

**(独) 科学技術振興機構
創造科学技術推進事業
追跡評価用資料**

**ERATO
関口細胞外環境プロジェクト
(2000-2005 年度)**

2011 年 6 月 29 日

目次

要旨	1
1. プロジェクトの概要	1
(1)細胞外マトリックス研究への期待	1
(2)プロジェクトの研究テーマと主な成果	1
2. プロジェクト終了から現在に至る状況	4
3. プロジェクト成果の波及と展望	4
(1)マウス基底膜ボディマップ・データベース	4
(2)iPS 細胞、再生医療研究への影響(組換え蛋白質の構築)	5
プロジェクトの展開状況(まとめ図)	6
第1章 ERATOプロジェクトの概要	8
1-1 プロジェクトの背景	8
(1)プロジェクトの実施以前	8
(2)プロジェクトの実施内容	8
(3)他の研究との連携	9
1-2 プロジェクトの主な成果と評価	9
(1)プロジェクトの主な成果	9
(2)プロジェクトの中間評価・事後評価の結果	11
第2章 プロジェクト終了から現在に至る状況	13
2-1. 各研究テーマの現在の状況	13
(1)研究テーマの継続状況	13
(2)プロジェクトの主要な成果の展開状況	14
(3)論文および関連特許	23
(4)研究グループごとの成果の展開状況	26
2-2. プロジェクトメンバーの活動状況	30
第3章 プロジェクト成果の波及と展望	31
3-1. 科学技術への波及と展望	31
(1)再生医療、iPS 細胞研究への影響	31
(2)「マウス基底膜ボディマップ・データベース」研究の波及・展開、活用状況	32
(3)組換え蛋白質の構築	33
(4)関連研究者との共同研究の展開状況	34
3-2. 社会・経済への波及と展望	34
(1)社会・経済への波及	34
(2)波及に向けた今後の方策	35

第 4 章 事業運営に関する意見等	36
4-1. ERATO に対する意見	36
4-2. 課題等	37

要旨

1. プロジェクトの概要

戦略的創造研究推進事業（ERATO）「関口細胞外環境プロジェクト」は、2000年10月から2005年9月までの5カ年にわたり実施された。

研究総括は、関口清俊（大阪大学蛋白質研究所教授）である。このプロジェクトでは、異なる機能を有する細胞が器官特異的な構造を形成する上で、細胞ごとに最適化された細胞外マトリックスを形成する分子の実体を解明し、それを生体外で再構築するための基盤づくりを目指した。

(1) 細胞外マトリックス研究への期待

細胞外マトリックスとは、細胞外の空間を充填する物質であると同時に、骨格的役割、細胞接着における足場の役割（基底膜やフィブロネクチン等）、細胞増殖因子などの保持・提供を行う役割を担う動的かつ機能的な基質のことである。ヒトなどの脊椎動物に顕著な細胞外マトリックスの成分は、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニンといった糖タンパク質である。

細胞外マトリックス蛋白質は、これまでに200近くが同定され、未同定を含め総数はおよそ300程度と推定されている¹。細胞は、細胞外マトリックス蛋白質から必要な分子を選別、組み合わせて、自らの機能維持や増殖・分化の制御に最適化された細胞外環境を構築する。これらは幹細胞ニッチの解明に大きなブレークスルーをもたらすと期待されており、その成果は再生医学、組織工学、iPS細胞等の研究を展開していく上でも重要とされる。

細胞外マトリックスの評価を巡っては、以前考えられていた細胞間の単なる“詰め物”から、多細胞生物（動物）を構成する細胞の生存と増殖・分化の制御に不可欠な細胞外環境因子として、プロジェクト当時よりも、近年の再生医学、組織工学、iPS細胞研究の展開に伴って、より注目されている。

(2) プロジェクトの研究テーマと主な成果

プロジェクトの研究テーマと主な成果は次のとおりである。

① 新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニング法の開発²

- 理化学研究所で収集している、マウスの様々な組織、発生過程から集められた237種以上の異なるマウス完全長cDNA³（103,000個）を使用し、in silico スクリー

¹ 外部識者ヒアリング結果

² 特開2004-170194「グリコサミノグリカン結合性物質のスクリーニング法」

³ 完全長cDNA（Full-length Complementary DNA, Full-length Complementary Deoxyribonucleic Acid）ゲノムから取り出したmRNAの塩基配列情報を完全に写し取った相補鎖DNAのこと。全長のタンパク質を合成するための設計情報を有しているため、完全な長さのタンパク質を合成することができる。

ニングを行い、新規細胞外マトリックス候補の cDNA（候補遺伝子）を選択した。これら候補遺伝子が細胞外マトリックス蛋白質であるかを確認するため、複数の *in vitro* 機能的スクリーニングを、さらに同定された細胞外マトリックス候補蛋白質については、生体内での *in vivo* 局在スクリーニングを実施した。その結果、16 個の新規細胞外マトリックス蛋白質を同定した（同定した蛋白質のうち、基底膜に局在する蛋白質は 8 個⁴）。また、新規を含む 43 個の基底膜蛋白質（全基底膜蛋白質の 80%）について、マウス胎仔全身の基底膜マトリオームを解明した⁵。【理化学研究所 FANTOM データベース⁶の活用：林崎良英（理化学研究所）との共同研究】

②基底膜ボディマップ・データベースの構築

- 43 の基底膜蛋白質⁷のほぼすべての生体内局在部位を、マウス胎仔および成体組織を用いて、網羅的に解析し、細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子の実体を解明した。
- 得られた免疫組織染色標本を高解像度の画像として閲覧できる“基底膜ボディマップ・データベース”を構築し、ウェブ上で公開した。
(<http://www.matrixome.com/bm/Home/home/home.asp>)。
- データベースには、胎生 16.5 日 (E16.5) のマウス胎仔の全身標本のデジタル画像 210 枚が収録されているが、研究室には胎仔からの成長過程のデータもある。これらのデータは、研究室として可能な限り、公開できるよう考えているが、データベースで胎仔からの成長過程を公開するには、ウェブサイトのインターフェースを大幅に変更する必要がある。ERATO 終了以降、データベースの管理に専任スタッフを置くことができていない状況であるため、これらのデータを反映することは当面できない見通しである。

⁴ 基底膜に局在する新規細胞外マトリックス蛋白質 (ECM306, ECM592, ECM270, ECM392, MAEG, ECM290, ECM742, ECM866)

⁵ 研究プロジェクトでは、43 個の基底膜蛋白質についての解析を行った。研究プロジェクト終了以降に公開された「マウス基底膜ボディマップ・データベース」は、41 個の基底膜蛋白質の解析結果を用いている。

⁶ <http://fantom.gsc.riken.jp/4/>

⁷ 「マウス基底膜ボディマップ・データベース」で公開されている基底膜蛋白質は、41 個である。主な内訳は、既に知られている蛋白質でラミニン (11 種)、IV型コラーゲン (6 種)、ニドゲン (ラミニン結合蛋白質)、ペルレカン (プロテオグリカンの一種) 等が合計 36 種あり、これに加え、新たに基底膜蛋白質と識別された 5 つがある。



図1 マウス基底膜ボディマップ(例:ラミニン $\alpha 5$)⁸

③器官形成時に発現が誘導される新規基底膜蛋白質の発見

- 毛包形成時に発現する蛋白質を、改良 cDNA サブトラクション法を用いて検索し、インテグリン結合活性を有する2つの新規基底膜蛋白質 (QBRICK、MAEG) を発見した。

④人工基底膜の大量産生法の開発

- 基底膜成分を大量産生する複数の腫瘍細胞の遺伝子の発現プロファイルを解析し、これらが壁側内胚葉の性質を示すことを明らかにした。
- 壁側内胚葉細胞において、基底膜大量産生を誘導する遺伝子発現制御機構を解明した。
- 相同組換え技術を利用して、壁側内胚葉細胞に任意の基底膜蛋白質を大量発現させる技術を開発した。

研究プロジェクトは、多数の細胞の協調的な連携により器官の機能が発揮・維持される細胞外環境の整備（解明）を目標としているため、具体的な目標達成が見えにくく、プロジェクトの重要性が一般に伝わりにくい。それにも関わらず、研究プロジェクトの成果は、事後評価にて、“今後の研究の源流となる”、ERATO プロジェクトに期待されている目標

⁸ 「マウス基底膜ボディマップ・データベース」(<http://www.matrixome.com/bm/Home/home/home.asp>) から作成

設定であると評価された。

また、プロジェクトの主要な成果である“マウス基底膜ボディマップ・データベース”は、プロジェクトの計画段階では中心的な研究と位置づけられてはいなかったが、中間評価時にマトリオームの「データベースの構築」の必要性が指摘され（Kenneth M. Yamada、米国・NIH: 中間評価委員）、構築したものである。同データベースは、事後評価にて「PubMed」に匹敵するクオリティを有するデータベースと評価された⁹。

2. プロジェクト終了から現在に至る状況

ERATO プロジェクトを実施することで、細胞にとって必要な環境についての理解が進み、細胞外環境研究の基盤的な部分を構築することができた。一方で、ERATO プロジェクト終了以降の研究展開について、(独) 科学技術振興機構の他の事業 (SORST 等) に引き継がれるに至らなかった。

しかし、関口は(独) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (以下、NEDO) が 2005 年度から 2009 年度までに実施した「研究用モデル細胞の創製技術開発」(中辻憲夫、京都大学物質-細胞統合システム拠点・再生医科学研究所 拠点長・教授) の追加研究に応募し、提案が採択され、主に細胞外マトリックスの再構築を中心に「人工基底膜による分化誘導制御技術の開発」ならびに「人口基底膜、擬似マトリックスの評価」といった研究開発に携わった¹⁰。

3. プロジェクト成果の波及と展望

ERATO プロジェクトで得られた研究成果の一部は、NEDO の研究開発プロジェクトで継続的な研究の蓄積を図ることができた。ERATO プロジェクト終了以降の主要な研究成果の科学技術への波及と展望の状況は以下のとおりである。

(1) マウス基底膜ボディマップ・データベース

ERATO プロジェクトの主要な成果として構築した「マウス基底膜ボディマップ・データ

⁹ <http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/20060228/sekiguchi.pdf>

¹⁰ NEDO・健康安心プロジェクト「モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発/研究用モデル細胞の創製技術開発プロジェクト」は、政府の健康安心イノベーションプログラム基本計画のうち、創薬に資する基盤技術の開発、関連産業の競争力強化・ベンチャー企業の創出を図ることを上位の目的に、医薬品開発における安全性や薬理評価の確実性の向上等、創薬に向けた研究開発を加速するための、ヒト生体内における様々な反応や遺伝子機能をより高精度で解析するツール開発と、ヒトモデル細胞株を創製するための基盤となる技術開発を事業の目的としている。事業では追加テーマとして、分化誘導制御技術の高度化に資するものとして、関口の ERATO プロジェクトの成果を活用した細胞外環境制御技術が採択された。関口以外にも財団法人日本皮革研究所、独立行政法人国立環境研究所の提案も採択され、日本皮革研究所とは「人工基底膜による分化誘導制御技術の開発」、「人工基底膜、擬似マトリックスの評価」を共同で実施した。(研究予算合計：大阪大学蛋白質研究所〈296 百万円〉、日本皮革研究所〈20 百万〉)

(<http://www.nedo.go.jp/iinkai/kenkyuu/bunkakai/22h/jigo/10/1/index.html>)

ベース」は、2007年に公開され、2008年にはグループリーダーであった真鍋（理化学研究所）がPNAS（Proceedings of the National Academy of Science）において、データベースに関する論文を発表した¹¹。

また、NEDO プロジェクトは、基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築、また人工基底膜によるES細胞の選択的分化誘導制御技術の開発を目的としたものであるが、プロジェクトの一部として「細胞毎に最適化された基底膜分子構成の解明とデータベース化」も行った。基底膜分子構成の解明とデータベース化の研究では、ERATO プロジェクトの成果として構築した「マウス基底膜ボディマップ・データベース」（胎生16.5日の胎仔の全基底膜）に、新たに12.5日胚、14.5日胚のデータを加え、主要20種の基底膜蛋白質の全身高解像免疫組織染色像と、新たに発見した基底膜蛋白質15種類と基底膜周辺に局在する細胞外マトリックス蛋白質の6種類の画像を追加更新した。ただし、関口研究室では、人的リソースの関係から、データベースのウェブサイト自体の更新までは着手できていない。

