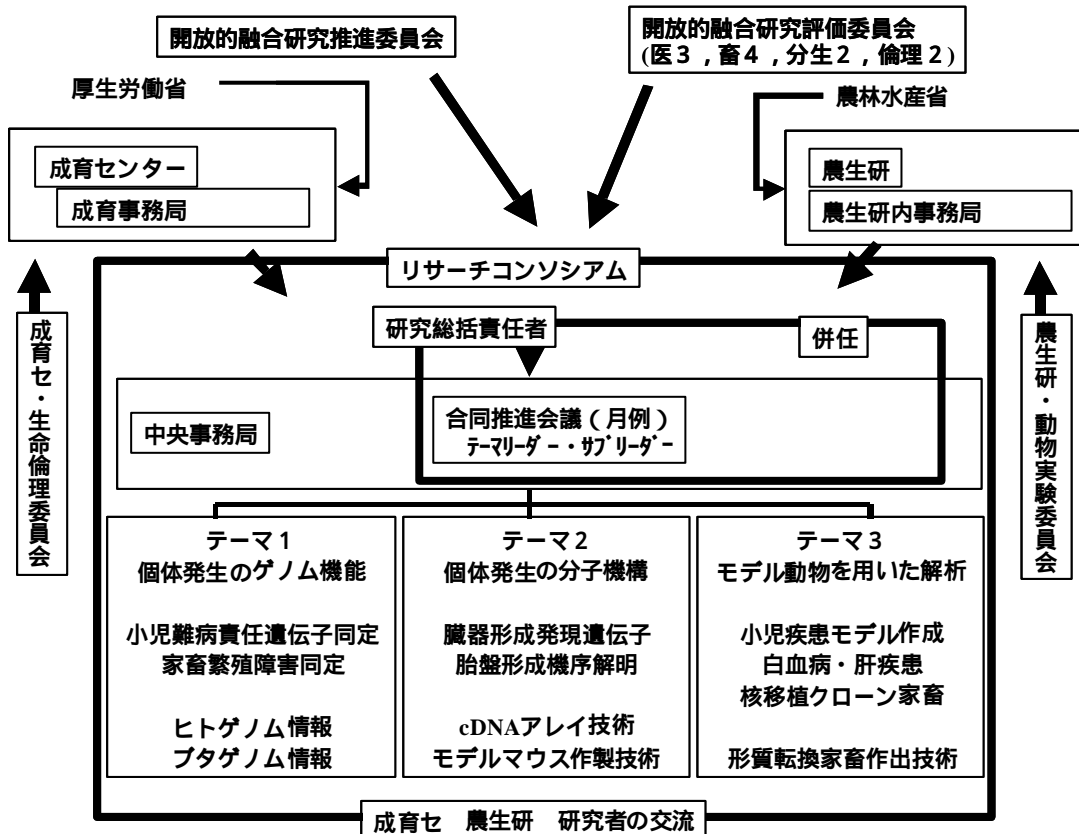


個体発生のゲノム機能と分子機構の解明

融合研究機関：国立成育医療センター研究所、農業生物資源研究所

研究の概要・目標	諸外国の現状等	研究進展・成果がもたらす利点
<p>1 研究の目標 個体発生の異常に基づく小児難病および家畜繁殖障害の克服などにより、次世代の健康保持に貢献する。</p> <p>3年後の目標 先天性疾患遺伝子絞り込み ヤギ体細胞移植技術の改良</p> <p>5年後の目標 新規疾患遺伝子の同定(2~3) ヒトタンパク合成ヤギの開発</p> <p>2 研究の内容 遺伝子工学による小児難病責任遺伝子、ブタ繁殖障害遺伝子の同定 シグナル伝達や蛋白解析による臓器形成機序、妊娠維持機序の解明 形質転換家畜による医療への応用(白血病や再生医療モデル)と新規繁殖技術開発</p> <p>3 新規性 ヒトと家畜のゲノム情報相互補完による目標達成促進 個体・臓器発生の遺伝子カタログ作成 家畜疾患モデル作成</p>	<p>1 現状 疾患遺伝子、家畜繁殖障害遺伝子同定は各々独立した研究。個体発生機序や妊娠機構の解明は世界的な重要課題であり多数の研究が行われている。 動物工場や移植用臓器などの家畜の作出に関する研究は開始しており特許取得のものもある。</p> <p>2 我が国の水準 小児難病遺伝子同定や家畜繁殖障害遺伝子情報研究(特にブタ)は世界と互角。 アドレナリン受容体の解明、ヒト胎盤レプチンの発見などは世界をリード。 医学応用に向けた家畜の作出研究は遅れているが、クローン技術などの発生工学技術は世界と同程度。</p>	<p>1 世界との水準の比較 家畜繁殖障害遺伝子同定は、ヒト疾患ゲノム情報の応用によりトップレベルとなる。 発生や臓器形成の発現遺伝子カタログが完成すれば世界中が利用する。胎盤形成物質の発見で測定法、診断薬などの独自技術が開発できる。 クローン技術などでのモデル家畜作成で世界の水準に達する。</p> <p>2 波及効果 新しい家畜繁殖技術の開発は効率的な家畜生産をもたらす。 発現遺伝子カタログは特許を取得できる。 疾患モデル家畜は、治療法開発や薬剤開発の研究を促進する。</p>



個体発生のゲノム機能と分子機構の解明

テーマ名	国立成育医療センター研究所	農業生物資源研究所	融合の形態
テーマ1：個体発生のゲノム機能	<p><u>研究内容</u> 腎、肝奇形等のヒト先天性形成異常症の責任遺伝子を探索する。</p> <p><u>融合のメリット</u> 農生研からの研究者、農生研に派遣した研究者から、家畜繁殖障害の遺伝子解析情報技術をスムーズに導入できる。</p>	<p><u>研究内容</u> ブタ繁殖障害家計を用いて致死性遺伝子を探索する。</p> <p><u>融合のメリット</u> 成育セからの研究者、成育セに派遣した研究者から、小児疾患の遺伝子解析情報技術をスムーズに導入できる。</p>	<p>両研究所のゲノム解析専門家を相互に併任し、双方の研究の加速を図る。</p> <p>具体的には、成育セから農生研への併任者は、主にブタ胚の発生過程を担当し、ヒトの流産研究への応用を図る。</p> <p>農生研から成育セへの併任者は、主にヒト遺伝子ライブラリー探索を担当し、家畜の繁殖障害研究へ応用する。</p> <p>併任(1) 成育セ(13) 農生研(7) 併任(1)</p>
