

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「代謝調節機構解析に基づく細胞機能
制御基盤技術」
研究課題「鉄および鉄補欠分子族の動態調節と
その破綻による病態の解明」

研究終了報告書

研究期間 平成19年10月～平成25年3月

研究代表者：岩井 一宏
(京都大学大学院医学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

鉄は酸素をはじめとした気体と親和性を有するのに加え、中性 pH の還元環境下では容易に電子を授受できる。それゆえ、鉄は鉄イオンとして、また、鉄補欠分子族(鉄-硫黄クラスターやヘム)の形でタンパク質と結合し、酸素運搬、エネルギー産生、核酸合成をはじめとする種々の酸化還元反応の活性中心として利用されている。しかしながら、過剰な鉄の蓄積は無秩序な酸素などとの電子の受け渡しを惹起してフリーラジカルの産生源となり、細胞障害性を有する。それゆえ、細胞は鉄代謝を厳密に調節する巧妙なシステムを備えている。哺乳類細胞においては、鉄代謝は IRP (iron regulatory protein : IRP1 と IRP2 が存在する)と呼ばれる RNA 結合タンパク質が鉄代謝に関与するタンパク質をコードする遺伝子の mRNA 上に存在する IRE (iron responsive element) と選択的に結合することによって調節されている。しかしながら、ひとたび鉄代謝調節システムが破綻すれば、ガン、神経変性疾患など種々の疾患が誘発されるが、その鉄毒性の誘発メカニズムは解明されていない。そこで、本研究では鉄代謝調節機構の理解に必須である、鉄および鉄補欠分子族の動態を分子レベルで解析するとともに、鉄代謝異常が関連する疾患の病態生理学的解析を進めた。

細胞レベルでの鉄及び鉄補欠分子族の代謝調節に関しては、IRPs の鉄感知メカニズムを中核に主に岩井グループが解析を進めた。IRPs は鉄欠乏状態においてのみ IRE 結合活性を有することが示されていたが、鉄による制御の詳細な分子メカニズムは不明であった。本 CREST 研究遂行中に他の研究者から鉄イオン自体の多寡によって、2 種の IRP のうちで中核的な機能を有している IRP2 の活性が制御されると報告されたが、研究代表者らは本研究において、鉄が過剰に存在しても、ヘム、鉄-硫黄クラスターが生成されない場合には細胞は鉄過剰を感知できず、IRP2 の活性が低下しないことを明らかにした。鉄イオンプールは細胞質に存在しているのに対し、これらの鉄補欠分子族はミトコンドリアで生成される。それゆえ、細胞の鉄感知においては細胞質の鉄イオンプールのみならず、ミトコンドリアでの鉄補欠分子族産生の重要性を明確にできたと考えている。また、毒性回避のために過剰時にはフェリチンに貯蔵された鉄の動態に関してはほとんど研究がなされていなかったため、検討を加えた。その結果、正常細胞では鉄の多寡に関わらず、フェリチンに貯蔵された鉄は一定の割合でフェリチンから遊離して利用されているが、がん細胞株では鉄過剰時にはフェリチンに貯蔵された鉄は放出されないことを見出した。これまで鉄代謝研究は株化癌細胞を用いて研究されてきたが、本成果は正常細胞、個体を用いた研究の重要性を明確にしたのみならず、鉄過剰時のフェリチン鉄の放出メカニズムの喪失と発癌との相関を示唆したものである。また、細胞質には鉄イオンプールが存在するがその存在様式、例えば鉄イオンと結合する鉄キャリアは同定されていない。植物の鉄イオンプールは低分子化合物と結合することから、岩井グループ、メタボロームグループが共同でメタボロームを用いて鉄キャリアの同定を進めたが同定には至っていない。

鉄代謝異常と疾患との関連に関しては、神経細胞特異的な NSE プロモーターを用いた IRP2 トランスジェニック(NSE-IRP2 Tg)マウスでは鉄による酸化ストレスの亢進により神経変性症状を呈することを示してきたが、本研究においては、家族性パーキンソン病の責任遺伝子産物の1つである Parkin のノックアウト(KO)マウスと交配を行った。Parkin KO マウスのみでは顕著な症状は示さないが、IRP2 Tg マウスとの交配により、5ヵ月齢から神経変性疾患による症状を呈することが明らかとなり、鉄による酸化ストレスがパーキンソン病の増悪因子として機能する可能性を示した。また、疲労は発熱、痛みと並ぶ3大生体アラームの1つであるが、客観的な疲労の指標は見いだされていなかった。本研究では疲労研究グループが準備した疲労マウス、慢性疲労症候群患者血漿をメタボロームグループが慶應義塾大学の曾我朋義教授と共同でメタボローム解析を進め、疲労のバイオマーカーを同定して特許申請を行った。

(2) 顕著な成果

1. フェリチンの貯蔵される鉄の利用メカニズムの解明

概要: 鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンの動態の詳細な解析の結果、フェリチンは鉄過剰、欠乏時いずれにおいてもリソソームに輸送されて分解されるが、欠乏時、過剰時でリソソームへの輸送経路が異なること、鉄過剰時の輸送機構は癌細胞株では欠損していることを示した。

2. FBXL5 による IRP の活性制御機構は鉄代謝調節機構の中核を担っていることを示した。

概要: 九州大学の中山敬一教授と共同で FBXL5 KO マウスを解析し、FBXL5 KO マウスは鉄過剰による酸化ストレスの亢進のために胎生致死であること、IRP2KO マウスと交配することで、胎生致死が回避されることを示し、FBXL5 による IRP2 の活性制御が生体の鉄代謝制御の中核であることを示した。

3. 疲労バイオマーカーの同定

概要: 慢性疲労症候群患者の血液や比較的長期に疲労負荷を与えた動物モデルから採取した臓器を対象にメタボローム解析研究をおこない、疲労バイオマーカーを同定することに成功した。特に、慢性疲労症候群患者と疲労モデル動物に共通する代謝変化パターンを解糖系から TCA 回路にかけて見出し、慢性疲労症候群の診断バイオマーカーとなりうる3つの代謝物(グルコースを除く)の組み合わせを示した。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

背景:

鉄は中性 pH の還元環境下では、容易に電子を授受できる酸化還元反応の活性中心として最適の性質を有しており、生物は鉄を種々の酸化還元反応を担う酵素と結合させて利用している。また鉄は呼吸鎖の最終電子受容体である酸素への電子供与にも関与し、エネルギー産生の重要な機能も担っている。一方で鉄の持つ酸素との強い反応性ゆえにフリーラジカルの産生源となり細胞障害性を有するため、生物は鉄代謝を厳密に調節する巧妙なシステムを備えている。

哺乳類細胞では IRP(iron regulatory protein)と呼ばれる RNA 結合タンパク質が鉄濃度の変化を感知して、鉄代謝に関与する遺伝子群、フェリチンやトランスフェリン受容体 1(TfR1)などの発現を RNA レベルで制御することで鉄代謝を調節している(図1)。ノックアウト(KO)マウスの解析から、2種類存在する IRP(IRP1、IRP2)のうち IRP2 がより重要であることが判明している(IRP1 KO マウスは正常、IRP2 KO マウスは神経異常を発症)。研究代表者らは IRP2 の鉄依存的活性調節機構について先駆的な研究を展開し、IRP2 が鉄自体ではなくヘムの濃度変化を介して鉄濃度変化を感知し鉄代謝を制御していることを明らかにしてきた。

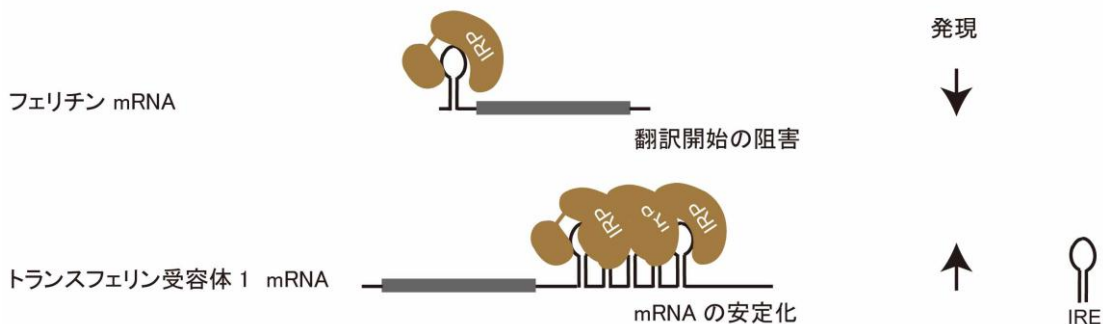


図1 IRE/IRP 系による鉄代謝制御機構 IRP は鉄欠乏時にのみフェリチンやトランスフェリン受容体 1 (TfR1) mRNA 上に存在する IRE に結合する。TfR1 mRNA は半減期が短い mRNA であるが、IRP が結合することで安定化することで mRNA 量が増加して、TfR1 タンパク質の発現が亢進する。フェリチン mRNA の場合には 5' の cap 領域の近傍に存在する IRE に IRP が結合することで翻訳の開始を阻害してフェリチンの産生を抑制する。

鉄はヘム、鉄-硫黄(Fe-S)クラスター(鉄と硫黄によって構成される構造体で4Fe-4S、2Fe-2S型がある)の2種の鉄補欠分子族の形でタンパク質と結合して機能することが多いことが知られている。IRP1 が鉄濃度依存的な Fe-S クラスターの着脱で制御されることが知られていたが、前述のように研究代表者らは IRP2 はヘム依存性分解によって制御されることを示し、細胞は2種の主たる鉄の補欠分子族を介して鉄濃度の変化を感知することを示唆する結果を得ていた。ヘム、Fe-S クラスターはミトコンドリアで産生される。しかしながら、鉄代謝調節機構の理解に必要なヘムのミトコンドリアからの輸送をはじめとする鉄および鉄補欠分子族の細胞内動態や、鉄代謝調節におけるミトコンドリアの役割はほとんど未解明である。そのような状況下で、研究代表者らはニワトリ B 細胞株 DT40 を用いてミトコンドリアにおける鉄-硫黄クラスターに合成のスカフォールドタンパク質である IscU タンパク質のコンディショナルノックアウト細胞を作製し、ミトコンドリアの鉄代謝が細胞の鉄代謝調節に関与する可能性を示す知見を得ている。

しかしながら、ひとたび巧妙な鉄代謝調節システムが破綻すれば、種々の疾患が誘発されることは容易に想定される。実際、鉄はガン、神経変性疾患などの発症、病態形成に深く関与しているこ

とが知られているが、その鉄毒性の誘発メカニズムは解明されていない。研究代表者らは神経特異的 IRP2 トランスジェニック (NSE-IRP2 Tg) マウスを用いて、鉄含量の増加自体ではなく、反応性に富んだ鉄の蓄積が神経変性を引き起こす可能性を示唆する所見を得ている。また、‘劇症疲労モデルラット’を用いて、疲労モデル肝臓ではヘム代謝に異常をきたすことを見出した。

研究のねらい・着眼点:

近年の鉄代謝研究は主としてヒト疾患や変異モデル生物の原因遺伝子クローニングによって急速な進展を遂げてきた。しかしながら、細胞内での鉄および鉄補欠分子族のキャリア、輸送体など鉄代謝の根幹となる分子は未同定である。とりわけ、細胞内鉄キャリアはタンパク質ではなく小分子化合物である可能性も考えられる。そこで、本研究では研究代表者らのこれまでの研究成果を踏まえ、メタボロームと分子遺伝学的解析を中核とした従来とは異なる視点からの鉄代謝研究を立案した。

上記を踏まえ、鉄代謝調節機構の理解に必須である、鉄および鉄補欠分子族の動態を分子レベルで解析するとともに、鉄代謝異常が関連する疾患の病態生理学的解析を進める。具体的には、

- 1) 細胞レベルにおける鉄および鉄補欠分子族の動態
 - 2) ミトコンドリアの鉄代謝調節における役割の解明
- の2点から分子レベルで鉄および鉄補欠分子族の役割を明らかにするとともに、
- 3) メタボローム解析も含めた多彩な研究手法で種々の疾患、病態に深く関与する鉄の病態生理学的役割に関する包括的な研究
- を進めて、鉄代謝の破綻を原因とする疾病の発症機構を解明するとともに、その予防法・治療法、診断に対する科学的評価方法の確立を目指す。

コンセプト:

鉄および鉄補欠分子族は種々の酵素の活性中心として存在することが多いのに加え、フリーラジカルの産生源として存在することから、鉄代謝異常によって種々の代謝が障害されると考えられる。鉄の生体における役割の理解に不可欠であると考えられる、未だ同定されていない細胞内鉄キャリアも小分子である可能性が考えられる。以上を踏まえ、本研究ではこれまで肝臓のヘム代謝異常時の包括的メタボローム解析を進めてきた研究者を主たる共同研究者に加え、これまでに蓄積されたノウハウを生かしつつ、鉄の有無や、鉄およびヘム代謝に異常をきたす病態でメタボローム解析を行い、それら分子の同定および病態バイオマーカーの検索を進める。すなわち、従来とは異なる視点、手法を用いて、これまで未解明である鉄および鉄補欠分子族の動態、それらの代謝異常が関連する病態の解明を目指すのが本研究のコンセプトである。

将来展望:

神経変性疾患の遺伝子改変モデルマウスのほとんどはヒト疾患と比べ非常に弱い表現系しか示さない。しかし、既存の神経変性疾患マウスをIRP2 Tgマウスと交配することにより、有益な創薬モデルマウスを樹立できる可能性が高い。反応性に富んだ鉄の蓄積が神経変性疾患の発症、増悪因子であることも明確に出来ることから、本研究は鉄代謝制御による治療も含め、神経変性疾患の治療法開発に大きな進展をもたらす可能性が大きい。さらに疲労のバイオマーカーが開発できれば、一兆円産業と言われる疲労関連産業に科学的裏付けを与え得る大きなエポックとなることが期待される。加えて鉄、鉄補欠分子族の動態・鉄代謝調節機構の詳細な解析は、それらの代謝調節法の開発の基礎的な成果を提供できる。鉄過剰は多くの臓器障害の増悪因子である可能性が大きく、原因不明であるC型慢性肝炎で認められる鉄代謝異常制御法などの開発など大きな可能性を秘めた研究である。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想
本研究の途上で他のグループから鉄が IRP の分解に導くタンパク質である FBXL5 と結合して

FBXL5 を安定化させることで鉄存在下では IRP が分解される、すなわち、鉄自体によって IRP の IRE 結合活性が調節されるとの報告がなされた。しかし、本研究チームでは FBXL5 が存在していても、FBXL5 による IRP の認識にはヘムが必要であること、ミトコンドリアでの鉄-硫黄クラスターの合成が阻害された場合にもヘム合成を阻害するために、IRP は FBXL5 に認識されないことを示した。すなわち、鉄イオン、鉄補欠分子族の両方が十分に存在した場合にのみ、細胞は鉄過剰であると感知することを示した。

中間評価では以下のような指摘を受けた。論文発表が遅れているが本年度中に何とかインパクトのある論文を in press にしたいと考えている。

指摘: 出芽酵母の遺伝学的手法による研究は、欠損遺伝子の同定ができれば、細胞内のヘム輸送に関して大きなブレイクスルーとなるため、その解決を強く期待したい。慢性疲労症候群のバイオマーカーに関しては、実用化に近づくよう研究の発展を期待したい。パーキンソン病の症状を呈するマウスの創薬への応用も今後の展開として期待したい。現在までに優れた研究成果が数多く蓄積されて来ており、インパクトのある論文発表を期待する。

§ 3 研究実施体制

(1)「岩井」グループ

① 研究参加者

(京都大学:H24.4～)

氏名	所属	役職	参加時期
岩井 一宏	京都大学医学研究科	教授	H24.4～
佐々木 義輝	同上	准教授	H24.4～
中原 匡咲	同上	助教	H24.4～
武田 有紀子	同上	教務補佐員	H24.9～

(大阪大学:H20.4～H24.3)

氏名	所属	役職	参加時期
岩井 一宏	大阪大学医学系研究科	教授	H20.4～H24.3
坂田 真一	同上	特任研究員	H20.4～H23.3
植田 亮	同上	助教	H20.4～H24.3
武田 有紀子	同上	D4(JST-RA)	H20.4～H24.3
徳永 文稔	同上	准教授	H20.7～H24.3
亀井 希代子	同上	一般職 B1	H20.7～H22.3
奥田 晶子	同上	一般職 C	H20.7～H20.9
蒲生 純子	同上	一般職 B2	H20.7～H24.3
櫻井 仁美	同上	D4	H20.7～H24.3
浅野 剛史	同上	一般職 C1	H20.7～H24.3
中川 朋子	同上	一般職 C1	H20.7～H24.3
新 佐知子	同上	一般職 C3	H20.7～H24.3
臼井 景子	同上	M2	H22.4～H24.3

(大阪市立大学:H19.10～H20.3)

氏名	所属	役職	参加時期
岩井 一宏	大阪市立大学医学研究科	教授	H19.10～H20.3
徳永 文稔	同上	准教授	H19.10～H20.3
坂田 真一	同上	博士研究員	H19.10～H20.3
加藤 美智子	同上	研究補佐 A	H19.10～H20.3
亀井 希代子	同上	研究補佐 A	H19.10～H20.3
櫻井 仁美	同上	D3	H19.10～H20.3
浅野 剛史	同上	D2	H19.10～H20.3
中川 朋子	同上	D1	H19.10～H20.3
武田 有紀子	同上	M2	H19.10～H20.3

② 研究項目

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析
 - ア) ヘム運搬メカニズムの解析
 - イ) 細胞内鉄輸送担体の解析
2. 細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリアの役割の解析
3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析
 - ア) 神経変性疾患における鉄代謝異常の関与の解析
 - イ) 疲労のバイオマーカーの検索

(2)「植田」グループ (大阪大学:H24.4～24.9)

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
植田 亮	大阪大学医学系研究科	助教	H24.4～H24.9
武田 有紀子	同上	D6(JST-RA)	H24.4～H24.8
蒲生 純子	同上	一般職 B2	H24.4～H24.6
新 佐知子	同上	一般職 C3	H24.4～H24.8

② 研究項目

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析
 - ア) へム運搬メカニズムの解析
2. 細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリア・へムの役割の解析
3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析
 - ア) 神経変性疾患における鉄代謝異常の関与の解析

(3)「徳永」グループ(大阪市立大学:H20.4～20.6)

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
徳永 文穂	大阪市立大学医学研究科	教授	H20.4～H20.6
亀井 希代子	同上	助教	H20.4～H20.6
奥田 晶子	同上	D1～3	H20.4～H20.6
櫻井 仁美	同上	教授	H20.4～H20.6
浅野 剛史	同上	助教	H20.4～H20.6
中川 朋子	同上	D1～3	H20.4～H20.6

② 研究項目

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析
 - ア) へム運搬メカニズムの解析
 - イ) 細胞内鉄輸送担体の解析
3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析
 - ア) 神経変性疾患における鉄代謝異常の関与の解析
 - イ) 疲労のバイオマーカーの検索

