

個 体 機 能 制 御 学 部 門

Department of Immunobiology and Neuroscience

免疫遺伝学分野

Division of Immunogenetics

免疫システムは多様な感染源との相互作用を通して進化してきた生体にとって必須の防御機構である。このため、T細胞受容体 (TCR) は理論上 10^{15} を越す高度の多様性を獲得し得るが、実際には TCR は胸腺において自己の主要組織適合抗原 (MHC) およびそれと結合した自己ペプチドを同時に認識することによって、この多様性の中から (1) 自己MHC による拘束性の獲得 (正の選択), および (2) 自己反応性 TCR の除去 (負の選択), という二大選択を受け、免疫システムのフレームワークが決定されている。

一方胸腺におけるこの二大選択を経て生き延びたT細胞は、末梢において自己の MHC と結合した細菌やウイルス由来のペプチドを認識して、量的にも質的にも様々な免疫応答を惹起し、感染防御あるいは逆に自己免疫疾患発症など、生体にとっては正負の両面の機能を有する。

当分野では、①胸腺における正および負の選択機構、②末梢における MHC 多重遺伝子族による免疫応答の制御機構、をそれぞれ分子レベルで解明し、その理解に立脚して、③先鋭的な免疫応答制御法を確立することで、感染症、自己免疫疾患、アレルギー、GvH 病、癌など現代医学が抱える難治性疾患の真の治療法、予防法の確立に資すると共に、生物学的見地から、④免疫系の構築とその恒常性維持の分子機構を解明することを目的に研究を進めている。

平成13年度の主な人事異動は以下のとおりである。平成13年4月より笹月健彦教授が国立国際医療センター研究所長を併任し、6月に助手の白澤専二が国立国際医療センター研究所臨床病理部長として、8月に助手の山本健がゲノム集団遺伝学分野助教授として転出した。また青木正幸が大学院生として新たに研究に参画している。

A. リンパ球遊走に不可欠な分子の同定

免疫細胞は、種々の感染源に迅速に対処すべく生体内を常にパトロールしている。このように構成細胞が絶えず動き回るという特徴は、他の生命複雑系においては認められず、免疫系独自に進化したものである。胸腺、骨髄といった1次リンパ組織で分化したT及びBリンパ球は、脾臓、リンパ節、パイエル板といった2次リンパ組織の特定のコンパートメントへ移動することでリンパ濾胞を構築する。リンパ球の移動がケモカインと総称されるタンパク質によって誘導されることは知られているが、リンパ球の運動性を制御する分子機構そのものは不明であった。我々は、マウス胸腺 cDNA ライブラリーにより線虫およびショウジョウバエにおいて細胞運動を制御することが知られている CDM ファミリーに属し、免疫系特異的に発現する遺伝子 *DOCK2* を単離し、その生理的機能をノックアウトマウスを作製することで解析した。*DOCK2* 欠損マウスのリンパ球は種々のケモカイン刺激に対して遊走せず、その結果リンパ濾胞の萎縮、辺縁帯B細胞の消失等さまざまな免疫系の構築異常を呈した。野生型マウスのリンパ球をケモカインで刺激すると *Rac* の活性化及びアクチンの重合が観

察されたが、ノックアウトマウスのリンパ球においてはこれらの反応が消失していた。すなわち、DOCK2 は Rac を活性化し細胞骨格の再構築を促すことでリンパ球の運動性を制御する重要な分子であり、その欠損が免疫系の構築に多大な影響を与えることを明らかとした。

B. 自己免疫性末梢神経炎を自然発症するマウスの樹立とその発症機序の解析

多くの臓器特異的自己免疫疾患及びそのモデル動物において、その発症がある特定の MHC 対立遺伝子と相関することが知られている。MHC 遺伝子は高度の遺伝的多型を有し、この多型に応じて結合する抗原ペプチドが異なるため、このメカニズムとして、特定の MHC 分子が臓器特異的自己抗原ペプチドと結合し、これに対する T 細胞応答が惹起されるために発症するという考え方が一般的である。一方、自己免疫を惹起する T 細胞レパートリーは疾患感受性の MHC 分子により京成されているため、T 細胞レパートリーの選択そのものが疾患感受性に寄与している可能性も考えられるが、‘免疫応答’と‘T 細胞レパートリー形成’という 2 つの機能を分断して解析することが困難であるため、この可能性につき明確な解答は得られていない。我々は、1 種類の MHC クラス II/ペプチド複合体のみを発現する複数系統のトランスジェニックノックアウトマウスのうち、胸腺での発現レベルが最も低い(H3-TKO) マウスにおいて 10 週齢以後に下肢の運動不全と筋力低下を主徴とする病態が生じることを見出した。組織学的解析より、末梢神経において CD4 陽性 TCR α β 陽性 T 細胞、マクロファージの浸潤と脱髄性変化が観察されたが、中枢神経及び他の臓器は正常であった。しかしながら、non-transgenic littermate や同じ MHC クラス II/ペプチド複合体をより高いレベルで発現する B2L-TKO においてはこのような病態は観察されなかった。H3 TKO マウスにおいては、この複合体に対する免疫寛容が不完全であり、H3 TKO の骨髄を放射線照射した B2L TKO マウスに移入することで同様の病態を再現できることより、骨髄由来細胞上の MHC クラス II/ペプチド複合体の低発現に起因する負の選択の insufficiency が疾患発症に関与していると考えられた。以上の結果は、MHC 分子により胸腺で形成される T 細胞レパートリーそのものが自己免疫疾患発症を規定する可能性を示すものである。

C. T 細胞の運命を決定する TCR-MHC/ペプチド複合体相互作用の解析

T 細胞に相異なる運命を課す TCR-MHC/ペプチド相互作用を分子及び原子レベルで解析する目的で、1 つの TCR が正の選択、免疫応答、およびアロ MHC 抗原反応の際に認識する抗原ペプチドを同定し、その可溶性 TCR 及び可溶性 MHC/ペプチド複合体の樹立に着手した。

業績目録

原著論文

1. Morishima, Y., Sasazuki, T., Inoko, H., Juji, T., Akaza, T., Yamamoto, K., Ishikawa, Y., Kato, S., Sao, H., Sakamaki, H., Kawa, K., Hamajima, N., Asano, S., Kodera, Y., for the Japan Marrow Donor Program. 2002.

The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from a serologically HLA-A, B and DR matched unrelated donor.

Blood, 99, 4200-4206.

2. Oono, T., Fukui, Y., Masuko, S., Hashimoto, O., Ueno, T., Sanui, T., Inayoshi, A., Noda, M., Sata, M., Sasazuki, T. 2001.

Organ-specific autoimmunity in mice whose T cell repertoire is shaped by a single antigenic peptide.

J. Clin. Invest., 108, 1589-1596.

3. Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., Sasazuki, T. 2001

Hematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration.

Nature, 412, 826-831.

4. Miyoshi, Y., Yamada, T., Tanimura, M., Taniwaki, T., Arakawa, K., Ohyagi, Y., Furuya, H., Yamamoto, K., Sakai, K., Sasazuki, T., Kira, J. 2001.

A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA16) linked to chromosome 8q22.1-24.1.

Neurology, 57, 96-100.

総説

1. 福井宣規, 2001.

CDM ファミリー分子 DOCK2 によるリンパ球遊走の制御.

細胞工学, 20, 1549-1551.

2. 福井宣規, 2001.

リンパ球遊走に不可欠な CDM ファミリー分子 DOCK2.

実験医学, 19, 2409-2412.

3. 福井宣規, 2002.

リンパ球遊走, ホーミングの制御機構—遺伝子操作マウスからのレッスン.

医学のあゆみ, 別冊免疫疾患—state of arts, 342-346.

著書

1. Yamamoto K and Sasazuki T. 2002.

HLA and Autoimmune Thyroid Diseases.

The Genetics of complex thyroid diseases, (T. Akamizu, M. Kasuga, TF Davies Eds. Springer-Verlag, Tokyo) 55 - 63.

学会発表

1. Takehiko Sasazuki, Yoshinori Fukui (11/8-10)
Identification of a molecule critical for lymphocyte motility.
Cytokine Odyssey, Hawaii.
2. 福井宣規 (2002, 2/14).
リンパ球遊走に不可欠な CDM ファミリー分子 DOCK2.
「高次複雑系免疫システムの情報伝達制御」第3回公開シンポジウム, 東京.
3. 福井宣規 (2002, 2/27).
リンパ球遊走の制御システムとその免疫系構築における役割.
京都大学再生医科学研究所学術講演会「再生医学と制御システム」, 京都.
4. 大野隆真, 福井宣規, 讚井彰一, 笹月 健彦 (2001, 12/11-13).
単一 MHC/ペプチド複合体上で分化した T 細胞が末梢で自己およびアロ MHC 分子の拘束下で認識する
抗原ペプチドの同定.
第31回日本免疫学会総会, 大阪国際会議場.
5. 讚井彰一, 福井宣規, 橋本修, 白井俊一, 笹月健彦 (2001, 12/11-13).
リンパ球の運動性を制御する分子の同定.
第31回日本免疫学会総会, 大阪.
6. 高橋武司, 福井宣規, 笹月健彦, 阪口志文 (2001, 12/11-13).
免疫制御性 CD25+CD4+T 細胞の抗原特異性について.
第31回日本免疫学会総会, 大阪.
7. 吉田謙二, Martin Tracy, 上川路信博, 山本健, Munz Christian, 中野直子, Rammensee Hans-Georg,
笹月健彦, 岸本忠三, Haskins Kathryn, 菊谷仁 (2001, 12/11-13).
膵島反応性 T 細胞クローンの認識する自己ペプチド同定の試み.
第31回日本免疫学会総会, 大阪.

免疫制御学分野

Division of Molecular and Cellular Immunology

当教室は2001年(平成13年)1月1日より吉村が担当することになった。当教室の目標は“細胞の増殖、分化、死のメカニズムを分子レベルで明かにし、あわせてその成果をもって医学、医療に貢献する”ことである。具体的にはエリスロポエチンをはじめとする細胞の増殖分化誘導因子(サイトカイン)の受容体から核へ至る情報伝達経路とその制御機構の解明、T細胞分化やアポトーシスとの関連、さらに新しい情報伝達分子のクローニングと機能解析を行っている。これらの遺伝子の個体レベルでの解析を行えるようにトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成を行ない、特に造血系、免疫系、腫瘍を中心に解析をすすめている。さらに、それらの遺伝子と病態との関連を様々な疾患で調べている。

当教室では基礎研究を通じて病気を理解し、新たな治療法に結びつくような研究をめざしている。当教室のすべての研究は病に苦しむ人々の利益になることを第一に考えている。しかし我々の研究は分子生物学の知識と技術をベースに行われ、より広く医学を下支えするもの、10年後、20年後にも知識や技術として広く使われるものであるべきと考える。

平成13年4月より当教室は始動した。まず吉村前任の久留米大学より助手として箕口滋、学術振興会特別研究員として花田俊勝、佐々木敦朗、学術支援研究員として加藤玲子、三浦和子、研究員として脇岡徹(久留米大学分子生命科学研究所兼任)、大学院生として金城市子(D3、学振DC)、箕口真弓(D1)、庄田孝則(整形外科D4)、吉田隆文(内科D3)、また研究補助員として佐々木美加が引き続き研究に参画してくれた。新たに学術支援研究員として稲垣匡子、研究補助員として川畑結城、竹内道代、大学院生として城尾晶子(当教室)、大石正信(整形外科)、武田篤信(眼科)、野波篤(第一内科)、三好敢太(鹿児島大学整形外科)、武富孝治(歯学部)が参加、さらに10月より木村丹香子(腫瘍センター)、神尾真樹(鹿児島大学産婦人科)が参加してくれた。前身の野本研からの助教授であった松崎吾郎助教授は10月に琉球大学遺伝子情報センター教授として転任、かわって助手であった吉田裕樹は助教授に昇任した。岸原健二助手(平成14年4月に感染制御学分野に転出)もおおいに新たな教室づくりに貢献してくれた。また秘書として有福直子さんがラボの運営を支えてくれている。

