

管閉鎖後の妊娠14日の投与により認められ、本研究の結果と類似している。このように各々の脳発達障害の臨界期の検討により、生後に発現する脳発達障害の特徴(例えば神経管閉鎖前後の胎児脳の障害は生後に社会性行動の異常を誘発し、神経管閉鎖後のある一定の期間は生後に多動性障害が発現するといったプロファイリング)が明らかにされるであろう。

ADHD(注意欠陥多動性障害の症状(多動性、集中力の低下)はドーパミン神経支配を受ける前頭葉新皮質回路の異常といわれており、ドーパミントランスポーター阻害作用をもつメチルフェニデートやドーパミン作動薬であるアンフェタミンが症状緩和に効果的である。さらに近年では脳の画像解析研究から、ドーパミンを多く含む脳領域(前頭葉皮質や背側線条体部位)がADHDの患児では健常児と比較して少ないことから、多動性障害とDAとの関連性が示唆されている(DA説)。動物実験ではラット新生児期6ハイドロキシドーパミン(6-OHDA)投与動物や、ドーパミントランスポーターノックアウト(DAT-KO)マウスが多動性障害モデルとして研究されている。そこで、本研究ではBrdU投与による胎児脳におけるドーパミン作動性神経発生への影響を検討した。その結果、ドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)陽性細胞の分布は、対照群とB-all群との間に明らかな差は観察されなかった。また、神経核が存在する中脳被蓋領域では、BrdU暴露による細胞死が発現しないことから、BrdUはドーパミン作動性神経の発生に影響を及ぼしていないことが示唆された。

我々がすでに実施しているマウスの単回BrdU投与実験から、ラットと同様な領域特異性のある細胞死の発現がマウス脳の神経上皮細胞にも確認されており、細胞周期の中期の特異的なマーカーであるリン酸化ヒストンH3免疫染色の結果から、BrdUには大脳皮質、乳頭体、小脳領域の神経上皮細胞の分裂を抑制することが示唆された(移動以降の過程にBrdUが影響するかは次のステップ)。今回、10週齢の剖検で観察された小脳重量の低下は、BrdU暴露直後の神経幹あるいは前駆細胞の分裂阻害の結果である可能性も考えられた。

今後は化学物質暴露直後の化学物質の神経発

生への影響を検討するとともに、生後に発現する多動性障害の程度(自発運動量の結果)及び成熟動物脳の病理学検査の結果を対応させ、遺伝子毒性物質誘発性脳発達障害の発現機構を体系的に評価する予定である。

E. 結論

今年度は胎生期BrdU暴露による多動性障害の臨界期を解析した。その結果、胎生期BrdU暴露誘発性の多動性障害の臨界期は、神経幹閉鎖後に比較的長く存在し、投与日数に依存することが明らかになった。また、暴露直後の胎児脳の所見から、BrdUはドーパミンニューロンの発生に重篤な影響は及ぼしていないことが示唆された。今後、さらなるデータの蓄積が必要ではあるが、化学物質暴露直後の胎児脳の観察は、生後の観察結果をバックアップしうるエンドポイントになりうるものと考えられる。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

G-1.

(1) 論文発表

- 1) Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J, Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod. Toxicol.* 18,109-20 (2004).
- 2) Kuwagata M, Muneoka K, Ogawa T, Takigawa M, Nagao T, Locomotor hyperactivity following prenatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine: neurochemical and behavioral evidence of dopaminergic and serotonergic alterations. *Toxicol. Lett.* 152, 63-71 (2004).
- 3) Ogawa T, Kuwagata M, Muneoka K, Shioda S, Neuropathological examination of fetal rat

brain in the 5-bromo-2'-deoxyuridine-induced neurodevelopmental disorder model. *Congenit. Anom.* 45, 18-26 (2005)

- 4) Ogawa T, Kuwagata M, Ruiz J, Zhou FC, Differential Teratogenic Effect of Alcohol on Embryonic Development Between C57BL/6 and DBA/2 Mice: A New View. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* (2005) 29, 855-863.

(2) 書籍

該当なし

(3) 雑誌

該当なし

G-2.学会発表

- 1) 2003 Abstract viewer and Itinerary Planner (33rd Society for Neuroscience, 2003, Nov. New Orleans) prog.no. 419.13., M Kuwagata, TA Powrozek, DL McKinzie, FC Zhou. Maternal factor on fetal alcohol spectrum disorder: Comparison of embryo culture versus uterus models.
- 2) Abstract Itinerary Planner ([http://SOT2005.abstractcentral.com./](http://SOT2005.abstractcentral.com/)) (43rd Society of Toxicology, Annual Meeting, 2004, Mar. Baltimore) M. Kuwagata, T. Ogawa, FC Zhou. Comparative study of alcohol teratogenic effect in C57BL/6 and DBA mouse embryos using the whole embryo culture.
- 3) Abstract Itinerary Planner (<http://SOT2004.abstractcentral.com./>) M. Kuwagata, T. Ogawa, KT. Muneoka, H. Ono, S. Shioda. Heterogeneous sensitivity of the embryonic nervous system to the genotoxic

agent BrdU in Mice. 44th Society of Toxicology, 2005, Mar. New Orleans. USA.

- 4) *Congenital Anomalies*, 45 (4), A26, 2005, M. Kuwagata, The behavioral approach in developmental neurotoxicology. (45th Japanese Teratology Society Annual Meeting, 2005, Jul., Tokyo)
- 5) *Congenital Anomalies*, 45 (4), A47, 2005, M. Kuwagata, T. Ogawa, S. Shioda, T. Nagata. The detection of the inhibition of the embryonic neural stem cell cycle after chemical exposure. (45th Japanese Teratology Society Annual Meeting, 2005, Jul., Tokyo)

- 6) *Neurotoxicology*, (in press) 2006, M. Kuwagata, T. Ogawa, S. Shioda
New approach for the effects of the toxic chemical exposure on the proliferation of embryonic stem cells in the developmental neurotoxicity study. (22th International Neurotoxicology Conference, Research Triangle, USA. 2005, Sep.)

