

calreticulin, CHOP mRNA を誘導したが、他の遺伝子の発現には影響がなかった。この3つの遺伝子の上流には転写因子 ATF6 が作用する ERSE (ER stress response element) があり、化合物 BIX は ATF6-ERSE の経路に働いている可能性が示唆された。

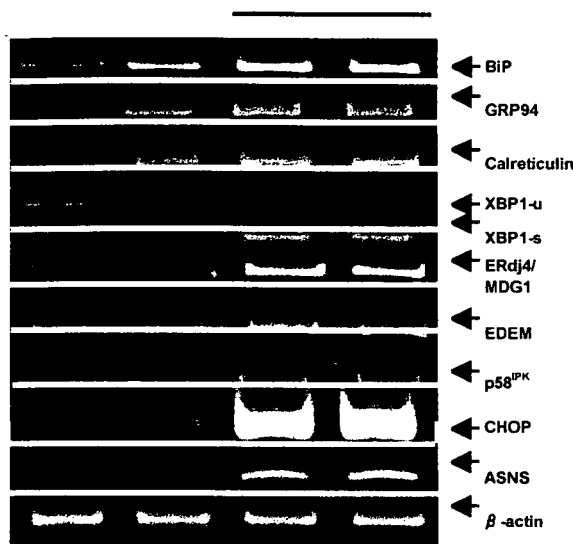


図 3

Semi-quantitative RT-PCR analysis. 6 h treatment of cells with 5 μ M BIX induces BiP mRNA but not spliced XBP-1 (XBP1-s), ERdj4/MDG1, EDEM, p58^{IPK}, and ASNS (asparagine synthetase) mRNAs, which are induced by 1 μ M thapsigargin (Tg) or 1 μ g/ml tunicamycin (Tm). GRP94, calreticulin, CHOP are slightly induced by BIX.

6. 遺伝子改変マウスの作製

6-1) 小胞体ストレスモニターマウス

Red/ET 反応により、CHOP-GFP、および CHOP-LUC 遺伝子座のエキソン/イントロン構造、およびマウス遺伝子座の発現制御配列を損なうことなく、CHOP-GFP、および CHOP-LUC 組換え BAC (RecBAC) クローンの構築を試みた。

大腸菌内での能動型相同組み換え反応である Red/ET Recombination Technology を利用して、マウス CHOP 遺伝子を含む BAC クローンから luc、および GFP の組換え BAC クローン (CHOP-luc、および CHOP-GFP) を構築した。マウス CHOP 遺伝子開始コドンの 5'、および 3' flanking 配列、および luc、および GFP 遺伝子の 5'、および 3' flanking 配列を大腸菌内での能動型相同組み換え反応のためのキ

一配列とした。マウス CHOP 遺伝子のゲノム DNA 配列を含む 200 kb BAC ゲノムクローン RP24-341K21、および RP23-331K3 を入手した。そして、挿入する EGFP タグ、および luc タグをコードする DNA カセットを正確に構築し、EGFP タグ、および luc タグのトランスファーフラグメントを調製した。現在、マウス BAC クローンの CHOP 遺伝子の開始コドンの直後に Red/ET セレクションマーカーを挿入し、そこに EGFP タグ、および luc タグのトランスファーフラグメントの挿入を試みた。

6-2. 自閉症モデル (セクレチン欠損マウス)

我々は、自閉性障害治療の候補分子の開発を目的に、(1)自閉性障害患者における候補遺伝子の変異解析と、(2)自閉性障害候補遺伝子のノックアウトマウスの解析による、自閉性障害の病因遺伝子同定と病態解明研究を行った。治療候補分子の一つとして、セクレチン (SCT) とそのシグナル伝達系が挙げられる。我々は、自閉性障害患者においてセクレチン遺伝子の変異解析を行ない、遺伝子発現が低下するプロモーターの変異を検出し、セクレチンが自閉性障害に関与する可能性を示唆した。さらに、セクレチンの脳内での機能と自閉性障害との関連を明らかにするために、セクレチンおよびセクレチン受容体 (Sctr) のノックアウトマウスを確立し解析した。

6-3. ストレス保護マウス

SCCA1 (squamous cell carcinoma antigen 1) はセルピン B3 とも呼ばれることから解るように、セリンプロテアーゼ阻害物質セルピンの仲間である。しかしながら、極めて特徴的なことに、SCCA1 は他の仲間と異なり、システイン酵素に対して強い阻害活性を有する。我々のこれまでの研究で、SCCA1 が乾癬表皮で異常な発現亢進を示すこと、さらには UV でその発現が強力に誘導されることが明らかになっていた。これらの事実は、SCCA1 が単なるシステイン酵素の阻害物質ではなく、他の生理的な反応に関わっていることを示唆している。SCCA1 の生理的機能を明らかにするため、我々はインボルクリンプロモーターにより、表皮上層に SCCA1 を過剰発現させた Tg マウスを作製した。また、その発現調節機構を明らかにするために、各種サイトカインに対する反応性を検討した。さらに SCCA1 遺伝子の 5' 上流 -5K までをクローニングし、レポーターアッセイ系を構築し、SCCA1 発現に及ぼすサイトカインの影響について

検討した。

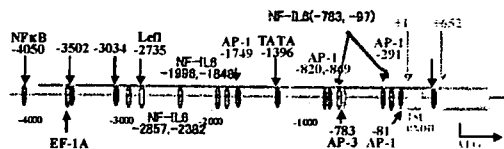


図 4
SSCA1 プロモーター領域の解析

D. 考察

1. 正常および多くの変異ジスフェリンはトランスロコンを介して ERAD へと搬送され、分解されるとともに、オートファジーの系により、小胞体内のジスフェリンがリソゾームへと輸送され、分解されることと考えられる。テトラサイクリンにより Dysferlin の発現を調節することにより変異蛋白凝集がもたらす ERAD の抑制および小胞体ストレス誘導をモニターすることが可能となり、小胞体ストレスを制御する化合物のスクリーニングが可能となった。また、BIP を発現させる化合物が小胞体ストレスによる細胞死を抑制することから、BIP 遺伝子、CHOP 遺伝子の発現を制御する化合物が治療薬として有効と考えられる。また、ストレス細胞死を抑制する SS CA1 の発現を制御する化合物も有望であり、こうした化合物のモニター系としては Red/ET Recombination Tech を応用し、特異的に BAC ゲノムクローンの DNA 配列を操作することで、SSCA1, Bip, CHOP 発現制御系を用いたモニター細胞、マウスの作製を考えたい。

2. 一方、MM-1 が polyQ 凝集の初期段階であるオリゴマー形成を抑制することから、PFD の一員として機能すると考えられる。今後、PFD の他の subunit でも同様な実験を行い、これらを確認する必要がある。また、何分子のオリゴマー形成から機能するかを定量する必要もある。一方、MM-1 がオートファジーに関与することが明らかになりつつあるが、その分子機構は良く分かっておらず、今後の検討が必要である。

3. CFTRDF508 という典型的な ERAD 基質蛋白のユビキチン化が RMA1 と gp78 という二つのリガーゼによって協調的にポリユビキチン化されることでプロテアソーム分解を受けることを示し、小胞体膜における異常蛋白質識

別において新たなメカニズムを提唱することができた。また、ユビキチン鎖伸長活性(E4)ではこれまで Ufd2 のみが知られていたが、gp78 が E4 であることを明確に示すことができた。今後、これらのリガーゼ活性を標的として制御する化合物(ケミカルシャペロン)を探索することによって ERAD を制御する新たな物質の開発が期待される。

4. セクレチン、およびセクレチン受容体ノックアウトマウスの解析から、GPR のシグナル伝達の欠損が自閉症に関係している可能性が示唆され、今後自閉症候補遺伝子としての GPR の可能性を検討することが必要である。

