

### 3. 外部評価結果（研究課題の事後評価）



## (1) ライフサイエンス領域

研究課題名	免疫ダイナミズムの統合的理解と免疫制御法の確立
中心研究者名	審良 静男
研究支援担当機関名	大阪大学

## <研究課題からの報告>

### 1. 研究課題の目的及び意義

現在、日本国民の 1/3 が花粉症などのアレルギー疾患に、1/200 が重篤な自己免疫疾患であるリウマチや膠原病に罹患していると言われていたとともに、世界では毎年 15 万人が感染症で亡くなっている。一方、近年、がんや神経変性疾患などの発症と制御にも免疫系が深く関わっていることが分かってきており、免疫のメカニズムを解明することにより、難治性疾患の治療に変革をもたらすことが重要と考えられた。

このため、本研究課題では、自然免疫から獲得免疫までの動的機構を、イメージング技術やシステムバイオロジーを用いて包括的、統合的に理解し、この理解に基づいて免疫機構の細胞内、細胞間システムを効果的に調節することにより、免疫細胞制御法を確立することを目標として研究開発を実施した。

具体的な研究課題としては、

- (1) 自然免疫による獲得免疫活性化機構の解明
- (2) 生体イメージングとシステム生物学による単球・マクロファージ系細胞のダイナミズム解析
- (3) 免疫現象を可視化する化学分子イメージングプローブの開発
- (4) 免疫研究のための無標識ラマンイメージング
- (5) 自然免疫の構造生物学的研究
- (6) 免疫応答のシステムバイオロジー解析を設定した。

### 2. 研究成果の概要

#### ・ mRNA 調節による免疫制御因子「Regnase-1」の発見・解明

中心研究者らが発見した Regnase-1 は、炎症反応に深く関わっている IL-6 の mRNA を特異的に分解し、炎症にブレーキを掛けているマスター分子であるが、自然免疫系の細胞（図 1）だけでなく、CD4 陽性 T 細胞や CD8 陽性 T 細胞のような獲得免疫系の細胞でも、炎症調節の鍵となる分子であることを発見し、国際的に高い評価を受けた。異分野の研究者と連携して、Regnase-1 の特異性を生み出す分子構造、機能変化を起こす 3 次元構造モデル、特異的プローブを用いた細胞内での分解のダイナミズムなども解析した。Regnase-1 活性を阻害する小分子は、ワクチンを増強するアジュバントとして使えるほか、活性化型 T 細胞を増や

すことから抗がん剤としての効果も期待できるため、興味を示した企業と連携して、実用化に向けて阻害作用を持つ小分子スクリーニングを開始した。以上のように、免疫を様々な手法を用いて包括的に理解し治療薬開発への道を拓くという当初の目標は達成できた。

