

[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 :



ゲノム集団遺伝学分野

Division of Molecular Population Genetics

ゲノム集団遺伝学分野では、特定領域「ゲノム」におけるヒト多型タイピング支援を主体として、日本人における多型マイクロサテライトの整備、ゲノムの配列情報を利用した統計遺伝学的手法による疾患関連遺伝子の同定、およびエピジェネティック転写制御機構、T細胞における転写制御ネットワークについて研究を行っている。平成16年度の異動は以下の通りである。青木正幸が学位を取得し、17年度よりJSTのプロジェクト(代表・森正樹教授)のポスドクとしてゲノム多型解析を継続している。科研費派遣技術員として、大西麻理、後藤麻美が研究に参加した。科研費派遣技術員の徳安智子、中井順子、山口寛子が辞した。以上により、教官1名、ポスドク1名、大学院生2名、派遣技術員6名となった。コラポステーション2において研究活動を行っている。

A. 単一遺伝病、多因子疾患のゲノム解析

がん、自己免疫病、糖尿病、アレルギーなどは、複数の遺伝要因と環境要因の相互作用によって発症する多因子疾患である。これらの疾患の遺伝要因を明らかにするためには、遺伝学的解析法が必須であり、その手法を用いて疾病発症関連遺伝子を同定し、発症機序の分子レベルでの解明とそれに基づく新しい診断・治療・予防法の基盤技術を開発することは有意義である。これまでは、既知の知識に基づいて選択された疾患候補遺伝子を個別に解析する手法が主流であったが、特に、大規模ゲノム解析に必要な多検体同時解析法の進展により、網羅的・物理的に疾患関連遺伝子を探索することが可能となった。本分野では、全ゲノム連鎖解析に必須であるマイクロサテライトマーカーの情報を多数収集し、日本人集団に最適化された遺伝マーカーを準備すると同時に、他施設との共同研究により、以下の単一遺伝病、多因子疾患に関して全ゲノムを網羅的に遺伝学解析し、未知の疾病発症関連遺伝子の同定を目指している(特定領域ゲノム、ヒト多型解析センター業務を主体とする)。

自己免疫性甲状腺炎・全ゲノム連鎖解析(国立国際医療センター) 胃がん・全ゲノム連鎖解析(国立国際医療センター・笹月健彦総長他がん特班研究) 2型糖尿病・全ゲノム相関解析(神戸大学・春日雅人教授他ミレニアムプロジェクト2型糖尿病チーム) 2型糖尿病・全ゲノム連鎖解析(九大・名和田教授) 劇症型1型糖尿病・全ゲノム相関解析(愛媛大学・牧野英一教授他日本糖尿病学会劇症型1型糖尿病委員会) 統合失調症・全ゲノム相関解析(九大・服巻保幸教授) 心筋梗塞・全ゲノム連鎖解析(九大・下川宏明助教授) 結核・候補遺伝子相関解析(九大・楠原浩一助教授)。 家族性血球貪食性リンパ球症・全ゲノム連鎖解析・候補遺

伝子変異解析（佐賀医科大・石井榮一助教授他 FHL 研究会）、大腸がん・候補遺伝子相関解析（九大・森正樹教授・CREST）、GvHD・相関解析（東大・小川誠司助教授・CREST）。16年度の成果として、8番染色体における橋本病関連遺伝子の同定と機能解析（ ）、4連鎖領域の同定と21番染色体候補領域における原因遺伝子多型の同定（ ）、全ゲノムからの14候補遺伝子の同定（ ）、日本人2型糖尿病に特異的な連鎖領域の同定（ ）、2次スクリーニング陽性約200マーカーの同定（ ）、疾患関連1塩基多型の同定（ ）、MUNC13-4新規遺伝子変異の同定（ ）が挙げられる。

B. ヘテロクロマチン構成因子と PcG の機能的相互作用の研究

ショウジョウバエにおいてはヘテロクロマチン構成因子の変異は PEV を抑制するが、ポリコーム遺伝子 (PcG) のうちホメオティック変異に加え PEV を抑制するものが知られている (Su(z)12, E(z))。われわれは、ヘテロクロマチンと PcG による転写抑制機構の共通性を見出し、これらのエピジェネティック転写制御の分子機序を明らかにするために、Su(z)12 分子の機能を分子レベルで解析している。これまでに、Su(z)12 がヘテロクロマチンの主たる構成因子である HP1a と PcG の一つである EZH2 に異なるドメインによって直接的に結合すること、特に、ショウジョウバエの遺伝学解析によって形態形成に重要な機能が示唆されていた Su(z)12 分子の VEFS ドメインが、EZH2 との結合に必須であることを見出した。EZH2 は H3-K9,27 のメチル化酵素であり、この結果は、PcG の一部がヘテロクロマチン形成あるいは維持に機能していることを示唆すると同時に、PcG による Hox 遺伝子などの発現制御に、ヘテロクロマチン構成因子が関与する可能性も示し、これらを明確にすべく研究を進めている。また、近年同定されたメチロソーム複合体の一因子がヒストン H2A と特異的に結合すること、そして Su(z)12 分子がこの因子と相互作用することを見出し、メチロソーム複合体による標的遺伝子の転写制御機構と Su(z)12 分子の役割について昨年度に引き続き検討している。

C. CpG マイクロアレイによる転写因子標的遺伝子の網羅的同定

これまで多くの DNA 結合型転写因子が同定されているが、その直接的な標的遺伝子の系統的把握は端緒についたばかりである。ヒトゲノム配列が総て明らかとなり、約 22,000 個とも言われる全遺伝子の転写開始点が明確になって、転写因子の結合配列をデータベース上同定したとしても、細胞の発生・分化過程においてはそれらが総て標的となっているとは考え難く、時空的な転写制御の複雑さを解明するためには、転写因子の標的遺伝子を、細胞内を反映しかつ網羅的に同定する手法が必要である。われ

われは、主として遺伝子プロモーター領域を含むヒトの CpG ライブラリーの挿入ゲノム断片をアレイ化し、これまでに約 2 万個をスポットしたマイクロアレイを作成した。ChIP アッセイとの組み合わせにより、T 細胞に特異的なある転写因子について、これまで知られていなかった標的遺伝子を同定し、さらにこの標的遺伝子産物が新たな標的遺伝子を有する DNA 結合型転写因子であることを確認した。この転写因子カスケードと T 細胞機能との関連について現在研究を進めている。

業績目録

原著論文

1. E.Ishii, I.Ueda, R.Shirakawa, K.Yamamoto, H.Horiuchi, S.Ohga, K.Furuno, A.Morimoto, M.Imayoshi, Y.Ogata, M.Sako, K.Koike, A.Sakata, H.Takada, T.Hara, A.Imashuku, T.Sasazuki, M.Yasukawa. 2005.
Genetic subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: correlations with clinical features and cytotoxic T lymphocyte/natural killer cell functions.
Blood, 105, 3442-3448.
2. M.Aoki, Y.Yamamura, H.Noshiro, K. Sakai, J.Yokota, T.Kohno, T.Tokino, S.Ishida, S.Ohyama, I.Ninomiya, K.Uesaka, M.Kitajima, S.Shimada, S.Matsuno, M.Yano, M.Hiratsuka, H.Sugimura, F.Itoh, T.Minamoto, Y.Maehara, S.Takenoshita, T.Aikou, H.Katai, K.Yoshimura, T.Takahashi, K.Akagi, M.Sairenji, K.Yamamoto, T.Sasazuki. 2005.
A full genome scan for gastric cancer.
J Med Genet., 42, 83-87.
3. M. Zaitzu, K.Yamamoto, E.Ishii, T.Teramura, N.Nakadate, M.Sako, N.Sakata, H.Wakiguchi, M.Hirose, M.Imayoshi, Y.Ogata, S.Imashuku, Y.Hamasaki, M.Yasukawa.2004.
High frequency of QPY allele and linkage disequilibrium of granzyme B in Epstein-Barr virus associated hemophagocytic lymphohistiocytosis.
Tissue Antigens, 64, 611-615.
4. H.Nawata, S.Shirasawa, N.Nakashima, E.Araki, J.Hashiguchi, S.Miyake, T.Yamauchi, K.Hamaguchi, H.Yoshimatsu, H.Takeda, H.Fukushima, T.Sasahara, K.Yamaguchi, N.Sonoda, T.Sonoda, M.Matsumoto, Y.Tanaka, H.Sugimoto, H.Tsubouchi, T.Inoguch, T.Yanase, N.Wake, K.Narazaki, T.Eto, F.Umeda, M.Nakazaki, J.Ono, T.Asano, Y.Ito, S.Akazawa, I.Hazegawa, N.Takasu, M.Shinohara,

- T.Nishikawa, S.Nagafuchi, T.Okeda, K.Eguchi, M.Iwase, M.Ishikawa, M.Aoki, N.Keicho, N.Kato, K.Yasuda, K.Yamamoto, T.Sasazuki. 2004.
Genome-wide linkage analysis of type 2 diabetes mellitus reconfirms the susceptibility locus on 11p13-p12 in Japanese.
J Hum Genet, 49, 629-634.
5. S.Shirasawa, H.Harada, K.Furugaki, T.Akamizu, N.Ishikawa, K.Ito, K.Ito, H.Tamai, K.Kuma, S.Kubota, H.Hiratani, T.Tsuchiya, I.Baba, M.Ishikawa, M.Tanaka, K.Sakai, M.Aoki, K.Yamamoto, T.Sasazuki. 2004.
SNPs in the promoter of a B cell-specific antisense transcript, SAS-ZFAT, determine susceptibility to autoimmune thyroid disease.
Hum Mol Genet, 13, 2221-2231.
6. K.Yamamoto, E.Ishii, M.Sako, S.Ohga, K.Furuno, I.Ueda, N.Suzuki, M.Imayoshi, S.Yamamoto, A.Moromoto, H.Takada, T.Hara, S.Imashuku, T.Sasazuki, M.Yasukawa. 2004.
Identification of novel *MUNC13-4* mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and functional analysis of MUNC13-4-deficient cytotoxic T lymphocytes.
J Med Genet, 41, 763-767.
7. K.Yamamoto, M.Sonoda, J.Inokuchi, S.Shirasawa, T.Sasazuki. 2004.
Polycomb group suppressor of zeste 12 links heterochromatin protein 1 alpha and enhancer of zeste 2.
J Biol Chem, 279, 401-406.
8. H.Takada, H.Kanegane, A.Nomura, K.Yamamoto, K.Ihara, Y. Takahashi, S.Tsukada, T.Miyawaki, T.Hara. 2004.
Female agammaglobulinemia due to Bruton's tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X chromosome inactivation.
Blood, 103, 185-187.

