

[0020]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2005年

<https://doi.org/10.15017/6244>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 20, 2006-07. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :



分子発現制御学分野

Division of Cell Biology

分子発現制御学分野(旧細胞学部門)では,細胞の基本的性質である細胞周期と細胞死を制御する分子メカニズムを,遺伝学的・生化学的・細胞生物学的・発生工学的手法を用いて研究を進めている。つまり細胞周期や細胞死の制御に関わっていると推測される分子の遺伝子を単離同定し,最終的にはその遺伝子を破壊したマウス(ノックアウトマウス)を人工的に作製し,その異常を調べることによって,その分子の生理的役割を個体レベルで明らかにしようというものである。特に免疫系と神経系の細胞の分化段階特異的な細胞周期と細胞死の制御因子の量的制御機構を,選択的タンパク質分解の視点から取り組んでいる。

分子発現制御学分野は,中山敬一教授,白根道子助手(さきがけ研究者兼任),松本雅記特任助手(21世紀COE雇用),恒松良祐特任助手(九大スーパープログラム雇用)の教官を中心に大学院生(修士課程2名,博士課程7名),科学技術振興事業団派遣職員(研究員2名,技術員1名,研究補助員3名,一時雇用職員3名,事務員1名),企業からの派遣研究者2名の体制で研究を進めている(2006年3月31日現在)。

その他の人事異動について,新規参加者としては2005年4月より大学院修士課程に松本有樹修(摂南大・薬)と佐伯友子(東薬大・薬)が,博士課程に北川哲平(九大・理)と逸見百江(鳥大・生命)が入学した。さらに2005年4月より高橋秀尚と西山正章(両名とも前年度まで大学院生)を科学技術振興事業団派遣職員(研究員)として雇用した。2005年4月より同じく科学技術振興事業団派遣職員(研究補助員)として東芳を雇用した。2005年7月より同じく科学技術振興事業団派遣職員(一時雇用職員)として吉村祐子を雇用した。

次いで退職者として,助教授であった嘉村巧は2005年10月より名古屋大学大学院理学研究科教授として転任した。2006年3月に特任助手の恒松良祐が,また科学技術振興事業団派遣職員(研究員)であった高橋秀尚と西山正章が退職した。また大学院生の事柴周平が学位取得の上卒業した。小野山一郎,洲崎悦生,藤井洋は単位取得の上退学した。北川哲平は2006年3月に途中退学し,逸見百江は2005年10月より配置転属となった。さらに科学技術振興事業団派遣職員(研究補助員)であった矢田(旧姓安河内)亮子が2005年5月に,篠原都子が2005年8月に,光安理恵,倉光美恵,東芳が2006年3月に退職した。また2006年3月に研究生であった佐藤学道(日本化薬)が退学した。さらに2006年3月に一時雇用職員のセイドマハムード容子,吉田英子,瀬戸容子が退職した。

1997年11月より当研究室は科学技術振興機構(JST)による戦略的創造研究推進事業(CREST)「脳を守る(1997~2002年度)」・「生物の発生・分化・再生(2002年度~)」の支援を受けている。本年度は研究員として高橋秀尚,西山正章(大学院より新規雇用),技術員として小山田浩二(継続),研究補助員として矢田(旧姓安河内)亮子(継続),篠原都子(継続),光安理恵(継続),倉光美恵(継続),東芳(新規,一時雇用職員として木村美保子(継続),西村直子(継続),吉村祐子(新規),事務員として太田茜(継続)をJST派遣職員として受け入れている。

A. G1期におけるp27のユビキチン化を司る新規酵素KPCの構造機能連関解析

われわれは昨年度世界で初めてp27のG1期における細胞質内分解に関わる責任分子であるKPC

を同定した。今年度は KPC を構成する分子である KPC1 および KPC2 の機能解析を行った。一次構造より KPC1 は RING フィンガードメインを持つ触媒サブユニット、KPC2 は UBL ドメインと UBA ドメインを有する調節サブユニットであることが推測された。KPC1 と KPC2 は複合体を形成し、p27 をユビキチン化することができる。KPC1 の RING フィンガードメインを欠損した変異体はこのユビキチン化を起こすことができないことから、この RING フィンガードメインが p27 のユビキチン化に必須であることが証明された。KPC1 と KPC2 は共に細胞質に共発現しており、KPC1 と KPC2 を細胞に過剰発現させると p27 の G0-G1 移行期における分解が促進されること、逆に KPC1 の変異体(酵素活性を持たないもの)と KPC2 を過剰発現させると、その分解が遅延することなどから、KPC が細胞質に輸送されてきた p27 をユビキチン化して分解していることが示唆された。そのことを最終的に証明するため、核外輸送阻害剤である Leptomycin B で細胞を処理すると、KPC の効果は完全に消失することがわかり、KPC の働きは核外輸送された p27 をユビキチン化することであることが明らかとなった。このことは、細胞周期のブレーキである p27Kip1 の分解は、核外輸送とそれに引き続くユビキチン依存性分解という機構で行われており、これは生物が速やかに細胞周期ブレーキを不活性化するための戦略であると考えられる。

さらに KPC1 と KPC2 の機能解析を行うため、各々の分子が含むドメイン構造を欠失する変異体を多数作製し、その機能的差異を調べた。KPC1 は SPRY ドメインを含む N 末端側で KPC2 及び p27 と結合し、C 末端側の RING フィンガードメインで E2 と相互作用することが示された。p27 はそのサイクリン・CDK 結合ドメイン付近において KPC1 と結合する。この所見と一致するように、p27・サイクリン・CDK 複合体には KPC1 は作用できない。つまり KPC1 は単体の p27 だけに結合しユビキチン化できると考えられる。一方、KPC2 は N 末端側の UBL ドメインで KPC1 と結合し、UBL ドメインと UBA_n ドメインを含む領域で 26S プロテアソームと結合することが判明した。さらに UBA_n ドメインと UBA_c ドメインでポリユビキチン鎖と結合することから、KPC2 はユビキチン化された p27 を 26S プロテアソームに効率よく運搬するためのシャトル分子である可能性が示唆された。KPC2 をノックダウンすると p27 の分解効率は低下することからも、この仮説は裏付けられた。

B. 新規ユビキチン化因子 E4B のマウスにおける機能解析

神経変性疾患における封入体を構成している物質は、ほとんどがユビキチン化されていることが知られている。そこでわれわれはその物質のユビキチン化機構の詳細を調べるために、それらの物質に特異的にユビキチン化を起こす酵素の精製及び遺伝子の単離同定を試みた。われわれはポリグルタミン病の一つである Machado-Joseph disease (MJD/SCA3) において、その原因遺伝子産物であり封入体の主成分である MJD1 (ataxin-3) が細胞内において強くユビキチン化される事実を見出した。病気の原因である MJD1 中のポリグルタミンの伸長は MJD1 の分解を強く抑制し、その安定性を著しく延長させる働きがあることが明らかとなった。われわれは MJD1 のユビキチン化反応を試験管内で再構築することに成功し、この反応系による MJD1 のユビキチン化能を活性の指標として、MJD1 のユビキチン化を引き起こす活性分画からユビキチン化因子を生化学的に精製することを試みた。ウサギ網状赤血球抽出液から種々のカラムクロマトグラフィー等を組み合わせて、ポリユビキチン化活性に必要な因子である E4B/UFD2a (酵母 Ufd2 の哺乳類ホモログ) を同定した。E4B は酵母 Cdc48 の哺乳類ホモログである VCP と結合し、VCP を介して MJD1 とも結合した。E4B は、E1-E2-E3 によって数個のユビキチンが付加された MJD1 に、さらに多数のユビキチンを付ける活性(ユビキチン鎖伸長活性=E4 活

性)があることが明らかとなった。E4Bはこの反応系の律速段階であり、E4Bの量とMJD1の分解速度はほぼ比例して変動することがわかった。驚くべきことにE4Bの量を増やしてやるだけで、細胞内で非常に安定な異常MJD1タンパク質の分解速度を正常MJD1の分解速度並に促進することが可能となった。実際に細胞内に過剰蓄積しているMJD1はE4Bによって消失することがわかった。逆にE4Bの機能を阻害するようなドミナントネガティブ型変異体による内在性E4Bの活性抑制は、MJD1による封入体形成を促進することがわかった。さらにショウジョウバエを用いた治療モデルを確立することを試みた。まずハエの網膜に変異型MJD1を発現して神経変性を起こさせたMJD1トランスジェニックハエとマウスE4Bを網膜に発現させたE4Bトランスジェニックハエを作製した。MJD1トランスジェニックハエでは網膜神経細胞の変性によって複眼表面の規則的な配列が強く乱れる表現型を示すのに対し、MJD1/E4Bダブルトランスジェニックハエでは複眼表面の異常は消失し、病的ポリグルタミンタンパク質の分解が亢進した結果、神経変性が抑制されていることが示された。これらの結果は、E4Bがataxin-3の分解機構において極めて重要な役割を果たしていることを示唆しており、E4Bの過剰発現によるポリグルタミン病の遺伝子治療の可能性が提唱された。さらに、E4Bの生物学的機能を探索するために、E4Bノックアウトマウスを作製し解析を行った。E4Bノックアウトマウスは胎生致死であり、心臓において顕著なアポトーシスが観測された。E4Bノックアウトマウス由来の線維芽細胞抽出液においてはUFD基質のポリユビキチン化が消失していた。さらに、E4B(+/-)マウスは薄束における軸索障害およびPurkinje細胞の変性を認め、ERストレスの上昇を認めた。運動失調(歩行障害)を示した。以上の結果よりE4Bが心臓発生や脊髄小脳神経を変性から防御するために極めて重要な分子であることが明らかとなった。

C. ユビキチンプロテオミクスの確立と応用

タンパク質のユビキチン化はタンパク質のリジン残基に小さなタンパク質であるユビキチンが付加されるタンパク質の翻訳後修飾である。タンパク質のユビキチン化は複数の酵素群によってなされることが知られている。ユビキチンのC末端のグリシンはATPとユビキチン活性化酵素(E1)作用によってアデニル化されE1のシステイン残基と高エネルギー結合を形成する。さらに、この活性型ユビキチンはユビキチン結合酵素(E2)のシステイン残基に転移する。最終的にユビキチンリガーゼ(E3)を介して標的タンパク質のリジン残基にユビキチンはイソペプチド結合を介して共有結合する。この反応が繰り返されることでポリユビキチン鎖が形成され、これがプロテアソームによって認識され分解される。近年、シグナル伝達分子や細胞周期関連分子などユビキチン化を介して分解される分子が数多く報告され、実に多くのタンパク質がユビキチン介在性のタンパク質分解によって量的制御を受けていることが明らかとなった。さらに、タンパク質のユビキチン化がタンパク質分解シグナル以外の機能を有することも示されており、リン酸化とならんで重要なタンパク質の翻訳後修飾の一つとして注目されている。E3が基質認識において中心的な役割を担っていることから、われわれはこれまで数多くのE3分子のノックアウトマウスの作製を行ってきた。これらのノックアウトマウスにおいてどのような分子のユビキチン化が欠失しているか知るためにはユビキチン化タンパク質の網羅的解析法の確立が必須である。そこで、われわれは抗ユビキチン抗体を用いた精製法によるユビキチン化タンパク質の特異的精製を試みている。ユビキチンは細胞内で量的に多いタンパク質であり、そのほとんどが遊離の状態(基質に結合していない)で存在しているため、通常の抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うと、主に遊離ユビキチンが回収される。そこで、われわれは抗ユビキチンモノクローナル抗体であるFK2

が基質と共有結合したユビキチンを選択的に認識できることに着目し、FK2-カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによるユビキチン化タンパク質の濃縮を行った。本方法は非変性および変性条件下の二つの異なる条件下でユビキチン化タンパク質のアフィニティー精製を行うことが可能である。非変性条件下ではユビキチン化タンパク質に加えてユビキチン結合タンパク質も精製される。一方、変性条件下ではユビキチン結合タンパク質はほとんど回収されず、主にユビキチン化タンパク質が回収されると考えられる。濃縮されたタンパク質を酵素消化後、ESI-MS/MS 解析を行ったところ、ユビキチン関連プロテオーム(Urp)に関しては通常条件下(Urp-N:ユビキチン化タンパク質及びその結合タンパク質)で 330 種類、変性条件下(Urp-D:ユビキチン化タンパク質のみ)で 350 種類のタンパク質を同定した。Urp-N と Urp-D の間にはそのスペクトルに明らかな違いが認められた。前者はユビキチン・プロテアソーム系の分子群を多く含み、後者は翻訳系の分子や RNA 結合分子などが多く検出された。さらに、いくつかの基質分子に関してはMS/MS スペクトルからユビキチン化部位の同定が可能であった。この方法を用いて膜局在型タンパク質の中でユビキチン化を受けているものを網羅的に同定することに成功した。これらのタンパク質翻訳後修飾の網羅的解析は、従来のタンパク質の同定よりも遙かに複雑で膨大な情報量を含んでおり、今後益々重要な生物学的情報を提供するようになると思われる。

D. 人工ユビキチンリガーゼを用いた癌治療の研究

多くの癌細胞において癌遺伝子産物の発現増加、もしくは癌抑制遺伝子産物の発現低下が認められる。ある種の腫瘍細胞において癌遺伝子 c-Myc 遺伝子の増幅が起こり、その発現量の増加が認められ、それが癌化に関与していることが明らかにされている。われわれは c-Myc に結合できる分子 Max とタンパク質分解酵素関連分子を人工的に融合させ、c-Myc の分解を促進させる方法を考案した。そこで Max とユビキチンリガーゼである U-ボックスタンパク質のキメラ分子(Max-U)を作製し、c-Myc がMax-Uによってユビキチン化を受け、プロテアソームによって分解される系を構築した。実際に、試験管内において Max-U は c-Myc に結合し、そのユビキチン化を引き起こすことができた。さらに細胞内において Max-U を発現させた場合に、c-Myc による足場非依存的な増殖やヌードマウスにおける腫瘍形成能が有意に阻害される結果を得た。この系が実際に有効な手段であることが判明すれば、細胞において不利なタンパク質(癌遺伝子産物や神経変性疾患関連タンパク質など)に対して特異的な分解を遂行する細胞内発現量調節の手段として臨床医学上重要な遺伝子治療につながる可能性がある。

業績目録

原著論文

1. He, C. H., Waxman, A. B., Lee, C. G., Link, H., Rabach, M. E., Ma, B., Chen, Q., Zhu, Z., Zhong, M., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Homer, R., Elias, J. A. 2005.
Bcl-2-related protein A1 is an endogenous and cytokine-stimulated mediator of cytoprotection in hyperoxic acute lung injury.
J. Clin. Invest. 115, 1039-1048.