A. Spred

Rasは細胞内シグナル伝達系できわめて重要な位置を占める。RasはC末を脂質で修飾されており細胞膜に存在し増殖因子など様々な外界の刺激で活性化される。Rasの恒常的活性化型変異は約30%の癌にみられ、細胞増殖と密接な関係があることがわかる。活性化されたRas

は主に Raf を細胞膜にリクルートしそこで Raf は未同定のキナーゼによりリン酸化（特にセリン 388）を受け活性化される。活性化された Raf は MEK を、MEK は MAP キナーゼを活性化するカスケードを形成する。このように Ras/MAP キナーゼ経路の正のシグナル経路は近年かなりの理解が進んだが負の制御メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。我々はレセプター型のチロシンキナーゼである c-fms や c-kit の新たな基質や制御因子を検索する目的でキナーゼドメインを bait とした yeast two-hybrid screening を行ってきた。破骨細胞 cDNA ライブラリーより新たな分子を見いだした。N 末端に EVH-1 (Ena/Vasodilator-stimulated phosphoprotein homology-1) ドメインを C 末端に Sprouty と相同性のある Sprouty (SPR) ドメインをもっており、Spred (Sprouty-related protein with EVH-1 domain) と命名した。データベース検索により Spred と類似する Spred-2 および Spred-3 もクローニングした。c-kit と結合するドメインとして約 50 アミノ酸からなる kit-binding domain (KBD) を同定した。

Spred の機能として Sprouty との類似性から Ras シグナルへの影響を調べた。末梢神経系の細胞株 PC12 細胞は NGF などにによって Ras/MAP kinase が活性化されることにより神経突起を伸ばし分化が促進される。もともと PC12 細胞は Spred-1,2 を発現しており NGF 処理によって発現が 2-3 倍に増強された。まず野生型の Spred-1、ないし Spred-2 の強制発現は NGF (nerve growth factor) による PC12 細胞の分化を抑制した。このとき NGF による MAP キナーゼ活性の抑制が認められた。抗体マイクロインジェクションと C 末の Sprouty ドメインを欠損させた dominant negative 変異体の過剰発現においては逆に PC12 の NGF による分化と MAP kinase の活性化が増強されていた。さらに Spred-2 の発現が高い筋芽細胞株 C2C12 での分化を調べた。C2C12 は低血清培地にさらされると一過性に MAP kinase の活性化が低下し、筋肉様細胞へと分化する。C2C12 においては野生型の Spred の発現はそれだけで分化を誘導し、逆に Spred-1, 2 の dominant negative 変異体の過剰発現は分化を抑制した。このとき野生型 Spred では MAP キナーゼ活性の低下が、dominant negative 変異体では MAP キナーゼ活性の増強が認められた。以上のことから Spred は内因性のタンパクレベルでの MAP kinase 抑制因子であることが示された。

次に Spred の Ras/MAP kinase 経路に対する抑制メカニズムを調べた。C2C12 細胞では免疫沈降によって Spred は Ras と恒常的に結合していることが示された。EGF 刺激によって MAP キナーゼ活性は抑制されるが、Ras 自身の活性化 (GTP 型への変換) と Raf-1 の細胞膜への移行は抑えなかった。しかし、活性化に必須である Raf-1 の 338 番目セリン残基のリン酸化を抑えることにより Raf-1 の活性を阻害していることが分かった。この抑制には Spred の EVH-1 ドメインも必要であった。Spred は C 末端のシステインに富む領域を介して細胞膜に局在する。さらに Ras と同じく Raft 分画に相当量存在するので Ras とは脂質マイクロドメイン上で何らかの相互作用をしているものと考えられる。Spred は EVH-1 ドメインを介して何らかの分子をリクルートし、Ras/Spred/Raf-1 複合体上での Raf-1 のリン酸化を抑制しているものと

考えられる。しかしその詳細なメカニズムの解明は今後の課題である。

B. Sprouty による MAP キナーゼ抑制機構

最近 MAP キナーゼ系の負の制御因子として新たに Sprouty が発見され注目を集めている。Drosophila の気管の発生には FGF (fibroblast growth factor) が必須であり、その過程に異常をきたす遺伝子として Sprouty は発見された。変異によって気管の分枝が多くなり、出芽 (Sprout) したような状態になることから Sprouty と命名された。遺伝学的な解析から FGF シグナルに antagonize する分子と考えられたが、その後 Sprouty は Drosophila の eye、wing 形成において EGF (epidermal growth factor) レセプター/Ras シグナルを抑制する細胞内分子として再発見された。哺乳類では4種類のホモログが知られており、少なくとも Sprouty2, Sprouty4 は EGF、FGF、フォールボールエステルなどの刺激によって MAP キナーゼを介して転写誘導される。興味深いことに Sprouty は VEGF による MAP キナーゼの活性化を抑制するものの、EGF による MAP キナーゼ活性化には影響しない。Sprouty 感受性而非感受性の経路があるらしい。我々は Sprouty の N 末端に保存されたチロシン残基に注目し、これをフェニルアラニンに置換するとドミナントネガティブ型分子として作用し、FGF シグナルを増強することを発見した。Sprouty は複数の分子が一つの細胞に同時に発現していることが多いのでこの変異体は Sprouty の哺乳類での生理機能を調べる上で有用と考えられる。この変異体は Spred には影響しなかったので Spred と Sprouty は別の分子機構で Ras/Raf の活性化を抑制しているものと考えられる。Sprouty が MAP キナーゼをどのようにして抑制するのか、あるいはそれ以外のシグナル経路にどのように影響するのか今後の解析が待たれる。

C. SOCS3 による炎症性自己免疫疾患の遺伝治療

サイトカインは主に造血系、免疫系を制御し、細胞の増殖、分化そして機能を調節する一群のタンパク質性ホルモンで生体のホメオスターシスに必須であるほか免疫系を通じて感染防御に重要な役割を果たしている。またサイトカインはネットワークを形成し、その破綻が自己免疫疾患や炎症性疾患の病態形成に深く関与していることも明らかにされている。サイトカイン受容体には JAK 型チロシンキナーゼが会合しており転写因子 STAT を活性化し、一方で Ras/MAP キナーゼ経路も活性化される。JAK/STAT と Ras/MAP キナーゼは共同して遺伝子発現制御や細胞増殖分化に関与すると考えられている。免疫制御の破綻は過剰なアレルギー反応や炎症性疾患を引き起こすが、シグナルを負に制御する仕組みはこれまで解明が遅れていた。我々はシグナル伝達の負の制御因子として CIS/SOCS ファミリーおよび Spred/Sprouty ファミリーを発見した。CIS/SOCS ファミリーはサイトカイン受容体や JAK キナーゼに結合してその活性化を抑制する。最近 SOCS1, SOCS3 がエンドトキシンショックの原因であるリポ多糖 (LPS) のシグナル経路の抑制にも関与することを見いだした。また我々は炎症性疾患において STAT3 の活性化と特に SOCS3/CIS3 の関係について新たなパラダイムを提唱した。すなわち STAT3 は

炎症の増悪化に、SOCS3/CIS3 がその抑制に働くというものである。様々な遺伝子改変マウスを用いてこれを証明した。またヒトにおいても慢性関節炎リウマチ患者滑膜細胞や炎症性大腸炎において、STAT3 の活性化と CIS3 の誘導が観察された。そこで遺伝子治療の試みとしてマウス関節炎モデルに SOCS3 やドミナントネガティブ STAT3 (dnSTAT3) 遺伝子をアデノウイルスを用いて導入したところ関節炎が著しく軽減した。ウイルス投与によって組織破壊も抑えられ IL-6 レベルも減少していた。このことから SOCS3 が炎症性疾患において抑制的な作用を持つことが示唆された。

D. WSX-1 ノックアウトマウスの解析

アポトーシスは個体の発生やホメオスタシスの維持に重要な役割を果たしている。ミトコンドリア依存性アポトーシスは、種を越えて保存されたアポトーシス誘導機構である。Apaf1 はミトコンドリア依存性アポトーシス誘導機構においてカスパーゼを活性化するアダプター分子であり、神経系の発生や細胞の癌化に重要な役割を果たすことが明らかにされている。現在 Apaf1 欠損細胞を用いてカスパーゼ非依存性のネクローシス様細胞死の誘導機構やネクローシス誘導・抑制分子の同定を試みている。

サイトカインバランスは感染や自己免疫疾患の経過に影響する。IL-12 が Th1 反応を誘導する一方、IL-4 は Th2 反応を惹起する。WSX-1(TCCR)は IL-12 受容体に相同性を有する新規にクローニングされた分子であり、そのリガンドやシグナル伝達経路は不明である。WSX-1 欠損マウスはリーシュマニア感染抵抗性が減弱することから、WSX-1 が Th1 誘導に重要な役割を果たしていることが示された。現在 WSX-1 欠損マウスを用いて様々な寄生虫・ウイルス感染における WSX-1 分子の役割を解析中である。

業績目録

原著論文

1. Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura A, and Bazzoni F. 2002.
Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation.
J Immunol. 168, 6404-6411.
2. Gasperini S, Crepaldi L, Calzetti F, Gatto L, Berlato C, Bazzoni F, Yoshimura A, and Cassatella MA. 2002.
Interleukin-10 and cAMP-elevating agents cooperate to induce suppressor of cytokine signaling-3

- via a protein kinase A-independent signal.
Eur Cytokine Netw. 13, 47-53.
3. Hara H, Takeda A, Takeuchi M, Wakeham AC, Itie A, Sasaki M, Mak TW, Yoshimura A, Nomoto K, and Yoshida H. 2002.
The apoptotic protease-activating factor 1-mediated pathway of apoptosis is dispensable for negative selection of thymocytes.
J Immunol. 168, 2288-95.
 4. Foley HA, Ofori-Acquah SF, Yoshimura A, Critz S, Baliga BS, and Pace BS. 2002.
Stat3beta Inhibits gamma globin gene expression in erythroid cells.
J Biol Chem. 277, 16211-16219.
 5. Tonko-Geymayer S., Goupille O, Tonko M., Soratro C, Yoshimura A, Streuli C., Ziemiecki A., Kofler R, and Soppler W. 2002.
Regulation and function of the cytokine inducible SH-2 domain proteins CIS and SOCS3 in mammary epithelial cells Mol.
Endocrinol. in press.
 6. Flodstrom M, Maday A, Balakrishna D, Cleary MM, Yoshimura A, and Sarvetnick N.2002.
Antiviral defenses expressed by the pancreatic b cell govern the development of type 1 diabetes after Coxsackievirus B4 infection.
Nature Immunology 3, 373-382.
 7. Ohtsuka S, Takaki S, Iseki S, Miyoshi K, Nakagata N, Kataoka Y, Yoshida N, Takatsu K, and Yoshimura A. 2002.
SH2-B is Required for both Male and Female Reproduction Mol.
Cell. Biol. 22, 3066-3077.
 8. Sasaki, M., Miyazaki, K., Koga, Y., Kimura, G., Nomoto, K. and Yoshida, H. 2002.
Calcineurin-Dependent Mitochondrial Disturbances in Calcium-Induced Apoptosis of Human Immunodeficiency Virus gp160-Expressing CD4(+) Cells. J Virol. 76, 416-420.
 9. Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, Tsuneoka M, Komiya S, Baron R, and Yoshimura A. 2001.
Spred, a Sprouty-related suppressor of Ras signaling.
Nature . 412, 647-651.
 10. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, and Yoshimura A. 2001.
Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis.

