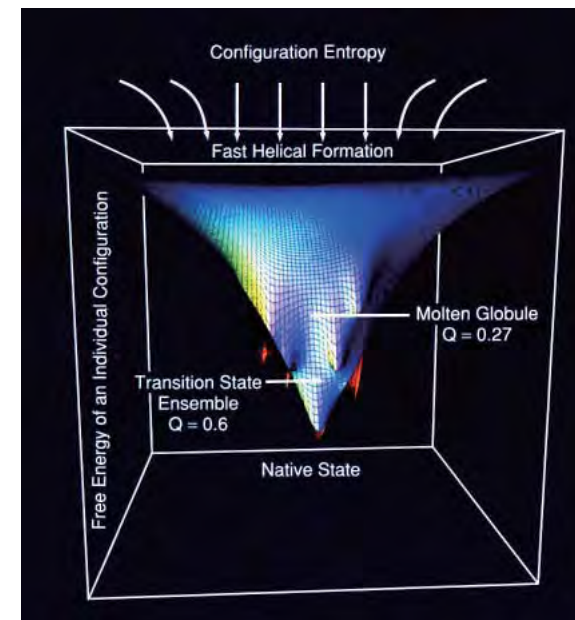
文献：

Dynamical Transition and Proteinquake in Photoactive Yellow Protein,
K. Itoh and M. Sasai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14736-14741 (2004).

Conformational Change of Actomyosin Complex Drives the Multiple Stepping Movement,
T.P. Terada, M. Sasai, and T. Yomo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9202-9206 (2002).

ソフトマシンとしての蛋白質

高等研究院フォーラム, Nov. 2004
笹井理生 (名大 情報科学)

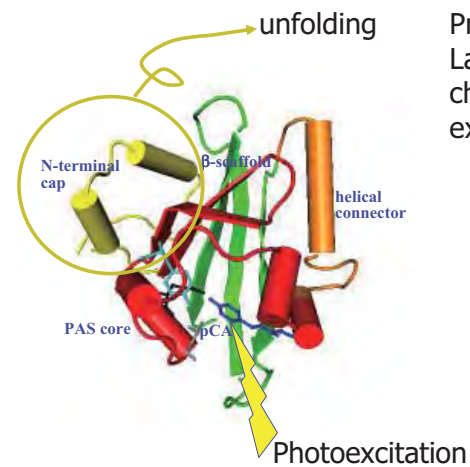


(1) Fluctuations around a structure;
normal modes, or principal components

10^{-10} sec の世界ではこれでOK !

しかし、多くの生理的機能が発現するスケールは

Time scale: 10^{-3} s – s
Energy scale 10 – 20kT
Length scale nm – 100nm



Proteinquake:
Large scale structural
change caused by a local
excitation

Photoactive Yellow Protein (PYP)

Model

•Wako-Saito-Muñoz -Eaton model

$m_i = 1$ when the i th residue takes the native-like configuration
 $m_i = 0$ otherwise

$$H_{WSME}(\{m_{ij}\}) = \sum_{i,j} \varepsilon_{ij} \Delta_{ij} m_{ij} + \sum_i f_i(T)(1 - m_i) \quad m_{ij} = \prod_{k=i}^j m_k$$

$$V = \sum_{i,j} K_{ij} (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^0) \cdot (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_j^0) + \frac{\gamma}{2} \Delta_{ij} \langle m_{ij} \rangle_{ME} (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_i^0)^2$$

K_{ij} : spring constant along the chain backbone

$f_i(T)$: entropic contribution

$\varepsilon_{ij} < 0$: interactions for the native contact

$\Delta_{ij} = 1$, when $|\mathbf{r}_i^0 - \mathbf{r}_j^0| \leq 6.5 \text{ \AA}$

$\Delta_{ij} = 0$, otherwise $\mathbf{r}_i^0$: native structure

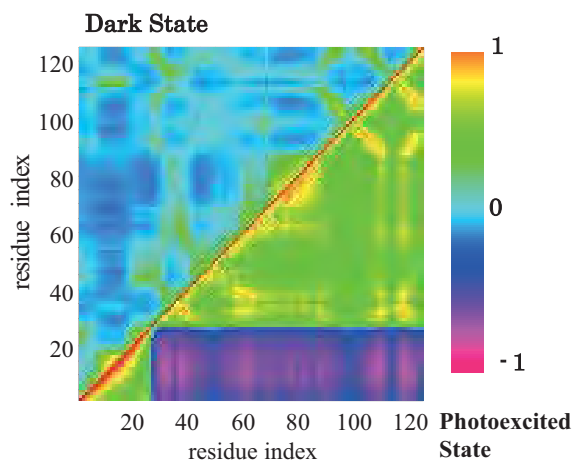
Unfolding of the N-terminal domain

Invoking the collective motion, in which the N-terminal domain and the core part of the protein move in the opposite direction

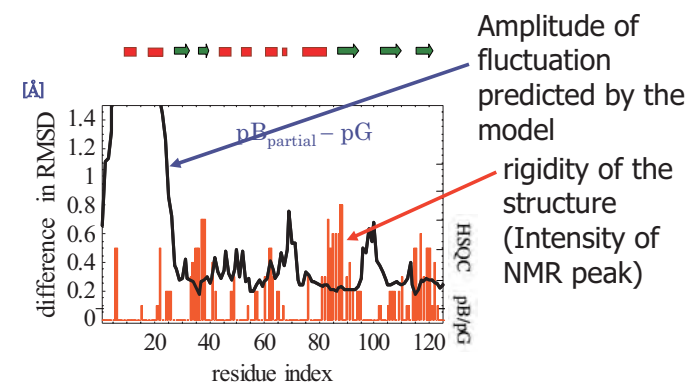
Induced large wavelength motion in the core part accommodates the loosened structure around the photoexcited chromophore

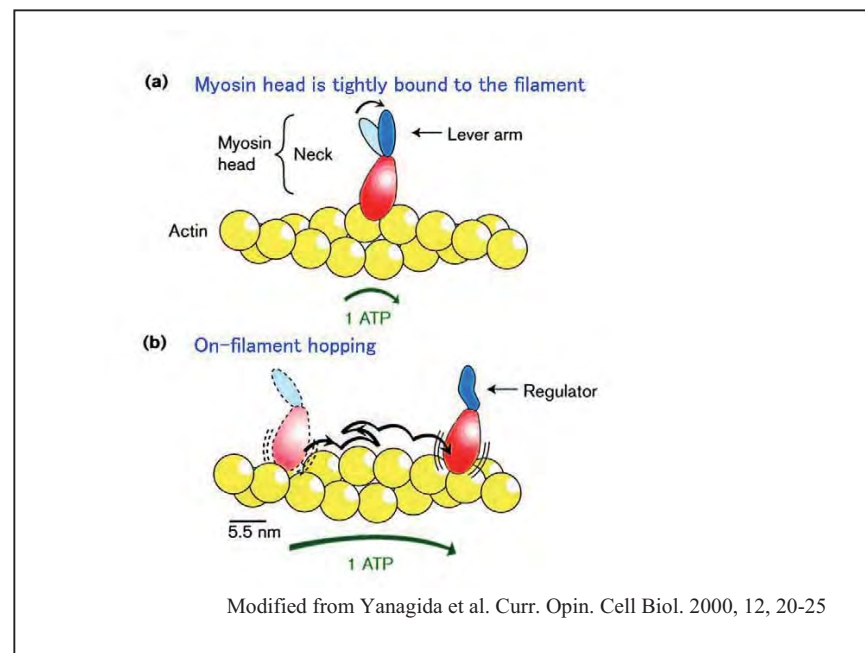
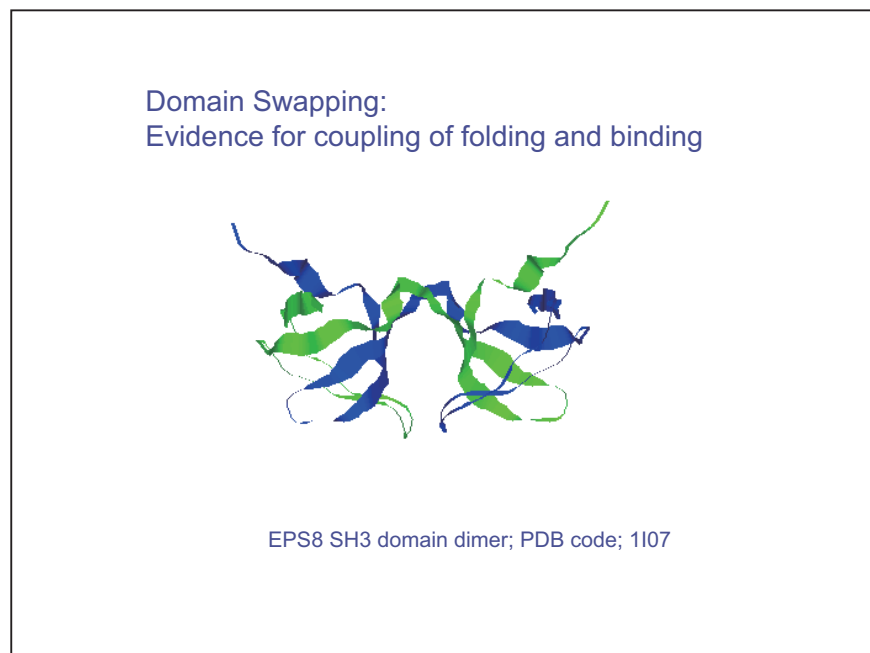
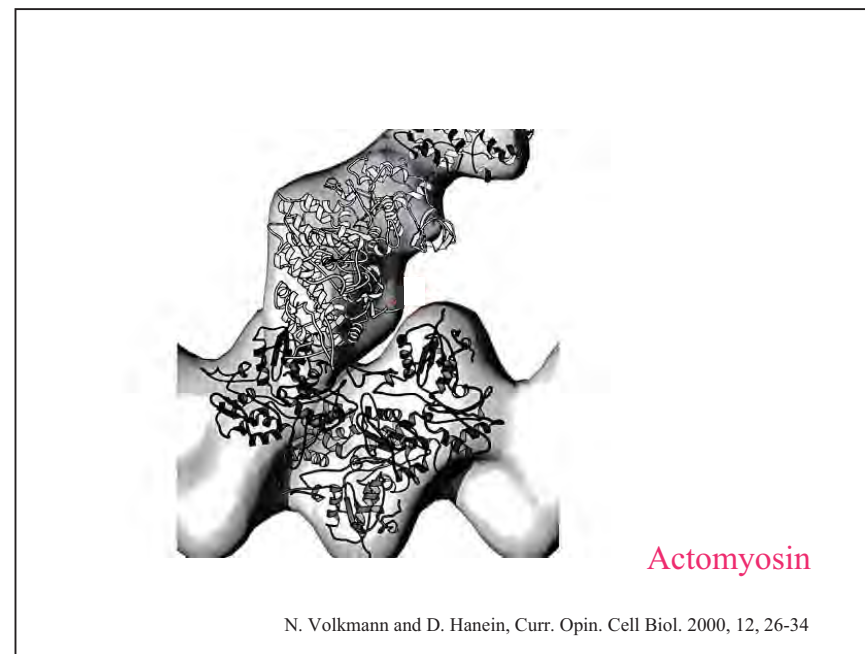
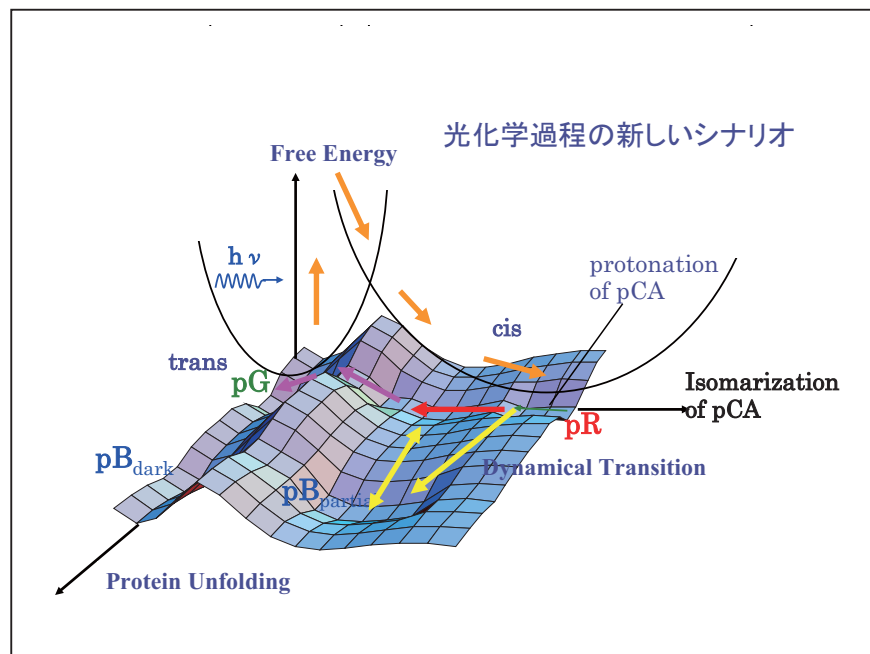
Self-consistent stabilization of the partially unfolded structure in the photoexcited state

$$C_{ij} = \langle \Delta \mathbf{r}_i \cdot \Delta \mathbf{r}_j \rangle_M / \left[\langle \Delta \mathbf{r}_i \cdot \Delta \mathbf{r}_i \rangle_M \langle \Delta \mathbf{r}_j \cdot \Delta \mathbf{r}_j \rangle_M \right]^{1/2}$$



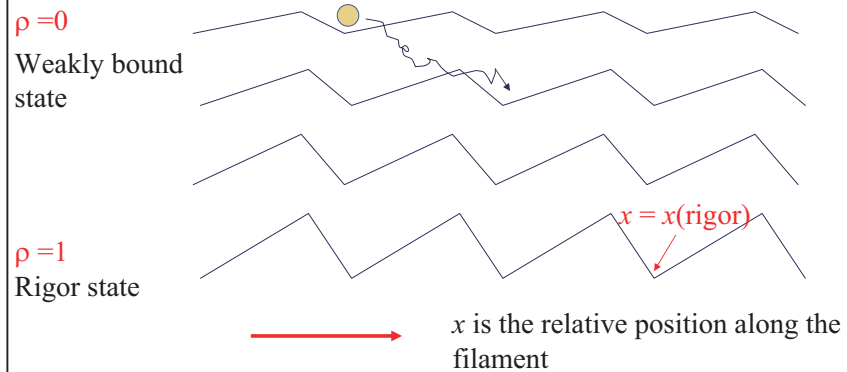
collective motion across the N-terminal domain and the rest part in the photoexcited state: Dynamics mediated transition to the partially unfolded state (Dynamical transition)





Coupling of folding, binding and sliding: two order parameters; ρ and x

Terada et al., PNAS 99, 9202–9206 (2002)

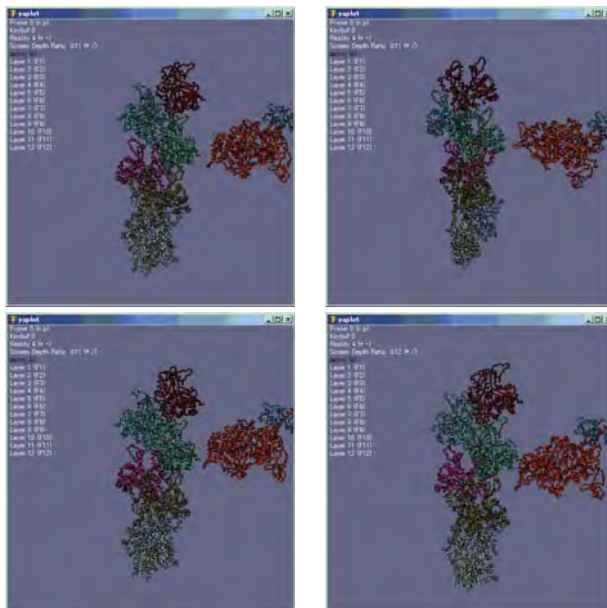


機能ファネル Functional Funnel

標的構造に近づくほどエネルギーが下がる大域的
バイアスを持ったエネルギー面

機能ファネル上のトラジェクトリの統計性が
機能発現の精妙な動作を特徴付ける。

シグナル伝達過程における重要な中間体の形成(PYP)
分子モーターの動作 (actomyosin)
スイッチ、アロステリー、複合体形成



ファネル的エネルギー面

佐々木 尚(名大 院生)
長尾 知生子(名大 研究生)

PYP

伊藤 一仁 (名大 PD)

Actomyosin

寺田 智樹(名大 PD)
四方 哲也(阪大)
高野 光則(早稲田大)

ソフトリソグラフィーを駆使したメカノバイオロジーの研究

成瀬恵治（医学系研究科細胞情報医学・細胞生物物理学）

1.はじめに

細胞は外部環境から様々なインプットを適切に受容-応答し、ホメオスタシスを維持している。しかし、伸展刺激などの物理的刺激に対する受容-応答機構の詳細については不明な点が多い。そこでシリコンエラストマー

(polydimethylsiloxane, PDMS) を素材としたソフトリソグラフィーを駆使し機械受容依存細胞内情報伝達機構に関する研究をおこなってきた。このソフトリソグラフィーを用いるとミリメートルオーダーから、ナノメートルオーダーまでの造形物を作ることが可能である。本講演ではこのソフトリソグラフィーを用いて①細胞伸展刺激チャンバーを用いた機械受容チャンネルの分子生理学的研究、②マイクロ・コンタクトプリンティング法を用いた細胞形態制御、③マイクロチャンネルを用いた流体力学的研究について講演する。

2. 伸展刺激と機械受容チャンネル

血管内皮細胞は血管内で常に血流による機械刺激を受けており、その機械抵抗を減少させるために紡錘形をとり、長軸を血管走行方向に向けて配列している。血管内皮細胞をシャーレ上で培養すると細胞は不定形でいわゆる“敷石状構造”を示すが、PDMS製伸展チャンバー上に培養された細胞に周期的一軸伸展刺激負荷装置にて周期的伸展刺激を加えると伸展方向に対して垂直方向に細胞が配列する現象が観察された。また伸展刺激に応じて細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が観測されたことから細胞膜上にあるSA（機械受容チャンネル、Stretch-activated）チャンネルが活性化され細胞内に Ca^{2+} が流入するために起こることが判明した。この細胞内Ca上昇がトリガーとなり蛋白チロシンリン酸化酵素の活性化、転写因子の活性化およびそれに引き続く遺伝子発現・タンパク質合成・細胞増殖などが起こることを解明した。またSAチャンネルの分子実体の解明にも用いることが出来た[1]。

3. マイクロコンタクトプリンティング

シリコンプロセスにて作成した鋳型にPDMSを注入・硬化させることによりマイクロスタンプ作製した。蛍光標識フィブロネクチンをスタンプしたところ、鋳型と同じパターンを培養基質上にプリントすることができた。この上に細胞を培養するとパターン上に細胞接着班を形成した細胞を観察することが出来た。この方法により細胞内の細胞接着班・細胞骨

