

## 創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究

所属 北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子免疫分野  
研究者 上出 利光

研究要旨: 自己免疫疾患の新規治療を目的とし、BAFF-R と会合する分子 DWMD の発見とこの分子の BAFF による NF- $\kappa$ B 活性化、IL-10 の産生における重要性を明らかにした。また、B 細胞の生存・増殖に重要なラフト刺激によって発現が誘導される遺伝子群の候補を特定するとともに、刺激伝達関連分子 BLNK の機能の一端を解明した。

### 分担研究者

- (1) 北海道大学 遺伝子病制御研究所 宮崎 忠昭
- (2) 国立成育医療センター研究所  
発生・分化研究部 形態発生研究室 清河 信敬
- (3) 株式会社プライムイオン 研究開発 洲鎌 和茂
- (4) 協和発酵株式会社 東京研究所 設楽 研也

### A. 研究目的

1) BAFF (B-cell activating factor belonging to the TNF family; TALL-1, Blys, THANK, zTNF4とも呼ばれている)はTNF (tumor necrosis factor)スーパーファミリーに属し、B細胞の分化と生存に主要な役割を担っているサイトカインである。これまでBAFFのトランスジェニックマウスは全身性エリテマトーデス(SLE)様の症状を呈し、SLE等の自己免疫疾患の血清においてもBAFF濃度の上昇が認められる事から、過剰なBAFFの存在は自己免疫疾患発症の原因になると考えられている。また、BAFFトランスジェニックマウスは、加齢により健常人に比べて非ホジキンリンパ腫を引き起こす危険性が高いと報告されているシェーグレン症候群様の症状を呈すこと、またB細胞慢性リンパ性白血病の患者では血中BAFF濃度の上昇がみられる事から、BAFFの産生異常がB細胞性の白血病への関

与する事も考えられている。

BAFFノックアウトマウスは成熟B細胞の深刻な損失を引き起こし、T2 (immature transitional type 2; CD21<sup>+</sup> IgM<sup>hi</sup>)移行期にあるB細胞数に著しい減少が認められる事から、B細胞の成熟過程においてT1 (immature transitional type 1; CD21<sup>-</sup> IgM<sup>hi</sup>)からT2への移行にBAFFのシグナルが特に重要であると考えられている。

これまでBAFFのシグナルを伝達する受容体としてはTACI (transmembrane activator and CAML-int eractor)、BCMA (B cell maturation antigen)、BAFF-R (BAFF receptor; BR3とも呼ばれる)(図1)が知られているが、これらの受容体のうちTACI、BCMAはBAFF以外のリガンドであるAPRIL (a proliferation-ind ucing ligand)とも結合するのに対し、BAFF-RはBAFF特異的に結合することが報告されている。またTACIのノックアウトマウスはB細胞の異常増殖とSLE様の症状を示し、BAFFのシグナルを負に伝達する受容体であると考えられている。一方、BCMAのノックアウトマウスは長期生存の抗体産生B細胞数に減少が認められるものの深刻な免疫系の異常は認められないことから、BAFFのシグナルへの関与は少ないものと考えられている。これらに対し、BAFF-Rの遺伝子損傷マウスであ

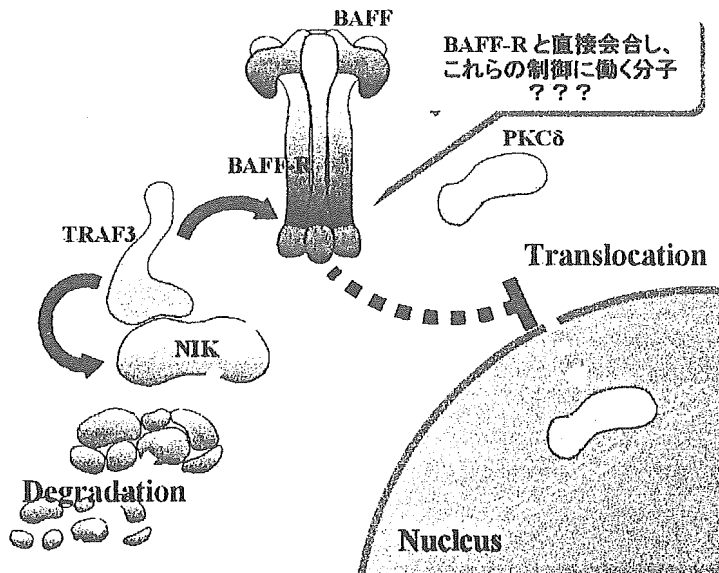


図 1. BAFF-R を介したシグナル伝達機構に関与する分子

るA/WySnJマウス、およびBAFF-R

ノックアウトマウスはBAFFノックアウトマウスとよく似た表現系を呈し、B細胞の成熟過程におけるT1からT2移行への阻害とそれに伴う成熟B細胞数の減少を示すことが報告されている。これらのことからBAFF-RはBAFFのシグナルを支配的に伝達する受容体であると考えられている。

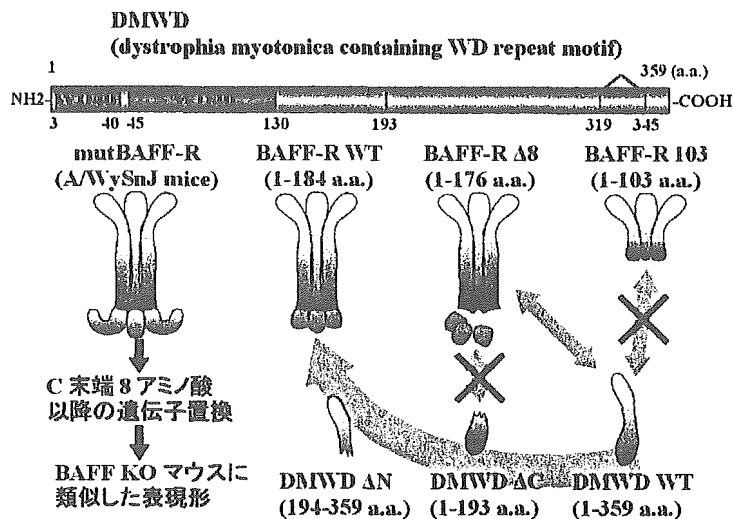
BAFF-Rを介したBAFFのシグナルはNF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) の活性化を伴い、Bcl-2 (B-cell CLL/Lymphoma 2)の発現やIL-10 (interleukin-10)の産生等を通じて自己抗体産生B細胞を含めたB細胞の生存に働くと考えられている。BAFF-Rを介したNF- $\kappa$ Bの活性化にはNIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase)の関与が報告されており、NIKによるNF- $\kappa$ B 2の直接的なプロセッシングを介したNF- $\kappa$ B活性化経路が主要な経路であると考えられている(図1)。またBAFF-Rの遺伝子損傷マウスとPKCd (protein kinase Cd)のノックアウトマウスを用いた両遺伝子欠損マウスは成熟B細胞数の回復がみられ、その機構としてBAFF-RによるPKCd核移行阻害が示されている。このように、BAFF-Rが下流に伝達するシグナルについては徐々に明らかとなりつつあるが、BAFF-Rに直接会合し、これらのシグナルを正に伝達する分子については未だに報告がなされていない。これまでBAFF-Rに直接会合する分子としてはTRAF3 (TNF receptor-associated factor 3)が知られているが、TRAF3はNIKと会合しその分解促進に働く事が報告されているように、BAFF-RによるNF- $\kappa$ B の活性化、IL-10の産生に対して負の制御を行う分子であると考えられている。さらに、以上の解析によって明らかとなった遺伝子をB細胞へ効率よく導入する方法の確立のための新たなアデノウイルスベクターの検討を試みた。BAFF-Rと直接会合し、BAFFのシグナル伝達経路の制御に関与する分子の解析はB細胞の恒常性維持