- J Clin Invest. 108, 1781-8.
11. Hanada T, Yoshida T, Kinjyo I, Minoguchi S, Yasukawa H, Kato S, Mimata H, Nomura Y, Seki Y, Kubo M, and Yoshimura A. 2001.
A mutant form of JAB/SOCS1 augments the cytokine-induced JAK/STAT pathway by accelerating degradation of wild-type JAB/CIS family proteins through the SOCS-box.
J Biol Chem. 276, 40746-40754.
 12. Sasaki A, Taketomi T, Wakioka T, Kato R, and Yoshimura A. 2001.
Identification of a dominant negative form of Sproutys that potentiates FGF- but not EGF-induced ERK activation.
J Biol Chem. 276, 36804-36808.
 13. Yokouchi M, Kondo T, Sanjay A, Houghton A, Yoshimura A, Komiya S, Zhang H, and Baron R. 2001.
Src-catalyzed phosphorylation of c-Cbl leads to the interdependent ubiquitination of both proteins.
J Biol Chem. 276, 35185-35193.
 14. Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, Nakamura T, Pradervand S, Hanada T, Hanakawa Y, Yoshimura A, Ross J. Jr., and Chien KR. 2001.
SOCS3 is a biomechanical stress inducible gene that suppresses gp130 mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways .
J Clin Invest 108, 1459-1467.
 15. Hamanaka I, Saito Y, Yasukawa H, Kishimoto I, Kuwahara K, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Masuda I, Yoshimura A, and Nakao K. 2001.
Induction of JAB/SOCS-1/SSI-1 and CIS3/SOCS-3/SSI-3 Is Involved in gp130 Resistance in Cardiovascular System in Rat Treated With Cardiotrophin-1.
In Vivo. Circ Res. 88, 727-732.
 16. Suzuki A, Hanada T, Mitsuyama K, Yoshida T, Kamizono S, Hoshino T, Kubo M, Yamashita A, Okabe M, Takeda K, Akira S, Matsumoto S, Toyonaga A, Sata M and Yoshimura A. 2001.
CIS3/SOCS3/SSI3 Plays a Negative Regulatory Role in STAT3 Activation and Intestinal Inflammation.
J. Exp. Med. 193, 471-482.
 17. Kamizono S, Hanada T, Yasukawa H, Minoguchi S, Kato R, Minoguchi M, Hattori K, Morita S, Kitamura T, Kato H, Nakayama K, and Yoshimura A .2001.
The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2.
J. Biol. Chem.276, 12530-12538.
 18. Tauchi T, Yoshimura A, and Ohyashiki K.2001.

- CIS1, a cytokine-inducible SH2 protein, suppresses BCR/ABL-mediated transformation. Involvement of the ubiquitin proteasome pathway. *Exp Hematol.* 29, 356-361.
19. Yamamoto T, Matsuda T, Junicho A, Kishi H, Yoshimura A, and Muraguchi A. 2001. Hematopoietic cell-specific adapter proteins, SLP-76 and BLNK, effectively activate NF-AT as well as NF-kappaB by Syk and Tec PTKs in non-lymphoid cell lines. *FEBS Lett.* 491, 272-278.
 20. Sporri B, Kovanen P.E, Sasaki A, Yoshimura A and Leonard WJ.2001. JAB/SOCS1/SSI-1 is an IL-2-induced inhibitor of IL-2 signaling. *Blood* 97, 221-226.
 21. Guo, Z., Yikang, S., Yoshida, H., Mak, T. W. and Zacksenhaus, E. 2001. Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Induces Apoptosis Protease-activating Factor-1 Dependent and Independent Apoptotic Pathways during Embryogenesis. *Cancer Res.* 61, 8395-8400.
 22. Yoshida, H., Hamano, S., Senaldi, G., Covey, T., Faggioni, R., Mu, S., Xia, M., Wakeham, A. C., Nishina, H., Potter, J., Saris, C. J. and Mak, T. W. 2001. WSX-1 Is Required for the Initiation of Th1 Responses and Resistance to L. major Infection. *Immunity.* 15, 569-578.
 23. Miyazaki, K., Yoshida, H., Sasaki, M., Hara, H., Kimura, G., Mak, T. W. and Nomoto, K. 2001. Caspase-independent cell death and mitochondrial disruptions observed in the apaf1-deficient cells. *J Biochem (Tokyo).* 129, 963-969.

総説

1. 吉村昭彦、庄田孝則。 2002
サイトカインシグナルの負の制御因子と炎症性疾患
炎症と免疫 10, 72-80.
2. 花田俊勝、吉村昭彦。 2001
SOCS/CISファミリーによるサイトカインシグナルの負の制御
Annual Review 免疫 2002, 90-98.
3. 吉村昭彦、箕口滋。 2001
サイトカインシグナルとCIS/SOCSノックアウトマウス
血液フロンティア 11, 23-30.
4. 光山慶一、鈴木飛鳥、吉村昭彦。 2001
サイトカインシグナル炎症性腸疾患

- 実験医学 19, 166-172.
5. 吉村昭彦、加藤玲子、吉田隆文. 2001
サイトカインシグナル伝達と制御機構
臨床検査 45, 10-18.
 6. 吉村昭彦、鈴木飛鳥、光山慶一. 2001
炎症性腸疾患とサイトカインシグナル抑制因子CISファミリーの役割
臨床免疫 36, 373-379.
 7. 脇岡徹、佐々木敦朗、加藤玲子、吉村昭彦. 2001
Ras/MAPキナーゼシグナル伝達経路の新たな制御因子 Sproutyと Spred
細胞工学 20, 1328-1329.
 8. 脇岡徹、佐々木敦朗、加藤玲子、吉村昭彦. 2001
Ras/MAPキナーゼシグナル伝達経路のフィードバック調節因子 Sproutyと Spred
実験医学 19, 2194-2197.
 9. 吉田裕樹. 2001
Apaf1 の役割：個体発生から発癌まで
実験医学（増刊）19, 1672-1676.
 10. 原博満 吉田裕樹. 2001
胸腺のネガティブセレクションと Apaf1
臨床免疫 35, 688-694.

学会発表

1. 吉村昭彦(2001,1/30)
JAB-SOCS-box を介した JAK 機能の抑制
特定領域A高次複雑系免疫システムの情報伝達制御第二回公開シンポジウム, 大阪
2. 吉村昭彦(2001,7/3)
新規 Ras/MAP キナーゼの負の制御因子,Spred と Sprouty
癌特定領域C シンポジウム, 東京
3. 脇岡徹、吉村昭彦(2001,7/30)
新規 Ras/MAP キナーゼの負の制御因子,Spred
がん特定若手シンポジウム, 蓼科
4. 吉村昭彦(2002,5/14)
サイトカインシグナルの負の制御とその破綻
日本分子生物学会・第2回春季シンポジウム, 広島
5. 吉村昭彦(2001,6/14)

- サイトカインシグナルの制御とその破綻
第5回分子動脈硬化研究会, 福岡
6. Yoshida, H., Hamano, S., Mak T. W., et al. (2001, 7/22-7/29)
WSX-1 Is Required for the Initiation of Th1 Responses and Resistance to *L. major* Infection
The 11th International Congress of Immunology Stockholm, Sweden
 7. 吉村昭彦(2001,10/12)
Ras/MAP キナーゼ系の新しい制御因子: Sprouty と Spred
平成13年度哺乳動物遺伝学研究会, 熊本
 8. 吉村昭彦(2001,10/13)
新しい Ras/MAP キナーゼ系制御因子 Spred と Sprouty
第3回分子血液研究会, 大阪
 9. 吉田裕樹, 濱野真二郎, Tak W. Mak (2001, 12/11-12/13)
新規サイトカイン受容体 WSX-1 のインターフェロン γ 産生における役割: WSX-1 遺伝子変異マウスによる解析
第31回日本免疫学会総会・学術集会 大阪
 10. 吉田裕樹, 濱野真二郎, Tak W. Mak, 姫野国祐 (2001, 12/11-12/13)
WSX-1 遺伝子変異マウスの作成と解析
WSX-1 分子は *Leishmania major* 感染時の Th1 応答惹起および感染抵抗性に寄与する。
第31回日本免疫学会総会・学術集会 大阪
 11. 吉村昭彦(2002,1/12)
サイトカインのシグナル伝達の制御機構とその破綻
第2回分子血管研究会, 大阪
 12. Hideo Yasukawa, Kenneth R. Chien and Akihiko Yoshimura(2002,5/30)
Negative Regulator of Cytokine Signaling (SOCS) Genes in Cardiomyopathies and Heart Failure.
心筋症・心不全国際会議, 京都
 13. 吉村昭彦(2002,6/14)
サイトカインシグナルの制御とその破綻
第5回分子動脈硬化研究会, 福岡
 14. 松崎吾朗, 原博満, 岸原健二, 姫野国祐, 吉村昭彦(2001,12/12)
マウス $V\gamma 1$ +T細胞による *Listeria monocytogenes* 感染初期の肝臓病巣形成制御
第31回日本免疫学会, 大阪
 15. Toshikatsu Hanada, Akihiko Yoshimura.(2001,12/12)
A mutant from of JAB augments the cytokine signals by accelerating degradation of wild-type

JAB/CIS family proteins through the SOCS-box.

第 31 回日本免疫学会, 大阪

16. 関陽一、林克彦、小峯起、吉村昭彦、久保允人(2001,12/12)

SOCS3/CIS3のTh2特異的発現と機能分化におけるその機能

第 31 回日本免疫学会, 大阪

17. 稲垣匡子、花田俊勝、松崎吾朗、吉村昭彦(2001,12/12)

トランスジェニックマウスを用いた炎症性腸疾患発症(IBD)におけるJAB/SOCS1の機能解析

第 31 回日本免疫学会, 大阪

18. 小林剛、村上瑞奈、川崎拓実、吉村昭彦、楠見明弘(2001,5/21)

生細胞における細胞内情報伝達の1分子解析

第 55 回日本細胞生物学会, 横浜(2002,5/21)

19. 小山郁子、飯野良太、藤原敬宏、梶川絵里子、箕口滋、吉村昭彦、楠見明弘(2002,5/21)

細胞内外のラフト分子の多量体化によるカップリング

第 55 回日本細胞生物学会, 横浜

20. 村上瑞奈、小林剛、大島智香、佐久間麻由子、武田美江、村越修治、飯野良太、吉村昭彦、楠見明弘(2002,5/21)

生細胞におけるH-Ras活性化の厳密な制御

第 55 回日本細胞生物学会, 横浜

21. 藤田至彦、伊藤裕恵、飯野良太、田賀哲也、吉村昭彦、楠見明弘(2002,5/21)

インターロイキン6刺激によるStat3の2量体化と核膜第

55 回日本細胞生物学会, 横浜

22. 小林剛、村上瑞奈、吉村昭彦、楠見明弘(2001,5/30)

膜受容体とシグナル伝達分子の1分子可視化(活性化と空調情報の記憶)

第 54 回日本細胞生物学会, 岐阜

23. 佐甲靖志、箕口滋、吉村昭彦、柳田敏雄(2001,5/30)

細胞膜の上皮成長因子受容体クラスターの動的構造変化

第 54 回日本細胞生物学会, 岐阜

24. 小林剛、村上瑞奈、入江かおる、佐久間麻由子、安井智香、武田美江、飯野良太、藤原敬宏、吉村昭彦、楠見明弘(2001,5/30)

SCF受容体の情報伝達における空間情報の制御

第 54 回日本細胞生物学会, 岐阜

25. 村上瑞奈、小林剛、安井智香、村越秀治、佐久間麻由子、武田美江、飯野良太、箕口滋、吉村昭彦、楠見明弘(2001,5/30)

