

[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 : published
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、嘉村巧助教授、白根道子助手(2004年10月着任:さきがけ研究者兼任)、松本雅記特任助手(21世紀COE雇用)の教官を中心に大学院生(11名)、科学技術振興事業団派遣職員(研究員1名、技術員1名、研究補助員5名、一時雇用職員1名、事務員1名)、その他の資金による一時雇用職員3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(2005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大学院生として2004年4月より中川直(北大・薬)が入学した。さらに押川千恵(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2004年4月より雇用した(押川千恵は2004年8月に出産のため退職)。また西村直子(前年度まで研究支援推進員)を科学技術振興事業団派遣職員(一時雇用)として雇用した。さらにその他の研究費でセイドマハムード容子、吉田英子、瀬戸容子(以上2004年1月より)を雇用した。また2004年4月より研究生として佐藤学道(日本化薬)を、2005年3月より派遣共同研究員として高木正徳(日立ハイテクノロジー)を受け入れている。

次いで退職者として2005年3月末で大学院生の高橋秀尚、西山正章、神武洋二郎、奥村文彦が学位取得の上卒業した。また栄信孝は単位取得の上退学した。また助教授であった畠山鎮次は、2004年7月1日付けで北海道大学大学院医学系研究科教授として転任した。

2002年11月1日より当研究室は科学技術振興事業団(JST)による戦略的創造研究推進事業(CREST)「生物の発生・分化・再生」の支援を受けている。本年度は研究員として恒松良祐(継続)、押川千恵(2004年4月-8月)、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)、木村美保子(継続)、一時雇用者として西村直子(研究支援推進員より)、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. Skp2によるp27の分解がM期への進行に果たす役割の研究

Skp2はG1~S期におけるp27の分解を司ると考えられてきたが、Skp2を持たないノックアウトマウスにおいてもG1~S期におけるp27の分解は正常である。しかしSkp2ノックアウトマウス由来細胞ではS~G2期にp27の蓄積を示し、過剰複製を起こす。われわれはこのような異常を生じる原因がp27の蓄積によるものかどうかを検討するためにSkp2・p27ダブルノックアウトマウスを作製した。このマウスでは過剰複製による表現型を示さないことから、Skp2ノックアウトマウスに見られる過剰複製は

p27 の S~G2 期における過剰な蓄積が原因であることが明らかとなった。肝細胞は女性ホルモンであるエストロールを経口摂取させると一過性に増殖を起すが、Skp2 ノックアウトマウスにエストロールを飲ませると、細胞は S 期に進行できるが、全く M 期には入らず、細胞は多倍数体になって巨大化することがわかった (endoreplication)。しかし Skp2・p27 ダブルノックアウトマウスではこのような減少は認められず、p27 の蓄積がこの endoreplication に関与していることが明らかとなった。次に生化学的に Skp2 ノックアウトマウス由来細胞を調べてみると、Cdc2 キナーゼの活性が有意に低下していることが判明した。これは G2 期において過剰に蓄積した p27 が Cdc2 と結合し、その活性を抑制していることが明らかとなった。このように Skp2 の欠失は S~G2 期における p27 の蓄積を引き起こし、それは Cdc2 キナーゼの阻害を通じて M 期への進行を抑制し、結果的には endoreplication を生じることが示された。つまり p27 の分解は Cdk2 だけでなく Cdc2 の活性発現にとっても重要であり、Skp2 は p27 を G2 期で破壊することによって細胞を M 期へ進行させるのに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

B. G1 期における Skp2 非依存的な p27 のユビキチン化を司る酵素 KPC の発見

前述のように Skp2 ノックアウトマウスにおいても p27 は G1 期において分解されることから、われわれは Skp2 非依存性の分解系があることを想定し、その酵素の同定作業を行った。まず試験管内で p27 の分解系を構築し、そこにウサギ網状赤血球抽出液をカラムで分画して加え、そのポリユビキチン化活性を測定することによって、そこに存在するポリユビキチン化因子を精製し、質量分析によって 140kDa と 50kDa のタンパク質を同定した。前者は KPC1、後者は KPC2 と命名した。KPC1 は C 末端に RING フィンガードメインを持つユビキチンリガーゼ (E3) であり、KPC2 は UBL-UBA 型のユビキチン化された基質をプロテアソームにエスコートする機能を持つ分子であることが推定された。KPC1 と KPC2 は細胞質において複合体を形成している。KPC1 は p27 と結合し、ユビキチン化することが生化学的に示された。KPC を過剰発現することによって p27 の分解は促進し、逆にドミナントネガティブ型変異体を発現すると p27 の分解は抑制される。この現象は核外輸送を阻害するレプトマイシン B によって抑制されることにより、p27 の核外移行が KPC 依存性の分解の前提条件であることがわかる。KPC1 をノックダウンすると p27 の分解は有意に抑制されるが、それだけでは細胞周期の遅延を引き起こさない。但し KPC1 と Skp2 の両者をノックダウンすると G1 期から S 期への進行が遅延する。G1 期においては p27 の分解は KPC に依存しており、S 期においては Skp2 に依存していることがノックダウン実験から明らかになっている。これらの研究から、p27 の分解に対して G1 期には KPC が、S~G2 期には Skp2 が中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。

C. p27 の主要リン酸化部位を変異したノックインマウスの解析

われわれは今までに p27 が 10 箇所以上リン酸化されていること、その中でも特にセリン 10 番が非常に強くリン酸化されていることを示してきた。また、このリン酸化は p27 の安定性を増し、また核外移行を促進すると考えてきた。しかしながらこれらの知見の多くは培養細胞に変異 p27 を強制発現した結果から導かれたものであり、その発現量が生理的な条件を逸脱しているために本来の作用を模擬しているかどうかについては疑義があった。そこでわれわれはマウス p27 遺伝子中に点突然変異を導入したマウス (S10A マウス) を作製し、その異常を検索した。S10A マウスの体の大きさは正常であり、p27 の全体的な機能低下はないと考えられる。しかし特定の臓器 (脳、胸腺、脾臓、精巣) において

p27 の発現量が減少していることが明らかとなった。S10A マウスの胸腺細胞では p27 が G0 期において極端に不安定化していることが判明したが、これはプロテアソーム阻害剤で抑制された。一方、S 期における安定性には S10A 変異はほとんど影響を与えなかった。p27 の核外移行は S10A マウスの線維芽細胞においても正常に起こることから、セリン 10 番のリン酸化は G0 期の安定性に関わっているものの、核外移行にはあまり関与していないことが明らかとなった。

D. Fbw7 による c-Myc のユビキチン化の制御

c-Myc は細胞増殖にとって必要な転写因子であるが、その寿命は非常に短いことが知られている。c-Myc の安定性を決定している領域(デグロン)は転写活性化ドメイン内の MycBox1 (MB1) と MycBox2 (MB2) である。以前われわれは c-Myc の分解に Skp2 が関与していることを報告したが、Skp2 は MB2 と結合するものの MB1 とは結合しない。c-Myc の MB1 にはリン酸化を受けるアミノ酸(スレオニン 58 番とセリン 62 番)があり、この変異は癌における c-Myc の変異の中で最も多いものである。われわれはこの MB1 に結合する仮想のユビキチンリガーゼを探索した結果、SCF 複合体型ユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットである F-box タンパク質の一つである Fbw7 (hCdc4) を同定した。Fbw7 は c-Myc に MB1 のリン酸化依存的に結合し、そのユビキチン化を促進する。Fbw7 のノックダウンやノックアウトは c-Myc の蓄積を引き起こし、その転写活性化能は増大する。これらのことより、c-Myc の安定性制御には Fbw7 (MB1) と Skp2 (MB2) の二つの F-box タンパク質が関与しており、特に前者は癌において分解システムが破綻しているケースが多いことが明らかとなった。

E. Cul2-Rbx1 と Cul5-Rbx2 のユビキチンリガーゼの差異に関する研究

哺乳類において Cullin は Cul1, 2, 3, 4A, 4B, 5, 7 の 7 種類があり、SCF 複合体類似のユビキチンリガーゼ (E3) を構成するためのプラットフォームとして機能すると考えられている。その中で Cul2 と Cul5 はどちらも Rbx1 や Elongin B/C 複合体に結合し、さらに VHL や SOCS ファミリー分子と会合することによって、ユビキチンリガーゼ複合体として機能すると信じられてきた。われわれは Cul2 は Rbx1 と、Cul5 は Rbx2 と特異的に結合することを発見した。また VHL ファミリーと SOCS ファミリーはどちらも Elongin B/C 複合体に結合するドメイン (BC ボックス) を有するものの、その C 末端側の配列が異なり、各々 Cul2 ボックス、Cul5 ボックスと命名した。それはこの部位が Cul2 または Cul5 との結合特異性を決定していることがドメイン置換実験で明らかとなったからである。つまり VHL/SOCS 分子は、各々 VHL ボックス (BC ボックス+Cul2 ボックス)、SOCS ボックス (BC ボックス+Cul5 ボックス) という異なったドメインを有することが判明した。そこでこれらのユビキチンリガーゼ複合体を Elongin B/C-Cul2/Rbx1-VHL (ECV) 複合体、Elongin B/C-Cul5/Rbx2-VHL (ECS) 複合体と再命名した。さらに Cul2、Cul5、Rbx1、Rbx2 をノックダウンし、VHL による HIF2 α のユビキチン依存性分解を検討したところ、Cul2 と Rbx1 をノックダウンした場合にのみ HIF2 α は蓄積し、Cul5 と Rbx2 をノックダウンしても HIF2 α の量に変動はなかった。このことより、生理的に VHL による HIF2 α のユビキチン化は Cul2-Rbx1 によって担われていることが判明した。本研究では今まで機能未知であった Rbx2 の役割も明らかにした。

原著論文

1. Uchida, D., Hatakeyama, S., Matsushima, A., Han, H., Ishido, S., Hotta, H., Kudoh, J., Shimizu, N., Doucas, V., Nakayama, K. I., Kuroda, N., Matsumoto, M. 2004.
AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase.
J. Exp. Med. 199, 167-172.
2. Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., Nakayama, K. I. 2004.
Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4.
EMBO J. 23, 659-669.
3. Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y. A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K. I., Aaronson, S. A., Lee, S. W. 2004.
ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway.
Nature Cell Biol. 6, 121-128.
4. Tsunematsu, R., Nakayama, K., Oike, Y., Nishiyama, M., Ishida, N., Hatakeyama, S., Bessho, Y., Kageyama, R., Suda, T., Nakayama, K. I. 2004.
Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for Notch degradation during vascular development.
J. Biol. Chem. 279, 9417-9423.
5. Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., Nakayama, K. I. 2004.
Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis.
Dev. Cell 6, 661-672.
6. Oh, K. J., Kalinina, A., Wang, J., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Bagchi, S. 2004.
The papillomavirus E7 oncoprotein is ubiquitinated by UbcH7 and Cullin 1- and Skp2-containing E3 ligase.
J. Virol. 78, 5338-5346.
7. Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K., Nakayama, K. I. 2004.
Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7.
EMBO J. 23, 2116-2125.
8. Yoshida, K., Kase, S., Nakayama, K., Nagahama, H., Harada, T., Ikeda, H., Harada, C., Imaki, J., Ohgami, K., Shiratori, K., Ohno, S., Nakayama, K. I. 2004.
Distribution of p27^{KIP1}, cyclin D1, and proliferating cell nuclear antigen after retinal detachment.
Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 242, 437-441.
9. Yoshida, K., Nakayama, K., Kase, S., Nagahama, H., Harada, T., Ikeda, H., Harada, C., Imaki, J., Ohgami, K., Shiratori, K., Ohno, S., Nishi, S., Nakayama, K. I. 2004.
Involvement of p27^{KIP1} in proliferation of the retinal pigment epithelium and ciliary body.
Anat. Embryol. 208, 145-150.
10. Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Yada, M., Nakayama, K. I. 2004.
Interaction of U-box-type ubiquitin-protein ligases (E3s) with molecular chaperones.

