

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク 研究事業

ダイオキシン類の生体毒性発現機構の解析

平成14-16年度 総合(総括・分担)研究報告書

主任研究者 山下 敬 介

平成17年(2005年) 3月

殖をおさえることによって、口蓋突起の伸長を抑制する。このため、口蓋突起が水平位に転位しても、左右の突起の接触はおこらない。これによって、口蓋裂が誘発されることになる (Takagi et al., 2000)。

さらに、どういう遺伝子メッセージのカスケードが、口蓋突起の増殖を抑制し、口蓋裂を誘発するにいたるのかを明らかにするための実験を行った。方法は、上記、実験系を用いて、TCDD を同じ用量で、妊娠 12.5 日の C57BL/6J マウスに投与し、投与 6, 12, 24 時間後の胎児の口蓋部分の遺伝子メッセージの発現を、ディファレンシャル・ディスプレイ法、ディファレンシャル・スクリーニング法、cDNA マイクロアレイ法で見た。メッセージの検討には、投与 12 時間後が適当であることが判明したが、結局、うまくカスケードを描くには至らなかった。

AhR と類似した構造をもつタンパク (bHLH ドメインと PAS ドメインをもつ) をスクリーニングしている最中に、培養細胞系で、AhR の作用を抑制する働きをもつ、AhR 抑制因子 (AhR repressor, AhRR) がクローニングされた (Mimura et al., 1999; Baba et al., 2001; Mimura and Fujii-Kuriyama, 2002)。今回、この AhRR 遺伝子の欠損マウスが作製された (論文未発表、三村氏による参考日本語総説を添付しています)。

ダイオキシンをはじめとする芳香族炭化水素は細胞内に入ると、細胞質に存在する AhR と結合する。AhR は、核移行シグナルがオンになって、核に移行すると、AhR 核移行分子 (AhR nuclear translocator, Arnt と略) と結合し、AhR-Arnt ヘテロ二重体を形成する。AhR-Arnt は、DNA のダイオキシン反応配列 (Xenobiotic responsive

element, XRE と略) に結合し、種々の遺伝子発現を調節する。AhRR も発現が上昇する。AhRR は、さらに Arnt とヘテロ二重体を形成する。AhR-Arnt, AhRR-Arnt の両者が XRE を取り合うことによって、AhR の作用を拮抗的に阻害する。こうして、AhR の作用が AhRR によって抑制される結果、負のフィードバック・ループが形成される。

さて、AhRR 遺伝子を欠損したホモマウスにおいては、この負のフィードバック・ループの一翼が欠損することになり、リガンドを結合した AhR-Arnt 系の転写が促進され続けることが、予想された。ダイオキシンの口蓋裂誘発の実験系において、AhRR 欠損マウスでは、ダイオキシンの影響は強くなるのだろうか。結果は、「増強しない」であった。

## B. 研究方法

### 1) マウス

マウスは細谷らが作製した AhRR 遺伝子欠損マウスを用いた。メス AhRR<sup>-/-</sup>マウスをオス C57BL/6J にバッククロスし、AhRR<sup>+/-</sup>ヘテロマウスを得た。この AhRR<sup>+/-</sup>ヘテロマウスの雌雄を交配し、妊娠マウスを得た。胎児の遺伝子型はメンデルの法則に従って、AhRR<sup>-/-</sup>, <sup>+/-</sup>, <sup>+/+</sup> (野生型) が得られた。

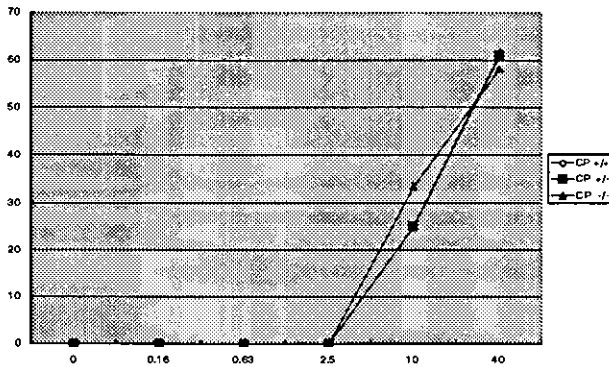
#### 1. TCDD 投与

妊娠 12.5 日の AhRR<sup>+/-</sup>マウスに、TCDD を公比 4 で、0 (溶媒), 0.156, 0.625, 2.5, 10, 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重の割合で 1 回投与した。各用量群に供した妊娠マウスは 7 母体とした。妊娠 18.5 日に母体を屠殺し、胎児の口蓋裂の有無、腎盂拡大の有無を観察した。胎児の尾から DNA を抽出して、AhRR の遺伝子型を判定した。各用量での胎児の遺伝子型別の口

蓋裂、腎盂拡大の頻度を計算した。

### C. 研究結果

TCDD 10, 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群の野生型胎児 (AhRR+/+) において、口蓋裂が観察され



た。AhRR+/-, -/-の胎児においては、口蓋裂の誘発率が AhRR+/+のそれと殆ど同じであった。AhRR 遺伝子型の違いと口蓋裂誘発との関係を示す結果を図に示す。横軸は TCDD の用量( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )を、縦軸は口蓋裂の誘発率(% per fetus)を表す。腎盂拡大については、予想とは逆に AhRR-/- 群が野生型群よりも誘発率が若干低いという結果が得られた。

### D. 考察

胎児の口蓋裂、腎盂拡大をエンドポイントにした場合、AhRR 遺伝子欠損マウスのダイオキシンへの感受性上昇は見られなかった。最初に想定した結果が得られなかったことについて、考察する必要がある。

野生型マウスにおいて、リガンド存在下で AhRR の発現は臓器によって異なる。さらに詳細に AhRR の発現を調べて、実験にのぞむ必要がある。

(参考文献)

Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y, Inazawa J, Sogawa K, Fujii-Kuriyama

Y (2001) Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem* 276: 33101-33110.

Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda

M, Katsuki M, 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.

Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13: 20-25.

Mimura J, Fujii-Kuriyama Y (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619: 263-268.

Takagi TN, Matsui KA, Yamashita K, Ohmori H, Yasuda M (2000) Pathogenesis of cleft palate in mouse embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 20: 73-86.

三村純正 (2004) 生体内における AhR シグナル伝達系の役割。生化学 76 (4): 359-362.

### E. 結論

AhRR 遺伝子を欠損したノックアウトマウスが作製された。この遺伝子ノックアウトホモマウス (AhRR-/-) においては、ダイオ

キシンのリガンドを結合した AhR-Arnt 系の転写が促進され続けることが、予想された。換言すれば、ダイオキシンの作用が増強することが予想された。

しかしながら、ダイオキシンの口蓋裂誘発の実験系において、AhRR 欠損マウスでは、ダイオキシンの影響は変化を受けなかった。

ダイオキシンの作用が AhRR-/- マウスで増強しなかった原因については、未だに明らかにできていない。

F. 健康危険情報  
特になし。

G. 研究発表  
(論文発表)

1) Morita M, Kobayashi A, Yamashita T, Shimanuki T, Nakajima O, Takahashi S, Ikegami S, Inokuchi K, Yamashita K, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y.

Functional analysis of basic transcription element binding protein by gene

targeting technology.  
Mol. Cell Biol. 23: 2489-2500 (2003).

Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T.

Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 318: 571-578 (2004).

(学会発表など)  
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

研究要旨

アリール炭化水素受容体、別名ダイオキシン受容体(Aryl hydrocarbon receptor, AhR)はダイオキシンと結合して、ダイオキシンによる毒性の発現に関与する。しかしながら、AhRの生体内リガンド(結合物質)は同定されていない。AhR遺伝子欠損マウスの表現型を解析することにより、AhRの生体内作用を解析できるはずである。この作業仮説のもとに、表現型解析を行った。AhR欠損ホモマウス(AhR<sup>-/-</sup>)マウスは加齢に伴い、背曲がりを起こしてくる。これは、AhR<sup>-/-</sup>マウスでは、エストロゲンが低値であるために、骨粗鬆症が誘発されるのではないかと推測された。そこで、メスの野生型マウスとAhR<sup>-/-</sup>マウスのそれぞれに卵巣摘出手術を施し、低エストロゲン状態を起こすことにより、骨粗鬆症がおこるかどうかを見た。まず、野生型マウスの卵巣を摘出することにより、骨粗鬆症を誘発することができ、骨粗鬆症モデルとなることが確認された。AhR<sup>-/-</sup>マウスの卵巣を摘出することによって、骨密度は一層低下することが明らかになった。このことは、AhR<sup>-/-</sup>マウスの背曲がり現象は、不完全なもので、卵巣摘出によって、一層の骨粗鬆症が起こることを意味した。無処置群のAhR<sup>-/-</sup>マウスの骨密度は、野生型マウスのそれよりも低値であることが予想されたが、両マウスの遺伝的バックグラウンドの相違により、その予想を証明することはできなかった。

A. 研究目的

ダイオキシンをはじめとする芳香族炭化水素は、細胞内でアリール炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor, 以下 AhR と略)を介して種々の毒性を発揮することが明らかにされてきた。AhRはbasic helix-loop-helix(bHLH)ドメインをもつ転写調節型の受容体である。

(目的)

アリール炭化水素受容体遺伝子欠損ホモ(AhR<sup>-/-</sup>)マウスを飼育している最中に、背曲がりマウスが見つかった。これは、骨粗鬆症によるものではないかどうかを検証する目的で実験を行った。

(実験デザイン)

野生型マウスに卵巣摘出手術を施すと、エストロゲン低下状態がおこる。エストロゲンの低下は、骨粗鬆症発症の要因であることから、椎骨と脛骨をマイクロCTで、骨密度を測定し、骨粗鬆症がおこることを確認する。これを基本的な実験系として用いる。

AhR<sup>-/-</sup>マウスを通常飼育していると、野生型と同等の骨粗鬆症が起こっているとすると、これは表現型として、遺伝子欠損により、骨粗鬆症が起こるといえる。さらにAhR<sup>-/-</sup>マウスに卵巣摘出手術を施すと、骨粗鬆症が一層重篤化するかどうかを確認する。一層重篤化するとなると、AhR<sup>-/-</sup>に表現型として見られる骨粗鬆症は、不完全なものであることが考えられ、AhR欠損以外にもエストロゲン代謝に関係する代謝経路があることが予想される。

B. 研究方法

(材料と方法)

7週齢のメスマウスを用いた。使用したマウスは、C57BL/6J:Jclは日本クレアから購入した。AhR<sup>-/-</sup>マウスは、Mimuraら(1997)が作製したマウスを継代したマウスを用いた。

1) 卵巣摘出手術

Roggiaら(2001)にならって、卵巣摘出手術を施した。ペントバルビタールによりマウスを麻酔した。開腹を行い、両側の卵巣を摘出

した。シャム手術群として、開腹は行ったが、卵巣は摘出しない実験群を設けた。シャム手術群は、開腹手術が実験結果に及ぼす影響を評価するための群である。各群 5 匹のマウスを用いた。

ア) C57BL/6J マウスをそのまま 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(野生型マウス無処置群)

イ) C57BL/6J マウスに卵巣摘出術を施して、その後 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(野生型マウス卵巣摘出群)

ウ) C57BL/6J マウスに開腹手術は行ったが、卵巣は摘出しないシャム手術を施して、その後 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(野生型マウスシャム手術群)

エ) AhR-/- マウスをそのまま 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(AhR-/- マウス無処置群)

