ゲノム集団遺伝学分野

Division of Molecular Population Genetics

ゲノム集団遺伝学分野では，特定領域「ゲノム」におけるヒト多型タイピング支援を主体として，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，およびゲノムの高次構造と転写制御機構について研究を行っている．平成 15 年度の異動は以下の通りである．酒井健司が研究生を辞し第一内科に帰局した。新たに，古野憲司（小児科），政次俊宏（第一外科）の 2 名が大学院生として研究に参加した．科研費派遣職員として，古野名加が参加し，大石さやかが辞した．以上により，教官 1 名，大学院生 4 名，派遣職員 7 名となった．また，研究の場をコラボステーション 2 へと移した．

A.　ヘテロクロマチン構成因子の解析

ショウジョウバエにおいてはヘテロクロマチン構成因子の変異は PEV を抑制するが，ポリコーム遺伝子（PcG）のうちホメオティック変異に加え PEV を抑制するものが知られている（Su(z)12，E(z)）．われわれは，ヘテロクロマチンと PcG による転写抑制機構の共通性を見出し，これらのエピジェネティック転写制御の分子機序の一端を明らかにするために，Su(z)12 分子の機能を分子レベルで解析している．これまでに，Su(z)12 がヘテロクロマチンの主たる構成因子である HP1a と PcG の一つである EZH2 に異なるドメインによって直接的に結合すること，特に，ショウジョウバエの

遺伝学解析によって形態形成に重要な機能が示唆されていた Su(z)12 分子の VEFS ドメインが，EZH2 との結合に必須であることを見出した．EZH2 は H3-K9,27 のメチル化酵素であり，この結果は，PcG の一部がヘテロクロマチン形成あるいは維持に機能していることを示唆するものであるが，一方，PcG による Hox 遺伝子を含めた形態形成に関わる遺伝子の発現制御に，ヘテロクロマチン構成因子が関与する可能性も示唆し，今後の検討課題である．また，近年同定されたメチロソーム複合体の一因子がヒストン H2A と特異的に結合すること，そして Su(z)12 分子がこの因子と相互作用することを見出し，メチロソーム複合体による標的遺伝子の転写制御機構と Su(z)12 分子の役割について検討している．

B. CpG マイクロアレイの作成と転写因子標的遺伝子の網羅的同定

これまで多くの DNA 結合型転写因子が同定されているが，その直接的な標的遺伝子は僅かに知られているのみである．その理由は，全遺伝子のプロモーター領域を個々に検討することは数的に不可能であり，また，転写因子の活性化による遺伝子発現の変化を検出する方法は，あくまで間接的な解析法であるからである．一方，ヒトゲノム配列が総て明らかとなり，約 32,000 個とも言われる全遺伝子の転写開始点が明確になって，転写因子の結合配列をデータベース上同定したとしても，細胞の発生・分化の過程においては，それらが総て標的となっているとは考え難い．よって，転写因子の標的遺伝子を，細胞内を反映しかつ網羅的に同定し，転写制御のネットワークを緻

密に理解するためには新しい手法が必要となる .これを実現するために ,本分野では ,ヒトの遺伝子プロモーター領域を主として含む CpG ライブラリーをアレイ化し ,これまでに約 2 万個をスポットしたマイクロアレイを作成した . これを利用した転写因子標的遺伝子の網羅的同定を進め ,CHIP アッセイとの組み合わせにより ,ある転写因子について , これまで知られていなかった標的遺伝子を数種同定し , 細胞機能との関連を解析している .

C. 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

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· 笹月健彦所長他が

ん特班研究）③２型糖尿病（神戸大学・春日雅人教授他ミレニアムプロジェクト２型糖尿病チーム）④劇症型１型糖尿病（愛媛大学・牧野英一教授他日本糖尿病学会劇症型１型糖尿病委員会）⑤統合失調症（九大・服巻保幸教授）⑥心筋梗塞（九大・下川宏明助教授）⑦結核（九大・楠原浩一助教授）．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．⑧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 FHL 研究会）．１５年度の成果として，８番染色体における橋本病関連遺伝子の同定（①），連鎖領域 2q33-35 の同定（②），全ゲノムからの 10 候補遺伝子の抽出(③)，4 連鎖領域の同定(⑥),疾患関連１塩基多型の同定(⑦),MUNC13-4 新規遺伝子変異とスプライシング異常の同定（⑧）が挙げられる．

業績目録

原著論文

1. Aoki M, Yamamura Y, Noshiro H, Sakai K, Yokota J, Kohno T, Tokino T, Ishida S, Ohyama S, Ninomiya I, Uesaka K, Kitajima M, Shimada S, Matsuno S, Yano M, Hiratsuka M, Sugimura H, Itoh F, Minamoto T, Maehara Y, Takenoshita S, Aikou T, Katai H, Yoshimura K, Takahashi T, Akagi K, Sairenji M, Yamamoto K, Sasazuki T. 2004.
   A full genome scan for gastric cancer.
   J. Med. Genet. in press

2. Yamamoto K, Ishii E, Sako M, Ohga S, Furuno K, Ueda I, Suzuki N, Imayoshi M, Yamamoto S, Moromoto A, Takada H, Hara T, Imashuku S, Sasazuki T,

Yasukawa M. 2004.
Identification of novel *MUNC13-4* mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and functional analysis of MUNC13-4-deficient cytotoxic T lymphocytes.
J. Med. Genet. in press

3. Yamamoto K, Sonoda M, Inokuchi J, Shirasawa S, Sasazuki T. 2004.
Polycomb group suppressor of zeste 12 links heterochromatin protein 1 alpha and enhancer of zeste 2.
J. Biol. Chem. 279, 401-406.

4. Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, Ihara K, Takahashi Y, Tsukada S, Miyawaki T, Hara T. 2004.
Female agammaglobulinemia due to Bruton's tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X chromosome inactivation.
Blood. 103, 185-187.

5. Yamamoto K, Sonoda M. 2003.
Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 301, 287-292.

総説

1. 山本　健, 笹月健彦. 2003.
HLA 適合と非血縁者間骨髄移植.
医学のあゆみ, 207, 533-537.

2. Ishii E, Yasukawa M, Kimura N, Yamamoto K, Imashuku S. 2003.
Current review on the pathogenesis of primary hematophagocytic lymphohistiocytosis
Recent Res. Devel. Haematol. 1, 13-25.

3. 山本　健，笹月健彦．2004.

ヒトゲノムの多様性.

Molecular Medicine 臨時増刊号,「ヒトゲノム」, 41, 94-100.

学会発表

１．青木正幸，古野憲司，園田美紀，山本　健 (2003，12/10-13).

ヒストン H3 メチル化酵素 SUV39H と RNA ポリメラーゼ II サブユニット RPB5 との相互作用.

第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸.

2．古野憲司，青木正幸，園田美紀，山本　健 (2003，12/10-13).

ポリコームタンパク SU(Z)12 と Methylosome Protein 50 (MEP50)の相互作用.

第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸.

3．山本　健，園田美紀，猪口淳一，白澤専二，笹月健彦 (2003，12/10-13).

Polycomb group, SU(Z)12 directly interacts with HP1 and EZH2.

第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸.

4．山本　健 (2003, 11/22) .

HLH 発症に関わる遺伝子検索.

京滋悪性腫瘍懇話会，京都．

5．山本　健 (2003, 12/13).

胃がん発症の遺伝子研究の現状．

第 3 回胃がんリスクファクター研究会，東京．

ゲノム病態学分野

Division of Molecular and Clinical Genetics

当分野では血液・腫瘍性疾患、消化器疾患ならびに神経疾患患者を対象に臨床を行っている。研究内容としては、新規治療法開発を目的に、A.癌に対する遺伝子治療の基礎および 臨床研究、B.血液疾患に対する遺伝子治療法開発研究、C.小型霊長類コモンマーモセットを用いた再生医療開発研究、D.ノックアウトマウスを用いた免疫関連分子の解析、E. 胎生期マウス脳組織内環状 DNA の意義の研究、などを行ってきている。これらの基礎ならびに臨床研究を積極的に進めることで、腫瘍性疾患ならびに慢性進行性疾患に対するより効果的でかつ安全な治療法を開発できるものと考えている。なお、われわれの研究内容を含めた九州大学で開発された新規医療技術を難病に苦しまれている患者さんへ円滑かつ早期に還元していくためには、九州大学附属病院内での新システムの構築が重要であるため、その構築も九州大学医学部附属病院・歯学部附属病院と共同で早急に進めていく予定である。

A. 癌に対する遺伝子治療の基礎および臨床研究

a. GM - CSF 免疫遺伝子治療臨床研究のフォローアップと新規プロトコールの作成

GM - CSF 免疫遺伝子治療臨床研究に参加頂き、生存中の３名の患者についての安全面を中心とした定期的フォローアップを実施している。これらの患者はワクチン接種開始より既に３～４年経過しており、２名の患者は PS０の状態で良好な経過を辿っている。これらの経験を背景に現在アデノウイルスベクターを用いた GM - CSF 免疫遺伝子治療臨床研究を米国 CellGenesys 社との共同研究として計画し、その臨床プロトコールを作成中である。

b. GM-CSF 免疫遺伝子治療実験系における抗腫瘍効果発現に関連する因子の SAGE 法をもちいた同定とその機能の検討

SAGE (serial analysis of gene expression)法により、マウス in vivo の腫瘍局所における遺伝子発現を、増殖過程に有る腫瘍および退縮過程に有る腫瘍において比較した。腫瘍の退縮は GM-CSF 遺伝子導入により誘導したものであり、その退縮効果に密接に関わりがある因子を同定することが目的である。その結果、両者において遺伝子発現に差異の有る遺伝子群が同定され、これを RT-PCR で確認した。この遺伝子群にはケモカインに属するものがいくつか入っており、そのうち TARC および RANTES に着目し、これらの in vivo 抗腫瘍効果を検討したところ、特に TARC は GM-CSF と協調的に抗

