

野生型とASK1 ノックアウトマウス的一方のみで選択的に変化が認められる遺伝子がそれぞれ幾つか抽出できた。

本研究班の目的の一つに、マウスの種々の組織における毒性学的トランスクリプトームデータベースを構築し、毒性予測に資するというものがある。本研究では、対象を、これまであまり検討されてこなかった消化器粘膜におくこととした。本年度は予試験として、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発炎症性腸疾患モデルを対象に選んだ。それは以下の理由からである。

炎症性腸疾患は予後不良・原因不明の慢性炎症性病変であり、その原因解明・治療法の確立が望まれている。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析法の開発初期に炎症性腸疾患の病因究明にこれが応用され、各種サイトカインの関与が大きいことが示され、実際、臨床の場で、最大の治療効果をあげているのが、そのサイトカインの一つである TNF α の中和抗体である。しかしながら、これは既に成立してしまった病変に対する対症療法であり、根本的治療につながるものではない。

炎症性腸疾患の病因に、ストレスシグナルの関与が重要であることを示す証拠がある。例えば、小胞体ストレスを感知してこれを ASK1 を含むストレスシグナルカスケードに伝達する分子 IRE1 β をノックアウトしたマウスにおいては、DSS 誘起炎症性腸疾患が悪化するという報告がなされている(J. Clin. Invest.107:585-, 2001)。

以上のことから、ASK1 ノックアウトマウスにおける炎症性腸疾患モデルの網羅的遺伝子発現解析による解析は、十分に検討の価値があると考えられた。

B. 研究方法

動物と遺伝子解析

ASK1 ノックアウトマウスは、東京大学大学院薬学

系研究科細胞情報学教室一條秀憲教授より供与された。前年度までにこのマウスを実験動物中央研究所においてSPF化し、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター動物施設に導入し、B57BL/6 ヘテロ体として維持繁殖させ、昨年度、同志社女子大学薬学部動物施設に移送し、維持繁殖を再開した。また実験の一部は研究協力者である東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学研究室においても行われた。

腸炎モデルは、DSS 3%或いは1.5%水溶液を飲水中に混和して作成し、3週間まで観察した。組織より標準プロトコールに従って mRNA を調製し、Affymetrix 社 GeneChip(Mouse Genome 430 2.0)により遺伝子発現を網羅的に解析した。このとき、Spike による mRNA 絶対量化システムを用いて定量化を行った。

抗リン酸化 ASK1、JNK、P38 抗体も一條教授より供給された。

また、細胞のアポトーシス判定には、Apoptag Fluorescein Direct *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon International) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究に用いた動物は同志社女子大学動物実験委員会の承認を得ている。使用する動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用で苦痛の少ない方法を用いるといった、本学の実験動物取り扱い倫理規定に従った対応を行っている。

C. 研究結果

1. マウスの腸炎評価法

まず最初に、野生型 B57BL/6 マウスを用いて、DSS 誘起腸炎の発生を検討した。

通常、DSS 腸炎の評価は便の外観(下痢の程度や明瞭な出血)と体重、全身症状をスコア化し、腸粘膜病変の程度とあわせて、判定する。これは明らかに主観が入り、定量化と感度に問題がある。

そこで、より客観的で定量的な評価法を開発することとした。

種々の検討の結果、マウスの便中の潜血を、抗マウスヘモグロビン抗体を用いたウエスタンブロットにより検出する系を開発した。図1は3% DSS による腸炎を旧来法により半定量的に評価したものであるが、投与開始三日になるまで変化が見られない。本研究の目的は、炎症性腸疾患の発生原因の究明であるから、病変発現直前～直後の解析が必要であり、不満が残る。図2は、今回開発した方法による潜血反応であるが、投与開始翌日から出血が検出できた。以上のことから、病変の進展は数日単位でおこるが、引き金となる反応は、DSS 摂取開始のきわめて初期段階から生じていることが判明した。

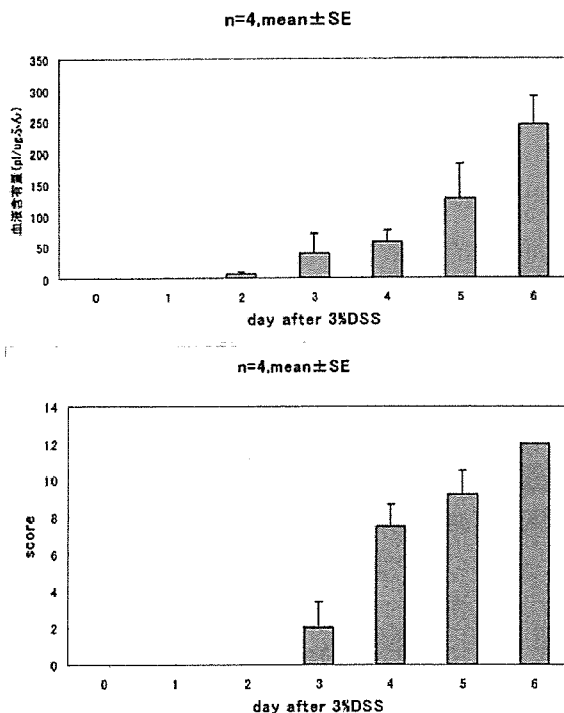


図1. DSS 誘起腸炎のスコア

図2: DSS 腸炎モデルの潜血反応

2. DSS 腸炎における ASK1 シグナル

野生型B57BL/6マウスを用いて、DSS誘起腸炎が発生した時の ASK1 を含むストレスシグナルカスケードを検討した。

図3は、3%DSS 投与前、投与後1～4日の結腸粘膜におけるリン酸化 ASK1, リン酸化 JNK, リン酸化 p38 の量をウエスタンブロットで検討したものである。これらストレスキナーゼのリン酸化は明瞭に認められたが、その応答する時期には大きなばらつきが認められた。これは、単一個体で時間経過を追わない限り、検討が困難であることを示しているが、生体マウスを用いる限り、不可能である。

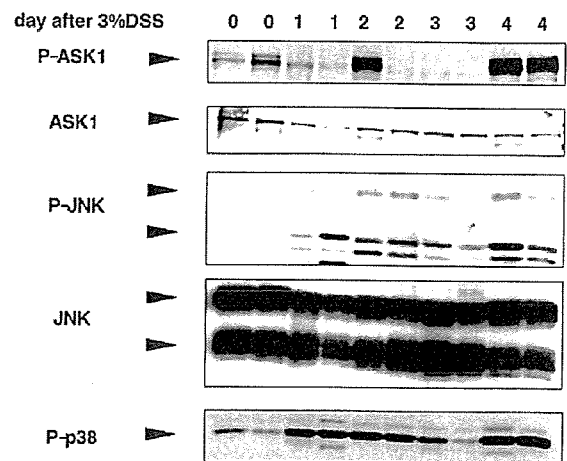
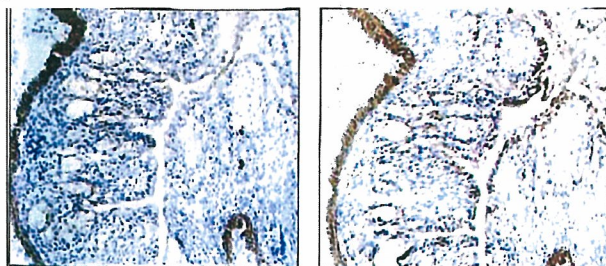


図3: DSS 投与マウス結腸粘膜におけるリン酸化 ASK1, JNK, p38.

