

感 染 防 御 研 究 セ ン タ ー

Research Center for Prevention of Infectious Diseases

感染防御学分野

Division of Molecular Immunology

当部門では従来より、免疫系の発生分化、免疫応答機構の解明と、その異常によって生ずるアレルギー病、自己免疫病、免疫不全症の解明を、免疫学的、分子生物学的、発生工学的手法を駆使して行っている。すなわち、免疫系の分化および免疫応答の機構を、分子レベル及び細胞レベルさらには個体レベルで解析して、免疫細胞の分化および免疫反応の制御機構を解明する研究を推進するとともに、その制御機構の破綻によって生じる自己免疫病、アレルギーの解析と治療法の確立や難治感染症の新しい治療法の開発を目指している。また、免疫学的方法によるヒト癌の診断と治療法の開発についても鋭意、研究を進めている。さらにこれらの疾病の治療法の開発に向けての研究を行っている。また、癌の免疫療法についても新たな視点から研究を推進しており、特に免疫監視機構からの癌の逸脱 (Escape) 機構に関わる我々が見出した新しい分子、RCAS1、の機能の解明に向けて鋭意研究を行っている。免疫細胞の増殖、分化、細胞死の制御機構に関与する分子、遺伝子の同定および機能解析を通してその制御機構の解明を行っている。

2001年(平成13年)度は昨年に引き続き、(1)B細胞抗原受容体からシグナル伝達機構と遺伝子発現制御およびその異常によって発症する自己免疫病の解析にむけての研究、特に、自己抗原反応性の未熟B細胞がアポトーシスにより除去される機構について、抗原受容体からシグナルによって誘導される新規の分子を中心に解析を行っている、(2)プレB細胞受容体およびB細胞抗原受容体からのシグナル伝達機構の解析、(3)我々の研究室で作製されたヒスタミン H1 およびH2受容体遺伝子欠損マウスでの免疫異常の解析、(4)癌抗原の分子生物学的遺伝子学的研究および癌の免疫監視機構からの逸脱に関わる分子、RCAS1の解明、(5)生体適合材料を用いたハイブリッド型人工リンパ節の構築、等を主な研究テーマとして研究を進めた。

2001年(平成13年)における主な人事異動は次のとおりである。平成12年3月には、末松佐知子さんが留学先の米国から新たに、助手として赴任し引き続き研究に従事している。助手の中島 学君も引き続き助手として研究に従事している。平成9年度からのナスリン・バヌーさん、平成10年度からの久原尚子さんは大学院生として研究を続けている。また平成11年4月から前沢 浩君、平成11年5月に MD-PhD コースの学生として入学してきた老耄英毅君が大学院生として研究を続けている。研究補助員の古賀律子さんは引き続き研究を行っている。

A. B細胞の分化と選択に関与するシグナル伝達機構の解析

a. BCR からのシグナルと未熟B細胞のアポトーシス

マウスB細胞株 WEHI-231 を抗 IgM 抗体で架橋すると 24 時間以降にアポトーシスに陥る。この場合、カスパーゼの活性化と DNA の切断が誘導及び細胞膜透過性の亢進を引き起こすことを昨年度に示した。カスパーゼ阻害剤 Z-VAD は核の分画化、DNA 切断を完全に阻止するが、細胞膜透過性の亢進は阻止しない。マウス未熟B細胞

株である WEHI-231 細胞では BCR 刺激後、膜透過性の亢進に先立って、ミトコンドリア膜電位の変化および活性酸素の増加が生ずることを見出した。即ち、BCR からの Death signal はまずミトコンドリアに伝達され、その後にかスパーゼの活性化と DNA 切断及び膜透過性の亢進が生ずると考えられた。即ち、自己反応性未熟B細胞では、抗原受容体からのシグナルはまずミトコンドリアを標的にして伝達され、その後アポトーシス及びネクローシスの反応が引き起こされると考えられた。この系にタンパク合成阻害剤シクロヘキシミドを加えておくと、ミトコンドリア膜電位の変化および活性酸素の増加は60-70%抑制された。抗原受容体からのシグナルによる新たな蛋白の合成が、抗 IgM 抗体の架橋によるアポトーシス誘導には深く関わっていることがわかった。どのような新規タンパクがミトコンドリアをアタックするのかについて、WEHI-231 細胞を抗 IgM 抗体で架橋する前後で、RNA subtraction を行った。すなわち、12時間抗 IgM 抗体で架橋して刺激した WEHI-231 細胞から cDNA library を作製し、ミトコンドリア膜電位の変化を指標として、ミトコンドリア膜をアタックする新規のタンパク分子の探索を行い、5種類以上の新規候補タンパクを同定単離した。その中で iWH37 という cDNA クローンに注目している。iWH37 は WEHI-231 細胞を抗 IgM 抗体で架橋することによりその発現が誘導されること、未熟骨髄B細胞では、抗 IgM 刺激で発現が誘導されること、成熟B細胞ではその発現が抗 IgM 抗体で架橋で強く抑制されること、Flag-tag iWH37 タンパクはミトコンドリアに局在すること、などから、ミトコンドリア膜をアタックする新規のタンパク分子の可能性が高いことから現在、鋭意解析を行っている（古賀律子、渡邊 武）。

b. プレB細胞受容体からのシグナルとB細胞初期分化

マウスプレB細胞をプレB細胞受容体の架橋により刺激すると、36kDa のタンパクがチロシン酸化を受けることを見出した。教室の大屋は、種々の抗体を用いたウエスタンブロットにより、このタンパクが LAT 分子である可能性を示した。LAT 分子はT細胞にのみ発現されるシグナル伝達のアダプター分子として重要であることは、この分子を欠損させたマウスではT細胞分化の障害、T細胞活性化の低下を示すことから明らかである。この分子がプロB細胞、プレB細胞でも発現されていることが見出された。しかし、未熟B細胞以降の成熟B細胞では全く発現されていない。しかもプレB細胞受容体を刺激すると、LAT タンパクの発現は逆に抑制される。すなわち、プレB細胞受容体からのシグナルは LAT の発現に対して負の制御を行う。このような幼若B細胞における LAT 分子の機能とその発現およびプレB細胞受容体シグナルによる発現抑制の意味について研究するために、Ig heavy chain エンハンサーに LAT cDNA を結合させて、LAT 分子をB細胞で発現させたトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスの末梢血を調べたところ、B細胞数が著明に減少していた。リンパ節におけるB細胞数も著しく減少していた。しかし、T細胞数には変化は見られず、胸腺も正常であった。骨髄細胞では、未熟B細胞の減少が著明であったが、プレB細胞数はやや増加していた。残っている末梢のB細胞を、抗 IgM 抗体、LPS で刺激するとその反応は正常であった。異常の結果は、マウスのプロB、プレB細胞に発現している LAT 分子はB細胞初期分化の負の制御分子として働いている可能性が示唆された（大屋和也、渡邊 武）。

B. ヒスタミン H1, H2 受容体遺伝子欠損マウスの作製とこれらの受容体シグナルの免疫反応における役割について

ヒスタミン H1 受容体および H2 受容体は7回膜貫通部位を持ち、三量体型 G-タンパクが共役している受容体である。H1 受容体には特に Gαタンパクとして Gαq サブファミリーが会合していることが報告されている。一方、H2 受容体には Gαs が会合している。

1) ヒスタミン H1 受容体は、平滑筋、心臓その他多くの組織で発現されており、さらに脳中枢にはヒスタミンニューロンが存在し、覚醒、睡眠、食欲、日内リズムなどの制御に関与していることが示唆されている。我々はこれまで、ヒスタミン H1 受容体欠損マウスにおいて日内リズムの異常、行動の異常について報告してきた。一方、ヒスタミン H2 受容体は、胃および脳中枢に発現している。ヒスタミン H2 受容体は胃粘膜細胞、特に壁細胞に多く発現されており、従来より胃酸分泌の促進制御に重要であることが知られている。そこで、H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスにおける胃の変化について調べた。予想に反して、ノックアウトマウスの胃酸度は正常であった。しかし、H2 受容体アンタゴニストには全く反応しなかった。一方、H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスでは、胃壁が異常に厚くなり、趨壁は巨大になり、胃の hypertrophy が著明となった。また、その壁細胞の構造は異常であった。これらの結果から、H2 受容体からのシグナルは、胃酸分泌の制御のみならず、胃壁細胞、ECL 細胞の増殖、構造維持に重要な機能を有していることが初めて明らかになった。6ヶ月から一年ぐらいになると、H2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの胃はさらに巨大となり、胃壁構造は異常となる。さらに血清アルブミン値が低下してくる。これは、ヒトの病気、メネトリエル病に酷似している。

2) 我々は、以前から、アレルギー反応の分子機序および活性アミンの免疫反応への影響を調べる目的で、ヒスタミン受容体欠損マウスの作成とその解析を行ってきた。そこでこのような個体における免疫能および即時型アレルギー反応について解析した。ヒスタミン H1 受容体欠損マウスの T細胞あるいは B細胞をそれぞれ、抗 CD3e 抗体あるいは抗 IgM 抗体で架橋して細胞増殖を誘導させると、wild マウスのそれに比べて細胞増殖反応の低下が見られた。そのような増殖反応の低下はマイトゲンや種々のサイトカイン (IL2, IL4, IL7) や CD40L などの刺激では見られず、抗原受容体からの情報伝達に特異的であった。さらに正常脾細胞よりマスト細胞を除去した後に、抗 CD3e 又は抗 IgM で刺激して生ずる細胞増殖反応はヒスタミンの添加により増強された。H1R 欠損マウスの脾細胞ではそのような増強作用は見られなかった。以上の結果は、三量体型 G-タンパクからのシグナルが抗原受容体からのシグナル伝達に対して正の制御を行っていることを示唆している。