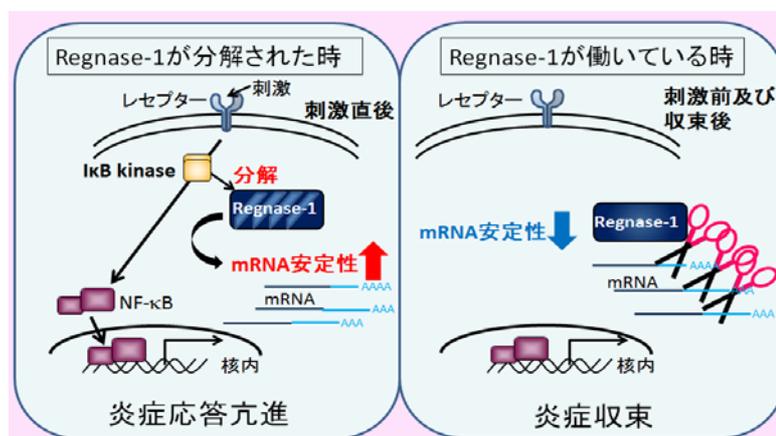


図1. Regnase-1の免疫応答メカニズム

#### ・疾患特異的 M2 マクロファージの発見

M2 マクロファージに関して、アレルギー型の M2 マクロファージと、代謝リック症候群に關与する組織常在型 M2 マクロファージを特定し、それぞれが *Jmjd3*、*Trib1* という遺伝子により分化誘導されることを解明した。今までは 1 種類しかないと思われていた M2 マクロファージであったが、この研究により疾患特異的な M2 マクロファージの存在が明らかとなった。M2 マクロファージは、アレルギー・代謝リックシンドロームのみではなく、がん・動脈硬化・難治性疾患にも関わっていると考えられており、今後それぞれの疾患特異的なマクロファージを対象にした副作用の少ない治療方法への道を拓くものとして注目され、企業との連携を開始した。また、一細胞レベルの解像度を有するように改良された高感度 MRI を駆使することにより、M2 マクロファージの分化・動態が生体内で解明されることが期待される。以上のように、当初の目的を達したのみでなく、新しい治療領域を創成することができた。

#### ・骨組織内での破骨細胞の in vivo 動態の解析

免疫細胞の一種である破骨細胞が骨吸収を行っている状態と、休止状態の違いを動物の体内で観察することに成功した。目的とする細胞の組織内分布を調べる方法は色々あるが、生きてしかも活動している状態の細胞だけを細胞の動態によって識別する方法は希少であり、プローブ作成技術を開発した研究者とイメージングの専門家の共同研究により、初めて可能となった(図2)。破骨細胞は骨の修

復を促すことも知られており、単に破骨細胞の総数を減らすのではなく、活性化型破骨細胞の数を減らすことで、骨粗鬆症などに対する大きな治療効果が得られると期待されている。このように免疫細胞のダイナミズムの解析により初めて見出される新規治療法が示され、当初の目標を達成した。

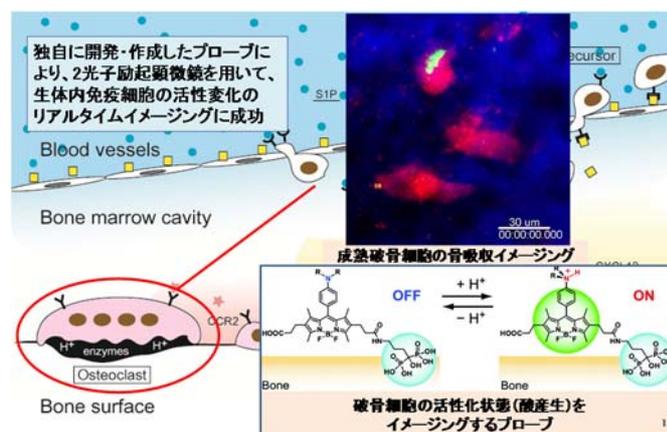


図2. 骨組織内での破骨細胞の in vivo 動態の解析

生体全体のダイナミズムについても、MRI を用いて、マクロファージの一細胞レベルでの可視化が可能になった。また、自然免疫による獲得免疫活性化の機構について、調節因子の発見や、システムバイオロジーによる解析も順調に進んだ。

なお、中心研究者は、10年連続で、免疫学分野での論文被引用数が世界トップであり、平成23年には、医学に関して最も著名な賞の一つであるガードナー国際賞を受賞した。

## <評価小委員会による所見>

### 1. 研究目標の達成状況

本研究課題は分子生物学・発生工学を中心としたこれまでの免疫学と構造生物学、イメージング、バイオインフォマティクスとを融合させ「免疫ダイナミズムの統合的理解と免疫制御法の確立」を目指したものであり、集学的な方法で、新しい視点での治療法の開発に取り組んだ。特に、Regnase-1については、自然免疫だけでなく、CD4陽性T細胞やCD8陽性T細胞のような獲得免疫系の細胞でも働いている分子であり、また、Regnase-1の活性を阻害する小分子は、ワクチンを増強するアジュバントとして使えるほか、活性化型T細胞を増やすことから、抗がん剤などの創薬につながる可能性も期待される。マクロファージに関わる研究、破骨細胞に関わる研究でも、それぞれ十分な成果を上げており、免疫学研究における着実な実績を基にした最先端の研究が実施され、世界トップ水準の成果が得られている。

