

[0019]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2004年

<https://doi.org/10.15017/6247>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 19, 2005-07. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :



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球特異的に発現する細胞骨格制御分子 DOCK2 を同定し、この分子がリンパ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。

平成16年4月26日より福井宣規が本分野を担当することとなり、同年9月1日より田中芳彦が、また平成17年3月1日より錦見昭彦が助手として赴任し新しい免疫遺伝学分野がスタートした。また、福井宣規が九州大学研究スーパースター支援プログラムに選出されたことに伴い、特任助手として瀧井良祐が平成17年1月より研究に参加した。國崎祐哉は大学院生として、稲吉あゆみ、野田繭子は科学技術振興機構 戦略的基礎研究推進事業 技術員として引き続き研究に参加した。

A. DOCK2 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。我々は、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した (Nature 412:826-831, 2001; Immunity 19:119-129, 2003)。本年度は *DOCK2* によるリンパ球ホーミングの制御機構、および *DOCK2* シグナル伝達を解明する目的で以下のような研究を行った。

a. リンパ球遊走における *DOCK2* と PI3K の関係

これまで主に *Dictyostelium discoideum* (細胞性粘菌) や好中球を用いた解析から細胞運動における PI3K の重要性が指摘されている。PI3K はイノシト-ルリン脂質のイノシト-ルリングの3位水酸基をリン酸化する脂質キナーゼであり、class I PI3K は2つのグループに大別される。class Ia PI3K は 85KDa の調節ユニットと 110KDa の触媒ユニットからなり、調節ユニットは SH2 ドメインを介してリン酸化チロシン残基に会合することで蛋白-蛋白相互作用に関わっている。一方 class Ib PI3K は G 蛋白質の サブユニットによって活性化される PI3K が P101 アダプター分子と会合して形成され、これまで PI3 ノックアウトマウスを用いた解析から好中球遊走におけるその重要性が指摘されている。

野生型の T 細胞を PI3K の阻害剤である wortmanin で処理してもケモカインに対する遊走活性は非処理群の 70-80% に低下するに過ぎない。このことはリンパ球遊走において、PI3K の関与は *DOCK2* に比べ小さいことを示している。しかしながら *DOCK2* ノックアウトマウスの T 細胞や B 細胞を wortmanin で処理すると、わずかながら残存している遊走活性を完全にブロックすることを見いだした。*DOCK2* と PI3K の2重欠損マウスより T 細胞を単離してケモカインに対する反応性を検討すると、wortmanin 処理と同様に、その遊走活性はほぼ完全にブロックされていた。しかしながら、*DOCK2* 欠損 B 細胞では PI3K 欠損の影響はほとんど認められなかった。以上より *DOCK2* と PI3K は独立してリンパ球遊走を制御しており、*DOCK2* が主、PI3K が従の役割を演じること、また T 細胞では PI3K が主に PI3K 活性を担っているのに対して、B 細胞では恐らく class Ia PI3K が関与していることが明らかとなった。

b. *DOCK2* によるインテグリン活性化の制御

リンパ球をケモカインで刺激するとインテグリンの活性化を介して血管内皮細胞への接着性が亢進する。リンパ球ホーミングとは、言い換えればリンパ球の血管内皮細胞間隙への浸潤であり、それ故このプロセスはリンパ球ホーミングにおいて極めて重要な意味を持つ。リンパ球に

において発現する主なインテグリンとして LFA-1, 4 7, VLA-4 が知られており, それぞれ ICAM-1, MAdCAM-1, VCAM-1 をリガンドとして接着応答を惹起する.

DOCK2 欠損 T 細胞をケモカインで刺激した場合, ICAM-1, VCAM-1 に対する接着性は全く正常であった. しかしながら, DOCK2 欠損 B 細胞では, ケモカイン刺激によるインテグリン活性化が著しく障害されており, その結果生体内で血管内皮細胞に接着する B 細胞の数が著減していた. これまでに辺縁帯 B 細胞の脾臓での局在にインテグリン活性化が重要であることが報告されている. DOCK2 ノックアウトマウスではこの辺縁帯 B 細胞が著減しており, この表現型は恐らく DOCK2 欠損 B 細胞におけるインテグリン活性化の異常に起因するものと考えられる. 以上より, T 細胞の場合と異なり B 細胞では DOCK2 はインテグリン活性化を介してリンパ球ホーミングを制御していることが明らかとなった.

c. DOCK2 シグナル伝達機構の解明

私達はこれまでに DOCK2 の N 端 502 アミノ酸残基と ELMO1 との会合が, 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, ELMO1 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, 現在その機能解析を進めている. また, DOCK2 の細胞内動態をリアルタイムでモニターするため, DOCK2 の C 端に EGFP を挿入した遺伝子産物を発現するノックインマウスの作製を行った. このマウスは分子イメージングへの応用のみならず, 極めて生理的な条件下で, 刺激依存性に DOCK2 と会合する分子の同定に威力を発揮するものと期待される.

B. Phosphatidylserine 受容体(PSR)の機能解析

アポトーシスは不要な, あるいは傷害を受けた細胞を取り除くための基本的な生体反応である. このため多細胞生物体では毎日多くの細胞がアポトーシスに陥るが, これらの細胞はマクロファージによって迅速に処理されることで, 生体の恒常性が維持されている. マクロファージによるアポトーシス細胞の処理は, アポトーシス細胞の認識, 取り込み, DNA 分解の3つのステップにより構成される. マクロファージにおける DNA 分解は DNase1 によって担われていることが明らかにされているが, アポトーシス細胞の認識・取り込みには, CD14, クラス A スカベンジャー受容体, ABC1, 受容体型チロシンキナーゼ MER, $\alpha v \beta_3$ インテグリン, CD36, MFG-E8, GAS6

等の多くの分子の関与が報告されている。ホスファチジルセリン受容体(PRS)もその1つであり、アポトーシス細胞に特有な細胞表面上に露出したホスファチジルセリンを認識する分子として同定されたが、近年 PRS は転写因子ではないかとの報告もあり、その生理的機能は依然として不明である。また、PRS 刺激は DOCK180 を介して低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac を活性化することでアポトーシス細胞の取り込みを惹起すると考えられているが、このシグナル伝達の分子レベルでの理解はなされていない。

我々は PRS の生理的機能を明らかにするため、PRS ノックアウトマウスを樹立し、これらのマウスが炎症反応の惹起とは無関係に、顕著な貧血と T 細胞分化傷害を呈し新生児早期に死亡することを見出した。PRS ノックアウトマウスでは、貪食されていないアポトーシス細胞の割合は増加しているものの、アポトーシス細胞の絶対数は減少していた。このことより、PRS によって直接的あるいは間接的に制御されるアポトーシス細胞の貪食が、線虫において提唱されているフィードバック機構に関与し、分化段階にある細胞の 'cell death machinery' を制御していることが示唆された。このフィードバック機構の本質を明らかにすることで、従来より概念として提唱されてきた「central macrophage」の実体に迫れるのではないかと考えている。

業績目録

原著論文

1. Nombela-Arrieta C, Lacalle RA, Montoya MC, Kunisaki Y, Megías D, Marqués M, Carrera AC, Mañes S, Fukui Y, Martínez-A C, Stein JV. 2004.
Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase γ during T and B lymphocyte homing.
Immunity, 21: 429-441,
2. Kunisaki T, Masuko S, Noda M, Inayoshi A, Sanui T, Harada M, Sasazuki T, Fukui Y. 2004.
Defective fetal liver erythropoiesis and T-lymphopoiesis in mice lacking phosphatidylserine receptor.
Blood, 103: 3362-3364,

総説

1. 福井宣規 . 2004 .
免疫シナプス形成を制御する CDM ファミリー分子 DOCK2 .
Molecular Medicine 増刊「免疫 2005」, 41: 75-83 ,
2. 福井宣規 . 2004 .
MHC による免疫システムの構築 .
ゲノム医学 , 4: 331-336 ,
3. 福井宣規 . 2005 .
リンパ球の運動性を制御する分子 DOCK2 .
医学のあゆみ , 213: 2915-2920

著書

1. Sasazuki T, Fukui Y. 2005.
MHC and Immune Regulation.
HLA 2005, in press

学会発表

1. 福井宣規 . 2004年12月8日
リンパ球細胞高次機能を司るCDMファミリー分子DOCK2
第27回日本分子生物学会年会, シンポジウム, 神戸 .

2. 國崎祐哉, 濱野真二郎, 姫野国祐, 福井宣規 . 2004年12月1-3日
ヘルパーT細胞分化におけるリンパ球細胞骨格制御分子DOCK2の役割
第34回日本免疫学会総会, 札幌 .

3. 福井宣規 . 2004年8月2日
リンパ球細胞高次機能を司るCDMファミリー分子DOCK2
免疫サマースクール2004, 木更津 .

4. 國崎祐哉, 野田繭子, 稲吉あゆみ, 福井宣規 . 2004年6月5日
遺伝子欠損マウスにより明らかにされたホスファチジルセリン受容体(PSR)の新しい機能
Kyoto T cell Conference, 京都 .

5. 福井宣規 . 2004年5月21日
リンパ球細胞高次機能を司るCDMファミリー分子DOCK2
第1回リン酸化研究会, 大阪 .

免疫制御学分野

Division of Molecular and Cellular Immunology

平成16年度は多数の移動があった。九大でのラボの立ち上げ当初から参画してくれた川畑さんが出産のために9月30日付けで、また竹内さんは情報処理関連の専門学校に通うために10月2日付けで退職した。平成17年1月から助手の花田君はオーストリアのPenninger研に留学し17年3月で退職した(4月より大分大学医学部助手転任)。平成17年4月より、学振PDの真嶋君は東京医科歯科大学の助手に、同じくPDの城尾さんはサンデエゴのScripps研へ留学し、研究員の木村さんは松山の病院勤務に、福山君は九州大学病院呼吸器科医員として勤務となった。また学振PDであった武田君はニューヨークに、金城さんはPennsylvania大学へ留学、博士課程4年生だった野波君は輸血部勤務、大石君は17年6月にBostonへ留学予定である。修士課程の守田さんは九州大学医学研究科博士課程予防医学教室に進学した。平成16年度は野波篤、大石正信、武富孝治の3名が博士号学位を、簗田、守田が修士号を修得した。

本年度は特筆すべき研究成果として SOCS による代謝制御、発癌の制御、Spred による mast-cell、好酸球炎症の制御に関する成果が得られた。

A. サイトカインシグナルと癌

細胞増殖因子の受容体の多くは細胞内ドメインにチロシンキナーゼを内在しているかもしくは造血因子やサイトカインの受容体のように JAK 型チロシンキナーゼが非共有結合によって会合している。慢性骨髄性白血病の原因遺伝子 Bcr-Abl から明らかのようにチロシンキナーゼの恒常的活性化は腫瘍や白血病の発生、悪性化に密接に関連している。さらにその下流で働く Ras および STAT は細胞内シグナル伝達系できわめて重要な位置を占める。Ras の恒常的活性化型変異は約 30%の癌にみられ、細胞増殖と密接な関係があることがわかる。また STAT のなかでも特に STAT3 の恒常的な活性化が多くの癌で見い出されており STAT3 が癌遺伝子として働くことも報告されている。Ras/MAP キナーゼや JAK/STAT 経路の正の経路は近年かなりの理解が進んだが負の制御メカニズムに関しては未だ不明な点が多い。またこれらの経路は癌細胞のみならず周辺の細胞、特に炎症細胞でも重要な役割を果たしており癌の進展や免疫からのエスケープ機構にも関与していることが明らかになってきた。我々はこれまでチロシンキナーゼシグナルの制御にかかわる分子を同定しその制御機構と癌、炎症などの病態との関係を解明してきた。JAK