に重要な役割を担うBAFF-Rのシグナル伝達機構を理解する上で必要不可欠であると考えられる。本研究ではBAFF-Rと会合する分子の検索とその機能解析から自己免疫疾患発症の分子メカニズムを解明し、新たなこの疾患治療法の開発につながる分子標的の同定を目的としている。

2) 抗体産生細胞として液性免疫の中心的役割を担うB細胞には、外来抗原に対し高い特異性を持った抗体を産生するクローンを効率的に増やすとともに、同時に発生してくる自己反応性抗体、あるいは低親和性抗体の産生クローンを排除するため、B細胞抗原受容体を中心とした独自の増殖・分化制御の刺激伝達機構が存在する。この独自性に着目してその制御機構を分子レベルで解明し、得られた知見を基礎にB細胞に対する選択的な新規増殖制御法を開発することによって、同細胞の分化・増殖の異常に起因する自己免疫疾患やB細胞性腫瘍に対する新規治療法開発へと結びつくことが期待される。

一方、ラフトは特定の脂質や脂質修飾タンパクが形成する細胞膜上の動的なドメイン構造で刺激伝達の場合として機能するが、特にB細胞ではクローン排除の刺激伝達に関与することが明らかになっており、治療応用を目的としたB細胞の分化・制御法開発における創薬のターゲットとしての期待が持たれる。そこで本研究では、B細胞の増殖・分化制御の刺激伝達機構について、“ラフト”に着目した解析を行い、その成果を新たなB細胞の増殖・分化制御法開発に応用することを目的としている。

抗体産生細胞として液性免疫の中心的役割を担うB細胞には、外来抗原に対し高い特異性を持った抗体を産生するクローンを効率的に増やすとともに、同時に発生してくる自己反応性抗体、あるいは低親和性抗体の産生クローンを排除するため、B細胞抗原



DMWD は BAFF-R の 103-126a.a. 領域と C 末端 8 アミノ酸に会合する。

図 2. DMWD のアミノ酸構造と BAFF-R 会合部位の解析

受容体を中心とした独自の増殖・分化制御の刺激伝達機構が存在する。この独自性に着目してその制御機構を分子レベルで解明し、得られた知見を基礎にB細胞に対する選択的な新規増殖制御法を開発することによって、同細胞の分化・増殖の異常に起因する自己免疫疾患やB細胞性腫瘍に対する新規治療法開発へと結びつくことが期待される。

ラフト構成分子に対する抗体の中には、B細胞にアポトーシスを誘導する効果を示すものが複数存在する。従って、ラフトには治療応用を目的としたB細胞の分化・制御法開発における創薬のターゲットとしての期待が持たれる。そこで本研究では、B細胞の増殖・分化制御の刺激伝達機構について、“ラフト”に着目した解析を行い、その成果を新たなB細胞の増殖・分化制御法開発に応用することを目的とし、B前駆細胞のラフトを免疫源とした単クローン性抗体作成を行う。

(倫理面への配慮)ヒト末梢血採取時やマウス脾細胞の調製時には実験手技において十分な倫理面での配慮に努めた。

## B. 研究方法

1) 酵母two-hybrid法を用いてヒト胎児脳cDNAライブラリーよりBAFF-Rと会合する分子のスクリーニングを行った。得られた陽性クローンの遺伝子解析にはBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を用いた。DMWDのcDNAはヒト胎児脳のcDNAよりPCR法を用いて調製した。これをFLAGタグ融合タンパク質発現ベクターであるpcDNA3 FLAGのマルチクローニングサイトに挿入し発現プラスミドを構築した。DMWDの欠失変異体を発現するプラスミドは上記pcDNA3 FLAGにDMWDのcDNAを挿入したプラスミドを用い、DMWDのcDNA配列中に含まれる制限酵素、SmaI認識部位を利用して構築を行っ

た。BAFF-RのcDNAはHong-Bing Shu博士 (コロラド大学保健科学センター看護学部)より供与されたBAFF-R発現プラスミドを用い、PCR法によりHAタグ融合タンパク質を発現するベクターに挿入した。BAFF-Rの欠失変異体を発現するプラスミドはPCR法を用いて構築した。

DMWDとBAFF-Rの会合部位の解析は免疫共沈降法により行った。人腎臓由来の培養細胞株であるHEK293T細胞を用い、FLAGタグを付けたDMWDを発現するプラスミド、およびHAタグを付けたBAFF-Rを発現するプラスミドを共にトランスフェクションした。その細胞粗抽出液に対し、それぞれのエピトープタグに特異的な抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降画分をSDS-PAGEにより分画し、共沈降される分子についてウエスタンブロッティング法による解析を行った。

IL-10の産生はヒトB細胞由来の培養細胞株であるBJAB細胞を用いて解析を行った。BJAB細胞に対し、BAFF-RとDMWDおよびその欠失変異体を発現するプラスミドを用いて、これらを恒常的に発現する培養細胞株を樹立した。これら安定維持株の培養上清中に含まれるIL-10に対してELISA法により、その産生量の測定を行った。

NF- $\kappa$ Bの活性化はレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポータージーンアッセイにより解析を行った。NF- $\kappa$ Bの認識部位と最小プロモーター配列の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子が挿入されたプラスミドを用い、HEK293T細胞へDMWDおよびその欠失変異体と共にトランスフェクションした。24時間後にルミノメーターを用いルシフェラーゼ活性の測定を行った。内部標準としてHSV(単純ヘルペスウイルス)由来のチミジンキナーゼプロモーター下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を持つプラスミドを用い、ウミシイタケルシフェラーゼの活性で標