同データベースは、他分野の研究者が細胞外マトリックスの研究に従事する上で助けとなるものと期待されているが、具体的な活用方法（研究論文としての引用先等も含む）についての課題は依然として残されている^{12,13}。

(2) iPS細胞、再生医療研究への影響(組換え蛋白質の構築)

ERATO プロジェクトでは、発生学のアプローチから、細胞にとって必要な環境の理解を進めることで、細胞外マトリックス研究の基盤的な部分を構築することができた。

特に、関口研究室では、多くの臓器実質細胞の直近の足場となっている基底膜に着目し、細胞ごとに分子構成をカスタマイズした完全合成型人工基底膜の構築を進めた。研究では、これまでに知られている12種のラミニン・アイソフォーム、2種のニドゲン、2種のヘパラン硫酸プロテオグリカンの組換え蛋白質の発現・精製法を確立するとともに、IV型コラーゲンの生物活性とI型コラーゲンの物理的強度を併せ持つ改良型IV型コラーゲンを開発し（ニッピバイオマトリックス研究所・服部俊治との共同研究、特許出願「I型-IV型コラーゲン混成ゲル」〈特願2009-235348〉）¹⁴、分子組成をカスタマイズしたラミニン—IV

¹¹ R, Manabe; K, Tsutsui; T, Yamada; M, Kimura; I, Nakano; C, Shimono; N, Sanzen; Y, Furutani; T, Fukuda; Y, Oguri; K, Shimamoto; D, Kiyozumi; Y, Sato; Y, Sado; H, Senoo; S, Yamashina; S, Fukuda; J, Kawai; N, Sugiura; K, Kimata; Y, Hayashizaki; K, Sekiguchi, “Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins”, *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol.105(35)-12849, 2008.

¹² NEDO (2010), 『健康安心プログラム「研究用モデル細胞の創製技術開発（事業原簿）」』, p.221。基底膜分子の生体内局在情報データベースの実用化の見通しについて、生体組織での局在情報を今後追加することで情報源としての付加価値が高まり、ライセンス化した場合のニーズも高まる。また、解析対象を正常の個体だけでなく、様々な病態モデルマウスやノックアウトマウスに広げることで、基底膜分子構成を指標とした新たな病因解析の基盤情報としての役割を持たせることを可能にした。それ以外にも、ヒト基底膜分子に対する抗体整備によりヒト組織を対象とした基底膜分子局在情報データベースの展開や、ヒトの様々な疾患における基底膜分子構成のデータベース（新たな腫瘍マーカー、医薬品開発で利用可能）等も考えられる。

¹³ 外部識者ヒアリング結果

¹⁴ H, Fujisaki; S, Hattori, “Keratinocyte Apoptosis on Type I Collagen Gel Caused by Lack of Laminin

型コラーゲン—ニドゲン—ヘパラン硫酸プロテオグリカンからなる完全合成型多成分人工基底膜の構築に成功した¹⁵。

また、組換え基底膜蛋白質を利用したヒトES細胞用のフィーダ・フリー培養基質の開発を進め、組換えラミニン-511 およびラミニン-332 を固相化した基質上でヒトES細胞が未分化性を維持したまま増殖することを明らかにした（京都大学再生医科学研究所・宮崎隆道・中辻憲夫との共同研究）¹⁶。フィーダ・フリー培養基質（基材）については、主要な企業とのライセンスに関する交渉を進めているところであり、ERATO プロジェクトの成果は社会的、経済的な面においても結実しつつある。

プロジェクトの展開状況（まとめ図）

図 2)

5/10/11 Deposition and Akt Signaling”, *Experimental Cell Research*, Vol.280(2), pp.255-269, 2002.

¹⁵ S, Vuoristo; I, Virtanen; M, Takkunen; J, Palgi; Y, Kikkawa; P, Rousselle; K, Sekiguchi; T, Tuuri; T, Otonkoski, “Laminin isoforms in human embryonic stem cells: synthesis, receptor usage and growth support”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol.13(8b), pp.2622-2633, 2009

¹⁶ T, Miyazaki; S, Futaki; K, Hasegawa; M, Kawasaki; N, Sanzen; M, Hayashi; E, Kawase; K, Sekiguchi; N, Nakatsuji; H, Suemori, “Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.375(1), pp.27-32, 2008.

第1章 ERATOプロジェクトの概要

1-1 プロジェクトの背景

(1)プロジェクトの実施以前

関口教授は、ERATOの研究プロジェクト以前から、科学研究費補助金（科研費）¹⁷等の研究資金にて、細胞外マトリックスを標的としたターゲティング技術の開発や、ターゲティング技術を利用した細胞外マトリックスの設計、基底膜による細胞機能制御の分子的基盤の解明等の研究に従事してきた。

当時、細胞外マトリックス研究にて、細胞外環境の全容（全貌）解明を研究の対象としている研究者はおらず、プロジェクト開始時点（約10年前）では、細胞にとって本来必要な環境について未知の状態であった。細胞外マトリックスの全容解明に関する研究が進まなかった背景には、研究成果の創出の困難性がある。細胞外マトリックスの全容解明を研究の主眼とした場合、個々の細胞外マトリックスの分析は、研究計画上、十分に掘り下げることはできず、その結果、当該研究の成果（論文）のインパクトは弱いものにならざるを得ない可能性を有している。また、細胞外マトリックスの研究には、多数の研究者の参加が不可欠で、プロジェクト自体、規模の大きいものが求められる。

また、社会的にも、細胞外マトリックス研究の重要性については、あまり認識されていなかった。現在の再生医療やiPS細胞の研究の進展を考慮すれば、研究プロジェクトの着手が「少々早すぎた」との評価もある。

(2)プロジェクトの実施内容

研究プロジェクトでは、研究対象を個々の臓器ではなく個体全体を視野にいれ、組織・器官の構築と組織（幹）細胞の機能維持における細胞外マトリックスの役割（マトリオーム）¹⁸に着目し、器官の特定領域についての特異性を具体的な成分の局在により明らかにした。

また、研究プロジェクトでは、解明した細胞外マトリックスの分子の実体を生体外で再構築するための基盤技術の確立を目指した。特に、プロジェクトの主要な成果となる「新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニング」と「マトリオームデータベース」は、研究プロジェクト発足以前には主要な研究テーマとして位置づけられてはいなかったものの、中間評価を受けて注力し、ヒト生物学、医学関連の研究推進の基盤となるデータ

¹⁷ 関口（1998）「細胞外マトリックスを標的とした新しいバイオターゲティング技術の開発とその応用」〈科研費・特定領域A〉、関口（1999）「基底膜による細胞機能制御の分子的基盤の解明」〈特定領域A〉、関口（1999-2001）「細胞外マトリックスへのターゲティング技術を利用した細胞外環境設計とその応用」〈基盤B〉

¹⁸ 細胞外マトリックスの分子構成の総体を示すキーワード。細胞外マトリックスという位置情報を持った因子複合体全体のことを指す。プロジェクト当時は、マトリオームと表現していたが、現在は“マトリクソーム”と表現する。JST「関口細胞外環境プロジェクト終了報告書」、2006年3月。

ベースを構築した。

(3)他の研究との連携

研究プロジェクトでは、新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニング法を開発し、新規の細胞外マトリックス因子の同定と組織・細胞毎のマトリオームを明らかにした。開発した新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニング法は、*in silico* スクリーニング、複数の *in vitro* 機能的スクリーニング、そして生体内の *in vivo* 局在性スクリーニングからなる。

最初の *in silico* スクリーニングでは、遺伝子の網羅性が極めて重要であることから、研究プロジェクト初期段階より、理化学研究所の林崎良英と共同研究を行い、理化学研究所が収集しているマウス完全長 cDNA コレクション (FANTOM データベース)¹⁹を使用し、スクリーニングを行った。また、研究を進める際に、同氏より膨大な蛋白情報とともにクローンの提供も受けた。



図3 理化学研究所“FANTOM データベース”¹⁸

1-2 プロジェクトの主な成果と評価

(1)プロジェクトの主な成果

関口細胞外環境プロジェクトは、細胞ごとに最適化された細胞外マトリックスの分子の実態を解明し、それを生体外で再構築するための基盤づくりを目指した。研究実施期間は、2000年10月から2005年9月までの約5年間である。

研究プロジェクトは、「マトリックス機能情報グループ」、「マトリックス応答遺伝子グループ」、「マトリックス工学グループ」の3つの研究グループを編成し、活動を展開した(研

¹⁹ FANTOM データベースは、マウスの様々な組織、発生過程に由来する 237 種以上の完全長 cDNA ライブラリーについて、全長の塩基配列と、その機能注釈を付けて一般に公開しているデータベースである。
(<http://fantom.gsc.riken.jp/4/>)

究実施場所はいずれも愛知医科大学)。プロジェクトの主な成果を下記に示す。

- i. 「新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニング法の開発」：FANTOM データベースを活用し、43 を超える新規細胞外マトリックス蛋白質を同定した。
【マトリックス工学グループ】
- ii. 「基底膜ボディマップ・データベースの構築」：新規に同定された蛋白質も含め、43 の基底膜蛋白質のほぼすべての生体内局在部位をマウス胎仔および生体組織を用いて網羅的に解析し、細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子の実体を解明した。また“基底膜ボディマップ・データベース”を構築し、ウェブ上で公開した。【マトリックス工学グループ】
- iii. 「器官形成時の発現が誘導される新規基底膜蛋白質の発見」：毛包形成時に発現する蛋白質を改良 cDNA サブトラクション法を用いて検索し、インテグリン結合活性を有する 2 つの新規基底膜蛋白質 (QBRICK, MAEG) を発見した。【マトリックス機能情報グループ】
- iv. 「人工基底膜の大量生産法の開発」：相同組換え技術を利用して、壁側内胚葉細胞に任意の基底膜蛋白質を大量に発現させる技術を開発した。【マトリックス応答遺伝子グループ】

表 1 関口細胞外環境プロジェクト概要

▼研究総括	関口清俊 (大阪大学 蛋白質研究所 教授)
▼研究実施場所	愛知医科大学 (〒愛知県愛知郡長久手町大字岩作 愛知医科大学)
▼研究期間	2000年10月～2005年9月
▼参加研究者とグループの構成	<ul style="list-style-type: none"> ■マトリックス機能情報 G …研究員(3名)、技術員(2名:内1名は機能情報 G、応答遺伝子 G に移動) ■マトリックス応答遺伝子 G …研究員(4名)、技術員(4名) ■マトリックス工学 G …研究員(5名:内2名は途中(2003年まで))、技術員(5名、内1名は非常勤)
▼研究体制	<p>※人数は延べ数</p>

(2) プロジェクトの中間評価・事後評価の結果

① 中間評価の結果

中間評価では、研究プロジェクトは新規で且つ重要な科学的基盤を創造することに成功しつつあると高く評価された。また、研究終了までの約2年間に以下の2点に重点的に取り組むことを強く求められた。

- i. プロジェクトで得られた新規の細胞外マトリックス分子の免疫組織化学的検索によって得られた知見や特性に関する情報やデータベースを、関連分野の研究者がアクセスできるように、公開すること
- ii. 研究全体を、このプロジェクトの主要概念であるマトリオーームやカスタマイズ ECM に調和または一致させるような方向性を明確にすること

②事後評価の結果

研究プロジェクトは、細胞外マトリックスの中で上皮細胞の増殖・機能に直接的に関係することが想定されている基底膜に焦点を絞り、新規成分も念頭に入れて根本的なことから解明しようとしたものであり、ERATO が求める今後の研究の源流となる目標設定であると評価した。研究プロジェクトの成果については、中間評価に受けて戦略的転換（論文数にこだわらず）を図り、構築したデータベースは評価された。以下、研究プロジェクトの主要成果についての評価である。

