

[0025]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2010

<https://doi.org/10.15017/26853>

---

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 25, 2011. 九州大学生体防御医学研究所  
バージョン :  
権利関係 :



個 体 機 能 制 御 学 部 門

Department of Immunobiology and Neuroscience

## 免疫遺伝学分野

### Division of Immunogenetics

免疫系は「自己」と「非自己」を識別し、非自己成分（微生物、変異タンパク質）をすみやかに生体より排除し、その恒常性を維持するために構築されたシステムである。免疫系が真に生体にとって有益な監視システムとして機能するには、免疫系独自に進化した細胞高次機能の存在が不可欠である。例えば、外来異物やアポトーシス細胞の貪食、リンパ球やマクロファージの遊走、抗原認識といった細胞高次機能は免疫監視機構の根幹をなすものであり、それらはいずれも細胞骨格の再構築により巧妙に制御されている。私達はこれまでに免疫系特異的に発現する CDM ファミリー分子として DOCK2 を同定し、この分子がリンパ球や好中球の遊走や活性化において極めて重要な役割を演じることを明らかにした。本分野では、DOCK2 及びその関連分子を中心に、各種受容体刺激から細胞骨格再構築に至るシグナル伝達を解明し、免疫系の発生、分化、構築や機能発現における各シグナル伝達系の意義を明らかにすると共に、その理解に立脚して、自己免疫疾患、移植片拒絶など現代医学が抱える難治性疾患の新しい治療法、予防法を開発することを目標とし、研究を進めている。

今年度から、牛島美保が大学院修士課程学生として、森沙也子が卒研生として、新たに研究室に参加した。また、主幹教授制度に伴う先導的学術研究拠点として、「免疫機構研究センター」を設置し、段学峰がこのセンターの助教に就任した。

#### A. CDM ファミリー分子を介したシグナル伝達機構の解明とその機能解析

突然変異体を用いた遺伝学的解析より、*Caenorhabditis elegans*（線虫）において生殖巣の形成に重要な遠端細胞（distal tip cell）の移動に関与するいくつかの分子が同定されている。CED-5 もその1つであり、ヒトにおける DOCK180 および *Drosophila melanogaster*（ショウジョウバエ）における Myoblast City（MBC）と相同性を示すことより、これらの分子は現在その頭文字をとって CDM ファミリー分子とよばれている。これら CDM ファミリー分子はいずれも Rac の上流で機能することで細胞骨格の再構築に関与すると考えられており、細胞運動以外にも CED-5 はアポトーシス細胞の貪食、MBC は筋芽細胞の融合といった種々の細胞機能制御に関与することが知られている。私達は、マウス胸腺 cDNA ライブラリーよりこの CDM ファミリーに属する新しい遺伝子として *DOCK2* を単離し、ノックアウトマウスを作製することで、この分子が Rac 活性化を介してリンパ球の遊走および免疫シナプス形成を制御することを明らかにすると同時に（Nature 412:826-831, 2001; Immunity 19:119-129, 2003; Immunity 21: 429-441, 2004）、その欠損によりアロ移植心臓の長期生

着が可能になることを実証した (J. Exp. Med. 22:1121-1130, 2005). また, DOCK2 が好中球の遊走や活性酸素産生においても重要な役割を演じることを実証すると共に (J. Cell Biol. 174:647-652, 2006), アレルギー反応の制御に重要な役割を演じていることを明らかにした (Nature Immunology 8:1067-1075, 2007). さらに最近では, DOCK2-GFP 融合タンパク質を発現するノックインマウスを作製し, 好中球遊走における DOCK2 の細胞内動態が 2 種類の異なるリン脂質により連続的に制御されていることを実証した (Science 324:384-387, 2009). このような知見をふまえ, 本年度は以下のような研究を行った.

#### **a. DOCK2 を介した形質細胞様樹状細胞活性化の制御機構**

形質細胞様樹状細胞 (pDC) は, 微生物由来の核酸を細胞内に存在する TLR7/TLR9 を介して認識することで, 炎症性サイトカインのみならず, 大量の I 型インターフェロン (IFN) を産生する. pDC 活性化における DOCK2 の役割を解析する目的で, CpG DNA や R848 といった TLR リガンドで pDC を刺激したところ, DOCK2 欠損 pDC では IL-12p40, IL-6 といった炎症性サイトカインは全く正常に産生されるにも関わらず, I 型 IFN の産生が著しく低下することを見出した. 同様の知見は, pDC に *in vitro* でウイルスを感染させた場合においても認められた. このことから, DOCK2 は pDC において I 型 IFN の産生を選択的に制御していることが明らかとなった.

DOCK2 欠損 pDC においても, CpG DNA の取り込みは正常に起こる. しかしながら, 野生型 pDC では CpG DNA 刺激に伴いアクチン重合が惹起されるのに対して, DOCK2 欠損 pDC ではこのような形態変化が全く起こらなかった. このアクチン重合は, CpG DNA をコートしたマイクロビーズで刺激した際にも認められることから, TLR9 による認識とは無関係に, 細胞表面で惹起されていると考えられた. 事実, TLR9 欠損 pDC を CpG DNA で刺激した場合にも, アクチン重合が観察された. 野生型 pDC や TLR9 欠損 pDC では, 種々の TLR リガンド刺激に伴い Rac が活性化されるが, DOCK2 欠損 pDC では, この活性化がほぼ完全に消失していた. 一方, 野生型 pDC にドミナントネガティブ Rac 変異体を発現させると, IL-12p40 のレベルに影響を与えることなく, I 型 IFN の産生が顕著に抑制された. このことから, 核酸リガンドは TLR 非依存的, DOCK2 依存的なメカニズムにより Rac を活性化し, この Rac 活性化が I 型 IFN 産生に重要であることが明らかとなった.

