

中央実験施設

1. 研究スタッフ

常勤

准教授 黒木 和之 1984年11月～現在

准教授 久野 耕嗣 1992年8月～現在

助教 天野 重豊 1977年11月～現在

2. 研究概要

中央実験施設では、次のテーマで研究を進めている。

黒木は肝炎・肝がん発生の原因ウイルスである B 型肝炎ウイルスの増殖と感染の分子メカニズム解明と阻止をテーマにヒト B 型肝炎ウイルス (HBV) 及びモデルとしてのダック B 型肝炎ウイルス (DHBV) を対象にウイルス遺伝子の発現制御・in vitro 感染系の確立・宿主レセプター分子の同定など分子生物学的研究を進めている。

久野は ADAMTS ファミリーの最初のメンバーである ADAMTS1 遺伝子を 1997 年に同定した後、そのプロテオグリカン分解活性や腫瘍増殖促進作用、実験的肺転移抑制作用等について明らかにしてきた。また ADAMTS-1 遺伝子欠損マウス (129/B6 遺伝子背景) が腎盂尿管移行部閉塞症を発症し、排卵や卵胞生育過程に異常を示すことを明らかにしてきたが、今回、遺伝子背景の異なる BALB/c 遺伝子背景の遺伝子欠損マウスの解析し、ADAMTS-1 が分娩過程にも重要な役割を果たしていることを新たに見出した。

天野は血球による生体防御機構の発生と進化について研究している。ホヤでは遊泳幼生に血球はないが、変態後幼若体に初めて 4 種類の血球が分化するので、その発生過程について電子顕微鏡を用いて明らかにした。成体では、ヘパリン含有顆粒血球とヒスタミン含有顆粒血球を発見し、それぞれ mast cell と basophil の祖先型と想定された。自然免疫と獲得免疫の双方に重要なこれらに血球が、無脊椎動物ですでに存在していることを明らかにした。

3. 主な研究成果

黒木

1) B 型肝炎ウイルスの増殖は時計制御遺伝子群によって制御されている可能性を示してきた。これらのうち正の転写制御因子として知られる Retinoid-related orphan receptor α (ROR α) は、ウイルス遺伝子群の発現をひじょうに強く抑制する。それには複数の機構が関わっており、ひとつは B 型肝炎ウイルス遺伝子の転写活性因子である C/EBP β への ROR α の結合によることを示した。

2) DHBV の DNA 複製の鋳型となる pregenomic RNA のプロモーターの転写活性化には、promoter-proximal splice donor site (SD) 及びその 3'側領域が必要であることを示した。

3) B 型肝炎ウイルス in vitro 感染系を確立するための試みを進めている。HuH7 細胞は分化

促進因子 DMSO 添加によって正常肝細胞に似た遺伝子発現プロファイルを示すようになり、HBV 感染能を低いながらも獲得すること。肝がん由来培養細胞株間で細胞融合させると HBV 感染能を低いながらも獲得するものがあることがわかった。

4) 新規の組換え HBV の作成。

5) miR122 遺伝子の構造と肝臓特異的転写因子による発現調節を明らかにした。

久野

1) BALB/c 遺伝子背景の ADAMTS1^{-/-}マウスは、予定日に分娩が起こらないなど分娩時の異常を示すが、この異常は胎仔死によるものではないことから、ADAMTS-1 が分娩の進行過程に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2) 妊娠マウスの子宮組織では、平滑筋層および脱落膜腺上皮細胞で ADAMTS-1 タンパクの発現が認められた。

3) 妊娠 19 日目に調製した ADAMTS1^{-/-}マウスの子宮平滑筋条片では、野生型と比較して、機能的平滑筋量を反映する hypotonic shock による収縮力が減少し、またオキシトシンに対する応答性が顕著に低下しており、これらが分娩障害の原因である可能性が示唆された。

4) ADAMTS-1 は前立腺癌がアンドロゲン依存性から非依存性に進行する際にその発現が抑制される。前立腺腫瘍では腫瘍血管の血管径が ADAMTS-1 の発現量に正に相関する一方、腫瘍でのトロンボスポンジン-1 の発現量は ADAMTS-1 の発現量に逆相関していた。この結果から前立腺腫瘍においては、ADAMTS-1 がトロンボスポンジン-1 量を調節することにより、腫瘍血管の形態制御に関与していることが示唆された。

5) ADAMTS1^{-/-}マウスでは、皮膚損傷治癒過程に有意な遅延が認められた。

(参考) 2008 年に実験動物研究施設で発生した MHV 感染事故のため、ADAMTS1^{-/-}マウスの実験を長期間中断せざるを得なかった。

天野

1) ホヤ血球が変態後に初めて分化することを確認し、血球の発生について論文発表した。

2) Mast cell 及び basophil の進化について、ホヤに祖先型の血球があることを明らかにした。

4. 今後の研究目標

黒木

肝癌発生に関わる B 型肝炎ウイルスの増殖と感染を阻止することを最終目標に、まずこれらの現象を分子レベルで解明することをめざす。そのため、本年度からは厚生科研 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業) の交付 (分担) も得て肝がん由来培養細胞、iPS 由来肝細胞、iHep 細胞などを用いた HBV in vitro 感染系の確立とその利用、HBV 感染に関連する宿主因子の同定と機能解析・感染メカニズムの解明を中心テーマに研究を進める。