オ) AhR-/- マウスに卵巣摘出術を施して、その後 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(AhR-/- マウス卵巣摘出群)

カ) AhR-/- マウスに開腹手術は行ったが、卵巣は摘出しないシャム手術を施して、その後 7 週間飼育して、その第 1 腰椎と脛骨を取り出した。(AhR-/- マウスシャム手術群)

## 2) 骨密度測定

6 群のマウスの胸椎と腰椎を連続した椎骨として摘出した。さらに、脛骨を摘出した。腰椎は、第 2 腰椎を測定に供した。第 1 腰椎であることを確認するために、肋骨と腰椎を一塊として摘出し、第 1 腰椎のみを測定の対象とした。骨は周囲の軟部組織を剥離し、ホルマリン固定した。測定したスライス断面は第 1 腰椎で頭側と尾側の 2 つのスライス、脛骨で骨幹端部と中央部の 2 つのスライスを用いた。

骨密度測定は、エルク・コーポレーション(〒113-0034 東京都文京区湯島 2 丁目 17 番 4 号) (<http://www.elkc.co.jp/business/bone.html>)に依頼した。

測定の方法は、pQCT 法(peripheral quantitative computed tomography)を用い

て骨密度を測定した(Ferretti, 2000)。基本的には、骨の海綿骨と皮質骨を区別して、それぞれ骨体積密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )を解析するものである。

## C. 研究結果

### 1) 野生型マウスにおける卵巣摘出が骨密度に及ぼす影響

野生型マウスに卵巣摘出を行うことにより、腰椎と脛骨の骨密度が有意に低下した。これは、卵巣摘出手術により、骨粗鬆症が誘発されたことを意味する(図 1、A から C、図には脛骨の結果のみを示す)。これにより、卵巣摘出術による、骨粗鬆症誘発の実験系が確立した。

### 2) AhR-/- マウスにおける卵巣摘出が骨密度に及ぼす影響

AhR-/- マウスに卵巣摘出を行うことにより、腰椎と脛骨の骨密度が有意に低下した(図 1、D から F、図には脛骨の結果のみを示す)。

### 3) 野生型マウスと AhR-/- マウスの腰椎と脛骨の骨密度の比較

両者の腰椎と脛骨の骨密度を、無処置群同士で比較した。両マウスでの骨密度は、腰椎および脛骨のそれぞれで、異なっていた。そのため、両マウス間での比較はできなかった。

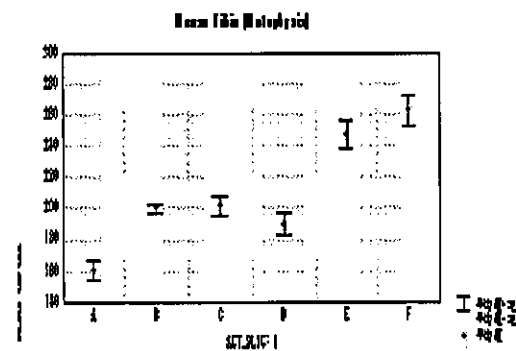


図 1. 脛骨の骨端部における海綿骨の密度の変化 (A から C は野生型マウス、D から F は AhR-/- マウスの脛骨)

A : 卵巣摘出をした野生型

B : シャム手術をした野生型

C : 無処置の野生型

D : 卵巣摘出をした AhR-/- マウス

E : シャム手術をした AhR-/- マウス

F : 無処置の AhR-/- マウス

## D. 考察

### 1) 野生型マウスにおける卵巣摘出が骨密度に及ぼす影響

野生型マウスに卵巣摘出手術を行うことにより、骨粗鬆症のモデルを作製することができた。

### 2) AhR-/-マウスにおける卵巣摘出が骨密度に及ぼす影響

AhR-/-マウスに卵巣摘出を行うことにより、骨密度は低下した。このことは、卵巣摘出により、低エストロゲン状態をおこすと、骨密度が低下することを意味する。

### 3) 野生型マウスと AhR-/-マウスの腰椎と脛骨の骨密度の比較

実験を行う前の作業仮説として、無処置群において、野生型マウスの骨密度よりも、AhR-/-マウスの骨密度が低いことが、AhR-/-マウスの骨粗鬆症の原因であるとの仮説を立てて、実験をおこなった。

しかし、実際に実験を行ってみると、結果は逆であった。無処置群の野生型マウスの骨密度が、AhR-/-マウスの骨密度よりも低いことが判明した。

これは、両マウスの遺伝的背景が異なることが骨密度に反映したことが考えられる。野生型として、今回は日本クレアから購入したC57BL/6Jを用いた。AhR-/-マウスは、作製された当初のマウスの AhR-/-マウスのオスとメスの交配により得られたマウスを実験に用いた。作製された当初のマウスの遺伝的背景としては、S129マウスと C57BL/6Jの両方の遺伝形質を持っていることが考えられる。

以上の問題点を解決するためには、野生型マウスと AhR-/-マウスの遺伝的背景を完全に一致させて、実験に臨むことが必須となる。

今年度の実験では、AhR-/-マウスのバッククロスが進まず、野生型マウスと AhR-/-マウスのバックが揃わなかったために、正確な比較ができなかった。

問題解決の具体策は以下の通りである。C57BL/6J:Jclを用いて、AhR-/-マウスを10世代以上にわたり、バッククロスする。10世代以上のバッククロスができた後、AhR+/-

マウス（ヘテロ型）同士を交配し、そのF1世代に AhR の遺伝子型が+/+（野生型）、+/-、-/-（ノックアウトホモ）のマウスを得る。このF1世代のマウスを用いて、本年度行った実験を同様に行う。これにより、AhR-/-マウスの腰椎と脛骨の骨密度は、AhR+/+マウスの腰椎と脛骨の骨密度と比較して、有意に低いことが証明できれば、AhR-/-マウスの表現型として、骨粗鬆症が見られることが結論できる。

## E. 結論

1) 野生型マウスを用いた卵巣摘出実験により、マウスの骨粗鬆症のモデルが作製された。  
2) AhR-/-マウスの卵巣を摘出することにより、骨密度はさらに低下した。このことは、AhR-/-マウスに見られた骨粗鬆症が完全なものではないことを意味する。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・ Sugihara K, Kitamura S, Yamada T, Okayama T, Ohta S, Yamashita K, Yasuda M, Fujii-Kuriyama Y, Saeki K, Matsui S, Matsuda T (2004) Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of microsomal drug-metabolizing enzyme activity by indirubin and indigo. BBRC 318: 571-578.

