

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	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	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

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: BAFF-R と会合する分子、DMWD は USP12 の安定化により NIK を介した NF- κ B2 活性化経路に関与し、Pyk2 の活性化を通じて PKC δ のリン酸化に関与する可能性が示された。また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とラフト刺激により発現誘導される遺伝子群の候補を特定し、バイオフラボノイドのアポトーシス誘導効果を検討した。

分担研究者

- (1) 北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター
バイオリソース部門 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・細胞生物学 清河信敬
- (3) 協和発酵工業株式会社・東京研究所 設楽研也

A. 研究目的

抗体産生を担う重要な免疫系の細胞である B 細胞は、外来抗原に対し有効な抗体を産生するクローンを選択的に増やすとともに、自己反応性抗体や低親和性抗体の産生クローンの除去するために、様々な分化・増殖制御のシグナル伝達機構を保有する。B 細胞における分化・増殖の異常は自己免疫疾患や B 細胞性の腫瘍の原因となり、B 細胞の制御に働くに様々なシグナル伝達機構を解明することはこれらの疾患に対する新規治療法開発へ結びつくものと考えられる。

BAFF (B-cell activating factor belonging to the TNF family; TALL-1, Bly5, THANK, zTNF4 と呼ばれている) は B 細胞の分化、増殖、生存に重要な役割を担っているサイトカインであり、そのノックアウトマウスは成熟 B 細胞の深刻な欠損を引き起こすことが知られている。一方、BAFF のトランスジェニックマウスは全身性エリチマトーデス(SLE)様の自己免疫疾患を発症することが知られ、また SLE 患者は健常人に比べ血中 BAFF 濃度が高いことが報告されていることから、過剰な BAFF シグナルが自己免疫疾患発症に関与している可能性が考えられている。BAFF-R(BAFF receptor, BR3 と呼ばれている)は BAFF のシグナルを細胞に伝える主要な受容体であり、その遺伝子欠損マウスである A/WySnJ マウス、およびノックアウトマウスは BAFF のノックアウトマウスと類似した表現系を呈することが知られている。

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あり刺激伝達の場合として重要な機能を持つことから注目されている。B 細胞においては B 細胞抗原受容体を中心とした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いる。

本研究では B 細胞の B 細胞の分化、増殖、生存に重要な役割を担っているサイトカインである BAFF のシグナルを主に伝達する受容体である

BAFF-R、および細胞膜上の動的なドメイン構造として B 細胞におけるクローン排除の刺激伝達に重要な場として存在するラフトについて詳細な解析を行うことにより、新たな B 細胞の分化・増殖異常に起因する疾患の治療法の開発につなげることを目的とした。

B. 研究方法

DMWD、および USP12 の cDNA はヒト B 細胞に由来する BJAB 細胞の total RNA より RT-PCR 法を用いてクローニングを行い、FLAG タグを有する発現プラスミドに挿入した。

DMWD の siRNA を恒常的に発現する BJAB 細胞は DMWD の発現を特異的に抑制する siRNA 発現ベクターと共にプラスチジン耐性遺伝子を有するベクターを直鎖化し、BJAB 細胞にトランスフェクションした後、プラスチジンによる選択を行い作製した。

内在性 DMWD の発現は大腸菌を用いて調整した組み換え DMWD タンパク質を抗原としたウサギ抗血清より精製した特異的抗体を用いた。また、活性化された NF- κ B2 分子、Pyk2 のリン酸化、および PKC δ のリン酸化の解析はそれぞれ特異的な抗体を用いて行った。

B 前駆細胞の分化誘導には骨髓 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) を用い、増殖した血球系細胞の表面抗原をフローサイトメトリーで解析した。

Affimetrix 社の GeneChip を用いた網羅的な遺伝子発現解析には抗 CD24 抗体添加によって刺激した Pre-B 細胞株 HPB-NULL より調製した RNA を用いた。

バイオフラボノイドによるアポトーシス誘導効果の検討には MitoCapture を用いたフローサイトメトリー解析によりミトコンドリア膜電位の解析、および活性化カスパーゼに対する特異抗体を用いたウェスタンブロット法により解析を行った。

C. 研究結果

BAFF-R を介したシグナル伝達機構の解明のため、酵母 two-hybrid 法により BAFF-R の細胞内領域と会合する分子として見出された DMWD に注目して解析を行った。