E. 結論

1 UPS とオートファジーリソゾーム系の二つの分解系が小胞体および小胞体ストレスにより制御されることを明らかにした。われわれは UPS を ERAD-I, オートファジーリソゾーム系を ERAD-II と名づけることを提唱した。

小胞体ストレスをモニターする系を確立するとともに、制御する化合物のスクリーニング系として応用することが可能になった。

2. MM-1 はオートファジー関連因子 Atg16 に直接結合し、少なくともオートファジー形成初期段階に作用する。MM-1 は Hsp70, Hsc70 と複合体を形成し、PolyQ 凝集の初期段階であるオリゴマー形成を阻害する。

RMA1 と gp78 という二つのリガーゼによって協調的にポリユビキチン化されることでプロテアソーム分解を受けることを示し、小胞体膜における異常蛋白質識別において新たなメカニズムを提唱することができた。また、ユビキチン鎖伸長活性(E4)ではこれまで Ufd2 のみが知られていたが、gp78 が E4 であることを明確に示すことができた。

3. BIX は ATF6 の下流に作用して BiP mRNA を誘導することが明らかになった。実際に BIX を投与した細胞では GRP94 や calreticulin が誘導されていた。

F. 研究発表

主任研究者
桃井 隆

1) Fujita E, Tanabe Y, Hirose T, Aurrand-Lions M, Kasahara T, Imhof BA, Ohno S, Momoi T. Loss of partitioning-defective-3/isotype-specific interacting protein(par-3/ASIP) in the elongating spermatid of RA175 (IGSF4A/SynCAM)-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 171,1800-1810,2007.

2) Uchio N, Oma Y, Toriumi K, Sasagawa N, Tanida I, Fujita E, Kouroku Y, Kuroda R, Momoi T, Ishiura S. Endoplasmic reticulum

stress caused by aggregate-prone proteins containing homopolymeric amino acids. **FEBS J.**274,5619-5627,2007.

3)Bail J, Nakamura H, Yong-W K, Tanito M, Ueda S, Tanaka T, Hattori I, Ban S, Momoi T, Kitao Y, Ogawa S, Yodoi J. Does thioredoxin-1 prevent mitochondria- and endoplasmic reticulum-mediated neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine?

Antioxidants & Redox Signaling. 9,603-608,2, 2007.

4)Kitao Y, Matsuyama T, Takano K, Tabata, Y, Yoshimoto T, Momoi T, Yamatodani A, Ogawa S, Hori O. Does ORP150/HSP12A Protect Dopaminergic Neurons Against MPTP/MPP(+)-Induced Neurotoxicity? **Antioxid Redox Signal.** 9,589-95.2007.

5)Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagi H, Matsuda C, Hayashi Y, Momoi, T. Two Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Systems (ERAD) for the Novel Variant of the Mutant Dysferlin; Ubiquitin/Proteasome ERAD (I) and Autophagy/Lysosome ERAD (II). **Hum. Mol.Genet.**16,618-629.2007.

6)Mizutani A, Matsuzaki A, Momoi MY, Fujita E, Tanabe Y, Momoi T. Intracellular distribution of a speech/language disorder associated FOXP2 mutant. **Biochem Biophys Res Commun.**353,869-874,2007.

7)Takai Y, Matikainen T, Jurisicova A, Kim MR, Trbovich AM, Nakagawa T, Lemmers B, Momoi T, RAFlavell R Hakem, J Yuan, JL Tilly, GI Perez. Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. **Apoptosis.**12, 791-800,2007.

8)Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. **Cell Death Differ.**14,230-239,2007.

分担研究者

磯合 敦

1)Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagi H, Matsuda C, Hayashi Y, Momoi T. Two Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Systems (ERAD) for the Novel Variant of the Mutant Dysferlin; Ubiquitin/Proteasome ERAD (I) and Autophagy/Lysosome ERAD (II). **Hum. Mol.Genet.**16,618-629,2007.

2)Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. **Cell Death Differ.**14,230-239,2007.

上田 正次

1)Oka A, Aoto T, Takahashi R, Ueda M, Mita A, Sakurai-Yamatani N, Yamamoto H, Kuriki S, Takagi N, Moriwaki K, Shiroishi T. Disruption of genetic interaction between autosomal regions and the X chromosome causes reproductive isolation between mouse strains derived from different subspecies. **Genetics.** 5,185-197,2007,.

2)Takahashi, R, Kuramochi T, Aoyagi K, Hashimoto S, Miyoshi I, Kasai N, Hakamata Y, Kobayashi E, Ueda M. Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. **Transgenic. Res.**16,115-120,2007.

3)Kitada K, Ishishita S, Tosaka K, Takahashi R, Ueda M, Keng V.W, Horie K, Takeda J. Transposon-tagged mutagenesis in the rat. **Nature Method.**4,131-133,2007.

4)Aoto T, Totsuka Y, Takahashi R, Ueda M, Production of progeny mice by intracytoplasmic sperm injection of repeatedly frozen and thawed spermatozoa experimental technique. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**46, 41-46,2007.

5)Sakata S, Shimizu S, Ogoshi K, Hirai K, Ohno Y, Kishi, Sherchand J.B, Utsumi K, Shibata M, Takaki M, Ueda M, Mori I. Inverse relationship between serum erythropoietin and blood lead concentrations in Kathmandu tricycle taxi drivers. **Int. Arch Occup. Environ. Health.**80,324-345,2007.

6)Hashimoto S, Kimura K, Aoyagi K, Hirako M, Kawaguchi M, Iwata H, Hirao M, Kitada K, Hirosawa K, Ueda M. Responsiveness of rabbits to superovulation treatment by a simple injection of follicle-stimulating hormone with aluminium hydroxide gel. **Mol. Reprod. Dev.**74, 1208-1212. 2007.

7)Koshiba S, Ito T, Shiota A, Wakabayashi K, Ueda M, Ichinose H, Ishikawa T. Development of polyclonal antibodies specific to ATP-binding cassette transporters human ABCG4 and mouse Abcg4: site-specific expression of mouse Abcg4 in brain. **J. Exp. Ther. Oncol.**6,321-333,2007.

日比野 利彦

1)Nukui T, Ehama R, Sakaguchi M, Sonogawa H, Katagiri C, Hibino T. Nam-ho Huh. S100A8/A9, a Key Mediator for Positive Feedback Growth Stimulation of Normal Human Keratinocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**.2008(in press).

徳永 文稔

1)Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, Tokunaga F, Iwai K, Igarashi K. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. **Mol. Cell. Biol.** 27, 6962-6971,2007.

2)Morito D, Hirano K, Oda Y, Hosokawa N, Tokunaga F, Cyr D.M, Tanaka K, Iwai K, Nagata K. Gp78 cooperates with RMA1 in ER-associated degradation of CFTRDF508. **Mol. Biol. Cell**.2008(in press)

今泉 和則

1) Yoshinaga K, Kawai K, Tanii I, Imaizumi K, Kodama K. Nerve fiber analysis on the so-called accessory subscapularis muscle and its morphological significance. **Anatomical Science International**.2008(in press)

2) Kudo T, Kanemoto S, Hara H, Morimoto N, Morihara T, Kimura R, Tabira T, Imaizumi K, Takeda M. : A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. **Cell death differ.**15,364-375,2008.

3)Kondo S, Saito, A, Hino S-I, Murakami T, Ogata M, Kanemoto.S, Nara,S. Yamashit A, Yoshinaga.Hara,H, Imaizumi,K. BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of ER stress transducer. **Mol. Cell. Biol.**27,1716-1729,2007.

4)Hino S-I, Kondo S, Sekiya H, Saito A, Kanemoto S, Murakami T, Chihara K Aoki Y, Nakamori M, Takahashi MP, Imaizumi K. Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. **Human Molecular Genetics**.16,2834-2843, 2007.