・ Fukui Y, Ema M, Fujiwara M, Higuchi H, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Nishimura T, Oi A, Ooshima Y, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, Tanimura T (2004) Comments from the behavioral teratology committee of the Japanese Teratology Society on OECD guideline for the testing of chemicals, proposal for a new guideline 426, developmental neurotoxicity study, draft document (September 2003). Cong. Anom. 44: 172-177.

### 2. 学会発表等 なし。

#### H. 参考文献

Ferretti JL (2000) Peripheral quantitative computed tomography for evaluating structural and mechanical properties of small bone. IN: (An YH, Draughn RA, eds) Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface. CRC; Boca Raton (FL), pp. 385-405.

Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, Ema M, Sogawa K, Yasuda M, Katsuki M, 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.

Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R (2001) Up-regulation of TNF-producing Tcells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13960-13965.

Parfitt AM, Drezner MK, Clorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *Journal of Bone and Mineral Research* 2: 595-610.

I. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



常に高いと思われる。そのような観点から、小児で増加しているアレルギーやアトピーの原因の一つとしてダイオキシン類をターゲットとして考え、その対応法を探るための基礎実験の必要性は非常に高く、社会的なニーズも高いと考えられる。大人でもアレルギー性の疾患は年々増加しており、ダイオキシン類との関係は無視できない。さらに、最近の再生医療が注目を集める中、造血幹細胞を用いた各種の再生医療の試み等も盛んになってきているが、この幹細胞がダイオキシン投与でどのような影響があるのかについてはほとんど報告が無い。本研究を遂行することで、小児のアレルギーやアトピーに対処する新しい方法論や幹細胞生物学に対する新しいアプローチ、再生医療への応用、などが生まれる基礎研究になることを目指した。

## B. 研究方法

ダイオキシン経口投与(1回)マウスを用い、胸腺のT細胞の分化過程の解析、および骨髄中の造血幹細胞の機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

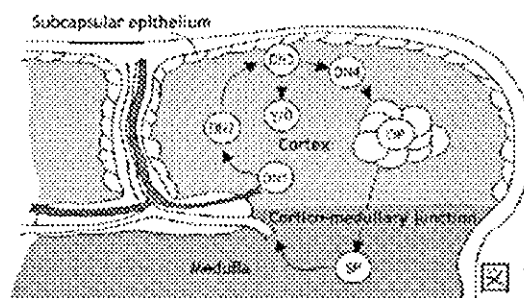
マウスを用いた実験は、広島大学動物実験指針に基づき実験計画書の審査がなされ、許可されたものであり、倫理面の審査も問題がなないとされた。

## C. 研究結果

### 実験1(胸腺萎縮)：

胸腺という器官はTリンパ球の発生・分化に重要な器官であるだけではなく、免疫系全体にとっても、「自己・非自己の識別」をリンパ球が学習する教育機関として非常に重要である。ここで正しく「自己同一性」を教育されなければ、外部からの感染症に対応出来なくなる。さらに

間違った教育(正・負の選択)から自己反応性リンパ球の排除が適切に行われないうちに、自己反応性リンパ球が末梢に出現し、自己組織を攻撃してしまう。これらの要因が重なった結果として、「感染症」「自己免疫疾患」「免疫不全」「アレルギー・アトピー」をとらえることが出来るため、これらの疾患との関係を考えるうえで、中心的な器官である。その胸腺の中で、



リンパ球は、図1の様に胸腺の中を移動しながら分化・成熟し、末梢・全身へと運ばれてゆく。さらに詳しくその分化段階を見ると下の図2の様に細胞の選択と運命づけの段階が判明してお

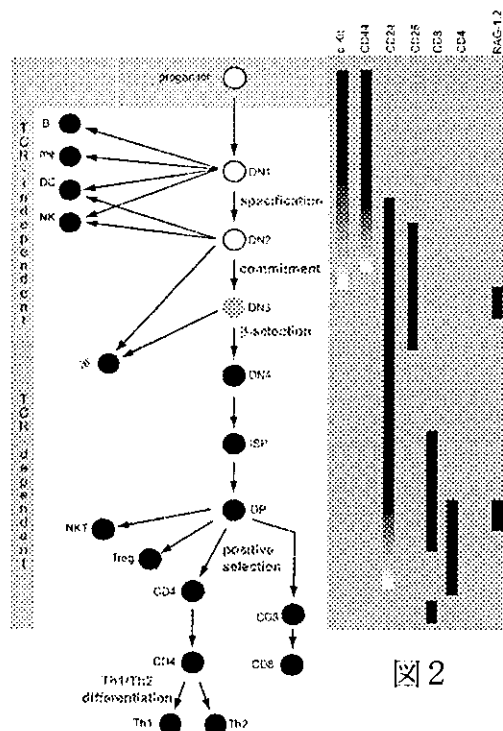


図2

り、ほぼ各段階ごとに細胞死のルートが設定されていると考えられている。

研究の経過：

ヒトの体内に普通にダイオキシンが入ってくるのと同じ経路（経口投与）でマウスに投与したときに、「マウス個体（特に免疫系）に何が起きているのか？」という事を正確に記述・解析することにフォーカスを絞った。免疫学的には、最近リンパ球の発生・分化に核内受容体ファミリーが重要な役割を果たしていることが少しずつ明らかになってきているが、AhRが胸腺内T細胞分化にどのような役割を果たしているのか、という点に研究の的を絞った（生体内のリガンドは不明?）。とにかく、ダイオキシンによる免疫不全（胸腺萎縮を含む）に関して、あまりにも様々な報告（中には間違った情報もある）がされている。実際、ダイオキシンによる胸腺萎縮、免疫不全の作用点は、「アポトーシス・細胞周期停止だ」としてin vitroの実験をしている論文・報告があるが、今回の我々の研究から、それは間違いである可能性が高くなった。