中心研究者は、これらの成果を基にインパクトのある論文を多数発表し、平成23年にはガードナー国際賞を受賞しており、免疫を様々な手法を用いて包括的に理解し、治療薬開発への道を拓くという当初の目標は達成できたものと判断される。

## 2. 研究推進・支援体制の状況

大型教育研究プロジェクト支援室と新たに設置された大型教育研究プロジェクト支援事務室による専任の支援チームが結成され、中心研究者の強いリーダーシップ及び求心力により、研究の実施・推進体制は的確に機能し、免疫に対して多面的なアプローチを行っている。

また、サブテーマ間やメンバー間の連携・協働を図る上で実施した取組として、研究成果報告会と運営委員会が開催され、免疫学と異なる研究分野との融合研究のために、国際シンポジウムも開催した。更に、研究経験のある博士学位を有した教員を、リサーチ・アドミニストレーター（URA）として、支援チームに配置して研究推進を支援し、支援機関としても適切に機能していたと判断される。

若手研究者の人材育成に関しては、国際的な活躍・発展を促すような取組が行われ、論文数も多く、人材育成は積極的に行われたと判断される。

## 3. 研究成果の今後の展開

複数の製薬企業との共同研究が開始されており、社会還元に向けた具体的な取組が進んでいる。既に、新規治療薬や評価系開発のシーズが FIRST 事業期間中に多くのサブテーマで発見され、特許出願も 14 件を数える。

また、科学・技術対話の取組については、サイエンスカフェを頻繁に開催する等、積極的な取組が行われたと判断される。

なお、Regnase-1 の発見と機能解析は、免疫の多彩な制御を明らかにしつつあるが、実は領域横断的な RNA world への突破口となるべきツールとも考えられる。RNA world は、mRNA の構造を認識した制御や、ノンコーディング RNA の機能などを統合する考え方であり、免疫分野にとらわれず、多くの研究者と共同研究を進め、新たな治療法や創薬の可能性を模索していくことが期待される。

また、本研究課題の進展により、免疫疾患の新たな治療法への道が拓けたことから、基盤的な研究だけでなく、臨床サイドの研究者や製薬企業との連携により、免疫関連の治療薬の創出を一層加速していくことが期待される。

## 4. 総合所見

本研究課題は、生体内での動的な免疫細胞の動きや相互作用の包括理解及び理解に基づく免疫制御法の確立を目的として研究開発を実施した。その結果、免疫反応におけるキー分子「Regnase-1」の発見と解析、「M2 マクロファージ」と様々な疾患の関連性の発見及びイメージングなど新規技術を駆使することによる免疫動的機構の解明など、免疫システム全体の解明に向け、研究が大きく進展したことは高

く評価される。

また、中心研究者の強いリーダーシップ及び求心力により、研究の実施・推進体制が的確に機能し、人材育成も積極的に行われたことにより、免疫に対して多面的なアプローチができたことも評価される。

以上のことから、本研究課題は目標を達成しており、世界をリードする世界トップ水準の研究成果が得られたと判断される。

今後、免疫分野の枠を越えた研究を進め、更なる波及効果を展開するとともに、臨床応用の観点から、製薬企業等との協力の下、新たな治療法、創薬の可能性を模索していくことを期待する。

研究課題名	心を生み出す神経基盤の遺伝学的解析の戦略的展開
中心研究者名	岡野 栄之
研究支援担当機関名	独立行政法人理化学研究所

## <研究課題からの報告>

### 1. 研究課題の目的及び意義

ヒトの脳の正常な機能や、心の問題、あるいはこれらが破綻した疾病を正しく理解するためには、両者の構造とそれに基盤を置く脳機能を解明する必要がある。

しかし、脳の作動原理の解明を目指した従来の研究では、対象とする実験動物によって得られる情報に偏りと限界があった。マウスを中心とした遺伝子工学的手法と、霊長類を中心とした認知神経科学的手法には、それぞれ一長一短があり、相互補完が期待されていたが、技術的にも相互の接点が乏しかった。