テーマ2：個体発生の分子機構	<p><u>研究内容</u> 胎児の発生・分化ならびにその障害における各種分子の機能をシグナル伝達、細胞死(アポトーシス)、細胞周期調節の面から解明し疾患の制御法開発に用いる。</p> <p><u>融合のメリット</u> 農生研からの研究者、農生研に派遣した研究者から、家畜の個体発生の分子・生理機構に関する情報・技術をスムーズに導入できる。</p>	<p><u>研究内容</u> 家畜(ブタ等)を用いて、個体発生および維持機構を分子生物学な観点から解明し、新規繁殖技術開発に応用する。</p> <p><u>融合のメリット</u> 成育セからの研究者、成育セに派遣した研究者から、ヒトの個体発生の分子・生理機構に関する情報・技術をスムーズに導入できる。</p>	<p>両研究所の胎子胎盤機能解析専門家を相互に併任し、双方の研究の加速を図る。</p> <p>具体的には、成育セの胎子胎盤機能解析の専門家を併任として農生研に派遣し、主にヒトで多数発見されている接着関連物質の探索を行う。</p> <p>農生研の胎子胎盤機能解析専門家を併任によって成育セに派遣し、主にヒト成長ホルモン等生理活性物質の産生等を担当し、家畜繁殖障害研究への応用を図る。</p> <p>併任(2) 成育セ(9) 農生研(7) 併任(1)</p>
テーマ3：モデル動物を用いた解析	<p><u>研究内容</u> 小児難病のモデル家畜の作成を目指した基礎研究を実施する。</p> <p><u>融合のメリット</u> 農生研からの研究者、農生研に派遣した研究者から細胞株の作出技術がスムーズに導入され、細胞レベルでの基礎実験が加速される。</p>	<p><u>研究内容</u> 形質転換家畜作出システムを確立するため、遺伝子導入・核移植等の技術を高度化する。</p> <p><u>融合のメリット</u> 成育セからの研究者、成育セに派遣した研究者からヒト遺伝子の取扱い技術がスムーズに導入される。また、医学利用がスムーズに行える。</p>	<p>両研究所の遺伝子工学関係の専門家を相互に併任し、双方の研究の加速を図る。</p> <p>具体的には、農生研から細胞株作出の専門家を併任により、成育セに派遣し、ヒト肝細胞や血球を維持する細胞株作出を担当し、家畜繁殖障害研究へ応用する。</p> <p>成育セの発生工学専門家を併任により、農生研に派遣し、ヒト疾患遺伝子の家畜への導入を担当し、医学利用研究に応用する。</p> <p>併任(2) 成育セ(10) 農生研(7) 併任(1)</p>