pDC において, IRF-7 は I 型 IFN の産生に必須の転写因子であり, その活性化は IKK- $\alpha$  によって制御されている. 野生型 pDC を CpG DNA で刺激すると, 活性化ループ上のセリン残基がリン酸化される. しかしながら, DOCK2 欠損 pDC では, この IKK- $\alpha$  の活性化が障害されており, その結果 IRF-7 の核移行が起こらなかった. 同様の結果は, TLR9 欠損 pDC においても認められた. 以上より, 核酸リガンドの取り込みに伴い, TLR による抗原認識とは独立して DOCK2-Rac シグナル伝達系が作動し, IKK- $\alpha$  の活性化を介して, I 型インター

フェロン産生を選択的に制御するという、新しい制御機構の存在を明らかにした。pDC による I 型 IFN の産生は、SLE や乾癬といった自己免疫疾患の発症に深く関わっていることから、DOCK2 はこのような疾患を治療・予防する上で、格好の分子標的になると考えられる。

#### **b. DOCK180 の生理的機能の解明**

DOCK2 はリンパ球、好中球、形質細胞様樹状細胞の遊走や活性化を制御する Rac 活性化分子であるが、マクロファージや骨髄系樹状細胞では、DOCK2 欠損の影響は認められない。これは、DOCK2 欠損の影響が、DOCK180 といった他の Rac 活性化分子によって機能的に代償されているためと考えられる。そこで DOCK180 の生理的機能を明らかにするため、コンディショナル KO マウスを作製した。すべての細胞系譜で DOCK180 を欠損させたマウスは全例、心室中隔欠損 (VSD) と両大血管右室起始症 (DORV) を呈し、全身の浮腫を伴い胎生後期に死亡した。また、DOCK180 欠損マウス胎児では midgut における血管形成に異常が認められた。これらの表現型はケモカイン受容体 CXCR4 の欠損マウスのそれと類似していることから、DOCK180 KO マウスから血管内皮細胞を単離し、CXCL12 で刺激したところ、Rac 活性化およびラッフル膜形成が顕著に障害されていた。以上より、DOCK180 が血管内皮細胞において CXCR4 の下流で機能する Rac 活性化分子であり、心血管形成に重要な役割を演じることを明らかにした。

#### **c. リンパ球ホーミングの分子機構**

リンパ球に発現するインテグリンとして LFA-1 や VLA-4 が知られており、それぞれ ICAM-1/ICAM-2 や VCAM-1 をリガンドとして接着応答を惹起する。これらインテグリンのリンパ球ホーミングにおける役割を解明する為、ICAM-1、ICAM-2、VCAM-1 のノックアウトマウスを用いた解析を行った。その結果、末梢リンパ節の HEV との接着応答は主に ICAM-1 によって担われているが、いずれのインテグリンも transendothelial migration やリンパ組織での運動には必須ではないことが明らかとなった。

#### **d. DOCK2 シグナル伝達機構の解明**

我々はこれまでに DOCK2 の N 端 502 アミノ酸残基が ELM01 との会合することが、Rac 活性化に重要であることを明らかにしているが (Blood 102:2948-2950, 2003)、DOCK2 は 1822 アミノ酸残基からなる大きな分子であり、ELM01 以外にも多くの分子と会合し、細胞骨格を制御していることが予想される。そこで、DOCK2 シグナル伝達の全貌を明らかにする目的で yeast two hybrid, プロテオミクスを用いたスクリーニングを行い、未知及び既知の分子を含め数種類の DOCK2 会合分子を同定した。また、DOCK2 欠損 T 細胞に種々の DOCK2 変異体を発現できる実験系を構築し、DOCK2 活性化の制御機構につき解析を進めている。

#### **e. DOCK2 を標的とした創薬研究**

DOCK2 はリンパ球の遊走や活性化に不可欠な分子であり、その欠損により移植片拒絶や自己免疫疾患発症がブロックされることから、これら免疫難病を治療・予防する上で格好の分子標的になると期待される。このため私達は DOCK2 機能ドメインと会合分子の複合体の構造解析をスタートすると共に、この相互作用を特異的に阻害する低分子化合物のスクリーニングを行っている。

#### **f. 新規 DOCK ファミリー分子の同定と機能解析**

Rac 以外にも多くの低分子量 G 蛋白質が細胞骨格の再構築に関与し、細胞機能を制御している。今回、免疫系に発現し、Rac 以外の低分子量 G 蛋白質の活性化を制御すると考えられる新規 DOCK ファミリー分子を数種類クローニングし、その生理的機能をノックアウトマウスを用いて解析している。

### **業績目録**

#### **原著論文**

1. Sanematsu F, Hirashima M, Laurin M, Takii R, Nishikimi A, Kitajima K, Ding G, Noda M, Murata Y, Tanaka Y, Masuko S, Suda T, Meno C, Côté JF, Nagasawa T, Fukui Y. 2010.  
DOCK180 is a rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4.  
Circ. Res., 107: 1102-1105.
2. Boscacci RT, Pfeiffer F, Gollmer K, Sevilla AC, Martin AM, Soriano SF, Natale D, Henrickson SE, Andrian UH, Fukui Y, Mellado M, Deutsch U, Engelhardt B, Stein JV. 2010.  
Comprehensive analysis of lymph node stroma-expressed Ig superfamily members reveals redundant and non-redundant roles for ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in lymphocyte homing.  
Blood, 116: 915-925.
3. Kumar V, Scandella E, Danuser R, Onder L, Nitschke M, Fukui Y, Halin C, Ludewig B, Stein JV. 2010 .  
Global lymphoid tissue remodeling during a viral infection is orchestrated by a B cell-lymphotoxin-dependent pathway.  
Blood, 115: 4725-4733.
4. Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Maeda N, Ishikawa T, Hoshino K, Uruno T, Cao Q, Higashi S, Kawaguchi Y, Enjoji M, Takayanagi R, Kaisho T, Yoshikai Y, Fukui Y. 2010.  
Selective control of type I IFN induction by the Rac activator DOCK2 during TLR-mediated plasmacytoid dendritic cell activation.  
J. Exp. Med., 207: 721-730.

