

## 変異蛋白が誘導するストレスを原因とする神経(精神) 筋疾患に対する治療候補化合物の開発に関する研究

所 属：国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第五部

研究者：桃井 隆

**研究要旨** 本研究は小胞体における蛋白分解系の制御機構を基盤とし、変異蛋白凝集を原因とする神経筋疾患に対する治療戦略の確立を目的とする。本研究はさまざまな神経筋疾患の予防や病状の進行緩和に大いに役立つことが期待される。

分担研究者

- (1)上田正次 (株)フェニックスバイオ  
(2)日比野利彦 資生堂ライフサイエンス  
研究センター  
(3)桃井 真里子 自治医科大学 小児科学

### A. 研究目的

ハンチントン舞踏病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患では異常蛋白の蓄積が観察される。こうした神経変性疾患では異常蛋白と小胞体における蛋白品質管理機構との関連が示唆されてきた。品質管理機構として1)フォールディングに必要なシャペロン蛋白質の転写速度を上げ、かつ、新たな蛋白質合成を抑制する機構。2)生体にとって有害となる折りたたみ異常蛋白質(ミスフォールド蛋白質)を細胞内で分解除去する小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)機構がある。こうした品質管理機構や分解機構が破綻し、小胞体に過剰なストレスがかかると細胞では変性や死が引き起こされ、こうした反応が多様な神経変性の原因と考えられる。

すなわち、小胞体に新生された蛋白質は、分子シャペロンが一過性に会合し、折りたたみを識別する。その後、ミスフォールド蛋白質についてはレクチン様蛋白質(EDEMなど)が会合し、小胞体のチャンネル蛋白質(Sec61複合体、Derlin など)を介してサイトゾルへ輸送される。サイトゾルではVCPなどのATPaseがミスフォールド蛋白質を引きずり出し、各種ユビキチンリガーゼによってユビキチン化された後、プロテアゾーム(UPS 分解系により)分解

される。

一方、神経変性疾患のような異常蛋白質の処理機構に問題があると考えられる疾患異常蛋白質の排除にオートファジーが関与していると考えられてきている。こうした異常蛋白凝集は小胞体内と外でおこる。

これまでに、小胞体外で凝集するポリグルタミン凝集や小胞体内での変異ジスフェルリン凝集がUPS 以外に小胞体ストレスシグナルの下流、細胞死シグナルの上流に位置する eIF2 のリン酸化を介して活性化されたオートファジーリゾソーム系を介して分解されることを明らかにした。すなわち、神経変性疾患以外にも三好型・LGMD2B にみられる筋ジストロフィーでも変異ジスフェルリンによる小胞体ストレスにより、eIF2 のリン酸化を介してオートファジーリゾソームを介して分解される。

昨年度は、自閉症、言語障害などの脳発達障害の原因遺伝子の探索を行い、シナプス接着蛋白 CADM1 の変異を自閉症患者とその家族に見出した、また言語障害の原因遺伝子である FOXP2(R553H)小胞体ストレスを誘導すうことを明らかにした。また、オートファジーによる分解および小胞体分子シャペロ BiP を誘導する化合物や自らシャペロンとして作用する化合物の探索、開発、薬効および小胞体ストレスによる制御機構、および異常蛋白分解の機構の解析をおこなった。

本年度は CADM1 変異タンパクによる小胞体ストレスと自閉症の病態について主に解析を行った。

### B. 研究方法

### 1. 変異蛋白が誘導する小胞体ストレスの検出と小胞体モニター系の作製

テトラサイクリン制御によるジスフェルリンを安定に発現する細胞株を作製した。正常、および変異ジスフェルリン (T4022C;L1341P、G3370T; W999C) を制限酵素で切断し pcDNA4/TO/myc-His ベクターへサブクローニングした。リン酸カルシウム法により C2C5 細胞へトランスフェクションし、50ug/ml zeocine; 25ug/ml blastin により正常および変異ジスフェルリンを安定に発現している細胞 (Tet<sup>+</sup> 正常あるいは変異ジスフェルリン細胞) を選別した。テトラサイクリン制御によりジスフェルリン EGFP を安定的に発現する Tet<sup>+</sup>-Dys<sup>+</sup>-C2C5 細胞を作製し、ERAD の抑制により小胞体でジスフェルリン凝集を検出することで小胞体ストレスをモニターすることが可能となった。

### 2. CADM1 遺伝子のターゲティング戦略

マウス CADM1 遺伝子の cDNA 配列をもとにしてマウスドラフトゲノムを検索し、CADM1 遺伝子が存在する染色体とその領域を確認した。さらに、cDNA 配列とゲノム配列を整列させて、CADM1 遺伝子のエキソン・イントロン構造を明らかにした。そして、CADM1 遺伝子のゲノム配列を検索して、配列の特異性が高い領域を抽出した。これらの情報から、CADM1 遺伝子産物の機能ドメインである第3イムノグロブリンドメインをコードしているエキソン6に [Y251S] 変異をもたらす遺伝子置換がおこるように、ターゲティングベクター、スクリーニング用プローブ、およびサザン解析に用いる制限酵素を選択して、CADM1 遺伝子のターゲティング戦略を作製した。

### 3. ES 細胞への CADM1 遺伝子ターゲティングベクターの導入と G418 耐性株の樹立

大腸菌内での能動型相同組み換え反応である Red/ET Recombination Technology (Zhang Y et al, A new logic for DNA engineering using recombination in E.Coli., Nature 20 (1998) 123-128) を利用して、CADM1 遺伝子を含む BAC クローンから CADM1 遺伝子ターゲティングベクターを構

築した。CADM1 遺伝子ターゲティングベクターをキアゲンミディプラスミド精製キットを用いて精製し、制限酵素 NotI により直鎖にしたものを ES 細胞に導入した。不活性化処理したマウス胎児繊維芽細胞をフィーダー細胞にして、129Sv/EvTac 系統マウス由来 ES 細胞を培養した。1.0X10<sup>7</sup> コの ES 細胞をエレクトロポレーションバッファー 500μl にサスペンドし、40μg の直鎖にした CADM1 遺伝子ターゲティングベクターを加えて、室温で5分間インキュベートした。その後、0.4 cm ギャップのジーンパルサーキューベット (バイオラッド社) に ES 細胞のサスペンドを加え、ジーンパルサー II (バイオラッド社) を用いて、電圧 240V、キャパシタンス 500μF でエレクトロポレーションを行った。

PGK/Neo 遺伝子のトランスジェニックマウス由来の胎児繊維芽細胞をフィーダー細胞にして、40~60% の生存率の ES 細胞を一晩培養し、その後は 200μg/ml の G418 を含む培地を1日2回ずつ交換しながら7日間培養した。その後形成される G418 耐性 ES 細胞のコロニーをピックアップして培養することにより、ターゲティングベクターが導入された ES 細胞をクローニングした。

これらの ES 細胞株を凍結保存するとともに、さらフィーダー細胞の上に継代して増殖させ、それぞれの細胞株からゲノム DNA を抽出した。

樹立された ES 細胞株のゲノム DNA を制限酵素 EcoRV を用いて完全分解させ、生成したゲノム DNA 断片をイソプロパノール沈澱により析出させ、洗浄後 TE に再溶解させた。これらのゲノム DNA 断片を 1.2% のアガロースゲルで電気泳動し、アガロースゲル中に分離されたゲノム DNA 断片をナイロンメンブレンにトランスファーさせた。ゲノム DNA 断片がトランスファーされたナイロンメンブレンをハイブリダイゼーションバッファーに入れて 65°C で1時間プレインキュベートした後、変性させた [<sup>32</sup>P] ラベル化 CADM1 3'プローブを加えて、65°C で4時間インキュベートした。インキュベーション終了後にナイロンメンブレンを洗浄し、X線フィル

ムを重ねてオートラジオグラフィークセットに入れた。4°Cで一週間感光させた後に X 線フィルムを現像した。

#### 4. ES 細胞株の凍結保存、ジェノタイプング、およびカリオタイプング

サザンスクリーニングにより選択された、CADM1 遺伝子座にターゲティングを受けた ES 細胞株を融解してフィーダー細胞上に培養し、 $5.0 \times 10^5$  コの ES 細胞をクライオチューブに入れて液体窒素内に保管した。さらに、この ES 細胞株からゲノム DNA を抽出し、CADM1 5'プロンプ、3'プロンプ、および KI プロンプを用いたサザン解析により遺伝子ターゲティングを受けた CADM1 遺伝子座の確認を行った。また、この ES 細胞株のカリオタイプを調べた。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト材料は用いていないためヒト人権・倫理面への配慮には該当していない。

