

遺伝学部門 Department of Genetics

遺伝学部門では、MHC 多重遺伝子族による免疫システムフレームワーク決定の分子機構、免疫制御の分子機構、および癌を含む多因子病の遺伝子解析を主要な研究テーマとして研究を行っている。

平成12年4月より大学院生として、猪口淳一、古垣浩一が研究に参加した。また、平成12年9月より池田順子が、12月より藤本さやかが研究補助員として研究に参加した。

A. 免疫系のフレームワーク決定及び免疫制御の分子機構

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。

当部門では、胸腺における正および負の選択機構、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、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、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。

a. T細胞レパトリー形成における TCR-MHC / ペプチド複合体相互作用

胸腺内分化過程で、T細胞は TCR-MHC / ペプチド複合体相互作用の結果、正と負の選択を受け、免疫応答に寄与する T細胞レパトリーが決定される。我々は、これまでに I-A^b/E α 52-68 複合体を単一 MHC クラス II / ペプチド複合体を発現するトランスジェニックノックアウトマウス (Tg-KO) を用いて、正の選択においても特異的 TCR-ペプチド相互作用が関与し得ることを明らかにした。本年度は、選択に関わる抗原ペプチドの構造が T細胞レパトリー形成に及ぼす影響は明らかとする目的で、E α 52-68 の TCR コンタクト部位にあたるアミノ酸残基を置換したアナログペプチドを I-A^b 分子との単一 MHC クラス II / ペプチド複合体として発現する複数系統の Tg-KO を樹立し、その CD4⁺ T細胞分化及び TCR の構造を詳細に解析することで、TCR コンタクト部位のアミノ酸残基の側鎖の大きさや荷電の有無によって、正の選択における抗原ペプチドの関与の程度が異なり、結果として多様性や特異性を異にする T細胞レパトリーが形成されるというモデルを提唱した。

また、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、それぞれを可溶性蛋白として発現する系に着手した。

b. HBs 抗原特異的免疫応答制御機構の解析

健康人の 5-10%が HBsAg ワクチンに対して抗体産生低応答者である。我々は、これまでに、特定の HLA タイプがこの低応答と相関すること、そして低応答であるにもかかわらず、その約半数において HBsAg に対する T細胞増殖反応が認められることを証明しており、この低応答のメカニズムは単に HBsAg に特異的な T細胞の欠如では説明できない。一方、我々は抗体産生に対する HLA の寄与が50%であることを示しており、HLA 以外の他の因子の関与を示唆している。HBsAg ワクチンに対する免疫応答に個体差が生じる機序を T細胞レベルでの抗体産生制御に焦点をあて、抗体高応答者および低応答者それぞれ3人より HBsAg 特異的な T細胞クローンを146クローン樹立した。高応答者より得られた T細胞クローンは、CD4 陽性 TCR 型の T細胞であり、77%が HBsAg に対し IL-4 優位の産生パターンで増殖反応を示す Th2 タイプの T細胞であったが、低応答者に関しては、CD4 陽性 TCR 型で γ -IFN 優位のサイトカイン産生パターンを示す Th1 タイプの T細胞クローンを主に有する個体、CD4 陽性 TCR 型で Th0 タイプの T細胞クローンを主に有する個体、また、HBsAg 特異的に増殖を示す CD8 陽性 TCR 型 T細胞クローンと CD4 陽性 T細胞クローンの両者を有する個体が認められた。これは、ヒト集団における免疫応答の個体差が、機能的に異なる CD4T 細胞サブセットの活性化に基づくことを示した初めての例である。HBsAg に対する免疫応答に関し、このような Th1/Th2 バランスの差が生じる機序の一つとして、抗体高応答者と低応答者における T細胞クローンの拘束分子の差異が考えられたが、現段階では、解析対象数が不十分であり、特定の HLA との相関は明確ではない。今後、対象者を増やして再検討することにより拘束分子と Th1/Th2 バランスの関連が明らかにされるであろう。