格などの構造を人為的にコントロール出来ることが確認された。

用いた流体力学的研究

した立体的構造物を鋳型とし

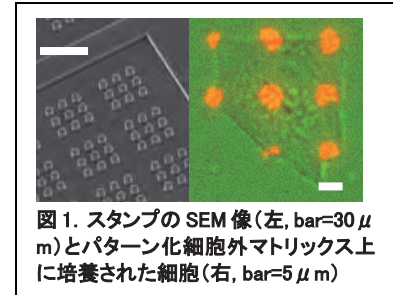
PDMSにて高さ $50\mu\text{m}$ ×幅 $300\mu\text{m}$ のマイクロチャンネルを作成した。このマイクロチャンネルの中では層流が観察されるほか、高ズリ応力を与えることが出来る。マイクロチャンネル中に細胞を培養しPARTCELL法[2]により細胞局所に薬物を投与したり、ズリ応力に対する細胞応答を観察することができる。更に臨床的应用として男性不妊症患者の精液より活動性の高い精子を分離することも可能であり男性不妊症の診断及び人工授精への適用が可能である。

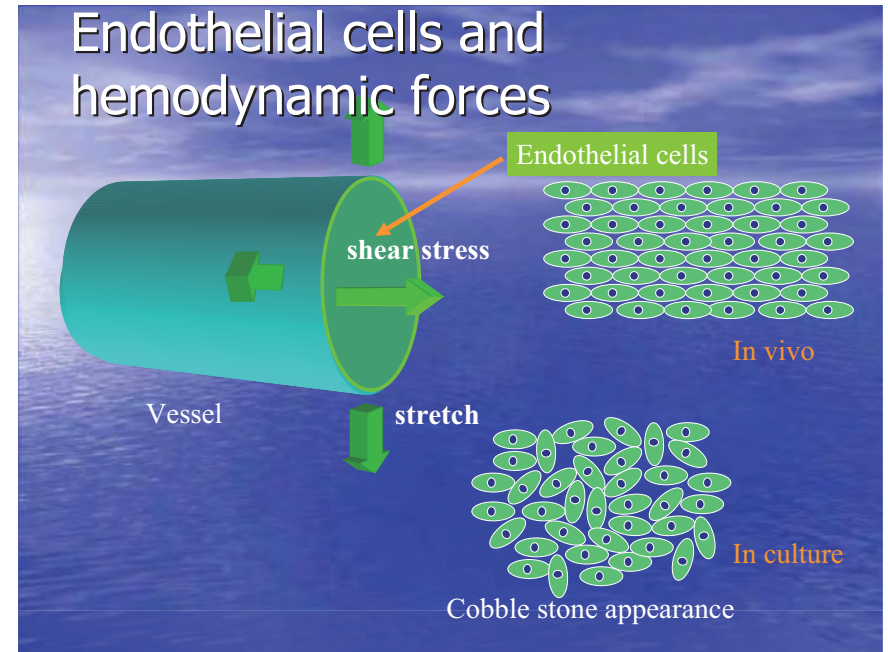
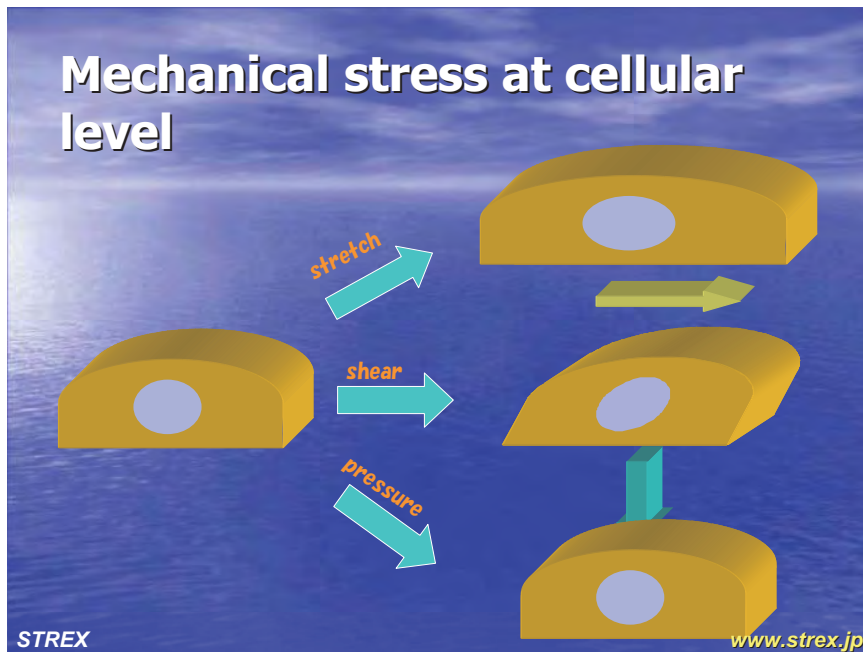
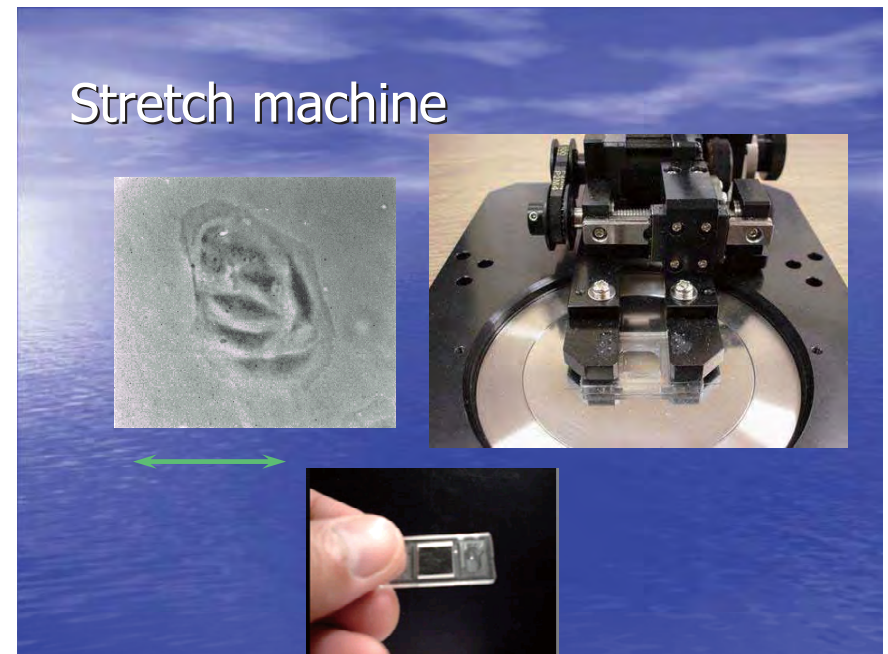
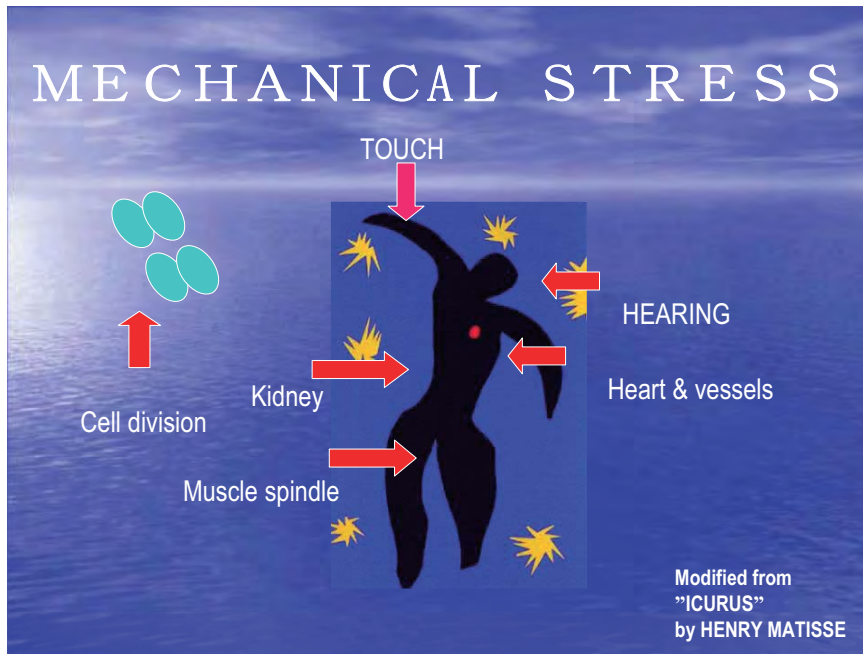
5 まとめ

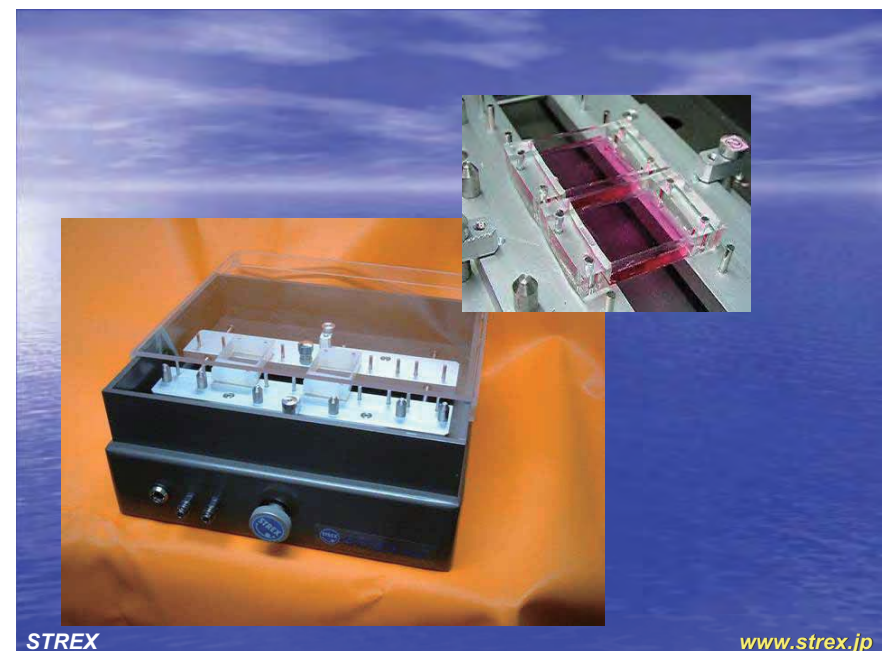
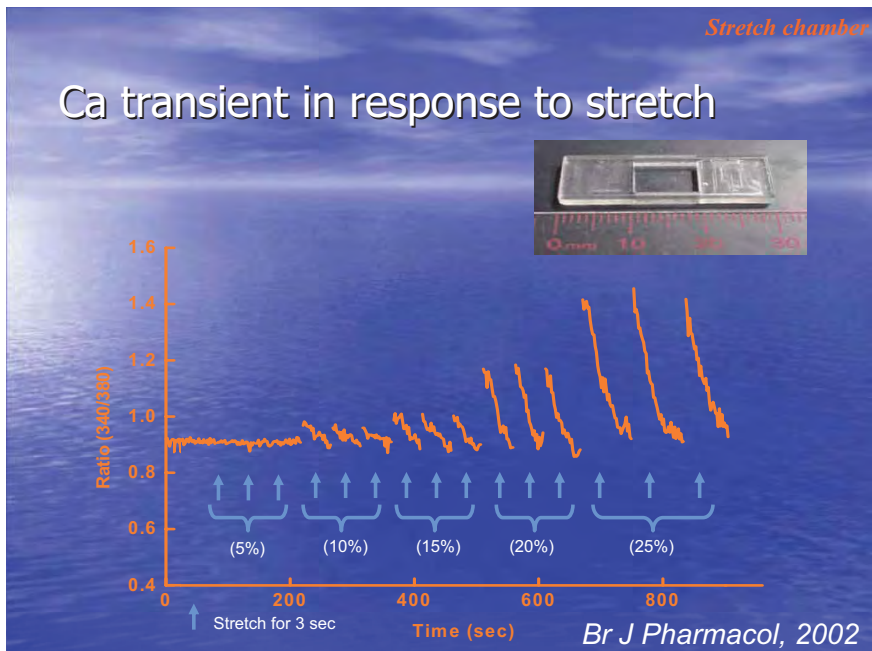
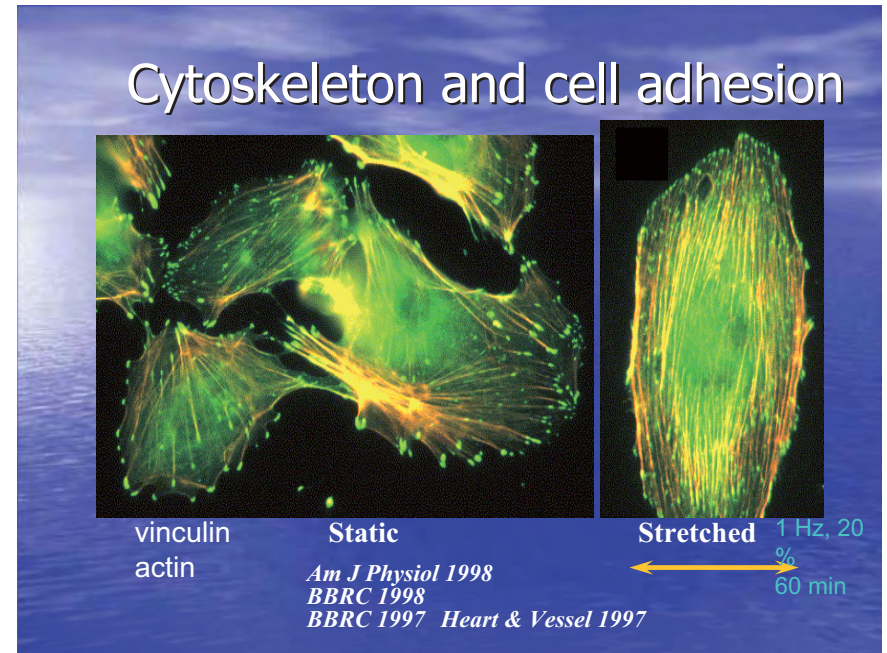
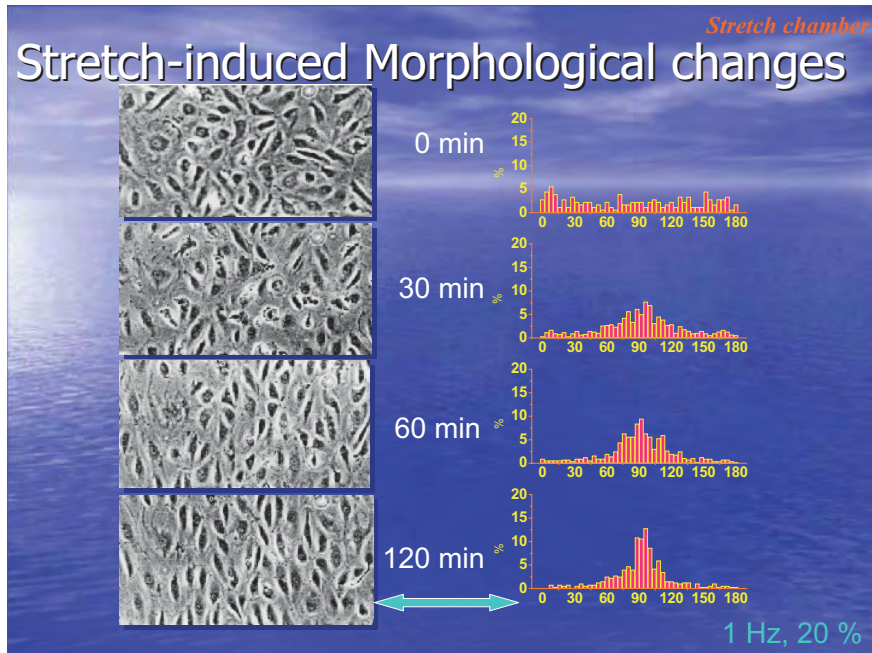
ソフトリソグラフィー法を用いることにより通常の培養法では得ることが出来ない細胞形態制御および環境の制御ができ、細胞生物学的研究、特にメカノバイオロジー解明のための強力なツールとなるだけでなく、医療にも応用することもできるであろう。

6. 参考文献

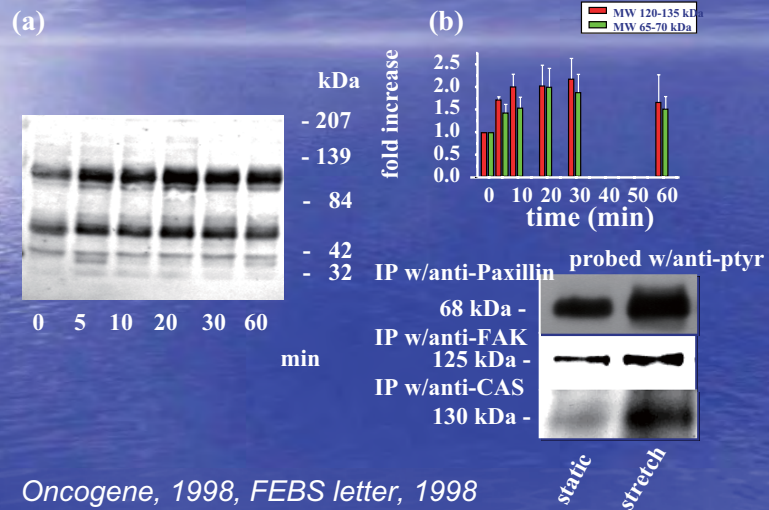
- [1] Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated nonselective cation channel. *Science*, 285, 882-886, 1999
- [2] Subcellular positioning of small molecules. *Nature*, 411, 1016, 2001