H. 知的財産所有者権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし

Ambulation

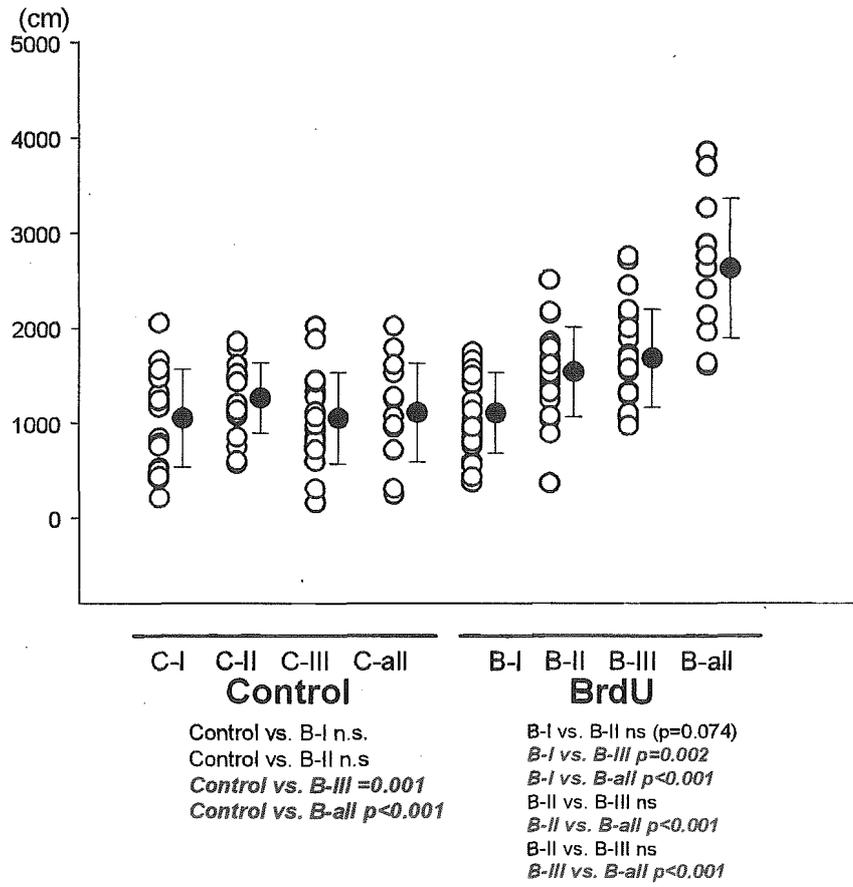


Fig.1 Locomotor activity in the open field test at 5 weeks of age

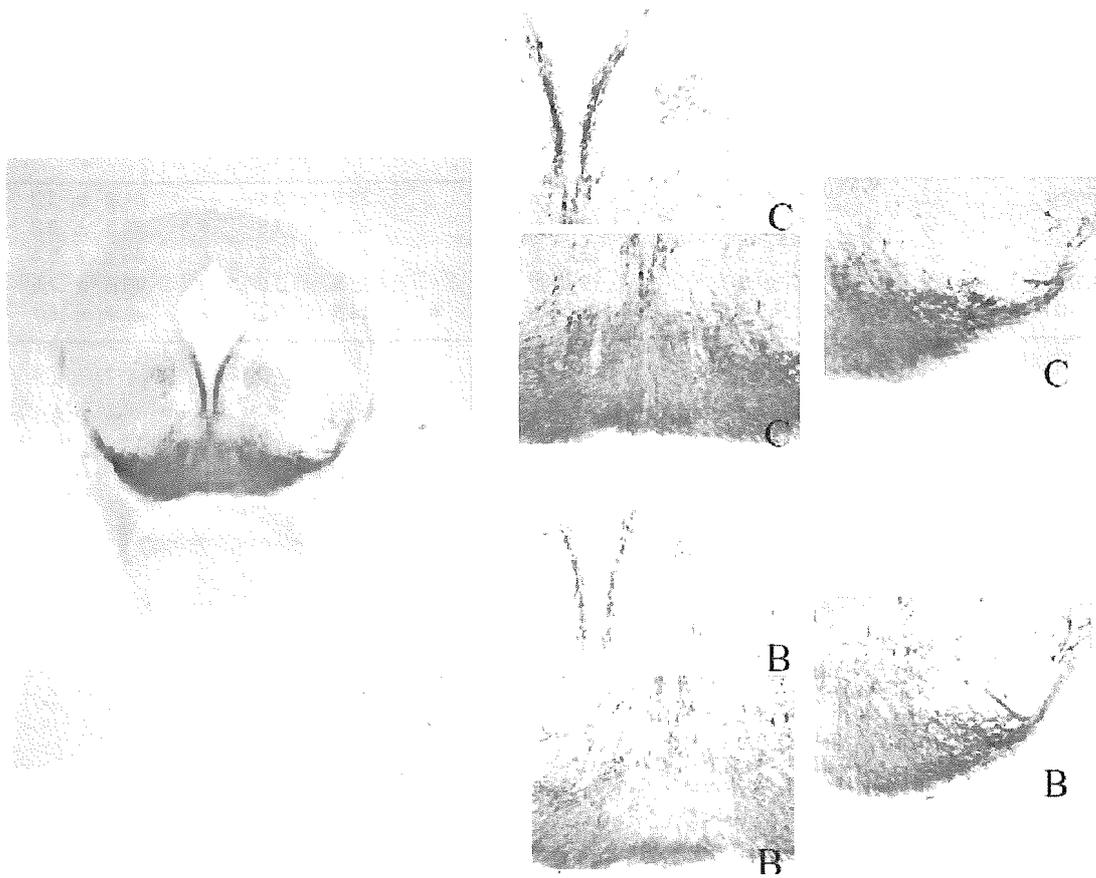


Fig.2 TH-positive reactivity in tegmentum area on the rat embryonic day.
C; control embryo, B; BrdU-treated embryo

Table 1 Body weight changes in male offspring treated prenatally with BrdU.

(1) Pre-weaning period

Groups	Number of litters	Postnatal day			
		1	7	14	21
Vehicle control	(22)	7.4 ± 1.1	18.4 ± 2.1	36.5 ± 3.4	61.6 ± 5.3
BI (GD9,10)	(6)	7.7 ± 1.2	17.3 ± 3.1	30.9 ± 1.5 *	59.8 ± 9.8
BII (GD11-13)	(6)	7.2 ± 0.3	16.5 ± 1.4	30.7 ± 1.7 *	50.1 ± 5.4 *
BIII (GD14,15)	(6)	8.1 ± 1.7	19.1 ± 2.7	38.5 ± 3.6	65.6 ± 7.5
Ball (GD9-15)	(4)	5.8 ± 0.6	13.0 ± 2.3 *	26.5 ± 3.2 *	42.4 ± 5.7 *

(2) Post-weaning period

Groups	Number of offspring	Weeks of age	
		5	10
Vehicle control	(69)	172.9 ± 17.4	431.1 ± 30.9
BI (GD9,10)	(23)	167.6 ± 28.9	413.5 ± 36.7
BII (GD11-13)	(21)	149.6 ± 18.4 *	362.2 ± 30.8 *
BIII (GD14,15)	(22)	169.3 ± 20.3	404.6 ± 50.0
Ball (GD9-15)	(16)	117.0 ± 9.4 *	296.4 ± 27.5 *

Value, mean±SD

*, p<0.05

Table 2 Brain weight in male offspring treated prenatally with BrdU.

