

ゲノム機能制御学部門

Department of Molecular Genetics

# ゲノム集団遺伝学分野

## Division of Molecular Population Genetics

本分野は、生体防御医学研究所の改組に伴い、新しい研究室として平成 13 年度に新設された。8 月 1 日より、山本 健が旧遺伝学部門より助教授として異動した。教官は 1 名であるが、ゲノムの高次構造と転写制御機構の解明、およびゲノムの配列情報を利用した統計遺伝学的手法による疾患関連遺伝子の同定を目指し、平成 13 年度は免疫遺伝学部門との共同研究により、以下の研究を行った。

### A. ヘテロクロマチン構成因子の解析

真核生物は、遺伝情報を安定に保ち正確に発現して細胞分化を維持するために多様な機構を働かせており、そのうちの一つは、クロマチンと呼ばれるゲノム DNA の高次構造である。クロマチン構造の変化をもたらす因子は遺伝子発現制御の基盤を成し、近年、複数のクロマチン構造変換因子複合体、ヒストンの修飾酵素が同定され、既知の転写因子とそれらの相互作用が明らかにされるに及び、遺伝子発現の制御機構が遺伝子特異的転写因子によるクロマチンの構造変化によって説明されるに至った。一方、クロマチンはその凝集の程度によりユークロマチンとヘテロクロマチンとに形態分類されている。発現が活性化されている遺伝子はユークロマチンの状態にあり、上に述べた転写制御機構は、主としてユークロマチンを舞台とするものである。ヘテロクロマチンは凝集したスポットとして観察され、遺伝子発現は不活化されており、複数のヘテロクロマチンに特異的なタンパクにより構成されている。ユークロマチンからヘテロクロマチン、あるいはその逆の変換過程は未だ不明であるが、局所的なクロマチン構造変換とは異なり、広い範囲にわたる遺伝子発現制御機構の一つとして興味深い。本分野では、この変換過程を調節する因子の同定を目指し、まず、未だ全容が不明なヘテロクロマチン構成因子の解析を進めている。

ヘテロクロマチンの主要因子として HP1 が同定されている。HP1 とクロマチンとの相互作用は長い間不明であったが、ヒストンメチル化酵素 (HMTs) の発見に続いて、メチル化 H3 に HP1 が結合することが明らかとなった。HMTs の一つである SUV39 はヘテロクロマチンに局在し、メチル化 H3 と HP1 の相互作用の維持、すなわちヘテロクロマチンの基本構成の維持に重要であることが予想されたため、SUV39 と相互作用しその機能を制御する因子の同定を開始した。まず、SUV39 と HP1 の直接的な相互作用はこれまでに報告がなかったが、*in vitro* において SUV39 のクロモドメインよりも N 末側の部位と HP1 のクロモシャドウドメインが相互作用すること、そこには HP1 のクロモシャドウドメインを介したダイマー形成が必須であることを明らかにした。SUV39 と相互作用するクロマチン蛋白を数種同定したが、これらの蛋白の機能的相互作用の解析を現在引き続き行っている。

### B. 全ゲノム連鎖・相関解析による多因子疾患の遺伝要因の解明

現代医学が解決を迫られている、がん、自己免疫病、糖尿病、アレルギーなどは、複数の遺伝要因と環境

要因の相互作用によって発症する多因子疾患である。これらの疾患の遺伝的要因を明らかにするためには、遺伝学的解析法が必須であり、その手法を用いて疾病発症関連遺伝子を同定し、発症機序の分子レベルでの解明とそれに基づく新しい診断・治療・予防法の基盤技術を開発することは有意義である。これまでは、既知の知識に基づいて選択された疾患候補遺伝子を個別に解析する手法が主流であったが、特に、ゲノム解析に必要な多検体同時解析法の進展により、網羅的・物理的に疾患関連遺伝子を探索することが可能となった。本分野では、他施設との共同研究により、以下の疾患に関して全ゲノムを網羅的に遺伝学解析し、未知の疾病発症関連遺伝子の同定を目指している（特定領域ゲノム、ヒト多型解析センター業務）。①自己免疫性甲状腺炎（国立国際医療センター）②胃がん（国立国際医療センター）③糖尿病（神戸大学・春日雅人教授他）④心筋梗塞（九大循環器内科）⑤結核（九大小児科）。また、以下に示した原因が未知の家族性遺伝性疾患についても家系分析とこれまでの連鎖解析に基づいた候補染色体領域の解析を行っている。⑥脊髄小脳失調症（九大神経内科）⑦家族性血球貪食性リンパ球症（佐賀医科大・石井榮一助教授他）。全ゲノムの配列情報は著しく膨大であり、これらを網羅的に効率よく解析するために、系統化された“ウエット”と“ドライ”の実験を組織立てている。

#### **a. 自己免疫性甲状腺炎（橋本病・グレーブス病）の遺伝的要因の解明**

甲状腺特異的な自己免疫疾患である橋本病(HT)と Graves 病(GD)が、どのような遺伝的要因をそれぞれ特異的にもち、また共有するかを明らかにし、臨床的・免疫学的に所見の異なるこれら2つの疾患が、同じ甲状腺を舞台として形成される分子機序を解明することを目的とする。そのために、罹患同胞対法による全ゲノムスキャンと、その結果に基づく相関検定による物理マッピングを行う。これまで自己免疫性甲状腺疾患の罹患同胞対123組に対して392個のマイクロサテライトマーカーを用いた全ゲノムスキャンを行い、罹患同胞対法による統計遺伝学的解析により、自己免疫性甲状腺疾患全体の疾患感受性遺伝子領域を5q31-q33に、またHTの疾患感受性遺伝子領域を8q23-q24に同定した。これらの疾患感受性遺伝子領域において、CAリピートマーカーおよびgSNPsをゲノム情報より抽出し、相関検定を進行させる。最終的には、これらの解析により狭められた領域に存在する遺伝子の配列を解析し、原因遺伝子を同定する。

#### **b. 胃がんの遺伝的要因の解明**

細胞のがん化は、複数の遺伝的要因と複数の環境要因とが多段階で相互作用を繰り返すことで引き起こされる。遺伝性がんあるいはがん多発家系を解析することにより、網膜芽細胞腫の原因遺伝子であるRb遺伝子、ウィルムス腫瘍のWT-1遺伝子あるいは家族性乳癌の原因遺伝子であるBRCA-1、BRCA-2、などが同定され、がんの多発家系は発がんの遺伝的要因を解明する上で貴重な研究対象となる。本研究においては、胃がん発症を規定する遺伝的要因を同定するために、1)胃がん発症同胞対を対象として、400個のマイクロサテライトマーカーを用い罹患同胞対法による全ゲノムスキャンを行うこと、2)1)によって同定された連鎖領域について、新たなマイクロサテライトマーカーあるいはgSNPsを設定し、胃がん発症例と日本人健常対照群間で相関検定を行うこと、によ

り胃がん発症の責任遺伝子を同定することを目的としている。平成 13 年度は、これまでに収集された 118 組の胃がん発症同胞対を対象とした全ゲノムスクランを行い、1) 1 番染色体 1p32、D1S2890 近傍、2 番染色体 2q33-34、D2S325 近傍、11 番染色体 11p12-13、D11S935 近傍に多点解析で LOD 値がそれぞれ 1.3、1.5、1.5 を示す領域を同定した。2) 21 番染色体 21q11、D21S1256 に多点解析で LOD 値が 2.0 を示す領域を同定した。これらの領域をさらに狭めるための相関解析の対象となる胃がん孤発症例の検体収集を行い、これまでに 400 症例から DNA が抽出・保存された。また、21 番染色体候補領域においては相関解析のためのマイクロサテライトマーカーをゲノム配列をもとに 170 個同定した。21 番染色体については、これらのマーカーを用いた相関検定による候補領域の絞り込みを実施するとともに、他の領域についても、同様の手法による物理マッピングを行う予定である。

## 業績目録

### 原著論文

1. Miyoshi, Y., Yamada, T., Tanimura, M., Taniwaki, T., Arakawa, K., Ohyagi, Y., Furuya, H., Yamamoto, K., Sakai, K., Sasazuki, T., and Kira, J. 2001.  
A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA16) linked to chromosome 8q22.1-24.1.  
Neurology 57, 96-100.
2. Sakai, K., Shirasawa, S., Ishikawa, N., Ito, K., Tamai, H., Kuma, K., Akamizu, T., Tanimura, M., Furugaki, K., Yamamoto, K., and Sasazuki T. 2001.  
Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese.  
Hum. Mol. Genet. 10, 1379-1386.
3. Wataya, M., Sano, T., Kamikawaji, N., Tana, T., Yamamoto, K., and Sasazuki T. 2001.  
Comparative analysis of HLA restriction and cytokine production in hepatitis B surface antigen-specific T cells from low- and high-antibody responders in vaccinated humans.  
J. Hum. Genet. 46, 197-206.

### 総説

1. 山本 健, 笹月健彦. 2001.  
罹患同胞対法による疾患発症関連遺伝子の探索 —自己免疫性甲状腺炎、胃がんを対象として—  
BioClinica, 9, 18-22.
2. 山本 健, 笹月健彦. 2001  
HLA タイピングと疾患感受性・骨髄移植

医学のあゆみ, 197, 991-995.

