

平成14年度
厚生労働科学研究費補助金実績報告書
(食品・化学物質安全総合研究事業)

研究課題名(課題番号) :

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析

(H14-食品・化学-026)

主任研究者：山下敬介

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科
解剖学・発生生物学)

分担研究者：菅野雅元

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科
免疫学)

分担研究者：横崎恭之

(国立療養所 広島病院)

平成15年(2003年)4月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金 総括研究報告書概要版

研究費の名称=厚生労働科学研究費補助金

研究事業名=食品・化学物質安全総合研究事業

研究課題名=ダイオキシン類の毒性発現機構の解析（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円）=18,000,000

研究期間（西暦）=2002-2003

研究年度（西暦）=2002

主任研究者=山下敬介（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 解剖学・発生生物学研究室）

分担研究者=菅野雅元（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 免疫学研究室）

分担研究者=横崎恭之（国立療養所 広島病院 呼吸器科）

研究目的=ダイオキシン類は肝臓酵素誘導作用、生殖発生毒性、免疫毒性などさまざまな毒性を有する。本研究は、ダイオキシン類の肝臓への影響・発生毒性・雄性生殖毒性・神経毒性に焦点を絞り、これらの毒性発現機序について明らかにしようとするものである。ダイオキシンはダイオキシン受容体（別名：アリール炭化水素受容体、以下AhRと略）を介して毒性を発現すると考えられている。ダイオキシン類の毒性発現に対するAhRの関与の有無について検討することも本研究の目的である。研究の結果、ダイオキシンは抗原提示細胞である樹状細胞に働きかけて、アレルギー疾患・アトピー疾患誘発のリスクを増加させることが明らかとなった。

研究方法=マウスを用いて研究を進めた。マウスの系統はダイオキシンに対する感受性が最も高いとされる系統のC57BL/6Jを用いた。AhRの関与を見るため、AhR遺伝子欠損マウス(AhR^{-/-})マウス（Mimura et al., 1997）を使用した。ダイオキシンは、ダイオキシン類のうち最も毒性が強いとされる、2,3,7,8四塩化ジベンゾパラジオキシン（2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 以下TCDDと略、Cambridge Isotope Laboratories Japan, CIL Japan、製品番号 ED-901）をコーン油を溶媒として溶解した。溶媒投与（5,000 μ l/kg体重）を対照群とした。

5週齢の雄マウスを購入し、飼育環境に慣らすため、1週間飼育した。6週齢で、マ

ウスにTCDDを40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の割合で1回強制経口投与した。投与後7日でマウスをネンブータル深麻酔により屠殺した。AhR遺伝子欠損マウスにも同量のTCDDを投与して7日後に屠殺し、AhRの関与を見た。

(倫理面への配慮) 実験はヒトを対象としないので、倫理問題は生じない。また、実験動物はマウスを使用した。ヘルシンキ条約に基づき、動物は愛護的に扱い、十分な麻酔下にて屠殺、あるいは頸椎脱臼により屠殺した。

結果と考察=抗原提示細胞への影響 (樹状細胞の分離と表面抗原)

樹状細胞(DC, dendritic cells)を他の細胞と区別するため、一般的にDCのマーカースとして用いられているCD11cとDEC205に対するFITC標識抗体を用いて組織染色を行った。その結果、両抗原とも良好な染色像を示した。さらにCD11cに染色されるDCのアクチン線維を調べたところ、細胞内表層に存在するストレスファイバーの存在も明確に観察され、細胞の形態も細胞骨格も正常に保たれていることが確認できた。

TCDD投与1週後のマウス脾臓からDCを分離し、その細胞数と活性化表面マーカー群の変化を調べた。その結果、脾細胞の総数は溶媒投与対照群では 88.00×10^6 、TCDD投与群では 83.33×10^6 であるが、樹状細胞数に関しては溶媒投与対照群では 0.40×10^6 、TCDD投与群では 0.17×10^6 となり、投与群では対照群の約40%までの樹状細胞数の低下が認められた。

また表面マーカーに関しては、CD11c陽性細胞中のCD80、CD24の増加が認められた。したがってTCDD投与によりDCの総細胞数は低下するもののこれらの細胞は活性化されており、抗原提示能が亢進していることが判った。