Groups	Number of offspring	Terminal Body weight (10W)	Brain weight		Number of offspring	Telencephalon	Midbrain	Medulla + pons	Cerebellum	
			(g)	(g%)						
Vehicle control	(34)	431.1 ± 30.9	(g)	1.936 ± 0.187	(14)	(g)	1.010 ± 0.089	0.402 ± 0.067	0.211 ± 0.037	0.309 ± 0.035
			(g%)	0.451 ± 0.048		(g%)	51.94 ± 3.158	21.399 ± 3.270	10.828 ± 1.58	15.833 ± 1.043
BI (GD9,10)	(17)	413.5 ± 36.7	(g)	1.919 ± 0.049	(9)	(g)	0.960 ± 0.029	0.432 ± 0.036	0.206 ± 0.026	0.317 ± 0.048
			(g%)	0.488 ± 0.043		(g%)	50.47 ± 1.663	22.428 ± 2.029	10.676 ± 1.124	16.414 ± 2.385
BII (GD11-13)	(17)	362.2 ± 30.8 *	(g)	1.781 ± 0.089 *	(8)	(g)	0.930 ± 0.083 *	0.436 ± 0.042	0.179 ± 0.023	0.24 ± 0.023 *
			(g%)	0.485 ± 0.037		(g%)	51.82 ± 1.982	24.527 ± 2.521	10.063 ± 1.511	13.46 ± 0.582 *
BIII (GD14,15)	(17)	404.6 ± 50.0	(g)	1.818 ± 0.089 *	(8)	(g)	0.940 ± 0.061	0.445 ± 0.027	0.192 ± 0.033	0.27 ± 0.018 *
			(g%)	0.459 ± 0.075		(g%)	50.77 ± 1.165	24.172 ± 1.707	10.375 ± 1.256	14.686 ± 1.137
Ball (GD9-15)	(12)	296.4 ± 27.5 *	(g)	1.517 ± 0.094 *	(6)	(g)	0.800 ± 0.053 *	0.377 ± 0.031	0.182 ± 0.016 *	0.191 ± 0.018 *
			(g%)	0.542 ± 0.146		(g%)	52.12 ± 0.732	24.699 ± 1.383	10.67 ± 1.256	12.509 ± 0.512 *

Value, mean±SD

*, p<0.05

神経幹細胞系譜制御における化学物質の影響に関する研究

分担研究者 中島 欽一 奈良先端科学技術大学院大学 教授

研究要旨

本研究は神経幹細胞系譜制御に対する化学物質影響の分子基盤解明を目的としている。化学物質の中でもレチノイン酸(RA)とバルプロ酸(VPA)に焦点を絞り、その神経幹細胞分化における作用及び作用機序の解明を目指す。本年度の研究では、1)RAがES細胞の早期アストロサイト分化を誘導すること、2)RAが胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化をサイトカインLIFと協調して誘導すること、3)VPAが胎生期神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化を顕著に抑制することなどを明らかにした。今後はこれら各化学物質の新規な作用についてその機序解明に臨む。

A. 研究目的

本研究は上述のように化学物質の神経幹細胞系譜制御における影響の分子基盤の解明を目的とする。特に催奇形成を有するビタミンA(レチノイン酸)や明確な奇形を伴わない状況で自閉症を誘発するバルプロ酸の機能に着目する。マウス胚性幹細胞(ES細胞)や胎子及び成体神経幹細胞を用いた予備的実験では、レチノイン酸(RA)が神経幹細胞からアストロサイトへの分化時期を早めること、バルプロ酸(VPA)が成体神経幹細胞のニューロンへの分化を促進することなどを明らかにしている。このような作用及び作用機序を明らかにすることにより、化学物質の子どもの脳神経系への影響を予想・考察する上で基盤となる知見が集積できると考える。

間浮游培養した場合、胎生初期～中期の神経幹細胞に相当する神経幹細胞様細胞が誘導されるため、アストロサイト誘導性サイトカインLIFで刺激した場合にもアストロサイトへの分化は観察されない。しかしこの4日間の浮游培養中にRAを添加することで、LIFに応答したアストロサイトへの分化が見られるようになることが予備的実験において明らかになっている。分担研究者はこれらの結果と自身のこれまでの研究結果とを合わせて、このアストロサイト早期分化能獲得にDNAメチル化というエピジェネティックなゲノム修飾の関与を想定している。そこで本研究ではDNAのメチル化状態がRAによって実際に変化を受けることをbisulfiteシーケンスなどによって検討する。変化を受けている場合は分子生物学や細胞生物学の技術や知識を駆使しそのメカニズム解明に臨む。これと並行してRAが胎子神経幹細胞分化に及ぼす影響についても細胞種特異的抗体を用いた免疫染色法などにより検討する。VPAに関しては成体神経幹細胞のニューロン分化を促進することが分かっているものの胎子神経幹細胞に対する影響については不明である。そこで本研究では胎子神経幹細胞に対する影響

B. 研究方法

生体内の発生過程において神経幹細胞はニューロンへの分化がアストロサイトへの分化に先行する。本分担研究者らはマウスES細胞を用い、血清非存在下に浮游培養することで上記現象を再現できる*in vitro*の系を確立している。ES細胞を血清非存在下に4日

を成体神経幹細胞に対するそれと比較するとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現解析などを足掛りとしてその作用機序解明も試みる。

(倫理面への配慮)

本研究は奈良先端科学技術大学院大学の動物倫理委員会の規定に基づき行われるものである。

C. 研究結果

1. ES細胞から神経系細胞への分化におけるRAの影響: 我々は予備的実験においてRAがES細胞からの早期アストロサイト分化を誘導するという結果を得ている。さらに我々はアストロサイト特異的遺伝子GFAPプロモーターの転写因子STAT3結合配列は、神経幹細胞がアストロサイトへの分化能を獲得する胎生後期に脱メチル化を受けることを報告している。そこでRA処理したES細胞においてこのSTAT3結合配列を含む周辺領域のメチル化を調べたところ、コントロールと比較して脱メチル化が促進されていることが分かった。

2. RAの胎仔神経幹細胞分化における影響: 我々はRAの合成・分解酵素や受容体群が胎生期の脳でも発現していることから、RAの胎仔期神経幹細胞分化における影響も検討した。既にアストロサイトへの分化能を獲得したマウス胎生14日の神経幹細胞をアストロサイト誘導性サイトカインであるLIFと同時にRAで刺激したところ、相乗的なアストロサイト分化誘導が見られた。

3. 神経幹細胞分化におけるVPAの影響: 我々は以前にVPAが成体ラット神経幹細胞のグリア細胞(アストロサイトとオリゴデンドロサイト)への分化を抑制しつつニューロンへの分化を促進することを明らかにしている。本研究ではマウス胎生14日神経幹細胞に対してもVPAは同様の作用を発揮することを明らかにし

た。中でもオリゴデンドロサイトへの分化抑制作用が顕著であったため、そのメカニズム解明の足掛りとして、経時的にVPA処理した神経幹細胞から抽出したRNAを用いマイクロアレイ解析を行った。現時点までに、オリゴデンドロサイト特異的遺伝子の発現が免疫染色の結果と一致してVPA処理により抑制されることを確認している。

D. 考察

1. ES細胞から神経系細胞への分化におけるRAの影響: 我々はクロマチン免疫沈降解析から、RA処理によりDNAメチル化酵素群の一つ、Dnmt1のGFAP遺伝子プロモーターへの結合が減弱することを本研究において見出している。従ってRAによるES細胞からの早期アストロサイト分化誘導は、Dnmt1のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターへの結合が弱まることによって脱メチル化が促進されるためであると考えている。

