

## 基盤研究施設（分子遺伝学）

教授：玉利真由美 分子遺伝学, アレルギー学  
 准教授：鐘ヶ江裕美 分子ウイルス学, 遺伝子治療  
 講師：大野 裕治 薬理学  
 講師：廣田 朝光 分子遺伝学, アレルギー学

### 教育・研究概要

#### I. 免疫アレルギー疾患研究

##### 1. 免疫アレルギー疾患の分子遺伝学的研究

近年のヒトゲノム情報基盤の整備と配列解析技術の向上により、様々な疾患や関連形質においてゲノムワイド関連解析（GWAS）が行われ、関連遺伝子が多数同定されている。GWASで得られた知見の臨床への応用には、ゲノム多様性の機能に及ぼす影響の解析は必須である。我々はゲノム解析を行い、疾患に関連する遺伝子、パスウェイを同定し、それらの機能解析を通して、疾患発症や重症化のメカニズムの解明を目指している。2017年度は小児食物アレルギー患者におけるアトピー性皮膚炎及び好酸球性食道炎関連バリエーションの関連解析の結果を米国免疫アレルギー学会誌に報告した。IL-13の機能亢進が小児食物アレルギー発症のリスク要因として示唆され、皮膚の保湿成分であるフィラゲリンの機能低下の変異も発症のリスク因子であることが示された。この他、ゲノム医学に関する研究では、乾癬や旧茶のしずく石鹸使用後の小麦アナフィラキシーなど、様々な疾患のGWASによる遺伝要因の解明、及び関連領域の機能解析を行っている。今後も、多因子疾患の遺伝要因の探索及び遺伝子の機能解析を中心に、疾患発症や重症化の分子機構の解明を行い、疾患の予防やバイオマーカーの同定を目指して研究を行う。

##### 2. アレルギー疾患対策に関する研究基盤の構築

2017年度の厚生労働科学特別研究事業の研究班において、免疫アレルギー疾患対策に関する研究基盤の構築についての研究を行った。“国民の一人一人の貢献と国内外の産学官民連携に基づく、ライフステージ毎のPrecision Medicineの実現により、免疫アレルギー患者数の減少と重症患者死亡の根絶を目指す”というビジョンのもと、3つのアクションプランを策定した。

#### II. アデノウイルスベクター（AdV）を用いた発現制御システムの開発

AdVは遺伝子治療だけでなく基礎研究にも応用可能なベクターである。特に肝臓細胞への遺伝子導入効率が高いことが知られており、我々は、肝臓細胞癌への移行リスクが極めて高いB型肝炎ウイルス（HBV）に対する遺伝子治療用ベクターの開発を進めている。昨年度開発したHBVゲノム複製高感度検出系であるHBV103-AdVシステムを用いて抗HBV薬のハイスループットスクリーニングを行い、有用性が期待される化合物を数種類同定するとともに、その作用機序の解析も行った。また、新たに複数の研究機関と共同研究を行い、スクリーニングを継続している。更に、CRISPR/Cas9によるHBVゲノム複製抑制効率を検討し、高いHBVゲノム切断効率を示すガイドRNAの同定に成功するとともに、アルブミンプロモーターを用いた肝臓細胞特異的ゲノム編集システムの開発を行っている。AdVはin vivoへの応用も可能であり、またHBVゲノム切断で非常に高い切断効率を示したことから、Sly病のGusb遺伝子をゲノム編集により修復するためのベクターを構築し、現在ゲノム編集効率を検討している。

#### 「点検・評価」

##### 1. 研究について

本年度は、免疫アレルギー疾患の分子遺伝学的研究において、本学の皮膚科学講座、日本医科大学、大阪大学との共同研究を開始し、乾癬についてのサンプル収集およびGWASで同定された領域の遺伝バリエーションのタイピングを行った。今後、サンプル数を増やすとともに、臨床情報、トランスクリプトーム、メタボロームの情報を統合し、病態に関連するターゲット分子の同定を行う。また、これまで行ってきた研究成果について、国内外の学会、Nature Conference、米国免疫アレルギー学会、日本アレルギー学会、日本人類遺伝学会等にて発表した。