腫瘍効果を誘導し、この効果は Th2 経路の細胞性免疫応答の強化によるものであることが示唆され、次世代の腫瘍の免疫遺伝子治療の開発に重要な知見が得られたものと考えられる。

c. 消化器癌モデルマウスを用いた遺伝子治療および他療法を組み合わせた前臨床試験

癌の遺伝子治療において、腫瘍細胞に GM-CSF を導入し放射線を照射したワクチン細胞療法による抗腫瘍効果が認められ臨床応用が開始されている。現在我々は発癌物質を内服させて作製した消化器癌モデルノックアウトマウスを用いて,アデノウイルスベクターを用いて GM-CSF を導入した腫瘍細胞をワクチン治療として行い,抗腫瘍効果について検討している.また遺伝子治療のみならず,各種免疫療法やミニ移植を含めた複合的な治療法が癌治療により有効であろうと考えられているため,我々はこのマウスモデルを使用し,この複合的な治療法の確立のための前臨床研究を行ってきている.

d. GM-CSF 免疫遺伝子治療を受けた患者血清中に存在する抗腫瘍たんぱく質抗体とその抗原の解析

GM-CSF 免疫遺伝子治療を受けた患者の自己腎癌細胞の mRNA より

cDNA 発現ライブラリーを作製し、これに対して患者血清を用いて免疫スクリーニングをおこない腫瘍抗原遺伝子群を同定した。これらの抗原遺伝子にエピトープタグを付加して E. coli で発現し、抗原たんぱく質を単離した。現在、患者の治療開始前後、あるいは正常人の血清等をもちいて、これらの抗原に対する血清中抗体濃度を検討しているが、既に治療開始後にその濃度が上昇するような免疫遺伝子治療反応性の抗原が存在することがわかってきている。

e. 新規ウイルスベクターによる遺伝子導入法の確立

癌の遺伝子治療において、ベクターの導入効率や安全性が重要な問題になってきている。現在我々はレトロウイルスやアデノウイルスを用いより有効な癌治療用ベクターの開発研究を特に腫瘍融解ウイルスベクターを用いることで実施予定である。

f. 腎細胞癌における CAR(コクサッキー・アデノウイルス受容体)やインテグリンの発現の検討

アデノウイルスが主に CAR を介して細胞に感染することは知られている。また最近では CAR の発現の少ない癌細胞では、アデノウイルスを改変し接着分子であるインテグリンを介して細胞内に感染させる技術の開発も世界

的に進められている。今回腎細胞癌を用いて細胞表面の CAR やインテグリンの発現を調べ、より腎癌細胞に感染効率の高いアデノウイルスの開発に取り組む予定である。

ｇ.癌特異的タンパクに特異的に感染するアデノウイルスを用いた新しい癌に対する遺伝子治療の開発

近年、アデノウイルスの増殖に関わる遺伝子である E1 遺伝子に発現プロモーターとして様々な遺伝子を組み込む技術が開発されてきている。我々は、癌特異的なタンパクをいくつか選び出し、それらを発現プロモーターとして用いるアデノウイルスを開発することにより、癌細胞のみを攻撃し治療する遺伝子治療の開発に取り組んでいる。

B. 血液疾患に対する遺伝子治療法開発研究

a. VSV-G シュードレンチウイルスベクターを用いたヒト造血幹細胞への遺伝子導入法の開発

ヒト造血幹細胞や初代白血病細胞への遺伝子導入は現行の遺伝子導入ベクターでは極めて困難である。我々は Verma 博士らが開発した VSV-G シュードレンチウイルスベクターを元にヒト造血幹細胞への遺伝子導入法を開発してきたが、本ベクターを改良することでヒト造血幹細胞や初代白

血病細胞へほぼ１００％の効率で GFP(green fluorescent protein)遺伝子を導入することに成功した。本成果はヒト造血幹細胞を対象として、遺伝子治療法の開発にとって極めて重要な意味を持つものと考えている。

b. マキシザイムを用いたフィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病遺伝子治療法の開発

フィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病は白血病の中でも特に予後が悪い疾患であり、新規治療法の導入が必要であると考えられる。我々はリボザイムの進化型であるマキシザイムの開発を東大工学部· 多比良教授らとの共同研究として行なってきた。今回フィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病を標的としたマキシザイムを作製し、VSV-G シュードレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、白血病細胞にアポトーシスを誘導することができた。本研究は次世代の白血病にたいする標的遺伝子治療として期待が持てる。

c. PNH 遺伝子治療に関する研究

我々は PNH 遺伝子治療法開発を目的として、その原因遺伝子である PIG-A 遺伝子を組み込んだレンチウィルスベクターを作製し、PIG-A 欠損

K562 細胞に導入したところ、その機能回復に成功した。今後は PNH 患者の骨髄細胞（造血幹細胞）に PIG-A 遺伝子を導入し、PIG-A 遺伝子の機能回復の可能性について検討する予定である。

C. 小型霊長類コモンマーモセットを用いた再生医療開発研究

a. コモンマーモセット ES 細胞からの血球分化誘導

これまでに当教室では、コモンマーモセット ES 細胞の培養系を確立し、embryoid body（EB）formation およびストローマ細胞との共培養により、種々の血液細胞（赤芽球、顆粒球、単球、巨核球、破骨細胞など）への分化誘導に成功した。今後はｉｎ　ｖｉｔｒｏでの血液細胞分化誘導の効率化、さらには放射線照射し骨髄を破壊した動物（マーモセット）個体への移植を行い、霊長類骨髄再構築系を確立し、再生医療における ES 細胞の有効性および安全性の検討を行っていく予定である。

b. コモンマーモセット ES 細胞の樹立研究

本邦においてコモンマーモセット ES 細胞を用いた再生医療研究を発展させる目的で、コモンマーモセット ES 細胞樹立を試みて、困難であったコモンマーモセット受精卵採取の効率化に最近成功した。

c. ヒト白血病モデルコモンマーモセットの作製

我々は白血病治療法の開発を目的として、ヒト白血病モデルマーモセットの作製に取り組んでいる。東京大学医科学研究所ならびに実験動物中央研究所との共同研究により、これまでに bcr-abl 遺伝子を組み込んだレンチウィルスベクターを用いて、血液細胞株およびマーモセット骨髄細胞への遺伝子導入に成功した。今後は bcr-abl 遺伝子導入マーモセット骨髄細胞をマーモセット個体に自家移植し白血病モデルコモンマーモセットを作製する予定である。

d .ランダムリボザイム法によるマーモセット ES 細胞の分化誘導関連遺伝子の同定と解析

ES 細胞は、各臓器を構成する特異的な細胞への多分化能を持つ。この多分化能から特異的分化への運命づけのメカニズムは不明である。ヒトやマウスの ES 細胞から培養条件下で種々の成長因子や増殖抑制性因子により血液、神経、筋肉、肝細胞等への分化誘導がなされ、その際の細胞分化の指標として何種かの遺伝子活性化が確認されている。一方で ES 細胞の分化の際に新たな遺伝子発現群と抑制される遺伝子群が存在して分化過程が進行すると推定される。小型霊長類コモンマーモセット ES 細胞株にランダムリボザイムライブラリー発現ベクターを用いた遺伝子抑制スクリーニング

法により、ヒトに近い霊長類の ES 細胞で、神経系などへの分化の際発現が抑制される新規の遺伝子を探索していく予定である。

D. ノックアウトマウスを用いた免疫関連分子の解析

a. ＣＤ３０Ｌノックアウトマウスにおけるフェノタイプの解析

1. 肝臓、脾臓、リンパ節および腹腔内リンパ球における免疫担当細胞の構成をフローサイトメーターで解析した。
2. Listeria monocytogenes を腹腔内に投与して、感染前後における免疫担当細胞の変化を解析した。

b. ＣＤ３０ＬとＣＤ４０Ｌのダブルノックアウトマウスにおけるフェノタイプの解析

1. ダブルノックアウトマウス（ＣＤ３０４０ＤＫＯ）とコントロールマウスについて経時的な体重の変化を測定した。
2. 特徴ある肺病変について病理学的に解析した。
3. 特徴ある肺病変について電子顕微鏡にて解析した。

E. 胎生期マウス脳組織内環状 DNA 産生領域の DNA 組み換えの検出とその生理学的意義の探索

a. 胎生期マウス脳組織内環状 DNA を抽出 ,解析して胎生１６日前後に環状 DNA を生み出す特定のゲノム領域をマウス染色体１６番上に同定した . この領域は,ALCAM (Activated leukocyte cell adhesion molecule) 遺伝子の 150kb 下流に位置し,ヒト 3 番染色体に分節状に相同性を示す orthologous な領域である.広範囲のゲノム PCR 検索で,この環状 DNA 産生領域を含む領域が胎生 18 日以降に欠失することを確認した.マウス胎生脳組織を対象とした FISH 法により,この環状 DNA 産生ならびに欠失を引き起こす DNA 組み換えを起こす細胞群の同定を試みている.

症例報告

a. 中山 雅晴、酒井 健二、簑田 俊二

「再出血予防に内視鏡的クリップ結紮術が有効と思われた大腸憩室出血の３例」

消化器内視鏡 (2003, in press)

内視鏡的クリップ結紮術は大腸憩室出血に対して有効な治療法である。我々は、さらに近傍にある憩室に対してもクリップ結紮術を追加することで短期的な再出血を予防できる可能性があると思われた３例を経験したため報告した。

b. 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来呈した一例．

内科．第８９巻、 第２号、374-377.

子宮頚癌術後放射線照射による放射線腸炎で回盲部一部切除後７年を経て発症した巨赤芽球性貧血を認めた例を報告し，回盲部の短切除であっても骨盤部放射線照射を行う場合，ビタミン Ｂ１２欠乏による巨赤芽球性貧血に注意して長期の経過観察をする必要性を示した．

c. 鈴木康代、吉川康二、 前田豊樹、岡田全司、鈴木友和．2002.