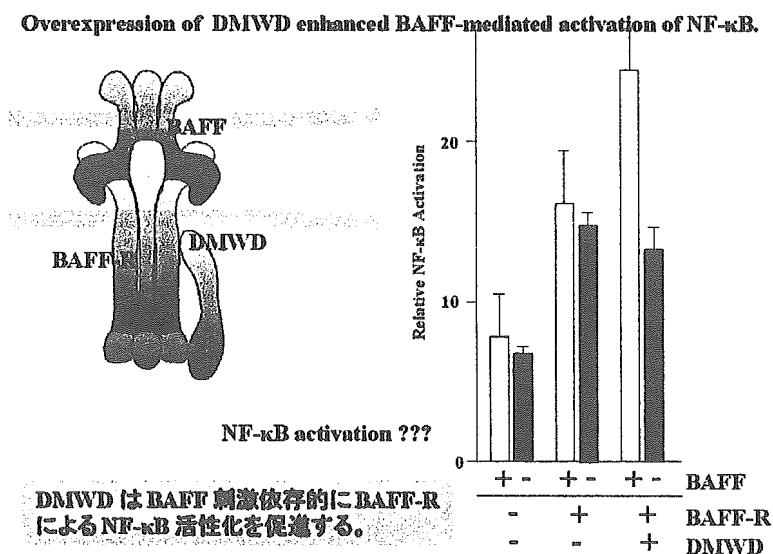


図 3. BAFF-R を介した NF- $\kappa$ B 活性化経路における DMWD の機能解析

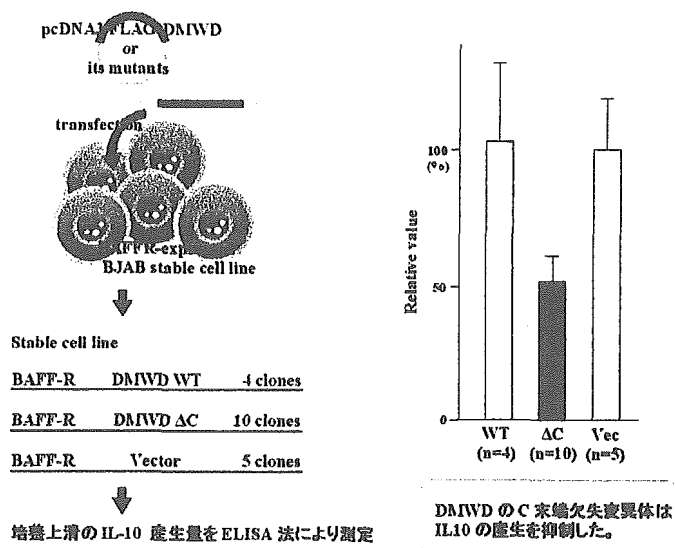


図4. IL-10 産生に対する DMWD の機能解析

準化を行った。

遺伝子導入法の改良のため、通常のアデノウイルス5型 (Ad5) の fiber 部分をアデノウイルス35型 (Ad35) のそれに置換したキメラウイルス (Ad5/35) を作製して用いた。遺伝子導入・発現効率の解析のため、CMV-promoter で転写される GFP 遺伝子を Ad5/35 に挿入した。

2) 骨髄 CD34 陽性細胞 (米国 Clonetics 社からインフォームドコンセントを得た上で市販されているもの) をマウス骨髄間質細胞株 MS-5、正常ヒト骨芽細胞、ヒト繊維芽細胞株 KMS-6、正常ヒト骨髄間質細胞、等の種々の骨髄間質細胞と4週間共培養した後、増殖した血球系細胞の表面抗原を各種 CD 抗原に対する単クローン性抗体を用いた蛍光染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。

また、この培養系に抗 CD24 抗体 (L30) を添加し、血球系細胞のアポトーシス誘導を蛍光標識アネキシン

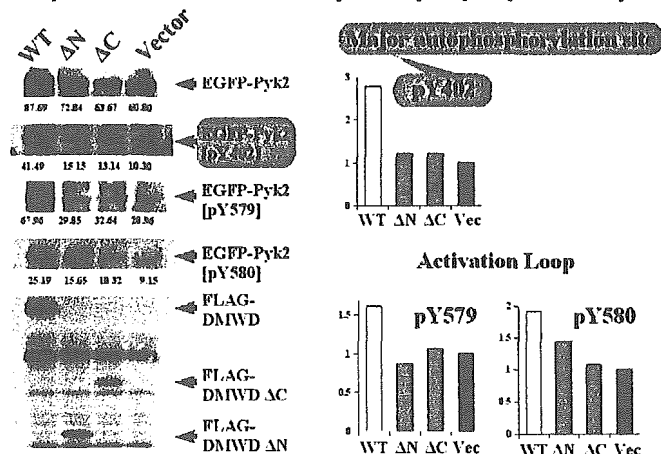
ン-V との結合性によりフローサイトメトリーにより検出した。

Pre-B 駆細胞株 HPB-NUL を抗 CD24 抗体添加によって刺激してその前後の RNA を抽出し、Affimetrix 社の GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

Pre-B 前駆細胞株 HPB-NUL、NALM-17、NALM-6、P30/OHK 等の BLNK の発現をイムノプロット、RT-PCR により検討した。また、同細胞株を抗  $\mu$  鎖抗体で刺激し、誘導される細胞内蛋白のチロシンリン酸化についてリン酸化特異抗体を用いたイムノプロットで、細胞質内  $Ca^{++}$  濃度の変化について Fluo3am を用いたフローサイトメトリー解析で、それぞれ検討した。

細胞株膜抽出蛋白を調整し、ショ糖密度勾配超遠心法によりラフト画分を分離し、マウスに1週間ごとに腹腔内注射によって免疫した。4回免疫後、マウスよ

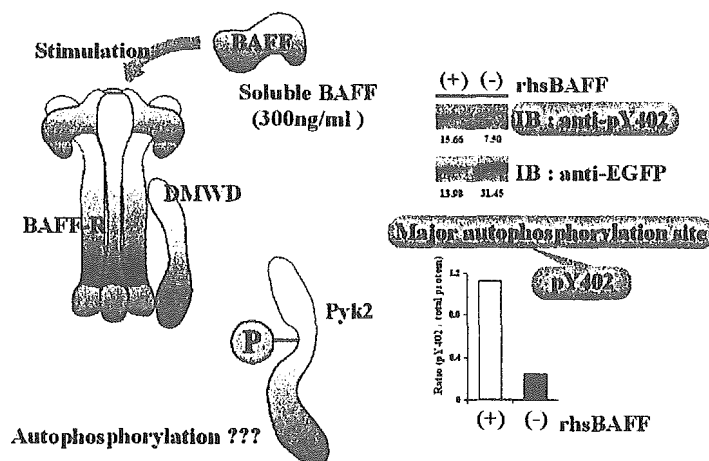
Overexpression of DMWD activate tyrosine phosphorylation of Pyk2.