また、Th1/Th2 バランス形成に関与することが知られている分子群 (T-bet、NFAT、c-Maf、GATA-3) やこれら転写因子と相互作用する分子の多型性なども視野に入れ、これまでに GATA-3 と結合する分子を数種精製し、その同定と機能解析を行っている。

c. 多発性硬化症 (MS) モデルマウスの樹立

HLA-DR2 ハプロタイプを有する MS 患者において認められる proteolipid protein (PLP) 由来のペプチド (PLP 95-116) 反応性 CD4⁺ T細胞の MS 発症における役割を明らかにするために、HLA-DR2 トランスジェニックマウスを用いた解析を行った (国立精神神経センター田平武部長らとの共同研究)。このマウスに PLP95-116 を免疫することで樹立した PLP95-116 特異的 HLA-DR2 拘束性 CD4⁺ T細胞株のうち1種類は、HLA-DR2 トランスジェニック RAG2 欠損マウスに移入することで疾患を惹起した。以上の結果は、HLA-DR2 を有する MS 患者において、この HLA に拘束された PLP 反応性 CD4 陽性 T細胞が疾患発症に関与していることを明らかにしたのみならず、このマウスが今後 MS 研究の新しい材料として極めて有用であることを

示している。

d. 新規遺伝子の単離とその解析

新規遺伝子をマウス胸腺 cDNA ライブラリーより単離し、ノックアウトマウスを用いた解析より、この遺伝子産物が免疫系の構築に重要な役割を演じることを明らかにした。

B. 発がんの分子機構の解析

当部門では、固形腫瘍において高頻度に変異が検出される Ki-ras の発がんにおける生物学的意義について、変異 Ki-ras を持つ大腸癌細胞株の変異 Ki-ras を遺伝子標的法を用いて特異的に欠失させた細胞を樹立することにより、詳細な解析を行ってきた。本年度は、特に変異 Ki-ras により発現抑制される遺伝子と、その遺伝子産物と会合する分子を同定することにより、発がんにおける変異 Ki-ras の役割を解析した。

C. Hox11 ファミリーの機能解析

T-ALLの転座より単離されたホメオドメインを有する転写因子 hox11 と高い相同性を認める Enx, Rnx を単離し、その発現パターンの解析及び遺伝子欠損マウスを樹立・解析することによりそれらの機能解析を行ってきた。本年度は Rnx の機能解析を中心に進め、Rnx が神経発生分化に重要な役割を果たす phox2b の発現の維持に關与することを明らかにした。

D. 多因子疾患の発症関連遺伝子の探索

現代医学が解決を迫られている、がん、自己免疫病、糖尿病などの生活習慣病の多くは、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要因を明らかにするためには、集団遺伝学的解析法が必須であり、その手法を駆使して疾病発症関連遺伝子を同定することは重要な研究課題である。我々は、日本人における胃がんおよび自己免疫性甲状腺炎（橋本病、グレーブス病）の遺伝要因を明らかにする目的で、遺伝子解析指針に基づいた全国規模での臨床検体の収集により、両疾患ともに約120組の罹患同胞対検体を収集し、また、ゲノム解析技術においては多検体同時並列解析法を確立させ、全ゲノムに約10cM間隔で位置する約400のマイクロサテライトマーカーを用いた罹患同胞対法による全ゲノムにわたる連鎖解析を行った。その結果、自己免疫性甲状腺炎においては5番および8番染色体に、胃がんにおいては複数の染色体に、それぞれ有意な連鎖領域を見出した。これらの領域をさらに狭め、疾患発症関連遺伝子を同定する目的で、新たに多数の遺伝マーカーをその領域内に設定し、健常対照群と患者群間での相関解析を行っている。現在、上に示した複数の連鎖領域を対象に、一日平均約8千1万の多型解析を行っており、これらの疾患の発症関連遺伝子の同定が期待される。

また、平成12年9月より、特定領域研究(C)「ゲノム科学」のもと、ヒトゲノム多型解析室を設置し、上に述べた胃がん、自己免疫性甲状腺炎の他に、他施設との共同研究により、以下のプロジェクトを進行

させている。

- 1) 心筋梗塞の遺伝要因の解明：特定領域研究(C)「気管支喘息アトピー、精神分裂病、血清脂質異常関連遺伝子の解明」(有波忠雄、下川宏明)
- 2) 結核発症に關与する遺伝要因の解明：特定領域研究(C)「精神分裂病関連遺伝子群および結核発症に關連する宿主遺伝要因の解明」(服巻保幸、楠原浩一)
- 3) 尋常性乾癬の遺伝要因の解明：特定領域研究(C)「乾癬の疾患感受性遺伝子の同定」(武藤正彦)
2型糖尿病の遺伝要因の解明：特定領域研究(C) (春日雅人)