また、本研究でのマウスを用いた動物実験は施設にて設定されている動物取り扱いマニュアルに沿って行った。本研究で行う動物実験に際しては、動物への恐怖感、苦痛をさけるため、エーテル麻酔下で行うことにしており、動物に対する倫理面での十分な配慮がなされている。また、マウス各組織の採取に際しては、深いエーテル麻酔で無痛下で二度と覚醒しないよう、安楽死させてから行うことにしており、苦痛の無いように十分な配慮をした。

### C. 研究成果

#### 1. 自閉症患者における CADM1 変異

Caucasian 試料では、C739A (H246N) と A755C (Y251S) の 2 ミスセンス変異を検出した (図1)。いずれも男性罹患者であった。H246N は、自閉性障害の同胞男子と正常母親に同一変異を検出した。Y251S 変異は同胞女子と父親に同一変異を検出した。父親には小児期に軽度の言語の問題があった。両変異は CADM1 蛋白の 3 番目の Ig ドメイン上に局在した。

また、昨年度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。セクレチンの脳内での機能と自閉性

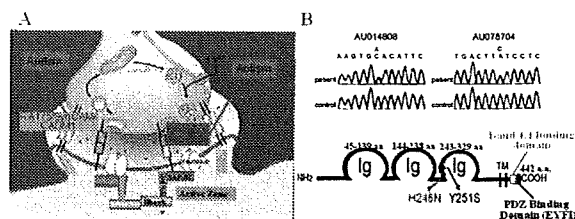


図1 シナプスの形成機構

A: シナプスと自閉症, B: CADM1の変異。自閉症患者のスクリーニングからアミノ酸246番目のヒスチジン(H)がアスパラギン(HK)に、アミノ酸251番目のチロシン(Y)がセリン(S)に変化しているCADM1が確認された。TM: Transmembrane domain

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 (*Scnr*) のノックアウトマウスを確立し解析し、シグナルの異常と自閉症との関連を調べてきた。本年度は、*gpr85* 受容体に着目し、欠損マウスの解析をおこなった。

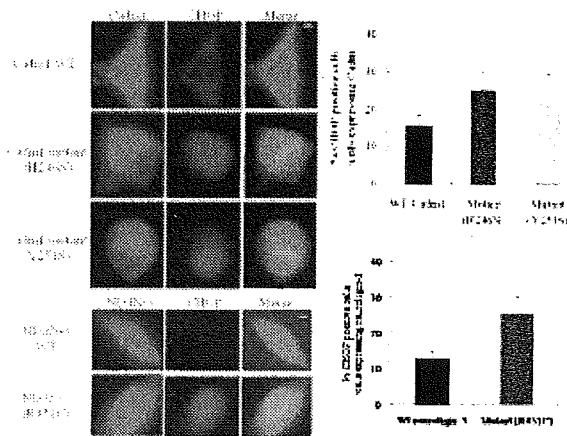


図2 Cadm1 変異によるストレス応答

#### 3. ストレス保護マウス

CA1 (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。

SCCA の発現は、表皮上層に認められるため、インボルクリン・プロモーター (Dr. Taichman より供与) を用いることとした。ケラチノサイト cDNA ライブラリーよりクローニングした SCCA1 遺伝子を同ベクターに挿入し、トランスジーンを作製した。また、皮膚における観察を容易ならしめるために、無毛の HR-1 マウスと交配を繰り返し、インボルクリン・SCCA1 ヘアレスマウスを作製した。SCCA1 Tg マウスの一部は年齢とともに皮膚のたるみが顕著となってきた。組織学的検査では、それらのマウスは表皮肥厚を示し、BrdU の取込試験では、基底細胞のかなりの部分が陽性であり、明らかな増殖亢進を示した。

#### D. 考察

##### CADM1 変異と自閉性障害

Caucasian 家系で検出された 2 変異は罹患者の同胞男子と非罹患者の父、または母に検出された。この変異遺伝子の検出パターンは、自閉症家系でしばしば観察されることから、浸透度の極めて低い常染色体優性遺伝するという

報告と一致する。両変異ともに第三 Ig domain に局在することは、共通に機能的意味を示唆している。シナプス接着蛋白の 1 つである CADM1 に変異が 2 種検出されたことは、自閉性障害の基本的分子病態がシナプス形成障害、または機能障害であることを指示する点で意味がある。変異 CADM1 の機能障害  
変異 CADM1 は細胞膜上に局在せず、細胞内に多く局在し、かつ、一部は分解されていたことは、変異蛋白は膜上に発現せず、細胞内に留まることを示唆した。変異 CADM1 は膜上への移動が障害され、ER に留まり、protease によって分解される可能性がある。細胞膜上への移動が障害されることで、シナプス形成不全を来たすことが推定される。この変異蛋白の局在異常は、これらの変異が疾患と関連していることを支持している。

#### E. 結論

1. シナプス接着蛋白の 1 つである CADM1 遺伝子に、自閉性障害関連変異を 2 つ同定した。これらの変異を導入して発現した変異蛋白は、細胞膜上への局在が阻害され、細胞内、おそらくは ER に留まり分解されていることが明らかになった。このことは、自閉性障害という非進行性の精神発達障害が、原因蛋白の膜上への局在障害によって生じていることを示唆する点で、新しい知見である。

3. ヒト言語障害の FOXP2(R553H) の変異に対応したマウス Foxp2(R552H) の変異をもつノックインマウスを作成し、USV を解析した。USV の障害と小脳発達障害をもたらすことが明らかになった。Foxp2 が転写制御する遺伝子産物によるヒト言語とマウス USV に共通な分子機構が存在することを示唆された。  
2. 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。

#### F. 研究発表

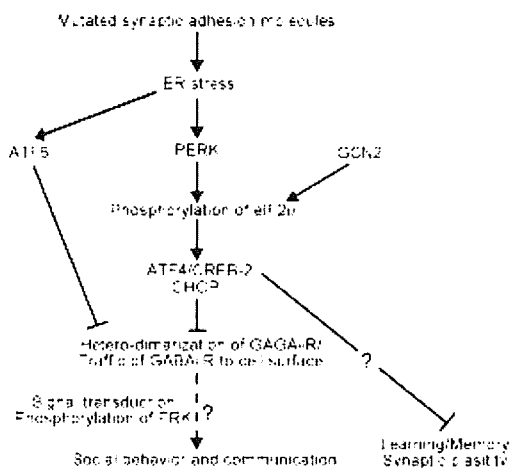


図 3 変異蛋白による小胞体ストレス誘導とシナプス機能障害。

#### 主任研究者

桃井 隆

1) Fujita E, Dai H, Tanabe Y, Yamagata T, Miyakawa T, Tanokura M, Momoi MY, Momoi T. Autism Spectrum Disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, *CADM1* Cell death Disease, 2010, in press.

2) Momoi T, Fujita E, Senoo H, Momoi M. Genetic factors and epigenetic factors for autism: endoplasmic reticulum stress and impaired synaptic function. *Cell Biol Int.* 2009;34:13-19.

3) Hibino T, Fujita E, Tsuji Y, Nakanishi J, Iwaki H, Katagiri C, Momoi T. Purification and characterization of active caspase-14 from human epidermis and development of the cleavage site-directed antibody. *J Cell Biochem.* 2010;109:487-497.

#### 分担研究者

上田 正次

1) Hayashi M, Arima H, Ozaki N, Morishita Y, Hiroi M, Ozaki N, Nagasaki H, Kinoshita N, Ueda M, Shiota A, Oiso Y. Progressive polyuria without vasopressin neuron loss in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296:R1641-1649.

日比野 利彦

- 1) Kamata Y, Taniguchi A, Yamamoto M, Nomura J, Ishihara K, Takahara H, Hibino T, Takeda A. Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids. *J Biol Chem.* 2009; 284:12829-12836.
- 2) Zheng B, Matoba Y, Kumagai T, Katagiri C, Hibino T, Sugiyama M. Crystal structure of *SCCA1* and insight about the interaction with *JNK1*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 380:143-147.
- 3) Hibino T, Fujita E, Tsuji Y, Nakanishi J, Iwaki H, Katagiri C, Momoi T. Purification and characterization of active caspase-14

from human epidermis and development of the cleavage site-directed antibody. *J Cell Biochem.* 2010;109:487-497.

桃井 真里子

1) Nakashima N, Yamagata T, Mori M, Kuwajima M, Suwa K, Momoi MY. Expression analysis and mutation detection of *DLX5* and *DLX6* in autism. *Brain Dev.* 2010; 32: 98-104.

