



〔最終講義〕

疾患モデルマウスと歩んだ40年

幡野 雅彦

(2023年5月31日受付, 2023年8月10日公表)



コロナ禍のため約3年ぶりの対面（オンラインとのハイブリッド）での最終講義となりました。本来であれば医学研究院長及び附属病院長との日程調整をして開催日を決めるのですが、今回は未だコロナ禍でありまた私の希望もあり2月17日（金曜日）午前9時30分からという時間帯に設定させていただきました。この時間帯は通常はBasic Science Joint Meeting（通称BSJM）というクローズドのミーティングが開催されています。基礎研究をおこなっている研究室が集まり、論文投稿前のデータについて主に若手の教員や大学院生が発表し議論することによりさらにブラッシュアップして良い論文にしようという場です。私自身もBSJMでお世話になり思い出もあるため是非この場で最終講義を行いたいと思った次第です。最終講義の内容は①卒後40年を振り返って

（自己紹介）、②研究・共同研究の紹介、③教育・大学運営・国際交流について、④バイオメディカル研究センター及び動物実験施設の歩み、⑤メッセージ（まとめ）という構成にしました。動物実験施設については長年施設を切盛りして下さった伊勢川直久先生がやはりこの3月で定年退職を迎えられ、施設の歴史を知る者がいなくなるためこの機会にお話をさせていただくことにしました。

卒後40年を振り返って

私は昭和57年に千葉大学医学部を卒業しました。卒後40年になりますがその間社会も大きく変わっています。阪神淡路と東日本の2つの大震災と原発事故、新型コロナウイルス感染症の流行、ウクライナ侵攻など予期せぬことが起こりまた



最終講義風景

千葉大学名誉教授・千葉大学大学院医学研究院疾患生命医学
Masahiko Hatano, 40 years with disease model mice.
Professor Emeritus, Department of Biomedical Science, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.
Phone: 043-222-7171. E-mail: hatanom@faculty.chiba-u.jp
Received May 31, 2023, Published August 10, 2023.

継続しています。一方で科学の分野においても、PCRの開発、ジーンターゲティングとノックアウトマウス作製技術の確立、iPS細胞、ゲノム編集技術など生命科学のブレイクスルーに貢献する新たな技術が生み出されました(図1)。さらに忘れてはならないのは情報技術の進歩です。インターネットやスマートフォンの普及により私たちの手にする情報量は圧倒的に増えました。正しい情報を発信し、また取舍選択することが非常に重要になっています。

さて私は医学部卒業後直ちに千葉大学医学部小児科に入局しました。その後の師との出会いが私の将来を決定づけるものとなりました。当時小児科学教室を主宰されていた中島博徳教授(昭23卒)はすぐれた臨床医であるとともにすぐれた研究者でもありました。その医師・研究者としての姿(今でいうPhysician Scientist)に憧れ、また胎児期を含めた小児の成長・発達というダイナミックな変化に興味を持ち入局を決めました。そして入局した年にアメリカから留学を終えて小児科に戻られた河野陽一先生(昭48卒・現千葉大学名誉教授)と出会います。河野先生は熱く免疫学の研究について語られ私もそれに魅了されて小児科免疫・アレルギーグループ研究班を選ぶこととなります。その後、関連病院で小児科医としての研鑽を積むこととなりますが、そこでは成田赤十字病院小児科部長福本泰彦先生(昭35卒)に出会います。福本先生には小児科医として患者・家族などとの接し方、また外来では私の隣のブー

スで診察されており、時折私に声をかけて下さり「これがコプリック斑だよ」など小児common diseasesについて機会あるごとにご指導いただきました。関連病院出張後、大学に戻ることになりますが、せっかく免疫グループに入ったからには基礎から学びたいと思い河野先生の紹介で免疫研究部谷口克教授のラボに行くことになりました。そこで出会ったのが徳久剛史先生(昭48卒:元千葉大学学長、千葉大学名誉教授)でした。徳久先生からはサイエンスの手ほどきから基礎免疫学、胚工学技術など一からご指導いただきました。その後、昭和62年に神戸大学の教授に栄転され私も同行しラボのセットアップなどを手伝いながら学位論文を仕上げました。さらに平成元年に河野先生、徳久先生との縁でアメリカ合衆国ワシントン大学(St. Louis)のStanley Korsmeyer Labに留学する機会を得ました。Korsmeyer博士は染色体転座から新しいがん遺伝子のクローニングをしてきた研究者で、特にBcl2, Baxなどアポトーシス関連遺伝子のクローニングと機能解析をした業績で有名です(図2)。ノーベル賞の候補にもノミネートされたとのことですが、残念ながら54歳という若さで肺癌のため逝去されました。私の研究テーマは染色体転座を持つT細胞白血病細胞から新しいがん遺伝子をクローニングするというものでした。当時は今のようない次世代シーケンサーやデータベースはなく、世界中で新しい遺伝子のクローニングが競争となっていました。幸いなことに一番乗りでクローニングに成功