3) さらに、ヘルパー T細胞上のヒスタミン H1, H2 受容体からのシグナルはヘルパー T細胞の活性化に重要な制御機能を果たしていることがわかった。すなわち、Th1 細胞上にはヒスタミン H1 受容体が優位に発現されているが、ヒスタミン H2 受容体の発現は低い。一方、Th2 細胞上には H2 受容体が優位に発現されているが、H1 受容体の発現は低い。Th1 細胞上のヒスタミン H1 受容体からのシグナルは Th1 細胞の活性化に正の制御を行い、IFN γ の産生を増強させる。従って、H1R 欠損マウスの T細胞では、抗原刺激後の IFN γ の産生が非常に低くなる。Th2 細胞の活性化には負の制御をしていることが明らかとなった。一方、ヒスタミン H2 受容体もまた、ヘルパー T細胞上に発現されているが、ヒスタミン H2 受容体からのシグナルは Th2 細胞、Th1 細胞の活性化を抑制し、負の制御を行っていることが示された。すなわち、H2R 欠損マウスの T細胞では、サイトカイン産生がいずれも非常に亢進する。以上の結果から、H1 受容体と H2 受容体が免疫細胞の活性化に対して拮抗的に働いていることがわかった。また、ヒスタミンは即時型アレルギーの初期には発症の引き金となっているが、最終的には、Th1 細胞を

活性化し、Th2 細胞の活性化を抑制することから、アレルギー反応を終息させる効果を持っていることを世界ではじめて示した。

3) 即時型アレルギー反応について調べた。HIR 欠損マウスでは、IgE が引き金となる即時型アレルギー反応は殆ど完全に消失する。一方、ヒスタミン H2 受容体欠損マウスでは即時型アレルギー反応は正常であった。以上の結果から、アレルゲン特異的な IgE 抗体を介するヒスタミンによる初期のアレルギー反応はヒスタミン H1 受容体を介して起こることが明快に示された。

(古賀律子, 渡邊 武)。

C. 癌関連抗原 RCAS-1 の機能の解析と 22-1-1 抗体による癌診断

モノクローナル抗体「22-1-1」が認識する癌関連抗原は、その発現が癌細胞に比較的特異的であること、癌の進展とその発現がパラレルであること、子宮癌、大腸癌、肺癌などでの臨床における5-10年の経過観察から、RCAS1 陽性の癌ではその予後が陰性の場合に比べて悪いこと等がわかってきた。すなわち、「22-1-1」抗体が認識する抗原の発現は癌の進展、悪性度と強い相関関係がある。免疫組織染色法にて 22-1-1 抗原は子宮頸部腺癌以外にも子宮頸部扁平上皮癌、卵巣癌、胃癌、大腸癌、乳癌、食道癌、膵臓癌、皮膚癌等にも高率(70-90%陽性率)に発現している。一方、これらの臓器では、胃腺上皮細胞の正常細胞内が僅かに染色されるのみであった。このように 22-1-1 抗原は広く癌組織に発現している。さらに腫瘍細胞の進達度とその発現の強さが関連していること、本抗原の発現と生存率の関係において抗原陽性例が抗原陰性例と比べて有意に低いこと、さらに臨床的に癌細胞と識別が困難な異形成細胞においてはその発現が認められない点において、この抗原が癌関連抗原分子として非常に興味を持たれる。従って、22-1-1 抗体は新しい腫瘍マーカーとして、癌の免疫学的診断、経過観察、治療等において非常に有用である。

癌患者の血清中にも可溶性の 22-1-1 抗体が結合する抗原、RCAS1、が存在することがわかり、血清中の RCAS1 を測定しうる ELISA を作製してキット化した。肺癌、大腸癌、胆嚢癌、膵臓癌などで、60-70%の陽性率が得られた。特に、膵臓癌では高率に陽性となるが、慢性膵臓炎では陰性であることから、従来より診断に用いられている CA19-9 (慢性膵臓炎でしばしば陽性となる)に比べてもより特異的な腫瘍マーカーであることがわかった。臨床への応用に向けて企業と準備している。

この新しい癌関連抗原分子の機能の解析を目的として、22-1-1 抗体が認識する抗原分子の cDNA の一つは、213個のアミノ酸より成る 23-24kDa のコア蛋白分子 (RCAS-1) をコードしていた。N 末端側に膜貫通部 (N-terminal transmembran segment), C 末端側に coiled-coil 構造が存在する II 型膜蛋白であることが示唆された。Cos7 細胞にて発現させると、40kDa の分子量をもつ膜タンパクとして同定された。さらに、RCAS-1 分子に結合する細胞表面分子 (受容体) の存在が確認された。正常活性化ヒトリンパ球においても受容体の存在が確認された。また、結合分子陽性細胞の一つである K562 細胞を GST-RCAS-1 とともに培養したところ、細胞死が誘導された。このように、癌細胞に特異的に強く発現している抗原分子である RCAS-1 は、その受容体分子を発現しているリンパ球系細胞に細胞死を誘導すること事が示された。このことは、癌細胞の免疫系細胞からの逸脱において RCAS-1 抗原が重要な作用を担っている可能性を示唆している。現在、この細胞死誘導機構の解明を

目的として、受容体遺伝子の単離を試みている。

さらに、最近、マウスの RCAS1 cDNA の単離にも成功した。マウス RCAS1 cDNA をプローブとしてノーザンプロットを行ったところ、胎生初期(7-8日)に強い発現が見られることがわかった。マウスの系を用いて RCAS1 の発生分化における役割についても検討を加える予定である。また、ジーンターゲティングのために、マウスゲノム遺伝子の単離も行い、ターゲティングベクターの構築を行っている。

RCAS1 タンパクの添加により、受容体陽性細胞では、細胞周期の停止が誘導される。ヒト末梢血 T リンパ球を活性化して細胞増殖を誘導しこれに RCAS1 タンパクを添加すると、細胞増殖は早期に停止する。この時、cyclin D3 量が 3-6 時間以内に、9 時間以内に PCNA の量的な著明な減少が見られる。さらに、12 時間後には、高リン酸化 Rb 蛋白の量的減少が認められた。しかし、cyclin B, cyclin E, cdk2, cdk4, p16 (ink4a), p21 (Cip1/Waf1), p27 (Kip1), p57 (Kip2)などは全く変化しない。この cyclin D3 および高リン酸化 Rb 蛋白の減少が RCAS1 による細胞周期停止機構に深く関わっていることが示唆された。現在、受容体の遺伝子の単離、cyclin D3 および高リン酸化 Rb 蛋白の減少を誘導するシグナル伝達系の解明を行っている。

また、造血系細胞における RCAS1 受容体の発現について第三内科の牟田、松島らとの共同研究をおこなった。ヒト末梢血から、造血系幹細胞を分離し、種々のサイトカインを添加すると赤芽球系細胞に分化する。さらに培養を続けると赤血球が生成される。この系において、RCAS1 receptor の発現を検討したところ、分化初期の赤芽球細胞では、90%以上の細胞で RCAS1 receptor の発現がみられた。しかし、赤血球へと分化するに従って、RCAS1 receptor 陽性細胞は減少しついには消失する。この RCAS1 receptor 陽性赤芽球細胞に RCAS1 を添加すると強いアポトーシスが誘導された。また、マクロファージに多くの RCAS1 receptor 陽性赤芽球細胞がロゼットを形成している像が観察された。活性化マクロファージでは、膜上に RCAS1 抗原が発現されることを観察していることと考えあわせると、RCAS1-RCAS1 receptor interaction は、赤芽球の分化、特に大量の赤芽球細胞の細胞死と脱核による赤血球の生成の過程で重役な役割を演じていることが推察された。今後は、RCAS1 およびその受容体の生理学的役割についても研究を推進していく予定である(中島 学, 前沢 浩, 老羽英毅, Nasreen Banu, 渡邊 武)。

D. 人工リンパ節の構築

我々はつぎの3つの目的を持って生体内で機能するハイブリッド型人工リンパ節の構築と臨床への応用を目指している。(1)病原微生物などに対して、特異的に強力、迅速に感染防御能を発揮し、緊急に患者に提供出来る免疫装置の開発、(2)従来よりヒト免疫細胞を試験管内で抗原刺激を行うことにより抗体の産生、キラーT細胞の誘導が行われているが、その効率は良くなく実際に広く臨床的に応用出来るものではない。そこで、体外でも体内でも手軽に使用することが出来、がん細胞(がん抗原)、あるいは毒素や病原性の強い微生物、AIDS などのウイルスなどに対して効率的に迅速で、強力な免疫反応が得られる免疫学的装置の開発、(3)濾胞形成、胚中心形成を試験管内で再現しうるリンパ節様臓器(lymph-noid)の開発、を我々は目指している。ストローマ細胞、生体適合性材料の三次元骨格、種々のケモカイン、サイトカインを構成することにより、人工リンパ節の構築を行っている。(末松佐知子, 渡邊 武)

業績目録

原著論文

M.Jutel, T. Watanabe, S.Klunker, M. Akdis, O.A.R. Thomet, J. Malolepszy,

T. Zak-Nejmark, R.Koga, T. Kobayashi, K. Blser, C.A. Akdis. 2001.

Histamine regulates T cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors.

Nature 413: 420-425.

Z-Li Huang, W-M. Qu, W-D. Li, T. Mochizuki, N. Eguchi, T. Watanabe, Y.

Urade and O. Hayaishi. 2001.

Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 9965-9970..

H.Timmerman and K.Yanai. Elsevier Science B.V.

M. Izumi, Y.Nakanishi, M. Nakashima, N.Hara, and T. Watanabe, 2001.

Expression of tumor associated antigen RCAS1 is significantly correlated with poor prognosis in non small cell lung cancer.

Cancer 92 (2): 446-451.

K. Oshima, K.Muta, M.Nakashima, S.Haraoka, K.Tutiya, J.Suzumiya, C.Kawasaki, T.Watanabe, M.Kikuchi. 2001.

Expression of human tumor-associated antigen RCAS1 in Reed-Sternberg cells in association with Epstein-Barr virus infection. A potential mechanism of immune evasion.

Int. J. Cancer. 93:91-96.

T.Yuasa, M.Ono, T.Watanabe and T.Takai. 2001.

Lyn is essential for Fcγreceptor III-mediated systemic anaphylaxis but not for the Arthus reaction.

J. Exp. Med. 193 (5): 563-571.

T.Watanabe, T.Kobayashi, S.Tonai, Y.Ishihara, R.Koga and S.Okabe. 2001.

Functional and morphological abnormality of gastric mucosa in histamine H2 receptor (H2R)-deficient mice.

In "Histamine Research in the Millenium". p229-p234. Ed. T.Watanabe,

M. Kubokawa, M. Nakashima, T. Yao, K-I. Ito, N. Harada, H. Nawata and T. Watanabe. 2001.

Aberrant intracellular localization of RCAS1 is associated with tumor progression of gastric cancer.