考察

樹状細胞は他のB細胞やマクロファージに比べて強力な抗原提示細胞であり、生体内の様々な組織に分布し、免疫応答の制御に関与している。未成熟な樹状細胞は多様な食作用機能を有し、末梢の組織内で抗原を取り込む。異物の侵入に伴う炎症性の刺激によりリンパ節への移動が促進され成熟した樹状細胞は、T細胞を活性化し、相互作用により強力な免疫応答を引き起こす。リンパ組織に存在する成熟樹状細胞は、高レベルのMHCクラスIおよびクラスII分子、補助刺激因子B7.1、B7.2(CD80、CD86)および接着分子ICAM-1、ICAM-2、LFA-1、LFA-3を発現して、ナイーブT細胞を活性化する。本研究において、ダイオキシンを投与したマウスの末梢樹状細胞は、CD80などの補助刺激因子の発現のみならず、T細胞上に発現するCD40リガンドと結合するCD40や、heat stable antigenであるCD24を高発現していた。すなわち活性化状態にある成熟した樹状細胞のT細胞への抗原提示能が亢進し、過剰な免疫反応によるアレルギー疾患やアトピー疾患へと導かれる可能性が考えられた。

参考論文

Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, and Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor.
Genes to Cells 2: 645-654.

健康危険情報

今回の実験はマウスを用いた実験で、TCDDの暴露用量も高く、得られた結果を直ちにヒトへ外挿することはできない。健康危険情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報）として、厚生労働省に報告すべき事柄はない。

研究発表

1. 論文発表

なし。本年度は期間の大半を実験に費やした。

2. 学会発表

なし。

知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

結論=研究の結果、ダイオキシンは抗原提示細胞である樹状細胞に働きかけて、アレルギー疾患・アトピー疾患誘発のリスクを増加させることが明らかとなった。

（以上約2,700文字）

厚生科学研究費補助金実績報告書
食品・化学物質安全総合研究事業

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析
課題番号：(H14-食品・化学-026)
平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山下敬介

平成15年(2003年)4月

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金 報告書

食品・化学物質安全総合研究事業

課題番号：(H14-食品・化学-026)

目次

I. 総括研究報告書

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析

山下敬介 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科
解剖学・発生生物学)

II. 分担研究報告

菅野雅元 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科
免疫学)

横崎恭之 (国立療養所 広島病院 呼吸器科)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

(別添4)

厚生労働科学研究費補助金
(食品・化学物質安全総合研究事業)

総括研究報告書(平成14年度)
ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解
析(H14-食品・化学-026)

主任研究者 山下敬介
(広島大学大学院医歯薬学総合研究科
解剖学・発生生物学)

研究要旨

A. 研究目的

ダイオキシン類とは、ジベンゾパラジ
オキシン、ジベンゾフラン、ノンオルソ
多塩化ビフェニールの総称である。ダイ
オキシン類は急性毒性、肝臓酵素誘導作
用、発がんプロモータ作用、生殖毒性、
発生毒性(催奇形性)、免疫毒性などさ
まざまな毒性を有する。

山下は、ダイオキシンによる発生毒性
発現のメカニズムに興味を持ち、研究を
続けてきた。

妊娠マウス(Jcl:ICR系統)の妊娠12.5
日にTCDDを体重1kg当り40 μ gの割合
で1回強制経口投与する。妊娠18.5日
(満期)に母体を屠殺し、胎子を取り出
し、観察すると、ほぼすべての胎子に口
蓋裂と腎盂拡大(水腎症)が観察される。
腎盂拡大の原因(病因)として、尿管上
皮が過剰増殖し、それが尿管腔をふさぎ、
上流から流れ落ちてくる尿が貯留し、そ
の結果、腎盂拡大に至ると説明されてい
る。

尿管上皮は移行上皮であると組織学的
に説明されているが、その細胞動態につ
いては、本当のところは、解明されてい

ないのが実情である。そこで、今回は、
正常尿管上皮細胞の細胞動態を微細形態
学的・組織細胞化学的に検討し、論文と
して発表した。

B. 研究方法

成獣マウス(Jcl:ICR)(日本クレア)
を購入し、実験に供した。

マウスをネンブタール麻酔下に開胸・
開腹し、右心房を切開後、左心室から3%
グルタルアルデヒド固定液を灌流し、
全身を固定した。尿管を取り出し、オス
ミウム酸で後固定し、酢酸ウラニールで
ブロック染色後、アルコール系列で脱水
し、エポキシ樹脂に包埋した。試料を超ミ
クロトームで薄切し、透過電子顕微鏡で
観察した。