TCDDをただ1回、経口投与するだけで、3日後から胸腺の萎縮が始まり、回復するのに1ヶ月以上かかることがわかった（前年度参照、図3）。最

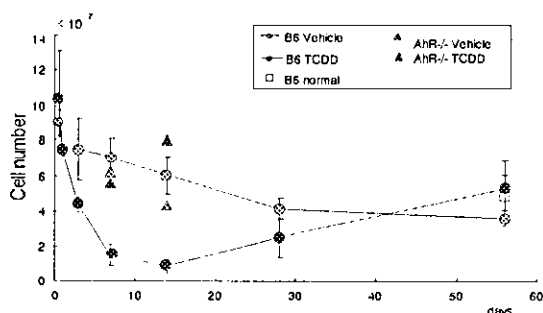


図3 細胞数の推移

も症状が顕著である3日—2週間の時期について、注目すると、この時期の胸腺は正常の1/10の大きさになり、遺伝子再構成を起こす分化段階(図2のDN3とDN4の間;)が最も影響が強い事などがわかった。このことから、DN3細胞で、pre-T CR シグナルが入り細胞増殖が起きるステージから後のT細胞分化段階においてTCDD投与による異常(細胞数の減少)が起こることが判明した。その分子機構としては、DN3細胞の増殖(またはサバイバル障害)と細胞死のバランスの破綻が起きていることが考えられた。

2) この時期のダイオキシンの作用点は細胞周期ではなく、細胞死調節機構であることが判明した。ダイオキシンによる胸腺細胞死は、DNA分断非依存性、Bcl-2非依存性(Bcl-2 Tgマウスでレスキュー出来ない)、Caspase非依存性、であるが、ミトコンドリア膜電位依存性、の細胞死であることが分かり、一般的「アポトーシス」とは異なるタイプの細胞死である事が分かった(データは示しません)。形態学的にも、電子顕微鏡観察を行ったところ、ミトコンドリアの膨化や、小胞体(ER)が空胞化している像が多く見られ、死細胞の割合も多かった。特にこのステップの細胞死はp53依存性の細胞死であることが判明しており、AhR依存性の細胞死の経路とp53依存性細胞死が交差している可能性が考えられた。

3) リセプター遺伝子欠損マウスにおいて同様の実験を行うと、胸腺萎縮が90%以上回復することから、ミトコンドリアの膜電位を介したCa

space非依存性の細胞死機構がAhR依存性である事が判明した。この経路・機構にAhRの標的遺伝子群が関与していると考えられた。この事は逆にいうと、この時期(図1 CD3のからCD4への移行期)にSubcapsularリンパ球が滞在しているリガンドが存在している可能性も唆している。細胞死の様式に関する検討は「考察」の所で述べる。

キシシン投与群(黒三角)の幹細胞分画はその能力をほとんど失っていた。この結果は単にダイオキシシン類が幹細胞の自己複製能をも標的にしているという毒性学的な観点だけでなく、AhRとその自然リガンド系が幹細胞の自己複製制御機構に関与していると考えることが出来る。最近の自己複製制御(不均等細胞分裂制御機構)との関係を「考察」で論じる。

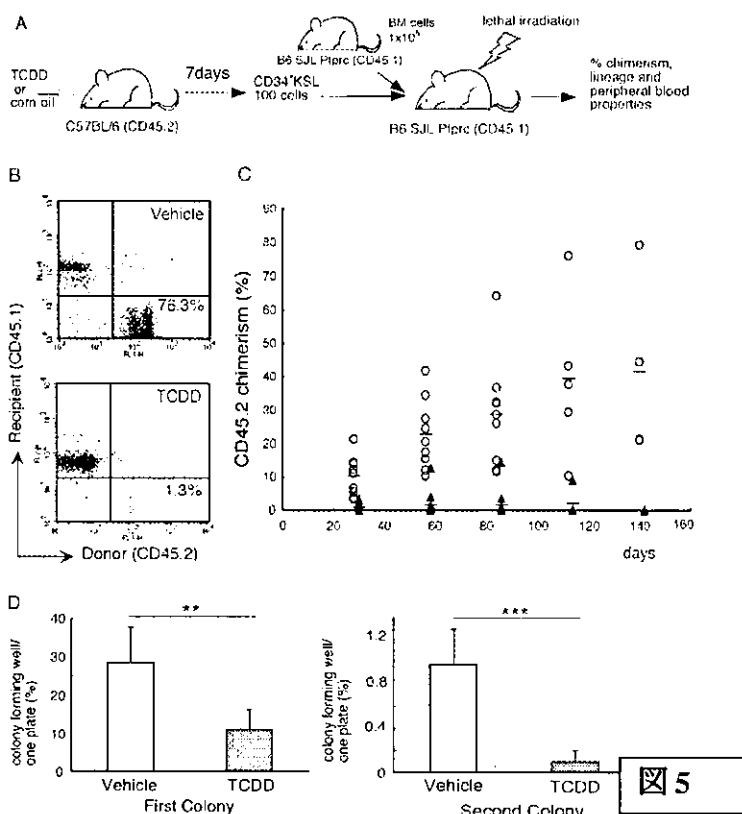
## 実験2 (造血幹細胞):

