

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィotonics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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
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 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
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 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
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 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎藤嘉朗 …… 449
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 …… 466
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 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 龍兒 …… 566
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 …… 576

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
研究期間平成16年4月1日～平成19年3月31日

研究要旨: BAFF-R 会合分子である DMWD の解析を行い、DMWD が BAFF-R を介した主要なシグナル伝達経路に
関与する事を示した。また、抗 B 前駆細胞ラフト抗体 2E6 を作出し、本抗体が B 細胞株の特殊な株とのみ
反応する事を明らかにした。

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) オステオファーマ株式会社 洲鎌和茂
- (4) ジーンテクノサイエンス株式会社 前田 龍
- (5) 協和発酵工業株式会社 東京研究所 設楽研也

A. 研究目的

抗体産生細胞として液性免疫の中心的役割を担う B 細胞には、外来抗原に対し高い特異性を持った抗体を産生するクローンを効率的に増やすとともに、同時に発生してくる自己反応性抗体、あるいは低親和性抗体の産生クローンを排除するため、B 細胞抗原受容体 (BCR) を中心とした独自の増殖・分化制御の刺激伝達機構が存在する。この独自性に着目してその制御機構を分子レベルで解明し、得られた知見を基礎に B 細胞に対する選択的な新規増殖制御法を開発することによって、同細胞の分化・増殖の異常に起因する自己免疫疾患や B 細胞性腫瘍に対する新規治療法開発へと結びつくことが期待される。本研究課題においては、B 細胞において重要なシグナル伝達関連分子である BAFF-R および DAP3 に注目しそのシグナル伝達機構について解析を行った。また、BCR をはじめ、B 細胞表面の受容体を介したシグナル伝達経路の場として極めて重要な役割を担っているラフトに注目し、その機能解析を行った。

BAFF (B-cell activating factor belonging to the TNF family; TALL-1, Blys, THANK, zTNF4 と呼ばれる) は TNF (tumor necrosis factor) スーパーファミリーに属するサイトカインである。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) 様の症状を呈し、SLE 等の自己免疫疾患においても血清中の BAFF 濃度の上昇が認められることから、BAFF 刺激の異常は自己免疫疾患発症につながると考えられている。BAFF が会合し得る受容体としては BAFF-R (BAFF receptor; BR3 と呼ばれる)、TACI (transmembrane activator and CAML-interactor)、BCMA (B cell maturation antigen) が知られているが、これらのうち BAFF-R は BAFF のシグナルを支配的に伝達する受容体であると考えられている。従って BAFF-R を介したシグナル伝達機

構の解明により、BAFF が関与する自己免疫疾患発症の機構の解明、および自己免疫疾患に関わる新たな分子の発見が期待出来る。BAFF-R を介した BAFF のシグナルは NF- κ B の活性化を伴い、Bcl-2 の発現や IL-10 の産生等を通じて自己抗体産生 B 細胞を含めた B 細胞の生存に働くと考えられている。これまで BAFF-R を介したシグナル伝達経路の下流に位置する重要な分子として PKC- δ (protein kinase C δ) および NIK (NF- κ B inducing kinase) が報告されている。NIK は BAFF-R を介した NF- κ B の活性化に重要な役割を果たしていることが報告されている分子であり、非標準的な NF- κ B 活性化経路を介した NF- κ B2 の活性化に必須のキナーゼである。また PKC- δ は核移行により、ヒストン H2B のリン酸化亢進に働き、細胞にアポトーシスを誘導するキナーゼである。BAFF のシグナルにより PKC- δ の核移行が阻害されることから、BAFF-R を介したシグナル伝達機構に PKC- δ の核移行阻害とアポトーシス誘導阻害が重要な役割を果たしていると考えられている。一方これまで BAFF-R に会合する分子として Act1 (NF- κ B activator 1)、TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3)、が知られているが、これらは BAFF-R のシグナル伝達経路に対し阻害的に働く分子であり、Act1 は BAFF のシグナル依存的に TRAF3 を BAFF-R にリクルートし、TRAF3 は NIK を介した NF- κ B2 の活性化阻害に働く分子と考えられている。TRAF3 のノックアウトマウスは胎性致死であるが、NF- κ B2 遺伝子とのダブルノックアウトによりレスキューされること、また Act1 のノックアウトマウスにおいて B 細胞の異常増殖が認められることから、これらの分子は生理学的にも意義のある分子であると考えられている。しかしながら、これらの分子と競合して BAFF-R に直接会合し、NF- κ B2 の活性化に機能する分子についてはこれまで報告がなされていない。