## 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.),  
pp.55-63  
Springer-Verlag, Tokyo

## 学会発表

1. 青木正幸, 山本 健, 笹月健彦 (2001, 10/3-5) .  
全ゲノムスキャンによる胃がん発症関連遺伝子の探索.  
日本人類遺伝学会第46回大会, 大宮.
2. 古垣浩一, 白澤専二, 石川直文, 窪田純久, 赤水尚史, 伊藤国彦, 隈 寛二, 酒井健司,  
山本 健, 笹月健彦 (2001, 10/3-5).  
橋本病の疾患感受性遺伝子の同定—第二報 8q23-q24 を中心として.  
日本人類遺伝学会第46回大会, 大宮.
3. Yamamoto, K., and Sasazuki, T. (2001, 11/1-2).  
HLA allele matching and clinical out come of unrelated bone marrow transplantation.  
The 10th Annual Meeting of the Japanese Society for Histocompatibility and  
Immunogenetics, Fukuoka.
4. Yamamoto, K., Aoki, M., Sakai, K., and Sasazuki, T. (2001 11/19-20).  
Genome-wide scan for gastric cancer susceptibility genes.  
The 1<sup>st</sup> Hakone-yama Symposium, Tokyo
5. 山本 健, 園田美紀, 笹月健彦 (2001, 12/9-12) .  
SUV39H1 と HP1 の相互作用  
第24回日本分子生物学会年会, 横浜
6. Sasazuki, T., and Yamamoto, K. (2001, 12/14-16).  
Genetic analysis of gastric cancer in Japanese population  
The 6<sup>th</sup> Japan-Korea Cancer Research Workshop, Beppu

## 学会開催

1. 第51回日本アレルギー学会総会 (会長・笹月健彦教授) (2001, 10/29-31)・事務局
2. 第10回日本組織適合性学会大会 (会長・笹月健彦教授) (2001, 11/1-2)・事務局

# ゲノム病態学分野

## Division of Molecular Genetics

### A. 造血(幹)細胞の維持・分化に及ぼす各種サイトカインの役割の検討

1. CML において BCR/ABL mRNA の融合パターンとインターフェロン $\alpha$ に対する反応性の間には相互関連の可能性が認められた。
2. プラスミドベクターを用いて活性化 c-H-ras 遺伝子を FDC-P2 細胞に導入することで IL-3 非依存性が獲得できた。
3. C3H 10T1/2 マウス胎児繊維芽細胞の分化過程においてそれらの造血支持能は変化した。
4. 再生不良性貧血患者の骨髄ストローマ細胞からの G-CSF と IL-6 の産生について検討した。
5. 膜結合性 M-CSF のそのリセプターへの接着はストローマ細胞と M-CSF リセプターを有する造血細胞との特異的な結合を補助した。
6. 顆粒球系刺激因子が alkaline phosphatase, myeloperoxidase, defensin and granulocyte colony-stimulating factor receptor の各 mRNA 発現に及ぼす影響を正常人ならびに骨髄機能異常症患者で比較検討した。
7. マウス腫瘍モデルにおいて GM-CSF もしくは CD80 遺伝子導入マウス白血病・リンパ腫細胞のワクチン効果が認められ、かつ協調作用を有していた。
8. インターフェロン $\alpha$ が誘導した G1 停止はマウスマクロファージにおいては CDK inhibitors である p19 Ink4D and p21Cip1 の発現亢進を介していた。

### B. 血液悪性腫瘍に対する造血細胞移植療法の進化をめざした基礎並びに臨床研究

1. 腎移植後に発症した成人 T 細胞性白血病症例を報告した。
2. 抱合体 (KM2210)はマウスにおける同種抗原特異的免疫抑制作用をもち同種骨髄移植への利用は有用であった。

3. G-CSF 誘導遺伝子の分子クローン化とその特性を検討した。
  4. NFS-60 myeloid leukemia cells が MC3T3-G2/PA6 に接着することで G-CSF の発現が誘導された。
  5. 染色体 3q21 にある Breakpoint cluster region 3' of the ribophorinI gene は inv(3)(q21q26)を有する急性白血病の EVI1 遺伝子を転写活性化した。
  6. 胎児肝における造血は PEBP2/CBF 転写因子の非 DNA 結合鎖をコードする遺伝子の標的変異により阻害された。
  7. 標準リスクにある急性骨髄性白血病に対する同種骨髄移植にリコンビナント G-CSF 併用前処置法は有用と考えられた。
  8. 非血縁ドナーより骨髄移植を受けた治療抵抗性急性単球性白血病へ IL-2/LAK 療法を行った。
  9. 骨髄系細胞ならびに NK 細胞において G-CSF induced gene-1(GIG-1)は顕著に発現していた。
  10. RT-PCR 法による TCR-VB レポートリー解析法をもちいたことで自家造血幹細胞移植後再発した T細胞腫瘍の早期発見が可能であった。
  11. BCR/ABL-inducible gene としての PRAME メラノーマ抗原を同定した。
  12. 好中球機能亢進を認めた BCR/ABL 陰性慢性骨髄性白血病症例と、その機能解析結果を報告した。
  13. マウスモデルにおいて癌遺伝子の不活性化を認めた。
- C. 細胞療法・遺伝子治療・再生医療の前臨床研究モデルとしてのコモンマーモセットの応用研究**
1. コモンマーモセットはサイトカインならびに遺伝子治療研究の前臨床研究非ヒト霊長類と

して有用である。

2. MDR1 遺伝子導入自家末梢血幹細胞移植コモンマーマーモセットの血液学的解析を長期間に渡って行なった結果、遺伝子導入は低効率ながら安全に可能であった。
3. レトロウイルスベクターならびにアデノウイルスベクターによる遺伝子導入対象としてのコモンマーマーモセット造血幹細胞の解析を行なった。

#### D. ベットサイドでの遺伝子治療法開発に向けた前臨床ならびに臨床研究

1. G-CSF ならびに IFN- $\alpha$  cDNA を発現させた繊維芽細胞を用いたサイトカイン補充遺伝子治療法の前臨床研究を行なった。
2. レトロウイルスベクターを用いてヒトピルビン酸キナーゼ cDNA をマウス造血細胞へ遺伝子導入した。これにより PK 欠損症による溶血性貧血患者に対する遺伝子治療の可能性が示唆された。
3. Herpes simplex virus 1 thymidine kinase 遺伝子を用いてヒト G-CSF 発現制御法を開発した。
4. レトロウイルスベクターならびにアデノウイルスベクターを用いて白血病細胞への LacZ 遺伝子導入効率について検討した。
5. 繊維芽細胞を用いたインターフェロン $\alpha$  遺伝子治療と化学療法剤の併用による肝細胞癌に対する治療法開発の可能性が認められた。
6. GM-CSF と B7-1(CD80) costimulatory signals は同系マウスにおける効果的な抗腫瘍免疫を誘導する上で共調的に作用した。
7. BCR-ABL キメラ L6 (b2a2) mRNA の切断に関して hammerhead ribozymes と DNA enzymes の間での特異性と酵素活性の比較を行った。
8. 造血幹細胞へのアデノウイルスベクターを用いたインターフェロン $\alpha$  遺伝子導入を検討した。



9. 同系マウスにおける抗腫瘍免疫療法には IL-12 遺伝子導入肺ガン細胞が GM-CSF もしくは B7-1 遺伝子導入肺ガン細胞より優れていた。
10. tRNA<sup>Val</sup>-ribozyme であるマキシザイムはアロステリックに制御されており、正常細胞に影響を与えることなく白血病細胞に対してのみ特異的かつ強力にアポトーシスを誘導できた。
11. 第 IV 期腎癌患者に対する大量放射線照射 GM-CSF 遺伝子導入自家腎癌細胞を用いた免疫遺伝子治療臨床研究の経過を報告した。
12. GM-CSF 遺伝子導入腫瘍ワクチンを用いた Ex vivo 遺伝子治療研究を行なった。
13. CD30 シグナルが T 細胞の細胞障害性、増殖あるいは細胞死に対して及ぼす影響の研究を行なった。
14. ラットにおけるヒト成長ホルモンのグルココルチコイド遺伝子を用いた発現制御法の開発を行なった。
15. p53 遺伝子誘導 BAI-1 遺伝子過多発現は腫瘍血管増生を効果的に抑制した。
16. 本邦における癌遺伝子治療の第 1 例目の経験として、GM-CSF 遺伝子治療をうけた進行期腎癌患者の臨床経過を報告した。

#### **E. 腸管細胞の生理学的解析と関連ペプチドの臨床応用にむけての研究**

1. 胃平滑筋細胞に対しニューロテンシンは直接弛緩作用を有し、その細胞内情報伝達機構として cGMP が関与することを明らかにした。
2. 新鮮な胃平滑筋細胞上、及び初代培養胃平滑筋細胞上に VIP の 2 つの受容体サブタイプが発現しており、この両方の受容体サブタイプを介して弛緩反応が惹起されることを明らかにした。
3. 胃平滑筋細胞に対するエンドセリンの収縮作用はエンドセリン A 受容体を介することを明らかにした。

4. 盲腸輪走平滑筋細胞上の VIP 受容体と PTH 受容体の間に受容体-受容体相互干渉機構が存在することを明らかにした.
  5. TRH は盲腸輪走平滑筋細胞上の特異的 VIP 受容体に結合し弛緩作用を惹起することを明らかにした.
- F. 先天性疾患に対する新規治療法開発を目的とした前臨床研究
1. エーラーズ, ダンロス症候群と先天性心奇形の合併例を報告した.
  2. 脳内アミン合成が障害されたフェニールケトン尿症マウスにおけるその原因遺伝子 GTP シクロヒドラーゼ I の発現異常を示した.

## 業績目録

### 原著論文

- 1) Hibino, H., Tani, K., Ikebuchi, K., Suzuki, S., Wu, M.S., Sugiyama, H., Izawa, K., Hase, H., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Ooi, J., Izeke, T., Tojo, A., Tanioka, Y. and Asano, S. (2001)  
Haematopoietic progenitor cells from common marmoset as targets of gene transduction by retroviral and adenoviral vectors.  
Eur J Haematol 66(4):272-280.
- 2) Tomonari, A., Tojo, A., Iseki, T., Ooi, J., Nagayama, H., Ogami, K., Maekawa, T., Shirafuji, N., Tani, K. and Asano, S. (2001)  
Severe autoimmune thrombocytopenia after allogeneic bone marrow transplantation for aplastic anemia.  
Int J Hematol 74(2):228-232.
- 3) Ohshima, K., Muta, H., Kawasaki, C., Muta, K., Deyev, V., Kanda, M., Kumano, Y., Podack, ER., Kikuchi, M. (2001)  
Bcl10 expression, rearrangement and mutation in MALT lymphoma: Correlation with expression of nuclear factor-kappaB  
Int J Oncol 19(2):283-289

- 4) Ohshima, K., Kawasaki, C., Muta, H., Muta, K., Deyev, V., Haraoka, S., Suzumiya, J., Podack, ER., Kikuchi, M. (2001)  
CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis  
Histopathology 39(2):156-162
  
- 5) Ooi, J., Iseki, T., Nagayama, H., Tomonari, A., Ito, K., Shirafuji, N., Tojo, A., Tani, K. and Asano, S. (2001)  
Unrelated cord blood transplantation for adult patients with MDS-related secondary acute myeloid leukaemia.  
Br J Haematol 114(4):834-836.
  
- 6) Inazawa, T., Tanabe, T., Yamada, H., Nakaoka, T., Hashimoto, Yamasaki, T., Kotaki, H., Tani, K., Asano, S., and Yamashita, N. (2001)  
Glucocorticoid-regulated expression of exogenous human growth hormone gene in rats.  
Molecular Therapy 4(3):267- 272.
  
