

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過程で、大腸に局在する自然免疫担当細胞は、TLR 刺激に不応答になっていることを見出し、さらにこれら細胞に選択的に発現している遺伝子として IkBNS を同定した。そして、IkBNS の機能解析から、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型と遅期誘導型があり、IkBNS は遅期誘導型の遺伝子発現を NF- κ B の活性を制御することにより抑制していることを見出している。

そこで、自然免疫系の活性制御機構をさらに解析するため、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。まず、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、TRIF 依存性のシグナルが入る状況で早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子発現を解析した。さらに、早期誘導型遺伝子として MIP2 遺伝子、遅期誘導型遺伝子として Lcn2 遺伝子を代表とし、各遺伝子プロモーターへの転写制御因子群のリクルートをクロマチン免疫沈降法で解析した。また、各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。

また、同じ核に発現する IkB 分子 IkBzeta の遅期誘導型遺伝子の発現誘導における役割を解析した。

また、子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を、2週齢と8週齢のマウスの腹腔に存在するマクロファージを用いて解析した。まず、両週齢のマウスの腹腔を Hanks 液で洗浄し、細胞を回収し、CD11b 陽性細胞を単離し実験に用いた。TLR4 リガンドである LPS で刺激し、TNF- α , IL-6 の産生を解析した。次に、胸腺腫細胞株 EL-4 を CFSE で蛍光ラベルし、

irradiation でアポトーシスを引き起こし、この細胞の食食能を解析した。また、大腸菌を蛍光ラベルし、抗血清でオプソニン化し、この食食のも比較解析した。

(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

MyD88 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子の発現は障害されている。しかし、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 刺激すると TRIF 依存性の一見無意味なシグナルが活性化される。そこで、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、早期誘導型と遅期誘導型の各遺伝子の mRNA の発現誘導をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、遅期誘導型の遺伝子は MyD88 欠損マクロファージでは全く誘導されないが、早期誘導型の遺伝子はかなり減弱しているものかすかに誘導された。このかすかな早期誘導型遺伝子の発現は、MyD88/TRIF 二重欠損マクロファージでは全く認められなかった。このように、早期誘導型遺伝子は、極めて発現誘導されやすく、一見無意味なシグナルが入ることによって、かすかに誘導されることが明らかになった。次に、早期誘導型、遅期誘導型遺伝子としてそれぞれ MIP2, Lcn2 遺伝子を代表として取り上げ、各遺伝子プロモーターへの、NF- κ Bp65 サブユニット、RNA polymerase II, TBP のリクルートをクロマチン免疫沈降法により解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターへのこ

れら転写制御因子群のリクルートは刺激後 180 分より認められ、MyD88 欠損マクロファージでは全く認められない。一方、早期誘導型遺伝子のプロモーターへは、刺激後 15 分ときわめて早い時間から認められ、さらに MyD88 欠損マクロファージでも有意に認められた。この結果から、早期誘導型遺伝子のプロモーターは、転写制御因子がきわめてアクセスしやすい状態であることが明らかになった。

そこで、次に各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターではヒストン H3 のメチル化は認められず、TLR 刺激 180 分から観察された。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターでは、メチル化が刺激以前から常に見られた。この結果から、早期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が常に開いた状況にあり、その結果転写制御因子がアクセスしやすく、遺伝子発現が早期に誘導されることが明らかになった。一方、遅期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激によって構造変換を受け、転写制御因子がアクセスされやすくなること、そしてこのことが、遺伝子発現が遅れるメカニズムであることが明らかになった。

次に、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造変換に関与する分子について解析を行った。これまでに IkBNS と同じ核に発現する IkB 分子である IkBzeta が遅期誘導型遺伝子の発現に関与していることを示したきた。実際、IkBzeta 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現が障害されている。IkBzeta は TLR 刺激により早期に誘導される遺伝子の一つである。そこでマクロファージに IkBzeta を常時発現させ、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現を解析した。IkBzeta を発現させたマクロファージでは、遅期誘導型遺伝子の発現誘導が早く観察されるようになった。また、遅期誘導

型遺伝子プロモーターへの転写制御因子のリクルート、メチル化の誘導も早く観察されるようになった。これらの結果から、IkBzeta は、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造を変換させることにより遺伝子発現の誘導に関与していることが明らかになった。

2週齢と8週齢のマクロファージを LPS 刺激し、TNF-alpha, IL-6 産生を解析したところ、両週齢のマクロファージ間で差は認められなかった。しかし、アポトーシス細胞および大腸菌の食食能が、2週齢のマクロファージで有意に低下していた。

D. 考察

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF-kB 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類される。遅期誘導型の遺伝子プロモーターはクロマチン構造が閉じていて、TLR 刺激により構造変換を受け、転写制御因子がアクセスする。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造は常に開いている。このことが、早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子群に分けられるメカニズムであることが考えられる。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IkBzeta が関与することも明らかになった。しかし、IkBzeta 自身には、クロマチン構造を変換させる酵素活性はない。IkBzeta と相互作用し、クロマチン構造を変換させる分子の同定をさらに行ってきたい。

2週齢のマウスを用いた解析から、子どものマクロファージでは、TLR 刺激に対する応答性は大人と変化がないが、食食能が有意に低下していることが明らかになった。獲得免疫系に比べて原始的な自然免疫系も、獲得免疫系に属するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達していくことが示された。今後も、さらに2週齢マウスの自然免疫系の活性を解析し、その制御技術基盤を確立していきたい。

E. 結論

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類されるが、この相違は各遺伝子プロモーターのクロマチン構造の違いによることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に I κ Bzeta が関与することも明らかになった。また、2 週齢のマウスのマクロファージでは、貪食能の発達が不十分であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.: TLR-dependent induction of IFN- β mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059-7066 (2006).

Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* in press

Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7,

962-970 (2006).

Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S.: Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c⁺ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7, 868 - 874 (2006).

Yoshimatsu, T., Kawaguchi, D., Oishi, K., Takeda, K., Akira, S., Masuyama, N., and Gotoh, Y.: Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33, 2553-2563 (2006).