#### 2.学会発表

なし

#### G. 健康危機情報

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

## 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

研究期間 平成19年4月1日～平成22年3月31日

研究要旨： B細胞性腫瘍でのラフト関連アポトーシスに対するBAFFの抑制機構やアポトーシス制御におけるDAP3とIPS-1等の機能解析、関節リウマチモデルマウスを用いた新規治療法開発研究などを進捗させ、高感度BAFF-ELISA測定系について検討した。

### 研究分担者

- (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) 株式会社札幌イノダ イグノスティック・ラボラトリー 藤原優
- (5) 株式会社免疫生物研究所 前田雅弘

### 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(BCR)を中心とした独自の増殖・分化制御機構が存在し、様々な分子や刺激伝達系がこれに関与する。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し、BCRの刺激伝達に重要な役割を果たす。B cell-activating factor belonging to the TNF family

(BAFF)はB細胞の生存、増殖に必須のサイトカインとして近年同定された。Death associated protein 3 (DAP3)は、リンパ球のアポトーシス制御にかかわる分子である。一方、リウマチを始めとする自己免疫疾患やB細胞性腫瘍は上記のB細胞の分化・増殖制御機構の破綻や異常により発症すると考えられる。そこで本研究では、上記刺激伝達系のB細胞の増殖・分化制御における分子機構を相互の機能的関連性に着目して解明し、その成果を効果的なB細胞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診断法および治療法開発研究へ発展させることを目指す。

当初、BCRを含むラフト関連の刺激伝達系、BAFF、DAP3、それぞれの分子機構を詳細に解析し、相互の関係について検討を進めるとともに、マウスを用いた病態・治療モデルを作出する計画であったが、研究の進捗に伴い、BAFFがラフト関連刺激伝達系と密接に関連して非常に重要な役割を担っていることが明らかとなったため、計画を一部変更し、BAFFを中心とした解析を集中的に実施することとした。また、関節リウマチモデルマウスを用いた新規治療法開発研究を開始した。

### B. 研究方法

1. 細胞培養、アポトーシスの検出  
Hairy cell leukemia 細胞株 MLMA、急性B前駆細胞性リンパ性白血病(B-pre

cursor ALL) 細胞株 NALM-6、Burkitt リンパ腫 (BL) 細胞株 BALM-18 (胚中心 B 細胞に相当) 等を用いて、抗  $\mu$  鎖抗体、抗 CD20 抗体等の添加によるラフト関連アポトーシスやデキサメサゾン、エトポシド添加による薬剤誘導性アポトーシスに対する組み換え型 BAFF の効果について検討した。DAPBP1 に対する siRNA を導入した HeLa 細胞に TNF- $\alpha$  および TRAIL 刺激を加えてアポトーシスを誘導させた。アポトーシスの検出は Cell Counting Kit 8 による細胞数測定、アネキシン-V との結合性、colorimetry 法や Caspase-Glo Assay による caspase の活性測定等により行った。BAFF 受容体 (BAFF-R) の発現は特異抗体を用いてフローサイトメトリーにより解析した。培養細胞から total RNA を抽出し、マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現を行った。

## 2. 遺伝子ノックアウトマウスの作出

ターゲッティングベクターを導入した 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 と交配させてヘテロ挿入遺伝子座を有するマウスを作出した。

## 3. ELISA 系の確立

ヒトとマウス BAFF に共通し、生理活性を欠く欠失型  $\Delta$ BAFF では欠損しているアミノ酸配列から合成したペプチドを免疫原に、新たに抗体を作製し、組み換え BAFF を標準品として、市販抗体と種々の組み合わせで、ELISA 測定系の条件検討を行った。(倫理面への配慮)

ヒト試料は、関連指針に従って当該施設の倫理委員会の承認を得た上で使用した。動物実験は、関連法規を遵守し、当該研究施設の動物実験委員会の承認を得て動物愛護と動物福祉の観点に立ち、行った。

## C. 研究結果

### (1) BAFF を中心とする B 細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解析

前述のごとく、研究の進捗に伴い、当初の計画を変更して、BAFF を中心とした解析を集中的に行った。BAFF-R を発現する Hairy cell leukemia 細胞株を用いて、BAFF がその増殖を促進すること、CD20 刺激や BCR 刺激によるラフト関連アポトーシス誘導を抑制することを明らかにし、これに GSK-3 $\beta$  の機能抑制や、NF- $\kappa$ B2 の活性化を介する Bcl-2 の発現増強、CD40 の発現増強等が関与することを示し、マイクロアレイによる BAFF の標的因子探索を行った。小児領域で最も頻度が高い腫瘍である B-precursor ALL および同様に小児領域で特徴的な BL において BAFF-R を発現する亜群が存在することを明らかにし、細胞株での検討で、BAFF

がこれら双方の亜群に対して細胞増殖を亢進するが、アポトーシスについては BL においてのみ抑制し、B-precursor ALL においては抑制しないこと、この BAFF の効果の違いは惹起される細胞内刺激伝達の様式の差に関連している可能性を示した。

酵母 two-hybrid 法による BAFF-R 会合分子探索により、DMWD (dystrophia myotonica-containing WD repeat motif) を同定し、培養細胞株での過剰発現系を用いて、関連分子 USP12 との共発現で NIK タンパク質のユビキチン化を抑制することにより non-canonical な NF- $\kappa$ B 経路の活性化に作用することを示した。同様に、DAP3 会合分子を探索し IPS-1、DELE、DAPBP1 を同定した。IPS-1 は NF- $\kappa$ B 刺激伝達やアポトーシスに関与するミトコンドリア局在のアダプター分子で、同遺伝子欠損マウス胚性線維芽細胞がカスパーゼ 8, 3 の活性化の減少を伴い足場喪失に伴い誘導されるアポトーシス、アノキス誘導に抵抗性を示す事を明らかにし、IPS-1 欠失変異体発現するプラスミドを用いてアポトーシス誘導に関わる領域を同定した。DELE の過剰発現によりアポトーシスが誘導される事、siRNA を用いた遺伝子発現抑制により HeLa 細胞における TNF- $\alpha$  および TRAIL による細胞死がカスパーゼ 3, 8 および 9 の活性化抑制を伴って有意に抑制される事を明らかにした。

### (2) 病態解析および治療モデルの確立

マウス骨髄間質細胞株との共培養で正常ヒト骨髄 CD34+細胞から B 前駆細胞を効率的に分化誘導する培養系を検討し、これを用いて正常の B 前駆細胞の一部の分画に BAFF-R が発現していることを示した。BAFF が B 細胞のみでなく B 前駆細胞にも作用を及ぼし、B-precursor ALL の発症や病態にも関与する可能性が考えられる。

DMWD (前述) の B 細胞を中心とした免疫系維持における生理学的意義を明らかにする目的で、DMWD 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスを作出に着手し、元となる ES 細胞の 1 クローン (クローン 134) に由来する系統から C57BL/6 とのバッククロスによる系統化に成功し、引き続き他 ES 細胞クローン由来キメラマウス系統樹立を進めている。DAP3 遺伝子ノックアウトマウスを作出したが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作出に計画を変更し、ES 細胞にターゲッティングベクターを導入してキメラマウスの作出を試みている。

関節リウマチのモデルとして抗コラー

ゲン抗体誘導性関節炎(CAIA)誘導したマウスを用い、CAIAに対する $\alpha 9\beta 1$ インテグリン( $\alpha 9$ インテグリン)の機能について $\alpha 9$ インテグリンに対する阻害抗体55A2Cを用いて解析を行った。その結果、55A2CはCAIAに対し顕著な発症予防効果および治療効果を示した。

### (3) BAFF ELISA 測定系の確立

BAFFのELISA測定系について条件設定を行い、市販の抗体を用いて62.5pg~4ng/mLの範囲で測定可能な系を確立した。より感度が高く、活性を持たない欠失型の $\Delta$ BAFFとは反応しない測定系の開発を目指して、新たに複数の抗体を作成し、これを用いた測定系の条件検討を進めたが、系の確立には至らなかった。

## D. 考察

今回の検討によりBAFFが様々なB細胞性腫瘍細胞の増殖因子として作用するとともに、ラフト刺激伝達系によって誘導されるアポトーシスの制御にも関与して、非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。特に、B-precursor ALLおよびBLでは、BAFF-R陽性群と陰性群が存在することが臨床検体(連結不可能匿名化検体、倫理承認済み)でも確認され、BAFF-Rの発現の有無や血中や局所のBAFF濃度が病状の進行や治療反応性と関連する可能性が考えられる。今後、これらのB細胞性腫瘍に対して、現在確立を目指しているBAFFのELISA測定系(後述)によりBAFF濃度と病態の関連性についての検討や、抗BAFFあるいは抗BAFF-R抗体の治療応用の可能性について検討を行う。