アスペルギルスによる頭蓋内動脈炎の１剖検例．

大分県医学会雑誌．第２０巻、１号、３２ー３５．

62 歳糖尿病患者でアスペルギルス副鼻腔炎から髄膜脳炎を来たし死亡した症例を報告し，compromised host の副鼻腔炎に続発する神経症状に対してアスペルギルス感染症を念頭に置くよう警鐘を鳴らした．

業績目録

原著論文

1. Bai Y., Soda Y., Izawa K., Tanabe T., Kang X., Tojo A., Hoshino H., Miyoshi H., Asano S. and Tani K. 2003.
Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector.
Gene Therapy. (in press)

2. Kojima,T., Yamazaki,T., Tamura,Y., Ogura,S., Hizawa,N., Yamaguchi,E., Tani,K., Kinoshita,I., Nishimura,M and Dosaka-Akita ,H. 2003.
Tumor-Derived Gp96 Combined with GM-CSF Gene-Transduced Tumor Cells Inhibit Tumor Growth in Mice through Migration and Maturation of CD11c+ Cells.
Human Gene Therapy. (in press)

3. Yoshida Y., Nakamura T., Komoda M., Sato H., Suzuki T., Tsuzuku J.K., Miyasaka T., Yoshida E.H., Umemori H., Kunisaki R.K., Tani K., Ishii S., Mori S., Suganuma M., Noda T. and Yamamoto T. 2003.
Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer
Genes&Development. 17、 1201-1206.

4. Soda Y., Tani K., Bai Y., Saiki M., Chen M., Izawa K., Kobayashi S., Takahashi S., Uchimaru K., Kuwabara T., Warashina M., Tanabe T., Miyoshi H., Sugita K., Nakazawa S., Tojo A., Taira K. and Asano S. 2003(submitted)
A novel Maxizyme vector targeting a *bcr-abl* fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.

5. Maeda, T., Hatakenaka, M., H. Muta, H., Nakayama, M., Nakazaki, Y., Hiroyama, Y., Suzuki, Y. and Tani K. 2004
Clinically mild, atypical, and aged craniofacial syndrome is diagnosed as Crouzon syndrome by identification of a point mutation in the fibroblast growth factor receptor 2 gene (*FGFR2*).
Internal Medicine (in press).

6. Maeda, T., Mutoh, T., Muta, H., Nakayama, M., Nakajima, Y., Ikuta, T.,

Yasuda, M., Etoh, T., Shimizu, K., Nakazaki, Y., Hiroyama, T., Somada, S., Kurita, R., Shiratsuchi, M., Nishimura, J. and Tani, K. 2004
An 85-year-old Japanese female with Ph-1-positive CML with del (5q) successfully treated by intermittent imatinib therapy.
J. Am. Geriat. Soc. (in press).

7. Maeda, T., Shiokawa,S., Yoshikawa, Y., Hiroyama, T., Nakajima, Y., Muta, H., Nakayama,M., Nakazaki, Y., Akizuki, S., Shimizu, K., Mutoh,T., Somada, S., Kurita, R., Shiratsuchi, M., Makino, N., Nishimura, J. and Tani, K. 2004
Successful treatment of pure red cell aplasia of an 88-year-old case with cyclosporin A and erythropoietin after thymectomy.
Haematologica. (in press).

8. Maeda, T., Chijiiwa, Y., Tsuji, H., Sakoda, S., Tani, K and Suzuki, T. 2004
Somatic DNA recombination yielding circular DNA and deletion of a genomic region in embryonic brain.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press).

9. Kurita R, Sagara H, Aoki Y, Link BA, Arai K, Watanabe S. 2003.
Suppression of lens growth by alphaA-crystallin promoter-driven expression of diphtheria toxin results in disruption of retinal cell organization in zebrafish.
Dev Biol. 255, 113-27.

10. Kurita R, Tabata Y, Sagara H, Arai K, Watanabe S. 2004 .
A novel smoothelin-like, actin-binding protein required for choroidal fissure closure in zebrafish.
Biochem Biophys Res Commun. 313, 1092-100.

11. 前田　豊樹.　2003.

GTP シクロヒドロラーゼ I 欠損症の遺伝子治療の基礎研究.

Progress in Medicine ,　23: 2788-2793.

総説

1. 谷　憲三朗. 2003.

遺伝子治療と細胞療法.

最新医学、58、64-75.

著書

1. 前田豊樹、谷　憲三朗. 2003.

分子生物学イラストレイテッド(田村隆明、山本雅編) pp.361-371

羊土社、東京

学会発表

1. Tani K. (2003.2.14)
Development of Nnovel Molecular Therapy Targeting Philadelphia Positive Acute Lymphocytic Leukemia.
NCI-JSPS Conference Program, Maui.

2．前田豊樹 .(2003 , 4 / 19) .

GTP シクロヒドロラーゼ I 欠損症の遺伝子治療の基礎研究 .

第 11 回カテコールアミンと神経疾患研究会 .

3. 別府良人、長谷英徳、中崎有恒、谷憲三朗 (2003, 7/10-11)

GM-CSF 遺伝子導入抗腫瘍動物モデルの腫瘍拒絶時におけるケモカインの役割とその抗腫瘍効果

第 40 回日本臨床分子医学会学術総会、東京

4. Yukoh Nakazaki, Yoshihito Beppu, Hidenori Hase, Kenzaburo Tani (2003, 7/31-
8/1)
The role and the efficacy of chemokines preferentially expressed in rejecting mouse tumor.
The 23rd Summer Seminar, Sapporo Cancer Seminar, Sapporo

5. 橋口　隆生、中崎　有恒、谷　憲三朗 (2003, 12/10-13)

GM-CSF 免疫遺伝子治療を受けた腎細胞がん患者における SEREX 抗原の探索

第 26 回日本分子生物学会年会、神戸

6. Kurita ,R. Sasaki,E. Hiroyama,T. Nakazaki ,Y. Izawa ,K. Ishii,H. Tanioka , Y. Hanazawa , K. Osonoi ,M. Hashiguchi ,T. Yuan-Son B. Soda, Y. Xiao J. Watanabe , S. Asano,S. and Tani,K.(2004.6.)
Hematopoietic Cell Differentiation of Common Marmoset (Callithrix jacchus) Embryonic Stem Cells and Their Genetic Manipulation Using the Third Generation Lentiviral Vector.
American scciety of gene therapy (ASGT) 7th Annual Meeting

所員名簿

教　授	谷　憲三朗
助　手	牟田　浩実
	中崎　有恒
	久野　晃聖
	中山　雅晴
	末廣　陽子
ﾘｻｰﾁｱｿｼｴｲﾄ	栗田　良
	田中　智子
大学院生	阪口　岳
	井上　博之
	橋口　隆生
	高野　扶弓
	横尾　朋子
医員	杣田　真一
	生田　卓也
技能補佐員	楠本　裕恵
事務補佐員	松鶴　陽子
	杉　真紀

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．平成１５年度は，教授，和氣徳夫，講師，加藤秀則，加藤聖子，助手，有馬隆博，松田貴雄の教官のほかに，一戸晶元，上木原哲也，井上貴史の各医員，浅野間和夫大学院生，学外留学生の須賀 新，産学連携研究員の山吉麻子で教室を構成した．

Ａ．造腫瘍能抑制効果をもつ NECC1 遺伝子の胎盤形成における働き

（浅野間和夫，加藤秀則，井上貴史，松田貴雄，和氣徳夫）

【目的】

NECC1 遺伝子はヒトにおいて絨毛癌細胞株の造腫瘍能を抑制する．Necc1 遺伝子の胎盤形成における機能についてノックアウトマウスとラット細胞株を用いて解析する．

【方法】

（１）ジーン・ターゲティングにより Necc1 遺伝子のコーディング領域を潰した

129/SvEv×129/SvEv または 129/SvEv×C57BL6/J の 2 系列の変異マウスを解析した．様々な胎齢の胎盤構造を in situ hybridization をもちいて解析した．

（２）ラット絨毛癌細胞株 Rcho-1 に Necc1 遺伝子を強発現させて，分化誘導を行い分化が抑制されるか観察した．解析は形態観察，トリプシンテスト，FACscan を用いた．

【成績】

（１）Necc1 変異胚の胎盤は E9.5 において海綿状栄養膜細胞層，栄養膜迷路層の形成不良を認め栄養膜巨細胞層の過形成を認めた．この傾向は E10.5，E11.5 と胎齢が進むにつれて顕著になり胎児の発育不良も認めた．

（２）Necc1 変異胚の胎盤には Cdx2 陽性細胞が少なく，栄養膜幹細胞の減少が示唆された．

（３）Necc1 強制発現 Rcho-1 細胞は分化誘導に抵抗性を示した．Necc1 は Rcho-1 細胞の分化を抑制することが示唆された．

【結論】

（１）Necc1 はマウスにおいて海綿状栄養膜細胞層，迷路層の発生及び構築に関与する．栄養膜幹細胞の維持にも関わることが示唆された．

（２）Necc1 は栄養膜幹細胞から栄養膜巨細胞への分化を抑制することが示唆された．

Ｂ．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ダイソミー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．今回こ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，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．

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どの様な経路で遺伝子発現調節をしているかを明らかにする．

２）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．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．

Ｃ．p21 による癌細胞死誘導能の解析

（井上貴史，浅野間和夫，松田貴雄，加藤秀則，和氣徳夫）

【目的】

CDK インヒビターである p21 の発現は細胞老化に重要な役割を果たす．一方，ヒト癌の多くで p53 の機能が不活化され，p21 発現が抑制されている．また細胞死に関与する pRb，p16 の経路にも変異が多い．本研究は，p21 の機能が障害された癌細胞株において p21 を外来性に発現させ細胞死誘導能を解析することで，p21 の関与する細胞老化機構を解明することを目的とした．