型チロシンキナーゼの制御に関しては CIS/SOCS ファミリーについて，Ras/MAP キナーゼ経路では Src/Spred ファミリーについて報告してきたが，本年度は SOCS1 の癌抑制遺伝子としての新しい作用機序について報告する．

a. SOCS1 の肝癌での発現抑制と SOCS1 の遺伝子メチル化

久留米大学内科学教室の協力を得て C 型肝炎患者，および肝癌患者約 200 名を対象に同意を得た生検サンプルを用いて SOCS1 の発現レベルと遺伝子のメチル化の検索を行った．発現レベルは real-time-RT-PCR 法によって，遺伝子メチル化は bisulfate 処理後の PCR 法によって検出した．まず肝癌部での SOCS1 の発現は非癌部に比べて 30-10% 程度に低下していた．また遺伝子メチル化が起っているものでは発現レベルがメチル化のないものに比べて 50% 以下であった．したがって肝癌においては SOCS1 の遺伝子メチル化に依存的，非依存的な発現レベルの低下が認められた．肝癌での遺伝子メチル化は約 60% であり他の報告とほぼ一致した．このレベルはメチル化がよく起るとされる p16 や E-カドヘリンよりも多く，SOCS1 は肝癌でもっとも遺伝子のメチル化が起る遺伝子のひとつと考えられる．

ところが肝炎を伴わない正常な肝臓でのメチル化が 15% 程度であるのに対して，癌に至らない C 型肝炎患者肝臓でも 50% 程度の遺伝子メチル化が観察された．特にメチル化の頻度は肝繊維化の進行とともに上昇した．このことから SOCS1 遺伝子のメチル化，そしておそらく発現低下は肝炎の進行とともに増加し，癌化のみならず肝炎（炎症）との関連が示唆された．

b. 肝炎，肝癌モデルと SOCS1

そこでジエチルニトロソアミン（DEN）によるマウス肝臓癌モデルを用いて 2 対の SOCS1 遺伝子のうち 1 本を欠損する SOCS1-/+（ヘテロ）マウスと野生型マウス（SOCS1+/+）を用いて肝臓癌の発生率を比較した．その結果ヘテロマウスのほうが野生型マウスよりも 3 倍程度肝臓癌の発症が多かった．またヒトと同様にオスのほうがメスよりも発症が 4 倍程度多かった．この結果より SOCS1 遺伝子の発現低下が肝癌に直接関与することが明かとなった．次にジメチルニトロソアミン（DMN）などの化学物質による肝障害モデルを用いて肝臓の組織破壊，繊維化と STAT, SOCS の関連について調べた．SOCS1-/+ ヘテロマウスでは野生型マウスに比べて DMN による肝障害に感受性が高く，STAT1 の活性化も強かった．また TGF β の産生や肝繊維化も促進されていた．逆に IL-6 レベルが高く SOCS3 の発現誘導がみられ，STAT3 の活性化は減弱していた．また BclX などの抗アポト・シス遺伝子の発現低下がみられた．以上の結果から単純な化学物質による肝障害の系では SOCS1 の発現低下は STAT1 のより強力な活性化をもたらし，結果的にアポトーシスを促進させ，TGF β の産生を促すことで繊維化を促進する．また STAT3 の活性低下によっ

て抗アポトーシス分子の発現が低下し、肝再生も低下することが考えられる。以上の結果より STAT1 が肝繊維化と肝障害の促進に、SOCS1 はその抑制遺伝子であることが示された。

B. SOCS3 によるレプチンシグナルの制御

肥満はエネルギー摂取過剰と消費不足などのエネルギーのインバランスにより惹起される。この不均衡の是正が肥満に関連した各種合併症を防ぐうえで重要である。生体にはエネルギーの摂取と消費のバランスをとり、体重を一定に保とうとするメカニズムが存在し、その中心的働きを担うのがレプチンである。肥満では脂肪組織におけるレプチン産生と分泌が増大することが明らかにされている。ところが慢性的な肥満症では血中レプチン濃度の上昇にもかかわらず肥満が持続するため、レプチンの作用障害(レプチン抵抗性)が起る。そのメカニズムはいくつか示唆されている。その機序については、血液-脳関門でのレプチンの輸送能低下や、負の制御因子によるレプチンシグナル伝達の減弱などが考えられている。サイトカインシグナルの負の制御因子である SOCS ファミリーもレプチン感受性に関与することが示唆されており、そのなかでも特に SOCS3 がレプチンによって誘導されレプチン受容体に会合することが示されてきた。しかし個体レベルでの証明はなされておらずコンディショナルノックアウトを用いた解析が待たれていた。我々は脳特異的な SOCS3 欠損マウスを作成し解析したところ、SOCS3 の欠損によってレプチン感受性が亢進し高脂肪食の摂取によっても肥満にならずレプチン抵抗性、インスリン抵抗性にならないことを見出した。脳内 SOCS3 はレプチン抵抗性を改善する有力な標的遺伝子であることが示された。

C. Spred-1 ノックアウト(KO)マウスの作成と解析

Spred1 KO マウスは脾腫を示した。通常 WT 脾臓には巨核球はほとんど見られないが、Spred-1 KO マウスでは巨核球が増加し、色素の沈着がみられた。肥大脾臓で骨髄性の細胞の増加がみられたことから Spred-1 が造血において負の制御因子であることが示唆された。次にのコロニー形成能を比較したところ、骨髄で約 1.5 倍程、脾臓で Spred1 KO マウスが 5-10 倍多い傾向がみられた。これらのことより Spred-1 が欠失することで造血前駆細胞の数が増加すること、特に脾臓で髄外造血が起こることが示唆された。

そこで造血系の細胞での Spred-1 の発現を確認したところ、骨髄細胞を IL3 および IL5 で誘導したマスト細胞、好酸球で高い発現が認められた。次に、造血系の細胞において増殖因子として働く IL3, SCF に対する応答を骨髄由来の Mast cell を用いて確認しました。すると、WT に比べて KO の mast-cell の方がいずれの刺激に対しても MAPK の活性化や細胞増殖を増強することが

わかった．一方，好酸球は IL5 によって JAK/STAT 経路および Ras/ERK 経路が動くことが知られている．そこで WT 及び Spred1 KO マウスの IL5 誘導性好酸球での Raf-1, ERK および JAK2 の活性化をみたところ，KO 好酸球は Raf-1, ERK の活性化は増強していたが JAK2 の活性化には影響がなかった．以上のことから Spred-1 は JAK/STAT 経路ではなく Ras/Raf/ERK の経路を選択的に負に調節していることが示された．

次に個体での Spred-1 の効果を調べるために WT と KO マウスに IL5 を投与した．定常状態ではマウスの末梢血中には好酸球はほとんど存在しないが，IL5 の投与後増加する．KO の方が好酸球の増加が有意に高いことが分かった．また BM, Spleen 由来細胞において IL5 依存コロニー形成能をみたところ，WT に対して KO の方が高く，KO の好酸球の前駆細胞は IL5 に対して感受性が高いことが分かった．さらに卵白アルブミン (OVA) によって誘導される喘息病態モデルの系で Spred-1 分子の役割を解析した．その結果 KO が WT に比べて抗原による気道収縮が強くなりさらに気管支肺胞洗浄液中の細胞数が約三倍になっており，中でも好酸球が著しく増加していた．したがって Spred-1 は喘息モデルにおいて好酸球浸潤を抑制する分子であることがわかった．以上の結果より，Spred-1 は造血性サイトカインの Ras/MAPK シグナル伝達経路の負の調節因子であると言える．

D . Spred-1 強制発現による癌細胞の転移抑制

Spred-1 は Ras/MAP キナーゼ経路の抑制因子と考えられて来た．我々は Spred-1 や Sprouty-2 を搭載したセンダイウイルスベクターを開発した．これらのウイルスを高転移性癌細胞である LM8 に感染させたところ細胞増殖はほとんど抑制しなかったが，ヌードマウスにおける造腫瘍能は低下した．また肺や肝臓への転移はほとんど認められなくなった．さらにボイデンチャンパーを用いた遊走試験によって CCL19, CCL21 といったケモカインに対する応答も低下していることが明かとなった．その分子機構を明らかにするためにアクチンの状態を調べた．Spred-1 の過剰発現によってアクチン線維の消失が認められた．Spred-1 は細胞骨格系のリモデリングを制御するものと考えられた．そこで RhoA, Rac, cdc42 との会合を調べたところ Spred-1 と RhoA が会合すること，活性化型 RhoA による Rho キナーゼの活性化を Spred-1 が抑制することを見い出した．以上の結果は過剰発現系ながら Spred/Sprouty が Rho を抑制することで細胞運動を制御すること，ひいては転移の抑制にも応用可能であることを示している．

業績目録

原著論文

1. Kobayashi T, Yoshimura A.2005.
Keeping DCs awake by putting SOCS1 to sleep.
Trends Immunol. ;26:177-179.
2. Takatori H, Nakajima H, Kagami S, Hirose K, Suto A, Suzuki K, Kubo M, Yoshimura A, Saito Y, Iwamoto I.2005.
Stat5a Inhibits IL-12-Induced Th1 Cell Differentiation through the Induction of Suppressor of Cytokine Signaling 3 Expression.
J Immunol. ;174:4105-4112.
3. Aki D, Mashima R, Saeki K, Minoda Y, Yamauchi M, Yoshimura A.2005.
Modulation of TLR signalling by the C-terminal Src kinase (Csk) in macrophages.
Genes Cells.;10:357-368.
4. Hanada T, Tanaka K, Matsumura Y, Yamauchi M, Nishinakamura H, Aburatani H, Mashima R, Kubo M, Kobayashi T, Yoshimura A.2005.
Induction of hyper Th1 cell-type immune responses by dendritic cells lacking the suppressor of cytokine signaling-1 gene.
J Immunol. ;174:4325-4332.
5. Ohishi M, Matsumura Y, Aki D, Mashima R, Taniguchi K, Kobayashi T, Kukita T, Iwamoto Y, Yoshimura A.2005.
Suppressors of cytokine signaling-1 and -3 regulate osteoclastogenesis in the presence of inflammatory cytokines.
J Immunol. ;174:3024-3031.
6. Inoue H, Kato R, Fukuyama S, Nonami A, Taniguchi K, Matsumoto K, Nakano T, Tsuda M, Matsumura M, Kubo M, Ishikawa F, Moon BG, Takatsu K, Nakanishi Y, Yoshimura A. 2005.
Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness.
J Exp Med.;201:73-82.
7. Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K.2005.
SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration.
Biochem Biophys Res Commun. ;327:100-105.
8. Takahashi N, Saito Y, Kuwahara K, Harada M, Tanimoto K, Nakagawa Y, Kawakami R, Nakanishi M, Yasuno S, Usami S, Yoshimura A, Nakao K.2005.
Hypertrophic responses to cardiotrophin-1 are not mediated by STAT3, but via a MEK5-ERK5 pathway in cultured cardiomyocytes.
J Mol Cell Cardiol.;38:185-192.
9. Sekine Y, Yamamoto T, Yumioka T, Sugiyama K, Tsuji S, Oritani K, Shimoda K,