2. RAの胎仔神経幹細胞分化における影響: 我々はクロマチン免疫沈降解析から、RA処理されたマウス胎生14日神経幹細胞ではGFAP遺伝子プロモーターのヒストンAセチル化が亢進されることを明らかにしている。さらにやはりクロマチン免疫沈降解析においてGFAP遺伝子の発現に必須なSTAT3のプロモーターへの結合が増強されることも確認している。これらの結果を総合して、RA処理により誘導されるヒストンAセチル化によってクロマチンが脱凝縮し、それによりSTAT3がGFAP遺伝子プロモーターへと結合しやすくなるため、LIFとRAによる相乗的なGFAP陽性アストロサイトへの分化が誘導されたものと考えられる。

3. 神経幹細胞分化におけるVPAの影響: マイクロアレイの結果でVPA処理によりオリゴデンドロサイト特異的遺伝子の発現が抑制されることは明らかにな

ったが、オリゴデンドロサイトの分化誘導に関わると考えられているいくつかの転写因子の発現はそれほど影響を受けていなかった。近年ヒストン脱アセチル化酵素が様々な転写因子のアセチル化状態を制御しその活性を調節しているという報告もあるため、オリゴデンドロサイトの分化誘導に関与する転写因子の翻訳後修飾を視野に入れた解析も考えている。

E. 結論

本研究によって RA や VPA が神経幹細胞分化制御に様々な影響を及ぼすことが明らかとなった。今後はそのメカニズムを詳細に解析することで、生物学的に興味深い発見や、ひいては化学物質の子どもの脳神経系への影響を予想・考察する上で基盤となるような概念の提示を目指したい。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

1. 滝沢琢己、中島欽一、組織間細胞の分化と DNA のメチル化、佐々木裕之、エピジェネティクス、シュプリンガー・フェアラーク東京(株)、東京(2004) 135-145

2) 雑誌

(#, Shared correspondence, *, Equal first authorship)

1. Abematsu, M., Smith, I. and Nakashima, K. (2006) Mechanisms of neural stem cell fate determination: extracellular cues and intracellular programs. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 1, 267-277.
2. *Muotri, A.R., *Nakashima, K., Toni, N., Sandler, VM. and Gage, F.H. (2005) Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18644-18648.
3. Yanagisawa, M., Nakashima, K., Ochiai, W., Takizawa, T., Setoguchi, T., Uemura, A., Takizawa, M., Nobuhisa, I. and Taga, T. (2005) Fate redirection of hippocampal

astrocytes toward neuronal lineage by aggregate culture. *Neurosci. Res.* 53, 176-182.

4. Shimosaki, K., Namihira, M., Nakashima, K. and Taga, T. (2005) Stage- and site-specific DNA demethylation during neural cell development from embryonic stem cells. *J. Neurochem.* 93, 432-439.
5. *Hsieh, J., *Nakashima, K., Kuwabara, T., Mejia, E. and #Gage, F.H. (2004) HDAC inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16659-16664.
6. Namihira, M., Nakashima, K. and Taga, T. (2004) Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in an immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett.* 572, 184-188.
7. Setoguchi, T., Nakashima, K., Takizawa, T., Yanagisawa, M., Ochiai, W., Okabe, M., Yone, K., Komiya, S. and #Taga, T. (2004) Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp. Neurol.* 189, 33-44.
8. Wurmser, A.E., Nakashima, K., Summers, R.G., Toni, N., D'Amour, K.A., Lie, D.C. and Gage, F.H. (2004) Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage. *Nature* 430, 350-356.
9. Kuwabara, T., Hsieh, J., Nakashima, K., Taira, K. and Gage, F.H. (2004) Small modulatory dsRNA-mediated neuronal fate specification of adult neural stem Cells. *Cell* 116, 779-793.
10. Hsieh, J., Aimone J.B., Kasper B.K., Kuwabara, T., Nakashima, K. and Gage, F.H. (2004) IGF-I instructs multipotent adult neural progenitors to become oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 164, 111-122.
11. Nakashima, K., Colamarino, S. and #Gage F.H. (2004) Embryonic stem cells: Staying plastic on plastic. *Nature Med.* 10, 23-24.
12. Shi, Y., Lie, D.C., Taupin, P., Nakashima, K., Yu, R.T., Gage, F.H. and Evans, R.M. (2004) The expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature*, 427, 78-83.
13. Takizawa, T., Ochiai, W., Nakashima, K. and Taga, T.

(2003) Enhanced gene activation by Notch and BMP signaling cross-talk. *Nucleic Acids Res.* 31, 5723-5731.

14. Zhao, X., Ueba, T., Christie, B. R., Barkho, B., McConnell, M.J., Nakashima, K., Lein, E.S., Eadie, B.D., Willhoite, A.R., Muotri, A.R., Summers, R.G., Chun, J., Lee, K.-F. and Gage, F.H. (2003) Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6777-6782, 2003.
15. Shimozaki, K., Nakashima, K., Niwa, H. and Taga, T. (2003) Involvement of Oct-3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development* 130, 2505-2512.
16. Takizawa, M., Nobuhisa, I., Igarashi, K., Ueno, M., Nakashima, K., Kitamura, T. and Taga, T. (2003) Requirement of gp130 Signaling for the AGM Hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 4, 283-289.

2. 学会発表

(国内学会)

1. 神山淳、黒見靖、瀬戸口廣貴、波平昌一、中島欽一：
メチル化 DNA 結合タンパク質による神経系細胞分化
可塑性制御機構の解析、第 28 回日本分子生物学会
年会、JAL リポート シーホークホテル福岡、2005 年
12 月 7 日-10 日
2. 瀬戸口廣貴[○]、波平昌一、青沼真、神山淳、中島欽一：
メチル化 DNA 結合タンパク質による神経系細胞分化
可塑性制御、第 28 回日本分子生物学会年会、JAL リ
ポート シーホークホテル福岡、2005 年 12 月 7 日-10
日
3. 波平昌一[○]、神山淳、青沼真、瀬戸口廣貴、田賀哲也、
中島欽一：Notch シグナルによる発生段階依存的な
神経幹細胞成熟機構の解析、第 28 回日本分子生物
学会年会、JAL リポート シーホークホテル福岡、
2005 年 12 月 7 日-10 日
4. 青沼真[○]、波平昌一、瀬戸口廣貴、神山淳、中島欽一：
レチノイン酸と LIF による神経幹細胞の相乗的アス
トロサイト分化誘導、第 28 回日本分子生物学会年会、

