

病因病態医学講座／ゲノム科学・微生物学分野

1. 領域構成教職員・在職期間

教授	定 清直	平成18年10月～
准教授	千原 一泰	平成22年1月～（平成24年1月～現職）
講師（学内）	竹内 健司	平成 3年4月～（平成24年2月～現職）

2. 研究概要

研究概要

タイトル：病原微生物感染に対する宿主因子についての分子生物学的研究、ならびに疫学、国際医学教育交流

病原性を有する微生物は、細胞内の様々な宿主因子と相互作用することが知られている。当研究室では、ゲノム編集技術（CRISPR/Cas9システム）を用いて細胞内チロシンキナーゼが様々な病原体による感染の宿主因子であることを明らかにしてきた。特にチロシンキナーゼSykの標的分子であるアダプタータンパク質3BP2のチロシンリン酸化がマクロファージの貪食とケモカイン産生を調節するメカニズムや、STAT1がインターフェロン γ によるC型肝炎ウイルス（HCV）の複製抑制に不可欠であることを解明した。現在は遺伝子改変マウスや新たに樹立した遺伝子欠損細胞により、チロシンキナーゼを中心とする新たな感染宿主因子の研究を進めている。さらに金沢医科大学・旭川医科大学・富山大学との間で、それぞれ神経薬理学、ウイルス学に関する共同研究を実施した。福井県との協同研究では、疫学調査に有用な新規検査法を開発し実用化した。さらにインドネシア共和国アイルランガ大学・神戸大学との共同により微生物学の研究と医療に重点を置いた国際医学教育交流を推進した。

1) 病原菌・宿主相互作用：病原菌に対する免疫応答に関わる宿主因子の研究

非受容体型チロシンキナーゼSykは、B細胞やマスト細胞、マクロファージなどにおける免疫受容体を介したシグナル伝達に必要な不可欠な分子として知られている。我々は、Sykによりチロシンリン酸化を受けるアダプター蛋白質3BP2の機能に着目して研究を行っている。近年フランスの研究グループにより、3BP2がマクロファージの貪食を調節する事が明らかにされた。しかし、そのメカニズムは不明である。そこで我々は、様々なシグナル伝達因子をCRISPR/Cas9システムを用いて欠損させたノックアウト細胞株を作成し、3BP2による貪食の調節メカニズムを解析した。その結果、高親和性IgG受容体を架橋すると、3BP2がSykに依存してチロシンリン酸化されることを見出した。さらに変異体を使った解析から、Sykによる3BP2のチロシンリン酸化は貪食の調節に必要な不可欠であると考えられた。一方、高親和性IgG受容体を架橋すると、ケモカインの発現が誘導される。そこで、マイクロアレイおよびリアルタイムPCRを使って解析したところ、3BP2がケモカイン遺伝子の発現誘導に関わっており、Sykによるチロシンリン酸化がその調節に重要である事を見出した（Scientific Reports誌に論文発表）。

我々がこれまでにに行った研究から、Sykによる3BP2のチロシンリン酸化は様々な免疫細胞の機能調節に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、3BP2のチロシンリン酸化が個体レベルの免疫応答にどのような影響を及ぼすのか分かっていない。この問題を解決するために、CRISPR/Cas9システムを用いてチロシンリン酸化部位をフェニアラニンに置換した非リン酸化型3BP2を発現するノックインマウスを作製した。現在、B細胞における3BP2の機能に焦点を当て、解析を進めている（第一研究室）。

2) ウイルス・宿主相互作用の分子生物学的研究、並びに、ウイルス感染症の疫学研究

偏性細胞内寄生体であるウイルスは宿主細胞内の様々な高分子を利用して増殖する。その一方、宿主側にはインターフェロン（IFN）を中核とする自然免疫システムも備わっている。本研究室では、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の病原体であるC型肝炎ウイルス（HCV）を主な研究対象として、その増殖に影響する宿主因子の研究を行っている。

その結果、例えば、宿主のチロシンキナーゼc-Abi1がHCVの非構造蛋白質NS5Aのチロシンリン酸化を介してウイルス粒子形成過程に資することを明らかにしている。c-Abi1阻害薬は急性骨髄性白血病治療薬として知られるが、本研究の結果はc-Abi1阻害薬をある種のウイルス性疾患の治療薬として転用できる可能性があることを示唆している。また、我々は、HCVとIFNとの相互作用についても解析を行っている。その結果、I型IFNとIII型IFNとでは細胞内シグナル伝達におけるSTAT1蛋白質依存性に違いがあることを見出した。様々なウイルスが宿主細胞内のSTAT1を標的としてIFNのシグナル伝達を阻害することがわかっているが、本研究の結果はこのようなウイルスに対しては一部の型のIFNが有効に働いていることを示唆している。