【方法】

１）癌細胞株 Hela，HHUA，SKOV，DLD1，Lovo，HCT116 で pRb，p53，p21，p16 の発現および機能をウエスタンブロット法および RT-PCR 法で解析した．

２）野生型ヒト p21cDNA，p21 の CDK 結合領域のみからなる欠失変異体

（p21delPCNA）および PCNA 結合領域からなる欠失変異体（p21delCDK）を，それぞれの細胞株にトランスフェクトした．

３）それぞれの細胞株における p21 の発現状態をウエスタンブロット法，細胞周期変化を FACS 法，老化死誘導能をβ -gal 染色で解析した．

【成績】

１）すべての細胞株において，野生型および p21delPCNA をトランスフェクトさせた場合にのみ細胞死が認められ，pRb，p53，p21，p16 による細胞死誘導との関与は認めなかった．

２）p21 発現に伴い，SKOV，HHUA， DLD1，Lovo は多核化し，β -gal 染色陽性となったため，細胞老化死の誘導が示唆された．Hela，HCT116 では核の断片化，FACS 法による subG1 への集積を認めたため，アポトーシス誘導が示唆された．

【結論】

１）p21 による細胞死誘導には，CDK 結合領域もしくはその近傍ドメインが関与し，PCNA 結合領域は関与しない．

２）p21 は，p53，p16，pRb 非依存性に細胞死を誘導する．

３）p21 は細胞型の相違により，細胞老化あるいはアポトーシスのいずれかを選択する．

Ｄ．子宮内膜幹細胞同定の試み

（加藤聖子，須賀新，一戸晶元，山吉麻子，上木原哲也，有馬隆博，和気徳夫）

【目的】

月経毎に周期的に再生される子宮内膜には幹細胞の存在が示唆される．組織幹細胞の同定には Hoechst33342 の取り込みの低い分画の細胞（side population cells, 以下 SP 細胞）を分離する方法が用いられる．この方法を用いて子宮内膜 SP 細胞を分離しその生物学的特性を解析した.

【方法】

１）同意を得た患者の摘出子宮より正常子宮内膜を採取し,上皮と間質細胞に分離後 Hoechst33342 で染色した. FACS で SP 細胞を分離し，サイトカインを含む培養液で collagen dish, feeder cell や matrigel 上に培養した.

２）長期培養 SP 細胞の CD9, E-cadherin,CD13,Vimentin の発現を Western blot 法や免疫染色で解析し正常子宮内膜の発現と比較した.

【成績】

１)解析した 20 例中 7 例に,上皮のみ 2 例，間質のみ 2 例,両方 3 例に SP 細胞が存在した．全細胞数に対する割合は 0.01-0.3　%であった.

２）SP 細胞は SCF,IL-6, TPO 存在下で増殖した. collagen dish 上より feeder cell 上の方が増殖する確率は高かった. SP 細胞を直接 matrigel に撒いても増殖しなかった.

３）collagen dish 上で長期培養した SP 細胞は，形態学的に間質細胞に類似し，正常子宮内膜間質で発現している CD13, Vimentin が陽性，正常子宮内膜上皮で発現している CD9, E-cadherin が陰性であった. feeder cell 上で長期培養した SP 細胞はコロニー上に増殖し，その細胞集団を collagen dish 上に撒き直すと腺管構造を呈し, CD9, E-cadherin 陽性であった.

【結論】

１）子宮内膜には SP 細胞が存在する.

２)SP 細胞を長期培養すると子宮内膜上皮あるいは間質類似の特性を示したため, SP 細胞が子宮内膜の幹細胞或いは前駆細胞である可能性が高いことが示唆された.

Ｅ．HIF1 シグナル伝達系と子宮内膜癌細胞老化誘導との関連

（加藤秀則　井上貴史，浅野間一夫，松田貴雄，和気徳夫）

【目的】多くのヒト癌では低酸素で誘導される代表的な転写因子である HIF(Hypoxia Inducible Factor 1)が過剰発現しており，解糖系の亢進，血管新生を

はじめ腫瘍細胞の生存に有利に働いていると考えられる .子宮内膜癌細胞での HIF 活性化の機構を探るとともにこのシグナルを抑制した場合の変化について解析する．

【方法】

１）HIF1 を水酸化する酵素である EGLN1 とこれを認識してユビキチン化し分解を誘導する酵素である VHL の発現と遺伝子変異について子宮内膜癌細胞株 7 株を用いて RT-PCR，ウエスタンブロット(WB)，蛍光シークエンサーにて検討した．

２）HIF を不活化するために EGLN1 または FIH(HIF1 の転写を競合阻害する因子)を内膜癌細胞株 HHUA および Ishikawa に強制発現させ，またさらに HIF1 の発現阻害をする SiRNA を添加し細胞増殖の変化を観察した．

３）２）の変化に関連すると思われるシグナル蛋白の動態を WB にて検討した．

【成績】

１）全ての細胞株で VHL の発現は保たれていたが 7 株中 6 株で EGLN1 のアミノ酸構造の変化を伴う遺伝子変異または発現の消失が見られた .子宮体癌症例でも約２５％に変異が見られた．

２） EGLN1 または FIH の導入では HIF1 の発現が消失し，細胞が扁平化，多核化しβ -gal 染色陽性でテロメラーゼ活性が抑制されていることより細胞老化死が誘導されていると考えられた．SiRNA を添加でも同様のことが観察された．

３)老化死の誘導に伴い p21 のみが誘導されており p14,p16,p53,Rb などの細胞死誘導に関連する因子には変化がなかった．

【結論】

子宮内膜癌細胞で発現が亢進している HIF1 の抑制は p21 の発現誘導を伴い細胞老化死を誘導する．癌細胞での HIF1 の高発現は細胞死を回避する方向に働いており，抗癌剤感受性を規定する一つの因子となる可能性があり，さらに新しい分指標的となる得ることも示された．

Ｆ．胞状奇胎発生に関与する遺伝子群

（加藤秀則，井上貴史，浅野間和夫，松田貴雄，和気徳夫）

【目的】

胞状奇胎は精子のみの雄核発生から成り立ち，正常受精胚と異なり胎児部分を有さず水腫化した絨毛組織のみからなり立つ．この発生機構を解明することは正常胎盤の発生機構を解明する一助となり，また母親刷り込み遺伝子の機能を考える上にも役立つ．

【方法】

正常胎盤絨毛と胞状奇胎絨毛より RNA を抽出し Cy3, Cy5 でラベルした後，

Incyte 社製マイクロアレイスライドを用いて発現プロファイルを検討した．

【成績】

１）胞状奇胎絨毛で特徴的に発現の消失しているものは IGFBP, TSSC3, LIM/homeogene などであった．母親刷り込み遺伝子は理論的には全て発現がないはずであったが，消失していたのは TSSC3 のみであった．

２）一方，胞状奇胎絨毛で特徴的に発現の上昇しているものは GRO2, CTGA1 などの癌関連遺伝子であった．

３）細胞骨格蛋白もあるものは有為に発現低下し，またあるものは上昇していた．

【結論】

　これらの変化は絨毛の旺盛な増殖と水腫化を起こす胞状奇胎の病理学的特徴の背景となるものと考えられた．またインプリント遺伝子の中でも TSSC3 のみは有意に発現が消失しており，これらの抗体を作製し，正常絨毛と奇胎の鑑別に有用かどうかを免疫染色を用いて検討している．

Ｇ．インプリント遺伝子 ZAC の卵巣癌抑制機構の解析

（上木原哲也，有馬隆博，加藤聖子，須賀新，一戸晶元，山吉麻子，和氣徳夫）

【目的】

インプリント遺伝子の異常が腫瘍形成に関与する事が知られている．卵巣癌でLOHの頻度の高い6番染色体(6q24)上にマップされるインプリント遺伝子ZACは卵巣癌細胞株及び摘出卵巣癌組織で著明な発現低下を認め,その発現調節にはプロモーター領域のDNAのメチル化が関与する．本研究ではZACの卵巣癌抑制の分子メカニズムについて解析した．

【方法】

１）テトラサイクリンによりZACの発現を制御できる卵巣癌細胞株を樹立した．

２）ZAC強制発現細胞の細胞増殖特性及び造腫瘍能を解析した．

３）ZACを導入した細胞株(野生型p53，変異型p53)を用い，アポトーシス誘導能を細胞周期分布(FACS)及び免疫染色法を用い検討した．さらにアポトーシス関連蛋白はWestern　blot法にて比較した．

４）脱メチル化剤及び脱アセチル化阻害剤を用いZAC遺伝子発現量と表現型の変化について解析した．

【成績】

１）ZACの発現亢進に伴い細胞増殖抑制と造腫瘍能抑制を認めた．

２）ZACの発現はp53非依存性にSubG1期に細胞集積を認め，免疫染色法でもアポトーシスを誘導する事が判明した．またカスパーゼ8及び9阻害剤でZACによ

るアポトーシスが回避された事から，2つのカスパーゼ経路はZACの下流で機能する事が示唆された．

３）5-AzaC及びTSA投与のいずれにおいてもZACの発現回復を認め，その併用で更に発現の増強を認めた事よりZACの発現調節にはDNAメチル化及びヒストン脱アセチル化が関与した．

【結論】

１）インプリント異常によるZACの不活化は卵巣癌細胞にアポトーシス回避を賦与する．

２）ZACはp53非依存性にカスパーゼ8,9から構成される経路でアポトーシスを誘導する．

３）インプリンティングの再構築をターゲットとした新たな卵巣癌分子標的治療の有用性が示唆された．

H.婦人科癌におけるRas/ERα/MDM2経路を標的にした癌治療法開発の試み

（須賀新，加藤聖子，山吉麻子，一戸晶元，有馬隆博，和氣徳夫）

【目的】

Rasを介する造腫瘍能獲得機構には ,ERα /MDM2/p53シグナル伝達が関与する．そこで，子宮体癌，卵巣癌細胞株を用いて，Ras/ERα /MDM2 経路を制御する手段を開発することにより，婦人科癌における分子標的治療への応用を試みた．