総説

- 1 . 山本 健 , 笹月健彦 . 2004 .
ヒトゲノムの多様性 .
Molecular Medicine 臨時増刊号 , 41 , 「ヒトゲノム」 94-100 .
- 2 . 山本 健 . 2004 .

HLA 型適合と非血縁者間骨髄移植 .
ゲノム医学 , 4 , 71-75 .

- 3 . 笹月健彦 , 山本 健 . 2004 .
胃がん発症に関する分子疫学研究 .
学術月報 , 57 , 21-26 .
- 4 . 山本 健 . 2005 .
全ゲノムを対象とした胃がん発症を規定する遺伝要因の探索 .
福岡医学雑誌 , 96 , 25-33 .
- 5 . 石井榮一 , 上田育代 , 山本健 , 堀内久徳 , 今宿晋作 , 安川正貴 . 2005 .
家族性血球貪食症候群の遺伝子異常 .
血液・腫瘍科 , 50 , 332-340 .
- 6 . E.Ishii, S.Ohga, S.Imashuku, N,Kimura, I.Ueda, A.Morimoto, K.Yamamoto,
M.Yasukawa. 2005.
Review of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in children with focus on Japanese
experiences.
Crit Rev Oncol Hematol, 53,209-223.

学会発表

- 1 . 青木正幸 , 山本 健 , 笹月健彦 . (2004 , 9/29-10/1) .
全ゲノム罹患同胞対連鎖解析による胃がん発症関連遺伝子の探索 .
第 63 回日本癌学会学術総会 , 福岡 .
- 2 . 山本 健 . (2004 , 9/29-10/1) .
SUZ12 を介したヘテロクロマチンと PcG による転写制御の機能的相互作用の可能性 .
第 63 回日本癌学会学術総会 , 福岡 .
- 3 . 横溝 晃 , 山本 健 , 後藤 健 , 猪口淳一 , 古賀寛史 , 内藤誠二 (2004 , 10/27-10/29) .
GSTP1 遺伝子多型と MVAC 化学療法有害事象の相関 .
第 42 回日本癌治療学会総会 , 京都 .
- 4 . 青木正幸 , 山本 健 , 笹月健彦 . (2004 , 10/12-10/15) .

罹患同胞対連鎖解析による胃がん関連遺伝子の網羅的探索 .
日本人類遺伝学会第 49 回大会 , 東京 .

- 5 . 山本 健 , 石井榮一 , 迫 正廣 , 大賀正一 , 古野憲司 , 鈴木信寛 , 上田育代 ,
今吉美代子 , 山本修一 , 森本 哲 , 高田英俊 , 原 寿郎 , 今宿晋作 , 笹月健彦 ,
安川正貴 . (2004 , 10/12-10/15) .

日本人家族性血球貪食症候群における MUNC13-4 遺伝子異常 .
日本人類遺伝学会第 49 回大会 , 東京 .

- 6 . I.Ueda ,E. Ishii, K.Yamamoto,S. Ohga, M.Sako, M.Yasukawa, T.Inaga, S.Hibi, S.Sugimoto, A.
Morimoto, S.Imasuku , Japan HLH Study Group .(2004, 9/12-9/14)

Genotype-phenotype correlation in 3 subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis
patients

The 20th Annual Meeting of the Histiocyte Society, Stockholm.

- 7 . 山本 健 . (2004 , 11/1) .

疾患ゲノム解析の分子生物学基盤 : SNP 解析および MS 解析 .
第 1 回ゲノム医療情報シンポジウム , 東京 .

- 8 . 山本 健 , 石井榮一 , 迫 正廣 , 大賀正一 , 古野憲司 , 鈴木信寛 , 上田育代 ,
今吉美代子 , 山本修一 , 森本 哲 , 高田英俊 , 原 寿郎 , 今宿晋作 , 笹月健彦 ,
安川正貴 . (2004 , 9/ 17-9/18) .

日本人家族性血球貪食症候群における新規 MUNC13-4 遺伝子変異の同定 .
第 11 回日本遺伝子診療学会大会 , 東京 .

ゲノム病態学分野

Division of Molecular and Clinical Genetics

当分野では血液・腫瘍性疾患ならびに消化器疾患患者を対象に臨床を行っている。研究内容としては、新規治療法開発を目的に、A.癌に対する遺伝子・免疫治療の基礎および臨床研究、B.血液疾患に対する遺伝子治療法開発研究、C.小型霊長類コモンマームセットを用いた再生医療開発研究、D.ノックアウトマウスを用いた免疫関連分子の解析、などを行っている。これらの基礎ならびに臨床研究を積極的に進めることで、腫瘍性疾患ならびに慢性進行性疾患に対するより効果的かつ安全な治療法を開発できるものと考えている。なお、われわれの研究内容を含めた九州大学で開発された新規医療技術を難病に苦しめられている患者さんへ円滑かつ早期に還元していくためには、九州大学病院内での新システムの構築が重要であるため、その構築も九州大学病院内で早急に進めているところである。

A. 癌に対する遺伝子治療の基礎および臨床研究

a. GM - CSF 免疫遺伝子治療臨床研究のフォローアップと新規プロトコルの作成

GM - CSF 免疫遺伝子治療臨床研究に参加頂き、生存中の2名の患者についての安全面を中心とした定期的フォローアップを実施している。これらの患者はワクチン接種開始より既に4～6年経過しており、PS0の状態安定した経過を辿っている。これらの経験を背景に現在アデノウイルスベクターを用いた GM - CSF 免疫遺伝子治療臨床研究を米国 CellGenesys 社との共同研究として計画し、その臨床プロトコルを作成中である。

b. GM-CSF 免疫遺伝子治療を受けた患者血清中に存在する抗腫瘍たんぱく質抗体とその抗原の解析

GM-CSF 免疫遺伝子治療を受けた患者の自己腎癌細胞の mRNA より cDNA 発現ライブラリーを作製し、これに対して患者血清を用いて免疫スクリーニングをおこない腫瘍抗原遺伝子群を同定した。これらの抗原遺伝子にエピトプタグを付加して E. coli で発現し、抗原たんぱく質を単離した。患者の治療開始前後、あるいは正常人の血清等を持ちいて、これらの抗原に対する血清中抗体濃度を検討した結果、治療反応性にその濃度が上昇するような抗原が存在し、さらにこの抗原は健常人には反応せず、各種腫瘍患者血清に高頻度で反応することがわかってきており、腫瘍マーカーとしての応用を考え特許出願中である。

B. 遺伝子治療ベクターの検討

癌の遺伝子治療において、ベクターの導入効率や安全性が重要な問題になってきている。現在我々はレトロウイルスやアデノウイルスを用いより有効な癌治療用ベクターの開発研究を特に腫瘍融解ウイルスベクターを用いることで実施予定であり、さらにセンダイウイルスベクターの免疫遺伝子治療における有用性も検討中である。

a. 腎細胞癌における CAR(コクサッキー・アデノウイルス受容体)やインテグリンの発現の検討

アデノウイルスが主に CAR を介して細胞に感染することは知られている。また最近では CAR の発現の少ない癌細胞では、アデノウイルスを改変し接着分子であるインテグリンを介して細胞内に感染させる技術の開発も世界的に進められている。現在腎細胞癌や肺癌を用いて細胞表面の CAR やインテグリンの発現を調べ、臨床研究の基礎データを蓄積し

ている。

b. 癌特異的タンパクに特異的に感染するアデノウイルスを用いた新しい癌に対する遺伝子治療の開発

近年、アデノウイルスの増殖に関わる遺伝子である E1 遺伝子に発現プロモーターとして様々な遺伝子を組み込む技術が開発されてきている。我々は、癌特異的なタンパクをいくつか選び出し、それらを発現プロモーターとして用いるアデノウイルスを開発することにより、癌細胞のみを攻撃し治療する遺伝子治療の開発に取り組んでいる。

C. 造血器悪性腫瘍に対する新規免疫治療法の開発研究

骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植 (Nonmyeloablative stem cell transplantation; NST) は、移植幹細胞生着に必要な免疫抑制のみを目的とした軽度な前処置後、同種移植を施行し造血キメラを誘導した時点でドナーリンパ球による同種免疫反応によって腫瘍細胞を破壊する免疫療法の一つである。NST 後混合キメラ状態にある、ドナー、ホスト両者の樹状細胞が GVL(移植片対白血病)効果に携わっている事が報告されているが、最近この GVL 効果発現にはNK/NKT細胞と樹状細胞の相互作用の重要性が指摘されている。NK細胞によって樹状細胞の成熟、活性化、抗原提示未熟樹状細胞の排除による anergy が回避されることにより効率的な CTL の誘導が可能となると考えられる。我々は造血器腫瘍に対する非特異的な同種免疫細胞療法としての NST とNK/NKT、樹状細胞細胞療法による腫瘍特異的免疫療法を組み合わせることで、より強力かつ腫瘍特異性の高い治療法の実現に取り組んでいる。

a. リンパ腫/白血病モデルマウスの作製

我々は造血器悪性腫瘍の治療開発を目的として B 細胞リンパ腫/白血病のモデルマウスを作製した。このモデルはリンパ腫の肝臓、脾臓への腫瘍形成、腹腔内及び表在リンパ節腫脹、骨髄浸潤を認めた。これはヒトリンパ腫の病変分布に類似しておりモデルとして有効と考えられた。現在、腫瘍への遺伝子導入や CT による腫瘍の評価方法を検討中である。

b. 骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植モデルの作製

我々は BALB/c (H-2d, Ly9.1+), B10.D2 (H-2d, Ly9.1-)を用いた骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植モデルの作製に成功した。この系では重篤な GVHD (移植片対宿主病)を認めず、T 細胞、B 細胞における混合キメラは6ヶ月間維持できている。またリンパ腫/白血病マウスに骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植を施行すると有意な生存期間の延長を認めている。

c. 腫瘍特異的免疫療法の実現

現在リンパ腫/白血病マウス移植モデルにおいてドナー、ホストの樹状細胞を用いNK/NKT, CTL の誘導を解析中である。NK/NKT 細胞と樹状細胞の相乗効果により腫瘍特異的 CTL の増幅が得られればこれまでにない強力な GVL 効果が誘導されるものと期待される。