5)Murakami T, Hino S-I, Saito A, Imaizumi K. Endoplasmic reticulum stress response in dendrites of cultured primary neurons. **Neuroscience**.146,1-8,2007.

6)Saito A, Hino S-I, Murakami T, Kondo S, Imaizumi K. A novel ER stress transducer, OASIS, expressed in astrocytes. **Antioxidants & Redox Signaling**.9,563-571,2007.

7)Antony JM, Ellestad KK, Hammond R, Imaizumi K, Mallet F, Warren KG, Power C. The human endogenous retrovirus envelope

glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. **The Journal of Immunology**.179,1210-1224,2007.

8)Morimoto N, Oida Y, Shimazawa M, Miura M, Kudo T, Imaizumi K, Hara H. Involvement of endoplasmic reticulum stress after middle cerebral artery occlusion in mice. **Neuroscience**.147,957-967,2007.

9)Ikezoe K, Nakamori M, Furuya H, Arahata H, Kanemoto S, Kimura T, Imaizumi K, Takahashi MP, Sakoda S, Fujii N, Kira J-I. Endoplasmic reticulum stress in myotonic dystrophy type 1 muscle.**Acta.europathologica**.14,527-535,2007

10)Manabe T, Ohe K, Katayama T, Matsuzaki S, Yanagita T, Okuda H, Bando Y, Imaizumi K, Reeves R, Tohyama M, Mayeda A. HMGA1a:Sequence-specific RNA-binding factor causing sporadic Alzheimer's disease-linked exon skipping of Presenilin-2 pre-mRNA. **Genes to Cells**.12,1179-1191,2007.

11)Tanii I, Yagura T, Inagaki N, Nakayama T, Imaizumi K, Yoshinaga K. Preferential localization of rat GAPDS on the ribs of fibrous sheath of sperm flagellum and its expression during flagellar formation. **Acta Histochemica et Cytochemica**.40,19-26,2007.

有賀 寛芳

1)Yoshida T, Kitaura H, Hagio Y, Sato T, Iguchi-Arigo S.M.M, Ariga H.Negative regulation of the Wnt signal by MM-1 through inhibiting expression of the wnt4 gene.**Exp.Cell Res**.2008(in press)

2)Ishimura A, Ishige K, Taira T, Shinba S, Ono S, Ariga H, Tezuka M, Ito Y. Comparative study of hydrogen peroxide- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced cell death in HT22 cells. **Neurochem.Int.** 52,776-85,2008.

3)Maita C, Tsuji S, Yabe I, Hamada S, Ogata A, Maita H, Iguchi-Arigo S.M.M, Sasaki H, Ariga H. Secretion of DJ-1 into the serum of patients with Parkinson's disease. **Neuroscience Lett.** 431,86-89,2008.

4)Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagida T, Takata K, Kobayashi Y, Taniguchi T, Yoshimoto K, Kaneko M, Okuma Y, Taira T, Ariga H. Shimohama S. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. **J. Neurochem**.101,1491-1504,2007.

- 5)Kinoshita T, Ariga H, Matsumoto K. Distinct glycosylation in interstitial and serum Tenascin-X. **Biol. Pharm. Bull.**30,354-358, 2007.
- 6)Itoh Y, Hayashi H, Xu J, Takii T, Miyazawa K, Ariga H, Akahoshi T, Waguri-Nagaya Y, Otsuka T, Okamoto T, Onozaki K. Dihydrotestosterone inhibits tumor necrosis factor α -induced interleukin-1 α mRNA expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells. **Biol. Pharm. Bull.**30,1140-1143, 2007.
- 7)Koide-Yoshida S, Niki T, Ueda M, Himeno S, Taira T, Iguchi-Ariga S.M.M, Ando Y, Ariga H. DJ-1 degrades transthyretin and an inactive form of DJ-1 is secreted in familial amyloidotic polyneuropathy. **Int. J. Mol. Med.**19,885-894, 2007.
- 8)Kimura Y, Nagao A, Fujioka Y, Satou A, Taira T, Iguchi-Ariga S.M.M, Ariga H. MM-1 facilitates degradation of c-Myc by recruiting proteasome and a novel ubiquitin E3 ligase. **Int. J. Onc.**31,829-836, 2007.
- 9)Yanagisawa D, Kitamura Y, Inden M, Takata K, Taniguchi T, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Tooyama I, Taira T, Iguchi-Ariga S.M.M, Akaike A, Ariga H. DJ-1 protects against neurodegeneration caused by focal cerebral ischemia and reperfusion in rats. **J. Cereb. Blood. Flow. Metab.**28,563-78,2007.

桃井 真里子

- 1)Goto T, Kimura H, Numazaki K, Akiyama M, Kato M, Noda M, Nozaki Y, Tanaka-Taya K, Taniguchi K, Yamagata T, Nishio O, Oogane T, Momoi MY, Okabe N. A case of meningoencephalitis associated with G1P[8] rotavirus infection in a Japanese child. **Scand J. Infect Dis.**39,1067-70,2007.
- 2)Sato Y, Ichihashi K, Kikuchi Y, Shiraishi H, Momoi MY. Autonomic function in adolescents with orthostatic dysregulation measured by heart rate variability. **Hypertens Res.**30,601-605,2007.
- 3)Goto T, Mori M, Yamagata T, Mizuguchi M, Momoi MY. A child with generalized myasthenia gravis successfully treated with tacrolimus. **No To Hattatsu.**39,300-3,2007.
- 4)Honma Y, Yada Y, Takahashi N, Momoi MY, Nakamura Y. Certain type of chronic lung disease of newborns is associated with *Ureaplasma urealyticum* infection in utero. **Pediatr Int.**49,479-484,2007.
- 5)Iino M, Shiraishi H, Ichihashi K, Hoshina M,

- Saitoh M, Hirakubo Y, Morimoto Y, Momoi MY. Volume measurement of the left ventricle in children using real-time three-dimensional echocardiography: comparison with ventriculography. **J Cardiol.**49,221-229,2007.
- 6)Mizutani A, Matsuzaki A, Momoi MY, Fujita E, Tanabe Y, Momoi T. Intracellular distribution of a speech/language disorder associated FOXP2 mutant. **Biochem Biophys Res. Commun.**353,869-874,2007.

2.学会発表

主任研究者

桃井 隆

- 1)Fujita E, Kouroku Y, Momoi M, Momoi M. PERK/eIF2 α -MSDIATED ONSTITUTIVE AUTOPHAGY/LYSOSOME REGURATES ER STRESS_CELL DEATH BY DEGRADING ABNORMAL PROTEIN AGGREGATES AS ERAD- II . 15th Euroconference on Apoptosis, October, 27-30, 2007. Portoros, Slovenia.

分担研究者

日比野 利彦

- 1)Katagiri C, Negishi K, Hibino T. SCCA1 contributes inflammatory cytokine and accelerates keratinocyte proliferation. The Annual Meeting of the society for investgative dermatology. May 3-6, 2006.

徳永文稔

- 1)徳永文稔、坂田真一、里見佳典、桐裕隆嘉、亀井希代子、中川朋子、村田茂穂、山岡昇司、高尾敏文、田中啓二、岩井一宏：LUBAC ユビキチンリガーゼによる NEMO の直鎖型ポリユビキチン化修飾と NF- κ B 活性化：第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会合同大会、2007 年 12 月、横浜

有賀 寛芳

- 1)Tasiro E, Muto H. Miyazawa M, Kitaura H Iguchi-Ariga S.M.M, Kinjo M, Ariga H. Effect of MM-1 and molecular chaperone on formation of polyglutamine aggregation. 10th Workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy and related methods, 札幌, 2007.
- 2)Ishikawa SH, Maita, C, Ariga H, Iguchi-Ariga S.M.M. Roles of DJ-1, a causative gene product for familial Parkinson's disease, in dopamine biosynthesis. 11th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. イスタンブール, 2007.
- 3)Kim Y, Kitaura H, Iguchi-Ariga, H. Ariga,

S.M.M, Modulation of Akt signaling pathway by the interaction of DJ-1 with PTEN. 11th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. イスタンブール, 2007.