所要経費

(単位：百万円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	H10 年度	H11 年度	H12 年度	H13 年度	H14 年度	所用 経費
テーマ1．個体発生のゲノム機能								
(1) ヒト疾患遺伝子の探索とゲノム異常の同定	国立成育医療センター研究所(成育セ)	山田正夫	70	47	56	79	56	308
(2) 家畜の繁殖障害ゲノム領域の推定	農業生物資源研究所(農生研)	安江 博	27	45	60	69	66	267
テーマ2．個体発生の分子機構								
(1) 胎子胎盤相互作用の分子機構	農生研	居在家義昭 橋爪一善	25	29	40	25	10	129
(2) 分子伝達機構の解明	成育セ	辻本豪三	60	65	65	40	40	270
(3) 重点課題1．着床・胎盤特異的cDNAマイクロアレイの作成と胎盤機能の検索	成育セ 農生研	辻本豪三 橋爪一善				20	16	36
テーマ3．モデル動物を用いた解析								
(1) 形質転換家畜の作出と解析	農生研	徳永智之	80	55	40	35	26	236
(2) 肝組織再構築に関する研究	成育セ	鈴木盛一 絵野沢伸	70	60	30	55	50	265
(3) 血球の発生・分化と制御	成育セ	藤本純一郎	70	70	80	45	45	310
(4) 重点課題2．再生医療モデル作成を目指した免疫不全ブタ作出	成育セ 農生研	藤本純一郎 安江 博 徳永智之				10	14	24
合計			402	371	371	378	323	1,845