D. 固形腫瘍患者に対する免疫療法

a. テーラーメイド・マルチペプチドパルス成熟樹状細胞を用いた癌免疫療法臨床研究

九州大学病院別府先進医療センター外科(森 正樹 教授)ならびに久留米大学医学部免疫学教室(伊東 恭悟 教授)との協同研究で、以下の臨床研究を実施している。HLA-A24 陽性もしくはHLA-A2 陽性の固形腫瘍患者を対象として開発された癌ペプチドのうち、患者末梢血リンパ球中のキラーT 細胞前駆体に認識されるか、もしくは血清中にペプチド特異的 IgG 抗体の存在が確認されたペプチド最大4種類(テラーメード・マルチペプチド)を用いて、患者末梢血より精製した成熟樹状細胞をパルスし、患者体内へ皮内注射により戻す。これを進行固形腫瘍患者に対して 14 日毎に計4回実施する。本テラーメード・マルチペプチドパルス樹状細胞療法の実施の可能性、テラーメード・マルチペプチドパルス樹状細胞接種による有害事象発生の有無(安全性評価)ならびに抗腫瘍免疫誘導能、対象患者の生存期間と評価可能病変の縮小効果の有無(臨床効果など)について検討することを目的とする。これまでに4症例に対して樹状細胞療法を実施したが、NCI-CTC ver.2.0における Grade3 以上の有害事象を認めなかった。また、一部の症例では抗ペプチド抗体価の上昇あるいは腫瘍マーカーの低下を認めた。現在、臨床効果ならびに抗腫瘍免疫誘導能の評価を行っている。

b. 強化養子免疫療法

強力な抗原提示細胞である樹状細胞に腫瘍抗原ペプチドである CEA(癌胎児性抗原(Carcinoembryonic Antigen))ペプチドを提示させ末梢血リンパ球と共培養することにより CEA 特異的細胞障害性 T リンパ球(CTL)を誘導する。その後この CTL および CEA ペプチドパルス樹状細胞を患者に投与し、本治療法の安全性および抗腫瘍免疫誘導効果の有無を *in vitro* 検査ならびに臨床効果の観点から検討する臨床研究を計画中である。

E. 小型霊長類コモンマーモセットを用いた再生医療開発研究

a. コモンマーモセット ES 細胞からの血球分化誘導

これまでに当教室では、コモンマーモセット ES 細胞の培養系を確立し、遺伝子導入法により種々の血液細胞(赤芽球、顆粒球、単球、巨核球など)への分化誘導に成功した。今後は *in vitro* での血液細胞分化誘導の効率化、さらには放射線照射し骨髄を破壊した動物(マーモセット)個体への移植を行い、霊長類骨髄再構築系を確立し、再生医療における ES 細胞の有効性および安全性の検討を行っていく予定である。

b. コモンマーモセット ES 細胞の樹立研究

本邦におけるコモンマーモセット ES 細胞を用いた再生医療研究を発展させる目的で、コモンマーモセット ES 細胞の独自技術での樹立に成功した。

c. ヒト白血病モデルコモンマーモセットの作製

我々は白血病治療法の開発を目的として、ヒト白血病モデルマーモセットの作製に取り組んでいる。東京大学医科学研究所ならびに実験動物中央研究所との共同研究により、現在 bcr-abl 遺伝子導入マーモセット骨髄細胞をマーモセット個体に自家移植し白血病モデルコモンマーモセットを作出中である。

d. ランダムリボザイム法によるマーモセット ES 細胞の分化誘導関連遺伝子の同定と解析

ES 細胞は、各臓器を構成する特異的な細胞への多分化能を持つ。この多分化能から特異的分化への運命づけのメカニズムは不明である。ヒトやマウスの ES 細胞から培養条

件下で種々の成長因子や増殖抑制性因子により血液, 神経, 筋肉, 肝細胞等への分化誘導がなされ, その際の細胞分化の指標として何種かの遺伝子活性化が確認されている. 一方で ES 細胞の分化の際に新たな遺伝子発現群と抑制される遺伝子群が存在して分化過程が進行すると推定される. 小型霊長類コモンマーマセット ES 細胞株に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り, ヒトに近い霊長類の ES 細胞で, 血液系や神経系などへの分化の際発現が抑制される新規の遺伝子を探索していく予定である.

F. CD30/CD30ligand シグナルの腸管炎症における役割の検討

CD30 は TNF レセプタースーパーファミリーに属する糖蛋白である. CD30 は活性化 T あるいは B 細胞等に発現しており, そのシグナルはこれらの細胞の分化, 増殖, クラススイッチなどに関与すると言われている. しかし, 詳細については未だ不明な点が多い. CD30/CD30L シグナルの腸炎における役割を検討するために以下の項目について検討している.

- ・ 潰瘍性大腸炎患者血清中の可溶性 CD30 濃度を ELISA 法により測定し, 疾患活動性との関係を検討している.
- ・ CD30L 欠損マウスと野生株マウスに抗 CD3 抗体の腹腔内投与により小腸炎を誘導し, 体重変化, 小腸病理組織像, 血清中サイトカイン (TNF, IFN, IL-4) 濃度を ELISA 法にて検討している.

これまでの成績では, 血清中の可溶性 CD30 濃度は, 健常人と比較し, 潰瘍性大腸炎患者において高値を示す傾向が見られている. また, 抗 CD3 抗体腸炎モデルでは, 野生株マウスと比較し CD30L 欠損マウスにおいて, 体重減少, 小腸病理組織像, サイトカイン濃度の上昇などの指標から炎症所見が軽度であると考えられている. 詳細については現在検討中である.

業績目録

原著論文

- 1) Tomonari, A., Takahashi, S., Iseki, T., Ooi, J., Yamada, T., Takasugi, K., Shimohakamada, Y., Ohno, N., Nagamura, F., Uchimar, K., Tani, K., Tojo, A., Asano, S. 2004.
Herpes simplex virus infection in adult patients after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan.
Bone Marrow Transplant. 33: 317-320.
- 2) Maeda, T., Hatakenaka, M., Muta, H., Nakayama, M., Nakazaki, Y., Hiroyama, T., 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).
Intern. Med. 43: 432-435.
- 3) Soda Y, Tani K, Bai Y, Saiki M, Chen M, Izawa K, Kobayashi S, Takahashi S, Uchimar K, Kuwabara T, Warashina M, Tanabe T, Miyoshi H, Sugita K, Nakazawa S, Tojo A, Taira K, Asano S. 2004.
A novel Maxizyme vector targeting a bcr-abl fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome-positive lymphoblastic acute leukemia.
Blood 104: 356-363.
- 4) Izawa, K., Tani, K., Nakazaki, Y., Hibino, H., Sugiyama, H., Kawasaki, A., Sasaki, E., Nishioka, C., Ishii, H., Soda, Y., Yagita, H., Tanioka, Y., Tojo, A., Asano, S. 2004.
Hematopoietic Activity of Common Marmoset CD34 Cells Isolated by a Novel Monoclonal Antibody MA24.
Exp. Hematol. 32: 843-851.
- 5) 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. and 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(6 Suppl):ECR17.
- 6) Harata M, Soda Y, Tani K, Ooi J, Takizawa T, Chen M, Bai Y, Izawa K, Kobayashi S, Tomonari A, Nagamura F, Takahashi S, Uchimarui K, Iseki T, Tsuji T, Takahashi TA, Sugita K, Nakazawa S, Tojo A, Maruyama K, Asano S. 2004.
CD19-targeting liposomes containing imatinib efficiently kill Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells.
Blood 104: 1442-1449.
- 7) Maeda, T., Mutoh, T., Muta, H., Nakayama, M., Nakajima, Y., Ikuta, T., Yasuda, M., Etoh, T., Shimizu, K., Nakazaki, Y., Hiroshima, T., Somada, S., Kurita, R., Tani, K., Shiratsuchi, M., Nishimura, J. 2004.
An 85-year-old Japanese female with Ph-1-positive CML with del (5q) successfully treated by intermittent imatinib therapy.
J Am Geriatr Soc. 52: 1783-1784.
- 8) 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.
- 9) Tani, K., Azuma, M., Nakazaki, Y., Oyaizu, N., Hase, H., Ohata, J., Takahashi, K., Oiwa-Monna, M., Hanazawa, K., Wakumoto, Y., Kawai, K., Noguchi, M., Soda, Y., Kunisaki, R., Watari, K., Takahashi, S., Machida, U., Satoh, N., Tojo, A., Maekawa, T., Eriguchi, M., Tomikawa, S., Tahara, H., Inoue, Y., Yoshikawa, H., Yamada, Y., Iwamoto, A., Hamada, H., Yamashita, N., Okumura, K., Kakizoe, T., Akaza, H., Fujime, M., Clift, S., Ando, D., Mulligan, R. and Asano, S. 2004.
Phase I Study of Autologous Tumor Vaccines Transduced with the GM-CSF Gene (GVAX[®]) in Four Patients with Stage IV Renal Cell Cancer in Japan: Clinical and Immunological Findings.
Mol Ther. 10: 799-816.
- 10) Ooi, J., Iseki, T., Takahashi, S., Tomonari, A., Takasugi, K., Uchiyama, M., Konuma, T., Futami, M., Nomura, A., Nakayama, S., Soda, Y., Ohno, N., Nagamura, F., Uchimarui, K., Tojo, A., Tani, K., Asano, S. 2004.
Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in patients over the age of 45 years.
Brit J Haematol. 126: 711-714.
- 11) Takahashi, S., Iseki, T., Ooi, J., Tomonari, A., Takasugi, K., Shimohakamada, Y., Yamada, T., Uchimarui, K., Tojo, A., Shirafuji, N., Kodo, H., Tani, K., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Asano, S. 2004.
Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies.
Blood 104: 3813-3820.
- 12) Cho, S.G., Shuto, Y., Soda, Y., Nakazaki, Y., Izawa, K., Uchimarui, K., Takahashi, S., Tani, K., Tojo, A., Asano, S. 2004.
Anti-NK cell treatment induces stable mixed chimerism in MHC-mismatched, T-cell depleted, nonmyeloablative bone marrow transplantation.
Exp. Hematol. 32: 1246-1254.
- 13) Kim YT, Kurita R, Kojima M, Nishii W, Tanokura M, Muramatsu T, Ito H, Takahashi K. (2004)
Identification of arginine residues important for the activity of Escherichia coli signal peptidase I.
Biol Chem. 385, 381-8.
- 14) Blazar BR, Levy RB, Mak TW, Panoskaltsis-Mortari A, Muta H, Jones M, Roskos M, Serody JS, Yagita H, Podack ER, Taylor PA. 2004.
CD30/CD30 ligand (CD153) interaction regulates CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease.
J Immunol. 173: 2933-41.
- 15) Maeda, T, Oyama, J, Mukai, Y, Satoh, S, Sugano, M, Makino, N. and Tani, K. 2005.
Cardiac dysfunction with severe anemia in an aged case.
J Am Geriatr Soc. 53: 361-362.