Genes Cells 9, 533-548.

11. Urushitani, M., Kurisu, J., Tateno, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Kato, S., Takahashi, R. 2004.
CHIP promotes proteasomal degradation of familial ALS-linked mutant SOD1 by ubiquitinating Hsp/Hsc70.
J. Neurochem. 90, 231-244.
12. Yoshida, K., Kase, S., Nakayama, K., Nagahama, H., Harada, T., Ikeda, H., Harada, C., Imaki, J., Ohgami, K., Shiratori, K., Ilieva, I. B., Ohno, S., Nishi, S., Nakayama, K. I. 2004.
Involvement of p27^{KIP1} in the proliferation of the developing corneal endothelium.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 45, 2163-2167.
13. Li, B., Wang, X., Rasheed, N., Hu, Y., Boast, S., Ishii, T., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Goff, S. P. 2004.
Distinct roles of c-Abl and Atm in oxidative stress response are mediated by protein kinase C δ .
Genes Dev. 18, 1824-1837.
14. Akiyoshi, H., Hatakeyama, S., Pitkanen, J., Mouri, Y., Doucas, V., Kudoh, J., Tsurugaya, K., Uchida, D., Matsushima, A., Oshikawa, K., Nakayama, K. I., Shimizu, N., Peterson, P., Matsumoto, M. 2004.
Subcellular expression of autoimmune regulator is organized in a spatiotemporal manner.
J. Biol. Chem. 279, 33984-33991.
15. Terunuma, M., Jang, I. S., Ha, S. H., Kittler, J. T., Kanematsu, T., Jovanovic, J. N., Nakayama, K. I., Akaike, N., Ryu, S. H., Moss, S. J., Hirata, M. 2004.
GABA_A receptor phospho-dependent modulation is regulated by phospholipase C-related inactive protein type 1, a novel protein phosphatase 1 anchoring protein.
J. Neurosci. 24, 7074-7084.
16. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Matsuda, T., Nakayama, K. I., Harada, M. 2004.
The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals.
Int. Immunol. 16, 1173-1179.
17. Komatsu, T., Mizusaki, H., Mukai, T., Ogawa, H., Baba, D., Shirakawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Yamamoto, H., Kikuchi, A., Morohashi, K. 2004.
Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9.
Mol. Endocrinol. 18, 2451-2462.
18. Nishiyama, M., Nakayama, K., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Kikuchi, A., Nakayama, K. I. 2004.
Early embryonic death in mice lacking the β -catenin-binding protein Duplin.
Mol. Cell. Biol. 24, 8386-8394.
19. Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Kamura, T., Murayama, M., Chui, D. H., Planel, E., Takahashi, R., Nakayama, K. I., Takashima, A. 2004.
U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates poly-ubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy.
J. Neurochem. 91, 299-307.
20. Yamaguchi, T., Kubota, T., Kanematsu, T., Nakayama, K. I., Hirata, M., Yamamoto, T. 2004.
Hypersensitivity to pentylentetrazol-induced convulsion in mice lacking the PLC-related inactive protein-1.
Brain Res. 1025, 237-240.

21. Tamamori-Adachi, M., Hayashida, K., Nobori, K., Omizu, C., Yamada, K., Sakamoto, N., Kamura, T., Fukuda, K., Ogawa, S., Nakayama, K. I., Kitajima, S. 2004.
Down-regulation of p27^{Kip1} promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and CDK4. Evidence for impaired Skp2-dependent degradation of p27 in terminal differentiation.
J. Biol. Chem. 279, 50429-50436.
22. Tokarz, S., Berset, C., La Rue, J., Friedman, K., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Zhang, D. E., Lanker, S. 2004.
The ISG15 isopeptidase UBP43 is regulated by proteolysis via the SCF^{Skp2} ubiquitin ligase.
J. Biol. Chem. 279, 46424-46430.
23. Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K., Nakayama, K. I. 2004.
Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27^{Kip1} at G1 phase.
Nature Cell Biol. 6, 1229-1235.
24. Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Nakayama, K. I. 2004.
VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases.
Genes Dev. 18, 3055-3065.
25. Mao, J. H., Perez-Losada, J., Wu, D., Delrosario, R., Tsunematsu, R., Nakayama, K. I., Brown, K., Bryson, S., Balmain, A. 2004.
Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene.
Nature 432, 775-779.
26. Blaschke, F., Leppanen, O., Takata, Y., Caglayan, E., Liu, J., Fishbein, M. C., Kappert, K., Nakayama, K. I., Collins, A. R., Fleck, E., Hsueh, W. A., Law, R. E., Bruemmer, D. 2004.
Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries.
Circ. Res. 95, e110-123.
27. Mirza, A. M., Gysin, S., Malek, N., Nakayama, K. I., Roberts, J. M., McMahon, M. 2004.
Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT.
Mol. Cell Biol. 24, 10868-10881.
28. Okumura, F., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Kamura, T., Nakayama, K. I. 2004.
Functional regulation of FEZ1 by the U-box-type ubiquitin ligase E4B contributes to neuritogenesis.
J. Biol. Chem. 279, 53533-53543.
29. Rodier, G., Makris, C., Coulombe, P., Scime, A., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Meloche, S. 2005.
p107 inhibits G1 to S phase progression by down-regulating expression of the F-box protein Skp2.
J. Cell Biol. 168, 55-66.
30. Kotake, Y., Nakayama, K., Ishida, N., Nakayama, K. I. 2005.
Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation.

- J. Biol. Chem. 280, 1095-1102.
31. Harada, K., Takeuchi, H., Oike, M., Matsuda, M., Kanematsu, T., Yagisawa, H., Nakayama, K. I., Maeda, K., Erneux, C., Hirata, M. 2005.
Role of PRIP-1, a novel Ins(1,4,5)P₃ binding protein, in Ins(1,4,5)P₃-mediated Ca²⁺ signaling.
J. Cell. Physiol. 202, 422-433.
 32. Uchida, T., Nakamura, T., Hashimoto, N., Matsuda, T., Kotani, K., Sakaue, H., Kido, Y., Hayashi, Y., Nakayama, K. I., White, M. F., Kasuga, M. 2005.
Deletion of *Cdkn1b* ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice.
Nature Med. 11, 175-182.
 33. Takahashi, H., Hatakeyama, S., Saitoh, H., Nakayama, K. I. 2005.
Noncovalent SUMO-1 binding activity of thymine DNA glycosylase (TDG) is required for its SUMO-1 modification and colocalization with the promyelocytic leukemia protein.
J. Biol. Chem. 280, 5611-5621.
 34. 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.
 35. 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 Cδ.
Oncogene 24, 3067-3072.
 36. Kase, S., Ikeda, H., Harada, T., Harada, C., Imaki, J., Ohgami, K., Shiratori, K., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Ohno, S., Yoshida, K. 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. in press.
 37. Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T., Nakayama, K. I. 2005.
Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome.
Proteomics in press.
 38. Kase, S., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Ikeda, H., Harada, T., Harada, C., Ohgami, K., Shiratori, K., Ohno, S., Yoshida, K. 2005.
Phosphorylation of p27^{KIP1} in the developing retina and retinoblastoma.
Int. J. Mol. Med. in press.
 39. Kase, S., Yoshida, K., Harada, T., Harada, C., Namekata, K., Suzuki, Y., Ohgami, K., Shiratori, K., Nakayama, K. I., Ohno S. 2005.
Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and p27KIP1 after retinal detachment.
Graefes Arch. Clin. Exp. in press.
 40. Kotoshiba, S., Kamura, T., Hara, T., Ishida, N., Nakayama, K. I. 2005.

Molecular dissection of the interaction between p27 and KPC, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase.

J. Biol. Chem. in press.

41. 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. 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. in press.
2. 西山正章, 白根道子, 中山敬一. 2004.
RNAi 技術を用いたアポトーシス経路の解明.
Molecular Medicine 41, 50-58.
3. 洲崎悦生, 中山敬一. 2004.
多発性骨髄腫の病態における NK- κ B シグナルとユビキチン-プロテアソームシステム.
血液・腫瘍科 48, 255-261.
4. 押川清孝, 中山敬一. 2004.
PKC- δ 遺伝子ノックアウトマウスと自己免疫疾患.
最新医学 59, 951-957.
5. 田中啓二, 高橋良輔, 中山敬一. 2004.
鼎談: 広がりゆくユビキチンワールド.
現代医療 36, 788-810.
6. 中山敬一. 2004.
オーバービュー: ユビキチン化: 蛋白質修飾の巨大なシステム.
現代医療 36, 812-823.
7. 畠山鎮次. 2004.
NF- κ B シグナル伝達におけるユビキチン化.
現代医療 36, 844-854.
8. 嘉村巧. 2004.
von Hippel-Lindau 病の原因遺伝子産物 pVHL のユビキチンリガーゼ活性.
現代医療 36, 961-967.
9. 矢田雅佳, 中山敬一. 2004.
がん遺伝子産物 Myc の分解機構.
現代医療 36, 940-945.
10. 畠山鎮次. 2004.
最新国際学会情報: Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family".
現代医療 36, 978-980.