免疫系・血球系細胞の基になる

「造血幹細胞」に対するTCDDの影響は何であろうか? ほとんど報告がなされていないのが現状である。そこで、ダイオキシシン投与による造血幹細胞の機能を骨髓移植の実験系を用いて解析を始めた。その結果、表面マーカーは造血幹細胞であるが、まったく再構築能を失っていることが判明した(図5参照)。図

5Aの様に、ダイオキシシン経口投与1週間後のマウス骨髓より、CD34<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Lineage marker-negativeの造血幹細胞分画をFACS Vantage/ cell sor

terで単離し、その細胞100個を、致死量の放射線を照射し、血球系を破壊しておいたレシピエント・マウスに骨髓移植を行った。その後140日まで、観察し長期再構築能を検討した。図5Cのグラフで分かるように、コントロール群(白丸)は正常に血球系が再構築されたが、ダイオ

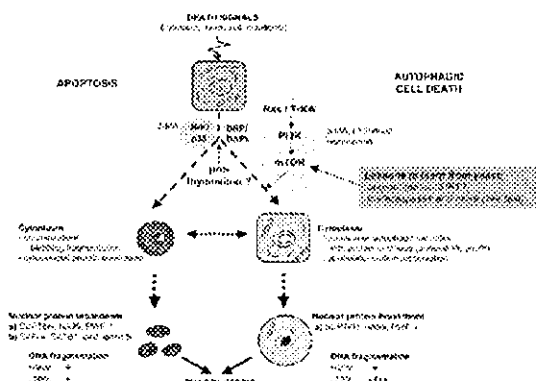


## D. 考察

### 実験1 (胸腺萎縮)

今回の研究から、AhR/Arnt系(またはTCDDの作用)は、T細胞のDiversity形成に重要なpreTCRからのシグナルを受

け取った後の細胞増殖 (beta-selection) を制御していることがわかった。少なくともそのシグナル伝達分子の遺伝子発現が AhR/Amt により制御されていることがわかった。結果的に免疫系の Diversity が正常よりかなり小さくなることから、自己免疫疾患・アレルギー との関係について無視できないことがわかった。また、その際に起きる細胞死はアポトーシスとは異なる細胞死であることが判明した。DAP-Kinase 群の発現上昇 (DNA Tip 解析の結果より)、電子顕微鏡を用いた細胞形態の解析、ミトコンドリア膜電位の変化 (MMP), などの解析結果を総合すると、「Autophagy」タイプの細胞死 (下図参照) が起きていると考えられる。この人工的制御技術の開発、または TCDD の作用を阻害する手段の開発につながる分子標的



を示すことが出来たと思う。

### 実験2 (造血幹細胞) :

この研究結果は、AhR/Amt を介して、造血幹細胞の自己複製能を制御できる可能性が存在する事を意味している。最近、ポリコム遺伝子群による造血幹細胞の不均衡細胞分裂の制御が自己複製能の制御に非常に重要であることが示され、AhR/Amt システムはそれらの遺伝子発現を制御している可能性が非常に高くなってきた。このことは将来的には患者自身の造血幹細胞を用いた再生医療を考える上で、そ

の人工的制御技術の開発という観点からは非常にインパクトが大きいと思われる。さらに TCDD が造血幹細胞の機能にも致命的な障害を与えているという、全く初めての研究結果なので、その意味でも初回的影響は大きいと思われる。

### E. 結論

ダイオキシン(TCDD)が免疫系・血球系にどのように作用しているのかと言う質問に、一部答えることが出来た。特に胸腺萎縮に関しては新しい作用点を発見できたし、造血幹細胞については機能障害を証明できた。このような変化が小児に多発しているアトピーやアレルギーの減員となることが十分に考えられた。作用点に分かることにより対策も可能になると考えられる。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

• Miyazaki M, Kawamoto H, Kato Y, Itoi M, Miyazaki K, Masuda K, Tashiro S, Ishihara H, Igarashi K, Amagai T, Kanno R, and Kanno M. Polycomb group gene mel-18 regulates early T progenitor expansion by maintaining the expression of Hes-1, a target of Notch pathway. *J.Immunol.* 174 : 2507-2516, 2005

• Kajiume T, Ninomiya Y, Ishihara H, Kanno R, and Kanno M The Polycomb group gene mel-18 modulates the self-renewal activity and cell-cycle status of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 32: 571-578, 2004

#### 2. 学会発表 など

(国外：シンポジウム・学会発表、など)

・ Masamoto Kanno<sup>1</sup>, Masaki Miyazaki<sup>1</sup>, Hiroshi Kawamoto<sup>2</sup>, Yuko Kato<sup>1</sup>, Manami Itoi<sup>3</sup>, Kyoko Masuda<sup>2</sup>, Takashi Amagai<sup>3</sup>, and Rieko Kanno<sup>1</sup>  
*POLYCOMB* GROUP GENE *MEL-18* CONTROLS NOTCH SIGNALING IN EARLY T-CELL PROGENITOR EXPANSION.