- Minoguchi M, Yoshimura A, Matsuda T.2005.
Physical and functional interactions between STAP-2/BKS and STAT5.
J Biol Chem. ;280:8188-8196.
10. Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, Taniguchi E, Kumemura H, Hanada S, Maeyama M, Baba S, Koga H, Kumashiro R, Ueno T, Ogata H, Yoshimura A, Sata M.2004.
Hepatitis C Virus Down-Regulates Insulin Receptor Substrates 1 and 2 through Up-Regulation of Suppressor of Cytokine Signaling 3.
Am J Pathol.;165:1499-1508.
11. Yamagishi S, Abe R, Inagaki Y, Nakamura K, Sugawara H, Inokuma D, Nakamura H, Shimizu T, Takeuchi M, Yoshimura A, Bucala R, Shimizu H, Imaizumi T.2004.
Minodronate, a newly developed nitrogen-containing bisphosphonate, suppresses melanoma growth and improves survival in nude mice by blocking vascular endothelial growth factor signaling.
Am J Pathol.;165:1865-18674.
12. Yamagishi S, Inagaki Y, Nakamura K, Abe R, Shimizu T, Yoshimura A, Imaizumi T.2004.
Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation.
J Mol Cell Cardiol.Aug;37(2):497-506.
13. Kuriyama M, Taniguchi T, Shirai Y, Sasaki A, Yoshimura A, Saito N.2004.
Activation and translocation of PKCdelta is necessary for VEGF-induced ERK activation through KDR in HEK293T cells.
Biochem Biophys Res Commun. ;325:843-851.
14. Nonami A, Kato R, Taniguchi K, Yoshiga D, Taketomi T, Fukuyama S, Harada M, Sasaki A, Yoshimura A.2004.
Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells.
J Biol Chem. ;279:52543-52551.
15. Inagaki-Ohara K, Chinen T, Matsuzaki G, Sasaki A, Sakamoto Y, Hiromatsu K, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Yoshimura A.2004.
Mucosal T cells bearing TCRgammadelta play a protective role in intestinal inflammation.
J Immunol. ;173:1390-1398.
16. Miyoshi K, Wakioka T, Nishinakamura H, Kamio M, Yang L, Inoue M, Hasegawa M, Yonemitsu Y, Komiya S, Yoshimura A.2004.
The Sprouty-related protein, Spred, inhibits cell motility, metastasis, and

Rho-mediated actin reorganization.

Oncogene. ;23: 5567-5576,.

17. Kazemi S, Papadopoulou S, Li S, Su Q, Wang S, Yoshimura A, Matlashewski G, Dever TE, Koromilas AE.2004.
Control of alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 alpha) phosphorylation by the human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein: implications for eIF2 alpha-dependent gene expression and cell death.
Mol Cell Biol. ;24:3415-34129.
18. Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, and Yoshimura A.2004.
SOCS3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity.
Nature Medicine.; 10: 739-743
19. Yoshida T, Ogata H, Kamio M, Joo A, Shiraishi H, Tokunaga Y, Sata M, Nagai, H and Yoshimura A.2004.
SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis.
J Exp Med. ;199: 1701-1707.
20. Murakoshi H, Iino R, Kobayashi T, Fujiwara T, Ohshima C, Yoshimura A, Kusumi A.2004.
Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. ;101; 7317-7322.
21. Yamada S, Taketomi T, Yoshimura A.2004.
Model analysis of difference between EGF pathway and FGF pathway.
Biochem Biophys Res Commun. ;314:1113-1120.
22. Nobuhisa I, Kato R, Inoue H, Takizawa M, Okita K, Yoshimura A, Taga T.2004.
Spred-2 Suppresses Aorta-Gonad-Mesonephros Hematopoiesis by Inhibiting MAP Kinase Activation.
J Exp Med. ;199:737-742.
23. Kamio M, Yoshida T, Ogata H, Douchi T, Nagata Y, Inoue M, Hasegawa M, Yonemitsu Y, Yoshimura A.2004.
SOCS1 inhibits HPV-E7-mediated transformation by inducing degradation of E7 protein.
Oncogene. ;17:3108-3116.
24. Qu L, Huang S, Baltzis D, Rivas-Estilla AM, Pluquet O, Hatzoglou M, Koumenis C, Taya Y, Yoshimura A, Koromilas AE.2004.
Endoplasmic reticulum stress induces p53 cytoplasmic localization and prevents p53-dependent apoptosis by a pathway involving glycogen synthase kinase-3{beta}
Genes Dev. ;18:261-277.

25. Gatto L, Berlato C, Poli V, Tininini S, Kinjyo I, Yoshimura A, Cassatella MA, Bazzoni F.2004.
Analysis of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 promoter responses to interferon.
J Biol Chem. ;279:13746-13754.
26. Joo A, Aburatani H, Morii E, Iba H, Yoshimura A.2004.
STAT3 and MITF cooperatively induce cellular transformation through upregulation of c-fos expression.
Oncogene.;23: 726-734.
27. Kimura A, Kinjyo I, Matsumura Y, Mori H, Mashima R, Harada M, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A.2004.
SOCS3 is a physiological negative regulator for granulopoiesis and G-CSF receptor signaling.
J Biol Chem. ;297: 6905-6910.
28. Fischer P, Lehmann U, Sobota RM, Schmitz J, Niemand C, Linnemann S, Haan S, Behrmann I, Yoshimura A, Johnston JA, Muller-Newen G, Heinrich PC, Schaper F.2004.
The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitisation of interleukin-6 signalling.
Biochem J.;378: 449-460.

総説

1. 花田俊勝, 松村友美子, 真島隆一, 吉村昭彦.2004.
SOCSによる自然免疫と獲得免疫の制御.
実験医学, Vol.22, NO.5(増刊), 666-673.
2. 花田俊勝, 金城市子, 田中謙太郎, 吉村昭彦.2004.
SOCSによる自然免疫と獲得免疫の制御獲得免疫の制御.
炎症と免疫, Vol.12, no.2, 201-209.
3. 吉村昭彦, 花田俊勝, 盛 裕之, 金城市子.2004.
SOCS1, SOCS3による炎症性シグナルの制御.
Annual Review 免疫
4. 井上博雅, 西中村瞳, 真嶋隆一, 吉村昭彦.2005.
CIS/SOCSファミリーによる炎症, アレルギーの制御.
分子呼吸器病, 93-101.
5. 吉村昭彦, 白石裕士, 高木宏美, 小林隆志.2005.
自己免疫疾患とシグナル伝達.
実験医学, Vol.23, No.3(2月号), 377-384.

学会発表

1. 白石裕士，吉村昭彦，吉田裕樹（2004/12/10）.
小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおけるミトコンドリアの役割 .
第 27 回日本分子生物学会年会，神戸 .
2. 小林剛，村上-田中瑞奈，武田美江，吉村昭彦（2004/12/8）.
細胞膜上で一時的に形成される信号複合体における Ras シグナル伝達 .
第 28 回日本分子生物学会年会，神戸 .
3. 簀田泰昌，真嶋隆一，真田貴人，吉村昭彦（2004/12/8）.
LPS 刺激下の活性化マクロファージを用いた TLR シグナルにおける新規分子
ZCCHC11 と TIFA の相互作用 .
第 29 回日本分子生物学会年会，神戸 .
4. 城尾晶子，初沢清隆，橋本仁志，佐伯和子，吉村昭彦，和田郁夫
（2004/12/8）.
分泌系初期経路における t-SNARE D12 動態の解析 .
第 30 回日本分子生物学会年会，神戸 .
5. 安藝大輔，佐伯和子，吉村昭彦（2004/12/8）.
LPS 活性化されたマクロファージにおける C-terminal Src kinase(Csk)の役
割 .
第 31 回日本分子生物学会年会，神戸 .
6. 真嶋隆一，真田貴人，簀田泰昌，吉村昭彦（2004/12/8）.
インターフェロンによって誘導される新規抗炎症分子 FLN29 の機能解析 .
第 32 回日本分子生物学会年会，神戸 .
7. 福田信次，中島欽一，柳澤亮，吉村昭彦，田賀哲也（2004/12/10）.
神経上皮細胞からアストロサイトへの分化におけるサイトカイン応答
遺伝子の解析 .
第 33 回日本分子生物学会年会，神戸 .
8. 加藤玲子，井上博雅，谷口浩二，野波篤，吉村昭彦（2004/12/8）.
Spred 1 は Ras/MAPK 経路を抑制することでマスト細胞の増殖と機能を制
御する .
第 34 回日本分子生物学会年会，神戸 .
9. 真嶋隆一，吉村昭彦（2004/12/1）.
インターフェロンによって誘導される新規抗炎症分子 FLN29 の機能解析 .
日本免疫学会総会，北海道 .
10. 宮崎義之，井上博雅，松村美貴子，松元幸一郎，中野貴子，津田幸，吉
村昭彦，濱野真二郎，吉田裕樹（2004/12/1）.
WSX-1 欠損による Th2 免疫応答の亢進およびマウス気管支喘息の増悪化 .
日本免疫学会総会，北海道 .

11. 高取宏昌, 中島裕史, 廣瀬晃一, 加々美新一郎, 岩本逸夫, 斉藤康, 久保允人, 吉村昭彦 (2004/12/1).
Stat5a による Th1 細胞分化抑制機構の解明.
日本免疫学会総会, 北海道.
12. 関根勇一, 山本哲也, 杉山憲司, 吉村昭彦, 松田正 (2004/12/2).
NF- κ B 活性化機構における新規アダプター分子 STAT-2/BKS の役割.
日本免疫学会総会, 北海道.
13. 辻暁司, 関根勇一, 山本哲也, 杉山憲司, 吉村昭彦, 松田正 (2004/12/2).
新規アダプター分子 STAP-2/BKS 結合分子群の解析.
日本免疫学会総会, 北海道.
14. 金城市子, 濱野真二郎, 山内盛泰, 関陽一, 吉田裕樹, 久保允人, 吉村昭彦 (2004/12/2).
SOCS-3 は CD4+T 細胞の Th3 型分化を制御する.
日本免疫学会総会, 北海道.
15. 知念孝敏, 吉村昭彦 (2004/12/2).
SOCS1 による腸管炎症の制御.
日本免疫学会総会, 北海道.
16. 吉村武, 武田篤信, 宮崎義之, 濱野真二郎, 石井一成, 金城市子, 石橋達郎, 吉村昭彦, 吉田裕樹 (2004/12/2).
IL-27/WSX-1 (IL-27R) シグナル伝達経路の解析.
日本免疫学会総会, 北海道.
17. 井上博雅, 加藤玲子, 福山聡, 松元幸一郎, 中野貴子, 松村友美子, 津田幸, 高津昭彦, 中西洋一, 吉村昭彦 (2004/12/2).
Sprouty-related EVH-1 domain-containing protein (Spry-1) による喘息反応の制御機構.
日本免疫学会総会, 北海道.
18. 西中村瞳, 城尾晶子, 山内盛泰, 花田俊勝, 吉村昭彦 (2004/12/2).
STAT3 による TLR4 シグナル抑制機構の解析.
日本免疫学会総会, 北海道.
塚田旬, 花田俊勝, 知念孝敏, 安部良, 吉村昭彦, 久保允人 (2004/12/2).
サイトカイン抑制シグナル分子 SOCS1 による CD8 樹状細胞の制御.
日本免疫学会総会, 北海道.
19. 松村友美子, 花田俊勝, 吉村昭彦 (2004/12/2).
サイトカインシグナル抑制分子 SOCS3 による樹状細胞の制御.
日本免疫学会総会, 北海道.
20. 田中謙太郎, 花田俊勝, 吉村昭彦 (2004/12/2).
センダイウィルスベクターシステムを用いた樹状細胞への SOCS 遺伝子

の強制発現 .