Miyatsuka, T., Kaneto, H., Shiraiwa, T., Matsuoka, T. A., Yamamoto, K., Kato, K., Nakamura, Y., Akira, S., Takeda, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Sandgren, E. P., Kawaguchi, Y., Wright, C. V., and Fujitani, Y.: Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20, 1435-1440 (2006).

Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsujii, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., and Kikutani, H.: Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.*

8, 615–622 (2006).

Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Fujita, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adachi, Y., Ohno, N., Takeda, K., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M. and Kawakami, K.: Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 148–154 (2006).

Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K. and Yoshikai, Y.: MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8 $\alpha\alpha$ and TCR $\gamma\delta$ intestinal intraepithelial T lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 6180–6185 (2006).

Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto, Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Notohara, K., Katayose, K., Okamura, H., Kahn, C. R., Noda, T., Takeda, K., Akira, S., Inui, A. and Kasuga, M.: Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3, 267–75 (2006).

Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S. and Matsumoto, M.: Essential role of I κ B kinase α in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176, 3995–4002 (2006).

Santos, L. L., Milenkovski, G. P., Hall, P. H., Leech, M., Sharma, L., Takeda, K., Akira, S., Kitching, A. R., and Morand, E. F.: IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 84, 166–173 (2006).

Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Takeda, K., Fukai, F., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* 176, 2773–2780 (2006).

Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: I κ BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41–51 (2006).

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).

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).

- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Hirofumi, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650–3657 (2005).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Curr. Med. Chem. AIAA.* 4, 3–11 (2005).
- Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1–14 (2005).
- Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51–55 (2005).
- 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).

2. 学会発表

Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006.9.3-6, Hyogo, Japan

Kiyoshi Takeda, Innate immune responses against mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program, 41st Tuberculosis and leprosy research conference, 2006.7.19-21, Kagoshima, Japan

Kiyoshi Takeda, Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting, 2006.6.1, San Francisco, USA

Kiyoshi Takeda, Nuclear I κ B protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium), 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪

香山尚子、竹田潔, Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪

財賀大行、竹田潔, Lipocalin 2 mediates anti-mycobacterial immune responses. 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪

古賀律子、竹田潔, IFN-beta-dependent innate immune response against *Trypanosoma cruzi*, 第36回日本免疫学会学術集会、2006.12.11-13、大阪

竹田潔, 自然免疫系によるトリパノソーマ原虫の感染制御機構, 第59回日本寄生虫学会、2006.10.28、福岡

竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構(シンポジウム), 第2回食品免疫学会、2006.10.23、東京

竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構(特別講演), 第43回補体シンポジウム、2006.8.19、福岡

竹田潔, 粘膜免疫の今後の展望(イブニングセミナー), 第43回日本消化器免疫学会総会、2006.8.3-4、青森

竹田潔, 自然免疫系による炎症制御, 日本動脈硬化学会、2006.7.13-14、東京

竹田潔, I型IFNによる細胞内寄生性原虫の感染防御機構, 第71回インターフェロンサイトカイン学会、2006.7.7-8、兵庫

竹田潔, I κ BNSによる自然免疫系の活性制御と消化管炎症(シンポジウム、招待講演), 第79回日本薬理学会年会、2006.3.9、横浜

竹田潔, 脊椎動物の自然免疫系の活性制御機構(シンポジウム、招待講演), 第141回日本獣医学会学術集会、2006.3.21、つくば

竹田潔, 細胞内寄生菌に対する宿主自然免疫応答の分子機構(シンポジウム、招待講演), 第79回日本細菌学会総会、2006.3.29、金沢

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

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

Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear IκB proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005.9.28-10.2, Heidelberg, Germany

竹田 潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第78回日本細菌学会総会、2005.4.4-6、東京

竹田 潔, Toll-like receptor と結核感染(シンポジウム)第80回日本結核病学会、2005.5.12-13、埼玉

竹田 潔, 自然免疫シグナルの制御機構(ワークショップ、招待講演)第5回日本蛋白質科学会年会、2005.7.1、福岡

竹田 潔, Toll-like receptor を介した自然免疫系の制御(特別講演)第45回日本リンパ網内系学会総会、2005.7.14-15、福岡

竹田 潔, 自然免疫系と炎症性腸疾患(シンポジウム、招待講演)第42回日本消化器免疫学会総会、2005.8.4-5、東京

Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium)第35回日本免疫学会学

術集会、2005.12.13-15、横浜

桑田啓貴、竹田 潔、Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear IκB protein IκBNS. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜

古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、久枝一、審良静男、姫野國介、竹田 潔、Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜

松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、吉開泰信、竹田 潔、The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