- 16) 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 Hematol, 74: 365-73.
- 17) Youko Suehiro, Dragoslava Kika Veljkovic, Nola Fuller, Yasuaki Motomura, Jean M. Masse, Elisabeth M. Cramer and Catherine P.M. Hayward, 2005
Endocytosis and storage of plasma factor V by human megakaryocytes.
Thrombosis and Hemostasis (in press)
- 18) Sasaki, E., Hanazawa, K., Kurita, R., Akatsuka, A., Yoshizaki, T., Ishii, H., Tanioka, Y., Ohnishi, Y., Suemizu, H., Sugawara, A., Tamaoki, N., Izawa, K., Nakazaki, Y., Hamada, H., Suemori, H., Nakatsuji, N., Okano, H. and Tani, K. 2005.
Establishment of Novel Embryonic Stem Cell Lines Derived from the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*).
Stem Cells (in press)

総説

- 1) 谷 憲三朗. 2004
単クローン抗体療法.
分子細胞治療、3、395-396.
- 2) 谷 憲三朗. 2005
腎癌に対する遺伝子治療臨床研究の現状
日本臨床、63、454-463

学会発表

- 1) Kurita ,R. Sasaki,E. Hiroyama,T. Nakazaki ,Y. Izawa ,K. Ishii,H. Tanioka , Y. Hanazawa , K. Osonoi ,M. Hashiguchi ,T. Yuan-Son B. Soda, Y. Xiao J. Watanabe , S. Asano,S. and Tani,K. (2004.6.)
Hematopoietic Cell Differentiation of Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Embryonic Stem Cells and Their Genetic Manipulation Using the Third Generation Lentiviral Vector.
American society of gene therapy (ASGT) 7th Annual Meeting
- 2) Terumasa Hisano, Yoshiyuki Arita, Tetsuhide Ito, Ken Kawabe, Takamasa Oono, Junya Gibo, Naoko Inoue, Mizuho Kojima, Hajime Nawata. (2004.7.14)
Antitumor Immunity Induced by Hybrids Fused Mature DC with Mouse IL-12 Expressing Human Pancreatic Ductal Cell Carcinoma Cell Line
Joint meeting of the 11th meeting of the international association of pancreatology and the 35th annual meeting of the japan pancreas society.
- 3) Hashiguchi T, Nakazaki Y, Asano S, Tani K. Aug. 2004.
Detection of enhanced serum antibody production to renal cell cancer proteins and identification of serological tumor antigens in patients treated with the GM-CSF gene-transduced autologous tumor vaccines (GVAX).
The 10th Annual Meeting, Japanese Society of Gene Therapy, Tokyo
- 4) Hashiguchi T, Nakazaki Y, Clift S, Ando DG, Asano S, Tani K. Jun.2004.
Detection of enhanced serum antibody production to renal cell cancer proteins and identification of serological tumor antigens in patients treated with the GM-CSF gene-transduced autologous tumor vaccines (GVAX).
The American Society of Gene Therapy's 7th Annual Meeting, Minneapolis, USA
- 5) Ryo Kurita, Erika Sasaki, Takashi Hiroyama, Yukoh Nakazaki, Kiyoko Izawa, Hajime Ishii, Yoshikuni Tanioka, Kisaburo Hanazawa, Makoto Osonoi, Takao Hashiguchi, Yuan-Son Bai, Yasushi Soda, Xiaojin Li, Yukio Nakamura, Sumiko Watanabe, Shigetaka Asano and Kenzaburo Tani. (2004.8.)
Hematopoietic Cell Differentiation of Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Embryonic Stem Cells and Their Genetic Manipulation Using the Third Generation Lentiviral Vector.
日本遺伝子治療学会 The 10th Annual Meeting
- 6) 栗田良, 寛山隆, 佐々木えりか, 中崎有恒, 花沢喜三郎, 石井一, 谷岡功邦, 伊澤清子, 白元松, 曾

- 田泰, 渡辺すみ子, 浅野茂隆, 谷憲三朗 (2004.9.)
 コモンマーモセット胚性幹(ES)細胞を用いた血球細胞分化誘導系の検討
 第 66 回日本血液学会総会
- 7) Youko Suehiro, Dragoslava Kika Veljkovic, Nola Fuller, Yasuaki Motomura, Jean M. Masse, Elisabeth M. Cramer and Catherine P.M. Hayward. 2004
 Secretable human megakaryocyte factor V endocytosed from plasma in complex with multimerin: The origin of human megakaryocyte factor V
 American Society of Hematology 46th Annual meeting.
- 8) Ryo Kurita , Erika Sasaki , Takashi Hiroyama, Tomoko Yokoo , Yukoh Nakazaki, Kiyoko Izawa, Hajime Ishii, Yoshikuni Tanioka, Kisaburo Hanazawa, Takao Hashiguchi, Yuan-Son Bai, Yasushi Soda, Sumiko Watanabe, Shigetaka Asano, Kenzaburo Tani (2004.12)
 Hematopoietic Cell Differentiation from Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Embryonic Stem Cells by Their Genetic Manipulation Using the Third Generation Lentiviral Vector.
 American Society of Hematology (ASH) 46th annual meeting
- 9) 横尾朋子, 栗田良, 佐々木えりか, 寛山隆, 橋口隆生, 伊澤清子, 石井一, 谷岡功邦, 中崎有恒, 谷憲三朗 (2004年12月)
 小型霊長類コモンマーモセットES細胞を用いた血球および免疫細胞分化誘導系の検討
 第 27 回 日本分子生物学会 神戸
- 10) 栗田良, 佐々木えりか, 横尾朋子, 寛山隆, 中崎有恒, 石井一, 谷岡功邦, 伊澤清子, 白元松, 曾田泰, 谷憲三朗 (2005.4)
 コモンマーモセット胚性幹(ES)細胞を用いた血球細胞分化誘導系の検討
 第三回幹細胞シンポジウム
- 11) 本田邦臣, 中村和彦, 杉田真一, 牟田浩実, 松井謙明, 高橋 誠, 水谷孝弘, 吉永繁高, 秋穂裕唯, Eckhard R. Podack, 谷憲三朗, 名和田新 (2005年4月14-16日)
 CD30 ligand(CD30L)のDSS腸炎における役割の検討
 第91回日本消化器病学会総会、東京国際フォーラム
- 12) Shinichi Somada, Hiromi Muta, Eckhard R Podack, Kuniomi Honda, Kazuhiko Nakamura, Shinichiro Nakagawa, Hajime Nawata, Kenzaburo Tani ,(2005年5月14日-19日)
 Defining the roles of CD30 signals in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine.
 DDW 2005,
- 13) Tomoko Yokoo, Ryo Kurita, Erika Sasaki, Takashi Hiroyama, Yukoh Nakazaki, Kiyoko Izawa, Hajime Ishii, Yoshikuni Tanioka, Kisaburo Hanazawa, Yuan Son Bai, Yasushi Soda, and Kenzaburo Tani. (June 1-5, 2005)
 Hematopoietic Cell Differentiation from Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Embryonic Stem Cells by Their Genetic Manipulation Using the Third Generation Lentiviral Vector.
 8th AMERICAN SOCIETY of GENE THERAPY, St.Louis

所員名簿

| | |
|--------|--------|
| 教授 | 谷 憲三朗 |
| 助手 | 牟田 浩実 |
| | 中崎 有恒 |
| | 久野 晃聖 |
| | 末廣 陽子 |
| リサーチ助手 | 栗田 良 |
| | 田中 智子 |
| 大学院生 | 阪口 岳 |
| | 井上 博之 |
| | 高杉 香志也 |
| | 高野 扶弓 |
| | 横尾 朋子 |
| 医員 | 藤井 雅一 |
| | 杉田 真一 |
| | 生田 卓也 |
| 技能補佐員 | 楠本 裕恵 |
| 事務補佐員 | 松鶴 陽子 |
| | 阿部 寛子 |