- 7) Ooi, J., Iseki, T., Adachi, D., Yamashita, T., Tomonari, A., Tojo, A., Tani, K. and Asano, S. (2001)  
Successful allogeneic bone marrow transplantation for hepatosplenic gd T cell lymphoma.  
Hematologica 86(10): E25
  
- 8) Kuwabara, T., Tanabe, T., Warashina, M., Kang X, Tani, K., Taira, K., and Asano, S. (2001)  
Allosterically controllable maxizyme-mediated suppression of progression of leukemia in mice.  
Biomacromolecules 2(4):1220-1228.
  
- 9) Harada, N., Hamada, S., Kubo, H., Oda, S., Chijiwa, Y., Kabemura, T., Maruoka, A., Akahoshi, K., Yao, T., Nawata, H. (2001)  
Preoperative evaluation of submucosal invasive colorectal cancer by a 15-MHz ultrasound miniprobe

- 10) Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, TA., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. (2002)  
Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim.  
Bone Marrow Transplantation 29(3):197-204.
- 11) Duda, D.G., Sunamura, M., Lozonschi, L., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Motoi, F., Horii, A., Tani, K., Asano, S., Nakamura, Y. and Matsuo, S. (2002)  
Overexpression of the p53-induced brain angiogenesis inhibitor 1 suppresses efficiently tumor angiogenesis.  
Br. J Cancer 86(3):490-496.
- 12) 松坂浩史, 板場壮一, 本村廉明, 牟田浩実, 前田豊樹, 千々岩芳春, 末広陽子, 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1例  
内科 89(2):373-378
- 13) Ooi, J., Iseki, T., Ito, K., Mori, Y., Sato, H., Takahashi, T., Ishii, N., Tomonari, A., Tojo, A., Tani, K. and Asano, S. (2002)  
Successful unrelated cord blood transplantation for relapse after autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma.  
Leuk Lymphoma 43(3):653-655

## 総説

- 1) 谷 憲三朗 2001  
腫瘍免疫遺伝子治療臨床研究の現状,  
分子細胞療法, 2:21-26
- 2) 谷 憲三朗 2001  
CMLに対する標的治療法の開発,

日本臨床, 59:2439-2444

- 3) 谷 憲三郎 2001  
癌の免疫遺伝子治療：腎癌への臨床応用,  
実験医学, 19:90-94
- 4) 谷 憲三郎 2001  
白血病遺伝子治療の新展開,  
分子がん治療, 2:19-24

#### 学会発表

- 1) Muta, H., Caceres, G., Ohata, P.J., Podack, ER (2001.3.31-4.4)  
CD30-ligand deficient mice are resistant to experimental allergic  
encephalitis  
Experimental Biology, オーランド
- 2) 曾田 泰, 白 元松, 伊沢清子, 杉山 肇, 田邊 剛, 長村文孝, 井関 徹, 東條有伸,  
谷 憲三郎, 浅野茂隆 (2001.4.20)  
VSV シュードタイプレンチウイルスベクター (HIV(VSV)vector) を用いたヒト血液  
細胞への遺伝子導入法の検討  
日本血液学会, 名古屋
- 3) BAI, Yuansong., Soda, Y., Izawa, K., Sasaki, E., Nakazaki, Y., Tanabe, T.,  
Tomonari, A., Ooi, J., Nagamura, F., Uchimaru, K., Iseki, T., Miyoshi, H., Tojo,  
A., Tani, K. and Asano, S. (2001.4.20)  
Analysis of Gene Transduction System to Human Leukemia and  
Hematopoietic Stem Cells by Oncoretrovirus and Lentivirus Vectors  
日本血液学会, 名古屋
- 4) Yamashita, N., Hamada, h., Hase, H., Hanazawa, K., Aclift, S., Kawai, K., Tojo,  
A., Tomikawa, S., maekawa, T., Soda, y., Oyaizu, N., Tani, K., Watari, K.,  
Sherwin, S., Takahashi, K., Wakumoto, Y., Ohata, j., Mulligan R., Machida, U.,  
Okumura, K., Satoh, N., Monna M. and Nakazaki, Y.(2001.5.31)  
Case Reports on Clinical Studies of Immunogene Therapy Using Autologous

第4回アメリカ遺伝子治療学会, シアトル

- 5) Tani, K., Nakazaki, Y., Hase, H., Takahashi, K., Monna, M., Komine, F., Kitamura, R., Machida, U., Ohata, J., Soda, Y., Watari, K., Oyaizu, N., Sath, N., Tojo, A., Yamashita, N., Maekawa, T., Eriguchi, M., Tomikawa, S., Hanazawa, K., Wakumoto, Y., Kawai K., Azuma, M. Hamada, H., Okumura, K., Kakizoe, T., Akaza, H., Fujime, M., Mulligan, R., Clift, S., Ando, D., Sherwin, S. and Asano, S. (2001.7.5)  
Clinical Studies of Immunogene Therapy Using Autologous GM-CSF Transduced Tumor Vaccines(GVAX) for Stage IV Renal Cell Cancer: Progress Report  
第7回日本遺伝子治療学会, 東京
- 6) Soda, Y., Bai, Y., Izawa, K., Sasaki, E., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Iseki, T., Tojo, A., Miyoshi, H., Tani, K. and Asano, S. (2001.7.7)  
Gene Transfer to Human Leukemia Cells, Lymphocytes and Hematopoietic Stem Cells with the Third Generation Lentiviral Vector  
第7回日本遺伝子治療学会, 東京
- 7) Kang X-X, Tani, K., Nakamura, Y. and Asano, S. (2001.7.7)  
Anti- and Angiogenic Gene Expressions in the Antitumor BAI-1 Gene Therapy  
第7回日本遺伝子治療学会, 東京
- 8) Kunisaki, R., Tani, K., Matsuda, S., Harata, M., Shuto, Y., Bai, Y., Tanabe, T., Sekihara, H. and Asano, S. (2001.7.7)  
Tob, a Novel Anti-Proliferative Tob/ BTG2 Family Member, Drastically Suppress Tumor Growth and p53 Wild Human Lung Carcinoma Cells in vitro and in vivo, Sparing Damage to Nomal Cells  
第7回日本遺伝子治療学会, 東京
- 9) 国崎玲子, 谷 憲三朗, 松田 覚, 原田雅充, 首藤介伸, 白 元松, 田邊 剛, 関原久彦, 浅野茂隆 (2001.9.26)  
新規癌抑制遺伝子; tob は p53 野生肺癌細胞株に強力な抗腫瘍作用を呈し, かつ癌特異的な増殖抑制効果を示す.  
第60回日本癌学会総会, 横浜
- 10) 谷 憲三朗, 中崎有恒, 東條有伸, 小柳津直樹, 富川伸二, 和久本芳彰, 河合弘二, 東

みゆき, 垣添忠生, 藤目 真, 赤座英之, 浅野茂隆 (2001.9.27)

GM-CSF 遺伝子導入自家腎がん細胞を用いた免疫遺伝子治療臨床研究経過報告  
第60回日本癌学会総会, 横浜

- 11) Itaba, s., Chijiwa, Y., Matsuzaka, H., Motomura, Y., Muta, H., Maeda, T.(2001.10.6-10)

Inhibitory effect of c-type natriuretic peptide via both particulate and soluble guanylate cyclase in caecal circular smooth muscle cells.

9th United European Gastroenterology Week, アムステルダム

- 12) 谷 憲三朗, 中崎有恒, 長谷英徳, 高橋圭介, 大畑順子, 町田詩子, 曾田 泰, 大岩真希, 前川 平, 東條有伸, 山下直秀, 佐藤典治, 江里口正純, 富川伸二, 小柳津直樹, 和久本芳彰, 花澤喜三郎, 河合弘二, 東みゆき, 濱田洋文, 垣添忠生, 奥村 康, 藤目 真, 赤座英之, Shirley Clift, Dale Ando, Stephan Shirwin, Richard Mulligan, 浅野茂隆 (2001.10.10)

GM-CSF 遺伝子導入自家腎がん細胞を用いた免疫遺伝子治療臨床研究報告  
第39回日本癌治療学会, 東京

- 13) 谷 憲三朗, 曾田 泰, 白 元松, 斎木 実, 伊澤清子, 田辺 剛, 李 曉進, 佐々木 えりか, 中崎有恒, 井関 徹, 東條有伸, 浅野茂隆, 三好浩之(2001.11.1)

第三世代 VSV シュードタイプレンチウイルスベクターによるヒト血液細胞への遺伝子導入法の検討

第21回血液幹細胞シンポジウム, 大阪

- 14) 谷 憲三朗, 曾田 泰, 白 元松, 田邊 剛, 浅野 茂隆, 多比良和誠(2001.11.13)

新規リボザイムを用いた白血病治療法の開発

第43回日本臨床血液学会, 神戸

# ゲノム創薬・治療学分野

## Division of Molecular and Cell Therapeutics

当部門は、ヒトリプロダクションの分子機構及びその異常に基づく疾患の病態の解明、遺伝子診断さらには遺伝子治療の開発を目的としている。現在、教授、和氣徳夫、講師、加藤秀則、加藤聖子、助手、有馬隆博、松田貴雄のスタッフのほかに、上岡陽亮、近藤晴彦の各医員、周勇、浅野間和夫、一戸昌元の大学院生で教室を構成している。

### A. 活性化型 K-Ras を介する造腫瘍能獲得機構における Estrogen Receptor $\alpha$ の役割の解明と分子標的治療への応用

(加藤聖子, 高橋晃, 上岡陽亮, 上木原哲也, 有馬隆博, 和氣徳夫)

#### 【目的】

Ras 蛋白は細胞内情報伝達系のシグナルスイッチの役割を果たしている。活性化型 K-Ras により造腫瘍能を獲得した NIH3T3 細胞をモデルに、発癌に重要なシグナル伝達を明らかにし、治療への応用を試みた。

#### 【方法と成績】

- ①活性化型 K-Ras, NIH3T3 細胞 (以下 K12V 細胞) は Estrogen Receptor  $\alpha$ (ER) の発現と機能が亢進していた。ER のアンチセンスオリゴを用いて K12V 細胞の発現量を抑制すると造腫瘍能は部分的に抑制された。また、野生型 K-Ras と ER を共発現させた KwtER 細胞は造腫瘍能を獲得し ER 機能が亢進していた。
- ②ER の機能を抑制する dominant negative ER 変異体 (DNER) を共発現させると造腫瘍能は完全に消失し、p53 依存性、p21 依存性、p16 非依存性の細胞老化が誘導された。
- ③K12V 細胞では mdm2 mRNA の発現は mock 細胞に比べ増加していたが、DNER の発現によりこの亢進は抑制された。p53 と MDM2 の結合は、mock 細胞に比べ K12V 細胞では亢進していたが、K12VDNER 細胞では低下していた。ER 過剰発現細胞では mock 細胞に比べ mdm2 の mRNA、蛋白、p53 との結合能のいずれも約 2 倍に亢進していた。
- ④K12VDNER 細胞に c-Jun を過剰発現させると MDM2 の発現の増加と p21 の発現低下並びに老化細胞数の減少を認めた。
- ⑤次に卵巣癌細胞株を用いてこのシグナル伝達を抑制することを試みた。ER の AF-1 機能を抑制する MEK 阻害剤と AF-2 機能を阻害する抗エストロゲン剤を投与するとそれぞれの単独投与では増殖能に有意差がなかった細胞株も同時投与では増殖能は著明に抑制された。
- ⑥軟寒天培地上のコロニー形成能はそれぞれの阻害剤の単独投与及び同時投与により著明に抑制された。



