

生化学第二

1 構 成 員

	平成 14 年 3 月 31 日現在
教授	1 人
助教授	1 人
講師（うち病院籍）	0 人（ 0 人）
助手（うち病院籍）	2 人（ 0 人）
医員	0 人
研修医	0 人
特別研究員	0 人
大学院学生（うち他講座から）	2 人（ 0 人）
研究生	0 人
外国人客員研究員	0 人
技官（教務職員を含む）	0 人
その他（技術補佐員等）	2 人
合 計	8 人

2 教官の異動状況

- 三浦 直行（教授）（H11.4.1～現職）
 上里 忠良（助教授）（H 4.4.1～現職）
 佐藤 英二（助手）（S62.10.1～現職）
 呉 一心（助手）（H 8.4.1～現職）

3 研究業績

数字は小数 2 位まで。

	平成 13 年度
(1) 原著論文数（うち邦文のもの）	3 編（0 編）
そのインパクトファクターの合計	14.88
(2) 論文形式のプロシーディングズ数	0 編
(3) 総説数（うち邦文のもの）	5 編（5 編）
そのインパクトファクターの合計	0
(4) 著書数（うち邦文のもの）	1 編（1 編）
(5) 症例報告数（うち邦文のもの）	0 編（0 編）
そのインパクトファクターの合計	0
(6) 国際学会発表数	3 編

(1) 原著論文（当該教室所属の者に下線）

- A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. Wang, T., Uezato, T., and Miura, N. (2001) Inhibition effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on mouse liver lysosomal Vacuolar H⁺-ATPase. J. Cell. Biochem. 81 : 295-303.

インパクトファクターの小計 [2.78]

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内との共同研究）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学外との共同研究）

1. Ichihara, T., Komagata, Y., Yang, X-L., Uezato, T., Enomoto, K., Miyazaki, J-i., Koyama, K., Sugiyama, T., and Miura, N. (2001) Resistance to fulminant hepatitis and carcinogenesis conferred by overexpression of retinoblastoma protein in mouse liver. Hepatology 33 : 948-955.

2. Nifuji, A., Miura, N., Kato, N., Kellermann O. and Noda, M. (2001) Bone morphogenetic protein regulation of forkhead/ winged helix transcription factor, Foxc2 (Mfh1) in a murine mesodermal cell line C1 and in skeletal precursor cells. J. Bone & Mineral Res. 16 : 1765-1771.

インパクトファクターの小計 [12.10]

(2) 論文形式のプロシーディングズ

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

(3) 総 説

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. 三浦直行 (2001) 明らかになってきたフォークヘッド遺伝子の器官形成における役割 蛋白質核酸酵素 46 : 26-35.
2. 三浦直行 (2001) Kartagener 症候群とフォークヘッド遺伝子 呼吸 20 : 134-140.
3. 三浦直行 (2001) 22q11 欠失症候群の遺伝子医学 遺伝子医学 5 : 204-211.
4. 三浦直行 (2001) ウイングドヘリックドメイン 生体の科学 52 : 388-389.
5. 三浦直行, 玉越智樹 (2001) 神経堤細胞の発生と分化 医学のあゆみ 199 : 1025-1030.

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの（学内の共同研究）

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

(4) 著 書

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

1. 三浦直行 (2001) フォークヘッド遺伝子 (FOX 遺伝子) [佐藤靖史編 Vascular Biology ナビゲーター, p. 278-279], メディカルレビュー社

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの (学内の共同研究)

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

(5) 症例報告

A. 筆頭著者が浜松医科大学の当該教室に所属していたもの

B. 筆頭著者が浜松医科大学の他教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの (学内の共同研究)

C. 筆頭著者が浜松医科大学以外の教室に所属し、共著者が当該教室に所属していたもの

(6) 国際学会発表

1. Sugiyama, T., Yasui, O., Terada, K. and Miura, N. (2001) Transformation of liver stem-like (oval) cells into hepatocytes in vivo. Keystone Symposia on "Pluripotent Stem Cells: Biology and Applications", April, Durango, CO.
2. Miura, N., Kato, N., Yanagisawa, M., and Sugiyama, T. (2001) MFH-1 and ETA act independently in the aortic arch formation. Weinstein Cardiovascular Development Conference, May, Dallas, TX.
3. Miura, N., Kato, N., Sugiyama, T. and Yanagisawa, M. (2001) Forkhead gene Foxc2 (MFH-1) and endothelin receptor A act independently in the aortic arch remodeling. 14th International Congress of Developmental Biology, July, Kyoto.