DMWD の糸状菌(*Aspergillus nidulans*)におけるホモログ、CreC タンパク質の機能に注目し、DMWD が脱ユビキチン化酵素 USP12(ubiquitin-specific protease 12)の安定化に機能し、ユビキチン-プロテアソーム分解系に関与する分子であることを明らかとした。BAFF-R のシグナル伝達経路においては重要な分子である NIK はそのタンパク質レベルが NF- κ B2 の活性化に重要である。また BAFF-R に会合する分子として知られる TRAF3 は E3 ユビキチンリガーゼとして NIK と会合し、NIK のユビキチン化とプロテアソームによる分解により NF- κ B2 活性化経路に対し抑制的に働くことが報告されている。これらのことから、DMWD が脱ユビキチン化酵素である USP12 の安定化を通じて TRAF3 による NIK の分解抑制に働き、NF- κ B2 の活性化に働くと考えられた。そこで HEK293T 細胞に NIK、DMWD、USP12 の遺伝子発現ベクターをトランスフェクションし、ウエスタンブロッティング法による解析を行ったところ、TRAF3 の発現による NIK の分解促進が DMWD の発現により抑制されること、DMWD と USP12 の共発現により遺伝子導入された NIK のタンパク質量が上昇することが明らかとなった。

一方、抗体アレイを用いて DMWD と会合する分子のスクリーニングを行った結果、チロシンキナーゼである Pyk2 が DMWD と会合することが明らかとなった。Pyk2 の活性化に関わるチロシン残基のリン酸化は DMWD の過剰発現によって亢進が認められた。BAFF-R を介したシグナル伝達経路において、PKC δ によるアポトーシス誘導阻害が注目されている。PKC δ と Pyk2 が会合し、Pyk2 のリン酸化に関与するとの報告から、それとは逆に PKC δ のリン酸化に Pyk2 が関与する可能性について検討を行った。その結果、Pyk2 の過剰発現により、PKC δ のチロシン残基リン酸化に亢進が認められることが明らかとなった。

大腸菌に由来する組み換え DMWD タンパク質を抗原とし、ウサギに免疫した抗体を作成した。この抗体を用いた解析によりタンパク質レベルでヒト B 細胞に由来する BJAB 細胞、および Ramos 細胞において内在性 DMWD が発現していることが明らかとなった。

DMWD の mRNA 配列より siRNA の配列をデザインし、siRNA 発現ベクターを構築した。その効果を検討した結果、DMWD の mRNA 配列上における 551 番目の塩基から始まる配列を標的配列とした siRNA 発現ベクターが有効であることが明らかとなった。この siRNA を恒常的に発現する BJAB 細胞はコントロールの siRNA を発現する BJAB 細胞と比べ有意に細胞増殖能が低下しており、またコントロールの siRNA を発現する BJAB 細胞において認められる恒常的な NF- κ B2 の活性化が抑制されていること、PKC δ のチロシンリン酸化が低下していることが明らかとなった。

骨髓間質細胞との共培養によるヒト骨髓 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ところマウス由来骨髓間質細胞株である MS-5 細胞が最も効率的に Pro-B 細胞を分化誘導し、この Pro-B 細胞の誘導には IL-7 や IGFBP-6 が必要であること、Oncostatin-M が増強作用を示すことが明らかになった。また MS-5 細胞に Jagged-1 を導入すると Pro-B 細胞の誘導を増強することが明らかとなった。さらにヒト骨髓 CD34 陽性細胞をあらかじめ SCF, Flt-3L, TPO, IL-7 添加で 48 時間培養後に MS-5 上に移すことによって Pro-B 細胞の誘導効率が高くなる可能性が示唆された。一方、支持細胞を用いない無血清培養による B 細胞の分化誘導では N-Cadherin, VCAM-1 を固相化したプレート上で、低濃度 SCF, IGF, TPO に IL-7 を添加して培養することによって数%の Pro-B 細胞の分化誘導が確認された。また Pre-B 細胞株である HPB-NUL に対して抗 CD24 単クローン抗体を結合させ、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を複数同定した。

大豆、柑橘類等に豊富に含まれ、抗酸化作用や抗がん作用があると考えられている Flavone を始めとする種々のバイオフラボノイドを B 前駆細胞株に添加し培養したところ、アポトーシス誘導効果が認められた。このアポトーシスは、バイオフラボノイドの濃度依存的にミトコンドリアの機能障害を介したカスパーゼの活性化に伴って誘導されると考えられた。バイオフラボノイドにはトポイソメラーゼ II (TOPOII) 阻害作用があることが報告されているが、TOPOII 阻害剤である VP-16 を用いて解析を行った結果、バイオフラボノイドによる B 前駆細胞株のアポトーシス誘導作用は TOPOII 阻害作用以外の機構が存在することが示された。