本研究で酵母 two-hybrid法を用いてスクリーニングにより、BAFF-R と会合する分子として見出された DMWD (dystrophia myotonica containing WD repeat motif) は I 型の筋緊張性ジストロフィーにおいて CTG 反復配列の増大が認められる遺伝子座に存在することが報告された遺伝子である。I 型の筋緊張性ジストロフィー患者では DMWD の近傍に存在する DMPK (DM protein kinase) の mRNA' 非翻訳領域に位置する CTG 反復配列の増大と疾患の重症度に相関が認められてお

り、CTG 反復配列の増大した mRNA の発現そのものが疾患に関与しているとの報告から、I 型の筋緊張性ジストロフィーに対する DMWD の関与については低いものと考えられている。DMWD は機能的に未知のタンパク質であり、そのシグナル伝達機構についてはこれまで全く報告がなされていない。本研究では BAFF-R のシグナル伝達経路における DMWD 分子の機能について解明する事を目的とした。

ラフトは特定の脂質や脂質修飾タンパクが形成する細胞膜上の動的なドメイン構造で刺激伝達場として機能するが、特に B 細胞ではクローン排除の刺激伝達に関与することが明らかになっており、治療応用を目的とした B 細胞の分化・制御法開発における創薬のターゲットとしての期待が持たれる。そこで本研究では、B 細胞の増殖・分化制御の刺激伝達機構について、“ラフト”に着目した解析を行い、その成果を新たな B 細胞の増殖・分化制御法開発に応用することを目的とした。そこで BAFF を介する刺激伝達が、ラフトを介するアポトーシス誘導に及ぼす影響について検討した。また、B 細胞株のラフト成分を免疫して樹立した単クローン抗体の性状解析を行った。

B. 研究方法

BAFF-R の細胞内領域を bait とし、ヒト胎児脳の cDNA ライブラリーに対し酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングを行った。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った。免疫共沈降法を用いた会合性の解析およびリン酸化の解析にはそれぞれの特異的抗体を用いて行った。DMWD と会合するシグナル伝達分子の検索は FLAG タグを付けた DMWD をプローブとして用いた抗体アレイ法により行った。BAFF-R、DMWD の欠失変異体は PCR 法および制限酵素を用いて作製した。

USP12 を恒常的に発現する 293 細胞は Flp-In 発現システム (Invitrogen) を用いて樹立した。BJAB 細胞由来の BAFF-R を恒常的に発現する安定維持株は HA タグを付けた BAFF-R を発現するベクターに挿入されたネオマイシン耐性遺伝子を用いて選択し、樹立した。DMWD およびその欠失変異体を発現する安定維持株は、最も良く BAFF-R を発現している安定維持株のクローンを用いて、プラストサイジン耐性遺伝子をもつプラスミドを co-トランスフェクションし、プラストサイジンにより選択を行った。DMWD の siRNA を恒常的に発現する BJAB 細胞はヘアピンタイプの siRNA を発現するベクターを用い、プラストサイジン耐性遺伝子をもつプラスミドを co-トランスフェクションし、プラストサイジン耐性細胞を選択した。

IL-10 産生能の解析は ELISA 法により培養上清中の IL-10 濃度を測定する事により行った。NF- κ B の活性化および JNK の活性化は HEK293T 細胞を用い、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーター遺伝子アッセイにより解析を行った。