## 学会発表

1. Fukui Y (2011, 2/10-2/11).  
Immune regulatory functions of DOCK2 in health and disease.  
The 7<sup>th</sup> Global COE International Symposium, Singapore.
2. Sakai Y, Tanaka Y, Fukui Y (2011, 2/10-2/14).  
The atypical Rac activator DOCK5 regulates osteoclast function for bone homeostasis.  
The 7<sup>th</sup> Global COE International Symposium and 6<sup>th</sup> Young Investigation Forum, Singapore /Bintan.
3. Harada Y, Sanematsu F, Fukui Y (2010, 2/10-2/14).  
DOCK180 is a Rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4.  
The 7<sup>th</sup> Global COE International Symposium and 6<sup>th</sup> Young Investigation Forum, Singapore /Bintan.
4. Fukui Y (2010, 11/18-11/19).  
Regulation of leukocyte migration and activation by the CDM family protein DOCK2 -From the molecular basis to its clinical application-  
The 2010 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea.
5. 福井宣規 (2010, 10/27).  
細胞骨格制御シグナルを標的とした免疫難病治療の新戦略  
CREST 「免疫機構」 研究領域・第一回シンポジウム, 東京.
6. Fukui Y (2010, 9/26-9/29).  
Signaling and function of the CDM family protein DOCK2.  
第 8 回日独シンポジウム 「免疫応答の制御と疾患」, Cuxhaven, Germany.
7. Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Hoshino K, Kaisho T, Yoshikai Y, Fukui Y (2010, 8/22-8/27).  
Critical role of DOCK2 in type I IFN induction in plasmacytoid dendritic cells.  
14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 神戸.
8. Gotoh K, Tanaka Y, Nishikimi A, Nakamura R, Yamada H, Higashi S, Uruno T, Yoshikai Y, Fukui Y (2010, 6/24-6/25).  
Critical role of DOCK2 in type I IFN induction in plasmacytoid dendritic cells.  
The 5<sup>th</sup> International Symposium of Institute Network, 金沢.
9. 後藤和人、田中芳彦、福井宣規 (2010, 6/4-6/5).  
TLR を介した形質細胞様樹状細胞活性化における DOCK2 の役割  
Kyoto T Cell Conference 第 20 回学術集会, 京都.

## 免疫病態学分野

### Division of Clinical Immunology

当部門では専門的診療分野として自己免疫疾患，血液疾患，内分泌代謝疾患など多岐にわたる病態を取り扱うため、これらに関連した多彩な基礎的研究が行われてきた。しかし、平成22年度は教授、講師、助教が退任し、補充が行われないままであったため、自己免疫疾患及び血液疾患に関する研究の停止を余儀なくされた。したがって現有スタッフで実施した研究は、細胞内脂肪滴構成蛋白に関する研究と補完代替医療に関する研究である。

#### A. 細胞内脂肪滴蛋白に関する研究

細胞内脂肪滴表面に存在する蛋白で、遊離脂肪酸の取り込みなど細胞内脂肪滴の形成に重要な役割を果たしている。細胞内脂肪の過剰蓄積に基づく病態、たとえば脂肪肝や動脈硬化などの病巣ではADRPが過剰に発現している。これまでubiquitousな発現を示す蛋白としてADRPについて、我々は肝およびマクロファージにおけるこの遺伝子の発現調節機構について解析を進め、発現調節に重要な機能を有する遺伝子領域の構造を明らかにした。また、サプリメントとして広く利用されているフランス海岸松樹皮抽出物ピクノジェノールがこの蛋白の発現を抑制するとともにマクロファージや肝細胞内への脂肪蓄積を抑制することを見出し、その分子機構を明らかにした。本年度はADRP同様ubiquitousな発現を示す脂肪滴蛋白TIP47のマクロファージにおける発現調節とその機能について解析し、TIP47はTLR9を介する炎症性刺激により顕著に発現が増強し、とくに中性脂肪の蓄積に関わることを明らかにした。このように細胞内脂肪蓄積には炎症性刺激が極めて重要な役割を果たしており、我々はInflammo-metabolic connectionと呼称している。ある種の食品成分はこのような炎症刺激シグナルを阻害することにより、細胞内脂肪蓄積に抑制的に働くことから、今後の健康増進手段としての応用が期待される。

#### B. 補完代替医療の生理的効果に関する科学的根拠の創生

健康補助食品、生薬、温泉など、補完代替医療の効用に関する科学的エビデンスを集積する「補完代替医療探索研究拠点」形成を目標に、技術基盤の確立をめざした以下の研究を行っている。1) フランス海岸松樹皮抽出物ピクノジェノールが破骨細胞の分化を抑制することを見出し、その分子機構の解析を行っている。また、ピクノジェノールにより変動する遺伝子の網羅的解析を行っている。2) 脂肪肝抑制作用のある健康補助食品成分がC型肝炎ウイルスの複製を抑制することを見出した。そこで、この健康補助食品の併用によるC型慢性肝炎のペグインターフェロン・リバビリン療法の治療効果の向上をめざした臨床研究を倫理委員会に申請、受理されたので、多施設共同研究として現在、臨床試験を実施している。3) 抗酸化作用を有する水素を高濃度に添加した温泉浴の生体に及ぼす生理的効果を実証し、付加価値をもった温泉療法の新たな展開をめざし、患者への応用をめざしている。

## 業績目録

### 原著論文

1. Gu JQ, Wang DF, Yan XG, Zhong WL, Zhang J, Fan B, Ikuyama S, 2010.  
A Toll-like receptor 9-mediated pathway stimulates perilipin 3 (TIP47) expression and induces lipid accumulation in macrophages.  
Am J Physiol Endocrinol Metab. 299,E593-E600.
2. Horai Y, Watanabe H, Miyamura Y, Takahama S, Hirata A, Nakamura M, Ando H, MinamiR, YamamotoM, Suematsu E. 2010.  
Clinical Analysis of Cerebrospinal Fluid Interleukin-6 in Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus.  
Fukuoka Acta Med. 101(2), 34-40.
3. 合田英明、塩川左斗志、渡邊秀之、平瀬伸尚、西川 寛、権藤重喜、本村誠一、生山祥一郎. 2010.  
インフリキシマブ治療中に重篤な非呼吸器感染症を合併した関節リウマチの2症例  
九州リウマチ 第31巻(1), in press.