免疫アレルギー疾患対策に関する研究基盤の構築については複数回の班会議を経て、報告書をまとめて厚生労働省に提出した。免疫アレルギー患者数の減少と重症患者の死亡を減らすことを目標に、先制治療を目指す免疫アレルギー疾患の本態解明の研究を国内外の産学官民連携のもとに進めること、そしてライフステージなど免疫アレルギー疾患の特性に着目し、層別化医療による予防・診断・治療の実現を目指すなどのアクションプランをまとめた。

AdVの研究については、HBVゲノム複製高感度

検出系であるHBV103-AdVシステムを用いて、HBVの逆転写活性を阻害する候補化合物の同定に成功するとともに、CRISPR/Cas9とAdVを組み合わせてHBVゲノムの高効率切断に成功した。これらの結果は、日本遺伝子細胞治療学会、欧州遺伝子細胞治療学会、日本ウイルス学会、日本分子生物学会で発表した

## 2. 学内への貢献

本施設では、DNAシーケンサーおよび個体識別検査の受託とともに、次世代シーケンサー、セルソーター、フローサイトメトリー、X線照射装置の管理、運営を業務として行っている。シーケンサーの受託業務、共通機器の運営管理業務は順調に遂行され、学内の研究の進展に寄与できたと考えている。ゲノム情報の臨床への利活用は国内外で進んできており、本学における臨床・基礎講座のゲノム医科学研究の発展に貢献したいと考えている。

がんプロフェッショナル事業の連携校として、本学のがんゲノム医療人養成コースを担当している。がんゲノム解析手法及びPrecision Medicineについてのe-learningの作成を行った。アレルギー拠点病院構想検討チームおよびがんゲノム推進医療チームにオブザーバーとして参加している。

3研究部の共同研究者に対して、11種類のAdVを作製し供給した。

## 3. 教育

学部教育では教員が実習、演習、チュートリアルおよび講義を担当し、教育に参加している。また、研究室配属・選択実習・医学英語論文抄読など、少人数での医学科教育を各教員が自主的に担当している。大学院教育では共通カリキュラム（バイオインフォマティクス、免疫学的研究法）の一部を担当した。また、大学院生の研究指導を行っている。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Kanazawa J<sup>1)</sup>, Masuko H<sup>1)</sup>, Yatagai Y<sup>1)</sup>, Sakamoto T<sup>1)</sup>, Yamada H<sup>1)</sup>, Kaneko Y<sup>1)</sup>, Kitazawa H<sup>1)</sup>, Iijima H<sup>2)</sup>, Naito T<sup>2)</sup> (<sup>2</sup> Tsukuba Med Ctr), Saito T (Ibaraki Natl Hosp), Noguchi E<sup>1)</sup>, Konno S<sup>3)</sup>, Nishimura M<sup>3)</sup> (<sup>3</sup> Hokkaido Univ), Hirota T, Tamari M, Hizawa N<sup>1)</sup> (<sup>1</sup> Tsukuba Univ). Genetic association of the functional CDHR3 genotype with early-onset adult asthma in Japanese populations. *Allergol Int* 2017; 66(4): 563-7.
- 2) Sunadome H<sup>1)2)</sup>, Matsumoto H<sup>1)2)</sup>, Petrova G<sup>1)</sup>, Kanemitsu Y<sup>1)2)</sup>, Tohda Y<sup>2)3)</sup> (<sup>3</sup> Kindai Univ), Hori-