【方法】

１）子宮体癌細胞株（Hec6,HHUA），卵巣癌細胞株（KK,PA-1,KF,SKOV,MCAS,KM）を用いた．

２）各癌細胞株の ERα ,MDM2 の発現を Western blot 法で解析した．

３） MDM2siRNA を作成，形質導入し，増殖能や MDM2 の発現の変化について検討した．

４）ERα 機能を MEK 阻害剤，抗エストロゲン剤で抑制し，増殖能，MDM2 発現量の変化について検討した．

５）ER 応答配列を含む luciferase 発現 vector を用いて ,luciferase reporter assay を行った．

【成績】

１）細胞株に MDM2,ERα の発現を認めた．

２）正常子宮内膜細胞，不死化卵巣上皮細胞と比べ，8 株中 4 株に有意な MDM2 の発現増加を認めた．

３）MDM2siRNA 投与により，正常子宮内膜と比較し，MDM2 過剰発現癌細胞株全てで，細胞増殖抑制が認められた．

４）MDM2 過剰発現株は，MEK 阻害剤，抗エストロゲン剤同時投与により，全株で MDM2 発現が減少し，細胞増殖能が抑制され，また全株で細胞老化の誘導を認めた．

５）薬剤投与による ER の転写活性抑制が認められた．

【結論】

１）SiRNA による MDM2 の発現抑制は，癌細胞の増殖能を抑制した．

２）MDM2 を過剰発現する子宮体癌･卵巣癌細胞において MEK 阻害剤及び抗エストロゲン剤投与は，MDM2 発現ならびに細胞増殖能を抑制し，細胞老化を誘導した．

３）Ras/ER/MDM2 シグナル伝達の制御は，ヒト癌細胞増殖を抑制し，癌の分子標的療法への応用の可能性が示唆された

Ｉ．HTF12 及び関連遺伝子の絨毛癌細胞増殖抑制効果の検討

（松田貴雄，浅野間和夫，井上貴史，加藤秀則，和氣徳夫）

【目的】

7q11.21 領域に存在する HTF12 遺伝子は絨毛癌細胞株に導入するとその増殖を抑制する．この遺伝子はクルッペル関連ボックスと Zn フィンガードメインを有する ZNF 遺伝子ファミリーに属する．選択的スプライシングによって 3 つのサイズの mRNA が存在する．正常絨毛細胞で発現している mRNA は HTF12-1 で cDNA ライブラリーのスクリーニングにより得られた mRNA は HTF12-2 で癌細胞に導入することによって増殖抑制効果が認められる．

【方法】

cDNA ライブラリーよりスプライシング変異（HTF12-1，2，3）を得て，これらをそれぞれ絨毛癌細胞株 CC1 に導入して絨毛癌細胞の増殖に対する効果を検討する．類似の構造を有する遺伝子をデータベースより検索し，単離して導入を行い，その効果を確認する．

データベース　ホモロジーサーチにより類似遺伝子をリストアップする .これに対してオリゴプローブ作成を行い，cDNA ライブラリーより単離し，細胞株に導入を行う．

【成績】

１）HTF12-1，2，3 のプロモーターはそれぞれ配列が異なった．

２）CC1 細胞に分化を誘導するフォルスコリンを添加すると同様の細胞形態の変化が認められるが，HTF12-2 の発現は認められなかった．

３）データベース検索により，HTF12 関連遺伝子としてクルッペル関連ボックスと Zn フィンガードメインを有する遺伝子は多数存在することがわかった．特に HTF12 と類似する遺伝子は第１９番染色体上にクラスター形成していた．

４）HTF12 遺伝子以外の類似遺伝子の導入によっては，絨毛癌細胞株 CC1 の増殖抑制効果は認められなかった．

【結論】

HTF12-2 は絨毛の合胞体化を促進するフォルスコリンによって発現が増加するが，その作用とは異なる作用で絨毛癌細胞の増殖を抑制する事が示唆された．選択的スプライシングで Zn フィンガードメインの数が異なるが，絨毛癌細胞の増殖抑制には関係しないと考えられた．HTF12 関連遺伝子はデータベースより，ヒト第１９番染色体上にもクラスターを形成して存在するが，いずれも絨毛癌に対する効果は，認められなかった．HTF12 遺伝子は類似遺伝子の中で最も単純な構造を示すが，絨毛癌に対して得意な細胞増殖抑制効果を示すと考えられた．

Ｊ．子宮頚癌に対する光架橋型アンチセンス分子標的療法

（山吉麻子，加藤聖子，須賀　新，一戸晶元，上木原哲也，有馬隆博，和氣

徳夫）

ヒトゲノムプロジェクトが DNA のドラフトシーケンスを明らかにした現在，遺伝子の効果的なノックアウト法開発は多くの難治性疾患の治療に繋がると期待される .核酸及びその誘導体は標的遺伝子を選択的にノックアウトするツールとして注目されており，近年，精力的に研究されている．我々は光架橋性分子であるソラレンを導入したアンチセンス DNA（Ps-S-Oligo）を作成し，ヒトパピローマウィルス（HPV） E6 癌遺伝子発現の選択的抑制手段の開発，及びそれに伴う，アポトーシス誘導を介した新規治療手段の有効性を評価した．

アンチセンス DNA 単独の場合には効果がみられなかったが，ソラレンをアンチセンス DNA に導入した Ps-S-Oligo は，細胞増殖を顕著にした．またその時，標的 E6 mRNA 量は減少することを RT-PCR により確認した .細胞増殖抑制はアポトーシスの誘導に起因していた .Ps-S-Oligo はヌードマウスでの造腫瘍性も抑制した．

以上をまとめると，①アンチセンスオリゴ DNA にソラレンを導入することで，アンチセンス分子としての高機能化に成功した．②本法は，子宮頚癌細胞特異的にアポトーシスを誘導できる有効な治療手法になり得る可能性が示唆された．

業績目録

原著論文

1 Asanoma K, Matsuda T, Kondo H, Kato K, Kishino T, Niikawa N, Wake N, Kato H. 2003.
NECC1, a candidate choriocarcinoma suppressor gene which encodes homeodomain consensus motif.
Genomics 81, 15-25.

2 Ueoka Y, Kato K and Wake N. 2003.
Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via Ras mediated pathway.
Molecular and cellular endocrinology, 202, 80-88.

3 Yamayoshi A, Kato K, Iwase R, Yamaoka T, Wake N and Murakami A. 2003.
Photodynamic antisense therapy: regulation of cervical carcinoma cells by psoralen-conjugated oligonucleotides.
Nucleic Acid Research Supplement, 3, 75-76.

4 Matsuda T, Wake N. 2003.
Genetics and molecular markers in gestational trophoblastic disease with special reference to their clinical application.
Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology, 17, 6, 827-836.

5 Ichinoe A, Behmanesh M, Tominaga Y, Ushijima Y, Hirano S,Sakai Y, Tsuchimoto D, Sakumi K, Wake N, and Nakabeppu Y. 2004.
Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts.
Nucl. Acids. Res. 32: 477-487.

6 Hatakenaka M, Yoshimitsu K, Adachi T, Matsuda T, Wake N, Honda H.2004.

Transient uterine myometrial contraction associated with moles.
J Magn Reson Imaging. 19(2):182-187.

7 Soma H, Okada T, Yoshinari T, Furuno A, Yaguchi S, Tokoro K, Kato H. 2004
Placenta site trophoblastic tumor of the uterine cervix occurring from undetermined antecedent pregnancy.
J. Obstet. Gynaecol. Res. 30, 2, 113-116.

総説

1 加藤圭次，加藤聖子. 2003

I 生殖内分泌　プロゲステロン受容体の分子生物学

産婦人科の世界 55, 42-46.

2 松田貴雄，和氣徳夫. 2003

II 腫瘍　絨毛癌発生の分子機構

産婦人科の世界 55, 133-139.

3 須賀　新，加藤聖子，和氣徳夫. 2003

臨床遺伝子学’03− がんのジェネティクス− 各論　子宮がんとジェネティクス

最新医学　58，2380-2391.

4　　松田貴雄，吉河康二．　2003

多型解析を用いた筋ジストロフィーの保因者診断，出生前診断〜着床前診断を念頭においた分子遺伝学的検査法の選択

産婦人科の実際・今日の話題　52, 9, 1321-1325.

著書

1　　加藤聖子，和氣徳夫.2003

婦人科腫瘍

看護のための最新医学講座　31　医学と分子生物学（中山書店）372-378.

2　　Kato K and Wake N.2003

Contribution of estrogen receptor α and progesterone receptor-B to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation.
Cell and Molecular Biology of Endometrial Carcinoma

（Springer-Verlag Tokyo 2003）, 207-218.

3　　榎本隆之，和氣徳夫.2004

第 9 章分子生物学

婦人科腫瘍の臨床病理，メディカルビュー，298-311　総ページ数 362.

学会発表

1　Kato H, Asanoma K, Matsuda T, Wake N (2003/2/18) .

NECC1 as a choriocarcinoma suppressor gene.

Southwest Medical center , Texas Dallas , USA.

2　Asanoma K , Kato H, , Matsuda T, Wake N (2003/2/18) .

NECC1 involved in trophoblastic cell development.

Southwest Medical center , Texas Dallas , USA.

3　和氣徳夫 (2003/3/13-14) .

絨毛性疾患の発生機序について

平成 14 年度国立遺伝学研究所研究会「エピジェネティックスの分子機構と疾患」, 静岡.

4　和氣徳夫 (2003/4/4-6) .

子宮がんに対するゲノム創薬

第 26 回日本医学会総会 , 福岡.