11. 矢田雅佳, 中山敬一. 2004.
がん遺伝子産物 Myc の発現制御機構.
分子細胞治療 3, 301-306.
12. 栄信孝, 中山敬一. 2004.
タンパク質分解と神経回路形成.
Clinical Neuroscience 22, 1027-1029.
13. 中山啓子, 中山敬一. 2004.
細胞周期制御分子の発生過程に果たす役割—遺伝子操作マウスは何を語るか？.
実験医学「拡大する細胞周期研究」 22, 1814-1819.
14. 恒松良祐, 中山敬一. 2004.
SCF 型ユビキチンリガーゼと発癌—2つの E-box 蛋白質による蛋白質分解制御機構.
医学のあゆみ「ユビキチン研究の新展開:メカニズムから疾患研究へ」 211, 37-42.
15. 嘉村巧, 中山敬一. 2005.
新規ユビキチンリガーゼ KPC は G1 期における p27 の分解を制御する.
細胞工学 24, 152-153.
16. 嘉村巧, 中山敬一. 2005.
CDK インヒビター p27 は KPC ユビキチンリガーゼ複合体により G1 期に分解される.
実験医学 23, 738-741.
17. 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」印刷中.
18. 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」印刷中.
19. 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」印刷中.

著書

1. 松本雅記, 中山敬一. 2004.
定量のための標識法 B) in vivo ラベル法.
実験医学(別冊)「決定版! プロテオーム解析マニュアル」(磯辺俊明・高橋信弘 編, 羊土社, 東京) 125-132.
2. 松本雅記, 中山敬一. 2004.
ユビキチン化修飾解析法.
実験医学(別冊)「決定版! プロテオーム解析マニュアル」(磯辺俊明・高橋信弘 編, 羊土社, 東京) 158-166.
3. 中山敬一, 畠山鎮次. 2004.
タンパク質分解.

- キーワードで理解するシグナル伝達イラストマップ (山本雅・仙波憲太郎 編, 羊土社, 東京) 138-149.
4. 中山敬一, 中山啓子. 2004.
ユビキチンと細胞周期.
わかる実験医学シリーズ「ユビキチンがわかる」(田中啓二 編, 羊土社, 東京) 86-93.
 5. 押川千恵, 中山敬一. 2005.
ポリグルタミン病の治療戦略.
Annual Review 神経 2005 (柳澤信夫・篠原幸人・岩田誠・清水輝夫・寺本明 編, 中外医学社, 東京) 20-28.
 6. 中山敬一. 2005.
細胞周期の基本概念.
キーワードで理解する細胞周期イラストマップ (中山敬一 編, 羊土社, 東京) 14-21.

学会発表

1. 中山敬一, 松本雅記. (2004, 3/15).
リン酸化とユビキチン化: タンパク質修飾のプロテオミクス. (招待講演)
プロテオミクス研究の最前線 ~ 熊本からの発信 ~, 熊本.
2. Nakayama, K., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. (2004, 4/14).
Role of Skp2-mediated degradation of p27 in progression to mitosis. (Invited speaker)
The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop, Nara, Japan.
3. Nakayama, K. I., Yada, M., Nakayama, K. (2004, 4/15).
Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. (Invited speaker)
The 5th UK-Japan Cell Cycle Workshop, Nara, Japan.
4. Nakayama, K. I., Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T. (2004, 4/17).
Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. (Invited speaker)
The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama, Japan.
5. Matsumoto, M., Oyamada, K., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. (2004, 4/17).
Comprehensive analysis of posttranslational modified proteins enriched by immunoaffinity chromatography.
The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama, Japan.
6. Shirane, M., Nakayama, K. I. (2004, 5/11).
FYVE-domain protein Protrudin induces neurite extension.
The 3rd Japanese Biochemical Society Biofrontier Symposium "New Aspect of Phospholipid Biology 2004",
Kamakura, Japan.
7. Nishiyama, M., Kamura, T., Hara, T., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2004, 5/21).
Functional analysis of a ubiquitin ligase, KPC, that regulates proteolysis of p27^{Kip1} at mid-G1 phase.
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle", Cold Spring Harbor, NY.
8. Kotake, Y., Nakayama, K., Ishida, N., Nakayama, K. I. (2004, 5/21).
Analysis of p27 knock-in mice harboring mutation on serine-10, a major phosphorylation site of p27.
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle", Cold Spring Harbor, NY.

9. Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2004, 5/21).
Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7.
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle", Cold Spring Harbor, NY.
10. Nakayama, K., Nagahama, H., Nakayama, K. I. (2004, 5/21).
Role of Skp2-mediated degradation of p27 in progression to mitosis. (Invited speaker)
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle", Cold Spring Harbor, NY.
11. Ishida, N., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. (2004, 5/22).
GdX, an X-linked ubiquitin-like modifier, is conjugated to cyclin F and regulates mitotic exit. (Invited speaker)
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle", Cold Spring Harbor, NY.
12. Nakayama, K. I. (2004, 6/28).
Mammalian E4 protects neuron from degeneration. (Invited speaker)
FASEB Summer Research Conferences "Ubiquitination and Cellular Regulation", Saxtons River, Vermont.
13. 中山敬一, 中山啓子. (2004, 7/14).
細胞周期と再生: p27 プレーキの分解による制御機構. (教育講演)
第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京.
14. 中山敬一. (2004, 7/23).
細胞周期プレーキ p27 の分解と癌. (特別講演)
第 3 回愛媛オンコロジーフォーラム, 松山.
15. 中山敬一. (2004, 8/21).
細胞周期と癌と再生と. (シンポジウム)
第 44 回生化学若い研究者の会夏の学校, 東京.
16. 中山啓子, 三宅智, 中山敬一. (2004, 9/29).
M 期進行における p27 分解の重要性 (シンポジウム)
第 63 回日本癌学会総会, 福岡.
17. 中山敬一. (2004, 10/8).
脂質膜輸送分子 protrudin による神経突起形成の分子機構. (シンポジウム)
「脳」三領域合同終了シンポジウム「脳！大いなるフロンティアに挑む」, 東京.
18. Nakayama, K. I. (2004, 11/1).
Two ubiquitin ligases control proteolysis of CDK inhibitor p27. (Invited speaker)
The 4th International Symposium on "Molecular Mechanisms of Cell Proliferation and Evolution", Fukuoka, Japan.
19. 中山敬一, 白根道子. (2004, 11/11).
神経突起形成に関わる新規脂質輸送分子 Protrudin. (シンポジウム)
「生物の発生・分化・再生」第 3 回公開シンポジウム, 東京.
20. 松本雅記, 中山啓子, 中山敬一. (2004, 11/11).
ポリグルタミン病原因産物を分解する新規ユビキチン化酵素 E4B.
「生物の発生・分化・再生」第 3 回公開シンポジウム, 東京.
21. 白根道子, 中山敬一. (2004, 11/11).
FKBP38 ノックアウトマウスにおける二分脊椎.

- 「生物の発生・分化・再生」第3回公開シンポジウム, 東京.
22. 恒松良祐, 中山敬一, 中山啓子. (2004, 11/11).
血管分化に関わる Notch コピキチン化因子 Fbw7.
「生物の発生・分化・再生」第3回公開シンポジウム, 東京.
 23. 中山敬一. (2004, 11/24).
細胞周期制御とがん. (招待講演)
第20回 Wako ワークショップ, 吹田.
 24. 洲崎悦生, 中山敬一. (2004, 12/8).
Cyclin D2 の G0-G1 移行期における p27 分解への寄与.
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
 25. 高橋秀尚, 松本雅記, 畠山鎮次, 中山敬一. (2004, 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27回日本分子生物学会年会, 神戸.
 26. 松本雅記, 小山田浩二, 畠山鎮次, 夏目徹, 中山敬一. (2004, 12/8).
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.
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
 27. 事柴周平, 嘉村巧, 中山敬一. (2004, 12/8).
p27 の新たな分解因子 KPC の機能解析.
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
 28. 石田典子, 畠山鎮次, 中山啓子, 中山敬一. (2004, 12/8).
ユビキチン様修飾分子, GdX は cyclin F に共有結合し M 期の脱出を制御する.
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
 29. 西山正章, 中山啓子, 恒松良祐, 築山忠維, 菊池章, 中山敬一. (2004, 12/8).
 β -Catenin 結合タンパク Duplin ノックアウトマウスは発生初期に死亡する.
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
 30. 神武洋二郎, 中山啓子, 石田典子, 中山敬一. (2004, 12/8).
ノックインマウスを用いた p27 の主要リン酸化部位であるセリン 10 リン酸化の機能解析.
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
 31. 杉本のぞみ, 巽康年, 松影昭夫, 中山敬一, 清野透, 藤田雅俊. (2004, 12/9).
Cdt1 結合蛋白の網羅的探索.
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
 32. 嘉村巧, 中山敬一. (2004, 12/9).
VHL-box および SOCS-box タンパク質と Cullin-Rbx との結合特異性は Cul2-box および Cul5-box 配列により決定される.
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
 33. 中山啓子, 神武洋二郎, 石田典子, 三宅智, 中山敬一. (2004, 12/9).
遺伝子改変マウスを用いた DNA 含量と細胞サイズについての解析. (ワークショップ)
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.

34. Nakayama, K. I., Matsumoto, M., Oshikawa, C., Yada, M., Nakayama, K. (2004, 12/9).
Mammalian E4 is required for prevention of neuronal degeneration. (ワークショップ)
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
35. 白根道子, 中山敬一. (2004, 12/10).
膜輸送分子 Protrudin による神経突起形成の分子機構. (ワークショップ)
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
36. 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. (2004, 12/10).
ヒト滑膜肉腫関連癌原遺伝子 SKT 欠損マウスの作製と解析.
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
37. 奥村文彦, 畠山鎮次, 松本雅記, 嘉村巧, 中山敬一. (2004, 12/10).
E4B による FEZ1 のポリユビキチン化は神経突起形成に必要である. (ワークショップ)
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
38. 安達(玉盛)三美, 山田一彦, 中山敬一, 北嶋繁孝. (2004, 12/11).
p27 ノックダウンによる心筋細胞増殖能の解析. (ワークショップ)
第27回日本分子生物学会年会, 神戸.
39. 中山敬一. (2005, 1/6).
リン酸化とユビキチン化: タンパク質の質的制御と量的制御. (招待講演)
蛋白質研究所セミナー「翻訳修飾後のプロテオミクス」, 吹田.
40. 中山敬一, 松本雅記. (2005, 1/28).
Post-proteomics: comprehensive analysis of post-translational modifications of proteins. (招待講演)
科学技術振興調整費公開シンポジウム「プロテオミクス生物学の最先端技術」, 東京.
41. 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.
42. 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.