DSS 腸炎が発生しているとき、ASK1 がリン酸化され、ストレスシグナルカスケードが動いていることが示唆されたが、このとき、ASK1 がリン酸化されている場所の同定が重要となる。リン酸化型 ASK1 を組織染色するのは非常に困難であるが、今回試みて見た。ウエスタンブロットでは、目的のバンドが分離されるので、非特異的染色を無視できるが、組織染色ではそれができない。実際、抗リン酸化 ASK1 抗体は、消化管内では平滑筋に非特異的に結合する。そこで、マウス結腸の連続切片を作成し、一方をリン酸化 ASK1 で吸収し

てコントロールとし、これと比較する方法をとった。図4左は、吸収したコントロール、右は非吸収の標本である。これから分かるように、特異的なリン酸化 ASK1 の染色は、結腸粘膜上皮細胞に生じていた。一方、非投与群では、このような染色像は見られなかった(図は省略)。



3. ASK1 ノックアウトマウスにおける DSS 腸炎

以上の結果に基づいて、野生型および ASK ノックアウトマウス各4匹に3%DSS を与え、腸炎の発生程度を比較した。しかしながら、両群の腸炎発生程度(体重減少)と死亡日には全く差がなかった(図5)。これは、腸炎の重篤度によって差が見にくい為ではないかと考え、5%および1.5%DSS も検討してみたが、差は認められなかった(データ省略)。

4. 腸粘膜におけるトランスクリプトーム解析

以上のサンプルに関して、Affymetrix GeneChip を用いたトランスクリプトーム解析を行う予定であったが、予算配分が年度末にずれ込んだため、現在実験の途中であり、本報告書作成時点では解析が終了して居らず、掲載できなかった。

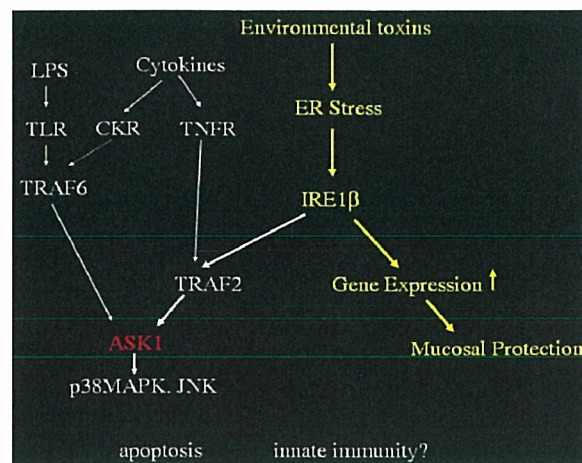
D. 考察

前年度までに、MPTP による細胞死誘導の毒性的解析に、ASK1 ノックアウトマウスを用いた系が有用なツールになりうることを示してきた。

今回の結果は、期待に反して、ASK1 ノックアウトマウスと野生型の間に、DSS に対する明瞭な感受性の差が認められなかった。しかしながら、これはある意味で当然の結果かもしれない。生体はストレスに対して、防御的応答をすると同時に、ストレスに耐え切れなくなった細胞は積極的に死に向

かわせるという戦略をとっている。消化管粘膜においても、種々の外敵に対して、防御と死(アポトーシス)の両面の反応が見られる。実際のストレスシグナルを詳細に解析するためには、in vitro の系を含めた、更に詳細な解析法を導入することが必要であろう。

現在、DSS 以外の腸炎誘起物質である trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)、や difluoromethylornithine の予備検討を行っているところである。また、これまでの研究との比較のために、酸化ストレス誘起物質である MPTP やパラコートとの比較を、GeneChip を用いて解析中である。更に、詳細な検討を可能にする、マウス腸粘膜上皮細胞の培養系の確立を、現在目指しているところである。



E. 結論

DSS 腸炎モデルにおいて ASK1 関連シグナルの変動が観察されたものの、病変自体には野生型と ASK1 欠損マウスの間に明瞭な差を認めなかった。これは、このシグナルが防御系と病態の進展の両方に関与するためと思われた。そこで、今後他の病態モデルや培養系など、腸粘膜障害の各ステップを詳細に解析する系の確立が望まれた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

Tetsuro Urushidani: "Prediction of hepatotoxicity based on the Toxicogenomics Project Database" in "Hepatotoxicity: From genomics to in vitro and in vivo models" ed. by Saura C. Sahu, John Wiley & Sons, 2007, in press

Tetsuro Urushidani and Taku Nagao. Toxicogenomics: The Japanese Initiative. in "Handbook of Toxicogenomics - Strategies and Applications. ed. by J. Borlak, Wiley-VCH., p623-631, 2005.

2) 雑誌

K. Takashima, Y. Mizukawa, K. Morishita, M. Okuyama, T. Kasahara, N. Toritsuka, T. Miyagishima, T. Nagao, and T. Urushidani. Effect of the difference in vehicles on gene expression in the rat liver - analysis of the control data in the Toxicogenomics Project Database. Life Sci. 78: 2787-2796, 2006.

Naoki Kiyosawa, Kouji Shiwaku, Mitsuhiro Hirode, Ko Omura, Takeki Uehara, Toshinobu Shimizu, Yumiko Mizukawa, Toshikazu Miyagishima, Atsushi Ono, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani. Utilization of a one-dimensional score for surveying the chemical-induced changes in expression levels of multiple biomarker gene sets using a large-scale toxicogenomics database. J. Toxicol. Sci. 31: 433-448, 2006.

Kotaro Tamura, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani. Comparison of gene expression profiles among papilla, medulla and cortex in rat kidney. J. Toxicol. Sci. 31: 449-470, 2006.

Kotaro Tamura, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani. Profiling of gene expression in rat liver and rat

primary cultured hepatocytes treated with peroxisome proliferators. J. Toxicol. Sci. 31: 471-490, 2006.

Katsumi Morishita, Yumiko Mizukawa, Toshihiko Kasahara, Manabu Okuyama, Kayoko Takashima, Naoki Toritsuka, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani. Gene expression profile in liver of differing ages of rats after single oral administration of acetaminophen. J. Toxicol. Sci. 31: 491-508, 2006.