### 学会発表

1. 平瀬伸尚 (2010,4/5-6).  
プロトンポンプ阻害薬(PPI)による胃酸分泌低下にて感染性胃炎を引き起こしたと考えられる1例  
第84回日本感染症学会総会, 京都.
2. 渡邊秀之、塩川左斗志、合田英明、赤木輝久、西川 寛、本村誠一、生山祥一郎、西村純二 (2010, 4/22-25).  
経過中にホジキンリンパ腫を発症した成人発症スチル病の1例  
第54回日本リウマチ学会学術集会, 神戸.
3. 合田英明、渡邊秀之、赤木輝久、西川 寛、末廣 悟、神宮博子、権藤重喜、本村誠一、塩川左斗志、生山祥一郎、西村純二(2010, 4/22-25).  
インフリキシマブ治療中に併発した非呼吸器感染症の4例  
第54回日本リウマチ学会学術集会, 神戸.
4. 平瀬伸尚(2010, 4/22-25).  
メトトレキサート(MTX)関連好中球減少症へのG-CSF投与中に脳梗塞を併発したRAの2例  
第54回日本リウマチ学会総会, 神戸.
5. 渡邊秀之、范 斌、生山祥一郎 (2010, 7/10).  
フランス海岸松樹皮抽出物による破骨細胞分化の抑制  
第9回 西日本骨・関節疾患懇話会, 福岡.
6. 平瀬伸尚、赤木輝久、本村誠一、渡邊秀之、西村純二 (2010, 7/15).  
Histiocytic Sarcoma と考えられた1例

- 第 94 回大分臨床血液懇話会，大分.
7. 平瀬伸尚、西川寛、渡邊秀之、合田英明、塩川左斗志、生山祥一郎、河野宏 (2010, 9/4-5).  
ステロイド投与中に肺結核を併発した全身性エリテマトーデスの一例  
第 40 回九州リウマチ学会，鹿児島.
  8. 渡邊秀之、塩川左斗志、合田英明、西川 寛、平瀬伸尚、生山祥一郎(2010, 9/4-5).  
下痢で発症し 5 年の経過で初めて診断された IgG4 関連疾患の 1 例  
第 40 回九州リウマチ学会，鹿児島.
  9. 田中綾、渡辺周、森本浩章、塚田順一、平瀬伸尚、本村誠一 (2010, 9/24-26).  
腎性貧血に対するエポエチン  $\beta$  製剤皮下投与にて早期に発症した抗エリスロポエチン抗体  
関連赤芽球癆  
第 72 回日本血液学会学術総会，横浜.
  10. 平瀬伸尚、西川寛、渡邊秀之、合田英明、塩川左斗志、生山祥一郎 (2010,10/22).  
当院における Imatinib 及び Nilotinib の使用経験  
第 7 回大分 CML 研究会，大分.
  11. 渡邊秀之、塩川左斗志、合田英明、西川 寛、平瀬伸尚、生山祥一郎 (2011, 2/26).  
IgG4 関連後腹膜線維症により再発性下痢を発症した 1 例  
平成 22 年度 別府市医師会学術講演会，別府.
  12. 平瀬伸尚、渡邊秀之、合田英明、西川寛、生山祥一郎 (2011, 3/19-3/20).  
メトトレキサート(MTX) 投与中に悪性リンパ腫を発症した全身性エリテマトーデス(SLE)  
の一例  
第 41 回九州リウマチ学会，宮崎.
  13. 渡邊秀之、平瀬伸尚、合田英明、西川 寛、生山祥一郎(2011, 3/19-3/20).  
血球貪食症候群に対しタクロリムスが有効であった全身性エリテマトーデスの 1 例  
第 41 回九州リウマチ学会，宮崎.

## 脳機能制御学分野

### Division of Neurofunctional Genomics

生物にとって、その遺伝情報を担うゲノム DNA を細胞から細胞へ、親から子へと正確に伝え維持することは最も基本的な生物学的機能であるが、ゲノム DNA やその前駆体であるヌクレオチドは、酸素呼吸の過程で必然的に発生する活性酸素や生体防御のために生体が能動的に産生する活性酸素によって酸化される危険に常に曝されている。活性酸素に曝された DNA やヌクレオチドは様々な酸化的化学修飾を受けるが、このような酸化損傷は修復、除去されないと突然変異を引き起こすことで細胞のがん化の原因となり、あるいは細胞死を引き起こすことで多くの変性疾患の原因となる。本分野では、活性酸素による非増殖性細胞の障害として「脳・神経細胞死」に、また増殖性細胞の障害として「突然変異と発がん」に注目して「活性酸素によるゲノム障害とその防御機構」の解明を目指している。神経細胞はその個体の生涯を通して生存し機能する必要があるが、分裂能を欠くため加齢に伴う活性酸素等による障害により変性脱落する運命にある。そのため成体においても神経幹細胞からの新たな神経細胞の供給など神経回路網を保持する機構が幾重にも用意されていると考えられる。成体脳における神経新生は脳虚血や神経興奮毒性などに伴い脳障害が引き起こされた際に著しく亢進する。本分野では、これまでに脳における酸化ストレス応答遺伝子として前初期遺伝子群の *jun*, *fos* ファミリー遺伝子とその下流で発現が制御される遺伝子群を同定しており、「成体脳における脳・神経細胞の運命決定機構」の制御機構の解明を進めている。