5　加藤秀則 , 浅野間和夫 , 近藤晴彦 , 松田貴雄 , 和気徳夫 (2003/4/12-15) .

ORF12 遺伝子の子宮内膜癌老化誘導能の検討

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会，福岡.

6　加藤聖子　高橋晃　上岡陽亮　上木原哲也　有馬隆博　和気徳夫

（2003/4/12-15）.

活性化型 K-Ras を介する造腫瘍能獲得機構における Estrogen Receptor a

の役割の解明と分子標的治療への応用

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会，福岡.

7　松田貴雄，浅野間和夫，近藤晴彦，加藤秀則，和氣徳夫（2003/4/12-15）.

HTF12 スプライシング変異遺伝子の絨毛癌細胞増殖抑制効果の検討」

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会，福岡.

8　有馬隆博，上木原哲也，高橋晃，上岡陽光，加藤聖子，和気徳夫

（2003/4/12-15）.

悪性卵巣腫瘍におけるゲノムインプリントの機構の破綻について

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会，福岡.

9　上岡陽亮，加藤聖子，高橋晃，上木原哲也，有馬隆博，和氣徳夫

（2003/4/12-15）.

Matrix metalloproteinase (MMP) の活性化における ras を介するシグナル伝達経路の関与

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会，福岡.

10　上木原哲也，有馬隆博，加藤聖子，上岡陽亮，高橋　晃，和氣徳夫（2003/4/12-15）

卵巣癌におけるインプリント遺伝子 ZAC の癌抑制機能とその発現調節機構について

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会，福岡

11　浅野間和夫，松田貴雄，加藤秀則，和氣徳夫（2003/4/12-15）.

絨毛癌の癌化抑制および絨毛分化に関わる新規候補遺伝子 NECC1 の解析

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会，福岡.

12　高橋　晃，加藤聖子，上岡陽亮，上木原哲也，有馬隆博，和氣徳夫（2003/4/12-15）.

cAMP による Progesterone Receptor B の発現制御と癌治療への応用

第 55 回日本産科婦人科学会学術講演会，福岡.

13　加藤聖子，須賀　新，上木原哲也，有馬隆博，和氣徳夫（2003/4/26）.

細胞増殖制御における GnRH antagonist の作用機構

第 10 回 GnRH 研究会，福岡.

14　上木原哲也，有馬隆博，加藤聖子，高橋　晃，上岡陽亮，須賀　新，和氣徳夫（2003/5/16-18）.

タモキシフェン服用及び抗うつ剤に起因すると思われる子宮体癌症例

第 60 回日本産婦人科学会九州連合地方部会，第 54 回日本産婦人科医会九州ブロック会，鹿児島.

15　加藤聖子，和氣徳夫（2003/6/2-3）.

細胞増殖抑制機構における Progesterone receptor-B の役割の解明と婦人科癌治療への応用

第 7 回がん分子標的治療学会，東京.

16　須賀　新 ,加藤聖子 ,上木原哲也 ,有馬隆博 ,吉河康二 ,和氣徳夫(2003/7/6).

診断に難渋した carcinofibroma の一例

平成 15 年度日本産科婦人科学会大分地方部会・ 日本母性保護産婦人科医会大分大分県支部　学術講演会，大分.

17　加藤秀則（2003/7/10〜12）.

絨毛癌発生に関与する特異な遺伝子変化について

第 34 回日本婦人科腫瘍学会学術集会，京都.

18　和氣徳夫（2003/8/24）.

悪性腫瘍に対するゲノム創薬のトライアル

岐阜ホルモンと婦人科疾患研究会，岐阜.

19　須賀　新，加藤聖子，上木原哲也，有馬隆博，和氣徳夫（2003/9/4-5）.

婦人科癌における Ras/ERα /MDM2 経路を標的にした癌治療法開発の試み

第 12 回産婦人科分子内分泌懇話会，名古屋.

20　和氣徳夫（2003/9/6-7）.

胞状奇胎− 現状の問題点とゲノム研究への応用

第 54 回日本産科婦人科学会広島地方部会，特別講演会，広島.

21　須賀　新，加藤聖子，上木原哲也，有馬隆博，和氣徳夫（2003/9/9-7）.

婦人科癌における Ras/ERα /MDM2 経路を標的にした癌治療法開発の試み

第 4 回ホルモンと癌研究会，筑波.

22　Asako Yamayoshi, Kiyoko Kato, Reiko Iwase, Tetsuji Yamaoka, Norio Wake and Akira Murakami.（2003/9/17-19）.

Photodynamic antisense therapy: regulation of cervical carcinoma cells by psoralen-conjugated oligonucleotides.

第 3 回国際核酸化学シンポジウム，北海道.

23　加藤聖子，和氣徳夫（2003/9/25-28）.

細胞増殖機構における Progesterone receptor-B の役割の解明と癌治療への応用

第 62 回日本癌学会総会，名古屋.

24　K. Asanoma, T. Matsuda, H. Kato, H. Kondo, T. Inoue and N. Wake（2003/9/28-10/1）.

Analysis of a candidate gene which is associated with growth

suppression of choriocarcinoma and differentiation of trophoblasts. XIIth World congress on gestational trophoblastic diseases, Sheraton Boston Hotel, Boston, MA.

25 和氣徳夫（2003/10/29）.

絨毛細胞の発生，分化，癌化の分子機構

久留米大学大学院特別講演会，福岡.

26 加藤秀則（2003/11/20-21）.

多型マーカーによる PSTT3 症例の発生起源の解析

第 20 回日本絨毛性疾患研究会　第 11 回日本胎盤学会学術集会，東京.

27 浅野間和夫，加藤秀則，井上貴史，松田貴雄，和氣徳夫（2003/11/20-21）.

絨毛癌抑制および絨毛分化に関わる NECC1 の解析

第 20 回日本絨毛性疾患研究会　第 11 回日本胎盤学会学術集会，東京.

ゲノム創薬・治療学分野

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
医員	上木原哲也
〃	井上貴史
〃	一戸晶元
研究生	二宮ユミ子
大学院生	浅野間和夫
学外留学生	須賀新
産学連携研究員	山吉麻子
研究補助員	蟻川内愛子
〃	蜂須裕子
〃	星野文子
〃	西村知恵

〃　　足　立　佐和子

〃　　上　田　恭　子

〃　　宮　成　洋　子

発生工学分野

Division of Embryonic and Genetic Engineering

発生工学分野は、2001 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。 2003 年1 月1 日付けで東北大学大学院医学研究科教授となり、その後非常勤職員として務めていた中山啓子は、2003年11月1日付けで東北大学専任となった。2003年12月1日付けで、大阪大学微生物病研究所より竹田潔が教授として赴任した。谷内一郎助手は、2004年2月1日付けで助教授となった。2003年11月1日からは、技術員として室井佐和子と秋山かおりが参画した。2004年3月1日付けで、理化学研究所・横浜研究所の研究員であった桑田啓貴が助手として参画し、本格的に新たな研究分野としてのスタートをきった。また、2004年3月1日からは、倉田真弓が事務補佐員として参画してくれた。

当分野では、ノックアウトマウスの作製を通じて、免疫系、特に自然免疫系の生体防御における生体レベルでの機能を解析している。なかでも (1) Toll-like receptor (TLR)による病原体の認識機構とそのシグナル伝達機構、(2)自然免疫系の異常活性化により発症する慢性炎症性腸疾患の発症機構、(3)自然免疫系に属するマクロファージの活性制御機構を中心に研究している。

A. TLRによる病原体の認識機構とそのシグナル伝達機構

a. TLR を介した MyD88 非依存性シグナルの分子機構の解析

これまでにノックアウトマウスの解析から TLR ファミリーの各メンバーが、病原体の構成成分を特異的に認識することにより、病原体の生体内侵入を察知することを明らかにしてきた。さらに、TLR を介した細胞内シグナルでは、MyD88 を介したシグナルが、すべての TLR ファ

ミリーを介した炎症性サイトカインの産生に必須であることを明らかにしてきた。しかしながら同一の細胞においても病原体成分ごとにその最終的な遺伝子発現のパターンが異なる。実際、MyD88 がすべての TLR を介した炎症性サイトカインの誘導に必須であるが、TLR3, TLR4 を介したシグナルでは MyD88 非依存性のシグナルが存在し、IRF-3 の活性化を通じて IFN-β、IFN 誘導性遺伝子が誘導される。MyD88 と同じ TIR ドメインを有する第二のアダプターTIRAP は、ノックアウトマウスの解析から TLR2 と TLR4 を介した MyD88 依存性のシグナルに特異的に関与していることを明らかにした。そこで、MyD88 非依存性の経路にも、TIR ドメインを持つ分子が重要な役割を担っているのではないかと予想し、まず TIR ドメインを持つ分子をデータベースから検索した。その結果、第 3 の TIR ドメインを持つアダプターとして TRIF を同定した。TRIF を 293 細胞に発現させると、MyD88 や TIRAP を発現させたときと異なり、IFN-β プロモーターの活性化を強く誘導した。このことから、この遺伝子を TIR domain-containing adaptor inducing IFN-βにちなんで TRIF と名付けた。また TRIF が MyD88, TIRAP と異なり MyD88 非依存性の IFN-β誘導のシグナルに関与していることが示唆された。そこで、TRIF の生理機能を解析するため、ノックアウトマウスを作製した。TRIF ノックアウトマウスは、TLR3 刺激に対する応答性が顕著に障害されていた。さらに TLR4 刺激による IFN 誘導性遺伝子の発現も顕著に障害されていた。また、TLR3, TLR4 刺激による IRF-3 活性化が障害されていた。一方、TLR4 刺激による MyD88 依存性のシグナルの活性化(IRAK1 のリン酸化誘導)は障害されていなかった。このことから、TRIF が MyD88 非依存性のシグナル伝達活性化に必須のアダプターであることが明らかになった。また、TRIF ノックアウトマウスでは、他の TLR 刺激と異