Int. J. Oncology. 19:695-700.

H.Takahashi, H.Iizuka, M.Nakashima, T.Wada, K.Asano, A.Ishida Yamamoto and T.Watanabe. 2001.

RCAS1 antigen is highly expressed in extramammary Paget's disease and in advanced stage squamous cell carcinoma of the skin.

J. Dermat Sci., 26:140-144..

K. Noguchi, M. Enjoji, M.Nakamura, M. Nakashima, H. Nishi, K.Choi, K Taguchi, M.Katoh, K.Shimada, K. Sugimachi, M.Tsuneyoshi, H.Nawata and T. Watanabe. 2001.

Expression of a tumor-associated antigen RCAS1 in hepatocellular carcinoma.

Cancer Letter. 168: 197-202..

T. Matsushima, M.Nakashima, K.Oshima, Y.Abe, J.Nishimura, H.Nawata, T.Watanabe and K.Muta. 2001.

RCAS1: A novel regulator of apoptosis of erythroid progenitor cells.

Blood 96:313-321.

K. Ohshima, M. Nakashima, K. Sonoda, M. Kikuchi and T. Watanabe. 2001.

Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy; the possible role in immune privilege.

Clin. Exp. Immunol. 123: 481-486.

K.Umeoka, N.Sanno, K.Oyama, S.Tahara, R.Kurotani, S.Ikuyama, M.Nakashima, T.Watanabe, RY.Osamura, A.Teramoto. 2001.

Immunohistochemical analysis of RCAS1 in human pituitary adenomas.
Modern Pathology 14: 1232-1236.

T. Masaki, H. Yoshimitsu, S. Chiba, T. Watanabe, and T. Sakata.. 2001.

Targeted disruption of histamine H1 receptor attenuated regulatory effect of leptin on feeding behavior, adiposity and UCP family expression in mice.

Diabetes 50: 385-391.

T. Masaki, H. Yoshimitsu, S. Chiba, T. Watanabe, and T. Sakata. 2001.

Central infusion of histamine reduced fat accumulation and increased UCP family expression in leptin resistant obese mice.

Diabetes 50: 376-384.

感染制御分野

Division of Host Defense

本来、免疫系は病原微生物から宿主を防御する生体防御機構として存在しており、その進化の歴史は感染症の脅威によってつくられてきたといえる。したがって、細菌、寄生虫やウイルスなどの病原微生物の侵入に対する感染防御機構を明らかにすることが、免疫機構の分子基盤の解明につながると考えている。免疫系を感染防御機構ととらえ、それを構成する複雑な要素を解析することによって、免疫機構の分子基盤を整理、再構築し、免疫制御による難治性疾患（感染症、癌、アレルギー、自己免疫疾患、移植拒絶）の先端的治療法の開発をめざす。

A. 自然免疫：Toll-like receptor(TLR)の発現制御およびシグナル伝達機構

Toll は初めショウジョウバエで見つけられた膜貫通性蛋白であるが、その後、植物から哺乳類に至る多くの種で保存され、生体の感染防御に重要な働きを果たしていることが分かってきた。哺乳動物の Toll-like receptors (TLRs)は現在まで 10 種類の報告されて、それぞれの TLR がいろいろな細菌の構成成分をパターン認識することによって、細胞内にシグナルを伝達して感染防御に重要な種々のサイトカインやアクセアリー分子を誘導させることが明らかになりつつある。これら TLR のうち、TLR2 と TLR4 はそれぞれ細菌膜成分リピド A とリポ蛋白を認識する。我々は TLR4 は構成的に osteoblast に発現し、リピド A の刺激で osteoclast differentiation factor(ODF)が産生されることを明らかにした。一方、TLR2 はインタロイキン 15(IL-15)の刺激でその転写が活性化されることを見出した。TLR2 遺伝子のプロモーター領域には 2 つの NfκB 結合部位とその間に STAT 結合部位が存在し、IL-15 刺激では STAT5a の結合と 3' 側に NfκB が結合することが TLR2 転写に重要であることがわかった。

B. 早期誘導免疫：粘膜系 αβ 型 T 細胞の特異性と機能の解析

腸管上皮間には末梢リンパ組織にはみられない CD8αα T リンパ球が存在する。CD8αノックアウトマウスでは 5-FU 投与による内因性感染症に対して高い感受性を示し、CD8α腸管上皮間 T リンパ球の移入によって内因性感染を防御することができた。CD8αノックアウトマウスの腸管上皮間 T リンパ球のインターフェロンγ産生能は有意に低く、また 5FU 投与後の腸管上皮間 T リンパ球の回復は CD8αノックアウトマウスで著しく抑制されていた。これらの結果から、CD8α腸管上皮間 T リンパ球はサイトカインを産生して直接腸管からの細菌の感染防御に働き、また腸管上皮細胞や腸管上皮間 T リンパ球の再生を促進する役割を担っていることが明らかになった。

C. 適応免疫：メモリー T 細胞の産生、維持の分子機構

Mycobacterium tuberculosis や *Listeria monocytogenes* などの細胞内寄生性細菌の感染に対して細胞傷害活性や γ IFN 産生能をもつ Th 1 細胞と Tc 1 細胞が重要な防御機構を担う。初感染で産生された活性化 T 細胞の大部分は菌の排除後にアポトーシスで消滅するが、一部はメモリー型となり、再感染時には迅速にかつ効率よく菌を排除する。しかしながら、メモリー型 T 細胞の産生、維持機構については、いまだに不明の点が多い。インターロイキン 15(IL-15)は、IL-2 と IL-2R β ,C γ 鎖を共有し、NK 細胞や T 細胞の増殖因子として働く。IL-15 ノックアウトマウスや我々の作製した分泌型 IL-15 トランスジェニック (Tg) マウスの解析から、IL-15 は、主にメモリー型 CD8⁺ T 細胞の産生と維持、増殖に重要であることが明らかとなった。さらに IL-15Tg マウスを用いて、IL-15 はメモリータイプの CD8⁺ T 細胞を抗原非特異的に活性化して *L.monocytogenes* に対する初期防御を担うこと、*Mycobacterium bovis* BCG 感染では CD8⁺T 細胞による Tc1 型免疫応答を誘導することを明らかにした。*L.monocytogenes* 由来の CD8⁺T 細胞エピトープ (LLO91-99) と MHC クラス I テトラマーを用いた解析から、IL-15 は Bcl-2 の発現を維持させることによって T 細胞のアポトーシスを抑制し、かつ、細胞分裂を誘導することによってメモリー型 CD8⁺T 細胞を長期にわたって維持すると考えられる。さらに腫瘍に対する IL-15 の役割を検討するために IL-15 Tg mice でのメラノーマの増殖を検討した。その結果、MHC クラス I 陰性メラノーマ、MHC クラス I 陽性メラノーマともに IL-15 Tg mice で増殖が有意に抑制された。抗体除去実験で、MHC クラス I 陰性メラノーマに対してはナチュラルキラー(NK)細胞がおもな防御機構を担っており、MHC クラス I 陽性メラノーマに対しては、NK 細胞と CD8 T 細胞の両方が防御を担っていると考えられた。IL-15 によるメモリー型 T 細胞の産生、維持機構の解明は結核のみならず、マラリア、エイズなどの難治性感染症や癌に対するワクチン/免疫療法の開発へとつながるものと期待される。

業績目録

原著論文

1. Kikuchi, T., Matsuguchi, T., Mitani, A., Tanaka, S., Matsuoka, M., Yamamoto, G., Hishikawa, T.,Noguchi,T., and Yoshikai, Y.: 2001.

Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. J.Immunol. 166:3574-3579.

2. Musikachoen,T., Matsuguchi, T., Kikuchi, Tand Yoshikai, Y. 2001
NF- κ B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression.
J.Immunol . 166:4516-24.
3. Matsuguchi T, Musikachoen,T. and Yoshikai Y. 2001.
A novel MAP kinase phosphatase is an important negative regulator of LPS-mediated JNK activation in mouse macrophage cell lines.
Mol. Cell. Biol. 20:6999-7009., 2001
4. Hara, T., Nishimura, H., and Yoshikai, Y. 2001.
Thymus-dependent modulation of Ly49 inhibitory receptor expression on NK1.1+ γ δ T cells.
Immunology 102 : 24-30.
5. Ishimitsu, R., Nishimura, H., Yajima, T., Watase, T., Kawauchi, H., and Yoshikai, Y. 2001
Overexpression of Interleukin-15 in vivo enhances Tc1 response which inhibits allergic inflammation in a murine model of asthma.
J. Immunol.166:1991-2001.
6. Nishimura, H., Tagaya, M., Tsunobuchi, H., Suzuki, H., Nakashima, I., and Yoshikai, Y. 2001.
Mice lacking IL-2/ IL-15 receptor α chain are susceptible but mice lacking IL-2 are resistant to infection with avirulent Salmonella choleraesuis.
Infect. Immun. 69:1226-1229.
7. Umemura,M., Wajjwalku,W., Hirose,K, Emoto,M., Nishimura,H., Matsuguchi,T., Gotoh,Y, Takahashi,M., Makino,M. and Yoshikai,Y. 2001.
Impaired IL-15 production in murine AIDS mice might underlie susceptibility to mycobacterial infection.

J.Leuko.Biol. 69:138-148.

8. Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Yamamura, K., Watase, T., D. H. Busch, E. G. Pamer, Kuwano, H., and Yoshikai, Y. 2001.
Memory phenotype CD8+T cells increased in IL-15 transgenic mice are involved in early protection against a primary infection with *Listeria monocytogenes*.
Eur. J. Immunol. 31, 757-766, 2001.
9. Ishimitsu, R., Nishimura, H., Kawauchi, H., Kawakita, T., and Yoshikai, Y. :2001.
Dichotomous effect of a traditional Japanese medicine, Bu-zhong-yi-qi-tang on allergic asthma in mice.
Int.Immunopharmac. 1:857-865.
10. Umemura, M., Nishimura, H., Hirose, K., Matsuguchi, T., and Yoshikai, Y. 2001.
Overexpression of IL-15 in vivo induces a predominant Tc1 response in mice inoculated with *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin infection.
J.Immunol. 167:946-956.
11. Masuda, A., Matsuguchi, T., Yamaki, K., Hayakawa, T., and Yoshikai Y. 2001.
Interleukin-15 prevents mouse mast cells from apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL Expression
J.Biol. Chem. 276:26107-26113.
12. Kato, M., Matsuguchi T., Furukawa T., Kinukawa, T., Ono Y., Ohshima S., and Yoshikai Y., 2001.
Downregulation of CD28 on CD4+ T cells might be involved in long term allograft acceptance in living kidney transplant patients.
Hum Immunol, 62:1335-1345.