2. Jackson, D., Zheng, Y., Lyo, D., Shen, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Humphries, M. J., Reyland, M. E., Foster, D. A. 2005.
Suppression of cell migration by protein kinase C δ .
Oncogene 24, 3067-3072.
3. Kotoshiba, S., Kamura, T., Hara, T., Ishida, N., Nakayama, K. I. 2005.
Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase.
J. Biol. Chem. 280, 17694-17700.
4. Kase, S., Yoshida, K., Ikeda, H., Harada, T., Harada, C., Imaki, J., Ohgami, K., Shiratori, K., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Ohno, S. 2005.
Disappearance of p27^{KIP1} and increase in proliferation of the lens cells after extraction of most of the fiber cells of the lens.
Curr. Eye Res. 30, 437-442.
5. Jiang, H., Chang, F. C., Ross, A. E., Lee, J., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Desiderio, S. 2005.
Ubiquitylation of RAG-2 by Skp2-SCF links destruction of the V(D)J recombinase to the cell cycle.
Mol. Cell 18, 699-709.
6. Pushkarsky, T., Yurchenko, V., Vanpouille, C., Brichacek, B., Vaisman, I., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Sherry, B., Bukrinsky, M. I. 2005.
Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60.
J. Biol. Chem. 280, 27866-27871.
7. Wang, H. Q., Nakaya, Y., Du, Z., Yamane, T., Shirane, M., Kudo, T., Takeda, M., Takebayashi, K., Noda, Y., Nakayama, K. I., Nishimura, M. 2005.
Interaction of presenilins with FKBP38 promotes apoptosis by reducing mitochondrial Bcl-2.
Hum. Mol. Genet. 14, 1889-1902.
8. Kase, S., Yoshida, K., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Ikeda, H., Harada, T., Harada, C., Ohgami, K., Shiratori, K., Ohno, S. 2005.
Phosphorylation of p27^{KIP1} in the developing retina and retinoblastoma.
Int. J. Mol. Med. 16, 257-262.
9. Chen, Z., Foster, M. W., Zhang, J., Mao, L., Rockman, H. A., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K. I., Hess, D. T., Stamler, J. S. 2005.
An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 12159-12164.
10. Hatakeyama, S., Watanabe, M., Fujii, Y., Nakayama, K. I. 2005.
Targeted destruction of c-Myc by an engineered ubiquitin ligase suppresses cell transformation and tumor formation.
Cancer Res. 65, 7874-7879.
11. Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K. I., Kikuchi, A. 2005.
Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination.

- Mol. Cell. Biol. 25, 9063-9072.
12. Hara, T., Kamura, T., Kotoshiba, S., Takahashi, H., Fujiwara, K., Onoyama, I., Shirakawa, M., Mizushima, N., Nakayama, K. I. 2005.
Role of the UBL-UBA protein KPC2 in degradation of p27 at G1 phase of the cell cycle.
Mol. Cell. Biol. 25, 9292-9303.
 13. Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T., Nakayama, K. I. 2005.
Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome.
Proteomics 5, 4145-4151.
 14. Kaneko-Oshikawa, C., Nakagawa, T., Yamada, M., Yoshikawa, H., Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nakayama, K. I. 2005.
Mammalian E4 is required for cardiac development and maintenance of the nervous system.
Mol. Cell. Biol. 25, 10953-10964.
 15. Yogosawa, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Miyoshi, H., Kohsaka, S., Akazawa, C. 2005.
Ubiquitylation and degradation of serum-inducible kinase by hVPS18, a RING-H2 type ubiquitin ligase.
J. Biol. Chem. 280, 41619-41627.
 16. Nishitani, H., Sugimoto, N., Roukos, V., Nakanishi, Y., Saijo, M., Obuse, C., Tsurimoto, T., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Fujita, M., Lygerou, Z., Nishimoto, T. 2006.
Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis.
EMBO J. 25, 1126-1136.
 17. Kase, S., Yoshida, K., Ohgami, K., Shiratori, K., Suzuki, Y., Nakayama, K. I., Ohno, S. 2006.
Expression of cdc2 and p27^{KIP1} phosphorylation in mitotic cells of the human retinoblastoma.
Int. J. Mol. Med. 17, 465-468.
 18. Iwanaga, R., Komori, H., Ishida, S., Okamura, N., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Ohtani, K. 2006.
Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners.
Oncogene 25, 1786-1798.
 19. Kase, S., Yoshida, K., Harada, T., Harada, C., Namekata, K., Suzuki, Y., Ohgami, K., Shiratori, K., Nakayama, K. I., Ohno, S. 2006.
Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and p27^{KIP1} after retinal detachment.
Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 244, 352-358.
 20. Sugihara, E., Kanai, M., Saito, S., Nitta, T., Toyoshima, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Fukasawa, K., Schwab, M., Saya, H., Miwa, M. 2006.
Suppression of centrosome amplification after DNA damage depends on p27 accumulation.
Cancer Res. 66, 4020-4029.
 21. Ryer, E. J., Hom, R. P., Sakakibara, K., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Faries, P. L., Liu, B., Kent, K. C. 2006.
PKC δ is necessary for Smad3 expression and transforming growth factor β -induced fibronectin synthesis in vascular smooth muscle cells.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26, 780-786.
 22. Humphries, M. J., Limesand, K. H., Schneider, J. C., Nakayama, K. I., Anderson, S. M., Reyland, M. E. 2006.
Suppression of apoptosis in the protein kinase C δ null mouse in vivo.

- J. Biol. Chem. 281, 9728-9737.
23. Kase, S., Yoshida, K., Ohgami, K., Shiratori, K., Ohno, S., Nakayama, K. I. 2006.
Phosphorylation of p27^{KIP1} in the mitotic cells of the corneal epithelium.
Curr. Eye Res. 31, 307-312.
 24. Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Khochbin, S., Solary, E., Garrido, C. 2006.
HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27^{KIP1} and helps S-phase re-entry in stressed cells.
FASEB J.
 25. Yoshida, K., Yamaguchi, T., Shinagawa, H., Taira, N., Nakayama, K. I., Miki, Y. 2006.
Protein kinase C δ activates topoisomerase II α to induce apoptotic cell death in response to DNA damage.
Mol. Cell. Biol. 26, 3414-3431.
 26. Niki, S., Oshikawa, K., Mouri, Y., Hirota, F., Matsushima, A., Yano, M., Han, H., Bando, Y., Izumi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kuroda, N., Matsumoto, M. 2006.
Alteration of intra-pancreatic target-organ specificity by abrogation of Aire in NOD mice.
J. Clin. Invest. 116, 1292-1301.
 27. Fotovati, A., Nakayama, K., Nakayama, K. I. 2006.
Impaired germ cell development due to compromised cell cycle progression in Skp2-deficient mice.
Cell Div. in press.,
 28. Fujii, Y., Yada, M., Nishiyama, M., Kamura, T., Takahashi, H., Tsunematsu, R., Susaki, E., Nakagawa, T., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. 2006.
Fbxw7 contributes to tumor suppression by targeting multiple proteins for ubiquitin-dependent degradation.
Cancer Sci. in press.,
 29. Shimazu, T., Komatsu, Y., Nakayama, K. I., Fukazawa, H., Horinouchi, S., Yoshida, M. 2006.
Regulation of SV40 large T antigen stability by reversible acetylation.
Oncogene in press.,

総説

1. Nakayama, K. I., Nakayama, K. 2005.
Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases.
Semin. Cell Dev. Biol. 16, 323-333.
2. Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. 2005.
Mapping of ubiquitination sites on target proteins.
Methods Enzymol. 399, 277-286.
3. Nakayama, K. I., Nakayama, K. 2006.
Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer.
Nature Rev. Cancer 6, 369-381.
4. 中山敬一. 2005.
細胞増殖: 生命の本質に迫る! .
学術月報「特集: 日本学術振興会賞と研究者養成」 58, 385-386.

5. 中山敬一. 2005.
G0 期—細胞周期研究における最後のブラックボックス.
実験医学(増刊)「細胞周期の最前線—明らかになるその制御機構」 23, 1282-1286.
6. 洲崎悦生, 中山敬一. 2005.
Rb, サイクリン C-CDK3 と E2F6—G0-G1 移行期における分子メカニズムの新展開.
実験医学(増刊)「細胞周期の最前線—明らかになるその制御機構」 23, 1287-1292.
7. 中山啓子, 中山敬一. 2005.
p27 の分解は M 期の進行に必要である.
実験医学(増刊)「細胞周期の最前線—明らかになるその制御機構」 23, 1383-1388.
8. 事柴周平, 中山敬一. 2005.
細胞周期ブレーキ p27 の分解と癌.
日本臨床 63, 2047-2056.
9. 松本雅記, 中山敬一. 2006.
抗体アフィニティーカラムを用いた翻訳後修飾タンパク質の網羅的解析～チロシンリン酸化とユビキチン化を中心に～.
バイオテクノロジージャーナル 6, 163-167.
10. 松本雅記, 中山敬一. 2006.
翻訳後修飾の網羅的解析: チロシンリン酸化プロテオーム解析によるシグナル伝達研究.
細胞工学 25, 602-607.

著書

1. 中山敬一. 2006.
細胞周期ブレーキ p27 の分解と発がん.
発がんの分子機構と防御 (笹月健彦・野田哲生 編, 東京大学出版会, 東京) 120-134.

学会発表

1. 中山敬一. (2005, 5/14).
細胞周期ブレーキ p27 の分解と癌. (招待講演)
京都大学大学院医学研究科21世紀 COE プログラム「病態解明を目指す基礎医学研究拠点(多重遺伝子変異による病態解明)」特任教官主催シンポジウム「がん研究の諸相と展望」, 京都.
2. 中山敬一. (2005, 5/22).
ユビキチン化による細胞周期の制御. (ランチョンセミナー)
日本生化学会九州支部例会, 福岡.
3. 中山敬一. (2005, 6/22).
細胞周期を制御するユビキチンリガーゼ群. (招待講演)
BD FACS New Technology セミナー, 東京.
4. Nakayama, K. I., Shirane, M. (2005, 6/29).
Protrudin-Rab11 system regulates directional membrane traffic to induce neurite formation. (Symposium)

International Symposium on "Membrane Dynamics and Cell Regulation", Fukuoka.

5. 中山敬一. (2005, 7/2).
新しいユビキチン化因子 E4 の機能 (シンポジウム)
第 5 回日本蛋白質科学会年会, 福岡.
6. 松本雅記, 畠山鎮次, 小山田浩二, 夏目徹, 中山敬一. (2005, 7/2).
チロシンリン酸化関連プロテオミクスによるシグナル伝達の体系的解析. (ワークショップ)
第 5 回日本蛋白質科学会年会, 福岡.
7. Shirane, M., Nakayama, K. I. (2005, 7/22).
Protrudin-Rab11 system regulates directional membrane traffic to induce neurite formation. (Symposium)
Shirokane International Symposium "System Genome Medicine ~Bench to Bedside", Tokyo.
8. 中山敬一, 松本雅記. (2005, 8/1).
タンパク質翻訳後修飾の網羅的解析. (シンポジウム)
日本プロテオーム機構第 3 回大会, 横浜.
9. 中山敬一. (2005, 8/4).
E4 による神経変性の防御. (招待講演)
第 35 回新潟神経学夏期セミナー, 新潟.
10. 中山敬一, 松本雅記. (2005, 9/2).
翻訳後修飾プロテオミクスから見えてきた意外な新事実. (特別講演)
疾患プロテオミクス最前線, 熊本.
11. 中山敬一. (2005, 9/7).
タンパク質翻訳後修飾の網羅的解析. (招待講演)
日独ワークショップ臨床プロテオミクス: 方法と応用, 横浜.
12. 中山啓子, 中山敬一. (2005, 9/14).
細胞増殖の制御におけるユビキチン化の役割. (シンポジウム)
第 64 回日本癌学会学術総会, 札幌.
13. 杉原英志, 斎藤総一郎, 新田孝幸, 豊島秀男, 中山啓子, 中山敬一, 佐谷秀行, 三輪正直. (2005, 9/15).
p27 は DNA 損傷後の中心体過剰複製を抑制する. (ワークショップ)
第 64 回日本癌学会学術総会, 札幌.
14. 松本雅記, 畠山鎮次, 中山敬一. (2005, 9/15).
チロシンリン酸化プロテオミクスによるシグナル伝達ネットワークの体系的解析. (シンポジウム)
第 64 回日本癌学会学術総会, 札幌.
15. Tada, H., James Okano, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kashima, H., Okano, H. (2005, 9/29).
Kspot, a novel ubiquitin ligase, may control synapse formation.
第 48 回日本神経化学学会大会, 福岡.
16. Nakayama, K. I., Shirane, M. (2005, 9/30).
Protrudin induces process formation by promoting membrane transport. (シンポジウム)
第 48 回日本神経化学学会大会, 福岡.
17. 西山正章, 中山敬一. (2005, 10/4).