生細胞におけるH-Ras活性化の1分子イメージング

第54回日本細胞生物学会, 岐阜

26. 小山郁子、飯野亮太、村越秀治、梶川絵里子、堀田陽子、箕口滋、吉村昭彦、小林剛、楠見明弘(2001,5/30)

多量体化したH-Rasの細胞膜上での運動とラフトへの局在

第54回日本細胞生物学会, 岐阜

27. 飯野亮太、時田由紀子、村越秀治、実松史幸、笹井倫志、吉住玲、小林剛、箕口滋、吉村昭彦、楠見明弘(2001,5/30)

界面活性剤不溶生膜に分配されるラフト構成分子は生細胞上で高い運動性を持つ

第54回日本細胞生物学会, 岐阜

28. 大塚哲、高木智、井関将典、高津聖志、吉村昭彦(2001,12/12)

SH2-Bはマウス生殖腺の発生および機能維持に必須である

第24回日本分子生物学会, 横浜

29. Yamei Niu, Noriko Okamoto, Takashi Murata, Akihiko Yoshimura, Nobuyuki Kobayashi(2001,12/9)

Characterization of a New IL13 Receptor Binding Protein-IL13RBP1

第24回日本分子生物学会, 横浜

30. 金城市子、吉村昭彦(2001,12/12)

ゲノムメチル化による持続的STAT3活性化制御の解析

第24回日本分子生物学会, 横浜

31. 吉田隆文、佐田通夫、吉村昭彦(2001,12/9)

C型肝炎ウイルスコア蛋白による発癌機構におけるJAK-STAT系の役割に関する検討

第24回日本分子生物学会, 横浜

32. 佐々木敦朗、脇岡徹、武富孝治、加藤玲子、吉村昭彦(2001,12/10)

SPRED, SproutyファミリーによるRas/ERKシグナルの制御機構

第24回日本分子生物学会, 横浜

33. 加藤玲子、脇岡徹、佐々木敦朗、吉村昭彦(2001,12/10)

新規分子Spred3の遺伝子構造と機能解析

第24回日本分子生物学会, 横浜

免疫病態学分野

Division of Clinical Immunology

当部門では診療上、自己免疫疾患、血液疾患、内分泌代謝疾患、肝疾患など多岐にわたる病態を取り扱うため、これらに関連した多彩な基礎的研究が行われている。すなわち、自己免疫疾患や血液疾患におけるリンパ球や免疫グロブリン遺伝子の解析、癌関連抗原 RCAS1 の発現、テロメラーゼの解析と活性制御機構などに関する研究と、細胞内脂肪滴構成蛋白に関する研究などである。

人事面では、平成 13 年 3 月 31 日付で杉村隆史（助手、肝臓病学）が国立東病院へ転出した。平成 13 年 10 月 1 日より魏平が中国医科大より留学生として着任し、4 月 1 日より九州大学大学院生となり、研究に従事している。

研究活動の概況

A.慢性関節リウマチにおける滑膜浸潤 B 細胞の集積機構と滑膜内胚中心様構造の関節炎発症、進展における役割

慢性関節リウマチ関節滑膜にはリンパ節などの 2 次リンパ組織にみられる胚中心と極めて類似した構造が存在する（異所性胚中心）。ここでは B 細胞のオリゴクローナルな増殖と体細胞突然変異などの分化、成熟過程がみられることが示されている。最近の研究から、異所性胚中心内には濾胞樹状細胞がみられること、B 細胞は自己反応性 T 細胞の活性化に重要な役割を果たすことなどが明らかにされており、このことは関節滑膜が炎症や外傷に伴い、豊富な自己抗原の供給源になりうることも考えあわせると、異所性胚中心は B、T 細胞のトレランスの破綻や自己反応性 B、T 細胞の産生に重要な役割を果たしている可能性がある。我々は現在までに RT-PCR-SSCP 法を用いた B 細胞クローナリティーの検出法を開発するとともに、慢性関節リウマチ関節滑膜内で B 細胞がオリゴクローナルに増殖していることを明らかにした。現在、個々の異所性胚中心の抗原特異性の検討、異所性胚中心構成 B 細胞と周辺に浸潤する形質細胞、メモリーB 細胞のクローナルな関係などを明らかにすることにより、慢性関節リウマチの関節炎を惹起、進展させる上での、関節滑膜内異所性胚中心の機能的役割を解析中である。

B.慢性関節リウマチ滑膜 T リンパ球のテロメラーゼ活性に対する TRAIL の効果

慢性関節リウマチ滑膜の CD4 T リンパ球は強いテロメラーゼ活性を持っていることが知られているが、その意義および調節機構については未知である。近年 TNF スーパーファミリーの TRAIL がマウスのコラーゲン誘発関節炎モデルにおいて発症を抑制すること、T リンパ球の細胞周期の進展を止めることが示された。われわれは慢性関節リウマチ滑膜より純化した CD4 T リンパ球に対する TRAIL の効果をテロメラーゼ活性、細胞周期、アポトーシスより検討する。

C.多発性骨髄腫に対する抗テロメラーゼ細胞療法の確立

染色体末端のテロメアの長さの調節に中心的役割を果たすテロメラーゼの活性はほとんどの悪性腫瘍で検出されるが、正常細胞にはごく一部しか検出されないことが分かっている。われわれはこれまでに多発性骨髄腫においてテロメラーゼ活性が検出され、その強さは細胞増殖と密接な関連があり、IL-6 を添加培養すると活性の上昇が見られることを明らかにした。また、テロメラーゼ構成蛋白である TERT の一部はクラス I HLA によって細胞表面に表出しており、細胞療法の標的となる可能性が示唆されている。われわれは hTERT ペプチドにてパルスした樹状細胞を用いて誘導された細胞傷害性 T リンパ球は多発性骨髄腫細胞株を傷害することを確認した。多発性骨髄腫に対する抗テロメラーゼ療法の臨床応用をめざしている。

D.癌関連抗原 RCAS1 の病態における解析と発現制御機構に関する研究

a. 慢性関節リウマチ滑膜病変形成における癌関連抗原 RCAS1 の役割

我々は滑膜組織の免疫染色で RCAS1 が発現していることを見出した。滑膜培養細胞でも RCAS1 の発現を認めており、炎症性サイトカインの添加で低下することから RCAS1 が関節局所での炎症を制御している可能性が示唆される。慢性関節リウマチ関節滑膜における癌関連抗原 RCAS1 の役割を明らかにするために、関節滑膜での RCAS1 とそのレセプターの発現を検討するとともに、滑膜培養細胞を用い、種々の炎症関連サイトカインが滑膜細胞の RCAS1 産生に及ぼす影響を検討する。

b.慢性炎症における RCAS1 と造血障害

近年、赤芽球前駆細胞が RCAS1 レセプターを発現し RCAS1 によりアポトーシスが誘導される事、また骨髄マクロファージが RCAS1 を発現している事が報告された。我々はヒト末梢血 CD14 陽性細胞より分化させたマクロファージを用い RCAS1 の発現、分泌を解析し、マクロファージから分泌された RCAS1 における赤芽球前駆細胞のアポトーシス誘導効果を検討した。RCAS1 の発現、分泌は LPS、炎症性サイトカインの添加で変化し、RCAS1 が炎症の制御に深く関わっていることが示唆された。また RCAS1 産生が亢進する条件下で赤芽球前駆細胞を共培養すると細胞数減少効果、細胞障害性を認めこれは anti-RCAS1 mAb の添加により阻害された。このことよりマクロファージから分泌された RCAS1 においても赤芽球前駆細胞のアポトーシス誘導効果を認めることが明らかになり、RCAS1 が慢性炎症における貧血の発症に深く関与している可能性が示唆された。今後、造血障害を有する自己免疫疾患症例において RCAS1 の病態生理学的意義を検討する。

c.サルコイドーシス、間質性肺炎における RCAS1 の役割

サルコイドーシス、間質性肺炎において、それぞれ肉芽腫、肺胞上皮、肺胞マクロファージに RCAS1 の発現が見られることを明らかにした。さらにサルコイドーシスでは肺胞洗浄液中の RCAS1 濃度が高値であること、肺胞洗浄液中のリンパ球数と RCAS1 濃度が逆相関することを見出した。今後はさらに解析のサンプル数を増やすとともに、RCAS1 を用いたサルコイドーシス、間質性肺炎の治療の可能性について検討する。

E.細胞内脂肪滴構成蛋白の発現調節機構と機能解析および病態における検討

a. adipose differentiation-related protein (ADRP)の発現調節機構

ADRP は細胞内脂肪滴表面に存在する蛋白で、遊離脂肪酸の取り込みなど細胞内脂肪滴の形成に関与していると推測されるが、その機能はよく分かっていない。肝細胞、マクロファージなどに極めて高い発現を認める。この遺伝子の発現調節機構について検討を進めており、発現制御に関わるいくつかの因子を明らかにした。この蛋白の発現や機能を制御する方法を開発し、細胞内脂

肪の過剰蓄積に基づく病態、たとえば脂肪肝、動脈硬化、インスリン抵抗性症候群などの治療への応用を探索する。

b. ADRP の関連遺伝子の探索

ADRP (adipose differentiation-related protein)や perilipin(PLN)は特に脂肪細胞において細胞内脂肪滴構成蛋白としての役割が報告されている。ADRP や PLN 以外にも細胞内脂肪滴構成蛋白が存在する可能性もあり、また、co-factor の存在する可能性も考え、関連遺伝子を同定する。

c. ADRP の膵β細胞における役割に関する検討

膵β細胞において脂肪酸の果たす役割は十分には解明されていない。脂肪酸が糖尿病発症に関する役割については lipotoxicity という概念で論じられているが、十分には理解されていない。膵β細胞に ADRP を発現させ、インスリン分泌動態に及ぼす影響を検討する。

d. ADRP の病態生理的意義の解明

細胞内に過剰に脂肪が蓄積する状態は種々の疾患でみられる。病態における意義を明らかにするため、動脈硬化でのマクロファージの泡沫化過程、および膵β細胞での脂肪毒性への ADRP の関わりについて、検討を進めている。今後、ADRP 過剰発現マウスを作製し、とくに膵β細胞機能、肝細胞機能、マクロファージ機能など個々の細胞の機能を解析するとともに、動脈硬化の発症、インスリン抵抗性など個体レベルでの表現型を解析し、ADRP の機能を明らかにする。

e. ADRP と共役する蛋白の探索

ADRP と細胞質内で結合する蛋白を探索するために、Yeast two hybrid System によるスクリーニングを行う。

F. ビタミンD受容体機能異常における脱毛に関与する因子について

毛周期の維持に不可欠な、VDRのターゲットジーンを同定すると共に、VDRのリガンド非依存性の生理的役割を明らかにする。

業績目録

原著論文

Kuniyoshi M, Nakamura M, Sakai H, Fukutomi M, Yokota M, Nishi H, Iwamoto H, Enjoji M, Uike N, Nishimura J, Nawata H, Muta K. 2001

High prevalence of hepatitis B or C virus infections in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16: 215-219

Shiokawa S, Suehiro Y, Uike N, Muta K, Nishimura J. 2001

Sequence and expression analyses of μ and δ transcripts in patients with Waldenström's macroglobulinemia.

Am. J. Hematol. 68: 139-143

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

Receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells, a novel regulator of apoptosis of erythroid progenitor cells.

Blood 98: 313-321

Orimo H, Hayashi Y, Fukunaga M, Sone T, Fujiwara S, Shiraki M, Kushida K, Miyamoto S, Soen S, Nishimura J, Oh-Hashi Y, Hosoi T, Gorai I, Tanaka H, Igai T, Kishimoto H.