13. Ishiguro, K., Kadomatsu, K., Kojima, T., Muramatsu, H., Iwase, M., Yoshikai, Y., Yanada, M., Yamamoto, K., Matsushita, T., Nishimura, M., Kusugami, K., Saito, H., and Muramatsu, T. 2001.
Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice.
J.Biol. Chem. 276:47483-47488.
14. Arai T, Yoshikai Y, Kamiya J, Nagino M, Uesaka K, Yuasa N, Oda K, Sano T, Nimura Y. 2001
Bilirubin impairs bactericidal activity of neutrophils through an antioxidant mechanism in vitro.
J Surg Res. 96:107-13.
15. Uchimura, K., Kadomatsu, K., Nishimura, H., Muramatsu, H., Nakamura, E., Kurosawa, N., Habuchi, O., El-Fasakhany, F. M., Yoshikai, Y., and Muramatsu, T. 2002.
Functional analysis of the chondroitin 6-sulfotransferase gene in relation to lymphocyte subpopulations, brain development and oversulfated chondroitin sulfates.
J. Biol. Chem. , 277: 1443-1450.
16. Murosaki S., Muroyama K, Yamamoto Y, Liu T., and Yoshikai Y. 2002. Nigerooligosaccharides augment natural killer activity of hepatic mononuclear cells in mice.
Int.Immunopharmac.2:151-159.
17. Yajima, T., Nishimura, H., Ishimitsu, R., Watase, T., Busch, D.H, Pamer, E.G., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. 2002.
Overexpression of IL-15 *in vivo* Increases antigen-driven memory CD8+T cells following a microbe exposure
J. Immunol. 168:1198-203.

18. Itoh, N. Nishimura, H., Matsuguchi, T., Mokuno, Y., Nimura, Y., and Yoshikai, Y. 2002.
Increased susceptibility to endogenous infection in CD8 α -deficient mice following administration of 5-fluorouracil.
Clin. Diagn. Lab. Immun., 9:550-7.
19. Yajima, T., Nishimura, H., Wajjwalku, W., Harada, M., Kuwano, H., and Yoshikai, Y. 2002. Overexpression of interleukin-15 in vivo enhances anti-tumor activity against MHC class I-negative and -positive B16 melanoma through augmented NK activity or Ag-specific cytotoxic T cell responses. Int.J. Cancer, 99(4):573-8.
20. Hasegawa, T., Matsuguchi, T., Noda K, Tanaka, K., Shoyama, Y., and Yoshikai, Y. 2002.
Toll-like receptor 2 (TLR2) is at least partly involved in anti-tumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*
Int. Immunopharmac., 2: 579-589.
21. Matsuzaki G, Yamada H, Kishihara K, Yoshikai Y, Nomoto K. 2002.
Mechanism of murine V γ 1+ γ δ T cell-mediated innate immune response against *Listeria monocytogenes* infection.
Eur J Immunol.32:928-35.
22. Shimizu, H., Matsuguchi, T., Fukuda, Y., Nakano, I., Hayakawa, T., Takeuchi, O., Akira, S., and Yoshikai, Y. 2002
Toll-like receptor 2 contributes to liver injury induced by *Salmonella* infection through Fas ligand expression on NKT cells in mice.
Gastroenterology, in press.
23. Masuda, A., Yoshikai, Y., Aiba, K. and Matsuguchi T. 2002.

Th2 cytokine production from Mast cells is directly induced by LPS and distinctly regulated by JNK and p38 pathways.

J.Immunol in press

24. Tsuboi,N., Yoshikai, Y., Matsuo,S., Kikuchi,T., Iwami,K., Nagai, Y., Takeuchi, O., Akira, S., and Matsuguchi , T.
Roles of Toll-like Receptors in C-C Chemokine Production by Renal Tubular Epithelial Cells.

J.Immunol in press

25. Umemura M, Nishimura H., Yajima T., Wajjwalku W, Matsuguchi T., Takahashi M, Nishiyama Y, Makino M, Nagai Y., and Yoshikai Y. 2002.
Overexpression of interleukin 15 prevents the development of murine retrovirus-induced acquired immunodeficiency syndrome

FASBJ in press

総説

1. Yoshikai Y. 2001.
The role of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection Curr. Opin. Infect. Disease 14:257-264.
2. 吉開泰信. 2001.
感染症における $\gamma\delta$ T細胞の時空的多様性
医学のあゆみ 199,65-70.
3. 吉開泰信. 2001.
IL-15 を介した Th1/Th2 バランスの制御と感染症
Molecular Medicine, 38, 1408-1415.
4. 吉開泰信. 2001.
21世紀の医学、医療を展望して『21世紀の免疫学研究とその医療への応用』
現代医学, 49, 25-27.
5. 吉開泰信. 2001.
IL-15 アイソフォームと免疫反応
免疫 Immunology Frontier 11. 160-165.

6. 菊池毅、松口徹也、吉開泰信. 2001.
LPS による骨吸収の機序.
臨床免疫, 36, 917-923.
7. 吉開泰信. 2001.
Innate immunity の分子基盤
現代医療, 33,910-916.
8. 吉開泰信. 2002.
免疫系とストレス蛋白質
最新医学, 57, 499-504.
9. 吉開泰信. 2002.
メモリー型 T 細胞と感染症
Molecular Medicine, 39, 202-208.

著書

1. 吉開泰信. 2002.
粘膜免疫と感染症
粘膜免疫学の最前線(吉開泰信編), pp. 42-56,
医薬ジャーナル社, 東京.

学会発表

1. 増田章男, 松口徹也, 山本健市, 吉開泰信 (2001, 12/11-12/13).
マスト細胞に発現される TLR ファミリーとアレルギー病態形成における意義.
第 31 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪.
2. MUSIKACHROEN Tipayaratn, MATSUGUCHI Tetsuya, KUBO Masato, YOSHIKAI
Ysunobu(2001,12/11-12/13).
MKP-M, a novel dual specificity phosphatase, ma be involved in the
regulation of Th1/Th2 differentiation.
第 31 回日本免疫学総会・学術集会, 大阪.
3. 広松孝, 矢島俊樹, 西村仁志, 二村雄次, 吉開泰信 (2001, 12/11—12/13).
IL-15 Tg マウスは大腸菌敗血症に対して抵抗性を示す
第 31 回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪.
4. 藤本淳司, 西村仁志, 矢島俊樹, 松口徹也, 吉開泰信 (2001, 12/11-12/13).

- 非分泌型インターロイキン15はIL-15遺伝子転写活性を抑制する。
第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪。
杉本憲治, 松口徹也, 吉開泰信 (2001, 12/11-12/13).
5. 14-3-3 蛋白の Toll-like receptor 4 細胞内ドメインとの結合と LPS 下流シグナルの抑制。
第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪。
6. 菊池毅, 松口徹也, 杉本憲治, ムシカチャルンティバヤラ, 三谷章雄, 野口俊英, 吉開泰信, 三好淳 (2001, 12/11-12/13).
骨芽細胞での LPS 誘導性 ELK 活性化および RANKL 発現における Cot/Tp12 活性化の役割。
第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪。
7. 劉鉄, 松口徹也, 坪井毅, 矢島俊樹, 吉開泰信 (2001, 12/11-12/13).
樹状細胞における Toll-like receptor 発現と IL-12/MCP-1 産性能のマウス系統差の検討。
第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪。
8. 矢島俊樹, 西村仁志, 桑野博行, 吉開泰信 (2001, 12/11-12/13).
抗原特異的メモリー CD8T 細胞の形成と維持における IL-15 の役割—分泌型及び非分泌型 IL-15 トランスジェニックマウスを用いて—
第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪
9. 山本玄太, 松口徹也, 三谷章雄, 田中繁寿, 西村仁志, 竹内理, 審良静男, 野口俊英, 吉開泰信 (2001, 12/11-12/13).
Listeria monocytogenes 経口感染マウスにおける腸管上皮細胞の初期免疫誘導での役割。
第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪。
10. 石光亮太郎, 西村仁志, 川内秀之, 谷口克, 吉開泰信 (2001, 12/11-12/13).
プロスタグランジン E による経口免疫寛容の破綻。
第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪。
11. 坪井直毅, 松口徹也, 松尾清一, 竹内理, 審良静男, 吉開泰信 (2001, 12/11-12/13).
腎尿細管上皮細胞からのケモカイン産生における TLR シグナル伝達機構の解析。
第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪。
12. 梅村正幸, 西村仁志, 松口徹也, 牧野正彦, 須田貴司, 吉開泰信 (2001, 12/11-12/13).
IL-15 はマウス後天性免疫不全症候群の病態の進展を抑制する。

第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪.

13. 吉開泰信, 矢島俊樹, 石川紀美香, 梅村正幸, 西村仁志, 松口徹也 (2002, 4/3-4/5).
細胞内寄生菌に対する免疫記憶の形成機構.

第75回日本細菌学会総会,

14. 松口徹也, Tipayaratn Musikacharoen, 吉開泰信 (2002, 4/3-4/5).
Toll Like Receptor4(TLR4)の新たな下流シグナル伝達分子の解析.

第75回日本細菌学会総会, 横浜.

15. 矢島俊樹, 西村仁志, 桑野博行, 吉開泰信 (2002, 4/3-4/5).
BCG感染マウス肝障害モデルにおけるメモリータイプCD8T細胞の役割.

第75回日本細菌学会総会, 横浜.

16. 矢島俊樹, 西村仁志, 桑野博行, 吉開泰信 (2001, 8/24-8/25).

抗原特異的メモリーCD8T細胞の形成と維持におけるIL-15の役割.

第12回日本生体防御学会, 京都.