平成 22 年度の人事異動は次の通りであった。4 月には、中国深圳疾病予防センター分子毒性研究所からの訪問研究員の袁建輝准教授が研究を終了し帰国した。小早川優子が医学系学府博士課程大学院生として入学した。Julio Jesus Leon-Incio が医科学専攻（修士課程）に入学した。瀧口友香（生命科学科 4 年生）が卒業研究生として配属された。猪山輝昭と湯通堂紀子が学術研究員として赴任した。Nona Abolhassani が財団法人長寿科学振興財団の認知症対策総合研究推進事業リサーチレジデントとして当研究室に派遣された。4 月にペルーから国費留学生として来日した Erika Katherine Castillo Carrión が日本語研修を修了し、10 月から研究生として入学した。6 月には林葉子が女性研究者支援プロジェクト（Hand in Hand）テクニカルスタッフとして赴任した。12 月に関鴻斌が研究生として来日した。平成 23 年 3 月に太田詠子が単位修得の上退学した。

## A. 8-オキソグアニンは DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる

グアニンの酸化体である 8-オキソグアニン (8-oxoG) はシトシンだけでなくアデニンとも対合できるため、塩基置換変異の原因となる。8-oxoG による突然変異の抑制に関わる *Mth1*, *Ogg1*, *Mutyh* 遺伝子を欠損したマウスでは自然突然変異と自然発がん頻度が数倍上昇することが明らかにされ、ヒトにおいても *MUTYH* 遺伝子の生殖細胞系列の変異が家族性大腸ポリポーシスの原因として同定されている。

我々は、ヒトゲノム中に 8-oxoG が恒常的に高密度に局在する特定の領域が存在する事を見だし、そのゲノム領域内において減数分裂期の組換えや一塩基多型の頻度が周辺領域より高い事を明らかにした。ゲノムに蓄積した 8-oxoG が組換えを促進する可能性を実験的に証明する目的で、*Ogg1*, *Mth1*, *Ogg1/Mth1* 遺伝子欠損マウスの体細胞を用いて解析したところ、これらの遺伝子欠損体細胞では野生型より DNA 中の 8-oxoG レベルと姉妹染色分体交換 (SCE) 頻度が上昇していることが明らかになった。さらに、野生型細胞を 8-oxo-deoxyguanosine (8-oxo-dG) を添加した培地中で培養すると SCE 頻度の有意な上昇を認めたことから、ヌクレオチドプール中に蓄積した 8-oxo-dGTP が DNA に取り込まれて染色体組換えを促進することが明らかになった。

*Ogg1*, *Mth1* 遺伝子欠損マウスの各種臓器を用いて、DNA 中に存在する 8-oxoG 量を定量したところ、*Ogg1* 遺伝子欠損に起因して 8-oxoG の蓄積が見られ、特に肝臓や卵巣で顕著だった。細胞種別の 8-oxoG 量を比較するため野生型マウスの精巣病理標本を用いて 8-oxoG を免疫学的に検出したところ、PCNA 陽性の精原細胞、精母細胞で強い染色が認められた。*Ogg1*, *Mth1* 遺伝子の野生型マウス精巣での発現パターンを解析した結果、DNA 複製を行う精原細胞、減数分裂期の精母細胞で強い発現を認めた。

次に、減数分裂期における組換えも 8-oxoG のゲノム蓄積で促進される事を検討するために、野生型マウスと *Mth1*, *Ogg1*, *Ogg1/Mth1* 遺伝子欠損マウス由来のパキテ期後期の精母細胞における組換えスポットを MLH1 フォーカスとして検出した。精母細胞ゲノム中の 8-oxoG のレベルは野生型マウス  $< Mth1 \ll Ogg1 \leq Ogg1/Mth1$  の順に増加したが、MLH1 フォーカスの頻度も同じ傾向で有意に増加した。第一減数分裂期の染色体標本作製し、キアズマ頻度を比較したところ、同様の傾向であった。*Ogg1*, *Mth1*, *Ogg1/Mth1* 二重欠損マウスの精母細胞核では DNA の二本鎖切断、一本鎖切断が増加していた。また、二本鎖 DNA 切断によって増加することが知られているヒストン H2AX のリン酸化体 ( $\gamma$ H2AX) の核内フォーカスも増加していた。さらに、これらの遺伝子欠損マウスでは相同染色体組換えに必須な RAD51 リコンビナーゼの発現も上昇していた。

野生型マウスにおける 8-oxo-dGTP の過剰蓄積が組換えに及ぼす影響を解析するために、8-oxo-dG を腹腔内投与し、キアズマ頻度を解析した。コントロールおよび deoxyguanosine 投与群に比較して 8-oxo-dG 投与によりキアズマ頻度の有意な上昇を認めた。

以上の結果より、ヌクレオチドプールの酸化や DNA の直接酸化により生じた 8-oxoG は、核 DNA 中の DNA 一本鎖および二本鎖切断を誘発することで相同染色体組換え頻度を上昇させることが示唆された。以上の結果は、8-oxoG のゲノム蓄積が塩基置換と減数分裂期の相同染色体組換え頻度に影響を及ぼし、ゲノム多様性の誘発要因になっていることを初めて実験的に示したものである。

## **B. APEX2 は正常なB細胞の発生分化と化学療法後のリンパ前駆細胞の回復に必須である**

B リンパ球の発生分化は高度の細胞増殖と遺伝子のリアレンジメントと選択を伴うことから、個体レベルにおける DNA 修復過程を研究する上で有用なモデルとなる。塩基除去修復経路はリンパ球の発生分化において必須なためにその意義を明らかにする事は困難であった。しかしながら、塩基除去修復経路の酵素の 1 つである APEX2 欠損マウスは、比較的正常に発生しながらもリンパ球形成に異常を示す。そこで、我々は APEX2 欠損マウスにおける骨髄における造血機能を詳細に解析し、pro-B 細胞から pre-B 細胞への移行が阻害されている事を見出した。APEX2 は V(D)J 組換えには不要で、APEX2 を欠損しても B リンパ球前駆細胞のターンオーバーは正常であった。しかしながら、pro-B 細胞と pre-B 細胞の産生は p53 依存性の DNA 損傷応答により低下していた。FACS で分離した APEX2 欠損 B リンパ球前駆細胞は試験管内でのストロマ細胞との共培養下では IL-7 に正常に応答し分化したが、pro-B 細胞は増殖の異常を示した。面白い事に、APEX2 欠損マウスでは 5-フルオロウラシルによる骨髄細胞枯渇後の B リンパ球前駆細胞の回復が遅延していた。5-フルオロウラシル 1 回投与から 2 週間後においても pro-B および pre-B 細胞数は顕著に減少したままであった。我々の結果は、APEX2 がリンパ球の発生分化において DNA 損傷からリンパ球を防護する上で重要な役割を持つ事を意味している。本研究は、米国 University of Massachusetts Medical School の Carol E. Schrader 博士との共同研究である。