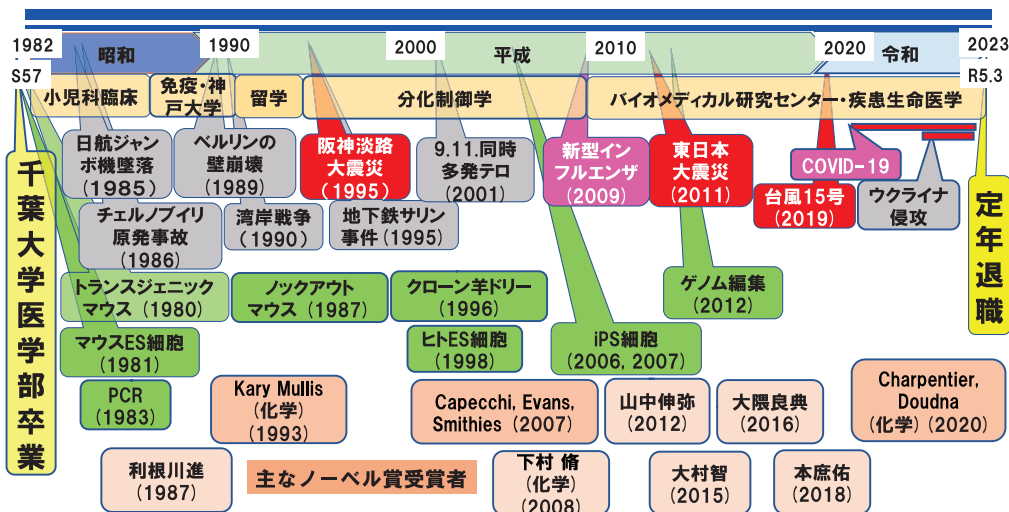


図1 ~卒後40年を振り返って~

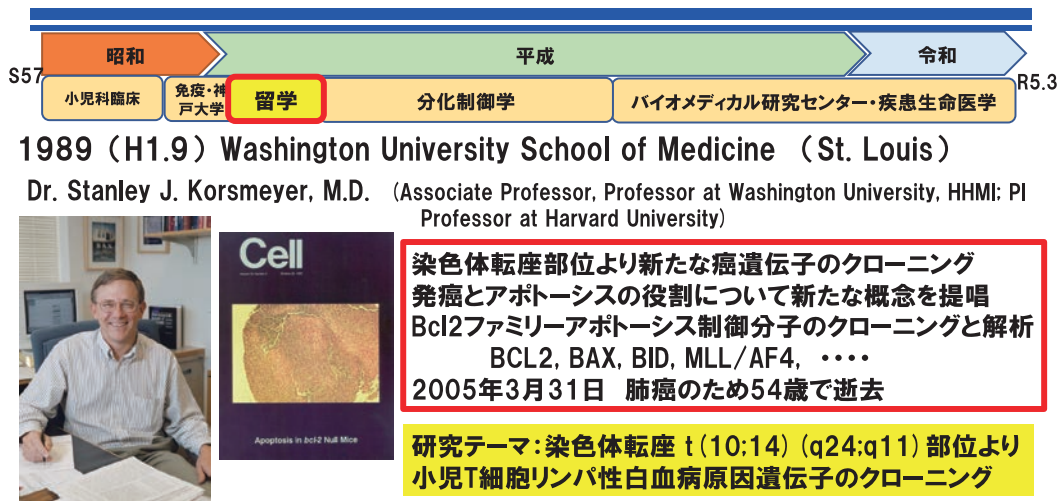
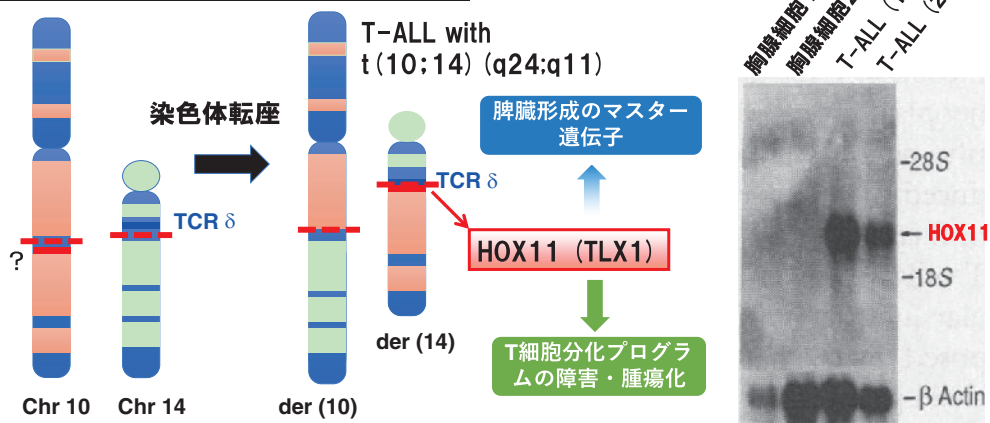