久野

分娩時の子宮平滑筋をはじめとして、ADAMTS1^{-/-}マウスでその機能異常が認められる組織において、細胞外マトリックス分子群の代謝およびその動態、またそれらを制御するシグナル伝達経路について調べ、これらの組織構築における ADAMTS1 の役割を明らかにして、卵胞

生育、排卵、分娩過程のメカニズムの解明に寄与する。また ADAMTS-1 は EGFR リガンドの遊離活性を有し、がん組織でのストローマ反応を促進し、腫瘍血管新生の制御にも関わっている。また ADAMTS-1 はがんの進展過程に類似した創傷治癒過程の制御にも関与している。今後、ADAMTS-1 および ADAMTS ファミリーメンバーによるがん微小環境の制御、発がん過程における役割を解析し、また ADAMTS ファミリーメンバーを標的とした抗腫瘍剤の開発を行う。

5. 共同利用・共同研究拠点としての役割を果たすことに関連する活動について

共同利用施設運営委員会および中央研究室の運営に参加している。また、厚生科研（B 型肝炎創薬実用化等研究事業）研究班の一員として本共同利用・共同研究拠点の活用を積極的に考えたい。

6. 研究業績

原著論文

1. Gustavsson H, Tesan T, Jennbacken K, Kuno K, Damber J-E, Welen K. ADAMTS1 alters blood vessel morphology and TSP levels in LNCaP and LNCaP-19 prostate tumors. *BMC Cancer* 10, 288, 2010.
2. S. Amano and I. Hori. Hemocyte differentiation in the juveniles of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Invert. Reprod. and Develop.*, 2008,51:11-18.

著書・総説など

1. Kuno K: ADAMTS-1. In *the Handbook of Proteolytic Enzymes* (The third edition), eds. Neil D Rawlings & Guy Salveson. (Oxford, Elsevier Science), in press.

主な学会発表など

1. 生水真紀夫、多久和陽、岡本安雄、栗原裕基、松島綱治、[○]久野耕嗣（[○]発表者）「ADAMTS-1 遺伝子欠損マウス子宮筋の uterotonin に対する応答性の解析」第 34 回日本分子生物学会年会（2011 年 12 月、横浜）
2. 天野重豊：マボヤ血球の Sulfated GAGs について 第 82 回日本動物学会大会 2011 年 9 月（旭川、旭川市大雪クリスタルホール）
3. 黒木和之、石川隆：Retinoid-related orphan receptor α (ROR α) による B 型肝炎ウイルス遺伝子発現の抑制 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月（徳島、あわぎんホール）
4. 生水真紀夫、多久和陽、岡本安雄、栗原裕基、松島綱治、[○]久野耕嗣（[○]発表者）：ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスにおける子宮平滑筋収縮能の低下 第 32 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月（神戸）

5. 天野重豊：ホヤ血球の貪食能について 第 81 回日本動物学会大会 2010 年 9 月（東京）
6. 天野重豊：「ホヤ血球の "Green cell" について」第 80 回日本動物学会大会（2009 年 9 月 静岡）
7. Kazuyuki Kuroki, Takashi Ishikawa : Retinoid-related orphan receptor α (ROR α) inhibits the activities of the promoters of hepatitis B viruses. 第 32 回日本分子生物学会年会（横浜）2009 年 12 月
8. 久野耕嗣, 松島綱治, 生水真紀夫. 妊娠マウス子宮組織における ADAMTS-1 タンパク発現部位の解析. 第 32 回日本分子生物学会年会（横浜）2009 年 12 月
9. 天野重豊・堀 功：「カタユレイボヤ血球の機能について」第 79 回日本動物学会大会（2008 年 9 月福岡）
10. 黒木和之、宇佐美陽子、福嶋康之、石川隆：「プロモーター下流の splice donor site は DHBV 遺伝子の発現を高める」第 31 回日本分子生物学会年会/第 81 回日本生化学会大会（2008 年 12 月神戸）
11. 生水真紀夫, 栗原裕基, 松島綱治, [○]久野耕嗣([○]発表者). ADAMTS-1 遺伝子欠損マウスにおける分娩異常. 第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本分子生物学会年会（神戸）2008 年 12 月

特許

なし

7. 外部資金受け入れ状況

2012 年度

1. 黒木和之：厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）「B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発」研究分担、11,000 千円
2. 黒木和之：科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）「B型肝炎ウイルス感染の分子機構」研究代表、500 千円

2011 年度

1. 黒木和之：科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）「B型肝炎ウイルス感染の分子機構」研究代表、700 千円

2010 年度

1. 黒木和之：科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）「B型肝炎ウイルス感染の分子機構」研究代表、1,000 千円

8. 特記事項

なし

外部評価報告書 — 2012 —

2013年5月 発行

編集 金沢大学がん進展制御研究所外部評価準備委員会

発行 金沢大学がん進展制御研究所
〒920-1192 金沢市角間町
TEL 076-264-6700 FAX 076-234-4527

印刷 田中昭文堂印刷株式会社