DMWD の過剰発現により Pyk2 の活性化に関わるチロシン残基のリン酸化が亢進した。

図5. Pyk2 の活性化に関わるアミノ酸残基のリン酸化におよぼす DMWD の機能解析

### BAFF-induced phosphorylation of the Pyk2 Tyr-402.



BAFF 刺激により Pyk2 の自己リン酸化が亢進された。

図 6. BAFF 刺激による Pyk2 の自己リン酸化解析

り採血し、血清を分離して、その免疫源である細胞株に対する反応性を免疫蛍光染色を用いて、フローサイトメトリーにより検討した。また、ラフト画分から抽出した脂質に対する反応性については、TLC-プロットにより検討した。

免疫したマウスより脾臓細胞を分離、調整し、常法により、マウスミエローマ細胞株P3U1と融合させ、HAT選択により、抗体産生ハイブリドーマを作成した。

### C. 研究結果

酵母two-hybrid法によるスクリーニングの結果、陽性クローンとして12種の遺伝子が得られた。これらの中からいくつかの分子に対して蛍光抗体法を用いた細胞内局在の解析、および免疫共沈降法を用いた培養細胞中におけるBAFF-R会合能について検討を行った。その結果より、細胞質に主な局在が観られ、BAFF-Rと培養細胞中で会合が認められたDMWD (dystrophia myotonica containing WD repeat motif) 遺伝子に注目し、解析を進める事にした。DMWDはI型の筋緊張性ジストロフィーにおいてCTG反復配列の増大が認められる遺伝子座に存在する遺伝子として知られている。しかしながら、疾患への関与は低いと考えられており、機能的にもこれまで全く報告がなされていないタンパク質である。DMWDは359アミノ酸からなり、その機能ドメインとしてN末端領域にWD40リピートモチーフを持つことが知られている(図2)。DMWDの193番目のアミノ酸からN末端領域(DMWD ΔC)、およびC末端領域(DMWD ΔN)の欠失変異体を発現するプラスミドを作製し、これを用いてBAFF-Rとの会合を検討したところ、これらの変異体は全てBAFF-Rと会合性を示した。またBAFF-Rの細胞内領域を欠失させた変異体を用い、DMWDとの会合領域を検討したところ、DMWDとBAFF-Rの

会合には膜貫通領域近傍に位置する103から126アミノ酸に相当する領域が必要であることが明らかとなった。一方、DMWD ΔCはBAFF-RのC末端8アミノ酸領域に会合することが明らかとなった。このことから、DMWDがBAFF-Rと複数の領域で会合している可能性が考えられた。BAFF-R遺伝子欠損マウスとして知られるA/WySnJマウスはBAFF-RのC末端8アミノ酸領域が他のアミノ酸に置き換わっていることが知られ、ヒトにおいてもBAFF-RのC末端8アミノ酸は完全に保存されている事からこの領域はBAFF-Rの機能に重要であると考えられている。DMWDがBAFF-Rの機能的に重要とされる領域と会合する事が示された事はDMWDがBAFF-Rのシグナル伝達機構に重要な役割を持つ可能性を示唆するものと考えられた。

BAFF-Rを介したNF-κBの活性化に及ぼすDMWDの影響をヒト腎臓由来の培養細胞株であるHEK293T細胞を用いてレポーター遺伝子アッセイにより解析を行った(図3)。その結果、BAFF-Rの過剰発現によるNF-κBの活性化はHEK293T細胞においても認められること、また膜存在型BAFFの共発現によりBAFF-Rに対してBAFFの刺激を加えた細胞群ではDMWDを共発現した場合においてのみNF-κB活性化の亢進が認められることが明らかとなった。

B細胞由来の培養細胞株であるBJAB細胞を用いてBAFF-Rを恒常的に発現する安定維持株を樹立した。この安定維持株に対して可溶性BAFFの刺激を加えIL-10の産生について解析を行った。その結果、培地に添加したBAFF濃度依存的にIL-10の産生が認められた。そこでBJAB細胞をBAFF-Rを介したBAFF刺激によるIL-10産生のモデル系として用いる事にした。BAFF-Rを恒常的に発現する安定維持株を用いてBAFF-RとDMWDおよびそのC末端領域を欠失させた変異体を恒常的に発現する安定維持株を

樹立した。これらの安定維持株が産生するIL-10量について解析を行ったところ、野生型のDMWDを発現する安定維持株と比較してC末端領域を欠失したDMWDを発現する安定維持株ではIL-10の産生量に低下が認められ、DMWDがBAFF-Rを介したIL-10産生経路に関与している可能性が示された(図4)。DMWDはキナーゼ、プロテアーゼ等の酵素活性に関与するモチーフ配列を持たずアダプター分子として機能しているものと考えられた。そこで抗体アレイを用い、DMWDと会合するシグナル伝達関連分子の検索を行った。その結果DMWDはチロシンキナーゼであるPyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2; CAK- $\beta$ 、RAFTKとも呼ばれる)と会合する事が示された。Pyk2の活性化にはその自己リン酸化部位である402番目に位置するチロシン残基(Tyr402)のリン酸化が必須であるとされ、Tyr402の自己リン酸化により、それに伴うSrcファミリーキナーゼのリクルートとキナーゼドメイン中に存在するactivation-loopと呼ばれるリン酸化部位(Tyr579, Tyr580)のリン酸化が起こり、キナーゼ活性の向上を伴う活性化が起こると報告されている。そこでPyk2の活性化に及ぼすDMWDの影響について検討を行った。HEK293T細胞へPyk2とDMWD、およびその欠失変異体を発現するプラスミドをトランスフェクションし、その細胞粗抽出液に対してTyr402のリン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、Pyk2の自己リン酸化について解析を行った。その結果、DMWDの過剰発現によりPyk2の自己リン酸化が亢進されることが明らかとなり、またこの自己リン酸化亢進はDMWDのN末端領域、C末端領域の各欠失変異体では認められなかった(図5)。同様にactivation-loop中に位置するTyr579、Tyr580のリン酸化について解析を行ったところ、Tyr402の自己リン酸化と同様にDMWDの過剰発現によりリン酸化の亢進が認められ、DMWDの欠失変異体では亢

進が認められなかった。この事からDMWDはPyk2の活性化に関与していると考えられた。次いでPyk2の自己リン酸化に対するBAFFによるBAFF-Rを介したシグナル伝達経路の関与について検討を行った。HEK293T細胞へBAFF-R、DMWD、Pyk2を発現するプラスミドをトランスフェクションし、培地中へ可溶性BAFFを添加し、BAFFの刺激を与えた。この細胞粗抽出液に対してPyk2の自己リン酸化についてウエスタンブロッティング法による解析を行った。その結果BAFF刺激依存的にPyk2の自己リン酸化亢進が認められ、BAFF、BAFF-Rのシグナル伝達経路にDMWDが関与し、Pyk2の活性化に働いていることが考えられた(図6)。

Pyk2はNF- $\kappa$ Bの活性化に関与する事が報告されている。そこでレポーター遺伝子アッセイによりDMWDとその変異体によるNF- $\kappa$ B活性化について検討を行った。その結果DMWDおよびその欠失変異体によるNF- $\kappa$ B活性化はPyk2の自己リン酸化亢進と相関が認められ、DMWDがNF- $\kappa$ Bの活性化に機能するのに対し、DMWDのC末端領域、N末端領域を発現する各欠失変異体はNF- $\kappa$ B活性化に対して抑制的に働く事が示された。

アデノウイルスベクターに関してはAd5/35を培養し、ヒト末梢血単核球に感染させると、広範囲の細胞集団に感染し、GFP陽性率はMOI=1~100において約30~60%であった。均一な細胞集団としてはin vitroで単球からGM-CSF/IL-4の存在下で培養して分化させた樹状細胞にはMOI=100では95%以上の効率でGFPが導入、発現された。また、Ad5/35は、マウス脾細胞にはin vitroでは感染しないものと考えられた。