guchi T<sup>2)4)</sup>, Kita H<sup>2)5)</sup> (<sup>5</sup> Takatsuki Red Cross Hosp), Kuwabara K<sup>2)4)</sup> (<sup>4</sup> Fujita Health Univ), Tomii K<sup>2)6)</sup>, Otsuka K<sup>2)6)</sup> (<sup>6</sup> Kobe City Med Ctr), Fujimura M<sup>2)7)</sup>, Ohkura N<sup>2)7)</sup> (<sup>7</sup> Kanazawa Univ), Tomita K<sup>2)3)</sup>, Yokoyama A<sup>2)8)</sup>, Ohnishi H<sup>2)8)</sup> (<sup>8</sup> Kochi Univ), Nakano Y<sup>2)9)</sup>, Oguma T<sup>2)9)</sup> (<sup>9</sup> Shiga Univ Med Sci), Hozawa S<sup>2)10)</sup> (<sup>10</sup> Hiroshima Allergy Respiratory Clin), Nagasaki T<sup>1)</sup>, Ito I<sup>1)</sup>, Oguma T<sup>1)</sup>, Inoue H<sup>1)</sup>, Tajiri T<sup>1)</sup>, Iwata T<sup>1)</sup>, Izuhara Y<sup>1)</sup>, Ono J (Shino-Test), Ohta S<sup>11)</sup>, Hirota T, Tamari M, Yokoyama T (Natl Inst Public Health), Niimi A<sup>1)2)12)</sup> (<sup>12</sup> Nagoya City Univ), Izuhara K<sup>11)</sup> (<sup>11</sup> Saga Med Sch), Mishima M<sup>1)2)</sup> (<sup>1</sup> Kyoto Univ, <sup>2</sup> KiHAC). IL4Rα and ADAM33 as genetic markers in asthma exacerbations and type-2 inflammatory endotype. *Clin Exp Allergy* 2017; 47(8): 998-1006.

- 3) Hirota T, Nakayama T, Sato S<sup>1)</sup>, Yanagida N<sup>1)</sup>, Matsui T<sup>2)</sup>, Sugiura S<sup>2)</sup>, Takaoka Y<sup>3)</sup>, Hizawa N (Tsukuba Univ), Fujieda S (Fukui Univ), Miyatake A (Miyatake Asthma Clin), Sasaki T<sup>4)</sup>, Amagai M<sup>4)</sup> (<sup>4</sup> Keio Univ), Doi S<sup>3)</sup> (<sup>3</sup> Osaka Pref Med Ctr Respiratory Allergic Diseases), Ito K<sup>2)</sup> (<sup>2</sup> Aichi Children's Health Med Ctr), Ebisawa M<sup>1)</sup> (<sup>1</sup> Sagamiara Natl Hosp), Tamari M. Association study of childhood food allergy with GWAS-discovered loci of atopic dermatitis and eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140(6): 1713-6.
- 4) Inoue H<sup>1)2)</sup>, Ito I<sup>1)</sup>, Niimi A (Nagoya City Univ), Matsumoto H<sup>1)</sup>, Oguma T<sup>1)</sup>, Tajiri T<sup>1)</sup>, Iwata T<sup>1)</sup>, Nagasaki T<sup>1)</sup>, Kanemitsu Y<sup>1)</sup>, Morishima T (Osaka Med Ctr Cancer Cardiovascular Diseases), Hirota T, Tamari M, Wenzel SE<sup>2)</sup> (<sup>2</sup> Pittsburgh Univ), Mishima M<sup>1)</sup> (<sup>1</sup> Kyoto Univ). Association of interleukin 1 receptor-like 1 gene polymorphisms with eosinophilic phenotype in Japanese adults with asthma. *Respir Investig* 2017; 55(6): 338-47.
- 5) Hirata J<sup>1)2)3)</sup> (<sup>2</sup> TEIJIN PHRAMA), Hirota T, Ozeki T<sup>4)</sup>, Kanai M<sup>1)4)</sup>, Sudo T<sup>3)</sup>, Tanaka T<sup>3)</sup> (<sup>3</sup> Tokyo Med Dent Univ), Hizawa N (Tsukuba Univ), Nakagawa H, Sato S (Univ Tokyo), Mushiroda T<sup>4)</sup>, Saeki H (Nippon Med Sch), Tamari M, Okada Y<sup>1)4)</sup> (<sup>1</sup> Osaka Univ, <sup>4</sup> RIKEN). Variants at HLA-A, HLA-C, and HLA-DQB1 confer risk of psoriasis vulgaris in Japanese. *J Invest Dermatol* 2018; 138(3): 542-8.
- 6) Kanazawa J<sup>1)</sup>, Masuko H<sup>1)</sup>, Yamada H<sup>1)</sup>, Yatagai Y<sup>1)</sup>, Sakamoto T<sup>1)</sup>, Kitazawa H<sup>1)</sup>, Iijima H<sup>2)</sup>, Naito T<sup>2)</sup> (<sup>2</sup> Tsukuba Med Ctr), Hirota T, Tamari M, Hizawa N<sup>1)</sup> (<sup>1</sup> Tsukuba Univ). How important is al-