ワクチン開発構造生物学分野

Division of Structural Biology

新設されたワクチン開発構造生物学の教授として神田 大輔 博士（生物分子工学研究所・構造解析研究部門・NMR グループ・主席研究員）を選出した。2002年4月1日より着任予定である。

微生物ゲノム情報学

Division of Functional Genomics

微生物ゲノム情報学分野は平成 14 年 3 月より生体防御医学研究所に新設された。主な研究分野はゲノム科学の中の、遺伝子機能解析、遺伝子発現解析、遺伝子情報解析（バイオインフォマティクス）である。

当分野の研究の開始は 1990 年頃に遡り、当時ヒトゲノム解読計画が本格的にスタートした時期に、ゲノムの機能的側面である遺伝子発現を、cDNA のランダムシーケンスによって解析し、以降の EST 解析に大きな役割を果たした。特に、細胞における多数の遺伝子の状態を、発現量の多いものから順に記載したリストを作製し、遺伝子発現プロファイルという考え方を定着させた。その後、種々の細胞や組織から、遺伝子発現プロファイルを集めることにより、各々の細胞ではどういった遺伝子が最も活発に働いているのか、また A では働くが B では発現していない遺伝子は何か、疾患に関連して発現量が変わる遺伝子は何かといった問題の解析を次々と行った。ヒト及びマウス合わせて約 100 種以上のサンプルから得られた約 3 万 5 千遺伝子のデータは、遺伝子発現データベース BodyMap として公開している。現在は、シーケンスによらない、PCR を用いた遺伝子発現比較解析法、iAFLP を用いて引き続き遺伝子発現の解析を行っている。

しかしながら、膨大なゲノム情報、そこにコードされる遺伝子発現の情報、さらにタンパク質の構造と働きに関する情報は、もはや上記のようなウェットの実験のみでは全貌を眺め解釈することは不可能になりつつある。情報が大量に溢れる中から重要な物のみを抽出する作業はコンピュータ無しには実現できない。このようなポストゲノム時代の重要課題に対して、数学的統計的手法を用いて解決する研究を行っている。

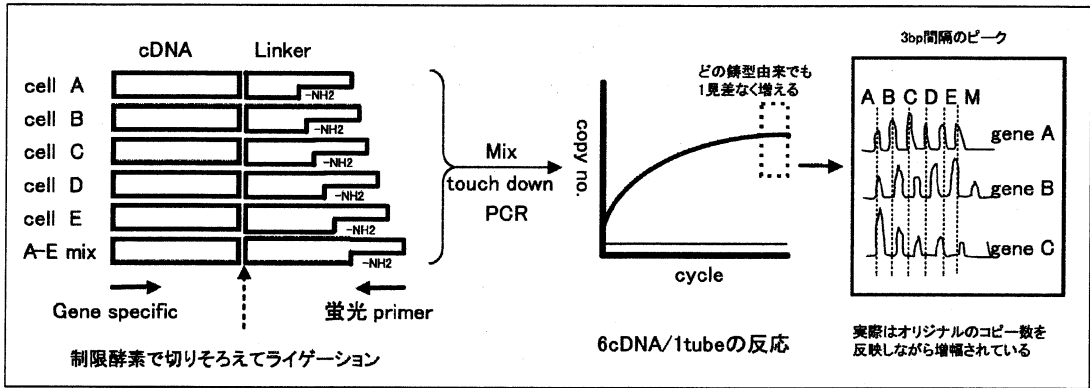
当分野開始時のメンバーは次のとおりである。教授の大久保公策は、平成 14 年 3 月 1 日付けで大阪大学細胞生体工学センター・染色体構造機能研究分野・助教授から当分野教授として着任した。同じく助手の川本祥子も大阪大学・助手より平成 14 年 4 月 1 日付けで当研究所に移動となった。同じく学術振興会特別研究員 (PD) の足立仁も大阪大学より移動となった。平成 14 年 5 月 1 日、研究生として尾辻真紀子が入学。企業からの研究協力メンバーとして (株)日立ソフト、峰崎雄一は同じく阪大から、平成 14 年 7 月からは (株)シーズ・ラボ、久末和代が加わった。教授の大久保は、平成 12 年度より産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター・発現頻度解析チームのチームリーダーを兼任している。当分野、平成 13 年度の研究は、文部省特定領域研究 (C) ゲノム医学から代表課題「遺伝子発現を基礎とする病態機序の解明」として研究費のサポートを受けた。

A. iAFLP 法による遺伝子発現情報の解析

a. iAFLP 法の原理

PCR 法による遺伝子の発現定量は、ノザンプロットティングに比べ簡単な操作でかつ少量の RNA で確認することができる方法である。一般的には 1 組織由来の cDNA に対し 1 遺伝子 1 回の PCR 反応で発現の有無を確認することができるが、単純に PCR サイクルを回すだけでは発現量を比較できないので、定量のためには、より煩雑な競合 PCR 法やリアルタイム PCR 法によらねばならない。テストする遺伝子数が少ない時には、これ

らの方法で十分な結果が得られるが、多数の遺伝子を同時に測定したい場合には不向きである。そこで我々は、1回のPCR反応で複数のPCR産物の相対量を比較する方法 iAFLP法を開発した(図A. 1)。



図A.1 iAFLP (introduced Amplified Fragment Length Polymorphism) 法の概略

合成されたcDNAをMbolで切断し遺伝子のpolyA側の断片に、3bpずつ長さの異なるリンカーをライゲーションする。次に全てのcDNAを同じチューブに等量ずつ混合したものを鑄型にしてPCRを行う。各Ampliconは、長さの違いを出すための部分以外は同じ配列であるため増幅率に差が無く、競合PCRの原理が働き、鑄型比に応じて目的産物が増幅される。シーケンサを用いて分離するとピークの高さの差として検出される。

この方法によれば、1反応につき5組織由来のcDNAが比較できる。一般に普及している96wellのPCR装置とシーケンサを用いれば、1回の実験で96遺伝子X5組織分の発現比較が可能となる。ただし、得られるデータは5組織間でのcDNA量の相対比であるのでピーク高が発現を定量的に表すものではない。大規模発現解析の技術としては、マイクロアレイ法が最も盛んに行われている。マイクロアレイはハイブリダイゼーションによりシグナルを検出、増減を比較する方法であることから、一度の実験で多数の情報が得られることが特徴である。一方iAFLP法はPCRによって得られるバンドの有無によって、実験の成否がはっきりしていることが特徴である(ハイブリダイゼーションの場合は、某かのシグナルが得られるためquality controlをしっかりと置かなければならない)。また数十から数百遺伝子単位で、確実に発現情報をとりたい場合などにも適した方法である。

b. iAFLP法による正常皮膚及び乾癬における遺伝子発現の解析

我々は本法を用いて、種々の疾患における遺伝子発現プロファイルの解析を行っている。ここでは皮膚疾患である乾癬(psoriasis)における結果を報告する。乾癬は皮膚の慢性炎症性角化疾患で、欧米で多いとされているが、最近では日本国内でも増加している慢性の難治性皮膚疾患の一つである。症状は皮膚に赤い皮疹が現れ、表面には白く乾燥した鱗屑と言う厚い垢が附着するのが特徴で、かゆみは一般的には強くないと言われている。患部の皮膚では、表皮の角層と有棘層が厚くなり、炎症をおこす細胞が集まる組織像が見られる。乾癬の原因ははっきりしておらず、ストレス等の環境要因や免疫機構の異常なども関係していると考えられている。現在治療はステロイド外用薬の他に、ビタミンD誘導体外用剤等が効果を上げている。当研究室では、大垣市民病院皮膚科、清島真理子博士、田辺製薬との共同研究により、この未解明の皮膚疾患の病態を遺伝子発現を通じて解析することとした。実験は主に、京都府立医大・眼科の川崎諭博士が行った。

皮膚で働く遺伝子のみを効率的に調べるために、iAFLP に先だって、正常皮膚サンプル及び、乾癬サンプルからそれぞれ 7866, 6091 件の 3'EST を収集し、遺伝子発現プロファイルを解析した。乾癬の列で示す数字は 6091 個の EST 中、何回その遺伝子が出現したかを表わしている (表 A. 1)。正常皮膚とともに皮膚の初代培養細胞から収集した (1701 EST) データも併記した。EST による解析からも、乾癬においては炎症と角化が激しく起きていることがわかる。次にこれら EST 配列を元に、図 A.1 に示した GeneSpecific primer・遺伝子特異的プライマを設計、GenBank 登録の RefSeq から設計した遺伝子プライマとあわせて約 8 千遺伝子の発現情報を解析した。解析サンプルは乾癬 14 例、アトピー性皮膚炎 2 例、菌状息肉症 3 例、正常 7 例。乾癬のうち 4 例に関しては、遠隔正常部もサンプルに加えた。

表A. 1 乾癬の遺伝子発現プロファイル

gene signature	乾癬	正常皮膚	皮膚培養	GenBank	Definition
(乾癬の発現 profile 上位)					
1372	74	0	0	M21064	migration inhibitory factor-related protein 14
20893	71	3	0	M86757	psoriasin
5738	64	29	14	J00124	50 kDa type I epidermal keratin
9039	61	2	0	M21302	small proline rich protein (sprl1)
5780	55	2	3	L42601	56kD Typell/keratin 6 isoform K6c (KRT6C)
20905	47	0	0	Z18538	skin-derived antileukoproteinase
3324	37	9	0	X05978	radiated keratinocyte cysteine protease inhibitor
20924	35	6	0	L42592	keratin 6 isoform K6b (KRT6B)
20906	31	0	0	Z71389	skin-antimicrobial-peptide 1 (SAP1).
20912	30	31	0		
20918	27	21	0	M98776	keratin 1
(正常皮膚の発現 profile 上位)					
418	5	45	0	U09953	ribosomal protein L9
20959	3	42	0		
650	14	41	1	X69150	ribosomal protein S18
336	18	40	1	Z12962	ribosomal protein L41
743	15	39	2	U14973	ribosomal protein S29
543	13	39	2	X56932	23 kD highly basic protein
211	10	36	1	X67247	ribosomal protein S8
273	16	34	3	X16064	translationally controlled tumor protein
500	10	34	1	D14530	ribosomal protein S28
5738	64	29	14	J00124	50 kDa type I epidermal keratin