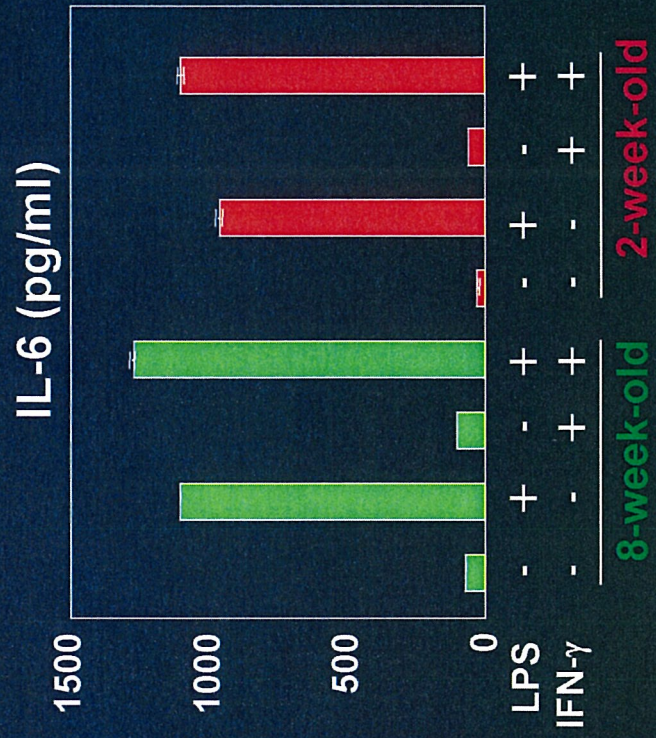
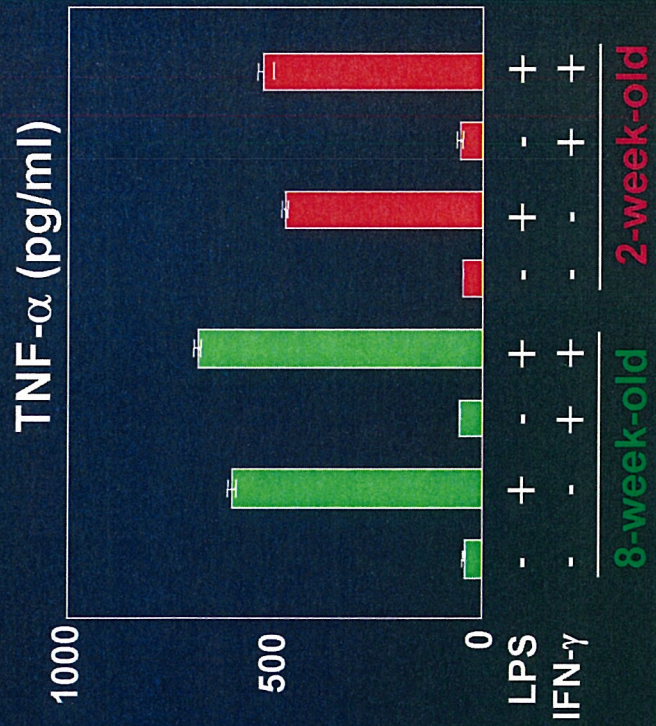
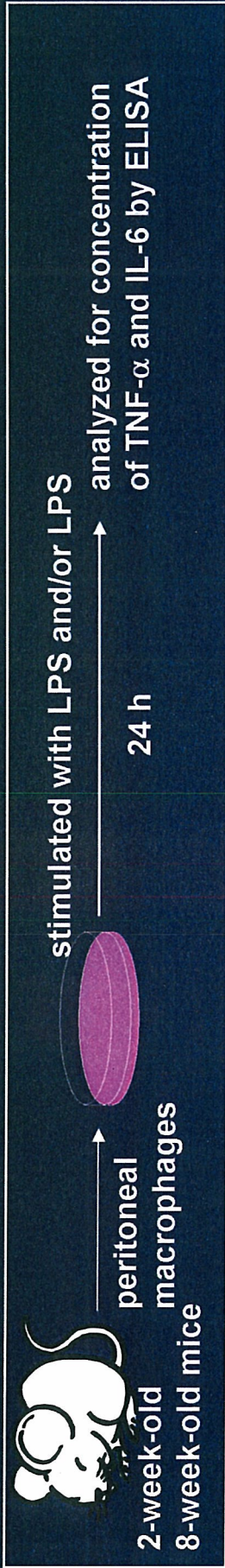
2. 実用新案登録

なし

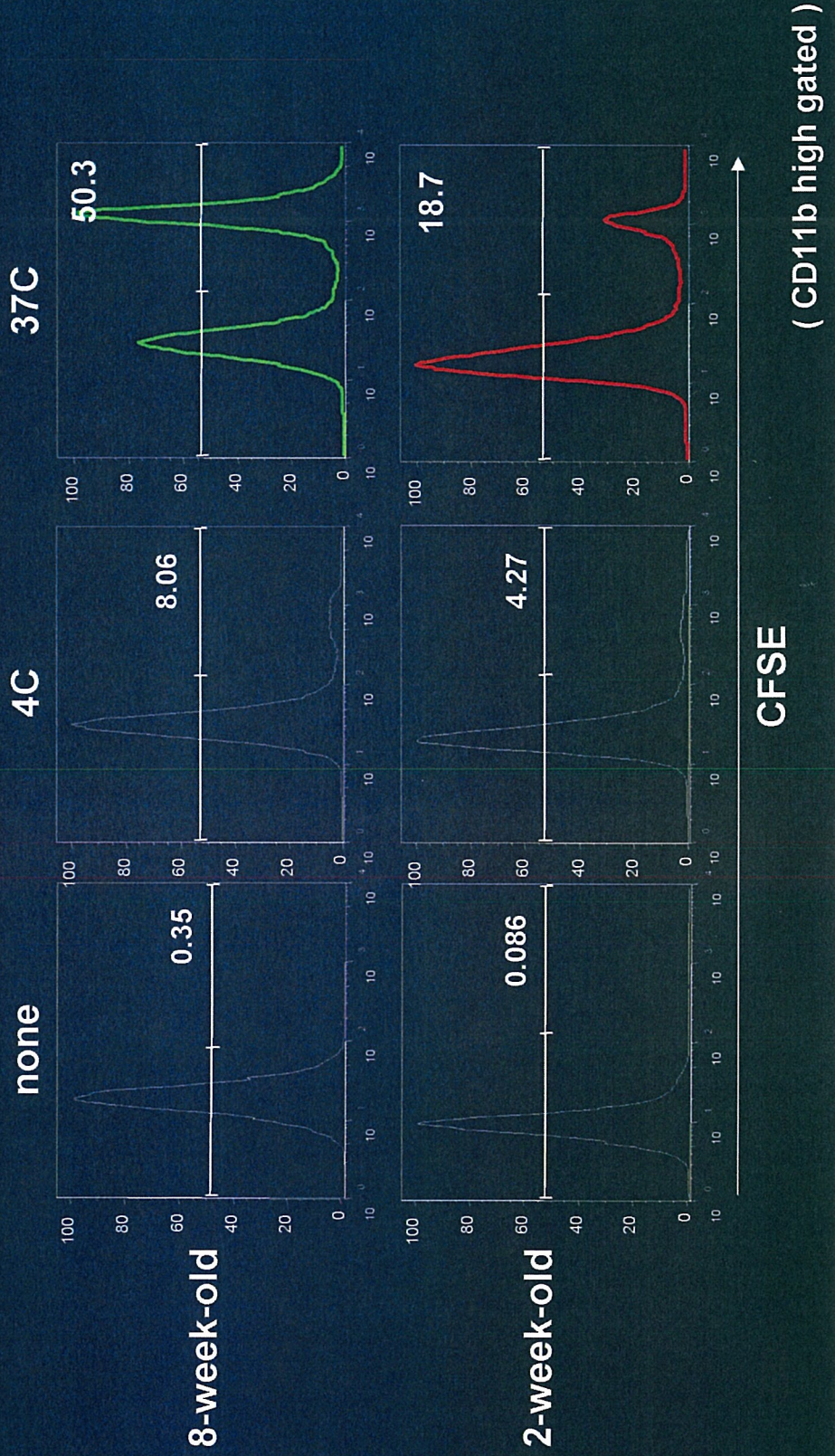
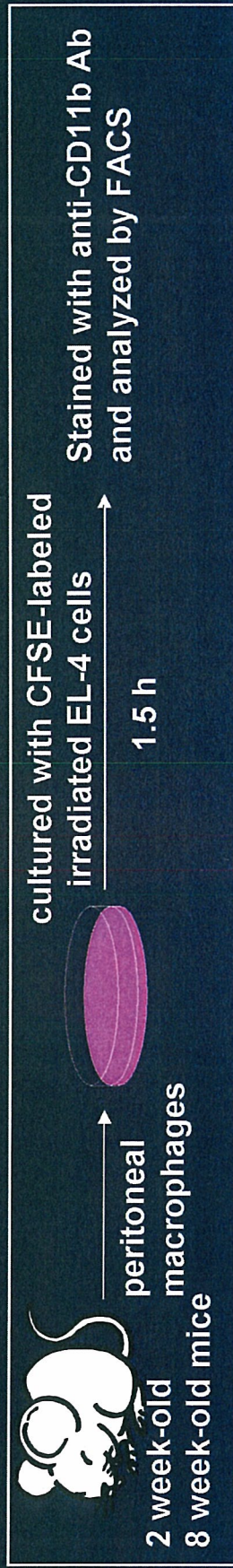
3. その他