4 特許等の出願状況

	平成 13 年度
特許取得数 (出願中含む)	0 件

5 医学研究費取得状況

	平成 13 年度
(1) 文部科学省科学研究費	6 件 (1,520 万円)

(2) 厚生科学研究費	0件 (万円)
(3) 他政府機関による研究助成	0件 (万円)
(4) 財団助成金	2件 (150万円)
(5) 受託研究または共同研究	1件 (100万円)
(6) 奨学寄附金その他(民間より)	1件 (30万円)

(1) 文部科学省科学研究費

三浦直行(代表者) 特定領域研究(C)(2)「ゲノム資源とノックアウトマウスを用いた 22q11.2 症候群の成因の解明」580万円(新規)

三浦直行(代表者) 基盤研究(B)(1)「肝癌抵抗性モデル動物の作製とその応用」240万円(継続)

三浦直行(代表者) 基盤研究(B)(2)「大動脈弓・骨格・腎臓形成に関わる MFH-1 遺伝子の分子作用機構の解明」280万円(継続)

三浦直行(代表者) 基盤研究(C)(1)「心大血管発生の分子機構と先天性疾患のメカニズム」210万円(新規)

三浦直行(代表者) 萌芽的研究「劇症肝炎抵抗性モデル動物を用いた肝細胞制御機構の解析」170万円(新規)

上里忠良(代表者) 基盤研究(C)(2)「環境ホルモン DEHP の上皮系細胞内の微小胞形成について」40万円(継続)

(4) 財団助成金

三浦直行(代表者) 旭硝子財団研究助成金「Fox 遺伝子ファミリーの分子進化と個体における役割」100万円(継続)

三浦直行(代表者) 浜松科学技術研究振興会科学技術研究助成金「肝臓幹細胞の分離とその応用」50万円(新規)

(5) 受託研究または共同研究

三浦直行(分担者) 循環器病研究委託費「心筋細胞の再生治療に関する研究」「心臓神経堤細胞の再生治療への基礎的研究」100万円(継続) 代表者 千葉大学大学院医学研究科教授 小室一成

6 特定研究などの大型プロジェクトの代表, 総括

7 学会活動

	平成 13 年度
(1) 特別講演・招待講演回数	0件
(2) 国際・国内シンポジウム発表数	2件
(3) 学会座長回数	2件
(4) 学会開催回数	0件

(5) 学会役員等回数	2件
-------------	----

(2) 国際・国内シンポジウム発表

1. 三浦直行 (2001) 心臓の形態形成は複数のファミリー遺伝子の組み合わせにより領域個別化する, 第74回日本生化学会大会, 10月, 京都
2. 三浦直行 (2001) フォークヘッド遺伝子 Foxc2 (MFH-1) を中心とした大動脈形成分子機構の解明, 第24回日本分子生物学会年回, 12月, 横浜

(3) 座長をした学会名

- 三浦直行 第75回日本生化学会大会シンポジウム
 三浦直行 第24回日本分子生物学会年回ワークショップ

(5) 役職についている学会名とその役割

- 三浦直行 日本生化学会評議員
 三浦直行 日本細胞生物学会評議員

8 学術雑誌の編集への貢献

	平成13年度
学術雑誌編集数	0件

9 共同研究の実施状況

	平成13年度
(1) 国際共同研究	3件
(2) 国内共同研究	2件
(3) 学内共同研究	1件

(1) 国際共同研究

- Kari Alitalo (ヘルシンキ大学) Foxc2 遺伝子のリンパ管形成における役割
 Tom Glover (ミシガン大学) 先天性リンパ水腫患者における FOXC2 遺伝子の突然変異
 Masashi Yanagisawa (テキサス大学) Foxc2 とエンドセリン受容体 A の相互関係

(2) 国内共同研究

- 杉山俊博 (秋田大学医学部) Rb トランスジェニックマウスにおける肝臓癌発生
 野田政樹 (東京医科歯科大学難治疾患研究所) MFH-1 遺伝子の骨軟骨形成における役割