- Duplin は p53 を介してアポトーシスを抑制する新規癌遺伝子である。
「生物の発生・分化・再生」第4回公開シンポジウム, 東京.
18. 小野山一郎, 恒松良祐, 嘉村巧, 中山啓子, 中山敬一. (2005, 10/4).
Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスにおける増殖分化異常と発癌.
「生物の発生・分化・再生」第4回公開シンポジウム, 東京.
 19. 恒松良祐, 中山敬一. (2005, 10/4).
胎盤形成に重要な F-box タンパク質 Fbw8.
「生物の発生・分化・再生」第4回公開シンポジウム, 東京.
 20. 中山啓子, 中山敬一. (2005, 10/4).
F-box タンパク質 Fbw1a と Fbw1b の発生分化における役割.
「生物の発生・分化・再生」第4回公開シンポジウム, 東京.
 21. 原賢太郎, 中山敬一, 中山啓子. (2005, 10/4).
マウス Geminin の欠損が初期発生に及ぼす効果の解析.
「生物の発生・分化・再生」第4回公開シンポジウム, 東京.
 22. 中山敬一. (2005, 10/5).
細胞分化と細胞周期制御. (シンポジウム)
「生物の発生・分化・再生」第4回公開シンポジウム, 東京.
 23. 中山敬一. (2005, 10/7).
神経変性を抑制する新規ユビキチン化酵素 E4. (招待講演)
第9回お茶の水 Brain Science Seminar, 東京.
 24. 中山敬一, 小野山一郎, 中山啓子. (2005, 10/20).
Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスにおける細胞周期の促進と腫瘍発生. (シンポジウム)
第78回日本生化学会大会, 神戸.
 25. 白根道子, 中山敬一. (2005, 10/20).
膜輸送分子 protrudin による神経突起伸長の分子機構. (ミニシンポジウム)
第78回日本生化学会大会, 神戸.
 26. 藤田英明, 石川大輔, 松本雅記, 畠山鎮次, 中山敬一, 吉森保, 横田貞記, 石堂一己, 姫野勝, 田中嘉孝. (2005, 10/21).
動物細胞クラス E Vps コンパートメントのプロテオミクス解析によるユビキチン化により輸送制御を受ける膜蛋白質の同定.
第78回日本生化学会大会, 神戸.
 27. 中山敬一, 松本雅記. (2005, 11/24).
翻訳後修飾プロテオミクスから見えてきた意外な新事実. (招待講演)
統合脳プロテオミクス教育研究講演会, 岡崎.
 28. 小野山一郎, 恒松良祐, 嘉村巧, 中山啓子, 中山敬一. (2005, 12/7).
Fbxw7 コンディショナルノックアウトマウスにおける増殖分化異常と発がん. (ワークショップ)
第28回日本分子生物学会年会, 福岡.
 29. 安達(玉盛)三美, 高木弘光, 橋本公男, 小清水右一, 中山敬一, 北嶋繁孝. (2005, 12/7).
サイクリン D1 核移行/p27 分解による心筋 in situ 再生と心不全予防の解析. (ワークショップ)

- 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
30. 中山敬一, 小野山一郎, 恒松良祐, 嘉村巧, 中山啓子. (2005, 12/7).
細胞周期と分化:F-box タンパク質による分化特異的な増殖制御機構. (シンポジウム)
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 31. 広瀬哲史, 中山敬一, 谷内一郎. (2005, 12/7).
CAF-1 の生体での機能
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 32. 恒松良祐, 中山敬一. (2005, 12/7).
胎盤形成に重要な F-box タンパク質 Fbxw8.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 33. 鈴木小由里, 深澤洋敬, 北川恭子, 戸川証, 大橋温, 小田敏明, 内田千晴, 服部隆行, 中山敬一,
山本龍夫, 菱田明, 北川雅敏. (2005, 12/7).
腎障害進行における Skp2 発現亢進の解析: Skp2KO マウスを用いた検討.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 34. 洲崎悦生, 中山敬一. (2005, 12/7).
サイクリン D2 による p27 の核外エスコートと分解促進
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 35. 杉原英志, 齋藤総一郎, 豊島秀男, 中山啓子, 中山敬一, 佐谷秀行, 三輪正直. (2005, 12/7).
p27 は DNA ダメージ後の中心体数異常を抑制する.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 36. 石川善則, 小野山一郎, 中山敬一, 中山啓子. (2005, 12/7).
ユビキチンリガーゼ Fbw7 による CDK インヒビター発現制御.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 37. 原賢太郎, 中山敬一, 中山啓子. (2005, 12/7).
Geminin は着床前初期発生に必須である.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 38. 楠康一, 鈴木忠樹, 牧野吉倫, 渡部琢哉, 田中伸哉, 畠山鎮次, 中山啓子, 中山敬一, 澤洋文.
(2005, 12/7).
転写因子 OLIG2 による神経膠芽腫細胞の運動能抑制とそのメカニズムの解析.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 39. 藤井洋, 矢田雅佳, 中山敬一. (2005, 12/7).
Fbxw7 の異常と腫瘍形成 ~ 中心的な役割を果たすのは c-Myc か Cyclin E か ?
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 40. 木村太一, 田中伸哉, 澤洋文, 恒松良祐, 中山啓子, 畠山鎮次, 中山敬一, 長嶋和郎. (2005,
12/7).
ヒト滑膜肉腫関連癌原遺伝子 SYT 欠損マウスは発生初期に死亡する.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
 41. 高橋秀尚, 松本雅記, 佐藤学道, 畠山鎮次, 中山敬一. (2005, 12/8).
T 細胞, B 細胞受容体刺激によって引き起こされる翻訳因子 eIF3 複合体のチロシンリン酸化の解

- 析.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
42. 西山正章, 菊池章, 中山敬一. (2005, 12/8).
Duplin は p53 を介してアポトーシスを抑制する新規癌遺伝子である.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
43. 嘉村巧, 中山敬一. (2005, 12/9).
Cullin-Rbx 型 E3 によるタンパク質分解機構. (シンポジウム)
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
44. 白根道子, 中山敬一. (2005, 12/9).
Protrudin による神経突起伸長は Rab および MAPK によって制御されている. (ワークショップ)
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
45. 中川直, 白根道子, 中山敬一. (2005, 12/9).
FKBP38 によるプロテアソームのミトコンドリア局在化とミトコンドリア関連分解(MTAD)の促進. (ワークショップ)
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
46. 事柴周平, 原太一, 嘉村巧, 藤原健一郎, 白川昌宏, 中山敬一. (2005, 12/10).
G1 期での p27 分解における UBL-UBA タンパク質 KPC2 の役割. (ワークショップ)
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
47. 中山敬一. (2006, 2/6).
細胞増殖と分化の接点: その破綻としてがんをとらえる. (シンポジウム)
第 3 次対がん 10 ヶ年総合戦略・第 1 回合同シンポジウム「がんの罹患率と死亡率の激減を目指して」, 東京.
48. 中山敬一. (2006, 2/17).
ユビキチンリガーゼによる分化特異的な細胞増殖制御機構と発がん. (ワークショップ)
「遺伝情報システム異常と発がん」合同ワークショップ, 東京.
49. Kamura, T., Nakayama, K. I. (2006, 3/8).
Identification of a ubiquitin ligase, KPC, that recognizes proteolysis of p27Kip1 at the G0-G1 transition.
(Workshop)
Cell Regulations in Division and Arrest Workshop, Okinawa.
50. Nakayama, K. I. (2006, 3/8).
Fbw7 is a key regulator of the G0-G1 transition and tumorigenesis during development. (Workshop)
Cell Regulations in Division and Arrest Workshop, Okinawa.
51. Nakayama, K., Hara, K., Nakayama, K. I. (2006, 3/8).
Geminin is essential for development of preimplantation embryos.
Cell Regulations in Division and Arrest Workshop, Okinawa.
52. Susaki, E., Nakayama, K. I. (2006, 3/8).
Cyclin D2 escorts p27 to cytoplasm and promotes its degradation at the G0-G1 transition.
Cell Regulations in Division and Arrest Workshop, Okinawa.
53. 中山敬一. (2006, 3/10).

ユビキチン化と細胞周期. (招待講演)

第 3 回日本癌学会カンファレンス「動物モデルによる新時代のがん研究－発症機構から治療まで」, 茅野.

54. 西山正章, 中山敬一. (2006, 3/10).

クロマチンリモデリング因子 CHD8 は p53 依存的なアポトーシスを抑制する新規がん遺伝子である. (招待講演)

第 3 回日本癌学会カンファレンス「動物モデルによる新時代のがん研究－発症機構から治療まで」, 茅野.

55. 中山敬一, 松本雅記. (2006, 4/24).

タンパク質翻訳後修飾のプロテオミクス:リン酸化とユビキチン化の網羅的解析. (シンポジウム)

第 6 回日本蛋白質科学会, 京都.

56. Hara, K., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2006, 5/18).

Geminin is essential for development of preimplantation embryos.

Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle", Cold Spring Harbor, NY.

57. Onoyama, I., Tsunematsu, R., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2006, 5/19).

Fbw7 is a key regulator of cell-cycle arrest and tumorigenesis during development.

Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle", Cold Spring Harbor, NY.

58. Susaki, E., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2006, 5/19).

p27 can substitute for p57 in mouse development.

Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle", Cold Spring Harbor, NY.

増殖分化制御学分野

Division of Biochemistry and Molecular Biology

細胞は様々な外的刺激に対して多様な応答を示すが、情報の多様性に対し、伝達機構を構成する蛋白質は、分子構造から見ると基本的な幾つかのモジュール構造からなっていることが明らかになりつつある。この基本構造を介した分子間相互作用が、蛋白質上で統合されることで情報伝達機構の複雑な制御を可能にしていると考えられる。

このような観点から、増殖分化制御学分野では、細胞内情報伝達機構解明の良いモデルとして、食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化機構の研究を生化学的・分子生物学的・細胞生物学的手法を用いて行うとともに、構造生物学研究を構造生物学者とのコラボレーションにより進めている。更には、特に蛋白質のドメイン構造とその分子間相互作用の視点から、細胞の極性形成や細胞骨格の制御といった方面の細胞内情報伝達の研究にも取り組んでいる。

武谷 立 助手が、「活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ (Nox) の新規調節蛋白質 Noxo1 及び Noxa1 の発見とその作用機構の解明」という業績により、2005 年日本生体防御学会奨励賞を受賞した。

A. 食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化の分子機構

食細胞 NADPH オキシダーゼは、病原性微生物の貪食時などにスーパーオキシド (高殺菌能をもつ種々の活性酸素の前駆物質) を生成する酵素系である。その酵素本体は細胞膜に存在する gp91^{phox} であり、同様に膜蛋白質である p22^{phox} と複合体を形成している (このヘテロダイマーはシトクロム b₅₅₈ と呼ばれている)。gp91^{phox} は細胞休止時には不活性化型であり、その活性化には、特異的アダプター蛋白質 (p47^{phox}, p67^{phox} と p40^{phox}; それぞれ SH3 ドメインをもつ) と低分子量 G 蛋白質 Rac が刺激依存性に細胞質から細胞膜に移行してシトクロム b₅₅₈ と相互作用する必要がある。私達はこの系に関してアダプター蛋白質による活性化機構を中心に研究を行ない、2005 年は以下のような成果を得ている。

シトクロム b₅₅₈ と細胞質因子の相互作用は、p47^{phox} の SH3 ドメインと p22^{phox} の C-末細胞質領域の proline-rich region (PRR) との結合に依存し、この結合は gp91^{phox} 活性化の ON/OFF を担う。この結合において、p47^{phox} の 2 つの SH3 ドメインは p22^{phox} の 1 つの PRR を挟み込むように認識すること、この認識様式がオキシダーゼ活性化に必須であることを、私達は示した [Nobuhisa *et al.*, 2006]。また、この p47^{phox}-SH3 と p22^{phox}-C 末ペプチドとの複合体の立体構造を、稲垣教授 (北大・院薬) との共同研究により NMR 法を用いて決定した [Ogura *et al.*, 2006]。更に、この構造解析によって見いだされた「p22^{phox} の PRR の C 末にある α -ヘリックス領域」がオキシダーゼ活性化を増強する役割を持つことを明らかにした [Nobuhisa *et al.*, 2006]。私達は以前、p47^{phox} の C 末領域が p67^{phox} との結合に必要であることを示していたが、この結合が gp91^{phox} 活性化に必須であること、p47^{phox} C 末領域の Ser-379 のリン酸化が p47^{phox}-p67^{phox} 結合を阻害することで gp91^{phox} 活性化を負に調節することを明らかにした [Mizuki *et al.*, 2005]。p47^{phox} の SH3 ドメインよりも更に N 末に存在する 3 つのアミノ酸残基は、p22^{phox} との結合や p47^{phox} の膜移行には必要ではないが、gp91^{phox} の活性化には必須であることを明らかにした [投稿中]。食細胞が微生物などを貪食した時に形成される食胞 (ファゴソーム) への細胞質因子の集積が、p40^{phox} の脂質結合能により調節されていることを示した。

B. 新規 NAD(P)H オキシダーゼの活性制御機構

gp91^{nox1}は、N末の6つの膜貫通領域(ヘム結合部位を含む)と、C末のFAD結合ドメイン及びNADPH結合ドメインからなる。現在、ヒトでは、私達が新規にクローニングしたNox4を含め5つのgp91^{nox}ホモログが存在することが知られており、Nox (NA(D)PHオキシダーゼ)ファミリーと呼ばれている。2005年は、Nox1の活性化において、Noxo1(新規p47^{nox}ホモログ)とp22^{nox}との結合、およびNoxo1とNoxa1(新規p67^{nox}ホモログ)の結合が共に必要であることを示した。更に、Nox1の活性化にRacが直接関与すること、RacはNoxa1の活性型への構造変化を促進することで働くことを明らかにした [Miyano *et al.*, 2006]。Nox3は、p22^{nox}とヘテロダイマーを形成して恒常的にスーパーオキシドを生成すること、その活性はp22^{nox}を介して働くp47^{nox}やNoxo1,あるいはp67^{nox}によって促進されることを明らかにした [Ueno *et al.*, 2005]。Nox4は、ヒト血管内皮細胞の主たるNoxであるが、p22^{nox}と複合体を形成して内皮細胞の核に存在すること、転写制御に関与するらしいこと等を示した [Kuroda *et al.*, 2005]。