共同研究者である岡山大学薬学部中尾浩史博士によって樹立された抗 B 前駆細胞ラフト抗体についてフローサイトメトリーにより解析を行った結果、免疫原に用いた NALM-6 と、Pro-B 細胞株 NALM-16 の B 前駆細胞株 2 株のみと反応し、これ以外の B-lineage 細胞および他の系統の血球細胞株、また B 細胞を含む正常の末梢血液細胞とは反応しないことが明らかとなった。この抗体は B 前駆細胞の特定の集団のみを認識すると考えられることから、小児急性 B 前駆細胞性リンパ芽球性白血病における特定の病態を示す症例の識別に応用できる可能性が示された。

D. 考察

本研究の結果により DMWD が NIK の安定化を通じて NF- κ B2 の活性化に関与し、また Pyk2 の活性化を介した PKC δ のリン酸化亢進に関与する可能性が考えられた。

本研究において示された Pyk2 が介すると考えられる PKC δ のリン酸化が実際に PKC δ の核移行抑制に働くかについて、また DMWD の siRNA を恒常的に発現する BJAB 細胞において細胞増殖能に

低下が認められることが増殖中の細胞における突発的な細胞死によるものかについて解析を進める予定である。また BAFF-R と会合し、その機能抑制に働く分子として知られる TRAF3 と Act1 は BAFF-R と同様に B 細胞にとって重要な受容体として知られる CD40 とも会合することが報告されており、DMWD が CD40 を介したシグナル伝達経路に関与するかどうかについては今後の検討が必要な課題である。

DMWD の生理学的意義については今後ノックアウトマウスを用いた解析等を行い十分に検討する必要があると思われる。

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、ラフト刺激伝達系の分子機構の解明が期待される。一方、バイオフラボノイドに B 前駆細胞に対するアポトーシス誘導作用があることが明らかになり、ラフトの機能に対するバイオフラボノイドの作用について検討中である。

新たに樹立された抗 B 前駆細胞ラフト抗体は B 前駆細胞の特定の集団のみを認識することが明らかとなり、この抗体を用いて B 前駆細胞性リンパ芽球性白血病細胞の増殖に対する効果を検討する予定である。

E. 結論

BAFF-R と会合する分子として見出された DMWD は脱ユビキチン化酵素 USP12 の安定化を通じて、BAFF-R のシグナル伝達経路を負に制御する分子である Act1、TRAF3 による NIK のユビキチン化とプロテアソームによる分解を阻害し NF- κ B2 の活性化に働くと考えられた。また DMWD はチロシンキナーゼである Pyk2 の活性化と PKC δ のリン酸化に働く可能性が示唆された。これらのことから DMWD は BAFF-R のシグナル伝達経路において重要な経路である NIK を介した NF- κ B2 の活性化、および PKC δ のリン酸化とアポトーシス制御に働く可能性が示された。

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した。バイオフラボノイドに白血病に対するアポトーシス誘導効果があることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表 上出利光

1. J. Kadota, S. Mizunoe, K. Mito, H. Mukae, S. Yoshioka, K. Kawakami, Y. Koguchi, K. Fukushima, S. Kon, S. Kohno, A. Saito, T. Uede, M. Nasu : High plasma concentrations