(4)「合田」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
合田 亘人	早稲田大学先進理工学部 生命医科学科	教授	H19.10～
藤木 夏子	早稲田大学先端科学・ 健康医療融合研究機構	客員研究助手	H20.4～H20.9
菱木 貴子	慶應義塾大学医学部 医化学教室	助教	H20.4～H24.3
松田 七美	早稲田大学先端科学・ 健康医療融合研究機構	客員講師	H21.2～H24.3
湊 麻衣	早稲田大学先進理工学部 生命医科学科	助手	H24.4～
長内 康太	早稲田大学先進理工学部 生命医科学科	M2	H24.4～

②研究項目

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析

イ) 細胞内鉄輸送担体の解析

3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

イ) 疲労のバイオマーカーの検索

(5)「片岡」グループ

① 研究参加者 (理化学研究所:H21.4～)

氏名	所属	役職	参加時期
片岡 洋祐	理化学研究所分子イメージング科学研究センター	チームリーダー	H21.4～
田中 雅彰	大阪市立大学大学院医学研究科	講師	H21.4～
大和 正典	理化学研究所分子イメージング科学研究センター	研究員	H21.4～
金 光華	同上	研究員	H21.4～
嶋原 良仁	大阪市立大学大学院医学研究科	D4	H21.4～H22.12
山口 浩二	同上	学外研究員	H21.4～
崔 翼龍	理化学研究所分子イメージング科学研究センター	研究員	H21.4～
田村 泰久	同上	研究員	H21.4～H21.12
田村 泰久	同上	研究員	H22.4～
山野 恵美	大阪市立大学大学院医学研究科	助教	H24.1～
田島 世貴	理化学研究所分子イメージング科学研究センター	客員研究員	H24.1～
Sami Mustafa	同上	パートアルバイト	H23.4～

(大阪市立大学医学研究科:H19.10～H21.3)

氏名	所属	役職	参加時期
片岡 洋祐	大阪市立大学大学院医学研究科	講師	H19.10～H21.3
田中 雅彰	同上	特任講師	H19.10～H21.3
安宅 鈴香	同上	D4	H19.10～H20.3
大和 正典	同上	D4	H19.10～H21.3
金 光華	同上	D4	H19.10～H21.3
嶋原 良仁	同上	D3	H19.10～H21.3
山口 浩二	同上	研究員	H19.10～H21.3
江口 麻美	同上	研究補助員	H19.10～H21.3
奥山 香里	同上	研究補助員	H19.10～H21.3

②研究項目

3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

イ) 疲労のバイオマーカーの検索

§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 「岩井」グループ(京都大学 岩井グループ)

本研究中に岩井は大阪市立大学→大阪大学→京都大学と異動した。異動時に研究の円滑な進行のために時限的に「徳永」グループ、「植田」グループが存在したが、研究内容は岩井グループと同一であるので、「岩井」グループとしてまとめて記載する。

(1)研究実施内容及び成果

A. 研究のねらい

鉄は容易に電子を授受できるため、種々の酸化還元酵素の活性中心として利用されているのみならず、ガス結合、エネルギー産生においても重要な役割を担っている。鉄は鉄イオンとして直接タンパク質と結合する場合もあるが、ヘム、鉄-硫黄(Fe-S)クラスター(鉄と硫黄によって構成される構造体で4Fe-4S、2Fe-2S型がある)の2種の鉄補欠分子族の形でタンパク質と結合して機能することが多いことが知られている。一方で鉄はフリーラジカルの産生源となり細胞障害性を有するため、生物は鉄代謝を厳密に調節する巧妙なシステムを備えている。哺乳類細胞ではIRP(iron regulatory protein)と呼ばれる細胞質に存在するRNA結合タンパク質によって鉄代謝が制御されている。研究代表者らの研究により、IRP2が鉄自体ではなくヘムの濃度変化を介して(Ishikawa et al. Molecular Cell 2005)、また、IRP1は鉄-硫黄クラスターを介して鉄濃度変化を感知して鉄代謝を制御していることが示されていた。生体の代表的な2つの鉄補欠分子族であるヘム・鉄-硫黄クラスターともにミトコンドリアで生成されることから、これらの結果は鉄代謝調節におけるミトコンドリアの重要性を示唆すると考えられてきた。実際にヘム合成系やミトコンドリアでの鉄-硫黄クラスター生成系、ミトコンドリアから細胞質への鉄-硫黄クラスター輸送系のタンパク質の変異により、ミトコンドリアに顕著な鉄蓄積を伴う疾患が生じることが知られている。このように、鉄代謝調節機構の破綻が種々の疾患の病態形成に係わることが示唆されていることを踏まえ、研究代表者らが進めてきた鉄代謝異常の神経変性疾患、疲労への関与について検索を進めた。

B. 研究実施方法

以下の3点から研究を推進しているため、各項目別に記載する。

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析

ア) ヘム運搬メカニズムの解析

遺伝学的手法が確立している真核生物である出芽酵母を用いて細胞内ヘム輸送系の解明を進めた。

イ) 細胞内鉄輸送担体の解析

質量分析系を用いた低分子鉄担体の同定を進めた。具体的には、岩井グループで作成したサンプルを合田グループに送付して質量分析用の処理し、合田グループとともに慶應義塾大学先端生命科学研究所の協力を得て鉄のキャリア低分子の探索を進めた。実施方法、進捗状況は合田グループの項で記載する。

2. 細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリアおよびリソソームの役割の解析

ア) 細胞の鉄感知におけるミトコンドリアの役割の解析

細胞レベルで容易にノックアウト細胞を作成できるトリ DT40 細胞を用いて、ミトコンドリアでの鉄-硫黄クラスター合成のスカフォールドタンパク質である IscU、細胞質・核のタンパク質への鉄-硫黄クラスターの挿入に関与する NuBP1、ヘム合成系の律速酵素である ALAS1 のノックアウト細胞を製作して、細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリアの関与を検索した。

イ) 細胞の鉄利用におけるリソソームの役割の解析

細胞質に存在する鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンに貯蔵された鉄の利用におけるリソソームの役割についてオートファジー欠損胎児線維芽細胞などを用いて解析を進めた。

3. 鉄および鉄補欠分子族の疾患、病態への関与の解析

ア) 神経変性疾患における鉄代謝異常の関与の解析

研究代表者らが作製した NSE-IRP2 Tg マウスを順天堂大学・脳神経内科・服部信孝教授らが樹立したパーキンソン病のモデルマウスである Parkin (家族性パーキンソン病の原因遺伝子) KO マウスと交配することで鉄代謝異常のパーキンソン病への関与を検索した。

C. 実施内容・成果

1. 細胞内の鉄および鉄補欠分子族の動態の解析

ア). ヘム運搬メカニズムの解析

細胞内のヘム動態メカニズムは細胞の鉄感知系の一翼を担うシステムである。ヘムはミトコンドリアと細胞質を行き来しつつ形成されるが、最終的にはミトコンドリアのマトリックスに活性中心を持つフェロケラターゼによってプロトポルフィリン IX に Fe^{2+} が挿入されることで生成される。ヘムは脂溶性に富んでおり、遊離した状態で細胞内に存在しているとは考えにくい。しかしながら、ミトコンドリアから細胞質への輸送に関与するトランスポーター、細胞質・核でのヘムキャリアタンパク質の存在は報告されていない。出芽酵母のヘム応答性転写活性化因子 Hap1 はヘムと結合して転写活性化能を獲得する(図2)。それゆえ、ヘムキャリア、ヘムトランスポーターに変異があれば、Hap1 へのヘム供給が低下して Hap1 の転写亢進活性が減弱する。

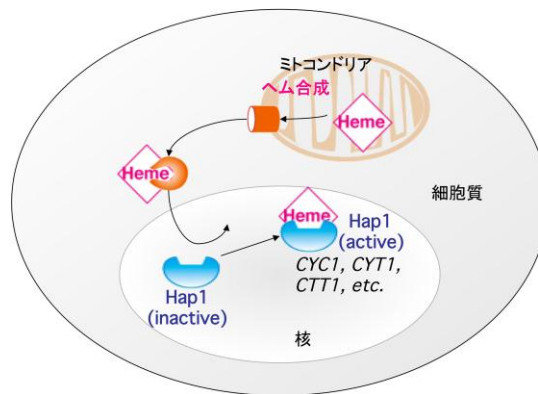


図2 出芽酵母ヘム輸送系

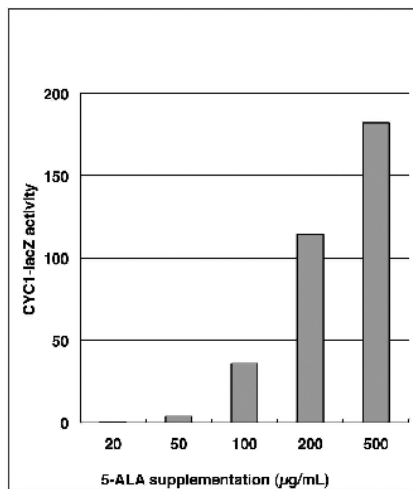
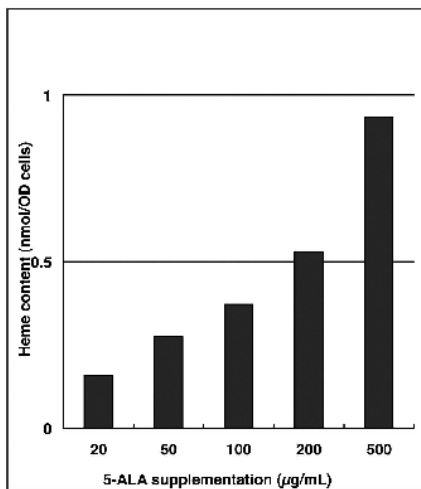


図3 5-ALA 添加による細胞内ヘム含量と Hap1 活性

ヘム合成系は律速酵素である5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS)により厳密な制御を受ける。そこで、ALAS(Hem1)を欠損させ、培地に5-アミノレブリン酸(ALA)を添加することで人為的なヘム濃度の制御を可能にした出芽酵母を作製した(図3)。細胞内ヘム動態に障害があれば、Hap1 へのヘムの load が十分で

はなく、Hap1 の活性化が抑制されると考えた。そこで、Hap1 応答配列 CYC1/UAS の下流に Ura3 遺伝子を導入したレポーター遺伝子を導入し他細胞株を用いてスクリーニング系の構築に着手した。Ura3 は 5-フルオロオロチン酸(5-FOA)を抗がん剤として知られている、5-フルオロウラシル(5-FU)に変換するので、ALA 高濃度かつ 5-FOA 添加培地で培養すると、ヘム濃度の上昇により Hap1 が活性化し、その結果発現が誘導される Ura3 によって毒性を有する 5-FU の産生が亢進して細胞が死滅する。ヘム動態に関与する遺伝子産物の遺伝子に変異があれば、ヘム濃度に応じて Hap1 が活性化されないため、5-FOA 存在下でも細胞は増殖できる(図4)。本スクリーニングでは、ヘム合成系、5-ALA 取り込み、ウラシル代謝に関与する遺伝子群の変異体も単離する可能性があ

るので、それらに対してはヘム含量、CYC1/UAS-HIS3を導入して培地からヒスチジンを欠損した場合の増殖等を指標にして排除できると考えた。樹立したスクリーニング株に紫外線照射を照射して出芽酵母遺伝子に変異を生じさせてスクリーニングを実施し、2種の変異株を単離した。いずれの変異株も1つの遺伝子の劣性変異による変異株であり、ALA添加時には細胞内ヘム含量は野生型と同等であったことからヘム合成系には異常はなかった。2つの変異株のうち、変異株 M186はALA添加ではHap1を活性化できないが、培地にヘムを添加した場合Hap1を活性化できるのに対し、変異株 M128は培地にヘムを添加してもHap1を活性化できなかった(図5)。

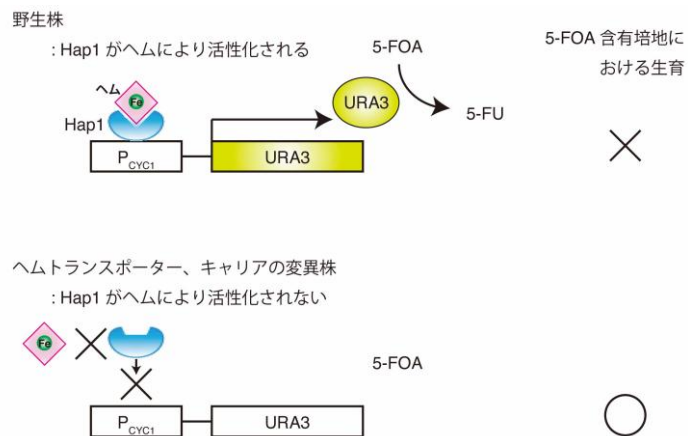


図4 細胞内ヘム動態変異株のスクリーニング系の概略

前述のようにヘムはミトコンドリアのマトリックスで生成される。それゆえ、M186はミトコンドリアから細胞質へのヘム輸送、M128は細胞質・核でのヘム輸送に関与する遺伝子産物の変異である可能性が高いと考えられた。しかし、残念なことにゲノムライブラリーの導入ではそれらの変異株の変異遺伝子を同定することは

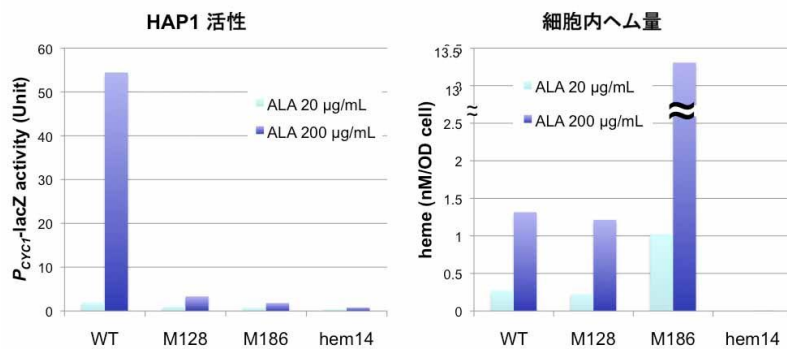


図5 単離した変異株(M128、M186)とヘム合成系変異株(hem14)のHap1活性とヘム含量

できなかったため、変異株の全ゲノムのシーケンスによって変異遺伝子を同定した。

イ) 細胞内鉄輸送担体の解析

合田グループの項で記載。

2. 細胞の鉄代謝調節におけるミトコンドリアおよびリソソームの役割の解析

ア) 細胞の鉄感知におけるミトコンドリアの役割の解析

A) 高等真核生物の解析

前述のように IRP1、IRP2 は TfR1 やフェリチン mRNA に存在する IRE と鉄欠乏時にのみ選択的に結合することで細胞の鉄代謝を調節する鉄代謝調節因子である。研究代表者らのこれまでの報告から、IRP1 は鉄-硫黄クラスター、IRP2 はヘムを介して鉄を感知して鉄代謝を調節すると考えられてきた(図6)。鉄補欠分子族である、鉄-硫黄クラスター、ヘムともに最終的にはミトコンドリアで生成されるので、細胞の鉄感知機構においてミトコンドリアが重要な役割を果たすと考えられる。

しかしながら、本 CREST 研究の途中で、海外の研究者から IRP の活性制御の新たなメカニズム: IRP2 のみならず、鉄-硫黄クラスターと結合しない IRP1 は鉄過剰時に SCF^{FBXL5} ユビキチンリガーゼ

に認識されて分解されることで調節されることが示された。SCF^{FBXL5} リガーゼの基質認識サブユニットである FBXL5 は鉄イオンと直接結合する部位を有しており、鉄イオンと結合して安定化することにより鉄過剰時のみ存在して IRP を認識して分解に至らしめる可能性が提唱された。この報告は FBXL5 には細胞質の鉄プールから供給されるので、細胞は細胞質鉄プールのサイズを介して細胞は鉄を感知することを示唆する。

しかしながら、ミトコンドリアでの鉄-硫黄クラスターやヘム合成系の変異によって生じる疾患では(表1)、ミトコンドリアに顕著な鉄の蓄積が認められるので、細胞は細胞質鉄プールの多寡によってのみ鉄の availability を感知するのか疑問がある。

そこで、細胞レベルで容易にノックアウト(KO)細胞を作製できるニワトリ B 細胞株である DT40 細胞を用いて、ヘムおよび鉄-硫黄クラスターの生合成系の欠損細胞を作製して解析した。具体的にはミトコンドリアにおける鉄-硫黄クラスター合成のスカフォールドタンパク質である IscU、細胞質・核のタンパク質への鉄-硫黄クラスターの挿入に関与する NuBP1、ヘム合成系の律速酵素である ALAS1 を KO し、鉄過剰状態における IRP1、IRP2 の挙動を検討した。

まず、ALAS1 KO 細胞ではヘム合成は低下したが、鉄-硫黄クラスター合成には異常は認められず、IRP1 には鉄-硫黄クラスターが配位して IRP1 は安定であった。しかしながら、IRP2 は鉄過剰下でも分解されなかったもので、ヘムが IRP2 の分解に関与することが明確となった(表2)。次に鉄-硫黄クラスター合成・輸送系の欠損細胞に関しての解析を行った。鉄-硫黄クラスターはミトコンドリアの ISC(iron-sulfur cluster assembly) machinery によって形成され、細胞質の cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly(CIA) machinery によって運ばれて IRP1 に挿入される。ISC 機構のスカフォールドタンパク質である IscU を欠損させた IscU KO 細胞では IRP1 には鉄-硫黄クラスターが配位しなかったが、鉄過剰時においても分解されなかった。(野生型の細胞では鉄-硫黄クラスターを有さない IRP1 は鉄過剰時には SCF^{FBXL5} リガーゼで認識されて分解に導かれる)。また IscU KO 細胞では IRP2 も鉄過剰時においても分解されなかった。一方、CIA 機構の構成成分の 1 つであり、鉄-硫黄クラスターに運搬に関わる NuBP1 の KO 細胞でも IRP1 に鉄-硫黄クラスターは配位しなかった。しかしながら IscU 欠損細胞とは異なり、NuBP1 KO 細胞では鉄過剰時には鉄-硫黄クラスターが配位しない IRP1 および IRP2 は分解された(表2)。

これらの結果から、鉄-硫黄クラスターが挿入されなかった IRP1 は、ミトコンドリアの鉄-硫黄クラスター合成系が傷害された場合には分解されないこと

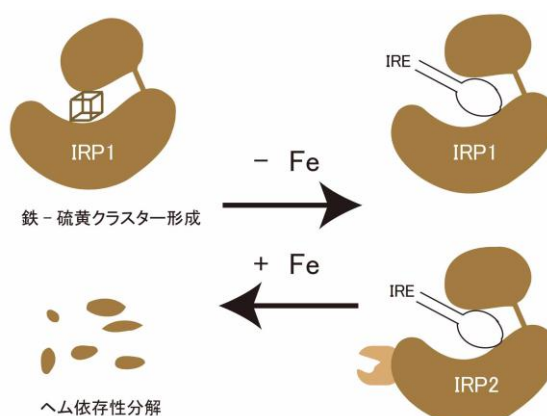


図6 研究代表者らが提案してきたIRPの鉄依存的活性制御メカニズム

鉄芽球性貧血	ABC7
	GRX5
ミオパチー	IscU
神経変性疾患	Frataxin

表1 鉄-硫黄クラスターの合成、輸送に関与するタンパク質とその変異により病巣のミトコンドリアに鉄が沈着する疾患

		IscU欠損細胞	NuBP1欠損細胞	ALAS1欠損細胞
IRP1	鉄-硫黄クラスター	配位せず	配位せず	配位する
	fate	安定	分解	安定
IRP2	fate	安定	分解	安定