(Osteoporosis Diagnostic Criteria Review Committee Japanese Society for Bone and Mineral Research) . 2001

Diagnostic criteria for primary osteoporosis: year 2000 revision *Osteoporosis.*

J. Bone Miner. Metab. 19: 331-337

Kobayashi Y, Nakata M, Maekawa M, Takahashi M, Fujii H, Matsuno Y, Fujishiro M, Ono H, Saito D, Takenaka T, Hirase N, Nishimura J, Akioka T, Enomoto K, Mikuni C, Hishima T, Fukuyama M, Sugano K, Hosoda F, Ohki M, Tobinai K. 2001

Detection of t (11; 18) in MALT-type lymphoma with dual-color fluorescence in situ hybridization and reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis.

Diagn. Mol. Pathol. 10: 207-213

Sakai Y, Kishimoto J, Demay MB. 2001.

Metabolic and cellular analysis of alopecia in vitamin D receptor knockout mice.

J Clin Invest 107:961-966.

Chen CH, Sakai Y, Demay MB. 2001.

Targeting expression of the human vitamin D receptor to the keratinocytes of vitamin D receptor null mice prevents alopecia.

Endocrinology. 142(12):5386-9.

Kita H, Mackay IR, Van De Water J, Gershwin ME. 2001

The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury.

Gastroenterology. 120:1485-501.

Kita H, Lian ZX, Van de Water J, He XS, Matsumura S, Kaplan M, Luketic V, Coppel RL, Ansari AA, Gershwin ME. 2002
Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells.
J Exp Med. 195:113-23.

Matsumura S, Van De Water J, Kita H, Coppel RL, Tsuji T, Yamamoto K, Ansari AA, Gershwin ME. 2002
Contribution to antimitochondrial antibody production: cleavage of pyruvate dehydrogenase complex-E2 by apoptosis related proteases.
Hepatology. 35:14-22.

安部康信、牟田耕一郎、平瀬伸尚、崔日承、松島孝充、原敬一、田口文博、末松栄一、柴田恵介、
鵜池直邦、西村純二、名和田新. 2002
骨髓異形成症候群におけるビタミンK₂の使用経験.
臨床血液 43: 117-121

症例報告

Hara K, Abe Y, Hirase N, Shiratsuchi M, Kihara T, Nishimura J, Nawata H, Muta K. 2001
Apoptosis resistance of mature neutrophils in a case of chronic neutrophilic leukaemia.
Eur. J. Haematol. 66: 70-71

Hirase N, Abe Y, Ishikura H, Muta K, Nawata H, Nishimura J. 2001
Autoimmune neutropenia with cyclic oscillation of neutrophilic count after steroid administration.
Int. J. Hematol. 73: 346-350

Hirayama K, Shiokawa S, Miyazaki Y, Nakamura M, Motomura S, Suehiro Y, Yoshikawa Y, Ikuyama S, Nishimura J. 2001.
Primary Sjögren's syndrome complicated by sarcoidosis and psoriasis vulgaris.
Mod Rheumatol 11:356-359.

安部康信、原敬一、白土基明、崔日承、松島孝充、南留美、木原亨、西村純二、名和田新、牟
田耕一郎. 2001
血球貪食症候群を合併したB細胞性リンパ腫の2例.
臨床血液 42: 35-39

松坂浩史、板場壮一、本村康明、牟田浩実、前田豊樹、千々岩芳春、末廣陽子、西村純二、吉河康
二. 2002

骨盤部放射線照射、回盲部切除後に巨赤芽球性貧血を呈した一例。

内科 89: 374-377

谷口 晋、生山祥一郎、平松真祐、塩川左斗志、西村純二、秦 聡孝、佐藤文憲、今川全晴、野村芳雄、笹野公伸. 2001.

アルドステロン・コルチゾール同時産生副腎腫瘍の一例。

日本内科学会雑誌 90:139-142.

福元 仁、白土基明、本村誠一、谷口 晋、末広陽子、平山健司、平松真裕、杉村隆史、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二. 2001.

免疫抑制剤による膠原病治療中に急性骨髄性白血病および骨髄異形性症候群を合併した二例。

九州リウマチ 20:47-50.

生山祥一郎、平松真祐、谷口 晋、西村純二

ミトコンドリア遺伝子異常を伴う糖尿病に偽性副甲状腺機能低下症類似の臨床所見を呈した1例

ホルモンと臨床 興味ある症例第39集: 73-77, 2001.

谷口 晋、末広 悟、杉村隆史、北村陽介、合田英明、白土基明、坂井義之、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二. 2002.

非定型的な皮膚硬化の分布を示した強皮症の一例。

九州リウマチ 21:108-111.

総 説

折茂 肇、林 泰史、福永仁人、曾根照喜、藤原佐枝子、白木正孝、串田一博、宮本繁仁、宗圓 聡、西村純二、大橋靖雄、細井孝之、五来逸雄、田中浩之、猪飼哲夫、岸本英彰. 2001

原発性骨粗鬆症の診断基準（2000年度改訂版）。

日本骨代謝学会雑誌 18: 76-82

工藤義弘、生山祥一郎. 2001.

生活習慣病予防に対する理学療法の効果とその限界。

理学療法 18:174-181.

谷口 晋、生山祥一郎、名和田 新. 2002

内分泌・代謝疾患とサーカディアンリズム

現代医療 34:117-122

著 書

西村純二. 2001

クリオグロブリン、クリオグロブリン血症ほか
免疫学事典(第2版), 東京化学同人、東京

生山祥一郎

単純性甲状腺腫

今日の治療指針 2002 (山口 徹、北原光夫総編集)、P479、医学書院、東京

塩川左斗志. 2001.

B細胞.

リウマチナビゲーター pp18-19、メディカルレビュー社、東京.

塩川左斗志. 2001.

免疫グロブリン.

リウマチナビゲーター pp20-21、メディカルレビュー社、東京.

塩川左斗志. 2001.

若年性関節リウマチと成人発症スティル病

看護のための最新医学講座、免疫アレルギー疾患 pp174-182、中山書店、東京.

学会発表

国際学会

Ikuyama S, Taniguchi S, Kuwano M, Nishimura J (2001, 6/20-6/23)

PPAR γ -mediated stimulation of the adipose differentiation-related protein (ADRP) gene expression in hepatocytes.

83rd Annual Meeting of The Endocrine Society, Denver, CO, USA

Kohgo Y, Nishimura J, Shiokawa S, Ohnishi K, Watanabe S, Shinozaki H, Tanaka S, Hamano S, Torimoto Y. (2001/8/18-24)

Distinct antigenicity of soluble transferrin receptors derived from erythroid and non-erythroid cells.

BioIron 2001 Cairns, Australia

Minami R, Abe Y, Nishimura J, Nawata H, Muta K (2001/8-25-28)

Key role of p16 in erythroid differentiation.

30th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology. Tokyo

Chen C, Sakai Y, Demay MB (2001/10/12-16)

Alopecia in VDR null mice is secondary to a keratinocyte defect and can be prevented by targeting expression of the human VDR to keratinocytes in vivo.

23rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research Oral Presentation, Phoenix, Arizona :

Sugimura T, Shiokawa S, Nishimura J. (2001/11/9-13)

Oligoclonal proliferation and local antigen-driven maturation of B cells in liver portal areas of patients with primary biliary cirrhosis.

52nd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver diseases, Dalas

Shinzaki H, Torimoto Y, Nishimura J, Shiokawa S, Ohnishi K, Watanabe S, , Tanaka S, Hamano S, Kohgo Y. (2001/12/7-11)

Distinct property of soluble transferrin receptors in anemia of chronic disease and chronic hepatitis. 43 rd Annual Meeting of American Society of Hematology. Orland

Choi I, Paiboonsukwong K, Nishimura J, Fucharoen S, Nawata H, Muta K. (2001/12/7-11)

Different pathway of erythropoietin and interferon gamma in preventing apoptosis of mature erythroid progenitor cells differ.

43 nd Annual Meeting of American Society of Hematology. Orland

国内学会

生山祥一郎、谷口 晋、今村美菜子、井口登與志、西村純二 (2001, 4/16~4/18)

細胞内脂肪滴構成蛋白 adipose differentiation-related protein (ADRP)の発現調節：PPAR γ と長鎖脂肪酸による発現調節

第44回日本糖尿病学会年次学術集会、京都

今村美菜子、中島直樹、井口登與志、谷口 晋、生山祥一郎、小林邦久、垣本真如子、江藤 隆、橋本俊彦、名和田 新 (2001, 4/16~4/18)

Swiss 3T3 線維芽細胞の脂肪蓄積における ADRP の役割：GFP-ADRP fusion protein 発現アデノウイルスを用いた検討

第44回日本糖尿病学会年次学術集会、京都

白土基明、末廣陽子、塩川左斗志、西村純二(2001/4/19-21)

Flu/CY 併用療法が奏功した cyclin D1 陰性 mantle cell lymphoma の 1 例
第 63 回日本血液学会総会, 名古屋

南 留美、本村誠一、安部康信、牟田耕一郎、梅村 創、西村純二、名和田新(2001/4/19-21)
K562 細胞での p16 遺伝子導入による SN38 感受性の変化
第 63 回日本血液学会総会, 名古屋

松島孝充、中嶋 学、大島孝一、崔 日承、原 敬一、南 留美、安部康信、西村純二、名和田新、渡
邊 武、牟田耕一郎(2001/4/19-21)
RCAS1 はアポトーシスを介して赤芽球系造血を抑制する
第 63 回日本血液学会総会, 名古屋

白土基明、末廣陽子、塩川左斗志、西村純二(2001/4/26)
Flu/CY 併用療法が奏功した cyclin D1 陰性悪性リンパ腫の 1 例
第 60 回大分臨床血液懇話会, 大分

塩川左斗志、松本直之、西村純二(2001/5/14-16)
慢性関節リウマチ患者病変関節内 B 細胞クローンの経時的解析
第 45 回日本リウマチ学会総会, 東京

合田英明、畠中文香、杉村隆史、谷口 晋、白土基明、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二、宮崎吉
孝(2001/5/14-16)
膠原病類似の病態を呈したヒトパルボウイルス B19 感染症の 5 例
第 45 回日本リウマチ学会総会, 東京

杉村隆史、塩川左斗志、西村純二(2001/5/17)
PBC 内門脈浸潤 B 細胞のクローナリティの解析
第 37 回日本肝臓学会総会, 横浜

北村陽介、白土基明、末廣陽子、谷口 晋、坂井義之、杉村隆史、塩川左斗志、生山祥一郎、西村
純二(2001/5/26)
赤芽球癆を合併したシェーグレン症候群の一例
第 253 回 日本内科学会九州地方会, 宮崎

末廣 悟、谷口 晋、杉村隆史、北村陽介、合田英明、白土基明、坂井義之、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二(2001/6/20)

非典型的な皮膚硬化の分布がみられた全身性硬化症の一例
第 60 回大分県リウマチ懇話会、大分

生山祥一郎、谷口 晋、井口登與志、西村純二 (2001, 6/29-7/1)

細胞内脂肪滴構成蛋白 adipose differentiation-related protein (ADRP)の発現調節機構(I) : PPAR γ による発現調節
第 7 4 回日本内分泌学会学術総会、横浜

坂井義之、岸本治郎、西村純二、名和田新、MarieDemay (2001, 6/29-7/1)

ビタミンD 受容体(VDR)機能異常と毛周期(毛再生)障害
第 74 回日本内分泌学会学術総会 横浜

谷口 晋、生山祥一郎、井口登與志、西村純二 (2001, 6/29-7/1)