IPS-1は細胞内センサーを介したI型インターフェロン産生誘導に重要な役割を果たし、その遺伝子欠損マウスは多様なRNAウイルスに対して抵抗性が低下する事が示されている。インターフェロンは抗癌作用を有し、既に慢性骨髄性白血病(CML)や多発性骨髄腫の治療に用いられている。本研究の成果により、IPS-1が癌の転移と悪性化に関わるアノイキスに関与する事が示された事は、インターフェロンの産生そのものに関わる分子がまた癌の抑制に関わる事を示唆しており非常に興味深い。FADDはIPS-1およびDAP3に共通して会合する分子であり、カスパーゼ8の活性化を通じて、NF- $\kappa$ Bの活性化を介した細胞の生存と、下流のカスパーゼを活性化してアポトーシスの誘導に働くという、相反する2つの機能を有する点で非常に興味深い。これらの経路の切り替えが細胞の生死を運命づけている可能性が示唆され、今後の研究の発

展が期待される。

DELEは代表的なデスレセプターを介したアポトーシス誘導経路へ関与している事が認められ、これら受容体を介したアポトーシスの誘導、例えば活性化誘導細胞死(AICD)への関与が示唆される。また、DAP3を介したアノイキスの誘導経路への関与も今後検討していく必要があるものと思われる。

DMWDおよびDAP-3のノックアウトマウスの作出を行なっているが、その過程で様々な問題が生じて確立には至っていない。これらの遺伝子改変マウスは、B細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解析のモデル、あるいはB細胞の異常によって発症する自己免疫疾患や腫瘍の病態および治療モデルとして有用であり、さらに作出の作業を進めている。

関節リウマチのモデル動物であるCAIAマウスを用いた解析により線維芽細胞様滑膜細胞とマクロファージが $\alpha 9$ インテグリンの発現を通じて炎症の惹起に関わるサイトカインおよびケモカインの産生を促進が関節リウマチ患者の病態に関わる可能性が示唆された。実際のリウマチ患者においてもモデルマウスと同様に炎症部位の線維芽細胞様滑膜細胞とマクロファージが $\alpha 9$ インテグリンを産生している事は、ヒトにおいても $\alpha 9$ インテグリンの機能を阻害する事により、関節リウマチの治療が可能である事を強く示唆するものと考えられる。本研究で作製した抗ヒト $\alpha 9$ インテグリンモノクローナル抗体の中には $\alpha 9$ インテグリンによる細胞接着を阻害する抗体も含まれており、関節リウマチ治療への応用が期待される。今後、BAFFのB細胞に対する作用との関連などにも着目した解析をさらに進める予定である。

今回、新たにBAFFに対するウサギポリクローナル抗体を作製し、これを用いてELISA系を構築したところ、この系では、組み替え型ヒトBAFFを感度良く測定することができたが、ヒト血清中のBAFFは測定できなかった。他の研究者の報告で、大腸菌産生組み替え型ヒトBAFFをウサギに免疫して得られた抗BAFFポリクローナル抗体は、天然型ヒトBAFFの糖鎖結合部位近傍をエピトープとして認識するため、組み替え型ヒトBAFFには良好な反応性を示すが、天然型ヒトBAFFとは反応しないと報告されており、これと同様の理由でヒト血清中BAFFを測定することができなかったと考えられる。今後ウサギ以外の動物種、例えばヤギからBAFF抗体を得てELISA開発を行う予定である。



## E. 結論

本研究により、B 細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構において、BAFF を中心とした刺激伝達系が非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後さらに、モデル系の確立やこれを用いた分子機構解析、BAFF の ELISA 測定系確立や抗 BAFF 抗体作製の推進することによって、B 細胞の分化・増殖・細胞死制御の異常に起因する自己免疫疾患や B 細胞性腫瘍の新規診断、治療法開発への貢献が期待される。

## F. 研究発表 (主要なもの)

### 1. 論文発表

- 1) 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) Kitamura N, Katagiri YU, Itagaki M, Miyagawa Y, Onda K, Okita H, Mori A, Fujimoto J, Kiyokawa N. The expression of granulysin in systemic anaplastic large cell lymphoma in childhood. *Leuk Res*. 2009 Jul;33(7):908-12.
- 3) Saito Y, Miyagawa Y, Onda K, Nakajima H, Sato B, Horiuchi Y, Okita H, Katagiri YU, Saito M, Shimizu T, Fujimoto J, Kiyokawa N. B-cell activating factor inhibits CD20- mediated and B-cell receptor- mediated apoptosis in human B cells. *Immunology*. 2008 Dec 125;(12):570-590.
- 4) Katagiri YU, Nakajima H, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. The detergent-insoluble microdomains, rafts, can be used as an effective immunogen. *Glycoconj J*. 2008 Aug;25(6):495-501.
- 5) 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, JC. Reed, T. Yamasita, T. Uede, T. Miyazaki : LKB1 is crucial for TRAIL-mediated apoptosis induction in osteosarcoma. *Anticancer Res*. 27:761-768, 2007.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 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) 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.
- 10) H. Diao, K. Iwabuchi, L. Li, K. Onoe, L. Van, Kaer, S. Kon, Y. Saito, J.Morimoto, DT. Denhardt, SR. Rittling, T. Uede : Osteopontin regulates development and function of invariant natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:15884-15889, 2008.
  - 11) K. Ito, S. Kon, Y. Nakayama, D. Kurotaki, Y. Saito, M. Kanayama, C. Kimura, H. Diao, J. Morimoto, Y. Matsui, T. Uede : The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. *Matrix Biol*. 28:11-19, 2009.
  - 12) T. Haga, J. Suzuki, H. Kosuge, M. Ogawa, H. Saiki, G. Haraguchi, Y. Maejima, M. Isobe, T. Uede : Attenuation of experimental autoimmune myocarditis by blocking T cell activation through 4-1BB pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 46:719-727, 2009.
  - 13) M. Kanayama, D. Kurotaki, J. Morimoto, T. Asano, Y. Matusi, Y. Nakayama, Y. Saito, K. Ito, C. Kimura, N. Iwasaki, K. Suzuki, T. Harada, HM. Li, J. Uehara, T. Miyazaki, A. Minami, S. Kon, T. Uede : Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J Immunol*. 182: 8015-8025, 2009.
  - 14) A. Takahashi, M. Kurokawa, S. Konno, K. Ito, S. Kon, S. Ashino, T. Nishimura, T. Uede, N. Hizawa, Sk. Huang, M. Nishimura : Osteopontin is involved in migration of eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy*. 39:1152-1159, 2009.
  - 15) Y. Matsui, N. Iwasaki, S. Kon, D. Takahashi, J. Morimoto, Y. Matsui, D.T. Denhardt, S. Rittling, A. Minami, T. Uede : Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in osteopontin-deficient mice. *Arthritis and Rheumatism*. 60:2362-2371, 2009.
  - 16) D. Takahashi, N. Iwasaki, S. Kon, Y. Matsui, T. Majima, A. Minami, T. Uede: Down-regulation of cathepsin K in synovium leads to progression of osteoarthritis in rabbits. *Arthritis Rheum*. 60:2372-2380, 2009.
  - 17) D. Iwata, M. Kitamura, N. Kitaichi, Y. Saito, S. Kon, K. Namba, J. Morimoto, A. Ebihara, H. Kitamei, K. Yoshida, S. Ishida, S. Ohno, T. Uede, K. Onoe, K. Iwabuchi : Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA. *Exp Eye Res*. 2009 Sep 18.
  - 18) M. Kurokawa, S. Konno, A. Takahashi, B. Plunkett, SR. Rittling, Y. Matsui, S. Kon, J. Morimoto, T. Uede, S. Matsukura, F. Kokubu, M. Adachi, M. Nishimura, SK. Huang : Regulatory role of DC-derived osteopontin in systemic allergen sensitization. *Eur J Immunol*. 2009 Oct 14.
  - 19) AM. Seier, AC. Renkl, GS. Chulz, T. Uebele, T. Ahrens, A. Sindrilaru, S. Iben, L. Liaw, S. Kon, T. Uede, JM. Weiss : Antigen-specific induction of osteopontin contributes to the chronification of allergic contact dermatitis. *Am J Pathol*. in press
  - 20) Li HM, Fujikura D, Harada T, Uehara J, Kawai T, Akira S, Reed JC, Iwai A, Miyazaki T : IPS-1 is crucial for DAP3-mediated anoikis induction by