表2 ヘム合成、鉄-硫黄クラスター合成、輸送に関与するタンパク質の欠損細胞とその表現系

が明確となった。加えて、鉄-硫黄クラスターが挿入されない IRP1 変異体を ALAS1 KO 細胞に発現させたところ、鉄存在下でも分解されなかったことから、ヘム合成が傷害された場合には同 IRP1 変異体は分解されないことも見いだした。

前述のように、鉄過剰時においては、IRP2 と鉄-硫黄クラスターを有さない IRP1 は鉄イオン結合により安定化した FBXL5(SCF^{FBXL5} リガーゼの基質認識サブユニット)によって認識されて分解へ導かれる。しかしながら、IRP が分解される NuBP1 KO のみならず、分解されない ALAS1、IscU のいずれの欠損細胞においても鉄過剰時のみ FBXL5 の蓄積が認められ、FBXL5 のタンパク量は IscU KO、ALAS1 KO 細胞の方が NuBP1 欠損細胞よりも多かった。さらに、ALAS1、IscU 欠損細胞では、鉄過剰時においても FBXL5 は IRP2 を認識できなかった。それゆえ、ミトコンドリアでのヘム合成あるいは鉄-硫黄クラスター合成が傷害された場合には FBXL5 は存在するにも関わらず、IRP を認識できないことが明確となった。

NuBP1 KO 細胞の結果から、IRP と FBXL5 がともに存在する細胞質への鉄-硫黄クラスターの供給は FBXL5 による IRP の認識に影響を与えないことも明確となった。IscU KO 細胞と NuBP1 KO 細胞の相異はミトコンドリアの鉄-硫黄クラスタータンパク質への鉄-硫黄クラスターの配位の有無である。プロトポルフィリン IX に Fe²⁺を挿入するヘム合成の最終ステップの反応を触媒する酵素であるフェロケターゼはミトコンドリアに局在する鉄-硫黄クラスタータンパク質である。鉄-硫黄クラスターは同酵素の安定性に関与しており、IscU KO細胞ではフェロケターゼの減少、ヘム産生も低下が認められた。すなわち、IscU 欠損細胞ではヘム産生も低下することから、FBXL5 による IRP の認識にはヘムが関与する可能性が示唆された。

そこで、IRP1 と IRP2 のヘム結合を解析したところ、IRP1、IRP2 ともにヘムが結合した。IRP1 にはヘム結合部位として知られる HRM(heme regulatory motif)が2カ所存在しており、HRM の中心である Cys 118 あるいは Cys300 を変異したと変異体にはヘムは1当量のみ結合することから、これら2つの HRM を介してヘムと結合することが明確となった(図7)。

そこで、Cys118 あるいは Cys300 を Ala に変異した IRP1 を NuBP1 細胞に導入したところ、IRP1 Cys118Ala は鉄過剰時でも分解されなかった。また、IRP1 の Cys118 に相当する IRP2 の Cys120 を Ala に置換した IRP2

変異体も鉄過剰時にも分解されなかった。それゆえ、FBXL5 による IRP の認識にはヘムが不可欠であり、ミトコンドリアでの鉄-硫黄クラスターの廃絶によってヘム生成が減少することが明らかとなった。それゆえ、細胞は細胞質の鉄のみならず、ミトコンドリアで生成される鉄補欠分子族のいずれもが十分量存在する場合にのみ、鉄過剰と感知することが明らかとなった(図8) (Nature communications リバイス中)。

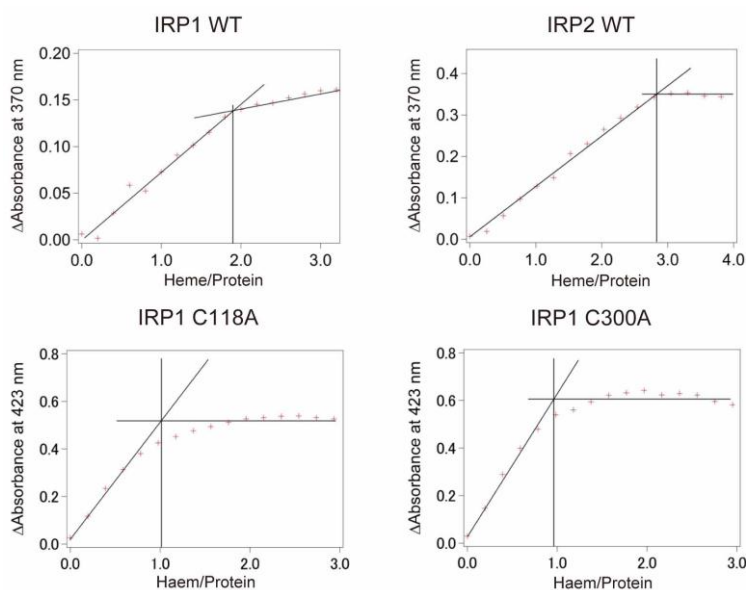


図7 IRP1 (WT 及び変異体)と IRP2 のヘム結合様式

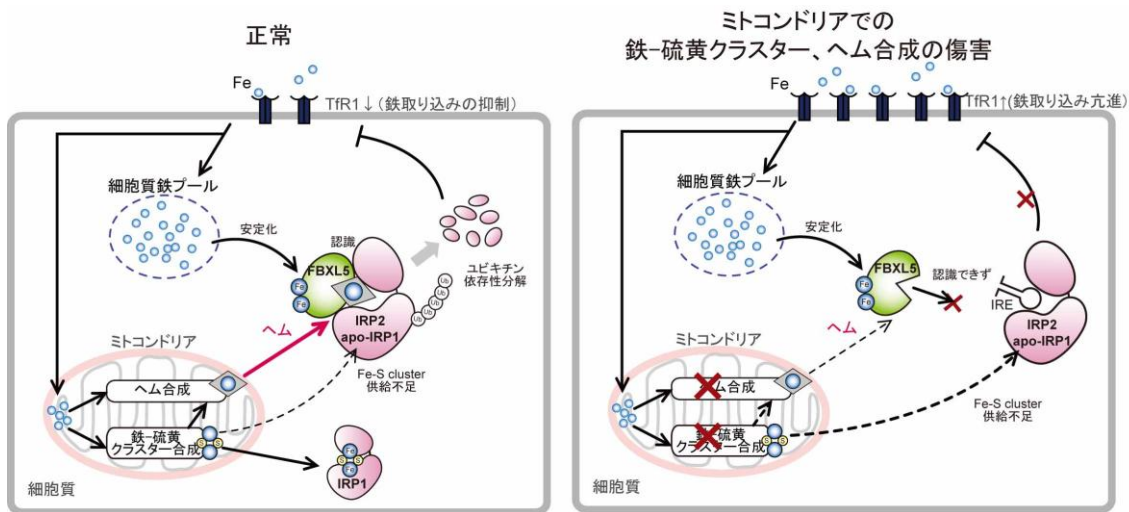


図 8 細胞の鉄感知メカニズム

正常の細胞では細胞外から取り込まれた鉄は細胞質鉄プールのみならず、ミトコンドリアで鉄補欠分子族(鉄-硫黄クラスター、ヘム)の合成に利用される。鉄は FBXL5 の安定化に、ヘムは FBXL5 による IRP の認識に関わっており、鉄イオンのみならず、鉄補欠分子族も十分量産生されている場合にのみ細胞は鉄過剰であると感じ、IRP の活性を抑制する。ミトコンドリアでの鉄-硫黄クラスター合成が傷害されるとヘム合成が抑制されるので、ミトコンドリアで、ヘム合成、鉄-硫黄クラスター合成のいずれかが傷害されれば、ヘム結合に陥るため、細胞は鉄不足に感じ、鉄を過剰に取り込む。その結果として、鉄-硫黄クラスター合成、輸送異常により疾患ではミトコンドリアに鉄が蓄積すると考えられる。

B) 出芽酵母の鉄感知機構の解析

フリードリッヒ失調症の原因遺伝子 Frataxin の機能が出芽酵母のオルソログである YFH1 の解析から明らかになったなど、出芽酵母は鉄代謝調節機構の研究においても有益なモデル生物である。図9に出芽酵母の鉄代謝とその調節機構の概略を示す。出芽酵母の鉄取り込み機構は消化管上皮の鉄吸収機構に似ており、鉄還元酵素である Fre1、Fre2 で Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元し、Fet3 と Ftr1 からなる鉄取り込み複合体を介して Fe^{2+} が細胞内に取り込まれる。これらの鉄代謝に関与する遺伝子産物の発現は鉄応答性転写因子である Aft1 によって制御されている。Aft1 は鉄欠乏時にのみ、FET3 などの標的遺伝子の 5' 上流に位置する標的配列に結合することで、FET3 などの発現を亢進させる(図9)。研究代表者らはこれまで、Aft1 は鉄依存的に核外移行によって制御されていること(Ueta et al. JBC 2003)、鉄依存的な Aft1 の核外移行は核外移行担体 Msn5 によることを示してきた(Ueta, et al. MBC 2007)。実際、Aft1 の恒常活性型変異体である Aft1-1^{up}(Aft1C291F)は鉄過剰時にも核に局在して FET3 などの標的遺伝子の発現を亢進させる。しかしながら、Msn5 欠損株においては、Aft1 は鉄過剰時にも核に存在するにもかかわらず、FET3 などの Aft1 の標的遺伝子の発現は抑制されていた。それゆえ、鉄過剰時には Aft1 はまず標的配列から遊離し、その後で Msn5 に認識されて核外移行すると考えられた。

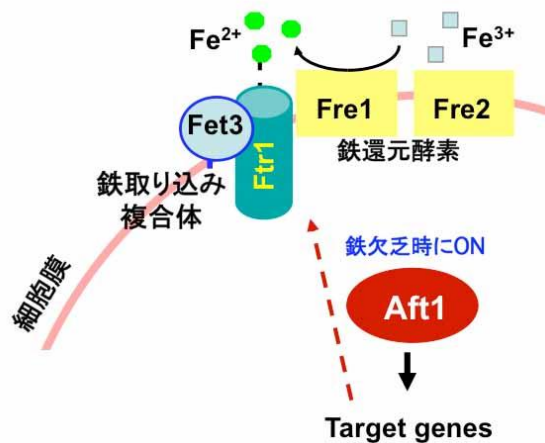


図 9 出芽酵母の鉄代謝調節機構

そこで、鉄過剰時に Aft1 を標的 DNA 配列から遊離させる因子を同定する目的で Aft1 と結合する分子を酵母2-ハイブリッド法を用いて同定したところ、Grx3、Grx4(Grx3/4)が同定された。お互いに高い相同性を有している Grx3/4 はモノグルタレドキシシ・ファミリーに属する分子であり、鉄-硫黄クラスターと結合して二量体化する。Grx3/4 と Aft1 と結合が Aft1 の標的 DNA から遊離に関する可能性を検索した。GRX3、GRX4の単独欠損株では Aft1 の標的遺伝子の発現は鉄過剰時には抑制されたが、GRX3、GRX4 の両遺伝子を欠失した株では FET3 などの Aft1 標的遺伝子の発現は鉄過剰時にも抑制されなかった。さらに、Grx3/4 欠損株に野生型 Grx3 を発現させた場合には鉄過剰時には Aft1 標的遺伝子の発現が抑制されたが、鉄-硫黄クラスターと結合できない Grx3 を発現させて場合には抑制されなかった。さらに Grx3/4 は鉄過剰時のみ Aft1 と結合するのに加え、鉄欠乏時には Grx3/4 も二量体化しなかった。それゆえ、Grx3/4 は鉄過剰時に鉄-硫黄クラスターと結合すると、Aft1 と結合して Aft1 を標的 DNA 配列から遊離させると考えられた。前述のように鉄-硫黄クラスターはミトコンドリアで生成される。そこで、出芽酵母においてミトコンドリアからの鉄-硫黄クラスターの輸送に関する輸送体である Atm1 を欠損した株を用いて検索したところ、鉄過剰時にも Aft1 の標的遺伝子の発現は抑制されなかった。

上記の結果を総合すると、出芽酵母においてはミトコンドリアで生成された鉄-硫黄クラスターが Atm1 を介して細胞質または核に輸送されて Grx3/4 と結合する。鉄-硫黄クラスターを結合した Grx3/4 が Aft1 と結合して Aft1 が標的配列から遊離することで鉄代謝を調節していることが明らかとなった(図10)。すなわち、鉄は鉄補欠分子族の形で鉄代謝調節因子に感知されることが明確となり、鉄代謝調節における鉄のミトコンドリアの重要性は進化的に保存されている可能性が示唆された(MCBリバイス中)。

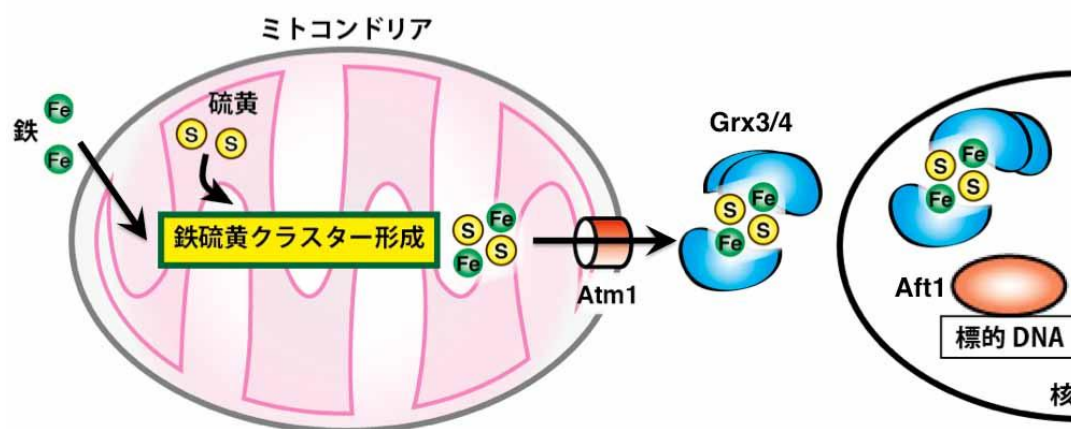


図 10 出芽酵母の鉄代謝調節機構におけるミトコンドリアの役割

ミトコンドリアで生成された鉄-硫黄クラスターが Atm1 を介して細胞質または核に輸送されて Grx3/4 と結合する。鉄-硫黄クラスターを結合した Grx3/4 が Aft1 と結合することで Aft1 が標的配列から遊離する。

イ) 細胞の鉄利用におけるリソソームの役割の解析

代謝調節機構の最も大きな役割は恒常性の維持であろう。鉄の代謝調節機構を考えて見れば、鉄は必須の微量元素であると同時に毒性を有するので、絶えず鉄を過不足なく利用できるように調節することが肝要である。高等真核細胞では、鉄過剰時にはフェリチンの発現を増加させること

で過剰な鉄を redox inactive な Fe^{3+} として貯蔵して、利用できる鉄の量を減少させ、鉄毒性を回避している。鉄過剰状態にあった細胞が鉄欠乏環境に曝された場合、恒常性の観点からフェリチンに貯蔵されている鉄を安全に取り出して利用すると考えられているが、そのメカニズムは明確にはなっていない。そこで本 CREST 研究では、フェリチンの動態を検討することからこの問題に取り組んだ。まず、マウス胎児線維芽細胞を用いてフェリチンの寿命を検討したところ、鉄欠乏環境下ではフェリチンはオートファジー依存的にリソソームに輸送されて分解されることを見出した。さらに、鉄過剰培地で培養した後に、鉄欠損培地で培養したところ、オートファジー欠損細胞では正常細胞に比べて短時間で鉄欠乏状態になることを観察したことから、鉄欠乏時におけるオートファジーによるフェリチンのリソソーム

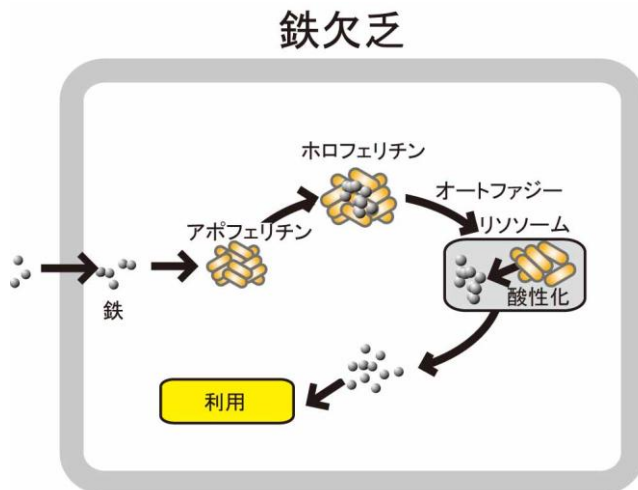


図 11 鉄欠乏時のフェリチンに貯蔵された鉄の動態
フェリチンに貯蔵されている鉄はフェリチンがリソソームに輸送され、リソソームの酸性環境下で Fe^{3+} の可溶性が増大することでフェリチンから抽出されて利用される。

の輸送が、鉄の恒常性維持に関与することが明確となった。また、リソソームに局在するタンパク質分解酵素に対する阻害剤を用いてリソソームにおけるフェリチン分解を阻害しても細胞は鉄欠乏にならなかったが、プロトンポンプ阻害剤処理でリソソームの pH を上昇させたところ、細胞は鉄欠乏状態に陥った。フェリチンの貯蔵されている鉄は Fe^{3+} であり、 Fe^{3+} は酸性環境下で水に対する溶解度が上昇する。それゆえ、フェリチンに貯蔵されている鉄はフェリチンがリソソームに輸送され、リソソームの酸性環境下で Fe^{3+} の可溶性が増大することでフェリチンから抽出されて利用されると考えられた(図11)(Asano et al., MCB 2011)。

一方、鉄過剰時には細胞外から十分に鉄の供給があるので、フェリチンに貯蔵されている鉄は安定に保持されている、すなわち、フェリチンは安定で分解されないと考えられてきた。実際、HeLa 細胞などの汎用されている癌由来の細胞株では、フェリチンは鉄欠乏時には分解されるが、鉄過剰時には分解されなかった。しかしながら、マウス胎児線維芽細胞や脾臓リンパ球などの正常細胞では鉄欠乏時、過剰時ともにフェリチンはリソソームに輸送されて分解された。驚いたことに、鉄欠乏時には前述のようにオートファジーでリソソームに輸送されたが、鉄過剰時のリソソームへの輸送にはオートファジーに必須の遺伝子である ATG5、ATG7 は不要であり、オートファジー以外の経路によってフェリチンに輸送されることが判明した。それゆえ、正常の細胞では、過剰な鉄はフェリチンに安定に貯蔵されているのではなく、フェリチンに貯蔵されている鉄は恒常的にリソソームにソーティングされてフェリチンから遊離して細胞質に輸送されると考えられた。鉄が十分に存在する場合には遊離された鉄が新規に産生されたフェリチンに再貯蔵されることで、鉄過剰による毒性を回避していると考えられる(投稿準備中)。さらに、鉄存在下で 48 時間培養したところ、正常細胞はほぼ完全に死滅したが、HeLa 細胞などの癌由来細胞は全く死滅しなかった。