## **C. *fosB* 遺伝子による脳機能制御機構の解明**

AP-1 (Activator Protein-1) コンプレックスを構成する転写因子ファミリー Jun/Fos は、細胞の増殖や分化を制御する多様な細胞内・細胞外シグナルによって発現が誘導される。 *fosB* 遺伝子は *fos* ファミリー遺伝子の中で唯一、alternative splicing と alternative translation initiation により複数のアイソフォーム (FosB,  $\Delta$ FosB,  $\Delta 2\Delta$ FosB) を生じるユニークな遺伝子である。その発現は、コカインや様々なドパミン作動薬の投与や一過性の前脳虚血後、または電気刺激やカイニン酸刺激によって引き起こされるてんかん後に、線条体や海馬において強く誘導されることが知られている。これまでに、*fosB* 遺伝子産物は線条体におけるドパミン応答と運動機能制御やコカイン依存性の制御に関わる事が明らかにされている。我々は、脳における *fosB* 遺伝子産物の機能解明を目的として、*fosB* 完全欠損アレル (*fosB*<sup>d</sup>) と  $\Delta$ FosB/  $\Delta 2\Delta$ FosB は発現するが FosB は発現しない *fosB*<sup>d</sup> アレルを遺伝子改変によって作製し、それぞれの変異アレルをヘテロ、ホモに持つマウスを樹立した。野生型マウス、*fosB*<sup>d/d</sup>、*fosB*<sup>G/G</sup>マウスの全脳における *fosB* 遺伝子産物の発現を確認したところ、*fosB*<sup>G/G</sup>マウスでは期待通りに *fosB* 遺伝子産物は全く検出されなかった。一方、*fosB*<sup>d/d</sup>マウスでは線条体、海馬、大脳皮質において  $\Delta$ FosB と  $\Delta 2\Delta$ FosB の発現が野生型マウスに比べて顕著に増加しており、FosB の発現は検出されなかった。 $\Delta$ FosB と  $\Delta 2\Delta$ FosB の発現亢進は *fosB*<sup>+d</sup>マウスでも顕著であったが、このヘテロマウスでは低いレベルながら FosB の発現が認められた。

野生型マウス、*fosB*<sup>d/d</sup>、*fosB*<sup>G/G</sup>マウスのホームケージにおける行動量を赤外線ビームでモニターしたところ、*fosB*<sup>d/d</sup> > 野生型 > *fosB*<sup>G/G</sup>マウスの順に行動量が減少した。同様の傾向は、オープンフィールドにおける新規探索行動においても観察された。高架十字迷路でも *fosB*<sup>d/d</sup> > 野生型 > *fosB*<sup>G/G</sup>マウスの順にオープンアームへの滞在時間が減少した事から、不安や恐怖感が亢進して *fosB*<sup>G/G</sup>マウスの行動が低下している可能性が示唆された。しかしながら、明暗箱における暗箱滞在時間は3群のマウス間で有意差は認められず、*fosB*<sup>d/d</sup>マウスにおける活動性の亢進と *fosB*<sup>G/G</sup>マウスにおける活動性の低下はいずれも不安や恐怖感とは無関係と考えられた。

*fosB*<sup>d/d</sup> と *fosB*<sup>G/G</sup> マウスで見られた活動性の亢進と抑制にドパミンが関与している可能性を検討する目的で、コカインと同様にドパミントランスポーターを阻害し、ドパミン応答性の活動を亢進するメチルフェニデートを投与したところ、*fosB*<sup>d/d</sup> > 野生型 > *fosB*<sup>G/G</sup>マウスの順に活動性が亢進する事が明らかになった。D1受容体のアゴニストでも同様の結果が得られたことから、線条体におけるD1ニューロンにおいて発現している  $\Delta$ FosB と  $\Delta 2\Delta$ FosB が活動性の亢進に関わる可能性が示唆された。一方、D2受容体のア

ンタゴニスト、ハロペリドールによる行動量の抑制は *fosB<sup>d/d</sup>* マウスでは全く認められなかった事から、D2ニューロンにおける  $\Delta$ FosBと  $\Delta 2 \Delta$ FosBの発現亢進はハロペリドールによる行動抑制に対して拮抗的に作用すると考えられる。

次に空間認識の記憶学習能力の比較を目的として1日1回の試行で10日連続のモリスの水迷路を用いた実験を行ったところ、オープンフィールド等における結果とは異なり、プラットフォーム到達までの時間は *fosB<sup>G/G</sup>* > *fosB<sup>d/d</sup>* = 野生型 > *fosB<sup>d/d</sup>* マウスの順となっていた。この結果は *fosB<sup>d/d</sup>* マウスが他のマウスよりも空間認識の記憶学習能力に優れている事を示唆するが、実験データを詳細に解析したところ、*fosB<sup>G/G</sup>* > *fosB<sup>d/d</sup>* = 野生型 > *fosB<sup>d/d</sup>* マウスの順に遊泳しない無動時間を呈する事が明らかになった。連日の水迷路テストはマウスにとってストレスとなっている事が示唆され、*fosB<sup>G/G</sup>* と *fosB<sup>d/d</sup>* マウスが異なるストレス耐性を示すと考えられた。そこで、ストレスによるうつ誘発試験に用いられる強制水泳テストを3日連続で行った。その結果、*fosB<sup>d/d</sup>* > 野生型 > *fosB<sup>d/d</sup>* > *fosB<sup>G/G</sup>* マウスの順に遊泳時間が短縮し、*fosB<sup>G/G</sup>* が著しくストレス感受性を示すのに対して、*fosB<sup>d/d</sup>* マウスは野生型マウスよりもストレス耐性である事が明らかになった。以上の結果は、FosBと  $\Delta$ FosBと  $\Delta 2 \Delta$ FosBがともにストレス応答性の制御に関与する事を意味し、さらにFosBの存在下で  $\Delta$ FosB/  $\Delta 2 \Delta$ FosBの発現量が増加することがストレス耐性の獲得に重要であることを初めて示したものである。