- of osteopontin in patients with interstitial pneumonia. *Respir Med.* 99:111-117, 2005.
2. S. Taharaguchi, K. Yoshida, Y. Tomioka, S. Yoshino, T. Uede, E. Ono : Persistent hyperplastic primary vitreous in transgenic mice expressing IE180 of the pseudorabies virus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:1551-1556, 2005.
3. AC. Renkl, J. Wussler, T. Ahrens, K. Thoma, S. Kon T. Uede, SF. Martin, JC. Simon, JM. Weiss : Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation towards a Th-1 polarizing phenotype. *Blood.* 106:946-955, 2005.
4. S. Inomata, N. Shijubo, S. Kon, M. Maeda, G. Yamada, N. Sato, S. Abe, T. Uede : Circulating interleukin-18 and osteopontin are useful to evaluate disease activity in patients with tuberculosis. *Cytokine.* 30:203-11, 2005.
5. T. Sato, T. Nakai, N. Tamura, S. Okamoto, K. Matsuoka, A. Sakuraba, T. Fukushima, T. Uede, T. Hibi : Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response. *Gut.* 54:1254-1262, 2005.
6. A. Izawa, K. Sano, M. Takehara, M. Inobe, JI. Suzuki, H. Imamura, M. Takahashi, U. Ikeda, M. Isobe, T. Uede : Cre/loxP-mediated CTLA4IgG gene transfer induces clinically relevant immunosuppression via on-off gene recombination in vivo. *Cardiovasc Res.* 69:289-297, 2005.
7. P. Baumann, N. Cremers, F. Kroese, G. Orend, R. Chiquet-Ehrismann, T. Uede, H. Yagita, JP. Sleeman : CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Research.* 65:10783-10793, 2005.
8. T. Masunaga, K. Yamashita, H. Sakihama, T. Hashimoto, N. Hua, A. Imai, M. Inobe, T. Miyazaki, S. Todo, T. Uede : Dimeric but not Monomeric Soluble CD40 Prolongs Allograft Survival and Generates Regulatory T Cells that Inhibit CTL Function. *Transplantation.* 80:1614-1622, 2005.
9. T. Mori, M. Murakami, M. Okumura, T. Kadosawa, T. Uede, T. Fujinaga : Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. *J Vet Med Sci.* 67:51-56, 2005.

10. A. Izawa, K. Sano, M. Takehara, M. Inobe, J. Suzuki, H. Imamura, M. Takahashi, U. Ikeda, M. Isobe, T. Uede : Cre/loxP-mediated CTLA4IgG gene transfer induces clinically relevant immunosuppression via on-off gene recombination in vivo. *Cardiovasc Res.* 69:289-297, 2006.

宮崎忠昭

1. Nitta T, Nasreen M, Seike T, Goji A, Ohigashi I, Miyazaki T, Ohta T, Kanno M, and Yousuke Takahama Y: IAN family critically regulates survival and development of T lymphocytes "Role of IAN family in T lymphocyte development", *PLoS Biology* 2006 7;4(4).
2. Masunaga T, Yamashita K, Sakihama H, Hashimoto T, Hua N, Imai A, Inobe M, Miyazaki T, Todo S, Uede T: Dimeric but not monomeric soluble CD40 prolongs allograft survival and generates regulatory T cells that inhibit CTL function. *Transplantation.* 2005 15;80(11):1614-22.

清河信敬

1. Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J: Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* 29: 573-581, 2005.

設楽研也

なし

2. 学会発表

上出利光

1. N. Mori, T. Majima, N. Iwasaki, S. Kon, C. Kimura, K. Miyakawa, K. Tanaka, A. Minami, T. Uede : IN VIVO ANALYSIS OF OSTEOPTIN EXPRESSION AND FUNCTION IN FIBROBLAST DURING TENDON REMODELING CAUSED BY STRESS DEPRIVATION. 51th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Washington, D.C., February.20-23, 2005.
2. T. Miyazaki, A. Iwai, M. Nakashima, C. Kimura, T. Uede : The functional role of DMWD in BAFF-R mediated signal. *Experimental Biology* 2005, San Diego, April.2-6, 2005.
3. H. Diao, S. Kon, K. Iwabuchi, C. Kimura, L.V. Kaer, K. Onoe, D. Denhardt, S. Rittling, T. Uede : Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Experimental Biology* 2005, San Diego, April.2-6, 2005.
4. 今 重之、齋藤善也、上出利光 : オステオポンチンsiRNAによる癌・炎症性疾患治療効果の

検討。生体防御機能異常ワークショップ2005, 第2回香川ガレクチンカンファレンス香川大学機能糖鎖プロジェクト(香川), 6月9-10日, 2005.