Toshihiko Kasahara, Toshiko Miyazaki, Hiroyuki Nitta, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Taku Nagao, and Tetsuro Urushidani. Evaluation of the methods for duration of preservation of RNA quality in rat liver used for transcriptome analysis. J. Toxicol. Sci. 31: 509-520, 2006

2. 学会発表

1. 清澤直樹、宮城島利一、漆谷徹郎、長尾拓:トキシコゲノミクスの現状と展望 第7回創薬ビジョンシンポジウム 2006年4月

2. 大村功、清澤直樹、上原健城、清水俊敦、廣出充洋、宮城島利一、小野敦、漆谷徹郎、長尾拓:血漿中トリグリセリドを減少させる化合物を投与したラット肝臓における遺伝子発現解析 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006年7月 J. Toxicol. Sci. 31: suppl. P108, 2006

3. 上原健城、清澤直樹、清水俊敦、大村功、廣出充洋、今澤孝喜、小野敦、宮城島利一、漆谷徹郎、長尾拓:クマリン誘発肝毒性:トキシコゲノクス解析によるヒトへのリスク評価 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006年7月 J. Toxicol. Sci. 31: suppl. P109, 2006

4. 廣出充洋、上原健城、大村功、清澤直樹、清水俊敦、小野敦、宮城島利一、漆谷徹郎、長尾拓:ラットにおける薬物誘発性肝障害と血液凝固

異常の関連(共同) 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006年7月 J. Toxicol. Sci. 31: suppl. P110, 2006

5. 清水俊敦、大村功、清澤直樹、上原健城、廣出充洋、小野敦、漆谷徹郎、宮城島利一、長尾拓:バルプロ酸暴露後のラット初代肝細胞およびヒト初代肝細胞における遺伝子発現変化 (共同) 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006年7月 J. Toxicol. Sci. 31: suppl. P111, 2006

6. 清澤直樹、塩飽恒史、廣出充洋、上原健城、大村功、清水俊敦、宮城島利一、小野敦、漆谷徹郎、長尾拓:遺伝子発現変動レベルのスコア化によるトキシコゲノクスデータベースの効率的解析 (共同) 第33回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 2006年7月 J. Toxicol. Sci. 31: suppl. P119, 2006

7. Takeki Uehara, Naoki Kiyosawa, Mitsuhiro Hirode, Koki Imazawa, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Tetsuro Urushidani, and Taku Nagao. A toxicogenomics approach for risk assessment of glutathione depletion and oxidative stress-induced nongenotoxic hepatocarcinogenesis in the rat liver. 43rd Congress of The European Societies of Toxicology, 6th Congress of Toxicology in Developing Countries, Croatia. 2006年9月

8. Mitsuhiro Hirode, Takeki Uehara, Naoki Kiyosawa, Atsushi Ono, Toshikazu Miyagishima, Tetsuro Urushidani, and Taku Nagao. Comparison with aspirin and hepatotoxic compounds inducing coagulopathy- gene expression profiling in rat liver -43rd Congress of The European Societies of Toxicology, 6th Congress of Toxicology in Developing Countries, Croatia. 2006年9月

9. 瓶子昌幸、廣出充洋、上原健城、小野敦、宮

城島利一、漆谷徹郎、長尾拓:トキシコゲノクスプロジェクト化合物の遺伝子発現変動解析 第29回日本分子生物学会 京都, 2006年9月

10. 漆谷徹郎:バイオマーカー遺伝子リストによる肝毒性の予測—トキシコゲノクス・データベースを用いた検討 第27回日本臨床薬理学会年会シンポジウム 東京, 2006年12月 臨床薬理37巻 Suppl.S114, 2006

11. 水川裕美子、小野敦、宮城島利一、大野泰雄、長尾拓、漆谷徹郎:各種薬物によるラット肝毒性における LPS/TNF シグナルの解析—トキシコゲノクスプロジェクトのデータを用いて— 第80回日本薬理学会年会、名古屋、2007年3月 J. Pharmacol. Sci. 103: suppl. I 221P, 2007.

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

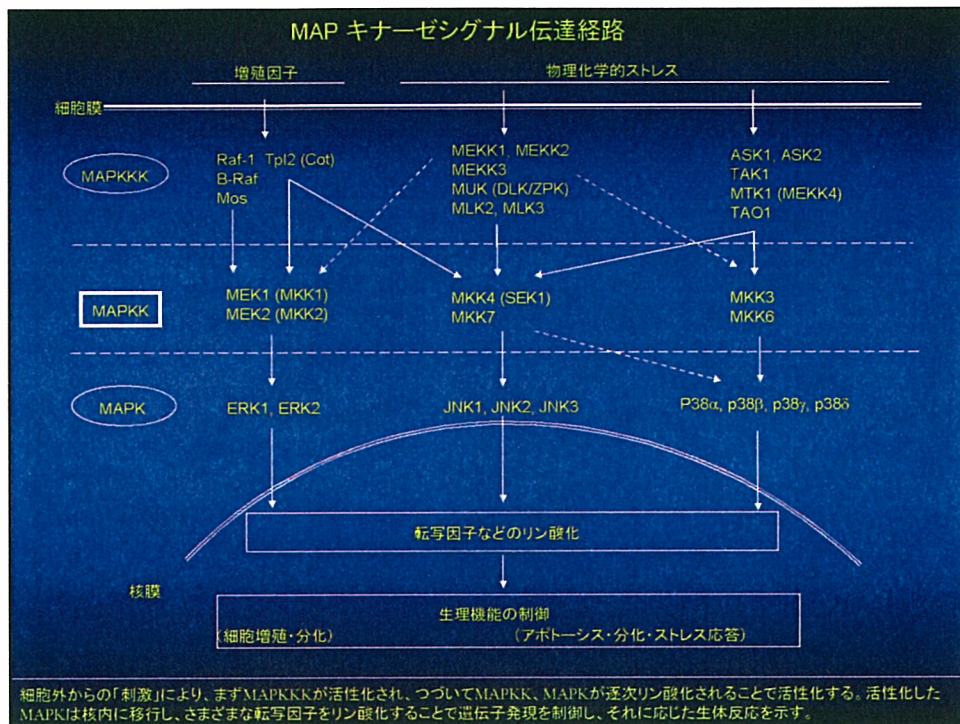
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



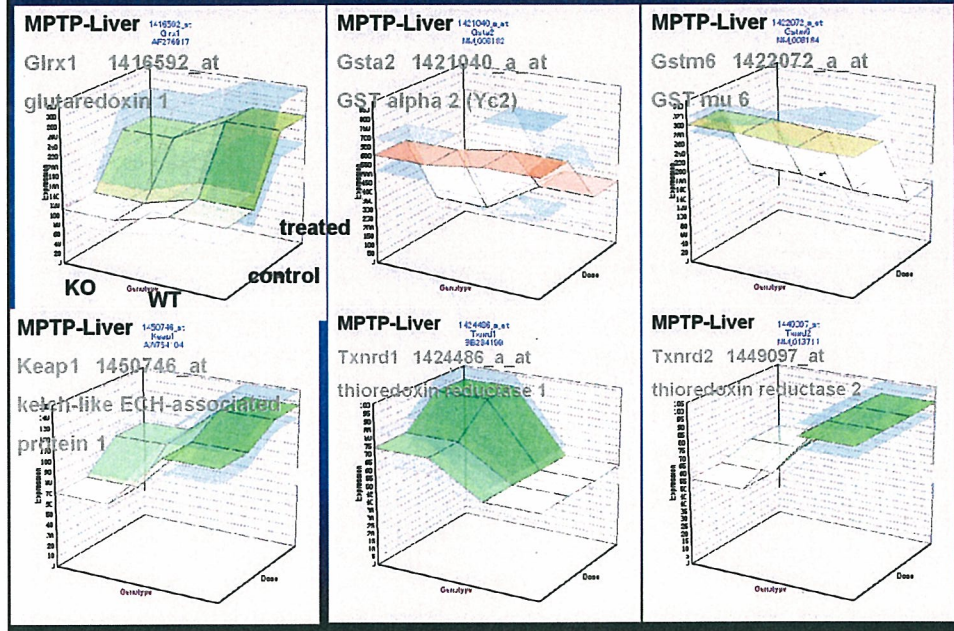
これまでの経過と目的

Apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK-1)のノックアウトマウスを用いて、酸化ストレス関連毒性物質投与後の遺伝子発現変化をGeneChipにより網羅的に解析することによって、毒性シグナルパスウェイを解明することを目的とした。