## 業績目録

### 原著論文

1. Iwama, E., D. Tsuchimoto, T. Iyama, K. Sakumi, A. Nakagawara, K. Takayama, Y. Nakanishi, and Y. Nakabeppu. 2011.  
Cancer-Related PRUNE2 Protein Is Associated with Nucleotides and Is Highly Expressed in Mature Nerve Tissues.  
J Mol Neurosci. In press.
2. Guikema, J.E., R.M. Gerstein, E.K. Linehan, E.K. Cloherty, E. Evan-Browning, D. Tsuchimoto, Y. Nakabeppu, and C.E. Schrader. 2011.  
Apurinic/Apyrimidinic endonuclease 2 is necessary for normal B cell development and recovery of lymphoid progenitors after chemotherapeutic challenge.  
J Immunol 186: 1943-1950.
3. Goto, M., K. Shinmura, Y. Nakabeppu, H. Tao, H. Yamada, T. Tsuneyoshi, and H. Sugimura. 2010.  
Adenine DNA glycosylase activity of 14 human MutY homolog (MUTYH) variant proteins found in

patients with colorectal polyposis and cancer.

Hum Mutat 31: E1861-1874.

4. Abolhassani, N., T. Iyama, D. Tsuchimoto, K. Sakumi, M. Ohno, M. Behmanesh, and Y. Nakabeppu. 2010.

NUDT16 and ITPA play a dual protective role in maintaining chromosome stability and cell growth by eliminating dIDP/IDP and dITP/ITP from nucleotide pools in mammals.

Nucleic Acids Res 38: 2891-2903.

5. Iyama, T., N. Abolhassani, D. Tsuchimoto, M. Nonaka, and Y. Nakabeppu. 2010.

NUDT16 is a (deoxy)inosine diphosphatase, and its deficiency induces accumulation of single-strand breaks in nuclear DNA and growth arrest.

Nucleic Acids Res 38: 4834-4843.

## 総説

1. Oka, S. and Y. Nakabeppu. 2011.

A DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis.

Cancer Sci. in press.

2. Ihara, H., T. Sawa, Y. Nakabeppu, and T. Akaike. 2011.

Nucleotides function as endogenous chemical sensors for oxidative stress signaling.

J Clin Biochem Nutr 48: 33-39.

3. Sakumi, K., N. Abolhassani, M. Behmanesh, T. Iyama, D. Tsuchimoto, and Y. Nakabeppu. 2010.

ITPA protein, an enzyme that eliminates deaminated purine nucleoside triphosphates in cells.

Mutat Res 703: 43-50.

4. Nakabeppu, Y., S. Oka, Z. Sheng, D. Tsuchimoto, and K. Sakumi. 2010.

Programmed cell death triggered by nucleotide pool damage and its prevention by MutT homolog-1 (MTH1) with oxidized purine nucleoside triphosphatase.

Mutat Res 703: 51-58.

5. Tsuchimoto, D., T. Iyama, M. Nonaka, N. Abolhassani, E. Ohta, K. Sakumi, and Y. Nakabeppu. 2010.

A comprehensive screening system for damaged nucleotide-binding proteins.

Mutat Res 703: 37-42.

## 学会発表

1. Sugako Oka, Yusaku Nakabeppu (2011/3/08).  
MUTYH-initiated base excision repair triggers two distinct cell death pathways by monitoring 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial DNAs.  
Keystone Symposia on Stem Cells, Cancer and Metastasis, Keystone, Colorado, USA.
2. Hiroko Nomaru, Yoshinori N Ohnishi, Masaaki Hokoma, Noriko Yutsudo and Yusaku Nakabeppu (2011/2/11).  
Comprehensive analysis of gene expression profiles in brain regulated by fosB gene.  
6th Global-COE Young Investigators Forum, Bintan Island, Indonesia.
3. Teruaki Iyama, Nona Abolhassani, Daisuke Tsuchimoto and Yusaku Nakabeppu (2011/2/12).  
NUDT16 is a (deoxy)inosine diphosphatase, and its deficiency induces accumulation of single-strand breaks in nuclear DNA and growth arrest.  
6th Global-COE Young Investigators Forum, Bintan Island, Indonesia.
4. 作見邦彦, 大野みずき, 田口健一, 外間政朗, 中別府雄作 (2011/2/3).  
Ogg1, Mth1, Mutyh triple knockout mouse の樹立と解析  
平成 2 2 年度「個体レベルでの発がん研究支援活動」ワークショップ-個体レベル研究のワークショップ (個体レベルの癌研究の魅力: 培養細胞と臨床研究をつなぐマトリクス), 大津.
5. Teruaki Iyama, Nona Abolhassani, Daisuke Tsuchimoto and Yusaku Nakabeppu (2011/2/1)  
NUDT16 is a (deoxy)inosine diphosphatase, and its deficiency induces accumulation of single-strand breaks in nuclear DNA and growth arrest.  
Keystone Symposia on Genomic Instability and DNA Repair, Keystone, Colorado, USA.
6. Yusaku Nakabeppu (2010/12/15).  
Molecular mechanisms for oxidative DNA damage-induced neurodegeneration.  
The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM) and The 10th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), Fukuoka, Japan.
7. 稲里みゆき, 古賀由香里, 橋川智恵, 中村照也, 池水信二, 中別府雄作, 山縣ゆり子 (2010/12/8).  
ヒト MTH1 の幅広い基質特異性発現機構の解明  
BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸.
8. 土本大介, 猪山輝昭, アボルハッサニ ノナ, 野中麻里, 中別府雄作 (2010/12/8).