日本免疫学会総会 , 北海道 .

免疫病態学分野

Division of Clinical Immunology

当部門では診療上、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いる。すなわち、自己免疫疾患や血液疾患におけるリンパ球や免疫グロブリン遺伝子の解析、TNF リガンドファミリー APRIL の解析、細胞内脂肪滴構成蛋白に関する研究などである。

A. 関節リウマチ滑膜内 B 細胞の動態解析

B 細胞除去療法の関節リウマチ (RA)における有効性、抗環状シトルリン化ペプチド抗体など、RA に特異性の高い自己抗体の発見などから、RA の病態形成における B 細胞の重要性が再認識されている。我々は RA 患者滑膜の RT-PCR-SSCP 法による解析により、RA 滑膜では B 細胞のオリゴクローナルな増殖がみられること、その一部は滑膜の離れた部位で共通に存在すること、オリゴクローナルな B 細胞の増殖は長期に渡って安定してみられることを明らかにした。また microdissection 法を用いた滑膜内胚中心様の構造物 (GCLS)の解析で、GCLS 内では B 細胞のオリゴクローナルな増殖がみられ、その一部には段階的な突然変異の蓄積がみられること、しかしクラススイッチはみられないことを明らかにした。さらに免疫グロブリンδ鎖の VH 領域の塩基配列の解析から、B 細胞のオリゴクローナルな増殖には体細胞突然変異の蓄積を伴うものと伴わないものがあることを、また滑膜内 B 細胞のあるものは滑膜内を活発に移動している可能性があることを明らかにした。さらにこのユニークなδ鎖を発現する B 細胞はメモリータイプの IgM⁺IgD⁺ CD27⁺ B 細胞であると考えられ、circulating splenic marginal zone B 細胞類似の B 細胞である可能性を指摘した。現在これらの IgM⁺IgD⁺ CD27⁺ B 細胞が RA の滑膜のどのような病変部に存在するのかを解析中である。

B. TNF リガンドファミリー、APRIL ノックアウトマウスの作成と解析

APRIL は TNF リガンドファミリーに属する Type II 膜蛋白である。APRIL は、同じく TNF リガンドファミリーに属する BAFF とレセプター結合部位に関し、28.7%の相同性を有する。BAFF のノックアウトマウスにおいて、成熟 B 細胞は著明に減少していた。一方 BAFF のトランスジェニックマウスは、B 細胞の著増、血清免疫グロブリンの上昇、抗 DNA 抗体、免疫複合体の出現、腎炎の発症およびそれによる蛋白尿等、ループス様の所見を呈していた。以上の如く、BAFF は B 細胞の成熟、増殖に関与し、自己免疫疾患の原因遺伝子である可能性もある遺伝子である。しかし、その相同蛋白である APRIL に関しては、その詳細な機能は不明である。今回我々は、APRIL の全長をノックアウトしたマウスを作成し、解析しているところである。

C. 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植法を用いた全身性強皮症の治療法の開発

全身性強皮症は皮膚の硬化と様々な臓器病変を伴い、広範で高度の皮膚硬化は生活の質を著しく障害し、心肺腎などの病変は生命予後を左右する。強皮症の原因は不明であるが、病初期には自己免疫学的機序が働き、後期には線維芽細胞の増殖がおこると考えられている。これまで様々な免疫抑制剤による治療が試みられているが、有効な治療法はない。侵襲の少ない骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植法を用いて、免疫系の再構築を計り、強皮症を治癒させる試み、すなわち合併症、治療関連死の少ない骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植法を全身性強皮症へ応用し、新規治療法の開発を行う。プロトコルの作成、安全性と臨床効果の判定、キメラズムの解析、免疫系の解析を行う。

D. 細胞内脂肪滴構成蛋白の発現調節機構と機能解析および病態における検討

a. adipose differentiation-related protein (ADRP)の発現調節機構

ADRP は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関与していると推測されるが、その機能はよく分かっていない。肝細胞、マクロファージなどに極めて高い発現を認める。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した。とくにプロモーター上の Ets/AP-1 複合配列が極めて重要なエレメントであることを明らかにした。この蛋白の発現や機能を制御する方法を開発し、細胞内脂肪の過剰蓄積に基づく病態、たとえば脂肪肝、動脈硬化、インスリン抵抗性症候群などの治療への応用を探索する。

b. ADRP の病態における意義の検討

末梢血白血球における ADRP mRNA の発現量を定量 PCR 法で測定したところ、糖尿病や関節リウマチの患者で有意に発現量が高い傾向を認めた。これらの疾患は動脈硬化性病変の発症率が高い疾患であることから、ADRP 発現量と動脈硬化進展との関連を探るため、多数例の患者において末梢血白血球における ADRP mRNA 発現量と動脈硬化の危険因子、頸動脈内膜中膜複合体厚などを経時的に追跡する研究を開始したところである。

c. ADRP と共役する蛋白の探索

ADRP と細胞質内で結合する蛋白として Yeast two hybrid System によりスクリーニングした PME-1 について、その生化学的解析を行っている。

E. 代替医療探索研究の推進

九州大学病院統合に伴い、別府先進医療センターの研究機能の一翼を担うため、特定保健食品、生薬、温泉など、いわゆる代替医療の効用に関する科学的エビデンスを集積する「代替医療探索研究拠点」の形成をめざしている。現在、大分県内の酒造会社と大分大

学との共同研究により, 大麦焼酎粕エキスの生体に及ぼす効果について, DNA アレイを用いた解析を行なっている. ラット肝を用いた研究から, 脂肪肝抑制効果に関与すると考えられる種々の遺伝子の変動を検出しており, さらに解析を進めている.

業績目録

原著論文

1. Shiratsuchi M, Suehiro Y, Oshima K, Shiokawa S, Nishimura J. 2004.
Extranodal multiple involvement of enteropathy-type intestinal T cell lymphoma without expression of CC chemokine receptor 7.
Int J Hematol. 79, 44-47.
2. Choi I, Abe Y, Otsuka R, Matsushima T, Tachikawa Y, Nagasawa E, Nishimura J, Inaba S, Nawata H, Muta K. 2004.
Successful treatment with nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient with acute myeloid leukemia complicated with pulmonary infection.
Int J Hematol. 78, 92-94.
3. Takeshita M, Okamura S, Oshiro Y, Okamoto S, Matsuki Y, Nakashima Y, Okamura T, Shiratsuchi M, Hayashi T, Kikuchi M. 2004.
Differences between 22 cases of CD56-negative and CD56-positive subcutaneous panniculitis-like lymphoma in Japan.
Hum Pathol. 35, 231-239.
4. Takeshita M, Imayama S, Oshiro Y, Kurihara K, Okamoto S, Matsuki Y, Nakashima Y, Okamura T, Shiratsuchi M, Hayashi T, Kikuchi M. 2004.
Clinicopathologic analysis of 22 cases of subcutaneous panniculitis-like CD56- or CD56+ lymphoma and review of 44 other reported cases.
Am J Clin Pathol. 121, 408-416.
5. Muta K, Oshima K, Abe Y, Uike N, Choi I, Matsushima T, Nishimura J, Nakashima M, Watababe T, Nawata H. 2004.
Expression of apoptosis-associated protein RCAS1 in adult T-cell leukemia/lymphoma.
Int. J. Hematol. 79, 340-344.
6. Maeda T, Shiokawa S, Yoshikawa Y, Hiroyama T, Nakajima Y, Muta H, Nakayama M, Nakazaki Y, Akizuki S, Shimizu K, Mutoh T, Somada S, Kurita R, Shiratsuchi M, Makino N, Nishimura J, Tani K. 2004.
Successful treatment of pure red cell aplasia of an 88-year-old case with cyclosporin A and

erythropoietin after thymectomy.

Haematologica. 89, ECR17.

7. Maeda T, Mutoh T, Muta H, Nakayama M, Yasuda M, Etoh T, Shimizu K, Nakazaki Y, Hiroyama T, Somada S, Kurita R, Tani K, Shiratsuchi M, Nishimura J. 2004.
An 85-year-old Japanese woman with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia with del(5q) successfully treated by intermittent imatinib therapy.
J. Am. Geriatr. Soc. 52, 1783-1784.
8. Kunishima S, Matsushita T, Shiratsuchi M, Ikuta T, Nishimura J, Hamaguchi M, Naoe T, Saito H. 2005.
Detection of unique neutrophil non-muscle myosin heavy chain-A localization by immunofluorescence analysis in MYH9 disorder presented with macrothrombocytopenia without leukocyte inclusions and deafness.
Eur. J. Haematol. 74, 1-5.
9. Zang M, Abe Y, Matsushima T, Nishimura J, Nawata H, Muta K. 2005.
Selective cyclooxygenase 2 inhibitor NS-398 induces apoptosis in myeloma cells via a Bcl-2 independent pathway.
Leuk. Lymph. 46, 425-433.
10. Abe Y, Matsushima T, Tachikawa Y, Nagasawa E, Nishimura J, Nawata H, Muta K. 2005.
Fludarabine-based conditioning used in successful bone marrow transplantation from an unrelated donor in a heavily transfused patient with severe aplastic anemia.
Int. J. Hematol. 81, 81-82.
11. Suehiro Y, Muta K, Nakashima M, Abe Y, Shiratsuchi M, Shiokawa S, Ikuyama S, Yoshikawa Y, Watanabe T, Nishimura J. 2005.
A novel mechanism in suppression of erythropoiesis during inflammation: a crucial role of RCAS1.
Eur. J. Haematol. 74, 365-373.
12. Nakashima Y, Shiratsuchi M, Tani K, Abe Y, Muta K, Shiokawa S, Nishimura J. 2005.
Molecular remission by nonmyeloablative stem cell transplantation after autologous peripheral blood stem cell transplantation in a patient with multiple myeloma.
Leuk. Lymph. in press.
13. 永澤恵理子, 安部康信, 松島孝充, 崔日承, 立川義倫, 西村純二, 稲葉頌一, 名和田新, 牟田耕一郎. 2004.
第1再発期に骨髓非破壊の同種末梢血幹細胞移植を施行した高齢者(70歳)急性骨髄性白血病.
臨床血液. 45, 167-169.
14. 合田英明, 白土基明, 谷口 晋, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二. 2004.

- SLEをはじめとする膠原病類似の病態を呈したヒトパルボウイルス B19 感染症の 10 例.
九州リウマチ. 23, 188-194.
15. 椋園 宏, 白土基明, 谷口 晋, 坂井義之, 福富崇能, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二. 2004.
著明な低フィブリノゲン血症を合併した全身性エリテマトーデスの一例.
九州リウマチ. 23, 206-210.
16. 豊田美夏, 谷口 晋, 白土基明, 生田卓也, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二. 2004.
H. pylori 除菌療法が有効であった全身性エリテマトーデスに合併した二次性自己免疫性血小板減少症.
九州リウマチ. 24, 66-70.
17. 合田英明, 生田卓也, 末廣 悟, 椋園 宏, 白土基明, 谷口 晋, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二. 2004.
全身性硬化症に合併したリンパ芽球性リンパ腫の 1 例.
九州リウマチ. 24, 71-76.
18. 中嶋康博, 安部康信, 大塚理恵, 立川義倫, 永澤恵理子, 西村純二, 大島孝一, 名和田 新, 牟田耕一郎. 2004.
赤芽球癆と自己免疫性貧血を合併した濾胞性リンパ腫.
臨床血液. 45, 167-169.
19. 園田紀之, 井口登與志, 今村美菜子, 森永秀孝, 小林邦久, 江藤隆, 佐藤直市, 関口直孝, 野村政壽, 名和田 新, 谷口晋, 生山祥一郎. 2004
脂肪滴関連蛋白 ADRP トランスジェニックマウスの解析 細胞内中性脂肪蓄積の意義に関する検討.
Therapeutic Research. 25, 1406-1409.
20. 生田卓也, 本村誠一, 大野博文, 白土基明, 塩川左斗志, 谷口 晋, 生山祥一郎, 西村純二, 境 隆太郎. 2005.
リウマチ性多発筋痛症の診断 3 年後に発症した慢性骨髄単球性白血病の 1 例.
九州リウマチ. 24, 173-178.
21. 谷口 晋, 生山祥一郎, 安田幹彦, 森 正樹, 西村純二. 2005.
非 Clostridium 性ガス産生性感染症を合併した 2 型糖尿病の 3 例.
糖尿病. In press.