### 【結論】

- ①DNER による細胞老化誘導に p53-p21 の経路の作用が示されたため、ER による p53 の負の制御が示唆された。
- ②Ras を介する造腫瘍能獲得機構に ER の関与が示された。本過程には ER -AP-1 による mdm2 発現の増加及び p53-MDM2 結合を介した p53 機能抑制が関与することが示された。
- ③卵巣癌細胞において ER 機能の阻害が増殖能を抑制し、治療の標的になることが示唆された。現在これらの阻害剤の作用機序の解析を行っている。

## B. Matrixmetalloproteinase (MMP) の活性化における ras の関与

(上岡陽亮, 加藤聖子, 高橋晃, 有馬隆博, 和氣徳夫)

### 【目的】

卵巣癌細胞, ラット子宮内膜細胞, マウス線維芽細胞を用いて ras を中心に MMP 活性化のシグナル伝達経路について検討した。

### 【方法】

- ①ラット子宮内膜細胞 RENT-4 に活性型 K, H-ras を形質導入した。これに MEK 阻害剤, PI3K 阻害剤を添加して MMP2, 9 の活性を Gelatinzymography で, MMP2, 3, 7, 9, MT1-MMP の蛋白発現を Westrenblot 法で解析した。
- ②卵巣癌細胞株 SKOV を肝細胞増殖因子 (HGF) で刺激して, さらに rasdominantnegative (rasDN) アデノウイルスを感染させ, また MEK 阻害剤 (U0126), PI3K 阻害剤 (LY294002) を添加して MMP2, 9 活性と各種 MMP 蛋白の発現を解析した。
- ③マウス線維芽細胞 NIH3T3 に活性型 K, H-ras を形質導入し, またレトロウイルスを用いて Raf, Ral-GDS, PI3K をそれぞれ活性化し, MMP2, 9 活性への影響を解析した。

### 【結果】

- ①RENT-4 で活性型 ras の形質導入により MMP2 の活性化がみられた。MMP2 の活性化の程度は活性型 K-ras の方が活性型 H-ras よりも顕著であった。ras の活性化により発現した MMP2 活性は PI3K 阻害剤で強く, MEK 阻害剤で部分的に抑制された。MMP 蛋白の発現は細胞溶解液・培養上清ともに ras の活性化, ras 下流の阻害剤による有意な変化を認めなかった。
- ②SKOV で HGF 刺激により MMP2, 9 の活性増強がみられた。rasDN の発現により HGF 刺激に伴う MMP2, 9 の活性化が消失した。MMP2 の活性化は PI3K 阻害剤により顕著に, MEK 阻害剤により部分的に抑制された。MMP9 の活性化は両阻害剤により消失した。HGF 刺激により細胞溶解液の各種 MMP 蛋白発現量は変化はみられなかった。
- ③NIH3T3 でも活性型 ras の形質導入により MMP2 の活性化がみられた。Raf, Ral-GDS の活性化により MMP2 の活性化が, PI3K の活性化により顕著な MMP2 の活性化と, 弱い MMP9 の活性化がみら

れた。

【結論】

- ①活性型 ras の形質導入により MMP2 が活性化されることが示された。
- ②MMP2 の活性化には Ras の下流で Raf, Ral-GDS を介するシグナル伝達経路より PI3K を介する経路が重要であることが示唆された。
- ③MMP 蛋白の発現量は MMP2, 9 の活性に相関しないと考えられた。

C. cAMP による Progesterone receptor B (PR-B) 誘導を介した子宮体癌, 卵巣癌細胞増殖抑制とその分子機構の解明

(高橋 晃, 加藤聖子, 上岡陽亮, 上木原哲也, 有馬隆博, 和氣徳夫)

【目的】

子宮体癌細胞においては PR-B の発現低下がみられ, 発癌機構や MPA による治療効果との関連が示唆されている。また, 卵巣においては cAMP による PR-B の発現誘導が報告されている。我々は NIH3T3 細胞において cAMP/PKA/PR-B/p27 のシグナル経路が存在し, 細胞増殖を負に制御することを見出した。そこで分子標的治療への応用を目的に婦人科癌細胞を用いて cAMP 下流のシグナル伝達路を活性化させ, 細胞増殖を抑制させることを試みた。

【方法】

- ①子宮体癌細胞株 2 株, 卵巣癌細胞株 5 株を用いた。
- ②cAMP 添加時の細胞増殖能を非添加時と比較検討した。
- ③cAMP 添加時の PR-B, p27, cyclin D, pRb の発現を Western blot 法で解析し, 非添加時と比較検討した。

【成績】

- ①ヒト婦人科癌細胞株 7 株中 6 株で cAMP により細胞増殖が抑制された。
- ②その 6 株中 5 株で PR-B の発現が増加していた。
- ③その 5 株中 3 株で p27 の発現増加が認められた。また, 4 株で cyclin D1 の発現低下とリン酸化 Rb 蛋白の減少が共に認められた。

【結論】

- ①cAMP はほとんどのヒト婦人科癌において PR-B の発現を増加させ, 細胞増殖を抑制した。
- ②PR-B による増殖能抑制の分子機構として p27 依存性と非依存性の経路が存在した。
- ③cAMP による PR-B の発現増加と cyclin D1 の発現減少の間に相関が認められ cAMP/PR-B の経路に cyclin D1 の関与が示唆された。

## D. ゲノムインプリント機構の解明について

(有馬隆博, 上木原哲也, 加藤聖子, 和氣徳夫)

ゲノムインプリントは, DNA やクロマチンの修飾や高次構造の変化に基づくエピジェネティックな現象と考えられている. また, 個体発生過程や出生直後にインプリントが破綻すると, 種々の先天異常や悪性腫瘍が生ずることも報告されている.

①新生児一過性糖尿病 (TNDM) の遺伝的病因として6番染色体長腕 (6q24) の父親からの片親性がイミとの関連性に注目し, 我々は, この領域がゲノムインプリント (両親由来の対立遺伝子に特異的な遺伝子発現を起こす) を受けていることを報告し, この疾患の候補遺伝子であることを示した. 今回の領域のインプリント機構の解明とこの疾患の発症機構に関し, マウスを用い, 詳細な検討を行うことを目的とする. また, モデルマウスの作成を行い, 疾患の病態メカニズムの解析と治療法の確立を研究目的とする. (脳機能制御学分野 山崎勝久, 中別府雄作)

微小インプリントセンターに直接結合する蛋白質の同定は, この領域に限らず, インプリント全般における機構の解明に重要である. また, 最近複数の転写因子がメチル化 DNA と複合体を作ることが報告されている. そこで, マウス生殖細胞を用い, どの転写因子を介し, 遺伝子発現調節をしているか, あるいは複数の経路で, 調節されているのかを明らかにする.

②前述のヒト染色体 6q24 は種々の悪性腫瘍において LOH の頻度が高いことが報告されている. この領域内に存在する ZAC 遺伝子は癌抑制遺伝子として機能することが報告されている. また, G1 arrest 及びアポトーシスを誘導する転写因子で, 我々はこの遺伝子がインプリント遺伝子であることを報告した. ZAC は p53 と類似の生物学的特徴を有することから, そのシグナル伝達経路について解析している. また, CDK インヒビターの1つでインプリントを受ける Kip2 も ZAC 同様癌抑制遺伝子である. 両遺伝子間シグナル伝達経路について, 卵巣癌細胞を用い検討している.

③インプリントを受ける遺伝子のほとんどは, 胎盤発生過程で発現する. 哺乳類に特徴的な胎盤形成は, ゲノムインプリントの役割を知る上で重要である. 実際にいくつかのインプリント遺伝子の KO mouse では胎盤形成不全などの異常も報告されている. 我々はマウス胎盤幹細胞 (TS 細胞) を用い, 胎盤の分化に伴う, インプリント遺伝子の発現様式の変化について解析している. また, ヒト胎盤幹細胞の樹立も手がけている. (東京大学農学部生命科学研究所応用動物科学 田中智)

## E. ヒト1番染色体長腕上の子宮内膜癌抑制遺伝子のクローニング

(加藤秀則, 周勇, 近藤晴彦, 小川昌宣, 浅野間和夫, 松田貴雄, 和氣徳夫)

【目的】

1番染色体上の子宮内膜癌細胞老化制御遺伝子をクローニングする.