2) a) 正常B前駆細胞のラフト刺激伝達系解析に応用する目的で、骨髄間質細胞との共培養によってヒ

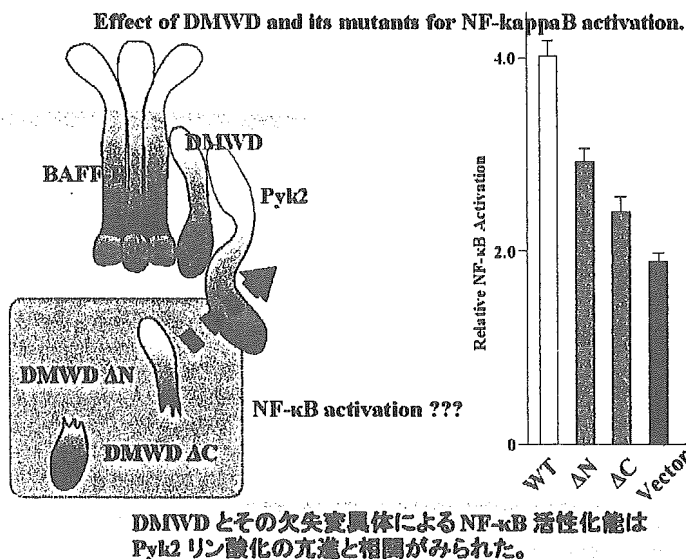
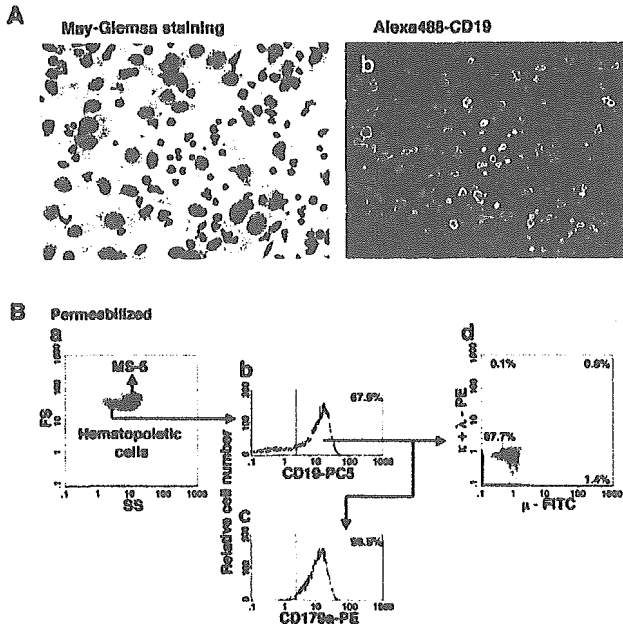


図 7. DMWD とその欠失変異体を用いた NF- $\kappa$ B の活性化能の解析

図 8.

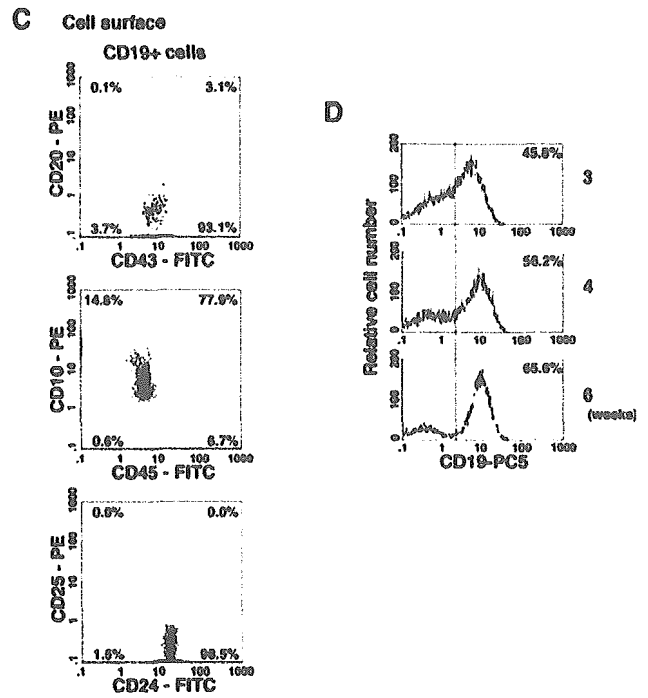


ト骨髓CD34陽性細胞からB前駆細胞を分化誘導する培養条件について検討を行った。複数の骨髓間質細胞について検討した結果、マウス由来骨髓間質細胞株MS-5が最も効率的にB細胞を分化誘導することが明らかとなった(図8)。誘導されたB細胞の性状解析を行った結果、これらの細胞は表面免疫グロブリンおよび細胞質内 $\mu$ 鎖陰性のPro-B細胞が大部分であった。また種々の因子を培養系に添加してその効果を検討したところ、Oncostatin-MがMS-5のPro-B細胞誘導能に対する増強効果を示した。IL-7はPro-B細胞のCD19発現を増強したが、その頻度や数には変化を認めず、Flt-3-ligand添加では骨髓球系細胞が著しく増加した。

MS-5との共培養によって誘導されたPro-B細胞に対して特異抗体添加によるCD24の架橋刺激を加えたところ、アポトーシスの誘導が確認され、これまでに細胞株での実験で観察されていたラフトを介するアポトーシス誘導刺激の伝達が、正常B前駆細胞でも起こることが示唆された。

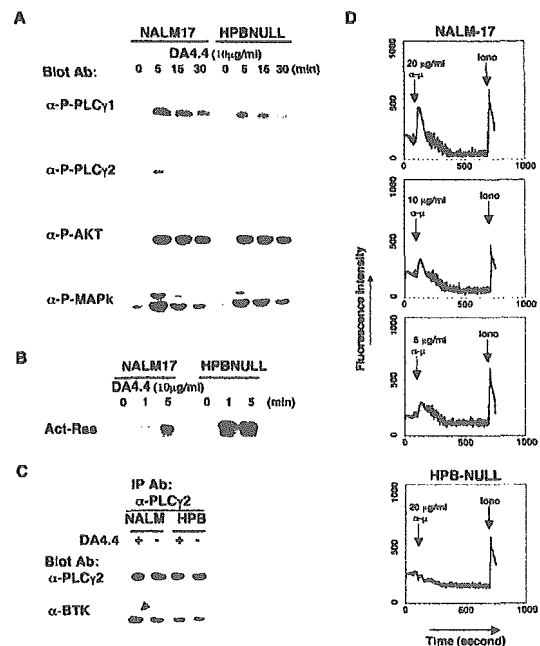
b) Pre-B細胞株であるHPB-NULLに対して抗CD24単クローン性抗体を結合させ、その前後のRNAを抽出してGeneChip解析を行い、CD24の架橋によるラフト刺激によって誘導される遺伝子の候補を複数同定した。

c) ラフトの刺激伝に関与する分子の機能について、ヒト細胞株を用いた検討を行った。BLNKはB細胞の刺激伝達において重要な役割を担っているアダプター分子であり、ラフト刺激伝達系の下流に位置すると想定されている。そこで、複数のB-precursor ALL細胞株におけるBLNKの発現を検討した結果、強発現している株から、ほとんど発現していない株まで様



々な発現状況が明らかになった。pre-BCRを発現するpre-B ALL株のうち、BLNK強発現株NALM-17と同欠損株HPB-NULLを用いて、pre-BCR刺激伝達系におけるBLNKの役割について検討した。この結果、抗 $\mu$ 鎖抗体によるpre-BCR架橋刺激により、細胞内蛋白のチロシン酸化やMAPキナーゼ系の活性化は同等に起こるものの、PLC- $\gamma$ 2および細胞質内Ca<sup>++</sup>の濃度の上昇はBLNK発現株のみで認められた(図9)。

d) B前駆細胞株NALM-16からラフト成分を精製し図9.