なし

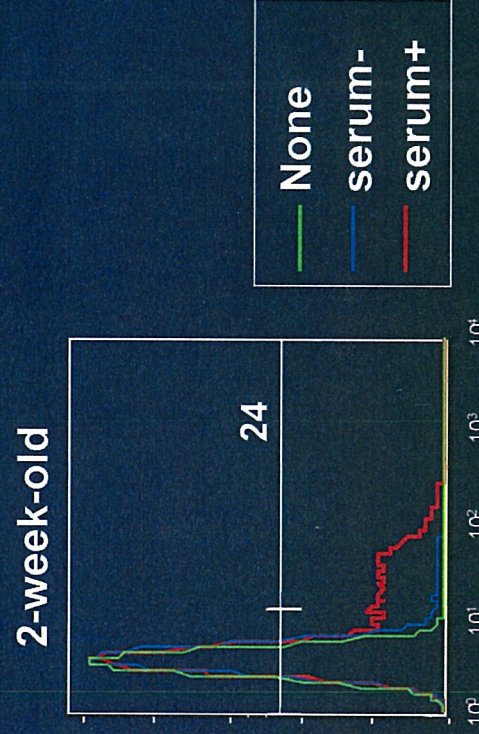
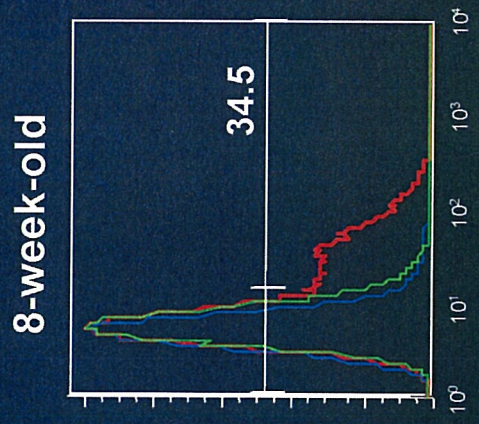
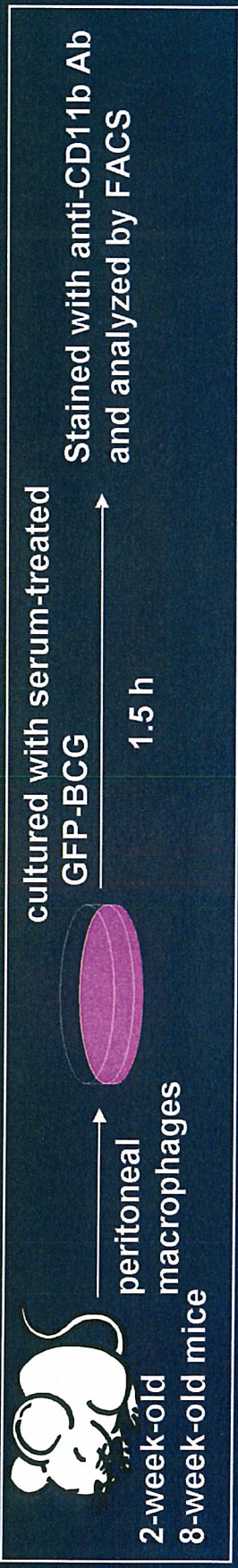
Normal TLR-dependent cytokine production in peritoneal macrophages from 2-week-old mice



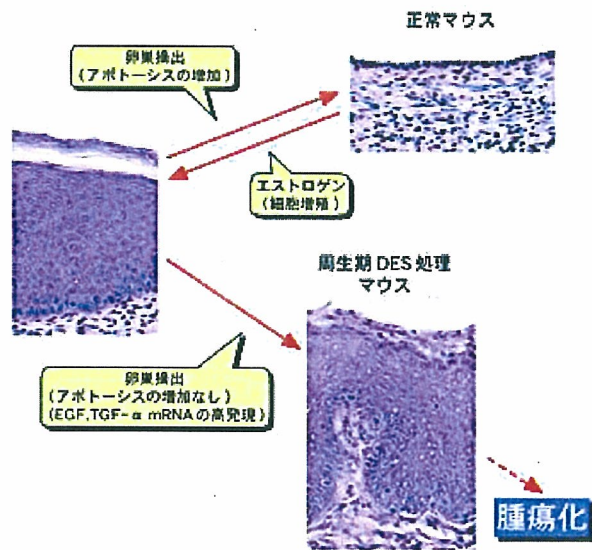
Defective phagocytosis of apoptotic cells in peritoneal macrophages from 2-week-old mice