(3) 学内共同研究

- 堀田喜裕 (眼科学) 色盲遺伝子の分子遺伝学的解析

10 産学共同研究

	平成 13 年度
産学共同研究	0 件

11 受賞 (学会賞等)

12 研究プロジェクト及びこの期間中の研究成果概要

1. 心大動脈形成の分子機構に関する研究

我々は、フォークヘッド遺伝子 *Foxc2* (MFH-1) のノックアウトマウスは心大動脈の形成異常を呈することから、MFH-1 遺伝子は心大動脈の発生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。一方、エンドセリン受容体 A (ETA) のノックアウトマウスも似た心大動脈の形成異常を示すことが共同研究者の柳沢博士の研究室で明らかにされた。昨年度、心大動脈形成における MFH-1 遺伝子と ETA 遺伝子の上流下流関係を明らかにすることにした。MFH-1 ノルマウスにおける ETA 遺伝子の発現と、ETA ノルマウスにおける MFH-1 遺伝子の発現を *in situ* hybridization 法で検討した結果、MFH-1 遺伝子と ETA 遺伝子はいずれも独立に大動脈血管形成に働いているが判明した。今年度は、MFH-1/ETA ダブルホモマウスを作製した。ダブルヘテロマウスは正常であったが、ダブルホモマウスはシングルホモマウスより重篤な症状を呈した。詳細な検討の結果、ダブルホモマウスはシングルホモマウスではおこらない総動脈幹開存が起こっていることが判明した。また、ダブルホモマウスは胎生 11.5 日で心不全のため死亡することが明らかになった。

最近、*Tbx1* および *Crkl* 遺伝子のノックアウトマウスが作製され、その 2 つのノックアウトマウスが大動脈弓の形成異常や副甲状腺の形成異常を示したことから、MFH-1 と *Crkl* 遺伝子の相互関係を明らかにする第一歩として、MFH-1/*Crkl* ダブルヘテロマウスを作製した。特に症状を示さなかったため、現在 MFH-1/*Crkl* ダブルホモマウスを作製し、心大動脈の症状を検討中である。

(三浦直行, 玉越智樹, 王とう, 高田橋真帆, 柳沢正史)¹ テキサス大学

2. 骨分化におけるフォークヘッド遺伝子 MFH-1 の役割

MFH-1 ノックアウトマウスが骨格形成異常を示したことから、発生中のマウス胎児の四肢および骨格系の MFH-1 遺伝子の発現を詳細に検討した。胎生 10.5 日で MFH-1 は将来の骨格になる間葉系組織に発現し始める。胎生 11.5 日では、凝集する骨格系原基細胞に発現し、胎生 13.5 日では、骨周囲膜に発現していた。また、BMP4/7 を投与すると、MFH-1 の発現は増加した。

BMP と MFH-1 の関係を明らかにするため、マウス肢芽への BMP 蛋白移植実験を行った。その結果、BMP が生体において直接か間接かは不明だが、MFH-1 発現を制御していることが明らかになった。

(揚暁麗¹, 杉山俊博¹, 三浦直行)¹ 秋田大学医学部

3. フォークヘッド遺伝子 LUN の発生における役割

新しいフォークヘッド遺伝子 Foxf2 (LUN) のノックアウトマウスを作製した。詳しい in situ hybridization の結果、LUN 遺伝子は肺間質や小腸間質そして上顎下顎周囲に発現している遺伝子であることが明らかになった。ノックアウトマウスの解析により、まずヘテロマウスは特に異常を示さなかった。ヘテロマウスどうしを掛け合わせてホモマウスを作製すると、ホモマウスは生後 1 日までに全部死亡することが判明した。各臓器における異常について検討したところ、口蓋裂が全ホモマウスに観察された。LUN ノックアウトマウス胎児期の口腔形成部位について、口蓋裂に関係すると言われる Msx1, Msx2, Tbx1, MFH-1 遺伝子発現の変化を詳細に検討したが、著明な発現の変化はなかった。この事実は、LUN 遺伝子の口蓋裂への影響は、Msx1, Msx2, Tbx1, MFH-1 遺伝子以外の経路を介していることを示唆している。

(王とう, 高田橋真帆, 三浦直行)