- caspase-8 activation. *Cell Death Differ.* 2009, 16(12):1615-21.
- 他 12 編
2. 学会発表
- 1) 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.
  - 2) 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.
  - 3) 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
  - 4) 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, 齋藤正博, 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.
  - 5) S. Kon, C. Kimura, M. Ikese, 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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)
  - 10) 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
  - 11) 岩井淳、宮崎忠昭. BAFF-R を介した NF- $\kappa$ 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
  - 12) 恩田恵子, 齊藤洋平, 飯島一智, 齋藤正博, 清河信敬. B 細胞性腫瘍に対する BAFF の効果. 第 71 回日本血液学会学術集会, 京都, 10 月 23 日-25 日, 2009.
  - 13) 恩田恵子, 齊藤洋平, 飯島一智, 齋藤正博, 清河信敬. BAFF の B 細胞性腫瘍に対する効果の検討. 第 51 回日本小児血液学会, 東京, 11 月 27 日-29 日, 2009.
  - 14) 恩田恵子, 片桐洋子, 清河信敬. Distinct effects of BAFF on human B cell neoplasms/B 細胞腫瘍に対する BAFF の効果. 第 39 回日本免疫学会学術集会, 大阪, 12 月 2 日-4 日, 2009.
  - 15) 金山剛士、黒滝大翼、森本純子、上出利光 :  $\alpha$ 9 インテグリンは関節炎の発症に重要な微小環境を構成する. 第 98 回日本病理学会総会 (京都) 5 月 1 日-3 日, 2009.
  - 16) Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki, Tsuyoshi Asano, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede : Synovial fibroblasts and macrophages differentially contributes to the development of autoimmune arthritis via  $\alpha$ 9 integrin. 第 9 回オステオポンチン研究会 (札幌), 9 月 12-13 日, 2009.
  - 17) Kazuya Iwabuchi, Daiju Iwata, Mizuki Kitamura, Yoshinari Saito, Shigeyuki Kon, Junko Morimoto, Shigeaki Ohno, Susumu Ishida, Toshimitsu Uede, Kazunori Onoe : Administration of Osteopontin small interfering RNA ameliorates experimental autoimmune uveoretinitis model in mice. 第 9 回オステオポンチン研究会 (札幌), 9 月 12-13 日, 2009.
  - 18) 浅野毅、岩崎倫政、今重之、金山剛士、鈴木孝治、三浪三千男、三浪明男、上出利光 : 関節リウマチにおける  $\alpha$ 9 インテグリン-リガンド間相互作用の解析. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術総会 (横浜), 11 月 5-6 日, 2009.
  - 19) Tsuyoshi Asano, Norimasa Iwasaki, Masashi Kanayama, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede : The interaction of  $\alpha$ 9 integrin and its ligands contributes to the development of Rheumatoid Arthritis. 第 39 回日本免疫学会学術集会 (大阪), 12 月 2-4 日, 2009.
  - 20) Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki, Tsuyoshi Asano, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede : Synovial fibroblasts and macrophages differentially contributes to the development of autoimmune arthritis via  $\alpha$ 9 integrin. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 12 月 2-4 日, 2009.
  - 21) Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Tsuyoshi Asano, Yutaka Matsui, Yosuke Nakayama, Yoshinari Saito, Koyu Ito, Chiemi Kimura, Norimasa Iwasaki, Koji Suzuki, Tanenobu Harada, Hong Mei Li, Jun Uehara, Tadaaki Miyazaki, Akio Minami, Shigeyuki Kon, Toshimitsu Uede : Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪), 12 月 2-4 日, 2009.
- 他 74 演題
- 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

## 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細胞性腫瘍でのラフト関連アポトーシスに対する BAFF の抑制機構やアポトーシス制御における DAP3 と IPS-1 の相互作用の解析、関節リウマチのモデルマウスを用いた新規治療法開発研究を進捗させ、高感度 BAFF-ELISA 測定系の確立を図った。

### 研究分担者

- (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) 株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー 藤原優
- (4) 株式会社免疫生物研究所 前田雅弘

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B細胞生存因子として同定され、B細胞の分化段階に応じて、その生存(アポトーシス抑制)、増殖、分化因子として様々な機能を示すことが明らかにされており、その過剰作用が自己免疫疾患やB細胞性腫瘍の発症に関与することが示唆されている。BAFF 受容体(-R)の会合分子とその下流のエフェクター分子が複数同定されており、そのアポトーシス制御機能について解析が行われている。

### 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(BCR)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

Death associated protein 3 (DAP3) は、リンパ球において TNF family 分子 TRAIL のアポトーシスシグナルに重要で、その過剰発現がリンパ球にアポトーシス

を誘導することが明らかにされており、やはり B 細胞のアポトーシス制御にかかわる分子である。

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、B 細胞腫瘍でのラフト関連アポトーシスに対する BAFF の抑制機構解析をさらに進め、アポトーシス制御における DAP3 と IPS-1 の相互作用や DELE の解析、B 細胞が関与する自己免疫疾患である関節リウマチのマウスモデルを用いた新規治療法開発研究を行うとともに、新たに作製した抗体を用いた BAFF-ELISA 測定系の確立を図った。

## 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、イムノプロット解析、マイクロアレイ解析

この研究では、Hairy cell leukemia 由来細胞株である MLMA 細胞、バーキットリンパ腫由来細胞株 BALM-18 および EB-3、急性 B 前駆細胞性リンパ性白血病細胞株 NALM-6 および RS4;11 細胞を用いた。細胞は、10% FCS 添加 RPMI1640 培地によって 5% CO<sub>2</sub> 存在化で維持された。MLMA およびバーキットリンパ腫細胞のアポトーシスは、抗  $\mu$  鎖抗体単独あるいは抗 CD20 抗体+抗マウス Ig 抗体 (いずれも 5  $\mu$ g/ml) を添加培養して誘導した。NALM-6 細胞のアポトーシスは、抗 CD24 抗体あるいは抗 CD10 抗体+抗マウス Ig 抗体 (いずれも 5  $\mu$ g/ml)、またはデキサメサゾン、エトポシドをそれぞれ記載量添加培養して誘導した。また、この培養系に遺伝子組み換え型ヒト BAFF (Hu-r-BAFF)、同 BAFF-R、および BAFF 関連因子である APRIL、あるいはヤギ抗 BAFF-R 抗体、マウス抗 BAFF 抗体 (いずれ

も 5  $\mu$ g/ml) を添加して、その効果について検討した。

培養細胞をピペッティングによって回収し、 $1 \times 10^6$  個の細胞に 1  $\mu$ g の各種 B 細胞細胞表面抗原および三者の BAFF 受容体 (BAFF-R、BCMA および TACI) に対する抗体を添加、室温 15 分反応後にリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、蛍光 (FITC あるいは PE) 標識 2 次抗体 (ヤギ抗マウス抗血清) 1  $\mu$ g と同様に反応させて洗浄後、各抗体に対する反応性をフローサイトメトリーにより解析した。また、一部の実験では、直接蛍光標識した一次抗体を細胞に反応させて同様に解析した。

培養細胞を回収し、表面抗原解析と同様に、蛍光 (FITC) 標識アネキシン-V を添加し、アネキシン-V との結合性によりアポトーシス細胞をフローサイトメトリーにより検出した。各実験は、triplicate で行い、結果を平均 + 標準偏差であらわした。また、一部の実験では、サイトスピンを用いて処理した細胞をスライドグラスに貼付けた標本を作製し、メイーグムザ染色、あるいは DAPI による核染色によって、核の断片化を光学あるいは蛍光顕微鏡により観察した。

アノイクスの誘導は野生型 (WT) および IPS-1 の遺伝子欠損マウス胚性線維芽細胞 (IPS-1 KO MEF) を Poly-HEMA コート化プレート上で培養する事により行った。アポトーシスの誘導は Cell Death Detection ELISA Kit (Roche 社) を用いて測定を行い、カスパーゼの活性化は Caspase-Glo Assay (Promega) を用いた発光法により解析を行っ

た。

DELE の遺伝子ノックダウンによるカスパーゼ活性化抑制効果の検討はカスパーゼを特異的に認識する抗体を用いて解析を行った。HeLa 細胞に DELE の遺伝子発現を特異的に抑制する siRNA をトランスフェクションし、48 時間後の細胞に対し、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) および TRAIL (30 ng/ml; SuperKiller TRAIL; ALEXIS Biochemicals) の刺激を加えた。TNF- $\alpha$  による刺激には同時に 10 mg/ml のシクロヘキサミドを添加し、アポトーシスの誘導を行った。

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。また TRAIL 刺激によるカスパーゼの活性化は Caspase-Glo Assay (Promega) を用いた発光法により解析を行った。

培養細胞を回収し、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、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、5% スキムミルクでブロッキング後、一次抗体と室温 30 分間反応させ、0.5% Tween-20 添加リン酸緩衝生理食塩水で 30 分間洗浄し、同様に二次抗体 (ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウス抗血清) を反応、洗浄後、化学発光 (ECL plus) により標的蛋白をラベルし、X 線フィルムに露光させて現像し、可視化した。

培養細胞から total RNA を RNeasy kit + DNase 処理 (Qiagen 社) で抽出し、各 2.5  $\mu$ g を用いてマイクロアレイ (Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0

Array) により網羅的遺伝子発現を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring (Agilent 社) を用いて解析した。