4) Yanagida T, Takata K, Inden M, Kitamura Y, Taniguchi T, Taira T, Ariga H. Familial Parkinson's disease related-protein, DJ-1 (PARK7) has a neuroprotective effects against dopaminergic cell death in 6-OHDA-injected rat brain. Neuroscience 2007, サンジェゴ, 2007

G. 健康危機情報

なし

H. 知的所有権の取得状況

特許取得

有賀寛芳

名称: 神経変性疾患治療薬

出願番号: PCT/JP2006/322977

公開番号: W02007/060886

出願人: 北海道大学、

発明者: 有賀寛芳

実用新案登録

なし

その他

なし

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 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部
研究者 清河 信敬

研究要旨：B 細胞におけるラフト関連アポトーシス、BAFF と DAP3 を中心としたアポトーシス制御機構、相互の作用等を解析し、将来的に診断・治療法の開発へ応用する目的で、細胞株を用いた分子解析、遺伝子改変マウスの作出、ELISA 測定系の開発等を行った。

分担研究者

- (1) 北海道大学遺伝子病制御研究所病因研究部門・分子免疫分野 上出利光
- (2) 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
- (3) 株式会社オステオファーマ 洲鎌和茂
- (4) 株式会社札幌仏ノ・ダ イグノスティック・ラボラトリー 藤原 優

A. 研究目的

B細胞には、外来抗原に対して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や低親和性抗体産生クローンを排除するため、B細胞抗原受容体を中心とした独自の増殖・分化制御機構が存在する。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。

B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) は、TNF ファミリーに属するサイトカインであり、B 細胞の分化段階に応じて、その分化、生存に重要な様々な機能を果たすことが明らかにされている。全身性エリテマトーデスや関節リウマチ等の自己免疫疾患や、多発性骨髄腫等のB細胞性腫瘍においてBAFF 発現の亢進が認められることから、これら疾患の発症に関わる要因と考えられている。

BAFF-R (BAFF-receptor)は主に B 細胞に発現する BAFF のシグナルを伝達する受容体の一つであり、その遺伝子欠損は深刻な成熟 B 細胞の欠失を引き起こすことから、B 細胞を中心とした免疫系

の維持に極めて重要と考えられている。BAFF-R を介したシグナル伝達経路においては、IKK γ (I κ B kinase γ) を介した canonical な NF- κ B 活性化経路に加えて、NIK (NF- κ B inducing kinase) を介した non-canonical な NF- κ B 活性化経路が重要であると考えられている。しかし、BAFF-R と直接会合し、上記 NF- κ B 活性化経路を活性化させる分子は不明であり、その同定・解明が期待されている。

これに対して、DMWD (dystrophia myotonica-containing WD repeat motif) は、BAFF-R の細胞内領域と会合する分子として酵母 two-hybrid 法を用いたスクリーニングにより見出された分子である。哺乳動物細胞における DMWD の機能は未だ不明であるが、これまでに DMWD は BAFF-R の機能上重要な C 末端 8 アミノ酸領域に会合することが明らかになっており、そのシグナル伝達において重要な機能を果たすことが推測され、その解明により、B 細胞を中心とした免疫系の維持機構の理解や、その破綻により発症する疾患に対する新たな治療法開発の上で、有用な情報が得られることが期待できる。

DAP3 (death associated protein3) はインターフェロン γ (interferon- γ ; IFN γ) 誘導性アポトーシスに関与する分子として発見されたタンパク質であり、FasL (Fas ligand)、TNF- α および TRAIL により誘導されるアポトーシスへの関与が報告されているほか、過酸化ストレスや足場消失により誘導されるアポトーシスとして知られるアノキスにも関与

が認められるなど、様々なアポトーシス誘導シグナル伝達経路への関与が報告されている。B 細胞においても、その生死の調節を通じて重要な役割を果たしているものと考えられる。

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の場合として機能するが、特に B 細胞ではクローン排除にかかわるアポトーシス誘導に重要な役割を果たす。ラフトの構成分子である GPI 結合蛋白やスフィンゴ糖脂質がアポトーシス誘導刺激に関与することが示されており、これらのラフト関連分子が、異常 B 細胞に対する新たな増殖制御法開発の標的となり得る可能性が考えられる。

三者はいずれも B 細胞の分化・増殖制御において重要な役割を担っており、その解析が、B 細胞の分化・増殖の異常によって発症する自己免疫疾患や B 細胞性腫瘍の治療において有効な新規標的分子の発見につながる可能性が期待される。BAFF がラフト刺激伝達系によって誘導されるアポトーシスを抑制することが明らかになっており、DAP3 は BAFF-R の下流の刺激伝達に関与するなど、三者は相互に機能的関連性を持つことが推測される。

そこで、本研究では、“BAFF”、“DAP3”、“ラフト” 三者の機能的関連性に着目して B 細胞の増殖・分化制御機構を分子レベルで解明し、その成果を応用してこれらを連携して調節することでより効果的な B 細胞の増殖制御法開

発に結びつけ、B 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発展させることを目指す。

本年度は、1) BAFF-R を発現する成熟 B 細胞性腫瘍に由来する細胞株を用いて、BCR および CD20 を介するラフト関連アポトーシス誘導の分子機構について解析し、これに対する BAFF 刺激伝達系の効果について解析するとともに、2) BAFF-R を介した NF- κ B 活性化経路における DMWD の機能解析を目的とした DMWD 遺伝子ノックアウトマウス作出、3) DAP3 と会合する分子 DAPBP1 の機能解析、4) B 細胞を中心とした免疫系の維持における DAP3 の生理学的重要性を明らかにすることを目的とした DAP3 のコンディショナルノックアウトマウスの作出、等によって BAFF-R および DAP3 を介した新たなアポトーシスの調節に関わるシグナル伝達機構とその機能を解明することを目指した。さらに、5) 上記解析への応用を目的とした正常 B 細胞の *in vitro* 培養系確立を目指した検討、ならびに6) BAFF が関与する病態解析や BAFF あるいは BAFF 受容体をターゲットとした医薬品効果判定のツールとして、ヒト血中の微量 BAFF 濃度定量可能な酵素免疫測定試薬 (ELISA) の開発研究を行った。

B. 研究方法

1. 細胞培養、表面抗原解析、アポトーシスの検出、免疫ブロット解析

培養細胞は、10% FCS 添加 RPMI1640 培地によって 5% Co2 存在化で維持した。B 細胞株のアポトーシスは、抗 μ 鎖抗体単独あるいは抗 CD20 抗体+抗マウス Ig 抗体添加培養で誘導した。また、この培養系に遺伝子組み換え型ヒト BAFF (Hu-r-BAFF)、BAFF 関連因子である APRIL あるいはヤギ抗 BAFF-R 抗体 (いずれも 5 μ g/ml) を添加して、その反応性を検討した。

回収した細胞に対し、間接蛍光抗体法を用いたフローサイトメトリー解析によって表面抗原の発現を検討した。アポトーシスは蛍光標識アネキシン-V を用いたフローサイトメトリー解析、メイグリュンシワルド-ギムザ染色による形態解析、DAPI を用いた核染色による核形態観察によって検討した。

培養細胞を回収し、細胞抽出液を調製し、SDS-Poly acrylamide gel 電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写し、免疫ブロット解析によって各蛋白の発現を検討した。