このため、本研究課題では、中心研究者らが平成21年に発表した革新的なトランスジェニック霊長類技術を、遺伝子工学的手法の開発で先行するマウスシステムと神経回路の機能マッピングに利点を持つマカクシステムとを併用することにより一層発展させ、言語や道具の使用といったヒトや一部の霊長類のみが持つ脳の高次機能メカニズムを解明するとともに、認知症（アルツハイマー病）、統合失調症、自閉症等の霊長類モデル動物を作成し、精神・神経疾患の発症原因を明らかにすることで、研究成果を将来の創薬につなげ、これらの疾患の治療法の開発の基礎の構築することを目的として研究開発を実施した。

研究課題全体としては、以下の10のサブテーマを構成し、「遺伝子改変動物の作成」と「進化学的観点からの脳機能の解明」の2つの柱から研究に取り組んだ（図1）。

- ① 環境・遺伝子・神経活動との相互作用によるヒト認知進化誘導
- ② 遺伝子改変マーマモセットを用いたヒト高次認知脳機能の研究
- ③ ヒト疾患モデルマーマモセットの開発
- ④ ヒト特有の遺伝子導入マーマモセットの開発
- ⑤ 特定神経機能障害マーマモセットの開発
- ⑥ 相同組換え法によるノックイン・ノックアウトマーマモセットの作成技術の開発
- ⑦ 多領域同時機能障害及び記録による多領域間相互作用の解析手法の開発
- ⑧ 局所神経回路の機能を効率よく限定的に可逆的及び不可逆的に障害する基盤的技術の開発

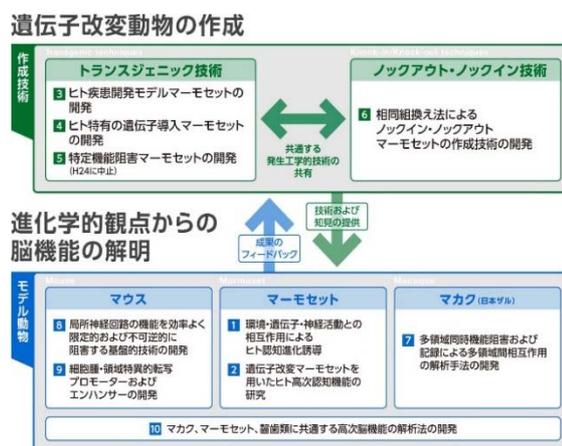


図1. サブテーマ間の相互関係

- ⑨ 細胞種・領域特異的転写プロモーター及びエンハンサーの開発
- ⑩ マカク、マーモセット、齧歯類に共通する高次脳機能の解析法の開発

なお、22年度のフォローアップ結果を受けてサブテーマを見直し、⑤「特定神経機能阻害マーモセットの開発」は中止して、③「ヒト疾患モデルマーモセットの開発」に集中し、また、②「遺伝子改変マーモセットを用いた「ヒト高次認知脳機能の研究」等の強化をした。

## 2. 研究成果の概要

### ・環境・遺伝子・神経活動との相互作用によるヒト認知進化誘導

様々な高次認知機能を行動的に検出評価して、定量的比較研究を可能にするとともに、その神経細胞生物学的メカニズムと関連付けようとするを目的に、マーモセットの認知的・生理的特徴を考慮した実験システムを開発した。動物の自由なモチベーションに基づいた行動に伴う脳活動を、通常の社会的条件下で測定するための無拘束無線神経活動記録システムと、これに併用可能な脳内刺激システムを組み合わせた、全脳多電極記録/刺激システムを開発し、革新的な「自律的動物実験装置」として、国内及び国際特許を出願した。

### ・遺伝子改変マーモセットを用いたヒト高次認知脳機能研究

道具使用訓練に伴い脳で発現量が増加する遺伝子群を同定し、胎生期の脳皮質形成や学習可塑性に関与する可能性の高い遺伝子について発現分布解析及び遺伝子導入による機能解析を行った。特にカドヘリン分子群及び *Gadd45b* について詳細に解析し、*Gadd45b* の発現の増加が霊長類脳でのニューロンの可塑性の増大に関わる可能性を示した。また、3次元MRI画像を用いてマーモセット、マウス及びデバネズミの脳皮質の厚みを可視化・比較できるアトラスを作成した。