図2 留学時代

T細胞白血病原因遺伝子のクローニング



(Hatano et al. Science 1991)

図3 T細胞分化と腫瘍化

しScience誌に論文を発表することができました(図3)。平成5年徳久教授が千葉大学医学部附属高次機能研究センター教授に異動になるタイミングで助手として帰国することになります。そこで再びノックアウト (KO) マウスなど胚工学技術を取り入れたラボを一緒に立ち上げることになりました。ちょうどドイツから帰国された古関明彦先生(昭61卒: 現理研チームリーダー, 千葉大学細胞分子医学教授)にES細胞の培養からKOマウス作製などの技術を学び, 研究室初めてのKOマウスとしてBcl6 KOマウス及びNcx KOマウスを作製しました。そしてBcl6 KOマウスの研究は徳久教授のライフワークとなり, また私はNcx KOマウスを軸に研究を進めていくこととなります。このように振り返ってみますと卒後10年での

出会いがその後の私の研究者・大学教員としての方向性を大きく決めることになったと思います。

研究・共同研究の紹介

帰国後, 前述のように胚工学の実験系を立ち上げながら自分の研究テーマを進めることになるのですが, やはり小児科医としての経験からヒトの疾患に直接かかわるような研究をしたいという思いがありました。幸いなことに帰国して最初に作製したNcx KOマウスは巨大結腸症を発症しました。巨大結腸症を呈する疾患としてはヒルシュスプルング病が有名です。ヒルシュスプルング病では先天的に腸管神経が欠如するために腸管機能異常をきたす疾患ですが, Ncx KOマウスではむしろ

ろ腸管神経細胞数の増加が認められました。これはヒトのヒルシュスプルング病類縁疾患の1つである腸管神経異形成症 (Intestinal Neuronal Dysplasia; IND) のモデルと考えられ論文として発表しました (図4)。INDはヨーロッパで症例が多くまたその病態については感染などによる二次的なものかと考えられていたがこの研究により遺伝的に規定された1つの疾患であることが証明されました。さらにこの論文によりイタリア・ジェノヴァ大学からセミナーの依頼が舞い込み、また国際Hirschsprung病学会で招待講演を行いました。まさに1報の論文で世界と繋がったわけです。その後「腸管神経」「IND」は私の研究テーマのキーワードとなりました。Ncxをノックアウトすると腸管機能異常及び巨大結腸症が発症

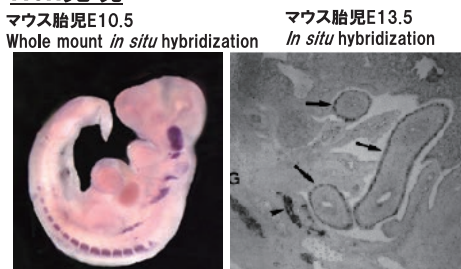
することが明らかになりましたがその分子メカニズムについては不明です。出生直後より腸管神経細胞数を数えると、新生児期は野生型・KOマウス共に差がないのですが、3週齢まで観察するとKOマウスでは正常発達過程で見られる腸管神経細胞の減少が起こらないために野生型と比較すると相対的に増加していることが明らかとなり、神経細胞死の障害であることが示唆されました (図5)。次にNcxがホメオボックスタイプの転写因子であることに着目しその標的遺伝子を明らかにすることにより神経細胞死の分子機構の解明を目指しました。当時は今のような網羅的解析技術は発達しておりませんでしたので、地道にRNAサブトラクション法やクロマチン免疫沈降法などをマニュアルで行いました。野生型マウスとNcx

TLX遺伝子ファミリー

- TLX1 (HOX11, TCL1)
- TLX2 (**NCX**, Enx, HOX11L1)
- TLX3 (Rnx, HOX11L2)