C. 細胞極性決定の分子機構

私達は、線虫の極性決定に関与する蛋白質 Par6 のヒトホモログ3種をクローニングし、ヒト Par6 が GTP 結合型の Rac/Cdc42 および atypical PKC (aPKC) と結合できることを示していた。更に、Par6 と aPKC の結合は、私達が見出した新規な蛋白質間相互作用「PB1-PB1 相互作用」によるものであること等を明らかにしていたが、2005年は、稲垣冬彦教授(北大薬)との共同研究により、aPKC の1つである PKC ζ の PB1 ドメインと Par6 の PB1 ドメインとの複合体の構造を解くことに成功するとともに、この結合が上皮細胞の極性決定に必要であることを明らかにした [Hirano *et al.*, 2005]。また、aPKC に結合する蛋白質として Par3 が知られていたが(従って Par3-Par6-aPKC 3者複合体が形成されることになる)、私達は Par3 の新規ホモログをクローニングし (Par3 と命名)、Par3 が tight junction に局在すること等を見出ししていた。2005年は、Par3 と Par3 の両者が、リン酸化依存性に 14-3-3 蛋白質 (, , 等の分子種) に結合することを明らかにし、この結合は Par3-Par6-aPKC 3者複合体の形成を阻害しないことを示した [Izaki *et al.*, 2005]。また、ショウジョウバエの極性蛋白質 Inscuteable (Insc) のヒトホモログを同定・クローニングした。ヒト Insc は、アミノ酸配列上はショウジョウバエ Insc と極めて弱い相同性しか示さないが、ヒト Par3 およびヒト LGN (あるいは LGN の paralogue であるヒト AGS3) と結合して 3者複合体を形成することを見出した [Izaki *et al.*, 2006]。現在、ヒト Insc の機能解析を進めているところである。

D. formin 関連蛋白質 Fhos の機能解析

好中球の食作用は、遊走、捕食そして殺菌という一連の過程からなる複雑な細胞現象であり、各過程は細胞骨格のダイナミックな再構築を通じて密接に関連しているが、その関連機構には不明な点が多い。formin 相同蛋白質は、Rho ファミリー GTP 結合蛋白質の下流でアクチン分子の核化・重合を促進すると同時に、微小管細胞骨格との連携にも関わり、細胞骨格の統合的制御に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。私達は、脾臓及び血球系細胞で高発現している formin 相同蛋白質 Fhos1 をクローニングし、その細胞骨格制御機構を中心に研究を進めてきている。2005年は、私達が新たに単離した Fhos1 相同新規蛋白質 Fhos2 の生化学的・生物学的特徴を明らかにした [Kanaya *et al.*, 2005]。Fhos2 には、2つの組織特異的なスプライスバリエント Fhos2L と Fhos2S が存在し、前者は心臓に後者

は腎臓と脳に主に発現していた。Fhos2 は、Fhos1と同様に活性化型でアクチン細胞骨格の再構成を誘導することができた。さらに、Fhos2 はアクチン微小繊維を制御するだけでなく、中間径フィラメントである nestin とも相互作用するようである。このことは、Fhos2 によるアクチン細胞骨格と中間径フィラメントとの統合的制御という新たな役割を示唆した[Kanaya *et al.*, 2005]。また、Fhos 活性化の分子機構の解明に取り組んでいる。これまでにFhos1 は分子内結合により、そのアクチン重合活性が負に制御されていることを明らかにしているが、その自己阻害的分子内結合を外す刺激は不明である。現在、細胞内での Fhos 活性化機構に関して精力的に解析を進めている。

業績目録

原著論文

1. Ueno, N., Takeya, R., Miyano, K., Kikuchi, H., and Sumimoto, H. 2005.
The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22^{phox}- dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators.
J. Biol. Chem. 280, 23328–23339.
2. Hirano, Y., Yoshinaga, S., Takeya, R., Suzuki, N. N., Horiuchi, M., Kohjima, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2005.
Structure of a cell polarity regulator, a complex between aPKC and Par6 PB1 domains.
J. Biol. Chem. 280, 9653–9661.
3. Kawahara, T., Kohjima, M., Kuwano, Y., Mino, H., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Tsunawaki, S., Wada, A., Sumimoto, H., and Rokutan, K. 2005.
Helicobacter pylori lipopolysaccharide activates Rac1 and transcription of NADPH oxidase Nox1 and its organizer Nox1 in guinea pig gastric mucosal cells.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 288, C450–C457.
4. Takamatsu, H., Takeya, R., Naito, S., and Sumimoto, H. 2005.
On the mechanism of cell lysis by deformation.
J. Biomech. 38, 117–124.
5. Tsubouchi, H., Inoguchi, T., Inuo, M., Kakimoto, M., Sonta, T., Sonoda, N., Sasaki, S., Kobayashi, K., Sumimoto, H., and Nawata, H. 2005.
Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic β -cell line, MIN6: a role of NAD(P)H oxidase in β -cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 326, 60–65.
6. Izaki, T., Kamakura, S., Kohjima, M., and Sumimoto, H. 2005.
Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to Par3 β , a human Par3- related cell polarity protein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 329, 212–219.
7. Kanaya, H., Takeya, R., Takeuchi, K., Watanabe, N., Jing, N., and Sumimoto, H. 2005.
Fhos2, a novel formin-related actin-organizing protein, probably associates with the nestin intermediate filament.

- Genes Cells* 10, 665–678.
8. Tsubouchi, H., Inoguchi, T., Sonta, T., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., Utsumi, H., and Nawata, H. 2005.
Statin attenuates high glucose-induced and diabetes-induced oxidative stress *in vivo* and *in vitro* evaluated by electron spin resonance measurement.
Free Radic. Biol. Med. 39, 444–452.
 9. Fujii, T., Onohara, N., Maruyama, Y., Tanabe, S., Kobayashi, H., Fukutomi, M., Nagamatsu, Y., Nishihara, N., Inoue, R., Sumimoto, H., Shibasaki, F., Nagao, T., Nishida, M., and Kurose, H. 2005.
G_{α12/13}-mediated production of reactive oxygen species is critical for angiotensin receptor-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts.
J. Biol. Chem. 280, 23041–23047.
 10. Murakami, M., Masuda, S., Ueda-Semmyo, K., Yoda, E., Kuwata, H., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Sumimoto, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakatani, Y., and Kudo, I. 2005.
Group VIB Ca²⁺-independent phospholipase A₂γ promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A₂.
J. Biol. Chem. 280, 14028–14041.
 11. Nakayama, M., Inoguchi, T., Sonta, T., Maeda, Y., Sasaki, S., Sawada, F., Tsubouchi, H., Sonoda, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., and Nawata, H. 2005.
Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of type II diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 332, 1153–1159.
 12. Ueyama, T., Eto, M., Kami, K., Tatsuno, T., Kobayashi, T., Shirai, Y., Lennartz, M. R., Takeya, R., Sumimoto, H., and Saito, N. 2005.
Isoform-specific membrane targeting mechanism of Rac during FcγR mediated phagocytosis: positive charge-dependent and independent targeting mechanism of Rac to the phagosome.
J. Immunol. 175, 2381–2390.
 13. Yoshida, S., Ogura, K., Yokochi, M., Yuzawa, S., Horiuchi, M., Morioka, H., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2005.
¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the backbone and methyl groups of the 24 kDa tetratricopeptide repeat domain in p67^{phox}.
J. Biomol. NMR 32, 176.
 14. Tanabe, M., Rådmark, O., Watanabe, T., Shiose, A., and Sumimoto, H. 2005.
Cloning of rat p47^{phox} and comparison with human p47^{phox}.
DNA Seq. 16, 65–68.
 15. Kuroda, J., Nakagawa, K., Yamasaki, T., Nakamura, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Igarashi, K., Shibata, Y., Sueishi, K., and Sumimoto, H. 2005.
The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells.
Genes Cells 10, 1139–1151.
 16. Mizuki, K., Takeya, R., Kuribayashi, F., Nobuhisa, I., Kohda, D., Nunoi, H., Takeshige, K., and Sumimoto, H. 2005.
A region C-terminal to the proline-rich core of p47^{phox} regulates activation of the phagocyte NADPH oxidase by

interacting with the C-terminal SH3 domain of p67^{phox}.

Arch. Biochem. Biophys. 444, 185–194.

17. Ogura, K., Nobuhisa, I., Yuzawa, S., Takeya, R., Torikai, S., Saikawa, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2006.
NMR solution structure of the tandem SH3 domains of p47^{phox} complexed with a p22^{phox}-derived proline-rich peptide.
J. Biol. Chem. 281, 3660–3668.
18. Izaki, T., Kamakura, S., Kohjima, M., and Sumimoto, H. 2006.
Two forms of human Inscuteable-related protein that links Par3 to the Pins homologues LGN and AGS3.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 341, 1001–1006.
19. Nobuhisa, I., Takeya, R., Ogura, K., Ueno, N., Kohda, D., Inagaki, F., and Sumimoto, H. 2006.
Activation of the superoxide-producing phagocyte NADPH oxidase requires cooperation between the tandem SH3 domains of p47^{phox} in recognition of a polyproline type II helix and an adjacent α -helix of p22^{phox}.
Biochem. J. 396, 183–192.

総説

1. Sumimoto, H., Ueno, N., Yamasaki, T., Taura, M., and Takeya, R. 2004.
Molecular mechanism underlying activation of superoxide-producing NADPH oxidases: roles for their regulatory proteins.
Jpn. J. Infect. Dis. 57, S24–S25.
2. Sumimoto, H., Miyano, K., and Takeya, R. 2005
Review: Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 677–686.
3. Takeya, R., Ueno, N., and Sumimoto, H. 2006.
Regulation of superoxide-producing NADPH oxidases in nonphagocytic cells.
Methods Enzymol. 406, 456–468.
4. Takeya, R., and Sumimoto, H. 2006.
Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases.
Antioxid. Redox Signal., in press.
5. 武谷 立 住本英樹
PXドメインと食細胞
Surgery Frontier 11, 54-57, 2004.
6. 住本英樹.2005.
動物における Nox ファミリーの役割とその活性化機構.
蛋白質核酸酵素 50, 302–309.
7. 宮野佳, 田村実, 住本英樹. 2005.
好中球による活性酸素生成の分子メカニズム.
炎症・再生 25, 113–117.
8. 住本 英樹.2005.
Nox: 活性酸素生成酵素ファミリー.

- Vita 22, 35- 40.
9. 水上 令子, 武谷 立, 住本 英樹. 2006.
食細胞による微生物の取り込みと殺菌.
蛋白質核酸酵素 51,109-117.
 10. 住本 英樹. 2006.
活性酸素生成酵素 Nox ファミリー.
実験医学 24, 印刷中.

学会発表

1. Ryu Takeya, Hideki Sumimoto. (2005, 7/27-7/30)
Localization of a Mammalian Formin, Fhos/FHOD1, to the Microtubule Networks.
The American Society for Cell Biology 2005 Summer Meeting on Systems Integration in Directed Cell Motility, Seattle, USA.
2. 住本 英樹.(2005,6/30- 7/2)
ワークショップ「細胞極性」
Par3 α 及び Par3 β による哺乳類上皮細胞の極性決定の制御.
第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡.
3. 児島 千恵, 橋本 あり, 藪田 いづみ, 廣瀬 まゆみ, 橋本 茂, 金保 安則, 住本 英樹, 池上 貴久, 佐邊 壽孝.(2005,6/30- 7/2)
ワークショップ「細胞極性」
リン脂質による Bin1 SH3 ドメインの結合性制御.
第5回日本蛋白質科学会年会, 福岡.
4. 住本 英樹, 宮野 佳, 武谷 立. (2005, 8/4-8/6)
シンポジウム「生体防御の役割をになう新ファミリー-NOX:植物-動物」
動物の Nox ファミリー-NADPH オキシダーゼの調節機構.
第16回日本生体防御学会学術総会, 東京.
5. 武谷 立, 住本 英樹. (2005,8/4-8/6)
Nox1 及び Noxa1 による活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ(Nox)の活性化制御機構.
第16回日本生体防御学会学術総会, 東京.
6. Ryu Takeya, Masahiko Taura, Tomoko Yamasaki, and Hideki Sumimoto. (2005,10/15-10/16)
Regulation of NADPH oxidases by Noxo1 τ , an alternative splicing form of the NADPH oxidase organizer 1.
The 11th MPO Meeting, Fukuoka.
7. Masahiro Shinohara, Saori Harada, Weihao Shang, Makoto Kubodera, Junji Mitsushita, Hideki Sumimoto, Tohru Kamata. (2005,10/19- 10/22)
ワークショップ「G タンパク質」
Nox1-dependent redox regulation exerts an integral role in actin cytoskeleton organization Ras- transformed cells by controlling Rho signaling.
第78回日本生化学会大会, 神戸.
8. Tomoko Izaki, Sachiko Kamakura, Motouki Kohjima, Hideki Sumimoto, (2005, 10/19- 10/22)

Phosphorylation- dependent binding of 14-3-3 proteins to Par3 β , a mammalian Par3-related cell polarity protein.
第 78 回日本生化学会大会, 神戸.

9. Ryu Takeya, Masahiko Taura, Tomoko Yamasaki, Hideki Sumimoto. (2005, 10/19- 10/22)
ワークショップ「ストレス 2」
Expression and function of Noxo 1 τ , an alternative splicing form of the NADPH oxidase organizer 1.
第 78 回日本生化学会大会, 神戸.
10. Noriko Ueno, Ryu Takeya, Kei Miyano, Hideaki Kikuchi, Hideki Sumimoto. (2005,10/19-10/22)
The NADPH oxidase Nox3 produces superoxide in a p22^{nox}- dependent manner.
第 78 回日本生化学会大会, 神戸.
11. Hideki Sumimoto, Noriko Ueno, Masahiko Taura, Kei Miyano, Ryu Takeya. (2005,12/7-12/10)
ワークショップ「レドックスシグナリングと生命機能の制御」
Regulatory mechanism for Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
12. Masahiro Shinohara, Saori Harada, Makoto Kubodera, Masayoshi katoh, Weihao Shang, Junji Mitsushita, Hideki Sumimoto, Tohru Kamata. (2005,12/7-12/10)
Redox regulation of Rho by Nox1 is required for action cytoskeleton organization in Ras- transformed cells.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
13. Noriko Ueno, Ryu Takeya, Kei Miyano, Hideki Kikuchi, Hideki Sumimoto. (2005,12/7-12/10)
The NADPH Oxidase Nox3 Constitutively Produces Superoxide in a p22^{nox} dependent Manner:
ITS REGULATION BY OXIDASE ORGANIZERS AND ACTIVATORS.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
14. Ryu Takeya, Masahiko Taura, Tomoko Yamazaki, Hideki Sumimoto, (2005,12/7-12/10)
Regulation of the NADPH oxidase(Nox) by Noxo1 τ , an alternative splicing form of the Nox organizer1.
第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.
15. Naoya Onohara, Tomomi Fujii, Masashi Fukutomi, Yuuichi Nagamatsu, Hiroyuki Kobayashi, Hideki Sumimoto, Futoshi Shibasaki, Motohiko Nishida, Hitoshi Kurose. (2005,12/7-12/10)
Requirement of G α 12/13-mediated Production of reactive Oxygen Species in Angiotensin II Receptor- induced NFAT Activation.