細胞内脂肪滴構成蛋白 adipose differentiation-related protein (ADRP)の発現調節機構(II) : 長鎖脂肪酸による発現調節
第 7 4 回日本内分泌学会学術総会、横浜

今村美菜子、中島直樹、井口登與志、谷口 晋、生山祥一郎、小林邦久、垣本真如子、江藤 隆、橋本俊彦、名和田 新 (2001, 6/29-7/1)

Swiss 3T3 線維芽細胞の脂肪蓄積における ADRP の役割 : GFP-ADRP 融合蛋白発現アデノウイルスベクターを用いた検討
第 7 4 回日本内分泌学会学術総会、横浜

坂井義之、生山祥一郎、西村純二(2001,7/21)

ビタミンD 受容体(VDR)機能と上皮細胞-間葉系細胞間相互作用
VDR ノックアウトマウスを用いた、毛再生障害(脱毛)の検討
第 1 回西日本骨、関節関連疾患懇話会、福岡

末廣 悟、白土基明、谷口 晋、坂井義之、杉村隆史、合田英明、北村陽介、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二(2001/8/4)

後縦靭帯骨化症と肺繊維症を合併した乾癬性関節炎の一例
第 254 回日本内科学会九州地方会、久留米

今村美菜子、井口登與志、名和田 新、谷口 晋、生山祥一郎 (2001, 8/18)
脂肪細胞分化における Adipose Differentiation-Related Protein (ADRP)の役割
第6回アディポサイエンス研究会、大阪

谷口 晋、末廣 悟、杉村隆史、北村陽介、合田英明、白土基明、坂井義之、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二(2001/9/8-9)
非定型的な皮膚硬化の分布がみられた全身性強皮症の一例
第22回九州リウマチ学会、熊本

末廣 悟、白土基明、谷口 晋、坂井義之、杉村隆史、合田英明、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二(2001/9/13)
後縦靭帯骨化症と肺繊維症を合併した乾癬性関節炎の一例
第61回 大分県リウマチ懇話会、大分

谷口 晋、坂井義之、西村純二、生山祥一郎. (2001, 9/22)
術後ショックのエピソードから診断し得た Empty Sella による汎下垂体機能低下症の一例
第1回九州内分泌代謝フォーラム、福岡.

白土基明、末廣陽子、塩川左斗志、西村純二(2001/10/18)
消化管原発 CD4 陽性リンパ腫の1例
第62回大分臨床血液懇話会、大分

谷口 晋、坂井義之、西村純二、生山祥一郎. (2001, 10/23)
術後ショックのエピソードを示した Empty Sella による汎下垂体機能低下症の一例
第71回大分県内分泌同好会、大分.

白土基明、塩川左斗志、西村純二、安部康信、牟田耕一郎(2001/10/27)
多発性骨髄腫におけるテロメラーゼ活性の臨床的検討
第26回骨髄腫研究会総会、宇部

塩川左斗志、末廣陽子、白土基明、西村純二(2001/10/27)
原発性マクログロブリン血症腫瘍細胞の μ , δ 鎖転写産物の解析
第26回骨髄腫研究会総会、宇部

谷口 晋、生山祥一郎、北村陽介、坂井義之、白土基明、末廣陽子、杉村隆史、塩川左斗志、西村純二 (2001, 11/8-11/10)

赤芽球癆、シェーグレン症候群を合併した橋本病の一例

第44回日本甲状腺学会、那覇

白土基明、末廣陽子、塩川左斗志、西村純二、大島孝一(2001/11/13-15)

節外浸潤性の消化管原発CD4陽性T細胞リンパ腫の一例

第43回日本臨床血液学会、神戸

安部康信、崔日承、松島孝充、牟田耕一郎、名和田新、西村純二(2001/11/13-15)

骨髄異形性症候群におけるビタミンKの使用経験

第43回日本臨床血液学会、神戸

松島孝充、崔日承、安部康信、西村純二、牟田耕一郎、名和田新(2001/11/13-15)

IgM- κ 、IgG κ の2種類のM蛋白を伴った悪性リンパ腫の一例

第43回日本臨床血液学会、神戸

島本悦宏、新崎人士、井内康之、新藤基博、大西浩平、渡邊真司、高後 裕、塩川左斗志、西村純二、田中誠司、浜野明栄(2001/11/13-15)

血液および非血液疾患における血清可溶性トランスフェリン受容体の抗原性の検討

第43回日本臨床血液学会、神戸

千住猛、杉村隆史、坂井義之、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二(2001/11/23)

門脈腫瘍塞栓を契機に発見され放射線療法を施行した尾状葉原発肝細胞癌の一例

平成13年度九大医学部第三内科開講記念会、教室員および会員による発表講演福岡

末廣 悟、白土基明、谷口 晋、坂井義之、杉村隆史、合田英明、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二(2001/12/6)

下腿の筋膨隆により発見された非乾酪性肉芽腫性筋炎の一例

第62回 大分県リウマチ懇話会、大分

合田英明、白土基明、末廣陽子、谷口 晋、坂井義之、杉村隆史、宮崎吉孝、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二(2002/3/2-3)

SLE 類似の病態を呈したヒトパルボウイルス B19 感染症の 9 例

第 23 回 九州リウマチ学会 , 大分

末廣 悟、白土基明、谷口 晋、坂井義之、杉村隆史、合田英明、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二(2002/3/14)

手背腫脹と肩関節痛を伴う不明熱の一例

第 63 回 大分県リウマチ懇話会, 大分

講演

西村純二(2001/6/1)

教育講演：膠原病・リウマチ性疾患と血液異常

第 48 回福岡リウマチ懇話会, 福岡

西村純二(2001/6/15)

CML は何を教えてくれたか？

旭川血液カンファレンス, 旭川

生山祥一郎 (2001, 8/25)

核内受容体と病態

別府市医師会メディカルセミナー、別府

生山祥一郎 (2001, 10/22)

糖尿病を予防するには&糖尿病といわれたら

別府ハットウ温泉博覧会・公開講座、別府

杉村隆史. (2001, 2/17).

アルコールと病気.

第 93 回別府市医師会 市民健康教室、別府.

杉村隆史. (2001, 3/23).

原発性胆汁性肝硬変の治療「日常生活での過ごし方」.

大分県中央保健所 原発性胆汁性肝硬変相談会、別府.

杉村隆史 (2002.2.16)

知って得する肝臓病の最新まめ知識「肝臓の病気」

厚生労働省支援 市民のための医療講座、別府.

脳機能制御学分野

Division of Neurofunctional Genomics

生物にとって、その遺伝情報を担うゲノムDNAを細胞から細胞へ、親から子へと正確に伝え維持することは最も基本的な生物学的機能であるが、ゲノムDNAやその前駆体であるヌクレオチドは、酸素呼吸の過程で必然的に発生する活性酸素や生体防御のために生体が能動的に産生する活性酸素によって酸化される危険に常に曝されている。活性酸素に曝されたDNAやヌクレオチドプール中には種々の塩基あるいはヌクレオチドの酸化体が生じるが、このような酸化損傷は修復されないと突然変異を引き起こすことで細胞のがん化の原因となり、あるいは細胞死をひき起こすことで多くの変性疾患の原因になると考えられる。本分野では、活性酸素による非増殖性細胞の障害として「神経細胞死」に、また増殖性細胞の障害として「がん」に注目して「活性酸素によるゲノム障害とその防御機構」の解明を目指して研究を進めている。我々は、さらに活性酸素ストレスを受けた細胞におけるゲノム複製と遺伝子発現の制御に関わるシグナル伝達系(JSAP1)と前初期遺伝子群(*jun*, *fos*)に注目して、細胞増殖・分化そして細胞死など「細胞運命の決定メカニズム」の解明を進めている。

当分野の研究の一部は、「活性酸素による脳・神経細胞の障害とその防御機構」の課題で、平成10年12月1日より平成15年11月30日までの5年間、科学技術振興事業団の戦略的創造研究推進事業からの研究費のサポートを受けている。

平成13年度の人事異動は次の通りであった。平成13年4月1日付で、北村節子が科学技術振興事業団からの派遣職員として赴任した。大学院医学系学府大学院生として三年次の岡素雅子（臓器機能医学専攻）、一年次の本田陽子（分子常態医学専攻）、Mehrddad Behmanesh（分子常態医学専攻）、中原久美子（分子常態医学専攻）の4名が新たに加わった。さらに、平成14年3月末で大学院生の酒井康成が学位取得の上卒業、大西克典、田原一樹が単位取得の上退学した。

A. 活性酸素によるゲノム障害とその防御機構に関する研究

a. 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素、MTH1の解析

MTH1は大腸菌ホモログMutTと異なり、8-oxo-dGTPに加えてdATPの酸化体(2-OH-dATP, 8-oxo-dATP)とATPの酸化体(2-OH-ATP, 8-oxo-ATP)、さらに8-Cl-dGTPを効率良く分解する。我々はこれらヌクレオチドの中で8-oxo-dGTPと2-OH-dATPに注目し、MTH1タンパクがどのような分子メカニズムでこれら2種の酸化ヌクレオチドを認識するかをMTH1タンパク質に本来存在するトリプトファン残基の蛍光分析により検討した。MTH1タンパク質の蛍光強度は酸化ヌクレオチド結合に伴いほぼ半減することより、MTH1タンパク質1分子あたり4個存在するトリプトファン残基の少なくとも1つがヌクレオチド結合部位あるいは

その近傍に位置することが示唆された。8-oxo-dGTPと2-OH-dATPによる蛍光の減衰パターンがほぼ同じであることから、これらの2つのヌクレオチドはMTH1タンパク質に同様のモードで結合することが示唆された。酸化されていない通常のヌクレオチド (dGTPおよびdATP) の結合によっても蛍光は減衰したが、減衰の程度が小さいことから結合モードが異なることが示唆された。8-oxo-dGTPと2-OH-dATPは正常なヌクレオチドに比べタンパク質とより多くの接点を持つことで強く結合すると考えられる。またこの解析からヌクレオチド結合部位に位置するトリプトファン残基の近傍に負の電荷をもったアミノ酸残基が存在することが示唆された。NMRにより決定したMTH1の立体構造において117番目のトリプトファン残基 (W117) が負の電荷をもつアミノ酸残基の近傍に位置する事から、このトリプトファン残基をアラニンに置換したところ、変異タンパク質 (W117A) では活性が完全に消失し、さらに上述の蛍光も消失したことから 117番目のトリプトファン残基がヌクレオチド結合に必須であることが明らかになった。

b. DNA 中の 8-oxoG の除去修復酵素, OGG1 の解析

OGG1 は、DNA 中に存在する 8-oxoG の中でシトシンと対合した 8-oxoG のみを遊離塩基として切り出す 8-oxoG DNA グリコシラーゼ活性を持つ酵素である。OGG1 タンパク質はシステインに富むタンパク質であるが、その活性が一酸化窒素 (NO) に曝された細胞で顕著に失活することを見出した。失活した OGG1 の修飾アミノ酸の解析から一部のシステイン残基のニトロ化が確認された。炎症時などに酸化ストレスの亢進した細胞内では、OGG1 はシステイン残基の酸化やニトロ化により失活する可能性が高く、このことが炎症時の細胞障害の増悪に関与している可能性が示唆される。

Ogg1 遺伝子欠損マウスの長期観察において、肺がんの自然発症頻度が数倍上昇することを見出した。一方、*Mth1* 遺伝子欠損マウスとの交配により得られた *Ogg1/Mth1* 二重遺伝子欠損マウスにおいては、このような肺がんの自然発症がほとんど観察されなかった。さらに、肝臓から抽出した DNA 中の 8-oxodG の蓄積量を LC-MS/MS により定量したところ、*Ogg1* 欠損マウスでは野生型マウスの数倍のレベルまで上昇するのに対し、*Mth1* 欠損マウスでは 10~20% 程度のわずかな上昇を認めるのみであった。*Ogg1/Mth1* 二重欠損マウスでは *Ogg1* 単独欠損マウスよりさらに 8-oxodG の蓄積量が 10~20% 程度増加していた。この結果は、DNA 中の酸化塩基の蓄積とヌクレオチドプール中の酸化ヌクレオチドの蓄積がもたらす細胞障害の質が異なることを示唆する。