【結果と方法】

①現在までの検討により 1q32-41 (STS549-ST51609) の領域に内膜癌細胞株 HHUA を老化に導く

活性が存在することが判明している。さらに内膜癌症例 60 例の検体を用いて、1q32-41 内の STS マーカーにより、ヘテロ接合性消失の検討を行った。D1S459-225 の 1Mb 以下の領域に 60%以上の頻度で LOH が観察され、子宮内膜癌抑制遺伝子は、この D1S459~225 の領域に存在することが明らかとなった。さらに、D1S459 及び 225 陽性 YAC クローン (748H11) の HHUA 細胞への導入により 79%の細胞クローンに細胞死が誘導された。次に 748H11 に含まれる BAC クローンを HHUA に導入し、細胞死誘導活性を検討した結果、ひとつの BAC クローンで細胞死が誘導された。

②この活性をもった BAC クローンと発表されたドラフトシーケンスをもとに 5つの候補遺伝子を得た。これら塩基配列について、正常子宮内膜癌と HHUA についてそれぞれ cDNA を RT-PCR で増幅し、変異についての検討を蛍光シーケンサーを用いて行った。

③これら 2つの遺伝子を Ta 発現誘導ベクターに組み込み HHUA へ導入し、発現させた。このうちひとつで、細胞死の誘導を認めた。

④この細胞死はその形態と、 $\beta$ -gal の強染により細胞老化死と考えられた。p21 の発現上昇と RB の脱リン酸化が観察された。

#### 【結論】

今回単離された遺伝子は子宮内膜癌抑制遺伝子候補であり、細胞老化誘導活性をもつと考えられた。

## F. 7q11.21 領域に存在する絨毛癌抑制遺伝子の解析

(松田貴雄, 浅野間和夫, 近藤晴彦, 周勇, 加藤秀則, 和気徳夫)

#### 【目的】

これまでにヒト 7 番染色体長腕 7q11.21 領域に絨毛癌における共通欠失領域を同定して、この領域が絨毛癌化抑制に重要であることを BAC クローンの絨毛癌細胞株への導入によって証明してきた。この導入によって細胞増殖の抑制が認められたクローンを基に cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、絨毛癌抑制候補遺伝子が複数得られた。ヒトゲノム計画の進捗によって同部位のドラフトシーケンスが明らかになり、同部位に存在が確認される遺伝子を検索した。

#### 【方法】

①オンラインで公開されたドラフトシーケンスとライブラリースクリーニングによって得られた候補遺伝子のホモロジーサーチを行った。

②同部位に存在する事が明らかとなった cDNA クローンのうち、C6-8 遺伝子について絨毛癌細胞株への導入と増殖特性の変化を検討した。

③同遺伝子の絨毛癌での 1 次構造の変異と発現の変化について検討した。

#### 【結果】

BAC クローンから得られた候補 cDNA クローン C6-8 は、HTF12 遺伝子と一致した。この遺伝子はクルッペル関連ボックスとフィンガードメインとからなり、N 末端側の機能ドメインが進化的に高度に保

存されている。この C6-8 の絨毛癌細胞株 CC1 への導入で、細胞の増殖能、腫瘍形成能の低下が観察された。この遺伝子発現は正常初期絨毛組織では発現を認めたが、絨毛癌細胞株で発現が認められなかった。インフォームド・コンセントを得て使用した絨毛癌摘出組織全例で、この遺伝子のホモ欠失が確認された。

#### 【結論】

HTF12 遺伝子は絨毛癌の増殖を抑制する事が推定され、同領域のホモ欠失によって癌化に至る機序が推定された。

### G. 絨毛特異的 cDNA ライブラリーの解析

(浅野間和夫, 松田貴雄, 近藤晴彦, 加藤秀則, 和気徳夫)

#### 【目的】

我々はヒト絨毛組織で発現を認め、絨毛癌細胞株にて発現を認めない遺伝子群の cDNA ライブラリーを作成した。この中の各クローンについて解析を行い絨毛癌化機構に関与する遺伝子の単離を目的とする。

#### 【方法】

- ①我々が作成した cDNA ライブラリーの各クローンについてノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションを行い胎盤特異的発現を示すものを選択した。
- ②胎盤特異的発現を示すものの内、機能などが知られていない 1 遺伝子 (NECC1) の発現を胎盤、胞状奇胎、絨毛癌の各組織、ヒトの各臓器について RT-PCR, ノーザン・ブロットを用いて検討した。
- ③NECC1 の全長を同定し、遺伝子座を決定した。
- ④絨毛癌細胞株に NECC1 を導入し、その形態、細胞増殖能、造腫瘍能の変化を検討した。
- ⑤分化マーカーを用いて遺伝子導入株の表現型を検討した。

#### 【成績】

- ①絨毛特異的な発現を示す遺伝子として Hman gingiva cDNA (NECC1), Human interferon-inducible peptide (6-16) gene, Human placental lactogen, Wilms' tumor related protein (QM), Osteopontin が得られた。
- ②NECC1 の発現はヒト胎盤の他、脳、肺、子宮など高発現を認め、胞状奇胎、絨毛癌組織で発現を認めなかった。
- ③NECC1 は染色体 4q11-12 にマッピングされた。
- ④NECC1 を絨毛癌細胞株 (Bewo) に遺伝子導入したところ細胞の形態に変化を来した。また、検討した Bewo, CC1 の 2 株において細胞増殖能は影響を受けなかったが、造腫瘍能が抑制され、復帰変異株で抑制が解除されることがわかった。
- ⑤NECC1 導入株は分化マーカーとしての hPL (Human placental lactogen) の発現を獲得した。

#### 【結論】

- ①胎盤組織で発現するが、絨毛癌化に伴い、遺伝子の欠失からその発現が認められなくなる遺伝子群を

同定した。

②この遺伝子群の中に絨毛癌の癌化抑制遺伝子の候補 NECC1 遺伝子を同定した。

③NECC1 遺伝子は絨毛の分化機序にも関わることを示唆された。

## H. TGF-β 関連 FOXC1 遺伝子の同定

(周勇, 加藤秀則, 松田貴雄, 浅野間和夫, 近藤晴彦, 和氣徳夫)

### 【目的】

我々は TGF-β の増殖抑制にかかわる未知の遺伝子を同定する目的で, PCR サブトラクションを用いて, TGF-β 1 による発現誘導される新規遺伝子の単離を試みた。その中から folk head domain をもつ転写因子と推定される FKHL7 が同定された。癌細胞株での同遺伝子の機能および変異について解析し, 婦人科癌への関与を検討した。

### 【方法および成績】

a. FKHL-7 の単離: TGF-β 応答性を持つ卵巣癌細胞株 SKOV において TGF-β 1 刺激前後のサブトラクションライブラリーを作製した。この中から Folk Head domain をもち転写因子として機能していると考えられる FKHL-7 遺伝子を単離した。FKHL7 は SKOV のみならず他の TGF-β 応答性 3 細胞株でも TGF-β 1 添加により発現誘導されることが確認された。

b. FKHL-7 の機能: 同遺伝子が完全欠損している Hela 細胞に FKHL-7 を導入した。これらのクローンでは TGF-β 1 添加により細胞増殖が著明に抑制された。FACS での検討では TGF-β 1 添加による G0/G1 期分画の上昇がコントロールで 5.8% だったのに対し, FKHL-7 発現クローンでは 22.2% と上昇し G1 arrest が起こっていると考えられた。

c. 婦人科癌での変異: 婦人科癌細胞株 29 株, 組織 103 検体を用いて, Northern blot あるいは RT-PCR により FKHL7 の発現の変化を検討した。また Genomic PCR により FKHL7 遺伝子 一次構造の変化についても検討した。

①Homozygous deletion を含めた FKHL7 遺伝子ゲノム構造の変化が婦人科癌 103 例中 10 例で観察された。

② FKHL7 遺伝子発現の消失が 56 例中 12 例で認められた。

③ FKHL7 遺伝子の変異が子宮体癌細胞株 1 例, 子宮体癌組織 21 例中 1 例及び卵巣癌組織 22 例中 1 例で見られ, これらはアミノ酸変異を伴うものであった。

### 【結論】

FKHL7 発現は TGF-β 刺激により誘導され, 増殖抑制のシグナル伝達に関与することが示された。この増殖抑制は RB 遺伝子を欠損する Hela 細胞で観察されたことや Luciferase アッセイによる検討から, 従来から考えられていた TGF-β の増殖抑制機構 (TGF-β ⇒ cdk Inhibitor ⇒ RB の機能的抑制) とは異なった経路で働くことが示唆された。RB の抑制に至る正常機能が多くの癌細胞で異常を起こしていること, また, この遺伝子は婦人科癌で高率に遺伝子変異がみられたことより, 婦人科癌の分子標的治療

に有用である可能性も示唆された。

## 1. サイクリンD サブタイプの内膜癌に伴う発現変化と分子標的治療への基礎的検討 (加藤秀則, 近藤晴彦, 浅野間和夫, 松田貴雄, 和氣徳夫)

### 【目的】

細胞周期の G1→S 移行に不可欠な分子であるサイクリン D1, D2, D3 の正常子宮内膜と内膜癌での発現パターンを比較する。癌に特徴的な変化があればこれを利用して癌細胞の増殖を阻害できるか否かを検討する。

### 【方法】

- ①正常子宮内膜増殖期 6 例, 分泌期 6 例, 内膜癌細胞株 5 株, 内膜癌標本 28 例を対象とし, 全てインフォームドコンセントを得たものを用いた。RNA, 蛋白を抽出し, それぞれに特異的なプライマーと抗体で RT-PCR とウエスタンブロットを行い発現を解析した。
- ②サイクリン D 阻害剤である 7- hydroxy coumarin を内膜癌細胞株 HHUA に添加し細胞増殖の変化を FACS にて解析した。
- ③サイクリン D1 を選択的に阻害する目的で二本鎖オリゴ RNA(SiRNA)を合成し, 内膜癌細胞株 HHUA と対照の卵巣癌細胞株 PA-1 に添加し細胞増殖の変化を同様に解析した。

### 【成績】

- ①卵巣癌, 頸癌細胞株ではサイクリンのサブタイプの発現変化に一定の傾向はみられなかった。内膜癌細胞株, 内膜癌症例では D1 の発現が強くみられ, D2 の発現が消失しているものがほとんどであった。D3 は全例で発現していなかった。類内膜癌の分化度, 組織型による差異は見られなかった。
- ②一方, 正常子宮内膜では増殖期, 分泌期とも全例 D1, D2 の双方を発現していた。D3 の発現はみられなかった。
- ③D1 のみ発現する内膜癌細胞株 HHUA に 7-hydroxycoumarin を添加したところ 1 日目で G1 期の細胞が 49.8%から 63.2%に増加し, 3 日目では subG1 期が 89.4%と多くの細胞で細胞死が観察された。
- ④D1 を選択的に阻害する目的で SiRNA を設計, 作製した。HHUA に添加したところ 7-hydroxycoumarin 添加と同様な変化と細胞死が観察された。

### 【結論】

- ①内膜癌に伴いサイクリンの発現パターンが D1 に特異的に変移する。他の癌では異なった変化を示すのに対し, 内膜癌では全例でみられたことより, 内膜癌の発癌機構に連動した特徴的変化であることが示唆された。
- ②内膜癌で唯一発現しているサイクリン D1 の発現を阻害すると細胞は G1 に集積しやがて apoptosis へ向かった。
- ③D1 ノックアウトマウスが正常に発育するとの報告と今回の我々の検討より, 子宮内膜癌に対するゲノ

△創薬に D1 を標的とすることの有用性が示唆された。

## J. 正常子宮内膜および子宮体癌における DCC 発現の検討

(近藤晴彦, 加藤秀則, 周勇, 浅野間和夫, 小川昌宣, 松田貴雄, 和氣徳夫)

### 【目的】

癌抑制遺伝子である DCC は Netrin-1 などのリガンドと結合しアポトーシスの抑制に作用する。正常子宮内膜およびその癌化過程での DCC の関与を検討する目的で、DCC 発現について検討した。