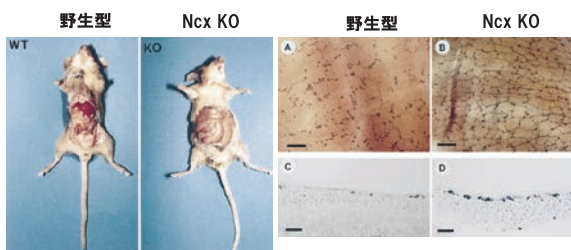
- T細胞白血病 / 脾臓
- 神経堤細胞、腸管神経系
- T細胞白血病 / 呼吸中枢

Ncx発現



(Hatano et al. *Anato Embryol* 1997)

腸管神経細胞増加を伴う巨大結腸症



(Hatano et al. *J Clin Invest* 1997)

図4 Ncx KOマウス

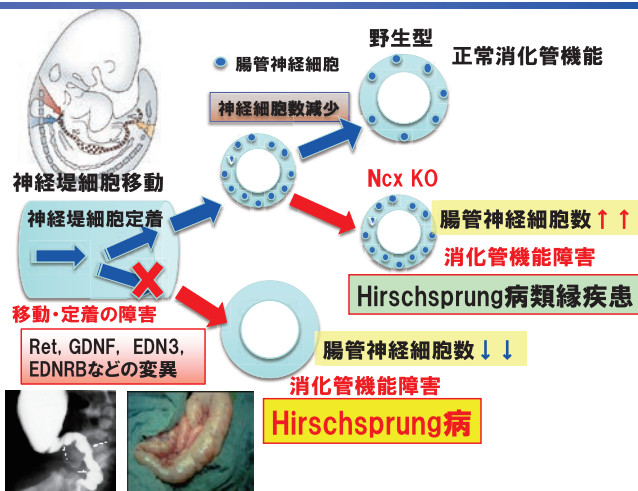
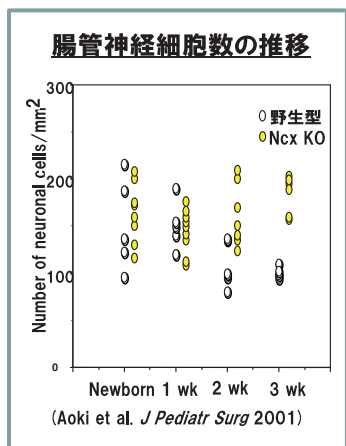


図5 NcxとHirschsprung病類縁疾患

KOマウス腸管で発現に差のある遺伝子はいくつか同定でき論文として発表しましたがKOマウスの表現型をうまく説明できる分子にはなかなか辿りつきませんでした。マイクロアレイなど網羅的解析が可能になって改めて実験を行ったところ神経細胞死に関与する遺伝子の発現に差があることが明らかになりました(図6)。神経細胞株ではNcxノックダウンにより発現が増加し、マウスでは野生型と比較してKOマウス腸管神経細胞に多く発現しており神経細胞死を防御していることが示唆されました。Ncxがレプレッサーとして機能し、出生直後の腸管神経細胞数を制御していることが考えられ、ようやくIND発症の分子機構の一端にたどり着けたと思います(本稿執筆時論文revise中)。一方でNcx KOマウスではその遺伝的バックグラウンドにより巨大結腸の発症率が

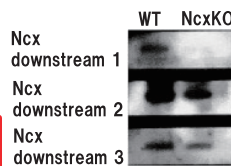
異なることがわかりました。C57BL/6系統では100%のKOマウスで発症するのに対しBALB/cや129系統ではKOマウスでの発症率は10%以下です。私たちは同じくINDのモデルとして巨大結腸症を発症するKif26a KOマウスを入手しC57BL/6およびBALB/cへとそれぞれバッククロスしました。そうしたところ、C57BL/6系統では100%発症し30日以内に死亡することが明らかになりました。一方でBALB/c系統では巨大結腸症は発症せず一部腎障害のため死亡することがわかりました。すなわち巨大結腸症の疾患修飾遺伝子の存在が示唆されC57BL/6の遺伝子多型が関与することが考えられます(図7)。これらの結果と疾患修飾遺伝子の解明は今後ヒト疾患発症のメカニズムや治療ターゲットを考える際に重要な情報と思われま