- lergic sensitization as a cause of atopic asthma? *Allergol Int* 2018; 67(2) : 292-4. Epub 2017 Nov 2.
- 7) Dahlin A<sup>1</sup>), Qiu W<sup>1</sup>), Litonjua AA<sup>1</sup>), Lima JJ (Nemours Clin), Tamari M, Kubo M (RIKEN), Irvin CG<sup>2</sup>), Peters SP (Wake Forest Univ), Wu AC<sup>1</sup>), Weiss ST<sup>1</sup>)<sup>3</sup>) (<sup>3</sup> Partners Health Care), Tantisira KG<sup>1</sup>)<sup>2</sup>) (<sup>1</sup> Brigham Women's Hosp Harvard Med Sch, <sup>2</sup> Univ Vermont). The phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathway is a determinant of zileuton response in adults with asthma. *Pharmacogenomics J* 2018 Jan 3. [Epub ahead of print]
- 8) Chida T<sup>1</sup>), Ito M<sup>1</sup>), Nakashima K<sup>1</sup>), Kanegae Y, Aoshima T<sup>1</sup>), Takabayashi S<sup>1</sup>), Kawata K<sup>1</sup>), Nakagawa Y<sup>2</sup>), Yamamoto M (Osaka Univ), Shimano H<sup>2</sup>) (<sup>2</sup> Tsukuba Univ), Matsuura T, Kobayashi Y<sup>1</sup>), Suda T<sup>1</sup>), Suzuki T<sup>1</sup>) (<sup>1</sup> Hamamatsu Univ Sch Med). Critical role of CREBH-mediated induction of transforming growth factor  $\beta$ 2 by hepatitis C virus infection in fibrogenic responses in hepatic stellate cells. *Hepatology* 2017; 66(5) : 1430-43.
- 9) Oki H<sup>1</sup>), Yazawa T<sup>1</sup>), Baba Y<sup>1</sup>), Kanegae Y, Sato H<sup>2</sup>), Sakamoto S<sup>1</sup>), Goto T<sup>1</sup>), Saito I<sup>2</sup>) (<sup>2</sup> Univ Tokyo), Kurahashi K<sup>1</sup>) (<sup>1</sup> Yokohama City Univ). Adenovirus vector expressing keratinocyte growth factor using CAG promoter impairs pulmonary function of mice with elastase-induced emphysema. *Microbiol Immunol* 2017; 61(7) : 264-71.
- 10) Honda M, Yogosawa S, Kamada M, Kamata Y, Kimura T, Koike Y, Harada T, Takahashi H, Egawa S, Yoshida K. A novel near-infrared fluorescent protein, iRFP720, facilitates transcriptional profiling of prostate cancer bone metastasis in mice. *Anticancer Res* 2017; 37(6) : 3009-13.
- ## II. 総 説
- 1) 玉利真由美, 広田朝光. 【アレルギーNext Stage】アレルギーと遺伝. *小児内科* 2017; 49(1) : 16-21.
- 2) 玉利真由美, 広田朝光. 【免疫学の新展開と呼吸器疾患】自然免疫機構と呼吸器疾患. *LUNG* 2017; 25(4) : 359-61.