(A)新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的スクリーニングとマトリオーームデータベース

- i. 中間評価時の指摘に対して、予想以上の「データベース」を構築した。
- ii. マトリックスの分布から解剖学を微細に見ていく方法は、今後の科学技術の流れを生み出す可能性がある。
- iii. 本研究プロジェクトが終了した後にはいかにデータベースを維持し、恒久的な組織を構築するか重要な課題である。

(B)器官形成時に発現する新規細胞外マトリックス蛋白質の探索とその機能解析

- i. 方法論開発では、EHS 腫瘍からは得られないラミニン・アイソフォーム（基底膜）を産生することが原理的に可能であることを見出した（大量生産系の確立）。
- ii. 再生医学に新しい試みの可能性を与える。

第 2 章 プロジェクト終了から現在に至る状況

研究プロジェクトは、中間評価を受けて、データベースの構築に研究リソースを振り分け、その結果、2008 年 8 月に「マウス基底膜ボディマップ・データベース」を公開するに至った。一方で、研究成果としての論文数は少なく、またプロジェクト終了以降に発表しているケースが多い。

2-1. 各研究テーマの現在の状況

(1) 研究テーマの継続状況

関口は、ERATO プロジェクトを通じて細胞外環境の基盤的な部分を構築できたものの、(独) 科学技術振興機構の SORST 等の後継事業に採択されるに至らなかった。

しかし、2006 年度から、関口は NEDO が実施していた「研究用モデル細胞の創製技術開発」(中辻憲夫、京都大学物質-細胞統合システム拠点・再生医科学研究所 拠点長・教授) にて、研究追加テーマ²⁰に応募し採択され、主に細胞外マトリックスの再構築分野で、ERATO プロジェクトの成果を引き継ぐことができた。

「研究用モデル細胞の創製技術開発」の追加公募では、「ヒト ES 細胞の分化誘導制御技術開発」において、生体内における細胞外環境を人工的に再構築し、細胞の生存する空間を制御することで目的とする特定の細胞への分化誘導を制御する技術等の開発に資する研究を求めている。関口には、細胞外環境制御技術の開発に関して、ERATO プロジェクトで蓄積した成果の活用も期待された(下記、図 4 参照のこと)。

²⁰ 関口は財団法人日本皮革研究所と共同で、「分子構成を最適化した人工基底膜による ES 細胞の分化誘導制御技術の開発」を提案した。研究開発の概要は、細胞ごとに最適化された細胞外マトリックス(特に基底膜)の分子構成を解明し、それを生体外で人工的に再構築する基盤技術を確立するとともに、それを利用した ES 細胞の分化誘導制御技術及び分化形質安定化技術の開発を行うことである。

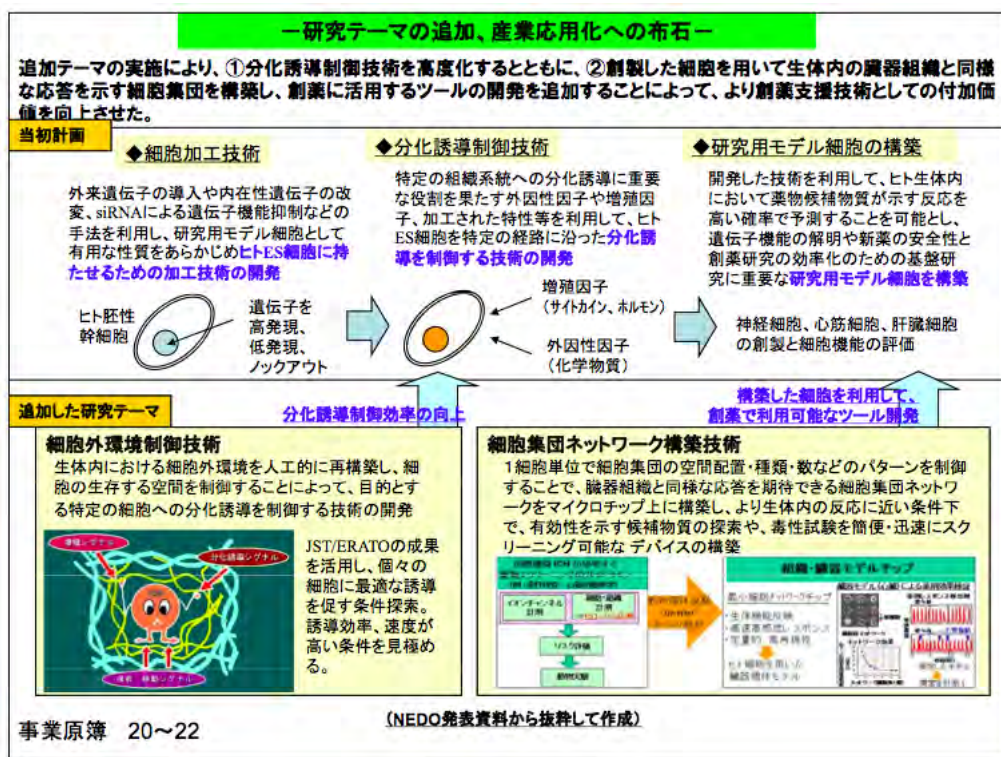


図4 NEDOプロジェクトにおける細胞外マトリックス研究の位置づけ²¹

これらから NEDO 「研究用モデル細胞の創製技術開発」 では、関口は下記の研究に従事した。

- i. 「基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の構築」(組換えラミニンの高発現系・安定供給系の構築、第二世代人工基底膜の構築に必要な細胞特異的基底膜分子の高発現系・安定供給系の構築)
- ii. 「人工基底膜による分化誘導制御技術の開発」(ヒト ES 細胞を用いた選択的分化誘導活性の評価。京都大学と幹細胞創薬研究所と共同研究)
- iii. 「人工基底膜、擬似マトリックスの評価」(人工基底膜を供与し、ヒト ES 細胞での評価)

(2)プロジェクトの主要な成果の展開状況

①成果の展開

図2(成果展開まとめ図)は、研究プロジェクトの各グループの成果の展開状況を示したものである。研究プロジェクトでは、中間評価以降、マトリックス工学グループ(眞鍋理一郎)にはデータベースの構築へ注力が求められ、マトリックス応答遺伝子グループ(林

²¹ NEDO「研究用モデル細胞PJ」第1回事後評価分科会説明資料、資料5-2-1「プロジェクト概要説明資料」

良敬)には応答遺伝子の探索から収束への方向性が示された。

以降、研究プロジェクトの主要な成果である「マウス基底膜ボディマップ・データベース」と「人工基底膜(組換え蛋白質)の構築」の成果の展開状況を示す。

②主要な成果の展開状況

(A)「マウス基底膜ボディマップ・データベース」

【データベースの更新状況】

研究プロジェクトでは、胎生 16.5 日マウス胎仔の全身における局在を免疫組織化学的に解析し、染色結果の画像(デジタル画像)を収録したデータベース(「マウス基底膜ボディマップ・データベース:”Mouse Basement Membrane Bodymap”」)を構築した。データベースは、2008 年 8 月に一般公開した²²。

研究プロジェクト終了以降、関口は NEDO プロジェクトの中で、ES 細胞の選択的分化誘導制御に有用な基底膜の分子構成を解明することを目的に、「細胞毎に最適化された基底膜分子構成の解明とデータベース化」を実施した。この研究では、胎生 5.5~7.5 日、8.5~10.5 日、および 12.5~16.5 日のマウス胎仔における全基底膜蛋白質の局在を、免疫組織化学的手法で網羅的に解析し、ES 細胞の選択的分化誘導に必要な発生初期から中期までの基底膜分子構成の時間空間的制御の全貌を解明した。また、これらの成果を受けて、12.5 日胚、14.5 日胚を新たにデータベースに反映させたほか、主要 20 種の基底膜蛋白質(ラミニンおよび IV 型コラーゲンの全サブユニット鎖、ニドゲン-1 及び-2、及び パールカン等)の全身高解像免疫組織染色像と、新たに発見した基底膜蛋白質 15 種類²³と基底膜周辺に局在する細胞外マトリックス蛋白質の 6 種類²⁴の画像を追加更新した。

「マウス基底膜ボディマップ・データベース」で見ることができる画像は、臓器形成時(12.5 日、14.5 日、16.5 日)の 41 種類の細胞外マトリックス蛋白質の経時的な発現画像である。一方で、関口研究室では、NEDO プロジェクトで得られた胎生 5.5~7.5 日、8.5~10.5 日までの情報もデータベースで公開したいと考えているが、新たにウェブサイトのデザインの変更が必要となることから、人的リソースおよび資金的な面の制約から、これらのデータを反映できずにいる。

²² <http://www.matrixome.com/bm/>

²³ 新規基底膜蛋白質(15 種類: XVIII 型コラーゲン、アグリン、ネトリン 1、ネトリン 2、ネフロネクチン、パピリン、Fras1、QBRIC/Frem1、エンドグリックス 1、SMOC-1、アメロジェニンと機能未知の MAEG、WARP、URB、SMOC-2)

²⁴ 追加した基底膜関連蛋白質(6 種類: レプレカン、ポドカン、IV 型コラーゲン、フィビュリン 1、フィビュリン 2、big-H3)

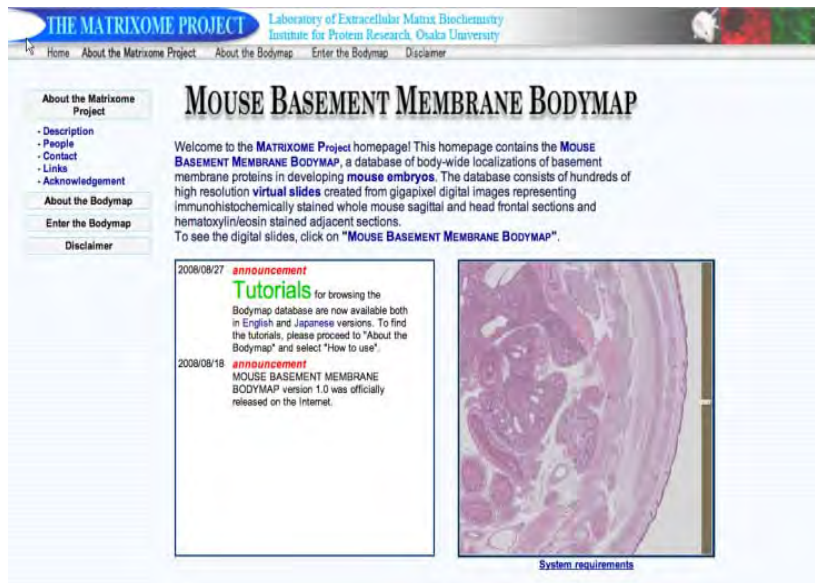


図5 “マウス基底膜ボディマップ・データベース”²²

【データベースで閲覧可能な蛋白質等】

基底膜の基本骨格となるラミニン（表 2）は、3本のサブユニット（ α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖）からなるヘテロ 3 量体蛋白質である。 α 鎖は 5 種類、 β 鎖と γ 鎖はそれぞれ 3 種類のタイプがある。これらの組み合わせによる 15 種類のアイソフォームが存在する。中でも、 $\alpha 4$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖をもつ、ラミニン・アイソフォームは、血管基底膜の主要な構成分子として、生体組織に最も多く含まれ、細胞外マトリックス研究にて注目されている。

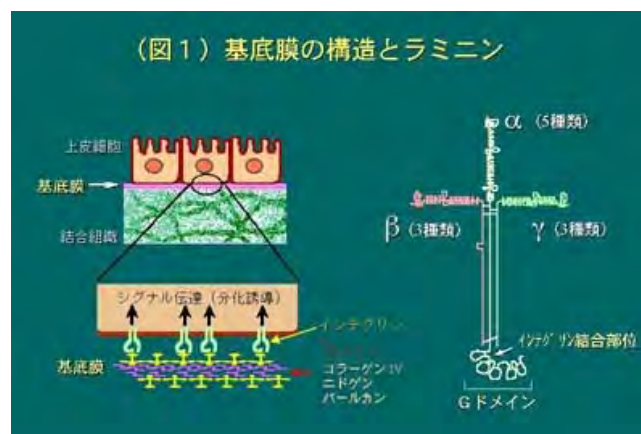


図6 基底膜の構造とラミニン²⁵

現在、「マウス基底膜ボディマップ・データベース」で閲覧可能な蛋白質は 41 種類である。ラミニン（11 種類）、コラーゲン（7 種類：新規基底膜である XVIII 型コラーゲンを含む）、