2. 遺伝子ノックアウトマウスの作出

遺伝子ノックアウトマウスの作出は理化学研究所、発生・再生科学総合研究センター、動物資源開発室との共同研究により行った。構築したターゲティングベクターを組み込んだ ES 細胞をマウス胚へ導入してキメラマウスを作出し、C57BL/6 と交配させヘテロ挿入遺伝子座を有するマウスを作出した。常法により、カットしたマウス尾中よりゲノム DNA を調整しサザンブロットィングおよびゲノミック PCR 法により解析した。

3. 遺伝子クローニング、遺伝子導入とその解析

DMWD および USP12 (ubiquitin specific protease 12) 遺伝子はヒト B 細胞株より RT-PCR 法でクローニングした。NIK のユビキチン化の解析は myc タグを有する NIK の発現ベクターおよび HA タグを有するユビキチン発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、プロテアソームインヒビター (MG132, 50 μ M) で 4 時間処理した細胞の総抽出液から抗 myc 抗体を用いて免疫沈降を行い、イムノブロットング後のメンブランを抗 HA 抗体で検出することにより行った。DAP3 および DAPBI によるアノイキス誘導は DAPBP1 およびその変異体の発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、24 時間後の細胞を 0.1%FCS を添加した D-MEM 培地に拡散し、細胞接着表面処理を施していない 96 ウェルプレート上で培養する事により行った。また細胞生存活性の測定は MTT アッセイの改良法である Cell Counting Kit 8 (同仁化学研究所)を用いて行った。

4. B 前駆細胞の分化誘導

マウス間質細胞株 MS-5 にヒト正常骨髄 CD34 陽性細胞を共培養させ、B 前駆細胞を分化誘導した。この系に種々の因子を添加して、その効果につき検討した。ヒト正常細胞は、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購入して使用した。誘導された B 前駆細胞の表面抗原を、直接蛍光抗体法を用いフローサイトメトリー

解析により行った。MS-5 細胞の脂肪細胞化は AdipoRed 染色を用いた蛍光顕微鏡観察によって行った。

5. ELISA 系の確立

市販されている抗 BAFF 抗体 4 種類を購入し、血清中の BAFF を測定可能な抗体の組み合わせを、大腸菌で作製した組み替え BAFF 抗原を健常者プール血清に添加し標品を用いて検討した。精製抗 BAFF 抗体 (C) をマイクロプレートに固相化して標品を反応させた後に、ビオチン標識抗 BAFF 抗体 (D) を反応させ、洗浄後 TMB により発色させた。確立した ELISA 系を用いて、ボランティア血清中の BAFF 濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、関連法規を遵守して動物愛護と動物福祉の観点に立った倫理的配慮をおこない、あらかじめ当該研究施設の動物実験委員会へ実験の実施について申請し、承認を得てから行った

BAFF 濃度測定に用いた血清は、IDL 社社内ボランティアの検診時検査に使用した血清残余分を、インフォームドコンセントを受けた上で完全匿名化して使用した。

C. 研究結果

細胞表面での BAFF-R の発現を確認している、Hairy cell leukemia 由来細胞株 MLMA について、詳細な表面抗原解析を行い、成熟 B 細胞の性格を有すること、BAFF-R を発現するがその他の BAFF に対する受容体 BCMA、TACI の

発現はごく僅かであることを明らかにした。また、MLMA 細胞に抗 μ 鎖抗体あるいは抗 CD20 抗体を添加することにより、アネキシン V 結合細胞の増加、核のクロマチンの凝集運や、断片化から時間依存性に進行的にアポトーシスが誘導されることが示された。また、カスパーゼ-2、-3、-9 の活性化や、その基質である PARP の切断が起こっていることが明らかとなった。

これに対して BAFF を添加したところ、アポトーシス誘導が部分的に抑制された。この効果は濃度に依存する傾向がみられ、高濃度の BAFF を添加した場合の方がより強くアポトーシスを抑制した。また、この作用には前処置の時間に対する依存性はく、BAFF 添加と同時にアポトーシス誘導を開始しても、ほぼ最大限に近いアポトーシス抑制効果が認められた。以上の効果は APRIL では認められず、BAFF 特異的と考えられた。また BAFF の添加によって、MLMA 細胞に 1) GSK-3 β の一過性の機能抑制が関与する増殖の促進、2) NF κ -B2 の活性化を介する Bcl-2 の発現増加、3) 細胞表面の CD40 の発現増強等が起こることが判明した。

DMWD は B 細胞以外の細胞にも発現しており、脳や生殖細胞の発生、分化段階でその発現亢進が認められていることから、DMWD 遺伝子を全身で欠くノックアウトマウスは胎生致死あるいは生殖不全に陥る可能性が示唆された。そこで、Cre-loxP 系を用いた DMWD 遺伝子のコ

ンディショナルノックアウトマウスを作成し、B 細胞特異的に遺伝子をノックアウトさせてその機能解析を行うこととした。遺伝子ターゲティングベクターを導入した ES 細胞から生まれたキメラマウスを C57BL/6 と交配させ、出産したマウスの遺伝子をサザンブロットイングおよびゲノミック PCR 法により解析を行った。その結果、キメラマウスより挿入遺伝子座を有するヘテロマウスが得られた事が明らかとなった。また、PCR 法による Genotyping のためにプライマー設計と条件検討を行い、1 チューブの PCR 反応により確実に野生型の遺伝子座と変異型の遺伝子座を区別して検出できる系を確立した。

これまでの報告から、DMWD と USP12 が共同して NIK の脱ユビキチン化と安定化に働くことによって、non-canonical NF- κ B 活性化経路の活性化に働いている可能性が示唆された。そこで、DMWD および USP12 を HEK293T 細胞で過剰発現させ、NIK のユビキチン化に及ぼす影響について解析を行った。その結果、DMWD と USP12 の共発現によって NIK のユビキチン化は有意に抑制され、またユビキチン鎖が付加していない NIK のタンパク質量は逆に向上していることが明らかとなった。

DAP3 の遺伝子ノックアウトマウスは胎生致死であったため、コンディショナルノックアウトマウスを作成することを計画し、ターゲティングベクターを導入した ES 細胞の一系統からキメラマウス

スを得て、その系統化を試みたが、挿入遺伝子陽性の仔マウスは生まれず、当該 ES 細胞の系列は生殖細胞系への寄与率が低いものと推定された。現在、再度 ES 細胞にターゲティングベクターを導入し、キメラマウスの作出を試みている。

DAP3 と会合する分子として見出された DAPBP1 はミトコンドリアに局在し、DAP3 によるアノイクスの誘導に関与することが明らかとなっている。しかし、野生型 DAPBP1 の蛋白発現量は DAP3 と比して弱く、それに相関するようにアノイクス誘導能も比較的弱い。DAPBP1 のアミノ酸配列を解析した結果からその N 末端領域に PEST 配列が存在することが明らかとなった。そこで DAPBP1 の N 末端領域に存在するミトコンドリア局在シグナルをチトクロム C オキシダーゼのサブユニット VIII に由来するミトコンドリア局在シグナル配列に置き換えた変異体を作成し、解析を行った結果、DAPBP1 は著しく発現量が増加し、それに伴いアノイクス誘導能も向上することが明らかとなった。

正常ヒト骨髄 CD34+ 細胞をマウス骨髄間質細胞株 MS-5 上で 4 週間程度共培養すると B 前駆細胞 (pro-B 細胞) と単球系細胞が分化誘導、増殖する。この培養系に IL-6 ファミリーサイトカインに属するオンコスタチン-M を添加したところ、CD34+ のままで維持される細胞の数が増加し、CD19+ 細胞を含めた血液系細胞の増加を認めたが、CD33+ 細胞数は大きな変化を示さなかった。また、

オンコスタチン-M を添加により、MS-5 細胞の脂肪化が著しく抑制された。一方、LIF、IL-6、IL-11 等その他の IL-6 ファミリー サイトカインについて同様の検討を行ったが、LIF にのみ強い脂肪細胞化抑制効果を認めたものの、いずれのサイトカインにも MS-5 上での CD34+ の分化・増殖に対する作用は認められなかった。