JAL リポート シーホークホテル福岡、2005 年 12 月 7
日-10 日

5. 波平昌一、神山淳、田賀哲也、中島欽一[○]：Accelerated
demethylation in an astrocyte specific gene promoter
mediated by Notch-signaling、第 48 回日本神経科学
会(福岡)大会、JAL リポート シーホークホテル福岡、
2005 年 9 月 28 日-30 日
6. 久保田亨[○]、中島欽一、西田幸二、田野保雄：
Mammalian Müller glial cells can be converted to a
neuronal lineage、第 48 回日本神経科学会(福岡)大
会、JAL リポート シーホークホテル福岡、2005 年 9
月 28 日-30 日
7. 中島欽一[○]：神経発生とエピジェネティクス。精神遅滞研
究ワークショップ、国立精神・神経センター研究所、
2005 年 9 月 24 日
8. 中島欽一[○]：神経幹細胞系譜制御機構とその応用。第 2
回安曇野循環器フォーラム、信州大学医学部附属病
院、2005 年 9 月 10-11 日
9. Fred.H.Gage[○]、桑原知子、Jenny.Hsieh、Hoonkyo Suh、
中島欽一、Chichung Lie：Epigenetic Regulation of
Adult Neurogenesis . 第 28 回 日本神経科学大会、
パシフィコ横浜、2005 年 7 月 26-28 日
10. 波平昌一[○]、青沼真、瀬戸口廣貴、神山淳、田賀哲也、
中島欽一：Notch シグナルによる DNA 脱メチル化
を介した神経幹細胞系譜制御機構の解析。第 28 回
日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2005 年 7 月
26-28 日
11. 瀬戸口廣貴[○]、波平昌一、青沼真、神山淳、中島欽一：
メチル化 DNA 結合タンパク質によるアストロサイト分
化制御機構の解析。第 28 回 日本神経科学大会、パ
シフィコ横浜、2005 年 7 月 26-28 日
12. 中島欽一[○]：神経幹細胞の分化制御メカニズムとその
応用。第 10 回 NAIST 産学連携フォーラム、関西経
済連合 29 階会議室、2005 年 7 月 7 日
13. 中島欽一[○]：エピジェネティクスが関与する神経系細胞

- 分化制御。大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪大学吹田キャンパス内蛋白質研究所一階講堂、2005年6月27-28日
14. 神山淳、黒見靖、波平昌一、Jenny.Hsieh, F.H. Gage, 中島欽一○:DNA methylation regulating neural cell fate specification. The 58 Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Omiya Sonic City, Saitama, Japan, June 15-17, 2005
 15. 波平昌一、神山淳、田賀哲也、中島欽一○:神経幹細胞多分化能獲得機構の解析。日本発生生物学会第38大会。仙台国際センター、2005年6月1-4日
 16. 中島欽一○:神経幹細胞分化とエピジェネティクス。創生応用医学研究セミナー、東北大学、2005年6月1日
 17. 波平昌一○、田賀哲也、中島欽一:発生段階依存的な神経幹細胞成熟機構の解析。第3回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、2005年4月21-23日
 18. 榎松昌彦○、鹿川哲史、福田信治、小宮節郎、中島欽二、田賀哲也:bFGFによる胎生期神経上皮細胞の背腹軸運命決定機構。第3回幹細胞シンポジウム、淡路夢舞台国際会議場、2005年4月21-23日
 19. 中島欽一○: エピジェネティクスが関与する神経幹細胞分化制御。第4回成体脳ニューロン新生懇談会、順天堂大学医学部、2005年2月5日
 20. 中島欽一○、Jenny Hsieh、桑原知子、Fred H.Gage : Valproic acidによる神経幹細胞のニューロン分化誘導。第27回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2004年12月8-11日
 21. 千々岩崇仁○、弟子丸正伸、信久幾夫、中島欽一、小川智久、服巻保幸、服部正策、小田-上田直子、大野素徳:ハブ毒ホスホリパーゼ A₂アイソザイムの島内及び島間多様性の比較。第27回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2004年12月8-11日
 22. 波平昌一○、中島欽一、田賀哲也:神経幹細胞系譜制御における発生段階・遺伝子領域特異的な DNA メチル化パターンの形成機構の解析。第27回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2004年12月8-11日
 23. 福田信治○、中島欽一、柳沢亮、吉村昭彦、田賀哲也:神経上皮細胞からアストロサイトへの分化におけるサイトカイン応答遺伝子の解析。第27回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2004年12月8-11日
 24. 落合和○、滝沢琢己、中島欽一、田賀哲也:胎生期の神経発生における AINT の役割。第27回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2004年12月8-11日
 25. 波平昌一○、中島欽一、田賀哲也:エピジェネティック制御による中枢神経幹細胞のアストロサイト分化制御機構。Neuro2004、大阪国際会議場、2004年9月21-23日
 26. 中島欽一○、Jenny Hsieh、桑原知子、田賀哲也、Fred Gage:ヒストン脱アセチル化阻害剤による神経幹細胞のニューロン分化誘導。Neuro2004、大阪国際会議場、2004年9月21-23日
 27. 落合和○、滝沢琢己、中島欽一、田賀哲也:胎生期脳における AINT の役割。Neuro2004、大阪国際会議場、2004年9月21-23日
 28. 中島欽一○:エピジェネティクスの関与する神経幹細胞系譜制御。第1回Neuroscience Frontier Research Conference(NEFRE)。シェラトン・リゾート・フェニックス・シーガイア ワールドコンベンションセンターサミット、2004年9月4-5日
 29. 植村篤実○、中島欽一、近藤亨、信久幾夫、鹿川哲史、田賀哲也:Homeobox 蛋白及び helix-loop-helix 型転写因子のクロストークによる中枢神経系の細胞系譜制御メカニズムの解析。第26回日本分子生物学会年会、神戸国際展示場、2003年12月10-13日
 30. 落合和○、滝沢琢己、中島欽一、田賀哲也:胎生期の神経分化における AINT の役割。第26回日本分子

生物学会年会、神戸国際展示場、2003年12月10-13日

31. 福田信治、滝沢牧子、波平昌一、近藤亨、中島欽一、田賀哲也[○]: Cell-fate determination in the developing brain governed by cross-regulatory interactions of transcriptional networks. 第26回日本生化学会大会シンポジウム“細胞分化の分子基盤”、パシフィコ横浜、2003年10月15-18日
32. 福田信治、滝沢琢己、波平昌一、近藤亨、中島欽一、田賀哲也[○]: 転写因子間相互作用とエピジェネティック修飾による中枢神経系の細胞系譜制御。第1回幹細胞シンポジウム、大阪千里ライフサイエンスセンター、2003年5月29日
33. 村松大[○] 吉田真子、中島欽一、宮本有正、久恒辰博: Neurogenin1 は神経幹細胞において Integrin $\alpha 5$ の発現を抑制する。2003年度日本農芸化学会、日本大学湘南キャンパス、2003年3月31-4月3日

(国際学会)