²⁵ <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/chemistry/research/researchmore.htm>

プロテオグリカン (2 種類)、その他ボディマップ蛋白質 (11 種類)、新規ボディマップ蛋白質 (4 種類)、その他の細胞外マトリックス蛋白質 (6 種類) の合計 41 種類である。

これらの蛋白質リストには、「ゲノム座」(マウス、ヒト別)、「遺伝子バンク番号」、「MGI ID」、「画像データベース」(胎生 16.5 日)、「抗体情報」、「抗体検証」等の情報(リンク)が付帯されている。

THE MATRIXOME PROJECT Laboratory of Extracellular Matrix Biochemistry
 Institute for Protein Research, Osaka University

Home About the Matrixome Project About the Bodymap Enter the Bodymap Disclaimer

Protein List

Protein name	Genomic loci		GenBank accession#	MGI ID#	image database	Antibody info	Validation
	Mouse	Human					
LAMININS							
laminin α1	17	18q11.31	J08094	88287	E16.5	507-H1	medium
laminin α2	10A4-B1	6q27-25	U12147	98912	E16.5	4H5-2	medium
laminin α3	18A	18q11.2	XB4016	32503	E16.5	M35-13-B9	medium
laminin α4	10	6q27	NM_012931	108321	E16.5	M48-N7-F3	medium
laminin α5	2	20q13.2-13.3	U87501	105382	E16.5	M98-C8	medium
laminin β1	12	7q22	M15625	98743	E16.5	1F5-D12	high
laminin β2	9	3q27	NM_001403	88616	E16.5	B34-A6-L06	medium
laminin β3	11H2-6	1q32	U43266	38015	E16.5	B31-N6-C6	medium
laminin γ1	1	1q31	J02930	99214	E16.5	A5	high
laminin γ2	1H1	1q25-31	U43322	38013	E16.5	C21-N1-C9	medium
laminin γ3	2	9q31-34	NM_011635	134439a	E16.5	C38-N4-F4	medium
COLLAGENS							
collagen α1(V)	8	13q34	NM_009831	88454	E16.5	H11	high
collagen α2(V)	8	13q34	NM_009832	88455	E16.5	H22	high
collagen α3(V)	1	2q35-37	NM_007734	104888	E16.5	H31	medium
collagen α4(V)	1	2q35-37	NM_007735	104887	E16.5	Re49	high
collagen α5(V)	X	Xq22	NM_007736	88456	E16.5	H53	high
collagen α6(V)	X	Xq22	AB041361	216266a	E16.5	B56	high
collagen α1(XV)	10B5-C1	21q22.3	NM_008629	88451	E16.5	CM16a	high
PROTEOGLYCAN							
perlecan	4	1p36.1-34	M77174	36257	E16.5	A70.6	medium
agrin	4	1p36.33	NM_021904	87961	E16.5	gdl	high
OTHER BM PROTEINS							
nidogen-1	10	1q43	NM_010817	87342	E16.5	El M1	high
nidogen-2	14	1q43	NM_001835	129523a	E16.5	nd2c	high
nehn-1	11E3	17q13-12	NM_008744	105389	E16.5	Ac-2	medium
nehn-4	10C3	12q22-23	NM_001320	188878	E16.5	nt4	medium
nechroectm	3	4q24	NM_033525	214811	E16.5	nt6	high
papilin	12	14q24.2	NM_130887	238613a	E16.5	pdf1	medium
Frst1	5	4q21.21	NM_125413	238235a	E16.5	pre-ecotomatin	high
GRXC-Frem1	4	NX	NM_177653	267067.2	E16.5	pre-NV-cytosin	high
endocyt-1	14	10q23.2	NM_153122	239581b	E16.5	st-1	medium
SMOC-1	12	14q24.2	NM_022156	192587a	E16.5	sp17	high
arrkogenin	X	Xq22.31-22.1	NM_009695	89005	E16.5	PC-072	medium
NOVEL BM PROTEINS							
ECM011NAEG	X F5	Xq22	AK020534	185268a	E16.5	nta1	high
ECM306NARIP	4 E2	1p36.33	AK030079	212022a	E16.5	3c92	high
ECM866URB	16 A1	3q13.2	AK132178	191014b	E16.5	866C	high
ECM276SMOC-2	17 A2	6q27	AK030858	182981	E16.5	27c	high
OTHER BM PROTEINS							
leptocan	4 D1	1p34.1	NM_018782	1885821	E16.5	lc2	medium
podocaln	4	1p32.3	NM_172874	287493a	E16.5	pd1	medium
collagen (VI)					E16.5	LR-16R7	medium
fibun-1	15 E-F	22q13.31	NM_010182	65497	E16.5	fbst	high
fibun-2	8 D-E	3p25.1	NM_007991	65498	E16.5	fbf	high
Bg-H3	13 B-C1	5q31	NM_008369	88205	E16.5	bfz	medium

図7 「マウス基底膜ボディマップ・データベース」におけるタンパク質のリスト(41 種)²²

【ボディマップ・データベースにおける画像の特徴】

ボディマップ・データベースは、「蛋白質リスト」、「蛋白質ベース・ボディマップ」、「組織ベース・ボディマップ」の3つからなる。「蛋白質ベース・ボディマップ」では蛋白質別に、「組織ベース・ボディマップ」では部位別に染色画像選択することができる。また、画像は、隣接切片別に「slice1」と「slice2」（染色はそれぞれ異なる：左側＝免疫組織化学染色、右側＝核と細胞をヘマトキシリン、エオジンで染色）、そして「上部画像」からなり、高倍率（20倍）で画像を見ることができる。



図8 マウス基底膜ボディマップ・データベースの操作画面²²

ボディマップ・データベースで見ることができる、部位の例として、下記の図に、脳（前頭葉）における基底膜コラーゲンIV型の各種プロテインの分布状況を示したものである。これを見ると、脳（前頭葉）には、コラーゲン $\alpha 1$ (IV)、コラーゲン $\alpha 2$ (IV) が多く含まれていることがわかる。

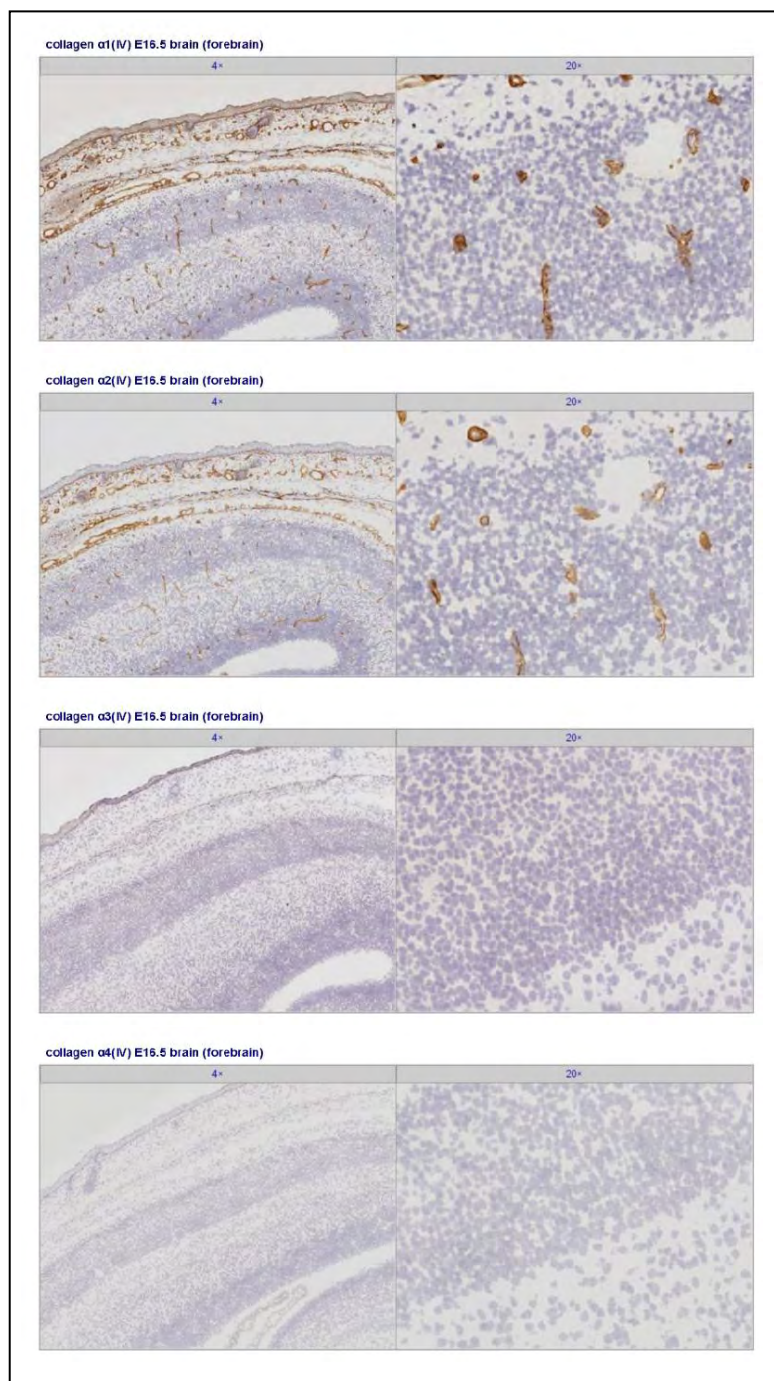


図9 脳(前頭葉)における基底膜コラーゲンIV型の各種プロテインの分布状況²²

(B)組換え蛋白質の構築(人工基底膜の構築、フィーダ・フリー培養基材の開発)

【研究の進展状況】

ERATO プロジェクトでは、発生学のアプローチから細胞にとって必要な環境の理解することで、細胞外マトリックス研究の基盤的な部分を構築することができた。

関口研究室では、多くの臓器実質細胞の直近の足場となっている基底膜に着目し、NEDO 研究プロジェクトを通じて、細胞ごとに分子構成をカスタマイズした完全合成型人工基底膜の構築を進めてきた。関口が分担となっている「分子構成を最適化した人工基底膜による ES 細胞の分化誘導技術の開発」では、「細胞ごとに最適化された基底膜分子構成の解明」と「ラミニン及び他の基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の確立」を行った。

「細胞ごとに最適化された基底膜分子構成の解明」では、第一世代人工基底膜（ラミニンと IV 型コラーゲンの組合せ）に、細胞特異的に発現する基底膜分子を組み込んだ第二世代人工基底膜を構築した。また、日本皮革研究所と共同し、「人工基底膜の再構築およびそれを用いた ES 細胞の選択的分化誘導制御」についての研究開発も行った。これらの研究により、これまでに知られている 12 種のラミニン・アイソフォーム、2 種のニドゲン、2 種のヘパラン硫酸プロテオグリカンの組換え蛋白質の発現・精製法を確立するとともに、IV 型コラーゲンの生物活性と I 型コラーゲンの物理的強度を併せ持つ改良型 IV 型コラーゲンゲルを開発し（ニッピバイオマトリックス研究所・服部俊治との共同研究）、特許出願「I 型-IV 型コラーゲン混成ゲル」〈特願 2009-235348〉²⁶、分子組成をカスタマイズしたラミニン—IV 型コラーゲン—ニドゲン—ヘパラン硫酸プロテオグリカンからなる完全合成型多成分人工基底膜の構築に成功した²⁷。

また、「ラミニンの高発現系・安定供給系の構築」では、ラミニンの細胞接着活性部位だけを含む組換え E8 フラグメント²⁸の発現系を構築し、このフラグメントが全長ラミニンとほぼ同等の細胞接着活性を有すること、収量は全長ラミニンと比べて 5~10 倍増加し、不純物の混入もほとんどないことを確認した。これらから、NEDO プロジェクトでは、組換え基底膜蛋白質を利用したヒト ES 細胞用のフィーダ・フリー培養基質の開発を進め、組換えラミニン-511 およびラミニン-332 を固相化した基質上でヒト ES 細胞が未分化性を維持したまま増殖することを明らかにした（京都大学再生医科学研究所・宮崎隆道・中辻憲夫との共同研究）²⁹。

²⁶ H, Fujisaki; S, Hattori, “Keratinocyte Apoptosis on Type I Collagen Gel Caused by Lack of Laminin 5/10/11 Deposition and Akt Signaling”, *Experimental Cell Research*, VI.280(2), pp.255-269, 2002.