職員学生名簿(2005年4月1日現在)

分子発現制御学分野

教授	中山敬一
助教授	嘉村巧
助手	白根道子
助手(特任)	松本雅記
助手(特任)	恒松良祐
科技団派遣職員・研究員	高橋秀尚
科技団派遣職員・研究員	西山正章
科技団派遣職員・技術員	小山田浩二
大学院生(博士)	洲崎悦生
大学院生(博士)	小野山一郎
大学院生(博士)	事柴周平
大学院生(博士)	藤井洋
大学院生(博士)	雑賀徹
大学院生(博士)	中川直
大学院生(博士)	北川哲平
大学院生(博士)	逸見百江
大学院生(修士)	松本有樹修
大学院生(修士)	佐伯友子
研究生	佐藤学道
派遣共同研究員	高木正徳
科技団派遣職員・研究補助員	矢田亮子
科技団派遣職員・研究補助員	篠原都子
科技団派遣職員・研究補助員	光安理恵
科技団派遣職員・研究補助員	倉光美恵
科技団派遣職員・研究補助員	木村美保子
科技団派遣職員・一時雇用	西村直子
科技団派遣職員・一時雇用	セイドマハムド容子
科技団派遣職員・一時雇用	吉田英子
科技団派遣職員・一時雇用	瀬戸容子
科技団派遣職員・事務員	太田茜

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。

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り、その酵素本体は細胞膜に存在するシトクロム b_{558} (gp91^{phox} と p22^{phox} の2つのサブユニットから成る)である。オキシダーゼは細胞休止時には不活性型であり、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 b_{558} 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、2004 年は以下のような成果を得ている。

シトクロム b_{558} と細胞質因子の相互作用は、p47^{phox} の SH3 ドメインと p22^{phox} 細胞質領域の proline-rich region (PRR) との結合に依存し、この結合は NADPH オキシダーゼ活性化の ON/OFF を担う。細胞休止状態では p47^{phox} の SH3 ドメインは AIR (autoinhibitory region) と分子内結合しているが、両者を含む領域の溶液構造を稲垣教授(北大・院薬)との共同研究により解析し、p47^{phox} の分子内相互作用の詳細が明らかにした [Yuzawa *et al.*, 2004]。細胞刺激時にはじめて p47^{phox} は p22^{phox} に結合できるようになるが、この p47^{phox}-SH3 と p22^{phox}-プロリン・リッチ領域 (PRR) 複合体の立体構造を、やはり稲垣教授(北大・院薬)との共同研究により NMR 法を用いて決定した [投稿中]。この結合において、2つの p47^{phox} の SH3 ドメインは p22^{phox} の1つのプロリン・リッチ領域 (PRR) を挟み込むように認識するが、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示し、加えて、構造解析で明らかとなった「PRR の C 末にある α -ヘリックス領域」も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 [投稿中]。また、p47^{phox} の SH3 ドメインよりも更に N 末に存在する3つのアミノ酸残基が、p47^{phox} の p22^{phox} との結合や膜移行には必要ではないが、NADPH オキシダーゼの活性化には必須であることを明らかにし、更に詳細な解析を進めている。更に、p47^{phox} の C 末領域は、p67^{phox} と結合するのに必要でありこの結合はオキシダーゼ活性化に必須であるが、p47^{phox} C 末領域の Ser-379 がリン酸化されるとこの結合が阻害されること、その結果オキシダーゼ活性化が抑制されることを明らかにした [投稿中]。

B. 新規 NAD(P)H オキシダーゼの活性制御機構

gp91^{nox} 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。2004 年は、新規オキシダーゼの1つである Nox3 が、p22^{nox} と会合してはじめて活性をもつことを示し、更に、p47^{nox} と p67^{nox} および我々が見い出したこれらの新規ホモログ(それぞれ Noxo1 と Noxa1)が Nox3 によるスーパーオキシド生成活性を制御すること、一方、Rac は Nox3 の活性制御に関与しないことなどを明らかにした。

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、私達が見い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、2004 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 / 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-aPKC3 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い出していた。2004 年は、Par3 と Par3 は共に tight junction 形成に必須であること、この過程には新規な蛋白質-脂質相互作用が関与すること等を明らかにした [投稿中]。また、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-aPKC3 者複合体の形成を阻害しないことを示した [Izaki *et al.*, 2005]。私達は、他にも新規 Par3 結合蛋白質を見い出しており、現在、その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。このような観点から、脾臓及び血球系細胞で高発現している新規 formin 相同蛋白質 Fhos の研究に取り組んでいる。formin 相同蛋白質は、四肢形成異常を来す変異マウスの原因遺伝子として報告された formin との相同領域 FH(formin homology)1 及び2ドメインを有した蛋白質群であり、形態形成や極性形成、細胞質分裂に機能する。近年、formin 相同蛋白質が 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、新規 formin 相同蛋白質 Fhos の細胞骨格制御機構を中心に研究を進めている。2004 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。Fhos2 は心臓、腎臓と脳に多く発現するが、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、HeLa 細胞において C 末を欠失した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。マウス筋芽細胞 H9c2

(2-1)細胞で、Fhos2は中間径フィラメント画分に豊富に存在していた。これと一致して、抗Fhos2抗体を用いたH9c2(2-1)細胞染色でFhos2は中間径フィラメントであるnestinと共局在していた。さらに、Fhos2はnestinを発現しているマウス胎児の神経上皮細胞にも存在していた。このように、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するものである。

業績目録

原著論文

1. Yuzawa, S., Ogura, K., Horiuchi, M., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Kataoka, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2004.
Solution structure of the tandem SH3 domains of p47^{phox} in an autoinhibited form.
J. Biol. Chem. 279, 29752–29760.
2. Tanaka, H., Minakami, R., Kanaya, H., and Sumimoto, H. 2004.
Catalytic residues of group VIB calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 320, 1284–1290.
3. Hirano, Y., Yoshinaga, S., Ogura, K., Yokochi, M., Noda, Y., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2004.
Solution structure of atypical PKC PB1 domain and its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5.
J. Biol. Chem. 279, 31883–31890.
4. Sasaki, Y., Ihara, K., Matsuura, N., Kohno, H., Nagafuchi, S., Kuromaru, R., Kusuhara, K., Takeya, R., Hoey, T., Sumimoto, H., Hara T. 2004.
Identification of a novel type 1 diabetes susceptibility gene, T-bet.
Hum. Genet. 115, 177–184.
5. Hanano, T., Hara, Y., Shi, J., Morita, H., Umebayashi, C., Mori, E., Sumimoto, H., Ito, Y., Mori, Y., Inoue, R. 2004.
Involvement of TRPM7 in cell growth as a spontaneously activated Ca²⁺ entry pathway in human retinoblastoma cells.
J. Pharmacol. Sci. 95, 403–419.
6. Ueyama, T., Lennartz, M. R., Noda, Y., Kobayashi, T., Shirai, Y., Rikitake, K., Yamasaki, T., Hayashi, S., Sakai, N., Seguchi, H., Sawada, M., Sumimoto, H., and Saito, N. 2004.
Superoxide (O₂⁻) production at phagosomal cup/phagosome through IPKC during FcγR-mediated phagocytosis in microglia.
J. Immunol. 173, 4582–4589.
7. Kojima, C., Hashimoto, A., Yabuta, I., Hirose, M., Hashimoto, S., Kanaho, Y., Sumimoto, H., Ikegami, T., and Sabe, H. 2004.
Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides.
EMBO J. 23, 4413–4422.

8. Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2004.
A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47^{phox}, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase.
Genes Cells 9, 443–456.
9. Hashida, S., Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Takikawa, T., Sumimoto, H., Inagaki, F., and Fujii, H. 2004.
Binding of FAD to cytochrome *b*₅₅₈ is facilitated during activation of the phagocyte NADPH oxidase, leading to superoxide production.
J. Biol. Chem. 279, 26378–26386.
10. Mizukami, Y., Sumimoto, H., and Takeshige, K. 2004.
Induction of cytochrome CYP4F3A in all-trans-retinoic acid-treated HL60 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 314, 104–109.
11. Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Sumimoto, H., Kishi, K., Tsunawaki, S., Hirayama, T., and Rokutan, K. 2004.
Role of NADPH oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells.
J. Immunol. 172, 3051–3058.
12. 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 Noxo1 in guinea pig gastric mucosal cells.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 288, C450–C457.
13. 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.
14. Takamatsu, H., Takeya, R., Naito, S., and Sumimoto, H. 2005.
On the mechanism of cell lysis by deformation.
J. Biomech. 38, 117–124.
15. 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.
16. Izaki, T., Kamakura, S., Kohjima, M., and Sumimoto, H. 2005.
Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 to Par3, a human Par3-related cell polarity protein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 329, 212–219.
17. 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., Kudo, I. 2005.

- Group VIB Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 promotes cellular membrane hydrolysis and prostaglandin production in a manner distinct from other intracellular phospholipases A_2 .
J. Biol. Chem. 280, 14028–14041.
18. Ueno, N., Takeya, R., Miyano, K., Kikuchi, H., and Sumimoto, H. 2005.
The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a $\text{p}22^{\text{phox}}$ -dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators.
J. Biol. Chem. 280, in press.
19. 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, in press.
20. 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., in press.
21. 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.
 $\text{G}_{\alpha 12/13}$ -mediated production of reactive oxygen species is critical for angiotensin receptor-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts.
J. Biol. Chem. 280, in press.
22. Takeya, R., Ueno, N., and Sumimoto, H. 2005.
Regulation of superoxide-producing NADPH oxidases in non-phagocytic cells.
Methods Enzymol., in press.

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. 武谷 立, 住本英樹. 2004
PXドメインと食細胞
Surgery Frontier 11, 54-57
3. 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.
4. 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.

5. 住本 英樹.2005.
Nox: 活性酸素生成酵素ファミリー.
Vita 22, 35-40.

学会発表

1. Sumimoto, H.(3/27-3/31, 2004)
Molecular mechanisms for activation of Nox1 and Nox4. (Invited speaker)
2nd International Conference on NADPH Oxidases, Pine Mountain, GA.
2. Sumimoto, H., Takeya, R., Taura, M., Ueno, N. (8/30-9/2, 2004)
Molecular mechanism by which p47phox or its homologue activates superoxide-producing NADPH oxidases.
The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo.
3. Sumimoto, H.(10/12, 2004)
Molecular mechanisms for activation of the superoxide-producing NADPH oxidases. (Invited speaker)
Chemical Biology of Metal Sensors with Switching Functions. the 4th Symposium, Yokamama.
4. Sumimoto, H., Ueno, N., Yamasaki, T., Taura, M., and Takeya, R. (10/27-10/30, 2004)
Molecular mechanism underlying activation of superoxide-producing NADPH oxidases: roles for their regulatory proteins. (Invited speaker)
The 4th International Peroxidase Meeting, Kyoto.
5. 住本 英樹, 武谷 立, 黒田 淳哉. (2004,3/8-3/10)
血管内皮細胞と血管平滑筋細胞における NADPH オキシダーゼ. (招待講演)
シンポジウム「新しい薬物治療の標的分子・非血球型 NADPH オキシダーゼの機能と制御機構」
第 77 回日本薬理学会年会, 大阪.
6. 平野 良憲, 国府島 庸之, 武谷 立, 吉永 壮佐, 鈴木 展生, 住本 英樹,
稲垣 冬彦. (2004, 5/26-5/28)
Structural basis of PB1-PB1 interaction between aPKC and Par6.
第 57 回日本細胞生物学会大会, 大阪.
7. 武谷 立, 住本 英樹.(2004, 5/26-5/28)
Fhos, a mammalian formin, integrates actin and microtubule networks.
第 57 回日本細胞生物学会大会, 大阪.
8. 住本 英樹, 田中 玄紀, 水上 令子. (2004, 6/18-6/19)
カルシウム非依存生ホスホリパーゼ A2 (VIB 型 iPLA₂) の構造と機能. (招待講演)
シンポジウム「ユニークな生物機能を有するホスホリパーゼ」
第 46 回日本脂質生化学会, 熊本.
9. 中谷 良人, 上田 香織, 依田 恵美子, 村上 誠, 工藤 一郎, 住本 英樹. (2004, 6/18-6/19)
カルシウム非依存生ホスホリパーゼ A₂ (iPLA₂) の機能解析.
第 46 回日本脂質生化学会, 熊本.