ゲノム創薬・治療学分野

Division of Molecular and Cell Therapeutics , Department of Molecular Genetics

当部門は、ヒトリプロダクションの分子機構及びその異常に基づく疾患の病態の解明、遺伝子診断さらには遺伝子治療の開発を目的としている。平成16年度は、教授、和氣徳夫、講師、加藤秀則、加藤聖子、助手、有馬隆博、松田貴雄の教官のほかに、一戸晶元、井上貴史、浅野間和夫の各医員、山口真一郎の大学院生、国内留学生の須賀 新、産学連携研究員の山吉麻子で教室を構成した。

A. 子宮体癌に特異的な遺伝子変異に基づいた細胞死誘導機構の解明と癌遺伝子治療への応用

(加藤秀則、和氣徳夫、松田貴雄)

研究の背景と課題

我々は子宮体癌の発癌機構を主に癌抑制遺伝子を中心として解析してきた。その結果 1) TGF- β のシグナル伝達系と転写因子である Foxc1 の異常 2) DCC 遺伝子の発現異常とアポトーシス回避 3) p53 依存性或いは p53 非依存性 p21cdk インヒビターの発現誘導と内膜癌細胞老化死 4) サイクリン D の癌化に伴う発現変異 5) ヒト 1q42 に未知の内膜癌抑制遺伝子が存在すること、などを明らかにしてきた。これらの遺伝子異常を正常遺伝子の再発現あるいは発現誘導物質によって是正すると細胞老化あるいはアポトーシスを惹起することも明らかにしてきた。以下の体癌に特徴的な遺伝子変異は全て我々によって明らかにされたものである。それぞれの変異は体癌抑制遺伝子として位置づけられるだけでなく、正常な子宮内膜細胞の性周期に伴う増殖制御機構を明らかにする一助ともなっている。1) TGF- β のシグナル伝達機構における異常を検索したところ一部の体癌で Smad4 の発現抑制や変異が見られた他は、明らかな異常を見出し得なかった。しかし多くの体癌細胞株は TGF- β の増殖抑制に抵抗性であり、その伝達機構のどこか未知の部分に変異が存在すると考えられた。そこで TGF- β 感受性株からサブトラクション PCR によって TGF- β 刺激でリクルートされる遺伝子を同定したところ転写共益因子である FOXC1 が同定された。多くの体癌で発現抑制が観察され、再発現により細胞増殖抑制(G0/G1 への集積)が観察された。2) DCC 遺伝子は大腸癌の候補抑制遺伝子としてクローズアップされてから多くの癌で発現が抑制されていることが明らかにされたが、その後は抑制遺伝子としての意義が不鮮明なままであった。我々は DCC が正常内膜細胞で発現されていること増殖期でそのリガンドである Netrin-1 も同時に発現されるが、分泌期後期で反対に抑制されることを明らかにし DCC/Netrin 系を介したアポトーシス誘導が正常内膜細胞増殖サイクルに関与することが示唆された。体癌ではほとんどの細胞で DCC/Netrin の発

現が出欠しており DCC のみを発現させてやるとアポトーシスの誘導が可能であった。3) Sodium Butyrate (NaB) は食物繊維の腸内発酵の過程で産生され、ヒストン脱アセチル化阻害作用を有する。我々は、子宮体癌を用いて、NaB による増殖抑制効果とその分子機構について研究した。その結果、NaB は Rb を介するシグナルが維持されている子宮体癌細胞を G0/G1 期に集積し、細胞老化を顕著に誘導することが判明した。NaB は p53 非依存性に p21 蛋白発現を誘導し、Rb 蛋白の脱リン酸化への移行が観察された。NaB は HPV (+) 子宮頸癌細胞でも p53 非依存性 p21 蛋白発現を誘導したが、Rb 蛋白の脱リン酸化フォームへの移行は全く観察されなかった。このため、p21 により制御される G0/G1 期停止と細胞老化の誘導は異なる分子機構により制御されていると考えられた。本研究では、p21 の下流で細胞老化誘導に関与するシグナル伝達路を解明しこれに基づいた癌分子標的療法も開発する。4) 乳癌において cyclinD のサブセット発現が癌化にともない変遷することが示されている。正常内膜細胞を分析したところ D1, D2 の双方が発現していたが癌化にともないほとんど 100% の体癌で D1 へ発現が移行していた。体癌に対して D1 アンチセンス DNA を添加したところ G0/G1 期への集積とアポトーシスへの移行が観察された。5) 正常細胞における老化誘導の分子機構には不明の点が多い。テロメア長の短縮、酸化ストレスによる DNA 障害の蓄積及び Rb 蛋白脱リン酸化に伴う細胞周期の停止、との関連が示唆されているにすぎない。子宮体癌を用いて正常細胞由来単一染色体の移入を行い、1 番染色体上に老化誘導遺伝子が存在することを明らかにした。さらに子宮体癌細胞へ 1 番染色体を単一移入した場合、造腫瘍性の抑制とともに細胞老化が誘導されることを明らかにした。以上の事実から染色体単一移入に伴う造腫瘍性の抑制には癌細胞における老化プログラムの再構築が関わることを明らかにした。細胞老化に関わる染色体を同定した後、我々は子宮内膜癌 DNA 上の STS マーカーを用い LOH を解析した。これにより子宮内膜癌では 1q42 領域にアリルの欠失が高頻度 (50% 以上) に出現することを明らかにし、続けて BAC DNA の移入実験に基づき候補遺伝子 ORF12 を同定した。本研究は染色体工学及び分子遺伝的手法を応用し、細胞老化誘導遺伝子を単離・同定するという新しい手法に基づくものである。

本研究はこれら子宮体癌に特徴的な抑制遺伝子変異に基づいて、これらの遺伝子異常の修復により癌細胞死を誘導する分子機構を解明するとともに、体癌遺伝子治療の基礎的検討を行い、臨床応用を目指そうとするものである。これらの体癌における特徴的な遺伝子変異に基づく癌細胞死の誘導は *in vitro* レベルでは全て確認されておりまた正常内膜細胞での発現機構も明らかにされているため、かなりの確度をもって遺伝子治療の基礎的研究を遂行できると考える。

研究成果

1) DCC について

ヒト子宮体癌細胞株 7 株をもちいて、全ての株で DCC の正常な発現が失われていることを確認し、DCC を再発現させると全株でアポトーシスが誘導されることも確認した。一方 Netrin-1 存在下で DCC を再発現させるとアポトーシスが回避された。したがって、ライガ

ンドである Netrin-1 とそのレセプターである DCC により誘導されるシグナルが内膜(癌)細胞を生存させ、DCC 存在下での Netrin-1 の消失が細胞死誘導の引き金となることが明らかとなった(添付論文 Gynecol Oncol 95, 2, 281-9 (2004))。また臨床検体30例の検討でも70%程度の症例で DCC 発現が消失しておりこれらの症例の予後は相対的に不良であることも判明した。臨床応用の第一歩として DCC 発現アデノウイルスベクターを作製し、子宮体癌細胞株とヌードマウスを用いた系で生体内投与の検討を行う。また、DCC の発現のある体癌については、Netrin-1 を枯渇させ細胞死を誘導する目的で抗 Netrin-1 抗体も臨床応用しうることも示唆された。

2) ORF-12 について

ORF-12 は HIF-1 プロリン残基水酸化活性をもち、これを通して HIF-1 の分解を促進する。多くの子宮体癌症例では HIF-1 の発現が亢進しておりその約5分の1に ORF-12 の異常が見られる(特に肉腫例ではほぼ全例)ことを明らかにした。ヒト子宮体癌細胞株3株を場として(これら全ては、ORF-12 に変異を持つ)、正常型 ORF-12 の再発現は HIF-1 蛋白を消失させ、その下流である VEGF などの腫瘍増殖促進的に働く多くの遺伝子の活性を低下させることを見いだした。さらに ORF-12 による HIF-1 の抑制は最終的には、senescence を誘導し癌細胞死を導くことも明らかとなった。この細胞死の誘導は p21 の発現増加とテロメラーズの抑制を伴い、一般に見られる accelerated senescence の分子機構が HIF-1 の抑制により惹起されることを示している。HIF-1 に競合的に働く FIH の高発現や、HIF-1 選択的な siRNA の添加も同様に細胞死を誘導したこともがん細胞生存に HIF-1 のシグナルが重要な役割を担うことを示している。これらの事実をふまえて HIF-1 活性阻害剤である YC-1 と 17AAG を癌細胞株に添加したところ同様な細胞死の誘導が観察された(図2)。ORF-12 発現アデノウイルスベクターとともにこれらの薬剤の生体内投与には、特に難治例の肉腫を中心にして臨床応用可能であることが示唆された。

3) p21 について

p21 発現アデノウイルスベクターを作製した。これらの癌細胞への感染は、Rb, p16, p53 の状態に依存せず低容量感染で senescence を、高容量でアポトーシスを誘導することを明らかにした。これら細胞死には p21 の下流で誘導される活性酸素種が関与し、その細胞死の形態は活性酸素種の量が決定することも明らかとなった。多くの上皮性癌細胞は Rb, p16, p53 が関与するシグナルシステムに変異を持つことから、これらに依存しない p21 のがん細胞死誘導の系は、臨床的に期待されるべきものと考えられた。基礎的検討が終了したのでこれもヌードマウスを場として今後検討を進める。

B. 抗 TSSC3 抗体の奇胎診断への応用

(加藤秀則, 松田貴雄, 浅野間和夫, 井上貴史, 山口真一郎, 和気徳夫, 平川俊夫* 中野仁雄*〔*九州大学医学研究院生殖病態生理学〕)