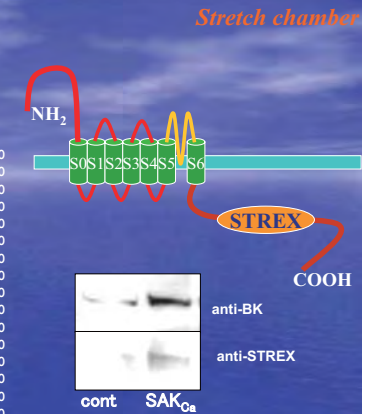


Tyrosine phosphorylation induced by stretch



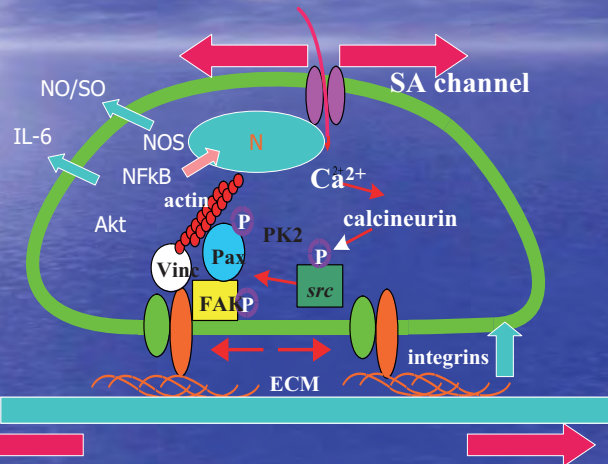
SAKCA

MDALIIPVTEVPCDSRGQRMWAFASSMVTFFGGLFIILLWRTIKYLW 50
TVCHCGVKNKEAQKINGGGDTQADGACKPTDEKEENVAEVEGWMESVKD 100
WAGVMISAQTLTGRVLVLVLFALSIGALVIYFIDSSNPIESCQNFYKDF 150
LQIDMAFNVFLLYFGLRFLAANDKLWFWLEVNSVDFTVPVVFVSVYL 200
NRSWLGRLRLRLRIQFSEILQFLNLKTSNSIKLVNLCISIFISTWLT 250
AGFIHLVENSQDPWENFQNNQQLTYWECVYLLMVTMTVGYGDVYAKTTL 300
GRLFMVFFILGGLAMFASYVPEIIEIGNRKKYGGSYSAVSGRKHIVVCG 350
HITLESVSNFLKDFLHKDRDDVNVFVFLHNISPNPEALFKRHFTQVE 400
FYQGSVLNPHDLARVKIESADACILANKYCADPAEDASNIMRVISIKN 450
YHPKIRIITQMLQYHNKAHLNIPSNWKEGDDAICLAELKLGTAQSC 500
APGLSTMLANLFSMRSPFKIEEDTWQKYYLEGVANEMYTEYLSAFVGLS 550
FPVAVCELVFAKLKLLMTAIEYKSEKRESSILINPGNHVKIQEGTLGFFIA 600
SDAKEVKRAFFYCKACHDDITDPKRIKCGCKR 650
GRSERDCSCMSGSYVHMDTLANFLESTYVHWSTYLSRAFEDEQPSTL 700
SPKKKQNRNGMRNSPNSSPKLMRHDPLLIIPGNEQIDNMDANVKYDSTGM 750
FWCFAKDIEKVILTRSEAMTVLSGHVVVICIFGDVKSALIGLRNLVMP 800
RASNFHYHELKHIVFVGSLEYLRREWETLHNFVKVSLPGLPLSRADLRA 850
VNINLDCMVCILSANQNNIDASLDQKECILASLNKSMQFDDSIGVLA 900
NSQGFPTPGMDRSSPDNSPVHGLLRQPSITTGANIPITELVNDNSVQFL 950
DQDDDDPDTELYLTQPFACGTAFVSVLDSLSMSATYFNDNLTIRTLV 1000
TGGATPELEALIAENALRGGYSTPQTLANRDRCRVAQLAYDGPFDLG 1050
DGGCYDGLFCKALKTYNMFCEGFIYRLRDAHLSTPSQCTKRYVITNPPYEF 1100
ELVPTDLIFCLMQFDHNAQSRASLSHSHSSSYSSSKSSSVHSIPSTAN 1150
RPNRTKTRDSREKQKYVQEDRL 1172



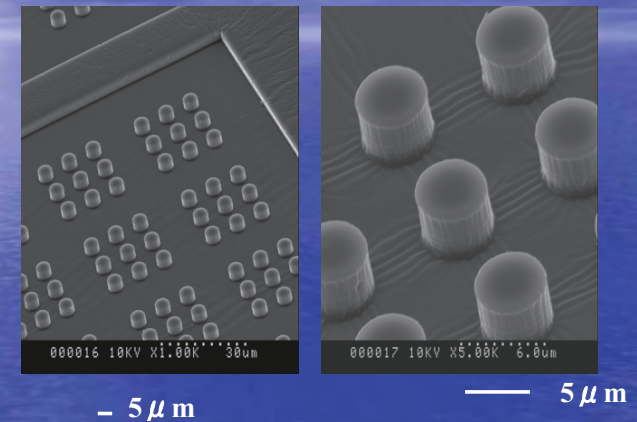
STREX: Stress-axis Regulated exon

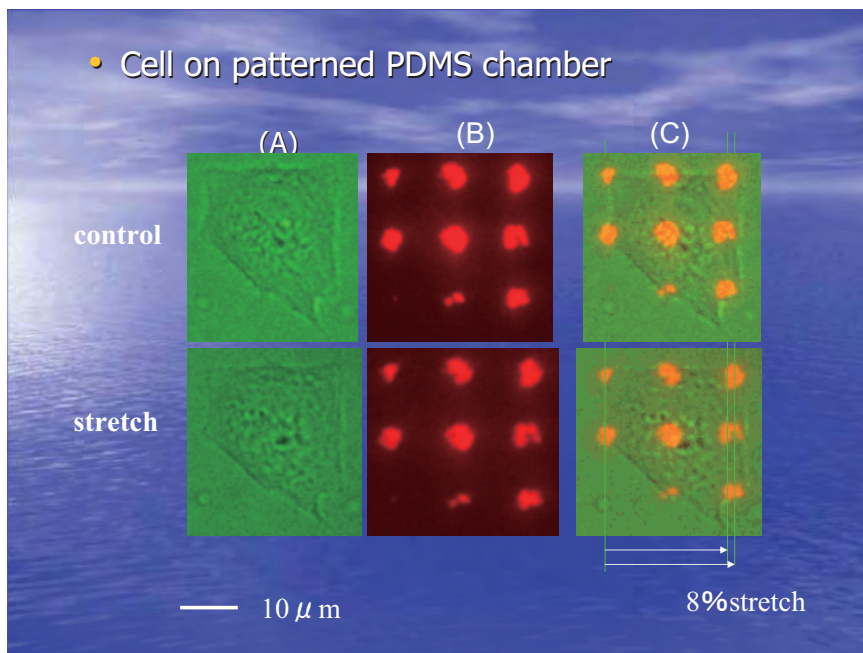
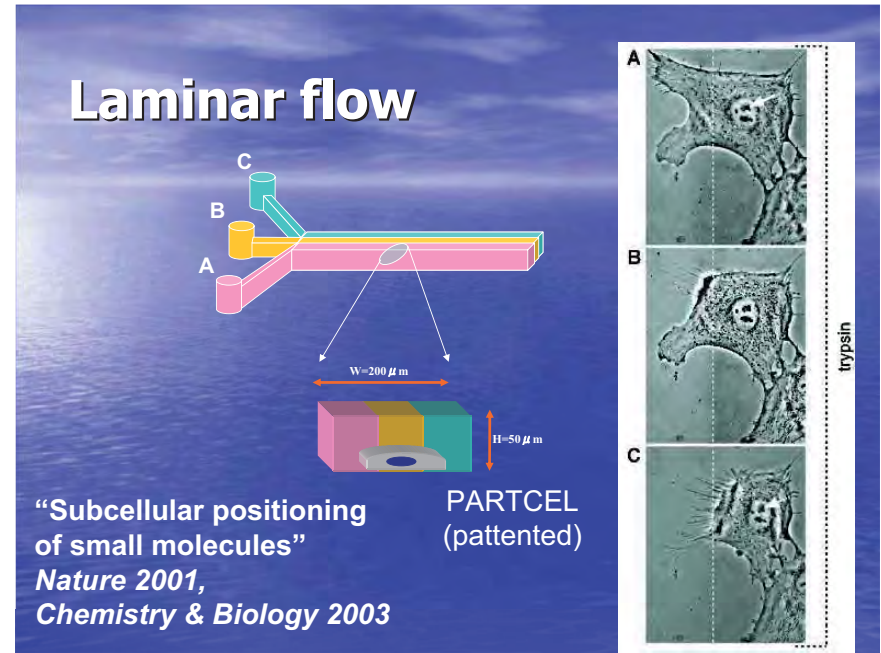
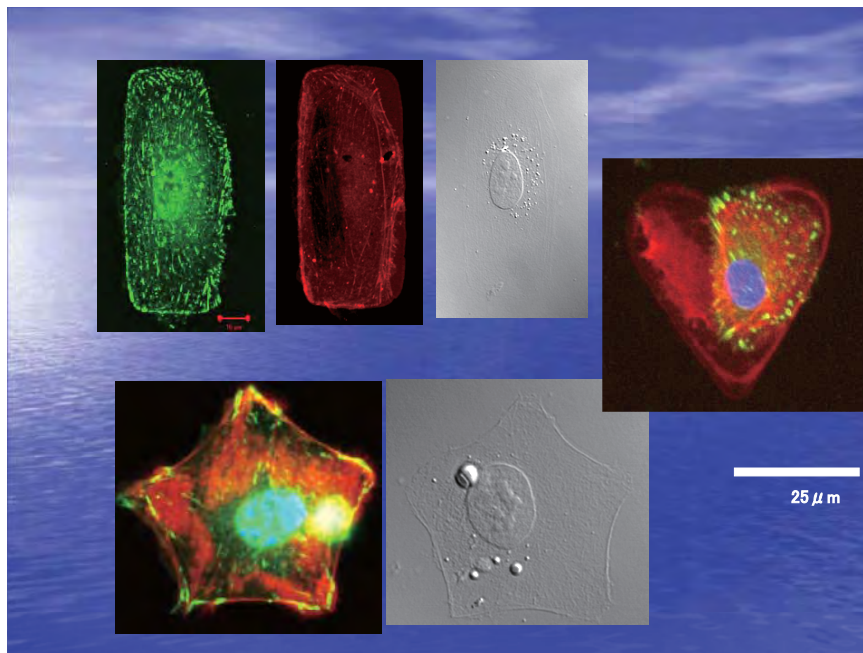
Mechanotransduction



ONCOGENE 1998, SCIENCE 1999, FEBS letter 1998/2003, FASEB J 2002, BBRC 2002, J Hepatol 2002 etc

SEM images of stamps





発生を制御する原理とは

近藤 滋（理学研究科・生命理学専攻）

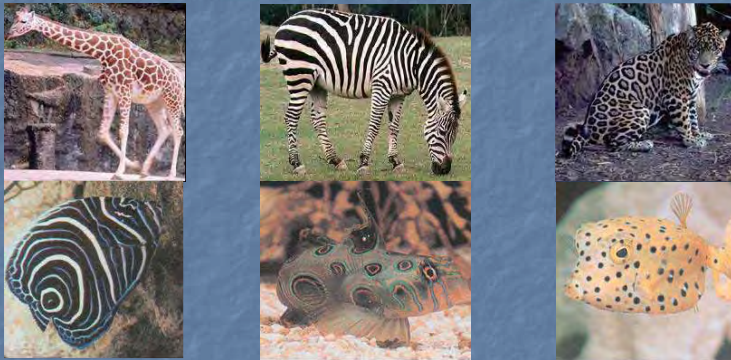
分子生物学的手法とゲノム情報のおかげで、以前とは比較にならないくらいたくさんの発生現象に関する分子レベルの情報がもたらされた。研究で扱う動物種や現象は増え続けており、分子に関する情報量は今後も爆発的に増え続けるだろう。しかし、将来、全ての遺伝子の働きがわかったとして、そのときに我々は「発生を理解した」と感じる事が出来るのだろうか？どうもそういう気はしない。現在でも、分子情報はあまりにも多すぎて、全てを把握している人は、ほとんど存在しないのである。何か発想の転換が必要に思える

チューリングの反応拡散波

イギリスの数学者アラン・チューリングは、発生を「空間的秩序が自発的に作られる現象」ととらえ、それを可能にする化学反応系が存在しうることを数学的に証明した。いわゆる「反応拡散モデル」である。詳しい説明（文献1、2、あるいは<http://www.cdb.riken.go.jp/pin/research/rdsoft.htm>にシミュレーションソフトを載せた説明があります。）はほかに譲るが、簡単に言うと、化学反応と拡散がちょうど良く組み合わせると、「波ができる」と理解してもらってよい。チューリングの反応拡散波は発生現象を説明するのに非常に都合のよい性質をいくつか持っている。まず、安定な定在波なので、発生の位置情報として都合がよい。さらに、パターンの形成には初期条件としての位置情報は必要とせず、人為的に乱してやってもすぐにもとのパターンが回復する。つまり、形態形成の自律性を説明するのに実にぴったりなのである。反応拡散波の波長は、関与する分子の性質（拡散、合成、分解の速度）に依存して決まるから、胚は、これらのパラメーターを調節することにより、任意の長さの位置情報を作り出すことが可能である。つまり、反応拡散波は、伸縮自在の『魔法の物差し』として使うことが可能なのである。反応拡散波に細胞の増殖、分化を組み合わせれば、ランダムな細胞集団から再生可能な3次元の形態を作り上げることも理論的には可能である。言い換えれば、チューリングの波の存在を仮定すれば、形態形成現象の最も不思議な点が、すべて説明可能になってしまう。大胆に言い切ってしまうと、反応拡散モデルは形態形成の「基本原理」でありうるのだ。

我々の研究室の目的は、このチューリング仮説を実験的に証明することである。動物の皮膚模様のパターンは、多くの場合皮下の構造とは全く異なっており、また、怪我などにより模様が失われても再生する。つまり、「自発的パターン形成」「再生可能」という反応拡散波と共通する性質を持っている。さらに驚くべきことに、模様は固定しているわけではなく、チューリングのモデルからの予測にぴったりのやり方で変化していくのである。また、最近脊椎動物の体節などで、発言レベルが時間的に振動する遺伝子が発見されており、体節の等間隔パターンも反応拡散原理で出来ている可能性が高い。これらの系を用いて細胞・分子レベルの解析を行うことにより、動物の体における「波」存在を証明することができると期待している。

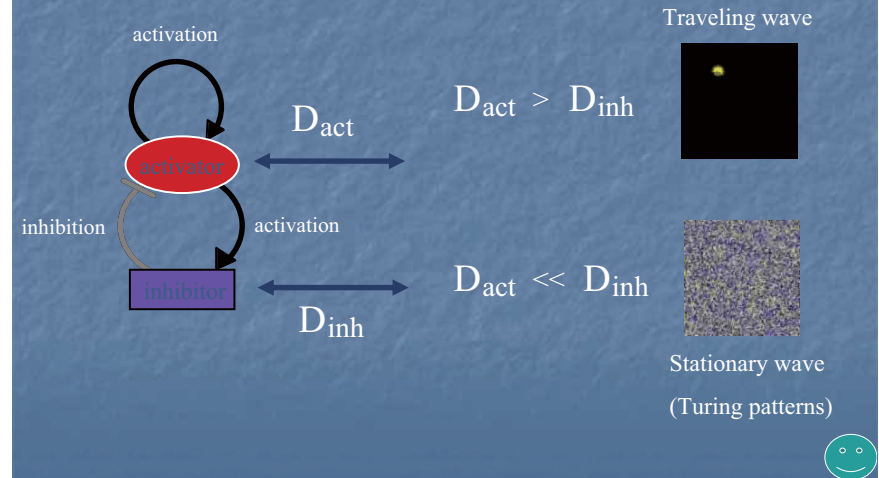
How animals get skin patterns?



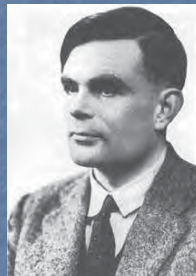
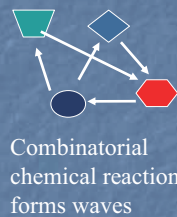
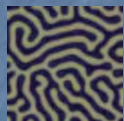
Shigeru Kondo:

Riken Center for Developmental Biology
Nagoya University

Reaction-diffusion model



Reaction-Diffusion Model (A.Turing: 1952)

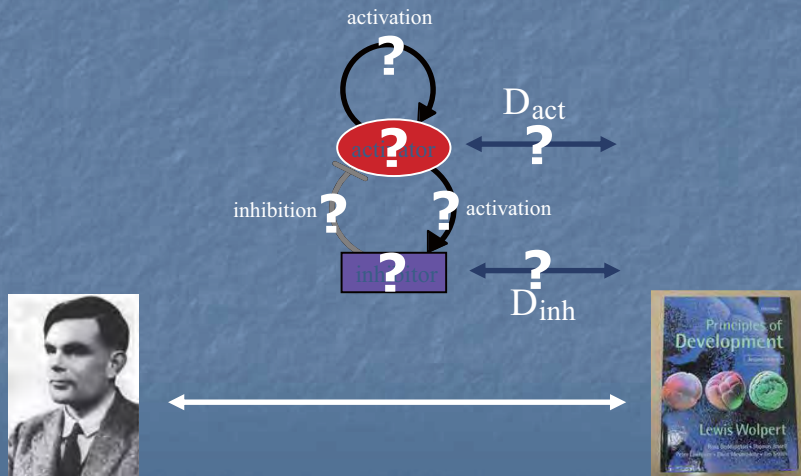


Complex shell patterns are reproduced by Reaction-Diffusion system

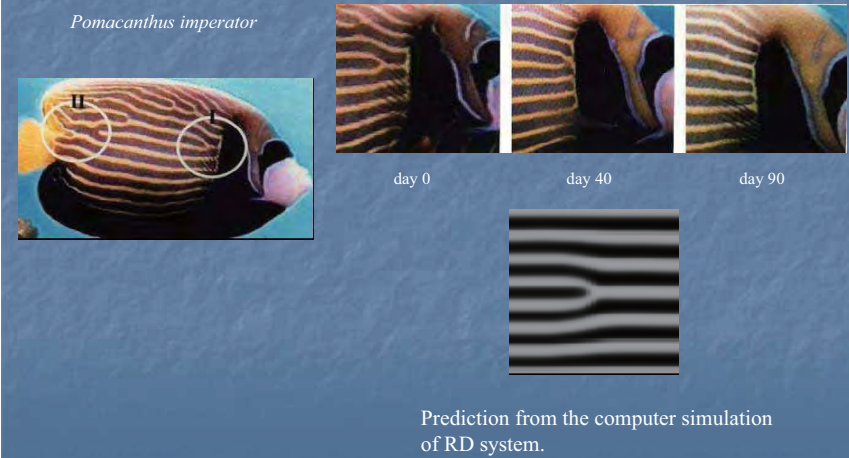


By H Meinhardt

Turing model lacks experimental proof.



Dynamic nature of pigment pattern.
(Stripes)

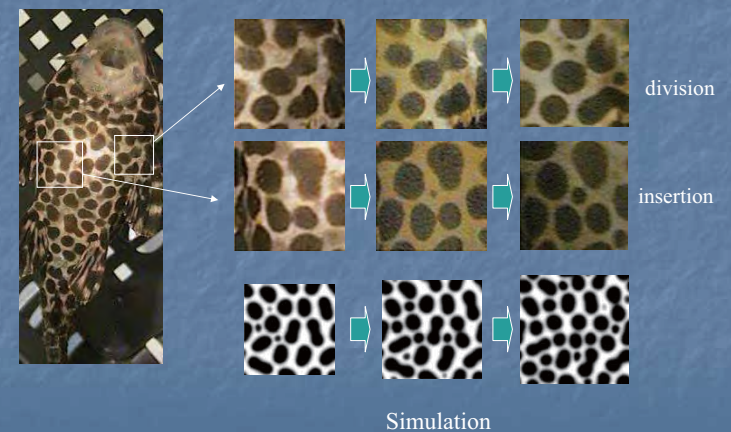


Striped mammals



**Zebra horse have beautiful stripes.
But the spacing is not even.**

Spot division and insertion



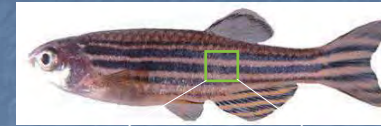
Zebrafish is a convenient model system to investigate skin pattern



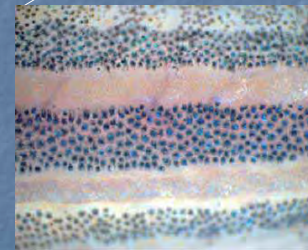
- Small
- Many mutants
- Variety of genetic techniques developed

Need to know the stripes are really the Turing wave

Zebrafish patterns and pigment cells



three kinds of pigment cells in the hypodermis of zebrafish.