### 【方法】

正常子宮内膜組織 20 例, 子宮体癌組織 28 例より抽出した RNA を用い, RT-PCR 法にて DCC 及び Netrin-1, mRNA を定量化した。さらに免疫染色にて DCC 蛋白発現を検討した。また, DCC 及び Netrin-1 欠損している内膜癌細胞にこれらを導入し表現型の変化を観察した。

### 【成績】

①正常子宮内膜での検討の結果免疫染色での月経周期における DCC 発現は分泌期後期で消失する傾向を認めた。RT-PCR でも同様の発現パターンを示した。

②子宮体癌においては RT-PCR 28 例中 14 例で, 免疫染色で 4 例中 4 例に DCC 発現の消失を認めた。

③Netrin-1 は月経周期を通じてすべての正常子宮内膜で発現がみられた。癌細胞株ではその発現が消失しているものもみられた。

④Netrin-1, DCC 両方の発現を欠損している Ishikawa 細胞に DCC を発現させるとアポトーシスが誘導された。さらに Netrin-1 を追加発現させるとこれが回避される傾向が見られ, さらに追試を行っている。

### 【結論】

①子宮体癌における DCC 発現の消失から, 子宮内膜癌化あるいはその進展過程に DCC 発現の消失が関与することが示唆された。

②正常子宮内膜の正常機能維持に DCC と Netrin-1 が関与していることが示唆され, その増加調節に双方の発現のバランスが関与している可能性が示唆された。

## 業績目録

### 著書

- 1 浅野間和夫, 松田貴雄, 和氣徳夫. 2001.  
絨毛癌の分子機構: 婦人科腫瘍の分子・細胞生物学  
新女性医学大系 41 (中山書店) 423-432



- 2 加藤秀則, 和氣徳夫. 2001.  
遺伝子を標的とした治療：婦人科腫瘍の分子・細胞生物学  
新女性医学大系 41 (中山書店) 325-335
- 3 加藤聖子. 2001.  
ras とそのシグナル：婦人科腫瘍の分子・細胞生物学  
新女性医学大系 41 (中山書店) 19-42
- 4 有馬隆博, 和氣徳夫. 2002  
胎児の成長・発達－胎盤の発生 (ゲノムインプリンティングの役割)  
新女性医学大系 29, 38-47

#### 原著論文

- 1 Murakami A, Yamayoshi A, Iwase R, Nishida J, Yamaoka T, Wake N. 2001.  
Photodynamic antisense regulation (PDAR) of human cervical carcinoma cell growth using psoralen-conjugated oligo (nucleoside phosphorothioate).  
European Journal of Pharmaceutical Science 13, 25-34
- 2 N. Shahib, D. Martaadisoebrata, H Kondo, Y Zhou, N Shinkai, C Nishimura K Kiyoko T Matsuda, N Wake and H. D. Kato. 2001.  
Genetic Origin of Malignant Trophoblastic Neoplasms Analysed by Sequence Tag Site Polymorphic Markers.  
Gynecologic Oncology 81, 247-253
- 3 Arima T, Drewell RA, Arny KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, Oshimura M, Wake N, and Surani MA. 2001.  
A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus.  
Human Molecular Genetics 10, 1475-1483
- 4 Terao Y, Nishida J, Horiuchi S, Rong F, Ueoka Y, Matsuda T, Kato H, Furugen Y, Yoshida K, Kato K and Wake N. 2001.  
Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecological cancer cells.

International Journal of cancer 94, 257-267

- 5 小川昌宣, 松田貴雄, 吉河康二, 和氣徳夫. 2001.  
出生前遺伝子診断により胎内治療を中止しえた 21 水酸化酵素欠損患児同胞例  
日本産科婦人科学会雑誌, 53, 8, 1225-1229
- 6 Kato K, Horiuchi S, Takahashi T, Ueoka Y, Arima T, Matsuda T, Kato H, Nishida J,  
Nakabeppu Y, Wake N. 2002.  
Contribution of estrogen receptors (ERα) to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell  
transformation and its implication for escape from senescence by modulating the  
p53 pathway.  
Journal of Biological Chemistry ., 277, 13, 11217-11224

## 総説

- 1 松田貴雄. 2001  
正常絨毛における増殖・分化調節の分子機構  
日本産科婦人科学会雑誌 53, 9, 1618-1628
- 2 加藤秀則, 近藤晴彦, 和氣徳夫. 2001  
悪性腫瘍の遺伝子診断, 遺伝子治療 6 癌遺伝子治療の将来  
臨床婦人科産科, 55, 8, 934-936
- 3 上岡陽亮, 和氣徳夫. 2001  
胞状奇胎・および娩出後管理  
日本産科婦人科学会専門医制度 研修コーナー 日本産科婦人科学会雑誌, 54, N19-24
- 4 高橋 晃, 加藤聖子, 和氣徳夫. 2002  
癌遺伝子と癌抑制遺伝子  
医学書院 婦人科検査マニュアル I. 婦人科腫瘍の検査 6. 遺伝子診断, 76-80

## 学会発表

- 1 和氣徳夫 (2001, 2/2)  
癌における細胞老化の逸脱とその制御

第5回日本産科婦人科腫瘍マーカー遺伝子診断学会 特別講演, 東京

- 2 上岡陽亮, 堀内新司, 高橋 晃, 有馬隆博, 加藤聖子, 和氣徳夫 (2001, 2/17)  
難治性卵巣癌に対する塩酸イリノテカンを中心とした化学療法の有効性の検討  
第3回 九州婦人科がんフォーラム, 福岡
- 3 加藤秀則, 周勇, 近藤晴彦, 浅野間和夫, 小川昌宣, 松田貴雄, 和氣徳夫 (2001, 2/23)  
マイクロアレイによる胞状奇胎での増殖関連遺伝子の発現制御  
第4回 九州大学生体防御医学研究所リトリート, 別府
- 4 加藤聖子, 堀内新司, 上岡陽亮, 寺尾泰久, 西田純一, 和氣徳夫 (2001, 2/23)  
造腫瘍能獲得機構における Ras, ER, p53 の相互作用  
第4回 九州大学生体防御医学研究所リトリート, 別府
- 5 小川昌宣, 浅野間和夫, 松田貴雄, 近藤晴彦, 周勇, 加藤秀則, 和氣徳夫 (2001, 2/23)  
正常絨毛細胞特異的に強発現する遺伝子群の単離・同定  
第4回 九州大学生体防御医学研究所リトリート, 別府
- 6 堀内新司, 加藤聖子, 上岡陽亮, 寺尾泰久, 西田純一, 和氣徳夫 (2001, 2/23)  
細胞増殖におけるプロゲステロンレセプターの役割  
第4回 九州大学生体防御医学研究所リトリート, 別府
- 7 有馬隆博, 松田貴雄, 和氣徳夫 (2001, 2/23)  
ヒト6番染色体の新規インプリント領域の構造ならびに機能解析について  
第4回 九州大学生体防御医学研究所リトリート, 別府
- 8 周勇, 加藤秀則, 近藤晴彦, 浅野間和夫, 小川昌宣, 松田貴雄, 和氣徳夫 (2001, 2/23)  
TGF- $\beta$ により誘導される転写因子である FKHL7 の婦人科癌発生への関与  
第4回 九州大学生体防御医学研究所リトリート, 別府
- 9 上岡陽亮, 加藤聖子, 堀内新司, 寺尾泰久, 西田純一, 和氣徳夫 (2001, 2/23)  
MMP の活性化における ras の関与  
第4回 九州大学生体防御医学研究所リトリート, 別府

- 10 加藤聖子, 和氣徳夫 (2001, 3/10-11)  
中高年外来における乳房検診の現状  
第11回臨床内分泌代謝 Update, 東京
- 11 加藤秀則, 周勇, 近藤晴彦, 浅野間和夫, 小川昌宣, 松田貴雄, 和氣徳夫 (2001/5/12~16)  
子宮体癌におけるユビキチンC末延長蛋白 (HUBCUP) 類似遺伝子の異常  
第53回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌
- 12 加藤聖子, 堀内新司, 上岡陽亮, 寺尾泰久, 西田純一, 和氣徳夫 (2001/5/12~16)  
造腫瘍能獲得機構における Ras, ER, p53 の相互作用  
第53回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌
- 13 上岡陽亮, 加藤聖子, 堀内新司, 寺尾泰久, 西田純一, 和氣徳夫 (2001/5/12~16)  
MMP の活性化における ras の関与  
第53回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌
- 14 小川昌宣, 浅野間和夫, 松田貴雄, 近藤晴彦, 周勇, 加藤秀則, 和氣徳夫 (2001/5/12~16)  
正常絨毛細胞特異的に強発現する遺伝子群の単離・同定  
第53回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌
- 15 寺尾泰久, 西田純一, 上岡陽亮, 堀内新司, 加藤聖子, 和氣徳夫 (2001/5/12~16)  
酪酸ナトリウム (NaB) を用いた癌の分子標的療法  
第53回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌
- 16 堀内新司, 加藤聖子, 上岡陽亮, 寺尾泰久, 西田純一, 蜂須賀徹, 瓦林達比古, 和氣徳夫 (2001/5/12~16)  
細胞増殖におけるプロゲステロンレセプターの役割  
第53回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌
- 17 周勇, 加藤秀則, 浅野間和夫, 小川昌宣, 松田貴雄, 和氣徳夫 (2001/5/12~16)  
婦人科癌細胞株における TGF- $\beta$ 1 不応性の分子機構  
第53回日本産科婦人科学会学術講演会, 札幌
- 18 松田貴雄 (2001/5/12~16)

ヒト絨毛細胞の機能とその異常

第53回日本産科婦人科学会学術講演会, シンポジウム, 札幌

- 19 堀内新司 (2001/6/1)  
細胞増殖抑制に関与するプロゲステロンレセプターを介した情報伝達系の解析  
第6回生殖医学フォーラム, 山口
- 20 有馬隆博 (2001/6/1)  
新規ヒトゲノムインプリント領域の構造ならびに機能解析について  
第6回生殖医学フォーラム, 山口
- 21 和氣徳夫 (2001/6/28~30)  
細胞老化の分子機構  
第42回 日本臨床細胞学会 要望講演, 横浜
- 22 小川昌宣, 松田貴雄, 和氣徳夫, 吉河康二 (2001/5/27)  
21 水酸化酵素欠損症の出生前診断と胎内治療について  
第57回日本産科婦人科学会九州連合地方部会, 福岡
- 23 Wake N (2001/9/1-2)  
Cell senescence induction in gynecological cancer cells.  
第12回福岡周産期シンポジウム, 福岡
- 24 浅野間和夫, 松田貴雄, 近藤晴彦, 加藤秀則, 和氣徳夫 (2001/10/20-21)  
排卵障害を伴う不妊患者のインスリン抵抗性の評価と改善薬の使用経験  
第58回日本産科婦人科学会九州連合地方部会, 久留米
- 25 加藤秀則, 近藤晴彦, 浅野間和夫, 松田貴雄, 和氣徳夫 (2001/10/25)  
マイクロサテライト多型マーカーを用いた侵入奇胎および絨毛癌の発生源の解析  
第19回絨毛性疾患研究会, 大阪
- 26 浅野間和夫, 松田貴雄, 近藤晴彦, 周勇, 加藤秀則, 和氣徳夫 (2001/10/25)  
絨毛癌の癌抑制に関わる新規候補遺伝子の報告  
第19回絨毛性疾患研究会, 大阪

27 Wake N (2001/10/27-31)

Involvement of imprinted genes and cytokine mediated signalling in development and proliferation of placental trophoblasts.