5. 齋藤 善也, 今 重之, 上出 利光 : siRNA を用いたオステオポンチン遺伝子発現制御と疾患制御。第24回分子病理学研究会支笏湖シンポジウム(千歳), 6月16日-18日, 2005.
6. 藤倉大輔、伊藤誠敏、千葉聖子、上出利光、宮崎忠昭 : リンパ細胞の活性化を制御する新規TNF受容体ファミリー分子、DR6 (Death receptor 6) の細胞内シグナル伝達機構。第16回生体防御学会学術総会。(東京), 8月4-6日, 2005.
7. 岩井淳、上出利光、宮崎忠昭 : B細胞の生存に重要なBAFF-Rのシグナル伝達機構。第16回生体防御学会学術総会。(札幌), 8月4-6日, 2005
8. 今 重之、齋藤善也、上出利光 : オステオポンチンsiRNAによる癌・炎症性疾患治療効果の検討。第16回日本生体防御学会学術総会(東京), 8月4-6日, 2005.
9. 齋藤善也、今 重之、上出利光 : オステオポンチンsiRNAによる疾患治療効果の検討。第38回北海道病理談話会(札幌), 9月10日, 2005.
10. 北村 瑞、岩渕和也、北明大洲、北市伸義、南場研一、今 重之、大野重昭、上出利光、小野江和則 : マウス実験的自己免疫網膜ぶどう膜炎(EAU)におけるオステオポンチン(OPN)の役割。第38回北海道病理談話会(札幌), 9月10日, 2005.
11. 藤倉大輔、上出利光、宮崎忠昭 : 新規アポトーシス誘導受容体 Death-receptor-6 (DR6) を介した細胞内シグナル伝達経路の解析。第64回日本癌学会学術総会。(札幌), 9月14-16日, 2005.
12. D. Fujikura, T. Miyazaki, M. Ito, F. Perez, T. Kumagai, T. Uede : Functional analysis of CLIPR-59 as a novel binding protein to DR6 (Death receptor 6) The international 21st century COE symposium of BINDEC chemistry network (BINDEC 2005), (Osaka), Oct. 11-13, 2005.
13. 森 律明、眞島任史、岩崎倫政、今 重之、三浪明男、上出利光 : 力学的負荷軽減による腱・靭帯リモデリングにおけるOsteopontinの役割。第20回日本整形外科学会基礎学術集会。(三重), 10月20日, 2005.
14. 藤倉大輔、宮崎忠昭、伊藤誠敏、F. Perez, 熊谷知華、上出利光 : TNF受容体ファミリー分子 Death Receptor 6 (DR6) 会合因子 CLIPR-59の機能解析。第33回細胞情報伝達系北海道研究会。(札幌), 11月19日, 2005.
15. 岩井淳、上出利光、宮崎忠昭 : BAFF-Rと会合する新規分子、DWMDを介したシグナル伝達機構の解析。第28回日本分子生物学会年会(福岡), 12月7-10日, 2005.