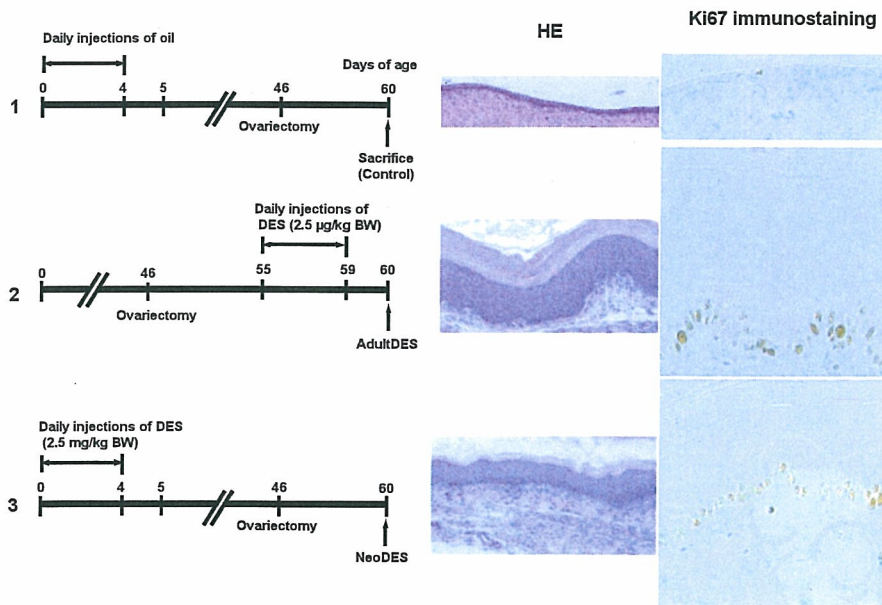
Defective phagocytosis of complement-opsonized BCG in peritoneal macrophages from 2-week-old mice



新生児期のエストロゲン様化学物質曝露の影響



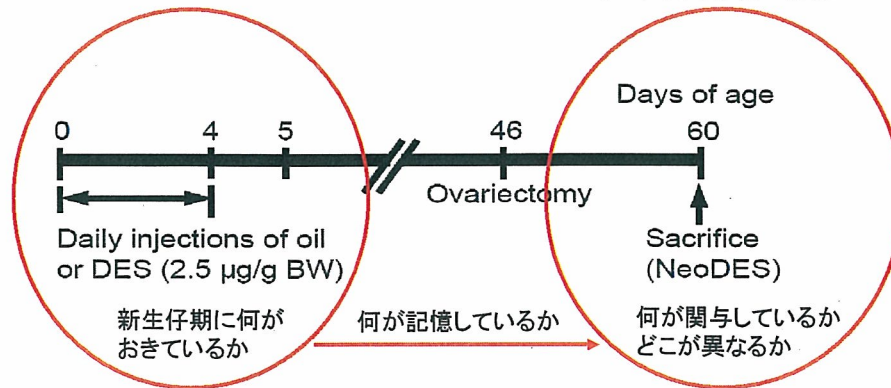
基本的な実験デザイン



雌性生殖器官への不可逆的な作用の問題点

新生児期のエストロゲン暴露

不可逆的な影響の発現



新生児期の遺伝子発現制御解析

エストロゲン非依存的な増殖時の関連遺伝子の機能解析

ゲノムDNAメチル化による遺伝子発現変化の可能性

REPORTS Science. 2005 Jun 3;308(5727):1466-9.

Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility

Matthew D. Anway, Andrea S. Cupp,* Mehmet Uzumcu,† Michael K. Skinner†

Transgenerational effects of environmental toxins require either a chromosomal or epigenetic alteration in the germ line. Transient exposure of a germline female rat during the period of gonadal sex determination to the endocrine disruptor vinclozolin (an antiandrogenic compound) or methoxychlor (an estrogenic compound) induced an adult phenotype in the F₁ generation of decreased spermatogenic capacity (cell number and viability) and increased incidence of male infertility. These effects were transferred through the male germ line to nearly all males of all subsequent generations examined (that is, F₁ to F₄). The effects on reproduction correlate with altered DNA methylation patterns in the germ line. The ability of an environmental factor (for example, endocrine disruptor) to reprogram the germ line and to promote a transgenerational disease state has significant implications for evolutionary biology and disease etiology.

Transmitters, such as irradiation and chemotherapy, and compounds, such as environmental toxins, pose a threat to the integrity of the genome. Studies have shown that these agents can result in genetic or developmental defects in the offspring of F₁ generation from an exposed germline mother. The ability of an external agent to induce a transgenerational effect requires stable chromosomal alterations or an epigenetic phenomenon such as DNA methylation (1). In the present study, transgenerational effects to a germline transmission to multiple generations, naturally to the F₂ generation. Transgenerational effects of irradiation were the first to be identified through transmission of DNA mutations in the germ line to multiple generations (2), when associated with tumor formation. Chromosomal transmitters (strand environmental toxins such as endocrine disruptors (4) can cause effects in the F₁ generation, but they tend not from down to affect the F₂ generation. Although no effects have been shown to be transgenerational, the potential impact of such transgenerational effects of endocrine disruptors has been discussed (5).

Epigenetic alterations that could lead to transgenerational transmission of specific

Li S, Washburn KA, Moore R, Uno T, Teng C, Newbold RR, McLachlan JA, Negishi M.

Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus.

Cancer Res. 1997 Oct 1;57(19):4356-9.

Li S, Ma L, Chiang T, Burrow M, Newbold RR, Negishi M, Barrett JC, McLachlan JA.