4 種類の抗体について BAFF 標品を用いた ELISA 測定系に関する検討を行い、最適な抗体の組み合わせを選定し、62.5pg ~ 4ng/mL の範囲で測定できる ELISA 試作品の作成に成功し、社内ボランティア血清を用いて、血清中 BAFF 濃度の測定を行った。

D. 考察

MLMA 細胞が成熟 B 細胞の表面形質を示して BAFF に対する受容体のうち BAFF-R のみを強く発現し、抗 μ 鎖抗体あるいは抗 CD20 抗体を添加するとアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。さらにこのアポトーシス誘導が BAFF の添加によって抑制されることが判明し、これに伴い NF κ -B2 の活性化と Bcl-2 の発現増強や、GSK-3 β の一過性のリン酸化、CD40 の発現の増加が起こっていることが示された。以上の結果から、この細胞株が、成熟 B 細胞におけるラフト関連のアポトーシス誘導の分子メカニズム解析、ならびにこれに対する BAFF の作用を解析する上で有用な *in vitro* モデル系となることが期待され

る。現在、上記現象にともなって引き起こされる発現遺伝子の変化について、マイクロアレイを用いた解析を開始している。

DMWD のコンディショナルノックアウトマウス作出では、キメラマウスにおける ES 細胞の寄与率の指標となる毛色と出生したマウスにおける挿入遺伝子の陽性率には相関性が認められず、毛色から ES 細胞の寄与率が中程度と判別されるキメラマウスより、高確率で挿入遺伝子陽性マウスが得られた。現在得られたヘテロマウスを系統化のために C57BL/6 とのバッククロスを進めているところであるが、元となる ES 細胞は 1 系統のみであるため、他の ES 細胞に由来するマウスの作出を準備中である。一方、ヘテロマウスを C57BL/6 と交配させ出生したマウスの遺伝子解析では、その遺伝子型はメンデルの法則に従い、ほぼ 1:1 で野生型および変異型の遺伝子座を有するマウスが生まれ、挿入した loxP 配列を有する遺伝子カセットがマウスの出生に影響を与えないことが確認された。

DWMD と USPI2 は NIK のユビキチン化抑制とタンパク質レベルでの発現亢進に機能することが明らかになりつつあるが、脱ユビキチン化酵素である USPI2 の直接的な基質として NIK が存在しているのかについては今後検討が必要な課題であると思われる。また、DMWD と USPI2 の siRNA 発現ベクターを用いて、これら siRNA を恒常的に発現した B 細胞に由来する培養細胞株の樹立を試みて

いるが、B 細胞に由来する培養細胞株において DMWD と USPI2 の遺伝子ノックダウンは細部増殖能に影響を与えるため、効率的に遺伝子抑制がなされた培養細胞株を樹立することが困難な状況にある。siRNA を用いた B 細胞における DMWD および USPI2 の機能解析法については引き続き検討を続け、安定した系を確立し、さらなる解析を行う予定である。

DAPBP1 の N 末端領域に存在する PEST 配列を、その細胞内局在が変化しないように他のアミノ酸配列と置換するとアノイキス誘導能に亢進が認められた。このことは DAPBP1 のタンパク質レベルでの発現制御がアノイキス誘導に関わる可能性を示唆していると思われる。DAPBP1 のタンパク質レベルでの発現制御に関わるシグナル伝達経路、およびその制御に関与する分子については明らかになっていないため、今後解析を進めていく予定である。

オンコスタチン-M は gp130 を共通副受容体とする IL-6 family の増殖因子で、胎生/骨髄造血に関与すると考えられているが、詳細は不明である。今回の検討により、骨髄 CD34+細胞とマウス間質細胞株 MS-5 の共培養系にオンコスタチン-M を添加すると、CD34+のまま維持される細胞数が増え、これに伴って B 前駆細胞を含む血液系細胞の増殖が増強されることが明らかになった。しかし、CD33+細胞の数はほとんど影響を受けなかった。また、今回検討した IL-6 ファミリーサイトカインの中では、オンコス

タチン-M のみがこの作用を有していた。この作用は、オンコスタチン-M が MS-5 に作用してその性状を変化させることにより生じるものであり、単に MS-5 の脂肪細胞化を抑制することに起因するものではないことが示唆され、CD34+細胞自体を増幅するが単球系細胞への分化は促進されないために相対的に B 前駆細胞への分化・増殖が増強する結果ではないかと推測している。今後、CD34+細胞と MS-5 の共培養系に、オンコスタチン-M とその他の B 細胞分化・増殖を支持する因子と組み合わせることで添加することにより、より効率的に B 前駆細胞を誘導、増殖可能な培養系の開発が期待される。

市販の抗 BAFF 抗体 4 種類を購入して ELISA の構築を試みた。主にヒト血清中に含まれる異好抗体により影響を受けやすい組み合わせが多いことが推測されたが、この中から最も影響を受け難い組み合わせを選定し、満足行く結果が得られた。この組み合わせで、社内ボランティア 8 名の血清を測定した結果、文献上報告されている健常者の血中 BAFF 濃度と近い値が得られた。現在、コストダウンと試薬の安定供給、さらにマウスでも使用可能な系の確立のためにヒト BAFF、マウス BAFF 共通に反応する抗体作製を進めている。

E. 結論

BAFF-R を強発現する B 細胞株で、抗 μ 鎖抗体および抗 CD20 抗体の添加によって誘導されるアポトーシスを詳細に検

討し、これに対する BAFF の抑制効果についても解析を行った。今後、この系についてさらに解析を進めることにより、B 細胞の新規増殖制御法開発、さらには治療薬、診断キットの開発に有用な知見が得られるものと期待される。

BAFF-R 会合分子 DMWD の生理学的意義を *in vivo* の系で明らかにするために DMWD のコンディショナルノックアウトマウスを作出した。今後系統化すると共に、全身および B 細胞特異的に DMWD 遺伝子をノックアウトしたマウスを作出し、その表現系解析から BAFF シグナル伝達における DMWD の機能を明らかにしていく。

BAFF-R 会合分子 DMWD は NIK のユビキチン化を抑制し、BAFF-R を介したシグナル伝達経路において重要な *non-canonical* な NF- κ B 活性化経路の活性化に働く可能性が示唆された。また DAP3 と会合する分子である DAPBP1 は足場喪失に伴うアポトーシスであるアノイキスに関与が認められることが明らかとなった。

上記研究に活用する目的で、骨髄幹細胞からの B 前駆細胞分化誘導法の改良を目指しており、骨髄 CD34+細胞とマウス間質細胞株の共培養系においてオンコスタチン-M が CD34+細胞の増加とこれに伴う B 前駆細胞の増殖を示すことを明らかにした。今後、他のサイトカインとの組み合わせによって、より効率的に B 前駆細胞を誘導、増殖可能な培養系の開発が期待される。

市販されている抗 BAFF 抗体を用いて、ヒト血清中の BAFF を濃度 62.5pg/mL ~4ng/mL の範囲で測定可能と思われる ELISA を構築する事に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Kase, M. Yodoi, W. Saito, N. Furudate, K. Ohgami, M. Kitamura, N. Kitaichi, K. Yoshida, M. Kase, S. Ohno, T. Uede : Increased osteopontin levels in the Vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.* 39:143-147, 2007.
- 2) S. Takeda, A. Iwai, M. Nakashima, D. Fujikura, S. Chiba, HM. Li, J. Uehara, S. Kawaguchi, M.Kaya, S. Nagoya, T. Wada, J. Yuan, S. Rayter, A. Ashworth, J.C. Reed, T. Yamasita, T. Uede, T. Miyazaki : LKB1 is crucial for TRAIL-mediated apoptosis induction in osteosarcoma. *Anticancer Res.* 27:761-768, 2007.
- 3) M. Kitamura, K. Iwabuchi, N. Kitaichi, S. Kon, H. Kitamei, K. Namba, K. Yoshida, DT.Denhardt, SR. Rittling, S. Ohno, T. Uede, K. Onoe : Osteopontin aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *J Immunol.* 178:6567-6572, 2007.
- 4) N. Yamamoto, T. Nakashima, M. Torikai, T. Naruse, J. Morimoto, S. Kon, F. Sakai, T.Uede : Successful treatment of collagen-induced arthritis in non-