第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡.

分子腫瘍学分野

Division of Molecular and Surgical Oncology

細胞機能制御学部門(分子腫瘍学分野)では、(A)癌の基礎研究、(B)癌の遺伝子診断法の確立、(C)新しい治療の開発、を研究の3つの柱と位置づけ研究を推進している。人事面では、平成18年3月に講師・佐々木 淳が独立法人国立病院機構宮崎病院外科へ転出した。一方、平成17年7月より横江 毅(三重大学・大学院)、平成18年4月より松本 敏文(講師)が別府医療センターより着任、さらに石川健二(医員)、本山一夫(医員)、坂下博之(東京医科歯科大学・大学院)喜多芳昭(鹿児島大学・大学院)、坂下克也(大阪市立大学・大学院)、佐伯泰慎(九州大学・大学院)が着任し、現在総員17名で臨床・研究を進めている

研究室で取り組んでいる研究の内容と、その歩みについてご紹介いたします。

A. 癌の基礎的研究

a. 疾患関連遺伝子のマイクロアレイによる包括的解析

1. DNA microarray 法を用いた遺伝子解析

DNA マイクロアレイ法は多数(～数万)の遺伝子の発現を一度に解析できる方法である。教室では胃癌・食道癌・大腸癌・肝臓癌検体を用いて癌関連遺伝子 マイクロアレイ解析を行ったところ、癌の悪性度のクラスタリングを行う過程で、遺伝子によって加重を変えて解析をすることで、リンパ節転移・進行度・予後を反映する遺伝子群の抽出に成功した。更に術前生検標本を用いたマイクロアレイ解析も可能となった。

2. DNA microarray 法を用いた肝癌特異的な遺伝子発現プロファイル解析

昨年まで肝炎・肝硬変合併肝癌の手術において術前肝予備能を正確に把握することを目的として、肝炎・肝硬変合併肝癌における併存病変の遺伝子発現プロファイル解析を行い、ラット動物モデルおよび臨床肝切除例で炎症・繊維化に伴って変化する遺伝子群の同定に成功した。本年度は臨床切除肝癌における遺伝子プロファイルを検索したところ、肝癌特異的発現を示す遺伝子としてapolipoprotein D (Utsunomiya et al, *Int J Cancer*, 2005), EZH2(Sudo et al, *Brit J Cancer*, 2005)を新たに見いだした。

3. メチル化により発現制御を受ける癌関連遺伝子の解明

癌における遺伝子発現の抑制機序には遺伝子の欠失、突然変異などの他にゲノムのメチル化が関与していることが分かってきた。そこで大腸癌においてゲノムの脱メチル化を引き起こし発現の増強する遺伝子をDNA Microarray法を用いて同定し、発癌および癌の進展に中心的に関与する遺伝子プロファイルを明らかにした (Ogawa, K., et al. *Int J Oncol*, 2005)。

4. aCGH 法による包括的ゲノム解析

これまでのマイクロアレイによる遺伝子発現解析に加え、平成17年度からはゲノム DNA の欠失・増幅を全ゲノムレベルで行える aCGH 法(アレイ comparative genomic hybridization 法)を導入して、消化器癌の微細なゲノム変化を検討している。LMD 法と組み合わせることで、食道癌、肝臓癌の多段階病変を詳細に検討している。また本年度からは同じ病変の mRNA 発現プロファイルと DNA ゲノム変異を同時に検索し、全ゲノム上におけるマッピングを開始した。

b. 癌の治療を困難にしている癌の多様性の解析

1. ラット多段階発癌モデルによる発癌機構と癌多様性のメカニズム解明

癌の多様性は癌治療を困難にしている。われわれの作成したラット多段階発癌モデルを用い、それらの腫瘍(パピローマ 進行食道癌)組織における遺伝子発現パターンを、特にLCM (Laser Captured Microdissection)法とDNA microarray法を応用して解析し、多段階発癌過程における遺伝子発現プロファイルを明らかにした(Nishida et al. *Cancer Res*, 2005).

2. LMD と DNA マイクロアレイを用いた消化器癌多様性のメカニズム解明

癌における腫瘍内の癌多様性、あるいは原発巣と転移巣の違いを明らかにする目的でLMD法、T7遺伝子増幅法、DNA microarrayを応用した解析を行っている。現在、消化器癌および乳癌において新規癌関連遺伝子や癌抗原の同定を行っており、その一つとして乳癌原発巣と転移リンパ節腫瘍における遺伝子変異を詳細に検討し転移関連遺伝子群を見いだした(Mimori et al, *Clin Exp Metastasis*,2005).現在その詳細を検討中である。

c. 腫瘍における各種癌関連遺伝子の解析と新しい癌関連遺伝子の同定

1. 消化器癌における EGFR 遺伝子突然変異

分子標的薬剤イレッサはEGFR遺伝子突然変異がある症例ではより有効であることが肺癌で報告されたが、我々は大腸癌症例においてLMD法を加味したEGFR遺伝子検索を行ったところ、33例中4例(12%)に突然変異を見つけ報告した(Nagahara et al, *Clin Cancer Res*, 2005)。従来大腸癌には使用が認めれないイレッサの適応拡大の可能性が示された。次いで胃癌におけるEGFR遺伝子突然変異を検索したところ大腸癌と異なり胃癌では変異を認めなかった(Mimori et al, *J Surg Oncol*, 2006).

2. Skp2・cks1遺伝子の消化器癌における発現の意義

これまで p27 遺伝子の発現低下が胃癌においてリンパ節転移陽性症例に多いこと(Mori M. et al. *Nat. Med.* 1997)、skp2遺伝子がp27の発現低下と極めて強い相関を示すこと(Masuda M. et al *Cancer Res.* 2002)、skp2関連遺伝子cks1の関与について(Masuda M. et al *Clinical Cancer Res.* 2003)報告してきた。更に本年度は乳癌においても消化器癌同様の関連を認めためこれを報告した(Sonoda et al, *Clin Cancer Res*, 2006).

3. FHIT/FRA3B 領域におけるゲノム解析と癌における遺伝子欠失機序の解明

我々はヒト3番染色体 3p14.2 領域から癌関連遺伝子FHITを単離し、癌組織でFHITが欠落していることを明らかにした (Inoue H et al, *PNAS* 1998, Mimori K et al. *PNAS*, 1999, Shiraiishi T et al *PNAS* 2001)。一方、機能面に介してFhitはcaspaseの亢進を介してapoptosisに関連することがわかってきた。またFhitが遺伝子修復酵素Msh2と密に関連することを明らかにした(Mori M. et al. *Cancer Res*, 2001)。更に炎症(特にプロスタグランジン系)と癌という観点から検索したところ、FHIT遺伝子発現は反復する炎症に影響を受けること、またNSAID系の抗炎症薬がその作用を押さえることを見いだした(Mimori et al, *Cancer Res*, 2006).

d. 消化器癌における癌幹細胞の研究

血球細胞のように腫瘍にも幹細胞という分化能と自己複製能をもった細胞が存在し、これらの細胞が分化増殖して腫瘍を形成すると考えられている。腫瘍幹細胞の同定とその機能の解明を目的として、肝臓癌細胞株の中に幹細胞の資格を持つ細胞群を同定することに成功した。これらの細胞は全細胞

中1~2%しか存在しないが、肝臓と胆管に共通する未分化な遺伝子群、あるいは薬剤耐性遺伝子を強く発現していることが示された(Haraguchi et al, *Stem Cells*, 2006, Haraguchi et al, *Hum Cell*, 2006).現在、胃癌、食道癌、大腸癌、膵臓癌についても同様の癌幹細胞候補を見いだした。これらについては細胞生物学的機能解明とともに、共通する幹細胞マーカーの検索を精力的に進めているところである。また癌の転移形成あるいは薬剤抵抗性に癌幹細胞が関与する可能性を詳細に検討している。

e. プロテインチップを用いた癌の包括的蛋白発現解析

当科ではこれまで DNA・RNA を対象とした癌の遺伝子解析を行ってきたが、腫瘍マーカーや分子標的薬剤の検索を今後より多角的に検討するために、昨年度プロテインチップによる包括的蛋白ペプチド解析装置を導入した。LMD を利用した微細病変による蛋白発現の違いを現在検索中である。この装置の導入により今後、DNA・RNA・蛋白と3位一体型の研究が可能となった。

f. miRNA の癌における意義の解明

癌発生・進展における遺伝子の変化については、DNA ゲノムレベルでの点突然変異、欠失・増幅・転座等々、ゲノムの修飾(メチレーション、アセチレーション)による転写制御、さらに蛋白修飾(リン酸化、ユビキチン分解)等々の事象が知られていた。一方最近、蛋白をコードしない領域の機能性 RNA 異常(miRNA)の存在が明らかになってきており、これを介した癌化のメカニズムが注目を浴びようになっている。そこで我々は miRNA の変化と共にそれらの病変における既存のゲノム変化、遺伝子発現レベルの変化を包括的・統合的に解明し新しい視点からがん病態を捉えると共に、新規治療法の開発を目指すことを目的とした研究を開始している。

B. 癌の遺伝子診断法の確立

a. 癌の微小転移の検出

病理診断で転移陰性のリンパ節に対し遺伝子診断(CEAとMAGE遺伝子のRT-PCR法)を用い微小転移を検出してきた。n0症例の術後再発予測に遺伝子診断が有用であった。当研究は厚生省科学研究費の対象となり平成17年3月時点で全国多施設共同研究として1500例の末梢血・骨髄液を収集しており、精力的に解析が進んでいる(Masuda et al, *Int J Oncol*,2005)。

b. 鏡視下手術の腫瘍発育に及ぼす影響の分子生物学的解析

鏡視下手術は開腹手術より QOL の面で優れているが、悪性腫瘍手術への影響を検索するために担癌マウスにおける鏡視下手術施行での各臓器(脾, 肝, 肺)及び腫瘍の DNA マイクロアレイ解析を行っている。いくつかの興味深い関連遺伝子を同定した。

c. 放射線化学療法感受性・抵抗性遺伝子の検索

食道癌において放射線感受性の違いをもたらす遺伝子 Hepatoma derived growth factor (HDGF) をクローニングした (Matsuyama A, *Cancer Res*,2001)。更に消化器癌、乳癌について放射線耐性株を作成し DNA microarray を用いて放射線感受性・抵抗性規定遺伝子群を同定した。本年度は食道癌と並んで悪性度が高い膵臓癌について同様の検索を行い、放射線感受性・抵抗性規定遺伝子群を同定した (Ogawa et al, *Int J Oncol*,2006)。

d. 疾患感受性遺伝子の同定・検索

われわれは消化器癌を対象として、環境中の発癌物質の代謝酵素遺伝子を含め、様々な癌関連遺伝子(L-myc, NAT2, COMT, DH3, ALDH2, p53 など)の多型性検索に取り組んでいる。癌へのかかり易さを遺伝子多型の観点から予測できるようになれば、発癌のハイリスク群をより客観的に評価することが可能となり、将来発癌に対する予防策を講じる一助となることが期待される。本年度は乳癌エストロゲン代謝に関与する catechol-O-methyltransferase 多型が乳癌発症に強く相関すること出した(Inoue et al, *Oncol Rep*, 2005).

e. 大腸癌の発生、進展および治療感受性に関わる生活習慣および遺伝子多型の解析

平成16年度10月からは全国7施設共同によるクレスト(科学技術振興機構)研究が5年計画で始まり大腸癌2000例、健常者3000例の大規模スタディーを開始したが、平成18年度3月時点で総計2900例の症例を収集し、食事を中心とする疫学的観点、DNA 多型、遺伝子発現マイクロアレイ解析を同時に進めているところである。当科が主任研究施設である。

f. 食道癌の発生、進展および治療感受性に関わる生活習慣および遺伝子多型の解析

平成17年度4月からは全国5施設共同による基盤研究S(文部科学省)研究が5年計画で始まり食道癌1000例、健常者2000例の大規模スタディーを開始した。当科が主任研究施設である。

C. 新しい治療法の開発

a. 腫瘍拒絶抗原を用いた癌特異的免疫療法

1. MAGE ペプチドと樹状細胞を用いた癌ペプチドワクチン療法

腫瘍拒絶抗原 MAGE ペプチドを用いた DC ワクチン療法を世界に先駆けて臨床応用し、進行再発消化器癌 13 症例に行ったところ副作用は全く認めず高い評価を受けた(Sadanaga N, Clin Cancer Res, 2001)。治療効果については転移性肺癌の縮小、再発リンパ節の縮小した症例も認めた。平成 17 年2月に本治療は厚生労働省より高度先進医療の認可を受けることができ、現在 30 例に治療を行っている。

2. 効果的な DC・ペプチドワクチン療法の開発

担癌患者では免疫能が低下しているため、よりよい治療効果が望めない。Balb/c マウスの大腸癌担癌モデルを用いた解析の結果、担癌マウス由来の DC では健常マウス由来の DC に比較して機能低下していたが、OK-432 の投与により DC の抗原提示能の増強、腫瘍内 T リンパ球の増加を伴う抗腫瘍効果が得られることがわかった(Mashino K, Mol Cancer Ther, 2002)。よって、今後は DC ワクチン OK432 の併用を加えていきたい。