²⁷ S, Vuoristo; I, Virtanen; M, Takkunen; J, Palgi; Y, Kikkawa; P, Rousselle; K, Sekiguchi; T, Tuuri; T, Otonkoski, “Laminin isoforms in human embryonic stem cells: synthesis, receptor usage and growth support”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol.13(8b), pp.2622-2633, 2009

²⁸ マウス EHS 腫瘍から得られるラミニン-111 をエラスターゼで限定分解することで、全長ラミニンと同程度の細胞接着活性を有するフラグメント（E8 フラグメント）を得ることができる。ヒトラミニン-511 の組換え E8 フラグメントの作製にあたり、マウスラミニン-111 の E8 フラグメントのアミノ酸配列と比較して、ヒトラミニン $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の E8 相当部位のアミノ酸配列を決定した。次に、ヒトラミニン $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の全長 cDNA 配列を含むプラスミドを鋳型として PCR を行い、各鎖の E8 部位に相当する cDNA 領域を増幅し、哺乳細胞用発現ベクター pSecTag2B に挿入した。

²⁹ T, Miyazaki; S, Futaki; K, Hasegawa; M, Kawasaki; N, Sanzen; M, Hayashi; E, Kawase; K,

当該技術は、マウス・フィーダ細胞を使わず、ヒト蛋白を用いて組換え蛋白（ラミニン）を生産できるようになるほか、培養基材に関する研究への展開も期待される。実際のところ、当該技術については、2009年度に国際特許に申請を行っており、併行して主要な企業とのライセンスングについての交渉も進めているところである。

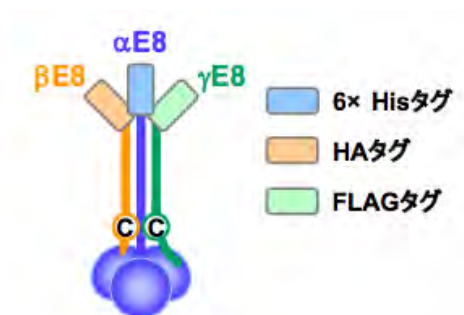


図10 組換え E8 フラグメントの構造³⁰

「ラミニン及び他の基底膜蛋白質の高発現系・安定供給系の確立」の研究の展開にあたっては、関口研究室が既にラミニン-411、ラミニン-511 の発現系（ERATO プロジェクト-マトリックス応答遺伝子グループ）を構築している実績を踏まえ、研究は既に同定されている 15 種類のラミニン・アイソフォームの発現系の確立と、各アイソフォームの安定供給系の確立を目的に行われた。

表 2 ラミニン・アイソフォームの種類³¹

ラミニン	旧名称	サブユニット構成	発現部位
ラミニン-111	ラミニン-1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	胎仔組織
ラミニン-211	ラミニン-2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	筋肉、神経
ラミニン-121	ラミニン-3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	胎仔組織
ラミニン-211	ラミニン-4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	筋肉、神経
ラミニン-332	ラミニン-5	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	皮膚、肺
ラミニン-331	ラミニン-6	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	皮膚、肺
ラミニン-321	ラミニン-7	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	皮膚、肺
ラミニン-411	ラミニン-8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	血管
ラミニン-421	ラミニン-9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	血管

Sekiguchi; N, Nakatsuji; H, Suemori, “Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.375(1), pp.27-32, 2008.

³⁰ NEDO「研究用モデル細胞PJ」第1回事後評価分科会説明資料、資料5-1(2)事業原簿、P.139

³¹ 平成19年度NEDO「モデル細胞を用いた遺伝子機能等解析技術開発/研究用モデル細胞の創製技術開発 中間報告書」(P.73)を元に作成。

ラミニン	旧名称	サブユニット構成	発現部位
ラミニン-511	ラミニン-10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	腎、肺、脾臓、血管
ラミニン-521	ラミニン-11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	腎、肺、脾臓、血管
ラミニン-213	ラミニン-12	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	筋肉、神経
ラミニン-423	ラミニン-13	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	-
ラミニン-523	ラミニン-14	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	-
ラミニン-333	ラミニン-15	$\alpha 3\beta 3\gamma 3$	-

【当該研究テーマと競合する研究者の状況】

2008年に、関口は中辻(京都大学)らと共同研究で、NEDOプロジェクトで蓄積した成果として、マウス・フィーダ細胞を用いないヒトES細胞の培養について発表した(下記)。この発表は、マウス・フィーダ細胞を用いないヒトES細胞の培養において、世界で最初の報告である。

T, Miyazaki; S, Futaki; K, Hasegawa; M, Kawasaki; N, Sanzen; M, Hayashi; E, Kawase; K, Sekiguchi; N, Nakatsuji; H, Suemori, “Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells”, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.375(1), pp.27-32, 2008.

…被引用数(11件)

その後、2010年には、ノーベル賞委員会委員である、Karl Tryggvason³²がマウス・フィーダ細胞を用いないヒトES細胞の培養に関する論文(下記)を、「Nature biotech」に発表した。関口らの研究成果が2年先んじているが、当該分野で競合する論文が発表されている³³。

S, Rodin; A, Domogatskaya; S, Ström; E.M, Hansson; K.R, Chien; J, Inzunza; O, Hovatta; K, Tryggvason, “Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511”, Nature biotechnology, Vol.28(6), 611-615, 2010.

…被引用数(9件)

³²) Karl Tryggvason, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet (<http://ki.se/ki/jsp/polopoly.jsp?d=17271&l=en>)

³³) 外部識者ヒアリング結果

(3) 論文および関連特許

① 学術論文

プロジェクト終了以降の ERATO 関連の成果として、21 報の論文が発表されている。そのうち、主要な論文としては、以下の 5 つがあげられる。

表 3 ERATO プロジェクト終了以降の主要関連論文

PY	Authors	Title	Journal	Vol	Total Citation
2010	Tsutsui, K; Manabe, R; Yamada, T; Nakano, I; Oguri, Y; Keene, DR; Sengle, G; Sakai, LY; Sekiguchi, K	ADAMTSL-6 Is a Novel Extracellular Matrix Protein That Binds to Fibrillin-1 and Promotes Fibrillin-1 Fibril Formation	J. Biol. Chem.	285	0
2008	Manabe, RI; Tsutsui, K; Yamada, T; Kimura, M; Nakano, I; Shimono, C; Sanzen, N; Furutani, Y; Fukuda, T; Oguri, Y; Shimamoto, K; Kiyozumi, D; Sato, Y; Sado, Y; Senoo, H; Yamashina, S; Fukuda, S; Kawai, J; Sugiura, N; Kimata, K; Hayashizaki, Y; Sekiguchi, K	Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	105	5
2008	Miyazaki, T; Futaki, S; Hasegawa, K; Kawasaki, M; Sanzen, N; Hayashi, M; Kawase, E; Sekiguchi, K; Nakatsuji, N; Suemori, H	Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells	Biochem. Biophys. Res. Commun.	375	10
2007	Ido, H; Nakamura, A; Kobayashi, R; Ito, S; Li, SL; Futaki, S; Sekiguchi, K	The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin gamma chains in integrin binding by laminins	J. Biol. Chem.	282	16
2006	Kiyozumi, D; Sugimoto, N; Sekiguchi, K	Breakdown of the reciprocal stabilization of QBRICK/Frem1, Fras1, and Frem2 at the basement membrane provokes Fraser syndrome-like defects	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	103	20

注) 網掛: 紫色…マトリックス工学 G、青色…マトリックス応答遺伝子 G、赤色…マトリックス機能解析 G

② 特許等

プロジェクト実施期間中又は終了後において、取得特許は全部で 2 件ある。ERATO プロジェクトに直接関わるもの（出願自体を終了報告書に記載しているもの）として、「タンパク質の生産に用いることが可能な F 9 胚性腫瘍細胞、およびその利用」（発明者：林良敬、関口清俊）、「毛包プラコードに特異的に発現する新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子」（発明者：浄住大慈、岡田明子、関口清俊、長田亜樹、今井俊夫、尾野雄一）

の2つがあげられる。

表4 関口細胞外環境プロジェクト関連特許

発明の名称	出願番号、発明者、出願人、公開番号、登録番号等	概要
「タンパク質の生産に用いることが可能な F9 胚性腫瘍細胞、およびその利用」	出願番号/出願日： 特願 2005-130194/4/27/2005 発明者： 林良敬、関口清俊 出願人： JST 公開番号/公開日： 特開 2006-304668/11/9/2006 登録番号/登録日： 9/18/2009	【課題】 各種細胞外マトリックス分子を組み込んだ細胞外基質や分泌タンパク質を、効率よく大量調製する用途に好適に用いることのできる F9 胚性腫瘍細胞と、その代表的な利用技術を提供する。 【解決手段】 少なくともタンパク質の生産に用いることが可能な F9 胚性腫瘍細胞であって、一方のラミニン α1 遺伝子座のうち、一方の遺伝子座には、ラミニン α1 遺伝子に代えて、ラミニン α1 遺伝子のプロモーターの制御を受けて発現するように外来性遺伝子を挿入するための外来遺伝子挿入配列が設けられている F9 胚性腫瘍細胞によれば、各種細胞外マトリックス分子を組み込んだ細胞外基質や分泌タンパク質を、効率よく大量調製する用途に好適に用いることができる。
「毛包プラコードに特異的に発現する新規細胞外マトリックスタンパク質、及びその遺伝子」	出願番号/出願日： 特願 2002-272055/9/18/2002 発明者： 淨住大慈、岡田明子、関口清俊、長田亜樹、今井俊夫、尾野雄一 出願人： JST、ユーザイ・アール・アンド・ディー・マネジメント株式会社 公開番号/公開日： 特開 2004-105086/4/8/2004 登録番号/登録日： 5/2/2008	【課題】 毛包プラコードに発現する新規細胞外マトリックスタンパク質及びその遺伝子、さらにはその抗体等を提供する。 【解決手段】 本発明にかかるタンパク質及びその遺伝子は、マウス由来の新規な細胞外マトリックス因子であり、マウス由来の特定なアミノ酸配列からなるタンパク質、及び/又は、該アミノ酸配列において、1 又はそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び/又は付加されたアミノ酸配列からなる細胞外マトリックスタンパク質と、これをコードする遺伝子である。 【選択図】 なし

取得特許「タンパク質の生産に用いることが可能な F9 胚性腫瘍細胞、およびその利用」は、組換えラミニンを従来の方法に比べて 10 倍以上生産できる方法である³⁴。しかし、マウスとヒトとのハイブリッドであり、フィーダ・フリーでないため、医療への応用を考えるとあまり実用的ではない。現在の ES 細胞、iPS 細胞は、細胞培養段階でマウス・フィーダ細胞を用いていることから、医療応用を考えると、同種の問題を抱えている。

NEDO プロジェクトでは、組換え基底膜蛋白質を利用したヒト ES 細胞用のフィーダ・フリー培養基質（基材）を開発した。当該技術については、2009 年度に国際特許に申請を行った。関口が関連する国際特許を示す（上述の 2009 年度に申請中のものは除く）。

³⁴ 当該技術は、α、β、γ の三つの鎖からできているラミニン（蛋白）について、F9 胚性腫瘍細胞が大量に生産する β、γ を利用し、一般活性のある α にヒト遺伝子を用いたものを組み合わせて生産する技術である。