## 2. 関節リウマチモデルマウスの作出

関節リウマチモデルマウスとして CAIA マウスを作成し、用いた。CAIA は BALB/c マウスに抗 Type II コラーゲン抗体混合液と LPS を併用投与することによって誘導した。

サイトカインおよびケモカインの発現量については CAIA マウスの後肢足関節病変部から採取した細胞を用いて、リアルタイム RT-PCR 法により解析を行った。

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。

## 3. ELISA 系の確立

ヒト BAFF とマウス BAFF に対して反応性を持ち、かつ配列の一部が欠失して生理活性を持たない delta ( $\Delta$ )BAFF とは反応しない測定試薬の開発を目指し、ヒト BAFF アミノ酸配列とマウス BAFF アミノ酸配列を比較して、ヒトとマウスに共通したアミノ酸配列から、ヒト BAFF の細胞外領域部分と (抗原 1) と c 末側の部分 (抗原 4)、また delta ( $\Delta$ )BAFF では存在しない細胞外領域部分の配列 (抗原 2) のペプチドを合成した。また大腸菌を用いて、組み替え型 BAFF の蛋白を調整した。これらのペプチドおよび蛋白を抗原としてウサギに免疫し抗体を作製した。上記作製した抗体と市販抗 BAFF 抗体をについて血清中の BAFF を測定可能な条件を、大腸菌で作製した組

み替え BAFF 抗原を用いて検討した。抗 BAFF 抗体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 抗体を反応させ、洗浄後 TMB により発色させた。

(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。

## C. 研究結果

バーキットリンパ腫由来細胞株 BALM-18、EB-3 および B-precursor ALL 由来細胞株 NALM-6、RS4;11 の BAFF-R の発現をフローサイトメトリーで検討した結果、BALM-18 と NALM-6 では明らかな発現を認めたが MLMA 細胞に比較すると発現量は低かった。また、EB-3 細胞では BAFF-R の発現を認めず、RS4;11 細胞では発現が非常に弱かった。RT-PCR による検討でも、BAFF-R のメッセンジャーRNA の発現について同様の結果が得られた。そこで、それぞれの細胞株に BAFF を添加し、増殖に対する影響について、トレパンブルーを用いた細胞数測定と WST アッセイで検討した結果、BALM-18 と NALM-6 では増殖の亢進が認められたが、EB-3 と RS4;11 では亢進を認めなかった。さらに、それぞれの細胞に抗  $\mu$  鎖抗体、抗 CD20、CD24、CD10 抗体による架橋刺激によるアポトーシス誘導に対する BAFF の効果について検討したところ、BALM-18 では

BAFF のアポトーシス抑制効果を認めた  
が、EB-3 および precursor ALL 由来細胞  
株では認められなかった。

CAIA を誘導したマウスに対して抗  $\alpha$   
9 インテグリン抗体 55A2C を関節炎発症  
前に投与し、予防的な効果について検討  
を行った。その結果、コントロール抗体  
投与群と比較して、55A2C 投与群では関  
節炎の重篤化が顕著に抑制され、クリニ  
カルスコアは関節炎発症後 6 日目ではほ  
ぼ正常な足と同程度まで回復した。次いで、  
抗本研究の成果により関節リウマチのモ  
デル動物である CAIA マウスを用いた解  
析により線維芽細胞様滑膜細胞とマクロ  
ファージが  $\alpha$ 9 インテグリンの発現を通  
じて炎症の惹起に関わるサイトカインお  
よびケモカインの産生を促進が関節リウ  
マチ患者の病態に関わる可能性が示唆さ  
れた。 $\alpha$ 9 インテグリン抗体 55A2C を  
CAIA 発症後 3 日後のマウスに投与し、そ  
の治療効果について検討を行った結果、  
同抗体投与群では有意なクリカルスコ  
アの低下が認められ、CAIA に対し治療効  
果を発揮する事が明らかとなった。

CAIA 発症における  $\alpha$ 9 インテグリンの  
機能を明らかとするために、炎症局所  
である後肢足関節病変部における各種細胞  
の  $\alpha$ 9 インテグリンの発現について FACS  
解析を行った結果、滑膜線維芽細胞とマ  
クロファージにおいて  $\alpha$ 9 インテグリン  
の発現を認められる事が明らかとなった。  
そこで、これらの細胞を単離し、 $\alpha$ 9 イ  
ンテグリンのリガンドであるオステオポ  
ンチンおよびテネイシン-C により刺激

を行ったところ、炎症の惹起に関わるサ  
イトカインやケモカインの発現が顕著に  
亢進する事が示された。また、これらサ  
イトカインおよびケモカインの発現亢進  
は抗  $\alpha$ 9 インテグリン抗体 55A2C により  
抑制される事から、 $\alpha$ 9 インテグリン依  
存的なシグナルによるものと考えられた。  
CAIA マウスに対する抗  $\alpha$ 9 インテグリン  
抗体 55A2C の治療効果とこれらサイト  
カイン、ケモカインの産生との相関性を  
明らかとするために、CAIA 発症 9 日後の  
マウスより試料を採取し、リアルタイム  
RT-PCR 法によりサイトカイン、ケモカ  
インの産生量について解析を行った。その  
結果コントロール抗体投与群と比較して  
55A2C 投与群では  $\alpha$ 9 インテグリン依  
存的に発現誘導がなされるサイトカインお  
よびケモカインの発現が有意に抑制され  
ていた。

欠失変異体を用いて IPS-1 の proline-  
rich region がそのアポトーシス誘導に  
関わる事が明らかとなった。IPS-1 の遺  
伝子欠損マウス胚性線維芽細胞 (IPS-1  
KO MEF) が足場喪失に伴い誘導されるア  
ポトーシス、アノイキスに対して抵抗性  
を示すこと、その際カスパーゼ 8, 3 の活  
性化の有意な減少を伴っていることが明  
らかとなった。DAP3 と会合する分子とし  
て見出された DELE に関して、HeLa 細胞  
における siRNA を用いた DELE の遺伝子ノ  
ックダウンが TNF- $\alpha$  および TRAIL による  
カスパーゼ 8 および 9 の生成を有意に低  
下させ、その細胞死を有意に抑制する事  
が明らかとなった。

BAFF ペプチドおよび大腸菌産生組み替え型ヒト BAFF を抗原としてウサギを免疫し、固相化した組み替え型ヒト BAFF に対する強い反応性を示す抗血清を得た。この抗血清から精製した抗体を用いて、ヒト BAFF のサンドイッチ ELSIA を構築し 0.15  $\mu$ g/mL まで検出可能な測定系が構築された。しかし、この ELSIA 系でヒト血清中の BAFF の測定を試みたが、反応が認められなかった。

#### D. 考察

今回の検討により、BAFF-R が一部のパーキットリンパ腫および B-precursor ALL 細胞に発現し、BAFF が BAFF-R 陽性の細胞に対して細胞増殖を亢進すること、BAFF-R 陽性のパーキットリンパ腫細胞において BAFF が BCR および CD20 を介するアポトーシス誘導に対して抑制的に作用するが、BAFF-R 陽性の B-precursor ALL 細胞においては BAFF が CD24 および CD10 を介するアポトーシス誘導に対して抑制効果を示さないことが明らかとなった。この結果は、BAFF が特異的に BAFF-R 陽性の B 細胞性腫瘍細胞の細胞増殖を亢進するが、アポトーシス誘導については、その腫瘍細胞の特性あるいは分化の状況によって抑制する場合としない場合があることを示している。これまでの報告で、成人の成熟 B 細胞性腫瘍では、患者血中の BAFF 濃度や腫瘍細胞の BAFF-R の発現がその治療反応性や長期予後と関係することが示されていることから、パーキットリンパ腫や B-precursor ALL において

も、BAFF-R の発現や BAFF がその病態と関連している可能性が考えられる。今後のさらに解析を進め、B 細胞性腫瘍に対する BAFF の作用を明らかにすることを目指すと同時に、それぞれの腫瘍における BAFF-R の発現や患者血中の BAFF 濃度と予後や治療効果との関連についても検討を進めることで、その病態における BAFF の意義について明らかにしていく。

本研究の成果により関節リウマチのモデル動物である CAIA マウスを用いた解析により線維芽細胞様滑膜細胞とマクロファージが  $\alpha 9$  インテグリンの発現を通じて炎症の惹起に関わるサイトカインおよびケモカインの産生を促進が関節リウマチ患者の病態に関わる可能性が示唆された。実際のリウマチ患者においてもモデルマウスと同様に炎症部位の線維芽細胞様滑膜細胞とマクロファージが  $\alpha 9$  インテグリンを産生している事は、ヒトにおいても  $\alpha 9$  インテグリンの機能を阻害する事により、関節リウマチの治療が可能である事を強く示唆するものと考えられる。本研究で作製した抗ヒト  $\alpha 9$  インテグリンモノクローナル抗体の中には  $\alpha 9$  インテグリンによる細胞接着を阻害する抗体も含まれており、関節リウマチ治療への応用が期待される。