なり、TLR4 刺激による炎症性サイトカインの産生が認められなかった。このことから、TLR4 を介した炎症性サイトカインの誘導は、MyD88 依存性のシグナルだけでなく、MyD88 非依存性/TRIF 依存性のシグナルも必要であることが示された。

b. MyD88 非依存性/TRIF 依存性シグナルの特異性を規定する分子機構の解析

MyD88, TIRAP, TRIF以外のTIRドメインを持つ分子をデータベース上で検索し、第４のアダプターとしてTRAMを同定した。TRAMのTIRドメインが、TRIFのTRIドメインと最も似ていることから、TRIF-related adaptor moleculeと名付けた。そしてTRAMの生理機能を、ノックアウトマウスを用いて解析した。TRAMノックアウトマウス由来の細胞は、TRIFノックアウトマウスと同様にTLR4刺激による炎症性サイトカインの産生、およびIFN-β、IFN誘導性遺伝子の誘導、IRF-3の活性化が認められなかった。しかし、TRIFノックアウトマウスと異なりTLR3刺激によるIFN-β、IFN誘導性遺伝子の誘導、IRF-3の活性化は正常であった。この結果は、第４のアダプターTRAMが、MyD88非依存性/TRIF依存性のシグナルの中で、TLR4を介したシグナルに特異的に関与していることを示している。

B. 自然免疫系の異常活性化により発症する慢性炎症性腸疾患の発症機構

これまでに、通常の遺伝子欠損マウスが胎生致死となるSTAT3の機能を、マクロファージで特異的に欠失させると、IL-10の作用が消失しマクロファージは異常活性化を示すことを明らかにした。さらに、このSTAT3変異マウスは、強いTh1反応を示し、IL-10欠損マウスと同様に慢性腸炎を発症した。このことから、マクロファージでのIL-10によるSTAT3活性化が、マクロファー

ジの機能抑制、さらには慢性炎症の抑制に必須であることを明らかにした。そこで、STAT3変異マウスで発症する慢性腸炎が、どのような因子により引き起こされるかを生体レベルで解析した。まず、マクロファージ活性化に必須のIFN-γのシグナル伝達分子STAT1とSTAT3の二重変異マウスを作製した。このマウスでは、IFN-γの作用が消失しているにも関わらず慢性腸炎を発症した。他に炎症を引き起こすサイトカインとしてTNF-αやIL-12p40が知られている。そこで、これらのサイトカインとSTAT3の二重変異マウスを作製した。TNF-α/STAT3二重変異マウスでは、STAT3単独変異マウスと全く同様に慢性腸炎を発症した。一方、IL-12p40/STAT3二重変異マウスでは、Th1反応が軽減され、慢性腸炎が発症しなくなった。さらに、B, T細胞の欠損するRAG2欠損マウスとSTAT3変異マウスを交配したところ、この二重変異マウスでも、慢性腸炎の発症が抑制された。このことから、慢性腸炎の発症にはマクロファージ系細胞からの過剰なIL-12p40産生が、強力なTh1反応を生体レベルで誘導することが大きな要因であることが明らかになった。さらに、STAT3の非存在下では、いかなる機構でマクロファージが異常活性化にいたるかを検討した。マクロファージ系細胞は、TLRファミリーが病原体構成成分を認識することにより活性化される。そこで、リポ多糖を認識するTLR4との二重変異マウスを作製した。TLR4/STAT3二重変異マウスでは、慢性腸炎の発症が優位に抑えられ、Th1反応も軽減されていた。この結果は、STAT3欠損マクロファージでは、TLR4を介したシグナルにより異常活性化状態になり、慢性炎症の引き金になることを示している。このように、自然免疫系の異常活性化による慢性腸炎発症の段階的分子機構を生体レベルで明らかにした。

C. 自然免疫系に属するマクロファージの活性制御機構

転写因子として作用する STAT3 の非存在下では、マクロファージは IL-10 のシグナルが障害された結果、異常活性化に陥ることから、正常マクロファージでは IL-10 刺激による STAT3 の活性化を通じ、何らかの炎症抑制に関わる遺伝子が誘導されてくることが予想された。そこで、IL-10 刺激によりマクロファージで誘導される遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて検索した。その結果、マクロファージにおける IL-10 誘導性遺伝子としていくつかの遺伝子を同定した。これらの遺伝子を、マクロファージ系細胞株 RAW264.7 にレンチウイルスシステムを用いて導入した。その結果、IκB ファミリーに属する Bcl-3 を導入した細胞では、リポ多糖刺激による TNF-α産生が顕著に抑制されることを見出した。Bcl-3 を導入した細胞では、IL-10 で前処置したマクロファージと同様に、NF-κB の DNA 結合能が障害されていた。Bcl-3 ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、IL-10 前処置による TNF-α産生の抑制が部分的に障害されていた。このことから、IL-10 で誘導される Bcl-3 がマクロファージにおいて、LPS 刺激依存性の TNF-αの産生抑制に関与していることが明らかになった。

業績目録

原著論文

1. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J. -K., Ohta, N., Iwatani, K., Iijima, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M. -N., Kawano, S., Takeda, K., Akira, S., Sasaki, Y., Hori, S., and Kiyono, H. 2003.
   Development of colitis in STAT6-deficient TCR -/- mice: a potential role of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4+ T cells.
   Am. J. Pathol. 162, 263-271.
2. Sanjo, H., Takeda, K., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Akira, S. 2003.

TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for IL-1 signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1231-1238.

3. Prinz, M., Heikenwaelder, M., Schwarz, P., Takeda, K., Akira, S., and Aguzzi, A. 2003. Prion pathogenesis in the absence of Toll-like receptor signaling. *EMBO Rep.* 4, 195-199.
4. Hazeki, K., Masuda, N., Funami, K., Sukenobu, N., Matsumoto, M., Akira, S., Takeda, K., Seya, T., and Hazeki, O. 2003. Toll-like receptor-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin via MyD88-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol.* 33, 740-747.
5. Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-PKcs in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 170, 3059-3064.
6. Schultz, M., J., Knapp, S., Florquin, S., Pater, J., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T. 2003. Interleukin-18 impairs the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 71, 1630-1634.
7. Wheeler, R. D., Boutin, H., Touzani, O., Luheshi, G. N., Takeda, K., and Rothwell, N. J. 2003. No role for interleukin-18 in acute murine stroke-induced brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 531-535.
8. Kobayashi, M., Kweon, M., Kuwata, H., Kiyono, H., Takeda, K., and Akira, S. 2003. Toll-like receptor-dependent IL-12p40 production causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 111, 1297-1308.
9. Wheeler, R. D., Brough, D., Le Feuvre, R. A., Takeda, K., Iwakura, Y., Luheshi, G. N., and Rothwell, N. J. 2003. Interleukin-18 induces expression and release of cytokines from murine glial cells: interactions with interleukin-1β. *J. Neurochem.* 85, 1412-1420.
10. Zwijnenburg, P. J. G., van der Poll, T., Florquin, S., Akira, S., Takeda, K., Roord, J. J., and van Furth, A. M. 2003. Interleukin-18 gene-deficient mice show enhanced defense and reduced inflammation during pneumococcal meningitis. *J. Neuroimmunol.* 138, 31-37.
11. Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., Takeda, K., Akira, S., Hoshijima, M., Hirano, T., Chien, K. R., and Yoshimura, A. 2003. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages.

Nat. Immunol. 4, 551-556.

12. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Igawa, K., Miyazaki, Y., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K. 2003.
Th2 cytokines, IgE and mast cells play a crucial role in the induction of para-phenylenediamine-induced contact hypersensitivity in mice.
Clin. Exp. Immunol. 132, 385-392.
13. Elhage, R., Jawien, J., Rudling, M., Ljunggren, H. G., Takeda, K., Akira, S., Bayard, F., and Hansson, G. K. 2003.
Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice.
Cardiovasc. Res. 59, 234-240.
14. Yazawa, N., Fujimoto, M., Sato, S., Miyake, K., Asano, N., Takeuchi, O., Takeda, K., Akira, S., Tedder, T. F., Tamaki, K. 2003.
CD19 regulates innate immunity by the Toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes.
Blood 102, 1374-1380.
15. Kojima, E., Takeuchi, A., Haneda, M., Yagi, F., Hasegawa, T., Yamaki, K., Takeda, K., Akira, S., Shimokata, K., and Isobe, K. 2003.
The function of GADD34 is a recovery from a shut-off of protein synthesis induced by ER stress; elucidation by GADD34-deficient mice.
FASEB J. 17, 1573-1575.
16. Zhang, J. H., He, H., Borzychowski, A. M., Takeda, K., Akira, S., and Croy, B. A. 2003.
Analysis of cytokine regulators inducing interferon production by mouse uterine natural killer cells.
Biol. Reprod. 69, 404-411.
17. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. 2003.
Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway.
Science 301, 640-643.
18. Takagi, H., Kanai, T., Okazawa, A., Kishi, Y., Sato, T., Takaishi, H., Inoue, N., Ogata, H., Iwao, Y., Hoshino, K., Takeda, K., Akira, S., Watanabe, M., Ishii, H., and Hibi, T. 2003.
Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice.
Scand. J. Gastroenterol. 38, 837-844.
19. Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T., and Tanaka, N. 2003.
Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response.
Genes Dev. 17, 2233-2238.
20. Chen, F., Wang H.-W., Cuenca, A., Wang, H., Huang, M., Ghansah, T., Brayer, J., Kerr,

W. G., Takeda, K., Akira, S., Schoenberger, S., Yu, H., Jove, R., and Sotomayor, E. M. 2003.
A critical role for STAT3 signaling in immune tolerance.
Immunity 19, 425-436.

21. Weijer, S., Sewnath, M. E., de Vos, A. F., Florquin, S., van der Sluis, K., Gouma, D. J., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T. 2003.
Interleukin-18 facilitates the early antimicrobial host response to *Escherichia coli* peritonitis.
Infect. Immun. 71, 5488-5497.