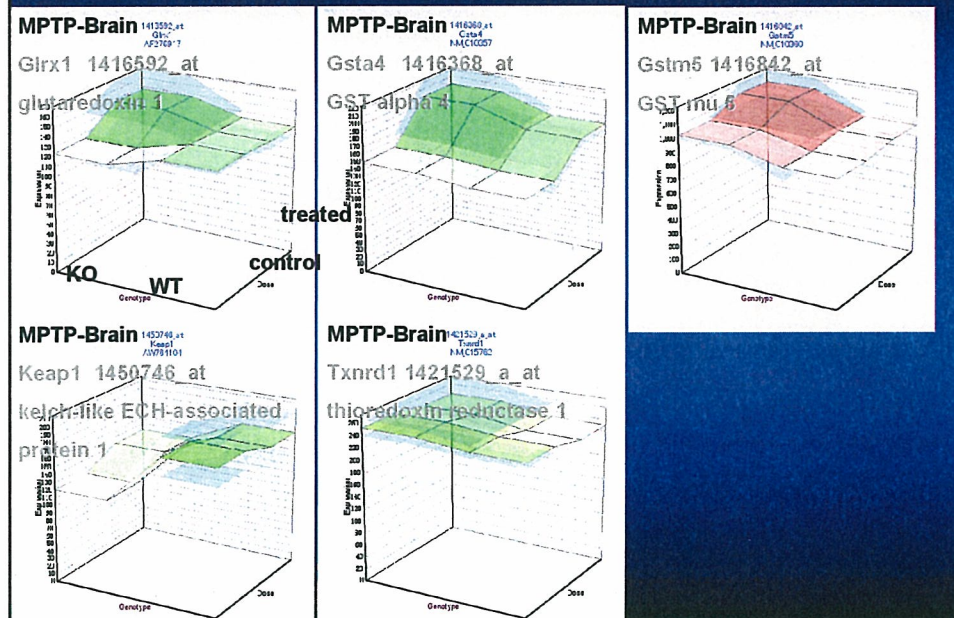
脳、肝臓、MEFでMPTPの作用を検討したところ、KO・WTの差より臓器特異的な変化が大きかった