- 3) 広田朝光, 玉利真由美. 【アトピー性皮膚炎】アトピー性皮膚炎の疾患感受性遺伝子. *医と薬学* 2017; 74(4) : 373-8.
- ## III. 学会発表
- 1) Tamari M. (Afternoon Session: Immune and Inflammatory Diseases) Genetic study of allergic diseases. *Genomic Variation in Precision Medicine* 2017: Nature Conference. Guangzhou, May.
- 2) Tamari M. (Scientific Program Courses 1003: From Genome-Wide to Worldwide: Allergic Diseases around the Globe) Development of food allergy in genetically similar populations living in distinct locations. AAAAI (American Academy of Allergy, Asthma & Immunology)/WAO (World Allergy Organization) Joint Congress. Orlando, Mar.
- 3) 玉利真由美, 広田朝光. (シンポジウム4: 遺伝子から解くアレルギーの謎) アレルギーの遺伝要因の探索. 第66回日本アレルギー学会学術大会. 東京, 6月. [アレルギー 2017; 66(4-5) : 381]
- 4) 金澤 潤<sup>1</sup>), 増子裕典<sup>1</sup>), 北沢晴奈<sup>1</sup>), 谷田貝洋平<sup>1</sup>), 野口恵美子<sup>1</sup>), 飯島弘晃<sup>2</sup>), 内藤隆志<sup>2</sup>) (<sup>2</sup> 筑波メディカルセンター病院), 玉利真由美, 広田朝光, 坂本透<sup>1</sup>), 檜澤伸之<sup>1</sup>) (<sup>1</sup> 筑波大). (ミニシンポジウム48: アレルギー疾患の疫学・発症因子・発症予防) 日本人集団における *TYRO3* 遺伝子多型がアレルギー疾患に与える影響. 第66回日本アレルギー学会学術大会. 東京, 6月. [アレルギー 2017; 66(4-5) : 637]
- 5) 玉利真由美. (講義: 遺伝子から見た免疫とアレルギー) アレルギー疾患と遺伝要因. 日本アレルギー学会第4回総合アレルギー講習会. 横浜, 12月. [日本アレルギー学会第4回総合アレルギー講習会テキスト 2017; 159-61]
- 6) 平田 潤<sup>1</sup>), 広田朝光, 大関健志<sup>2</sup>), 蒔田泰誠<sup>2</sup>) (<sup>2</sup> 理化学研究所), 佐伯秀久 (日本医科大), 玉利真由美, 岡田随象<sup>1</sup>) (<sup>1</sup> 大阪大). (一般口演11: 免疫遺伝学) HLA-A, HLA-C, HLA-DQA1 遺伝子変異が日本人集団で乾癬発症リスクを有する. 日本人類遺伝学会第62回大会. 神戸, 11月. [日本人類遺伝学会プログラム・抄録集 2017; 62回: 145]
- 7) 広田朝光, 中山次久, 藤枝重治 (福井大), 谷口正実 (国立病院機構相模原病院), 小島博己, 玉利真由美. (一般ポスター: 多因子遺伝2) TSLP 遺伝子多型と慢性副鼻腔炎における関連解析. 日本人類遺伝学会第62回大会. 神戸, 11月. [日本人類遺伝学会プログラム・抄録集 2017; 62回: 62]
- 8) 玉利真由美, 廣田朝光. (ポスター) 小児食物アレルギー患者におけるアトピー性皮膚炎及び好酸球性食道炎関連バリエーションの関連解析. 第134回成医会総会. 東京, 10月.
- 9) Maekawa A, Suzuki M<sup>1</sup>), Nagamoto S (Tokyo Univ Sci), Saito I<sup>1</sup>) (<sup>1</sup> Univ Tokyo), Kanegae Y. (Oral Session XIV: Basic Science 3) The novel elimination system of HBV DNA using adenovirus vector expressing Cas9 and multiplex guide RNAs. 第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会. 岡山, 7月.
- 10) Maekawa A, Kanegae Y. (Poster) The novel elimination system of HBV DNA using adenovirus vector