組織細胞化学的手法としては、細胞を
BrdUでラベルし、DNA増殖能を持つ細
胞の同定を行った。具体的には、マウス
を毎日7日にわたり、BrdUを腹腔内に
投与した。最終投与後1日に、マウスを
3.7%ホルマリン溶液にて灌流固定し、パ
ラフィン包埋した。試料をマイクロトーム
で薄切後、抗BrdU抗体で免疫反応し、
さらに、ペルオキシダーゼをラベルした
二次抗体で反応させ、過酸化水素、ジア
ミノベンジジンで可視化した。これによ
り、BrdU取り込み細胞が褐色にラベル
された。

(倫理面への配慮)実験はヒトを対象と
しないので、倫理問題は生じない。また、
実験動物はマウスを使用した。ヘルシン
キ条約に基づき、動物は愛護的に扱い、
十分な麻酔下にて屠殺、あるいは頸椎脱
臼により屠殺した。

C. 研究結果

成熟マウスの尿管上皮が、一般に言われている移行上皮ではなく、重層扁平上皮であることを明らかにできた。

その根拠は2つ。

1つには、マウス尿管上皮細胞は4層の細胞から成り立つ。基底膜側から、基底細胞、2つの中間細胞、表層細胞である。細胞内にある紡錘型小胞の成熟を超微形態学的に追及したところ、基底細胞、中間細胞、表層細胞へと内腔側に向かうほど、紡錘型小胞は成熟してゆくことが明らかになった。

2つ目には、BrdU取り込み細胞は、最初、基底細胞の位置にあるが、時間経過をおって、ラベルされた細胞の動きを見ると、ついで中間細胞がラベルされ、最後に表層細胞がラベルされることが明らかとなった。

以上の証拠から、尿管上皮は重層扁平上皮であるの結論を得た。

D. 考察

成熟マウスの尿管上皮細胞の動態を記載し、新知見を得た。今までは、一般に移行上皮といわれていた、尿管上皮が実は重層扁平上皮であることが明らかとなった。

腎盂拡大の解析には、尿管上皮の細胞動態の知識が必須であるが、現在胎生期での細胞動態を明らかにしつつあり、これと合わせて、腎盂拡大の原因を形態学的に明らかにすることが期待される。さらに、分子生物学的な解析も進めているところである。

E. 結論

今回の研究により、尿管上皮が重層扁平上皮であることが、超微細形態学的、免疫細胞化学的に証明された。

F. 健康危険情報

今回の実験から直ちにヒトへの影響を外挿することはできない。健康危険情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報）として、厚生労働省に報告すべき事柄はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

K Yamashita

Fine structural aspects of the urothelium in the mouse ureter with special reference to cell kinetics. Hiroshima Journal of Medical Sciences 51 (2): 41-48 (June 2002)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

(別添4)

厚生労働科学研究費補助金

(食品・化学物質安全総合研究事業)

分担研究報告書(平成14年度)

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析(H14-食品・化学-026)

(ダイオキシンは抗原提示細胞である樹状細胞に働きかけて、アレルギー疾患・アトピー疾患誘発のリスクを増加させる)

分担研究者 菅野雅元(広島大学大学院医歯薬学総合研究科 免疫学)

研究要旨

A. 研究目的

近年、ヒトのアレルギー疾患・アトピー疾患が増加してきているのではないかと不安が一般大衆の間に広がっている。

本研究は、ダイオキシン類の免疫毒性に焦点を絞り、その毒性発現機序について明らかにしようとするものである。

ダイオキシン類とは、ジベンゾパラジオキシン、ジベンゾフラン、ノンオルソ多塩化ビフェニールの総称である。ダイオキシン類は急性毒性、肝臓酵素誘導作用、生殖毒性、発生毒性(催奇形性)、免疫毒性などさまざまな毒性を有する。ダイオキシンはダイオキシン受容体(別名:アリール炭化水素受容体、以下AhRと略)を介して毒性を発現すると考えられている。

今年度は、ダイオキシンが、抗原提示細胞である樹状細胞に及ぼす影響を評価した。

B. 研究方法

マウスを用いて研究を進めた。マウスの系統はダイオキシンに対する感受性が

最も高いとされる系統のC57BL/6Jを用いた。AhRの関与を見るため、AhR遺伝子欠損マウス(AhR^{-/-})マウス(Mimura et al., 1997)を使用した。ダイオキシンは、ダイオキシン類のうち最も毒性が強いとされる、2,3,7,8四塩化ジベンゾパラジオキシン(2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin, 以下TCDDと略、Cambridge Isotope Laboratories Japan, CIL Japan、製品番号ED-901)をコーン油を溶媒として溶解した。溶媒投与(5,000 μl/kg体重)を対照群とした。