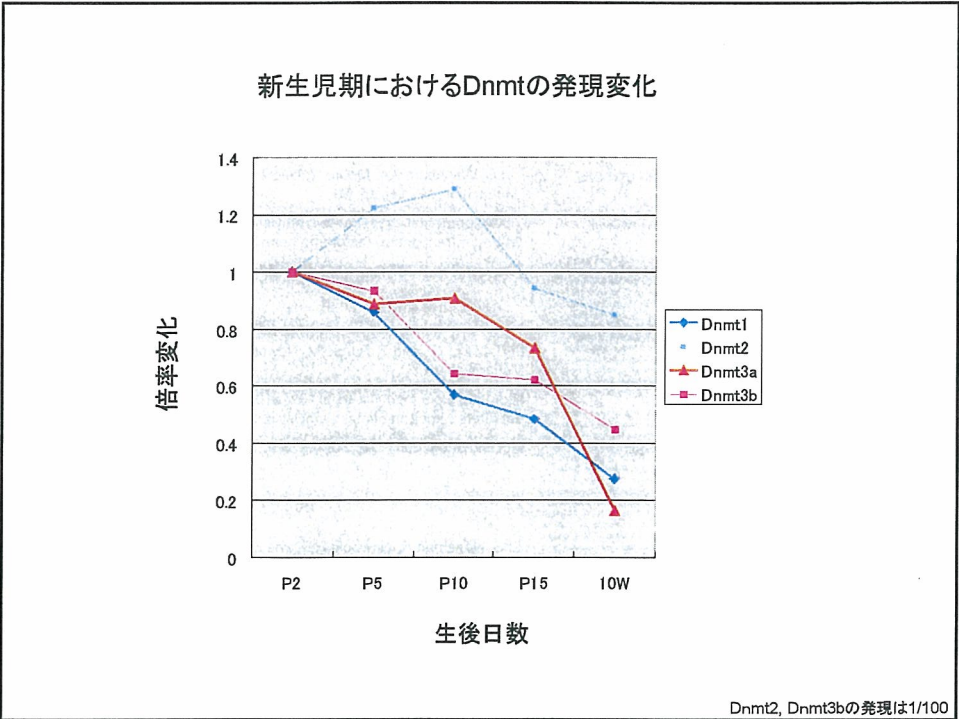
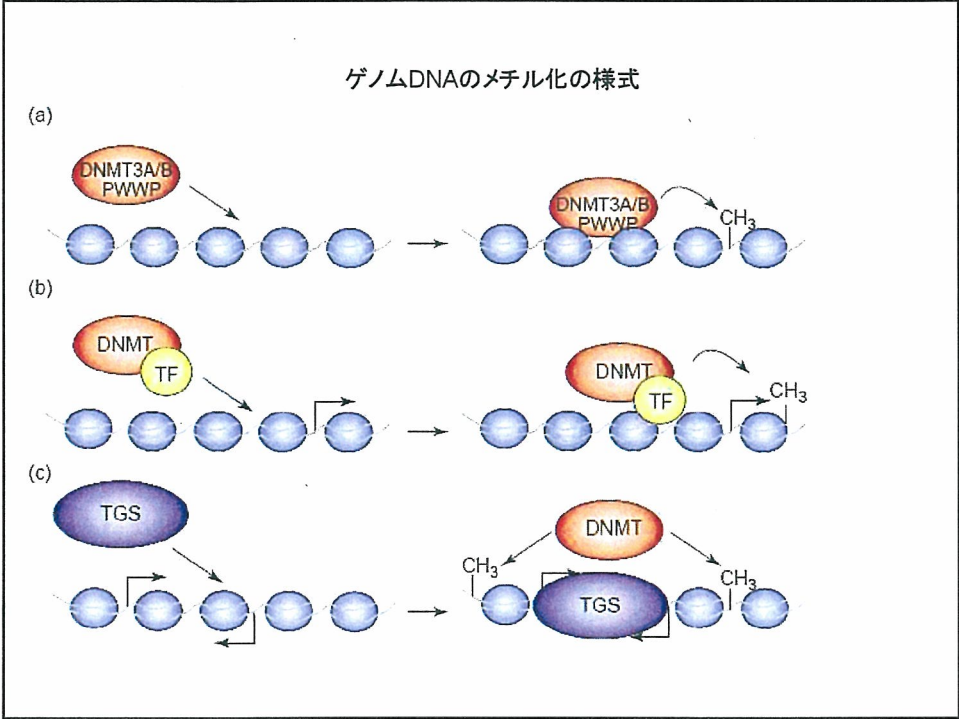
Promoter CpG methylation of Hox-a10 and Hox-a11 in mouse uterus not altered upon neonatal diethylstilbestrol exposure.

Mol Carcinog. 2001 Dec;32(4):213-9.

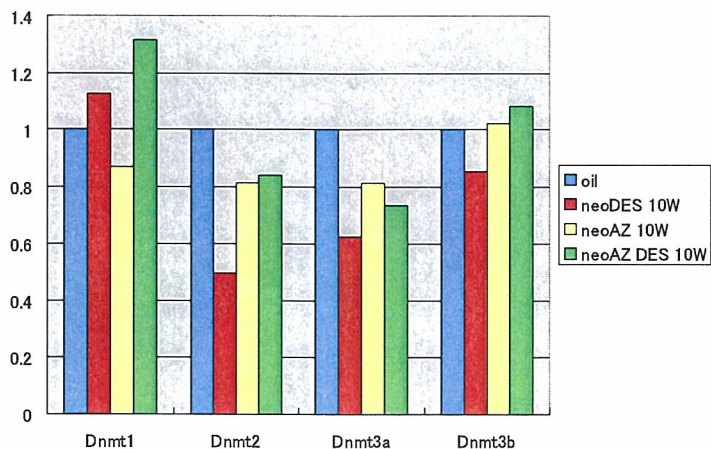
Li S, Hansman R, Newbold R, Davis B, McLachlan JA, Barrett JC.

Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus.