The 69th Symposium Epigenetics, Cold Spring Harbor Symposium, Cold Spring Harbor, NY, 2-7 June 2004

・ Masamoto Kanno<sup>1</sup>, Masaki Miyazaki<sup>1</sup>, Hiroshi Kawamoto<sup>2</sup>, Yuko Kato<sup>1</sup>, Manami Itoi<sup>3</sup>, Kyoko Masuda<sup>2</sup>, Takashi Amagai<sup>3</sup>, and Rieko Kanno<sup>1</sup>  
*POLYCOMB* GROUP GENE *MEL-18* CONTROLS NOTCH SIGNALING IN EARLY T PROGENITOR EXPANSION. CSHL meeting; Gene Expression & Signaling in the immune system, Cold Spring Harbor, NY, 28 April-2 May 2004

Masaki Miyazaki<sup>1</sup>, Hiroshi Kawamoto<sup>3</sup>, Yuko Kato<sup>1</sup>, Manami Itoi<sup>4</sup>, Kazuko Miyazaki<sup>5</sup>, Kyoko Masuda<sup>6</sup>, Satoshi Tashiro<sup>2</sup>, Hiroto Ishihara<sup>1</sup>, Kazuhiko Igarashi<sup>2</sup>, Takashi Amagai<sup>4</sup>, Rieko Kanno<sup>1</sup>, and Masamoto Kanno<sup>1</sup>  
*Polycomb* group gene *mel-18* controls Notch signaling in early T progenitor expansion. 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology Montreal Quebec, Canada 18-23 July 2004

Hiroko Inoue<sup>\*‡</sup>, Rieko Kanno<sup>\*‡</sup>, Ruriko Sakai<sup>\*‡</sup>, Saori Okamura<sup>†‡</sup>, Yuichi Ninomiya<sup>\*‡</sup>, Keisuke H. Yamashita<sup>†‡</sup> and Masamoto Kanno  
After Activation by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin, AhR Induces Developmental Defect in DN3 Thymocyte and Caspase-independent Cell Death 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology Montreal Quebec, Canada 18-23 July 2004

Teruyuki Kajiume a,b, Yuichi Ninomiya b, Rieko Kanno b, and Masamoto Kanno  
The Polycomb group gene *mel-18* modulates the self-renewal activity and cell-cycle status of hematopoietic stem cells by controlling *Hoxb4* expression Death 12<sup>th</sup>

International Congress of Immunology Montreal Quebec, Canada 18-23 July 2004

・ Masaki Miyazaki,<sup>\*</sup> Hiroshi Kawamoto,<sup>‡</sup> Yuko Kato,<sup>\*</sup> Manami Itoi,<sup>§</sup> Kazuko Miyazaki,<sup>¶</sup> Kyoko Masuda,<sup>||</sup> Satoshi Tashiro,<sup>†</sup> Hiroto Ishihara,<sup>\*</sup> Kazuhiko Igarashi,<sup>†</sup> Takashi Amagai,<sup>§</sup> Rieko Kanno,<sup>\*</sup> and Masamoto Kanno<sup>\*1</sup>  
Epigenetic Regulation in the Immune System: *Polycomb* group gene *mel-18* regulates early T progenitors expansion by maintaining the expression of *Hes-1*, a target of Notch pathway The Second International Symposium on COE "DNA Metabolism and Chromatin Dynamics in Cellular Responses" Hiroshima Japan, 16-17 Dec 2004

・ Masamoto Kanno<sup>1</sup>, Teruyuki Kijume<sup>1</sup>, Hideaki Tgami<sup>2</sup>, Mari Kimura<sup>1</sup>, Rieko Kanno<sup>1</sup>, and Yoshihiro Nakatani<sup>2</sup>  
Epigenetic regulation of tumorigenicity by Polycomb protein complexes Hiroshima Cancer seminar & Tottori Bioscience seminar/ International Symposium; Hiroshima Japan 30 Oct-1 Nov, 2004

M.Kanno Epigenetic Regulation on Immune System  
*POLYCOMB* GROUP GENE CONTROLS NOTCH SIGNALING IN EARLY T PROGENITOR EXPANSION; CSHL meeting; SYSTEM BIOLOGY Global Regulation of Gene Expression Cold Spring Harbor, NY, 17-20 March 2005

M.Miyazaki and M.Kanno. Stability of Polycomb protein complexes influences intrathymic T cell development during DN to DP transition. 4<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto Tcell Conference Shiran-Kaikan Kyoto Japan 8-10 April 2005

(国内：シンポジウム・特別講演)

・ 菅野雅元 ポリコム遺伝子群 *mel-18* による T 前線細胞の増殖制御 転写研究会 2004 年1月15-17日 筑波

・ 菅野雅元 井上洋子 チンパンジーを用いた、HCV 感染初期免疫応答の解析 血液事業研究会

・ 菅野雅元 ポリコーム遺伝子群mel-18による  
T前駆細胞の増殖制御 大阪大学 2004年8月  
2日

・ 菅野雅元 組織障害とアレルギー：Danger  
仮説と自然/獲得免疫系 シンポジウム3「気  
道感染とアレルギー・最近の知見」第41回日本  
小児アレルギー学会 都市センターホテル 2004  
年11月27日-28日

・ 宮崎正輝 河本宏 加藤裕子 宮崎和子 糸  
井マナミ 増田喬子 雨貝孝 菅野理恵子 菅野  
雅元 ポリコーム遺伝子群mel-18によるT前駆  
細胞の増殖制御 第27回日本分子生物学  
会ワークショップ W1Q免疫系細胞の発生分化の  
分子機構 神戸ポートアイランド 神戸 2004  
年12月8日-11日

#### 知的財産権の出願・登録状況

特になし

#### 研究協力者

井上洋子 (広島大学 医学部・教務員)

菅野理恵子 (広島大学 医学部・研究員)

要旨

酸性糖蛋白オステオポンチンは、組織リモデリングや炎症の制御などの多彩な局面で作用を示す細胞外マトリックスで、骨形成、線維化、冠動脈狭窄や腫瘍の転移に関する報告が多くみられる。横崎はオステオポンチンが7種類のインテグリンを受容体とすることから、オステオポンチンとインテグリンの相互作用に関して検討した。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。