Ncx下流標的遺伝子の探索

1. RNA subtraction

2. Chromatin immunoprecipitation

- Prickle1
- IVNS1AP (Nd1) → Novel PID associated gene Nature 2020
- Nczf



Kang et al. *Biochim Biophys Acta* 2001
 Sasagawa et al. *J Biol Chem.* 2002
 Fujimura et al. *Cardiovasc Res* 2004
 Inoue et al. *DNA Cell Biol.* 2005
 Matsudo et al. *Transgenic Res.* 2006
 Takamori et al. *Int J Mol Med.* 2006
 Kitahashi et al. *DNA Cell Biol.* 2007
 Fujimura et al. *Neurosc Letters* 2009
 Ohta et al. *Int J Oncol.* 2010
 Teratake et al. *Sci Rep.* 2016

3. Microarray

Endothelin converting enzyme-like 1 (Ecel1):
 Endothelin-converting enzyme 1 (Ece1) のパラログ
 ECE1変異はHirschsprung病患者で同定

(Oita et al. Under revision)

図6 NcxとHirschsprung病類縁疾患

Ncx KOマウス

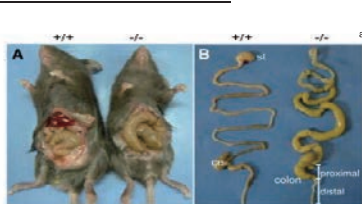
Strain (generation)	N	+/+	+/-	-/-	-/- With no symptoms ^a	-/- With phenotype
129 (N5-8)	47	14	20	13	11	2 ^b
B6 (N5-8)	100	38	45	17 ^c	0	16 ^d

(Parisi, et al. *Gastroenterology* 2003)

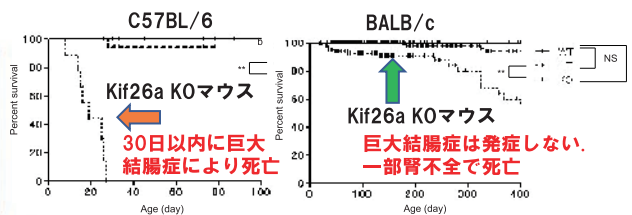
巨大結腸症：
 C57BL/6系統では100%発症
 129系統では10%

疾患表現型修飾因子の存在
 C57BL/6系統の遺伝子多型？

Kif26a KOマウス



(Zhou, et al. *Cell* 2009)



(Ohara et al. *Scientific Reports* 2021)

図7 疾患修飾遺伝子

さて、腸管神経と巨大結腸症の研究のほかに腸管神経と免疫・腸内細菌叢および腸管バリア機構の制御についての研究も行ってきました。腸管は神経系・免疫系と腸内細菌叢が上皮細胞バリアを隔てて接している臓器です(図8)。神経系・免疫系と腸内細菌叢の相互作用については近年盛んに研究が行われています。私たちは腸管神経の増加しているNcx KOマウスにおいて免疫系および腸内細菌叢がどのような影響を受けているかを調べました。本稿執筆時点で論文reviseあるいは投稿中のため概要を図9に示します。実際、腸管神経系の異常に起因するHirschsprung病やその類縁疾患においては重篤な腸炎の発症率が高いことがいわれています。腸管神経を治療ターゲットと

してこれら腸炎の制御に寄与できる可能性を示しています。なお、これらの腸管神経に関する一連の研究は疾患生命医学・バイオメディカル研究センター坂本明美先生、藤村理紗先生及びスタッフの方々、修士・博士課程大学院生、千葉大学小児外科をはじめとする各研究領域の大学院生の皆さん、さらに順天堂大学小児外科山高篤行先生及びスタッフの先生方、杏林大学医学部感染症学神谷茂先生及びスタッフの先生方らの協力のもと行われましたことを申し添えます。

小さな基礎研究室ですが私自身のメインの研究以外にも「疾患モデルマウス」をキーワードとして学内外の先生方より多くの優秀な大学院生を派遣していただき、おかげさまで素晴らしい共同研