さらに、顕微鏡的拡散テンソルMRIを実施し、皮質間連絡構造の描出を行った。脳溝形成と皮質形成との関係を調べるため、マーモセットの成体及び胎生期の高分解能MRIを取得し、皮質体積、脳溝形成頻度を算出し脳表面像を作成した。in situ ハイブリダイゼーション法を用いてマーモセットの脳皮質形成時における自閉症原因遺伝子群の発現様式を調べ、マウスとは異なる発現様式を示す遺伝子を発見した。

### ・ヒト疾患モデルマーモセットの開発

2頭の変異型ヒト *APP* 遺伝子トランスジェニックマーモセットを平成24年12月に作出(図2)し、次世代を得るための交配を開始した。さらに、変異型タウ遺伝子発現トランスジェニックマーモセットの作成に着手した。隔離飼育マーモセットについては、隔離飼育期間中の行動の変化を解析するため Actiwatch mini を用いた活動量の測定やビデオ観察を継続的に行った。ビデオ撮影による行動解

析により、群れから離れた際に発するとされる Phee Call の回数が隔離群において減少する傾向が認められ、社会的隔離により個体の行動パターンを変化させることを示した。

・ヒト特有の遺伝子導入マーマセットの開発

ヒト *ASPM* トランスジェニックマウスの解析と、ヒト *HAR1* BAC トランスジェニックマウスの作成を行った。ヒト神経幹細胞で *HAR1* を強制発現したところ、細胞増殖を抑制したことにより、*HAR1* が霊長類において細胞増殖の調整に関与している可能性を示した。また、哺乳類で高度に保存されているがヒトゲノムにおいて完全に欠失した塩基配列 (hCONDEL) についてマーマセットゲノムとの比較解析を行い、同配列を欠失した遺伝子改変マウスを作成した。

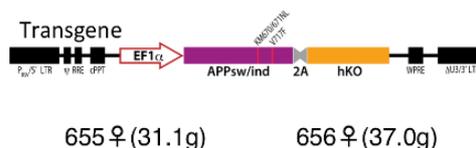


図2. 作出された変異 APP 過剰発現トランスジェニックマーマセット

・相同組換え法によるノックイン・ノックアウトマーマセットの作成技術の開発

マーマセット着床前胚で発現する遺伝子の時間的・空間的発現パターンの変化を多重免疫染色法で調べ、マーマセットの着床前胚の発生はマウスと比較すると遅いことを明らかにした。また、遺伝子導入及び低分子化合物を用いて培養することで得られたマウス ES 細胞及びマーマセット胚盤胞と共通する性質を有するマーマセット ES 細胞の幹細胞生物学的性質を明らかにした。さらに、マーマセット胚へマイクロインジェクションを行い、キメラ胚の作出及び発生能の検討を行った。

免疫不全モデルと自閉症モデル動物作出のため、*Il2rg* と *Mecp2* の 2 遺伝子を標的とした。*Il2rg* 遺伝子ノックアウトマーマセットで、全身性の遺伝子改変と胸腺の消失、T 細胞及び NK 細胞の著減 (免疫不全状態) が確認され、ファウンダー一頭レベルでのノックアウトが証明された。*Mecp2* 遺伝子ノックアウトマーマセットに関しても、平成 26 年 8 月にヒトのレット症候群と同様の遺伝子変異を有するノックアウト個体が得られた。

ES 細胞、生殖細胞を介したノックアウト・ノックイン法の開発については、マーマセット ES 細胞の *in vitro* 生殖細胞分化条件の検討を行い、FSH/EGF 添加 Waymouth 培地によって卵母細胞様分化が見られること、*BLIMP1/PRDM14* 強制発現によって生殖細胞特異的マーカーである *VASA* 陽性生殖細胞分化が顕著に促進されることが判明した。