3. 新規腫瘍拒絶抗原の検討とペプチドワクチン療法対象症例の拡大

腫瘍拒絶抗原として報告のある NY-ESO-1, LAGE-1, SSX, SCP-1 についてその消化器癌、乳癌組織における発現を解析したが、免疫染色によると heterogeneous な発現が観察され、複数抗原を標的とした治療の必要性が考えられた(Mashino K, Br J Cancer 2001)。さらに MAGE-1, -3 発現陰性症例に SCP-1 発現が比較的高率に認められペプチド・ワクチン療法の症例拡大の可能性が示唆された。この治療については平成16年度よりがんトランスレーショナル・リサーチ(代表: 三重大学玖珠教授)に参加し全国規模の治療研究を展開している。

4. 大腸癌における fractalkine の発現と腫瘍の進展の解明

CD8 陽性リンパ球や NK 細胞の遊走因子である fractalkine の発現を解析し、大腸癌においては fractalkine の高発現例では予後が良好であるとの結果を得た。これにより腫瘍で発現した Fractalkine が腫瘍内にリンパ球を誘導する機序が考えられた(Ohta et al, *Oncol*, 26: 41-47, 2005)。

5. 消化器癌における TRAG-3 の発現とその意義の解明

Cancer-testis antigen のひとつとして TRAG-3 が同定された。TRAG-3 の発現を消化器癌で解析したところ胃癌、食道癌で比較的高頻度に発現していることを明らかにした、癌特異的免疫療法の新しい標的となる可能性を見いだした(Ohta et al. *Oncol Rep*, 2006)。

6. 化学療法、凍結療法あるいはRF併用による癌特異的免疫療法の効果増強の検討

マウス担癌モデルを用いて低濃度化学療法を併用した癌特異的免疫療法はそれぞれの単独治療よりも効果が高いことを報告した(Tanaka F et al. *Human Int J Cancer*, 2002)。現在臨床応用に向け準備中である。また、癌の凍結療法では癌組織の破壊とともに免疫系への増強効果が知られている。この凍結療法とRF療法を加味した治療法を開発し、その癌特異的免疫増強効果を検討する。

b. 脂肪幹細胞を用いた再生医療

近年細胞工学の進展、各種増殖因子の同定などにより様々な組織のもとになる細胞、すなわち「幹細胞」の存在が明らかにされてきた。私たちは乳癌術後の乳房の変形、欠如あるいは長期に療養する老人患者に多くみられる褥瘡への根本的治療のために脂肪幹細胞を用いた再生医療の可能性を検討してきた。脂肪幹細胞の分離・臨床応用を精力的に進めている米国 cytori 社との共同研究を開始したところである。脂肪幹細胞は心筋細胞への分化も報告されており、この点に関しては当病院・循環器内科との共同研究を行う予定にしている。

業績目録

原著論文

- 1 Inoue H, Shibuta K, Matsuyama A, Yoshinaga K, Sadanaga N, Ueo H, Graham F, Barnard, Mori M:
Genetic susceptibility of catechol-O-methyltransferase(COMT) polymorphism in Japanese patients with breast cancer.
Oncol Rep 14:707-712, 2005
- 2 Utsunomiya T, Ogawa K, Yoshinaga K, Ohta M, Yamashita K, Mimori K, Inoue H, Ezaki T, Yoshikawa Y, Mori M:
Clinicopathologic and prognostic values of apolipoprotein D alterations in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 116(1):105-109, 2005
- 3 Mimori K, Ishii H, Okamoto M, Barnard GF, Mori M:
Identification of bona-fide characteristics of esophageal cancer by adenoviral-FHIT treatment.
Ann Surg Oncol 12 (2): S44-S44, 2005
- 4 Mimori K, Ogawa K, Okamoto M, Sudo T, Inoue H, Mori M:
Clinical significance of the expression of enhancer of zeste homolog 2 in colorectal cancer cases.
Eur J Surg Oncol 31:376-380, 2005
- 5 Mimori K, Kataoka A, Yoshinaga K, Ohta M, Sagara Y, Yoshikawa Y, Ohno S, Barnard GF, Mori M:
Identification of molecular markers for metastasis-related genes in primary breast cancer cells.
Clin Exp Metastas 22:59-67, 2005

- 6 Ohta M, Tanaka F, Yamaguchi H, Sadanaga N, Inoue H, Mori M:
The high expression factalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients.
Int J Oncol 26:41-47, 2005
- 7 Sudo T, Utsunomiya T, Mimori K, Nagahara H, Ogawa K, Inoue H, Wakiyama S, Fujita H, Shirouzu K, Mori M:
Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma.
Br J Cancer 92(9):1754-1758, 2005
- 8 Nishida K, Mine S, Utsunomiya T, Inoue H, Okamoto M, Udagawa H, Hanai T, Mori M:
Global analysis of altered gene expressions during the process of esophageal squamous cell carcinogenesis in the rat:
A study combined with a laser microdissection and a cDNA microarray.
Cancer Res 65:401-409, 2005
- 9 Masuda T, Kataoka A, Ohno S, Murakami S, Mimori K, Utsunomiya T, Inoue H, Tsutsui S, Kinoshita J, Masuda N,
Moriyama N, Mori M:
Detection of occult cancer cells in peripheral blood and Bone marrow by quantitative RT-PCR assay for
cytokeratin-7 in breast cancer patients.
Int J Oncol 26:721-730, 2005
- 10 Nagahara H, Mimori K, Ohta M, Utsunomiya T, Inoue H, Barnard GF, Ohira M, Hirasaki K, Mori M:
Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma.
Clin Cancer Res 11:1368-1371, 2005
- 11 Nagahara H, Mimori K, Utsunomiya T, Barnard GF, Ohira M, Hirakawa K, Mori M:
Clinicopathologic and biological significance of kallikrein 6 overexpression in human gastric cancer.
Clin Cancer Res 11(19):6800-6806, 2005
- 12 Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Nagahara H, Murayama S, Mori M:
Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer.
Clin Cancer Res 11(8):2889-2893, 2005
- 13 Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Yamashita K, Okamoto M, Tanaka F, Inoue H, Ikeda Y, Saku M, Murayama
S, Mori M:
Genomic screens for genes upregulated by demethylation in colorectal cancer:
Possible usefulness for clinical application.
Int J Oncol 27:417-426, 2005
- 14 Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, Suzuki K, Higashi H, Era S, Mori M:
Reduced expression of PTEN protein and its prognostic implications in invasive ductal carcinoma of the breast.
Oncology 68:398-404, 2005
- 15 Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S, Mori M:
Inactivation of PTEN is associated with a low p27Kip1 protein expression in breast carcinoma
Cancer 104(10):2048-2053, 2005
- 16 Ishii H, Mimori K, Yoshikawa Y, Mori M, Furukawa Y, Vecchione A:
Differential roles of E-type cyclins during transformation of Murine E2F-1-deficient cells.
DNA Cell Biol 24 (3):173-179, 2005
- 17 Ishii H, Mimori K, Inageta T, Murakumo Y, Vecchione A, Mori M, Furukawa Y:
Components of DNA damage checkpoint pathway regulate UV exposure-dependent alterations of gene expression
of FHIT and WWOX at chromosome fragile sites.
Mol Cancer Res 3 (3):130-138, 2005
- 18 Ishii H, Mimori K, Mori M, Vecchione A:
Differentially expressed genes in endothelial differentiation.
DNA Cell Biol 24:432-437, 2005

- 19 Ishii H, Inageta T, Mimori K, Saito T, Sasaki H, Isobe M, Mori M, Croce CM, Huebner K, Ozawa K, Furukawa Y: Frag1, a homolog of alternative replication factor C subunits, links replication stress surveillance with apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9655-9660, 2005
- 20 Calin GA, Trapasso F, Shimizu M, Dumitru CD, Yendamuri S, Godwin AK, Ferracin M, Bernardi G, Chatterjee D, Baldassarre G, Rattan S, Alder H, Mabuchi H, Shiraishi T, Hansen LL, Overgaard J, Herlea, Mauro FR, Dighiero G, Movsas B, Rassenti L, Kipps T, Baffa R, Fusco A, Mori M, Russo G, Liu CG, Neuberger D, Bullrich F, Negrini M, and Croce CM: Familial cancer associated with a polymorphism in ARLTS1. *N Engl J Med* 352:1667-1676, 2005
- 21 Mandelker DL, Yamashita K, Tokumaru Y, Mimori K, Howard DL, Tanaka Y, Carvalho AL, Jiang WW, Park HL, Kim MS, Osada M, Mori M, Sidransky D: PGP9.5 promoter methylation is an independent prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 65:4963-4968, 2005
- 22 Mimori K, Nagahara H, Sudo T, Ishii H, Yamashita K, Barnard GF, Mori M: The epidermal growth factor receptor gene sequence is highly conserved in primary gastric cancers. *J Surg Oncol* 93(1):44-46, 2006
- 23 Mimori K, Ishii H, Nagahara H, Sudo T, Yamashita K, Inoue H, Barnard GF, Mori M: FHIT is Up-Regulated by inflammatory stimuli and inhibits Prostaglandin E2-Mediated cancer progression. *Cancer Res* 66(5):2683-2690, 2006
- 24 Inuma H, Okinaga K, Egami H, Mimori K, Hayashi N, Nishida K, Adachi M, Mori M, Sasako M: Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol* 28:297-306, 2006
- 25 Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Haraguchi N, Inoue H, Murayama S, Mori M: Differential gene expression profiles of radioresistant pancreatic cancer cell lines established by fractionated irradiation. *Int J Oncol* 28:705-713, 2006
- 26 Sonoda H, Inoue H, Ogawa K, Utsunomiya T, Masuda A, Mori M: Significance of Skp2 expression in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 12(4):1215-1220, 2006
- 27 Tanaka S, Pero S, Taguchi K, Shimada M, Mori M, Krag D, Aii S: Specific peptide ligand for Grb7 Signaltransduction protein and pancreatic cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 98(7):491-498, 2006
- 28 Yamashita K, Park HL, Kim MS, Osada M, Tokumaru Y, Inoue H, Mori M: Sideransky DPGP9.5 Methylation in Diffuse Type Gastric Cancer. *Cancer Res* 66(7):3921-3927, 2006
- 29 Ohta M, Tanaka F, Sadanaga N, Yamaguchi H, Inoue H, Mori M: Expression of the TRAG-3 gene in human esophageal cancer. *Oncol Rep* 15(6):1529-1532, 2006
- 30 Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka H, Mimori K, Barnard, G. F., Mori M: Characterization of a Side Population of Cancer Cells from Human Gastrointestinal System. *Stem Cells* 24(3):506-513, 2006
- 31 Haraguchi N, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Sasaki A, Mori M: Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers. *Human Cell* 19(1):24-29, 2006

- 32 Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Yanaga K, Mori M:
Clinical Significance of TROP2 Expression in Colorectal Cancer.
Clin Cancer Res 12(10):3057-3063, 2006
- 33 Kim MS, Yamashita K, Beak JH, Park HL, Carvalho AL, Osada M, Hoque MO, Upadhyay S, Tokumaru Y, Mori M:
Sidransky D N-Methyl-D-Aspartate:Receptor Type 2B is epigenetically inactivated and exhibits tumor suppressor activity in human esophageal cancer.
Cancer Res 66(7):3409-3418, 2006
- 34 Sasaki A, Iwashita Y, Shibata K, Ohta M, Kitano S, Mori M:
Preoperative Transcatheter Arterial Chemoembolization Reduces Long-term Survival Rate after Hepatic Resection for Resectable Hepatocellular Carcinoma.
Cancer(in press) ;
- 35 Mimori K, Nishida K, Nakamura Y, Ieta K, Yoshikawa Y, Sasaki A, Ishii H, Alonso MA, Mori M:
Loss of MAL expression in precancerous lesions of the esophagus.
Ann Surg Oncol(in press) ;
- 36 Okamoto M, Utsunomiya T, Wakiyama S, Hashimoto M, Fukuzawa K, Ezaki T, Hanai T, Inoue H, Mori M:
Specific Gene-Expression Profiles of Noncancerous Liver Tissue Predict the Risk for Multicentric Occurrence of Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis C Virus-Positive Patients.
Ann Surg Oncol(in press)

総説

- 1 森 正樹 太田 光彦:
大腸癌分子メカニズムの解明と臨床応用.
実験医学 23(8): 1240-1246, 2005
- 2 井上裕 森 正樹:
ゲノム解析とフォローアップ計画ー転移再発にかかわる遺伝子ー.
コンセンサス癌治療 4(1): 40-41, 2005
- 3 宇都宮 徹 森 正樹:
悪性腫瘍における輸液.
外科 67(1): 93-97, 2005
- 4 宇都宮 徹 森 正樹:
転移性肝癌の成立機序.
外科治療 92(2): 140-147, 2005
- 5 宇都宮 徹 森 正樹:
肝転移の予測因子.
癌転移のメカニズムがよくわかる肝転移のすべて
1: 105- 112,2005
- 6 宇都宮 徹 森 正樹:
遠隔転移の機序.
外科 67(8): , 2005

- 7 田中文明, 井上 裕, 森 正樹:
乳癌遺伝子の意味するもの.
臨床と研究 82(10): 53-57, 2005
- 8 三森功土, 森 正樹:
マイクロアレイを用いた転移関連遺伝子群プロファイル.
癌治療と宿主 17(1): 17-25, 2005
- 9 片岡明美, 大野真司, 宇都宮徹, 森 正樹:
分子マーカーによる検査法の発展.
治療学<2> 39: 19(139)-25(145), 2005
- 10 主藤朝也, 田中真二, 田中文明, 三森功土, 藤田博正, 白水和雄, 森 正樹:
食道癌の分子標的 一分子標的治療を想定した一.
外科治療 92(1): 50-58, 2005
- 11 太田光彦, 森 正樹:
大腸癌分子生物学の臨床応用.
消化器外科 28(5): 641-646, 2005
- 12 大町貴弘, 井上 裕, 中村能人, 矢永勝彦, 森 正樹:
癌の網羅的発現解析と分子標的治療の深索.
Cancer Frontier 7:131:142, 2005
- 13 青木克益, 森 正樹:
血管新生阻害療法.
最新医学 60(6): 112-118, 2005
- 14 増田隆明, 三森功土, 森 正樹:
微小転移.
日本臨床 64(3): 442-449, 2006