22. Kariyone, A., Tamura, T., Kano, H., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Takatsu, K. 2003.
Immunogenicity of peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN-γ.
Int. Immunol. 15, 1183-1194.

23. Haga, S., Terui, K., Zhang, H. Q., Enosawa, S., Ogawa, W., Inoue, H., Okuyama, T., Takeda, K., Akira, S., Ogino, T., Irani, K., and Ozaki, M. 2003.
Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms.
J. Clin. Invest. 112, 989-998.

24. Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K., and Akira, S. 2003.
Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-β (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-κB and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling.
J. Immunol. 171, 4304-4310.

25. Shi, S., Nathan, C., Schnappinger, D., Drenkow, J., Fuortes, M., Block, E., Ding, A., Gingeras, T. R., Schoolnik, G., Akira, S., Takeda, K., and Ehrt, S. 2003.
MyD88 primes macrophages for full-scale activation by interferon- yet mediates few responses to *Mycobacterium tuberculosis*.
J. Exp. Med. 198, 987-997.

26. Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., and Bauer, S. 2003.
The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily.
Eur. J. Immunol. 33, 2987-2997.

27. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. 2003.
TRAM is specifically involved in the TLR4-mediated MyD88-independent signaling pathway.

Nat. Immunol. 4, 1144-1150.

28. Kuwata, H., Watanabe, Y., Miyoshi, H., Yamamoto, M., Kaisho, T., Takeda, K., and Akira, S. 2003.
IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-α production in macrophages.
Blood 102, 4123-4129.
29. Matsukawa, A., Takeda, K., Kudo, S., Maeda, T., Kagayama, M., and Akira, S. 2003.
Aberrant inflammation and lethality to septic peritonitis in mice lacking Stat3 in macrophages and neutrophils.
J. Immunol. 171, 6198-6205.
30. Joosten, L. A. B., Koenders, M. I., Smeets, R. L., Heuvelmans-Jacobs, M., Helsen, M. M. A., Takeda, K., Akira, S., Lubberts, E., van de Loo, F. A. J., and van den Berg, W. B. 2003.
Toll-like receptor 2 pathway drives Streptococal cell wall-induced joint inflammation: Critical role of MyD88.
J. Immunol. 171, 6145-6153.
31. Suzuki, N., Suzuki, S., Eriksson, U., Hara, H., Mirtosis, C., Chen, N.-J., Wada, T., Bouchard, D., Hwang, I., Takeda, K., Fujita, T., Der, S., Penninger, J. M., Akira, S., Saito, T., and Yeh, W-C. 2003.
IL-1R-associated kinase 4 is required for lipopolysaccharide-induced activation of APC.
J. Immunol. 171, 6065-6071.
32. Iiyama, R., Kanai, T., Uraushihara, K., Ishikura, T., Makita, S., Totsuka, T., Yamazaki, M., Nakamura, T., Miyata, T., Yoshida, H., Takeuchi, O., Hoshino, K., Takeda, K., Ishikawa, H., Akira, S., and Watanabe, M. 2003.
Normal development of the gut-associated lymphoid tissue except Peyer's patch in MyD88-deficient mice.
Scand. J. Immunol. 58, 620-627.
33. Sugawara, I., Yamada, H., Mizuno, S., Takeda, K., and Akira, S. 2003.
Mycobacterial infection in MyD88-deficient mice.
Microbiol. Immunol. 47, 841-847.
34. Hokuto, I., Ikegami, M., Yoshida, M., Takeda, K., Akira, S., Perl, A. T., Hull, W. M., and Whitsett, J. A. 2004.
Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia.
J. Clin. Invest. 113, 28-37.
35. Into, T., Kiura, K., Yasuda, M., Kataoka, H., Inoue, N., Hasebe, A., Takeda, K., Akira, S., and Shibata, K. 2004.
Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF-κB

activation.
Cell. Microbiol. 6, 187-199.

36. Akazawa, T., Masuda, H., Saeki, Y., Matsumoto, M., Takeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Takahashi, T., Azuma, I., Akira, S., Toyoshima, K., and Seya, T. 2004. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice.
Cancer Res. 64, 757-764.
37. Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., and Raz, E. 2004.
Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis.
Gastroenterology 126, 520-528.
38. Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Hiramatsu, R., Leroith, D., Takeda, K., Akira, S., and Kasuga, M. 2004.
Role of Stat3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* 10, 168-174.
39. Liu, B., Mori, I., Hossain, M. J., Dong, L., Takeda, K., and Kimura, Y. 2004.
Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity.
J. Gen. Virol. 85, 423-428.
40. Robben, P. M., Mordue, D. G., Truscott, S. M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L. D. 2004.
Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype.
J. Immunol. 172, 3686-3694.
41. Yukawa, K., Hoshino, K., Kishino, M., Mune, M., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Tanaka, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira S. 2004.
Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy.
Int. J. Mol. Med. 13, 515-520.
42. Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., and Zychlinsky, A. 2004.
Toll-like receptors are temporally involved in host defense.
J. Immunol. 172, 4463-4469.
43. Ikushima, H., Nishida, T., Takeda, K., Ito, T., Yasuda, T., Yano, M., Akira, S., and Matsuda, H. 2004.
Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is down-regulated after operation.
Surgery 135, 376-385.

44. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Miyagi, K., Kinjo, T., Yara, S., Koguchi, Y., Miyazato, A., Shibuya, K., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A. 2004.
Interferon-γ production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18.
Micrbes. Infect. 6, 339-349.

総説

1. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. 2003.
Toll-like receptors.
Annu. Rev. Immunol. 21, 335-376.
2. Takeda, K., and Akira, S. 2003.
Toll receptors and pathogen resistance.
Cell. Microbiol. 5, 143-153.
3. Akira, S., Yamamoto, M., and Takeda, K. 2003.
Role of adaptors in Toll-like receptor signaling.
Biochem. Soc. Trans. 31, 637-642.
4. Yamamoto, M., Takeda, K., and Akira, S. 2004.
TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling.
Mol. Immunol. 40, 861-868.
5. Takeda, K., and Akira, S. 2004.
TLR signaling pathway.
Seminar Immunol. 16, 3-9.
6. Takeda, K., and Akira, S. 2004.
Microbial recognition by Toll-like receptors.
J. Dermatol. Sci. 34, 73-82.

著書

1. Takeda, K., and Akira, S. 2003.
Toll receptors.
Curr. Proto. Immunol.
2. Takeda, K., and Akira, S. 2003.
Tissue-specific function of Stat3.
Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs): Activation and Biology.
3. Takeda, K., and Akira, S. 2004.
Toll-like receptors: ligands and signaling.
Innate Immunity

学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Hirotaka Kuwata, Shizuo Akira. (2003, 4/1-4/6)
   Identification of an IL-10-inducible gene that prevents LPS responses in macrophages.
   Keystone Sympoisa (The regulation of mucosal inflammation), Keystone USA
2. Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira. (2003, 5/14-18)
   Toll-like receptors: their specificity and signaling.
   EMBO Workshop on Patten recognition protein and receptors. (invited) Trest, Czech Republic.
3. 竹田潔、山本雅裕、審良静男 (2003, 7/23-24)

   Toll-like receptor を介したウイルス認識のシグナル

   第 68 回インターフェロン・サイトカイン学会 (招待講演)、東京

4. 竹田潔、山本雅裕、審良静男 (2003, 10/17)

   TIR domain-containing adaptors regulate TLR signaling pathways

   第 76 回日本生化学会 (シンポジウム)、横浜

5. 竹田潔 (2003, 10/26)

   自然免疫系における病原体の認識機構：Toll-like receptor とそのシグナル伝達

   第 55 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 (特別講演)、松山

6. Kiyoshi Takeda, Masahiro Yamamoto, Shizuo Akira. (2003, 11/20)
   Roles of TIR domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling pathways
   2003 annual meeting of Korean Rheumatological Association (invited), Seoul, Korea
7. Kiyoshi Takeda, Masahiro Yamamoto, Shizuo Akira. (2003, 11/21)
   Toll-like receptor signaling pathways
   The 44th Meeting of Korean Society for Immunology (invited), Seoul, Korea
8. Kiyoshi Takeda, Masahiro Yamamoto, Shizuo Akira. (2003, 12/8-10)

   TIR domain-containing adaptors mediate TLR signaling pathways. (シンポジウム)

   第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡

9. 山本雅裕、佐藤慎太郎、辺見弘明、改正恒康、星野克明、竹田潔、審良静男 (2003, 12/8-10)

TRIF は TLR の MyD88 非依存的経路を担うアダプター分子である (ワークショップ)

第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡

10. 佐藤慎太郎、山本雅裕、河合太郎、竹田潔、審良静男 (2003, 12/8-10)

新規 TIR ドメイン含有アダプターTRIF を介するシグナル伝達経路の解析 (ワークショップ)

第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡

11. 辺見弘明、佐藤慎太郎、山本雅裕、改正恒康、河合太郎、星野克明、竹田潔、審良静男 (2003, 12/8-10)

TBK1/NAK/T2K は LPS による IFN-inducible gene の発現に関与する(ワークショップ)

第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡

12. 松川昭博、竹田潔、審良静男 (2003, 12/8-10)

腹腔常在マクロファージに発現する Stat3 による急性炎症制御機構 (ワークショップ)

第 33 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡

14. Kiyoshi Takeda (2004, 2/16-17)
Role of TIR domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling pathways.
International Workshop on The Immune System; Development, Activation, and Manipulation, Tokyo

所員名簿

発生工学分野

教授	竹田　潔
助手	松本　真琴
助手	桑田　啓貴
技術補佐員	古賀　律子
技能補佐員	城戸　律子
事務補佐員	倉田　真弓
研究生	松本　郁子