4. Rb トランスジェニックマウスの劇症肝炎、肝癌抵抗性に関する研究

ヒト Rb 遺伝子をラット HNF-1 α の遺伝子プロモーター支配下に置いたコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを 2 系統得た。肝臓の大きさや組織構築はコントロールマウスと差異を認めなかった。劇症肝炎を誘導する抗 Fas 抗体を投与すると、コントロールマウスでは血清 GOT, GPT 値の上昇や、肝組織像で出血や肝細胞変性像が観察されるのに対して、Rb トランスジェニックマウスでは、GOT, GPT 値の上昇はほとんど見られず、肝組織像でも出血や肝細胞変性像も観察されなかった。また、ジエチルニトロサミン腹腔内注射後フェノバルビタール飲水により肝癌を誘導すると、コントロールマウスでは肝細胞癌と多数の結節が出現するが、Rb トランスジェニックマウスでは肝細胞癌は出現せず、結節数も有意に減少していた。トランスジェニックマウスとコントロールマウスの肝臓抽出液のアポトーシス関連蛋白をウエスタンブロット法で比較検討した。その結果、p53 蛋白, E2F 蛋白などは変化せず、Bcl ファミリー蛋白のうちでも、Bax 蛋白のみがトランスジェニックマウスで著明に減少していることが判明した。

(市原利晃¹, 杉山俊博¹, 上里忠良, 三浦直行)¹秋田大学医学部

5. H, K-ATPase の部分配列を認識する抗体と交差結合する新しい遺伝子の単離

H, K-ATPase の N 末端側のペプチドを合成し、これを兔に免疫して抗ペプチド抗体を得た。この抗体を用いて、ラット脳細胞抽出液に対してウエスタンブロットしたところ、1 本のバンドが検出された。本来の蛋白は脳では発現しない蛋白であるので、この蛋白は、未知の新しいファミリー遺伝子であると考え、脳 cDNA ライブラリーをこの抗体でイムノスクリーニングしたところ、陽性のクローンを 1 個得た。塩基配列を決定したところ、この遺伝子はヒト Rap2 Interacting Protein と構造上ホモロジーがあることが判明した。現在、組み換え蛋白を大腸菌で産出し、機能を解析しつつある。

(上里忠良, 三浦直行)

13 この期間中の特筆すべき業績、新技術の開発

フォークヘッド遺伝子 MFH-1 の心大血管形成における分子機構について、詳しく検討を行った

結果、転写因子である MFH-1 遺伝子とエンドセリン受容体 A 遺伝子はパラレルに形態形成に働いていることが明らかになったことは注目に値する。また、ダブルホモマウスがより早期に心不全で死亡することが明らかになった。また、MFH-1 が骨形成因子 BMP により生体でも制御されていることが明らかになり、骨分化過程の重要な分子として関わっているという発見は骨の分子生物学的見地からも重要である。

さらに、フォークヘッド遺伝子 LUN のノックアウトマウスを詳しく解析した。ホモマウスは出生後すぐに死ぬことが判明し、主な症状は口蓋裂と腸内ガス充満であった。LUN 遺伝子機能の喪失により、どのようにしてこれらの症状のつながるかを解析中である。

14 研究の独創性、国際性、継続性、応用性

フォークヘッド遺伝子ファミリーについて研究しているのは、日本では当教室だけである。外国では、アメリカに数研究室、ヨーロッパに 2 研究室がファミリーの他の遺伝子について研究を行っている。また、これらの研究室どうしでは、ある場合は競争が、ある場合は共同研究がなされているが、当教室はフィンランド、アメリカの研究室と共同研究を行っている。フォークヘッド遺伝子ファミリーはいろいろな器官の形成に関わる遺伝子ファミリーで、そのノックアウトマウスは発現している器官の形成異常を引き起こす。ヒト先天性リンパ水腫患者の一部に MFH-1 遺伝子の突然変異が発見されたことから、この遺伝子のリンパ血管形成における役割が注目されている。当講座の研究内容は心臓、大動脈、リンパ管、骨格系などの器官形成の分子機構の解明と疾患との関連という発展性の高いものであり、国際的にも大きく評価されている。

15 新聞、雑誌等による報道

1. 三浦直行 (2001) 臓器の再生に幹細胞移植へ (シリーズ生命科学の最前線), 静岡新聞, 4 月 28 日夕刊
2. 三浦直行 (2001) 臓器の左右の決定は三段階で (シリーズ生命科学の最前線), 静岡新聞, 5 月 12 日夕刊