業績目録

原著論文

1. Sakai, K., Shirasawa, S., Ishikawa, N., Ito, K., Tamai, H., Kuma, K., Akamizu, T., Tanimura, M., Furugaki, K., Yamamoto, K., 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, 1379-13861.
2. Wataya, H., Kamikawaji, N., Nakanishi, Y., Takayama, K., Hara, N., Sasazuki, T. 2001.
Quantitation of HLA-A*0201 bound tumor associated antigens on a peptide pulsed B cell line.
Hum. Immunol., 62, 125-132.
3. Wataya, M., Sano, T., Kamikawaji, N., Tana, T., Yamamoto, K., Sasazuki, T. 2001.
Comparative analysis of HLA restriction and cytokine production of hepatitis B surface antigen-specific T cells from low-and high-antibody responders in vaccinated humans.
J. Human Genet. 46, 197-206.
4. Habets, G.G., Knepper, M., Sumortin, J., Choi, Y.J., Sasazuki, T., Shirasawa, S., Bollag, G. 2001.
cDNA array analyses of K-ras-induced gene transcription.
Methods Enzymol. 332, 245-260.
5. Baba, I., Shirasawa, S., Iwamoto, R., Okumura, K., Tsunoda, T., Nishioka, M., Fukuyama, K., Yamamoto, K., Mekada, E., Sasazuki, T. 2000.
Involvement of deregulated epiregulin expression in tumorigenesis *in vivo* through activated Ki-ras signaling pathway in human colon cancer cells. Cancer Res. 60, 6886-6889.
6. Fukui, Y., Oono, T., Cabaniols, J.P., Nakao, K., Hirokawa, K., Inayoshi, A., Sanui, T., Kanellopoulos, J., Iwata, E., Noda, M., Katsuki, M., Kourilsky, P., Sasazuki, T. 2000.

Diversity of T cell repertoire shaped by a single peptide ligand is critically affected by its aminoacid residue at a T cell receptor-contact.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 13760-13765.

7. Ries, S., Biederer, C., Woods, D., Shifman, O., Shirasawa, S., Sasazuki, T., McMahon, M., Oren, M., McCormick, F. 2000.
Opposing effects of Ras on p53: Transcriptional Activation of *mdm2* and induction of p19^{ARF}.
Cell, 103, 321-330.
8. Kawamura, K., Yamamura, T., Yokoyama, K., Chui, D.H., Fukui, Y., Sasazuki, T., Inoko, H., David, C.D., Tabira, T. 2000.
Induction of autoimmune encephalitis by proteolipid protein 95-116-specific T cells from HLA-DR2 (DRB1*1502) transgenic mice.
J. Clin. Invest., 105, 977-984.
9. Toh, H., Kamikawaji, N., Tana, T., Muta, S., Sasazuki, T., Kuhara, S. 2000.
Magnitude of structural changes of the T-cell receptor binding regions determine the strength of T-cell antagonism: molecular dynamics simulations of HLA-DR4 (DRB1*0405) complexed with analogue peptide.
Protein Engineering, 13, 423-429.
10. Shirasawa, S., Arata, A., Onimaru, H., Roth, K., Brown, G., Horning, S., Arata, S., Okumura, K., Sasazuki, T., Korsmeyer, S. 2000.
Rfx-deficiency results in congenital central hypoventilation.
Nature Genetics, 24, 287-290
11. Dilworth FJ, Fromental-Ramain C, Yamamoto K, Chambon P. 2000.
ATP-Driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR In vitro.
Mol. Cell., 6, 1049-58
12. Toh, H., Savoie, C.J., Kamikawaji, N., Muta, S., Sasazuki, T., Kuhara, S. 2000. Changes at the floor of the peptide-binding groove induce a strong preference for proline at position 3 of the bound peptide: molecular dynamics simulations of HLA-A*0217.
Biopolymers, 54, 318-327.
13. Hamaguchi, K., Kimura, A., Seki, N., Higuchi, T., Yasunaga, S., Takahashi, M., Sasazuki, T., Kusuda, Y., Okeda, T., Itoh, K., Sakata, T. 2000.
Analysis of tumor necrosis factor- α promoter polymorphism in type 1 diabetes: HLA-Band -DRB1 alleles are primarily associated with the disease in Japanese.
Tissue Antigens, 55, 10-16.