表 5 国際特許

名称等	特許 DB
<p>(United States Patent Application 20070269835) REAGENT FOR DETERMINING LAMININ 5 ANTIGEN IN BIOLOGICAL SAMPLE AND ASSAY METHOD http://www.freepatentsonline.com/y2007/0269835.html Inventors: Katayama, Masahiko (Tukubashi, JP), Sanzen, Noriko (Aichi-gun, JP) Sekiguchi, Kiyotoshi (Osaka, JP) Application Number: 11/773393 Publication Date: 11/22/2007 Filing Date: 07/03/2007</p>	Free patent online
<p>(WO/2006/129393) COMPOSITION FOR TREATING PERIODONTAL DISEASE http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2006129393 Applicants: JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY KANAGAWA DENTAL COLLEGE SAITO, Masahiro; (US Only). TSUTSUI, Ko; (US Only). MANABE, Ri-ichiroh; (US Only). SEKIGUCHI, Kiyotoshi; (US Only). Inventors: SAITO Masahiro, TSUTSUI Ko, MANABE Ri-ichiroh, SEKIGUCHI Kiyotoshi . Priority Data: 2005-163337 02.06.2005 Publication Date: 07.12.2006</p>	WIPO
<p>(WO/2005/079859) TARGET DIRECTIONAL CARRIER http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2005079859 Applicants: OSAKA UNIVERSITY SEKIGUCHI, Kiyotoshi. SATO, Yuya Inventors: SEKIGUCHI Kiyotoshi. SATO Yuya Priority Data: 2004-049762 25.02.2004 Publication Date: 01.09.2005</p>	WIPO
<p>(WO/2003/016907) REAGENT FOR ASSAYING LAMININ 5 ANTIGEN IN BIOLOGICAL SAMPLE AND ASSAY METHOD http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2003016907 Applicants: EISAI CO. LTD. [JP/JP] KATAYAMA, Masahiko SANZEN, Noriko SEKIGUCHI, Kiyotoshi Inventors: KATAYAMA Masahiko, SANZEN Noriko, SEKIGUCHI Kiyotoshi Priority Data: 2001-247685 17.08.2001JP 2002-31181 07.02.2002JP 2002-106468 09.04.2002JP Publication Date: 27.02.2003</p>	WIPO

(4) 研究グループごとの成果の展開状況

①マトリックス機能情報グループ

ERATO プロジェクトでは、細胞外マトリックスが発揮する生理機能の解明に向けた「器官形成時に発現する新規細胞外マトリックス蛋白質の探索とその機能解析」、毛包を対象にした組織形成・維持のメカニズムの解明を目的にした「毛包発生および誘導に關与する間質因子の探索および毛包形成のメカニズムの解析」等の研究が行われた。

研究プロジェクト終了以降、マトリックス機能情報グループの ERATO プロジェクト關連の研究成果は、下記のとおりである。

表 6 プロジェクト終了以降のマトリックス機能情報グループの成果

PY	Authors	Title	Journal	Vol	Total Citation
2010	Carney, TJ; Feitosa, NM; Sonntag, C; Slanchev, K; Kluger, J; Kiyozumi, D; Gebauer, JM; Talbot, JC; Kimmel, CB; Sekiguchi, K; Wagener, R; Schwarz, H; Ingham, PW; Hammerschmidt, M	Genetic Analysis of Fin Development in Zebrafish Identifies Furin and Hemicentin 1 as Potential Novel Fraser Syndrome Disease Genes	PLoS Genet.	6	0
2007	Kiyozumi, D; Sugimoto, N; Nakano, I; Sekiguchi, K	Frem3, a member of the 12 CSPG repeats-containing extracellular matrix protein family, is a basement membrane protein with tissue distribution patterns distinct from those of Fras1, Frem2, and QBRICK/Frem1	Matrix Biol.	26	6
2006	Kiyozumi, D; Sugimoto, N; Sekiguchi, K	Reciprocal stabilization of Fraser syndrome-associated proteins	Matrix Biol.	25	0
2006	Kiyozumi, D; Sugimoto, N; Sekiguchi, K	Breakdown of the reciprocal stabilization of QBRICK/Frem1, Fras1, and Frem2 at the basement membrane provokes Fraser syndrome-like defects	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	103	20

②マトリックス応答遺伝子グループ

マトリックス応答遺伝子グループでは、ラミニンの大量生産關連の研究を担った。同グループの成果の一つである Laminin 10 の大量生成技術は、ERATO プロジェクトとしても主要な成果でもある³⁵。

ラミニンは基底膜を構成する重要な分子（成分）であり、ERATO プロジェクトではこれを全てではないものの、一部を組換えで大量に作ることに成功した。ただし、ラミニンの大量生産としても、以前と比べ大量で純粋な蛋白を組換えで作ることができようになった

³⁵ 「A noble large-scale production system for modified basement membrane matrices using gene-swapped parietal endoderm cells」

段階であり、実験レベルで用いるほどの量までは生産できなかったため、生産量という部分で課題が残された。また、ERATO プロジェクトでは、大量生産することの重要性を実証する研究として、F9 細胞を蛋白系で作り、15-20mg/l まで大量生産することに成功したものの、組換え蛋白を利用する際に、実験で用いることの有用性については、課題として残された。

プロジェクト終了以降、マトリックス応答遺伝子グループリーダーの林は、所属元の名古屋大学環境医学研究所に戻ったことから、本来の専門分野である内分泌臓器の発生分化、甲状腺がんの病態生理を中心に研究活動を行っている。このため、ERATO プロジェクトの成果を用いて、研究を発展させるに至っていない。

表 7 プロジェクト終了以降のマトリックス応答遺伝子グループの成果

PY	Authors	Title	Journal	Vol	Total Citation
2011	H.Fujiwara,M.Ferreira,G.Donati, D.K.Marciano,J.M.Linton,Y.Sato, A.Hartner,K.Sekiguchi,L.F.Reichardt,F.M.Watt	The basement membrane of hair fillicle stem cells is a muscle cell niche.	Cell	144	-
2009	Y. Hayashi, M. Yamamoto, H. Mizoguchi, C. Watanabe, R. Ito, S. Yamamoto, X.Y. Sun, Y. Murata	Mice deficient for glucagon gene-derived peptides displays normoglycemia, and hyperplasia of islet α -cells but not of intestinal L-cells.	Mol. Endocrinol.	23	3
2009	R. Watanabe, Y. Hayashi, M. Sassa, T. kikumori, T. Imai, T. Kikuchi, Y. Murata	Possible involvement of BRAFV600E in altered gene expression in papillary thyroid cancer	Endocr. J.	56	4
2009	Taniguchi, Y; Ido, H; Sanzen, N; Hayashi, M; Sato-Nishiuchi, R; Futaki, S; Sekiguchi, K	The C-terminal Region of laminin beta Chains Modulates the Integrin Binding Affinities of laminins	J. Biol. Chem.	284	6
2008	H. Ido, S. Ito, Y. Taniguchi, M. Hayashi, R. Sato-Nishiuchi, N. Sanzen, Y. Hayashi, S. Futaki, K. Sekiguchi	laminin isoforms containing the gamma 3 chain are unable to bind to integrins due to the absence of the glutamic acid residue conserved in the C-terminal regions of the gamma 1 and gamma 2 chains	J. Biol. Chem.	283	3
2008	Miyazaki, T; Futaki, S; Hasegawa, K; Kawasaki, M; Sanzen, N; Hayashi, M; Kawase, E; Sekiguchi, K; Nakatsuji, N; Suemori, H	Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells	Biochem. Biophys. Res. Commun.	375	10
2007	Ido, H; Nakamura, A; Kobayashi, R; Ito, S; Li, SL; Futaki, S; Sekiguchi, K	The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin gamma chains in integrin binding by laminins	J. Biol. Chem.	282	16

PY	Authors	Title	Journal	Vol	Total Citation
2007	H. Fujiwara, Y. Hayashi, N. Sanzen, R. Kobayashi, CN. Weber, T. Emoto, S. Futaki, H. Niwa, P. Murray, D. Edgar, K. Sekiguchi	Regulation of mesodermal differentiation of mouse embryonic stem cells by basement membranes	J. Biol. Chem.	282	13
2006	T. Niimi, Y. Hayashi, K. Sekiguchi, Y. Kitagawa, Y	The Sp family of transcription factors regulates the human laminin alpha 1 gene in JAR choriocarcinoma cells	Biochim. Biophys. Acta-Gene Struct. Expression	1759	0
2006	Hayashi, Y; Weber, CN; Emoto, T; Fujiwara, H; Sanzen, N; Futaki, S; Sekiguchi, K	A novel large-scale production system for modified basement membrane matrices using gene-swapped parietal endoderm cells	Matrix Biol.	25	1

③マトリックス工学グループ

ERATO プロジェクトでは、主に新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的なスクリーニングと、マウス基底膜ボディマップ・データベースの作製に関わった。プロジェクト終了以降、論文数は他のグループと比べて少ないが、2008年8月に公開した「マウス基底膜ボディマップ・データベース」や、データベース関連論文 (Manabe et al, 2008 (PNAS)) 等の成果は、関口細胞外環境プロジェクト全体を通じて、主要な成果となっている。

研究プロジェクト終了以降、マトリックス工学グループの ERATO プロジェクト関連の研究成果は、下記のとおりである。

表 8 プロジェクト終了以降のマトリックス工学グループの成果

PY	Authors	Title	Journal	Vol	Total Citation
2010	Shimono, C; Manabe, R; Yamada, T; Fukuda, S; Kawai, J; Furutani, Y; Tsutsui, K; Ikenaka, K; Hayashizaki, Y; Sekiguchi, K	Identification and characterization of nCLP2, a novel C1q family protein expressed in the central nervous system	J. Biochem.	147	0
2010	Tsutsui, K; Manabe, R; Yamada, T; Nakano, I; Oguri, Y; Keene, DR; Sengle, G; Sakai, LY; Sekiguchi, K	ADAMTSL-6 Is a Novel Extracellular Matrix Protein That Binds to Fibrillin-1 and Promotes Fibrillin-1 Fibril Formation	J. Biol. Chem.	285	0
2008	Manabe, RI; Tsutsui, K; Yamada, T; Kimura, M; Nakano, I; Shimono, C; Sanzen, N; Furutani, Y; Fukuda, T; Oguri, Y; Shimamoto, K; Kiyozumi, D; Sato, Y; Sado, Y; Senoo, H; Yamashina, S; Fukuda, S; Kawai, J; Sugiura, N; Kimata, K; Hayashizaki, Y; Sekiguchi, K	Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	105	5

「マウス基底膜ボディマップ・データベース」に関連した論文は、マトリックス工学グループリーダーであった眞鍋らが 2008 年に PNAS で発表した「Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins」があげられる。

同論文では、「マウス基底膜ボディマップ・データベース」で公開している基底膜蛋白質についての網羅的スクリーニング法 (in silico スクリーニング、複数の in vitro 機能的スクリーニング、そして生体内の in vivo 局在性スクリーニングからなる) や同定にいたるプロセス等について発表している。

また、同論文は、NEDO プロジェクトの成果としても取り上げられており、論文の謝辞には NEDO や理化学研究所の支援についての記載がある。



Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins

Riichiroh Manabe^{1,2}, Ko Tsuboi^{3,4}, Tomiko Yamada⁵, Mina Kimura⁶, Itoko Nakano^{6,7}, Chisai Shiono^{8,9}, Noriko Saitani¹⁰, Yutaka Furutani¹¹, Tomohiko Fukuda¹², Yasuko Oguni¹³, Keiko Shimamoto¹⁴, Daji Kiyozumi¹⁵, Yuya Sato¹⁶, Yoshikazu Sato¹⁷, Hisaki Tamori¹⁸, Shobu Yamashita¹⁹, Shiro Fukui²⁰, Jun Kawaji²¹, Nobuo Sugawara²², Koji Kimata²³, Yoshihide Hayashizaki²⁴, and Kiyotoshi Sekiguchi^{1,2,7}

¹Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ²Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ³Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ⁴Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ⁵Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ⁶Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ⁷Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ⁸Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ⁹Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹⁰Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹¹Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹²Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹³Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹⁴Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹⁵Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹⁶Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹⁷Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹⁸Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ¹⁹Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ²⁰Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ²¹Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ²²Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ²³Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan; ²⁴Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Japan