IPS-1 は細胞内センサーを介した I 型インターフェロン産生誘導に重要な役割を果たし、その遺伝子欠損マウスは多様な RNA ウイルスに対して抵抗性が低下する事が示されている。インターフェロンは抗癌作用を有し、既に慢性骨髄性白



血病 (CML) や多発性骨髄腫の治療に用いられている。本研究の成果により、IPS-1 が癌の転移と悪性化に関わるアノイキスに関与する事が示された事は、インターフェロンの産生そのものに関わる分子がまた癌の抑制に関わる事を示唆しており非常に興味深い。FADD は IPS-1 および DAP3 に共通して会合する分子であり、カスパーゼ 8 の活性化を通じて、NF- $\kappa$ B の活性化を介した細胞の生存と、下流のカスパーゼを活性化してアポトーシスの誘導に働くという、相反する 2 つの機能を有する点で非常に興味深い。これらの経路の切り替えが細胞の生死を運命づけている可能性が示唆され、今後の研究の発展が期待される。

DELE は代表的なデスレセプターを介したアポトーシス誘導経路へ関与している事が認められ、これら受容体を介したアポトーシスの誘導、例えば活性化誘導細胞死 (AICD) への関与が示唆される。また、DAP3 を介したアノイキスの誘導経路への関与も今後検討していく必要があるものと思われる。

今回、新たに BAFF に対するウサギポリクローナル抗体を作製し、これを用いて ELISA 系を構築したところ、この系では、組み替え型ヒト BAFF を感度良く測定することができたが、ヒト血清中の BAFF は測定できなかった。他の研究者の報告で、大腸菌産生組み替え型ヒト BAFF をウサギに免疫して得られた抗 BAFF ポリクローナル抗体は、天然型ヒト BAFF の糖鎖結合部位近傍をエピトープとして認識す

るため、組み替え型ヒト BAFF には良好な反応性を示すが、天然型ヒト BAFF とは反応しないと報告されており、これと同様の理由でヒト血清中 BAFF を測定することができなかったと考えられる。今後ウサギ以外の動物種、例えばヤギから BAFF 抗体を得て ELISA 開発を行う予定である。

## E. 結論

B-precursor ALL 細胞における BAFF-R の発現と BAFF の効果について解析し、同白血病には BAFF-R を発現する亜群が存在すること、BAFF がその増殖に関与するが、アポトーシス抑制はしない可能性が明らかとなった。今後さらに解析を進め、B-precursor ALL 細胞の新規増殖制御法開発、さらには治療薬、診断キットの開発への応用を目指す。

関節リウマチのモデルマウスである CAIA マウスの関節炎に対し、抗  $\alpha$  9 インテグリンの刺激を介した滑膜線維芽細胞とマクロファージによるサイトカインおよびケモカインの産生抑制によるものと考えられた。

DAP3 と会合する分子である IPS-1 を見出し、IPS-1 が足場喪失に伴い誘導されるアポトーシスであるアノイキスの誘導に関わる事が明らかとなった。DAP3 と会合する新規分子として DELE を明らかにし、DELE 特異的な siRNA を用いた解析により、DELE が TNF- $\alpha$  および TRAIL を介したアポトーシスに誘導において極めて重要な働きをしていることが明らかとなった。

組替え型ヒト BAFF を認識するウサギポリクローナル抗体を作製し、ELISA系を構築したが、血清検体中のBAFFを測定することができなかつたため、さらに検討を続けている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kitamura N, Katagiri YU, Itagaki M, Miyagawa Y, Onda K, Okita H, Mori A, Fujimoto J, Kiyokawa N. The expression of granulysin in systemic anaplastic large cell lymphoma in childhood. *Leuk Res.* 2009 Jul;33(7):908-12. Epub 2009 Feb 24.
2. K. Ito S. Kon, Y. Nakayama, D. Kurotaki, Y. Saito, M. Kanayama, C. Kimura, H. Diao, J. Morimoto, Y. Matsui, T. Uede : The differential amino acid requirement within osteopontin in alpha4 and alpha9 integrin-mediated cell binding and migration. *Matrix Biol.* 28:11-19, 2009.
3. T. Haga, J. Suzuki, H. Kosuge, M. Ogawa, H. Saiki, G. Haraguchi, Y. Maejima, M. Isobe, T. Uede : Attenuation of experimental autoimmune myocarditis by blocking T cell activation through 4-1BB pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 46:719-727, 2009.
4. M. Kanayama, D. Kurotaki, J. Morimoto, T. Asano, Y. Matusi, Y. Nakayama, Y. Saito, K. Ito, C. Kimura, N. Iwasaki, K. Suzuki, T. Harada, HM. Li, J. Uehara, T. Miyazaki, A. Minami, S. Kon, T. Uede : Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. *J. Immunol.* 182:8015-8025, 2009.
5. PH. Anborgh, SM. Wilson, AB. Tuck, E. Winqvist, N. Schmidt, R. Hart, S. Kon, M. Maeda, T. Uede, LW. Stitt, AF. Chambers AF : New dual monoclonal ELISA for measuring plasma osteopontin as a biomarker associated with survival in prostate cancer: clinical validation and comparison of multiple ELISAs. *Clin Chem.* 55:895-903, 2009.
6. Y. Maeno, M. Shinzato, S. Nagashima, SR. Rittling, DT. Denhardt, T. Uede, K. Taniguchi : Effect of osteopontin on diarrhea duration and innate immunity in suckling mice infected with a murine rotavirus. *Viral Immunol.* 22:139-144, 2009.
7. A. Takahashi, M. Kurokawa, S. Konno, K. Ito, S. Kon, S. Ashino, T. Nishimura, T. Uede, N. Hizawa, Sk. Huang, M. Nishimura : Osteopontin is involved in migration of eosinophils in asthma. *Clin Exp Allergy.* 39:1152-1159, 2009.
8. Y. Matsui, N. Iwasaki, S. Kon, D. Takahashi, J. Morimoto, Y. Matsui, D.T. Denhardt. S. Rittling, A. Minami, T. Uede : Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in osteopontin-deficient mice. *Arthritis and Rheumatism.* 60:2362-2371, 2009.
9. D. Takahashi, N. Iwasaki, S. Kon, Y. Matsui, T. Majima, A. Minami, T. Uede: Down-regulation of cathepsin K in synovium leads to progression of osteoarthritis in rabbits. *Arthritis Rheum.* 60:2372-2380, 2009.
10. N. Fujita, S. Fujita, Y. Okada, K. Fujita, A. Kitano, O. Yamanaka, T. Miyamoto, S. Kon, T. Uede, SR. Rittling, DT. Denhardt, S. Saika : Impaired angiogenic response in the cornea of mice lacking osteopontin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Sep 9.
11. D. Iwata, M. Kitamura, N. Kitaichi, Y. Saito, S. Kon, K. Namba, J. Morimoto, A. Ebihara, H. Kitamei, K. Yoshida, S. Ishida, S. Ohno, T. Uede, K. Onoé, K. Iwabuchi : Prevention of experimental autoimmune uveoretinitis by blockade of osteopontin with small interfering RNA. *Exp Eye Res.* 2009 Sep 18.
12. M. Kurokawa, S. Konno, A. Takahashi, B. Plunkett, SR. Rittling, Y. Matsui, S. Kon, J. Morimoto, T. Uede, S. Matsukura, F. Kokubu, M. Adachi, M. Nishimura, SK. Huang : Regulatory role of DC-derived osteopontin in systemic allergen sensitization. *Eur J Immunol.* 2009 Oct 14.
13. AM. Seier, AC. Renkl, GS. Chulz, T. Uebele, T. Ahrens, A. Sindrilaru, S. Iben, L. Liaw, S. Kon, T. Uede, JM. Weiss : Antigen-specific induction of osteopontin contributes to the chronification of allergic contact dermatitis. *Am J Pathol.* in press
14. Li HM, Fujikura D, Harada T, Uehara

J, Kawai T, Akira S, Reed JC, Iwai A, Miyazaki T. : IPS-1 is crucial for DAP3-mediated anoikis induction by caspase-8 activation. *Cell Death Differ.* 2009, 16(12):16 15-21.