骨髄 CD34 陽性細胞 (米国 Clonetics 社からイン

フォームドコンセントを得た上で市販されているもの) をマウス骨髄間質細胞株 MS-5 と 4 週間共培養した。また、各種接着因子を培養プレートにコートし、種々の増殖因子を添加した無血清培地で同様の培養をおこなった。増殖した血球系細胞の表面抗原を各種 CD 抗原に対する単クローン性抗体を用いた蛍光染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。

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

種々の B 駆細胞株に各種バイオフィラノイドを添加し、ミトコンドリア機能の状況を MitoCapture を用いたフローサイトメトリー解析で、カスパーゼの活性化の状況を特異抗体によるイムノプロットで、アポトーシス誘導効果の検討を行った。

BAFF-R の発現はフローサイトメトリーを用いた免疫蛍光染色法によって測定した。アポトーシスの誘導は蛍光標識アネキシン-V を用いてフローサイトメトリーにより測定した。ラフト画分の分離は細胞株膜抽出蛋白からショ糖密度勾配超遠心法により行った。調整したラフト画分をマウスに免疫し、常法により抗体産生ハイブリドーマの作成およびクローニングを行った。得られたハイブリドーマをヌードマウスの腹腔内に接種し、腹水より抗 IgM アフィニティーカラムを用いて単クローン性抗体を精製した。

C. 研究結果

酵母 two-hybrid 法を用いたスクリーニングの結果、陽性クローンとして 28 クローン、12 種の遺伝子が得られた。これらの分子について蛍光抗体法を用いた細胞内局在と免疫共沈降法による BAFF-R 会合性の解析を行った。その結果より細胞質に局在が認められ、機能ドメインとして WD40 リピートを持つ DMWD (dystrophia myotonica containing WD repeat motif) に注目し、解析を進めることにした。

BAFF-R の細胞内領域の欠失変異体を発現するプラスミドを構築し、DMWD との会合領域について免疫共沈降法により解析を行った。その結果、DMWD と BAFF-R の会合には BAFF-R の C 末端側 8 アミノ酸残基に相当する領域が必要である事が明らかとなった (図 1.)。C 末端 8 アミノ酸領域を欠失した BAFF-R はその機能の大部分を失う事から、DMWD が BAFF-R を介したシグナル伝達機構において重要な機能を持つ可能性が示唆された。また DMWD の全長から 3 分の 2 以上のアミノ酸を欠く、316-509 アミノ酸領域の欠失変異体も野生型 DMWD と同様の会合様式を示した。

B 細胞由来の培養細胞株である BJAB 細胞を用いて BAFF-R を恒常的に発現する安定維持株を樹立した。この安定維持株に対して可溶性の BAFF の刺激を加え、培養上清中に産生される IL-10 を ELISA 法により解析を行った。その結果 DMWD の欠失変異体

である DMWD 316-509 を発現する細胞群で IL-10 産生の抑制が認められた(図 2. A.)。

本研究において BAFF-R と会合する分子として見出された DMWD は種を越えて極めて良く保存がなされている分子であるが、数多くの種に存在する DMWD のホモログにおいて、その機能が明らかにされているものは糸状菌(*Aspergillus nidulans*)における CreC タンパク質のみである。CreC 遺伝子は *A. nidulans* においてカタボライト抑制に関与し、CreC の下流において脱ユビキチン化酵素として機能する CreB タンパク質の PEST 配列に会合し、CreB タンパク質のプロテアソームによる分解抑制に機能すると報告されている。このことから、ヒト DMWD もタンパク質の安定化に関与する分子であると考えられている。また *A. nidulans* における CreB に相当する脱ユビキチン化酵素もヒトに存在し、USP12 (ubiquitin specific protease 12)として知られている。このことから USP12 の遺伝子クローニングを行い、ヒト培養細胞中で DMWD と USP12 の会合能について解析を行った。その結果、DMWD と USP12 は細胞内で会合能を有することが明らかとなった(図 3. A.)。また、FLAG タグを付けた USP12 タンパク質を恒常的に発現する細胞に対し、DMWD をトランスフェクションすると、DMWD のタンパク質量依存的に USP12 のタンパク質量が上昇することが明らかとなった。このことはヒトにおいても DMWD が脱ユビキチン化酵素の安定化に寄与するという機能が保存されている事を示している(図 3. B.)。