Communicated by San-ichi Hakomori, Pacific Northwest Research Institute and University of Washington, Seattle, WA, April 23, 2008 (received for review January 2, 2008)

Extracellular matrix (ECM), which provides critical scaffolds for all adherent cells, regulates proliferation, differentiation, and apoptosis. Different cell types employ distinct ECMs, which are thought to play important roles in the generation of so-called niches that contribute to cell-specific functions. The molecular diversity of these extracellular ECMs, however, has not been elucidated. Here, we describe a strategy for transcriptome-wide identification of ECM proteins based on computational screening of ~65,000 full-length mouse cDNAs for secreted proteins, followed by *in vitro* functional assays. These assays identified the candidate proteins for ECM-assembly activities, interactions with other ECM molecules, modification with glycosaminoglycans, and cell-adhesion activities, and were then complemented with immunohistochemical analysis. We identified 19 ECM proteins, of which seven were localized in basement membrane (BM) zones. The identification of these previously unknown BM proteins allowed us to construct a body map of BM proteins, which represents the comparative immunohistochemistry-based expression profiles of the tissue-specific composition of BMs.

basement membrane | body map | niche | cell adhesion | glycosaminoglycan

The extracellular environment provides cues for the discrimination of cell fate and function. Extracellular matrix (ECM), a major constituent of the extracellular environment, is of particular interest because it modulates the activities of other extracellular factors, including growth factors, cytokines, and soluble ligands (e.g., cell-cell adhesion molecules) as well as physical stimuli. For example, ECM mediates the activities of growth factors and cytokines via interactions with those soluble ligands (1). ECM also transmits signals that influence cell-cell interactions (2) and growth factor signaling (3) through integrins and other cell surface receptors, thereby integrating these extracellular cues. ECM exhibits a marked degree of molecular diversity that is thought to be important for the generation of environments that are occupied by individual cell types. However, it is currently very difficult to define the composition of proteins that constitute the ECM of a given tissue or cell type. Because many ECM proteins have yet to be identified and no large-scale comparison of the spatiotemporal distribution of ECM proteins has been reported, thus, a large-scale study to identify ECM proteins would be helpful for the identification of various components of ECM proteins.

and the accumulation of various scientific resources offer some large-scale approaches for protein identification, such proteomic methods are not applicable for ECM proteins because of their complex posttranslational modifications and the difficulties associated with isolating high-quality ECMs from individual tissues. In addition, there are no motifs or signatures that define ECM proteins, which precludes simple sequence-based screening techniques.

To overcome these difficulties, we developed an approach for identifying unknown ECM proteins that combines computational screening for secreted proteins from a mouse transcriptome database with *in vitro* functional screening and immunohistochemical analysis. This strategy led to the identification of 19 ECM proteins, including 7 basement membrane (BM) proteins. These findings prompted us to use immunohistochemistry to delineate the molecular composition of various BMs, a specialized subset of ECMs associated with epithelial, endothelial, muscle, and nerve cells. In addition, we have detailed the localization profiles of BM proteins in the epithelial BMs of developing organs.

Results
ECM proteins are secreted from cells and localized to ECMs as a result of their self-assembly activities, the intrinsic cell-mediated assembly of ECM, and/or binding activities for other ECM components. Some ECM proteins are capable of promoting cell-adhesion activities, whereas members of the proteoglycan subfamily of ECM proteins possess glycosaminoglycan (GAG) chains. By using these characteristics as hallmarks of ECM proteins, we developed a systematic screening procedure that consisted of three steps (Fig. 1). First, cDNAs from a mouse transcriptome database were computationally screened for those encoding putative secreted proteins. Then, a series of *in vitro* functional screening assays were used to select putative ECM proteins based on their deposition to ECMs, interactions with known ECM molecules, promotion of cell adhesion, and GAG modifications. Finally, the localizations of the proteins were examined by using immunohistochemistry.

Author contributions: R.M., K.T., T.Y., M.K., I.N., C.S., N.S., Y.F., T.F., Y.O., K.S., D.K., Y.S., Y.S., H.T., S.Y., S.F., J.K., N.S., K.K., K.K., and K.S. designed research; R.M., K.T., T.Y., M.K., I.N., C.S., N.S., Y.F., T.F., Y.O., K.S., D.K., Y.S., Y.S., H.T., S.Y., S.F., J.K., N.S., K.K., K.K., and K.S. performed research; R.M., K.T., T.Y., M.K., I.N., C.S., N.S., Y.F., T.F., Y.O., K.S., D.K., Y.S., Y.S., H.T., S.Y., S.F., J.K., N.S., K.K., K.K., and K.S. analyzed data; R.M., K.T., T.Y., M.K., I.N., C.S., N.S., Y.F., T.F., Y.O., K.S., D.K., Y.S., Y.S., H.T., S.Y., S.F., J.K., N.S., K.K., K.K., and K.S. wrote the paper.

Supplementary information: Supplementary information is available at www.pnas.org/supplemental.

Conflict of interest statement: No conflict declared.

Copyright © 2008 the authors. 0027-8125/08/10512300-05\$15.00/0

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0803641105

PNAS | September 2, 2008 | vol. 105 | no. 35 | 12300-12304

図11 ERATO プロジェクトの主要論文

2-2. プロジェクトメンバーの活動状況

ERATO プロジェクトでは、プロジェクトメンバーとして 12 人の研究員（研究総括を除く）、17 人の技術員（うち、HP 作成要因等が 3 名、非常勤技術員が 1 名）が参画した。

プロジェクトメンバーで、ERATO プロジェクト終了以降、大学等のテニユアポストに就任した人数は、林と新美の 2 人である（両者とも所属元のポストに戻った）。他の研究員については、浄住、二木の両名は、関口研究室へ、藤原、筒井（2010 年 4 月～）の両名は海外の研究機関へ活躍の場を移した。

研究プロジェクトに関わった若手研究者のうち、今後の活躍に注目すべき研究者として、下記の研究人材が挙げられる。

表 9 注目すべき若手研究人材

氏名	所属	研究分野
林 良敬	名古屋大学 環境医学研究所	内分泌臓器の発生・分化 ※「タンパク質の生産に用いることが可能な F 9 胚性腫瘍細胞、およびその利用」の特許の取得に関わる
眞鍋 理一郎	(独) 理化学研究所 オミックス基盤研究領域	データベース ※ERATO プロジェクトでは、マウス基底膜のボディマップ・データベースの構築に従事 ※ERATO プロジェクト終了以降も、NEDO プロジェクトで研究総括と共同研究を行っている。
藤原 裕展	Cancer Research UK, Cambridge Research Institute	毛包の幹細胞（ステムセル領域） ※Cancer Research UK は、毛包の幹細胞分野の研究では世界的に有名。 ※基底膜研究を活かし、細胞外マトリックス研究の先にあるステムセル領域に従事。研究総括とは現在も共同研究を行っている。2011 年に毛包立毛筋の研究で Cell に論文発表。
二木 杉子	大阪大学 蛋白質研究所 助教	ラミニン機能解析、初期胚における基底膜の組成・動態・機能の解析
筒井 仰	Shriners Research Center, Shriners Hospitals for Children	細胞外マトリックス ※Shriners Hospitals は、米国では有名な小児関係の病院。2010 年 4 月から。

第3章 プロジェクト成果の波及と展望

3-1. 科学技術への波及と展望

(1)再生医療、iPS細胞研究への影響

ES細胞、iPS細胞研究の進展に伴い、あらゆる細胞の構築が理論的に可能になりつつあるが、具体的にどのように細胞を構築するかという点で大きな課題を抱えている。細胞外マトリックスは、細胞機能を調整する重要な因子として、この課題に対応するもので、ERATOプロジェクト当時よりも、当該研究分野の研究成果に対する要請が高まっている。

ERATOプロジェクトの初期の時点では、マトリックス工学グループでTissue Engineeringまで取り扱うことを考えていたが、プロジェクトで取り組むテーマが広範にわたることから、データベースの構築に注力した。

2006年度から追加採択されたNEDOプロジェクト（「研究用モデル細胞の創製技術開発」）では、ERATOプロジェクトの成果を引き継ぎ、細胞外マトリックスの再構築に取り組むことができた。関口には細胞外環境制御技術の開発にてERATOで蓄積した成果の活用も期待され、実際にNEDOプロジェクトの成果として取り上げられた論文のうち、下記のものにはERATOプロジェクトの関連成果である。

表10 NEDOプロジェクトの成果に活かされたERATOプロジェクト関連論文

(ERATOプロジェクト終了以降の関連論文)

グループ	研究成果（著者、論文タイトル等）
マトリック機能情報	Kiyozumi, D; Sugimoto, N; Nakano, I; Sekiguchi, K (2007) “Frem3, a member of the 12 CSPG repeats-containing extracellular matrix protein family, is a basement membrane protein with tissue distribution patterns distinct from those of Fras1, Frem2, and QBRICK/Frem1”, Matrix Biol. Vol. 26
	Kiyozumi, D; Sugimoto, N; Sekiguchi, K (2006) “Breakdown of the reciprocal stabilization of QBRICK/Frem1, Fras1, and Frem2 at the basement membrane provokes Fraser syndrome-like defects”, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Vol. 103
マトリックス応答遺伝子	Taniguchi Y, Ido H, Sanzen N, Hayashi M, Sato-Nishiuchi R, Futaki S, Sekiguchi K (2009) “The C-terminal Region of laminin beta Chains Modulates the Integrin Binding Affinities of laminins”, J. Biol. Chem., Vol.284.
	H. Ido, S. Ito, Y. Taniguchi, M. Hayashi, R. Sato-Nishiuchi, N. Sanzen, Y. Hayashi, S. Futaki, K. Sekiguchi (2008) “laminin isoforms containing the gamma 3 chain are unable to bind to integrins due to the absence of the glutamic acid residue conserved in the C-terminal regions of the gamma 1 and gamma 2 chains”, J. Biol. Chem., Vol. 283.
マトリックス応答遺伝子	Ido H, Nakamura A, Kobayashi R, Ito S, Li SL, Futaki S, Sekiguchi K (2007) “The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin gamma chains in integrin binding by laminins”, J. Biol. Chem., Vol. 282.

グループ	研究成果（著者、論文タイトル等）
マトリックス応答遺伝子	H. Fujiwara, Y. Hayashi, N. Sanzen, R. Kobayashi, CN. Weber, T. Emoto, S. Futaki, H. Niwa, P. Murray, D. Edgar, K. Sekiguchi (2007) “Regulation of mesodermal differentiation of mouse embryonic stem cells by basement membranes”, J. Biol. Chem., Vol. 282.
	Dainichi, T; Kurono, S; Oyama, B; Ishii, N; Hayashi, M; Shimono, C; Tainguchi, Y; Sanzeno, N; Karashima, T; Yaumoto, S; Sekiguchi, K; Zillikens, D; Hashimoto, T (2009) “Anti-laminin gamma-1 pemphigoid”, PNAS, Vol.106.
	Takashima S, Yasuo M, Sanzen N, Sekiguchi K, Okabe M, Yoshida T, Toda A, Nikaido T (2008) “Characterization of laminin isoforms in human amnion”, Tissue Cell, Vol. 40
	Willberg, J; Hormia, M; Takkunen, M; Kikkawa, Y; Sekiguchi, K; Virtanen, I (2007) “Lutheran blood group antigen as a receptor for alpha 5 laminins in gingival epithelia”, J. Periodont., Vol.78
マトリックス工学	Manabe, RI; Tsutsui, K; Yamada, T; Kimura, M; Nakano, I; Shimono, C; Sanzen, N; Furutani, Y; Fukuda, T; Oguri, Y; Shimamoto, K; Kiyozumi, D; Sato, Y; Sado, Y; Senoo, H; Yamashina, S; Fukuda, S; Kawai, J; Sugiura, N; Kimata, K; Hayashizaki, Y; Sekiguchi, K (2008) “Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins”, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol.105

また、NEDO プロジェクトにおいて、参考文献として引用された論文は、下記の通りである。林らの論文は、人工基底膜による ES 細胞の構築に関して引用され、宮崎らの論文は、人工基底膜の効果の評価において引用された。