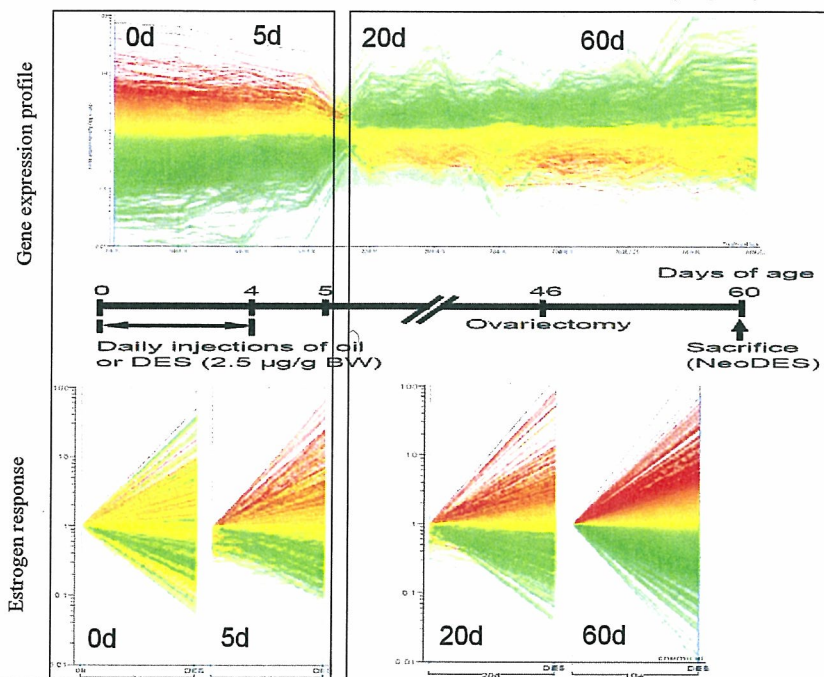
Mol Carcinog. 2003 Oct;38(2):78-84.

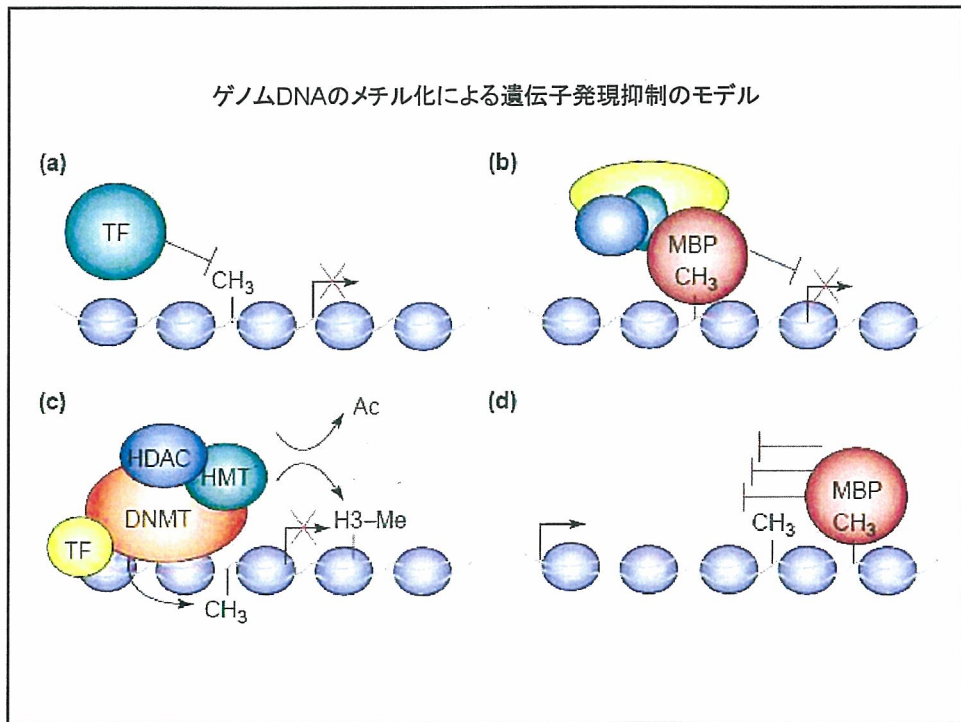
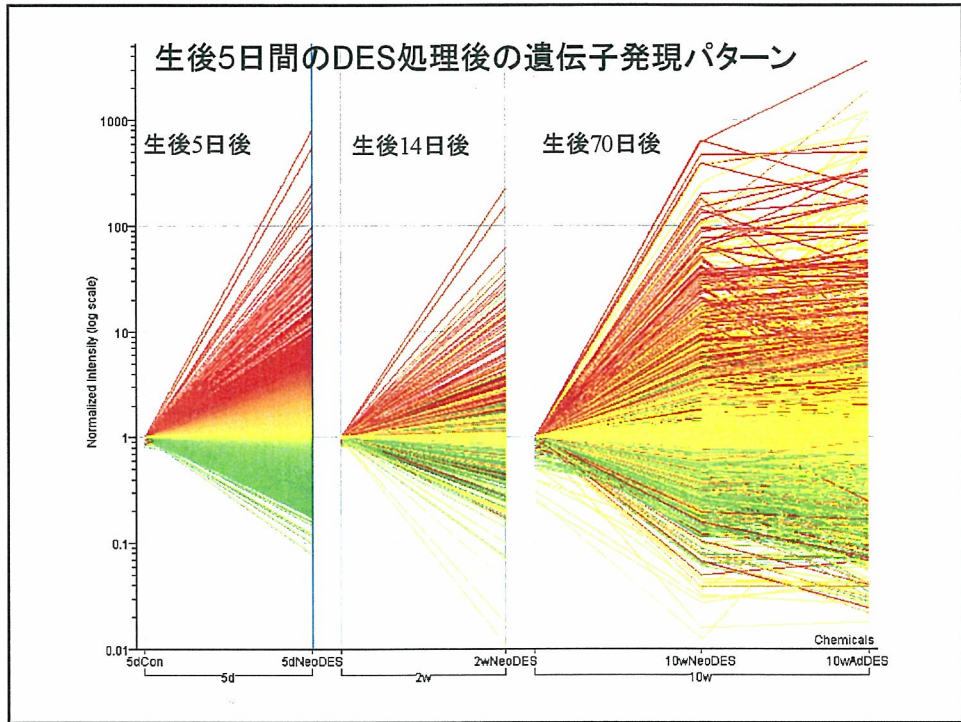