XIth World Congress On Gestational Trophoblastic Diseases, Santa Fe, USA,

## 発生工学分野

### Division of Embryonic and Genetic Engineering

発生工学分野は、平成 13 年 4 月の改組によって、旧附属発生工学実験施設から研究分野に昇格し、研究組織としての活動を開始した。また一方で感染防御研究センター発生工学室として、以前より行っているサービス業務として発生工学的技術供与（トランスジェニックマウスやノックアウトマウス作製）、マウス胚保存業務、マウス飼育維持の管理業務等を行っている。

発生工学分野、中山敬一教授（併任）、中山啓子助教授、小南欽一郎助手の教官を中心に非常勤研究員（1 名）、研究支援推進員（1 名）、研究補助員（2 名）の体制で研究とサービス業務を進めている。

本年度の人事異動について、6 月 1 日をもって助手の小南 欽一郎は辞職し、野村証券（株）に転出した。

#### A. カスパーゼ 3 欠損マウスにおける蝸牛神経の変性による難聴の研究

われわれはアポトーシスに重要な役割を果たすカスパーゼ 3 を欠損するマウスをジーンターゲットイングによって作製したところ、発達は正常だが、難聴を呈することが明らかとなった。カスパーゼ 3 ノックアウトマウスの聴性脳幹反応の閾値は有意に上昇しており、これは生後 15 日から認められて生後 30 日までの間に進行性のものであった。DPOAE はノックアウトマウスでは認められず、蝸牛機能が傷害されていることが判明した。病理学的にはラセン神経節の変性と有毛細胞の脱落を認めた。微細構造の解析では、変性細胞内には多くの空胞を認め、いわゆるアポトーシスとは異なっていた。これらの結果から、ラセン神経節や有毛細胞においてカスパーゼ 3 はその生存に必須であるが、発生期には必要ないことがわかった。ヒトカスパーゼ 3 遺伝子と常染色体優性遺伝型非症候群型難聴（DFNA24）はどちらも 4q35 にマップされることから、カスパーゼ 3 ノックアウトマウスはこの難聴のモデルとなる可能性がある。

#### B. ノックインマウスを用いた p27<sup>Kip1</sup> の分解機構の解析

p27 は細胞分裂の阻害分子であり、その量的増加は増殖細胞を細胞周期から逸脱させ、その減少は静止細胞を再び増殖サイクルに進行させるのに必須である。またその発現の異常低下はしばしば癌などの過剰に細胞増殖が行われている状態でしばしば認めることができるものである。星状細胞や癌細胞において p27<sup>Kip1</sup> のレベルは翻訳レベルかタンパク質分解のレベルで主に調節されている。p27<sup>Kip1</sup> の分解制御において 187 番目のスレオニンが Cdk2 によってリン酸化されることが非常に重要であることがわかっており、われわれはその意義を個体レベルで調べるために、米国フレッドハッチンソン癌研究所の Jim Roberts 博士との共同研究で p27<sup>Kip1</sup> 遺伝子の中で 187 番目

のスレオニンを変化させたマウスをノックイン技術を用いて作製した (p27<sup>T187A</sup> マウス). このマウス由来の細胞においては p27<sup>Kip1</sup> の分解が S-G<sub>2</sub> 期で抑制されていたが, 驚くべきことに細胞増殖の程度にはそれほど影響を与えなかった. このことは G<sub>1</sub> 期において増殖刺激によって活性化される第二の経路があることを示している.

### C. Skp2 ノックアウトマウスにおける部分肝切除による生体内細胞増殖の研究

生体内で人工的かつ同調して細胞周期を観察するのは容易ではないが, 部分肝切除術は数少ない例外であり, 肝細胞は術後急速に分裂して, 元の組織の大きさまで約 1 週間で回復した後, 増殖を停止する. この生体内細胞増殖過程において p27<sup>Kip1</sup> の Skp2 依存性分解による制御機構の意義を知るために, Skp2 ノックアウトマウスを用いて部分肝切除術を施行した. Skp2 ノックアウトマウスでは p27<sup>Kip1</sup> の分解が阻害されているので, 増殖が抑制され, 回復の程度が低いことが予想された. しかしながら術後 1 週間の Skp2 ノックアウトマウスの肝臓の大きさは野生型と同程度に回復していた. どちらのマウスでも術後 1 週間では正常レベルの血清アルブミン値を示したことから, Skp2 ノックアウトマウスにおいても肝機能が回復していることが示された. 組織病理学的解析を行ったところ, Skp2 ノックアウトマウスでは術後細胞の異常な肥大が観察され, 細胞数自体はほとんど増えていないことが明らかとなった. この巨大細胞は多倍数体化しており, p27<sup>Kip1</sup> の蓄積が観察された. 術後, 肝細胞における BrdU の取り込みを検討したところ, Skp2 ノックアウトマウスの肝細胞も有意に BrdU を取り込んでいたことから, この巨大細胞は S 期に進行することはできることが判明した. しかし一方で抗リン酸化ヒストン H3 を用いた免疫染色では M 期にいる細胞がほとんど見つからず, この Skp2 ノックアウトマウスにおける巨大細胞は, S 期には入るが, M 期には入らない endocycle を繰り返して巨大化していることが示唆された. これらの結果は, 細胞増殖が阻害されても, 細胞個々の大きさが大きくなることによって組織の大きさは代償されていることを示している. そしてこの組織の大きさの決定という問題に関し, p27<sup>Kip1</sup>-Skp2 系がなくても正常な大きさは維持できることが明らかとなった.

## 業績目録

### 原著論文

1. Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Morita, S., Kitamura, T., Kato, H., Nakayama, K.-I., Yoshimura, A. 2001.  
The SOCS box of SOCS-1 accelerates ubiquitin-dependent proteolysis of TEL-JAK2.  
J. Biol. Chem. 276, 12530-12538.



2. Ageta, H., Kato, A., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I., Isojima, Y., Sugiyama, H. 2001.  
Regulation of the level of Ves1-1S/Homer-1a proteins by ubiquitin-proteasome proteolytic systems.  
J. Biol. Chem. 276, 15893-15897.
3. Morishita, H., Makishima, T., Kaneko, C., Lee, Y. S., Segil, N., Takahashi, K., Kuraoka, A., Nakagawa, T., Nabekura, J., Nakayama, K., Nakayama, K.-I. 2001.  
Deafness due to degeneration of cochlear neurons in caspase-3-deficient mice.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 284, 142-149.
4. Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Nakayama, K.-I. 2001.  
U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases.  
J. Biol. Chem. 276, 33111-33120.
5. Malek, N. P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakidis, T. R., Roberts, J. M. 2001.  
A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase.  
Nature 413, 323-327.
6. Ikeda, H., Yoshimoto, T., Shida, N., Miyoshi, I., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Oshima, M., Taketo, M. M. 2001.  
Morphologic and molecular analysis of estrogen-induced pituitary tumorigenesis in targeted disruption of transforming growth factor-beta receptor type II and/or p27 mice.  
Endocrine 16, 55-65.
7. Kiernan, R. E., Emiliani, S., Nakayama, K., Castro, A., Labbe, J. C., Lorca, T., Nakayama, K.-I., Benkirane, M. 2001.  
Interaction between Cyclin T1 and SCF<sup>SKP2</sup> targets CDK9 for ubiquitination and degradation by the proteasome.  
Mol. Cell. Biol. 21, 7956-7970.
8. Maruyama, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ishida, N., Kawakami, K., Nakayama, K.-I. 2001.  
Characterization of a mouse gene (*Fbxw6*) that encodes a homologue of *Caenorhabditis elegans* SEL-10.  
Genomics 78, 214-222.
9. Hara, T., Kamura, T., Nakayama, K., Oshikawa, K., Hatakeyama, S., Nakayama,

- K.-I. 2001.  
Degradation of p27<sup>Kip1</sup> at the G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway.  
J. Biol. Chem. 276, 48937-48943.
10. Doira, N., Kanematsu, T., Matsuda, M., Takeuchi, H., Nakano, H., Ito, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.-I., Hirata, M. 2001.  
Hyperinsulinemia in *PRIP-1* gene deleted mice.  
Biomed. Res. 22, 157-165.
11. Xiang, Z., Ahmed, A. A., Moller, C., Nakayama, K.-I., Hatakeyama, S., Nilsson, G. 2001.  
Essential role of the prosurvival bcl-2 homologue A1 in mast cell survival after allergic activation.  
J. Exp. Med. 194, 1561-1569.
12. Ikebe, C., Kominami, K.-I., Toda, T., Nakayama, K.-I. 2002.  
Isolation and Characterization of a Novel F-Box Protein Pof10 in Fission Yeast.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 290, 1399-1407.
13. Yamanaka, A., Yada, M., Imaki, H., Koga, M., Ohshima, Y., Nakayama, K.-I. 2002.  
Multiple Skp1-Related Proteins in *Caenorhabditis elegans*. Diverse Patterns of Interaction with Cullins and F-Box Proteins.  
Curr. Biol. 12, 267-275.
14. Minamishima, Y. A., Nakayama, K., Nakayama, K.-I. 2002.  
Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice.  
Cancer Res. 62, 995-999.
15. Yoshida, K., Nakayama, K., Nagahama, H., Harada, T., Harada, C., Imaki, J., Matsuda, A., Yamamoto, K., Ito, M., Ohno, S., Nakayama, K.-I. 2002.  
Involvement of p27<sup>KIP1</sup> degradation by Skp2 in the regulation of proliferation in response to wounding of corneal epithelium.  
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43, 364-370.
16. Kanematsu, T., Jang, I. S., Yamaguchi, T., Nagahama, H., Yoshimura, K., Hidaka, K., Matsuda, M., Takeuchi, H., Misumi, Y., Nakayama, K., Yamamoto, T., Akaike, N., Hirata, M., Nakayama, K.-I. 2002.  
Role of the PLC-related, catalytically inactive protein p130 in GABA<sub>A</sub> receptor function.