総説

1. 吉河康二, 塩川左斗志, 西村純二. 2004.
サルコイドーシス(図説).

- 大分県医学会雑誌, 22, 1-2.
2. 生山祥一郎. 2004.
粘液水腫昏睡.
総合臨床, 53, 救急マニュアル2004, 1179-1182.
 3. 塩川左斗志, 末広 悟, 西村純二. 2004.
関節リウマチの病態と最新治療の動向.
大分県医学会雑誌, 22, 3-7.
 4. 塩川左斗志. 2005.
RA 患者の疼痛対策.
Medical Practice, 22, 473-476.

著書

1. 西村純二. 2004.
血液・造血器疾患, 白血球系の異常.
Year note 内科・外科編(14版)2005, G38-56.
Medic Media, 東京.
2. 生山祥一郎. 2004.
甲状腺が診られなきゃ向上せん！-甲状腺疾患を診るポイントとコツ-.
内分泌疾患のとらえかた-眼でみるベッドサイドの病態生理-, 72-87.
文光堂, 東京.
3. 谷口 晋. 2004.
原因不明は自己免疫？-自己免疫性内分泌疾患-.
内分泌疾患のとらえかた-眼でみるベッドサイドの病態生理-, 242-252.
文光堂, 東京.
4. 坂井義之, 生山祥一郎, 名和田 新. 2004.
小さな爆弾, 褐色細胞腫-その臨床型と徴候-
内分泌疾患のとらえかた-眼でみるベッドサイドの病態生理-, 178-187.
文光堂, 東京.
5. 西村純二. 2005.
慢性骨髄性白血病.
Year note 主要病態・主要疾患論文集 2006. 1133-1140.
Medic Media, 東京.

学会発表

国際学会

1. Shiratsuchi M, Motomura S, Ikyuta T, Ohno H, Shiokawa S, Nishimura J (2004, 12/4-12/7).
Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of systemic sclerosis.
46th Annual Meeting of American Society of Hematology, San Diego.
2. Ikuyama S, Wei P, Taniguchi S, Inoguchi T, Nawata H, Nishimura J (2004, 8/31-9/4).
Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) is conjointly regulated by PU.1 and AP-1 in macrophages.
12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal.

シンポジウム

3. 生山祥一郎, 谷口 晋, 魏 平, 井口登興志, 名和田 新, 西村純二 (2004, 6/24-6/26).
シンポジウム「脂肪細胞, 脂肪蓄積と糖代謝異常」.
細胞内脂肪蓄積に関わる蛋白 adipose differentiation-related protein (ADRP)の組織特異的な発現調節機構.
第77回日本内分泌学会学術総会, 京都.

国内学会

4. 豊田美夏, 椋園 宏, 白土基明, 谷口 晋, 秋岡博子, 生田卓也, 末広 悟, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二 (2004, 2/7).
自己免疫性血小板減少に対し, ピロリ除菌療法が有効であった SLE.
第264回日本内科学会九州地方会, 福岡.
5. 秋岡博子, 末広 悟, 豊田美夏, 茶園智人, 椋園 宏, 白土基明, 谷口 晋, 合田英明, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二 (2004, 2/28-2/29).
関節リウマチ患者に対するレフルノミドの使用経験.
第27回九州リウマチ学会, 長崎.
6. 末広 悟, 秋岡博子, 椋園 宏, 白土基明, 豊田美夏, 茶園智人, 谷口 晋, 合田英明, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二 (2004, 2/28-2/29).
関節リウマチ患者に対するインフリキシマブの投与経験.
第27回九州リウマチ学会, 長崎.
7. 谷口 晋, 生山祥一郎, 西村純二 (2004, 3/6).
抗鬱剤投与, 感染を契機に悪性症候群を呈した ACTH 単独欠損症の1例.
第14回日本老年医学会九州地方会, 福岡.
8. 前田豊樹, 寛山 隆, 中嶋康博, 牟田浩美, 中山雅晴, 中崎有恒, 清水佳奈子, 谷憲三朗, 塩川左斗志, 白土基明, 西村純二, 吉河康二, 秋月真一郎 (2004, 3/6).
胸腺摘徐後免疫抑制剤シクロスポリン A とエリスロポエチン投与により良好な経過を辿った胸腺腫を伴う高齢者(88歳)真性赤芽球ろうの一例.
第14回日本老年医学会九州地方会, 福岡.

9. 塩川左斗志, 宮原寿明, 西村純二 (2004, 4/15-4/17).
関節リウマチ(RA)関節滑膜の胚中心様構造内 B 細胞のクローナリティーの解析.
第 48 回日本リウマチ学会総会, 岡山.
10. 椋園 宏, 白土基明, 豊田美夏, 秋岡博子, 末廣 悟, 合田英明, 谷口 晋, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村 純二 (2004, 4/15-4/17).
著明な低フィブリノゲン血症を伴った全身性エリテマトーデスの兄弟発症例.
第 48 回日本リウマチ学会総会, 岡山.
11. 生山祥一郎, 谷口 晋, 魏 平, 井口登輿志, 名和田 新, 西村純二 (2004, 5/13-5/15).
細胞内脂肪蓄積に関わる蛋白 adipose differentiation-related protein (ADRP)の PPAR γ による発現調節機構.
第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京.
12. 谷口 晋, 生山祥一郎, 安田幹彦, 西村純二 (2004, 5/13-5/15).
非クロストリジウム性ガス産生菌感染症をきたした糖尿病の 3 例.
第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京.
13. 園田紀之, 井口登与志, 今村美菜子, 小林邦久, 関口直孝, 江藤隆, 野村政壽, 名和田 新, 谷口晋, 生山祥一郎, 森永秀孝 (2004, 5/13-5/15).
脂肪滴関連蛋白質 ADRP トランスジェニックマウスの解析.
第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京.
14. 武藤敏孝, 牟田浩実, 中山雅晴, 前田豊樹, 清水佳奈子, 杉田真一, 谷憲三朗, 白土基明, 西村純二 (2004, 5/22).
メシル酸イマチニブが有効であった高齢者慢性骨髄性白血病(CML)の一例.
第 265 回日本内科学会九州地方会, 那覇.
15. 魏 平, 谷口 晋, 井口登輿志, 名和田 新, 西村純二, 生山祥一郎 (2004, 6/24-6/26).
マクロファージ adipose differentiation-related protein (ADRP)遺伝子の発現調節における転写因子 PU.1/AP-1 の協調作用.
第 77 回日本内分泌学会学術総会, 京都.
16. 谷口 晋, 魏 平, 井口登輿志, 名和田 新, 西村純二, 生山祥一郎 (2004, 6/24-6/26).
細胞内脂肪蓄積に関わる蛋白 adipose differentiation-related protein (ADRP)の PPAR γ による発現調節機構.
第 77 回日本内分泌学会学術総会, 京都.
17. 西村純二 (2004, 7/10).
リウマチ性疾患の治療-最近の話題-.

- 日本内科学会関東支部主催第 30 回生涯教育講演会, 東京.
18. 永澤恵理子, 牟田耕一郎, 安倍康信, 立川義倫, 大塚理恵, 西村純二, 名和田 新 (2004, 7/16-7/17).
PPAR ligand はヒト赤芽球系前駆細胞の分化を遅延させる.
第 41 回日本臨床分子医学会学術集会, 福岡.
 19. 魏 平, 生山祥一郎, 谷口 晋, 井口登輿志, 名和田 新, 西村純二 (2004, 7/16-7/17).
マクロファージ活性化における ADRP 遺伝子の発現調節機構.
第 41 回日本臨床分子医学会学術総会, 福岡.
 20. 生田卓也, 本村誠一, 白土基明, 塩川左斗志, 谷口 晋, 生山祥一郎, 境 隆太郎, 西村純二 (2004, 9/4-9/5).
リウマチ性多発筋痛症の診断 3 年後に発症した慢性骨髄単球性白血病の一例.
第 28 回九州リウマチ学会, 久留米.
 21. 永澤恵理子, 牟田耕一郎, 安倍康信, 立川義倫, 大塚理恵, 西村純二, 名和田 新 (2004, 9/17-9/19).
PPAR ligand はヒト赤芽球系前駆細胞の分化を遅延させる.
第 66 日本血液学会, 第 46 回日本臨床血液学会, 京都.
 22. 立川義倫, 板野誠治, 牟田耕一郎, 安倍康信, 永澤恵理子, 大塚理恵, 西村純二, 名和田 新 (2004, 9/17-9/19).
赤芽球前駆細胞の分化・増殖制御における Notch シグナルの役割.
第 66 日本血液学会, 第 46 回日本臨床血液学会, 京都.
 23. 前田豊樹, 寛山隆, 中嶋康博, 谷憲三朗, 牟田耕一郎, 塩川左斗志, 白土基明, 西村純二, 吉河康二 (2004, 9/17-9/19).
胸腺摘後免疫抑制剤シクロスポリン A とエリスロポエチン投与により良好な経過を辿った胸腺腫を伴う高齢者真性赤芽球ろうの一例.
第 66 日本血液学会, 第 46 回日本臨床血液学会, 京都.
 24. 本村誠一, 白土基明, 生田卓也, 大野博文, 塩川左斗志, 西村純二 (2004, 12/16-12/17).
全身性強皮症に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植.
第 26 回日本造血細胞移植学会, 岡山.
 25. 豊田美夏, 園田浩一郎, 大野博文, 本村誠一, 谷口 晋, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二 (2005, 2/5).
全身性エリテマトーデス関連血球貪食症候群の 1 例.
第 268 回日本内科学会九州地方会, 福岡.
 26. 合田英明, 末廣 悟, 本村誠一, 谷口 晋, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二 (2005,

3/5).

痴呆症状を呈した高齢者悪性貧血の一例.

第 15 回 日本老年医学会九州地方会, 大分.

27. 藤森 尚, 茶園智人, 本村誠一, 谷口 晋, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 吉河康二, 西村純二 (2005, 3/5-3/6).

両下肢壊疽を呈した悪性関節リウマチの一例.

第 29 回九州リウマチ学会, 福岡.

28. 塩川左斗志, 西村純二 (2005, 4/17-4/20).

関節リウマチ (RA) と変形性関節症 (OA) 関節滑膜における B 細胞のクロナリティーの相違.

第 49 回日本リウマチ学会総会, 横浜.

29. 本村誠一, 白土基明, 生田卓也, 大野博文, 谷口晋, 塩川左斗志, 生山祥一郎, 西村純二 (2005, 4/17-4/20).

骨髓非破壊的同種造血幹細胞移植法を用いた全身性強皮症治療の試み.