10. 住本 英樹. (2004, 6/24- 6/25)
活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼの活性化メカニズム. (招待講演)
シンポジウム「活性酸素・フリーラジカルの産生に関わる酵素系」
第 26 回日本フリーラジカル学会学術集会, 山形.
11. 住本 英樹.(2004, 7/8- 7/10)
動物における NOX ファミリーの役割とその活性化機構. (招待講演)
シンポジウム「生体防御における酸素の功罪」
第 15 回日本生体防御学会学術総会, 長崎.
12. 住本 英樹. (2004, 7/13- 7/14)
好中球による活性酸素生成の分子メカニズム. (招待講演)
ワークショップ「好中球と炎症」
第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京.
13. Tomoko Izaki, Motoyuki Kohjima, Hideki Sumimoto. (2004, 10/13- 10/16)
An Interaction between 14-3-3 and Par3 is important in establishment of mammalian cell polarity.
第 77 回日本生化学会大会, 横浜.
14. Ryu Takeya, Hideki Sumimoto. (2004, 10/13- 10/16)
Localization of the mammalian forming Fhos to actin- based structures and microtubule networks.
第 77 回日本生化学会大会, 横浜.
15. Shinichi Yoshida, Tamon Kawamura, Hideki Sumimoto, Fuyuhiko Inagaki. (2004, 10/13- 10/16)
NMR study on the interaction between gp91^{phox} and NADPH.
第 77 回日本生化学会大会, 横浜.
16. Masahiko Taura, Ryu Takeya, Keiichiro Kami, Hideki Suimoto. (2004, 10/13- 10/16)
The roll for Iie-152 and Thr-153 of p47^{phox} in activation of the phagocyte NADPH oxidase.
第 77 回日本生化学会大会, 横浜.
17. Satoru Yuzawa, Hazuya Honbou, Yuko Fujioka, Mikiko Kataoka, Hideki Sumimoto, Fuyuhiko Inagaki. (2004, 10/13- 10/16)
Structural properties of cytosolic regulatory subunits of phogocyte NADPH oxidase.
第 77 回日本生化学会大会, 横浜.
18. Shukichi Hashida, Satoru Yuzawa, Yuko Fujioka, Hideki Sumimoto, Fuyuhiko Inagaki, Hirotsada Fujii. (2004, 10/13- 10/16)
Activation by Fatty Acids of the O₂⁻-Generating NADPH Oxidase Reconstituted with Recombinant Cytosolic Proteins.
第 77 回日本生化学会大会, 横浜.
19. Chie Kojima, Ari Hashimoto, Izumi Yabuta, Mayumi Hirose, Shigeru Hashimoto, Yasumori Kahaho, Hideki Sumimoto, Takahisa Ikegami, Hisataka Sabe. (2004, 10/13- 10/16)
Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides.
第 77 回日本生化学会大会, 横浜.
20. Emiko Yoda, Kaori Ueda, Yoshito Nakatani, Hideki Sumimoto, Makoto Murakami, Ichiro Kudo.(2004,10/13- 10/16)

Immunochemical and functional analysis of Ca^{2+} -independent PLA₂.

第77回日本生化学会大会, 横浜

21. Kenji Ogura, Shinnosuke Torikai, Satoru Yuzawa, Kazuya Saikawa, Hideki Sumimoto, Fuyuhiko Inagaki.(2004, 10/13- 10/16)

NMR solution structure of the tandemSH3domains of p47^{phox} complexed with the p22^{phox}- derived peptide.

第77回日本生化学会大会, 横浜

22. Masahiro Shinohara, Saori Harada, Makoto Kubodera, Junji Mitsushita, Hideki Sumimoto, Tohru Kamata.(2004,10/13-10/16)

Study on signal transduction by the superoxide producing “Nox” family mediating cellular transformation.

第77回日本生化学会大会, 横浜

23. Weiho Shang, Yoshifumi Adachi, Wei Chen, Yuko Yokoo, Junji Mitsushita, Hideki Sumimoto, Tohru Kamata. (2004,10/13-10/16)

Identification and functional analysis of cellular targets for a superoxide producing oxidase Nox1 involved in Ras oncogene- transformation.

第77回日本生化学会大会, 横浜

24. 住本 英樹. (2004, 1/28- 1/29)

注目される新しい活性酸素産生酵素 Nox/Duox ファミリーの多彩な機能 (招待講演)

シンポジウム「新しい時代にむけた消化管研究-他分野からの提案」

第1回日本消化管学会総会, 名古屋

増殖分化制御学分野

教 授 住 本 英 樹
助 手 武 谷 立

“ 紙 圭 一 郎
(海外渡航の為辞職)

“ 鎌 倉 幸 子
(10月より就任)

研究員(JST) 宮 野 佳

共同研究員 水 上 令 子

“ 谷 口 賢 一 郎

大 学 院 生 山 崎 朋 子

”	伊崎 智子
”	上野 紀子
”	田浦 政彦
”	山本 麻太郎
”	上坂 十四夫
科学技術振興機構派遣職員	鹿毛 陽子
”	西納 美奈子
研究補助員	松尾 美樹
”	吉浦 奈津子

分子腫瘍学分野

Division of Molecular and Surgical Oncology

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 法を用いた肝炎・肝硬変特異的な遺伝子発現プロファイル解析

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った。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(Utsunomiya T et al, 2004)。これにより肝炎から肝硬変、また肝硬変から肝癌発症に至る経済的機能解析を行うことができ、同時に既存の肝機能評価を超える新しい診断基準を確立したい。

3. DNA microarray 法を用いた HCC の多中心性発がんと肝内再発の遺伝解析

肝細胞癌は肝炎、肝硬変をベースに発生するため多中心的に同時に発生したり、肝内再発をくり返すという特徴がある。その一方で単発するのみの肝細胞癌が存在する。DNA microarray 法を用いて遺伝子を解析しそれぞれの遺伝子学的特徴を解明し、診断や治療法に応用するため検討を行っている。

4. 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。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の同定を試みている。その他癌で抑制されていることが分かっている遺伝子についてその抑制機序をメチル化の観点から検討している。

5. aCGH 法による包括的ゲノム解析

平成15年度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16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、多段階発癌、特に肝臓癌の多段階病変を詳細に検討している。

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た。本年度は各発がん段階で特徴的な遺伝子を抽出したのでさらなる機能解明をすすめたい。

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 (Mori M et al Surgery, 2002)。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いる。

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 (Nghara 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

2. 食道癌における PIK3CA 遺伝子の突然変異

食道癌において PIK3CA 遺伝子のエクソン9に高頻度に突然変異を見いだした(13 例/36 例: 36%)。

PIK3CA に対する分子標的薬剤開発の可能性を今後探索したい。

3. 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 skp2 および cks1 遺伝子が染色体レベルで増強していることを見だし、今後ゲノム変化を中心に研究を進めたい。

4. 消化器癌・乳癌における マトリックス・メタプロテアーゼ ファミリー発現と癌の悪性度

MMP family (MMP-1, 2, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14) の発現を食道癌の同一検体を用いて解析した結果、予後に関わる因子 (MMP-7, 11, 13, 14) の中で特に MT1-MMP が中心的な役割を果たすと考えられたため遺伝子導入株を作成し詳細な解析を行っている。

5. 消化器癌・乳癌における small G-protein 発現の意義

small G-protein は発癌・進展に重要な役割を持つとされるが、我々はそのひとつ G-protein $\gamma 7$ を同定し、膵癌を初めとする消化器癌で重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。本年度はこの G-protein $\gamma 7$ の発現抑制機序を解明するとともに、関連タンパク質について検索をすすめる予定である。(Utsunomiya T, Arch Surg, 2002)

6. 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, Shiraishi 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)

7. 薬剤誘導性 FHIT 発現ベクター導入による FHIT 遺伝子機能の解明

癌関連遺伝子 FHIT の機能を明らかにする目的で、薬剤誘導性 FHIT 発現ベクター導入による FHIT 遺伝子機能の解明を、Fhit 遺伝子導入株と親株の DNA microarray 解析により検討している。

d) 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。

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16年3月時点で全国多施設共同研究として1500例の末梢血・骨髓液を収集しており、精力的に解析が進んでいる。

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。現在、これらの遺伝子を用いた治療前の放射線感受性検査としての診断用マイクロアレイの作成中である。

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。大腸癌については平成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。また食道癌については平成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。いずれも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ている (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。これまで多施設と共同で約 60 症例に治療を実施し一定の効果を得ている。

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 では健康マウス由来の 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, SSSX, 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。

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。これには腫瘍で発現した Fractalkine が腫瘍内にリンパ球を誘導する機序が考えられた。

5. 消化器癌における TRAG-3 の発現とその意義の解明

Caner-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現在検討中である。

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) アデノウイルスベクターを用いた癌の遺伝子治療法の開発

1. Interferon- γ -inducing factor/IL-18 とアデノウイルスベクターを用いた抗腫瘍効果の機序の解析

IL-18 は免疫反応の急性期にマクロファージや樹状細胞 (DC) から分泌される。IL-18 を産生するアデノウイルスベクターを担癌マウスの腫瘍に直接投与することにより、発揮される抗腫瘍効果を明らかにし、さらに樹状細胞と同時投与することにより増強される抗腫瘍効果を解析する (Tanaka F, Cancer Res 2002)。

2. Fhit アデノウイルスベクターを用いた抗腫瘍効果 の機序の解析

Fhit は3番染色体 3p14.2 領域において高率に遺伝子異常を示す癌抑制遺伝子である。Fhit とアデノウイルスベクターを用いた臨床応用を目指して、遺伝子治療の実験を行っていきたいと考えている。