- xanthophores
- melanophores
- iridophores

Tpr mutant (no iridophore) fish forms stripes.

Localization is directed by some other cells?
Or the pigment cells manage by themselves?

Genetics and Turing Model

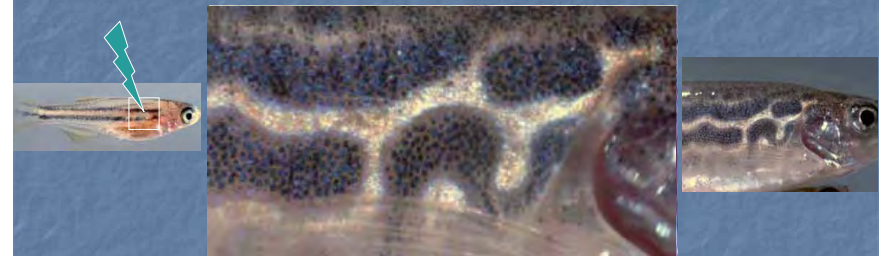
wild type (+ / +) (leo^{tw28} / leo^{tw28}) (leo^{t1} / leo^{t1}) (leo^{tq270} / leo^{tq270})



Pigment patterns of the different alleles of leopard gene

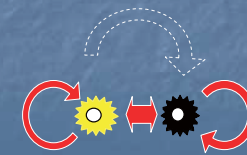
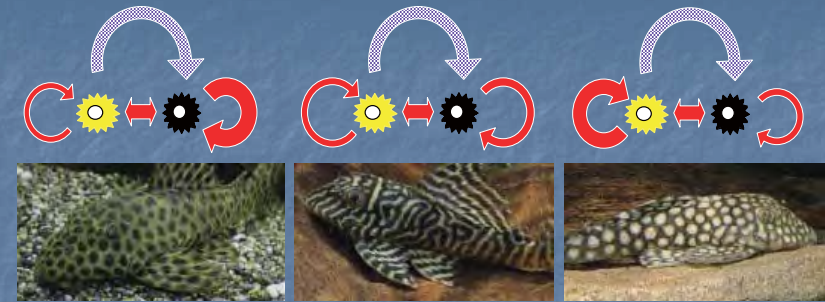
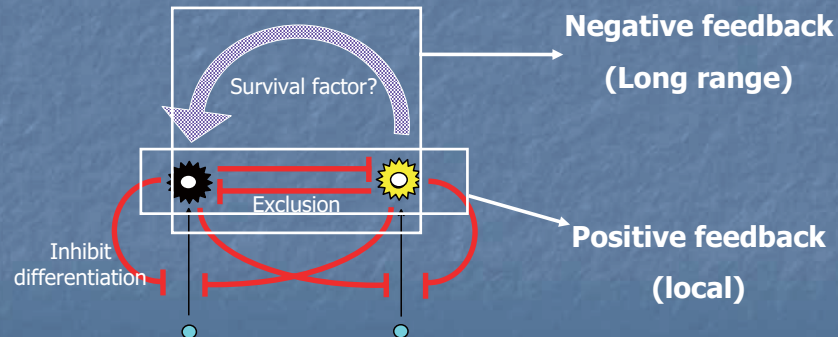
How do gene mutations change the pattern?

When all the pigment cells in a wide region are removed,,,,,

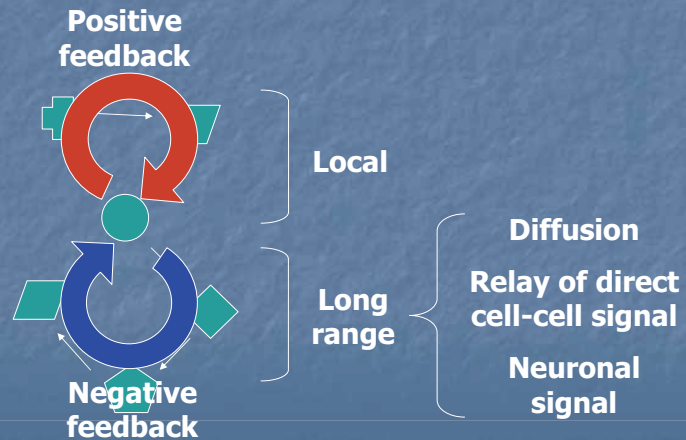


First, pigment cells regenerate at random position,
Then, the two types of cells gradually segregate to form the pattern

Pigment cell network satisfies the principle of Turing model



To form Turing Instability, Local activation and long range inhibition are required.

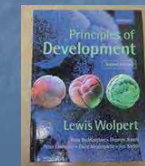


Summary

- Both stationary and traveling wave exist in the skin of animals
- Waves are generated by the interaction of pigment cells or hair follicles
- Interaction network conjectured from experiments satisfies the necessity of Turing's model



Identification of long-range and short range factor



Program 3 生命科学の新たな発展

細胞移植を用いた血管新生療法 (Therapeutic angiogenesis by autologous cell implantation)

室原豊明 (Toyoaki Murohara)

名古屋大学大学院医学系研究科・病態内科学講座 器官制御内科学 (循環器分野)

Department of Internal Medicine, Division of Cardiology, Nagoya University
Graduate School of Medicine

キーワード

血管新生 angiogenesis

血管形成 vasculogenesis

内皮前駆細胞 endothelial progenitor cell (EPC)

細胞移植 cell transplantation (cell therapy)

再生医療 regeneration medicine

血管新生療法 therapeutic angiogenesis

サマリー

成人における血管新生は、既存の成熟内皮細胞の増殖と遊走によるもののみであると理解されてきたが、成人の骨髄さらには末梢血液中には、内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞が存在することが最近明らかにされた。この結果、成人における血管新生においては、流血中の内皮前駆細胞の取り込みという胎生期にみられるような、いわば血管発生型の血管新生も関与する可能性がある。これらの内皮前駆細胞は、成人においては骨髄より動員される。事実、自己骨髄細胞移植により、虚血組織の血管新生を増強出来ることが最近実験動物で次々に明らかにされ、さらにこの分野の臨床応用も開始されている。将来はこのような自己骨髄細胞や、内皮前駆細胞、あるいは遺伝子導入された幹細胞を移植することで血管新生をコントロールすることができるようになるであろう。

Abstract

Therapeutic angiogenesis is an effective means for tissue salvage in patients with critical limb ischemia. Angiogenesis is defined as a formation of new blood vessels by sprouting of preexisting mature endothelial cells (ECs). In contrast, vasculogenesis is referred to as the creation of primordial blood vessels from endothelial progenitor cells (EPCs) or angioblasts. Neovascular formation in adults has been considered to result exclusively from the former process (i.e., angiogenesis). However, we and other researchers recently identified EPCs in human peripheral blood (PB), and circulating EPCs have been shown to accumulate at active angiogenic sites and to participate in neovascularization, a notion consistent with “postnatal vasculogenesis”. EPCs in adults originate from bone marrow (BM), and we recently have demonstrated that in vivo implantation of autologous BM-MNCs effectively augmented ischemia-induced neovascularization in animal studies as well as human trial (TACT Trial). Here we summarize recent advances in cell transplantation-mediated therapeutic angiogenesis.

はじめに

閉塞性動脈硬化症 (ASO) や Buerger 病 (TAO) 患者においては、まず生活習慣の改善勧告 (禁煙など) に加え、薬物療法や運動療法などが行われる。Fontane III ないし IV 度の重症例に対しては、血管造影を行った後に経血管的な血管形成術 (PTA やステント挿入、血栓除去術)、さらに外科的なバイパス手術が試みられる。これら一連の方法は確立された有効な治療法であるが、一定の率 (30-40%) で拡張した血管やバイパスの再狭窄や閉塞がみられる。また Buerger 病患者のように、器質的な血栓性閉塞性病変が末梢動脈に存在し、標的血管の内径が小さい場合には、血管形成術やバイパス手術後も再狭窄を来しやすくなるため施行不可能となる。このような症例に対して最近、虚血部周辺の組織からの血管新生および側副血行の発達を促し、虚血組織の血流を確保し、組織傷害や壊死を軽減させようとする試みがなされている。これらの戦略は治療的血管新生、あるいは血管新生療法 (Therapeutic Angiogenesis) と呼ばれ、虚血組織・臓器そのものの救済、さらにそれらの機能回復という点において、非常に重要な治療分野となっている。

血管新生は様々な液性・細胞性因子により密接にコントロールされており、血管内皮細胞増殖に対するプラスとマイナスの因子群のバランスによって恒常性が保たれている。現在心血管領域においては、血管新生に対するプラスの因子 (VEGF, FGF, HGF, Angiopoietin-1 などの血管成長因子の遺伝子や遺伝子組み換え蛋白) を利用した血管新生療法の基礎的・臨床的研究が急速に進んでおり、欧米ではすでに 1994 年から臨床試験も開始され結果も多く報告されている。

また、近年遺伝子治療に加え、内皮細胞やその前駆細胞を虚血組織に移植し、血管新生を誘導して治療を行なおうとする試みがなされている。本稿では、これらの細胞移植による治療的血管新生に関する最近の知見を臨床例を含めてまとめた。

血管新生と血管発生

脈管系の早期形成と血液循環は脊椎動物の発生過程において、胚 (Embryo) の成長に、

最も初期から必須な器官である。したがって、血管発生 (Vasculogenesis) と血管新生 (Angiogenesis) は、胎生初期の心臓をはじめとする循環器・脈管系の形成や各組織や器官の形成そのものに密接に関与する。一方成熟個体においては、身体の成長とともに血管系も増殖・進展するが、思春期以降、男性では恒常的な血管新生は観察されない。女性においては性周期に伴う子宮内膜の発育の際に、一過性の強い血管新生が認められる。したがって、生理的な条件下においてもさまざまな発生成長時期・組織特異的に血管新生はダイナミックにコントロールされていると考えられる (1)。

発生学や組織学の観点から、広義の血管新生 (Neovascularization) は以下の2種に大別される。その1つは発生初期における内皮細胞の前駆細胞である血管芽細胞 (Angioblast または Endothelial progenitor cell; EPC) からの全く新しい血管の形成で、血管発生 (Vasculogenesis) と呼ばれる過程であり (2)、もう1つのタイプは、すでに組織に存在する成熟血管からの、内皮細胞増殖および遊走・リモデリングを基本とした新しい娘血管枝の形成で、狭義の血管新生 (Angiogenesis) と呼ばれる過程である (2、3)。最近まで胎生の後期以降および出生後すべての時期における血管新生は、狭義の血管新生 (Angiogenesis) によるもののみであると考えられてきた。

胎生期における血管内皮前駆細胞

胎生初期の血管形成、特に羊膜上においてみられる原始血管発生 (Primordial vasculogenesis) の過程においては、造血幹細胞が中心部に位置し、血管内皮前駆細胞 (または血管芽細胞) が辺縁部に位置する細胞群としてのいわゆる血島 (Blood island) から始まるものと考えられている。血島は互いに融合し合い、辺縁部に位置する血管内皮前駆細胞が内皮細胞さらには血管壁に、また中心部に位置する造血幹細胞が血球系に分化して血液を形成すると考えられている。これらの解剖学的また発生学的類似性から、造血幹細胞と血管内皮前駆細胞は共通の先祖細胞である血球血管芽細胞 (Hemangioblast) から分化してくるものと考えられている (図1) (4)。

従来より血球系幹細胞の細胞表面マーカーとしては CD34 などが用いられてきた。興味深いことに CD34 は成熟血管内皮細胞の一部にも発現していることが以前から明らかにされていた。すなわち、造血幹細胞と血管内皮前駆細胞は細胞表面マーカーからそれらの類似性・相互性が元々認識されていたことになる。近年 CD34 に加え、血球系幹細胞のマーカーとして特に重要であると思われる表面抗原が、実は血管内皮細胞にも発現することが明らかにされてきた。代表的なものに、血管形成と血管新生の両方に重要とされている血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) の2型受容体である Flk-1/KDR と、やはり血球発生と血管新生に重要な役割を果たしている Angiopoietin-1, -2 の受容体である Tie-2 がある。実際に Flk-1/KDR、Tie-2 や、それらのリガンドである VEGF や Angiopoietin-1 のノックアウトマウスにおいては、血管新生と血球発生の両方が障害されていることが明らかにされた (5-7)。これら一連の研究から、造血幹細胞と血管内皮前駆細胞は共通の先祖細胞から分化してくること、さらにこれらの分化成熟が少なくともいくつかの共通の増殖因子でコントロールされていることなどが明らかにされた。さらに現在では、発生過程において血球系幹細胞と血管内皮前駆細胞は互いの細胞の分化成熟に対して相補的に作用し、必要不可欠なものであるとも考えられている。事実、コロニー増殖因子のような血

球系細胞の分化誘導因子と、血管新生因子が実は機能の面においてかなり類似していることも報告されており興味深い (8)。最近では、血球幹細胞は Angiopoietin-1 を産生し、血管内皮細胞のリモデリングさらには血管新生そのものに寄与しているという全く新しい知見も Takakura らにより報告されている (9)。

成人における内皮前駆細胞の存在と後天的血管発生 (Postnatal Vasculogenesis) の可能性

従来成人個体における血管新生は、既存の血管内皮細胞の発芽の増殖と遊走によるもの (狭義の Angiogenesis) のみであると理解されていたが、成人の末梢血液中には、内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞 (EPC) が存在することが最近明らかにされた (10)。1997 年 Asahara らは、成人末梢血中の CD34 陽性細胞の分画から内皮へと分化しうる一群の細胞が得られることを証明した (10)。これら内皮前駆細胞は、培養過程で一定細胞数以上からなる細胞塊 (コロニー) を形成したのち、その辺縁部から紡錘状のフィブロネクチンに付着する細胞として分化し、その後線状構造、ネットワーク構造をも形成することが明らかにされた。これらの細胞は、免疫細胞化学染色やフローサイトメトリーによって、内皮細胞に比較的特徴的な抗原 (CD34, CD31, Flk-1/KDR, Tie-2, Ulex-1 Lectin 結合能, ecNOS, von Willebrand Factor など) を発現していた。また、内皮細胞の特徴の一つである一酸化窒素 (NO) の産生や Acetyl-LDL の取り込み能を有することも明らかにされた。また内皮前駆細胞を蛍光標識し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とともに共培養すると、マトリゲル上で内皮管腔形成網に組み込まれることも示された。さらに、ヒト由来の内皮前駆細胞を蛍光標識し、免疫抑制動物に経静脈的に投与すると、虚血下肢の血管新生に組み込まれることが明らかにされた。以上より成人 (成熟動物) における出生後の血管新生 (Postnatal neovascularization) においては、血管新生のみではなく、流血中の内皮前駆細胞の取り込みという血管発生型の血管形成も関与する可能性が示唆された (10)。

では、成熟個体 (成人) における内皮前駆細胞はどこに起源するのであろうか。先にも述べたように、内皮前駆細胞と血球幹細胞とは互いに類縁関係にあるために、成人では唯一の造血臓器である骨髓に由来するものと予想される。実際に Asahara らは、血管内皮細胞に特異的に発現される遺伝子 (Flk-1/KDR, Tie-2) のプロモーターにより誘導される β -galactosidase を発現するトランスジェニックマウスからの同種骨髓移植マウスを作製し、この骨髓キメラマウスに移植癌、下肢虚血、心筋梗塞、角膜血管新生モデル (VEGF pellet 移植) あるいは子宮内膜血管新生などを誘発させた。この結果、それぞれの血管新生部位において、骨髓由来の (X-gal 染色により陽性に染まる) 内皮細胞の存在が確認された (11)。これらのことから、成体における血管形成においては、内皮前駆細胞は少なくとも骨髓に由来し、必要に応じて末梢血液中に動員 (Mobilization) され、血管新生部位に取り込まれる (Chemotaxis) ことが示唆されている。しかしながら、これらの詳細な分子メカニズムについては、依然として不明な点が多い。

細胞移植による血管新生療法

現在のところ、内皮前駆細胞による血管発生型の血管新生が、成人における血管新生のどれくらいの比率を占めているのかは明らかにされていない。最近、人工的な血管新生モデル (動物) においては、約 10% の新生血管床に骨髓由来細胞 (内皮前駆細胞) によると思われ

る血管発生型の血管新生がみられたと報告された(12)。よって理論上は、流血中の内皮前駆細胞の量を100%コントロール出来ても、約10%くらいの新生血管床しかコントロールできないのではないかと、という懸念が生まれる。これらの事実は、血管新生を流血中の細胞数でコントロールするよりは、これらの幹細胞をいったん外に取り出して直接移植するか、流血中(虚血組織の上流)に高濃度で細胞移入する必要性があることを示唆している。

造血細胞と血管内皮細胞は共通の幹細胞(Hemangioblast)より発生すると考えられている。したがって、成人における内皮前駆細胞は唯一の造血器官である骨髓に由来すると考えられる。事実1996年 Noishiki ら(13)は、イヌ大動脈人工血管置換モデルを作成し、腸骨より採取した自己骨髓全血をあらかじめ人工血管グラフトに移植することにより人工血管内側に有意な再内皮化を認め、血栓を予防できたことを報告した。1998年、さらに Shi ら(14)は、やはりイヌ胸部下行大動脈人工血管置換モデルを作成し、全骨髓照射を行った後に、別のイヌからの骨髓を経静脈的に移植し、内皮の遺伝子型をPCR法で解析することにより、人工血管内側の再内皮化にドナー遺伝子型の骨髓由来細胞が関与することを確認した。

また、内皮前駆細胞はCD34陽性細胞分画から主に発生すると考えられているが、CD34陽性幹細胞は、通常の末梢血中には骨髓の約1/10の0.2%程度しか存在しない(15)。測定可能な最も未熟な細胞であるLTC-IC(long-term culture initiating cell)は末梢血1ml中に平均2.9個のみ存在し、骨髓に比べ約1/100と報告されている(16)。つまり成人においては、骨髓由来細胞の方がより多くの内皮前駆細胞を供給し、有用な血管新生を惹起できる可能性が示唆される。

以上のことから、我々はこれまでにウサギの片側下肢虚血モデルを用いて、手術1週間後に自己骨髓由来単核球を移植することにより、虚血下肢の血管新生が増強されるか否かを検討した。血管造影・レーザードップラー法・虚血組織切片における毛細血管密度などの各種パラメーターにおいて、コントロール群(生理食塩水注入群と線維芽細胞移植群)と比較し、自己骨髓移植群において有意に側副血行や血管新生の改善がみられた(17)(図2)。また、ブタの急性心筋虚血モデルにおいても、自家骨髓細胞の虚血組織内移植で、有意に血管新生が増強された(図3)。移植された自己骨髓単核球は、虚血組織において、少なくともそれら細胞自身が一部血管形成に参加するか、さらには種々の血管新生促進因子(例VEGF,bFGFやAngiopoietin-1など)を放出し、局所の血管新生を刺激したものと考えられた(18、19)。