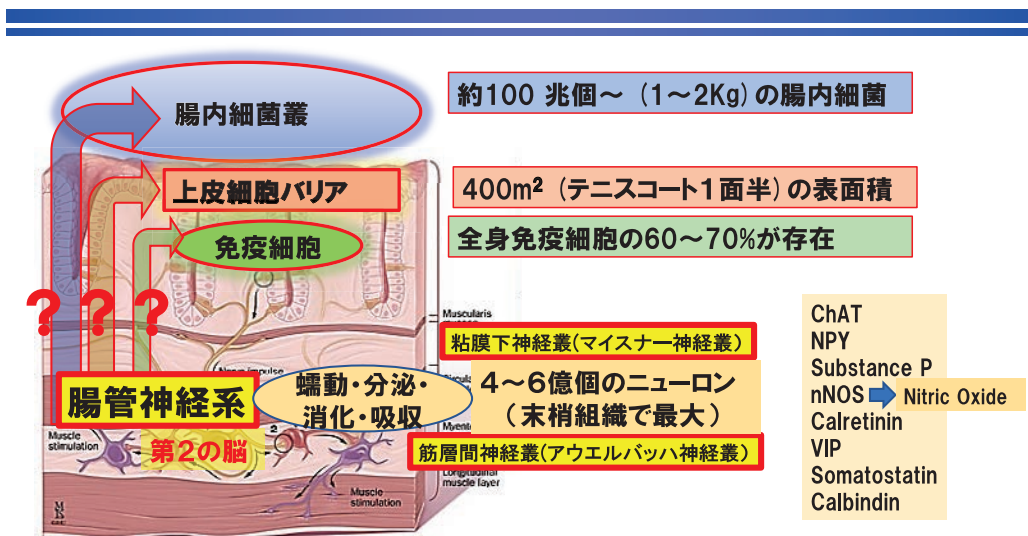


図8 腸管神経による腸管バリア機構制御

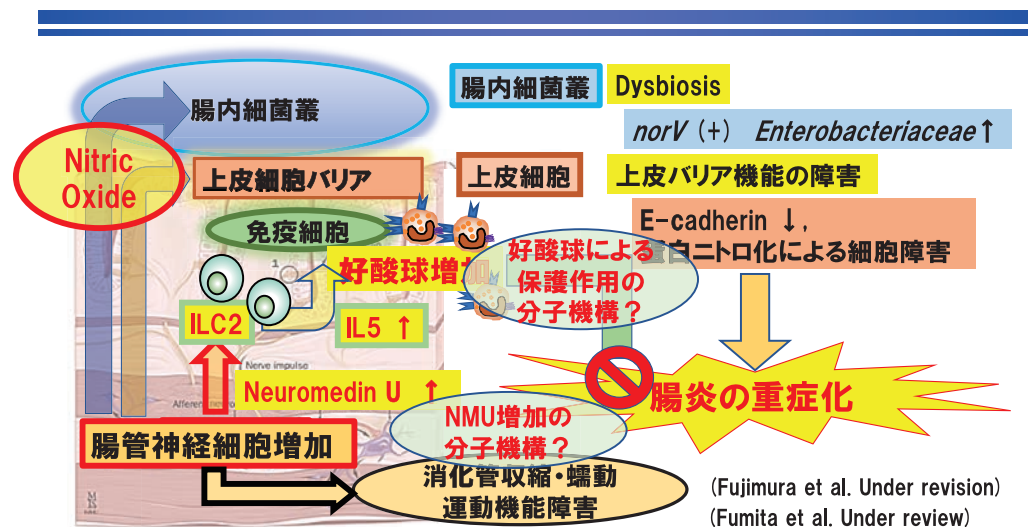


図9 腸管神経による腸管バリア機構制御

に関わらせていただきました。また卓越大学院プログラム「革新医療創生CHIBA卓越大学院」プログラム担当者及び学生選抜委員長、JST次世代研究者挑戦的研究プログラム「全方位イノベーション創発博士人材養成プログラム」学生選抜委員として大学院教育に携わりました。学部学生とは講義の他に学生サークル「世界の医療を考える会」の顧問としての交流及び海外医学部の留学生を1か月単位で研究室に受け入れての研修を行ってきました。これらの活動を通じて多才で優秀な学部学生や大学院生と接する機会をいただきました。将来の医学・生命科学のリーダーとして活躍することを願っています。また、国際交流に関しては神戸大学時代からインドネシアのガジャマダ大学との交流が続いており、留学生の受け入れやvisiting professorとして胚工学の講義を担当して

いました。残念ながらコロナ禍のためこの3年間は交流のできない状況でしたが、今後再開されさらに海外との交流機会が増えることを祈っています。

動物実験施設及びバイオメディカル研究センターの歩み

動物実験施設は昭和53年設置が認可され昭和57年現在の建物が竣工しました。ちょうど偶然にも私が千葉大学を卒業した年で40年経過しており、平成27年より施設長を務めさせていただきました(図12)。施設は老朽化しており維持費・飼育費なども高騰しています。またこの間に動物愛護・動物福祉の重要性が国際的にも広く認識され、動物実験においてもそれらの精神を重んじることが要求されてきています(図13)。動物実験の再現性・