本研究室では、また、外部研究機関との共同研究も行っている。富山大学とは単純ヘルペスウイルスの母子感染におけるウイルス・宿主相互作用の研究、福井県衛生環境研究センターとは感染性胃腸炎の起因ウイルスに関する疫学研究を行っている。

以上のような研究を進めることによって、ウイルス性疾患の病態をより深く理解し、その治療法を模索するための分子基盤を提供し、あるいは、公衆衛生上の問題を改善するための一助としたい。（第二研究室）

3) 微生物学の研究と医療に重点を置いた国際医学教育交流
福井大学医学部とインドネシア・アイルランガ大学医学部との学部間協定に基づき、本年1月にアイルランガ大学の医学生が本学を訪問し、当研究室（ゲノム科学・微生物学分野）のほか、呼吸器、内分泌代謝、救急医学の各診療科にて日本人医学生とともに4週間の研修に参加した。本事業の前身となる国際交流は2011年に開始され、毎年1～2名の本学医学生が引率教員とともにインドネシアを訪問し、その実績を経て2016年には医学教育に関する学部間協定が調印されている。（第一・第二研究室）

キーワード

生化学、ウイルス学、ゲノム編集、遺伝子改変マウス、Syk、C型肝炎ウイルス、病原体・宿主相互作用、感染症の疫学、国際医学教育交流

業績年の進捗状況

- 1) CRISPR/Cas9システムを使い、貪食能をもつU937細胞を親株とした3BP2ノックアウト細胞を作製した。ノックアウト細胞の機能を解析したところ、3BP2が高親和性IgG受容体を介する貪食やケモカインの産生に関わっており、Sykによる3BP2のリン酸化がこれらの機能に重要であることを見出した（Scientific Reports誌に論文発表）。
- 2) 福井県衛生環境研究センターとの共同研究として県内発生の感染性胃腸炎症例を調査したところ、小児散発症例と集団食中毒事例とでは検出される腸管ウイルスの種別割合や共感染の割合に大きな違いがあることを見出した。この知見をもとに、感染性胃腸炎の疫学調査で行われるウイルス検査の方法と手順を大きく改善することができた（Journal of Medical Virology誌に論文公表）。
- 3) 金沢医科大学の村松教授、旭川医科大学の谷口教授との間で、神経系におけるアセチルコリンの薬理学的動態についての共同研究を継続した（Journal of Neurochemistry誌、Cellular Signalling誌に論文発表）。
- 4) 富山大学の白木教授との間で、単純ヘルペスウイルスについての共同研究を継続した。
- 5) 学部間協定校であるアイルランガ大学医学部より1名の医学生を留学生として受け入れ、微生物学の研究と医療に関する教育交流を行った。

特色等

最新のゲノム編集技術を使って作製した遺伝子改変マウスを対象として、マイクロアレイやリアルタイムPCRによる遺伝子発現調節の解析、ELISAによるサイトカイン産生の解析、フローサイトメトリーを使った細胞表現型の解析などを行い、細胞レベルで起こる様々な生命現象を数値化して研究を進めている。（第一研究室）
第一研究室では蛋白質のチロシンリン酸化を介したシグナル伝達機構に関する研究を長年にわたって進めており、この方面に関する研究リソースの蓄積がある。第二研究室ではこれを利用してウイルス・宿主相互作用の研究を行っている。細胞遺伝学的研究では遺伝子欠損細胞株を用いることにより当該遺伝子の機能を明らかにする。従来、マウスでは遺伝子K0マウスに由来する細胞を用いて研究を行ってきたが、ヒトの場合、一般的に利用できる遺伝子K0技術のないことが研究の足枷となっていた。これに対し、近年、CRISPR/Cas9システムを利用した遺伝子K0技術が開発され、ヒト由来細胞株の遺伝子K0に用いられるようになっていた。本研究室では、この新しい技術を導入することによって、ヒト肝細胞株でしか増殖できないC型肝炎ウイルスの研究を進展させることができた。（第二研究室）
アイルランガ大学との間の国際医学教育交流は、研究室配属による医学生の研究体験と海外短期留学、さらに学部間協定による交換留学の側面を取組であり、2016年に締結された学部間協定に基づき毎年2名を上限として互いに留学生を派遣している。今年度はインドネシアから初の留学生が参加した。（第一・第二研究室）