BAFF-R のシグナル伝達経路において NIK は NF- κ B2 の活性化に必須なキナーゼであり、重要な役割を果たしている。これまでに NIK は常にプロテアソームによる分解を受けており、BAFF の刺激によりその分解が抑制されると考えられている事、また NIK のプロテアソームによる分解抑制が NF- κ B2 活性化に必須であるという事が報告されている。このことから BAFF-R を介したシグナル伝達経路には NIK の分解抑制に働く分子が重要であることが予想され、DMWD が脱ユビキチン化酵素である USP12 を介して TRAF3 による NIK の分解抑制と NF- κ B2 の活性化に機能している可能性が考えられた。そこで TRAF3、DMWD を NIK と共に HEK293T 細胞で発現させ NIK のタンパク質量について検討を行った。その結果、TRAF3 の発現により NIK の分解が促進されるが、この分解促進は DMWD の発現により抑制される事が明らかとなった(図 4. A.)。次いで DMWD と USP12 を NIK と共に HEK293T 細胞で発現させそのタンパク質量について検討を行った。その結果、USP12 の共発現により NIK のタンパク質量が上昇する事が明らかとなった(図 4. B.)。これらの事から、DMWD が脱ユビキチン化酵素である USP12 の安定化に働き、NIK の脱ユビキチン化とプロテアソームによる分解抑制に機能すると考えられた。また DMWD の mRNA 発現を特異的に抑制する siRNA を恒常的に発現する BJAB 細胞を用いた解析では、DMWD の siRNA 発現によって、NIK のタンパク質量および恒

常的な NF- κ B2 活性化が抑制されていた(図 2. B.)。DMWD と会合性を示すシグナル伝達関連分子を抗体アレイを用いて検索を行った。その結果、脳および血球系の細胞で特に発現が認められるチロシンキナーゼ、Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2; CAK- β 、RAFTK と呼ばれる)が DMWD と会合性を示す事が明らかとなった(図 1. A, B.)。Pyk2 の活性化は自己リン酸化部位(Tyr402)のリン酸化とそれに伴う Src ファミリーキナーゼのリクルート、およびキナーゼドメインに存在するリン酸化部位(Tyr579, Tyr580)のリン酸化により誘導されることが報告されている。そこで HEK293T 細胞に DMWD と Pyk2 を過剰発現させ、DMWD が Pyk2 の自己リン酸化に及ぼす影響についてリン酸化特異的な抗体を用いて検討を行った。その結果、野生型 DMWD の過剰発現により Pyk2 の自己リン酸化亢進が起こる事、また DMWD の欠失変異体の過剰発現では Pyk2 の自己リン酸化亢進が抑制される事が明らかとなった(図 1. C.)。また、Tyr579, Tyr580 のリン酸化についても特異的な抗体を用いて解析を行ったところ、Tyr402 のリン酸化と同様に野生型 DMWD の過剰発現時のみ、リン酸化の亢進が認められた。このことから、DMWD が Pyk2 の活性化に関与する可能性が示された。

BAFF-R を介したシグナル伝達経路に関与する重要な分子として PKC- δ が注目されているが、これまで PKC- δ は Pyk2 と会合すること、および Pyk2 の活性化に関与するリン酸化の亢進に機能することが報告されている。このことから 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。