→消化管粘膜において同様な解析を行い、衛研毒性部データベースに寄与するとともに、細胞普遍的・細胞特異的な毒性シグナルパスウェイを抽出したい

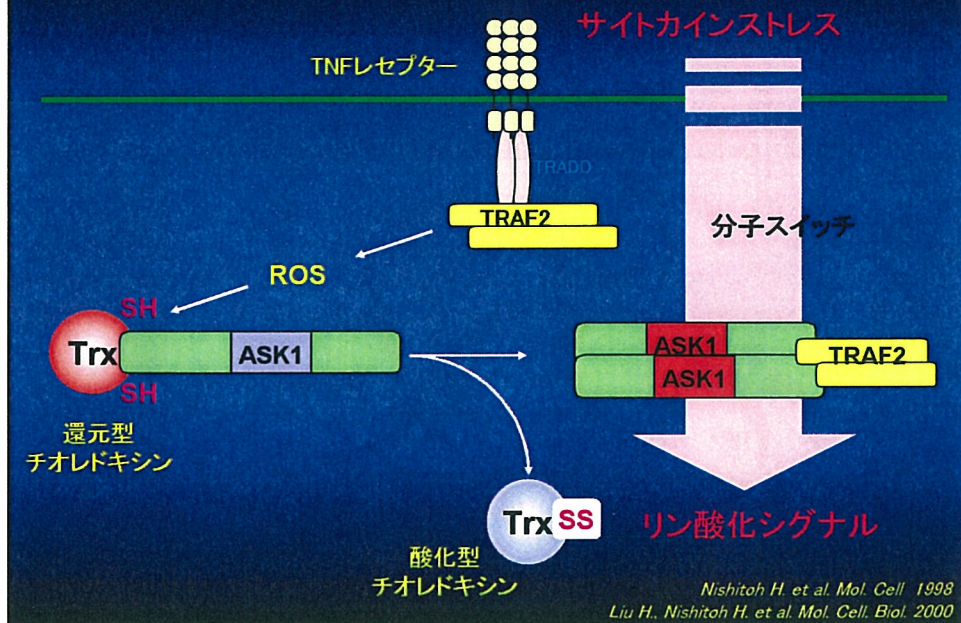
酸化ストレス関連遺伝子—肝臓



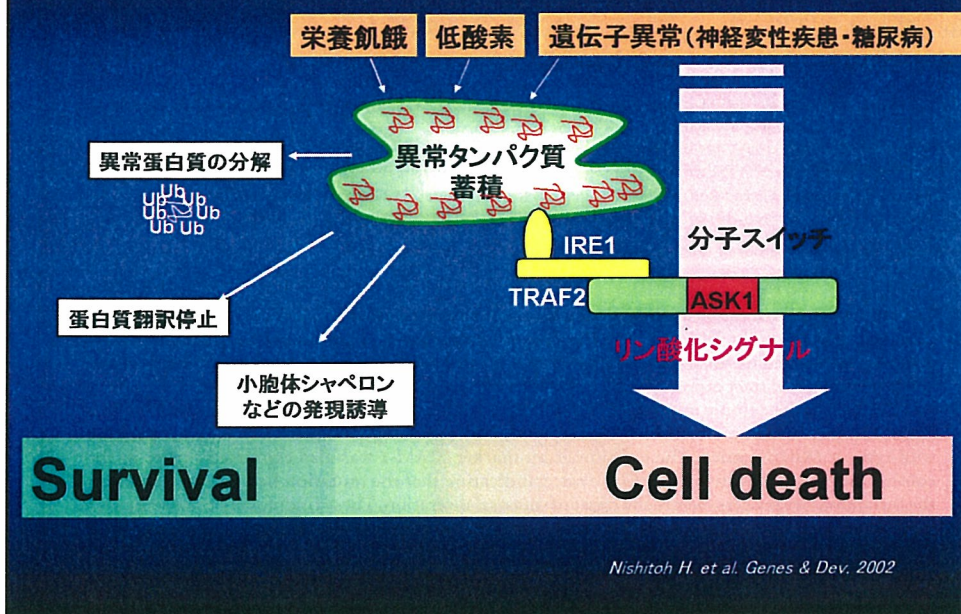
酸化ストレス関連遺伝子—脳



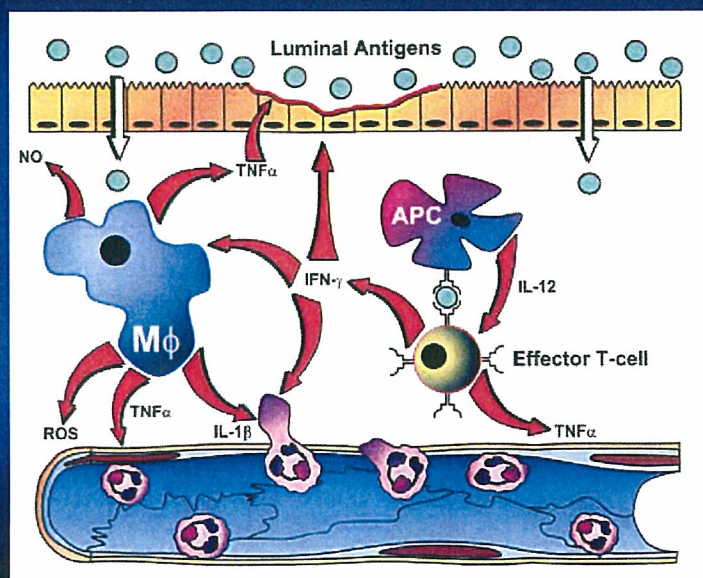
細胞のサイトカインストレス(TNF)応答機構



細胞の小胞体ストレス応答機構



Intestinal Immune Response to Enteric Antigens



Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1β-deficient mice

Anne Bertolotti,¹ XiaoZhong Wang,¹ Isabel Novoa,¹ Rivka Jungreis,¹ Karni Schlessinger,¹ Judy H. Cho,² A. Brian West,³ and David Ron¹

¹Skirball Institute of Biomolecular Medicine, Departments of Medicine and Cell Biology, and the Kaplan Cancer Center, New York University School of Medicine, New York, New York, USA

²Gastroenterology Section, Department of Medicine, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA

³Department of Pathology, and the Kaplan Cancer Center, New York University School of Medicine, New York, New York, USA

Address correspondence to: David Ron, New York University Medical Center, S1 3-10, 540 First Avenue, New York, New York 10016, USA. Phone: (212) 263-7786; Fax: (212) 263-8951; E-mail: ron@saturn.med.nyu.edu.

Received for publication October 4, 2000, and accepted in revised form January 18, 2001.

The epithelial cells of the gastrointestinal tract are exposed to toxins and infectious agents that can adversely affect protein folding in the endoplasmic reticulum (ER) and cause ER stress. The *IRE1* genes are implicated in sensing and responding to ER stress signals. We found that epithelial cells of the gastrointestinal tract express IRE1β, a specific isoform of IRE1. BiP protein, a marker of ER stress, was elevated in the colonic mucosa of *IRE1β*^{-/-} mice, and, when exposed to dextran sodium sulfate (DSS) to induce inflammatory bowel disease, mutant mice developed colitis 3–5 days earlier than did wild-type or *IRE1β*^{-/-} mice. The inflammation marker ICAM-1 was also expressed earlier in the colonic mucosa of DSS-treated *IRE1β*^{-/-} mice, indicating that the mutation had its impact early in the inflammatory process, before the onset of mucosal ulceration. These findings are consistent with a model whereby perturbations in ER function, which are normally mitigated by the activity of IRE1β, participate in the development of colitis.

J. Clin. Invest. 107:585–593 (2001).

大腸炎モデルの作成

- trinitrobenzensulfonic acid (TNBS),
- difluoromethylornithine,
- dextran sulfate,

大腸粘膜の炎症細胞を感作

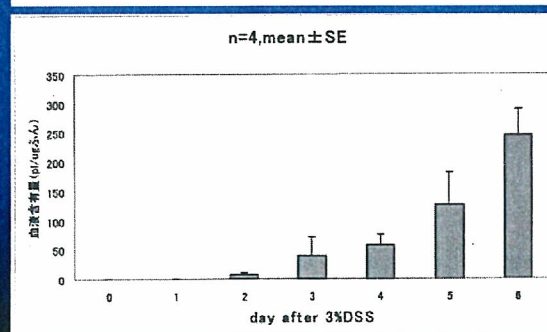
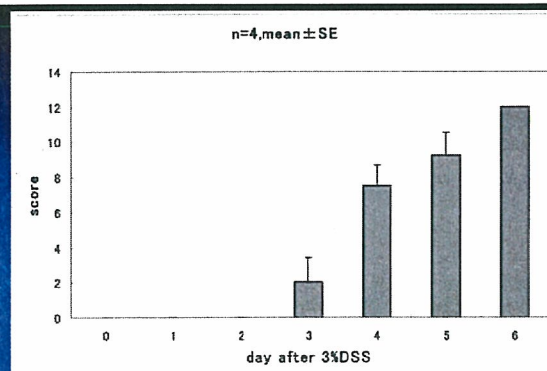
MPTP, paraquat