expressing Cas9 and guide RNAs. 25th Anniversary Congress of the European Society of Gene & Cell Therapy (ESGCT). Berlin, Oct.

- 11) 鐘ヶ江裕美. (一般公開フォーラム: 着実に実り始めた遺伝子治療) ゲノム編集による遺伝子治療の現況. 第23回日本遺伝子細胞治療学会. 岡山, 7月.
- 12) 鐘ヶ江裕美. (口頭) 遺伝子治療の現況とゲノム編集による未来. 第4回包括的医療科学学術研究会・第5回TOKYO疼痛緩和次世代研究会合同研究会. 東京, 8月.
- 13) 山崎 学<sup>1)</sup>, 松田法恵<sup>1)</sup>, 鈴木まりこ<sup>2)</sup>, 鐘ヶ江裕美, 斎藤 泉<sup>2)</sup> (<sup>2)</sup> 東京大), 柴崎正勝<sup>1)</sup> (<sup>1)</sup> 微生物化学研究所). (ポスター) Identification of an anti-HBV agent targeting viral genome replication using adenovirus vector. 第65回日本ウイルス学会学術総会. 大阪, 10月.
- 14) 前川 文, 永本紗也佳 (東京理科大), 鐘ヶ江裕美. (ポスター) CRISPR/Cas9 搭載アデノウイルスベクターを用いた細胞特異的ゲノム編集システム. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 神戸, 12月.

#### IV. 著 書

- 1) Tamari M, Hirota T. Part III : Genetics 5. Genome-wide association study for atopic dermatitis in the Japanese population. In : Katayama I<sup>1)</sup>, Murota H<sup>1)</sup> (<sup>1)</sup> Osaka Univ), Satoh T (Natl Defense Med Coll), eds. Evolution of Atopic Dermatitis in the 21st Century. Singapore : Springer Nature Singapore, 2018. p.45-58.
- 2) 玉利真由美, 広田朝光. 2章 : 気管支喘息の危険因子と病態生理 2. 気管支喘息のゲノム解析. 三嶋理晃 (京大) 総編集, 井上博雅 (鹿児島大) 専門編集. 呼吸器疾患診断治療アプローチ 1 : 気管支喘息. 東京 : 中山書店, 2017. p.28-32.

### 基盤研究施設 (分子細胞生物学)

教 授: 馬目 佳信	分子細胞生物学, 分子診断・治療学
教 授: 岩本 武夫	生化学, 分子生物物理
教 授: 立花 利公	微細形態学
教 授: 坪田 昭人	肝臓病学
講 師: 池田 恵一	分子細胞生物学, 内分泌学
講 師: 藤岡 宏樹	分析化学

#### 教育・研究概要

##### I. 脳腫瘍細胞における補助療法の転写因子の活性化とメタルプロテナーゼ発現への影響

悪性脳腫瘍, 特に悪性神経膠腫や神経膠芽腫は予後が悪く難治性であるため手術療法とともに放射線療法や化学療法などが併用される。標準的な補助療法として用いられる放射線照射や抗悪性腫瘍薬であるテモゾロミドが脳腫瘍の浸潤能へ影響を及ぼすメタルプロテナーゼの活性を上昇させないことが分かっていたがその理由を解明するために本年度これらの遺伝子の転写への影響を与える因子への影響について調べた。その結果, 放射線照射やアルキル化剤の投与は細胞修復を促す一連の転写因子を活性化していることが示され, 転写因子自体の転写産物の亢進をももたらしていることが分かった。メタルプロテナーゼ・ファミリーのうち基底膜へ影響を及ぼすものとしてMMP2とMMP9がある。プロモーターの塩基配列からこのうちMMP2は転写因子の影響を受けにくいMMP9は被攻撃性が高いためどの因子が脳腫瘍の浸潤性に優位に関わっているかについて解明を進めている。

##### II. 甲状腺がんにおける Hippo 調節異常の検討

本施設では外科学講座 武山 浩教授により作成された甲状腺乳頭がんに対するモノクローナル抗体を用いた臨床応用研究を進めている。細胞が増殖する時, 各種の増殖因子はPI3キナーゼとPDキナーゼ1を介してHippo複合体を分離させ, エフェクターであるYAPを脱リン酸化して核移行させることが知られているが, 抗体の認識する抗原と細胞増殖の関係調べるために細胞内でのYAPの局在と移行について調べたところ, 抗原を産生するSW1736細胞では通常リン酸化されて細胞質内に係留されているYAPタンパクが細胞接触や血清欠乏状態でも脱リン酸化されて核に存在することが今回明らかとなった。細胞の増殖シグナルがこの経路に