総説

1. 山本 健、笹月健彦 . 2000 .
HLA 多型と骨髄移植 .
Molecular Medicine, 37, 582-588.
2. 山本 健、笹月健彦 . 2000.
HLA と血液腫瘍 その多型と骨髄移植に関して .
血液フロンティア, 10, 61-67.
3. 山本 健、笹月健彦 . 2000.
自己免疫性甲状腺炎の成因 .
現代医療, 32, 149-154.

学会発表

- 1 . Takehiko Sasazuki, Yoshinori Fukui (2000, 11/14-16)
'Diversity' versus 'specificity' of T cell repertoire shaped by a single peptide-MHC complex.
第 30 回日本免疫学会総会, 仙台 .
- 2 . Takehiko Sasazuki, Yoshinori Fukui (2000, 10/15-20)
Contribution of MHC and non-MHC loci to the susceptibility to organ-specific autoimmune disease.
International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Australia.
- 3 . Takehiko Sasazuki (2000, 11/11-13)
The role of HLA in hematopoietic cell transplantation from an unrelated donor.
Euroconference II, Portugal.
- 4 . 福井宣規, 讃井彰一, 大野隆真, 笹月健彦 (2000, 11/14-16)
造血系細胞特異的に発現する CDM ファミリー遺伝子の単離とその機能解析 .
第 30 回日本免疫学会総会, 仙台 .
- 5 . 大野隆真, 福井宣規, 讃井彰一, 笹月健彦 (2000, 11/14-16)
自然発症末梢神経特異的自己免疫疾患マウスモデルの樹立とその発症における T 細胞レパートリー
選択の関与 .
第 30 回日本免疫学会総会, 仙台 .
- 6 . 讃井彰一, 福井宣規, 大野隆真, 笹月健彦 (2000, 11/14-16)
高親和性可溶性 TCR の樹立とその未知抗原ペプチド同定への応用 .
第 30 回日本免疫学会総会, 仙台 .
- 7 . 笹月健彦 (2000, 10/25-27)
免疫システムの多様性と多型性の遺伝学的基盤 .
日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡 .

- 8 . 福井宣規, 笹月健彦 (2000, 10/25-27)
MHC による免疫系のフレームワーク決定機構 .
日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡 .
- 9 . 白澤専二, 酒井健司, 石川直文, 玉井一, 赤水尚史, 伊藤國彦, 隈寛二, 谷村雅子, 山本健, 笹月健彦 (2000, 10/25-27)
罹患同胞対法による自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子座の同定 第 2 報 .
日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡 .
- 10 . 山本 健, 笹月健彦(2000, 10/25-27)
罹患同胞対法による胃がん発症関連遺伝子座の同定 特定領域研究「胃がん発症に關与する遺伝子の解明」班, 班研究第 2 報 .
日本人類遺伝学会第 45 回大会, 福岡 .
- 11 . Ken Yamamoto and Takehiko Sasazuki (2000, 10/21-22)
“HLA and autoimmune thyroiditis”
Genetics of Complex Thyroid Disease-Satellite Symposium for year 2000
International Thyroid Congress, Kyoto
12. 角田俊之, 白澤専二, 奥村幸司, 笹月健彦 . (2000 10/4-10/6)
「ヒト癌細胞における Mig-6 遺伝子の発現・機能解析」
第 59 回日本癌学会総会, 横浜 .
13. 角田俊之, 白澤専二, 奥村幸司, 笹月健彦 . (2000 10/4-10/6)
「大腸癌細胞における変異 Ki-Ras による Epiregulin の発現とその腫瘍原性に及ぼす効果の解析」
第 59 回日本癌学会総会, 横浜 .
14. 白澤専二, 奥村幸司, 馬場賀, 角田俊之, 笹月健彦 . (2000 10/4-10/6)
「変異 Ki-Ras により発現制御される新規癌関連遺伝子の同定・機能解析」
第 59 回日本癌学会総会, 横浜 .
- 15 . F.J.Dilworth, C.Fromental-Ramain, K. Yamamoto and P.Chambon (2000, 4/)
“Control of transcription by retinoic acid receptors”
Workshop on Integration of Transcriptional Regulation and Chromatin Structure ,
Madrid, Spain.