- human primates by chimeric anti-osteopontin antibody. *Int Immunopharmacol.* 7:1460-1470, 2007.
- 5) Y. Saito, S. Kon, Y. Fujiwara, Y. Nakayama, D. Kurotaki, N. Fukuda, C. Kimura, M. Kanayama, K. Ito, H. Diao, Y. Matsui, Y. Komatsu, E. Ohtsuka, T. Uede : Osteopontin small interfering RNA protects mice from fulminant hepatitis. *Hum Gene Ther.* 18:1205-1214, 2007.
 - 6) S. Kon, M. Ikesue, C. Kimura, M. Aoki, Y. Nakayama, Y. Saito, D. Kurotaki, H. Diao, Y. Matsui, T. Segawa, M. Maeda, T. Kojima, T. Uede : Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J Exp Med.* 205:25-33, 2008.
 - 7) A. Nagasaka, H. Matsue, H. Matsushima, R. Aoki, Y. Nakamura, N. Kambe, S. Kon, T. Uede, S. Shimada : Osteopontin is produced by mast cells and affects IgE-mediated degranulation and migration of mast cells. *Eur J Immunol.* 38:489-499, 2008.
 - 8) Kim, H.R., Chae, H.J., Thomas, M., Miyazaki, T., Monosov, A., Monosov, E., Krajewska, M., Krajewski, S., and Reed, J.C., Mammalian *dap3* is an essential gene required for mitochondrial homeostasis in vivo and contributing to the extrinsic pathway for

apoptosis., *FASEB J.* ; 21(1), 188-196, 2007.

9) Taguchi T, Takenouchi H, Shiozawa Y, Matsui J, Kitamura N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Takahashi T, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system. *Exp Hematol.* 2007;35(5):1398-1407.

2. 学会発表

1) S. Kon, C. Kimura, M. Ikesue, Y. Nakayama, D. Kurotaki, Y. Saito, Y. Matsui, T. Uede : Regulation of osteopontin-induced inflammation and tissue injury through syndecan-4. Small Integrin-Binding Proteins. Gordon Research Conference. Biddeford. ME, Aug.5-10, 2007.

2) K. Ito, S. Kon, T. Uede : The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. Small Integrin-Binding Proteins. Gordon Research Conference. Biddeford. ME, Aug.5-10, 2007.

3) D. Fujikura, T. Uede, T. Miyazaki: CLIP-59 is crucial for death receptor mediated signal by the regulation of ASK1-JNK pathway. 第 37 回日本免疫学会総会学術集会, (東京), 11 月 20-22 日, 2007.

4) H. Diao, S. Kon, K. Iwabuchi, K.

Onoe, T. Uede : The role of osteopontin in the activation and function of natural killer T cells. 第 37 回日本免疫学会総会学術集会, (東京), 11 月 20-22 日, 2007.

5) 池末昌弘、今 重之、上出利光 : シンデカン4 によるオステオポンチン機能制御。第 37 回日本免疫学会総会学術集会, (東京), 11 月 20-22 日, 2007.

6) 藤倉大輔、一條秀憲、上出利光、宮崎忠昭 : CLIPR-59 の Death receptor を介した細胞死誘導における機能と役割。第 30 回日本分子生物学会年会, (横浜), 12 月 11-15 日, 2007.

7) 齋藤善也、今 重之、上出利光 : Osteopontin small interfering RNA protects mice from fulminant hepatitis. 第 30 回日本分子生物学会年会, (横浜), 12 月 11-15 日, 2007.

8) Sato, K., Fujikura, D., Takada, A., Kida, H., and Miyazaki, T. Changes in Cellular Composition and Induction of Cell Death in the Spleen Are Correlated to the Disease Symptoms in Response to Influenza A Virus 94th Annual Meeting The American Association of Immunologists 2007.05.18-22 (Miami Beach, Florida)

9) Sato, K., Fujikura, D., Takada, A., Kida, H., and Miyazaki, T. Changes in Cellular Composition in the Spleen Are Correlated to the Disease Symptoms in Response to Influenza A Virus. 第 16

回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 2007.6.14-15

10) Miyazaki, T., Iwai, A., Sato, K., Fujikura, D., Shiozaki, T., Takada, A., and Kida, H. Host immune and cell death responses induced by influenza A viruses

OPTIONS for the Control of Influenza VI 2007.07.17-23(Toronto, Ontario, Canada)

11) 塩崎拓也、岩井淳、河岡義裕、高田礼人、喜田宏、宮崎忠昭. インフルエンザウイルスの PB2 に会合する宿主細胞因子の同定とその機能解析 第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007.10.21-23

12) Miyazaki, T., Sato, K., Fujikura, D., Shiozaki, T., Iwai, A., Takada, A., and Kida, H. Apoptosis and Pathogenicity of Influenza A Virus, The 14th International Symposium for Zoonosis Control, Prescription for Fighting against Zoonoses 2007.10.31

13) Sato, K., Takada, A., Kida, H. Miyazaki, T. Significance of NK cells for the pathogenicity of influenza A virus 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007.11.20-22

14) 若生武、浅井あづさ、宮崎忠昭、丸山光生 成熟 B 細胞における Zizimin2 の機能解析 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会 2007.11.20-22

15) 岩井淳、宮崎忠昭 BAFF-R を

介した NF- κ B 2 の活性化経路におよぼす DWMD 分子の機能解析 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 2007.12.11-15

16) Katagiri YU, Sato B, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. The immunological effects of subcutaneous injection with raft microdomains. Glycobiology and Sphingobiology 2007-Hakomori Commemorative Forum, Tokushima, Japan, Feb 27-Mar 1, 2007.

17) 片桐洋子, 佐藤伴, 宮川世志幸, 堀内保臣, 石垣宏仁, 小笠原一誠, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. ラフトマイクロドメイン免疫の抗腫瘍効果. 第 96 回日本病理学会総会, 大阪, 3 月 13 日-15 日, 2007.

18) 片桐洋子, 佐藤伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島英規, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の多様性. 第 27 回日本糖質学会年会, 福岡, 8 月 1 日-3 日, 2007.

19) 片桐洋子, 佐藤伴, 田口智子, 石垣宏仁, 伊藤靖, 大喜多肇, 小笠原一誠, 藤本純一郎, 清河信敬. 同系腫瘍細胞及びヒト腎癌由来細胞株 ACHN ラフト免疫により誘導される免疫応答. 第 37 回日本免疫学会総会, 東京, 11 月 20 日-22 日, 2007.

20) 片桐洋子, 佐藤伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島英規, 大喜多肇, 藤本純一郎, 清河信敬. ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の

多様性と endopeptidase 活性. 第 30
回日本分子生物学会第 80 回日本生
化学会大会合同大会; 横浜, 12 月 11
日-15 日, 2007.