DMWD に対する siRNA 発現ベクターについて検討を行い、DMWD の mRNA 発現を特異的に抑制する siRNA 発現ベクターを得た。この siRNA 発現ベクターを恒常的に発現する BJAB 細胞を樹立し、その増殖について解析を行ったところ、コントロールの siRNA を発現する BJAB 細胞と比べ、DMWD 特異的な siRNA を発現する BJAB 細胞は有意に細胞増殖能が低下していた。このことから DMWD が BJAB 細胞における突発的なアポトーシスを抑制している可能性が考えられた。また、この BJAB 細胞における PKC- δ のリン酸化について解析を行ったところ、DMWD の siRNA を発現する BJAB 細胞では PKC- δ のリン酸化が抑制されている事が明らかとなった。

正常 B 前駆細胞のラフト刺激伝達系解析に応用する目的で、骨髄間質細胞との共培養によってヒト骨髄 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。その結果、マウス由来骨髄間質細胞株 MS-5 が最も効率的に Pro-B 細胞を分化誘導することが明らかとなった。また、この系における Pro-B 細胞誘導には IL-7 や IGFBP-6 が必要であること、Oncostatin-M および Jagged-1 が Pro-B 細胞の誘導に対して増強作用を示すことが明らかとなった。さらにヒト骨髄 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って B 細胞の分化誘導を検討したところ、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。

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

バイオフィラポノイドはビタミン P と呼ばれ、抗酸化作用や抗がん作用を有する。B 前駆細胞株に、Flavone を始めとする種々のバイオフィラポノイドを添加培養したところ、濃度依存的なアポトーシス誘導効果を認めた。このアポトーシスは、ミトコンドリア膜電位の消失に伴うカスパーゼの活性化に伴い誘導されると考えられた。バイオフィラポ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ことから、TOPOII 阻害剤である VP-16 との比較を行ったところ、バイオフィラポノイドによる B 前駆細胞株のアポトーシス誘導作用は TOPOII 阻害作用のみでは説明できない事が明かになった。

種々の B 細胞性腫瘍細胞株について、細胞表面での BAFF-R の発現について特異抗体を用いてフローサイトメトリー解析した結果、一部の株でその発現が確認された。その発現様式には、病型特異性は認められなかった。B 細胞性腫瘍細胞株のうち BAFF-R の発現が最も強かった MLMA 株を用いて、B 細胞性腫瘍のラフト関連アポトーシス誘導に対して BAFF-R を介する刺激伝達の影響について検討を行った。MLMA 株に対して、培養液中に抗 μ 鎖抗体あるいは抗 CD20 抗体を添加して、BCR、あるいは CD20 をそれぞれ架橋刺激し、アポトーシスを誘導した。これに抗 BAFF-R 抗体あるいは Hu-r-BAFF を同時に添加すると、CD20 を介するアポトーシス誘導は部分的に抑制された。一方、BCR を介するアポトーシス誘導には抑制が認められなかった。

共同研究者である岡山大学薬学部中尾浩史博士により、pre-B 細胞株 NALM-6 から精製したラフト成分を免疫することによって樹立された 2E6 抗体は、特定の B 細胞株とのみ反応すると考えられ、B 細胞を含む正常の末梢血液細胞と反応性を示さない。多数の B 細胞株について反応性を検討した結果、NALM-6 と、pro-B 細胞株 NALM-16 の B 前駆細胞株 2 株に加え pro-B 細胞株 KM-3、パーキットリンパ腫細胞株 BALM-18 とも反応することが明らかとなった。このことから、この抗体は病型特異的というよりは、B 細胞株の中の一部の特殊な株とのみ反応することが示唆された。

次いで 2E6 抗体が認識する抗原の同定を試みた。まず、2E6 陽性の NALM-6 と陰性の NALM-27 から抽出した蛋白に対して immunoblot 解析を行ったところ、2E6 は MW 110k の N グリコシド型糖タンパク分子に反応を示した。また抗体の結合には N-linked carbohydrate 部分は関与しないことが示