研究成果の概要

総括

本研究は、個体発生・分化の障害により生じる成育疾患および家畜の繁殖障害について、ゲノム機能と分子機構に着目して解明することを目的とした。医療分野では成育疾患の克服による健全な次世代の育成が求められている。また、畜産分野では家畜の繁殖障害の克服が急務である。いずれの場合も個体の発生機序の解明が重要であり、各々の分野、すなわち、国立成育医療センター研究所（旧国立小児医療研究センター）と独立行政法人・農業生物資源研究所（旧畜産試験場）が保有する情報を共有し、技術进行交流することにより課題の克服を加速する必要がある。国立成育医療センター研究所には相当数の疾患関連ヒトゲノム情報および豊富な病態情報が蓄積されているが、ヒト染色体との関連が明らかになりつつある家畜繁殖障害関連遺伝子情報の活用により、ヒト疾患責任遺伝子同定が加速化される。また、ヒト疾患情報は畜産分野の繁殖研究にも重要な情報を与える。発生・分化過程のヒト疾患モデルには、ヒトに近似な解剖学的・生理学的特徴を併せ持つ形質転換大動物などが有用である。また、畜産分野では家畜を用いた「動物工場」といって新たな産業分野の創出が可能となる。これらのいずれもが国立成育医療センター研究所と農業生物資源研究所との開放的融合研究で達成できる。これらの点を鑑み、本研究では5年後の目標を、1)成育疾患、家畜繁殖障害について原因遺伝子の解明と障害発生機序解明、2)初期器官形成における分子伝達機構とその障害発生機序解明、3)形質転換家畜・マウスによる再生医療への応用を目指した新規治療基盤の整備、と定めた。また、3年目の中間目標として研究推進に必要な基盤技術整備とした。上記目標を達成するため、テーマ1「個体発生のゲノム機能」、テーマ2「個体発生の分子機構」およびテーマ3「モデル動物を用いた解析」の3つのサブテーマを設定し、各々に国立成育医療センター研究所および農業生物資源研究所の研究者を配置した。また、監督省庁が異なる施設の研究者が効率的に研究を推進できるよう併任人事の発令、主たる研究者による連絡会議の月例化ならびに主要機器等の共同利用、研究費の流動的配分などの特別な配慮を実施した。

中間目標として研究全体の推進を支える研究技術基盤の整備を設定したが、DNAマイクロアレイ技術、可視化生物学手法技術、ノックアウトマウスを含むTGマウス作成技術（テーマ2）、血液および肝幹細胞単離技術確立（テーマ3）および核移植技術によるクローン化ヤギ出生（テーマ3）など、当初計画していた基盤技術が完成し目標は達成した。

開放的融合研究評価委員会ならびに科学技術会議政策委員会の中間評価意見を参考に、重点的に研究遂行すべき課題、重点課題1「着床・胎盤特異的cDNAマイクロアレイ作成と胎盤機能の検索」および重点課題2「再生医療モデル作成を目指した免疫不全ブタ作出」を設定した。さらに、重点課題の達成のため、平成12年度より特別予算枠を設けて研究推進を保証した。テーマ2「個体発生の分子機構」の研究課題については、評価委員会から家畜関連研究課題の整理が必要であるとの指摘を受けた。また、サブリーダーの転出ならびに機構改革による研究者再配置等があった。これらの点を鑑み、後期では研究体制の見直しを実施し、テーマ2における家畜関連課題をウシに特化し、かつ、重点課題1の推進に力点を置けるよう配慮した。重点課題1は前期に完成したDNAアレイ技術を応用したウシ初期胚発現遺伝子の網羅的解析とcDNAチップ作成およびそれを応用したクローン化ウシ解析を目標とし、テーマ2の居在家グループ（農生研）と辻本グループ（成育）が取り組んだ。ウシ子宮・胎盤特異的cDNAアレイチップ作成を完了し、このアレイを用いて妊娠60日の子宮・胎盤を検討したところ、栄養膜細胞および妊娠特異的な遺伝子群を多数含んでいることが判明した。さらに、IGF-BP3遺伝子発現が妊娠子宮の小丘領域で高値、インヒビン/アクチビン遺伝子が小丘間領域で高値など、妊娠に関連して特異的に発現する遺伝子は子宮領域に限局することが判明しこのアレイの有用性が明らかとなった。また、体細胞クローンウシの子宮・胎盤mRNAをこのcDNAアレイで解析した結果、多数の遺伝子が変動を示すことが判明し、クローン動物解析への応用性も明らかとなった。これらの成果は、共著として掲載された。上記のcDNA情報およびクローンは農林水産省ゲノムデータベースへ登録・寄託した。また、cDNAマイクロアレイについては研究終了後も利用可能となるよう配慮した。重点課題2はヒト細胞・組織移植による再生医学モデル作成を目指し、ブタ免疫関連遺伝子破壊による免疫不全ブタ開発を目標とし、テーマ1の安江グループ（農生研）、テーマ3の徳永グループ（農生研）および藤本グループ（成育）が取