21) 齊藤洋平, 清河信敬, 田口智子,
宮川世志幸, 中島英規, 佐藤伴, 堀
内保臣, 片桐洋子, 大喜多肇, 斎藤
正博, 清水俊明, 藤本純一郎. BAFF
による B 細胞アポトーシスの抑制.
第 49 回日本小児血液学会総会・第 23
回日本小児がん学会学術集会 合同
開催, 仙台, 12 月 14 日-16 日, 2007.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

3. その他

雑誌

岩井 淳、宮崎 忠昭. B 細胞に
おける BAFF 受容体を介した細胞内
シグナル伝達経路. 49(2)、150-159、

20

輸入熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬を用いた最適な治療法による医療対応の確立に関する研究

所 属 (財)結核予防会新山手病院
研究者 木村 幹男

研究要旨 輸入熱帯病・寄生虫症に対する国内未承認薬を導入し、それを用いた治療研究を行い、2薬剤については優れた治療効果と安全性を示した。これらの疾患の疫学、薬剤耐性などは絶えず変化しつつあり、国内で最適な医療を行なうには、海外の専門医療機関との交流などが必須であると思われる。

分担研究者

- (1) 東京大学医科学研究所感染免疫内科
小田原 隆
- (2) 国立国際医療センター国際疾病センター
工藤 宏一郎
- (3) 東京医科歯科大学国際環境寄生虫病学分野
太田 伸生
- (4) 京都府立医科大学大学院医学研究科
寄生病態学分野 有菌 直樹
- (5) 宮崎大学医学部感染症学講座
寄生虫病学分野 丸山 治彦
- (6) 国立医薬品食品衛生研究所薬品部
坂本 知昭
- (7) (株)メディサイエンスプランニング
臨床開発本部 草野 正弘
- (8) 国立感染症研究所ウイルス第一部
倉根 一郎

A. 研究目的

近年の日本人海外渡航者数の増加は止まる気配がない。2001年9月の米国同時多発テロ、それに続く米国のアフガニスタン侵攻、さらに2003年のイラク戦争や重症急性呼吸器症候群(SARS)流行の影響を受けて、日本人出国者数は一時減少したが、その後増加に転じて2006年には1,753万人となり、過去最高であった2000年の数値を超える勢いである。この中には熱帯/亜熱帯地域への渡航者も多く含まれることから、日本人渡航者もそれらの地域特有の感染症に曝露され、帰国

してから国内で発病する例は増加することが予想される。しかし、国内の医療機関では熱帯病の診断に不慣れであるのみならず、治療薬が国内未承認薬であることも多く、不幸な転帰を辿る症例の発生が危惧される。また、国内で感染する疾患でも、寄生虫症においては治療薬剤が入手不可能なことも多く、同じような事態の発生が危惧される。しかるに、これらの疾患の国内での患者数は必ずしも多くないために、国内製薬企業は収益性の問題から薬剤の開発に乗り出さない。本研究班は、熱帯病・寄生虫症の治療における国内未承認薬(稀少疾病治療薬)を海外から導入し、それらを必要とする症例に提供し、欧米先進国と同等のレベルでの熱帯病・寄生虫症の治療を可能にするための体制構築を目指すものである。今後も国際間の交流は益々活発化すると予想されるので、本研究班の活動は医療の分野で危機管理の面から貢献するのみならず、経済も含めて我が国全体の発展にも寄与するものと思われる。

上記の目標のためには、欧米先進国や日本における熱帯病・寄生虫症の最新の疫学状況、それらの診断や治療の最新動向、時とともに変動しうる薬剤の評価、需要、および入手可能性を絶えず把握しておく必要がある。例えば、我が国では2006年11月、フィリピンで感染した狂犬病の日本人症例が2例連続して発生したことを契機に、曝露後に用いるヒト免疫グロブリンの確保が強く望まれている。さらに、輸入薬剤の保管や供給の体制、薬剤保管機関についても、絶えず点検や改善

が必要となる。また新規薬剤の導入に際しては、日本人に対する安全性を確実にするために、品質検査にて我が国の製剤基準に合致することの確認が行われるが、それらの手段についても時代とともに最適な方法を採用する必要がある。

研究班の保管薬剤を使用した症例については、担当医師に治療報告書の提供を求めるが、治療報告書を確実に回収し、薬剤の治療効果や副作用を詳細に検討し、今後のためにフィードバックする必要がある。また国内承認薬を用いた治療についても、事例を詳細に検討し、本研究班の経験として蓄積して行く必要がある。さらに、適切な薬剤使用法の確立のためには動物実験が重要であるが、そのため適切な感染動物モデルを用いた研究も必要となる。

熱帯病・寄生虫症に関して、国内の医療現場では診断に難渋することも多いので、全国の医療従事者を対象とした診断の支援も必要である。診断法としては古典的方法のみならず、新規かつ最適な方法の確立も目指す必要がある。

本研究班はこの様な種々の分野における研究を遂行し、熱帯病・寄生虫症に対して、国内未承認薬の使用を含めて最適な治療が行われるのを可能とするネットワーク体制の構築を目指すものである。

B. 研究方法

薬剤の購入、保管、供給体制

今年度における薬剤の輸入量、使用量、治療報告書の回収、有害事象報告を検討し、各種マラリア治療薬の使用動向については、2007年を含めて最近数年間の推移を検討した。また、薬剤を安定的に供給するための実際的な必要性から、購入した段階で有効期限が短い薬剤の把握に務め、その対策を検討した。本年度唯一の新規導入薬剤として、狂犬病ヒト免疫グロブリンの輸入を行なった。

薬剤の品質検査

近年、本研究班に対する供給要請の多い赤痢アメーバ症の治療薬パロモマイシンを選び、研究班が導入したパロモマイシン製剤 Humatin の品質確認のための簡易分析法の開発を行った。具体的には、赤外分光 (NIRS) 法を用いた定性的試験法の開発、および超高速液体クロマトグラフィー/質量分析計 (UPLC/MS) を用いての新規定量分析法

の開発を試みた。

国立感染症研究所には狂犬病ヒト免疫グロブリン Berirab P の古い製剤が保管されていたので、有効期限から2年過ぎているものを対象に、RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) 法にて中和抗体を測定し、標準血清での値から国際単位に換算して力価の減衰の有無を検討した。熱帯病・寄生虫症の治療

2001年4月に本研究班が導入したメトロニダゾール注射薬を使用した赤痢アメーバ症の28例、さらに2001年4月から保管・供給を開始したトリクラベンダゾールを使用した肝蛭症の22例につき、治療報告書を用いて治療効果、副作用、その他の検討を行なった。さらに、京都府立医科大学(分担研究者 有菌)で経験した重症の三日熱マラリア1症例の治療につき検討した。

また首都圏の医療機関5カ所より、マラリア症例を多く経験している医師を集めた会議を開き、各機関での重症熱帯熱マラリアの治療方針に関して初期治療薬、キニーネ注射薬の loading dose、初期治療に続く追加投与薬の調査を行なった。

熱帯病・寄生虫症の診断

宮崎大学(分担研究者 丸山)では教室独自の multiple-dot ELISA 法および 96-well microtiterplate ELISA 法を開発し、多くの血清診断依頼を受けてきたが、本研究では2007年における寄生虫検査の受託数および陽性症例数、患者が受診した医療機関の都道府県、2001~2007年に診断確定された原因寄生虫などの検討を行なった。

京都府立医科大学では通常の診断法以外に、便中の赤痢アメーバ抗原検出には *E. histolytica* II (TechLab) を用い、赤痢アメーバ嚢子における *E. dispar* との鑑別には、peroxiredoxin 遺伝子および 18S rDNA をターゲットとした PCR 法を行い、条虫の鑑別には ITS1 領域、mtDNA、cox1、nd3 遺伝子をターゲットとした PCR 法にてゲノタイプ解析を行なった。

動物感染モデル

スナネズミにイヌ回虫幼虫包蔵卵 1,000 個を経口感染させることで眼トキシカラ症を惹起し、アルベンダゾール (ABZ, 100 mg/kg) の経口投与、ジエチルカルバマジン (DEC, 60 mg/kg) の経口投与、ステロイド (デキサメサゾン 0.165 mg) の