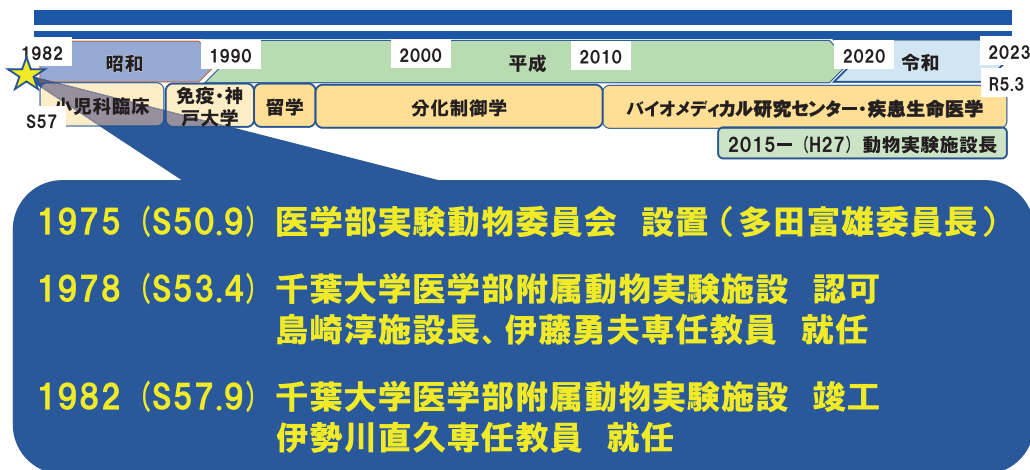


図12 動物実験施設の歩み

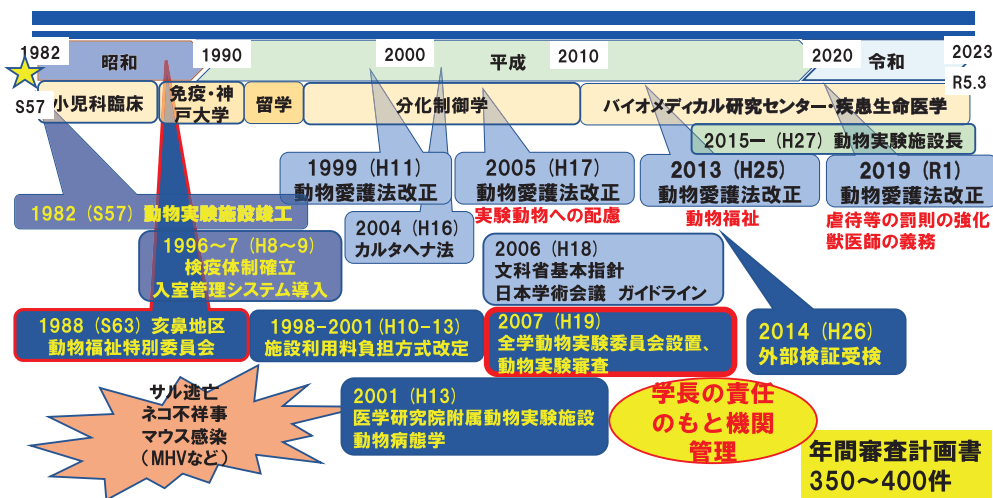


図13 動物実験施設の歩み

信憑性を維持することは千葉大学が今後研究大学として発展していくためには必須であり施設の新築をはじめとして多くの課題が山積みとなっています。

バイオメディカル研究センターは平成13年遺伝子実験施設として設置が認められ平成16年に竣工しました。学内の遺伝子組換え実験及び胚工学の研究支援施設として運営されています。主として高いクリーン度を必要とする遺伝子組換えマウスの飼育施設として動物実験施設との棲み分けを行ってきました。スライド図14, 15にバイオメディカル研究センターの歩みを簡単にまとめています。なお動物実験施設及びバイオメディカル研究センターについての詳細は現在作成作業が進行しております「千葉大学75年史」にも掲載予定です。

メッセージ

最後に約40年の大学教員生活のまとめとしてメッセージを送りたいと思います。これは教員生活から私が感じたことあるいは実践してきたことの個人の感想です。

1. 卒後10年が将来を決める（師との出会い）
2. 語学（英語・日本語も）、ITは必須（情報収集、取捨選択）
3. 得意技を持って
4. 直感を大切に（研究も人生も）
5. 歴史に学ぶ
6. 二刀流は当たり前、三刀流・四刀流も可能
7. 言い訳は聞く
8. 緩・急、オン・オフを意識
9. 想像力・創造力・破壊力