5週齢の雄マウスを購入し、飼育環境に慣らすため、1週間飼育した。6週齢で、マウスにTCDDを40 μg/kg体重の割合で1回強制経口投与した。投与後7日でマウスをネンプター深麻酔により屠殺した。AhR遺伝子欠損マウスにも同量のTCDDを投与して7日後に屠殺し、AhRの関与を見た。

(倫理面への配慮) 実験はヒトを対象としないので、倫理問題は生じない。また、実験動物はマウスを使用した。ヘルシンキ条約に基づき、動物は愛護的に扱い、十分な麻酔下にて屠殺、あるいは頸椎脱臼により屠殺した。

C. 研究結果

抗原提示細胞への影響(樹状細胞の分離と表面抗原)

樹状細胞(DC, dendritic cells)を他の細胞と区別するため、一般的にDCのマーカーとして用いられているCD11cとDEC205に対するFITC標識抗体を用いて組織染色を行った。その結果、両抗原とも良好な染色像を示した。さらにCD11c

に染色されるDCのアクチン線維を調べたところ、細胞内表層に存在するストレスファイバーの存在も明確に観察され、細胞の形態も細胞骨格も正常に保たれていることが確認できた。

TCDD投与1週後のマウス脾臓からDCを分離し、その細胞数と活性化表面マーカー群の変化を調べた。その結果、脾細胞の総数は溶媒投与対照群では 88.00×10^6 、TCDD投与群では 83.33×10^6 であるが、樹状細胞数に関しては溶媒投与対照群では 0.40×10^6 、TCDD投与群では 0.17×10^6 となり、投与群では対照群の約40%までの樹状細胞数の低下が認められた。

また表面マーカーに関しては、CD11c陽性細胞中のCD80、CD24の増加が認められた。したがってTCDD投与によりDCの総細胞数は低下するもののこれらの細胞は活性化されており、抗原提示能が亢進していることが判った。

D. 考察

樹状細胞は他のB細胞やマクロファージに比べて強力な抗原提示細胞であり、生体内の様々な組織に分布し、免疫応答の制御に関与している。未成熟な樹状細胞は多様な食作用機能を有し、末梢の組織内で抗原を取り込む。異物の侵入に伴う炎症性の刺激によりリンパ節への移動が促進され成熟した樹状細胞は、T細胞を活性化し、相互作用により強力な免疫応答を引き起こす。リンパ組織に存在する成熟樹状細胞は、高レベルのMHCクラスIおよびクラスII分子、補助刺激因子B7.1、B7.2(CD80、CD86)および接着分子ICAM-1、ICAM-2、LFA-1、LFA-3を発現して、ナイーブT細胞を活性化する。本研究において、ダイオキシンを投与し

たマウスの末梢樹状細胞は、CD80などの補助刺激因子の発現のみならず、T細胞上に発現するCD40リガンドと結合するCD40や、heat stable antigenであるCD24を高発現していた。すなわち活性化状態にある成熟した樹状細胞のT細胞への抗原提示能が亢進し、過剰な免疫反応によるアレルギー疾患やアトピー疾患へと導かれる可能性が考えられた。

参考文献

Minura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, and Fujii-Kuriyama Y (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes to Cells* 2: 645-654.

F. 健康危険情報

今回の実験はマウスを用いた実験で、TCDDの暴露用量も高く、得られた結果を直ちにヒトへ外挿することはできない。健康危険情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報）として、厚生労働省に報告すべき事柄はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。本年度は期間の大半を実験に費やした。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

(別添4)

厚生労働科学研究費補助金

(食品・化学物質安全総合研究事業)

分担研究報告書 (平成14年度)

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析 (H14-食品・化学-026)

分担研究者 横崎恭之 (国立療養所 広島病院 呼吸器科)

研究要旨

A. 研究目的

人体ではすべての細胞はマトリックスあるいは細胞と接するが、細胞がこの隣接環境を認識・識別するプローブは接着分子である。この分子の機能異常はどのような病態や疾患につながるのだろうか。