3. G protein 7 とアデノウイルスベクターを用いた抗腫瘍効果 の機序の解析

G protein 7 は各種消化器癌組織において発現の低下する遺伝子として当科において単離した。(Shibuta K, BBRC, 1998) G protein 7 の遺伝子導入では p27 を介した G1/S 期の抑制を介して細胞増殖が抑制された。(Shibuta K, Cancer Res 1999, Utsunomiya T, Arch Surg 2002) 実際の治療を想定して Ad-G protein 7 の投与を行いその効果を検討する。

c) 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、昨年度は肝臓癌細胞株 HuH7 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、現在精力的に研究をすすめている。さらにこのような幹細胞を臨床サンプルより分取し、詳細な遺伝子解析および機能解析をはじめている。

業績目録

原著論文

1. Mimori K, Tanaka Y, Yoshinaga K, Masuda T, Yamashita K, Okamoto M, Inoue H, Mori M. 2004
Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer.
Ann Oncol 15(2): 236-241,
2. Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Inoue H, Mori M. 2004
Identification of HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from cancer-testis antigen, NY-ESO-1, and induction of a specific antitumor immune response.
Clin Cancer Res 10: 890-896,
3. Yamashita K, Tanaka Y, Mimori K, Inoue H, Mori M. 2004
Differential expression of MMP and uPA systems and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma.
Int J Cancer 110(2): 201-207,
4. Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, Alder H, Rattan S, Cesari R, Nolli ML, Williams NN, Mori M, Kanematsu T, Croce CM. 2004
The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis.
Clin Cancer Res 10 (7): 2459-2465,
5. Ishii H, Mimori K, Vecchione A, Sutheesophon K, Fujiwara T, Mori M, Furukawa Y. 2004
Effect of exogenous E2F-1 on the expression of common chromosome fragile site genes, FHIT and WWOX.

- Biochem Biophys Res Comm 316 (4): 1088-1093,
6. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka Y, Tanaka F, Inoue H, Murayama S, Mori M. 2004
Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma.
Br J Cancer 91: 282-286,
 7. Utsunomiya T, Okamoto M, Hashimoto M, Yoshinaga K, Shiraishi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Watanabe G, Barnard GF, Mori M. 2004
A gene-expression signature can quantify the degree of hepatic fibrosis in the rat.
J Hepatol 41: 399-406,
 8. Sagara Y, Mimori K, Yoshinaga K, Tanaka F, Nishida K, Ohno S, Inoue H, Mori M. 2004
Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neumRNA expression in human breast cancer.
Br J Cancer 91: 959-965,
 9. Mimori K, Ueo H, Kuroki T, Shiraishi T, Creer S, Taylor S, Ishii H, Mori M. 2004
Prediction of 5'-deoxy-5-fluorouridine sensitivity in colorectal cancer cases by thymidine phosphorylase activity and preliminary identification of susceptibility related genes.
Oncol Rep 12(1): 19-23,
 10. Yoshinaga K, Inoue H, Utsunomiya T, Sonoda H, Masuda T, Mimori K, Tanaka Y, Mori M. 2004
N-cadherin is regulated by activin A and is associated with tumor aggressiveness in esophageal carcinoma.
Clin Cancer Res 10: 5702-5707,
 11. Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Yamaguchi H, Ohta M, Okamoto M, Mimori K, Mori M. 2004
Expression of cancer-testis antigen (CTA) genes in intrahepatic cholangiocarcinoma.
Ann Surg Oncol 11(10): 934-940,
 12. Haraguchi N, Inoue H, Mimori K, Tanaka F, Utsunomiya T, Yoshikawa K, Mori M. 2004
Analysis of gastric cancer with cDNA microarray.
Cancer Chemoth Pharm 54(1)Suppl 1: S21-S24,
 13. Mimori K, Yamashita K, Ohta M, Yoshinaga K, Ishikawa K, Ishii H, Utsunomiya T, Barnard GF, Inoue H, Mori M. 2004
Coexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and epidermal growth factor (EGF) receptor in colorectal cancer.
Clin Cancer Res 10: 8243-8249,
 14. Ohta M, Tanaka F, Yamaguchi H, Sadanaga N, Inoue H, Mori M. 2005
The high expression of factalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients.
Int J Oncol 26: 41-47,
 15. Nishida K, Mine S, Utsunomiya T, Inoue H, Okamoto M, Udagawa H, Hanai T, Mori M. 2005
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,
 16. Masuda T, Kataoka A, Ohno S, Murakami S, Mimori K, Utsunomiya T, Inoue H, Tsutsui S, Kinoshita J, Masuda N, Moriyama N, Mori M. 2005
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,
17. Nagahara H, Mimori K, Ohta M, Utsunomiya T, Inoue H, Barnard GF, Ohira M, Hirasaki K, Mori M. 2005
 Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma
Clin Cancer Res 11: 1368-1371,
 18. Ishii H, Mimori K, Yoshikawa Y, Mori M, Furukawa Y, Vecchione A. 2005
 Differential roles of E-type cyclins during transformation of murine E2F-1-deficient cells
DNA Cell Biol 24 (3): 173-179,
 19. Ishii H, Mimori K, Inageta T, Murakumo Y, Vecchione A, Mori M, Furukawa Y. 2005
 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,
 20. Calin GA, Trapasso F, Shimizu M, Dumitru CD, Yendamuri S, Godwin AK, Ferracin M, Bernardi G, Chatterjee D, Baldassare G, Rattan S, Alder H, Mabuchi H, Shiraiishi 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. 2005
 Familial cancer associated with a polymorphism in ARLTS1
N Engl J Med 352: 1667-1676,
 21. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Nagahara H, Murayama S, Mori M. 2005
 Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer
Clin Cancer Res 11(8): 2889-2893,
 22. Mimori K, Ishii H, Okamoto M, Barnard GF, Mori M. 2005
 Identification of bona-fide characteristics of Esophageal cancer by adenoviral-FHIT treatment
Ann Surg Oncol 12 (2): S44-S44,
 23. 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.
Int J Cancer (in press)
 24. Mimori K, Ogawa K, Okamoto M, Sudo T, Inoue H, Mori M:
 Clinical significance of the abundant expression of enhancer of zeste homolog 2 in colorectal cancer cases.
Eur J Surg Oncol(in press)
 25. 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 Metastasis(in press)
 26. 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(in press)
 27. Sudo T, Utsunomiya T, Mimori K, Nagahara H, Ogawa K, Inoue H, Wakiyama S, Fujita H, Shirouzu K, Mori M:

総説

1. 森 正樹: 2004
診断・治療における分子生物学の応用.
ドクターサロン 48(4): 299-303,
2. 森 正樹: 2004
乳腺腫瘍摘出後の生食水による replacement.
乳癌診療二頁の秘訣 176-177
3. 森 正樹, 太田 光彦: 2005
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,
4. 乳癌診療二頁の秘訣 : 176-177,井上 裕, 三森功士, 白石 猛, 森 正樹: 2004
転移癌.
Mebio 21(1): 56-64,
5. 赤座英之, 市川智彦, 鶴尾 隆, 島田 安博, 森脇久隆, 森 正樹, 野口眞三郎, 中村清吾, 西條
長宏, 曾根三郎, 磯西成治, 大橋靖雄, 樋之津史郎, Euler Mikael von, Blackedge George.: 2004
分子標的診断.
癌と化学療法 31(1): 125-133,
6. 小川和彦, 増田隆明, 井上 裕, 村山貞之, 森 正樹: 2004
がん組織における CDK インヒビター-p27 の分解.
現代医療 36(4): 947-952,
7. 三森功士, 増田隆明, 森山紀之, 森 正樹: 2004
微量癌細胞検出の臨床的意義.
外科 66(5): 497-501,
8. 太田光彦, 三森功士, 井上 裕, 森 正樹: 2004
遺伝子診断の現況と展望.
臨床消化器内科 19(7): 833-841,
9. 小川和彦, 森山貞之, 森 正樹: 2004
がん悪制度診断のための細胞周期マーカー.
分子細胞治療 3(3): 336-337,
10. 田中文明, 森 正樹: 2004
樹状細胞を用いた癌特異免疫治療.
現代医療 36(7): 1517-1521,
11. 宇都宮 徹, 西田康二郎, 井上 裕, 森 正樹: 2004
cDNA マイクロアレイ解析のピットフォール.
Cancer Frontier 6(1): 56-63,
12. 青木克益, 森 正樹: 2004
アンジオポイエチン-血管新生・形成因子.

- 生体の科学 55(5): 472-473,
13. 三森功士、山下継史、吉永敬士、森 正樹: 2004
癌における MMP7 による EGFR の活性化と分子標的としての意義
癌の臨床 50(10): 821-824,
 14. 宇都宮 徹、森 正樹: 2005
悪性腫瘍における輸液
外科 67(1): 93-97,
 15. 主藤朝也、田中真二、田中文明、三森功士、藤田博正、白水和雄、森 正樹: 2005
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,
 16. 片岡明美、大野真司、宇都宮徹、森 正樹: 2005
分子マーカーによる検査法の発展.
治療学 2 39: 19(139)-25(145),
 17. 宇都宮徹、森 正樹: 2005
転移性肝癌の成立機序.
外科治療 92(2): 140-147,
 18. 三森功士、森 正樹: 2005
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,
 19. 井上裕、森 正樹: 2005
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,

著書

1. 森 正樹: 2004.1.1
腸管癒着省
今日の治療指針 2004 年: 2004 年版第 1 刷 345-346, 医学書院, 東京都,
2. 黒木 保、井上 裕、森 正樹: 2004
発癌機構
消化器外科学レビュー: 3-7, 総合医学社, 東京都,
3. 太田 光彦、森 正樹: 2005.4.20
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,

学会発表

1. 黒木 保、松山 歩、田島義証、森 正樹、兼松隆之: 2004.4.8
WVVOX 遺伝子は膵管癌の癌抑制遺伝子である
第 104 回日本外科学会: 大阪
2. 三森功士、山下継史、永原 央、山口博志、宇都宮 徹、井上 裕、森 正樹: 2004.4.8