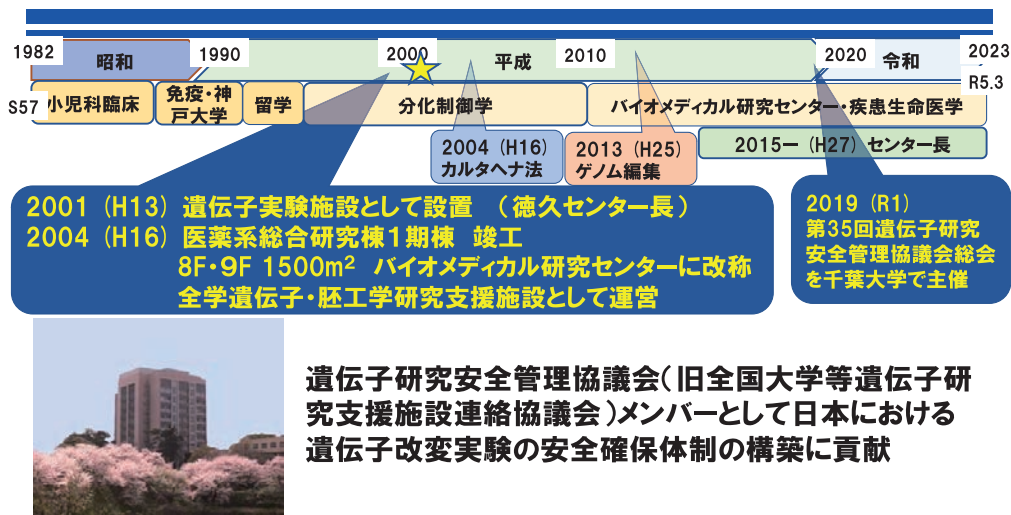


図14 バイオメディカル研究センター

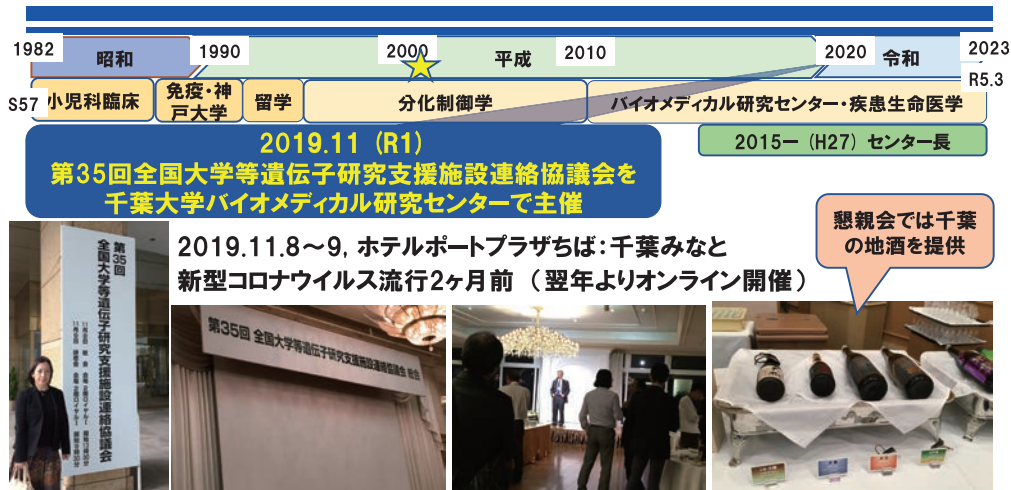


図15 バイオメディカル研究センター

最初の6つは特に学生さんや若手医師・研究者の皆さんへのメッセージです。コロナ禍でなかなか対面での学会には参加できない状況でしたが、人との出会いの中から将来の人生へのヒントが生まれてきます。そのためには語学力や情報の収集や取舍選択する力も必要です。臨床・研究においてはアピールできる得意技を身につけることが大切です。7番は普通「言い訳はするな」になると思いますが、私はこれまで学生やスタッフに接するときにはできるだけ言い訳を含め相手の話をよく聞くことを心がけてきました。聞くことによりそ

の人の抱えている問題点、あるいは研究室内や私自身に潜んでいる問題点に気づかされることがあるからです。最後に、研究あるいは臨床現場においては常に「想像力・創造力」を働かせることが求められていますし、新たにブレイクスルーするには「破壊力」も必要となります。千葉大学医学部学生、若手医師・研究者が多様な才能を出し合うことによって化学反応が起き、千葉大学医学研究院・附属病院がさらに活性化し世界へとメッセージを発信し続けることを祈っています。