り組んだ。標的遺伝子として RAG 1 と Common を選び、遺伝子単離と塩基性配列決定を終了した後にノックアウト用ベクターを構築した。ブタでは ES 細胞が利用できないため体細胞クローンによる免疫不全ブタ作成を計画し、米国イリノイ大学・シューク博士との共同研究として実施した。現在、RAG1 遺伝子を破壊したブタ胎仔線維芽細胞の検定中である。この細胞による免疫ブタ作成は、米国企業への委託により速やかに取りかかれる準備が整っている。免疫不全ブタ作出に向けての予備調査として新たなベクター構築と応用による免疫不全マウス開発に関する研究も成果が得られ共著論文となった。関連研究としてブタ免疫能に関する研究も進行させ、ブタ T 細胞抗原受容体鎖やブタ CD8 に対するモノクローナル抗体確立、これら抗体を用いたブタ T リンパ球大量精製と cDNA ライブラリー作成を行った。Common 遺伝子構造ならびにプロモーター機能についての成果は共著論文となった。

サブテーマ毎、個別課題毎の概要

テーマ1「個体発生のゲノム機能」におけるヒト疾患遺伝子研究(山田グループ:成育)の成果として、前期に、眼(PAX6)、腎(WT1)などの臓器形成不全症の原因遺伝子同定、変異と病態の関連解明、上述疾患や遺伝性神経変性疾患での責任蛋白(PAX6 蛋白や DRPLA 蛋白)の機能解明を達成した。後期には、視神経形成異常症での新たな PAX6 変異の発見、病態形成や細胞機能における PAX6 蛋白群、p53 や WT1 など転写因子の相互連携ネットワークの同定、DRPLA アイソフォームの発見とその同在の特徴の同定、アポトーシス誘導カスパーゼのある種のアイソフォームがアポトーシス抑制に作用することの世界初の発見、などの成果があがった。テーマ1における家畜の繁殖障害関連ゲノム領域(安江グループ:農生研)の研究では、ブタ第6染色体q腕部に存在し繁殖障害の原因となる劣性致死遺伝子についての研究を前期から継続し、約5センチモルガンの領域まで絞り込んだ。この候補致死遺伝子は日齢9日で活性化し胚が死滅することを明らかにした。ブタ第6染色体q腕部の候補領域はヒト第19番染色体q腕部に対応するが、遺伝子の配列順序は相当異なることを明らかにした。そこで、ブタEST配列等を利用して新たなプライマーセットを49種類作成し欠失の有無を検討したが大きな欠失はないと判断された。マウス初期胚発生に関与する TGF- β 1 について山田グループと共同でより詳細に解析したが、異常は認められなかった。

テーマ2「個体発生の分子機構」における胎子胎盤相互作用の分子機構の研究は、前期はブタ妊娠過程における認識機構ならびに接着関連分子解析を取り扱っていた(假屋グループ:農生研)が、後期ではウシ妊娠ならびに初期発生に関わる分子発現に関する研究に焦点を絞った(居在家グループ:農生研)。このテーマは後期には重点課題1の推進に重点を置いた(成果は前述)。テーマ2では、辻本グループ(成育)が、カスタムメイドcDNAチップ作製・解析技術開発、マウスによる疾患モデル作製を担当し、研究全体の推進に貢献した。また、アドレナリン受容体ノックアウトマウス作製と解析を通じて受容体サブクラスの機能解明に成果があがった。