データ解析は iAFLP で得られた 30 サンプル×8000 遺伝子データを、全てに共通な 6 番目のピークの数字で平均化し、得られた数値で距離を算出、階層的クラスタリング法によりクラスター分析を行った。その結果、乾癬で発現が上昇しているクラスター、及び減少しているクラスターを分類することができた。乾癬で発現が上昇す

る遺伝子群には、defensin, psoriasin, keratin6 といった乾癬で著明に増加することで知られている遺伝子の他、keratin16, 17, 炎症に関係する, lipocarin2, granzymeB, その他, tissue-plasminogen activator, histidine ammonia-lyase, integrin a5 がそれらと同様の発現パターンを示した。一方, 上皮の分化マーカーの一つ loricrin, さらに adherens junction に局在する beta catenin は乾癬で発現が低下していることがわかった。分化した皮膚に存在する keratin2, 15 も発現低下グループにクラスタされた。これらのデータから、乾癬の皮膚では真皮から表皮へと続く規則正しい重層構造が崩れ、不規則な増殖と炎症が起きていることがわかる。また、脂肪酸β酸化系律速酵素 acetyl-CoA dehydrogenase, リソソーム酵素 Cathepsin, 数種の蛋白分解酵素も乾癬で低いパターンを示した。これら酵素の異常は乾癬の特徴である皮膚の角化と炎症の原因や進行に関わる変化として注目すべき点である。以上のように乾癬の組織学的な所見と遺伝子発現プロファイルは非常によく一致するとともに、詳しい病態を明らかにすることができた。現在これらの中からさらに乾癬に関連のある遺伝子を同定中である。一つの試みとして川崎らは、乾癬のうち 5 例に関して皮疹部の中心から外側に 5 つの部分に分けて mRNA を抽出し、皮疹部と乾癬周囲の正常部における発現の差に注目して解析を行った。その結果、乾癬でない患者の皮膚では発現が低いにも関わらず、乾癬周辺部の正常部で発現が高いタイプの遺伝子を発見した。さらにこの遺伝子は乾癬患者の遠隔非病変部での発現も高いことが確認され、乾癬の発症の保因の一つではないかと推測された。primer 番号 HP00161 のこの遺伝子は zinc finger motif を持ち、染色体 20 番上にコードされる遺伝子であることが半明、解析を進行中である。

c. 発現プロファイルの解析と新しい知識発見法の開発

ここまで述べてきた発現プロファイルの解析は、得られた遺伝子発現情報の中から、ほんの一部のデータを、これまでの知見に照らし合わせて解釈可能なものにアプローチしたに過ぎない。ゲノム配列から得られるデータ、アミノ酸配列から得られるデータ等を取りこみつつ、文献情報を加味し、全体像を見て、新たな知識のクラスタを発見するためには全く新しい手法を開発しなければならない。次に、現在直面しつつある、ポストゲノム時代のデータの諸問題と、解釈の方法について解説する。

B. 新しい知識発見の方法

a. 始めに：ゲノム科学データの特徴

ゲノム科学は新しい測定手法の開発と機械化によるゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームの高速高精度測定を特徴としている。3つのオームの測定を通じて遺伝子・蛋白という生体構成単位に様々な特徴値(数値データ、またはパタンデータ)を与えるが、個々の分子データとオームデータの異なる点は大多数の要素に比較可能なデータを与えることで要素間の関係を求めることが出来、要素群の構造データを与える点である。ゲノム科学が生み出すデータからの専門知識の発見とは、遺伝子蛋白群がつくる構造のなかに説明可能な部分を探し、知識と対応するデータモチーフを見つける作業である。

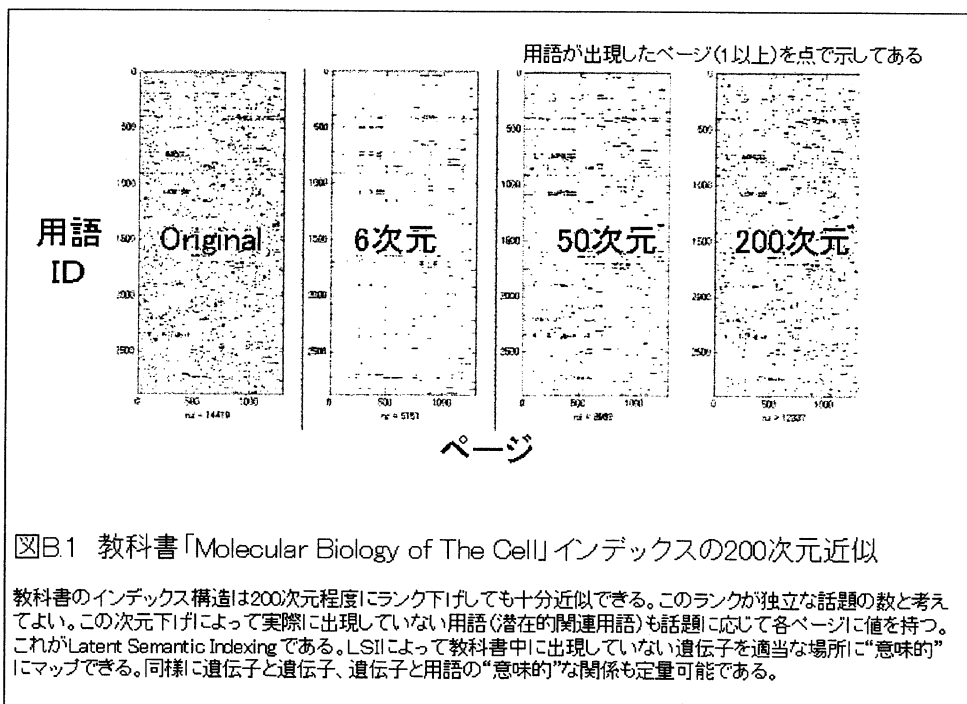
b. モチベーション：データ洪水

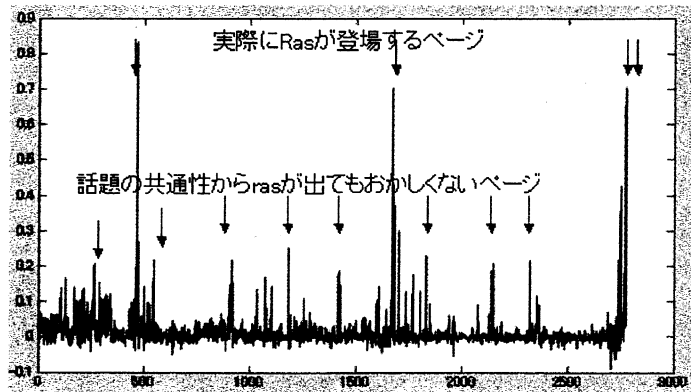
最近しばしば指摘されるデータ洪水とはデータ量に見合った知識が出ない状況を指している。一般にデータ洪水の解消には、データ整理・保存・共有・DB化(Data Management)と数値データとしての解析法の確立(Data

analysis) そしてドメイン的知識を見つける (Interpretation) の3つが全て効率よく行われなければならない。特に医学的解釈は専門家のみ領域と信じられておりデータ洪水解消のための難関である。医学知識表現を明示的に行うことが解釈を機械化する第一歩であるが、これを宣言的に行う方法はジーンオントロジーとして最近注目を集めている。しかし専門家による知識の宣言には多くの労力と調整努力を要し、知識の更新に従って永久に続く宣言の更新作業が必要になるなどの問題点も指摘されている。

c. 機械学習による機械的解釈法：BOB

ゲノム科学でのデータ解釈は一般化するとデータ内にある要素関係に既存の知識で説明できる部分を探すという行為である。例えばゲノム上のオペロンの検出や発現クラスタの解釈phylogenetic profileの解釈や蛋白間の結合データの解釈に全て共通である。これは測定データ集合が作る遺伝子列または遺伝子群が与えられたときにそれらに共通の機能的な特徴を探すことである。従って、解釈は遺伝子間の知識中での機能的な距離をあらかじめ教育しておけば機械にも可能な行為であり、機械的解釈の一番の問題は「どうやって機能的関係を定義しそれを機械に学習させるか」という点である。本年度構築を進めたBOBはベクター空間モデルと行列のランク下げによる特徴抽出を用いて①教科書からの小分野別基本用語の収集と構造化②遺伝子機能の文献データをを用いたベクター表現③分野別の基本用語関係空間への遺伝子ベクターの写像の3つの工程によって小分野別の観点からみた遺伝子の相関構造を100次元の高次元空間で表現するシステムである。(図B. 1)(図B. 2)





図B2 SwissProtから作ったH-rasベクトルと200次元近似Cellのページの余弦分布

実際にはrasが現れないページやrasの説明で使用されていない用語のみのページにも話題の共通性に応じて高い余弦を示している。このように機能説明の内容の共通性により遺伝子間の関係や遺伝子と用語、話題の関係が求められる

BOB を用いれば測定データがつくる遺伝子系構造に知識的なクラスタを探す方法で、定量的に説明可能部分を検出し、さらに分野空間を用いてクラスタに適当な言語表現を与えることができる。

なお本研究は産業技術総合研究所・生物情報解析センターの日紫喜光良博士、NTT 基礎研究所・前田英作博士のグループとの共同研究である。

業績目録

原著論文

1. Saito K, Tanaka T, Kanda H, Ebisuno Y, Izawa D, Kawamoto S, Okubo K, Miyasaka M. 2002 Gene expression profiling of mucosal addressin cell adhesion molecule-1+ high endothelial venule cells (HEV) and identification of a leucine-rich HEV glycoprotein as a HEV marker. *J. Immunol.* 168(3), 1050-1059.
2. Soejima H, Kawamoto S, Akai J, Miyoshi O, Arai Y, Morohka T, Matsuo S, Niikawa N, Kimura A, Okubo K, Mukai T. 2001 Isolation of novel heart-specific genes using the BodyMap database. *Genomics*, 74, 115-120.