研究の背景と課題

部分奇胎と全奇胎の鑑別は肉眼的にも、顕微鏡下でもしばしば困難である。鑑別には遺伝子診断が有用であるが、特殊な設備と高い費用を要する。一般の検査室でも簡便に両者を鑑別できる方法を検討した。全奇胎は雄核発生を原因とするため、母性発現する刷り込み遺伝子が鑑別に有用と考え、検索した。

研究方法として、全奇胎と正常絨毛との間でマイクロアレイを行い全奇胎で発現が消失している刷り込み遺伝子をスクリーニングし、遺伝子の発現の差を定量 PCR にて確認した。この遺伝子の蛋白に対して抗体を作製し、遺伝子診断で確定診断がなされている部分奇胎 14 例、全奇胎 17 例に対しウエスタンブロット(WB) および免疫染色(IHC)にて発現の差を検討した。また現在有用と考えられている p57 と比較した。刷り込み遺伝子の中で、全奇胎で常に発現が消失しているものは TSSC3 のみであった。定量 PCR では全奇胎、部分奇胎それぞれ 10 例の平均発現コピー数は 27.96 対 1250.54 であった。作製した抗体では WB, IHC とも部分奇胎 14 例中全例(100%)で陽性、全奇胎 17 例中全例(0%)で陰性であった。対照の正常絨毛、水腫様変性も常に陽性であった。IHC では cyto-trophoblast が特異的に染色されていた。p57 は全奇胎でも絨毛の間質細胞や intermediate trophoblast に発現陽性であった。WB でも全奇胎で全例陽性で部分奇胎との鑑別は困難であった。

以上の実験より、全奇胎と両親の染色体を含む流産絨毛、部分奇胎、胎盤嚢胞との鑑別に TSSC3 の発現の特異性は 100% であり、また免疫染色など一般病院の検査室でも用いることができるため、TSSC3 抗体は全奇胎の診断に極めて有用であることが示唆された。

C. 子宮内膜・子宮体癌幹細胞の同定

(加藤聖子, 加藤圭次, 須賀 新, 一戸晶元, 有馬隆博, 和氣徳夫)

我々は組織幹細胞の同定に使用される Hoechst33342 の取り込みの低い分画の細胞(以下 SP 細胞)を分離する方法を用いて子宮内膜や子宮体癌の SP 細胞を分離しその特性を解析している。まず、同意を得た患者の摘出子宮より正常子宮内膜を採取し、上皮と間質細胞に分離後 Hoechst33342 で染色後、FACS で SP 細胞を分離し、collagen dish, feeder cell や matrigel 上に培養し長期培養 SP 細胞の CD9, E-cadherin, CD13, Vimentin の発現を Western blot 法や免疫染色で解析したところ、collagen dish 上で長期培養した SP 細胞は、形態学的に間質細胞に類似し、内膜間質で発現している CD13, Vimentin が陽性、内膜上皮で発現している CD9, E-cadherin が陰性であった。feeder cell 上で長期培養した SP 細胞を collagen dish 上に撒き直すと腺管構造を呈し、CD9, E-cadherin 陽性であった。また、SP 細胞の多くは CD9, CD13 陰性の分画に存在していた。次に磁気ビーズ法で CD9, CD13 陰性の細胞を分離し長期培養後の形態変化を観察したところ、上皮細胞由来の CD9, CD13 陰性細胞は CD9, E-cadherin 陽性の腺管構造を呈し、間質細胞由来

の CD9,CD13 陰性細胞は CD9 陰性 CD13 陽性の間質細胞類似の細胞形態を示した。最後に同意を得た患者の子宮体癌組織から分離した細胞や子宮体癌細胞株 Hec1 について同様の実験を行ったところ、子宮体癌細胞にも SP 細胞が存在し非 SP 細胞に比べ CD9,CD13 の発現は低下していた。

以上より子宮内膜・子宮体癌には SP 細胞が存在し、正常子宮内膜の SP 細胞を長期培養すると子宮内膜上皮或いは間質類似の特性を示し、SP 細胞が子宮内膜の幹細胞或いは前駆細胞である可能性が示唆された。また、子宮内膜・子宮体癌の SP 細胞は共に CD9,CD13 発現低下という類似した特徴を示した。今後は、SP 細胞と非 SP 細胞の間で発現に差のある遺伝子・蛋白を検索し、未分化マーカーの同定を行う予定である。

D. ヒト胎盤栄養膜幹細胞同定と分離

(有馬隆博, 山吉麻子, 須賀 新, 一戸晶元, 加藤聖子, 和氣徳夫)

研究の目的: 胎盤組織は、栄養膜細胞(トロホブラスト)が主要な構成成分である。ヒト栄養膜細胞における分化制御機構の解明に栄養膜幹細胞(TS 細胞)は非常に有益であると考えられるが、未だ樹立されていない。我々は、ヒト TS 細胞を分離しその生物学的特性を解析し、さらにマウス TS 細胞と比較した。

方法としては(1)患者の同意を得て採取した妊娠初期胎盤絨毛組織を酵素処理および濃度勾配法を用いて栄養膜細胞を分離した後、Hoechst 染色し FACS で side population(SP)細胞を分離した。(2)SP 細胞に対しては Cytotrophoblast(CT)特異的(CK18,CD49f)および合胞体栄養細胞特異的抗体(HCG,HPL)を用いて細胞免疫染色を行った。(3)SP と非 SP 細胞から RNA を抽出し、胎盤未分化および分化マーカーの発現について定量 PCR 法で比較した。(4)マウス TS 細胞における発現パターンと比較した。

結果としては、(1)15 例中 11 例に SP 細胞が存在した。細胞数に対する割合は 0.01-0.3%であった。(2)SP 細胞には CK18,CD49f の両者を発現する細胞は 82%にみられた。HCG,HPL の発現は非 SP 細胞で確認されたが、SP 細胞では認めなかった。(3)SP 細胞は非 SP 細胞と比較し、未分化マーカー (ERR, CDX2)の発現は亢進し、分化マーカー (HASH2, GCM1, HAND1, BMP4)の発現は著しく低下していた。また、非 TS マーカー (OCT4)の発現は見られなかった。(4)マウス TS 細胞と比較し、未分化マーカー ID2 の発現の亢進と EOMES の発現の低下がみられた。

以上の実験より(1)ヒト胎盤組織の SP 細胞は CT に存在することが判明した。(2)SP 細胞は未分化マーカーを高発現することより、幹細胞的性格を有することが示唆された。(3)また、ヒトとマウスの TS 細胞における発現パターンは異なることが示唆された。

E. 活性型 K-Ras を介する造腫瘍能獲得機構における Rac1 の関与

(一戸晶元, 加藤聖子, 須賀 新, 山吉麻子, 有馬隆博, 和氣徳夫)

造腫瘍能や細胞老化誘導に低分子量 G 蛋白の Rac1 が関与することが報告されている。そこで活性型 K-Ras を形質導入した NIH3T3 細胞を用いて、この細胞の造腫瘍能や細

胞老化に關与する Rac1 の役割を解析した。まず、活性型 K-Ras, dominant negative estrogen receptor(DNER)を単独にまたは共に発現する NIH3T3 細胞 (K12V 細胞, K12VDNER 細胞)を樹立し、細胞増殖能を Flow Cytometer, 造腫瘍能を軟寒天培地によるコロニー形成能, ER の発現と機能をウエスタンブロット法とルシフェラーゼアッセイで解析したところ、K12V細胞は造腫瘍能を獲得しておりER の発現と機能が亢進していた。K12VDNER 細胞では ER の機能が著明に抑制され造腫瘍能が消失し細胞老化が誘導された。

次に Rac1 の活性を Rac1 の標的モチーフをもつ蛋白との結合によって解析したところ、mock 細胞に比べて K12V 細胞において増加し K12VDNER 細胞において低下していた。K12V 細胞に dominant negative Rac を一過性に発現させると、細胞老化が誘導された。さらに、K12VDNER 細胞に活性化型 Rac を一過性に発現させると老化細胞数の減少と細胞の小型化がみられた。以上より、Rac の機能の一つとして Ras/ER 経路の下流で細胞老化を逸脱することにより、Ras を介する造腫瘍能獲得に作用している可能性が示唆された。今後は細胞老化に關与する因子 (p53,p21,p16 など)と Rac の關連を解析する予定である。

F . p21 による癌細胞死誘導能と活性酸素種との關連

(井上貴史, 浅野間和夫, 山口真一郎, 松田貴雄, 加藤秀則, 和氣徳夫)

CDK インヒビターである p21 の発現は細胞老化に重要な役割を果たす。さまざまな癌細胞株にウイルスベクターを用いて p21 を過剰発現させると、癌細胞老化死を誘導することが報告されている。また、個体老化と活性酸素種 (ROS) には密接な關係があることが以前より知られている。そこで我々は、p21 による細胞老化死と活性酸素種とにどのような關係があるかを検討した。

卵巣癌細胞株である SKOV, 子宮頸癌細胞株である HeLa 細胞, 大腸癌細胞株である DLD1, LOVO, HCT116 細胞へ、野生型ヒト p21cDNA を、ウイルスベクターを用いて遺伝子導入した。全ての細胞株で p21 を過剰発現させると、FACS法で G1 期の増加を認め -gal 染色陽性となり、細胞老化の誘導が示された。さらに、LOVO 細胞と HCT116 細胞では、ウイルス量を調節し、p21 発現量をさらに増大させると、核の断片化および FACS 法によって subG1 期への集積を認め、細胞老化に替わり、アポトーシスが誘導された。

細胞内 ROS レベルを蛍光色素である Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて FACS 法で解析したところ、p21 発現により細胞老化死が誘導されると、細胞内 ROS レベルの増加が認められた。また、p21 過剰発現によるアポトーシス誘導時では、細胞内 ROS レベルは顕著に増加していた。