1. Namihira M.[○], Kohyama J., Aonuma M., Setoguchi H., Taga T. and Nakashima K. : Notch-induced acceleration of DNA demethylation implicated in fate specification of neural stem cells. KEYSTONE SYMPOSIA, January 19 - 24, 2006
2. Nakashima K.[○] : Notch signal-mediated DNA demethylation regulation the differentiatinal potential of neural stem cells. NAIST-CDB International Symposium, NARA-KEN NEW PUBLIC HALL, December 1-2, 2005
3. Aonuma M.[○], Namihira M., Setoguchi H., Kohyama J. and Nakashima K.: Retinoic acid cooperates with LIF to induce astrocyte differentiation of embryonic neural stem cells. NAIST-CDB International Symposium, NARA-KEN NEW PUBLIC HALL, December 1-2, 2005
4. Namihira M.[○], Kohyama J., Taga T. and Nakashima K. : Notch-induced DNA demethylation involved in fate determination of neural stem cells. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington Convention Center, November 12-16, 2005
5. Tanaka T.[○], Matsumura N., Muramatsu D., Nakashima K., and Hisatsune T. : Nestin-positive progenitor cells in adult neocortex. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington Convention Center, November 12-16, 2005
6. Hsieh J.[○], Jesseberger S., Clemenson D., Kuwabara T., Mejia E., Nakashima K. and Gage F.H. : Modulation of activity-induced neurogenesis: a new mechanism how antiepileptic drugs control seizures? Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington Convention Center, November 12-16, 2005
7. Smrt R.D.[○], Eaves J., Barkho B., Zhao C., Kuwabara T., Nakashima K., Gage F.H. and Zhao X. : Function of MeCP2 in postnatal neurogenesis and neural maturation. Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington Convention Center, November 12-16, 2005
8. Abematsu M., Namihira M., Nakashima K., Kagawa T. and T. Taga[○] : 3rd International Symposium on Basic Helix-Loop-Helix Genes. Regulators of Normal Development and Indicators of Malignant Transformation, Rome, Italy, May 9-10, 2005
9. Nakashima K.[○]: Epigenetic modification involved in fate determination of neural stem cells. Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Korea, May 13, 2005
10. Namihira M.[○], Taga T. and Nakashima K.: Indication of DNA demethylation-regulation fate switch of neural presursors in mouse fetal brain. KEYSTONE SYMPOSIA, February 10 - 15, 2005

11. Kuromi Y.[○], Kohyama J., Namihira M., Gage F.H., and Nakashima K.: Plasticity of neural cells restricted by methyl-CpG binding proteins. KEYSTONE SYMPOSIA, February 10 - 15, 2005
12. Nakashima K.[○]: Epigenetic modification regulating fate specification of neural stem cells. NAIST21st Century COE International Symposium, NARA-KEN NEW PUBLIC HALL, January 17-19, 2005
13. Kuromi Y.[○], Kohyama J., Namihira M., Gage F.H. and Nakashima K.: Neural cell plasticity regulated by methyl-CpG binding proteins. NAIST21st Century COE International Symposium. January 17-19, 2005
14. Matsumura N.[○], Ohta, A. Fukuda S., Muramatsu D., Sato Y., Nakashima K., Miyamoto Y. and Hisatsune T.: Adult neural progenitor cells from cortical gray matter retain differentiation potential for GABAergic neurons. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, October 23-27, 2004
15. Mira H.[○], Lie C.D., Nakashima K., Colamarino S.A., Lansford H.M., Dearie A.R. and Gage F.H.: Wnt and BMP signaling regulate neuronal commitment of multipotent adult neural progenitor cells. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, October 23-27, 2004
16. Nakashima K.[○]: Cytokine signaling and epigenetic modification involved in fate specification of neural progenitors. 19th Annual Meeting of the Experimental Biology Societies, Brazil, August 25-28, 2004
17. Hsieh J.[○], Aimone J.B., Kaspar B.K., Kuwabara T., Nakashima K. and Gage F.H. IGF-1 instructs multipotent adult neural progenitor cells to an oligodendroglial lineage. KEYSTONE SYMPOSIA "Stem Cells". Keystone, January 23-29, 2004.
18. Nakashima K.[○], Hsieh J., Kuwabara T. and Gage F.H.: HDAC inhibition-mediated neurogenesis of adult neural progenitors. KEYSTONE SYMPOSIA "Stem Cells", Keystone, January 23-29, 2004.
19. Hsieh J.[○], Aimone J.B., Kaspar B.K., Kuwabara T., Nakashima K. and Gage F.H.: IGF-1 instructive effect in the differentiation of adult multipotent neural stem cells to an oligodendroglial lineage. Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans, November 8-12, 2003.
20. Zhao X.[○], Ueba T., Christie B.R., Barkho B., McConnell M.J., Nakashima K., Lein E.S., Eadie B.D., Willhoite A.R., Muotri A.R., Summers R.G., Chun J., Lee K.-F. and Gage, F.H.: Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function. 4th Annual Rett Syndrome Symposium, Maltimore, June 23-25, 2003.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

平成17年度文部大臣表彰 若手科学者賞

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

自然免疫系の子どもの成長に応じた発達の分子基盤に関する研究

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨

生体の恒常性維持に重要な役割を果たす免疫系で、自然免疫系の活性化機構が近年明らかになった。しかし、自然免疫系の子どもの成長に応じた発達機構についてはまだ不明な点が多い。この自然免疫系の活性制御機構を解析した。大腸粘膜固有層に局在するマクロファージは、脾臓など他の組織由来のマクロファージと異なり、TLR リガンドに応答しない。しかし、慢性大腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウス由来の細胞は TLR リガンドに反応した。このメカニズムを解析するため、DNA microarray により両細胞間での遺伝子発現の差を解析した。その結果、正常の大腸粘膜固有層に局在する細胞特異的遺伝子として IkBNS を同定した。IkBNS をマクロファージ系細胞に発現させると、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に阻害された。RNAi によるノックダウンでは、逆に IL-6 産生が特異的に上昇した。さらに、IkBNS 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ところ、IkBNS ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、TLR 刺激により誘導される遺伝子の中で、IL-6 などの NF- κ B 依存性に3時間以降に遅れて誘導されてくる遺伝子の発現が有意に上昇していた。また TLR 刺激による NF- κ B の活性が遷延化し、刺激後3時間でも NF- κ B の活性が残存していた。さらに、dextran sodium sulfate の経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていった。以上の結果から、核に発現する IkB 分子 IkBNS が、NF- κ B の活性を抑制することにより自然免疫系の活性を制御し、個体レベルで腸管炎症抑制に関与していることが明らかになった。

A. 研究目的

生体の恒常性維持において、病原体などの外界異物の生体内侵入を非自己として感知し、排除する免疫系が重要な役割を果たしている。この免疫系は、大きく自然免疫系と獲得免疫系から成り立っている。外界異物を抗原として認識するリンパ球を主体とする獲得免疫系の活性化機構がこれまで詳細に解析されてきたのに比して、自然免疫系の活性化機構は永年不明のままであった。しかし、近年、病原体の構成成分を特異的に認識する Toll-like receptor (TLR)の機能解

析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになった。そして、TLR による病原体認識が、自然免疫系の活性化のみならず、抗原特異的な獲得免疫系の活性化をも制御していることが明らかになった。しかし、自然免疫系の子どもの成長に応じた発達機構についてはまだ不明な点が多い。そこで、本研究では、自然免疫系の活性を制御する分子機構を解析し、さらに子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を、マウスを用いて解析し、生体の恒常性維持に関わる自然免疫系の活性制御機構を明らかにする。

B. 研究方法

自然免疫系の活性制御機構を解析するためのモデルとして、自然免疫系の活性制御機構の破綻により慢性大腸炎を発症する、自然免疫系特異的 Stat3 欠損マウス、IL-10 ノックアウトマウスを用いた。