テーマ3「モデル動物を用いた解析」では、形質転換家畜の作出と解析(徳永グループ:農生研)の研究で、わが国では初めてのクローン化ヤギを出生させた。後期はクローン化技術を向上させながら、重点課題2に取り組み、新たなベクターによる免疫不全マウス作成に成功した。肝組織再構築に関する研究(鈴木グループから絵野沢グループに変更:成育)では、ラット肝幹細胞の単離と培養、代替え肝細胞としての羊膜細胞の有用性確立を前期で達成し、後期には、チミジンキナーゼ遺伝子導入トランスジェニックラット作成による肝障害モデル開発、アデノウイルスベクターでの p21 遺伝子導入による肝細胞増殖制御法や ref-1/STAT3 遺伝子導入による肝細胞増殖促進法の開発を達成した。血球の発生・分化と制御法(藤本グループ:成育)の研究では、前期にはセルソータによる造血幹細胞単離法の確立および肥満細胞の成熟法の確立、後期はトランスジェニックマウスによる巨核球特異的な外来性遺伝子発現系の確立、ヒトBリンパ球における CD24 分子関連アポトーシス機序の詳細解明、シグナル伝達分子に対する世界初の抗体作成などを達成した。

波及効果、発展方向、改善点等

医学研究と畜産研究という異分野に属する研究機関が融合的に研究する新たな試みは、生物学研究の新しいスタイルとして今後も発展してゆくものと考えられる。例えば、免疫不全ブタ作製と再生医学への応用に関するプロジェクトは、米国研究者を巻き込むグローバルな形で発展し、「生物医学研究におけるブタの活用」という国際コンソシアムに発展しつつある。研究期間中に具体的な成果を出せなかった部分もあるが、新たな競争的研究費獲得等が実現しており研究は確実に継続かつ発展している。また、部横断的・機関横断的な研究推進による目標達成型の有効性が両機関で認識され、新たな研究所のデザインにも反映している。

研究成果公表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	前期 10 件 後期 10 件	前期 23 件 後期 25 件	前期 120 件 後期 132 件	前期 153 件 後期 167 件
国際	前期 240 件 後期 207 件	前期 9 件 後期 11 件	前期 12 件 後期 20 件	前期 261 件 後期 238 件
合計	前期 250 件 後期 217 件	前期 32 件 後期 36 件	前期 0 件 後期 0 件	前期 414 件 後期 405 件

(2) 特許等出願件数

前期 3 件 (うち国内 2 件、国外 1 件)
 後期 7 件 (うち国内 6 件、国外 1 件)
 合計 10 件 (うち国内 8 件、国外 2 件)

(3) 受賞等

前期 5 件 (うち国内 1 件、国外 4 件)

1. Grand prize in the section of technology for Animal Industry. Mitushasi, T., et al. 1999. Discrimination of swine breeds based on DNA sequence polymorphism.
2. International Young Investigator Award. Li X-K, et al. 1999. Crm A gene can protect hepatocyte apoptosis induced by anti-Fas antibody in mice. 18th Annual Meeting, American Society of Transplantation. May 15-19, 1999 (Chicago)
3. BIOTEST AWARD. Li X-K, et al. 1999. Fas ligand adenovirus vector induced lethal hepatitis in Fas-negative liver transplanted mice. 9th Congress of the European Society for Organ Transplantation. June 19-24, 1999 (Oslo)
4. International Young Investigator Award. Ozaki M, et al. 1999. Inhibition of the small GTPase, Rac1, Protects against post-ischemic liver injury by suppressing generation of intracellular reactive oxygen species and NF- κ B binding activity. First Joint Annual Meeting of the American Society of Transplant Surgeons and the American Society of Transplantation. May 13-17, 2000 (Chicago)
5. 畜産大賞技術部門最優秀賞. 三橋忠由, ほか. 1999 毛色関連遺伝子の DNA 多型を用いた豚の品種識別技術.