上述の鉄過剰時のフェリチンの動態の解析から、以下の予想外の事実が明らかとなった。

鉄過剰

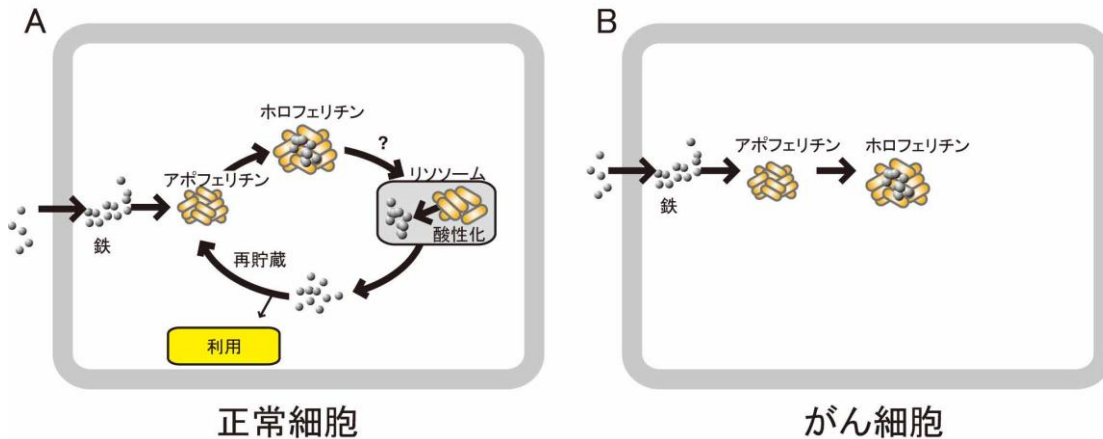


図 12 鉄過剰時のフェリチンに貯蔵された鉄の動態

A. 正常細胞ではフェリチンに貯蔵されている鉄はフェリチンがリソソームに輸送され、リソソームの酸性環境下で Fe^{3+} の可溶性が増大することでフェリチンから抽出されて利用される。しかしながら鉄過剰時のフェリチンのリソソームの輸送経路はオートファジーとは異なった未同定な経路による。B. がん細胞株では鉄過剰時にはフェリチンはリソソームに輸送されないのでフェリチンに貯蔵された鉄は安定に保持されている。

- i. 正常細胞ではフェリチンに貯蔵されている鉄は絶えずリソソームでフェリチンから遊離して利用可能な状態になるが、鉄過剰時にはフェリチンの新規合成が亢進しているので遊離した鉄は速やかにフェリチンに再貯蔵される(図12A)。正常細胞で鉄過剰時にフェリチンから鉄が供給される理由は不明であるが、正常細胞では速やかに十分な鉄が利用できる必要があり、細胞外の鉄環境に影響されることなく、いつも十分量の鉄が供給される必要がある可能性を想定している。例えば、フェリチンから絶えず鉄が供給されていれば、急速な血流遮断などにより鉄の供給が突然完全に消失した場合にも速やかに鉄が利用できる点などである。
- ii. 癌細胞では鉄過剰時のフェリチンのリソソームへの輸送機構が欠如しているのに加え(図12B)、鉄毒性に耐性が強い。1. でも述べたように鉄過剰時にフェリチンから鉄が供給されれば、鉄過剰時には利用できる鉄の量が増加して鉄の毒性が惹起される可能性が高い。それゆえ、癌細胞では、鉄過剰時にフェリチンをリソソームへ輸送するメカニズムを欠損させることで、鉄毒性を回避している可能性が考えられる。未同定の鉄過剰時にフェリチンをリソソームへ輸送するメカニズムが明らかになれば癌化の一端が明らかになる可能性や、鉄による癌細胞死滅方法の樹立につながる可能性が想定される。
- iii. フェリチンは鉄欠乏時にのみ選択的にオートファジーされる。すなわちフェリチンは細胞の状況に応じて選択的にオートファジーされる基質タンパク質であり、選択的オートファジーの分子機構の観点から見ても非常に意義深い。

現在、フェリチンと選択的に結合するタンパク質の同定を進めており、本 CREST 研究終了後にはそれらの解析から上記の i. -iii. の分子メカニズムの解明を進める予定である。

3. その他の鉄代謝研究

我が国の鉄代謝研究の中核グループの 1 つとして国内の多くの研究者と鉄代謝調節系に関する共同研究を推進した。

ア) 破骨細胞分化における鉄の役割

国立長寿医療センター研究所の池田恭治部長と共同で、鉄取り込みタンパク質であるトランスフェリン受容体1 (TfR1) を介する鉄取り込みの亢進が破骨細胞分化・活性化に必須であること、TfR1 の発現亢進は IRP2 の選択的な活性化によることを示した。

イ) 結核菌の鉄毒性回避機構

大阪市立大学大学院医学研究科の松本壮吉准教授と共同で、結核菌のヒストンがフェリチン様の活性を持ち、DNAを酸化ダメージから保護していることを見出した

ウ) FBXL5によるIRPの活性制御機構は鉄代謝調節機構の中核を担っていることの証明

九州大学の中山敬一教授と共同でFBXL5 KOマウスを解析し、FBXL5 KOマウスは鉄過剰による酸化ストレスの亢進のために胎生致死であること、IRP2 KOマウスと交配することで、胎生致死が回避されることを示し、FBXL5によるIRP2の活性制御が生体の鉄代謝制御の中核であることを示した。

エ) 根粒菌のヘム応答性転写調節因子Irrのヘム結合様式の解明

北海道大学の石森浩一郎教授と共同でIRP2と類似の様式でヘムによって活性が調節される根粒菌のヘム応答性転写調節因子Irrのヘム結合様式に関して、種々の分光的手法を用いて詳細な解析を行い、ヘム結合によるIrrの活性制御機構の一端を解明した。

(2) 研究成果の今後期待される展開

フェリチンの動態の解析で見いだした、鉄過剰時のフェリチンのリソソームへの輸送機構は鉄毒性、細胞の癌化との関連が示唆されるので、同メカニズムの同定が進めば、癌の新たな治療戦略へつながる可能性が考えられる。

4.2 「メタボローム」グループ(早稲田大学 合田グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

A. 研究のねらい

生体にとって鉄は必須の微量元素である。有効な鉄利用の観点から、余分な鉄分子は細胞内でフェリチンと結合した形で貯蔵されているが、鉄要求性が高まった際に遊離される鉄分子が如何なるキャリア分子を介して渡されるのかは全く解明されていない。本グループではキャリア分子が非タンパク質低分子有機酸であると考え、その存在をメタボローム解析によって同定することを目指している。また、ヘム代謝異常と関連の深い疲労の病態の診断や治療効果を客観的に判断できる低分子バイオマーカーの同定を合わせて行っている。

B. 研究実施方法

各研究グループから供与された細胞あるいは組織を、内部標準物質として終濃度 200 μ M の L-methionine sulfone, 3-aminopyrrolidine, 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, 1,3,5-benzenetricarboxylic acid を含む 1 vol のメタノール中でホモジナイズした。そこに 1/2 vol の滅菌蒸留水を加えた後、激しく混和した。この懸濁溶液 0.6ml を新しいチューブに分け、0.4ml のクロロホルムを加えさらに激しく混和した。次に 4 $^{\circ}$ C 下で 15,000 回転 15 分間遠心後上清を採取し、これをさらに分子量 5kDa 以下を分離できるフィルター付き遠心管(Ultrafree-CL; Amicon)を用いて遠心を行い、5kDa 以下の分画を採取した。採取した検体は測定まで-80 $^{\circ}$ C に保存した。測定前に採取した 5kDa 以下の分画 50 μ l を冷却機能付き真空遠心機にて液相を蒸発させた後、乾燥標品を再度蒸留水 50 μ l に懸濁した。これを Agilent Technologies 社の CE-MS あるいは CE-TOFMS システムにかけ測定を行った。本システムでは、陽イオンおよびヌクレオチドはフェーズドシリカキャピラリーを用いて、陰イオンは SMILE(+)キャピラリーあるいは COSMO(+)キャピラリーを用いて測定を行った。測定結果を Agilent Technologies 社のケミステーションを用いて解析した。また、内標によるノーマライゼーションを測定毎に行った。一方、血漿内の代謝産物測定についても、上記と同様にメタノール・クロロホルム抽出法によりサンプル調整を行ったものを用いて解析を行った。さらに、ICP 発光分析装置を用いた細胞内鉄濃度解析では、抽出サンプルに硝酸を添加し加熱処理を行うことで低分子から分離したものをサンプルとした。

C. 実施内容・成果

1)細胞内鉄キャリア低分子の検索

① CE-MS による HepG2 細胞を用いた代謝産物解析

ヒト肝がん細胞である HepG2 細胞を、鉄欠乏状態 (Chelex レジン処理、無血清処理)あるいは鉄過剰状態 (クエン酸鉄アンモニウム (FAC) 添加、トランスフェリン添加) の条件下で培養し、CE-MS を用いて細胞内代謝産物解析を行った。その結果、期待される鉄の細胞内濃度変化に一致した変動が認められる測定可能な既知代謝産物は存在していないことが判明した。これは、CE-MS の測定感度の問題もあるが、使用した細胞数が少なかったことが原因として考えられた。また、CE-MS 測定では標準サンプルとして利用した既知物質の定量には十分対応できたが、一つ一つのピークを解析するスキャン測定では測定感度が非常に悪く、また retention time がずれてしまうためサンプル間での比較が困難であることが判明した。一方、MS 測定時の鉄と低分子間の結合の安定性を確認するために、3 種類の鉄のキレート剤 deferoxamine mesilate, nitrilotriacetic acid disodium salt, diethylenetriaminepentaacetic acid を用いて測定を試みた。その結果、イオン化による複合体の乖離は認められず、鉄原子が結合した結合した状態のまま質量分析ができることを再確認した。

② ICP 発光分析装置を用いた細胞内鉄濃度測定

CE-MS 測定結果では未知鉄キャリア分子の検索が困難であった。この原因がそれぞれの細胞処理法による鉄濃度変化が小さかったことに由来する可能性を考え、金属分析に優れた ICP 発光分析装置 ICPE-9000 (島津製作所 分析計測事業部 応用技術部 京都アプリケーション開発センター) を用いて、それぞれの細胞処理法による鉄濃度変化を確認した。サンプルには、ニワトリ B 細胞株 DT40 とマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を用いた。また、細胞内鉄過剰および鉄欠乏状態を作出するために、DT40 細胞では IscU 遺伝子の不活化および IscU 遺伝子不活化 + FAC 添加 (鉄過剰) の処理を、一方 MEF 細胞では Chelex レジン処理血清 (鉄欠乏) あるいは FAC 添加血清 (鉄過剰) の処理を施した。

	Fe ($\mu\text{g/L}$)		Fe ($\mu\text{g/L}$)
DT40	3.733 \pm 1.429	MEF + ChelexFCS	3.567 \pm 1.504
DT40 + IscUKO	4.267 \pm 0.929	MEF + FCS + FAC	4.3 \pm 0.495
DT40 + IscUKO + FAC	6.567 \pm 1.25		

表 3 種々の細胞に対する鉄処理による鉄含量への影響

その結果、上記の表3に示したように、IscU 欠損 DT40 細胞に FAC を添加した細胞内には、鉄欠乏細胞群と比較して有意に増加していることが確認できた。しかし、鉄キャリア分子探索を行うためには、ICP 発光分析装置に LC などの分離装置を装着する必要がある、さらに十分な感度を維持したまま解析するためには今回利用したサンプルの 1000 倍以上の細胞数が必要であるとの結論に至り、実験遂行上 CE-TOFMS を用いた解析方法を検討することにした。

③ CE-TOFMS による細胞内鉄キャリア分子検索

慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我 朋義教授らが開発した CE-TOFMS システムは、従来の CE-MS と比較して数十倍以上の高感度・高精度解析が可能である。そのため CE-MS 解析でノイズ中に埋もれていた代謝産物の測定のみならず、10ppm の精度を持って質量解析が可能となる。また、曾我らの報告によれば、ATP、クエン酸、NADH や CoA などの細胞内代謝産物と 2 価鉄の錯体が形成され、負に荷電した状態の複合体 (例えば、クエン酸と鉄の錯体は、実測値から -1 価で存在する) として CE-TOFMS で測定できることが示されている。しかしながら、細胞内鉄キャリア分子と鉄原子との結合様式に関わる水分子の配位の有無や鉄の配位子がキャリア分子とどのような比率で結合しているのか簡単には推定できない。そこで、本研究では鉄原子とキャリア分子が

水などの配位がなくかつ、等モルずつ結合して錯体を形成すると仮定し解析に取り組んだ。

地球上に存在する鉄原子には同位体が存在し、その比率は質量数 54(53.9396147)が 5.85%、56(55.9349418)が 91.75%、57(56.9353983)が 2.12%、58(57.9332801)が 0.28%となっている。今回の実験では、鉄原子として最も多く存在する質量数 56 の鉄原子とキャリア分子の結合により生じるメインピークが検出できるものと考えた。また、細胞内では鉄原子が+2 価の状態が存在し、キャリア分子と錯体形成しかつ、この錯体の電荷が-1 価となって測定された場合には、この錯体と鉄キャリア分子(鉄原子と結合していないもの)の質量の差は、鉄の質量数から 2 分子ずつのプロトンと電子の質量数を引いた質量に一致すると考えられる。つまり、理論上の質量数の差は、

$$\text{Fe} - 2 \times (\text{H}^+ + \text{e}^-) = 55.9349418 - 2 \times (1.007276 + 0.000548) = 53.9192938$$

となる。また、3 価鉄としてキャリア分子に結合した場合には、上記の式の定数 2 が 3 になる。一方、-2 価で存在する場合には、-1 価で算出した半分の質量数(26.9596469)の変化が生じる。このような仮定に基づき、CE-TOFMS を用いて鉄過剰培養状態と鉄欠乏培養状態において測定できる細胞内代謝産物の質量数を全て抽出・解析し、さらに以下の条件に合致する鉄キャリア候補分子の検索を行った。

- A) 鉄過剰培養状態の細胞から抽出した代謝産物 X の細胞内含量が、通常培養状態のそれと比較して増加(1.4 倍以上の変化が認められたもの)が認められる
- B) 代謝産物 X の質量数から[鉄質量数-2X(プロトン質量数+電子質量数)]、あるいはその半分の質量数だけ小さい代謝産物 Y の通常培養状態の細胞内含量が、鉄過剰培養状態と比較して減少している(あるいは増加しない)代謝産物を候補分子として抽出する
- C) CE-TOFMS の精度が 10ppm なので、m/z を 1000 とすると、その測定誤差は 0.01 となることから、測定誤差を 0.05 以内とする

サンプルは DT40 細胞と MEF 細胞を用いた。また細胞内鉄過剰および鉄欠乏状態を作出するために、DT40 細胞では IscU 遺伝子の不活化あるいは IscU 遺伝子不活化+FAC 添加(鉄過剰)の処理を、一方、MEF 細胞では Chelex レジン処理血清(鉄欠乏)あるいは FAC 添加血清(鉄過剰)の処理を施した。その結果、陰イオン代謝産物として、既知物質 59 種と未知物質 600 種程度、一方、陽イオン代謝産物として、既知物質 59 種と未知物質 380 種程度の測定結果が得られた。しかし、MEF 細胞を用いた実験では代謝産物として測定できる代謝産物数が、DT40 細胞と比較して極端に少ないことがわかり、以後は DT40 細胞を用いた同様の実験を 3 回繰り返した。その結果、再現性が認められた未知の鉄キャリア候補分子とその鉄結合体物質の組み合わせとして下記表 4 の結果が得られた。また、鉄キャリア候補分子とその鉄結合複合体の細胞内含量変化を下記に図 14 に示した。

さらに、これらの候補分子が DT40 細胞の鉄欠乏状態において、通常状態と比較して低下するか否かをさらに検討するために、deferoxamine mesylate (DFO)処理を行ったサンプルの解析を行った。

その結果、上記全てのサンプルにおいて DFO 処理群は通常培養群と比較して低下することが分かった。しかしながら、DFO 処理群では、上記の候補分子のみならず測定できた多くの代謝産物の含量が通常培養群よりも減少していた。このことは、DFO 処理条件では細胞の viability をある程度維持できている状態であっても、代謝系全般にかなりの変動を惹起している可能性があると考えられた。そのため、細胞内鉄欠乏状態における鉄キャリア候補分子のさらなる絞り込みおよびその妥当性についての評価を避けた。今後、上記の候補分子の構造決定には、十分な量の候補分子の MS/MS 解析を用いた分子式の確定が必須である。

次に、既知代謝産物が鉄キャリア分子として機能する可能性について検討を行ったところ、完全に 3 つの条件を満たす既知物質は存在しなかった。しかしながら、今回の測定で既知代謝産物の含量が感度以下であるが、その代謝産物に鉄が結合して形成される想定複合体に相当する質量が再現性良く鉄負荷によって上昇する 7 種の代謝産物(2, 4-dihydroxypyrimidine-5-carboxylate, dihydroxyacetone phosphate, N-acetyl-leucine, 2-Quinoline carboxylate, glucuronate, trans-4-hydroxy-3-methoxycinnamate, arginosuccinate) (図 15) が存在していたので、これらの代謝産物が鉄キャリア分子である可能性を検討することにした。現在、これらの代謝産物と鉄を in vitro で混合した溶液を作成し、CE-TOFMS で検出できるピークの m/z を解析することで、想定された質量数と同一であるか否かについて検討を行っている。

No	鉄キャリア候補分子質量	鉄と結合したキャリア候補分子質量	想定鉄電荷
1	226.0306-226.0318	253.0084-253.0113	2 価鉄、-2 価
2	316.0823-316.0844	343.0217-343.0227	2 価鉄、-2 価
3	338.0680-336.0683	365.0029-365.0057	2 価鉄、-2 価
4	200.0571-200.0625	253.0084-253.0113	3 価鉄、-1 価
5	258.0363-258.0400	310.9952-310.9993	3 価鉄、-1 価

表 4 同定した鉄キャリア候補分子

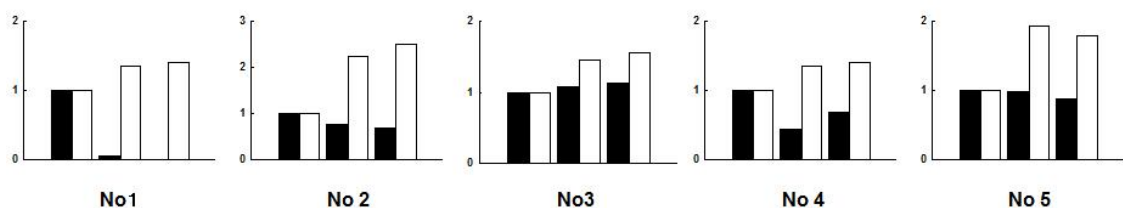


図 14 表 4 で示した鉄キャリア候補分子とその想定される鉄結合体の細胞内含量の変化
 グラフの縦軸は、通常培養時の細胞内代謝産物含量を 1 としたときのそれぞれの培養状態における代謝産物の相対含量を表す。左のカラムから 2 つずつを 1 セットとして、通常培養状態の DT40 細胞、通常培養状態の IscU 遺伝子の不活化した DT40 細胞、培地に FAC 添加した IscU 遺伝子の不活化した DT40 細胞の結果を示す。黒棒グラフは鉄キャリア候補分子質量を、白抜き棒グラフは鉄と結合したキャリア候補分子質量の代謝産物を指す。