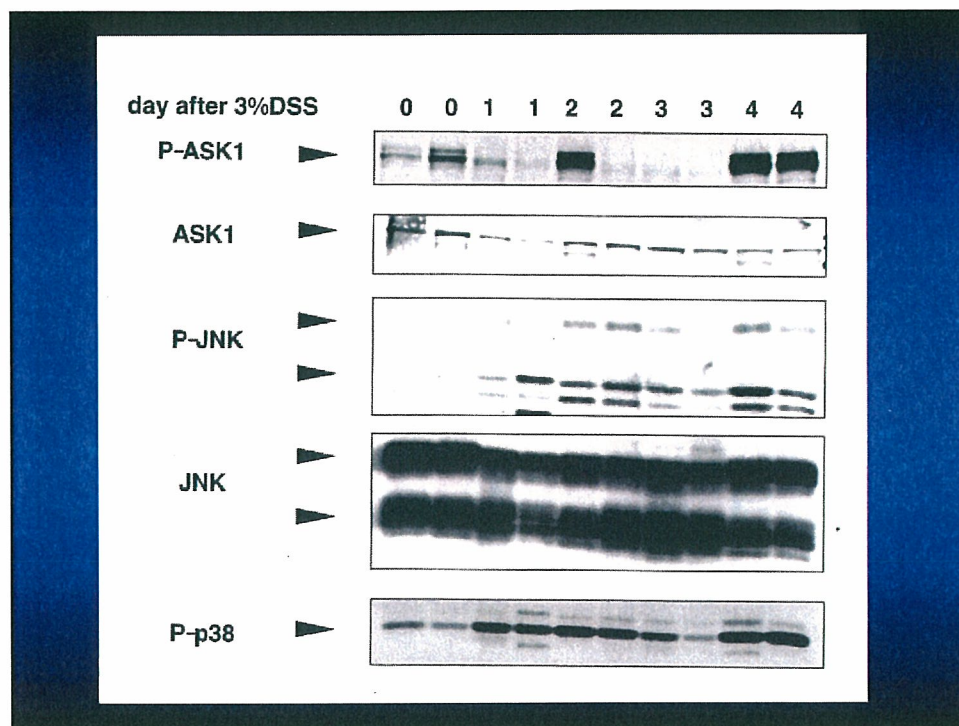
酸化ストレス性毒性物質: 脳、肝と比較

dextran sulfateモデル

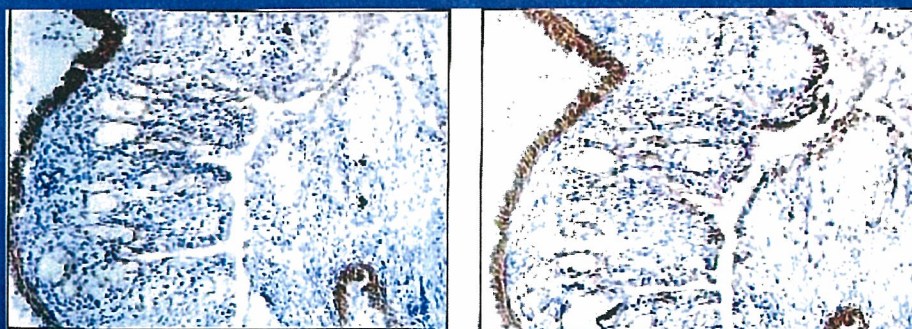
大腸炎スコア

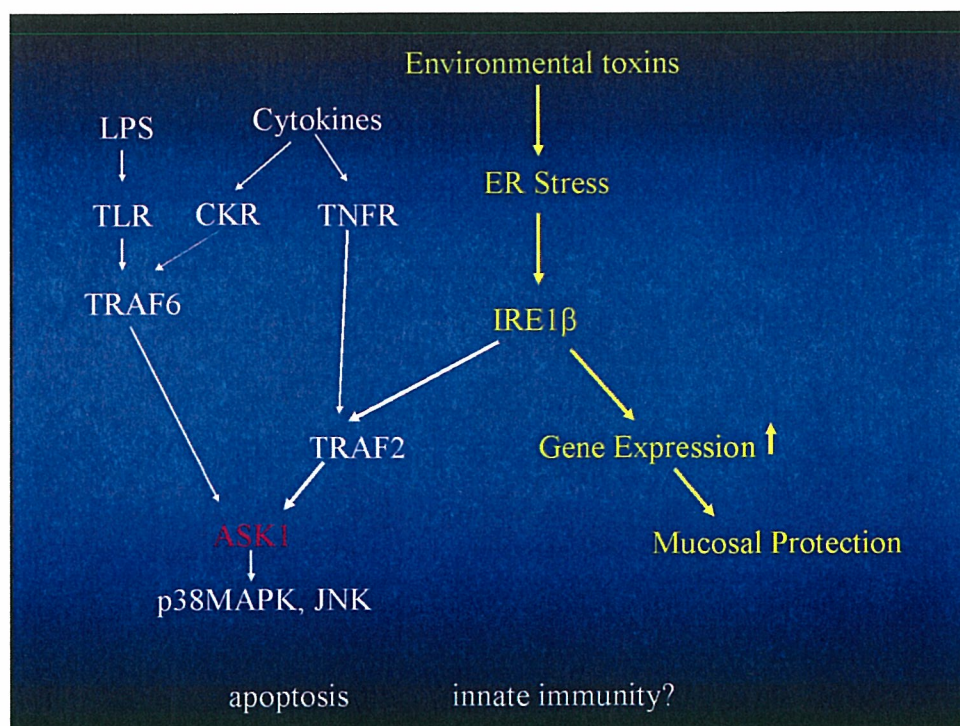
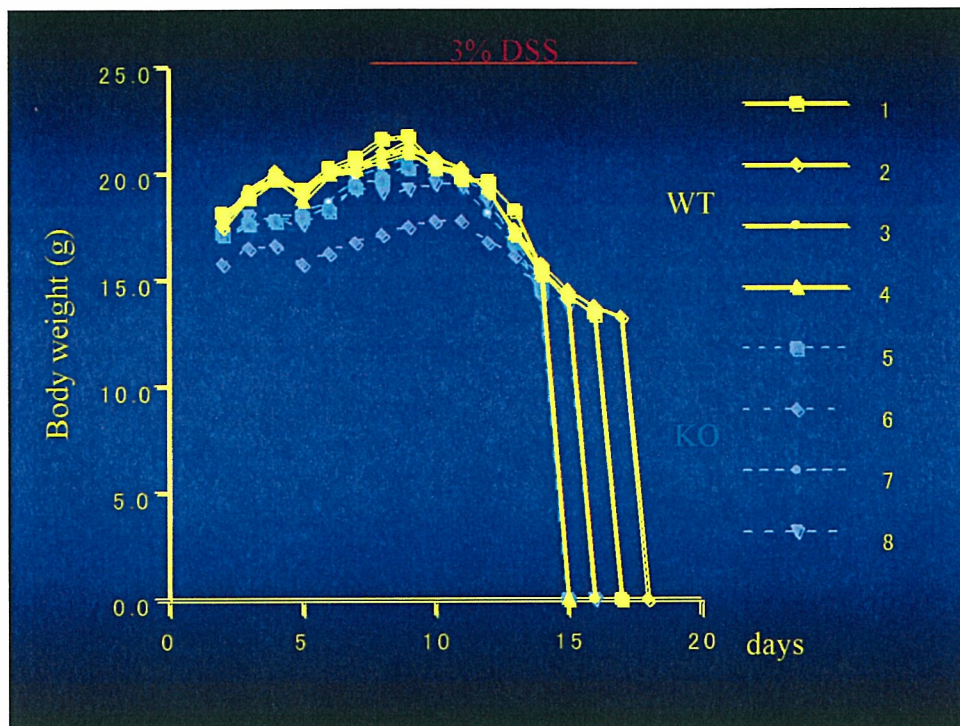
便中血液の定量
(マウスヘモグロビン
ウエスタンブロット)





抗リン酸化ASK-1抗体による染色
3%DSS、5日目





In vitro modelの必要性

1. 炎症細胞、粘膜細胞が混在していると、トランスクリプトームの解釈が困難である。
2. in vivoでは障害の進展のみが観測可能であり、重要な障害の発生時の情報を得にくい。
3. 繁殖で得られるノックアウトマウスを用いて、例数を稼ぐのは物理的に困難
4. 検証のために、鍵となる遺伝子をノックダウン、あるいは過剰発現する必要があるが、in vivoではほぼ不可能

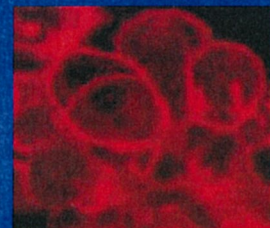
当研究室では、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入が可能な急性単離胃底腺細胞の短期培養系を持っている
→大腸粘膜細胞に応用

Cultured Gastric Mucosal Cells

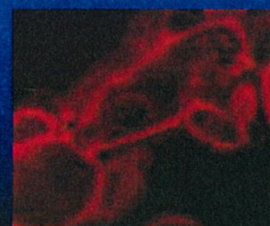
Control (GFP)