3. Dota A, Nishida K, Adachi W, Nakamura T, Koizumi N, Kawamoto S, Okubo K, Kinoshita S. 2001.
An expression profile of active genes in human conjunctival epithelium.
Exp. Eye Res. , 72, 235-241.
4. Sese J. , Nikaidou H. , Minesaki Y. , Kawamoto S. , Morishita S. , Okubo K. ,
BodyMap incorporated iAFLP data and Gene Ranking System.
Nucleic Acids Res. , 29, 156-158.
5. Suzuki Y, Taira H, Tsunoda T, Mizushima-Sugano J, Sese J, Hata H, Ota T, Isogai T, Tanaka T, Morishita S, Okubo K, Sakaki Y, Nakamura Y, Suyama A, Sugano S. 2001
Diverse transcriptional initiation revealed by fine, large-scale mapping of mRNA start sites.
EMBO Rep 2(5) pp. 388-393
6. Suzuki Y, Tsunoda T, Sese J, Taira H, Mizushima-Sugano J, Hata H, Ota T, Isogai T, Tanaka T, Nakamura Y, Suyama A, Sakaki Y, Morishita S, Okubo K, Sugano S. 2001
Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes.
Genome Res. , 11, pp 677-684.

総説

1. Kinoshita S. , Adachi W. , Sotozono C. , Nishida K. , Yokoi N. , Quantock A. , Okubo K. 2001
Characteristics of the human ocular surface epithelium.
Prog Retin Eye Res. , 20, 639-673.
2. 川本祥子, 大久保公策 2001
BodyMapによるヒト遺伝子発現プロファイル
バイオベンチャー, 1. 97-101.
3. 川崎諭, 大久保公策 2001

遺伝子発現定量 測定法からデータ解釈

蛋白質核酸酵素, 46 ゲノムサイエンスの新たなる挑戦

著書

1. Okubo K , Hishiki T. 2001
Knowledge Discovery from transcriptome In Introduction to Bioinformatics. (S. A. Krawetz ed.) Humana Press
2. 大久保公策 (菅野純夫編)
遺伝子の絶対発現量プロファイル
ゲノム医科学がわかる 羊土社 2001
3. 大久保公策, (松原謙一編)
医学知識を機械に伝える, 「ポストシーケンスのゲノム科学」
中山書店, pp134-143, 2000
4. 大久保公策, (松原謙一編)
トランスクリプトームを支配する法則, 「ポストシーケンスのゲノム科学」
中山書店 pp144-150, 2000

学会発表

1. 大久保公策 (平成 13 年 8 月 22 日)
遺伝子発現を基礎とする病態機序の解明
文部科学省・特定領域研究「ゲノム」合同班会議 神戸
2. 大久保公策 (平成 13 年 10 月 18 日)
ゲノム科学データからの知識発見
第 16 回日本整形外科学会基礎学術集会・教育講演, 広島
3. 大久保公策 (平成 13 年 9 月 1 日)
ゲノム科学データからの知識発見
日本乾癬学会学術大会・教育講演, 幕張
4. 大久保公策 (平成 13 年 10 月 15 日)

Knowledge discovery from human transcriptome

生物情報解析研究センター・開所記念国際シンポジウム, お台場

5. 日紫喜光良, 峰崎雄一, 田村卓, 山下巖, 山口大輔, 大久保公策(平成12月3年19日)

医学知識を計算するしくみ: BOB

第24回日本分子生物学会

6. 大久保公策(平成13年12月26-29)

JST 異分野交流フォーラム・ゲノムと言語 大磯

オーガナイザー

防御分子構築学分野

Division of Functional Protein Molecular Biology

疾患特異的な蛋白質の同定及び発現定量に関する方法論の研究、及びそれらを用いて病気と関わる細胞内機械の動的なメカニズムを明らかにするために蛋白質複合体のアクセサリ蛋白質の同定とそれらの機能に関する研究をおこなっている。

A. 疾患特異的な機能タンパク質同定に関する研究

a. 同位体コード・アフィニティータグ (ICAT) 法及び質量タグ (MS-tag) 法による高感度脱染色定量法の研究

2次元電気泳動ゲル(2-DE)による蛋白質の発現ディスプレイが現在でも多くプロテオーム解析に用いられている。然しながら、見ることでできる蛋白質が可溶化成分に限られることや、ひとつの染色スポットから多数の異なった蛋白質が質量分析などで明らかになり、分解能が思ったより少ないことが知られてきた。また、どの成分が増大しているかも染色法では知ることができない。当研究室では、より汎用性と検出感度の広い脱ゲルプロテオミクスの基本技術の確立に関する研究をしている。すでに、ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) による発現定量を実現している (図1)。また、対象試料をトリプシンで全消化して得たペプチド断片のC末端リジン基に特異的な修飾を行い、定量と翻訳後修飾の同定の両情報を一度に可能とするMS-tag法も開発している。このような方法により疾患特異的な機能蛋白質の同定や細胞周期での蛋白質の動的な挙動を翻訳後修飾の変化を含めた定量解析に適用し、細胞内分子機械の機能の解明に用いている。

b. 1-D SDS PAGE によるタンパク質一斉 (ショットガン) 解析

ゲノムの機能発現の本態としての蛋白質分子群に関する総合情報はプロテオームと呼ばれており、その発現レベルの包括的な定量・動態解析は、細胞の発生や老化などの現象を分子レベルで理解する上での新たな情報を提供することが期待されている。上記の目的のために現在まで広く用いられている技術が、二次元電気泳動 (2-DE) ゲルの染色画像の比較による‘ディファレンシャルディスプレイ’である。前述したように、2-DEには分離の再現性、検出感度や膜蛋白質の溶解性などに関して多くの問題を抱えており、その複雑な染色パターンは客観的で迅速な解析を困難にしている。医薬などの産業分野では、疾患マーカーや創薬の標的分子の効率的なスクリーニングのために、より簡便で処理能の高い解析システムの開発が求められている。

ICAT Strategy

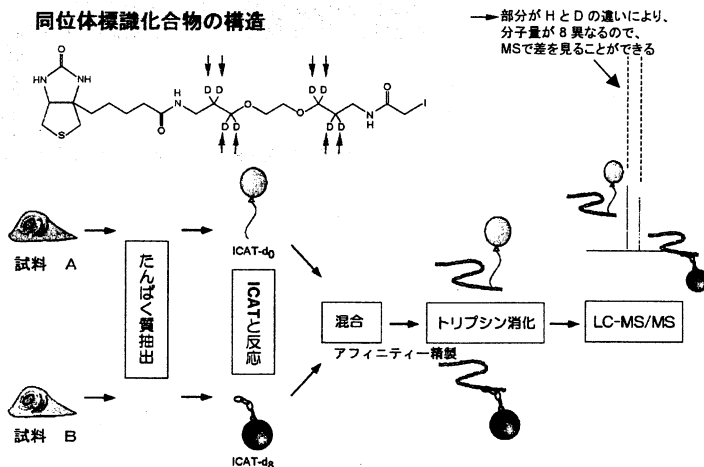


図 1. ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) による発現定量の概念図

当研究室では、より簡単な修飾法の組み合わせの評価を行い、我々のグループでこれまでに確立した一次元ゲル電気泳動 (1-SDS PAGE) と nanoLC/MS/MS からなる発現プロテオーム解析システムの研究を行っている。モデル試料としてマウス大脳皮質を用い、不溶性の蛋白質群に対する有効性や解析の処理能、および疾患モデルへの適用について研究し、1-SDS PAGE と nanoLC/MS/MS との組み合わせによって、ゲルの染色処理までも省いた客観的で高感度かつ高速の発現プロテオーム定量解析が可能となった (図 2)。一次元ゲル電気泳動による蛋白質混合物分画法は、細胞膜貫通型などの疎水性の高い蛋白質群や高塩基性の蛋白質群にも適用することができた。前者の結果は、主に SDS の強い溶解・変性作用に依っている。マウス大脳皮質の解析では、多くの膜結合型蛋白質や高塩基性蛋白質を含む合計約 750 個の蛋白質が一度の連続分析で同定された (‘ショットガン’ 蛋白質同定)。このことは、本法が細胞内の全蛋白質を視野に入れた発現プロファイリングに有効であることを示した。また、同定された蛋白質のなかには過去の研究ですでに明らかとなっている微量の疾患関連蛋白質を含んでおり、疾患マーカーや疾患責任遺伝子産物のスクリーニングに対しても有効性を明らかにした。

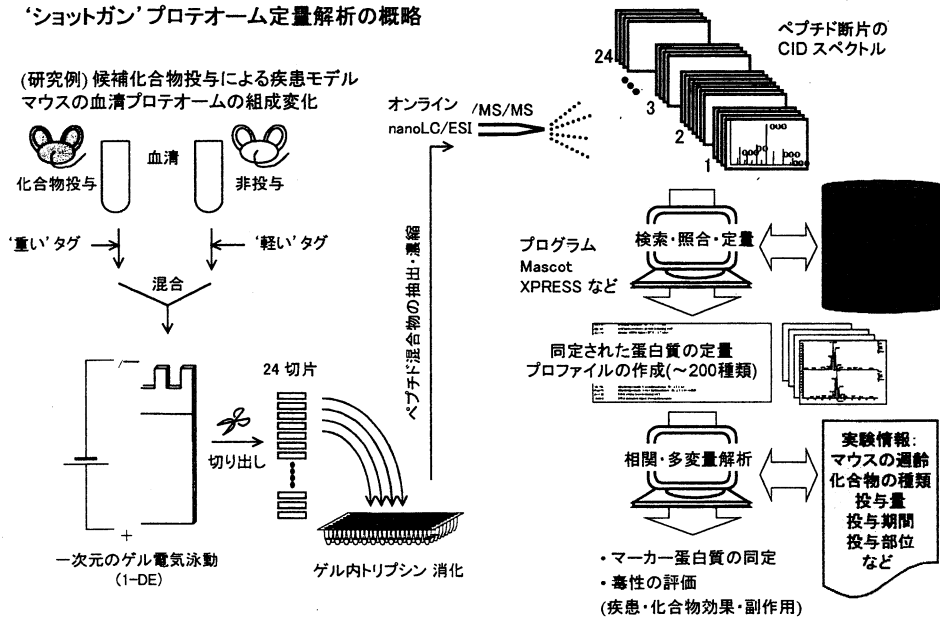


図2. 1-D SDS PAGE によるタンパク質一斉 (ショットガン) 解析の流れ。

c. 多次元液体クロマトグラフ (2-D LC) 法に基づく一斉プロテオーム解析技術に関する研究

ゲル・プロテオミクスの欠点を補い、異なった性質をもつ多く蛋白質を高速処理を可能とする新しい方法を研究している。ゲル・プロテオーム解析の諸課題を解消するために分画(精製)蛋白質群を可溶化した状態で消化後、LC-MS に直接導入することがこれまでも検討されてきた。消化後のペプチドフラグメント数によって、1D, 2D-LC が考えられ、更にそこで用いる分離モードはイオン交換/逆相など、これまで幾つかの組み合わせが検討されてきた。