EMBO J. 21, 1004-1011.

17. Shimoda, K., Tsutsui, H., Aoki, K., Kato, K., Matsuda, T., Numata, A., Takase, K., Yamamoto, T., Nukina, H., Hoshino, T., Asano, Y., Gondo, H., Okamura, T., Okamura, S., Nakayama, K.-I., Nakanishi, K., Niho, Y., Harada, M. 2002.  
Partial impairment of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 signaling in Tyk2-deficient mice.  
Blood 99, 2094-2099.

## 総説

1. Nakayama, K.-I., Hatakeyama, S., Nakayama, K. 2001.  
Regulation of the cell cycle at the G<sub>1</sub>-S transition by proteolysis of cyclin E and p27<sup>Kip1</sup>.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 282, 853-860.
2. 石田典子, 中山敬一. 2001.  
ユビキチン.  
分子細胞治療 2, 414-415.
3. 押川清孝, 中山敬一. 2001.  
TAP システムを用いたタンパク質複合体解析法.  
細胞工学 20, 1420-1427.
4. 中山啓子, 中山敬一. 2002.  
ヒトに最も近いモデル生物-マウス.  
細胞工学 21, 31-36.
5. 中山敬一. 2002.  
細胞周期研究: 2つの大河の合流点.  
実験医学「細胞周期: サイクリンの発見から 20年」 20, 520-525.
6. 中山啓子, 中山敬一. 2002.  
CDK インヒビター-p27<sup>Kip1</sup> のタンパク質分解による制御機構.  
実験医学「細胞周期: サイクリンの発見から 20年」 20, 526-531.

## 学会発表

1. 中山敬一 (2001, 4/28) .  
細胞の増殖と非増殖: 神経細胞はなぜ増殖しないか?. (シンポジウム)  
「脳を知る」・「脳を守る」合同シンポジウム, 京都.
2. 畠山鎮次, 中道郁夫, 中山敬一 (2001, 4/28) .

- タウ蛋白キナーゼ CDK5 の活性調節因子 Cable-1 および Cable-2 の同定.  
「脳を知る」・「脳を守る」合同シンポジウム, 京都.
3. 嘉村巧, Conaway, R. C., Conaway, J. W., 中山敬一 (2001, 4/28) .  
VHL ユビキチンリガーゼ複合体の機能解析: Rbx1 の発見.  
「脳を知る」・「脳を守る」合同シンポジウム, 京都.
  4. 白根道子, 中山敬一 (2001, 4/28) .  
Bcl-2 結合蛋白質 FKBP38 による抗アポトーシス作用の分子細胞生物学的解析.  
「脳を知る」・「脳を守る」合同シンポジウム, 京都.
  5. 松本雅記, 矢田雅佳, 島山鎮次, 北川雅敏, 中山敬一 (2001, 4/28) .  
Machado-Joseph 病の原因遺伝子産物 MJD1 の分解に関与する因子の同定.  
「脳を知る」・「脳を守る」合同シンポジウム, 京都.
  6. Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Nakayama, K.-I. (2001, 5/3) .  
U-box proteins: A novel family of ubiquitin protein ligase.  
Cold Spring Harbor Symposium "Proteolysis & Biological Control", Cold Spring Harbor, NY.
  7. Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Nakayama, K.-I. (2001, 5/4) .  
UFD2a, a mammalian ubiquitin-chain assembly factor (E4), promotes ubiquitination and degradation of the polyglutamine-containing protein, Machado-Joseph disease protein 1.  
Cold Spring Harbor Symposium "Proteolysis & Biological Control", Cold Spring Harbor, NY.
  8. Nakayama, K., Nagahama, H., Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I. (2001, 5/4) .  
Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1.  
Cold Spring Harbor Symposium "Proteolysis & Biological Control", Cold Spring Harbor, NY.
  9. Shirane, M., Nakayama, K.-I. (2001, 5/4) .  
FKBP38, an inherent inhibitor of calcineurin, is regulated by ubiquitin-proteasome pathway.  
Cold Spring Harbor Symposium "Proteolysis & Biological Control", Cold Spring Harbor, NY.

10. Yada, M., Hatakeyama, S., Ishida, N., Nakayama, K., Nakayama, K.-I. (2001, 5/4).  
Different fashion of recognition by Skp2 for p27Kip1 and cyclin E.  
Cold Spring Harbor Symposium "Proteolysis & Biological Control", Cold Spring Harbor, NY.
11. 中山敬一, 嘉村巧, 原太一, 畠山鎮次, 中山啓子 (2001, 9/26).  
ユビキチンリガーゼ群ノックアウトマウスによる生体機能の解析: 特に細胞周期研究を中心として. (シンポジウム)  
第60回日本癌学会総会, 横浜.
12. 増田隆明, 山下継史, 園田英人, 峯真司, 中山啓子, 中山敬一, 井上裕, 森正樹 (2001, 9/26).  
胃癌におけるユビキチンリガーゼ SCFSkp2 の発現とその意義.  
第60回日本癌学会総会, 横浜.
13. 中山敬一, 嘉村巧, 原太一, 畠山鎮次, 中山啓子 (2001, 10/26).  
静止期から増殖期へ: p27 分解に関わる二つのユビキチンリガーゼ. (シンポジウム)  
第74回日本生化学会大会, 京都.
14. 畠山鎮次, 矢田雅佳, 松本雅記, 石田典子, 中山敬一 (2001, 10/28).  
新規ユビキチンリガーゼ、U-ボックス蛋白質の同定と生化学的解析. (シンポジウム)  
第74回日本生化学会大会, 京都.
15. 松本雅記, 矢田雅佳, 畠山鎮次, 北川雅敏, 中山敬一 (2001, 10/28).  
Machado-Joseph 病の原因遺伝子産物 MJD1 の分解に関与する因子の同定. (シンポジウム)  
第74回日本生化学会大会, 京都.
16. 兼松隆, 中山敬一, 平田雅人 (2001, 10/28).  
GABA<sub>A</sub> 受容体情報伝達に関わる新しい分子の発見.  
第74回日本生化学会大会, 京都.
17. Nakayama, K.-I., Hara, T., Kamura, T., Nagahama, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K. (2001, 11/30).  
Regulation of the cell cycle by proteolysis of p27Kip1. (Invited speaker)  
16th Workshop on France-Japan Cooperative Cancer Research Program, Kyoto, Japan.
18. 中山敬一, 嘉村巧, 原太一, 畠山鎮次, 中山啓子 (2001, 12/10).  
G0 期から G1 期の移行メカニズム: p27 の新たな分解機構. (シンポジウム)  
第24回日本分子生物学会年会, 横浜.
19. 金子千恵, 畠山鎮次, 矢田雅佳, 中山啓子, 中山敬一 (2001, 12/10).

- マウス U-ボックス型ユビキチンリガーゼ UFD2a のゲノム DNA のスクリーニングとその解析.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
20. 中道郁夫, 畠山鎮次, 中山敬一 (2001, 12/10) .  
マロリー小体をつくる: ケラチン 18 の発現異常による細胞内凝集体形成と細胞死.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
21. 池辺千穂, 小南欽一郎, 中山敬一 (2001, 12/11) .  
分裂酵母における Skp1 と結合する新規 F-box 蛋白の同定.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
22. 畠山鎮次, 矢田雅佳, 松本雅記, 石田典子, 中山敬一 (2001, 12/11) .  
新規ユビキチンリガーゼ、U-ボックス蛋白群の同定と生化学的解析.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
23. 原太一, 嘉村巧, 中山啓子, 押川清孝, 畠山鎮次, 中山敬一 (2001, 12/11) .  
G0-G1 期における Skp2 非依存性 p27Kip1 分解システムの解明.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
24. 南嶋洋司, 中山啓子, 中山敬一 (2001, 12/11) .  
Skp2 ノックアウトマウスにおける肝再生: 量による数の代償.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
25. 今本裕幸, 中山啓子, 半田宏, 中山敬一 (2001, 12/11) .  
プロモーター解析による Skp2 遺伝子発現制御の研究.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
26. 白根道子, 中山敬一 (2001, 12/11) .  
カルシニューリン阻害分子 FKBP による Bcl-2 のミトコンドリア移行及びアポトーシス抑制.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
27. 松本雅記, 矢田雅佳, 畠山鎮次, 北川雅敏, 中山敬一 (2001, 12/12) .  
ポリユビキチン化促進因子 UFD2 はマシャド・ジョセフ病原因遺伝子産物 MJD1 の分解を促進する.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
28. 矢田雅佳, 松本雅記, 畠山鎮次, 石元広志, 谷村禎一, 中山敬一 (2001, 12/12) .  
ショウジョウバエにおけるポリグルタミン病モデルに対するユビキチン鎖伸長因子 UFD2a の抑制的効果.  
第 24 回日本分子生物学会年会, 横浜.
29. Nakayama, K., Miyamoto, A., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K.-I. (2001,

12/14) .

Increased proliferation of B cells and autoimmune disease in protein kinase-delta-deficient mice. (Invited speaker)

The 11th Hot Spring Harbor Symposium "Frontier of Molecular and Cellular Biology", Fukuoka, Japan.

30. 中山敬一, 松本雅記, 矢田雅佳, 畠山鎮次 (2002, 1/26) .

Mechanism for ubiquitination-dependent degradation of polyglutamine disease protein. (招待講演)

第2回九州脳シンポジウム, 福岡.

31. Nakayama, K.-I. (2002, 1/30) .

Regulation of the cell cycle by proteolysis of p27Kip1. (Invited speaker)

The use of animal models in cancer research, Maui, HI.

32. Nakayama, K. (2002, 1/30) .

Increased proliferation of B cells and autoimmune disease in protein kinase-delta-deficient mice. (Invited speaker)

The use of animal models in cancer research, Maui, HI.

33. 中山敬一 (2002, 3/1) .

細胞周期エンジンの始動に必要なブレーキ解除メカニズム. (招待講演)

先端技術によるゲノム創薬シンポジウム, 山口.

34. Nakayama, K.-I. (2002, 3/5) .

Mechanisms to control degradation of polyblutamine-containing protein. (Invited speaker)

COE International Symposium on Recent Advances in Research for Neurodegeneration, Tokyo, Japan.