## 2. 学会発表

1. 恩田恵子, 齋藤正博, 森鉄也, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 清河信敬. TCCSG-L1602 治療研究/Day8 末梢血-芽球数のフローサイトメトリー測定. 第19回日本サイトメトリー学会学術集会, 松江, 6月20日-21日, 2009.
2. 清河信敬, 恩田恵子, 高野邦彦, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 9 color フローサイトメトリーによる小児白血病のマーカー解析. 第19回日本サイトメトリー学会学術集会, 松江, 6月20日-21日, 2009.
3. 恩田恵子, 齋藤洋平, 飯島一智, 齋藤正博, 清河信敬. B 細胞性腫瘍に対する BAFF の効果. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 10月23日-25日, 2009.
4. 清河信敬, 恩田恵子, 飯島一智, 長谷川大輔, 加藤元博, 大喜多肇, 齋藤正博, 森鉄也, 真部淳, 康勝好, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 中川温子, 小川誠司, 藤本純一郎. 小児 B 細胞性リンパ腫のマイクロアレイを用いた molecular karyotyping と網羅的発現遺伝子解析. 第71回日本血液学会学術集会, 京都, 10月23日-25日, 2009.
5. 恩田恵子, 平林真介, 清河信敬, 齋藤正博, 森鉄也, 福島敬, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. TCCSG-L1602 治療研究における Day8 末梢血-芽球数のフローサイトメトリー測定についての評価. 第51回日本小児血液学会, 東京, 11月27日-29日, 2009.
6. 恩田恵子, 齋藤洋平, 飯島一智, 齋藤正博, 清河信敬. BAFF の B 細胞性腫瘍に対する効果の検討. 第51回日本小児血液学会, 東京, 11月27日-29日, 2009.
7. 清河信敬, 恩田恵子, 平林真介, 飯島一智, 福島敬, 齋藤正博, 藤本純一郎, 真部淳, 康勝好, 熊谷昌明, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 東京小児がん研究グループ急性リンパ性白血病第16次治療研究におけるマーカー中央診断. 第51回日本小児血液学会, 東京, 11月27日-29日, 2009.
8. 恩田恵子, 片桐洋子, 清河信敬. Distinct effects of BAFF on human B cell neoplasms/B細胞腫瘍に対する BAFF の効果. 第39回日本免疫学会学術集会,

大阪, 12月2日-4日, 2009.

9. 黒滝大翼, 森本純子, 上出利光: 組織固着マクロファージサブセットによる T 細胞免疫応答制御機構の解明. 第98回日本病理学会総会 (京都) 5月1日-3日, 2009.
10. 金山剛士, 黒滝大翼, 森本純子, 上出利光:  $\alpha 9$  インテグリンは関節炎の発症に重要な微小環境を構成する. 第98回日本病理学会総会 (京都) 5月1日-3日, 2009.
11. Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede: The role of osteopontin in the cardiovascular diseases. 第61回日本細胞生物学会 Workshop (名古屋) 6月2日-4日, 2009.
12. Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Toshimitsu Uede: Regulation of T cell responses by a distinct subset of resident splenic macrophages. マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム(金沢), 7月2-3日, 2009.
13. 伊藤甲雄, 黒滝大翼, 松井裕, 森本純子, 上出利光: 実験的自己免疫性脳脊髄炎における  $\alpha 9$  インテグリンの機能解析. 第20回生体防御学会学術集会 (東京), 7月25-26日, 2009.
14. 松井雄一郎, 岩崎倫政, 三浪明男, 今重之, 上出利光: Osteopontin による変形性関節症の発症及び進行抑制効果. 第9回オステオポンチン研究会 (札幌), 9月12-13日, 2009.
15. 松井裕, 池末昌弘, 森本純子, 小嶋哲人, 上出利光: 心筋梗塞における Syndecan-4 の機能解析. 第9回オステオポンチン研究会 (札幌), 9月12-13日, 2009.
16. 森本純子, 佐藤佳代子, 伊藤甲雄, 中山洋佑, 松井裕, 喜田宏, 宮崎忠昭, 上出利光: インフルエンザ A ウイルス感染防御免疫応答における Opn の機能解析. 第9回オステオポンチン研究会 (札幌), 9月12-13日, 2009.
17. Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Bae Kyeonghwa, Toshimitsu Uede: Regulation of T cell responses by a novel subset of resident splenic macrophages. 第9回オステオポンチン研究会 (札幌), 9月12-13日, 2009.
18. 今野哲, 黒川真嗣, 高橋歩, 松井裕, 上出利光, 足立満, 西村正治, Shau-Ku Huang: アレルゲン全身感作に及ぼすオステオポンチン(OPN)の影響. 第9回オステオポンチン研究会 (札幌), 9月12-13日, 2009.
19. 木田真紀, 岡田由香, 藤田織人, 北野愛, 雑賀司珠也, 上出利光: オステオ

- ポンチンの欠如は皮膚創傷治癒を遅延する。第9回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.
20. Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki, Tsuyoshi Asano, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede : Synovial fibroblasts and macrophages differentially contributes to the development of autoimmune arthritis via  $\alpha 9$  integrin. 第9回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.
21. Kazuya Iwabuchi, Daiju Iwata, Mizuki Kitamura, Yoshinari Saito, Shigeyuki Kon, Junko Morimoto, Shigeaki Ohno, Susumu Ishida, Toshimitsu Uede, Kazunori Onoe : Administration of Osteopontin small interfering RNA ameliorates experimental autoimmune uveoretinitis model in mice. 第9回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.
22. 藤田織人、岡田由香、上出利光、今重之、Susan R. Rittling, David T. Denhardt, 松岡雅人、緒方奈保子、雑賀司珠也 : 絡膜血管新生におけるオステオポンチンの役割。第9回オステオポンチン研究会(札幌), 9月12-13日, 2009.
23. 浅野毅、岩崎倫政、今重之、金山剛士、鈴木孝治、三浪三千男、三浪明男、上出利光 : 関節リウマチにおける $\alpha 9$ インテグリン-リガンド間相互作用の解析。第24回日本整形外科学会基礎学術総会(横浜), 11月5-6日, 2009.
24. Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Koyu Ito, Masashi Kanayama, Toshimitsu Uede : Regulation of T Cell Responses by a Distinct Subset of Resident Splenic Macrophages. 日本免疫学会総会(大阪), 12月2-4日, 2009.
25. Tsuyoshi Asano, Norimasa Iwasaki, Masashi Kanayama, Junko Morimoto, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede : The interaction of  $\alpha 9$  integrin and its ligands contributes to the development of Rheumatoid Arthritis. 第39回日本免疫学会学術集会(大阪), 12月2-4日, 2009.
26. Junko Morimoto, Kayoko Sato, Hiroshi Kida, Tadaaki Miyazaki, Toshimitsu Uede : Osteopontin deficiency promotes secondary immune response to influenza A virus infection, possibly by regulating the maintenance of virus-specific memory CD8+ T cells. 第39回日本免疫学会学術集会(大阪), 12月2-4日, 2009.
27. Yutaka Matsui, Masahiro Ikesue, Daichi Ohta, Keiko Danzaki, Tetsuhito Kojima, Toshimitsu Uede : Syndecan-4 protects from cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. 第32回日本分子生物学会(横浜), 12月9日-12日, 2009.
28. Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Tsuyoshi Asano, Yutaka Matsui, Toshimitsu Uede : Synovial fibroblasts and macrophages differentially contributes to the development of autoimmune arthritis via  $\alpha 9$  integrin. 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪), 12月2-4日, 2009.
29. Masashi Kanayama, Daisuke Kurotaki, Junko Morimoto, Tsuyoshi Asano, Yutaka Matsui, Yosuke Nakayama, Yoshinari Saito, Koyu Ito, Chiemi Kimura, Norimasa Iwasaki, Koji Suzuki, Tanenobu Harada, Hong Mei Li, Jun Uehara, Tadaaki Miyazaki, Akio Minami, Shigeyuki Kon, Toshimitsu Uede : Alpha9 integrin and its ligands constitute critical joint microenvironments for development of autoimmune arthritis. 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪), 12月2-4日, 2009.
30. Koyu Ito, Daisuke Kurotaki, Yutaka Matsui, Junko Morimoto, Toshimitsu Uede : Alpha9 integrin is involved in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating inflammatory cell migration from draining lymph node to central nervous systems. 第39回日本免疫学会総会・学術集会(大阪), 12月2-4日, 2009.
31. Keiko Danzaki, Yutaka Matsui, Yoichiro Iwakura, Toshimitsu Uede : Interleukin-17 deficiency accelerates atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice. 第32回日本分子生物学会年会(横浜), 12月9日-12日, 2009.
32. 池末昌弘、松井裕、檀崎敬子、太田大地、小嶋哲人、上出利光 : 新生内膜形成と動脈硬化におけるシンデカン-4の機能。第32回日本分子生物学会(横浜), 12月9日-12日, 2009.
33. 太田大地、池末昌弘、松井裕、上出利光 : The functional significance of interactions between ADAM15 and integrins in the invasion of breast