本研究室で開発した次世代のプロテオミクス解析技術となる 2-D LC Peptide Mapping システム (図3) の構成は以下のとおりである。1) 抽出タンパク質試料の有機溶媒中での高速酵素消化。2) サンプル, 塩バッファー, コンディショニングバッファーの供給を行うオートサンプリング・ロボット。3) 1次元目の Strong Cation Exchange(SCX)カラムによる分画。4) SCX から分画溶出したペプチド群の濃縮と脱塩をおこなうマイクロトラップカラム CapTrap。5) HFBA(Hexafluoro Butylic Acid) 含有バッファーを用い、2次元目の逆相 C18 カラムによるペプチド断片分離を行う低流速 (500 nl/min ~ 2,000 nl/min.) 液体クロマトグラフ Michrom BioResources 社製 MAGIC2000。6) 溶出する

Multi-Dimensional LC “Shotgun” Proteome Analysis

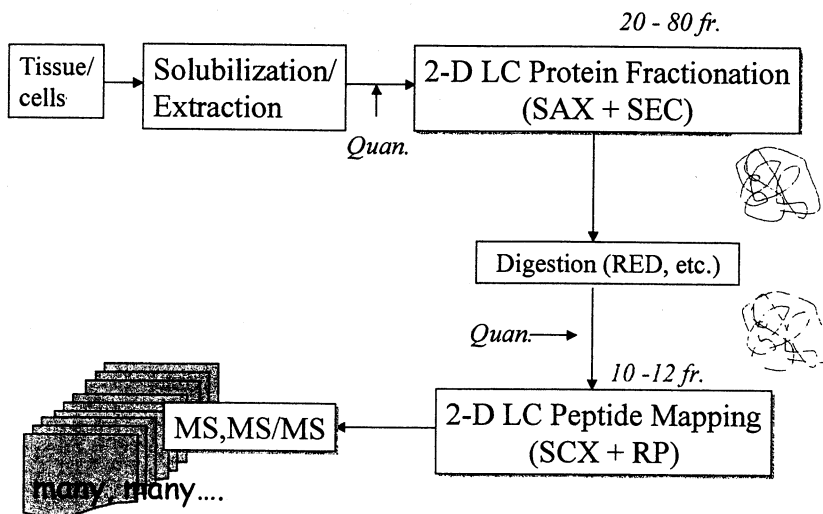


図3. 2-DLC プロテインマッピング及び 2-DLC ペプチドマッピングシステム
(1-D SCX カラム, トラップカラム, 2-D RP カラム) を含む多次元液体クロマトグラフによるプロテオーム解析の流れ。

ペプチド断片のナノエレクトロスプレー・イオン化(nano-electrospray ionization : nanoESI)システム。
7) ペプチド断片の分子量とその配列情報を測定する(MS, MS/MS)イオントラップ型質量分析計(Ion Trap Mass Spectrometer: ITMS) サーモフィニガン社製 LCQ Advantage™。 8) MS 及び MS/MS スペクトルデータからタンパク質・ゲノムデータベース上にあるタンパク質及び翻訳後修飾を同定する SEQUEST®または Matrix Science 社の MASCOT®検索ソフトのシステム。

ペプチド群の分画は PAL のプログラムを用いて行い、0.05% HFBA 及び 0.1%ギ酸を含む水—アセトニトリル系のグラジエント溶出プログラムでペプチド群の分離・溶出を行う。イオン化後、ペプチドは通常 2 価—3 価のイオンとして生成される。配列情報をもつ MS/MS スペクトルは、ThermoQuest 社の Dynamic Exclusion スキャンモードで行うことにより共溶出する多くのペプチド群を見逃さずに同定することが可能である。タンパク質発現の定量を行うために、抽出タンパク質のシステイン基に同位体修飾 (Isotope Coded Afinity Tag: ICAT など) を予め施し、その同位体比から発現量を見積もるソフトが SEQUEST®に盛り込まれている。これら一連の操作はすべて自動で行うことができる。2 次元

B. 機能性複合体タンパク質の相互作用研究

a. アポトーシス誘導機能蛋白質の同定研究

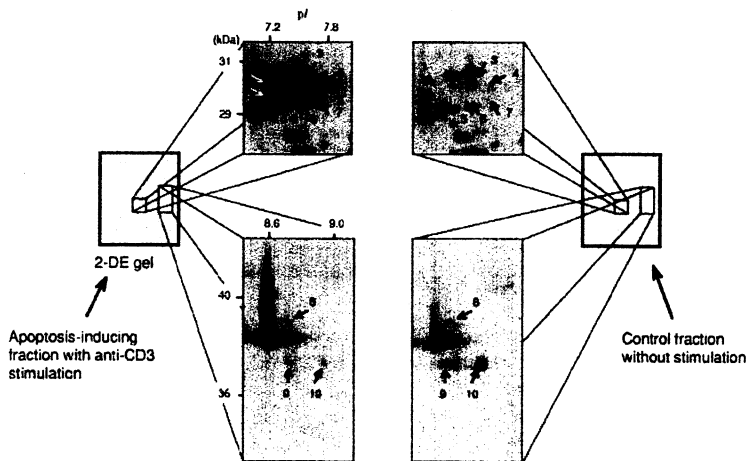


図5. 抗CD3モノクローナル抗体刺激の有無でのT細胞前駆体の2次元電気泳動ゲルにおける蛋白質発現の比較

哺乳動物の免疫系成立の際に、自己に反応性のある T 細胞受容体を発現している T 細胞前駆体は、T 細胞前駆体 CD3 の複合体からのシグナルによってアポトーシスの過程を経由して胸腺内で消失することが知られている。このアポトーシスの機構を解析するために *in vivo* で抗 CD3 モノクローナル抗体で処理したマウス胸腺の細胞抽出液よりアポトーシス誘導能をもつ無細胞系を確立した。遠心分離による細胞分画の各分画のうち、細胞質分画にアポトーシス誘導能が局在していることを突き止めた。アポトーシス誘導能は抗体処理に依存していた。さらに抗体処理の有無で細胞質分画の蛋白質組成を二次元ゲルで比較したところ、図5に示されるように新たに出現するあるいは減少する蛋白質スポットを見出し、ゲル中酵素消化とタンデム質量分析によってこれら蛋白質を同定した。このうち増加した HMG2 蛋白質は Dnase による DNA 断片化の際に DNA 二重鎖の‘折り曲げ’を誘導する蛋白質のひとつであり、アポトーシスの主な現象である核内 DNA の断片化との関係が示唆された。このように、ある生体活性の細胞内局在性を細胞分画により見出し、活性の本態を突き止める上で重要な機能発現に関わる蛋白質群の同定をおこなっている。

b. 細胞内分子機械の動的構造の解析

細胞内で機能する蛋白質複合体は主要な要素とともに、これらと相互作用しながら蛋白質複合体の多様な機能発現を制御したり、他の蛋白質複合体に一連の機械動作として伝達したりするアクセサリー蛋白質群がある。しかしながら、まずその構成要素やその機能についてよく理解されていない。プロテアゾームやリボゾームは細胞周期の時系列においてかなり正確に制御されている細胞内分子機械の典型である。プロテゾームで適切に蛋白質が壊されずに蓄積したり、また適切な速度で蛋白質が生産されなければ、細胞機能に多様な障害をおこす。今期は、超遠心密度勾配法により分画された大腸菌由来 70S リボゾーム酵素消化して、多次元液体クロマトグラフによるショットガン・プロテオーム解析 (2-D LC peptide mapping) を行い、翻訳開始因子(IF-2-a, IF-3)、伸長因子(EF-Tu) を含むアクセサリー蛋白質群 (15 個以上) の高感度な同定を行い、新しく見出された蛋白質の機能に関する研究を行っている。

原著論文

1. Kawakami, T., Anyoji, H. and Nishimura, T. 2002
Development of proteome analysis systems for efficient expression profiling: Towards high throughput identification and quantitation of disease target proteins
J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 50, 135 - 141.
2. Nishimura, T., Sakaguchi, Y., Usui, F., Kubota, M., Bando, Y. and Fujita, Y. 2002
Development of an automated "shotgun" proteome-analysis system with multi-dimensional liquid-chromatography
Medical Science Digest 28, 205 - 209.
3. Kawakami, T., Nagata, T., Muraguchi, A. and Nishimura, T. 2002
Proteomic approach to apoptotic thymus maturation
J. Chromatography B, 775 (in press).

総説

1. Nishimura, T. 2002
Introduction to "Role of mass spectrometry for proteomics in life science in new century"
J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 50, 112 - 115.
2. 西村俊秀 2002
「プロテオミクス研究における質量分析」
Molecular Medicine 西條長宏・横田 淳・吉田輝彦 編集 臨時増刊号『癌ゲノム学』第2節 (印

刷中)

3. 川上隆雄・西村俊秀 2002

「効率的な発現プロファイリングのためのシステム」及び「疾患関連タンパク質同定における課題」
鈴木絃一 監修、平野久・鮎沢 大 編『病態プロテオミクス』現代化学増刊号、東京化学同人(株)

著書

1. 西村俊秀 2001

「プロテオミクスとゲノム創薬」

野島 博 編集『ゲノム創薬の最前線』羊土社.

2. 川上 隆雄, 安養寺 久栄、西村俊秀 2002

“発現プロファイリングの基本技術：「タンパク質の分離と同定」『生命科学のための最新マスペクトロメトリー □タンパク質解析と薬物動態解析□』原田健一, 田口良, 橋本豊 編, 講談社サイエンティフィク

学会発表

1. 川上、安養寺、西村 (2001) 膜結合蛋白質を含む細胞蛋白質群の発現解析、第 74 回日

本生化学会大会

2. 安養寺、川上、西村 (2001) 1-D SDS-PAGE によるショットガンプロテオーム解析法に

よる疾患関連タンパク質の同定に向けて、第 74 回日本生化学会大会