治療応用可能な内皮前駆細胞は、成人の末梢血からも分離採取可能であろう。Kalka らは最近、成人末梢血を培養し内皮前駆細胞を得た後、これをヌードマウスに経血管的に移植すると(5×10^5 cells/animal)、虚血下肢領域の血管新生部位に集積し、側副血管形成・血流を促進させ、結果的に組織救済(auto-amputationの回避)が可能であることを報告した(20)。成人末梢血由来の内皮前駆細胞は数に限りがあるために、今後大量培養による必要細胞数の確保が重点課題となる。さらに最近では、内皮前駆細胞の数に制限があるため、これらの細胞にあらかじめVEGF遺伝子を導入し、少ない細胞数でも治療効果を維持しようとする試みもなされている(21)。しかしこれらの方法は未だ確立された物が無く、今後のさらなる研究が必要であろう。

自家骨髄単核球細胞の移植による血管再生療法-臨床応用-

上に述べたような実験的根拠に基づき、我々は末梢性血管疾患（閉塞性動脈硬化症・バージャー病）患者への自己骨髄細胞の虚血骨格筋内移植が、有望な血管新生療法として臨床レベルで応用可能かどうかを検証した。以下にその概略を示す。

対象

1) 末梢性血管疾患（閉塞性動脈硬化症・バージャー病）。

対象患者は、日常生活が著しく障害されている重症末梢性血管疾患（閉塞性動脈硬化症およびバージャー病）の患者で、他のいかなる治療にも反応せず今後回復が期待できない患者。詳細な説明文書にて十分に自己骨髄細胞移植で発生する合併症・効能・不利益・利益を説明し、患者みずからの意志および家族の理解と承諾に元づいて、細胞移植医療を希望する場合のみ施行する。一度本試験に参加し完了した患者の再エントリーは行なわない。

2) 性別：男性および女性（妊娠中および妊娠の可能性のある女性を除く）。

3) 年齢：20-75 歳

4) 適応除外事項：合併症により余命が1年以内と考えられる患者、悪性新生物を有する患者、及び5年以内にその既往のある患者、規定の諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された患者、重症の糖尿病性網膜症を有する患者、虚血性心臓病を有し治療されていない患者、その他インフォームドコンセントを得られない患者など。

方法

1) 必要と思われるすべての薬物治療は試験期間中継続する。細胞移植療法2週間前に自己末梢血液（400mL）を採取し貯蔵する。

2) 骨髄液採取および骨髄単核球細胞の分離

全身麻酔下にて患者腸骨より600-800mLの骨髄液採取を行い、比重遠心分離法（CS 3000、Baxter 社製を使用）にて骨髄単核球を分離する（全ての清潔操作方法は、すでに臨床実施されている骨髄移植法に準じる）。採取後に患者に、あらかじめ貯蔵しておいた自己血輸血を行う。

3) 下肢骨格筋への骨髄単核球投与：骨髄液採取にひき続き全身麻酔下にて、得られた骨髄単核球全てを約50カ所に分け、23G針を用いて虚血下肢骨格筋に筋肉内投与を行う。

治療効果判定法

1) 下肢骨格筋での血管新生・機能回復の評価：

①身体的所見：視診可能な虚血性潰瘍やチアノーゼは、それらの部位・深さ・壊死の形状を記録する。潰瘍の大きさは、長軸および短軸方向の最大長で評価する。足趾の間などの測定不能部位では表面面積を概算する。潰瘍の深さは、下記の基準による：1=表在欠損；2=皮下病変；3=腱もしくは骨の露出；4：腱もしくは骨の壊死、また、潰瘍は湿性か乾性であるかも評価する。

②ABI（ankle-brachial blood pressure index）

③レーザードップラー法またはTCO2法による下肢血流量・酸素飽和度測定。

④血管造影[DSA]にて血管新生を評価する。

⑤歩行可能距離、疼痛出現までの歩行距離（またはトレッドミル運動負荷テスト）

⑥QOLによる判定。

臨床例

筆者の前所属施設（久留米大学附属病院）では、2000 年 11 月に、73 歳の糖尿病を有する閉塞性動脈硬化症の女性患者に対して、第一例目の自己骨髄細胞移植治療が施行された。全身麻酔下に自己骨髄 600 mL を採取し、骨髄単核球細胞を術中に分離し、合計 0.93×10^9 個の自己骨髄単核球を虚血下腿屈側骨格筋内に移植した。結果は良好であり、有意な血管新生と、側副血管径の増加(図 4)、血流の回復を認めている。歩行可能距離は 10m から 150m に、1 日疼痛発作回数は平均 6 回から 1.6 回に、患側の ABI は 0.27 から 0.55 にそれぞれ改善した。

TACT trial

2000 年 6 月より、上記自己骨髄細胞移植による重症虚血肢患者の血管新生療法が、国内 3 施設（関西医科大学・久留米大学・自治医科大学）において検討された。Therapeutic Angiogenesis Using Cell Transplantation (TACT) trial と呼ばれている。合計 45 人の患者の治療が行われ、ABI が平均で約 1 ポイント増加し、下肢疼痛完全緩解が約 90% の患者でみられた。トレッドミルテストの歩行距離は約 2.6 倍へと増加した。細胞移植部位の炎症・浮腫は認められず、血中の VEGF, bFGF, HGF 濃度、単核球数は変化を受けなかった。動物実験と同様に骨・軟骨形成などへの細胞分化はみられなかった。血管造影でも著明な改善例が認められ、虚血性皮膚潰瘍も約 1 - 2 ヶ月で著明に改善する例が多く（約 80%）みられた（22）。

まとめ

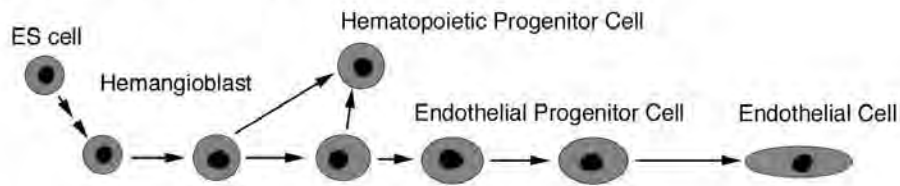
内皮前駆細胞は、移植されると生後にみられる血管新生（postnatal angiogenesis）に組み込まれることが明らかにされた。このことから、内皮前駆細胞や骨髄細胞移植による新しい血管新生療法（Therapeutic angiogenesis）の可能性が出てきた。今後細胞移植治療は、重症虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症の補助的な治療手段の一つになりうる可能性がある。しかしながら、同時に解決していかなければならない問題点は多く、今後のさらなる研究成果が待たれる。

文献

1. Ferrara N. et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. Nat Med. 1998;4:336-340.
2. Risau W. Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. In: Feinberg RN, Sherer GK, Auerbach R (Eds) The development of the vascular system. Vol 14, Karger, Basel, 1991, pp58-68.
3. Folkman J. et al. Angiogenic factors. Science. 1997;235:442-7.
4. Flamme I. et al. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. Development. 1992;116:435-9.
5. Shalaby F. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. Nature. 1995;376:62-66.
6. Shalaby F. et al. A requirement for Flk-1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. Cell. 1997;89:981-990.

7. Suri C. et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996;87:1171-80.
8. Bikfalvi A, et al. Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia*. 1994;8: 523-529.
9. Takakura N. et al. Novel function of hematopoietic stem cell for angiogenesis. *Cell*. 2000;102: 199-209.
10. Asahara T, Murohara T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
11. Asahara T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res*. 1999;85:221-228.
12. Crosby JR, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ. Res*. 2000;87: 728-730.
13. Noishiki Y. et al. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nature Med*. 1996;2:90-93.
14. Shi Q. et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92:362-367.
15. Bender JG. et al. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flowcytometry. *Blood*. 1991;77:2591.
16. Udomsakdi C. et al. Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood*. 80: 2513,1992.
17. Shintani S, Murohara T. et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*. 2001;103: 897-903.
18. Murohara T. et al. Autocrine release of vascular endothelial growth factor-A and nitric oxide plays an important role in the development and proliferation of human endothelial progenitor cells. *Circulation*. 1999;100:I-406 (abstract).
19. Kamihata K, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosai A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. Implantation of autologous bone marrow cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side-supply of angioblasts, angiogenic ligands and cytokines. *Circulation*. 2001; 104: 1046-1052.
20. Kalka C. *et al*. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97:3422-3427.,
21. Asahara T. et al. Gene therapy of endothelial progenitor cell for vascular development in severe ischemic disease. *Circulation*. 1999;100:I-481 (abstract).
22. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T. et al. for the Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation (TACT) Study Investigators. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002; 360: 427-435.

A Maturation of Endothelial Progenitor Cell



B Expression of Cell Surface Antigens



C Blood Vessel Formation

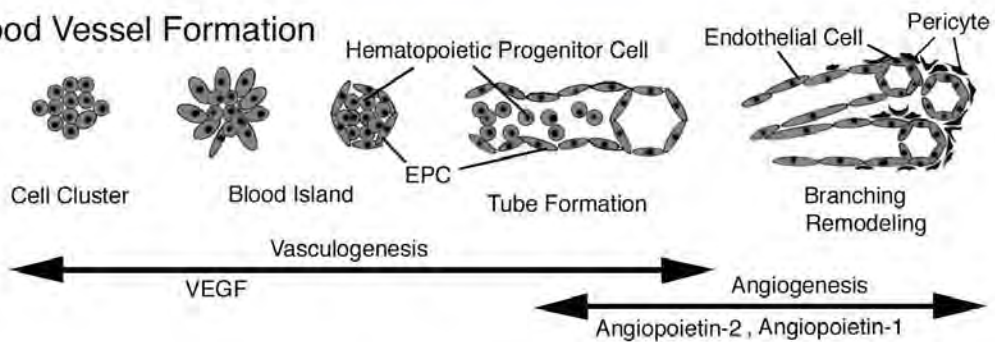


図1 胎生期における血管内皮細胞の発生分化と、それに関わるサイトカインおよびそれらの受容体。

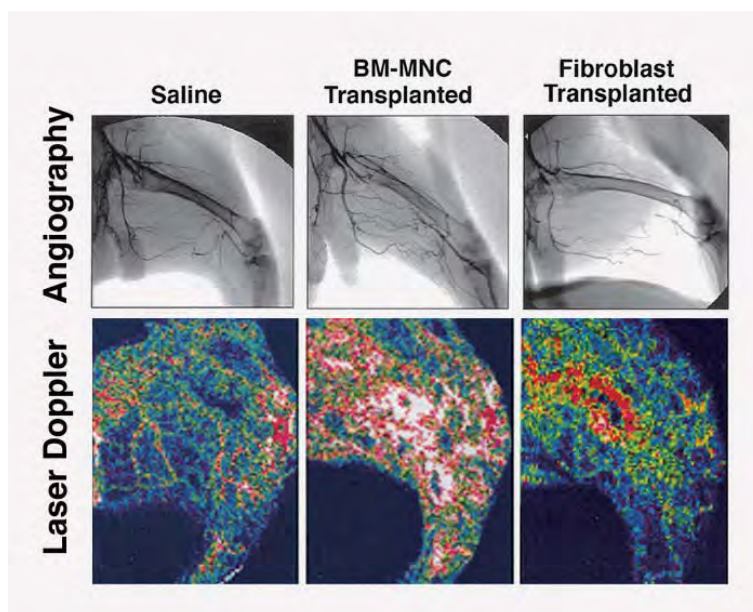


図2 ウサギ虚血下肢モデルにおける、自己骨髄細胞移植による血管新生増強作用。自己骨髄細胞を移植した群のみにおいて、有意な側副血管形成および皮下血流の増強をみた（文献 17 より）

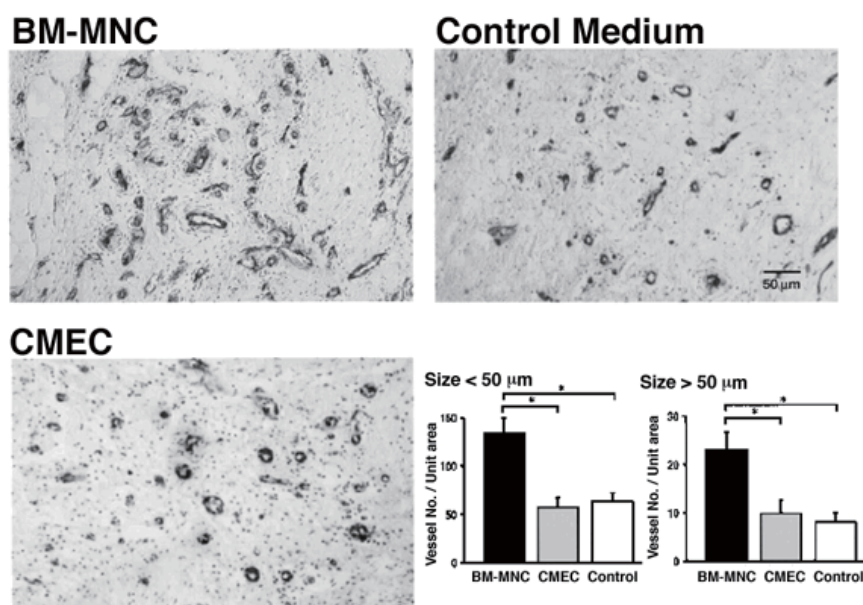


図3 ブタ急性心筋虚血モデルにおける、自己骨髄細胞移植による血管新生増強作用。自己骨髄細胞を移植した群において、有意な毛細血管密度の増加がみられた（文献 19 より）。

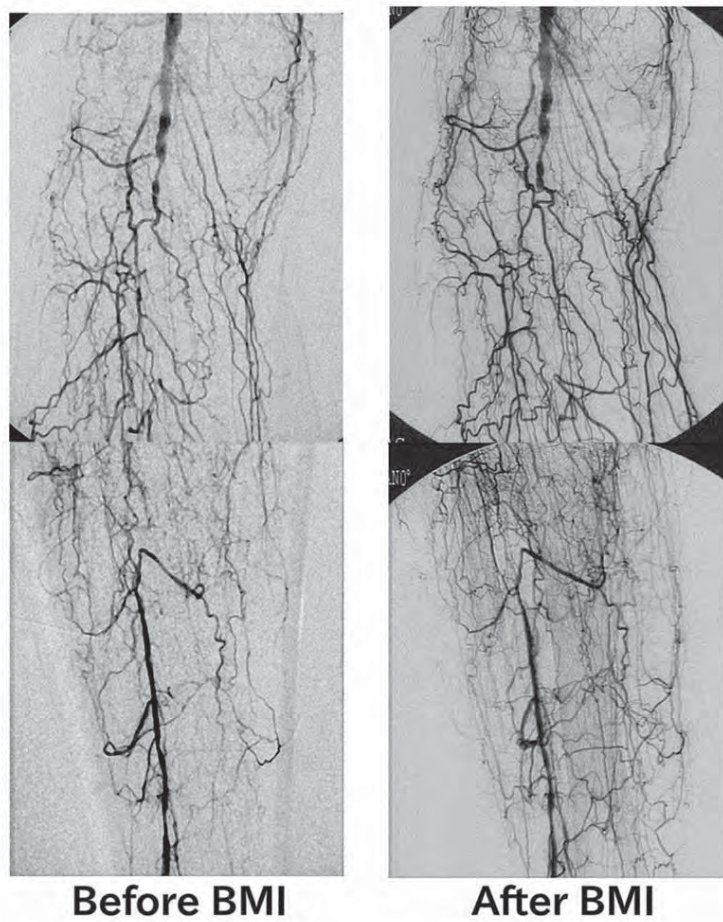


図4 自己骨髄細胞移植前後の下肢血管造影写真。閉塞性動脈硬化症患者において、自己骨髄単核球細胞移植により虚血下腿の側副血行増強がみられた。

球脊髄性筋萎縮症の病態に基づく治療法開発

勝野雅央、祖父江元 （医学系研究科・神経内科）

球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は、成人期に発症する緩徐進行性の下位運動ニューロン疾患であり、四肢近位部の筋力低下・筋萎縮と球麻痺を主症状とする。患者は男性のみであり、女性保因者は通常無症状である。病因はアンドロゲン受容体（AR）第1エクソン内のCAGリピートの異常延長であり、同様の遺伝子変異はHuntington病や脊髄小脳変性症でも見いだされている。SBMAをはじめとするこれらの神経変性疾患はポリグルタミン病と総称され、異常延長したポリグルタミン鎖を有する変異AR蛋白が核内に集積し、転写障害などを引き起こすことが共通の病態と考えられている。

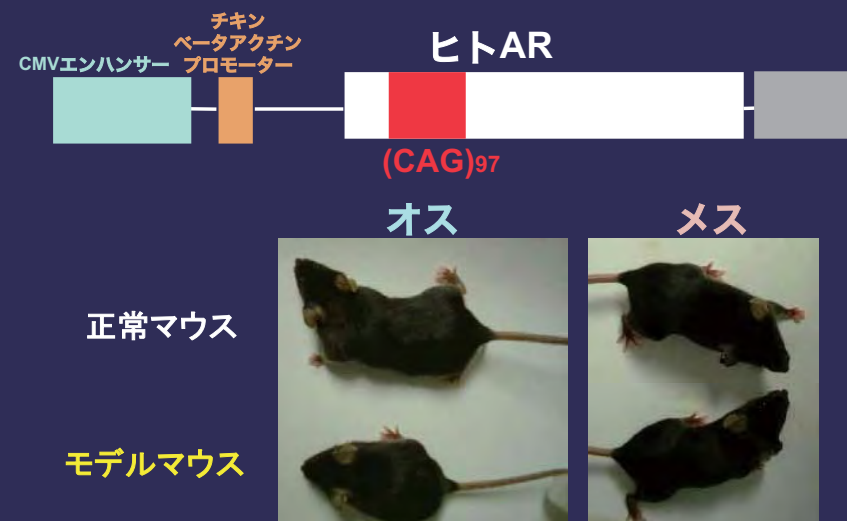
我々は、SBMAのモデル動物として、CAGリピートが97に延長した全長のヒトAR遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（Tg）を作成した。このTgでは進行性の運動機能障害や筋萎縮がみられ、症状は雄において重篤かつ急速に進行したが、雌では症状が認められないか、あっても雄より遥かに軽症であった。ウエスタンブロットや免疫染色では、変異ARの核内集積がみられ、雄においてより顕著であった。雄Tgに去勢を施行したところ運動障害は著しく改善し、変異ARの核内集積が劇的に改善した。逆に雌Tgにテストステロンを投与したところ、核内の変異ARが著明に増加し、運動機能は著しく低下した。これらの結果から、テストステロン依存性の変異ARの核内移行が病態を決定づける重要な要因であり、テストステロンの分泌を抑制することが治療に直結すると考えられた。

