

組換えDNA実験計画申請書

令和 8 年 4 月 17 日

学校法人学文館理事長 殿

所属 上武大学 医学生理学研究所
 申請者 職名 所長
 氏名 澁谷 正 史



申請の種類	新規 ☐ 継続 ☒ 変更 (令和 5 年 1 2 月第 23-GENE02 号) (赤字記載: 職名の部分)			
経 費	■文部科学省科学研究費 ■その他 (医学生理学研究所経費、寄付金、学内研究費) ☐ 無			
実験の種類	☒ 微生物使用実験 ☐ 大量培養実験 ☐ 動物使用実験 ☐ 動物作成実験 ☐ 動物接種実験 ☐ 植物使用実験 ☐ 植物作成実験 ☐ 植物接種実験 ☐ きのこ作成実験			
拡散防止措置 の区分	☐ P 1 ☒ P 2 ☐ P 3 ☐ P 1 A ☐ P 2 A ☐ P 3 A ☐ 特定飼育区画 ☐ P 1 P ☐ P 2 P ☐ P 3 P ☐ 特定網室 ☐ L S C ☐ L S 1 ☐ L S 2			
実験課題名	がん遺伝子変異の機能解析、および、血管制御システムの様々な疾患における病理的意義の解析 (その 3)			
実験実施期間 (最長 4 年)	令和 6 年 4 月 1 日から 令和 1 0 年 3 月 31 日まで			
実験場所	名 称	学文館 (高崎キャンパス) ・ 4 号館 3 階、バイオメディカルラボ、およびクリニカルサイエンスラボ実験室		
	所 在 地	(〒370-1393) 群馬県高崎市新町 270-1		
		TEL 0274-42-3864		
実験責任者	所属・職名	医学生理学研究所・所長		
	氏 名	澁谷正史		
	住 所	(〒370-1393) 群馬県高崎市新町 270-1		
		TEL 0274-42-3864 ; FAX 0274-42-5202 E-mail: shibuya@jobu.ac.jp		
実験従事者	氏 名	所属・職名	宿主及びその取扱い経験 年数	組換え DNA 実験経験年数
	澁谷 正史 西川 彰 田中 基晴 笹川 忠 林 泰秀 加藤 政彦 渡辺 正哉 学外共同研究者 大上 厚志 大澤 毅 入山 高行	医学生理学研究所・所長 同・教授 同・教授 同・主任研究員 同・客員教授 同・客員教授 同・客員研究員 群馬大学・准教授 東京大学・准教授 東京大学・准教授	あり (全ての宿主 40 年) あり (大腸菌 2 年) あり (大腸菌 1 年) あり (大腸菌 18 年) あり (大腸菌 5 年) あり (大腸菌 8 年 8 ヶ月) あり (大腸菌 7 年) あり (大腸菌 20 年) あり (大腸菌 18 年) あり (大腸菌 4 年)	あり (40 年) あり (2 年) なし あり (18 年) あり (5 年) なし あり (7 年) あり (20 年) あり (18 年) あり (4 年)