後期 5 件 (うち国内 1 件、国外 4 件)

1. Wellcome Travel Fellowship. Ishiwatari H. 2001. Characterization of inducible genes in gestating bovine uterus employing cDNA Microarray. Society for the study of Reproduction, August, 2001, Ottawa.
2. Trust for Research and Education in the Biology of Reproduction. Osman V Patel, et al. 2002. Trophoblast cell-specific bovine pregnancy associated glycoprotein-9 expression and localization in cloned pregnancies. Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants in Crieff, 14-17, August, 2002, Crieff, Scotland UK
3. 学術奨励賞. 細江実佐, ほか. 2002. 二本鎖 RNA を用いたマウス初期胚における EGFP 遺伝子発現の制御. 第 43 回日本哺乳動物卵子学会, 5月31日-6月1日, 2002年(和歌山)
4. International Young Investigator Award. Ozaki M, et al. 2001. Adenovirally over-expressed redox factor-1 (REF-1) protects against post-ischemic liver injury by reducing oxidative stress and NF- κ B DNA binding activity. TRANSPLANT 2001, Joint American Transplant Meeting, May 11-16, 2001 (Chicago).
5. International Young Investigator Award. Ozaki M, et al. 2002. Over-expressed redox factor-1(REF-1) by ex vivo adenovirus-mediated gene transfer promotes liver regeneration with reduced liver injury in rat

(4) 主な原著論文による発表の内訳

国内誌 (国内英文誌を含む)

1. Osamu Yamada, Junichi Todoroki, Toru Takahashi and Kazuyoshi Hashizume. The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation. J. Vet. Med. Sci. 64:207-214, (2002)
2. 勝間進、辻本豪三 .マイクロアレイ技術の応用 :GPCR 研究と細胞マイクロアレイ .血液 腫瘍科 45(6): 531-535, (2002)

国外誌

1. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Douguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science 282:2098-2100, (1998)
2. Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, YoshinoM, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M, Tsuji A. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. Nature Genet 21:91-94, (1999)
3. Furusawa T, Hosoe M, Ohkoshi K, Takahashi S, Kiyokawa N, Fujimoto J, Amemiya H, Suzuki S, Tokunaga T. Catalytic RAG1 mutants obstruct V(D)J recombination in vitro and in vivo. Mol Immunol, 39(14):871-8, (2003)
4. Ishiwata H, Katsuma S, Kizaki K, Patel OV, Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hirasawa A, Shiojima S, Ikawa H, Suzuki Y, Tsujimoto G, Izaike Y, Todoroki J, Hashizume K. Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. Mol Reprod Develop, 65(1):9-18, (2003)

(5) 主要雑誌への研究成果発表

Journal	Impact Factor	サブテーマ1	サブテーマ2	サブテーマ3	合計
Nature Genetics	29.600	0	1	0	1
New England Journal of Medicine	29.065	1	0	0	1
Science	23.329	1	0	0	1
Nature Cell Biology	14.739	1	0	0	1
Journal of Clinical Investigation	14.118	0	2	0	2
Gastroenterology	13.020	0	0	1	1
EMBO Journal	12.459	1	1	0	2
American Journal of Human Genetics	10.542	1	0	0	1
Circulation	10.517	0	0	0	0
Human Molecular Genetics	9.318	4	0	0	4
Blood	9.273	0	2	2	4
FASEB Journal	8.817	0	1	2	3
Cancer Research	8.302	1	2	0	3
Hepatology	8.096	1	0	0	1
Cell Death and Differentiation	8.027	2	0	2	4
Journal of Biological Chemistry	7.258	4	8	4	16
Journal of Immunology	7.065	0	0	5	5
Oncogene	6.737	0	1	0	1
Molecular Endocrinology	6.725	0	1	0	1
Nucleic Acids Research	6.373	0	0	1	1
Journal of Cell Science	6.213	0	1	0	1
Gut	6.170	0	0	1	1
Human Mutation	6.134	2	0	0	2
EMBO Reports	6.046	0	1	0	1