男性ホルモン依存性の病態に基づき、LHRHアナログであるleuprorelinを投与したところ、テストステロンは去勢の際と同様に著減し、変異ARの核内集積や神経症状についても去勢と同等の治療効果が認められた。アンドロゲン拮抗薬であるflutamideの投与では変異ARの核内集積には変化は見られず、治療効果も認められなかった。LHRHアナログはすでに前立腺癌の治療薬として広く使用され、その安全性も確立されていることから、SBMAの治療として有望と考えられる。我々は現在、球脊髄性筋萎縮症の患者に対するleuprorelinの臨床試験を実施中である。

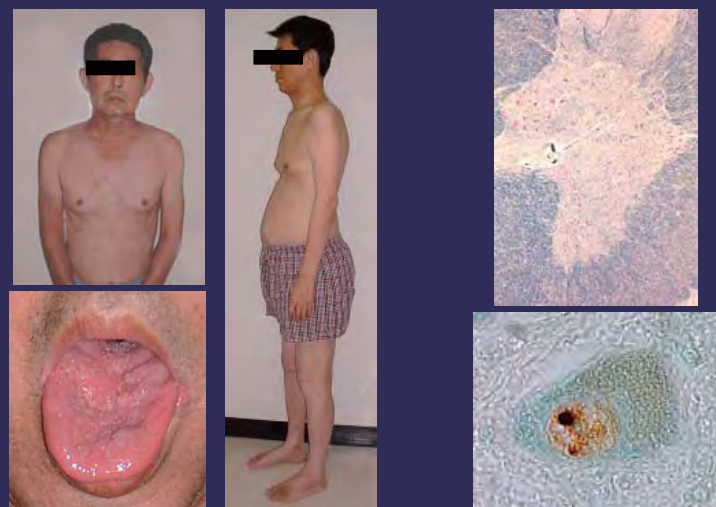
球脊髄性筋萎縮症の病態に基づく治療開発

名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科
勝野雅央、祖父江 元

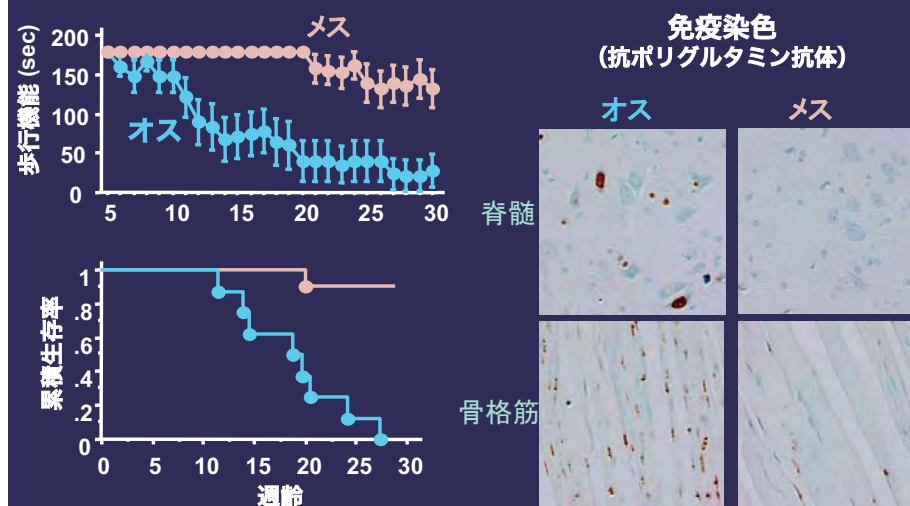
トランスジェニックマウスの作成



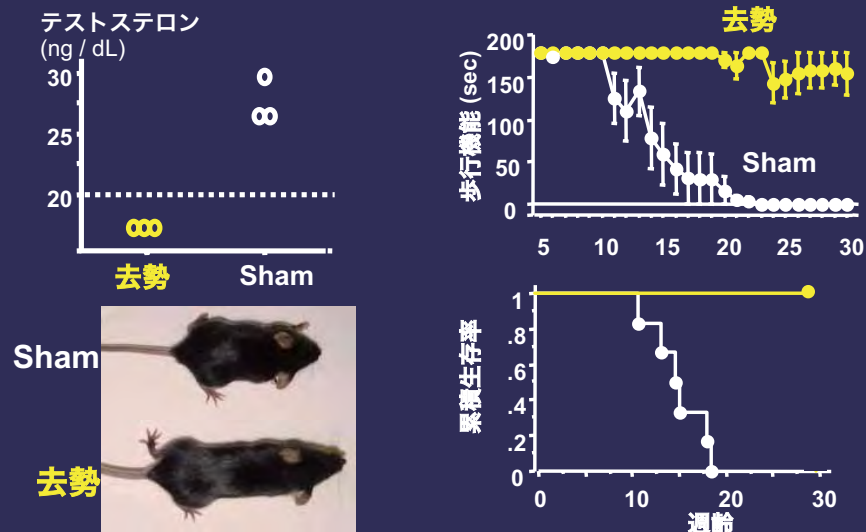
SBMAの臨床・病理像



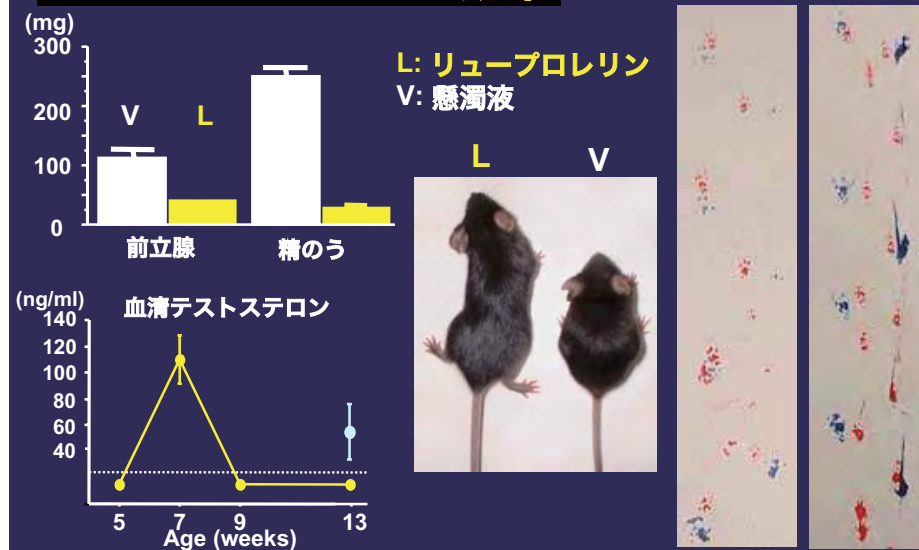
マウス表現型の性差



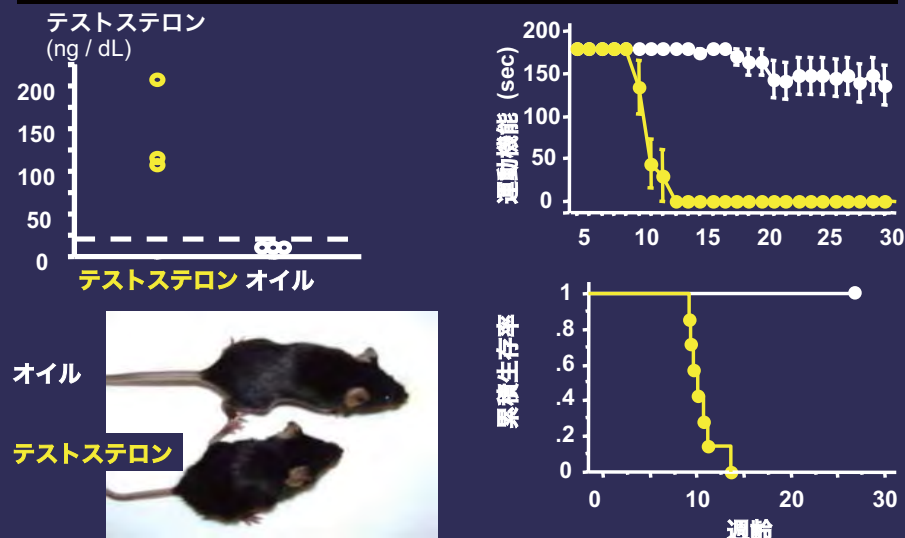
オスマウスの去勢



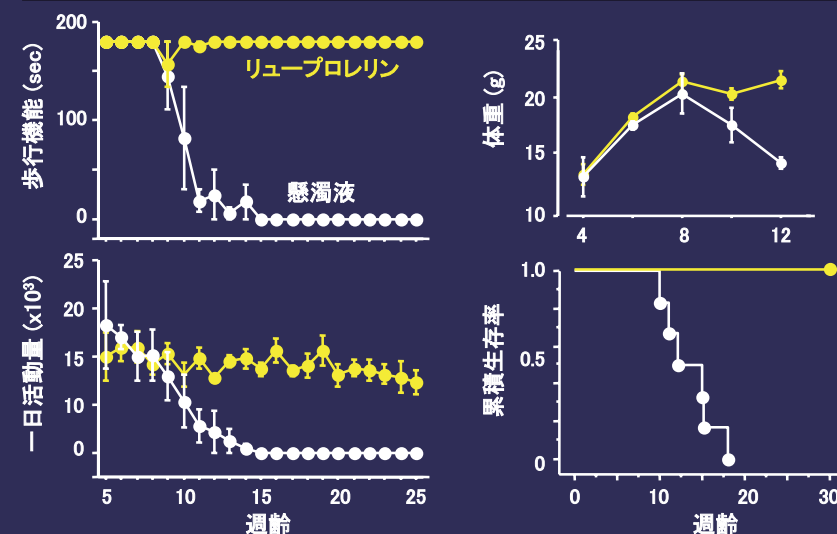
リュープロレリンの効果



メスマウスへのテストステロン投与



運動障害への効果



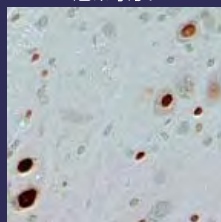
変異ARの核内集積への効果(1)

免疫染色: 抗ポリグルタミン抗体

リュープロレリン

懸濁液

脊髄

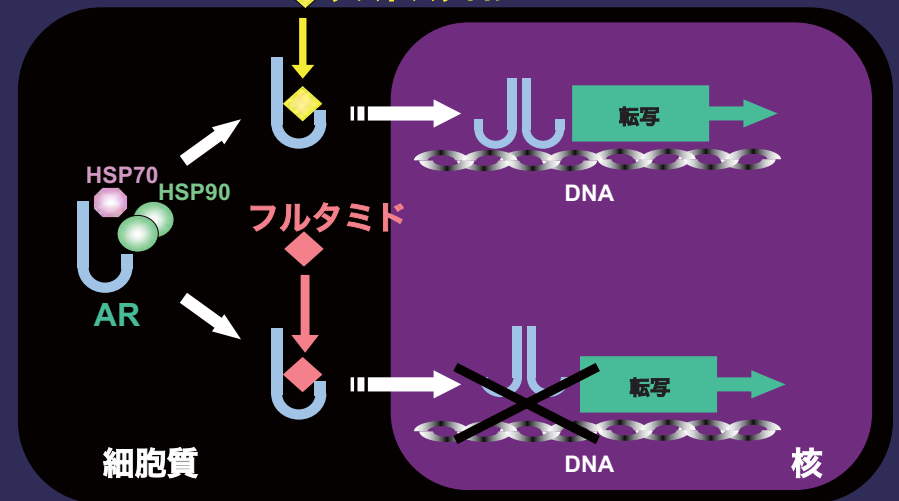


骨格筋



フルタミドの抗アンドロゲン作用

◆テストステロン



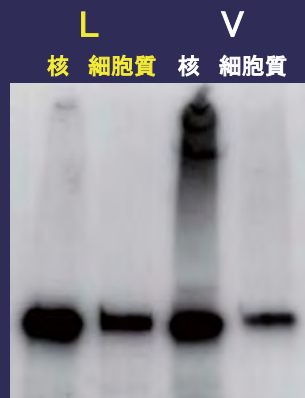
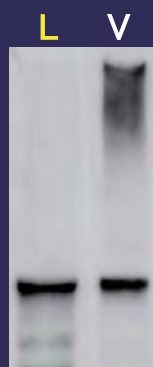
変異ARの核内集積への効果(2)

ウェスタンブロット: 抗AR抗体

脊髄

骨格筋

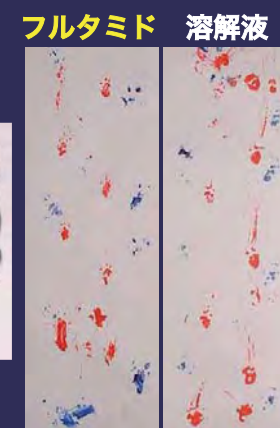
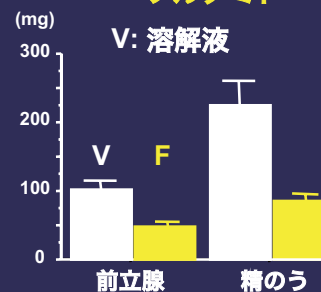
骨格筋



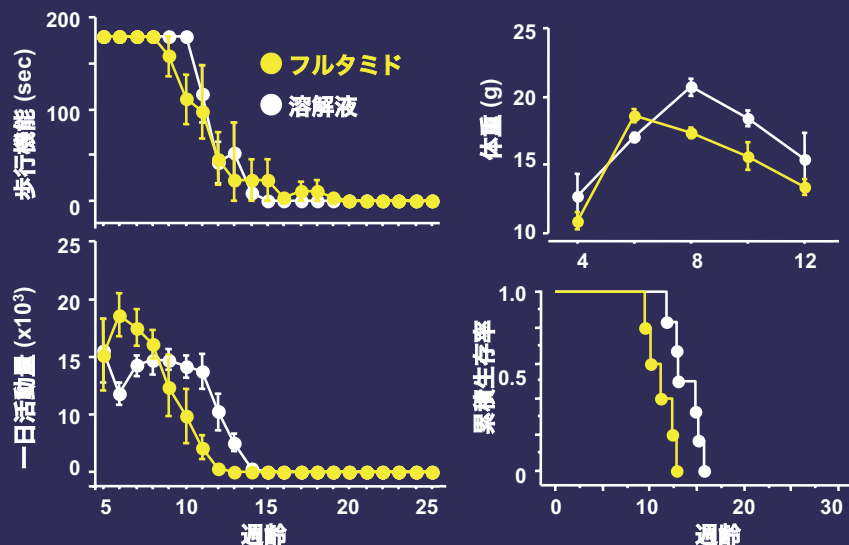
AR ▶

フルタミドの効果

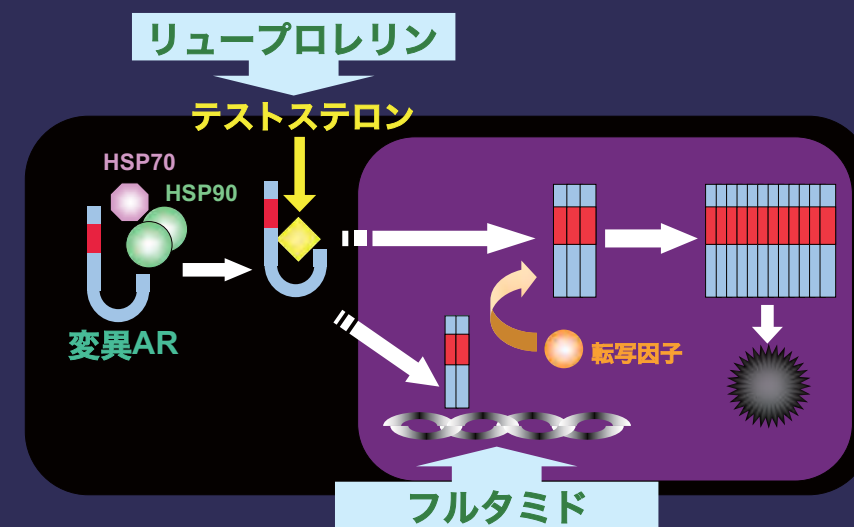
F: フルタミド
V: 溶解液



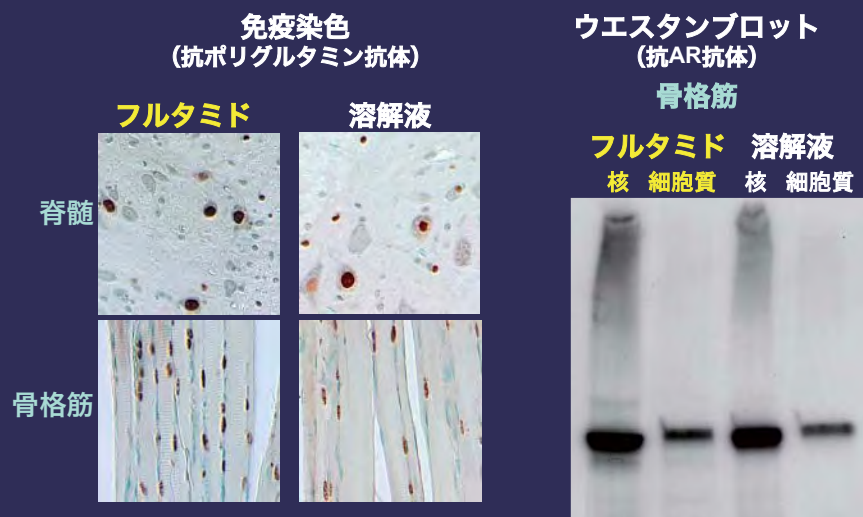
運動障害への効果



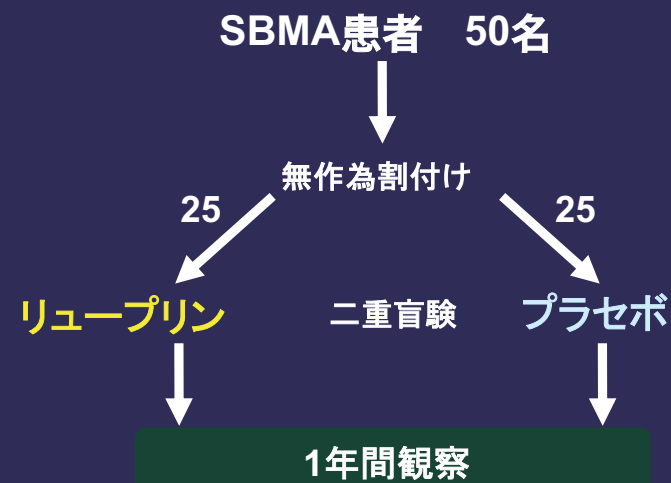
SBMAに対する抗アンドロゲン療法



変異ARの核内集積への効果



リュープリン® の臨床試験



ゲノム情報を利用した穀物育種

芦荻基行（生物機能開発利用研究センター）

様々な生物種でゲノム情報が公開される中、穀物で最初にゲノム情報が公開されたのがイネであり、2004年12月にはイネゲノム完全解読宣言（99.99%精度）が行われる予定である。またこれまでに日本のイネゲノム研究プロジェクトによって、遺伝地図の作成や tag ラインの整備など種々の研究ツールが整備されて来た。これらの研究基盤整備は穀物という人類の生存に欠かせない植物においても基礎生物学の研究を可能にしたばかりか、重要農業形質遺伝子の単離や育種への応用を可能にした事を意味する。