実験の目的		(1) EGFR などのがん遺伝子変異について、シグナル伝達の特徴、細胞がん化における役割を明らかにするとともに、阻害剤開発を目指す（一部は公益財団法人微生物化学研究所との共同研究）。小児がん（白血病・リンパ腫、固形腫瘍）についても遺伝子解析を進める（別紙参照）。 (2) 血管内皮増殖因子 VEGF とその受容体システムなどの血管制御系に関して、シグナル伝達を解析し、がん、その他の疾患の進行に関与する機構を明らかにする。また、VEGF ファミリーの血管再生、組織維持への応用について検討する。血管抑制因子についても作用機構を解析する。 (3) マウスやヒト由来の栄養層細胞、神経系細胞などにおける sVEGFR-1/sFlt-1 を含む VEGFR 系の役割を調べ、妊娠高血圧症候群や神経変性症などにおける VEGF 系の意義を明らかにする。				
実験の概要		2012 年 7 月以降 第 12-GENE 01、16-GENE 01、20-GENE01,02 号、23-GENE01 で約 12 年間おこなった研究をさらに発展させる。 ヒトグリオブラストーマにしばしば認められる EGFR 変異 (EGFR vIII) について、細胞がん化における役割を解析する。阻害剤スクリーニングも行う。その他のがん遺伝子についても解析する。 VEGF のシグナルががんの発生・増殖・進展にどのように関わるかを、主に、VEGFR-1 あるいは、VEGFR-2, VEGFR-3 cDNA 発現ヒト・マウス・トリ由来細胞株をもちいて調べる。VEGFR cDNA の変異を構築し、細胞株に導入して、そのシグナル伝達の機構を解析する。血管抑制因子 (sFLT1/sVEGFR-1,TSP-1,BMP など) についても、細胞への発現により、作用機構を解析する。 栄養層細胞、神経系細胞などに遺伝子導入、遺伝子発現抑制を行ない、効果を判定する。iPS 由来細胞も利用する。心臓血管系におけるシグナル伝達の進化、筋・血管系の異常についても調べる。 ゲノム編集技術をもちい、細胞の FLT1 遺伝子などに変異を導入して遺伝子発現の変化を検討する。				
供与体・ベクター・宿主の組み合わせ						
核 酸 供与体	供与核酸	ベクター	宿主等	保有動植物等	拡散防 止措置 の区分	備 考
マウス、ヒト	cDNA EGF,EGFR, 変異型 EGFR(EGFR vIII)な どの増殖因子とそ の受容体、およびこ れらの変異体： VEGF, FGF, VEGF-E, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR など の血管新生因子と その受容体、およ び、これらの変異体	pBR322 誘導体 pUC18, pBluescript	E.coli (JM109)		P2	B1 プラスミド DNA の 調製
			レトロウイルスベク ター、アデノウイルス ベクター、ウシパピ ローマウイルスベ クター	マウス NIH3T3 細胞、 B16 メラノーマ細胞、 LLC 細胞など；ヒト癌 細胞 (T98G, Hela な ど)、293 系統細胞、 内皮細胞など。マウス やヒト栄養層細胞、神 経系細胞、iPS 由来 神経細胞など。	P2	B1 細胞レベルの機能 解析
			バキュロウイルスベ クター	昆 虫 細 胞 Sf9, (Hi-five)	P2	B1 VEGF-E などのタン パクの調製
遺 伝 子 組 換 え 生 物 等 の 特 性	核酸供与体の特性	1) ヒト、マウス (129svJ、C57BL/6、BALB/c)。VEGF-E 遺伝子は Orf ウイルス (ヒツジ、ヤギパラボックスウイルス、P2 レベル) ゲノム由来。 2) いずれも病原性、有害物質産生性はない。				
	供与核酸の特性	1) ゲノム核酸、および相補的デオキシリボ核酸 2) EGFR は主に上皮系細胞に、VEGFR は主に血管・リンパ管内皮細胞に発現する遺伝子。 sVEGFR-1/sFlt-1 は主に栄養細胞や水晶体上皮細胞に発現する遺伝子。VEGF-E は VEGFR-2 受容体特異的な血管新生因子。(Ogawa et al. JBC, 1998) 3) Accession No. : (略)				
	ベクター等の特性	1) pBR322 系プラスミド、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、バキュロウイルスベクターは既に広く利用されているもの。ウシパピローマウイルスベクターは、染色体外で DNA が維持される性質を利用するもので、ウイルス粒子としては利用しない。(Karasuyama et al. JEM, 1990) 2) アンピシリン、ネオマイシン、カナマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン耐性遺伝子、GFP 等 (蛍光タンパク) 遺伝子。 3) 使用する全てのベクターは伝達性なし。				

	宿主等の特性	使用する大腸菌 (JM109)、バキュロウイルス、アデノウイルス、レトロウイルス、昆虫細胞、哺乳細胞はいずれも自然環境では生育できない。宿主にウイルス産生性、病原性、発がん性、毒素産生性はない。
	遺伝子組換え生物等の特性 (宿主等との相違を含む。)	バキュロウイルス等を用いて遺伝子導入した昆虫細胞、および、レトロウイルスベクター、アデノベクター等を用いて遺伝子導入した細胞にはマウスやヒトへの病原性、毒素産生性はない。ヒト iPS 細胞からの神経系細胞を含む諸細胞への分化は、令和元年の本学ヒト由来試料をもちいた実験に関する倫理審査委員会の承認を得ている。
遺伝子組換え生物等を保有している動物、植物又は細胞等の特性	本研究所においてはマウスなどの動物個体を飼育する設備が未設置のため、マウスをもちいた腫瘍移植実験は群馬大学の動物実験委員会の承認のもとで、群馬大学でおこなった (平成 29 年から開始した第一回の共同研究は終了) (別紙-6)。また、東大医科研・理研バンクに保存中の遺伝子改変マウス (受精卵) (flt-1 TK-/-, flk-1 1173F/F など) は、他大学などから依頼があれば、東大、上武大、理研の実験動物倫理の範囲内で MTA に基づき譲渡する。	
拡散防止措置に係る施設・設備	位 置	上武大学 4 号館 3 階 バイオメディカルラボ (細胞培養室) バイオサイエンスラボ (実験室)、オートクレーブ バイオサイエンスラボ (実験室)、オート クレーブ

	設 備	4号館3階、バイオメディカルラボ（細胞培養室）、クリニカルサイエンスラボ（実験室）：オートクレーブ、安全キャビネット設置
遺伝子組換え生物等を不活化するための措置		大腸菌や、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ウシパピローマウイルスベクター、バキュロウイルスベクターが付着したものは、オートクレーブあるいは、次亜塩素酸により滅菌処理する。
その他		該当なし

別紙

参考文献等：

1、 VEGF-E について

Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y., and Shibuya, M. A novel type of Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF-E (NZ-7 VEGF) preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. J. Biol. Chem., 273, 31273-31282, 1998.