てその脂質の組成について検討し、GM3とLacCerが主なスフィンゴ糖脂質であることを明らかにした。このラフト成分をBalb/cマウスに免疫した後、血清を採取し、誘導された脂質に対する抗体についてポリクローナルレベルでの解析を行ったところ、非常に高い免疫効果を示すことが明らかとなった。TLC-プロットの結果、ほぼ単一のバンドを認めたことから特定の脂質に対する抗体が選択的に誘導されていることが示唆された。興味深いことに、このバンドはLacCerあるいはGM3とは異なる位置に検出されることから、ラフトの脂質成分の免疫原性の強さはかならずしも含有量には左右されないことが示唆された。

さらに、このNALM-16のラフト成分で免疫したマウスから単クローン性抗体の作成を行い、2クローンを得て、その脂質に対する反応性をドットプロットおよびフローサイトメトリーにより確認した。

#### D. 考察

1) DMWDはほぼ全ての組織でmRNAの発現が認められ、本研究で用いたB細胞由来の培養細胞株であるBJAB細胞中でもmRNAレベルでの発現を認めている。しかしながら、内在性DMWDのB細胞中における発現とその制御については検討が必要であると考えられ、特異的抗体の作製が不可欠である。今後、特異的な抗体の作製とそれを用いた内在性DMWDの機能解析を行っていく方針である。

本研究で得られた結果からBAFFに対する他の受容体、TACIとBCMAが介するシグナル伝達経路へDMWDが関与する可能性について完全に排除することは出来ないと思われる。BAFF-R特異的にDMWDが機能する事を証明するにはBAFF-Rの細胞内領域と他の受容体とのキメラを用いた解析、およびBAFF-Rのアゴニストとして機能する抗体を用いた解析等が必要であると考えられる。またTACIおよびBCMAとDMWDの会合性については今後検討が必要な課題であると考えられる。

アデノウイルスベクターの改良型によってB細胞に有意な感染効率の上昇が認められたが、今後、複数の細胞表面マーカーを用いた解析により、どのようなB細胞亜集団において遺伝子導入効率が高いか、また、その亜集団がどのような機能的特徴を有するかについて検討する必要がある。

2) マウス由来骨髄間質細胞株MS-5がヒトPro-B細胞の分化誘導を有すること、誘導されたPro-B細胞が、正常B前駆細胞のラフト解析に有用であることが示唆された。また、Pre-B細胞株を用いたGeneChip解析により、CD24の架橋によるラフト刺激によって誘導される遺伝子の候補が複数同定され、この結果は今後のラフト刺激伝達系の分子機構解析に有用と考えられる。一方、BLNKがpre-BCR刺激伝達系におい

てPLC- $\gamma$ 2を介するCa<sup>++</sup>の濃度の上昇に重要な役割を担っていることが示唆され、現在ラフト構成分子との相互関係について検討中である。

B前駆細胞株のラフト画分を免疫することにより、非常に高い免疫効果があること、またこれに含まれる成分の免疫源性は、必ずしも量には依存しないことが明らかになった。現在、このシステムを用いてB前駆細胞株のラフト画分に対する単クローン性抗体を作成中であり、今後樹立された抗体の性状について、特にB前駆細胞に対するアポトーシス誘導効果に着目して解析を行って行く。

#### E. 結論

1) DMWDはBAFF-Rと会合し、その会合はDMWDはBAFF-Rの細胞膜貫通領域近傍に位置する103から126アミノ酸に相当する領域およびBAFF-Rの機能的に重要な領域であるC末端8アミノ酸領域を介することが示された。DMWDの欠失変異体を発現するBJAB細胞はIL-10の産生が抑制される事が示され、BAFF-Rを介したIL-10産生につながるシグナル伝達経路へDMWDが関与している可能性が示唆された。またDMWDがチロシンキナーゼであるPyk2と会合すること、また自己リン酸化を伴うPyk2の活性化にDMWDが機能する事が示された。Pyk2の活性化能はDMWDの欠失変異体では失われていた。DMWDはPyk2の関与が報告されているNF- $\kappa$ Bの活性化に機能し、この活性化はPyk2の自己リン酸化亢進能と相関するように、DMWDの欠失変異体では抑制された。以上の事からDMWDはBAFF-Rを介したシグナル伝達機構において正の制御因子として機能し、そのシグナル伝達機構としてPyk2の自己リン酸化亢進とその下流に位置するシグナル伝達経路の活性化が考えられた。B細胞および樹状細胞への高い遺伝子導入効率は、ワクチンベクター等、免疫応答の修飾・制御への応用の可能性を示唆するものと考えられた。マウス細胞培養系において、Ad5/35の感染が認められないことはCD46の種差によると思われ、今後の実験計画において不利な条件であるが、報告されている麻疹ウイルス・ワクチン研究用に作製されているヒトCD46トランスジェニック・マウスの使用により克服可能と考えられる。

2) ラフト解析に用いる正常B前駆細胞分化誘導の培養条件を検討し、実際に誘導された細胞に対してラフトを架橋刺激するとアポトーシスの誘導が起こることが確認された。細胞株を用いた実験により、ラフト刺激によって発現が誘導される遺伝子群の候補を特定するとともに、刺激伝達関連分子BLNKの機能の一端を明らかにした。B前駆細胞株のラフト画分を免疫原として、単クローン性抗体の作成を開始した。ラフト画分は非常に高い抗原性を示すとともに、免疫