- 癌における MMP7 による EGFR の活性化と分子標的としての意義
第 104 回日本外科学会.大阪
3. 三森功士、岡本正博、白石猛、田中文明、宇都宮徹、井上裕、森 正樹: 2004.6.10
生体内の発癌環境因子と癌抑制遺伝子 FHIT の関連について
第 13 回 日本がん転移学会総会.東京
 4. 大野真司、戸井雅和、中村清吾、岩田広治、増田慎三、片岡明美、森 正樹: 2004.6.11
乳癌ネットワーク: Data base と Tissue bank 機構への取り組み
第 12 回 日本乳癌学会総会.小倉
 5. Sudo T, Mimori K, Mori M: June 19, 2004
MAL gene expression in esophageal cancer suppresses motility, invasion and tumorigenicity and enhances apoptosis through the Fas pathway. Then 50th Annual Congress of The Japan Section, The international College of Surgeons, Kurume, Fukuoka
 6. Okamoto M, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Mori M: June 19, 2004
Specific gene-expression profiles associated with multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma predict intrahepatic recurrence after curative hepatectomy.
Then 50th Annual Congress of The Japan Section, The international College of Surgeons, Kurume, Fukuoka
 7. Mimori M, Kataoka A, Mori M: June 19, 2004
Identification of molecular markers for carcinogenesis or metastasis related gene in breast cancer
Then 50th Annual Congress of The Japan Section, The international College of Surgeons, Kurume, Fukuoka
 8. 田中文明、太田光彦、原口直紹、岡本正博、三森功士、宇都宮徹、井上裕、森 正樹: 2004.6.25
癌抗原ペプチドと樹状細胞を用いた進行食道癌に対する治療戦略
第 58 回 日本食道学会学術集会.東京
 9. 三森功士、西田康二郎、峯真司、田中文明、宇都宮徹、井上裕、森 正樹: 2004.6.25
ラット食道癌多段階発癌モデルを用いた dysplasia の意義
第 58 回 日本食道学会学術集会.東京
 10. 森 正樹: 2004.7.21
術前生検標本の分子遺伝学的活用
第 59 回日本消化器外科学会定期学術総会.鹿児島
基調講演
 11. 宇都宮徹、岡本正博、井上裕、脇山茂樹、橋本雅司、前田貴司、福澤謙吾、森 正樹: 2004.7.21
肝癌術前の非癌部肝生検による肝障害度の評価および残肝発生の予測
第 59 回 日本消化器外科学会定期学術総会.鹿児島
 12. 三森功士、白石猛、松山歩、井上裕、森 正樹: 2004.7.21
大腸癌における COX2 と癌抑制遺伝子 FHIT との関係
第 59 回 日本消化器外科学会定期学術総会.鹿児島
 13. 田中文明、山口博志、太田光彦、原口直紹、宇都宮徹、井上裕、森 正樹: 2004.7.22
癌抗原ペプチドと樹状細胞を用いた進行消化器癌に対する治療戦略

- 第 59 回 日本消化器外科学会定期学術総会.鹿児島
14. 森 正樹: 2004.7.22
消化器癌の微小転移診断と臨床展開 (特別発言)
第 59 回日本消化器外科学会定期学術総会.鹿児島
特別発言
 15. Mori M: August 19,2004
Molecular analysis of invasion and metastasis in clinical cancer with cDNA microarray.
The 3rd International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis. , Sapporo
 16. Inoue H, Matsuyama A, Mimori K, Utsunomiya T, Mori M: August 20,2004
Prognostic score of gastric cancer determined by cDNA microarray.
The 3rd International Conference on Gastroenterological Carcinogenesis. , Sapporo
 17. Okamoto M, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Mori M: September 12, 2004
SPECIFIC GENE-EXPRESSION PROFILES ASSOCIATED WITH MULTICENTRIC OCCURRENCE
AND WITH INTRAHEPATIC RECURRENCES OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN
HCV-POSITIVE PATIENTS.
14th World Congress of the International Association of Surgeons,and Gastroenterologists , スイス
 18. Tanaka F, Ohta M, Utsunomiya T, Inoue H, Mori M: September 12, 2004
Novel strategy of tumor-specific cancer immunotherapy; Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of
anticancer drugs
14th World Congress of the International Association of Surgeons,and Gastroenterologists , スイス
 19. 松山歩, 三森功士, 井上裕, ケイ・ヒューブナー, カルロ・クローチェ
森 正樹: 2004.8.20
発癌・癌進展に関連するゲノム脆弱性
第 15 回日本消化器発癌生学会総会.札幌
 20. 松山歩, 三森功士, 白石猛, 井上裕, ヒューブナー・ケイ
クローチェ・カルロ, 森 正樹: 2004.8.20
ゲノム脆弱性の原因究明 –ヒト FHIT とマウス Fhit を比較して–
第 63 回日本癌学会学術総会.福岡
 21. 大野真司, 片岡明美, 村上茂, 井上博道, 三森功士, 森 正樹: 2004.9.30
乳癌微小転移診断の臨床的意義と治療戦略構築への応用
第 63 回日本癌学会学術総会.福岡
 22. 太田光彦, 田中文明, 三森功士, 岡本正博, 宇都宮徹, 井上裕, 森 正樹: 2004.9.30
食道癌における large G protein 遺伝子の発現とその癌進展への関与
第 63 回日本癌学会学術総会.福岡
 23. 田中文明, 太田光彦, 原口直紹, 宇都宮徹, 井上裕, 森 正樹: 2004.11.26
癌抗原ペプチドと樹状細胞を用いたワクチン療法現状と発展への工夫
第 17 回日本バイオセラピー学会学術集会総会.北九州
 24. Mori M: December 10, 2004
Clinical significance of minute number of cancer cells in the blood.

- 19th World Congress of International Society for Digestive Surgery, Yokohama
25. Inoue H, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Okamoto M, Mori M: December 10, 2004
Molecular Diagnosis of Gastric Cancer Determined by cDNA Microarray & Laser Micro Dissection.
19th World Congress of International Society for Digestive Surgery, Yokohama
26. Tanaka F, Sonoda H, Okamoto M, Mimori K, Utsunomiya T, Inoue H, Mori M: December 11, 2004
TIMP-3 and PI3-kinase Genes were Related with Progression of Colon Cancer under Laparoscopic Surgery in Murine Model.
19th World Congress of International Society for Digestive Surgery, Yokohama
27. Sudo T, Mimori K, Inoue H, Mori M, Fujita H, Shirouzu K: December 11, 2004
Identification and Functional Analysis of Novel Suppressor Gene of Esophageal Cancer.
19th World Congress of International Society for Digestive Surgery, Yokohama
28. Mori M: February 13, 2005
Molecular Study on Inbasion and Metastasis of Colorectal Cancer
The 10th UNITED STATES-JAPAN CLINICAL TRIALS SUMMIT, Maui, Hawaii
29. Mimori K, Ishii H, Okamoto M, Barnard GF, Huebner K, Croce CM, Mori M: March 6, 2005
Identification of Bone-fide Characteristics of Esophageal Cancer by Adenobiral-FHIT Treatment
58th Annual Cancer Symposium. , Atlanta

分子腫瘍学分野

教授 森 正樹
 助教授 井上 裕
 講師 佐々木 淳
 助手 三森 功士
 田中 文明
 医員 大町 貴弘
 石川 健二
 小坂 愉賢
 平崎 重雄

大学院生 原口 直紹

共同研究者 家田 敬輔

中村 能人

張 翔

研究補佐員 下岡 都司子

緒方 和恵

小田 真弓

笠置 倫子

吉森 華香

中川 悠子

事務補佐員 阿南 真芸子

未高 僚子

工藤 美弥子

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。さらに、心不全における末梢リンパ球サイトカイン産生能を Flow Cytometry 法で検討し、ある種のサイトカインが心不全の発症・進展に関与している可能性を示唆する所見を得ている。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他、老化に伴っておこる脳でのゲノム構造変化を追跡している。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、2005年4月1日に樋口義洋助手が大分県立病院循環器内科より赴任した。佐藤真司講師が、九州医療センターへ異動のため2004年3月31日に退職した。升永典代医員が後期研修のため5月1日より赴任した。5月1日より菅 静芝非常勤研究員が赴任した。

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検査の開発

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-Brachil 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, チロシンフォスファ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

は無く、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、従来の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. 老化の機序に関する分子遺伝学的研究

a. マーモセット ES 細胞の分化誘導関連遺伝子の同定と解析

小型霊長類マーモセットの ES 細胞を用いて、多能性幹細胞から神経系細胞への分化誘導モデルの確立を目指している。ES 細胞は、長期培養中一部の細胞に、多細胞ヘアンカーリングする性格を有する軸索様突起の伸長が見られることが確認された。現在、

本細胞の神経細胞との異同を検討している。また、昨年来のランダムリボザイムライブラリー発現ベクターを用いた遺伝子抑制スクリーニング法による神経系への分化を引き続き行なう。

b. 胎生期マウス脳組織内環状 DNA 産生領域の DNA 組み換えの検出とそ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 欠失が起こることが確認された。さらに、周産期から生下時直後の一時期、水晶体でも同領域の DNA 欠失を認めた。これらの知見から BC-1 領域の組換えが外胚葉系細胞の分化に関わる可能性を推定している。また、成マウスでは、脳内で BC-1 組み換えは確認できないが、生後2年以上を経た老齢マウスでは、再び同領域の組換えが起こることを示唆する知見を得ており、老化に伴うゲノムの不安定化を示す所見の一つである可能性があり、老齢マウスにおける、より広範囲の領域の組換えを検索している。

c. 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可能性が報告されている。中でも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、その傾向が見られないなど、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。これについては、これまでテロメアの平均長をパラメーターとし、テロメア長の分布差を無視してきたことによるのではないかとする批判がある。今後、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検証することを計画している。また、テロメアの短縮には、テロメア構造の保護機能の脆弱化が関与するとする考え方があり、テロメア周辺の脱メチル化がその根拠の一つとなっている。しかし、テロメア周辺のメチル化の程度と生活習慣病の関連に関する報告は皆無である。本研究では、このようなテロメア周辺の脱メチル化についても合わせて検討する。

業績目録

原著論文

- 1) Sugano M, Tsuchida K, Makino N. 2004.
Effects of soluble TNF-alpha receptor 1 on apoptosis induced by oxidized LDL in endothelial cells.
Mol Cell Biochem. 258, 57-63.
- 2) Sugano M, Tsuchida K, Makino N. 2004.
Intramuscular gene transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 activates vascular endothelial growth factor receptor (KDR/flk-1) and accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia.
Circulation. 109, 797 – 802.
- 3) Sugano M, Tsuchida K, Hata H, Makino N. 2004.
In vivo transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats.
FASEB J. 18, 911-913.
- 4) Sugano M, Hata H, Tsuchida K, Suematsu N, Oyama J, Satoh S, Makino N. 2004.
Local delivery of soluble TNF-alpha receptor 1 gene reduces infarct size following ischemia/reperfusion injury in rats.
Mol. Cell Biochem. 266 , 127-132.
- 5) Sugano M, Tsuchida K, Makino N. 2004.
A Protein tyrosine phosphatase inhibitor accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia.
J. Cardiovasc. Pharmacol. 44,460-465.
- 6) Maeda T, Hatakenaka M, H, Muta H, Nakayama M, Nakazaki Y, Hiroyama Y, Suzuki T, Tani K. 2004.
Clinically mild, atypical, and aged craniofacial syndrome is diagnosed as Crouzon syndrome by identification of a point mutation in the fibroblast growth factor receptor 2 gene (FGFR2).
Internal Medicine. 43,432-435.
- 7) Maeda T, Mutoh T, Muta H, Nakayama M, Nakajima Y, Ikuta T, Yasuda M, Etoh T, Shimizu K, Nakazaki Y, Hiroyama T, Somada S, Kurita R, Shiratsuchi M, Nishimura J, Tani K. 2004.
An 85-year-old Japanese female with Ph-1-positive CML with del (5q) successfully treated by intermittent imatinib therapy.