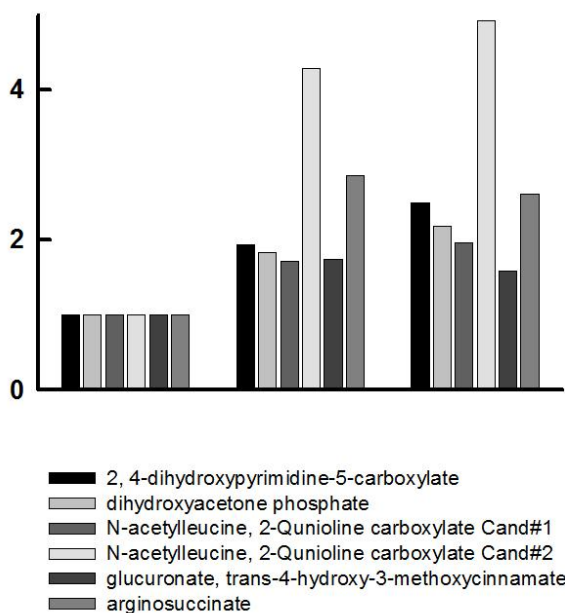


図 15 既知鉄キャリア候補分子の想定鉄結合体の細胞内含量の変化
 グラフの縦軸は、通常培養時の細胞内代謝産物含量を 1 としたときのそれぞれの培養状態における代謝産物の相対含量を表す。左のカラムから 6 つずつを 1 セットとして、通常培養状態の DT40 細胞、通常培養状態の IscU 遺伝子の不活化した DT40 細胞、培地に FAC 添加した IscU 遺伝子の不活化した DT40 細胞の結果を示す。

(2)研究成果の今後期待される展開

生体にとって必須の微量元素である鉄は、その反応性の高さから遊離の状態では存在すると酸化ストレスを誘導する物質でもあり、生体は安全な形で貯蔵することが求められている。フェリチンは鉄結合タンパク質として細胞内の鉄の貯蔵に関わり、鉄に対して非常に高い親和性を示すことが知られている。フェリチンからヘムや鉄硫黄クラスターなどの鉄を利用する分子への安全な鉄の輸送には、普遍的に存在する低分子鉄キャリアが存在すると考えられる。本研究で同定を試みた鉄キャリア分子が確定できれば、細胞内の鉄動態の詳細が明らかになり、鉄代謝制御の制御機構の理解がさらに深まると期待される。また、鉄キャリア分子の産生系の解明は、鉄利用障害が関わると考えられるがん、神経変性疾患や慢性疲労症候群などの病態理解に役立ちかつ、鉄制御による新たな診断や治療法の開発につながることで大いに期待される。

一方、本研究では鉄キャリア候補分子の選定までは至ったと考えられるが、残念ながらその分子構造式や鉄との親和性の解析はできていない。CE-TOFMS を用いた高感度・高精度の網羅的な代謝産物解析は、機能未知の未同定の細胞内代謝産物の存在を示しているが、質量数に関する情報が限られているため、これらを明らかにするためにはさらなる解析技術の向上とデータ集積が必要である。しかしながら、今後、鉄代謝制御破綻に起因するさまざまな病態における詳細な代謝変動解析やバイオマーカー探索が進めば、健康長寿の社会を支える新しい診断法や治療法の産業創成も期待できると考えている。

4. 3 疲労研究グループ(理化学研究所 片岡グループ)

(1)研究実施内容及び成果

A. 研究のねらい

疫学調査によると、現在、40%近くの国民が6ヶ月以上続く慢性疲労に悩まされており、慢性疲労を感じている人の半数が仕事や学業の能率低下を訴え、その経済的損失は1兆2千億円にも上るとされる。一方、疲労を主訴に医療機関を受診する患者数は、痛みにつき2番目に多い。しかしながら、疲労・倦怠感を客観的に評価する方法はこれまでになく、効果的な治療法も見出されていない。さらに、その中には強い疲労感を主訴とするものの、未だ原因が十分解明できていない慢性疲労症候群(chronic fatigue syndrome: CFS)の患者も含まれている。慢性疲労症候群は、1988年にアメリカ疾病予防管理センター(CDC)によって原因不明の強い疲労を呈する疾患として報告され、現在では全人口の0.2-0.3%の発生率と見積もられている。これまでに、そのメカニズムの解明、バイオマーカーの探索、治療予防法の開発を中心にさまざまな研究がなされてきた。しかしながら、未だ、慢性疲労症候群の発症メカニズムは不明であり、現在においても、1994年にCDCが発表した患者の自覚的・他覚的および医師による身体所見を基準に診断されているのが実情である(医学のあゆみ 特集「最新・疲労の科学 - 日本発:抗疲労・抗過労への提言」671-677 参照)。そのため、患者の経済的な負担に加え、医者による長期間にわたる観察の必要性や判断基準の個人差などが問題として挙げられている。

そこで本CREST研究では、長期間疲労負荷を行って肝臓ヘム代謝異常を示す慢性劇疲労の動物モデル、および、ウイルス感染や炎症との関わりが示唆されている慢性疲労症候群や慢性疲労病態のモデル動物において、疲労バイオマーカー分子を探索し、さらに疲労が慢性化するメカニズムを検討した。また、実際の慢性疲労症候群患者を対象に代謝解析を実施し、ヒトの慢性疲労バイオマーカーを見出すことを目的とした。

B. 研究実施方法

慢性劇疲労モデルラットを作成し、肝臓組織および血漿を採取してメタボローム解析をおこない、疲労負荷によって変化する代謝物を網羅的に探索した。慢性劇疲労モデルラットは、水深2.2cmの水を張ったケージ内で5日間飼育することにより、休息・睡眠の十分な摂取を妨げ、高い代謝を維持させることで作成した。さらに、慢性疲労症候群患者と健常人の血漿における代謝物質の変動をメタボローム解析し、疲労バイオマーカーとなる代謝物や代謝経路を探索した。メタボローム解

析は早稲田大学・慶応義塾大学との共同で実施し、また、慢性疲労症候群患者および健常人の血液サンプルの確保や診断等は大阪市立大学との連携において実施した。

また、感染・免疫疲労モデルラットを作成し、脳内のサイトカインやその産生に関わる分子や細胞の挙動を解析し、将来、慢性疲労症候群患者の PET 検査を含めた分子イメージング検査の対象となるバイオマーカーを探索した。感染・免疫疲労モデルラットは合成二本鎖 RNA である Poly I:C をラット腹腔内へ投与して作成した。また、中枢神経炎症モデルとして、片側大脳皮質に spreading depression を発生させたラットを作成した。ラットの疲労状態は自発行動量を測定することで、さらに脳内サイトカインの発現は PCR 法や組織化学的手法を用いて調べた。

C. 研究計画・成果

(1)慢性劇疲労モデル動物および慢性疲労症候群(CFS)患者を対象としたメタボローム解析研究
同疲労モデルラットを対象としたメタボローム解析を実施し、肝臓で 110 種類、血漿で約 60 種類の既知代謝物質が測定された。その中で、アミノ酸代謝においては過去のわれわれの研究と同様に、疲労負荷群の肝臓および血漿において分岐鎖アミノ酸が増加することが確認できた。また、肝臓組織におけるアデノシン三リン酸(ATP)含量が低下することも判明した。特に、肝臓の代謝物において、ATP 含量と相関するエネルギー産生関連代謝物が複数見出され、解糖系から TCA サイクルにかけての代謝系に機能異常が見られることがわかった。また、他の代謝物においても、疲労負荷によって増加・減少するものが多数見出せた。さらに、代謝物質間の相関解析によって、疲労のバイオマーカーとなりうる代謝物の組み合わせが見つかった。また、パス解析によって疲労状態における代謝動態を調べたところ、疲労負荷によって大きく変化する代謝系を見出せた。そして、疲労病態特有の代謝変化を効果的に是正するための摂取素材の選択を可能にする方法論の確立に挑戦し、複数の食薬素材候補を見出した。実際にそのいくつかの食薬素材を同動物モデルへ投与したところ、肝臓の ATP 含量が改善することも確認できた。こうした研究手法は、疲労のバイオマーカー探索や、疲労予防・回復に資する食薬開発において大きく貢献するものと思われ、当初の研究計画を大きく超えた成果となった。

また、慢性疲労症候群患者のメタボローム解析研究では、患者群 20 例、健常群 20 例の血漿を対象に実施し、50 種類の代謝物質が測定できた。動物実験では TCA サイクル関連代謝物の変化と肝臓 ATP 含有量の低下が見られ、疲労負荷がエネルギー代謝に影響することが見出せたが、慢性疲労症候群患者血漿でも、解糖系から TCA サイクルを含めた

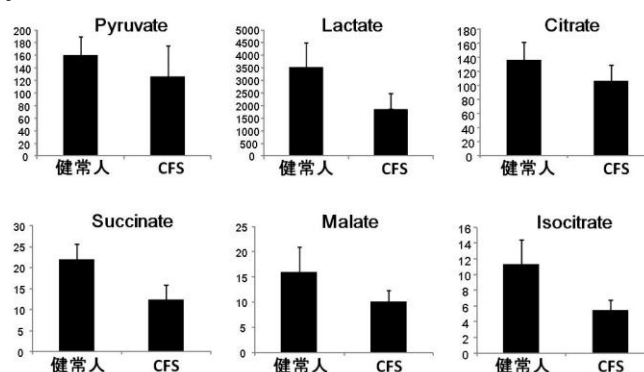


図 16 慢性疲労症候群患者における解糖系 TCA サイクル関連代謝物の低下

エネルギー代謝系の代謝物質で大きく低下するものが多く見出され、慢性疲労病態にエネルギー産生系の異常が伴っていることが示された(図16)。

最も上流の Glucose に関しては、健常群、患者群で全く差はなかった。さらに、患者の主観的疲労度(Performance status: PS)と各代謝物質との相関を調べたところ、Citrate, cis-Aconitate, Isocitrate, Succinate, Malate の低下が疲労感と相関する傾向が見出され、特に Citrate, Isocitrate, Succinate で有意であった(図17)。

また、エネルギー代謝系の代謝物間の相関関係および代謝の変化パターンを詳細に解析したところ、患者群において解糖系および TCA サイクルの中で、特に大きな異常を示す化学反応系を同定することに成功した。これらの成果により、患者群をたつた 4 種類(Glucose, Citrate, cis-Aconitate, Isocitrate)、あるいは 3 種類(Glucose, Citrate, cis-Aconitate)の血液中の代謝物の

測定で判定できることがわかった(図18)。また、解糖経路を評価する Citrate/Glucose 比率、Aconitase 活性を評価する cis-Aconitate/Citrate、Isocitrate/cis-Aconitate 比率を3軸に同時評価することで、正常群と慢性疲労症候群患者をほぼ完全に分けることに成功した(図19)。特に、判別分析、Partial Least Square、Support Vector Machine などの解析により、90%以上の正確さで慢性疲労症候群患者を判別可能であることが示された。その後、患者群で Isocitrate から Malate への代謝経路で代謝物レベルが回復する傾向があることを加えることで、さらに高い判別能力を発揮することがわかった。

以上のメタボローム解析研究の成果は、平成 24 年6月 24 日に特許申請を終えた。

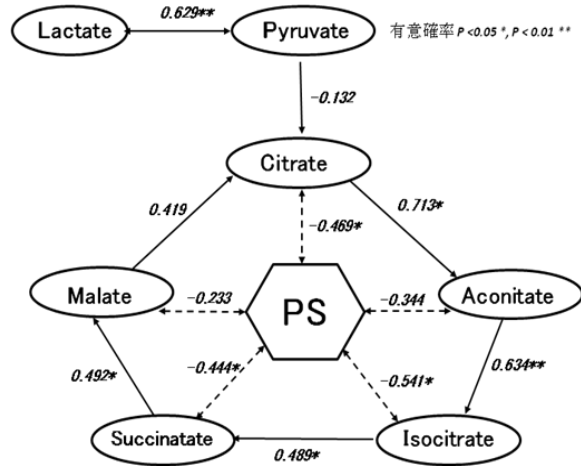


図 17 慢性疲労症候群患者の主観的疲労度 (Performance status: PS)と各代謝物質との相関

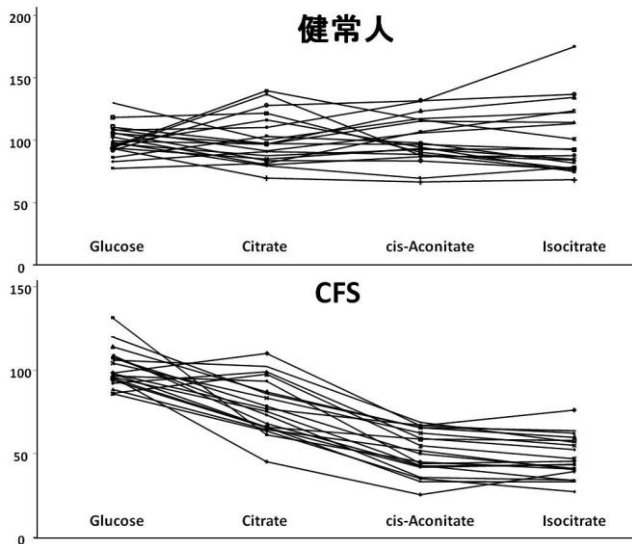


図 18 健常人と慢性疲労症候群(CFS)患者の血中 Glucose、citrate、cis-aconitate、isocitrate の変化

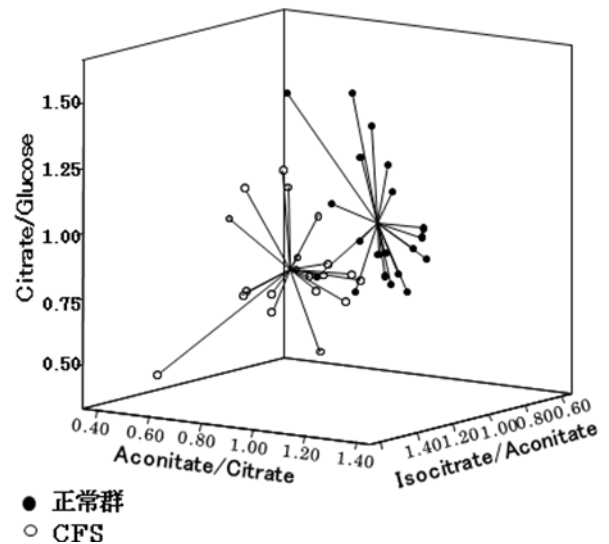


図 19 Citrate/Glucose、cis-Aconitate/Citrate、Isocitrate/cis-Aconitate 比率の同時評価による、正常群と CFS 患者との区別

(2) 感染・免疫疲労モデルおよび中枢神経疲労モデル動物の脳内メカニズム

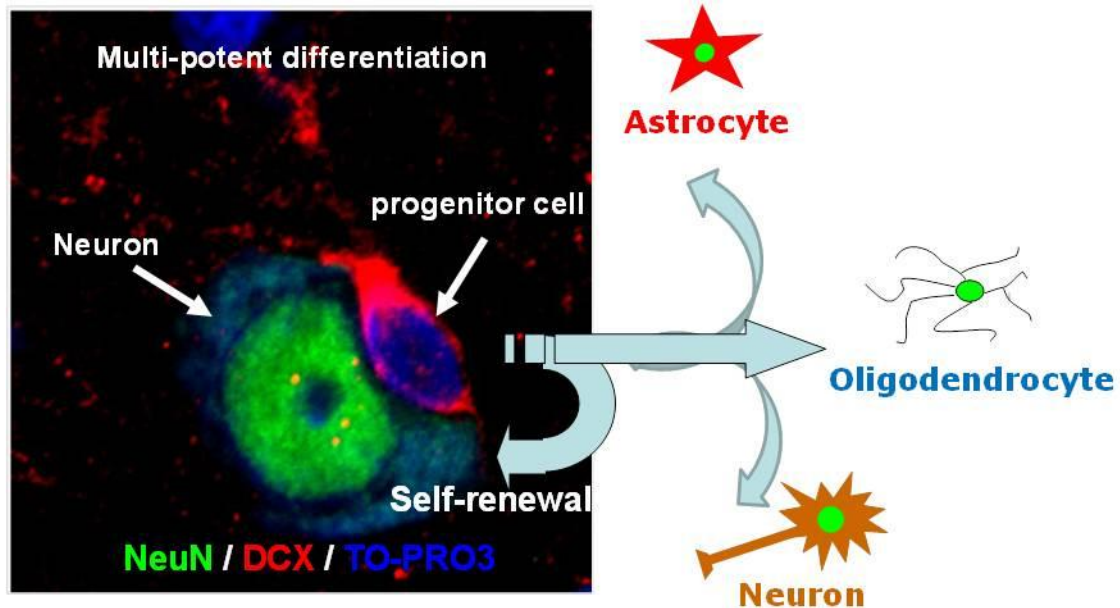


図 20 神経興奮負荷の変化による組織前駆細胞からの分化方向の調節

ウイルス感染模擬実験として合成二本鎖 RNA である poly I:C をラット腹腔内に投与し、一過性の発熱と自発行動量の減少を再現させた。本実験系において、脳内の広い領域で IL-1 β mRNA の発現が増強すること、OX-42 陽性の活性化ミクログリアの数が増加することを確認した。また、ラットリコンビナント IL-1 β を正常ラットの脳室内に持続投与すると自発行動量が著明に減少し、さらに IL-1 受容体アンタゴニストを脳室内に持続投与することで poly I:C 腹腔内投与による自発行動低下がほぼ完全に拮抗されることから、脳内の IL-1 β が感染疲労において重要な因子であることがわかった。さらに、脳内での IL-1 β は活性化型ミクログリアが産生し、その結果、脳内でのインターフェロン α の産生増加が引き起こされて、動物の自発行動が抑制されることもわかった。また、内因性に産生される IL-1 受容体アンタゴニストのはたらきを抑制したところ、動物の自発行動抑制期間が延長したことから、IL-1 受容体アンタゴニストは感染からの回復期における疲労倦怠感の緩和に大きく寄与しているものと考えられた。これらの研究成果により、ウイルス感性が引き金となって、その後数年にわたって重篤な疲労感が持続する慢性疲労症候群への移行に、脳内ミクログリアの持続活性化があるのではないかと仮説を得るに至った。