細胞を培養する際、他の細胞層の上におくと分化や増殖が促されるなど、細胞は他の細胞あるいはマトリックスとの接触によりふるまいを変えることがよく知られている。接着分子インテグリン、カドヘリンがシグナル伝達に働くことは、FAK (focal adhesion kinase)やカテニンなど細胞質内ドメインに会合するシグナル伝達分子が具体的に同定され、疑いの余地はなくなった。血球細胞では細胞の血管外遊出・集積などに役割を果たすことがセレクチンの働きを中心によく説明されているが、それ以外の組織での接着分子の働きは生物学的な観点からもいまだ不明な点が多い。

「接着分子」の概念が定着するにつれ、さまざまな分子がこの範疇に入れられており、厳密な定義はない。インテグリン、カドヘリン、セレクチン、続いてIgCAM (immunoglobulin-like domain

containing cell adhesion molecule)、さらに密着結合の構成成分としてのオクルジン、クラウジン、ギャップ結合のコネキシンなどがあげられる。それに加えてプロテオグリカン、CD44、近年ではADAM (A disintegrin and a metalloprotease domain)やチロシンホスファターゼ、さらにFasなども含まれる。また、ファイブロネクチンやコラーゲンなどのマトリックス蛋白が接着分子に加えられる場合もある。

インテグリンとは。

膜表面にヘテロ二重体として発現される。 α サブユニットは18種類、 β サブユニットは8種類同定されている。それらの組合せによりすくなくとも24種類が存在するが、ほとんどのサブユニットで欠損マウスは致死的であるか表現型に異常をきたし、個々が他で補われない働きを生命や健康の維持のために果たしている。種類によってはCD番号や他のよび方 (たとえばCD18は β 2サブユニット、LFA-1は α L β 2、VLA-4は α 4 β 1) で表したほうがなじみが深いかもしれない。接着分子のなかではリガンド結合後のシグナル伝達間こうがもっともよく確かめられており、増殖因子の受容体をもリン酸化してシグナルが伝達されることも判明している。また、リガンドとして従来知られていた細胞外マトリックス、IgCAMのほかADAM、アンジオスタチン、マトリックス架橋酵素トランスグルタミナーゼなどがつぎつぎと同定されており、従来の接着とそれに続くシグナル伝達以外にも役割が存在するようである。好酸球に発現するインテグリン α 4 β 1を分子標的として喘息などアレルギー疾患の治療が考えられており、薬剤開発の先陣争いが行われている。また、イ

ンテグリン $\alpha v \beta 6$ の不活化マウスはプレオマイシン肺線維症抵抗性であり、これより $\alpha v \beta 6$ が TGF- β の活性化に必要であることが判明している。潜在型 TGF- β は RGD 配列をもち、これに $\alpha v \beta 6$ が結合して活性型に変える。 $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 8$ 、 $\alpha 8 \beta 1$ も同様に潜在型 TGF- β に結合し、 $\alpha v \beta 8$ は MT1-MMP を介して TGF- β を活性化する。

今年度はオステオポンチンについて研究を進めたので報告する。

オステオポンチンは酸性のアミノ酸を多く含み、カルシウム結合領域、糖鎖を持つ分泌型の蛋白である。オステオポンチンは多くの生理学的作用を有するとともに、疾患に関連した作用も持つ。その作用には、細胞接着、細胞移動、発がん、がんの転移、免疫学的反応、生体防御、補体が関与する細胞融解の抑制がある。

オステオポンチンは、GRGDS あるいは SVVYGLR というアミノ酸配列を介してインテグリンに結合する。オステオポンチンの作用の多くは、細胞接着およびそれに引き続いておこる細胞内シグナル伝達を介していると考えられている。

今回、私達はヒトのオステオポンチンの種々のアミノ酸配列を認識するモノクローン抗体を 5 種類作製した。この抗体を用いて、オステオポンチンのどの部位が細胞接着と細胞移動に重要であるかの位置決めを行った。

B. 研究方法

5 種類すべてのモノクローン抗体は、ヒト由来のオステオポンチン、および遺伝子組み換えにて作製されたヒト型オステオポンチンに対して反応した。

オステオポンチンであらかじめコートした、細胞培養用のプレートにて、細胞

を培養し、細胞の接着能力、細胞移動能力を測定した。

(倫理面への配慮) 実験はヒトを対象としないので、倫理問題は生じない。実験には、培養細胞株を使用した。

C. 研究結果

VDTYDGRGDSVVYGLRS というアミノ酸配列を持つペプチドに対するモノクローン抗体である、2K1 と名付けられた抗体は、オステオポンチンに対する RGD 配列に依存した細胞接着を阻害した。さらにこの 2K1 抗体は、オステオポンチンに対する、インテグリンの $\alpha 9$ に依存した細胞接着を阻害した。2K1 抗体によって認識される抗原性提示部位は、トロンビンによる消化によっては壊されなかった。一方、mAb53 という抗体は、オステオポンチンをあらかじめトロンビンで消化しておく、または消化後のオステオポンチンに結合することはできなかった。