2、 ヒト血管内皮由来細胞 AG1-G1

連結不可能匿名化のもとでヒト血管腫細胞より樹立。（東大医科研・倫理委員会承認）

Ishizaki H, Tsunoda T, Wada S, Yamauchi M, Shibuya M, Tahara H. Inhibition of tumor growth with antiangiogenic cancer vaccine using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 1. Clin Cancer Res. 12, 5841-5849, 2006.

3、 ウシパピローマウイルスベクター

ウイルスゲノムの一部のみを含み、ベクターが細胞染色体外においてエピゾーム状態で維持されるもの。1990年に烏山博士らにより開発され、利用されている。

Karasuyama, H., Kudo, A., and Melchers, F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. J. Exp. Med. 172, 969-972.

4、 遺伝子改変マウス

トランスジェニックマウス6種

Keratin14(K14)-promoter-VEGF-E、K14-human VEGF-A、K14-PlGF、K14-VEGF-E/PlGFキメラ#9、K14-VEGF-E/PlGFキメラ#33、CMV-promoter-GFP.

ノックアウトマウス5種

flt-1 TK-/-、flt-1 TM-TK-/-、flk-1 1173 Y/F point mutant、flk-1 1212 Y/F point mutant、vav3 -/-、

(これらは、学文館と東京大学間の契約に基づき、受精卵として東京大学医科学研究所・動物実験施設の冷凍保存庫に保管され、その後、理研バイオバンクに移動されている。外部の研究機関、または企業から譲渡依頼があった場合には、東京大学医科学研究所・理化学研究所と協議して対応する。)

- 5、 東京大学との共同研究による正常および妊娠高血圧症候群患者由来の胎盤等の利用
- 平成28年1月に東京大学医学部附属病院と上武大学との間で妊娠高血圧症候群に関する解析の共同研究契約が両大学倫理審査委員会の承認のもとに開始された。具体的には、正常および妊娠高血圧症候群患者由来の胎盤と血液の一部を20-30症例から提供を受け、胎盤由来細胞などを用いて血管制御システムの遺伝子発現とその制御機構を主に解析する。(ヒト試料の解析は既に終了している。R8.4)

これまでに、成果として共同研究を含め原著論文13編を発表した。

- a. Sasagawa T, Nagamatsu T, Morita K, Mimura N, Iriyama T, Fujii T, Shibuya M. HIF-2 α , but not HIF-1 α , mediates hypoxia-induced up-regulation of Flt-1 gene expression in placental trophoblasts. *Sci Rep*. 2018 Nov 26;8(1):17375. doi: 10.1038/s41598-018-35745-1.
- b. Sasagawa T, Jinno-Oue A, Nagamatsu T, Morita K, Tsuruga T, Mori-Uchino M, Fujii T, Shibuya M. Production of an anti-angiogenic factor sFLT1 is suppressed via promoter hypermethylation of FLT1 gene in choriocarcinoma cells. *BMC Cancer*. 2020 Feb 10;20(1):112. doi: 10.1186/s12885-020-6598-9.
- c. Yoshida N, Yamamoto S, Hamashima T, Okuno N, Okita N, Horikawa S, Hayashi M, Dang TC, Nguyen QL, Nishiyama K, Makino T, Ishii Y, Tomihara K, Shimizu T, Shibuya M, Noguchi M, Sasahara M. Dysregulation of Amphiregulin stimulates the pathogenesis of cystic lymphangioma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2021 May 11;118(19):e2019580118. doi: 10.1073/pnas.2019580118.PMID: 33941693
- d. Adachi H, Nosaka C, Atsumi S, Nakae K, Umezawa Y, Sawa R, Kubota Y, Nakane C, Shibuya M, Nishimura Y. Structure-activity relationships of natural quinone vegfrecine analogs with potent activity against VEGFR-1 and -2 tyrosine kinases. *J Antibiot (Tokyo)*. 2021 Oct;74(10):734-742. doi: 10.1038/s41429-021-00445-y. Epub 2021 Jul 20.PMID: 34282315
- e. Shibuya M, Matsui H, Sasagawa T, Nagamatsu T. A simple detection method for the serum sFLT1 protein in preeclampsia. *Sci Rep*. 2021 Oct 18;11(1):20613. doi: 10.1038/s41598-021-00152-6.PMID: 34663835
- f. Sasagawa T, Nagamatsu T, Yanagisawa M, Fujii T, Shibuya M. Hypoxia-inducible factor-1 β is essential for upregulation of the hypoxia-induced *FLT1* gene in placental trophoblasts.