一方、中枢神経疲労モデル動物として、片側大脳皮質に脱分極波 (spreading depression) を誘発したラットを作成し、細胞動態を研究することで、疲労耐性に関わると思われる神経可塑メカニズムを発見した。spreading depression を誘発すると、中枢神経系全体に広く存在し、NG2 と doublecortin (DCX) を発現する組織前駆細胞の分裂増殖が誘導される (Tamura *et al.*, *Neurosci. Res.* 2004; Kataoka *et al.*, *Med. Mol. Morphol.* 2006)。以前より、この組織前駆細胞がオリゴデンドロサイトや幼弱なニューロンへ分化することを確認していたが (Tamura *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* 2007)、本 CREST 研究によって、脳に spreading depression などの神経興奮の負荷が与えられると、従来はオリゴデンドロサイトを産生していた組織前駆細胞がアストロサイトを産生し始め、中枢神経の過剰興奮を緩和するための脳の組織構築を築き上げることがわかった (図 20; Tamura *et al.*, *J. Cereb. Blood Flow Met.* 2012)。こうし組織前駆細胞の分化方向の調節による脳組織構築の改変は、神経興奮度合いに依存して引き起こされ、中枢神経刺激時のストレスや疲労への耐性構築に関わっているものと考えられた。

当初の計画では、疲労モデル動物および慢性疲労症候群患者からのサンプルを対象に、疲労のバイオマーカーを探索することが目標であった。現在までに、ヒトを含む慢性疲労のバイオマーカーについて、複数の代謝物が見つかったのみならず、網羅的解析に対してパス解析法などの数理モデル情報処理法を適応することによって、疲労病態の鍵となっている代謝反応系や酵素が判明し、さらに、疲労予防・回復に効果的な食薬素材も複数見出された。こうした成果は当初の研究計画を大きく超えるものであり、バイオマーカーの探索のみならず、疲労病態の治療や予防の方法として、将来、広く利用される方法論となる可能性がある。

一方、感染・免疫疲労モデル動物を対象とした研究から判明したミクログリア活性化と IL-1 β 産生に関しては、その後、大阪市立大学の研究グループが慢性疲労症候群患者に対して陽電子放射断層撮影法 (PET) を用いて患者脳内の神経炎症の検証試験を実施することへと結び付いた。そして、脳内 (視床) で IL-1 β 産生に関わるミクログリアの活性化が引き起こされていることを見出し、第 7 回日本疲労学会にて報告した。こうした疲労モデル動物を利用した詳細な基礎研究と、実際の慢性疲労症候群患者を対象とした分子イメージング研究が両輪となって、慢性疲労症候群の病態理解が大きく前進した。今後、こうした PET 検査も有望な慢性疲労症候群のバイオマーカーとなることが期待される。今回の CREST 研究から、脳内でミクログリアが活性化され続け、IL-1 β が産生され続けることが慢性疲労症候群における疲労・倦怠感の原因である可能性が得られたが、今後、脳内の免疫応答を抑制する薬剤の試験研究への展開も見込まれ、当初の予想を大きく超える展開となりつつある。

(2)研究成果の今後期待される展開

慢性疲労症候群患者や疲労動物モデルを対象としたメタボローム解析や、動物モデルを用いた疲労病態の分子・神経メカニズムの検討により、疲労病態にエネルギー産生機能の異常と中枢神経炎症が深く関わっていることがわかった。特に、メタボローム解析研究では、数理モデルを使用して、どの代謝経路を改善するとエネルギー産生がどの程度改善できるかを予測できる可能性が見出せた。今後、こうした結果を受けて、慢性疲労症候群や一般の疲労の軽減、さらに予防を可能にする食薬素材や新しい治療法の開発が加速するものと期待される。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際 (欧文) 誌 19 件)

1. Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K. (corresponding author) and Yamaguchi-Iwai, Y. Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell** 18(8):2980-2990, 2007.
2. Ishii, K., Fumoto, T., Iwai, K., Takeshita, S., Ito, M., Shimohata, N., Hiroyuki Aburatani, H., Taketani, S., J. Lelliott, C. J., Vidal-Puig, A., and Ikeda, K. Coordination of PGC-1b and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. **Nature Medicine** 15(3):259-66, 2009.
3. Shintani, T., Iwabuchi, T., Soga, T., Kato, Y., Yamamoto, T., Takano, N., Hishiki, T., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakuragawa, T., Ishikawa, K., Goda, N., Kitagawa, Y., Kajimura, M., Matsumoto, K., Suematsu, M. Cystathionine β -synthase as a CO-sensitive regulator of bile excretion. **Hepatology**, 49(1):140-150, 2009.
4. Ishikawa, H., Nakagaki, M., Bamba, A., Uchida, T., Hori, H., O'Brian, M.R., Iwai, K., and Ishimori K. Unusual heme binding in the bacterial iron response regulator protein (Irr): Spectral characterization of heme binding to heme regulatory motif. **Biochemistry**. 50(6):1016-1022, 2011.
5. Asano, T., Komatsu, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Ishikawa, F., Mizushima, N., and Iwai, K. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. **Mol. Cell Biol.** 31(10):2040-2052, 2011.
6. Takatsuka, M., Osada-Oka, M., Satoh, E.F., Kitadokoro, K., Nishiuchi, Y., Niki, M., Inoue, M., Iwai, K., Arakawa, T., Shimoji, Y., Ogura, H., Kobayashi, K., Rambukkana, A., and Matsumoto, S. A histone-like protein of mycobacteria possesses ferritin superfamily protein-like activity and protects against DNA damage by fenton reaction. **PLoS One**. 6:e20985, 2011.
7. Moroishi, T., Nishiyama, M., Takeda, Y., Iwai, K., and Nakayama, K. I. The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo. **Cell Metabolism** 14(3):339-351, 2011.
8. Ochiai, D., Goda, N., Hishiki, T., Kanai, M., Senoo-Matsuda, N., Soga, T., Johnson, R.S., Yoshimura, Y., Suematsu, M. Disruption of HIF-1 α in hepatocytes impairs glucose metabolism in diet-induced obesity mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 415(3): 445-9, 2011.
9. Sami, M., Tamura, Y., Cui, Y., Kikuchi, H., Kataoka, Y. In-vitro cell quantification method based on depth dependent analysis of brain tissue microscopic images. 33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society 4913-4916, 2011.
10. Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K. (Correspondence author) and Yamaguchi-Iwai, Y. Iron-Induced Dissociation of the Aft1p Transcriptional Regulator from Target Gene Promoters is an Initial Event in Iron-Dependent Gene Suppression. **Mol. Cell Biol.** 32(24):4998-5008, 2012.
11. Nishiyama, Y., Goda, N., Kanai, M., Niwa, D., Osanai, K., Yamamoto, Y., Senoo-Matsuda, N., Johnson, R.S., Miura, S., Kabe, Y., Suematsu, M. HIF-1 α induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice. **J Hepatol.** 56(2):441-447, 2012.
12. Ikejiri A, Nagai S, Goda N, Kurebayashi Y, Osada-Oka M, Takubo K, Suda T, Koyasu S. Dynamic regulation of Th17 differentiation by oxygen concentrations. **Int. Immunol.** 24(3): 137-146, 2012.
13. Nakamura-Ishizu A, Kurihara T, Okuno Y, Ozawa Y, Kishi K, Goda N, Tsubota K, Okano H, Suda T, Kubota Y. The formation of an angiogenic astrocyte template is regulated by the neuroretina in a HIF-1-dependent manner. **Dev. Biol.** 363(1):106-114, 2012.
14. Sakimoto S, Kidoya H, Naito H, Kamei M, Sakaguchi H, Goda N, Fukamizu A, Nishida K, Takakura N. A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice. **Development** 139(7): 1327-1335, 2012.
15. Higashiyama M, Hokari R, Hozumi H, Kurihara C, Ueda T, Watanabe C, Tomita K, Nakamura M, Komoto S, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Suematsu M, Goda N, Miura S. HIF-1 in T cells

- ameliorated dextran sodium sulfate-induced murine colitis. **J Leukoc Biol**, 91(6), 901-909, 2012. DOI: 10.1189/jlb.1011518
16. Goda N, Kanai M. Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. **Int J Hematol**, 95, 457-463, 2012. DOI: 10.1007/s12185-012-1069-y
17. Goda N. Hypoxia biology in health and disease. **Int J Hematol**, 95, 455-456, 2012. DOI: 10.1007/s12185-012-1084-z
18. Tamura, Y., Eguchi, A., Jin, G., Sami, M., Kataoka, Y. Cortical spreading depression shifts cell fate determination of progenitor cells in the adult cortex. **J Cereb Blood Flow Metab**, in press (DOI: 10.1038/jcbfm.2012.98)
19. Yamato, M., Kaneda, A., Kataoka, Y. Low-reactive level laser irradiation improves crescentic glomerulonephritis in rats. **Laser Med. Sci.**, in press

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 片岡 洋祐 モデル動物を用いた疲労メカニズムの解明(総説) Medical Bio 特集「疲労の科学と疲労克服」株式会社オーム社 p. 42-48. [2008年7月1日発行]
2. 片岡 洋祐 中枢性疲労の動物モデルと睡眠誘導メカニズム(総説) 医学のあゆみ 2009年2月発行予定
3. 片岡 洋祐、大和 正典 疲労モデル動物を用いた食薬成分の効能評価 - フルスルチアミンの感染疲労回復促進効果を中心に - (総説) 医学のあゆみ 2009年2月発行予定
4. 合田 亘人 ガスメディエーター(NO・CO・H₂S) 炎症・再生医学事典 (松島 綱治、西脇 徹 編)朝倉書店 査読無 150-153, 2009.
5. 片岡洋祐、大和正典、金光華、渡辺恭良 各種疲労モデル動物を用いた疲労の分子・神経メカニズム研究の概要 日本疲労学会誌 4, No. 2, 17-20 (2009).
6. 浅野剛史、岩井一宏 -話題の疾患と治療- 鉄不応性貧血とヘプシジン 感染・炎症・免疫 40:196-197, 2010.
7. 岩井一宏、武田有紀子 鉄代謝調節機構とミトコンドリア 日本医師会雑誌 特集「鉄過剰症-その病態と治療」139:295-299, 2010.
8. 片岡洋祐 脳の疲労と酸化ストレス Functional Food -機能性食品の基礎から臨床へ- 10号 特集「疲労と機能性食品」3: 318-323 (2010).
9. 松田七美、細胞競合の分子機構、実験医学増刊「増刊特集号・細胞死研究総集編」、Vol. 28、No. 7、2010
10. 武田 有紀子、岩井 一宏 蛋白質分解を介した鉄代謝調節 内分泌・糖尿病・代謝内科 33:377-383, 2011.
11. 田島 世貴、金 光華、片岡 洋祐、渡辺 恭良 オミックス解析と数理モデルについての概要 日本疲労学会誌 6:No.2, 2-8, 2011.
12. 片岡 洋祐、金 光華、田島 世貴、山野 恵美 慢性疲労症候群患者血液のメタボローム解析 日本疲労学会誌 6:No.2, 9-12, 2011.
13. 片岡 洋祐 脳科学で読み解くストレスのメカニズム 東洋経済(東洋経済新報社)第6332号 特集ストレス全対策(誌上講座) 平成23年6月25日発行
14. 合田 亘人、金井 麻衣 肝細胞の不均一性と肝代謝制御 実験医学 29(13): 2096-2100, 2011
15. 合田 亘人 アルコール性脂肪肝における低酸素応答性転写制御因子 HIF-1 の機能解析 アルコールと医学生物学 30: 7-10, 2011
16. 合田 亘人、鈴木 智大、金井 麻衣 HIF が制御するエネルギー代謝 実験医学 30(8): 1258-1263, 2012
17. 合田 亘人、鈴木 智大 低酸素転写制御因子とSDB 呼吸器 NEWS&VIEWS 40: 6-8, 2012
18. 合田 亘人、長内 康太 肝疾患とHIFを介した低酸素応答 血管医学 Vascular Biology & Medicine 13(4):377-383, 2012
19. 合田 亘人 HIFによる肝臓内糖・脂質代謝制御機構 生化学 84(11): 942-947, 2012

20. 合田 亘人、加藤 早由華 HIF を介した防御機構:低酸素ストレス下のエネルギー代謝制御 **医学のあゆみ** 244(4): 286-291, 2013
21. 佐古 健生、長谷川 功紀、西村 三恵、崔 翼龍、和田 康弘、林中 恵美、片岡 洋祐、千田 道雄、渡辺恭良 ソマトスタチンアナログを用いた膵内分泌細胞 PET イメージング **日本分子イメージング学会機関誌** 5, No. 1, 20-22, 2012
22. 矢野 恒夫、豊田 浩士、長谷川 功紀、野崎 聡、中村 郁子、片岡 洋祐 抗体医薬及び核酸医薬などバイオ PET 薬剤の安全性評価のための考察 **医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス PMDRS** 42 (2), 116-122, 2012
23. 大和 正典、金田 明、木村 誠、竹田 昂司、片岡 洋祐 近赤外低反応レベルレーザー照射による腎炎抑制効果 電気学会研究会資料(光・量子デバイス研究会) OQD-12-25, 1-4, 2012
24. 武田 友紀子、岩井 一宏 4. 鉄による酸化ストレス 「慢性肝疾患における鉄毒性と助鉄治療 ～C型慢性肝炎を中心に～」 60-70 ページ 日本鉄バイオサイエンス学会編 医薬ジャーナル社 平成 24 年 9 月 15 日
25. 片岡洋祐、武坂寿夫 自動車技術「気分の動きをみる新しい技術 KOKORO スケール」 66, 86-90, 2012

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 41 件、国際会議 10 件)

1. Iwai, K. (Osaka City University) Mechanism underlying the iron-dependent regulation of the iron-sensing transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae* Okazaki Conference Molecular Science and Chemical Biology of Biomolecular Function, Okazaki, Japan November, 10-12. 2007,.
2. Iwai, K., Involvement of the mitochondrial Fe-S cluster biogenetic system in the regulation of cellular iron metabolism 3rd International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest under Stress Okinawa, Japan April 6-10, 2008
3. Iwai, K., Ueta, R., Shimohata, N., Sakata, S.-I., Kataoka, Y., Imaoka, S., Watanabe Y. Disturbed heme metabolism in the liver of fatigue model rats and its involvement of fatigue The International Conference on Fatigue Science 2008 Okinawa, Japan September 3-5, 2008.
4. Kataoka, Y., Cui, Y., Tamura, Y., Yamato, M., Jin, G., Kurebayashi, S., Watanabe, Y. Fatigue signalings in the brain. The International Conference on Fatigue Science 2008 Okinawa, Japan September 3-5, 2008.
5. Ueta, R., and Iwai, K. Dissection of intracellular heme transport mechanism using a baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. JSH International Symposium 2010 in Akita "Seven Wonders of Erythropoiesis Akita, Japan July 16-17, 2010.
6. Kataoka, Y. Cellular mechanism on action of low-reactive level laser on neural activity and inflammation. The 13th Asian Pacific Association for Laser Medicine and Surgery, Suwa city, Japan, October 8-9, 2010.
7. Kataoka, Y. Molecular imaging for basic sciences and medical innovation. The 2nd SUN-RIKEN Workshop on Chemical Biology and Convergence Science Seoul, Korea, May 17-19, 2012.
8. Goda, N. Hypoxic responses and alcoholic fatty liver, 16th Congress of International Society for Biomedical Research on Alcoholism, Sapporo, September 10, 2012.
9. Iwai, K. Coordinate sensing of the cytoplasmic labile iron pool and the mitochondrial iron-prosthetic groups synthesis for cellular iron homeostasis. New frontiers of metabolism research in biomedical sciences. Tokyo. September 27-28, 2012.
10. Kataoka, Y. Anti-inflammatory effect of low-reactive level laser with a near-infrared wavelength by the actions on the nervous and immune systems. The 14th Asian Pacific Association for Laser Medicine and Surgery, Taipei, Taiwan, November 23-25, 2012

1. 岩井一宏 鉄と生体制御 第54回臨床検査医学会学術集会・第47回日本臨床化学会年次集会 連合大会、生涯教育講演、大阪、平成19年11月23日
2. 岩井一宏、植田亮、下畑宣行、坂田真一、片岡洋祐、今岡進、渡辺恭良 劇症疲労ラットのヘム代謝異常とその疲労への関与 第4回日本疲労学会総会・学術集会 シンポジウム 熊本 平成20年2月15日
3. 片岡洋祐、大和正典、金光華、渡辺恭良 各種疲労モデル動物を用いた疲労の分子・神経メカニズム研究の概要 第4回日本疲労学会総会・学術集会 シンポジウム 熊本 平成20年2月15日
4. 片岡洋祐、崔翼龍、田村泰久、大和正典、金光華、渡辺恭良 中枢神経興奮後の疲労と睡眠誘発 第85回日本生理学会大会 シンポジウム 東京 平成20年3月25日
5. 岩井一宏 細胞の鉄代謝におけるミトコンドリアの重要性 2008年 協和発酵キリン腎臓シンポジウム 東京 2008年11月29日
6. 岩井一宏 細胞の鉄代謝におけるミトコンドリアの重要性 BMB2008シンポジウム 神戸 2008年12月9-12日
7. 浅野 剛史、武田 有紀子、岩井一宏 細胞内の鉄代謝調節におけるヘムの役割 BMB2008シンポジウム 神戸 2008年12月9-12日
8. 片岡洋祐、大和正典、金光華、渡辺恭良 筋肉疲労および感染・炎症性疲労モデル動物を用いた疲労の分子・神経メカニズム 第5回日本疲労学会 福岡 平成21年5月15-16日
9. 岩井一宏 細胞の鉄代謝におけるミトコンドリアの重要性 The 3rd Life Science Seminar in Yamaguchi 宇部 平成21年5月26日
10. 岩井一宏 細胞の鉄感知機構における鉄-硫黄クラスター合成系の重要性 第36回生体分子科学討論会 札幌 平成21年6月19-20日
11. 岩井一宏 鉄代謝調節機構とその異常のガンを含めた種々の疾患への関与 第17回 FOCS(大阪若手がんセミナー) 大阪 平成21年7月10日
12. 岩井一宏 細胞質に存在する鉄貯蔵タンパク質、フェリチンの分解機構 第82回日本生化学会大会 シンポジウム 神戸 平成21年10月21-24日
13. 武田有紀子、浅野剛史、岩井一宏 ミトコンドリアで生成される鉄補欠分子族の細胞内鉄代謝制御における重要性 第82回日本生化学会大会 シンポジウム 神戸 平成21年10月21-24日
14. 岩井一宏 細胞の鉄代謝におけるミトコンドリアの重要性 九州大学GCOE連携生医研セミナー 福岡 平成21年11月13日
15. 田島世貴、片岡洋祐、渡辺恭良 オミックス解析と数理モデルについての概要 第6回日本疲労学会 大阪 平成22年6月25-26日
16. 片岡洋祐、金光華、山野恵美、田島世貴、中富康仁、倉恒弘彦、渡辺恭良、合田亘人、岩井一宏、曾我朋義 疲労モデル動物および慢性疲労症候群患者を対象としたメタボローム解析 第6回日本疲労学会 大阪 平成22年6月25-26日
17. 岩井一宏 鉄代謝調節におけるミトコンドリアの役割 第21回日本微量元素学会 シンポジウム「鉄研究の新展開」京都 平成22年7月3-4日
18. 坂田真一、服部信孝、岩井一宏 新たなパーキンソン病モデルマウス:Parkin KO x IRP2 Tg 二重変異マウス 第8回神経科学研究会 東京 2010年9月11日
19. 岩井一宏 鉄代謝異常と神経変性疾患 第34回鉄バイオサイエンス学会 シンポジウム 東京 2010年9月11日
20. 片岡洋祐、大和正典、渡辺恭良 感染・免疫疲労は脳内インターロイキン1 β により引き起こされる Neuro2010 神戸 平成22年9月2-4日
21. 合田亘人 疾患防御システムとしての低酸素応答、第5回難研MTTセミナー、東京、2010年10月22日
22. 片岡洋祐 メタボローム解析による疲労病態および慢性疲労症候群バイオマーカーの研究 第20回ヒューマンストレス産業技術研究会「ストレス診断と計測評価」池田 平成22年11月12日