・多領域同時機能阻害及び記録による多領域間相互作用の解析手法の開発

マカク属サルの大脳皮質領野間の相互作用により生じる機能を明らかにするた

め、投射選択的に機能を阻害する方法及び光遺伝学による方法を開発した。投射選択的に機能を阻害する方法では、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) を含むタンパク質をコードした発現ベクター搭載のアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を作成し、継続的に逆行性輸送能力を持った rtTA を投射部位で発現するシステムを開発した。光遺伝学による方法では、大脳皮質の第 1 の領野にチャンネルロドプシンを広範囲で発現させた後、第 1 の領野をレーザーで局所刺激し、その結果投射先の第 2 の領野に起こる活動の空間パターンを光イメージング法によって捉える方法を開発し、左右半球の第一次視覚野を結ぶ経路を用いて性能を確認した。

- ・ 局所神経回路の機能を効率よく限定的に可逆的及び不可逆的に阻害する基盤的技術の開発

注意・衝動性制御神経回路に焦点を当てて研究・開発を行い、有用性の高い神経回路特異的 Cre ラインを多数樹立した。情報統合実行分子 Netrin-G、NGL、cAMP-GEF2、alpha-Chimerin、NMDAR1 のノックアウトもしくは、上述 Cre ラインを活用した条件変異マウスを作成し、多面的解析を行った。

汎用性ツールによる神経回路機能介入法では、人工の G タンパク質共役型受容体の神経回路依存的及び合成リガンド投与依存的発現システムにより、REM 睡眠の中枢回路の同定に成功し、その回路の細胞系譜を明らかにした。また、非侵襲的かつ細胞種特異的に広範な大脳皮質の活動の様子を視覚的にモニターするマウスシステムの樹立に成功した。

- ・ 細胞種・領域特異的転写プロモーター及びエンハンサーの開発

特色のある Cre 発現トランスジェニックマウス系統や tTA 発現トランスジェニックマウス系統作成のための転写調節単位の入手と、ウイルスベクターへの組み込み可能な最小転写調節単位の分離同定を目的に解析を行った。大脳皮質第 4 層細胞の活動依存的発達のダイナミクスと NMDA 受容体の細胞自律的役割を明らかにした。また、*Musashi*、*Ntn1* 及び *Ntn2* の遺伝子の in vivo 発現特性を規定する cis エLEMENT の同定に成功し、高次脳機能発達の中で担った役割を考察した。さらに、視床及び脳幹の細胞マーカー遺伝子群について、転写産物の網羅的解析を行った。

- ・ マカク、マーモセット、齧歯類に共通する高次脳機能の解析法の開発

動物種間に共通して発現し、かつ実験的に検出・定量化可能な高次脳機能のモデル系として、注意の調節や意思決定などを担うトップダウン制御系に注目し、ボトムアップ制御系の脳内メカニズムの対比においてその特徴を種間比較する解析法を検討した。マカクでは、前頭前野における機能分化の理解を進めるため、ウイスコンシンカード分類課題遂行に対する前頭極や前帯状溝皮質の寄与の解明を進めた。マーモセットでは、他個体の行動に反応する神経細胞の集団を上側頭溝後端に見出し、この部位と結合する前頭葉の運動前野腹側部にも似た性質の神

経細胞集団を見出した。マウスでは、視床束傍核特異的 NMDA 受容体 1 型サブユニット(*Nr1*)条件変異マウスや *Netrin-g1* を視床特異的に欠損する条件変異マウスを作成し、注意機構に関与する脳部位及び神経回路の同定を行った。ハダカデバネズミでは、階級社会を制御する脳神経基盤の解明を進める準備として、成体脳・新生仔脳の MRI 脳アトラスの作成を完了させ公開し、遺伝子配列情報基盤を構築した。