16. M. Kitamura, K. Iwabuchi, N. Kitaichi, S. Kon, H. Kitamei, K. Namba, S. Ohno, T. Uede, K. Onoe : Investigation of the role of Osteopontin(OPN) in Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in mice. 第35回日本免疫学会総会学術集会 (横浜), 12月13-15日, 2005.
 17. D. Begum, M. Umemura, S. Kon, A. Yahagi, S. Harada, K. Ohshiro, T. Uede, G. Matsuzaki : Suppression of T cell response to bacterial antigens by exogenous osteopontin(OPN). 第35回日本免疫学会総会学術集会総会 (横浜), 12月13-15日, 2005.
 18. 藤倉大輔, 上出利光, 宮崎忠昭 : 新規アポトーシス誘導受容体 Death receptor 6 を介したシグナルの細胞内メカニズム。第35回日本免疫学会総会学術集会 (横浜), 12月13-15日, 2005
 19. H. Diao, S. Kon, K. Iwabuchi, L.V. Kaer, K. Onoe, T. Uede :Osteopontin as a Mediator of NKT Cell Function in T Cell-mediated Liver Diseases. 第35回日本免疫学会総会学術集会 (横浜), 12月13-15日, 2005.
 20. 岩井淳, 上出利光, 宮崎忠昭 : BAFF-R を介するシグナルに關与する DWMD の機能解析。第35回日本免疫学会総会学術集会 (横浜), 12月13-15日, 2005.
- 宮崎忠昭
1. 宮崎忠昭 : 「感染症研究の最前線」 「免疫系細胞の増殖と死の機構の解明による感染症の撲滅」 第609回獣医学研究談話会。 2005.4.12
 2. T. Miyazaki, A. Iwai, M. Nakashima, C. Kimura, T. Uede : The functional role of DWMD in BAFF-R mediated signal. Experimental Biology 2005, San Diego, April.2-6, 2005.
 3. 藤倉大輔, 伊藤誠敏, 千葉聖子, 上出利光, 宮崎忠昭 : リンパ細胞の活性化を制御する新規 TNF 受容体ファミリー分子, DR6 (Death receptor6) の細胞内シグナル伝達機構。第16回日本生体防御学会学術総会。 2005.8.4-6
 4. 岩井淳, 上出利光, 宮崎忠昭 : B細胞の生存に重要な BAFF-R のシグナル伝達機構。第16回日本生体防御学会学術総会。2005.8.4-6
 5. 藤倉大輔, 上出利光, 宮崎忠昭 : 新規アポトーシス誘導受容体 Death-receptor-6 (DR6) を介した細胞内シグナル伝達経路の解析。第64回日本癌学会学術総会。2005.9.14-16
 6. 宮崎忠昭, 上出利光 癌の増殖・転移の抑制を目指した新規 death receptor (DR) および anoikis のシグナル解明。第64回日本癌学会学術総会シンポジウム。2005.9.14-16
 7. D. Fujikura, T. Miyazaki, M. Ito, F. Perez, T. Kumagai, T. Uede : Functional analysis of CLIPR-59 as a novel binding protein to DR6 (Death receptor 6) The international 21st century COE symposium of BINDEC chemistry network (BINDEC 2005), (Osaka), Oct. 11-13, 2005.
 8. 若生武, 村田洋子, 川上奈都子, 宮崎忠昭 原田久士, 丸山光生 : アポトーシス関連因子であるDAP3とBIMの細胞老化における働き。第78回日本生化学会大会。2005.10.19-22
 9. 藤倉大輔, 宮崎忠昭, 伊藤誠敏, F. Perez, 熊谷知華, 上出利光 : TNF受容体ファミリー分子Death Receptor 6 (DR6) 会合因子CLIPR-59の機能解析。第33回細胞情報伝達系北海道研究会。2005.11.19
 10. 新田剛, 郷司敦史, 宮崎忠昭, 高浜洋介 : IANファミリー分子によるTリンパ球のアポトーシス制御。第28回日本分子生物学会年会。2005.12.7-10
 11. 村田洋子, 上川奈都子, 若生武, 宮崎忠昭, 丸山光生 : アポトーシス関連タンパク質 DAP3の細胞老化における関与。第28回日本分子生物学会年会。2005.12.7-10
 12. 岩井淳, 上出利光, 宮崎忠昭 : BAFF-R と会合する新規分子, DMWD を介したシグナル伝達機構の解析。第28回日本分子生物学会年会。2005.12.7-10
 13. 藤倉大輔, 上出利光, 宮崎忠昭 : 新規アポトーシス誘導受容体 Death receptor6 を介したシグナルの細胞内メカニズム。第35回日本免疫学会総会・学術集会。2005.12.13-15
 14. 岩井淳, 上出利光, 宮崎忠昭 : BAFF-R を介するシグナルに關与する DWMD の機能解析。第35回日本免疫学会総会・学術集会。2005.12.13-15
 15. 新田剛, 宮崎忠昭, 高浜洋介 : IANファミリー分子によるTリンパ球のアポトーシス制御。第35回日本免疫学会総会・学術集会。2005.12.13-15
 16. 宮崎忠昭 : 免疫系を中心とした宿主細胞の新規アポトーシス誘導機構。北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターオープニングセミナー。2005.12.19
- 清河信敬
1. 竹野内寿美, 清河信敬, 塩沢裕介, 北村紀子, 田口智子, 大喜多肇, 藤本純一郎. In vitroでの造血細胞の分化・増殖における接着分子の効果に関する検討。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 9月17-19日, 2005.
 2. 塩沢裕介, 清河信敬, 竹野内寿美, 北村紀子, 田口智子, 斎藤正博, 大喜多肇, 藤本純一郎. ヒト正常骨芽細胞の造血支持能に関する解析。第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 9月17-19日, 2005.
 3. 竹野内寿美, 清河信敬, 田口智子, 大喜多肇, 藤本純一郎. Jagged 1 の造血幹細胞と骨髄間

質細胞との共培養系における作用. 第 47 回
日本小児血液学会・第 21 回日本小児がん学会
合同総会, 宇都宮, 11 月 25-27 日, 2005.

4. 塩沢裕介, 清河信敬, 竹野内寿美, 田口智子,
齊藤洋平, 齋藤正博, 大喜多肇, 藤本純一郎.
CD34 陽性骨髄細胞と骨芽細胞との共培養系に
おけるサイトカインの作用. 第 47 回日本小児
血液学会・第 21 回日本小児がん学会合同総会,
宇都宮, 11 月 25-27 日, 2005.
5. 田口智子, 竹野内寿美, 塩沢裕介, 大喜多肇,
藤本純一郎, 清河信敬. ヒト骨髄造血幹細胞の
増殖に対する Oncostatin-M の作用. 第 47 回
日本小児血液学会・第 21 回日本小児がん学会
合同総会, 宇都宮, 11 月 25-27 日, 2005.

設楽研也

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社