正常マウスの大腸の粘膜固有層には少数のマクロファージや樹状細胞が存在している。これらの細胞を大腸組織より単離することは極めて困難であって、これらの細胞の機能解析ができなかった。われわれは、この細胞群の単離法を確立し、高純度のマクロファージや樹状細胞を培養できるようになった。正常マウスの大腸の粘膜固有層由来の細胞は、IL-12 などの炎症性サイトカインを産生しない。一方、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや Stat3 変異マウスの大腸の粘膜固有層では、たとえ慢性腸炎を発症する前の若いマウスでも、マクロファージや樹状細胞の数が極めて増加しており、さらにこれらの細胞は IL-6, IL-12 などの炎症性サイトカインを産生することを明らかにした。この結果は、正常マウス大腸の粘膜固有層に存在するマクロファージや樹状細胞は、何らかの分子機構により不応答性になっていて過剰な炎症反応を抑制していることを示唆している。そこで、この分子機構を正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの細胞間で遺伝子発現の差を DNA microarray で解析する。そして得られた候補遺伝子をマクロファージに導入し、サイトカイン産生の変化を解析する。

その結果、核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が、正常マウスの細胞に選択的に発現していることを見いだした。I κ BNS をマクロファージ系細胞株に発現させると、LPS 刺激による TNF- α 産生は抑制しないが、IL-6 産生を抑制することを見いだした。そこで、I κ BNS の生理機能を明らかにし、この個体レベルでの役割を明らかにするため、ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

これまでに STAT3 をマクロファージで特異的に欠失させたマウスを作製し、STAT3 がマクロファージでの IL-10 シグナルに必須であり、マクロファージの機能抑制、さらには生体レベルで慢性炎症の抑制に必須であることを明らかにした。そして、病原体構成成分を認識する Toll-like receptor (TLR)ファミリーが、STAT3 非存在下でマクロファージの異常活性化による慢性腸炎の発症のトリガーとなることを、TLR4/STAT3 二重変異マウスの解析により明らかにした。さらに、IL-10 刺激によりマクロファージで誘導される Bcl-3 が、TLR 刺激依存性の TNF- α 産生を特異的に抑制していることを明らかにした。

さらに、大腸粘膜固有層に存在するマクロファージの機能を解析した。その結果、正常マウスの大腸粘膜固有層マクロファージは、TLR 刺激依存性の炎症性サイトカインの産生が認められないが、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや STAT3 変異マウス由来の細胞は TLR 刺激依存性に炎症性サイトカインを産生した。そこで正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの大腸粘膜固有層マクロファージ間で TLR 応答性が異なる分子機構を解析するため、両者間で遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイで解析した。その結果、Bcl-3 と同じ I κ B ファミリーに属する I κ BNS が Bcl-3 とともに正常大腸粘膜固有層マクロファージに特異的に発現していることを見出した。I κ BNS をマクロファージに発現させると、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に減少していた。さらに I κ BNS を発現した細

胞では、NF- κ B の DNA 結合能に障害が認められた。さらに、IkBNS は IL-6 プロモーターに p50 NF- κ B サブユニットと共に恒常的に会合していることがクロマチン免疫沈降法の解析から明らかになった。さらに、RNAi による IkBNS のノックダウンマクロファージでは、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に増加していた。

さらに、IkBNS の生理機能を解析するため、IkBNS ノックアウトマウスを作成した。IkBNS ノックアウトマウスは正常に出生し、外見上異常は認めなかった。IkBNS ノックアウトマウスより腹腔マクロファージを単離、あるいは骨髄由来樹状細胞を分化させ、TLR 刺激による TNF- α 、IL-6、IL-12 産生を解析した。その結果、IkBNS ノックアウトマウスでは、TNF- α 産生に変化はないが、IL-6、IL-12 産生が有意に亢進していた。次にこれら遺伝子の mRNA の発現誘導を real time RT-PCR 法で解析した。TNF- α mRNA の誘導は刺激後 1 時間以内に認められるが、この誘導パターンには正常マウスと IkBNS ノックアウトマウス間で変化はなかった。IL-6 mRNA は刺激後 3 時間から誘導がみられるが、3 時間までは両マウス間で差はなかった。正常マウスでは 3 時間以降 mRNA の発現量は低下するが、IkBNS ノックアウトマウスでは mRNA 量は高いままであった。他の遺伝子にも刺激後 1 時間以内の早期に誘導されてくる遺伝子 (IL-1 β , IL-12p19 など) と遅れて時間以後に誘導される遺伝子 (IL-12p40, IL-18 など) があるが、早期に誘導される遺伝子群の発現誘導パターンは両マウス間で差がないが、遅れて誘導されてくる遺伝子群は 5 時間以降 IkBNS ノックアウトマウスで有意に発現が高かった。次に、TLR 刺激によるまた TLR 刺激による NF- κ B の活性化をゲルシフト法、および NF- κ B p65 の細胞内局在により解析した。その結果、IkBNS ノックアウトマウスでは NF- κ B の活性が遷延化し、刺激後 3 時間でもまだ NF- κ B の活性が残存していることが明らかになった。次に、TNF- α 、IL-6 プロモーターへの NF- κ B p65 の会合をクロマチン免疫沈降法で解析した。TNF- α プロモーター

への p65 の会合は刺激後 1 時間をピークに観察され、これは正常マウスと IkBNS ノックアウトマウスの間で差は認められなかった。一方 IL-6 プロモーターへの p65 の会合は刺激後 3 時間をピークに正常マウスでは認められた。IkBNS ノックアウトマウスでも 3 時間までは正常マウスと同様に p65 の会合が誘導されたが、3 時間以降正常マウスでは p65 の会合が減少していくのに対し、IkBNS ノックアウトマウスでは持続したままであった。これらの結果から、IkBNS は刺激後遅れて誘導されてくる遺伝子のプロモーターにおいて選択的に NF- κ B の活性を抑制することにより、遺伝子発現を抑制していることが明らかになった。さらに個体レベルでも、LPS 投与によるエンドトキシンショックに対する感受性が高くなり、また dextran sodium sulfate の経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていた。

D. 考察

以上の結果から、大腸粘膜固有層に局在する自然免疫担当細胞は、通常過剰な炎症反応を抑制するため、TLR 刺激に不応答になっていること、そしてそのメカニズムの一端として、核に発現する IkBNS が、自然免疫系の細胞において NF- κ B の活性を抑制することにより、あるサブセットの遺伝子発現を抑制し、個体レベルで炎症抑制に関与していることが明らかになった。

E. 結論

大腸の粘膜固有層に局在する自然免疫系細胞は、TLR 刺激に応答しない。そしてその不応答機構の破綻が慢性炎症性腸疾患の発症のトリガーとなりうる。正常では、核に発現する IkB 分子 IkBNS が選択的に TLR 刺激依存性のサイトカイン産生を負に制御し、過剰な炎症の誘導を抑制している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: IkBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
2. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe, T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105-113 (2006).
3. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
4. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.: Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087-1095 (2005).
5. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
6. Yukawa, K., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Bai, T., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S., and Iso, H.: Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 16, 673-675 (2005).
7. Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., and Ito, T.: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175, 3354-3359 (2005).
8. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28 (2005).
9. Ohkawara, T., Takeda, H., Nishihira, J., Miyashita, K., Nihiwaki, M., Ishiguro, Y., Takeda, K., Akira, S., Iwanaga, T., Sugiyama, T., and Asaka, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 412-421 (2005).
10. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., and Moreno, E.: MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 73, 5137-5143 (2005).
11. Yang, S., Takahashi, N., Yamashita, T., Sato, N., Takahashi, M., Mogi, M., Uematsu, T., Kobayashi, Y., Nakamichi, Y., Takeda, K., Akira, S., Takada, H., Udagawa, N., and Furusawa, K.: Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1b, and TNF-a through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956-1964 (2005).
12. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T.: Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J. Immunol.* 175, 1177-1183 (2005).
13. Kitching, A. R., Turner, A. L., Wilson, G. R., Semple, T., Odobasic, D., Timoshanko, J. R., O'sullivan, K. M., Tipping, P. G., Takeda, K., Akira, S., and Holdsworth, S. R.: IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am.*