著書

- 1 太田 光彦, 森 正樹:
大腸癌分子生物学の臨床応用
消化器外科 大腸癌のすべて: 28(5) 641-646, へるす出版,
東京都, 2005.4.20
- 2 森 正樹:
癌性腹膜炎
今日の治療指針 2006年: 2006年版第1刷 369-370,
医学書院, 東京都, 2006.1.1
- 3 森 正樹:

大腸癌取り扱い規約
大腸癌取り扱い規約: 金原出版株式会社, 2006

- 4 宇都宮 徹 森 正樹:
肝線維化の分子遺伝学的評価
肝臓病の最新治療: 治療シリーズ1 185-190,
先端医療技術研究所, 東京都, 2006
- 5 佐々木 淳 北野正剛 森 正樹:
小型肝臓の治療方針
肝臓病の最新治療: 治療シリーズ1 228-231,
先端医療技術研究所, 東京都, 2006

学会発表

- 1 Mimori K, Utsunomiya T, Inoue H, Mori M 2005.5.4
6th International Gastric Cancer Congress 横浜
ポスター
Cancer Specific Loss of Candidate Suppressor GeneMAL,and MAL is a Powerful Prognostic Indicator for Gastric Cancer
- 2 田中文明, 園田英人, 岡本正博, 松山 歩, 三森功士, 宇都宮 徹, 井上 裕,
森 正樹 2005.5.12
第 105 回 日本外科学会定期学術集会 名古屋
シンポジウム
「外科侵襲に対する生体反応:最新の知見」
腹腔鏡手術における生体侵襲からみた利点; 包括的遺伝子発現解析を用いた研究
- 3 中村能人, 永原 央, 太田光彦, 大町貴弘, 田中正博, 宇都宮 徹, 井上 裕, 矢永勝彦,
森 正樹 2005.5.
第 105 回 日本外科学会定期学術集会 名古屋
サージカルフォーラム
LMD, Microarray を用いた胃癌における癌特異的遺伝子の検索
- 4 大町貴弘, 永原 央, 井上 裕, 三森功士, 主藤朝也, 家田敬輔, 中村能人, 矢永勝彦, 森
正樹 2005.5.13
第 105 回 日本外科学会定期学術集会 名古屋
サージカルフォーラム
大腸癌における EGFR mutation の検索とその意義について
- 5 石川健二, 太田光彦, 三森功士, 田中文明, 宇都宮 徹, 井上 裕, 森 正樹
2005.5.13
第 105 回 日本外科学会定期学術集会 名古屋
サージカルフォーラム
胃癌における HDC 遺伝子発現の意義
- 6 三森功士, 松山 歩, 田中文明, 太田光彦, 原口直紹, 永原 央, 家田敬輔, 井上 裕, 森
正樹 2005.5.13
第 105 回 日本外科学会定期学術集会 名古屋
サージカルフォーラム
発癌に關与する体内環境因子と癌抑制遺伝子 FHIT の關連について

- 7 家田敬輔、主藤朝也、太田光彦、大町貴弘、松山 歩、岡本正博、三森功士、桑野博行、森 正樹 2005.5.1
第105回 日本外科学会定期学術集会 名古屋
ポスター
食道癌におけるメチル化遺伝子の包括的解析
- 8 田中文明、森 正樹 2005.5.20
第26回 癌免疫外科研究会 東京
シンポジウム
樹状細胞と癌抗原ペプチドを用いた進行消化器癌患者に対する癌ワクチン療法:有効な症例とは
- 9 原口直紹、宇都宮 徹、家田敬輔、田中文明、三森功士、井上 裕、森 正樹
2005.6.2
第14回 日本がん転移学会総会 大阪
ワークショップ
消化器癌における癌幹細胞の同定と分子生物学的特徴
- 10 家田敬輔、宇都宮 徹、中村能人、原口直紹、大町貴弘、田中文明、三森功士、井上 裕、桑野博行、森 正樹 2005.6.2
第14回 日本がん転移学会総会 大阪
ワークショップ
肝内胆管癌におけるCEACAM6 遺伝子発現の臨床病理学的意義
- 11 中村能人、田中文明、家田敬輔、大町貴弘、三森功士、宇都宮 徹、井上 裕、矢永勝彦、森 正樹 2005.6.3
第14回 日本がん転移学会総会 大阪
ワークショップ
「血管新生」
大腸癌におけるPDGF-BB 発現の検討
- 12 筒井信一、鈴木浩輔、森 正樹 2005.6.10
第13回日本乳癌学会総会 倉敷
一般演題
乳癌におけるPTENとp27 蛋白発現の意義
- 13 三森功士、永原 央、山下継史、主藤朝也、吉永敬士、井上 裕、森 正樹 2005.7.20
第60回日本消化器外科学会定期学術総会 東京
一般演題
消化器癌における分子標的薬の導入に関する研究(EGFR 阻害剤の適応拡大と合併症の予防)
- 14 田中文明、太田光彦、原口直紹、三森功士、宇都宮 徹、井上 裕、森 正樹 2005.7.20
第60回日本消化器外科学会定期学術総会 東京
一般演題
消化器外科に対する癌免疫療法:トランスレーショナルリサーチから高度先進医療への道
- 15 主藤朝也、三森功士、田中文明、岡本正博、松山 歩、宇都宮 徹、井上 裕、藤田博正、白水雄、森 正樹 2005.7.21
第60回日本消化器外科学会定期学術総会 東京
一般演題
食道癌におけるマイクロアレイを用いた放射線化学療法耐性関連遺伝子の解析

- 16 原口直紹、宇都宮 徹、家田敬輔、田中文明、三森功士、井上 裕、森 正樹 2005.7.21
第60回日本消化器外科学会定期学術総会 東京
ワークショップ
消化器癌における癌幹細胞の分離・同定とその臨床意義
- 17 森 正樹 2005.9.14
第64回 日本癌学会学術総会 札幌
シンポジウム
消化管がんの個別化治療へ向けた研究
- 18 Tanaka F, Sonoda H, Okamoto M, Mimori K, Utsunomiya T, Inoue H, Mori M: 2005.9.15
62th Congress of the association of Polish surgeons Bialostocka
TIMP-3 and PI3-kinase genes were related with progression of colon cancer under laparoscopic surgery in murine model.
- 19 三森功士、石井秀始、井上 裕、森 正樹 2005.9.16
第64回 日本癌学会学術総会 札幌
ポスター
癌抑制遺伝子 FHIT と炎症関連発癌因子との関係
- 20 家田敬輔、宇都宮 徹、中村能人、原口直紹、大町貴弘、佐々木 淳、田中文明、
三森功士、井上 裕、桑野博行、森 正樹 2005.10.13
第16回日本消化器癌発生学会総会 鹿児島
一般演題
肝内胆管癌における CEACAM6 遺伝子発現の臨床病理学的意義
- 22 三森功士、石井秀始、永原 央、井上 裕、森 正樹 2005.10.14
第16回日本消化器癌発生学会総会 鹿児島
パネルディスカッション
炎症に起因する大腸発癌機構における癌抑制遺伝子 FHIT の役割
- 23 森 正樹 2005.10.14
日本消化器癌発生学会 鹿児島
ランチョンセミナー
消化器癌の発生と進展
- 24 大町貴弘、中村能人、井上 裕、三森功士、張 翔、横江 毅、森 正樹
2005.10.14
第16回日本消化器癌発生学会総会 鹿児島
一般演題
大腸直腸癌における FABP6(Fatty acid binding protein 6, ileal bile acid binding protein)の高発現とその意義について
- 25 Tanaka F 2005.10.19
American College of Surgeons 91st Annual Clinical Congress USA Dendritic cell vaccination with MAGE peptides against advanced Gastrointestinal carcinomas.
- 26 森 正樹 2005.10.26
大腸肛門病学会 東京
ワークショップ
大腸疾患治療戦略の標準化を目指した臨床応用可能な分子生物学的アプローチ
- 27 森 正樹 2005.10.27

第 43 回日本癌治療学会総会 名古屋
シンポジウム
遊離癌細胞から微小転移成立の分子生物学

- 28 田中文明、山口博志、原口直紹、三森功士、佐々木 淳、井上 裕、森 正樹 2005.12.1
第 18 回日本バイオセラピー学会学術総会 宇部
ワークショップ
超短期培養成熟樹状細胞(Fast DC)の誘導と機能解析
- 29 中村能人、大町貴弘、永原 央、田中文明、三森功士、佐々木 淳、井上 裕、矢永勝彦、
森 正樹 2005.12.2
第 18 回日本バイオセラピー学会学術総会 宇部
ワークショップ
LMD、cDNA Microarray を用いた胃癌における癌特異遺伝子の検索
- 30 中村能人、大町貴弘、平崎重雄、井上 裕、三森功士、佐々木 淳、矢永勝彦、森 正樹
2006.1.20
第 64 回大腸癌研究会 東京
ポスター
大腸直腸癌における FABP6(Fatty acid binding protein 6)の高発現とその意義について
- 31 田中文明、原口直紹、三森功士、佐々木 淳、井上 裕、森 正樹 2006.2.27
第 2 回乳癌学会九州地方会 福岡
一般演題
乳癌における Laser Microdissection (LMD)と cDNA microarray を用いた癌特異的抗原遺伝子
の同定
- 32 家田敬輔、原口直紹、中村能人、佐々木 淳、田中文明、井上 裕、桑野博行、森 正樹
2006.3.10
第 78 回日本胃癌学会総会 東京
一般演題
胃癌における SP(side population)細胞の同定
- 33 張 翔、三森功士、井上 裕、森 正樹 2006.3.10
第 78 回日本胃癌学会総会 東京
一般演題
胃癌における CA1 遺伝子発現低下とその分子機構の解明
- 34 深川剛生、笹子三津留、三森功士、佐野 武、片井 均、阪 真、森田信司、森 正樹
2006.3.11
第 78 回日本胃癌学会総会 東京
特別企画
胃癌症例における末梢血及び骨髓液中微量癌細胞の検出
- 35 平崎重雄、佐々木 淳、石川健二、田中文明、三森功士、井上 裕、森 正樹 2006.3.18
大分県外科医会 第 181 回例会 別府
シンポジウム
肝細胞癌における遊離癌細胞の同定
- 36 Sasaki A, Ishikawa K, Haraguchi N, Mimori K, Tanaka A, Inoue H,
Ohta M, Kitano S, Mori M 2006.3.25
59th Annual Cancer Symposium San Diego
Symposium

Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B Ligand(RANKL)Expression in Hepatocellular Carcinoma with Bone Metastasis

- 37 佐々木 淳、石川健二、原口直紹、三森功士、田中文明、井上 裕、太田正之、北野正剛、森 正樹 2006.3.29
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
ポスター
肝細胞癌における receptor activator of nuclear factor-kB ligand(RANKL)の発現と骨転移との関連
- 38 平崎重雄、佐々木淳、石川健二、田中文明、三森功士、井上 裕、森 正樹 2006.3.29
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
ポスター
乳癌のリンパ節転移関連遺伝子の同定
- 39 小坂愉賢、大町貴弘、家田敬輔、原口直紹、田中文明、三森功士、井上 裕、渡邊昌彦、森 正樹 2006.3.2
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
サージカルフォーラム
胃癌における TRIM29 遺伝子発現の検討
- 40 張 翔、永原 央、三森功士、佐々木 淳、井上 裕、平川弘聖、森 正樹 2006.3.29
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
サージカルフォーラム
胃癌における CA1 遺伝子発現低下とその分子機構の解明
- 41 井上 裕、原口直紹、三森功士、家田敬輔、小坂愉賢、田中文明、佐々木 淳、森 正樹 2006.3.29
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
ワークショップ
大腸癌における効果的抗癌剤治療のための分子標的研究と癌幹細胞研究
- 42 主藤朝也、三森功士、田中文明、家田敬輔、井上 裕、藤田博正、白水和雄、森 正樹 2006.3.29
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
ワークショップ
食道癌における放射線化学療法耐性関連遺伝子の同定
- 43 横江 毅、大町貴弘、原口直紹、家田敬輔、田中文明、楠 正人、森 正樹 2006.3.30
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
サージカルフォーラム
大腸癌における新たな癌精巢抗原の同定
- 44 三森功士、片岡明美、増田隆明、平崎重雄、小坂愉賢、増田慎三、大野真司、森 正樹 2006.3.30
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
ワークショップ
乳癌患者における遊離癌細胞検出意義の解明と転移形成能予測マーカーの同定
- 45 松山 歩、三森功士、田中文明、佐々木淳、井上 裕、田中洋一、真船健一、森 正樹 2006.3.30
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
サージカルフォーラム

Adenovirus-FHIT 遺伝子治療の分子機序と抗腫瘍効果が期待される食道癌の特徴

- 46 永原 央、三森功士、主藤朝也、田中文明、井上 裕、大平雅一、平川弘聖、森 正樹
2006.3.30
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
サージカルフォーラム
胃癌における 5FU 関連遺伝子の網羅的検索
- 47 家田敬輔、宇都宮 徹、中村能人、原口直紹、井上 裕、桑野博行、森 正樹
2006.3.30
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
サージカルフォーラム
肝内胆管癌における CEACAM6 遺伝子発現の臨床病理学的意義
- 48 中村能人、大町貴弘、平崎重雄、佐々木 淳、井上 裕、森 正樹 2006.3.30
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
サージカルフォーラム
PDGF-BB は大腸癌のリンパ管侵襲に關与する
- 49 石川健二、大町貴弘、三森功士、田中文明、佐々木 淳、井上 裕、森 正樹
2006.3.31
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
サージカルフォーラム
大腸癌における TROP2 の高発現とその臨床病理学的意義の検討
- 50 田中洋一、三森功士、永原 央、主藤朝也、原口直紹、石川健二、川島吉之、西村洋治、
森 正樹 2006.3.31
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
ポスター
消化器癌における EGFR 突然変異の検索と gefitinib の適応拡大
- 51 大町貴弘、中村能人、井上 裕、横江 毅、石川健二、矢永勝彦、森 正樹 2006.3.31
第 106 回日本外科学会定期学術集会 東京
ポスター
大腸癌における Fatty Acid Binding Protein6(FAB6)の高発現とその意義について