本学の理念との関係

我々の研究は第三期中期計画における2-①「医学部・同附属病院では、地域の直面する少子高齢化や過疎化に対応するため、がん、発達障害や認知症、アレルギー・免疫疾患等の様々な疾患の克服を目指す先進的研究とともに・・・（中略）・・・学術誌への英語論文掲載数や研究成果の具体化件数等を第2期中期目標期間よりも増加させる。特に、がん、脳、アレルギー・免疫の分野では、第2期中期目標期間より20%以上増加させる。」に該当する。当研究室の「病原微生物感染に対する宿主因子についての研究」は広義のアレルギー・免疫の分野に該当する。

国際医学教育交流については、グローバル②「学生の国際交流を一層盛んにするために・・・（中略）・・・全学として受け入れ外国人留学生数と海外派遣日本人学生数を第2期中期目標期間と比較して、それぞれ15%増加させる。」に該当する。

3. 研究実績

区分		編数	インパクトファクター（うち原著のみ）
		2017年分	2017年分
和文原著論文		0	—
英文論文	ファーストオーサー	6	27.439 (27.439)
	コレスポンディング・オーサー	4	14.536 (14.536)
	その他	0	0 (0)
	合計	6	27.439 (27.439)

(A) 著書・論文等

(1) 英文：著書等

a. 著書

b. 著書（分担執筆）

c. 編集・編集・監修

(2) 英文：論文等

a. 原著論文（審査有）

1722001

K. Kowada, K. Takeuchi, E. Hirano, M. Toho, K. Sada: Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection of Human Enteric Viruses Other Than Norovirus Using Samples Collected from Gastroenteritis Patients in Fukui Prefecture, Japan., J Med Virol, 90(1), 67-75, 201801, DOI: 10.1002/jmv.24926, #1.935

1722002

K. Chihara, Y. Kato, H. Yoshiki, K. Takeuchi, S. Fujieda, K. Sada: Syk-dependent tyrosine phosphorylation of 3BP2 is required for FcR γ -mediated phagocytosis and chemokine expression in U937 cells., Sci Rep, 7(1), 11480, 2017, DOI: 10.1038/s41598-017-11915-5, #4.259

1722003

N. Takahashi, T. Saeki, A. Komatsuda, C. Munemura, T. Fukui, N. Imai, N. Homma, T. Hatta, K. Samejima, T. Fujimoto, H. Omori, Y. Ito, Y. Nishikawa, M. Kobayashi, Y. Morikawa, S. Fukushima, S. Yokoi, D. Mikami, K. Kasuno, H. Kimura, T. Nemoto, Y. Nakamoto, K. Sada, M. Sugai, H. Naiki, H. Yoshida, I. Narita, Y. Saito, M. Iwano: Tubulointerstitial nephritis with IgM-positive plasma cells., J Am Soc Nephrol, 28(12), 3688-3698, 20171217, DOI: 10.1681/ASN.2016101074, #8.966

1722004

I. Muramatsu, J. Uwada, T. Masuoka, H. Yoshiki, K. Sada, Lee, KS, M. Nishio, T. Ishibashi, T. Taniguchi: Regulation of synaptic acetylcholine concentrations by acetylcholine transport in rat striatal cholinergic transmission., J Neurochem, 143(1), 76-86, 2017, DOI: 10.1111/jnc.14127, #4.083

1722005

J. Uwada, T. Yazawa, Islam M. T., Khan, M. R. I., Krug, S. M., Fromm, M., S. Karaki, Y. Suzuki, A. Kuwahara, H. Yoshiki, K. Sada, I. Muramatsu, T. Taniguchi: Activation of muscarinic receptors prevents TNF- α -mediated intestinal epithelial barrier disruption through p38 MAPK., Cell Signal, 35, 188-196, 2017, DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.04.007, #3.937