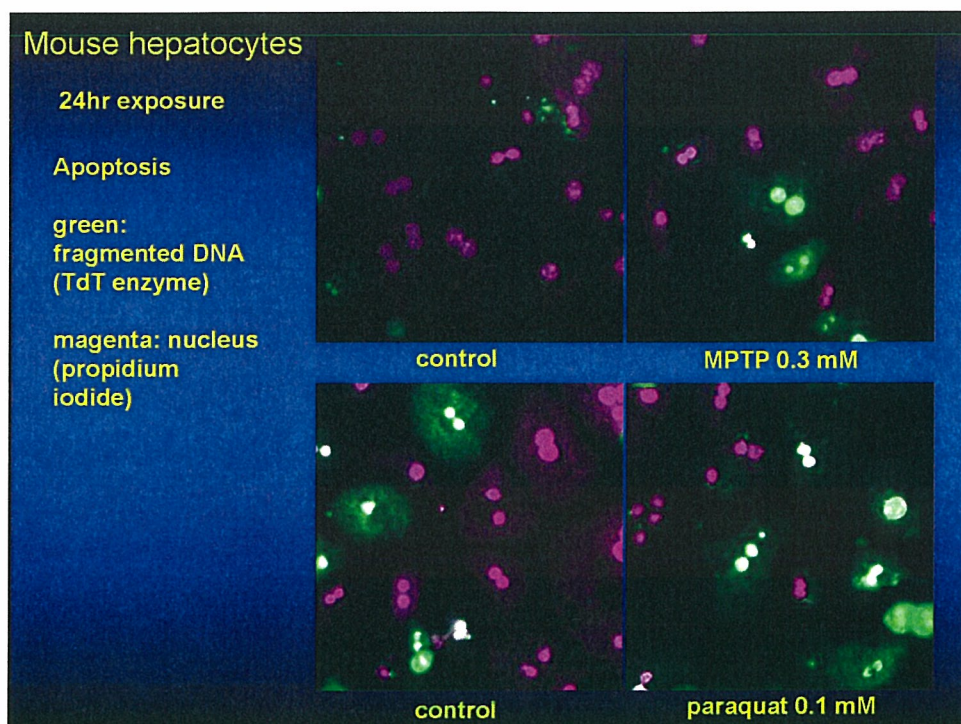
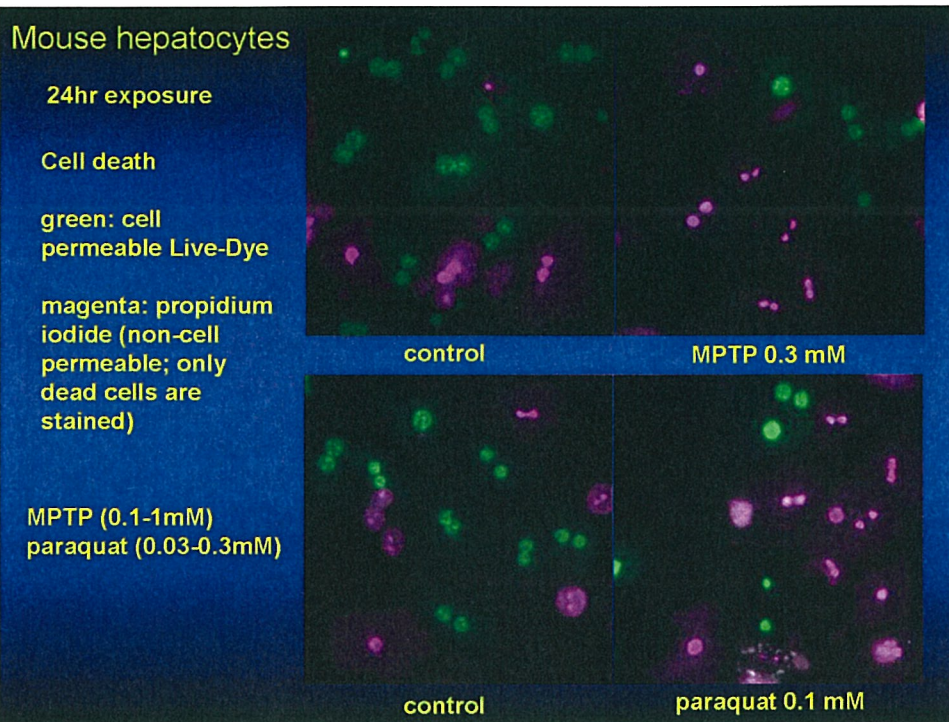
RhoAV14

Resting
(cimetidine)



Stimulated
(histamine)





全体計画

- 初年度:MPTP, paraquatをWT, KOそれぞれの一次培養肝細胞に暴露し, Percellome解析を行う. これにより, 酸化ストレスに共通の毒性シグナル, およびASK-1欠損によりその発現が影響される遺伝子群の候補を得る.
TNBS, difluoromethylornithine, dextran sulfate, MPTP, paraquatなどをマウスに投与して, 腸粘膜障害発生の用量・時間依存性を検討し, マイクロアレイ解析のための基礎データを得る.
- 次年度:前年度までに決定したプロトコールに従って, 腸粘膜のPercellome解析を行う. 並行して, マウス腸粘膜一次培養細胞系を確立し, 化合物暴露に対する応答性, 遺伝子導入効率などの基礎検討を行う.
- 最終年度:前年度までに, 細胞共通毒性シグナル, 細胞特異的毒性シグナルの鍵となるような遺伝子の候補を選び出し, これらの発現を培養細胞系で修飾した上で上記物質に対する応答を検討し, シグナルの検証を行う.

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究

分担研究者 北川 昌伸 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムを解析し、実際の感染症の発症に与える影響を遺伝子発現の変化という観点から網羅的に検討した。胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導することが知られているコルチコステロイドをマウスに in vivo 腹腔内投与し、投与マウスの胸腺細胞および脾細胞における遺伝子発現プロファイルの投与後早期における変化を経時的に解析した。発現変化を示した遺伝子群をいくつかの類型に分類して、細菌感染に関わることが知られている遺伝子リストと比較検討した。

A. 研究目的

細菌感染に対する感受性を左右する薬剤について、(とくに胸腺や脾臓などの免疫系臓器)に及ぼす影響を網羅的に解析する。今回は胸腺の萎縮とT細胞の著明な減少を誘導することが知られているコルチコステロイドの投与による変化を観察した。

B. 研究方法

【マウス、細菌、薬剤】

- ・ C57BL/6 マウス: 6週齢 ♂を搬入し、8週齢で実験を行った。
- ・ コルチコステロイド(ヒドロコルチゾン)処理:2.5 あるいは 10 mg/mouse を腹腔内投与(胸腺は2日後くらいでかなり縮小するが、その後正常に復した)した。

宿主細胞

【実験プロトコール】

- ・ 経過観察群:ステロイド投与 → 1 hr、6 hr、あるいは 24 hr 後にマウスを sacrifice し、胸腺および脾臓を採取
- ・ percollome 解析手順にのっとり、DNA あるいは RNAを調整し、dose dependency および時間経過の上から本班で開発された解析ソフトを用いて遺伝子発現プロファイルを作製した。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて東京医科歯科大学実験動物委員会の定める倫理基準に準拠して行うものとし、同委員会に申請して承認された方法(承認番号 0050015)にのっとり行う。

C. 研究結果

1. これまで明らかにしたように、ステロイド投与によって胸腺は著明な萎縮を示し、10 mg/mouse 投与では 24 時間後までに重量にして約 3 分の 1 にまで低下し、アポトーシス細胞が著明に増加した。変化は可逆的で、約 3 日で元に復した。
2. 脾の重量もステロイド投与後 24 時間まで軽度の減少を示したが、アポトーシス細胞の比率には大きな変化は認められなかった。
3. フローサイトメトリーによる解析では、ステロイド投与後、胸腺中の CD4/8 double positive T 細胞の比率が減少し、CD4 あるいは CD8 single positive T 細胞の比率が相対的に増加していた。脾の T 細胞については、分画の構成に変化は認められなかった。
4. 胸腺の遺伝子発現プロファイルは平均して 24 時間後にピークを示すものが多い傾向があった。アポトーシス関連遺伝子についてもこのような傾向を示すものが多く認められた。その他には response to biotic stimulus という類型に属する遺伝子群の発現が典型的な 24 時間後ピークを呈するパターンを示していた。
5. 脾臓については有意なあるいは特異的な動きを示さないパターンで発現変化する遺伝子が多かったが、胸腺との比較において両者の特異性を検討する予定である。
6. 細菌(リステリア)感染に対する感受性を増加させることが知られている遺伝子群についても胸腺における発現を検討した。最も強い作用をもつといわれている遺伝子群である TNF receptor、Ccr2、Interferon- γ などが典型的な 24 時間後ピークを呈するパターンを示していた。