源としての特殊性を有する可能性が考えられる。

F. 研究発表

上出利光

1. 論文発表

1. K. Tanaka, J. Morimoto, S. Kon, C. Kimura, M. Inobe, H. Diao, G. Hirschfeld, J.M. Weiss and T. Uede : Effect of Osteopontin Alleles on beta-Glucan Induced Granuloma Formation in the Mouse Liver. *American Journal of Pathology*. 164:567-575, 2004.
2. J. Morimoto, M. Inobe, C. Kimura, S. Kon, H. Diao, M. Aoki, T. Miyazaki, D.T. Denhardt, S. Rittling and T. Uede : Osteopontin affects the persistence of  $\beta$ -glucan-induced hepatic granuloma formation and tissue injury through two distinct mechanisms. *International Immunology*. 16: 477-488, 2004.
3. E. Ono, K. Amagai, S. Yoshino, S. Taharaguchi, M. Inobe and T. Uede : Resistance to pseudorabies virus infection in transformed cell lines expressing a soluble form of porcine herpesvirus entry mediator C. *Journal of General Virology*. 85:173-178, 2004.
4. E. Ono, S. Yoshino, K. Amagai, S. Taharaguchi, C. Kimura, J. Morimoto, M. Inobe, T. Uenishi and T. Uede : Enhanced resistance to herpes simplex virus type 1 infection in transgenic mice expressing a soluble form of herpesvirus entry mediator. *Virology*. 320:267-275, 2004.
5. T. Ishii, S. Ohshima, T. Ishida, T. Mima, Y. Tabunoki, H. Kobayashi, M. Maeda, T. Uede, L. Liaw, N. Kinoshita, I. Kawase and Y. Saeki : Osteopontin as a positive regulator in the osteoclastogenesis of arthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 316:809-815, 2004.
6. T. Yasumi, K. Katamura, T. Yoshioka, T. Meguro, R. Nishikomori, T. Heike, M. Inobe, S. Kon, T. Uede and T. Nakahata : Differential Requirement for the CD40-CD154 Costimulatory Pathway during Th Cell Priming by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> Murine Dendritic Cell Subsets. *The Journal of Immunology*. 172:4826-4833, 2004.
7. Y. Matsui, N. Jia, H. Okamoto, S. Kon, H. Onozuka, M. Akino, K. Liu, J. Morimoto, S.R. Rittling, D. Denhardt, A. Kitabatake, T. Uede : Role of Osteopontin in Cardiac Fibrosis and Remodeling in Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy. *Hypertension*. 43:1195-1201, 2004.
8. E. Hirakawa, Y. Yasunami, M. Nakano, M. Shiiba, M. Takehara, T. Uede, S. Todo, J. Ono, S. Ikeda : Amelioration of hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice with fetal pancreatic allografts: prevention of rejection by donor specific transfusion in conjunction with CTLA4Ig. *Pancreas*. 28:146-152, 2004.
9. T. Ishii, S. Ohshima, T. Ishida, I. Kawase, T. Mima, Y. Tabunoki, H. Kobayashi, M. Maeda, T. Uede, L. Liaw, N. Kinoshita, Y. Saeki : Mice with osteopontin deletion remain predisposed to collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 50:669-671, 2004.
10. H. Kosuge, J. Suzuki, T. Kakuta, G. Haraguchi, N. Koga, H. Futamatsu, R. Gotoh, M. Inobe, M. Isobe, T. Uede : Attenuation of graft arterial disease by manipulation of the LIGHT pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24:1409-1415, 2004.
11. T. Miyazaki, M. Shen, D. Fujikura, T. Tosa, S. Kon, T. Uede, J.C. Reed : Functional role of death associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J Biol Chem*. 279:44667-44672, 2004.
12. Y. Matsui, H. Okamoto, N. Jia, M. Akino, T. Uede, A. Kitabatake, J. Nishihira : Blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 37:557-566, 2004.
13. H. Diao, S. Kon, K. Iwabuchi, C. Kimura, J. Morimoto, D. Ito, T. Segawa, M. Maeda, J. Hamuro, T. Nakayama, M. Taniguchi, H. Yagita, L.V. Kaer, K. Onoe, D. Denhardt, S. Rittling and T. Uede : Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity*. 21:539-550, 2004.
14. H. Sakihama, T. Masunaga, K. Yamashita, T. Hashimoto, M. Inobe, S. Todo, T. Uede : Stromal Cell-Derived Factor-1 and CXCR4 Interaction Is Critical for Development of Transplant Arteriosclerosis. *Circulation*. Oct 25, 2004.
15. K. Watanabe, K. Saito, M. Kinjo, T. Matsuda, M. Tamura, S. Kon, T. Miyazaki, T. Uede : Molecular dynamics of STAT3 on IL-6 signaling pathway in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 324:1264-1273, 2004.
16. J.Q. Wang, J. Kon, C. Mogi, M. Todo, A. Damirin, K. Sato, M. Komachi, E. Malchinkhuu, N. Murata, T. Kimura, A. Kuwabara, K. Wakamatsu, H. Koizumi, T. Uede, G. Tsujimoto, H. Kurose, T. Sato, A. Harada, N. Misawa, H. Tomura, F. Okajima : TDAG8 Is a Proton-sensing a

nd Psychosine-sensitive G-protein-coupled Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:45626-45633, 2004

17. E. Ono, K. Amagai, S. Taharaguchi, Y. Tomioka, S. Yoshino, Y. Watanabe, P. Cherel, LM. Houdebine, M. Adam, M. Eloit, M. Inobe, T. Uede : Transgenic mice expressing a soluble form of porcine nectin-1/herpesvirus entry mediator C as a model for pseudorabies-resistant livestock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:16150-16155, 2004.

18. K. Nabeyama, Y. Yasunami, A. Toyofuku, M. Nakano, M. Satoh, N. Matsuoka, J. Ono, M. Kamada, T. Uede, S. Todo, S. Ikeda : Beneficial effects of costimulatory blockade with anti-inducible costimulator antibody in conjunction with CTLA4Ig on prevention of islet xenograft rejection from rat to mouse. *Transplantation*. 78:1590-1596, 2004.

19. N. Hua, K. Yamashita, T. Hashimoto, T. Masunaga, M. Fujita, H. Furukawa, T. Uede, S. Todo : Gene therapy-mediated CD40L and CD28 co-stimulatory signaling blockade plus transient anti-xenograft antibody suppression induces long-term acceptance of cardiac xenografts. *Transplantation*. 78:1463-1470, 2004.

20. H. Kojima, T. Uede, T. Uemura : In vitro and in vivo effects of the overexpression of osteopontin on osteoblast differentiation using a recombinant adenoviral vector. *J Biochem (Tokyo)*. 136:377-386, 2004.

21. N. Hua, K. Yamashita, T. Hashimoto, T. Masunaga, M. Fujita, H. Furukawa, T. Uede, S. Todo : Gene therapy-mediated CD40L and CD28 co-stimulatory signaling blockade plus transient anti-xenograft antibody suppression induces long-term acceptance of cardiac xenografts. *Transplantation*. 78:1463-1470, 2004.

## 2. 学会発表

1. T. Miyazaki, M. Shen, N. Tosa, D. Fujikura, S. Kon, T. Uede, and J.C. Reed : Functional role of death associated protein 3 in apoptosis induction. *Experimental Biology 2004*, Washington, DC, April.17-21, 2004.

2. D. Fujikura, M. Ito, T. Uede and T. Miyazaki : CLIPR-59 regulates FK- $\kappa$ B activation mediated by death receptor 6. *Experimental Biology 2004*, Washington, DC, April.17-21, 2004.

3. H. Diao, S. Kon, C. Kimura, M. Maeda, and T. Uede : Osteopontin neutralizing antibody pro-

TECTS mice from fulminant hepatitis. *Experimental Biology 2004*, Washington, DC, April.17-21, 2004.