日

23. Iwai, K., Takeda, Y. Crucial roles of mitochondria in cellular iron homeostasis BMB2010 シンポジウム 神戸 2010年12月10日
24. 片岡 洋祐、金 光華、田島 世貴、山野 恵美 CFS患者のメタボローム解析 第7回日本疲労学会 シンポジウム 名古屋 平成23年5月21-22日
25. 崔 翼龍、高島 忠之、高島 好聖、佐古 健生、奥山 香里、林中 恵美、和田 康弘、土居 久志、渡辺 恭良、片岡 洋祐 脳内炎症の分子イメージングと片頭痛病態 第6回日本分子イメージング学会 シンポジウム 神戸 平成23年5月26-27日
26. 田村 泰久、立花 晃子、江口 麻美、林中 恵美、和田 康弘、高橋 和弘、片岡 洋祐 NG2細胞のマルチモーダルイメージング 第6回日本分子イメージング学会 シンポジウム 神戸 平成23年5月26-27日
27. 岩井 一宏 鉄と神経変性 第26大脳基底核研究会 箱根 平成23年7月2日
28. 片岡 洋祐 組織・細胞研究から分子イメージング科学へ 理研-岡山ジョイントシンポジウム 最先端計測技術のトレンド2011 シンポジウム 岡山 平成23年7月4日
29. 片岡 洋祐 最近の分子イメージング科学の進展と光線力学療法の未来 第7回日本脳神経外科光線力学学会 招待講演 東京 平成23年7月9日
30. 岩井 一宏 鉄によるミトコンドリア制御と疾患 第20回日本Cell Death学会学術集会 東京 平成23年7月30日
31. 武田有紀子、岩井 一宏 細胞の鉄感知システム 第35回鉄バイオサイエンス学会学術集会 シンポジウム 徳島 平成23年9月10日
32. 浅野 剛史、岩井 一宏 フェリチンの細胞内動態の解析から明らかになったこと 第35回鉄バイオサイエンス学会学術集会 シンポジウム 徳島 平成23年9月10日
33. 浅野 剛史、岩井 一宏 フェリチンに貯蔵された鉄の利用メカニズム 第84回日本生化学会 シンポジウム 京都 平成23年9月21日
34. 片岡 洋祐、片瀨 俊彦 脳内神経炎症と疲労についてのオーバービュー 第89回日本生理学会大会 シンポジウム 松本 平成24年3月29-31日
35. 大和 正典、奥山 香里、金 光華、江口 麻美、片岡 洋祐 ウイルス感染疲労モデルにおけるIL-1 β およびIL-1 receptor antagonistの関与 第89回日本生理学会大会 シンポジウム 松本 平成24年3月29-31日
36. 合田 亘人 低酸素応答による肝代謝機能制御 第19回肝細胞研究会 平成24年6月札幌
37. 岩井 一宏 鉄代謝研究の現況 第23回日本微量元素学会 教育セミナー 平成24年7月5日 東京
38. 片岡 洋祐 原因別疲労動物モデルと分子神経病態 第34回日本生物学的精神医学会 平成24年9月28-30日 神戸
39. 片岡 洋祐 慢性疲労症候群のメタボローム解析 第7回メタボロームシンポジウム 平成24年10月10-12日 鶴岡
40. 武田有紀子、岩井 一宏 SCF^{Fbx15}によるIRPの鉄依存性認識・分解に必要な鉄シグナル 第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ 平成24年12月11-14日 福岡
41. 浅野 剛史、高橋 良輔、岩井 一宏 神経変性疾患における鉄代謝の役割 第85回日本生化学会大会 シンポジウム 平成24年12月14-16日 福岡

② 口頭発表 (国内会議 27 件、国際会議 0 件)

1. 坂田真一、中川朋子、大橋聡、波田野琢、吉見健二、浅沼幹人、豊國伸哉、服部信孝、岩井一宏 ニューロン特異的 IRP2 トランスジェニックマウスは神経変性を引き起こす、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、横浜、平成 19 年 12 月 12 日
2. 植田亮、藤原奈央子、岩井裕子、岩井一宏 鉄代謝調節因子 Aft1p の鉄感知機構、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、横浜、平成 19 年 12 月 12 日
3. 金光華、江口麻美、大和正典、奥山香里、田中雅彰、片岡洋祐、渡辺恭良 感染疲労モデ

- ル動物における自発行動の抑制と脳組織内 c-Fos 発現 第4回日本疲労学会総会・学術集会 熊本 平成20年2月16日
4. 大和正典、金光華、奥山香里、江口麻美、片岡洋祐、渡辺恭良 感染疲労モデル動物における一酸化窒素合成酵素(NOS)の役割 第4回日本疲労学会総会・学術集会 熊本 平成20年2月16日
 5. 合田 亘人 Hypoxia Response and Inflammation、第4回 ボン大学-早稲田大学ジョイントシンポジウム、東京、平成20年2月27日
 6. 植田 亮、藤原 奈央子、岩井 裕子、岩井 一宏 出芽酵母の鉄代謝制御因子 Aft1 による鉄感知メカニズム 第41回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 平成20年9月10-12日 札幌
 7. 崔 翼龍、片岡 洋祐、渡辺 恭良 動物モデルを用いた中枢神経疲労の分子・神経メカニズムの解析 第51回日本神経化学大会 平成20年9月11-13日 富山
 8. 岩井 一宏、植田 亮、坂田 真一、渡辺 恭良 劇症疲労ラットのヘム代謝異常とその疲労への関与 第32回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 平成20年9月13-14日 青森
 9. 武田 有紀子、浅野 剛史、岩井 一宏 鉄-硫黄クラスター生合成系の鉄代謝制御における役割の解明 第32回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 平成20年9月13-14日 青森
 10. 坂田 真一、大橋 聡、波田野 琢、浅沼 幹人、岩井 一宏 鉄代謝異常と神経変性疾患の因果関係について ～IRP2トランスジェニックマウスとHOIL-1ノックアウトマウスの解析～ 第6回神経科学研究会 平成20年9月20日 東京
 11. Senoo-Matsuda, N., de la Cova, C., Goda, N., Johnston, L.A. Analysis of competitive interactions during growth in *Drosophila* using a cell-culture based assay system. The 9th Annual Japanese *Drosophila* Research Conference YAMAHA Resort TSUMAGOI, Kakegawa-shi, Shizuoka-ken, Japan Dates: July 6 - July 8, 2009
 12. 松田七美、de la Cova, ç., 合田 亘人、Johnston, L.A. (早稲田大・先進理工) 癌関連遺伝子 Myc と p53 による代謝調節を介した細胞競合の制御機構 第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日
 13. 合田亘人、西山靖将、末松誠 アルコール性脂肪肝における低酸素応答性転写制御因子 HIF-1 の機能解析、第30回アルコール医学生物学研究会学術集会、久留米、平成22年11月26日
 14. 武田有紀子 岩井一宏 鉄代謝制御因子 IRP を分解へ導く鉄シグナル BMB2010 平成22年12月9日 神戸
 15. 松田七美、癌関連遺伝子 Myc を介した細胞競合の制御機構、BMB2010 ワークショップ 神戸、平成22年12月10日
 16. Goda, N., Nishiyama, Y., Suematsu, M. Protective role of HIF-1 in the development of alcohol-induced steatosis in mice. 第36回日本微小循環学会 名古屋 平成23年2月11日
 17. 金 光華、田島 世貴、山野 恵美、片岡 洋祐 慢性疲労症候群患者と疲労モデル動物におけるメタボローム解析研究 第7回日本疲労学会 名古屋 平成23年5月21-22日
 18. 中富 康仁、水野 敬、石井 聡、和田 康弘、田中 雅彰、田沢 周作、尾上 嘉代、福田 早苗、河邊 譲治、高橋 和弘、片岡 洋祐、塩見 進、山口 浩二、稲葉 雅章、倉恒 弘彦、渡辺 恭良 慢性疲労症候群における脳内ミクログリア活性化:PET 研究 第7回日本疲労学会 名古屋 平成23年5月21-22日
 19. 大和 正典、奥山 香里、金 光華、江口 麻美、片岡 洋祐 ウイルス感染疲労モデルにおける IL-1 β および IL-1 receptor antagonist の関与 第7回日本疲労学会 名古屋 平成23年5月21-22日
 20. 大和 正典、奥山 香里、金 光華、江口 麻美、片岡 洋祐 ウイルス感染疲労モデルにおける IL-1 β および IL-1 receptor antagonist の関与 第34回日本神経科学大会 横浜 平成23年9月14-17日
 21. 崔 翼龍、佐古 健生、奥山 香里、豊田 浩士、尾上 嘉代、林中 恵美、和田 康弘、渡辺

- 恭良、片岡 洋祐 MicroPETを用いたラット脳内の疼痛伝達・認知回路の解析 第34回日本神経科学大会 横浜 平成23年9月14-17日
22. 合田亘人, 肝代謝制御における低酸素応答の機能解析, 第84回日本生化学会総会, 京都, 平成23年9月
 23. 大野貴久, 合田亘人, 松田七美, ショウジョウバエモデルを用いた Sima/HIF-1 α シグナルが関わる神経変性疾患の発症機構の解明, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 平成23年12月
 24. 平本美香子, 大野貴久, 合田亘人, 松田七美, ショウジョウバエモデルを用いた Sima/HIF-1 α シグナルによる個体の大きさの制御機構の解析, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 平成23年12月
 25. 堤香菜子, 合田亘人, 松田七美, 2型筋萎縮性側索硬化症モデルショウジョウバエを用いた ALS2/Alsin の神経保護作用の解析, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 平成23年12月
 26. 合田 亘人 アルコール性脂肪肝の発症機構における低酸素応答の病態生理学的意義 第48回日本肝臓学会総会 金沢 平成24年6月
 27. 崔翼龍、佐古健生、奥山香里、豊田浩士、林中恵美、和田康弘、渡辺恭良、片岡洋祐 MicroPETを用いたラット神経因性疼痛モデルラットの脳内疼痛認知・伝達回路の解析 第35回日本神経科学大会 名古屋 平成24年9月18-21日

③ ポスター発表 (国内会議 44件、国際会議 26件)

1. 武田有紀子、浅野剛史、金井元子、岩井裕子、岩井一宏 CIA 機構の解析から明らかになった新規鉄代謝制御メカニズム, 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、横浜、平成19年12月11日
2. 金井元子、植田亮、下畑宣行、岩井一宏 出芽酵母を用いたヘム動態関連遺伝子の探索、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜、平成19年12月11日
3. 大和 正典、奥山 香里、金 光華、江口 麻美、片岡 洋祐、渡辺 恭良感染疲労モデル動物における一酸化窒素合成酵素(NOS)の役割 第31回日本神経科学会 東京 平成20年7月9-11日
4. 金 光華、江口 麻美、大和 正典、奥山 香里、田中 雅彰、片岡 洋祐、渡辺 恭良 感染モデルラットの中樞神経における c-Fos 発現 第31回日本神経科学会 東京 平成20年7月9-11日
5. 武田有紀子、浅野 剛史、岩井 一宏 タンパク質分解系による細胞内鉄代謝制御 特定領域研究「タンパク質分解による細胞・個体機能の制御」班会議 つくば 平成20年11月26-28日
6. 浅野 剛史、岩井 一宏 鉄貯蔵タンパク質 ferritin はどのようにしてターンオーバーされるのか? 特定領域研究「タンパク質分解による細胞・個体機能の制御」班会議 つくば 平成20年11月26-28日
7. 大和正典、奥山香里、金光華、江口麻美、片岡洋祐、渡辺恭良 Minocycline attenuates poly I:C-induced immunological fatigue-like behavior via suppression of inflammatory cytokines expression in the brain 第82回日本薬理学会年会 神奈川 平成21年3月16-18日
8. 大和正典、奥山香里、金光華、江口麻美、渡辺恭良、片岡洋祐 PolyI:C 誘起感染疲労における脳内 Interleukin-1 β の役割 第32回日本神経科学大会名古屋 平成21年9月16-18日
9. 片岡洋祐、金光華、合田亘人、岩井一宏 疲労モデル動物を対象としたメタボローム解析 第2回CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」公開シンポジウム 東京 平成21年10月16日
10. 武田有紀子、浅野剛史、岩井一宏 細胞内鉄代謝調節におけるミトコンドリアの役割の解析 第2回CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」公開シンポジウム(東

京) 平成 21 年 10 月 16 日

11. 浅野 剛史、水島昇、岩井 一宏 鉄貯蔵蛋白質 ferritin に貯蔵された鉄の放出機構 第 82 回日本生化学会大会 神戸 平成 21 年 10 月 21-24 日
12. 奥谷弘考、内田毅、岩井一宏、石森浩一郎 鉄代謝制御タンパク質 IRP2 において酸化変化を引き起こすヘムの結合部位の同定 第 82 回日本生化学会大会 神戸 平成 21 年 10 月 21-24 日
13. 金井麻衣、堤香菜子、合田亘人、松田七美 神経変性疾患ショウジョウバエモデルにおけるエネルギー代謝異常の解析 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、平成 21 年 12 月 9 日
14. 浅野 剛史、水島昇、岩井 一宏 鉄貯蔵蛋白質フェリチンに貯蔵された鉄の役割とその利用機構 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 平成 21 年 12 月 10 日
15. Ueta, R., Fujiwara, N., Yamaguchi-Iwai, Y., Iwai, K. Mechanisms underlying iron-response of Aft1, iron sensing transcriptional activator 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 平成 21 年 12 月 10 日
16. 武田有紀子、浅野剛史、岩井一宏 ミトコンドリアで生成される鉄補欠分子族の細胞内鉄代謝制御における重要性 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 平成 21 年 12 月 10 日
17. 坂田真一、服部信孝、岩井一宏 新たなパーキンソン病モデルマウス、Parkin KO /IRP2 Tg マウスの樹立第 32 回日本分子生物学会年会、横浜 平成 21 年 12 月 10 日
18. 大和正典、金光華、渡辺恭良、片岡洋祐 PolyI:C 誘起感染疲労における脳内 IL-1 β と IL-1 receptor antagonist の関与 第 6 回日本疲労学会 大阪 平成 22 年 6 月 25-26 日
19. 中富康仁、水野敬、和田康弘、田中雅彰、高橋和弘、田沢周作、重松誠、尾上嘉代、嶋原良仁、石井聡、小山英則、松井徳造、片岡洋祐、河邊譲治、山口浩二、塩見進、西沢良記、倉恒弘彦、渡辺恭良 慢性疲労症候群における脳内免疫異常に対する PET 研究:第 1 報 第 6 回日本疲労学会 大阪 平成 22 年 6 月 25-26 日
20. 坂田真一、服部信孝、岩井一宏 運動量の減少を示す新たなパーキンソン病モデルマウスの樹立 Neuro2010(神経科学会 神経化学会 神経回路学会合同年会) 神戸 平成 22 年 9 月 2-4 日
21. 大和正典、奥山香里、金光華、江口麻美、渡辺恭良、片岡洋祐 PolyI:C 誘起感染疲労モデルにおける内因性 IL-1 β と IL-1 receptor antagonist の関与 Neuro2010 神戸 平成 22 年 9 月 2-4 日
22. 田村泰久、立花晃子、奥山香里、林中恵美、和田康弘、高橋和弘、片岡洋祐 NG2 細胞の PET イメージング法の確立 Neuro2010 神戸 平成 22 年 9 月 2-4 日
23. 崔翼龍、佐古健生、豊田浩士、奥山香里、尾上嘉代、林中恵美、和田康弘、渡辺恭良、片岡洋祐 片頭痛病態モデルラットを用いた疼痛伝達回路の解析 Neuro2010 神戸 平成 22 年 9 月 2-4 日
24. 植田亮、藤原奈央子、岩井裕子、岩井一宏 出芽酵母の鉄感知にはミトコンドリア内外の鉄硫黄クラスター形成機構が関与する BMB2010 神戸 平成 22 年 12 月 7 日
25. 堤香菜子、合田亘人、松田七美、ショウジョウバエの 2 型筋萎縮性側索硬化症モデルを用いた ALS2/Alsin の機能解析、BMB2010 神戸 平成 22 年 12 月 9 日
26. 浅野剛史、小松雅明、水島昇、岩井一宏 鉄貯蔵タンパク質フェリチンに貯蔵された鉄の運命 BMB2010 神戸 2010 年 12 月 10 日
27. 奥谷博考、武田有紀子、内田毅、岩井一宏、石森浩一郎 ヘムの結合による鉄代謝制御タンパク質 IRP2 の機能制御 BMB2010 神戸 平成 22 年 12 月 10 日
28. 金 光華、田島 世貴、山野 恵美、片岡 洋祐 慢性疲労症候群患者と疲労モデル動物におけるメタボローム解析研究 第 7 回日本疲労学会 名古屋 平成 23 年 5 月 21-22 日
29. 中富 康仁、水野 敬、石井 聡、和田 康弘、田中 雅彰、田沢 周作、尾上 嘉代、福田 早苗、河邊 譲治、高橋 和弘、片岡 洋祐、塩見 進、山口 浩二、稲葉 雅章、倉恒 弘彦、渡辺 恭良 慢性疲労症候群における脳内ミクログリア活性化:PET 研究 第 7 回日本疲労学会 名古屋 平成 23 年 5 月 21-22 日
30. 大和 正典、奥山 香里、金 光華、江口 麻美、片岡 洋祐 ウイルス感染疲労モデルにおけ

る IL-1 β および IL-1 receptor antagonist の関与 第 7 回日本疲労学会 名古屋 平成 23 年 5 月 21-22 日

31. 中富康仁、水野敬、石井聡、和田康弘、田中雅彰、田沢周作、尾上嘉代、福田早苗、河邊譲治、高橋和弘、片岡洋祐、塩見進、山口浩二、稲葉雅章、倉恒弘彦、渡辺恭良 慢性疲労症候群患者における脳内ミクログリア活性化:[¹¹C]PK11195 を用いた PET 研究 第 34 回日本神経科学大会 横浜 平成 23 年 9 月 14-17 日
 32. 大野貴久、合田亘人、松田七美、ショウジョウバエモデルを用いた Sima/HIF-1 α シグナルが関わる神経変性疾患の発症機構の解明, 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 平成 23 年 12 月
 33. 平本美香子、大野貴久、合田亘人、松田七美、ショウジョウバエモデルを用いた Sima/HIF-1 α シグナルによる個体の大きさの制御機構の解析, 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 平成 23 年 12 月
 34. 堤香菜子、合田亘人、松田七美、2 型筋萎縮性側索硬化症モデルショウジョウバエを用いた ALS2/Alsin の神経保護作用の解析, 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 平成 23 年 12 月
 35. Kanai M, Tanaka T, Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y, Goda N, Relevance of mitochondrial bioenergetics to in vitro megakaryocyte differentiation, 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜 平成 23 年 12 月
 36. 佐古健生、長谷川功紀、西村三恵、崔翼龍、和田康弘、林中恵美、片岡洋祐、千田道雄、渡辺恭良、放射性ソマトスタチンアナログを用いた膵内分泌細胞 PET イメージング 第 51 回日本核医学会学術総会 つくば 平成 23 年 10 月 26-29 日
 37. 松本聡、安達秀子、田丸静香、片岡洋祐、田中一成 酵素分解牡蠣ペプチドのマウス抗疲労効果 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 仙台 平成 24 年 5 月 18-20 日
 38. 豊田浩士、矢野恒夫、長谷川功紀、野崎聡、中村郁子、片岡洋祐 バイオ PET 薬剤の安全性評価のための考察 第 7 回日本分子イメージング学会 浜松 平成 24 年 5 月 24-25 日
 39. 近藤亨、野崎聡、片岡洋祐、木下圭太、谷田部恭、渡辺恭良 癌幹細胞を標的とした癌根絶療法の創出 分子イメージング研究戦略推進プログラムシンポジウム 2012 神戸 平成 24 年 8 月 1 日
 40. 中富康仁、水野敬、石井聡、和田康弘、田中雅彰、田沢周作、尾上嘉代、福田早苗、河邊譲治、高橋和弘、片岡洋祐、塩見進、山口浩二、稲葉雅章、倉恒弘彦、渡辺恭良 慢性疲労症候群における神経炎症:[¹¹C]PK(R)-11195 を用いた PET 研究 第 35 回日本神経科学大会 名古屋 平成 24 年 9 月 18-21 日
 41. 新井理智、加藤祐樹、合田亘人 コリン欠乏食誘導性 NAFLD モデルにおける HIF1 の機能解析 第 85 回日本生化学会大会 平成 24 年 12 月 17 日
 42. 平本美香子、大野貴久、合田亘人、松田七美 ショウジョウバエモデルを用いた Sima/HIF-1 α シグナルによる個体の発生と老化の制御機構の解析 第 85 回日本生化学会大会 平成 24 年 12 月 17 日
 43. 府川直矢、堤香菜子、合田亘人、松田七美 Pathological Mechanism of ALS2/Alsin in a Drosophila Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model 第 35 回日本分子生物学会 平成 24 年 12 月 11 日
 44. 加藤早由華、合田亘人 Biological roles of HIFs in the maintenance of carbohydrate metabolism in liver 第 35 回日本分子生物学会 平成 24 年 12 月 11 日
1. Goda, N., Ochiai, D., Johnson, R., Suematsu, M. HIF-1 is not a critical determinant for metabolic zonation in liver acinus. Experimental Biology 2008 San Diego, USA April 5-9, 2008
 2. Cui, Y., Kataoka, Y., Watanabe, Y. Non-REM sleep induction after aberrant brain excitation: A possible pathway for central fatigue recovery. The International Conference on Fatigue Science 2008 Okinawa, Japan September 3-5, 2008.