唆された。MW 110k の N グリコシド型糖タンパク分子の候補として CD10 が考えられ、Nalm6 および Nalm27 (2E6 陰性) ラフト画分の 2-D gel から CD10 を切り出し Western 解析を行った結果、2E6 は CD10 の N-linked carbohydrate 部分以外を認識抗原としていることが示唆された。しかしながら Western 解析により 2E6 抗体は CD10 以外の多くの分子にも反応を示した。2E6 抗体は actin や G protein beta など単純タンパクには反応せず、2E6 陰性の Nalm27 から精製したラフト成分では、どの分子にも反応しなかった。さらに、2E6 陽性の Nalm16 細胞をビオチン標識し免疫沈降を行ったところ、MW 110k の分子を含む複数のバンドが再現性良く得られた。

D. 考察

BAFF-R の C 末端 8 アミノ酸領域は BAFF-R の機能に重要な領域であることは既に明らかとなっているものの、この領域に会合する分子についてはこれまで報告がなされていない。本研究で報告した DMWD は BAFF-R との会合にこの領域が関与する事から、DMWD が BAFF-R を介したシグナル伝達機構において重要な機能を持つ可能性が考えられた。本研究の成果により DMWD の機能として NIK のプロテアソームによる分解を USP12 と共同して抑制し、NF- κ B2 を活性化するという機構が考えられた。この活性化経路は受容体を介したシグナル伝達経路としてはこれまであまり報告のなされていない、極めて特殊な機構と言えるが、BAFF-R を介した NF- κ B2 の活性化は BAFF 刺激から遅れて起こる反応であるという報告もあり、他研究グループによる報告と本研究の結果は矛盾しないものであることを付け加えておきたい。

Pyk2 のノックアウトマウスは辺縁帯 B 細胞の損失を招くことが報告されている。一方 TACI-Ig トランスジェニックマウス (BAFF の機能阻害マウス) は Bcl-2 の過剰発現により、成熟 B 細胞数は回復するが、辺縁帯 B 細胞の回復は観られない事が報告されている。このことは BAFF は辺縁帯 B 細胞の分化にも関与する事を示していると考えられ、BAFF と Pyk2 の機能には相関があると思われる。Pyk2 と PKC- δ の B 細胞における機能とその関連性については不明な点が多いが、本研究で明らかにした Pyk2 による PKC- δ のリン酸化が実際に PKC- δ の核移行を阻害し、B 細胞のアポトーシス抑制に働くかについては今後更なる検討が必要な課題である。

マウス由来骨髓間質細胞株 MS-5 がヒト Pro-B 細胞の分化誘導を有すること、誘導された Pro-B 細胞が、正常 B 前駆細胞のラフト解析に有用であることが示唆された。また、Pre-B 細胞株を用いた GeneChip 解析により、CD24 の架橋によるラフト刺激によって誘導される遺伝子の候補が複数同定され、この結果をもとにラフト刺激伝達系の分子機構解析を行っている。一方、バイオフィラポノイドに 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った。現在、その作用がラフトの機能に関係していると考え、その詳細について検討中であり、その白血

病に対する治療薬としての可能性についても解析を行っている。

抗 BAFF-R 抗体および Hu-r-BAFF の投与が、CD20 を介するアポトーシス誘導に抑制的に作用することが明らかとなった。CD20 は、架橋に伴ってラフトに集積し、刺激伝達によってアポトーシス誘導を起こすことが報告されていることから、今回の結果は、BAFF-R を介する刺激伝達系とラフト刺激伝達系との間に何らかのクロストークが存在する可能性を示唆する。

一方、抗 BAFF-R 抗体および Hu-r-BAFF の投与は、抗 μ 鎖抗体による BCR を介するアポトーシス誘導に対しては抑制効果を示さなかった。このことは、同じラフト関連アポトーシス誘導でも、CD20 と BCR とでは、異なる刺激伝達経路による可能性や、惹起するアポトーシス誘導刺激の強さが異なる可能性を示唆すると考えられ、この点に関して、今後さらに詳細な解析を予定している。