4. S. Kon, H. Diao, C. Kimura, M. Maeda, T. Uede : Osteopontin neutralizing antibody protects mice from fulminant hepatitis. 12th International Congress of Immunology, Montrial, Canada, July.18-23, 2004.

1. デイオ宏燕、今重之、木村千恵美、前田雅弘、上出利光:オステオポンチンの中和抗体を用いた肝炎治療効果とその発症メカニズムの解析。第6回オステオポンチン研究会。(札幌), 5月29日, 2004.

2. 齋藤善也、今重之、小松康雄、デイオ宏燕、藤原幸雄、木村千恵美、大塚栄子、上出利光:Osteopontin siRNAを用いた疾患治癒効果の検討。第6回オステオポンチン研究会。(札幌), 5月29日, 2004.

3. 菅原武、松井裕、賈楠、岡本洋、今重之、小野塚久夫、秋野正敏、劉立志、森本純子 Susan R. Rittling, David Denhardt, 上出利光、北畠顕:アンギオテンシン負荷による心筋繊維化におけるオステオポンチンの役割。第6回オステオポンチン研究会。(札幌), 5月29日, 2004

4. H. Fukaura, S. Kon, T. Fukazawa, S. Kikuchi, T. Uede and H. Sasaki : OPN in CSF from patients with neurological diseases. 第6回オステオポンチン研究会。(札幌), 5月29日, 2004.

5. 山本宣哉、酒井文彦、今重之、森本純子、木村千恵美、山崎春美、岡崎郁子、関信男、藤井隆、上出利光:関節炎の病態形成におけるオステオポンチンエピトープの役割(基調講演), 第6回オステオポンチン研究会。(札幌), 5月29日, 2004.

宮崎忠昭

## 1. 論文発表

1. Miyazaki T, Shen M, Fujikura D, Tosa N, Kon S, Uede T, Reed JC., Functional role of death associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J. Biol. Chem.* 2004 279(43):44667-72.

2. Watanabe K, Saito K, Kinjo M, Matsuda T, Tamura M, Kon S, Miyazaki T, Uede T. Molecular dynamics of STAT3 on IL-6 signaling pathway in living cells.

*Biochem. Biophys. Res Commun.* 2004 26;324(4):1264-73.

3. Morimoto J, Inobe M, Kimura C, Kon S, Diao H, Aoki M, Miyazaki T, Denhardt DT, Rittling S, Uede T., Osteopontin affects the persistence of beta-glucan-induced hepatic granuloma formation and tissue injury through two distinct mechanisms. *Int. Immunol.* 2004 Mar;16(3):477-88.

## 2. 学会発表

1. 宮崎 忠昭、沈 敏、藤倉大輔、土佐 紀子、今 重之、上出 利光、John Reed 「DAP3のアポトーシス誘導における機能と役割」, 2004, 日本分子生物学会
  2. Tadaaki Miyazaki, Min Shen, Daisuke Fujikura, Noriko Tosa, Shigeyuki Kon, Toshimitsu Uede and John C. Reed, Functional role of DAP3 (death associated protein 3) in apoptosis, 2004, AAI meeting 発表
  3. 中島美都子、岩井淳、上出利光、宮崎忠昭 「BAFF受容体のシグナル伝達機構に参与するDMWD分子の同定と機能解析」 日本免疫学会 2004
  4. 岩井淳、中島美都子、上出利光、宮崎忠昭 「DMWD分子によるPyk2活性化を誘導するBAFF-Rのシグナル伝達機構」 日本免疫学会 2004
  5. 伊藤誠敏、藤倉大輔、上出利光、宮崎忠昭 「Toll-like receptor 4を介したシグナル伝達系におけるTLR4-binding proteinの同定とその機能解析」 日本分子生物学会 2004
  6. 岩井淳、中島美都子、上出利光、宮崎忠昭 「BAFFRを介するシグナル伝達機構の解析」 日本分子生物学会 2004
  7. 藤倉大輔、伊藤誠敏、熊谷知華、千葉聖子、上出利光、宮崎忠昭 「新規Death Receptor 6 (DR6) 会合分子CLIPR59の機能解析」 日本分子生物学会 2004
  8. 宮崎忠昭、沈敏、藤倉大輔、土佐紀子、今重之、上出利光、John Reed 「DAP3 (death associated protein 3) を介するアポトーシスシグナルの解明」 日本分子生物学会 2004
  9. 梅本貴央、宮崎忠昭、岩崎倫政、真島任史、三浪明男、上出利光 「虚血・再還流障害における血管内皮細胞のshear stressによるapoptosisに関する検討」 日本分子生物学会 2004
  10. 宮崎忠昭 北海道大学医系シンポジウム アジュバント免疫療法 100 周年記念シンポジウム「免疫系細胞および癌細胞における新規 death receptor シグナルの分子機構と役割」 清河信敬 1. 論文発表
1. Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J. Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma. *Modern Pathol* 17: 423-429, 2004.
  2. Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahashi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK hampers PLC- $\gamma$  2 phosphorylation

and Ca<sup>2+</sup> influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112: 575-582, 2004.

3. Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *J Cell Sci* 117: 3911-3922, 2004.

4. Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang WR, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* (in press).

2. 学会発表

1. 竹野内寿美, 清河信敬, 大喜多肇, 藤本純一郎. 糖脂質Gb3を介して伝達される細胞骨格系再構成の誘導刺激. 第93回日本病理学会, 札幌, 6月9-11日, 2004.

2. 清河信敬, 松井 翼, 竹野内寿美, 大喜多肇, 藤本純一郎. B前駆細胞性リンパ芽球性リンパ腫の診断マーカーとしてのCD179a/bの有用性. 第93回日本病理学会, 札幌, 6月9-11日, 2004.

3. 田口智子, 竹野内寿美, 大喜多肇, 清河信敬, 藤本純一郎. B前駆細胞の分化誘導に対するIGFBP-6の役割. 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会, 京都, 9月17日, 2004.

4. 竹野内寿美, 清河信敬, 塩沢祐介, 田口智子, 坂口佐知, 鈴木恭子, 斎藤正博, 大喜多肇, 藤本純一郎. 造血にかかわる血液-骨髄間質細胞間の接着に関する検討. 第20回小児がん学会, 第46回日本小児血液学会, 同時期開催, 京都, 11月21-23日, 2004.

5. 塩沢祐介, 清河信敬, 田口智子, 竹野内寿美, 坂口佐知, 鈴木恭子, 斎藤正博, 大喜多肇, 藤本純一郎. 正常骨芽細胞の造血支持能に関する検討. 第20回小児がん学会, 第46回日本小児血液学会, 同時期開催, 京都, 11月21-23日, 2004.

6. 田口智子, 清河信敬, 塩沢祐介, 竹野内寿美, 大喜多肇, 藤本純一郎. 正常ヒト骨髄CD34+細胞の分化誘導におけるIGF-IおよびIGFBP-3/6の作用. 第20回小児がん学会, 第46回日本小児血液学会, 同時期開催, 京都, 11月21-23日, 2004.

7. 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎. ヒトBLNK陰性pre-B細胞株の解析. 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 12月1-3日, 2004.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し