- NUDT16 は(デオキシ)イノシンニリン 酸分解酵素であり, その欠損は核 DNA の一本鎖切断の蓄積と増殖抑制をもたらす
- B20B2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸.
9. 太田詠子, 土本大介, 作見邦彦, 中別府雄作 (2010/12/8).
- 酸化ヌクレオチド 2-OH-ATP による細胞死の制御機構
- BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸.
10. 岡素雅子, フリオ レオン, 中別府雄作 (2010/12/10).
- MUTYH は p53 による発がん抑制のメディエータである
- BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸.
11. 大野みずき, 作見邦彦, 續輝久, 中別府雄作 (2010/12/8).
- 8-oxoguanine は DNA 鎖切断を誘発することで減数分裂期の相同染色体組換え頻度を上昇させる
- BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸.
12. Kunihiko Sakumi, Nona Abolhassani, Mehrdad Behmanesh, Teruaki Iyama, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu (2010/12/7).
- The biological significance of ITPA protein and its substrates, ITP and dITP in mouse
- BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸.
13. 中別府雄作, Nona Abolhassani, 猪山輝昭, 太田詠子, 盛子敬, 岡素雅子, 土本大介, 作見邦彦 (2010/12/7).
- 環境ストレスによるヌクレオチドプールの恒常性破綻に起因するゲノム障害とその防御機構
- BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸.
14. 中別府雄作 (2010/11/20)
- 活性酸素による核酸の損傷と神経変性の機序
- 第 3 回 Kyushu CVD Conference, 福岡.
15. Zijing Sheng, Sugako Oka, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiko Sakumi and Yusaku Nakabeppu (2010/10/26)
- Mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid induces striatal degeneration through the two distinct MUTYH-dependent cell death pathways.
- The 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, Toyama, Japan.
16. Sugako Oka, Zijing Sheng, Yusaku Nakabeppu (2010/10/26)
- MUTYH-initiated base excision repair triggers two distinct cell death pathways by monitoring

- 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial DNAs.  
The 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, Toyama, Japan.
17. Nona Abolhassani, Teruaki Iyama, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiko Sakumi, Mizuki Ohno, Mehrdad Behmanesh, Yusaku Nakabeppu (2010/10/26).  
NUDT16 and ITPA play a dual protective role in maintaining chromosome stability and cell growth by eliminating dIDP/IDP and dITP/ITP from nucleotide pools in mammals.  
The 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, Toyama, Japan.
18. Teruaki Iyama, Nona Abolhassani, Daisuke Tsuchimoto, Mari Nonaka and Yusaku Nakabeppu (2010/10/26).  
NUDT16 is a (deoxy)inosine diphosphatase, and its deficiency induces accumulation of single-strand breaks in nuclear DNA and growth arrest.  
The 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, Toyama, Japan.
19. Yusaku Nakabeppu, Nona Abolhassani, Teruaki Iyama, Zijing Sheng, Sugako Oka, Kunihiko Sakumi and Daisuke Tsuchimoto (2010/10/29).  
Quality control in the purine nucleotide pools is essential for maintaining genomic integrity in mammals.  
The 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, Toyama, Japan.
20. 岡素雅子, 中別府雄作 (2010/9/23).  
MUTYH は p53 による発がん抑制のメディエータである  
第 6 9 回日本癌学会学術総会, 大阪.
21. 西村行生, 吉岡潔子, 瀧口総一, 中別府雄作, 伊藤和幸 (2010/9/23).  
SNX1 に対する siRNA を用いた gefitinib 耐性肺癌細胞内における活性型 EGFR のエンドサイトーム機構の解析  
第 6 9 回日本癌学会学術総会, 大阪.
22. 高橋富美, 吉原達也, 中津可道, 續輝久, 中別府雄作, 笹栗俊之 (2010/9/23).  
酸化ストレス誘発小腸腫瘍に対する Diffrentiation-inducing factor-1 の抗腫瘍効果  
第 6 9 回日本癌学会学術総会, 大阪.
23. Nona Abolhassani, Teruaki Iyama, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu (2010/9/22).  
Deoxyinosine incorporated into DNA under ITPA deficiency  
日本遺伝学会第 8 2 回大会, 札幌.
24. 中別府雄作, 猪山輝昭, Nona Abolhassani, 太田詠子, 盛子敬, 岡素雅子, 作見邦彦, 土本

大介 (2010/9/20).

環境ストレスによるヌクレオチドプールの恒常性破綻の分子病態  
日本遺伝学会第82回大会, 札幌.

25. Daisuke Tsuchimoto, Eiko Ohta, Nona Abolhassani, Teruaki Iyama, Mari Nonaka, Mehrdad Behmanesh, Kunihiko Sakumi and Yusaku Nakabeppu (2010/7/21).  
Quality control in the purine nucleotide pools is essential for cellular homeostasis.  
L.I.G.G.S' Seminar at University of Leicester, Leicester, UK.
26. Zijing Sheng, Sugako Oka, Yusaku Nakabeppu, Base excision repair-mediated programmed cell death and neurodegeneration, 3rd International Genome Dynamics in Neurosciences Conference “DNA Repair and Neurological disease”, 2010.07.19, Brighton, UK.
27. 中別府 雄作 (2010/5/14)  
活性分子種による核酸の化学修飾と生体応答  
第51回日本生化学会 中国・四国支部例会シンポジウム, 山口.
28. Teruhisa Tsuzuki, Jing Shu Piao, Takuro Isoda, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu and Yoshimichi Nakatsu (2010/5/5).  
Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice.  
Bond Workshop: Biological Consequences and Health Risks of Low-level Exposure to Ionizing Radiation, Richland, WA, USA.