新生児期にエストロゲン曝露によるDnmt遺伝子発現への影響

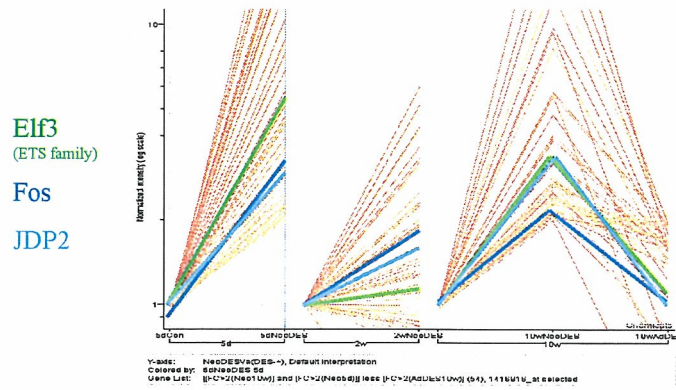


Transcriptional profiling during mouse maturation (vagina)





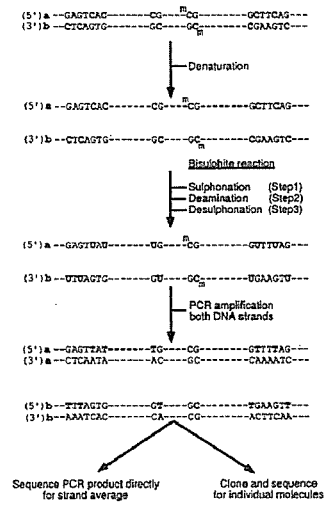
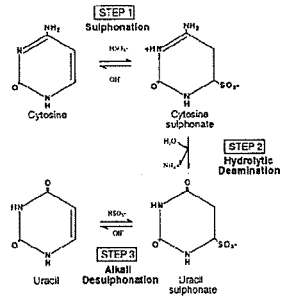
新生仔期エストロゲン処理により発現が上昇している遺伝子 (オンコジーン関連)



発現制御領域のゲノムDNAのメチル化状態を比較した遺伝子

- Jun dimerization protein 2 (JDB2)
- Myelin and lymphocyte protein (Mal)
- keratin 20 (Krt20)
- E74-like factor 3 (Elf3)
- amphiregulin (Areg)
- epiregulin (Ereg)
- forkhead box A1 (FoxA1)
- GATA-binding protein 2 (GATA2)
- FBJ osteosarcoma oncogene (c-fos)
- lactoferrin (Ltf)

Bisulfite法によるメチル化DNAの解析

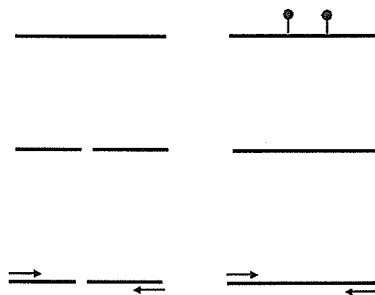


ゲノムがメチル化されている遺伝子の *de novo* の探索

Genome digestion

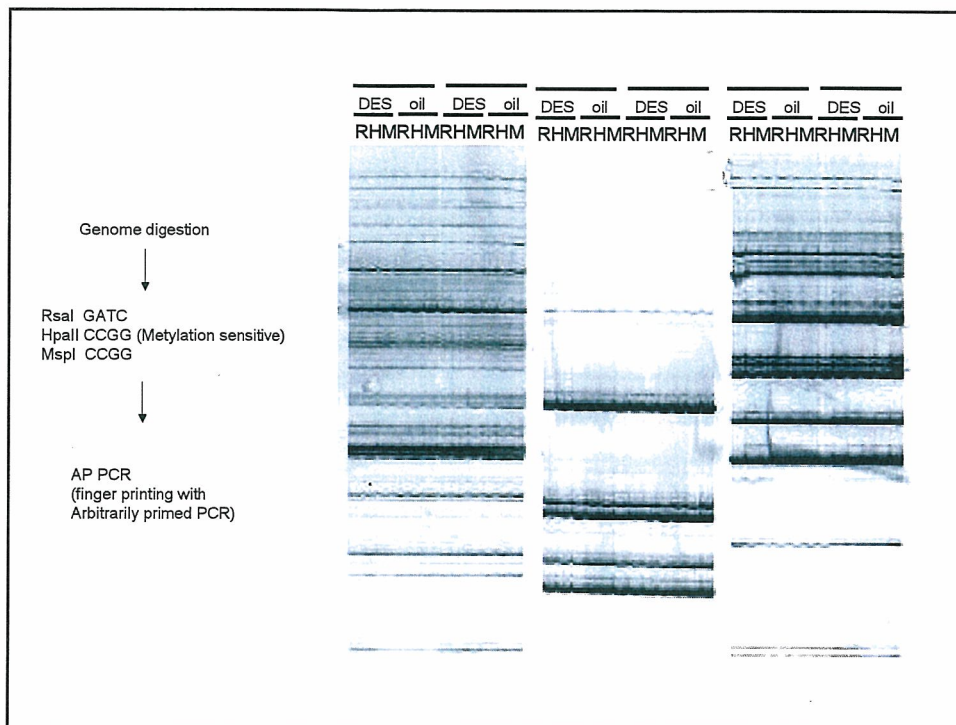
RsaI GATC
HpaII CCGG (Metylation sensitive)
MspI CCGG

AP PCR
(finger printing with
Arbitrarily primed PCR)



メチル化されたゲノムDNA断片を増幅できる

クローニング、配列を決定しゲノム上の位置を同定する



メチル化されているゲノムDNA断片の検出

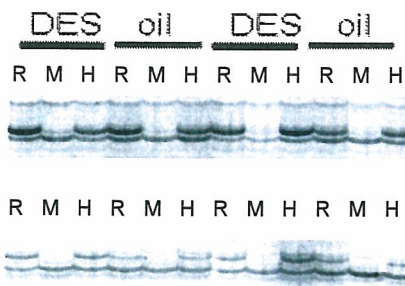
10W mouse vagina

RsaI GATC
MspI CCGG
HpaII CCGG (Metylation sensitive)

Cloning

Sequencing

Identification



Ch6_87238912-87239080
Ch9_120467742-120468113
Ch13_34068350-34068604
ChX_54006581-54006742

P2におけるゲノムDNAのメチル化の検討

膣、肝臓、心臓、腎臓、筋肉、皮膚における
メチル化パターンは10Wのマウス膣と同じ