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。 $\alpha$ サブユニットは18種類、 $\beta$ 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 $\beta$ 2サブユニット、LFA-1は $\alpha$ L $\beta$ 2、VLA-4は $\alpha$ 4 $\beta$ 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 $\alpha$ 4 $\beta$ 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- $\beta$ の活性化に必要であることが判明している。潜在型TGF- $\beta$ 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- $\beta$ に結合し、 $\alpha$ v $\beta$ 8はMT1-MMPを介してTGF- $\beta$ 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、トロンピ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ピンで消化しておく、もはや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 を含むトロンピ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、トロンピ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ができない、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

要旨

酸性糖蛋白オステオポンチンは、組織リモデリングや炎症の制御などの多彩な局面で作用を示す細胞外マトリックスで、骨形成、線維化、冠動脈狭窄や腫瘍の転移に関する報告が多くみられる。横崎はオステオポンチンが7種類のインテグリンを受容体とすることから、オステオポンチンとインテグリンの相互作用に関して検討した。まず、 $\alpha 9 \beta 1$ の他のリガンドであるトランスグルタミナーゼにより重合を受ける事に注目し、重合化オステオポンチンの作用を検討した。さらに、インテグリン $\alpha 9 \beta 1$ は生体では上皮も含め広く発現しているが、細胞株では限られたものみに発現がみられているため、発現調節機構に関して検討した。また、インテグリン $\alpha v \beta 6$ はTGF $\beta$ を活性化することが判明したが、オステオポンチンのこの機構への関与を検討した。これらより、オステオポンチンの多彩な作用は、リガンド側の翻訳後修飾とそれに関連した受容体の種類の変化によって制御される可能性が示された。

A. 研究目的

酸性糖蛋白オステオポンチンは、組織リモデリングや炎症の制御などの多彩な局面で作用を示す細胞外マトリックスで、骨形成、線維化、冠動脈狭窄や腫瘍の転移に関する報告が多くみられる。作用の多様性は、このマトリックスはサイトカインのクライテリアを満たしており、IL-28と提唱されたことから伺える。オステオポンチンの機能発現にはその受容体と結合することが必要であるが、少なくとも7種類のインテグリン、 $\alpha 4 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha 8 \beta 1$ 、 $\alpha 9 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ がこの分子の受容体として作用する事が知られている。多機能性は、少なくとも一部、これらの性質の違いに負っているものと考えられる。これらのうち多くはオステオポンチン内の Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を認識し結合する。 $\alpha 9 \beta 1$ はオステオポンチンがトロンピンに切断されて始めて結合するが、横崎はその配列をSVVYGLRと同定し、その配列のC-末端がトロンピン切断部位で、N-末側に隣接して

RGD配列が存在する

(..TYDGRGDSV**VYGLR**SKSKKF....)ことを示した(1)。このことより1)SVVYGLR配列はトロンピン切断によりはじめてインテグリンに認識され、2)ここにインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ が結合した場合RGDに結合するインテグリンは競合的に結合を解除する可能性を示した。従って、トロンピン存在下で $\alpha 9 \beta 1$ を介して受容体の切り替えが生じる可能性が考えられ(2)、オステオポンチンとインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ の相互作用の生物学的意義に興味もたれる。本年度、この点に関する興味深い2編の報告がなされた。一つはこの相互作用を阻害する事により、マウスのリウマチモデルで、関節滑膜細胞の増殖、骨のびらん、炎症性細胞の浸潤などが抑制されることが示された(3)。他の一編では、血管内皮細胞を3次元ゲルでこのSVVYGLRペプチドとともに培養すると著明な管腔形成を示す事が報告されている(4)。横崎はオステオポンチンがインテグリン $\alpha 9 \beta 1$ の他のリガンドであるトランスグルタミナーゼによ

り重合を受ける事に注目し、重合化オステオポンチンの作用を検討した。さらに、インテグリン $\alpha 9 \beta 1$ は生体では上皮も含め広く発現しているが、細胞株では限られたものみに発現がみられているため、発現調節機構に関して検討している。また、インテグリン $\alpha v \beta 6$ は TGF $\beta$ を活性化することが判明したが(5)、オステオポンチンのこの機構への関与を検討した(6)。

(関連論文)

1) Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schneider H, Higashiyama S, Saitoh Y, Yamakido M, Taooka Y, Sheppard D.

The integrin  $\alpha 9 \beta 1$  binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino terminal fragment of osteopontin. *J. Biol. Chem.* 274: 36328-36334 (1999).

2) Yokosaki Y, and Sheppard D.

Mapping of the cryptic integrin-binding site in osteopontin suggests a new mechanism by which thrombin can regulate inflammation and tissue repair. *Trend Cardiovasc. Med.* 10: 155-159 (2000).

3) Yamamoto N, Sakai F, Kon S, Morimoto J, Kimura C, Yamazaki H, Okazaki I, Seki N, Fujii T, Uede T.

Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 112: 181-188 (2003).

4) Hamada Y, Nokihara K, Okazaki M, Fujitani W, Matsumoto T, Matsuo M, Umakoshi Y, Takahashi J, Matsuura N.

Angiogenic activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 153-157 (2003).

5) Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D.

The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-328 (1999).

6) Yokosaki Y, Tanaka K, Yamashita K, Murakami I, Eboshida A, Sheppard D. Interaction of integrin  $\alpha v \beta 6$  with osteopontin, The international meeting of American Thracic Society, Orland, Florida, U.S.A. (2004).

## B. 研究方法

インテグリンとオステオポンチンの相互作用は、目的のインテグリンを遺伝子導入により発現させた細胞を用い、オステオポンチンでコートしたプレートへの接着性を観察した。オステオポンチンはリコンビナント GST 融合蛋白として大腸菌に産生させ、蛋白融解酵素で GST 部分を切り離して使用した。

## C. 研究結果

オステオポンチンはトランスグル民な一鎖より重合されたが、インテグリンとの結合性