2K1, mAb53 という 2 つのモノクローン抗体で認識される 2 つの抗原性提示部位は、SVVYGLR という細胞結合ドメインと、GLRSKS を含むトロンビンで消化される領域と、おのおの、深く関連していることが明らかとなった。そして、これらの 2 つのサイトは、細胞結合と細胞移動に関与していることがわかった。

D. 考察

私達は、ヒト型オステオポンチンへの、RGD 依存性の細胞接着は、mAb53 と 2K1 によって阻害されることを示した。2K1 抗体は、もともと VDTYDGRGDSVVYGLRS というアミノ酸配列に対して作製されたモノクローン

抗体であり、このアミノ酸配列は GRGDSとSVVYGLRという2つの細胞結合ドメインを持っている。2K1は、GRGDSとは結合しなかった。2K1はSVVYGLRのアミノ酸残基側に結合部位があると推測された。

それに対して、mAb53はSVVYGLRのカルボキシル残基側が認識部位であった。さらに、mAb53は、SVVYGLRSよりもSVVYGLRSKSと強く結合した。SVVYGLRSKSは、トロンビンで消化される部位を含んでいる。SVVYGLRは $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン受容体で認識される配列であるので、2K1がオステオポンチンに対する $\alpha 9 \beta 1$ インテグリン受容体依存性の細胞接着を阻害するかどうかを見た。 $\alpha 9$ を発現しているSW480細胞株では、オステオポンチンへの結合は、RGD配列依存性でも可能であるし、非依存的な結合も可能であった。後者の非依存的な結合は $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンを介していた。2K1は、この $\alpha 9 \beta 1$ インテグリンを介する結合を完全に阻害した。

F. 健康危険情報

今回の実験は、基礎的な実験であり、得られた結果を直ちにヒトへの健康と関連づけることはできない。よって、健康危険情報（国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報）として、厚生労働省に報告すべき事柄はない。

細胞外、および細胞間の接着分子を研究することは、すぐにはヒトの健康増進に役立つということにはつながらない。しかしながら、多数の（24種）インテグリンは、いずれもその1つを遺伝子工学的にノックアウトしたマウスでは、そのマウスが致死となったり、重篤な表現

型を呈したりしている。このことは、インテグリンが生命の根幹をなす、重要な分子であることを物語る。さらに、プレオマイシンによって誘発される肺線維症は、インテグリン $\alpha v \beta 6$ と深い関係を有することが明らかになる等、通常の実験では知ることのできない、疾患の側面を浮き彫りにする。

こういう意味からも、一見遠回りではあるが、生存に関係する分子を丹念に研究することには、大きな意味があるといえる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kon S, Yokosaki Y, Maeda M, Segawa T, Horikoshi Y, Tsukagoshi H, Rashid MM, Morimoto J, Inobe M, Shijubo N, Chambers AF, and Ueda T
Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences. *Journal of Cellular Biochemistry* 84: 420-432 (2002).

横崎恭之 呼吸器疾患と接着分子。
別冊・医学のあゆみ 呼吸器疾患 State of Arts 2003-2005. (北村 諭、福地義之助、石井芳樹編集) 2003年3月発行。
pp. 140-143 (2003).

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

20020946

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Fine structural aspects of the urothelium in the mouse ureter with special reference to cell kinetics.

Yamashita K.

Hiroshima J Med Sci. 2002 Jun;51(2):41-8.

Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences.

Kon S, Yokosaki Y, Maeda M, Segawa T, Horikoshi Y, Tsukagoshi H, Rashid MM, Morimoto J, Inobe M, Shijubo N, Chambers AF, Uede T.

J Cell Biochem. 2002;84(2):420-32.

呼吸器疾患と接着分子（特集）病態生理に関する最新の基礎的研究
横崎恭之

医学のあゆみ．別冊呼吸器疾患—state of arts 2003-2005
Page140-143(2003.03)