第 49 回日本リウマチ学会総会, 横浜.

所員名簿

分野: 個体機能制御学部門 免疫病態学分野

(九州大学病院 別府先進医療センター 免疫・生活習慣病内科
免疫・血液・代謝内科専門診療科)

教授 : 西村純二

助教授 : 生山祥一郎

講師 : 塩川左斗志

助手 : 谷口 晋

本村誠一

医員 : 末廣 悟

秋岡博子

大野博文

研修医 : 藤森 尚

園田浩一郎

長 昭洋

非常勤講師 : 合田英明

研究補助員 : 河野江利子

小田和美

倉橋優子

大学院生 : 魏 平

谷 剣秋

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になると考えられる。一方で、哺乳類においては、細胞の増殖と分化、あるいは細胞増殖の停止とプログラム細胞死の誘導といった細胞運命の制御は、正常な細胞の機能や組織の恒常性を維持するための最も根幹的なメカニズムである。

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」の解明を目指して研究を進めている。さらに、脳・神経細胞における遺伝子発現の制御に関わるシグナル分子、転写因子及びその標的の解析から、神経前駆細胞の増殖・分化そして神経細胞死など「脳・神経細胞の運命決定機構」の解明を進めるとともに、「脳ゲノム機能の制御機構」の解明を目指している。

平成16年度の人事異動は次の通りであった。大学院医学系学府医科学専攻修士課程大学院生として一年次の中島めぐみ、野中麻里の2名が新たに加わった。平成16年8月31日付けで休職渡航中の富永洋平助手が辞職した。平成17年3月末で Mehrdad Behmanesh が学位取得の上修了、帰国した。平成17年3月末で大学院生の鳥巢久美子が単位取得の上退学した。

A. 活性酸素によるゲノム障害とその防御機構に関する研究

ゲノム DNA への修飾、損傷塩基の蓄積は、遺伝情報の変化とその結果生じる突然変異やプログラム細胞死をひきおこす大きな原因である。ゲノム DNA 中の損傷塩基は2つの独立した経路で生じると考えられている。ひとつは DNA 中の正常な塩基の直接の修飾によるものであり、もうひとつはヌクレオチドプール中で生じた修飾ヌクレオチドが取込まれる場合である。我々はこれまで、ゲノム DNA 中の酸化プリン塩基(8-oxoG, 2-OH-A)の除去修復酵素 OGG1, MUTYH, APEX2 とプリンヌクレオチドの酸化体, 8-oxo-dGTP/8-oxo-GTP, 2-OH-dATP/2-OH-ATP の分解排除に関わる MTH1 の機能解析を進めてきた。

平成16年度は、ヌクレオチドプール中で生じた修飾ヌクレオチドの一種である脱アミノ化プリンヌクレオチド三リン酸の分解排除に関わると期待される ITPA と、複製中にゲノムに取り込

まれた 2-OH-dATP の修復に関わる MUTYH について解析を進め以下の結果を得た。

a. 酸化的脱アミノ化を受けたプリンヌクレオシド三リン酸の浄化機構

プリンヌクレオチドの酸化的脱アミノ化反応により生じる ITP/dITP と XTP/dXTP はイノシン三リン酸ピロフォスファターゼ (ITPase) により分解されると考えられている。大腸菌では ITPase 蛋白質をコードする *rdgB* 遺伝子の変異体は、単独では生存可能であるが *recA* 変異あるいは *recBC* 変異と同時に存在すると致死性を示す。ITPase 欠損がヌクレオチドプール中の dITP や dXTP といった基質ヌクレオチドの蓄積をもたらし、それが原因で DNA 中のデオキシイノシンやデオキシキサンチンが増加、さらに *recA* 変異体あるいは *recBC* 変異体ではこれらの損傷塩基の除去修復が染色体の断片化をひきおこしている可能性が示唆されている。

ヒトや哺乳類では ITPase の生物学的重要性やその欠損の結果生じる病態については、まだ解明されていない。哺乳類における ITPase の生物学的重要性を探るためには、マウスの ITPase をコードする遺伝子 (*Itpa*) を破壊し、その変異マウスを解析することが最適な実験方法のひとつであると考えられる。我々はレトロ組換え法によって単離された 2 番染色体 F3 に存在するイントロンを有する *Itpa* 遺伝子に加え、1 つの processed-*Itpa* 遺伝子類似配列と 2 つの processed-*Itpa* 偽遺伝子をマウスゲノムの中に発見した。さらに我々は、マウス組織の RNA 中に 3 種類 (A, B, C) の *Itpa* 転写産物を同定した。2 番染色体 E1 に存在する processed-*Itpa* 遺伝子類似配列は type A 転写産物がコードする ITPase (ITPA) とまったく同じポリペプチド配列をコードする完全なオープンリーディングフレームと polyadenylation signal 配列を有している。しかし、調べたすべてのマウス組織においてこの配列由来の転写産物は検出されなかったため、我々はこの配列を *Itpa* processed 偽遺伝子 と命名した。調べたすべてのマウス組織で発現していた type A の *Itpa* mRNA は、dITP を dIMP に加水分解する活性をもつ 198 アミノ酸からなるマウス ITPA ポリペプチドをコードする。*Itpa* mRNA は調べたすべての組織で検出され、その発現は精巣、脳、胸腺で特に高かった。脳の神経細胞では、ITPA 蛋白質は主に細胞質に検出されたが、核でも低いレベルながら検出された。また、肝臓では肝細胞、胆管の上皮細胞、門脈の内皮細胞の細胞質と核で発現が観察された。

現在、ITPA 欠損マウスを樹立し、その表現形の解析を進めているが、ホモ欠損マウスは生後 2-3 週間で死亡することが明らかになっている。

b. MUTYH の 2-ヒドロキシアデニン DNA グリコシラーゼ活性についての機能解析

MUTYH 蛋白質はアデニン DNA グリコシラーゼ活性により DNA 中の 8-オキシグアニンに誤対合したアデニンを切り出し、塩基除去修復反応を開始することで G:C T:A の突然変異を防ぐ。近年、*APC* 遺伝子に生殖細胞系列の変異が見つからない家族性大腸腺腫症患者にお

いて *MUTYH* 遺伝子の変異の存在が報告された。このような患者ではポリープやがん化した組織の *APC* 遺伝子に G:C T:A 変異が生じており、*MUTYH* の機能欠損がその原因として注目を集めている。我々は、ヒト *MUTYH* と 90%以上の相同性を持つマウス *MUTYH*(m*MUTYH*) をチオレドキシニン融合蛋白質として安定に発現精製することに成功し、精製 m*MUTYH* 蛋白質を用いた *in vitro* 修復反応系を構築した。

アデニンの酸化で生じる 2-OH-A は、グアニンの酸化体 8-oxoG と同様に、生体内において DNA 複製の際に誤塩基対合を形成することで突然変異を引き起こすことが知られている。我々は、精製 m*MUTYH* 蛋白質を用いて、m*MUTYH* が DNA 中の 8-oxoG に対して誤まって取り込まれたアデニンだけでなく、グアニンと誤対合した 2-OH-A を切り出す DNA グリコシラーゼ活性を持つことを示した。m*MUTYH* 蛋白質は、アデニンと 8-oxoG 誤対合を含む DNA とは安定な複合体を形成するが 2-OH-A とグアニンの誤対合を含む DNA への結合は非常に弱いことから、m*MUTYH* 蛋白質によるこれら 2 つの基質の認識および結合様式が異なることが示唆され、この違いは下流の修復経路の複雑さに関係することが推測された。ヒト家族性大腸腺腫症患者で報告されている *MUTYH* の生殖細胞系列の変異 (G382D) に相当する変異型 m*MUTYH*(G365D) では、野生型 *MUTYH* と同等レベルの 8-oxoG に誤対合したアデニンを切り出す酵素活性が認められたが、グアニンに誤対合した 2-OH-A を切り出す酵素活性が著明に低下していた。この結果は、G382D 変異型 *MUTYH* 遺伝子を有する家族性大腸腺腫症患者において、DNA 中の 2-OH-A に対する修復能の低下が体細胞における *APC* 遺伝子の G:C T:A 変異、ひいては大腸腺腫症の発症の原因である可能性を示唆するものである。

B. 脳・神経細胞の運命決定機構に関する研究

Fos ファミリーに属する蛋白質は、AP-1 (activator protein-1) の構成因子として細胞の増殖・分化やプログラム細胞死など細胞運命の調節に関わる多くの遺伝子の転写を制御することで、正常な細胞の機能や組織の恒常性に維持に関わっている。我々は、これまでに AP-1 サブユニットの1つである Δ FosB が、細胞増殖・分化、そして細胞死を制御する機能を有し、かつその細胞増殖の制御が部分的ながら α -ガラクトシド糖結合性レクチンであるガレクチン-1 に依存していることを明らかにしてきた。

平成16年度は一過性前脳虚血モデルを用いて、脳組織における神経変性と神経新生における Δ FosB とガレクチン-1 の発現及び機能解析を進め、以下の結果を得た。

a. FosB による神経前駆細胞の増殖と分化の制御

fosB 遺伝子産物である FosB 及び Δ FosB 蛋白質の成体ラット脳における発現は非常に低いが、一過性の前脳虚血や興奮毒性といった種々の脳障害後の神経細胞脱落に先立って、c-Fos, c-Jun, JunB といった他の AP-1 蛋白質とともにその発現も海馬で顕著に誘導される。

AP-1 蛋白質の中で、c-Fos の発現誘導は非常に早くかつ一過性で、その発現レベルは一過性の前脳虚血後 2-3時間程度で元のレベルに復帰する。一方、FosB 及び Δ FosB、あるいは c-Jun の発現は障害後の 2-48 時間まで持続的に上昇が認められる。JunB の発現レベルは一過性の虚血後の 12-24 時間まで緩やかに上昇するが、JunD の発現レベルは障害前後でほとんど変化しない。JNK3 などの Jun アミノ末端リン酸化酵素による c-Jun のリン酸化がアポトーシスあるいは神経変性において重要な役割を持つことから、一過性の前脳虚血後の AP-1 蛋白質の発現誘導はこのような脳障害によって引き起こされる神経脱落に関与していると考えられている。

我々は、一過性の前脳虚血後の2日目に海馬に加えて脳室壁内の細胞で Δ FosBの発現のみが選択的に誘導され、FosBの発現は誘導されない事、さらに成体脳の神経前駆細胞のマーカーの1つであるクラス IV 中間径フィラメント蛋白質、すなわちネスチンの発現が Δ FosB を発現している海馬及び脳室壁内の細胞で顕著に上昇している事を見出した。虚血後7日目には Δ FosBの発現はほぼ元の低いレベルに戻っていたが、ネスチン陽性細胞は海馬のCA1 や歯状回(DG)領域に加えて大脳皮質の虚血巣の周囲に集積し、新生神経細胞と考えられる5-ブromoデオキシウリジン(BrdU)陽性細胞もほぼ同様の部位に集積していた。