世界3大穀物のイネ、ムギ、トウモロコシは人類の食糧として欠くことのできない重要な植物であり、これらの穀物はすべてイネ科に属する。イネのゲノムサイズ(460Mb)はトウモロコシの1/6、オオムギの1/10、コムギの1/40のサイズであり、これら穀物の中で最も小さく、重要農業遺伝子の探索や単離及びそれらを利用した育種に関してイネが最も有利であると言える。またこれらの穀物は同一祖先から進化したと考えられることから、お互いに高い遺伝子の相同性（ゲノムシンテニー）を有する。つまりイネのゲノム研究成果はイネのみならず、他の穀物育種へ応用することも可能である。

世界人口が爆発的に増え続ける一方、環境汚染や地球温暖化・砂漠化による急激な耕地減少が起こっており、発展途上国を中心に慢性的な食糧不足が続いている。またこの食糧不足は今後さらに加速すると予想されている。この深刻な食糧不足を打破するためには、政治・経済的な政策はもちろん、穀物生産量を上昇させる科学的な穀物育種戦略が不可欠である。従来育種ではもはやこの深刻な状況を回避する事はできず、ゲノムサイエンスの進展によってもたらされた情報や道具を上手に利用した穀物の基礎研究と効率的かつ速やかな穀物育種が必要不可欠である。

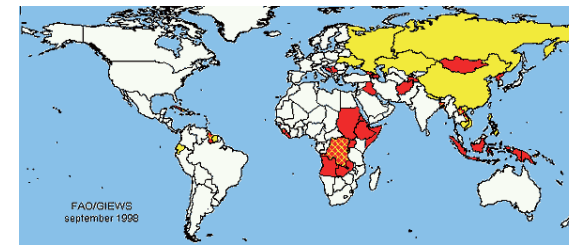
本講演ではゲノムサイエンスを利用した基礎研究と穀物育種への応用を紹介すると共にその課題点・展望について概説したい。

ゲノム情報を利用した穀物育種



芦刈基行
生物機能開発利用研究センター

現在、8億人が栄養不足に直面している



■世界の食糧不足国地図
今期不作が予測される国 本流年度、食料供給不足で特別援助を必要とする国 不作と食料供給不足の起こっている国
FAOホームページ <http://www.faokyoikai.or.jp>

20世紀後半、人間と環境のバランスが崩壊

爆発的な人口の増加

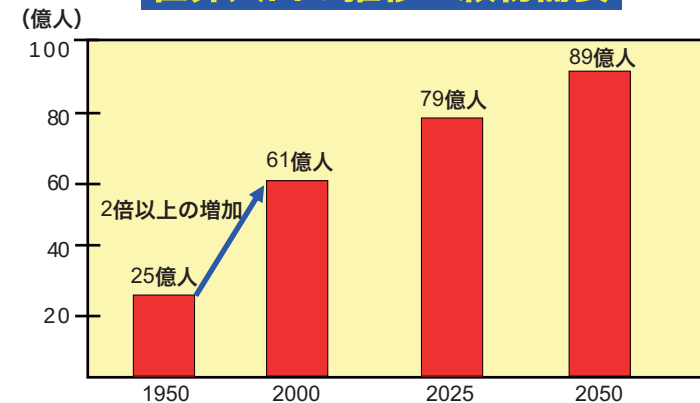
地球温暖化による砂漠化

過度の開発による耕地の減少

医療技術の進歩による平均寿命の上昇

-世界の食糧危機が叫ばれている-

世界人口の推移と穀物需要



1年間に8千万人の人口が増加している。(年1.4%の増加率)

一方食料は1年1%づつしか増えていない。作付け面積は減少中

2050年までに現在の50%の増収が必要

どうやってこの深刻な事態を打破するか？

政治的なアプローチ

1. 世界の作付面積の減少をストップさせる。
2. 人口の増加を抑える。

科学的なアプローチ

食料の増産を目指した穀物育種

作物の形態・能力を改変して収量をあげる。

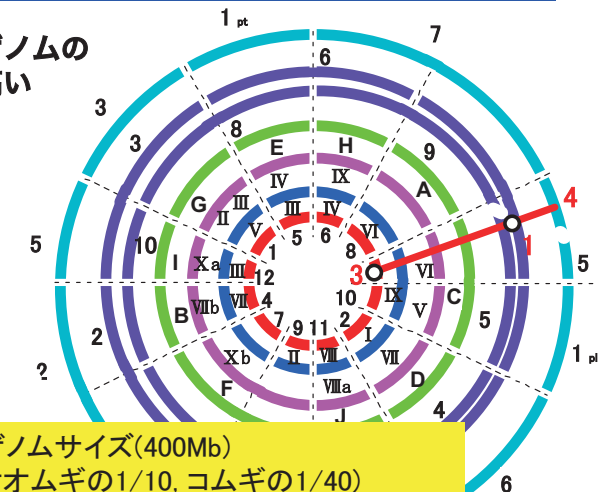
作物の形態・能力を改変して作付け面積を広げる。

穀類の重要性-イネがとても重要になってくる

世界の重要な穀類はイネ科に属する

イネ科の穀物はゲノムの
相同性が高い

イネ
キビ
サトウキビ
ソルガム (牧草)
トウモロコシ
ムギ



and Devos, 19

穀類は人類の主要エネルギー源である

オオムギ



コムギ



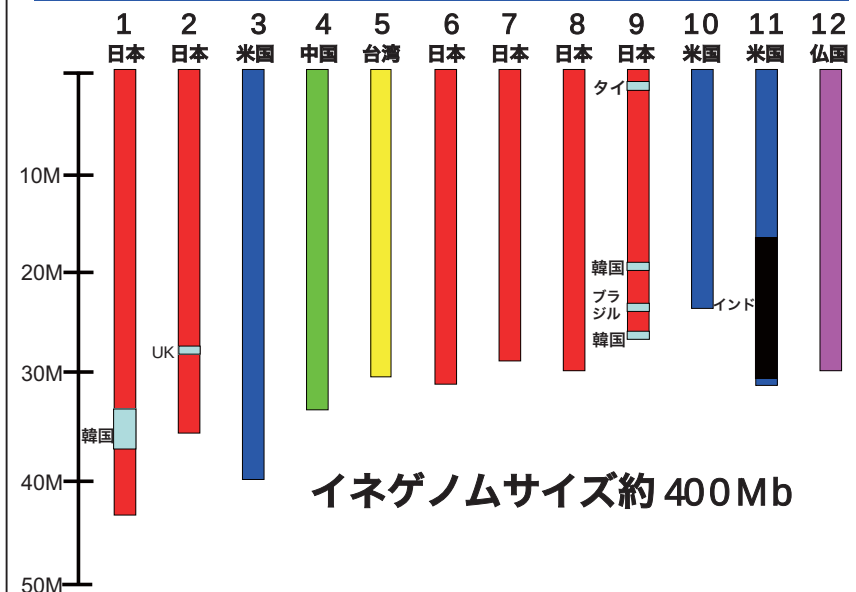
イネ

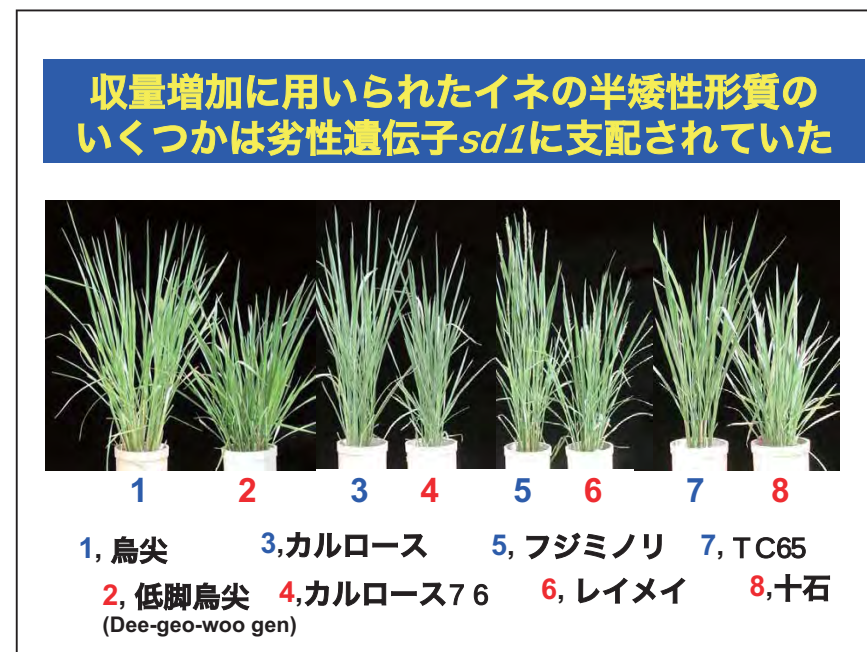
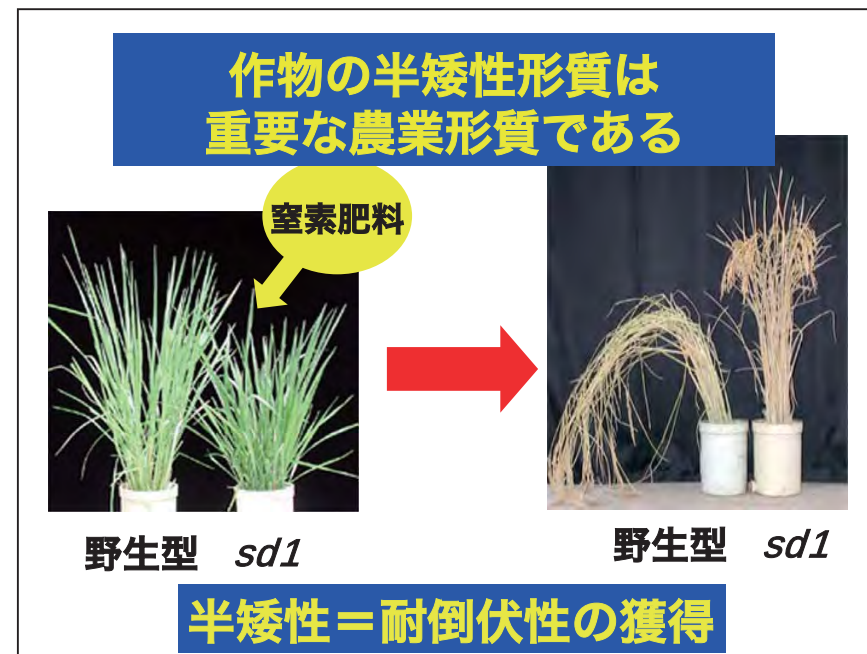
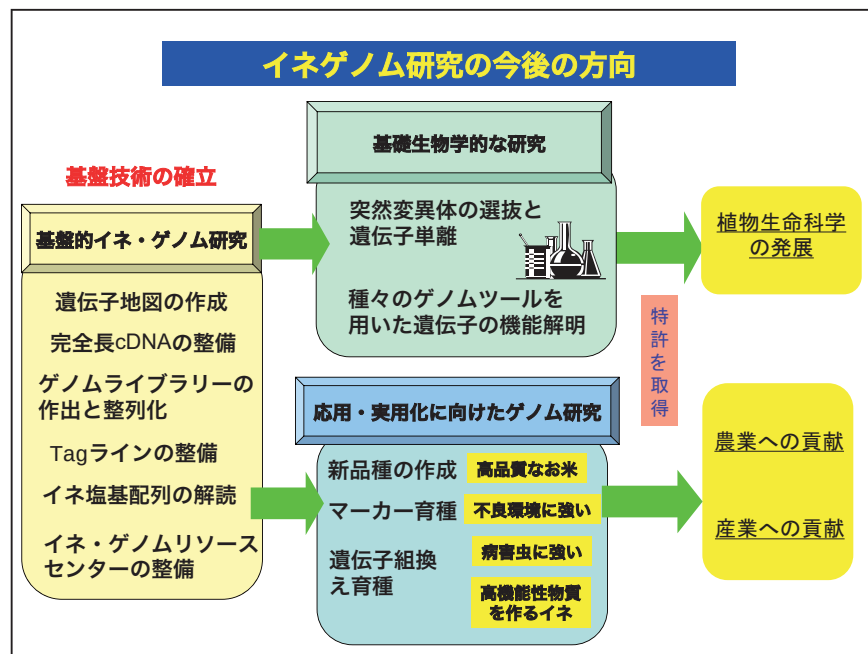