- Soc. Nephrol.* 16, 2023–2033 (2005).
14. Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H. 4th, Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B.: B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J. Immunol.* 174, 7912–7919 (2005).
 15. Yang, R., Wheeler, C. M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D. V., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79, 6741–6750 (2005).
 16. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S.: PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115, 951–958 (2005).
 17. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15, 819–825 (2005).
 18. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., and Kikutani, H.: Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22, 305–316 (2005).
 19. Hirotsu, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear IκB protein IκBNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650–3657 (2005).
 20. Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M.: MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* 40, 16–23 (2005).
 21. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M.: Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23, 252–263 (2005).
 22. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang, X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira, S.: STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 225–230 (2005).
 23. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 352–361 (2005).
 24. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73–78 (2005).
 25. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I. and Liesenfeld, O: Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur. J. Immunol.* 34, 3197–3207 (2004).
 26. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S.,

- Kaneda, Y., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther.* 11, 1753-1762 (2004).
27. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11, 1763-1771 (2004).
28. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
29. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem. AIAA.* 4, 3-11 (2005).
30. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
31. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
32. Hokuto, I., Ikegami, M., Yoshida, M., Takeda, K., Akira, S., Perl, A. T., Hull, W. M., and Whitsett, J. A.: Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 113, 28-37 (2004).
33. Into, T., Kiura, K., Yasuda, M., Kataoka, H., Inoue, N., Hasebe, A., Takeda, K., Akira, S., and Shibata, K.: Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- κ B activation. *Cell. Microbiol.* 6, 187-199 (2004).
34. 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.: Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64, 757-764 (2004).
35. Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., and Raz, E.: Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528 (2004).
36. 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.: Role of Stat3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* 10, 168-174 (2004).
37. Liu, B., Mori, I., Hossain, M. J., Dong, L., Takeda, K., and Kimura, Y.: Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Gen. Virol.* 85, 423-428 (2004).
38. Robben, P. M., Mordue, D. G., Truscott, S. M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L. D.: Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J. Immunol.* 172, 3686-3694 (2004).
39. 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.: 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 (2004).
40. Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., and Zychlinsky, A.: Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J.*

- Immunol.* 172, 4463–4469 (2004).
41. Li, Y., Ishii, K., Hisaeda, H., Hamano, S., Zhang, M., Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Hemmi, H., Takeda, K., Akira, S., Iwakura, Y., and Himeno, K.: IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther.* 11, 941–948 (2004).
 42. Ikushima, H., Nishida, T., Takeda, K., Ito, T., Yasuda, T., Yano, M., Akira, S., and Matsuda, H.: Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is down-regulated after operation. *Surgery* 135, 376–385 (2004).
 43. 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.: Interferon- γ production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes Infect.* 6, 339–349 (2004).
 44. Gorogawa, S., Fujitani, Y., Kaneto, H., Hazama, Y., Watada, H., Miyamoto, Y., Takeda, K., Akira, S., Magnuson, M. A., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y., and Hori, M.: Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 1159–1170 (2004).
 45. Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S.: The roles of two I κ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199, 1641–1650 (2004).
 46. Kishino, M., Yukawa, K., Hoshino, K., Kimura, A., Shirasawa, N., Otani, H., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Maeda, M., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Mune, M.: Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 1826–1834 (2004).
 47. Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Yamamoto, S., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saito, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Muta, T., Takeda, K., and Akira, S.: Regulation of Toll/IL-1 receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ B ζ . *Nature* 430, 218–222 (2004).
 48. Okamoto, M., Furuichi, S., Nishioka, Y., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S. U., Takeda, K., Akira, S., Ryoma, Y., Moriya, Y., Saito, M., Sone, S., and Sato, M.: Expression of Toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a Streptococcal preparation. *Cancer Res.* 64, 5461–5470 (2004).
 49. Yang, R., Murillo, F. M., Lin, K.-Y., Yutzy IV, W. H., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., and Roden, R. B. S.: Human papillomavirus type-16 virus-like particles activate complementary defense responses in key dendritic cell subpopulations. *J. Immunol.* 173, 2624–2631 (2004).
 50. Sato, N., Takahashi, N., Suda, K., Nakamura, M., Yamaki, M., Ninomiya, T., Kobayashi, Y., Takada, H., Shibata, K., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., Noguchi, T., and Udagawa, N.: MyD88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1 α . *J. Exp. Med.* 200, 601–611 (2004).
 51. Nakasone, C., Kawakami, K., Hoshino, T., Kawase, Y., Yokota, K., Yoshino, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Limited role for interleukin-18 in the host protection response against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect. Immun.* 72, 6176–6180 (2004).
 52. Yang, R., Murillo, F. M., Cui, H., Blosser, R., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce

- alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J. Virol.* 78, 11152–11160 (2004).
53. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I. and Liesenfeld, O: Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur. J. Immunol.* 34, 3197–3207 (2004).
 54. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther.* 11, 1753–1762 (2004).
 55. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11, 1763–1771 (2004).
 56. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73–78 (2005).
 57. Yamamoto, M., Takeda, K., and Akira, S.: TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* 40, 861–868 (2004).
 58. Takeda, K., and Akira, S.: TLR signaling pathway. *Seminar Immunol.* 16, 3–9 (2004).
 59. Takeda, K., and Akira, S.: Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34, 73–82 (2004).
 60. Akira, S., and Takeda, K.: Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511 (2004).
 61. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors: ligands and signaling. *Innate Immune Response to Infection* 257–270 (2004).
 62. Takeda, K., and Akira, S.: Biological roles of the STAT family in cytokine signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology* 166, 97–121 (2004).
 63. Akira, S., and Takeda, K.: Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* 327, 581–589 (2004).
2. 学会発表
 1. Kiyoshi Takeda, The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, 2005.5–20–25, San Diego, USA
 2. Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2005.7.28–30, Seattle, USA
 3. Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear I κ B proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005.9.28–10.2, Heidelberg, Germany
 4. Kiyoshi Takeda, Toll-like receptors for mucosal immunity (Invited) 2004 KOSEF-JSPS Asian Science Seminar, Development of Mucosal Vaccines, 2004.10.24–27, Seoul, Korea
 5. Kiyoshi Takeda, Role of TIR domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling pathways. International Workshop on The Immune System; Development, Activation, and Manipulation, 2004. 2.16–17, Tokyo
 6. Kiyoshi Takeda, Regulation of chronic intestinal inflammation by innate immune cells.