1722006

C. Honjoh, K. Chihara, H. Yoshiki, S. Yamauchi, K. Takeuchi, Y. Kato, Y. Hida, T. Ishizuka, K. Sada: Association of C-type lectin Mincle with Fc ϵ RI β γ subunits leads to functional activation of rat mast cells through Syk protein tyrosine kinase., Sci Rep, 7, 46064-46064, 20170410, DOI: 10.1038/srep46064, #4.259

b. 原著論文（審査無）

c. 原著論文（総説）

d. その他研究等実績（報告書を含む）

e. 国際会議論文

(3) 和文：著書等

a. 著書

b. 著書（分担執筆）

c. 編集・編集・監修

(4) 和文：論文等

a. 原著論文（審査有）

b. 原著論文（審査無）

c. 総説

1722007

千原 一泰, 本定 千知, 木村 幸弘, 竹内 健司, 藤枝 重治, 石塚 全, 定 清直: C型レクチンによるマスト細胞の活性化メカニズム, 臨床免疫・アレルギー科, 69(3), 271-276, 201803

d. その他研究等実績（報告書を含む）

e. 国際会議論文

(B) 学会発表等

(1) 国際学会

a. 招待・特別講演等

b. シンポジスト・パネリスト等

c. 一般講演（口演）

d. 一般講演（ポスター）

e. 一般講演

f. その他

(2) 国内学会（全国レベル）

a. 招待・特別講演等

b. シンポジスト・パネリスト等

c. 一般講演（口演）

d. 一般講演（ポスター）

e. 一般講演

f. その他

(3) 国内学会（地方レベル）

a. 招待・特別講演等

b. シンポジスト・パネリスト等

c. 一般講演（口演）

1722008

千原 一泰, 加藤 雄士, 竹内 健司, 藤枝 重治, 定 清直: アダプター蛋白質3BP2による貪食細胞の機能調節メカニズム, 日本生化学会北陸支部第35回大会, 金沢市, 20170603

d. 一般講演（ポスター）

e. 一般講演

f. その他

(4) その他の研究会・集会

a. 招待・特別講演等

b. シンポジスト・パネリスト等

c. 一般講演（口演）

d. 一般講演（ポスター）

e. 一般講演

f. その他

1722009

定 清直, 山内 翔太, 竹内 健司, 千原 一泰: ヒト肝細胞癌由来培養細胞のIFN- α 、 λ 応答のSTAT1依存性における違い, 平成29年度北陸腸内細菌研究会, 福井市, 20170708

(C) 特許等

区分	内容（発明の名称）	発明者又は考案者
----	-----------	----------

(D) その他業績

4. グラント取得

(A) 科研費・研究助成金等

区分	プロジェクト名	研究課題名	代表者名	分担者名	期間（年度）	金額（配分額）
区分	研究種目	課題名	代表者名	分担者名	期間（年度）	金額（配分額）
文部科学省科学研究費補助金	基盤研究 (C)	ウイルス感染宿主因子としてのチロシンキナーゼAb1の新しい役割	定 清直	千原 一泰, 竹内 健司	2017	1560000

(B) 奨学寄附金

受入件数	1
受入金額	300000

5. その他の研究関連活動

(A) 学会開催等

区分	主催・共催の別	学会名	開催日	開催地
----	---------	-----	-----	-----

(B) 学会の実績

学会の名称	役職	氏名
日本生化学会	代議員	定 清直
日本生化学会	評議員	定 清直
日本感染症学会	評議員	定 清直
日本ウイルス学会	一般会員	定 清直
日本分子生物学会	一般会員	定 清直
米国免疫学会	一般会員	定 清直
日本細胞生物学会	一般会員	千原 一泰
日本分子生物学会	一般会員	千原 一泰
日本生化学会	一般会員	千原 一泰
日本分子生物学会	一般会員	竹内 健司
日本ウイルス学会	一般会員	竹内 健司

(C) 座長

国内学会	学会名	氏名
------	-----	----

(D) 学術雑誌等の編集

学術雑誌等の名称	委員長（主査）・委員の別	氏名
----------	--------------	----

(E) その他

1722010

本定 千知, 千原 一泰, 吉本 はつみ, 山内 翔太, 竹内 健司, 加藤 雄士, 飛田 征男, 石塚 全, 定 清直: 2017年度前期優秀論文賞（医学研究推進室）, Association of C-type lectin Mincle with Fc ϵ R1 β γ subunits leads to functional activation of RBL-2H3 cells through Syk, 2017

1722011

千原 一泰, 加藤 雄士, 吉本 はつみ, 竹内 健司, 藤枝 重治, 定 清直: 2017年度前期優秀論文賞（医学研究推進室）, Syk-dependent tyrosine phosphorylation of 3BP2 is required for optimal Fc γ -mediated phagocytosis and chemokine expression in U937 cells, 2017

1722012

定 清直: 福井大医学部 結核予防法開発へ一步 「マスト細胞 免疫高める」（日刊県民福井、日経、福井、読売、NHK福井、FBC福井放送）, 20170428