J. Am. Geriat. Soc. 52, 1783-1784.

- 8) Maeda T, Shiokawa S, Yoshikawa Y, Hiroshima T, Nakajima Y, Muta M, Nakayama M, Nakazaki Y, Akizuki S, Shimizu K, Mutoh T, Somada S, Kurita R, Shiratsuchi M, Makino M, 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 ECR17, 89.

- 9) Maeda T, Chijiwa Y, Tsuji H, Sakoda S, Tani K, Suzuki T. 2004.

Somatic DNA recombination yielding circular DNA and deletion of a genomic region in embryonic brain.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 319, 1117-1123.

- 10) Maeda T, Oyama J, Mukai Y, Satoh S, Sugano M, Tani K, Makino N. 2005. Cardiac dysfunction with severe anemia in an aged case. J. Am. Geriat. Soc. 53: 361-362.

- 11) Higuchi Y, Charles F. McTiernan, Carole B. Frye, Brian S. McGowan, Tung O. Chan, Arthur M. 2004.

Feldman TNF Receptor 1 and 2 Differentially Regulate Survival, Cardiac Dysfunction, and Remodeling in Transgenic Mice with TNF-induced Cardiomyopathy.

Circulation. 109, 1892-1897.

- 12) Higuchi Y, Tomoki Yoshida, Takashi Okamura, Shunichi Kaseda. 2005. Implantation of a Permanent Suprarenal Vena Cava Filter in an Elderly Patient with Inherited Protein S Deficiency

Medical Postgraduates 43, 97-103

- 13) Oyama J, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. 2004. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice.

Circulation. 109, 784-9.

- 14) Matsui J, Tamasawa N, Tanabe J, Kasai N, Murakami H, Yamato K, Guan J, Suda T. 2004.

LDL particle size and lipid composition are risk factors for microalbuminuria in normotensive and normocholesterolemic patients with type 2 diabetes.

Diabetes Res. Clin. Pract. 66, 229-36.

- 15) Guan JZ, Tamasawa N, Matsui J, Murakami H, Suda T, Ochiai S, Tsutsui T, Satoh K, MR. 2004.

A case of tangier disease which showed very C-terminal mutation of ATP-binding cassette A1

- and impaired cholesterol efflux. Am. J. Med. Genet. Nov 1;130A(4):398-401.
- 16) Guan JZ, Murakami H, Yamato K, Tanabe J, Matsui J, Tamasawa N, Suda T. 2004.
Antioxidant effects of fluvastatin in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia: reduction of cholesterol oxidation products and VCAM-1 level.
J. Atherosclerosis and Thrombosis. 11:56-61.
- 17) Murakami H, Tamasawa N, Yamato K, Tanabe J, Kasai N, Matsui J, Guan JZ, Ogawa Y, Suda T.
Effect of fenofibrate on type 2 diabetic patients with dyslipidemia.
Hirosaki J Exp Med (in press)
- 18) Makino N, Sugano M, Satoh S, Oyama J, Maeda T.
PPAR- γ ligand attenuated brain natriuretic peptide production and affect remodeling in cardiac fibroblasts in reoxygenation after hypoxia.
Cell Biochem. Biophysic. (in press)
- 19) Makino N, Maeda T, Sugano M, Satoh S., Watanabe, R. and Abe, N.
High serum TNF- α level in Type 2 diabetic patients with microangiopathy is associated with eNOS downregulation and apoptosis in endothelial cells.
J. Diabetes and its Complications (in press).

総説

- 1) 前田豊樹, 谷 憲三郎 . 2004.
遺伝子工学の医療応用 -遺伝子診断と遺伝子治療-
Bioベンチャー . 羊土社 , 東京 , Vol4, 49-55.
- 2) 前田豊樹, 谷 憲三郎 . 2004.
赤芽球癆 .
内科 . 南江堂 . Vol94. 523-529.

学会発表

- 1) Sugano M, Suematsu N, Oyama J, Satoh S, Makino N. (2004, 3/27-29)
TNF-alpha Inhibits Activation of Hepatocyte Growth Factor Receptor and Hepatocyte Growth Factor-Induced Endothelial Cell Proliferation.
第 68 回日本循環器学会学術集会 (東京)
- 2) 菅野 公浩, 畑 知二, 土田 啓子, 牧野 直樹 . (2004, 6/25-26)

Soluble TNF-alpha receptor 1 遺伝子導入における, 心筋梗塞後の心機能及び梗塞範囲に対する効果.

第 8 回日本適応学会, 福島.

- 3) 菅野 公浩, 土田 啓子, 牧野 直樹. (2004, 7/17-18)
チロシンフォスファターゼ阻害剤による新たな血管新生療法—下肢虚血モデルにおける検討. 第 27 回心筋代謝研究会, 大阪.
- 4) Sugano M, Hata T, Tsuchida K, Makino N. (2004, 11/7-10)
SiRNA-mediated inhibition of SHP-1 alleviates myocardial infarction.
The 77th Scientific Sessions of American Heart Association, New Orleans, USA.
- 5) Sugano M, Hata T, Tsuchida K, Satoh S, Makino N. (2004, 11/24-25)
RNA INTERFERENCE TARGETING SHP-1 ALLEVIATES MYOCARDIAL INFARCTION.
The 21st Annual meeting of the Japanese Section International Society for Heart Research. Kofu
- 6) Sugano M, Hata T, Oyama J, Satoh S, Makino N. (2005, 3/19-21) Small Interfering RNA Targeting SHP-1 Limits Infarct Size in Acute Myocardial Infarction.
第 69 回日本循環器学会学術集会, 横浜.
- 7) Sugano M, Oyama J, Satoh S, Makino N. (2005, 3/19-21)
Small Interfering RNA Targeting SHP-1 Accelerates Angiogenesis in a Rat Model of Hindlimb Ischemia.
第 69 回日本循環器学会学術集会, 横浜.
- 8) Makino N, Abe N, Sugano M, Satoh S. (2004, 3/27-29)
Effects of Pioglitazone on aortic stiffness, carotid intima-media thickness and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus.
第 68 回日本循環器学会学術集会, 東京.
- 9) Makino N, Sugano M, Oyama J, Suematsu H, Satoh S. (2004, 3/27-29) PPAR-r ligands attenuated brain natriuretic peptide production and after remodeling in cardiac fibroblasts in hypoxia-reoxygenation.
第 68 回日本循環器学会学術集会, 東京.
- 10) Makino N, Sugano M, Tsuchida K, Oyama J, Satoh S, (2004, 8/7-11) Role of cytokines in redox regulation in the ischemic heart. International Society for Heart Research World

Congress. Brisbane, Australia.

- 11) 前田豊樹, 尾山純一, 向井由姫, 佐藤真司, 菅野公浩, 牧野直樹. (2004, 5/ 28)
貧血心を呈した高齢者赤芽球癆の一例.
第23回別府循環器研究会. 別府.
- 12) 前田豊樹, 畠中正光, 鈴木友和, 谷憲三郎, 牧野直樹. (2004, 7/16-17)
46XX/45XO モザイクを伴った脳内石灰沈着症の母娘例.
第41回日本臨床分子医学会学術集会. 福岡.
- 13) 前田豊樹, 佐古田三郎, 辻 秀雄, 谷 憲三郎, 鈴木友和, 牧野直樹. (2004, 9/
3-5)
胎生期マウス脳組織内環状 DNA 産生領域と DNA 組み換えの検出.
第8回 Molecular Cardiovascular Conference. 小樽.
- 14) 前田 豊樹, 寛山 隆, 中嶋 康博, 谷 憲三郎, 牟田 耕一郎, 塩川 左
斗志, 白土 基明, 西村 純二, 吉河 康二, 秋月 真一郎 (2004, 9/17-19)
胸腺摘除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が著効した
胸腺腫を伴う高齢者真性赤芽球癆例.
第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会. 京都.
- 15) 前田豊樹, 佐藤真司, 尾山純一, 向井由姫, 菅野公浩, 牧野直樹. (2005, 2/26)
46XX/45XO モザイクを伴った脳内石灰沈着症の家族内発症例.
平成16年別府医師会会員による学術講演会. 別府.
- 16) 前田豊樹, 佐藤真司, 尾山純一, 向井由姫, 菅野公浩, 牧野直樹. (2005, 3/5)
46XX/45XO モザイクを伴った脳内石灰沈着症の家族内発症例.
第15回日本老年医学会九州地方会. 大分.
- 17) Y. Higuchi, Tung O. Chan, Charles F McTiernan, W. Keith Jones, Arthur
M Feldman. (2004, 11/ 7-10)
Blockade of NF-kB activation inhibits
hypertrophy and improves survival in Male Mice with Heart Failure
Induced by Cardiac-Specific TNF-alpha Expressio.
American Heart Association scientific sessions 2004, New Orleans.
- 18) 福田祥子, 樋口義洋, 久米治, 久保満樹, 山口さおり, 中池竜一, 平川洋二. (2004,
10/31)
寄生虫感染に伴う高IgE血症と一過性好酸球増多を呈した急性心膜心筋炎の一例.
第267回日本内科学会九州地方会. 宮崎.

19) 山口さおり, 樋口義洋, 久米治, 久保満樹, 中池竜一, 平川洋二. (2004, 12/4) 急性心筋梗塞を発症した Bentall 術後 Marfan 症候群患者に良好に緊急冠動脈内ステント留置を行い得た一例.

第 97 回日本循環器学会九州循環器地方会. 長崎.

20) 福田祥子, 樋口義洋, 久米治, 久保満樹, 山口さおり, 中池竜一, 平川洋二. (2005, 2/5)

血管脆弱性と易出血性のある骨形成不全症患者に大動脈弁置換術を成し得た一症例.

第 268 回日本内科学会九州地方会. 福岡.

所員名簿

老化制御学分野

教授	牧野 直樹
助教授	菅野 公浩
助手	前田 豊樹
助手	樋口 義洋
助手	尾山 純一
医員	升永 典代
非常勤研究員	管 静芝
研究補助員	田口 幸代
研究補助員	土田 啓子
研究補助員	上田 安子
研究補助員	宮崎 裕美子