Ogg1 欠損および野生型マウス胚から分離した胚由来線維芽細胞を用いて、酸化ストレス負荷後の細胞内における 8-oxoG の分布の変化を免疫蛍光染色法で比較解析した。野生株では核およびミトコンドリアに検出された蛍光シグナルはともに H₂O₂ 負荷後 2 時間以内に急速に減少した。一方 *Ogg1* 欠損株では、核内シグナルは H₂O₂ 負荷後 2 時間以内にコントロール

のレベルまで低下するが、ミトコンドリアにおいては 2 時間たってもコントロールのレベルに低下することはなかった。以上から、OGG1 は核とミトコンドリアゲノム DNA の修復に重要であることが確認されたが、核ゲノムの 8-oxoG の修復には OGG1 以外の修復経路の存在が示唆された。

c. DNA 中の 8-oxoG に対合したアデニンと 2-OH-A の除去修復酵素, MYH の解析

ゲノム DNA 中の 8-oxoG は、複製の際にアデニンと誤って対合するために突然変異の原因となる。ヒト MYH 蛋白質は、8-oxoG に対合したアデニンとアデニンの酸化体の 2-OH-A を除去修復する活性を有する。我々は、MYH 欠損 ES 細胞において、自然突然変異率が 3 倍程度上昇し、8-oxoG に対合したアデニンの複製後修復が欠損していることを明らかにした。さらに、MYH が DNA 複製後に PCNA に依存して 8-oxoG に誤対合したアデニンを効率良く修復する事を明らかにした。

d. 新たな塩基除去修復酵素 APEX2 の解析

ヒト APEX2 (当初 APE2 と命名) cDNA をプローブとしてマウス *Apex2* cDNA および遺伝子をクローニングした。マウス *Apex2* 遺伝子はヒト同様 X 染色体上に位置し、5-アミノレブリン酸合成酵素をコードする *Alas2* 遺伝子の下流に逆方向に存在する。また、*Apex2* のプロモーター領域には Sp ファミリー転写因子および ELK1 の結合サイトがヒト、マウスとともに保存されていた。マウス *Apex2* 遺伝子は細胞増殖の活性化に伴って発現が誘導されることから、これらの転写因子がその発現制御に関わることが示唆された。また、*Apex2* の 106 塩基 5' 上流側には EST として報告されている mRNA に対応する新規遺伝子のエクソン/イントロンが見出された。この 2 つの遺伝子間領域は GC 含有が 60%前後で、かつ CpG 配列に富む CpG アイランドを形成することから、X 染色体の不活化に伴った遺伝子発現の制御に関わっている可能性が示唆される。マウス APEX2 蛋白質は核とミトコンドリアに局在し、核では PCNA と複合体を形成する。

B. Jun/Fos による細胞運命決定機構に関する研究

a. *fosB* 遺伝子改変 ES 細胞の樹立と解析

fosB 遺伝子の択一的スプライシング産物である Δ FosB 蛋白質の脳神経系における蓄積的発現は、コカインや脳虚血などのストレス応答時に重要な役割を持つことが示唆されつつある。我々は FosB と Δ FosB の機能の違いを明らかにするため、*fosB* 遺伝子の択一的スプライシングサイトに変異をノックインすることで FosB のみを発現する ES 細胞 (*fosB^f*) と Δ FosB のみを発現する ES 細胞 (*fosB^d*) を樹立し、さらに EGFP をエクソン 2 に挿入した *fosB* 完全欠損 ES 細胞を樹立した。野生株とこれらの変異 ES 細胞株を用いて、Nestler らのグループから Δ FosB の標的として

報告されているCdk5および我々がこれまでに同定した Δ FosBの標的分子である神経再生因子 Galectin-1の発現を解析した。

Cdk5に関してはどの細胞株においても発現量に差が認められなかった。一方、Galectin-1は野生株と Δ FosB発現ES細胞では血清刺激により発現が同程度に誘導されたが、FosBのみ発現するES細胞ではその誘導発現が完全に消失していた。また、*fosB*完全欠損ES細胞では、血清刺激によるGalectin-1の発現レベルが野生型以上に増加していた。 Δ FosBの過剰発現で Galectin-1の発現量が大幅に増加することも確認された。

以上から、Galectin-1の発現量が、FosBと Δ FosBの両者の存在比によって大きく変動することが明らかになった。

b. JNK カスケードスキャフォールド蛋白質 JSAP1 の機能解析

JSAP1はMAPキナーゼカスケード、特にJunタンパク質のリン酸化に関わるJNK経路の活性化を空間的に制御するスキャフォールド蛋白質として我々が同定した新規蛋白質である。我々は、このJSAP1の生理的機能を明らかにする目的で、*Jsap1*遺伝子欠損ES細胞株を樹立した。ヘテロの*Jsap1*遺伝子欠損ES細胞をマウス初期胚に移植し得られたキメラマウスと野生型マウスとの交配したところ、ヘテロの*Jsap1*遺伝子欠損マウスのみならずES細胞由来の野生型の*Jsap1*遺伝子を持つマウスも得られなかった。このことから、*Jsap1*遺伝子のヘテロ欠損でも個体の初期発生あるいは生殖細胞系列の形成に異常をもたらす可能性が示唆された。

我々は、脳神経系におけるJSAP1の機能を調べる目的でホモの*Jsap1*遺伝子欠損ES細胞株を樹立し、レチノイン酸誘導による神経分化系を用いて神経細胞におけるJSAP1の機能解析を行っている。ES細胞から分化した神経細胞では、JSAP1は主にNeuriteの成長円錐、またはシナプスを結成していると思われるNeuriteの接触部位に局在した。野生型およびホモの*Jsap1*遺伝子欠損神経細胞のNeuriteの長さを測定したところ、欠損株においてNeuriteの伸長が有意に抑制されていることが分かった。また、欠損株においてはシナプスのマーカーであるsynaptophysinの局在が変化することも見出した。さらに、嗅球における神経軸索のガイダンスや細胞運命の決定などに関わるGalectin-1の発現がJSAP1欠損株において有意に低下することが明らかになった。この結果は、Galectin-1の発現制御は、 Δ FosBだけでなくJunタンパク質にも依存している事を示唆している。

以上の結果から、我々は、JSAP1は個体の初期発生の中でも特に脳・神経系の発生分化に関与していると考えている。本研究は、金沢大学がん研究所の善岡克次博士との共同研究である。

C. 転写伸長因子 Elongin A を欠損するマウス ES 細胞の樹立と解析

Elongin は、アデノウイルス主要後期プロモーターからの転写を促進するタンパク質として同定され、その後、転写の伸長相に作用して Pol II による mRNA の合成速度を増加させる

ことが明らかとなった。Elongin は A, B, C の3つのサブユニットからなる3量体である。哺乳動物の Elongin A は約 770 個のアミノ酸からなり, C 末端部分が転写伸長促進に必要であるが, この領域には Elongin B, C との結合に必要な配列も存在する。精製された Elongin A タンパク質は, *in vitro* 転写系において, 単独で軽度の転写伸長活性を有し, Elongin B と C は正の調節性サブユニットとして機能することが示された。さらに最近 Elongin B, C は VHL, CUL2, Rbx1, UBC5 タンパク質と複合体を形成し, ユビキチンリガーゼとして働くことも明らかとなっている。

このような中, 我々は Elongin A の生理的機能を明らかにする目的で, マウス ES 細胞を用いて, Elongin A の遺伝子座をホモに欠損する細胞株の樹立を試みた。Elongin A の転写活性化必須部位を含むエキソン 8, 9, 10 およびこの周辺のイントロンをネオマイシン耐性遺伝子カセットで置換したターゲティングベクターを ES 細胞に導入し, ヘテロ欠損株を単離した。さらに高濃度の G418 存在下で培養することにより, ホモ欠損株を樹立した。Elongin A ホモ欠損 ES 細胞では, 増殖能の低下が観察され, また, DNA マイクロアレーを用いた遺伝子発現の変化を解析したところ, 一部(4%)の遺伝子群の発現が減少あるいは増加していることが判明した。

本研究は, 東京医科歯科大学の北嶋繁孝博士, 高知医科大学の麻生悌二郎博士との共同研究である。

業績目録

原著論文

1. Rodriguez, J.J., Garcia, D.R., Nakabeppu, Y., and Pickel, V.M. 2001.
Enhancement of laminar FosB expression in frontal cortex of rats receiving long chronic clozapine administration.
Exp. Neurol. 168(2), 392-401.
2. Iida, T., Furuta, A., Kawashima, M., Nishida, J., Nakabeppu, Y., and Iwaki, T. 2001.
Accumulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and increased expression of hMTH1 protein in brain tumors.
Neuro-oncol. 3(2), 73-81.
3. Tsuchimoto, D., Sakai, Y., Sakumi, K., Nishioka, K., Sasaki, M., Fujiwara, T., and Nakabeppu, Y. 2001.
Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell

nuclear antigen.

Nucleic Acids Res. 29(11), 2349-2360.

4. Kasprzak, K. S., Y. Nakabeppu, T. Kakuma, Y. Sakai, K. Tsuruya, M. Sekiguchi, J. M. Ward, B. A. Diwan, K. Nagashima, and B. H. Kasprzak. 2001.
Intracellular distribution of the antimutagenic enzyme MTH1 in the liver, kidney and testis of F344 rats and its modulation by cadmium.
Exp. Toxicol. Pathol. 53, 325-335.
5. Jaiswal, M., N. F. LaRusso, K. Nishioka, Y. Nakabeppu, and G. J. Gores. 2001.
Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide.
Cancer Res. 61, 6388-6393.
6. Furuta, A., T. Iida, Y. Nakabeppu, and T. Iwaki. 2001.
Expression of hMTH1 in the hippocampi of control and Alzheimer's disease.
Neuroreport. 12, 2895-2899.
7. Tsuzuki, T., A. Egashira, H. Igarashi, T. Iwakuma, Y. Nakatsuru, Y. Tominaga, H. Kawate, K. Nakao, K. Nakamura, F. Ide, S. Kura, Y. Nakabeppu, M. Katsuki, T. Ishikawa, and M. Sekiguchi. 2001.
Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98, 11456-11461.
8. Matsukura, S., Miyazaki, K., Yakushiji, H., Ogawa, A., Harimaya, K., Nakabeppu, Y., and Sekiguchi, M. 2001.
Expression and prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hepatocellular, gastric, and breast cancers.
Ann. Surg. Oncol. 8(10), 807-816.
9. Iida, T., A. Furuta, K. Nishioka, Y. Nakabeppu, and T. Iwaki. 2002.
Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain.
Acta Neuropathol. 103, 20-25.
10. Fujikawa, K., H. Yakushiji, Y. Nakabeppu, T. Suzuki, M. Masuda, H. Ohshima, and H. Kasai. 2002.
8-Chloro-dGTP, a hypochlorous acid-modified nucleotide, is hydrolyzed by hMTH1, the human MutT homolog.
FEBS Lett. 512, 149-151.