2E6 は、特定の B 細胞株とのみ反応する、非常に興味深い単クローン性抗体である。当初、その認識抗原は特殊な状況にある CD10 ではないかと考えられたが、さらに解析を進めた結果、複数の蛋白と反応することが判明し、単純に結論づけるのは困難と推測された。この抗体の反応性は、前述のごとく、ごく一部の B 細胞株に限られたものであること、また、actin や G protein beta など単純タンパクには反応せず、2E6 陰性の Nalm27 から精製したラフト成分では、どの分子にも反応しないこと、などから非特異的なものではないことが明らかである。現時点では Nalm6 を含む特定の細胞株にのみ発現している O-linked carbohydrate が認識抗原であるという可能性を考えており、今後、その生理的な意義を含め、さらに解析を行う予定である。

E. 結論

BAFF-R と会合する分子、DMWD は脱ユビキチン化酵素である USP12 と会合し、NIK の分解抑制を通じて NIK を介した非標準的 NF- κ B 活性化経路の活性化に働くと推測された。また DMWD は Pyk2 の活性化に関わる分子であると考えられ、Pyk2 は BAFF-R のシグナル伝達経路において重要な分子である PKC- δ のリン酸化にも関わることを示された。これらのことから DMWD は USP12 および Pyk2 を介して BAFF-R のシグナル伝達経路を正に制御する分子であると考えられた。

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。パ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。

B 細胞株において、BAFF-R を介する刺激伝達が、ラフト関連の CD20 誘導性アポトーシスに対して抑制的効果を示すことが明らかになった。B 前駆細胞のラフトを免疫原として樹立された単クローン性抗体 2E6 は、非常に限定された B 細胞株上の複数の蛋白と反応する、非常に特殊な単クローン性抗体であ

る事が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

上出利光

1. T. Miyazaki, M. Shen, D. Fujikura, N. Tosa, S. Kon, T. Uede, J.C. Reed : Functional role of death associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J Biol Chem.* 279:44667-44672, 2004.

宮崎忠昭

1. Y. Murata, T. Wakoh, N. Uekawa, M. Sugimoto, A. Asai, T. Miyazaki, M. Maruyama : Death-associated protein 3 regulates cellular senescence through oxidative stress response. *FEBS Letters.* 580(26):6093-6099, 2006.
2. H.R. Kim, H.J. Chae, M. Thomas, T. Miyazaki, A. Monosov, E. Monosov, M. Krajewska, S. Krajewski, J.C. Reed : Mammalian dap3 is an essential gene required for mitochondrial homeostasis in vivo and contributing to the extrinsic pathway for apoptosis. *FASEB Journal.* 21(1):188-196, 2007.
3. S. Takeda, A. Iwai, M. Nakashima, D. Fujikura, S. Chiba, H. Li, J. Uehara, S. Kawaguchi, M. Kaya, S. Nagoya, T. Wada, J. Yuan, S. Rayter, A. Ashworth, J.C. Reed, T. Yamashita, T. Uede, T. Miyazaki : LKB1 is crucial for TRAIL-mediated apoptosis in induction in osteosarcoma. *ANTICANCER RESEARCH.* In press

清河信敬

- 1) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J. Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell Lymphoblastic lymphoma. *Modern Pathol.* 17: 423-429, 2004.
- 2) Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahshi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK hampers PLC- γ 2 phosphorylation and Ca²⁺ influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology.* 112: 575-582, 2004.
- 3) Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *J Cell Sci.* 117: 3911-3922, 2004.
- 4) Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research.* (in press)

- 5) 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.