FosB と Δ FosB の神経前駆細胞における発現の影響を解析する目的で、EGFP-IRES-FosB および EGFP-IRES- Δ FosB を発現するアデノウイルスベクターを構築した。脳皮質と脳室表層を覆っている放射状グリアや放射状細胞などの神経前駆細胞はアデノウイルスレセプター(CAR)を最も高いレベルで発現している事が示されており、そのためアデノウイルスはこれらの細胞に非常に感染しやすいことが証明されている。実際、MOI=1 でアデノウイルスベクターをラット胚由来の初代培養脳皮質細胞に感染させたところ、EGFP 陽性の感染細胞はほとんどが MAP2 や β -tubulin III 陰性で、アデノウイルスベクターは成熟神経細胞にはほとんど感染しないことが示された。この条件で、ラット胚の脳皮質細胞にアデノウイルスベクターにより Δ FosB を発現させると、ネスチンあるいは GFAP 陽性の細胞が B27 栄養因子の除去後も高い生存率を示し、選択的に増殖する傾向が見られた。FosB の発現によっても同様の傾向が認められたが、 Δ FosB に比べるとかなり低い生存率しか得られなかった。 Δ FosB あるいは FosB を発現している細胞の中で、GFAP よりもネスチンの発現が優位な細胞は形態的には放射状グリア細胞と考えられる。一方、GFAP を優位に発現しているものはアストロサイトと考えられる。これらの細胞では、 Δ FosB の発現レベルの低下によりその一部の細胞が MAP2 陽性細胞へ転換する。すなわち、 Δ FosB は少なくとも *in vitro* では神経前駆細胞を分化成熟させることなくその増殖を促進すると考えられる。

ラットの脳室へのアデノウイルスベクター注入により脳室壁内の細胞に Δ FosB を発現させると、実際にネスチンの発現が上昇することが明らかになった。この時 GFAP の発現は上昇しなかった。この結果は、我々が虚血障害後のラット脳やアデノウイルスベクターを感染させた胚

由来の脳皮質細胞の初代培養系で観察した結果と一致しており、 Δ FosB が神経前駆細胞の増殖を活性化すると同時にネスチンの発現を亢進したことを示している。成体マウスの歯状回には、2種類の異なるタイプのネスチン陽性細胞(タイプIとタイプII)が存在することが報告されている。タイプIの細胞はより低い入力抵抗値を示し、その放射状の突起はGFAP陽性である。他方、タイプII細胞はより高い入力抵抗値を示し、GFAP陰性である。成体における神経新生の初期段階では、ネスチン陽性の前駆細胞はタイプIからタイプIIへ迅速かつ動的に変化することが示唆されている。最近、GFAPを発現する神経前駆細胞が齧歯類成体の前脳における構成的な神経新生の主要な起源である事が報告されたことから、 Δ FosBはネスチン陽性/GFAP陰性のタイプII細胞など一部の神経前駆細胞の増殖を促進的に制御すると考えられる。

b.一過性の前脳虚血によるガレクチン-1の発現誘導と神経前駆細胞の増殖制御

Δ FosBの発現は、rat 3Y1細胞株では形態変化を、rat 1a細胞株では遅発性細胞死を引き起こすとともに、主要な β -ガラクトシド糖結合レクチンの1つであるガレクチン-1の発現を誘導する。ガレクチン-1の発現はrat 1a細胞株における細胞増殖の促進に必要である。これらの事実は、 Δ FosBが細胞運命を制御する上でガレクチン-1が重要な標的の一つであることを意味し、 Δ FosBがガレクチン-1とともに損傷を受けた脳においても細胞の運命を決定する際に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

一過性の脳虚血後のラット脳におけるガレクチン-1の発現を検討したところ、コントロールラットの脳ではガレクチン-1やネスチンの発現はほとんど認められなかったが、虚血後7日目の脳では劇的なネスチン発現誘導がみられる海馬でガレクチン-1の顕著に高い発現が認められた。海馬ではネスチンを発現している細胞のほとんどがガレクチン-1を発現しているが、脳室壁内のネスチン陽性細胞はガレクチン-1を発現していなかった。

次に、我々は胚由来の脳皮質細胞でのアデノウイルスベクターによるFosBや Δ FosBの発現誘導がガレクチン-1の発現に及ぼす効果を検討した。EGFPのみを発現する胚由来の脳皮質細胞ではガレクチン-1の発現はほとんど認められなかったが、FosBや Δ FosBを発現するネスチン陽性の神経前駆細胞では非常に高いレベルのガレクチン-1の発現が認められた。以上より、虚血後に海馬で発現が誘導される Δ FosBは、ネスチンとガレクチン-1の発現を誘導することが確認された。

ガレクチン-1は細胞増殖やアポトーシスなどの細胞運命を制御できる分泌性因子として知られていることから、ガレクチン-1が胚由来の脳皮質細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。ラット胚由来の脳皮質細胞の培地に低用量(50pg/ml)の組換えガレクチン-1 α を添加した場合、わずかではあるが投与しない場合と比較して有意に細胞増殖が促進された。このことから分泌性因子の1つとしてガレクチン-1 α は胚由来の脳皮質細胞の増殖を促進する可能性が

示唆された。興味深いことに高用量(5 μ g/ml)の場合や、ガレクチン-1のバリエーションの一つであるガレクチン-1 β を使用した場合には、はるかに弱い作用しか示さなかった(50pg/ml, 5 μ g/ml)。

今回のデータは、ガレクチン-1がFosBや Δ FosB発現細胞からの分泌因子の一つとして胚由来の神経前駆細胞の増殖を促進する事を示している。現在我々は、損傷脳で起こる増殖反応におけるガレクチン-1の関与を検討している。

業績目録

原著論文

1. H. Kurushima, M. Ohno, T. Miura, T.Y. Nakamura, H. Horie, T. Kadoya, H. Ooboshi, T. Kitazono, S. Ibayashi, M. Iida and Y. Nakabeppu. 2005.
Selective induction of Δ FosB in the brain after transient forebrain ischemia accompanied by an increased expression of galectin-1, and the implication of Δ FosB and galectin-1 in neuroprotection and neurogenesis.
Cell Death Differ., in press.
2. M. Behmanesh, K. Sakumi, D. Tsuchimoto, K. Torisu, Y. Ohnishi-Honda, D.E. Rancourt and Y. Nakabeppu. 2005.
Characterization of the Structure and Expression of Mouse *Itpa* Gene and its Related Sequences in the Mouse Genome.
DNA Res., 12, 39-51.
3. J. Fukae, M. Takanashi, S. Kubo, K. Nishioka, Y. Nakabeppu, H. Mori, Y. Mizuno and N. Hattori. 2005.
Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders.
Acta Neuropathol., 109, 256-262.
4. Y. Ushijima, Y. Tominaga, T. Miura, D. Tsuchimoto, K. Sakumi and Y. Nakabeppu. 2005.
A functional analysis of the DNA glycosylase activity of mouse MUTYH protein excising 2-hydroxyadenine opposite guanine in DNA.
Nucleic Acids Res., 33, 672-682.
5. H. Furuya, N. Shinnoh, Y. Ohyagi, K. Ikezoe, H. Kikuchi, M. Osoegawa, Y. Fukumaki, Y. Nakabeppu, T. Hayashi and J. Kira. 2005.
Some flavonoids and DHEA-S prevent the cis-effect of expanded CTG repeats in a stable PC12 cell

transformant.

Biochem. Pharmacol., 69, 503-516.

6. G.S. Robertson, C.J. Lee, K. Sridhar, Y. Nakabeppu, M. Cheng, Y.M. Wang and M.G. Caron. 2004.
Clozapine-, but not haloperidol-, induced increases in Δ FosB-like immunoreactivity are completely blocked in the striatum of mice lacking D3 dopamine receptors.
Eur. J. Neurosci., 20, 3189-3194.
7. Y. Ide, D. Tsuchimoto, Y. Tominaga, M. Nakashima, T. Watanabe, K. Sakumi, M. Ohno and Y. Nakabeppu. 2004.
Growth retardation and dyslymphopoiesis accompanied by G2/M arrest in APEX2-null mice.
Blood, 104, 4097-4103.
8. K. Hashimoto, Y. Tominaga, Y. Nakabeppu and M. Moriya. 2004.
Futile short-patch DNA base excision repair of adenine:8-oxoguanine mispair.
Nucleic Acids Res., 32, 5928-5934.
9. T. Nunoshiro, R. Ishida, M. Sasaki, S. Iwai, Y. Nakabeppu and K. Yamamoto. 2004.
A novel Nudix hydrolase for oxidized purine nucleoside triphosphates encoded by *ORFYLR151c* (*PCD1* gene) in *Saccharomyces cerevisiae*.
Nucleic Acids Res., 32, 5339-5348.
10. T. Miura, M. Takahashi, H. Horie, H. Kurushima, D. Tsuchimoto, K. Sakumi and Y. Nakabeppu. 2004.
Galectin-1 β , a natural monomeric form of galectin-1 lacking its six amino-terminal residues promotes axonal regeneration but not cell death.
Cell Death Differ., 11, 1076-1083.
11. M. Mishima, Y. Sakai, N. Itoh, H. Kamiya, M. Furuichi, M. Takahashi, Y. Yamagata, S. Iwai, Y. Nakabeppu and M. Shirakawa. 2004.
Structure of human MTH1, a Nudix family hydrolase that selectively degrades oxidized purine nucleoside triphosphates.
J. Biol. Chem., 279, 33806-33815.
12. Y. Tominaga, Y. Ushijima, D. Tsuchimoto, M. Mishima, M. Shirakawa, S. Hirano, K. Sakumi and Y. Nakabeppu. 2004.
MUTYH prevents OGG1 or APEX1 from inappropriately processing its substrate or reaction product with its C-terminal domain.
Nucleic Acids Res., 32, 3198-3211.
13. T. Iida, A. Furuta, Y. Nakabeppu and T. Iwaki. 2004.
Defense mechanism to oxidative DNA damage in glial cells.

Neuropathol., 24, 125-130.

14. Y. Kimura, S. Oda, A. Egashira, Y. Kakeji, H. Baba, Y. Nakabeppu and Y. Maehara. 2004.
A variant form of hMTH1, a human homologue of the *E coli mutT* gene, correlates with somatic mutation in the p53 tumour suppressor gene in gastric cancer patients.
J. Med. Genet., 41, e57.
15. K. Shibahara, T. Uchiumi, T. Fukuda, S. Kura, Y. Tominaga, Y. Maehara, K. Kohno, Y. Nakabeppu, T. Tsuzuki and M. Kuwano. 2004.
Targeted disruption of one allele of the Y-box binding protein-1 (*YB-1*) gene in mouse embryonic stem cells and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C.
Cancer Sci., 95, 348-353.
16. H. Kamiya, H. Yakushiji, L. Dugue, M. Tanimoto, S. Pochet, Y. Nakabeppu and H. Harashima. 2004.
Probing the substrate recognition mechanism of the human MTH1 protein by nucleotide analogs.
J. Mol. Biol., 336, 843-850.
17. A. Ichinoe, M. Behmanesh, Y. Tominaga, Y. Ushijima, S. Hirano, Y. Sakai, D. Tsuchimoto, K. Sakumi, N. Wake and Y. Nakabeppu. 2004.
Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts.
Nucleic Acids Res., 32, 477-487.
18. M. Russo, M. Blasi, F. Chiera, P. Fortini, P. Degan, P. Macpherson, M. Furuichi, Y. Nakabeppu, P. Karran, G. Aquilina and M. Bignami. 2004.
The Oxidized Deoxynucleoside Triphosphate Pool Is a Significant Contributor to Genetic Instability in Mismatch Repair-Deficient Cells.
Mol. Cell. Biol., 24, 465-474.