ROS 阻害剤である N-acetyl-L-cystein (NAC) を使用したところ、p21 の発現に伴う細胞死を抑制できた。

以上の実験から、p21 は細胞内 ROS レベルを増加させることにより、癌細胞死を誘導し、また p21 により誘導される細胞内 ROS レベルにより、細胞老化死あるいはアポトーシスが

選択されることが示唆された。

G. Necc1 遺伝子の栄養膜細胞分化・胎盤形成における働き

(浅野間和夫、加藤秀則、山口真一郎、松田貴雄、井上貴史、和氣徳夫)

NECC1 は絨毛癌細胞株の造腫瘍能を抑制する遺伝子として単離された。野生型マウスの胎盤における Necc1 の発現は胎齢 8.0-9.5 日に限局しており局在は栄養膜巨細胞層と海綿状栄養膜細胞層に限局していた。Necc1 変異欠損マウス胎盤を解析したところ栄養膜巨細胞層の過形成と海綿状栄養細胞層、栄養膜迷路層の低形成を認めた。この結果は Necc1 が栄養膜細胞の巨細胞への分化を抑制することを示唆している。そこで Necc1 遺伝子の栄養膜細胞の分化における働きについて in-vitro で解析するためラットの栄養膜細胞株 Rcho-1 を用いて以下の実験をおこなった。まず Rcho-1 細胞を分化誘導したところ分化マーカーが漸増性の発現を示す中、Necc1 遺伝子は一過性の高発現を示し直ぐに低下した。アデノウィルスベクターを用いて Rcho-1 細胞に Necc1 遺伝子を強制的に高発現させ、この細胞に分化刺激を与え、それに対する細胞の反応をトリプシテスト、分化マーカーの発現を用いて検討したところ分化抵抗性を呈した。また、心筋細胞において Necc1 により活性の調節を受けていることが知られている転写因子である SRF の栄養膜細胞での機能について解析するため野生型と優性ネガティブ型 (DN 型) SRF をそれぞれ Rcho-1 細胞に強制発現させた細胞株を樹立した。これらの細胞に分化刺激を与えて、それに対する細胞の反応を検討したところ野生型 SRF 導入細胞株は対照と差は無かったが、DN 型 SRF 導入細胞株は分化抵抗性を示した。免疫沈降法を用いて検討したところ Necc1 と SRF は互いに共沈し、相互作用することが示唆された。野生型マウス胎盤において SRF の発現は脱落膜と栄養膜巨細胞層とに限局しており Necc1 との共在が認められた。以上より変異欠損マウスの解析結果から示唆されるように Necc1 は in-vitro でも栄養膜細胞の分化を抑制する機能を持つことが示唆された。この分化抑制能は Necc1 による SRF 機能の抑制を介することが示唆された。

H. Ras/ER /MDM2 経路を標的にした分子標的治療法開発の試み

(須賀 新、加藤聖子、山吉麻子、一戸晶元、有馬隆博、和氣徳夫)

我々は Ras を介する造腫瘍能獲得機構には、ER /MDM2/p53 シグナル伝達が関与することを報告した。そこで、子宮体癌、卵巣癌細胞株を用いて、Ras/ER /MDM2 経路を制御する手段を開発し、婦人科癌に対する分子標的治療の開発を試みた。まず、子宮体癌細胞株 (Hec6, HHUA)、卵巣癌細胞株 (KK, PA-1, KF, SKOV, MCAS, KM) を用い、各癌細胞株の ER、MDM2 の発現を Western blot 法で解析したところ、全細胞株に ER の発現を認め、正常子宮内膜細胞、不死化卵巣上皮細胞と比べ、8 株中 4 株に有意な MDM2 の発現増加を認めた。次に MEK 阻害剤、抗エストロゲン剤を培養液に添加し、細胞増殖能、MDM2 発現量の変化および ER 機能との関与について検討した。MDM2 過剰発現株では MEK 阻害剤投与により、MDM2 発現が減少し、細胞増殖能の抑制と細胞老化の誘導を

認められた。HHUA 細胞株に ER 蛋白を過剰発現させると MEK 阻害剤の細胞増殖抑制機能を阻害した。ER 応答配列を含む luciferase 発現 vector を用いた luciferase reporter assay では、MEK 阻害剤や低濃度 MEK 阻害剤と抗エストロゲン剤同時投与による ER 転写活性の抑制を認めた。最後に分子標的としての MDM2 の意義を検討するため MDM2siRNA を作成、形質導入、MDM2 の発現の変化やそれに伴う増殖能の変化について検討した。MDM2siRNA 投与にによる MDM2 発現低下に伴い、正常子宮内膜と比較し、MDM2 過剰発現癌細胞株全てで細胞増殖抑制が認められた。以上より MEK 阻害剤は MDM2 発現を抑制することにより、細胞増殖を制御し、細胞老化を誘導、この効果に ER を介する経路が関与していた。今後は Ras/ER/MDM2 シグナル伝達を制御する手段を考案し、ヒト癌に対する分子標的療法の開発を行っていく予定である。

I. HPV16 E6 を標的とした新規子宮頸癌治療法の開発

(山吉麻子, 加藤聖子, 須賀 新, 一戸晶元, 有馬隆博, 和氣徳夫)

ヒトパピローマウイルス (HPV) E6/E7 領域は子宮頸癌の 90%以上で保存され、その増殖に深く関与している。我々は光架橋性分子であるソラレンを導入したアンチセンスオリゴ DNA (Ps-S-Oligo) および siRNA を作成し、HPV E6 癌遺伝子発現の選択的抑制手段の開発、及びそれに伴う、p53 安定化シグナル再構築によるアポトーシス誘導を介した新規治療手段の有効性を評価した。

HPV16 型 E6 陽性子宮頸癌細胞株である Caski, SiHa, SKGIIIa 細胞を用い、HPV16 型 E6 を標的とした Ps-S-Oligo 及び siRNA の細胞増殖抑制効果を評価した。Ps-S-Oligo 及び siRNA はこれらの細胞株に対して顕著な細胞増殖抑制効果を示し、標的である E6 mRNA 量は減少することが RT-PCR によって確認された。ウェスタンブロッティング及び RT-PCR によって、p53 及びその下流のアポトーシス関連因子の発現を定量し、細胞増殖抑制メカニズムについて検討した。Ps-S-Oligo で処理することによって p53 蛋白量は有為に増大し、アポトーシス関連因子である Bax 蛋白量の増大が誘導されていることが確認された。フローサイトメトリー及び TUNEL 法による解析の結果、細胞増殖抑制はアポトーシス誘導に起因していることが明らかとなった。また Caski 細胞をコラーゲンゲル上で三次元的に培養し、層を形成した細胞塊に対する Ps-S-Oligo の効果を評価したところ、Ps-S-Oligo 処理を繰り返すことによって細胞層が薄くなることを確認した。以上より、本法は HPV ウィルス産物のうち E6 の発現のみを選択的に抑えることで、p53 安定化シグナルを再構築し、HPV 陽性子宮頸癌細胞特異的にアポトーシスを誘導できる有効な治療手法になり得る可能性が示唆された。

業績目録

原著論文

- 1 Ichinoe A, Behmanesh M, Tominaga Y, Ushijima Y, Hirano S, Sakai Y, Tsuchimoto D, Sakumi K, Wake N, and Nakabeppu Y . 2004
Identification and characterization of two forms of mouse MUTYH proteins encoded by alternatively spliced transcripts.
Nucl. Acids. Res. 32: 477-48
- 2 Hatakenaka M, Yoshimitsu K, Adachi T, Matsuda T, Wake N, Honda H. 2004
Transient uterine myometrial contraction associated with moles.
J Magn Reson Imaging. 19(2):182-187
- 3 Soma H, Okada T, Yoshinari T, Furuno A, Yaguchi S, Tokoro K, Kato H. 2004
Placenta site trophoblastic tumor of the uterine cervix occurring from undetermined antecedent pregnancy.
J. Obstet. Gynaecol. Res. 30, 2, 113-116
- 4 Oudejans CBM, Mulders J, Konst A, Westerman BA, van Wijk IJ, Leegwater PAJ, Kato HD, Matsuda T, Wake N, Pals G, Lachmeijer AMA, ten Kate LP, and Blankensin MA 2004
The parent - of - origin effect of 10q22 coincides with two regions enriched for genes with downregulated expression in androgenetic placenta.
Human Molecular Genetics 10, 589-598
- 5 Ninomiya Y, Kato K, Takahashi A, Ueoka K, Kamikihara T, Arima T, Matsuda T, Kato H, Nishida J, Wake N 2004
K-Ras and H-Ras activation promote distinct consequences on endometrial cell survival.
Cancer Reserch 64, 2759-2765
- 6 Asanoma K, Kato H, Inoue T, Matsuda T, Wake N.2004
Analysis of a candidate gene associated with growth suppression of choriocarcinoma and differentiation of trophoblasts.
J Reprod Med. Aug;49(8):617-626
- 7 Kato HD, Kondoh H, Inoue T, Asanoma K, Matsuda T, Arima T, Kato K, Yoshikawa T, Wake N.2004
Expression of DCC and netrin-1 in normal human endometrium and its implication in endometrial carcinogenesis.
Gynecol Oncol. Nov; 95 (2) :281-9
- 8 Inoue T, Kato H, Yoshikawa K, Adachi T, Etoh K and Wake N. 2004
A Case Report :A Retroperitoneal Schwannoma Bearing at the Right Vaginal Wall.
J Obstet and Gynaecol Res,30 (6) : 454-457 (2004)