## ＜評価小委員会による所見＞

### 1. 研究目標の達成状況

本研究課題は、げっ歯類と比較してより複雑な脳を持つ霊長類のモデル動物を作成し、精神・神経疾患の発症原因を明らかにして、研究成果を創薬につなげ、疾患の治療法の開発を展望する野心的なプロジェクトである。当初は、10 の小テーマが総花的に展開されていたが、中間評価を経て、中心研究者の強力なリーダーシップにより、マーモセットを中心とした研究に集中・再編成されたことで、マーモセットの発生工学と脳の分化、発達の視点から世界をリードする成果が創出されている。特に、ゲノム編集技術を活用して、世界初のノックアウトマーモセットの作出に成功したことは、今後の神経科学研究の発展に格段に貢献することが期待されるものであり、世界的にもインパクトが高く、注目を集めている。また、マーモセットはげっ歯類よりも寿命が長く、よりヒトに近いことから、これらの成果は、ヒトの脳のメカニズム解明だけでなく、ヒトの精神・神経疾患の発症原因の解明や創薬研究につながることを期待されるものであり、高く評価される。

ただし、本研究分野における世界的な競争は激化している。また、アルツハイマー病、自閉症、免疫不全のマーモセットモデルの作成に取り組んでいるが、一つの解析モデルを提供したことは評価されるが、いずれもヒトの病気としては非常に複雑なものと想定されるので、病態解析については、戦略的な研究展開を期待する。

### 2. 研究推進・支援体制の状況

中間評価の結果を受け、マーモセットを使った脳高次機能解析研究の基盤作りに焦点を当てて研究体制が再構築されており、集中的な投資が行われた結果、マーモセットの遺伝子改変技術の進歩につながったと判断される。

研究推進体制については、理化学研究所脳科学総合研究センター、慶應義塾大学、実験動物中央研究所との間で、物質移動合意書の締結を毎回行わずとも研究試料を移転できるよう包括的な取決めを締結した。また、研究課題の推進に関する包括的な実施協力覚書及び知的財産や研究成果の取扱いに関する取決めを締結することにより、研究が円滑に進むよう体制整備が行われている。

知的財産権に関する取組については、個々の研究者からの出願を待つのではなく、研究者と知財の専門家が面談することで、有用な知財の積極的な発掘が進められた

ことは評価される。

### 3. 研究成果の今後の展開

本研究課題の成果は、文部科学省の「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト」などに継承され、脳機能の解明に向け、更なる研究を続けていくこととしている。また、一部の成果については、製薬企業との共同研究につながっている。マーモセットの供給体制も整備され、研究開発とその成果の今後の展開や計画・構想が日本の次世代の脳科学プロジェクトとして具体化されていることから高く評価できる。この研究分野が発展していくことで、社会の重要課題の解決に対して大きなインパクトを与え得るものと考えられる。

ただし、疾患の発症機構を解明や効果的な治療法の確立には、多岐にわたる研究が必要であり、遺伝性疾患の遺伝子を導入してモデル動物を作成する場合、必ずしもマーモセットが最適とは言えない場合も想定されることから、マーモセットを用いることの意義を明確化し、対象とする疾患を絞り込んで研究を進めていくことを期待する。

### 4. 総合所見

本研究課題は、トランスジェニックマーモセット作成という革新的な技術をベースに、疾患モデルマーモセットやヒト特異的遺伝子導入マーモセットの作成を行うとともに、進化段階の異なる複数の実験動物系を用いて比較解析を行うことにより、ヒトの心を生み出す神経回路の作動原理とその分子機構を解明することを目的として研究開発を実施した。その結果、アルツハイマー病モデルのトランスジェニックマーモセットの作成に成功し、自閉症モデルマーモセットの作成とその行動学的な解析系の確立、さらには、技術としてノックアウトマーモセットの作出に成功するなど、基礎研究としては大きな成果が得られており、ヒトの精神・神経疾患の発症原因の解明や創薬研究など、今後の発展につながることを期待される。

以上のことから、本研究課題は目標を達成しており、世界をリードする世界トップ水準の成果が得られたと判断される。

今後、本研究課題の成果は、文部科学省のプロジェクトなどに引き継がれ、更なる研究開発を進めることとしているが、脳の機能解析や、精神・神経疾患の発症原因の解明は、まさにマーモセットモデルなどを用いたこれからの研究に掛かっている。本研究分野は国際競争が非常に激しい分野であることから、マーモセットのモデル動物としての役割も考慮しつつ、戦略的に活動展開していくことを期待する。