- Hayashi, Y; Weber, CN; Emoto, T; Fujiwara, H; Sanzen, N; Futaki, S; Sekiguchi, K (2006)
“A novel large-scale production system for modified basement membrane matrices using gene-swapped parietal endoderm cells”, Matrix Biol., Vol. 25
- Miyazaki T, Futaki S, Hasegawa K, Kawasaki M, Sanzen N, Hayashi M, Kawase E, Sekiguchi K, Nakatsuji N, Suemori H (2008)
“Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells”, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 375

(2)「マウス基底膜ボディマップ・データベース」研究の波及・展開、活用状況

ERATO プロジェクトでは、細胞外マトリックスの研究基盤として「マウス基底膜ボディマップ・データベース」を構築した。同データベースは、プロジェクト事後評価でも大きく評価され、2008年に一般公開された。また、グループリーダーの真鍋は、2008年にPNASに関連論文を発表することで、同データベースが研究コミュニティにも知られるところとなった。

ERATO プロジェクト終了以降のデータベースの更新については、前述のとおり、NEDO プロジェクトの中で実施された。具体的には、胎生 5.5～7.5 日、8.5～10.5 日、および 12.5～16.5 日のマウス胎仔における全基底膜蛋白質の局在を、免疫組織化学的手法で網羅的に解析し、ES 細胞の選択的分化誘導に必要な発生初期から中期までの基底膜分子構成の時間空間的制御の全貌を解明した。また、これらの成果を受けて、12.5 日胚、14.5 日胚を新たにデータベースに反映させ、主要 20 種の基底膜蛋白質の全身高解像免疫組織染色像と、新たに発見した基底膜蛋白質 15 種類と基底膜周辺に局在する細胞外マトリックス蛋白質の 6 種類の画像を追加更新した。

一方で、NEDO プロジェクトで得られた胎生 5.5～7.5 日、8.5～10.5 日までの情報は、ウェブサイト上の制約（画像データのハンドリング等）から反映できていない。

データベースを利用した関連論文は、主要学術誌からの発表はまだ確認されていないが、一部、眞鍋（2008）のデータベース関連論文を引用したケースとして、マウスの生殖細胞である SOX17（ES 細胞関連）についての論文³⁶がある。

「マウス基底膜ボディマップ・データベース」は、基底膜蛋白質を網羅的に解析することができる公開データベースであり、今後、再生医学、組織工学、iPS 細胞等の研究を推進するための情報基盤インフラとして期待される。また、データベース自体も、解析の対象を正常な個体だけでなく、様々な病態モデルマウス（ノックアウトマウス）に拡大することで、基底膜分子構成を指標とした新たな病因解析の基盤技術としての役割を持たすことも可能である。当該データベースの発展形として、データベースの対象範囲をヒトの疾患における基底膜の分子構成とした時には、医薬品開発における基盤情報ツールとしての役割を担うと考えられる¹²。

(3) 組換え蛋白の構築

ERATO プロジェクトの研究蓄積を受けて、NEDO プロジェクトでは、細胞ごとに分子構成をカスタマイズした完全合成型人工基底膜を構築した。具体的な成果として、IV 型コラーゲンの生物活性と I 型コラーゲンの物理的強度を併せ持つ改良型 IV 型コラーゲンゲルを開発し、特許出願「I 型・IV 型コラーゲン混成ゲル」〈特願 2009-235348〉を行ったほか、分子組成をカスタマイズしたラミニン—IV 型コラーゲン—ニドゲン—ヘパラン硫酸プロテオグリカンからなる完全合成型多成分人工基底膜の構築に成功した。

また、京都大学共同で、組換え基底膜蛋白質を利用したヒト ES 細胞用のフィーダ・フリー培養基質の開発を進めた。

³⁶ Kathy K. Niakan, Hongkai Ji, Rene Maehr, et al., “Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal”, Genes&Development, CSH Press.

(4) 関連研究者との共同研究の展開状況

ERATO プロジェクト終了以降、プロジェクトに関わる研究者間で共同研究等がいくつか行われており、プロジェクトを通じ構築された研究ネットワークは継続されている。以下、共同研究の実施の例である。

【NEDO プロジェクトにおける共同研究】

関口と真鍋は、ERATO プロジェクト終了後に実施した NEDO プロジェクトにおいて、引き続き共同研究を行った。

【その他の共同研究】

i) 幹細胞の大量生産に関する研究

藤原は、現在、英国のケンブリッジ研究所 (Cancer Research UK, Cambridge Research Institute) にて、幹細胞についての研究に従事している。関口とは共同研究を行っている。藤原の研究により、幹細胞の大量生産を構築することで、ES 細胞、iPS 細胞培養で多くの成果の創出に寄与することが期待される。

表 11 藤原裕展氏の Cancer Research UK における成果

PY	Authors	Title	Journal	Vol	Total Citation
2011	H.Fujiwara,M.Ferreira,G.Donati, D.K.Marciano,J.M.Linton,Y.Sato, A.Hartner,K.Sekiguchi,L.F.Reichardt,F.M.Watt	The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche.	Cell	144	-
2009	Ferreira M, Fujiwara H, Morita K, Watt FM	An activating beta1 integrin mutation increases the conversion of benign to malignant skin tumors	Cancer Res	69 (4)	5

ii) 基底膜とプロテオグリカンとの相互作用

関口は、木全 (愛知医科大学) との間で、基底膜とプロテオグリカンとの相互作用についての研究を実施している³⁷。

3-2. 社会・経済への波及と展望

(1) 社会・経済への波及

関口細胞外環境プロジェクトで取得した特許 (終了以降) は、「タンパク質の生産に用い

³⁷ 木全研究室と共同で、Journal of Biological Chemistry に「Activin Binds to Perlecan through Its Pro-region That Has Heparin/Heparan Sulfate Binding Activity」を発表

ることが可能な F9 胚性腫瘍細胞、およびその利用」を始め、4 件確認されている。これらが産業利用に発展した事例については確認できていない。

プロジェクト実施中に特許を取得した「タンパク質の生産に用いることが可能な F9 胚性腫瘍細胞、およびその利用³⁸⁾」について、2007 年に P. Marinkovich (スタンフォード大学) から問い合わせがあり、同氏に培養細胞を送った。その後共同研究に至り、論文を発表している³⁹⁾。同教授の研究室は皮膚がん研究のトップラボであり、がん研究への貢献につながっている。

(2)波及に向けた今後の方策

再生医学では、抗体を用いた医薬等が基盤的研究のツールとして期待される。関口らがプロジェクトを通じ、多数の抗体を組み替え蛋白で構築したことは、本プロジェクトの研究成果の意義として大きいものがある。

現在のところ、これらの組換え蛋白を持っているのは、世界で唯一、関口研究室だけであるが、研究に必要とされる蛋白を提供するためには、一大学研究室としては能力に限界がある。セルバンクやコンソーシアムのような研究支援インフラを構築し、強固な研究基盤が必要とされている。一方で、関口研究室ではフィーダ・フリー培養基質 (基材) について、現在、主要な企業とのライセンスに関する交渉を進めているところであり、研究支援インフラの構築の方向に向けて努力しているところである。

また、細胞外環境のような基礎研究を継続して推進するには、技術革新的な研究 (例えば、プリンティング技術を活用したマイクロアレイの開発のように応用先が見えるもの) も必要である。特に、細胞外マトリックス研究の今後の展開先として、再生医療分野への期待が大きいため、臨床と併せて具体的な応用研究のターゲットを絞り込む必要がある。

³⁸⁾ F9 胚性腫瘍細胞でしか生産できない技術であるが、どれだけ有用性があるか実証・評価の面で課題を残している。

³⁹⁾ J, Gao; M.C, DeRouen; C.H, Chen; M, Nguyen; N.T, NguyenH, IdoK, Harada; K, Sekiguchi; B.A, Morgan; J.H, Miner; E, Anthony; P, Marinkovich, "Laminin-511 is an epithelial message promoting dermal papilla development and function during early hair morphogenesis", *Genes & Development*, Vol.22(15), 2008.

第4章 事業運営に関する意見等

4-1. ERATO に対する意見

追跡調査で実施したプロジェクト関係者、外部識者へのヒアリング調査から、ERATO プロジェクトを実施したことによる利点、課題を以下にとりまとめる。

(A) 本研究分野における ERATO プロジェクトの意義

- i. ERATO プロジェクト開始時点は、細胞にとって本来必要な環境が分かっていない状態であったが、プロジェクトの実施により細胞にとって必要な環境についての理解が進み、基盤的な部分の構築ができたと評価されている。特に、ERATO プロジェクト、その後の NEDO プロジェクトを通じて、主要な蛋白を組換えで構築できるようになったことで、今後は演繹的な研究ができるような段階になった。ERATO プロジェクトは、基盤的な研究を発展させる上で、重要な研究資金である。
- ii. ERATO 実施時には、研究者、技術員を含めて、20 名程度の人材を抱えて研究活動を展開できた。マトリクソームの解析は、膨大な染色データがあり、それらをきちんと分析することで、多くの論文を生産することは可能である。しかし、現在の大学研究室の枠の中で研究に従事する場合、研究規模は小さくならざるを得ない。基礎科学を推進する点において、ERATO プロジェクトの果たす役割は大きい。
- iii. 大学を中心とした基礎科学研究を取り巻く環境が近年悪化していること（博士課程への進学者の減少＝研究の担い手の不足）を踏まえると、これらの研究を継続的に展開するには常時、ポスドク等を抱えることのできる研究資金を確保する努力がますます重要になっている。

(B) ERATO プロジェクトのユニークな点

- i. 【オフ・キャンパス】：ERATO プロジェクトでは、オフ・キャンパスで研究に従事するが（バーチャルインスティテュート）、そのメリットとして「研究ネットワーク」の構築があげられる。研究プロジェクトでは、愛知医科大学に研究拠点を設置したことで、名古屋地域の細胞外マトリックス研究者の人的ネットワークも活かすことができた。ERATO のようなプロジェクトでは、オフ・キャンパス制度は重要である。

(C) 研究活動評価

- i. 研究活動の評価は、主要学術雑誌（“Nature”、“Science”）等への発表数や被引用数（インパクトファクター）が用いられるが、これらを実評価軸にするのであれば、研究費が本当に効率よく使われている状態とはどのような状態か明確にする必要がある（主要学術誌に年に何本掲載されるか等）。

- ii. 日本では、主要学術雑誌に論文を掲載すれば、評価が安泰であるというところがある。評価のあり方には、まだ改善の余地がある。

(D)その他(近年の ERATO プロジェクトの採択テーマについて)

- i. 近年の ERATO プロジェクトをみると、研究総括を務める研究者の年齢が高齢化している印象を受ける。この傾向は、当初の ERATO プロジェクトの趣旨から乖離してはいないか気になるところである。関口細胞外環境プロジェクトでは、細胞外環境を形成する蛋白を網羅的に全て調べ、どの細胞とどのような関係があるかを調べた。これは、ゼロから立ち上げた研究であり、その成果が現在研究を推進していく上で非常に有用になってきている。関口プロジェクトは、基礎科学の基盤をなすものであるが、様々な研究分野の発展に寄与することが期待するものであり、ERATO プロジェクトの趣旨に沿って、一定の研究成果を創出することができたと考えている。

4-2. 課題等

プロジェクトの成果の発展に向けて、主に、研究基盤としてのデータベースの維持・管理について、現在抱えている課題等についての意見を以下にまとめる。

- i. ERATO プロジェクト終了以降、データベースの維持・管理に係る研究資金を獲得できておらず、ウェブサイトのメンテナンスが十分に行える環境にはない。データベースは、ある種のサービス業的な側面もあり、生命科学の発展に向けて、一研究室だけでなく、研究コミュニティとしてもこれまでとは少し異なる使い方も模索すべきである。
- ii. データベースの維持は、非常に地味な研究であり、論文を十分に生産できないことから、これらの研究に従事する若手研究者は少なくなっている。一方で、当該研究を推進するには、研究者・技術員による人海戦術（例えば、染色担当、解析担当、画像担当、データベース担当等に分担し研究を推進する体制）をとらざるをえず、継続的にポスドク等の研究者を確保する必要がある。