3. Yamato, M., Okuyama K., Jin, G., Eguchi, A., Kataoka, Y., Watanabe, Y. Inflammatory cytokines expression in the brain is involved in Poly I:C-induced immunological fatigue-like behavior in rats. The International Conference on Fatigue Science 2008 Okinawa, Japan September 3-5, 2008.
4. Jin, G., Eguchi, A., Yamato, M., Okuyama K., Tanaka, M., Kataoka, Y., Watanabe, Y. Expression of c-Fos in the central nervous system in a rat model for immunological fatigue induced by poly I:C administration. The International Conference on Fatigue Science 2008 Okinawa, Japan September 3-5, 2008.
5. Yamato, M., Okuyama, K., Jin, G., Eguchi, A., Kataoka, Y., Watanabe, Y. Inflammatory cytokines expression in the rat brain is involved in Poly I:C-induced immunological fatigue-like behavior. Society for Neuroscience 2008 Washington DC, USA November 15-19, 2008.
6. Yamato, M., Okuyama K., Jin, G., Eguchi, A., Watanabe Y., Kataoka, Y., Interleukin-1beta expression in the brain is involved in poly I:C-induced immunological fatigue-like behavior in rats. The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience 2009 Chicago, USA October 17-21, 2009.
7. Goda, N., Nishiyama, Y., Johnson, R.S., Suematsu, M. Protective role of HIF-1 in ethanol-induced fatty liver in mice, Keystone Symposia, Colorado, USA January, 2010.
8. Senoo-Matsuda, N., Johnston, L. A., and Goda, N. Analysis of factors involved in competitive interactions during growth using a Drosophila cell-culture based assay system. The 51st Annual Drosophila Research Conference Washington DC, USA April, 2010.
9. Sakata, S.-I., Hattori, N., and Iwai, K. Subtle change of iron metabolism can cause or deteriorate neurodegenerative symptoms in mice FASEB Summer Research Conference "Trace Elements in Biology and Medicine" Snowmass Village, Colorado, USA June 13-18, 2010.
10. Tamura, Y., Tachibana, A., Wada, Y., Takahashi, K., Kataoka, Y. In vivo imaging of neural progenitor cells in the adult rat brain. World Molecular Imaging Congress 2010, Kyoto, Japan September 8-11, 2010.
11. Yamato, M., Sugita S., Mizuma, H., Wada Y., Kataoka, Y., Watanabe, Y. Microautoradiographic studies with [18F]FDG, combined with immunohistochemistry. World Molecular Imaging Congress 2010, Kyoto, Japan September 8-11, 2010.
12. Sako, T., Kanayama Y., Hasegawa, K., Mishimura, M., Wada Y., Hayashinaka, E., Cui, Y., Kataoka, Y., Senda, M., Watanabe, Y. PET imaging of somatostatin receptors in the pancreatic endocrine cells with [Ga-68]DOTA-octreotide: A potential biomarker for beta cell mass measurement. World Molecular Imaging Congress 2010, Kyoto, Japan September 8-11, 2010.
13. Tamura, Y., Tachibana, A., Hayashinaka, E., Wada, Y., Takahashi, K., Kataoka, Y., In vivo imaging of NG2 cells in the adult brain using transgenic rat. The 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience 2010, San Diego, USA November 13-17, 2010.
14. Tamura, Y., Tachibana, A., Wada, Y., Takahashi, K., Kataoka, Y., Multi-modal imaging of NG2 cells in the adult rat brain. The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, Japan December 1-2, 2010.
15. Kanako, T., Goda, N., Senoo-Matsuda, N. Functional Analysis of ALS2/Alsin in a Drosophila Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model., The 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference (APDRC), Taipei, Taiwan May 2011.
16. Senoo-Matsuda, N., Kanai, M., Fukawa, N., Goda, N., Analysis of competitive interactions during proliferation and cell death via dMyc-mediated regulation., The 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference (APDRC), Taipei, Taiwan May 2011.
17. Sako, T., Hasegawa, K., Nishimura, M., Cui, Y., Wada, Y. Hayashinaka, E., Kataoka, Y.,

- Senda, M., Watanabe, Y. PET imaging of the pancreatic beta cells with radiolabeled Somatostatin analogs: A potential biomarker for beta cell mass measurement. World Molecular Imaging Congress, San Diego, USA September 7-10, 2011.
18. Kakuda, T., Kataoka, Y., Utsunomiya, K., Kataoka, K., Yoneda, Y., Neuroprotective effects of theanine, green tea ingredient, and its preventive effects on cognitive dysfunction. Annual Meeting of the International Society for Nutraceuticals and Functional Foods. The International Society for Nutraceuticals and Functional Foods (ISNFF), Sapporo, Japan November 14-17, 2011.
 19. Goda, N., Nishiyama, Y., Suematsu, M. Deletion of hepatic HIF-1 α gene aggravated alcohol-induced steatosis in mice, 6th International Symposium on ALPD and Cirrhosis, Fukuoka, October, 2011.
 20. Goda, N. Role of HIF-1 in the regulation of hepatic lipid metabolism The 33rd NAITO CONFERENCE ON OXYGEN BIOLOGY: HYPOXIA, OXIDATIVE STRESS AND DISEASES, SAPPORO, June, 2012.
 21. Goda, N. HIF-1 regulates lipid metabolism in the liver, New Frontiers of Metabolism Research in Biomedical Sciences, Tokyo, September 27, 2012.
 22. Sugita, S., Yamato, M., Kataoka, Y., Watanabe, Y. [¹⁸F]FDG accumulation in tumor microenvironment. American Association for Cancer Research, Chicago, USA March 31-April 4, 2012
 23. Cui, Y., Kataoka, Y., Watanabe, Y. Molecula imaging analysis of migraine pathophysiology in an animal model using small-animal PET, Seian, China July, 2012
 24. Yamato, M., Sugita, S., Mizuma, H., Wada, Y., Watanabe, Y., Kataoka, Y. Histochemical visualization of ¹⁸F-FDG, the most common PET tracer, by microautoradiography combined with immunohistochemistry. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Kyoto, Japan August 26-29, 2012
 25. Sami, M. M., Akazawa, K., Cui, Y., Kikuchi, H., and Kataoka, Y. Multi-atlas applications in fatigue pathophysiology. 15th International Conference on Medical Imaging Computer Assisted Intervention (MICCAI 2012), Nice, France, October 5th, 2012.
 26. Kanayama, Y., Sumita, C., Tazawa, S., Zochi, R., Morimoto, Y., Hasegawa, K., Hayashinaka, E., Sugita, S., Kataoka, Y., Wada, Y., Takahashi, K., Watanabe, Y. Evaluation of specific accumulation of ⁶⁴Cu-labeled cetuximab and trastuzumab in tumor-bearing mice. World Molecular Imaging Congress, Dublin, Ireland September 5-8, 2012.

(4)知財出願

①国内出願 (1 件)

1. 発明の名称 疲労のバイオマーカーおよびその利用
発明者 片岡洋祐、金光華、渡辺恭良、田島世貴、曾我朋義、倉恒弘彦、山野恵美
出願人 独立行政法人 理化学研究所、公立大学法人 大阪市立大学、倉恒弘彦
出願年月日 2011.2.21 (基礎出願)2010.6.24
出願番号 2011-34875 (基礎出願)2010-144128

②海外出願 (1 件)

1. 発明の名称 疲労のバイオマーカーおよびその利用
発明者 片岡洋祐、金光華、渡辺恭良、田島世貴、曾我朋義、倉恒弘彦、山野恵美
出願人 独立行政法人 理化学研究所、公立大学法人 大阪市立大学、倉恒弘彦
出願年月日 2011.8.22
出願番号 PCT/IB2011/001917

(5)受賞・報道等

①受賞

1. The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience ポスター賞 平成 22 年 12 月 1 日
2. 日本疲労学会研究奨励賞 中富 康仁、水野 敬、石井 聡、和田 康弘、田中 雅彰、田沢 周作、尾上 嘉代、福田 早苗、河邊 譲治、高橋 和弘、片岡 洋祐、塩見 進、山口 浩二、稲葉 雅章、倉恒 弘彦、渡辺 恭良、平成 23 年 5 月 22 日
3. 第 6 回日本分子イメージング学会最優秀発表賞 佐古 健夫、長谷川 功紀、西村 三恵、崔 翼龍、和田 康弘、林中 恵美、片岡 洋祐、千田 道雄、渡辺 恭良、平成 23 年 5 月 27 日
4. 第 30 回アルコール医学生物学研究会 高田賞 合田 亘人 平成 22 年 10 月
5. 6th International Symposium on ALPD and Cirrhosis Best Poster Award 合田 亘人 平成 23 年 10 月

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 片岡 洋祐 「疲労社会」からの脱却を」読売新聞 朝刊 「サンデー茶論(サロン)」インタビュー記事 平成 22 年 5 月 30 日
2. 片岡 洋祐 「慢性疲労症候群を診断」日本経済新聞 朝刊 科学技術面 平成 22 年 12 月 6 日
3. 片岡 洋祐 「原因不明・慢性疲労症候群血液利用の新診断法」神戸新聞 朝刊 平成 22 年 12 月 26 日
4. 片岡 洋祐 主観的気分測定装置 KOKORO スケールに関するプレス発表 産経新聞朝刊・日経新聞朝刊・読売新聞朝刊・神戸新聞朝刊・毎日新聞夕刊・化学工業日報・日経産業新聞・日刊工業新聞・他(概要:人の気分を2,3秒で簡単に記録するシステムを開発していたところ、偶然に東日本大震災が発生し、震災前後の人々の気分変化を記録する結果となったため、プレスリリースにてデータを公表した。)平成 24 年 3 月 1 日

③その他

1. 片岡 洋祐 理研ニュース(研究最前線)「進化する分子イメージング」記事 平成 21 年 12 月 7 日発行
2. 片岡 洋祐 研究に関するインタビュー記事 KOBE BI Me-Hi Journal HI-DEC Kobe 平成 22 年 5 月 25 日発行
3. 片岡 洋祐 「第 6 回日本疲労学会開催される」記事 Ph-PET Letter 平成 22 年 8 月 20 日発行
4. 岩井 一宏 パーキンソン病様症状を呈するモデルマウスの作製 近畿バイオインダストリー振興会議 第 24 回「バイオテクノロジー産業化のための技術シーズ公開会」大阪 平成 22 年 8 月 27 日
5. 片岡 洋祐 「メタボローム解析による慢性疲労のバイオマーカーの発見」大阪府立大学・大阪市立大学新技術説明会 東京 平成 22 年 11 月 4 日
6. 片岡 洋祐 厚生労働省科学研究費「自律神経異常を伴い慢性的な疲労を訴える患者に対する客観的な疲労診断法と慢性疲労診断指針の作成」研究班第 2 回班会議「慢性疲労症候群患者血漿のメタボローム解析」東京 平成 23 年 1 月 25 日
7. 片岡 洋祐、金光華、渡辺恭良、田島世貴、曾我朋義、倉恒弘彦、山野恵美 慢性疲労症候群の血液バイオマーカーの発見 国際バイオ EXPO 東京 平成 23 年 6 月 29 日-7 月 1 日
8. 片岡 洋祐 「KOKORO スケールの開発と応用」関東疲労懇話会 東京 平成 24 年 6 月 30 日
9. 片岡 洋祐 「心と体のつながりを科学する -あなたも自分の心の動きをみてみませんか? -」静岡県ファルマバレープロジェクト・地域イノベーション戦略支援プログラムセミナー 静岡 平成 24 年 7 月 10 日

§ 6 研究期間中の活動(主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 22 年 11 月 17 日	ヘルスケアビジネスセミナー 心地良さの「見える化」戦略	大阪産業創造館(大阪市)	50 人	脳科学の視点から、生活空間における疲労の原因や予防に関する講演を企業関係者を対象に実施した。
平成 22 年 12 月 9 日	ヘルスケアビジネスセミナー 脳科学から見るウォーキング健康効果と、新しい価値創造ビジネス	大阪産業創造館(大阪市)	50 人	疲労科学研究や脳科学研究から運動の効果と関連ビジネスの展開に関する講演を企業関係者を対象に実施した。
平成 23 年 2 月 22 日	「抗疲労・癒し」科学研究の基礎と活用連続講座 「疲労を知る② 疲労・抗疲労・癒しの脳内メカニズム」	大阪産業創造館(大阪市)	40 人	疲労の予防や癒しに関する脳内分子メカニズムについての講演を一般市民・企業関係者へ実施した。
平成 23 年 3 月 23 日	「こころの疲れと癒し」財団法人先端医療振興財団 第2回予防医学セミナー	臨床研究情報センター(神戸ポートアイランド)	200 人	脳の疲労と予防・癒しに関する科学研究とその成果についての講演を、一般市民を対象に実施した。
平成 23 年 6 月 21 日	疲労・抗疲労・癒しの脳内メカニズム「抗疲労・癒し」科学研究の基礎と活用連続講座	大阪産業創造館(大阪市)	40 人	疲労科学や癒しの脳科学に関するこれまでの研究成果について、一般市民・企業関係者を対象に実施した。
平成 23 年 8 月 30 日	大阪産業創造館ヘルスケア・フロンティア連続講座	大阪産業創造館(大阪市)	50 人	疲労科学・脳科学の研究成果を基にした新しいビジネス展開に関する講演を企業関係者を対象に実施した。
平成 23 年 9 月 6 日	第 9 回姫路食品技術研究会	姫路商工会議所(姫路市)	60 人	疲労と癒しの脳科学研究とそこから見えてきた新ビジネスの発想に関する講演を一般市民・企業関係者を対象に実施した。
平成 23 年 11 月 26 日	2011 年度理化学研究所科学講演会	丸ビルホール(東京)	80 人	疲労科学研究から、慢性疲労が起こる脳内メカニズムや予防法についての講演を一般市民を対象に実施した。
平成 24 年 6 月 6 日	「抗疲労・癒し」ビジネス開発研究	大阪駅前第3ビル(大阪市)	40 人	疲労科学・脳科学の研究成果を基にした新しいビジネス展開に関する講演を企業関係者を対象に実施した。
平成 24 年 11 月 9 日	大阪市・大阪市都市型産業振興センター共催特別セミナー「抗疲労ビジネスの可能性～ものづくり企業の新分野参	八尾市商工会議所大ホール(八尾市)	30 人	疲労科学研究から見えてきた新ビジネスの発想に関する講演を一般市民・企業関係者を対象に実施した。

	入の可能性～」			
平成 24 年 11 月 18 日	社会福祉法人ユーカリ優都会 第 2 回優都グッドフィーリングセミナー	介護老人保健施設ユーカリ優都苑 (佐倉市)	40 人	脳科学研究からみた認知症の原因や進展と QOL について介護関連職の方を対象に講演した。
平成 25 年 2 月 1 日	大阪市都市型産業振興センター共催アクティブシティーフォーラム研究会	新阪急ビル内サンブリッジグローバルベンチャーズ (大阪市)	20 人	主観的気分評価システム「KOKORO スケール」の利用とその応用に関して企業関係者へ講演した。
平成 25 年 2 月 8 日	大阪府・堺市・公益財団法人堺市産業振興センター・株式会社さかい新事業創造センター共催特別セミナー「抗疲労ビジネスの可能性～ものづくり企業の新分野参入の可能性～」	堺市 S-CUBE (堺市)	30 人	疲労科学研究から見えてきた新ビジネスの発想に関する講演を一般市民・企業関係者を対象に実施した。

§ 7 結び

私どもの鉄代謝の研究はこれまでの鉄代謝研究の概念を逸脱するような内容も多く、インパクトのあるジャーナルに出版するのが難しく、出版に予定よりも時間がかかったのが残念である。また、鉄キャリアとしてメタボローム解析を用いて未知の低分子化合物の同定を目指したが、現在のメタボローム解析、情報処理の限界もあり残念ながら現時点までには同定に至らなかったことが悔やまれる。鉄とミトコンドリア傷害、神経変性疾患に関しては論文化に関しては未だ道半ばであり、今年度中の出版を目指しているが、我が国の神経変性疾患の研究者には大きなインパクトを与え、いくつかの共同研究を開始するなど、神経変性疾患における鉄の役割の解明、優れた疾患モデルマウスの開発に道を拓きつつあると自賛している。

個人的には本CREST 研究中に2度、研究機関を異動したが領域統括のご理解もあり、円滑な研究室移転と研究の遂行が可能であったことに対して、この紙面を借りて感謝させて頂きたいと思えます。