総説

1. Y. Nakabeppu, D. Tsuchimoto, M. Furuichi and K. Sakumi. 2004.
The Defense Mechanisms in Mammalian Cells Against Oxidative Damage in Nucleic Acids and Their Involvement in the Suppression of Mutagenesis and Cell Death.
Free Radic. Res., 38, 423-429.
2. Y. Nakabeppu, D. Tsuchimoto, A. Ichinoe, M. Ohno, Y. Ide, S. Hirano, D. Yoshimura, Y. Tominaga, M. Furuichi and K. Sakumi. 2004.
Biological Significance of the Defense Mechanisms against Oxidative Damage in Nucleic Acids Caused by Reactive Oxygen Species: from Mitochondria to Nuclei.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 1011, 101-112.

3. Y. Ishino, Y. Nakabeppu, H. Maki, H. Iwasaki, H. Araki and H. Shinagawa. 2004.
The 4th International Symposium on 3R; DNA Replication, Recombination and Repair.
Genes Genet. Syst., 79, 53-63.

学会発表

1. K. Sakumi, Y. Tominaga, M. Furuichi, P. Xu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi, and Y. Nakabeppu. (2004, 2/17~2/22).
Ogg1 Knockout-associated Lung Tumorigenesis and Its Suppression by *Mth1* Gene Disruption.
Keystone symposium on Mouse Models of Human Cancer, Keystone, Colorado, U.S.A.
2. Yohei Tominaga, Yasuhiro Ushijima, Daisuke Tsuchimoto, Masaki Mishima, Masahiro Shirakawa, Seiki Hirano, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu. (2004, 3/7~3/12).
A germ-line mutation of *hMUTYH* gene found in patients with autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis impairs the protective function of MUTYH preventing APEX1 and OGG1 from inappropriately processing its product.
Gordon Research Conference on Mutagenesis and Carcinogenesis. Ventura CA, U.S.A.
3. 山口浩雄, 古市正人, 大野みずき, 作見邦彦, 中別府雄作. (2004, 5/11~5/14).
MPTP 投与マウスにおける核酸の酸化損傷と神経機能障害の解析および MTH1 の役割.
第 45 回日本神経学総会, 東京.
4. 牛島泰宏, 富永洋平, 土本大介, 平野世紀, 一戸晶元, 作見邦彦, 中別府雄作. (2004, 5/19~5/21).
家族性大腸腺腫症の生殖細胞系列で報告されている変異型 MUTYH の機能解析.
日本がん分子疫学研究会, 札幌.
5. Hiroo Yamaguchi, Daisuke Yoshimura, Mizuki Ohno, Masato Furuichi, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu. (2004, 6/4~6/9).
Oxidative Damage in Nucleic Acids in Brain and Neuroprotection by MTH1.
2nd US-Japan DNA Repair Meeting, Honolulu, U.S.A.
6. Hiroo Yamaguchi, Masato Furuichi, Mizuki Ohno, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu. (2004, 9/26~9/28).
MPTP-induced oxidative damage in dopaminergic neurons of mouse substantia nigra and neuro-protection by *MTH1* encoding an oxidized purine nucleoside triphosphatase.
第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会, 京都.
7. Yoshinori Ohnishi, Yoko Honda-Ohnishi, Katsuhisa Yamazaki, Hiroo Yamaguchi, Kousuke Kajitani, Yohei Tominaga, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu. (2004, 9/26~9/28).

- Behavioral analysis of *fosB^{ΔΔ}* mice which express only ΔFosB and *fosB*-null mice lacking both FosB and ΔFosB.
 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会, 京都.
8. Kosuke Kajitani, Kunihiko Sakumi, Hiroo Yamaguchi, Yusaku Nakabeppu. (2004, 9/26~9/28).
 Kainic acid-induced oxidative DNA damage in mouse brain and neuro-protection by *MTH1* encoding an oxidized purine nucleoside triphosphatase 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会, 京都.
 9. 中別府雄作. (2004, 9/29~10/1).
 核酸の酸化による生体障害とその防御機構.
 第 63 回日本癌学会学術総会教育講演, 福岡.
 10. 作見邦彦, 中別府雄作. (2004, 9/29~10/1).
 Ogg1 遺伝子欠損マウスで観察された肺の自然発がん.
 第 63 回日本癌学会学術総会シンポジウム, 福岡.
 11. 藏忍, 坂本勝美, 中津可道, 中別府雄作, 関口睦夫, 續輝久. (2004, 9/29~10/1).
 放射線誘発突然変異と生体の防御機構.
 第 63 回日本癌学会学術総会, 福岡.
 12. Tomoe Y. Nakamura, Hideaki Kurushima, Shigeo Wakabayashi, Yusaku Nakabeppu, Junichi Nabekura. (2004, 10/13~10/16).
 Novel role of neural Ca²⁺ sensor-1 (NCS-1) as a survival factor up-regulated in injured neurons.
 第 77 回日本生化学会大会, 横浜.
 13. Sugako Oka, Mizuki Ohno, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiko Sakumi, Masato Furuichi and Yusaku Nakabeppu. (2004, 11/1~11/2).
 Alternative pathways for cell death triggered by accumulation of 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial genomes.
 The 4th International Symposium on Molecular Mechanism of Cell Proliferation and Evolution, Fukuoka.
 14. Merhdad Behmanesh, Kunihiko Sakumi, Kumiko Torisu, Yoshinori Ohnishi, Daisuke Tsuchimoto and Yusaku Nakabeppu. (2004, 11/1~11/2).
 Biological significance of mouse *Itpa* gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase.
 The 4th International Symposium on Molecular Mechanism of Cell Proliferation and Evolution, Fukuoka.
 15. Yusaku Nakabeppu, Hiroo Yamaguchi, Daisuke Tsuchimoto, Masato Furuichi, Kunihiko Sakumi. (2004, 11/5~11/6).
 Defenses against Oxidative Damage in Nucleic Acids and the Suppression of Carcinogenesis and

Neurodegeneration.

Seventh Annual JBL Symposium: Genetic Stability through Quality Control in Cellular Processes, Boston, U.S.A.

16. Y. Nakatsu, K. Yamauchi, K. Sakamoto, Y. Tominaga, K. Yoshiyama, A. Egashira, S. Kura, K. Sakumi, H. Maki, T. Tsuzuki, Y. Nakabeppu. (2004, 11/14~11/19).

Spontaneous tumorigenesis and mutagenesis in mice with a targeted disruption of the *Mutyh* gene.

ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis: From Molecular Structure to Biological Consequences, Southampton, Bermuda.

17. K. Hashimoto, Y. Tominaga, Y. Nakabeppu, M. Moriya. (2004, 11/14~11/19).

Futile short-patch DNA base excision repair of adenine:8-Oxoguanine mispair

ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis: From Molecular Structure to Biological Consequences, Southampton, Bermuda.

18. Yasuhito Ide, Daisuke Tsuchimoto, Yohei Tominaga, Manabu Nakashima, Takeshi Watanabe, Kunihiko Sakumi, Mizuki Ohno, and Yusaku Nakabeppu. (2004, 11/14~11/19).

Growth retardation and dyslymphopoiesis accompanied by G2/M arrest in APEX2-null mice.

ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis: From Molecular Structure to Biological Consequences, Southampton, Bermuda.

19. 藏忍, 坂本勝美, 中津可道, 中別府雄作, 関口睦夫, 續輝久. (2004, 11/25~11/27). 放射線によって誘発される点突然変異とその抑制機構.

第 47 回日本放射線影響学会大会, 長崎.

20. 山内一巳, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久. (2004, 11/25~11/27).

Mutyh 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析.

第 47 回日本放射線影響学会大会, 長崎.

21. Sugako Oka, Mizuki Ohno, Kunihiko Sakumi, Masato Furuichi, Daisuke Tsuchimoto and Yusaku Nakabeppu. (2004, 12/8~12/12).

Alternative pathways for cell death triggered by accumulation of 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial genomes.

第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸.

22. 牛島泰宏, 富永洋平, 土本大介, 作見邦彦, 中別府雄作, (2004, 12/8~12/12).

MUTYH 蛋白質の 2-ヒドロキシアデニン DNA グリコシラーゼ活性についての機能解析. 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸.

23. 土本大介, 井手康人, 中島学, 渡邊武, 中別府雄作, (2004, 12/8~12/12).

APEX2 欠損マウスにおける抗オプアルブミン抗体産生の遅延.

- 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 .
24. Merhdad Behmanesh, Kunihiko Sakumi, Kumiko Torisu, Yoshinori Ohnishi, Daisuke Tsuchimoto and Yusaku Nakabeppu. (2004, 12/8~12/12).
Biological significance of mouse *Itpa* gene encoding inosine triphosphate pyrophosphatase .
第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 .
25. 岡 素雅子, 大野みずき, 土本大介, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作 . (2004, 12/8~12/12).
ヒト 8-oxoG DNA グリコシラーゼ, hOGG1 による酸化ストレス誘発細胞死の抑制 .
第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 .
26. 大野みずき, 三浦智史, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作 . (2004, 12/8~12/12).
8-オキソグアニンはゲノム進化の原動力か .
第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 .
27. 鳥巢久美子, 土本大介, 中別府雄作 . (2004, 12/8~12/12).
DNA glycosylase NEIL3 欠損マウスの樹立と NEIL3 の発現解析 .
第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 .
28. Keikichi Miyata, Hirofumi Satake, Tamotsu Takeuchi, Kazunori Sugahara, Katsuhisa Yamazaki, Taro Shuin, Yusaku Nakabeppu, Shigetaka Kitajima, Saburo Onishi, Tejiro Aso. (2004, 12/8~12/12).
Targeted disruption of *Elongin A* leads to embryonic lethality and p38 MAPK mediated senescence-like phenotypes in primary embryonic fibroblasts.
第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 .
29. 山内一巳, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久 . (2004, 12/8~12/12).
MUTYH 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析 .
第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 .
30. 田村清, 巴銀花, 足達進, 川内潤也, 森岡勝樹, 足達三美, 田中裕二郎, 中別府雄作, 砂盛誠, John Sedivy, 北嶋繁孝 . (2004, 12/8~12/12).
血清誘導細胞増殖におけるストレス応答遺伝子 *ATF3* とプロトオンコジーン *c-myc* とのクロストーク制御 .
第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 .
31. 佐藤時春, 西田純, 麦威, Gantulga Davaakhuu, 日高京子, 森崎隆幸, 中別府雄作, 善岡克次 . (2004, 12/8~12/12).
ES 細胞から心筋細胞への分化における足場蛋白質 JSAP1 の機能解析 .
第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸 .
32. 岡 素雅子, 大野みずき, 土本大介, 作見邦彦, 古市正人, 中別府雄作 . (2004, 12/8~12/12).
ヒト 8-oxoG DNA グリコシラーゼ, hOGG1 による酸化ストレス誘発細胞死の抑制 .

- 第 4 回日本ミトコンドリア研究会年会, 東京.
33. 新井健夫, 深江治郎, 波田野琢, 中別府雄作, 服部信孝, 水野美邦. (2004, 12/8~12/12). パーキンソン病における酸化における酸化防御酵素 MUTYH の検討.
第 4 回日本ミトコンドリア研究会年会, 東京.
34. 中別府雄作. (2005, 1/13~1/14).
核酸の酸化に起因する生体障害とその防御機構.
大阪大学蛋白質研究所セミナー「DNA 修復の分子ならびに構造生物学」, 大阪.
35. Sugako Oka, Mizuki Ohno, Kunihiko Sakumi, Masato Furuichi, Daisuke Tsuchimoto and Yusaku Nakabeppu. (2005, 1/26).
Alternative pathways for cell death triggered by accumulation of 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial genomes.
International Symposium “Genomic Maintenance and DNA Repair Network”, Kyoyo.