- g. Sasagawa T, Nagamatsu T, Shibuya M. CRISPR/Cas9-mediated mutations in both a cAMP response element and an ETS-binding site suppress FLT1 gene expression. *Experimental Cell Research* Volume 424, Issue 1, 1 March 2023, 113500
- h. Nakahara R, Aki S, Sugaya M, Hirose H, Kato M, Maeda K, Sakamoto DM, Kojima Y, Nishida M, Ando R, Muramatsu M, Pan M, Tsuchida R, Matsumura Y, Yanai H, Takano H, Yao R, Sando S, Shibuya M, Sakai J, Kodama T, Kidoya H, Shimamura T, Osawa T. Hypoxia activates SREBP2 through Golgi disassembly in bone marrow-derived monocytes for enhanced tumor growth. *EMBO J.* 2023 Nov 15;42(22):e114032. doi: 10.15252/emboj.2023114032. Epub 2023 Oct 2. PMID: 37781951
- i. Sjöberg E, Melssen M, Richards M, Ding Y, Chanoca C, Chen D, Nwadozi E, Pal S, Love DT, Ninchoji T, Shibuya M, Simons M, Dimberg A, Claesson-Welsh L. Endothelial VEGFR2-PLC γ signaling regulates vascular permeability and antitumor immunity through eNOS/Src. *J Clin Invest.* 2023 Oct 16; 133(20): e161366. Published online 2023 Oct 16. doi: 10.1172/JCI161366 PMCID: PMC10575733
- j. Park SI, Cho SM, Atsumi S, Kawada M, Shibuya M, Lee JY, Kim JY, Kwon HJ. NDUFA12 as a functional target of the anticancer compound Ertredin in human hepatoma cells as revealed by label-free chemical proteomics. *J Proteome Res* 2023 Nov 21. doi: 10.1021/acs.jproteome.3c00471. PMID: 38104258
- k. Osada M, Yamashita A, Akinaga S, Hosono K, Ito Y, Shibuya M, Asari Y, Amano H. VEGFR1 TK signaling protects the lungs against LPS-induced injury by suppressing the activity of alveolar macrophages and enhancing the anti-inflammatory function of monocyte-derived macrophages, *Toxicology and Applied Pharmacology* (2024), <https://doi.org/10.1016/j.taap.2024.117083>
- l. Atsumi S, Nosaka C, Onodera T, Adachi H, Watanabe T, Kawada M, Shibuya M, Park, S.I., Kwon H.J. Enhanced Anticancer Activity of 7MeERT over Ertredin: A Comparative Study on Cancer Cell Proliferation and NDUFA12 Binding. *Biomolecules* 2024, 14(9), 1197; <https://doi.org/10.3390/biom14091197>
- m. Sasagawa T, Shibuya M. Human trophoblast stem cell-differentiated syncytiotrophoblasts as a model for hypoxia-enhanced secretion of the anti-angiogenic factor sFLT1. *Experimental Cell Research*, Vol.452, Issue2,1, Oct. 2025, 114773.

6、群馬大学大学院医学系研究科・生物資源センター（大上厚志准教授）との共同研究。
平成29年より2年間、共同研究を行った。マウス移植実験は、両大学（群馬大学と上武大学）における遺伝子組換え実験審査委員会、および、動物実験倫理委員会、の承認のもとに行ったものであり、今後も必要に応じて両大学の委員会の承認を得た上で、共同研究を再開する予定である。その際は、改めて変更申請を行う。

第一回の共同研究の成果として、上記 b. の原著論文を発表した。

- 7、 小児がんについて：小児血液疾患（白血病、リンパ腫等）と固形腫瘍の細胞株や臨床検体を用いて遺伝子解析を共同研究で行い、臨床的意義のある遺伝子マーカーを見出す。これを群馬県小児医療センターと本学、両施設の倫理委員会の承認のもとで行う。
- 8、 今回の申請「がん遺伝子変異の機能解析、および、血管制御システムの様々な疾患における病理的意義の解析（その3）」の内容は、令和2年に承認された「がん遺伝子変異の機能解析、および、血管制御システムの様々な疾患における病理的意義の解析（その2）」と大きな変更はない。