洲鎌和茂 無し
前田 龍 無し
設楽研也 無し

2. 学会発表
上出利光

1. T. Miyazaki, M. Shen, N. Tosa, D. Fujikura, S. Kon, T. Uede, J.C. Reed : Functional role of death associated protein 3 in apoptosis induction. *Experimental Biology* 2004, Washington, DC, April.17-21, 2004.
2. 岩井 淳、中島美都子、上出利光、宮崎忠昭 : DMWD分子によるPyk2活性化を誘導するBAFF-Rのシグナル伝達機構。第34回日本免疫学会総会・学術集会(札幌), 12月1日-3日, 2004.
3. 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.

宮崎忠昭

1. 宮崎忠昭、沈 敏、藤倉大輔、土佐紀子、今重之、上出利光、John Reed : DAP3のアポトーシス誘導における機能と役割, 日本分子生物学会, 2004.
2. Tadaaki Miyazaki, Min Shen, Daisuke Fujikura, Noriko Tosa, Shigeyuki Kon, Toshimitsu Uede and John C. Reed : Functional role of DAP3 (death associated protein 3) in apoptosis, 2004, AAI meeting 発表
3. 岩井 淳、中島美都子、上出利光、宮崎忠昭 : BAFFR を介するシグナル伝達機構の解析, 日本分子生物学会, 2004.
4. 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.
5. 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
6. 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
7. A. Iwai, T. Miyazaki : Functional analysis of DMWD, a newly identified BAFF-R-binding protein, protocol for BAFF-R-mediated signaling pathway. 7th International conference on new trends in immunosuppression. *And Immunotherapy*

Berlin, Germany. (Germany) February 16-19, 2006.

8. A. Iwai, T. Miyazaki : DMWD, a newly identified BAFF-R-binding protein, responsible for BAFF-R-mediated NF- κ B activation. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. (京都), 6月18日-23日, 2006.

清河信敬

- 1) 竹野内寿美, 清河信敬, 大喜多 肇, 藤本純一郎. 糖脂質 Gb3 を介して伝達される細胞骨格系再構成の誘導刺激. 第93回日本病理学会, 札幌, 6月9-11日, 2004.
- 2) 清河信敬, 松井 翼, 竹野内寿美, 大喜多肇, 藤本純一郎. B前駆細胞性リンパ芽球性リンパ腫の診断マーカーとしてのCD179a/bの有効性. 第93回日本病理学会, 札幌, 6月9-11日, 2004.
- 3) 田口智子, 竹野内寿美, 大喜多 肇, 清河信敬, 藤本純一郎. B前駆細胞の分化誘導に対するIGFBP-6の役割. 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会, 京都, 9月17日, 2004.
- 4) 竹野内寿美, 清河信敬, 塩沢祐介, 田口智子, 坂口佐知, 鈴木恭子, 斎藤正博, 大喜多 肇, 藤本純一郎. 造血にかかわる血液-骨髄間質細胞間の接着に関する検討. 第20回小児がん学会, 第46回日本小児血液学会, 同時期開催, 京都, 11月21-23日, 2004.
- 5) 塩沢祐介, 清河信敬, 田口智子, 竹野内寿美, 坂口佐知, 鈴木恭子, 斎藤正博, 大喜多 肇, 藤本純一郎. 正常骨芽細胞の造血支持能に関する検討. 第20回小児がん学会, 第46回日本小児血液学会, 同時期開催, 京都, 11月21-23日, 2004.
- 6) 田口智子, 清河信敬, 塩沢祐介, 竹野内寿美, 大喜多 肇, 藤本純一郎. 正常ヒト骨髄CD34+細胞の分化誘導におけるIGF-IおよびIGFBP-3/6の作用. 第20回小児がん学会, 第46回日本小児血液学会, 同時期開催, 京都, 11月21-23日, 2004.
- 7) 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎. ヒトBLNK陰性pre-B細胞株の解析. 第34回日本免疫学会総会, 札幌, 12月1-3日, 2004.
- 8) 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.

洲鎌和茂 無し
前田 龍 無し
設楽研也 無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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