D. 考察

胸腺に明らかな毒性を有するステロイドをマウスの

腹腔内に投与して、in vivo における胸腺細胞の遺伝子発現変化を検討した。アポトーシスの著明な増加とともに、アポトーシス関連、サイトカイン関連(とくに IFN 関係)、細胞増殖関連(コルチコステロイドレセプターの動きに連動)などに有意な発現の動き(増強)が認められた。これらのうち、典型的な 24 時間後ピークを呈するパターンを示していたものについてさらに解析を進める予定である。

薬剤の胸腺毒性を試験する際に、一つのパターン(アポトーシス誘導)を示す薬剤の代表としてステロイド投与の影響を検討した。胸腺毒性が免疫抑制に作用して細菌感染を助長する作用と、ステロイド投与そのものが細菌に対する感受性を増強する作用とがあることがわかった。さらに、in silico での解析を工夫して、細菌感染に対する感受性の増強に寄与する因子を検討する系を構築したい。

E. 結論

胸腺細胞に著明なアポトーシスを誘導する薬剤であるコルチコステロイドの作用機構を、細菌感染に対する感受性という観点から解析するため、遺伝子発現プロファイルの上から機能分類した。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表(2005-2007)

【原著論文】

Keith T, Araki Y, Ohyagi M, Hasegawa M, Yamamoto K, Kurata M, Nakagawa Y, Suzuki K, Kitagawa M. Regulation of angiogenesis in the bone marrow of myelodysplastic syndromes transforming to overt leukaemia. Br J Haematol 2007, in press.

Wachi M, Koyama M, Utsuyama M, Bittman BB,

Kitagawa M, Hirokawa K. Recreational music-making modulates natural killer cell activity, cytokines, and mood states in corporate employees. Med Sci Monit 2007, in press.

Kitagawa M. The angiopoietin signaling pathway as a promising target for the treatment of acute leukemia. Haematologica 91:1155B, 2006.

Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, Hasegawa M, Yamamoto K, Inoue M, Takemura T, Suzuki K, Kitagawa M. IAP Family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. Am J Hematol 81:824-831, 2006.

Takai D, Park S-H, Takada Y, Ichinose S, Kitagawa M, Akashi M. UV-irradiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA primarily through hydrogen peroxide: Analysis of 8-oxodGuo by HPLC. Free Radical Res 40:1138-1148, 2006.

Kurata M, Hasegawa M, Nakagawa Y, Abe S, Yamamoto K, Suzuki K, Kitagawa M. Expression dynamics of drug resistance genes, multidrug resistance 1 (MDR1) and lung resistance protein (LRP) during the evolution of overt leukemia in myelodysplastic syndromes. Exp Mol Pathol, 81:249-254, 2006.

2. 学会発表

Mizutani S, Takagi M, Morio T, Horibe S, Kitagawa M. Clinico-pathological implications of ATM signaling pathways in the development of hematopoietic disorders. The 2006 International Workshop on Ataxia-Telangiectasia, Banff, Alberta, Canada,

September 8th to 12th, 2006.

北川昌伸、長谷川真紀、田中 薫、相沢志郎、廣川勝
暎. レトロウイルス感染にともなう放射線誘発アポトー
シス増強作用と宿主遺伝的背景. 日本病理学会会誌
94 巻:220, 2005.

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

なし。

T 細胞機能に関わる胸腺毒性発現メカニズムに関する研究

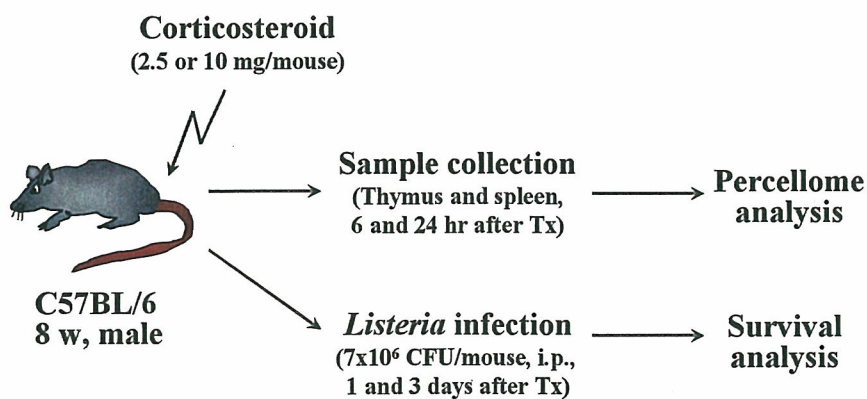
Chemicals trophic for the thymus

- Some organotin compounds: immature immunoblasts in the outer cortex
- Glucocorticosteroid: small lymphocytes in the cortex
- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: epithelial cells in the cortex
- Cyclosporin: dendritic cells and epithelium in the medulla

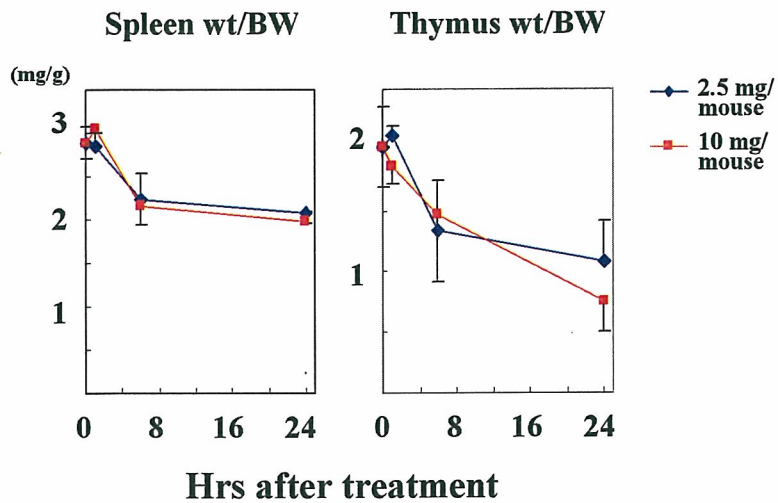
Mechanisms:

- Receptor binding (dioxin)
- Ca^{2+} -dependent activation of endogenous endonuclease resulting in apoptosis (dioxin, steroid)
- Interference with cell proliferation (some organotin compounds)

実験プロトコール



Changes of organ weight after treatment with steroid



Apoptotic cell ratio of the thymus and spleen after treatment with steroid (10 mg)

Organ	TUNEL positive cell ratio (FACS analysis)		
	Control	6 hrs	24 hrs
Thymus	2.88	10.2	81.8
Spleen	1.09	5.88	4.15