トウモロコシ

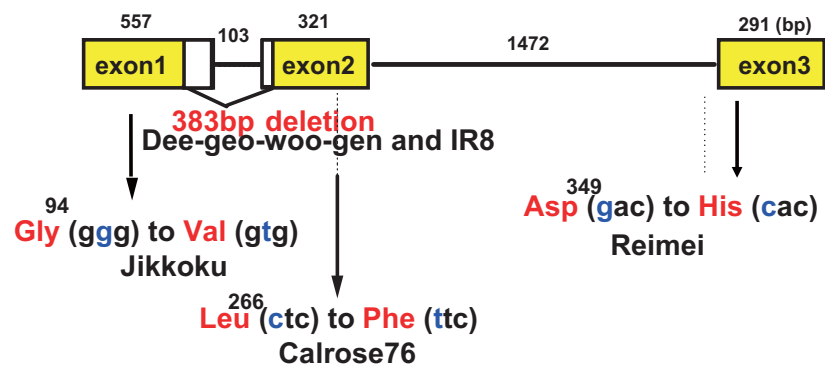


国際イネゲノムコンソーシアムによってイネの全ゲノム配列が決定された

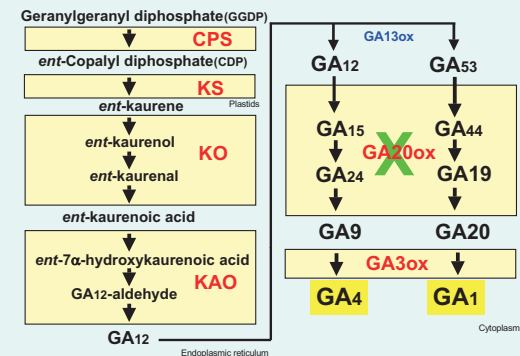




すべての*sd1*変異体において、GA20酸化酵素遺伝子 (*GA20ox2*)内に突然変異が存在した



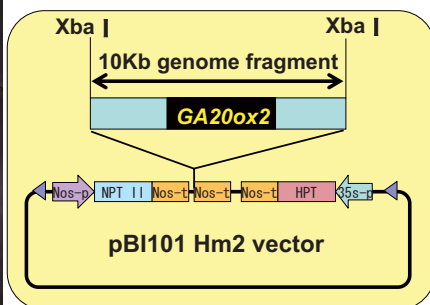
イネにおいても突然変異体を利用して原因遺伝子を単離し機能解析を行うことができる



*GA20ox2*遺伝子の導入により、*sd1*変異体の半矮性形質は野生型に回復する



vector 野生型*GA20ox2*遺伝子を導入



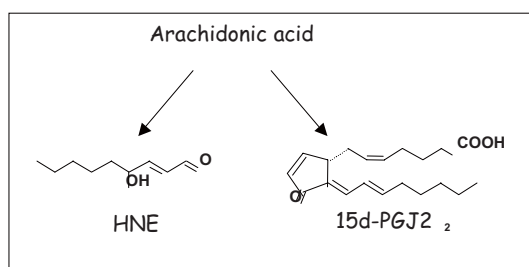
For enough distribution of rice



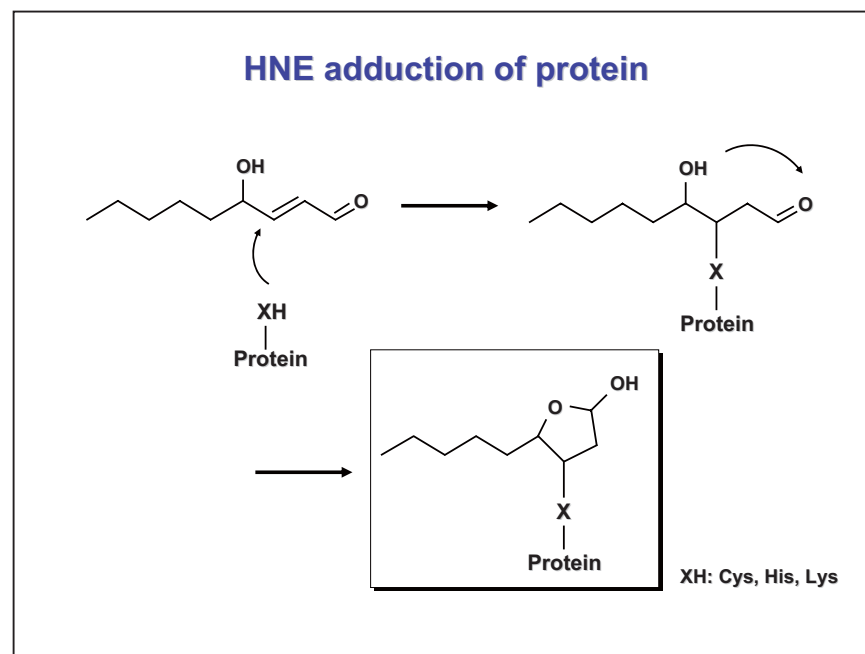
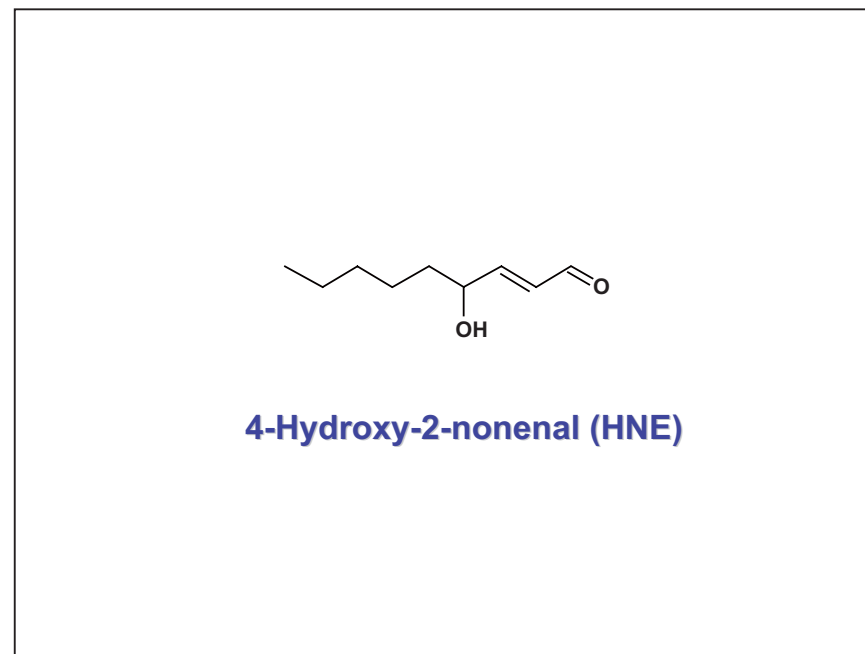
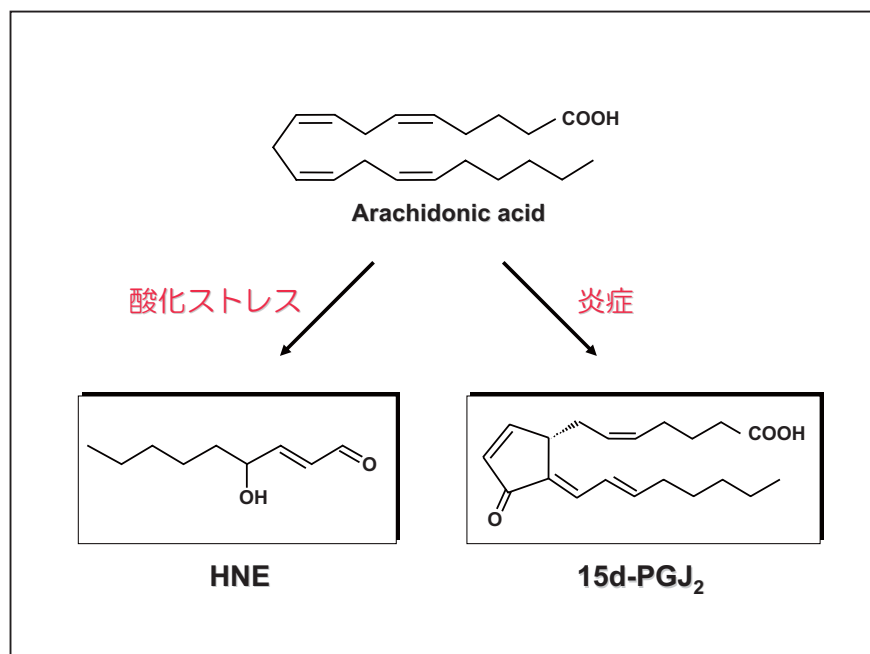
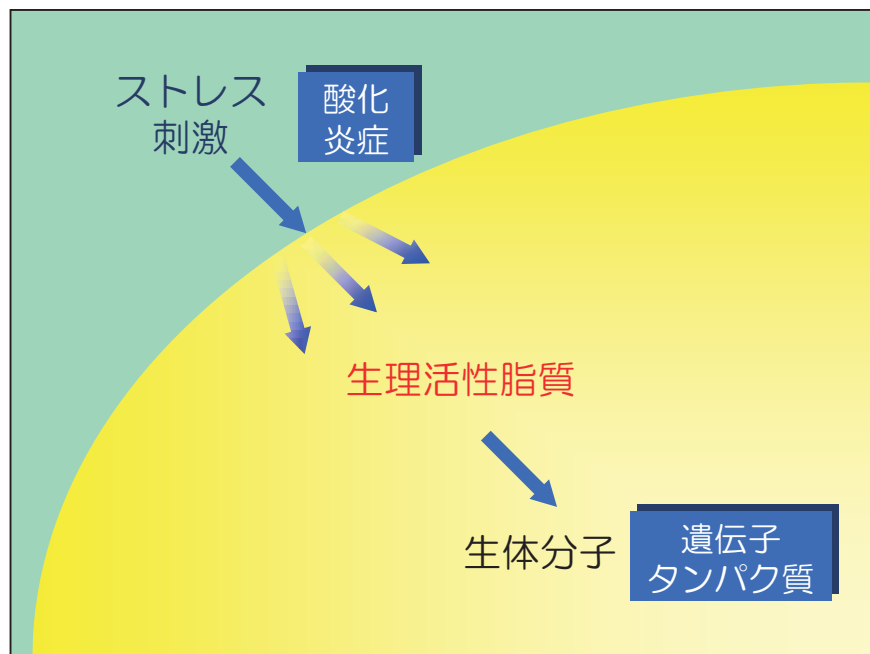
病態に関連した生理活性脂質のケミカルバイオロジー

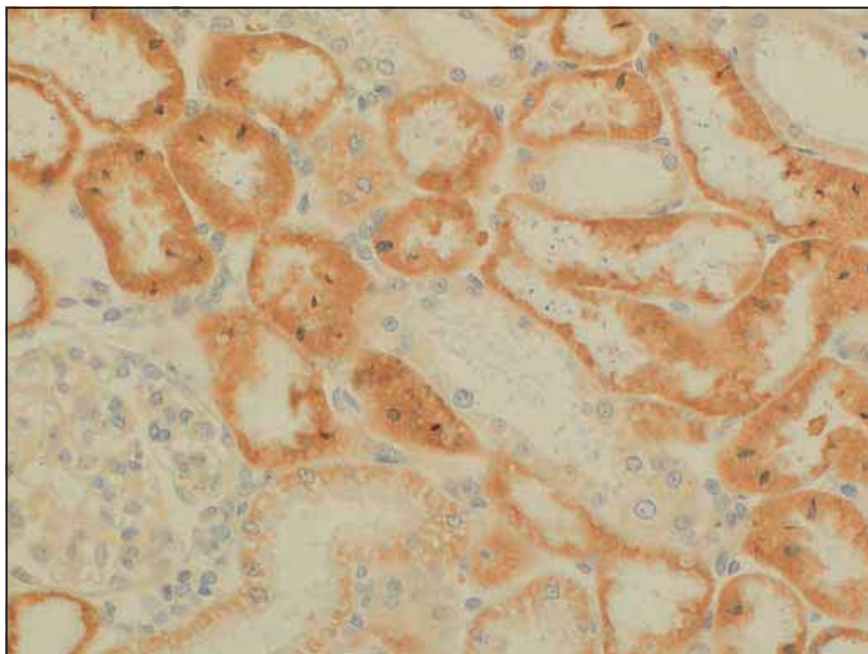
内田 浩二（生命農学研究科）

炎症や酸化ストレスなどの病態では、生体膜を構成するアラキドン酸などの脂肪酸は酸化修飾を受け、親電子性をもつ“酸化脂質”を生成することが知られる。4-ヒドロキシ-2-ノネナール (HNE)などの短鎖アルデヒド類やプロスタグランジンD₂ (PGD₂) 代謝産物であるJ₂型プロスタグランジン類 (15d-PGJ₂など) などはその代表的なものといえる（下図）。

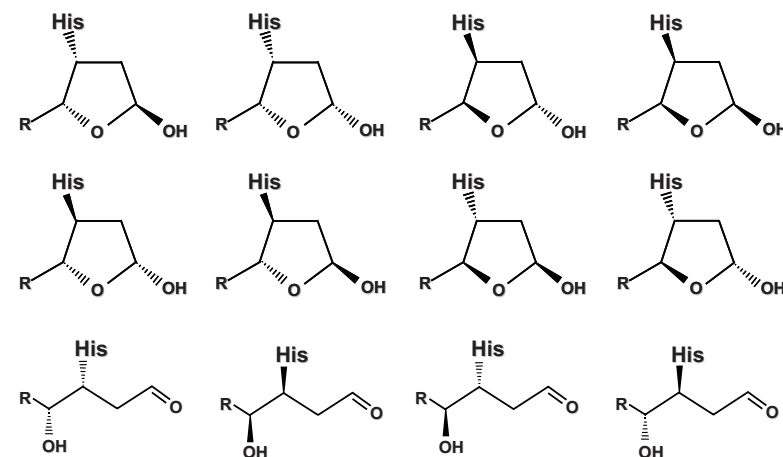


こうした酸化脂質の特徴は、その多くが反応性に富むことであり、細胞内タンパク質の化学修飾が原因となって病変を誘起している可能性が示唆されている。特に、動脈硬化症や神経変性疾患などにおいてみられる細胞変性への関与が示唆されている。そのため、病変発症機構を理解するためにも、こうした反応性活性種によるタンパク質の“翻訳後修飾”の詳細な分子機構の情報は極めて有用である。私たちの研究グループでは、こうした生理活性酸化脂質を分子プローブとした化学生物学的研究 (Chemical Biology) を行ってきた。本講演では、HNE及び 15d-PGJ₂によるタンパク質翻訳後修飾を中心に最新の成果を解説する。HNEに関しては、タンパク質との付加反応を解説し、またHNE修飾タンパク質の検出を目的として作製したモノクローナル抗体と自己免疫疾患である全身性エリテマトーシス (SLE) との関連性についての最新の知見を紹介する。また、15d-PGJ₂に関しては、炎症関連病態における検出法の確立と、15d-PGJ₂標的タンパク質に関する研究成果を紹介する。

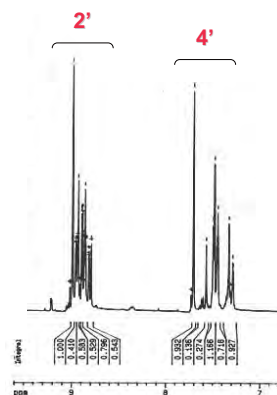


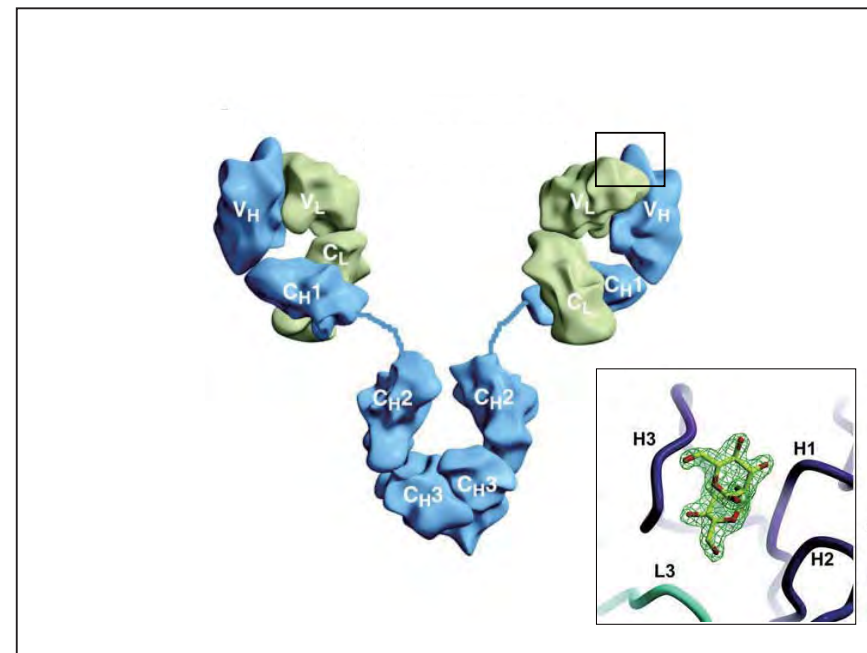
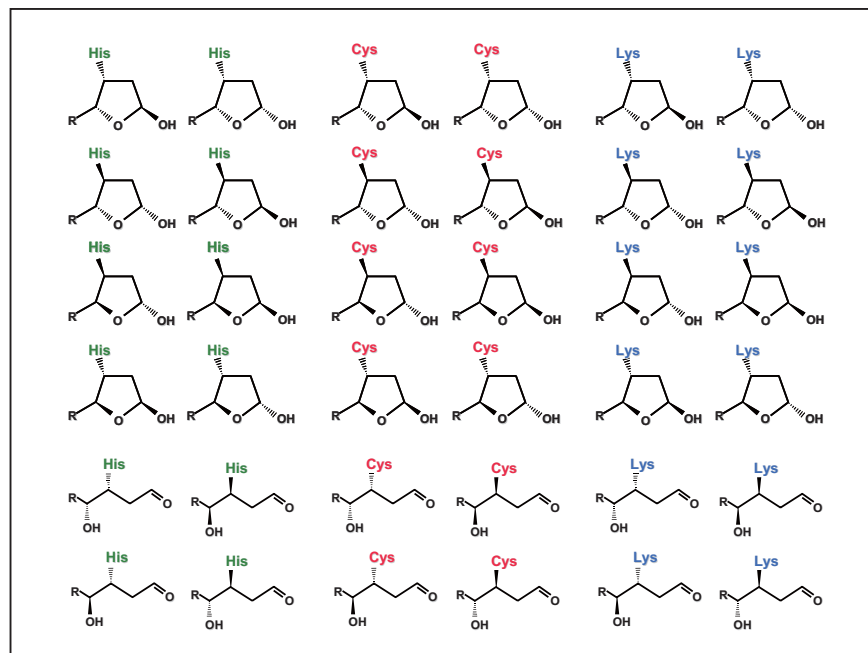


The HNE-histidine configurational isomers

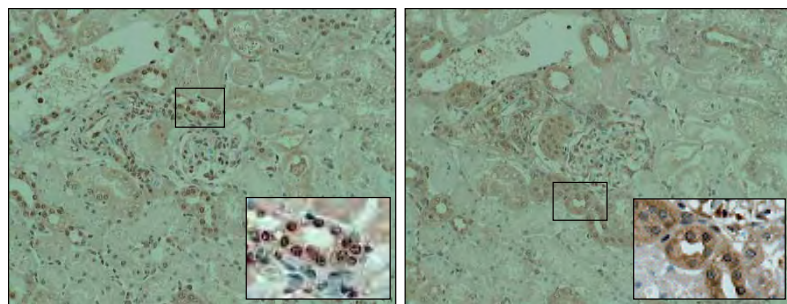


A portion of a ^1H -NMR spectrum of the HNE- N^α -acetylhistidine adduct





Distribution of (R)-HNE and (S)-HNE adducts in the kidney of rats administered with Fe³⁺-NTA



Anti-R (R310)

Anti-S (S412)

Hashimoto et al. JBC (2002)

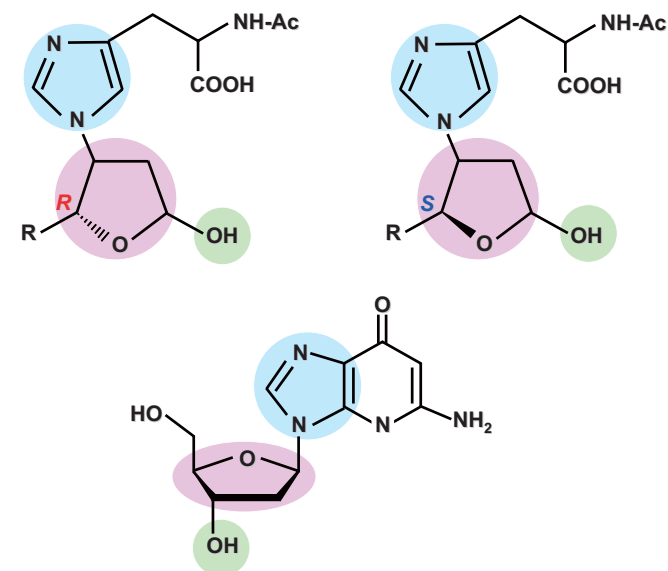
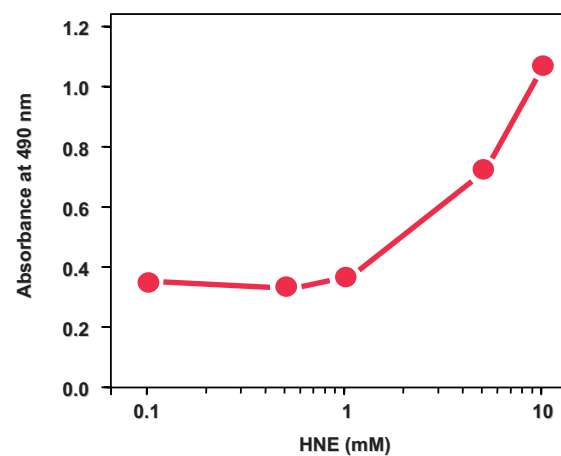
Alignment of the heavy chain sequences of Anti-R and anti-DNA antibody (24.1.2)

R310	?AG	GTG	AAG	CTG	CAG	GAG	TCA	GGA	CCT	GAG	CTG	GTA	AAG	CCT	GGG	GCT	TCA	GTG
Anti-DNA						C	T											
	AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAC	ACA	TTC	ACT	AGT	TAT	GTT	ATG	CAC	TGG
													C					
	CAG	AAG	CCT	GGG	CAG	GGC	CTT	GAG	TGG	ATT	GGA		TAT	ATT	AAT	CCT	TAC	AAT
	AAG	TAC	AAT	GAG	AAG	TTC	AAA	GGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACT	TCA	GAC	AAA	TCC	TCC
	GCC	TAC	ATG	GAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACC	TCT	GAA	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TAC	TGT
											G							

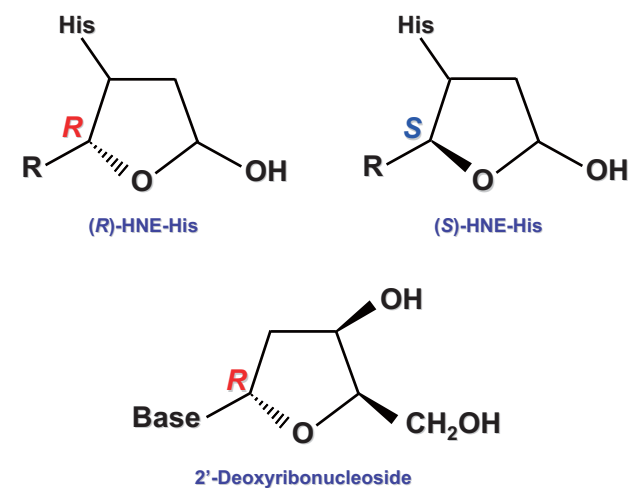
R310 H-chain $\equiv$ Anti-DNA antibody 24.1.2

R32 L-chain $\equiv$ Anti-poly(dC) antibody
R310 L-chain $\equiv$ Anti-polyreactive natural autoantibody

Recognition of HNE protein adducts by an anti-DNA monoclonal antibody



分子相同性 (Molecular mimicry)



座長および発表者リスト （発表順）

松本邦弘	g44177a@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp
森 郁恵	m46920a@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp
伊藤素行	mito@bunshi3.bio.nagoya-u.ac.jp
北島 健	kitajima@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp

町田泰則	yas@bio.nagoya-u.ac.jp
上田泰己	hiroki.ueda@nifty.ne.jp
笹井理生	sasai@is.nagoya-u.ac.jp
成瀬恵治	knaruse@med.nagoya-u.ac.jp
近藤 滋	skondo@bio.nagoya-u.ac.jp

松岡 信	makoto@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp
高橋雅英	mtakaha@med.nagoya-u.ac.jp
室原豊明	murohara@med.nagoya-u.ac.jp
勝野雅央	ka2no@med.nagoya-u.ac.jp
芦 莉基行	ashi@agr.nagoya-u.ac.jp
内田浩二	uchidak@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp

高等研究院フォーラム企画実行委員会ワーキンググループ

近藤孝男	kondo@bio.nagoya-u.ac.jp
中村研三	kenzo@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp,
高橋雅英	mtakaha@med.nagoya-u.ac.jp