11. Hayashi, H., Y. Tominaga, S. Hirano, A. E. McKenna, Y. Nakabeppu, and Y. Matsumoto. 2002.
Replication-Associated Repair of Adenine:8-Oxoguanine Mispairs by MYH.
Curr. Biol. 12, 335-339.
12. Sakai, Y., M. Furuichi, M. Takahashi, M. Mishima, S. Iwai, M. Shirakawa, and Y. Nakabeppu. 2002.
A molecular basis for the selective recognition of 2-hydroxy-dATP and 8-oxo-dGTP by human MTH1.
J. Biol. Chem. 277, 8579-8587.
13. Kato, K., S. Horiuchi, A. Takahashi, Y. Ueoka, T. Arima, T. Matsuda, H. Kato, J. Nishida, Y. Nakabeppu, and N. Wake. 2002. Contribution of estrogen receptor _ to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation and its implication for escape from senescence by modulating the p53 pathway.
J. Biol. Chem. 277, 11217-11224.

総説

1. 中別府雄作. 2001.
脳・神経細胞における塩基損傷とその修復の意義
蛋白質核酸酵素, 第46巻, 941-949.
2. 富永洋平, 中別府雄作. 2001.
活性酸素による核酸の酸化損傷とその防御機構
化学と生物, 第39巻, 223-231.
3. Nakabeppu, Y. 2001.
Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage.
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 68, 75-94.
4. Nakabeppu, Y. 2001.
Molecular genetics and structural biology of human MutT homolog, MTH1.
Mutat. Res. 477(1-2), 59-70.
5. Nakabeppu, Y., Y. Tominaga, D. Tsuchimoto, Y. Ide, S. Hirano, Y. Sakai, K. Sakumi, and M. Furuichi., 2001.
Mechanisms Protecting Genomic Integrity from Damage Caused by Reactive Oxygen Species: Implications for Carcinogenesis and Neurodegeneration.
Environ. Mutagen. Res. 23, 197-209.

著書

1. 中別府雄作. 2001.
ゲノム安定性, DNA 修復
新女性医学体系 41 婦人科腫瘍の分子・細胞生物学 (中山書店), 69-84.

学会発表

1. 中別府雄作. (2001, 4/27-28)
活性化素による脳・神経細胞の障害とその防御機構
CREST「脳を知る・守る」合同シンポジウム21, 京都.
2. 作見邦彦, 西岡智子, 中別府雄作. (2001, 4/27-28)
*fosB*遺伝子による細胞運命の制御と分子メカニズムの解析 (I)
CREST「脳を知る・守る」合同シンポジウム21, 京都.
3. 田原一樹, 富永洋平, 中別府雄作. (2001, 4/27-28)
*fosB*遺伝子による細胞運命の制御と分子メカニズムの解析 (II)
CREST「脳を知る・守る」合同シンポジウム21, 京都.
4. 酒井康成, 古市正人, 岩井成憲, 中別府雄作. (2001, 4/27-28)
酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素MTH1の基質認識機構の解析
CREST「脳を知る・守る」合同シンポジウム21, 京都.
5. 飯田崇, 古田晶子, 岩城徹, 中別府雄作. (2001, 4/27-28)
Alzheimer病における hOGG1 および hMTH1 の免疫組織化学的検討
CREST「脳を知る・守る」合同シンポジウム21, 京都.
6. 中別府雄作. (2001, 5/26)
核酸の酸化障害とその防御機構: 発がんと神経変性への関わり
平成13年度日本環境変異原学会公開シンポジウム, 東京.
7. 中別府雄作. (2001, 6/2)
酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素MTH1の分子細胞生物学
第1回日本蛋白質科学会年会シンポジウム, 大阪.
8. Masaki MISHIMA, Noriyuki ITO, Takahisa IKEGAMI, Yuriko YAMAGATA,
Mutsuo SEKIGUCHI, Yusaku NAKABEPPU and Masahiro SHIRAKAWA (2001,
8/20)
Tertiary structure of human MTH1 and its interaction with oxidative-damaged
DNA precursors,
XIX International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems,
Florence , Italy.

9. Teijiro Aso, Katsuhisa Yamazaki, Kazunori Sugahara, Deshun Ma, Yusaku Nakabeppu and Shigetaka Kitajima (2001, 8/30)
 FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF TRANSCRIPTION ELONGATION FACTOR ELONGIN AND THE VHL TUMOR SUPPRESSOR PROTEIN
 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting , NewYork , USA.
10. 作見邦彦, 許萍, 富永洋平, 續輝久, 関口睦夫, 中別府雄作 (2001, 9/26)
Ogg1 遺伝子欠損マウスで観察された肺の自然発癌
 第60回日本癌学会総会, 横浜.
11. 藤川勝義, 薬師寺浩之, 中別府雄作, 鈴木利典, 増田光治, 大島寛史, 葛西宏 (2001, 9/26)
 ヒトMTH1蛋白質による8-クロロ-dGTPの特異的分解
 第60回日本癌学会総会, 横浜.
12. 中川内哲治, 副島英伸, 佐藤勇司, 松倉史郎, 北島吉彦, 原田晴仁, 中別府雄作, 関口睦夫, 宮崎耕治, 江見充, 向井常博 (2001, 9/26)
 プロモーター領域のメチル化によるO6-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ (MGMT) の転写制御
 第60回日本癌学会総会, 横浜.
13. 北島吉彦, 田中雅之, 中別府雄作, 関口睦夫, 宮崎耕治 (2001, 9/26)
 胃癌進展過程におけるDNA修復酵素の発現低下の解析
 第60回日本癌学会総会, 横浜.
14. 中別府雄作 (2001, 9/27)
*fosB*遺伝子による細胞運命とGalectin-1の発現制御
 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会シンポジウム, 京都.
15. 山崎勝久, 管原和宣, 張純, 中別府雄作, 北嶋繁孝, 麻生悌二郎 (2001, 9/27)
 VHL癌抑制蛋白と相互作用する転写因子エロンガンの機能
 日本人類遺伝学会第46回大会, 埼玉.
16. 中別府雄作 (2001, 10/7)
 活性酸素種による核酸の酸化障害とその防御機構
 第6回金沢ニューロサイエンス・シンポジウム, 金沢.
17. 中別府雄作, 土本大介 (2001, 10/25)
 ミトコンドリアにおけるDNA酸化障害の防御機構
 第74回日本生化学会大会シンポジウム, 京都.
18. Yusaku Nakabeppu (2001, 10/28)
 Oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species, and protective mechanisms against the damage

第8回国際環境変異原学会奈良サテライトミーティング・シンポジウム, 奈良.

19. Hiroyuki Kamiya, Hiroyuki Yakushiji, Yusaku Nakabeppu and Hideyoshi Harashima (2001, 10/27)
The human MTH1 protein does not act on damaged dGTPs formed by nitric oxide. 第8回国際環境変異原学会奈良サテライトミーティング, 奈良.
20. Yasunari Sakai, Masato Furuichi, Masayuki Takahashi, Masaki Mishima, Shigenori Iwai, Masahiro Shirakawa, and Yusaku Nakabeppu (2001,11/6)
A Molecular Basis for the Selective Recognition of 2-Hydroxy-dATP and 8-Oxo-dGTP by MTH1 Which Is Known to Suppress Spontaneous Carcinogenesis. 第3回3Rシンポジウム : DNA Replication, Recombination and Repair, 三木.
21. Masayuki Takahashi, Yasunari Sakai, Hiroyuki Yakushiji, Mutsuo Sekiguchi, Shigenori Iwai, and Yusaku Nakabeppu (2001,11/6)
Role of tryptophan residues in the recognition of mutagenic oxidized nucleotides by human antimutator MTH1 protein
第3回3Rシンポジウム : DNA Replication, Recombination and Repair, 三木.
22. Masaki Mishima, Noriyuki Itoh, Yasunari Sakai, Hiroyuki Kamiya, Yusaku Nakabeppu, Masahiro Shirakawa. (2001,11/6)
Structural studies of the human MTH1
第3回3Rシンポジウム : DNA Replication, Recombination and Repair, 三木.
23. 三島正規, 伊藤紀幸, 酒井康成, 紙谷浩之, 中別府雄作, 白川昌宏 (2001, 11/14)
ヒト遺伝子修復酵素hMTH1の構造決定とその加水分解の研究
第40回NMR討論会, 京都.
24. 平野世紀, 富永洋平, 本田陽子, 中別府雄作 (2001, 12/9)
MYHタンパク質はマウスES細胞における自然突然変異の生起を抑制する
第24回分子生物学会年会, 横浜.
25. 酒井康成, 古市正人, 高橋正行, 三島正規, 岩井成憲, 白川昌宏, 中別府雄作 (2001, 12/11)
酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素hMTH1の機能解析 : 2-OH-dATPおよび8-oxo-dGTP識別の分子機構, 第24回分子生物学会年会, 横浜.
26. 三島正規, 伊藤紀幸, 酒井康成, 紙谷浩之, 中別府雄作, 白川昌宏 (2001, 12/11)
ヒトMTH1の立体構造とその加水分解反応の解析
第24回分子生物学会年会, 横浜.
27. 大野みずき, 中別府雄作 (2001, 12/11) : 酸化ストレスを受けた細胞における8-オキソグアニンの動態, 第24回分子生物学会年会, 横浜.

28. Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu (2001, 12/11)
 Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen
 第24回分子生物学会年会, 横浜.
29. 鶴屋和彦, 古市正人, 富永洋平, 篠崎倫哉, 徳本正憲, 吉光隆博, 福田恭一, 金井英俊, 平方秀樹, 中別府雄作 (2001, 12/11)
 ラット虚血腎臓での8-オキソグアニンの蓄積と修復酵素OGG1の発現変化
 第24回分子生物学会年会, 横浜.
30. Akimasa Ichinoe, Yohei Tominaga, Seiki Hirano, Yusaku Nakabeppu (2001, 12/11)
 Characterization of Two Forms of Mouse MYH Proteins Encoded by Alternatively Spliced Transcripts
 第24回分子生物学会年会, 横浜.
31. 山崎勝久, 北嶋繁孝, 麻生悌二郎, 富永洋平, 中別府雄作 (2001, 12/11)
 転写伸長因子Elongin AはマウスES細胞の生存には必須ではない
 第24回分子生物学会年会, 横浜.
32. 井手康人, 富永洋平, 土本大介, 中別府雄作 (2001, 12/16)
 マウスAPE2の発現とPCNAとの相互作用
 第24回分子生物学会年会, 横浜.
33. 酒井康成, 古市正人, 高橋正行, 三島正規, 岩井成憲, 白川昌宏, 中別府雄作 (2001, 12/16)
 酸化プリンヌクレオシド三リン酸分解酵素hMTH1の機能解析: 2-OH-dATPおよび8-oxo-dGTP識別の分子機構
 第24回分子生物学会年会, 横浜.
34. 酒井康成, 小田尚伸, 古市正人, 中別府雄作 (2002, 1/31)
 遺伝子多型にともなうヒトMTH1蛋白質の細胞内局在の変化
 第1回日本ミトコンドリア研究会年会, 東京.
35. 深江治郎, 久保紳一郎, 高梨雅史, 服部信孝, 水野美邦, 西岡憲一, 大坪俊夫, 作見邦彦, 富永洋平, 古市正人, 中別府雄作 (2002, 1/31)
 パーキンソン病における酸化防御酵素OGG1, MYHの検討
 第1回日本ミトコンドリア研究会年会, 東京.
36. 大野みずき, 富永洋平, 作見邦彦, 中別府雄作 (2002, 2/1)
 酸化ストレス負荷後の8-オキソグアニンの動態とOGG1の関与
 第1回日本ミトコンドリア研究会年会, 東京.

37. 中別府雄作 (2002, 1/27)

活性酸素による核酸の酸化障害とその防御機構：発がんや神経変性への関わり
第12回日本病態生理学大会シンポジウム, 松山.

38. 中別府雄作 (2002, 2/2)

活性酸素障害による脳の老化とその防御機構
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所公開シンポジウム2002, 名古屋.