老化制御学分野

Division of Molecular and Clinical Gerontology

当部門は生活習慣病および老年病を中心に診療する科であり、診療分野として循環器、呼吸器、老年病(神経疾患)を対象としている。研究面では、生活習慣病に対する治療への応用を目指して、以下のような遺伝子治療の基盤となる研究を推進している。まず、虚血性動脈疾患への治療の基盤として、抗サイトカイン遺伝子導入による血管新生の研究を行いその有効性を確認した。また、冠動脈再狭窄における内膜障害に対する抗サイトカイン遺伝子治療を試みている。

神経分野では、多能幹細胞から神経細胞への分化誘導因子の同定を試みている。老年病へのアプローチとして、各種生活習慣病患者集団における末梢血球のテロメア構造を解析し、生活習慣病による老化促進をゲノムレベルで評価する研究を行っている。臨床面では非侵襲的検査にて動脈硬化の程度を評価する試みを行っている。このことは生活習慣の改善や治療評価に重要であるだけでなく、各個人の老化の程度を客観的に知ることが可能となるだろう。

人事面では、升永典代医員が平成17年8月31日に退職した。

A. 動脈硬化の成因・治療に関する研究

a. サイトカインと血管新生

末梢虚血性疾患に対する血管新生の遺伝子治療。可溶性 TNF 受容体 1 の発現プラスミドを血管内皮細胞に導入させることにより、血管内皮細胞が増殖することを明らかにした。ラット下肢虚血モデルにおいては、TNF が増加し、血管内皮細胞増殖因子の受容体の KDR が TNF で不活化されていることを証明し、TNF に拮抗する可溶性 TNF 受容体 1 の発現プラスミドにより、KDR が活性化し、血管新生を起こす事を *in vivo* で証明した。その他、血管新生に関する、VEGF、HGF のレセプターが、チロシンリン酸化されることにより活性化されるため、現在、抗チロシンフォスファターゼの抑制による *in vivo* における血管新生の遺伝子治療に関する研究にも取り組んでいる。これらの結果は、将来の虚血性血管病の遺伝子治療に役立つものと考えられる。

b. 動脈硬化進展に対する非侵襲的評価

糖尿病、高血圧、高脂血症などの疾患は生活習慣病として知られており、これらの疾患は病状の進行に従い動脈硬化は促進し、心血管病、脳血管病、認知症などを併発する危険性が高い。また、加齢に伴い血管は老化が進み上記の疾患に罹患する割合も高くなる。非侵襲的検査にて動脈硬化の程度を評価することは生活習慣の改善や治療の評価に重要であるのみならず、各個人の老化の程度を客観的に知ることが可能となる。このため、頸動脈エコー、脈波伝播速度や Ankle-Brachial index を非侵襲的に検査し、血液中の炎症性パラメーター、各種サイトカイン、血糖値、脂質値などの関係を明らかにしている。

B. 心不全の成因および治療に関する研究

a. 心筋梗塞における抗サイトカイン遺伝子療法の開発

可溶性腫瘍壊死因子受容体による心筋梗塞の遺伝子治療 - 心筋梗塞において、ネクローシスのみならずアポトーシスによる心筋細胞死の予防が重要である。心筋虚血において、TNF が増加し、心筋のアポトーシスを起こす。そこで、TNF に拮抗する可溶性 TNF 受容体 1 の発現プラスミドをラット心筋梗塞モデルに投与した。可溶性 TNF 受容体 1 の発現プラスミドは、心筋のアポトーシスを抑制し、有意に梗塞サイズを減少させた。又、心筋梗塞後の心不全に対する影響についても検討した。可溶性 TNF 受容体 1 の発現プラスミドは、心機能を改善させた。TNF の心筋アポトーシスへの効果は、チロシンフォスターゼを介している可能性があり、最近では、チロシンリン酸化による虚血性心疾患の遺伝子治療に関する研究にも取り組んでいる。これらの結果は、将来の心筋梗塞の遺伝子治療に役立つものと考えられる。

b. 不全心における Toll-like receptor (TLR) 4 の役割

心筋梗塞及び心不全患者において血中及び心筋中の炎症性サイトカイン濃度が上昇していることが報告され、これらのサイトカインは自身が心筋収縮抑制作用を持ち、さらに誘導性一酸化窒素またはパーオキシナイトライトを産生し心筋収縮力を低下させることが明らかにされてきたがその機序については依然不明であった。共同研究者である Harvard Univ. Ralph Kelly 準教授らは梗塞心や不全心においてグラム陰性菌菌体成分リポポリサッカライド(LPS)の受容体である TLR が正常心に比較し過剰に発現している事が報告している。この受容体は単にグラム陰性菌感染時における宿主側の免疫応答を司るだけではなく、壊死心筋を直接認識する Pattern Recognition Receptor(PRR)としての役割が示唆されている。

c. マウス心筋梗塞モデル及び心不全モデルを用いた解析

TLR-4 欠損マウスを用いて実験的心筋梗塞モデルを作成し、通常マウスと比較し炎症免疫細胞の浸潤が減弱し最終的に梗塞サイズが減少する事を報告した。現在、そのシグナル伝達において下流にある転写因子 NF- κ B 及び AP-1 の転写活性、さらにはさらなる下流にあるこれらの炎症性サイトカイン及びケモカインの発現の差異について検討中である。

d. 培養心筋細胞を用いた TLR-4 受容体発現機構の解析

TLR-4 が低酸素下にて培養心筋細胞にて通常と比べて過剰に発現する事を突き止めており、この事はさらに不全心における免疫反応を増幅させる役割を示唆し炎症性サイトカインの発現の機序に迫る知見と考えられる。以上の事は、現在まで不明であった不全心における増悪因子である炎症性サイトカインの発現の機序を明らかにする初めての研究であり、従来的心不全治療とは全く異なる新しい免疫学的見地からの治療法を提供する臨床的にも重要視される研究と考えられる。

e. 心不全患者における温熱療法の効果について

温熱療法は、末梢血管を拡張させる事により、血管抵抗を減少させ、心負荷を軽減する事が期待されている。そこで我々は慢性心不全でかつ運動が困難な症例を対象に、単純泉(40度)に週5日、10分間入浴してもらい、心不全の程度、心機能、末梢血管の状態を治療開始前後で比較検討したところ、現在までに、血管内皮細胞機能の改善を示唆する所見が得られている。この事は、温熱効果により末梢血管血流が反復的に増加する事により血管内皮細胞から放出される一酸化窒素が増加することで不全心に対し有益な効果をもたらす事が考察される。

C. 個体の発達、老化の機序に関する分子遺伝学的研究

a. 胎生期マウス脳組織内体細胞 DNA 組み換えの生理学的意義の探索

胎生マウス脳組織において、マウス染色体16番上の特定のゲノム領域(BC-1領域)から環状DNAが産生され、同時期にDNA欠失が起こることを確認している。成マウス、老齡マウスでは、この組換えを検出できていない。今後、この組換えの起こる時期に放射線照射を行い、この組換えの異常を誘発して脳組織の発達にどのような異常が出るのかを追跡する。

b. 末梢血白血球のテロメア長とテロメア修飾の解析による生活習慣病における老化促進の評価

老化に伴う体細胞レベルでのテロメア短縮は、生活習慣病において、その短小化が促進される例が報告されている。動脈硬化による虚血性心疾患患者では、その短小化が促進され、その原因として酸化ストレスの蓄積による影響が示唆されている。しかし、インスリン非依存型糖尿病では、見解が分かれるなど、生活習慣病全般にわたって一定の見解が得られているわけではない。我々は、このテロメア長の分布を解析して、従来よりも詳細な検討を加えることで、より正確に生活習慣病の加齢に対する影響をゲノムレベルで追跡している。現在、九州大学別府先進医療センター循環・呼吸・老年病内科に受診する生活習慣病患者を対象に末梢血有核細胞テロメア長を測定データを蓄積しつつある。

業績目録

原著論文

1. N. Makino, T. Maeda, M. Sugano, S. Satoh, R. Watanabe, N. Abe. 2005
High serum TNF-alpha level in Type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS down-regulation and apoptosis in endothelial cells.
J Diabetes Complications. 19(6): 347-355

2. M. Sugano, K. Tsuchida, T. Hata, N. Makino. 2005
RNA interference targeting SHP-1 attenuates myocardial infarction in rats.
FASEB J. 19(14) :2054-2056.
3. T. Maeda, J. Oyama, Y. Mukai, S. Satoh, M. Sugano, N. Makino. 2005
Cardiac dysfunction with severe anemia in an aged case.
J Am Geriatr Soc. 53(2): 361-362.
4. T. Kadokami, McTiernan CF, Y. Higuichi, Frye CS, T. Kubota, Feldman AM. 2005
17 β -estradiol improves survival in male mice with cardiomyopathy induced by
cardiac-specific tumor necrosis factor- α overexpression.
J Interferon Cytokine Res. 25(5):254-60.
5. Y. Higuchi, T. Yoshida, T. Okamura, S. Kaseda. 2005
Implantation of a Permanent Suprarenal Vena Cava Filter in an Elderly Patient with Inherited
Protein S Deficiency - A Case Report -.
Medical Postgraduates 43: 97-103
6. N. Makino, M. Sugano, S. Satoh, J. Oyama, T. Maeda. 2006
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands attenuate brain natriuretic peptide
production and affect remodeling in cardiac fibroblasts in reoxygenation after hypoxia.
Cell Biochem Biophys. 44(1) : 65-71.
7. M. Sugano, K. Tsuchida, T. Maeda, N. Makino. (in press)
SiRNA targeting SHP-1 accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia
Atherosclerosis
8. T. Maeda, S. Sakoda, T. Suzuki, N. Makino. (in press)
The somatic DNA recombination in brain.
Can.J.Physiol .Pharmacol.
9. T. Maeda, R. Mizuno, M. Sugano, J. Oyama, S. Sakoda, T. Suzuki, N. Makino. (in press)
Somatic DNA recombination in a mouse genomic region, BC-1, in brain and non-brain tissue
Can. J. Physiol. Pharmacol
10. R. Kunisaki, S. Ikawa, T. Maeda, Y. Nakazaki, M. Harata, Y. Shutoh, Yuang Sung Bai, T.
Tanabe, T. Dohi, R. Kato, Y. Ikawa, H. Sekihara, S. Asano and K. Tani. (in press)
p51/p63, a novel p53 homologue, potentiates p53 activity and is a human cancer gene therapy
candidate.

J.Gene. Med.

11. T. Maeda, M. Hatakenaka, M. Sugano, Guan JZ, J. Oyama, Y. Higuchi, H. Muta, M. Nakayama, Y. Nakazaki, R. Kurita, T. Hiroyama, T. Suzuki, K. Tani, N. Makino. (in press)
Familial Turner mosaicism 46XX/45XO with brain calcification.
J.Neuropsychiat.Clin.Neurosci.

12. Y. Higuchi, Chan TO, Brown MA, Zhang J, Degeroge Jr BR, H. Funakoshi, Gibson G, McTiernan CF, T. Kubota, Jones WK, Feldman AM. (In press)
Cardioprotection Afforded by NF- κ B Ablation Is Associated with Activation of Akt In Mice Over-Expressing TNF .
Am J Physiol Heart Circ Physiol.

学会発表

1. 牧野直樹, 渡辺鈴子, 加藤眞由美, 後藤登美, 坂元眞紀子, 柴田美香, 阿部信行
(2005,5/12-14)

2 型糖尿病患者に対する Pioglitazone 長期投与における抗動脈硬化作用
第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会, 神戸市

2. 柴田美香, 渡辺由香, 渡辺鈴子, 阿部信行, 牧野直樹 (2005,5/12-14)
2 型糖尿病患者の頸動脈病変と脈波伝播速度 (PWV) との関係 プラークの有無による評価と治療効果の検討
第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会, 神戸市

3. 菅野公浩, 畑 知二, 土田啓子, 牧野直樹 (2005, 6/10-11)
急性心筋梗塞における SHP-1 の影響と SHP-1 siRNA による予防効果
第 9 回日本適応学会, 宮崎

4. M. Sugano, K. Tsuchida, J. Oyama, T. Maeda, N. Makino (2005, 7/16-17)
SiRNA-mediated inhibition of SHP-1 accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia
第 27 回心筋代謝研究会, 浜松

5. M. Sugano, K. Tsuchida, N. Makino. (2005, 11/13-16)
RNA interference targeting SHP-1 accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia
The 78th Scientific Sessions of American Heart Association, Dallas, USA.

6. 前田豊樹, 菅 静芝, 菅野公浩, 尾山純一, 樋口義洋, 牧野直樹 (2006,2/25)

日本人におけるサブテロミア領域のメチル化の加齢性変化の解析。
別府医師会学術講演会。別府

7. 管 静芝, 前田豊樹, 菅野公浩, 尾山純一, 樋口義洋, 牧野直樹。(2006,2/25)
日本人成人末梢血白血球のテロミア長サイズ別分布の解析。
別府医師会学術講演会。別府

8. 前田豊樹, 管 静芝, 菅野公浩, 尾山純一, 樋口義洋, 牧野直樹(2006/3/4)
健康成人のテロミア近傍メチル化領域の加齢性変化について。
日本老年医学会九州地方会。福岡

9. 管 静芝, 前田豊樹, 菅野公浩, 尾山純一, 樋口義洋, 牧野直樹。(2006,3/4)
健康成人テロミア長分布の検討。
日本老年医学会九州地方会。福岡

10. 前田豊樹。(2006,3/7)
生活習慣病とテロミア長について。
第9回大分循環器セミナー。大分

11. M. Sugano, Y. Higuchi, J. Oyama, N. Makino. (2006,3/24-26)
SiRNA Targeting SHP-1 Inhibits Endothelial Surface Adhesion Molecules Induced by Vascular
Endothelial Growth Factor
第70回日本循環器学会学術集会, 名古屋

12. Y. Higuchi, T. Tung O.Chan, Arthur M. Feldman, N. Makino(2006,3/24-26)
Cardioprotection Afforded by NF- κ B Ablation is Associated with Activation of Akt in Mice
Over-Expressing TNF- α
第70回日本循環器学会学術集会, 名古屋