学会発表

- 1 加藤秀則, 浅野間和夫, 松田貴雄, 和氣徳夫 (2004/4/10-13)
インプリント遺伝子 ZAC の卵巣癌抑制機構の解析

- 第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京.
- 2 加藤秀則, 井上貴史, 浅野間一夫, 松田貴雄, 和氣徳夫 (2004/4/10-13)
HIF1 シグナル伝達系と子宮内膜癌細胞老化誘導との関連
第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京.
- 3 山吉麻子, 加藤聖子, 須賀 新, 一戸晶元, 上木原哲也, 有馬隆博, 和氣徳夫
(2004/4/10-13)
子宮頸癌に対する光架橋型アンチセンス分子標的療法
第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京.
- 4 浅野間和夫, 加藤秀則, 松田貴雄, 井上貴史, 和氣徳夫 (2004/4/10-13)
造腫瘍能抑制効果をもつ NECC1 遺伝子の胎盤形成における働き
第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京
- 5 井上貴史, 浅野間和夫, 松田貴雄, 加藤秀則, 和氣徳夫 (2004/4/10-13)
p21 による癌細胞死誘導能の解析
第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京.
- 6 須賀新, 加藤聖子, 山吉麻子, 上木原哲也, 一戸晶元, 有馬隆博, 和氣徳夫
(2004/4/10-13)
婦人科癌における Ras/ER /MDM2 経路を標的にした癌治療法開発の試み
第 56 回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京.
- 7 須賀 新, 加藤聖子, 和氣徳夫 (2004/5/13-14)
婦人科癌における Ras/ER /MDM2 経路を標的にした癌治療法開発の試み
第 8 回がん分子標的治療研究会, 鹿児島.
- 8 加藤聖子 (2004/5/14)
発癌機構における Ras 蛋白の役割の解明と治療法の開発
第 10 回群馬 Clinical Oncology Research 勉強会, 群馬.
- 9 井上貴史, 浅野間和夫, 松田貴雄, 加藤秀則, 和氣徳夫 (2004/5/15-16)
若年者子宮頸部細胞診異常と HPV 感染との関連についての検討
第 61 回日本産科婦人科学会九州連合地方部会, 第 55 回日本産婦人科医会九州
ブロック会, 熊本.
- 10 和氣徳夫 (2004/6/20)
p53 安定化シグナルの再構築を標的とした癌分子標的治療の開発
第 107 回日本産科婦人科学会関東連合地方部会学術集会・特別講演, 東京.
- 11 松田貴雄 (2004/6/24)
胞状奇胎奇胎診断のための多型マーカーの応用
第 35 回 大三会, 大分.
- 12 山口真一郎 (2004/6/24)
若年者子宮頸部細胞診異常と HPV 感染との関連についての検討
第 35 回 大三会, 大分.

- 13 一戸晶元, 加藤聖子, 須賀 新, 山吉麻子, 有馬隆博, 吉河康二, 和氣徳夫 (2004/7/11)
術前診断に苦慮した原発性卵巣癌の一例
平成 16 年度日産婦大分地方部会・大分県産婦人科医会総会, 大分.
- 14 須賀 新, 加藤聖子, 和氣徳夫 (2004/7/23-24)
婦人科癌における Ras/ER /MDM2 経路を標的にした癌治療法開発の試み
第 5 回ホルモンと癌研究会, 大阪.
- 15 N. Wake (2004/9/13)
Cell senescence induction by reconstructing p53 stabilization signalling in cancer cells
8th Symposium of the Japanese-German Society of Obstetrics and Gynecology
Satellite-Symposium Berlin
- 16 和氣徳夫, 加藤聖子 (2004/9/29-10/1)
p53 安定化シグナルの再構築を目指した癌分子標的治療の開発
第 63 回日本癌学会総会 シンポジウム 39「婦人科腫瘍の発生機構解明と治療戦略の最先端」, 福岡.
- 17 加藤聖子, 和氣徳夫 (2004/9/29-10/1)
子宮内膜細胞のアポトーシス誘導における K-Ras と H-Ras の機能の違い
第 63 回日本癌学会総会, 福岡.
- 18 浅野間和夫, 加藤秀則, 松田貴雄, 井上貴史, 山口真一郎, 和氣徳夫 (2004.10/2)
造腫瘍能抑制効果をもつ NECC1 遺伝子の胎盤形成における働き
生医研リトリート, 由布院.
- 19 加藤聖子, 須賀新, 一戸晶元, 山吉麻子, 有馬隆博, 和氣徳夫 (2004.10/2)
子宮内膜幹細胞同定の試み
生医研リトリート, 由布院.
- 20 有馬隆博, 加藤聖子, 須賀新, 一戸晶元, 山吉麻子, 和氣徳夫 (2004.10/2)
インプリント遺伝子 ZAC の卵巣癌抑制機構の解析
生医研リトリート, 由布院.
- 21 山吉麻子, 加藤聖子, 須賀 新, 一戸晶元, 上木原哲也, 有馬隆博, 和氣徳夫 (2004.10/2)
子宮頸癌に対する光架橋型アンチセンス分子標的療法
生医研リトリート, 由布院.
- 22 井上貴史, 浅野間和夫, 松田貴雄, 加藤秀則, 和氣徳夫 (2004.10/2)
p21 による癌細胞死誘導能の解析
生医研リトリート, 由布院.
- 23 須賀 新, 加藤聖子, 一戸晶元, 山吉麻子, 有馬隆博, 和氣徳夫 (2004.10/2)
婦人科癌における Ras/ER /MDM2 経路を標的にした癌治療法開発の試み
生医研リトリート, 由布院.

- 24 Kato H, Inoue T, Wake N (2004.10/3-7)
Senescence induction for gene therapy of gynecological cancers based on its molecular machineries.
10th Biennial Meeting International Gynecologic Cancer Society(Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, Scotland)
- 25 Hirakawa T, Matsuda T, Kato H, Wake N, Nakano H (2004.10/3-7)
Relationship between morphological features and genetic diagnosis in hydatidiform Moles.
10th Biennial Meeting International Gynecologic Cancer Society(Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, Scotland)
- 26 加藤秀則(2004/11/10)
性行為感染症
大分工業高等専門学校, 大分 .
- 27 加藤聖子(2004/11/12-13)
子宮体癌発癌機構の解明と治療法の開発
第43回日本臨床細胞学会秋期大会 シンポジウム3 遺伝子・分子腫瘍学の現在と未来, 東京 .
- 28 加藤秀則, 和氣徳夫(2004/11/18-19)
絨毛性疾患の診断治療についての新知見-絨毛性疾患診断治療の up to date-
絨毛性疾患研究会, ワークショップ, 別府 .
- 29 加藤聖子(2004/11/22)
骨粗鬆症 あなたならどう治療する?
第6回骨粗鬆症病身連携研究会 パネルディスカッション, 別府 .

ゲノム機能制御学部門

ゲノム創薬・治療学分野

| | | |
|---------------|---|-----------|
| 教 | 授 | 和 氣 徳 夫 |
| 講 | 師 | 加 藤 秀 則 |
| | " | 加 藤 聖 子 |
| 助 | 手 | 有 馬 隆 博 |
| | " | 松 田 貴 雄 |
| 医 | 員 | 井 上 貴 史 |
| | " | 一 戸 晶 元 |
| | " | 浅 野 間 和 夫 |
| 研 究 生 | | 二 宮 コミ子 |
| 大 学 院 生 | | 山 口 真 一 郎 |
| 学 外 留 学 生 | | 須 賀 新 |
| 産 学 連 携 研 究 員 | | 山 吉 麻 子 |
| 研 究 補 助 員 | | 螻 川 内 愛 子 |
| | " | 星 野 文 子 |
| | " | 西 村 知 恵 |
| | " | 足 立 佐 和 子 |
| | " | 上 田 恭 子 |
| | " | 宮 成 洋 子 |
| | " | 仲 島 巴 美 |

発生工学分野

Division of Embryonic and Genetic Engineering

当分野では、ノックアウトマウスの作製を通じて、免疫系、特に自然免疫系の生体防御における生体レベルでの機能を解析している。なかでも (1)自然免疫系の異常活性化により発症する慢性炎症性腸疾患の発症機構、(2)Toll-like receptor (TLR) を介した自然免疫系の感染防御における役割、(3)自然免疫系に属するマクロファージの活性制御機構を中心に研究している。

2003年12月に竹田潔が教授として赴任し、教室のメンバーは大きく変わった。2004年3月1日に参加した助手・桑田啓貴および事務補佐員・倉田真弓は引き続き当研究室で仕事を続けている。2004年4月1日付けで助教授・谷内一郎が理化学研究所・免疫アレルギー研究所のグループリーダーとして転出した。また、技術員の室井佐和子と秋山かおり両氏は2004年4月1日付けで理化学研究所・免疫アレルギー研究所の技術員として転出した。かわって、感染防御学分野の技術補佐員であった古賀律子、技能補佐員であった城戸律子が、2004年4月1日付けで当分野に参加してくれた。また2004年4月1日付けで、アメリカ合衆国、システムバイオロジー研究所のポスドクであった松本真琴が助手として参加した。夏からは、新幸二、小川雅弘が医学修士1年生として参加した。

A. 自然免疫系の異常活性化により発症する慢性炎症性腸疾患の発症機構の解析

慢性大腸炎の発症と大腸局所に存在する自然免疫系細胞の活性との相関を解析するため、大腸粘膜固有層に存在するマクロファージの機能を解析した。その結果、正常マウスの大腸粘膜固有層マクロファージは、他の組織に存在しているマクロファージと異なり、TLR 刺激依存性の炎症性サイトカインの産生が認められないことを見出した。一方、慢性大腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや STAT3 変異マウス由来の大腸粘膜固有層マクロファージは TLR 刺激依存性に炎症性サイトカインを産生した。そこで正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの大腸粘膜固有層マクロファージ間で TLR 応答性が異なる分子機構を解析するため、両者間で遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイで解析した。その結果、Bcl-3 と同じ I κ B ファミリーに属する I κ BNS が Bcl-3 とともに正常大腸粘膜固有層マクロファージに特異的に発現していることを見出した。Bcl-3 は、これまでの解析から、マクロファージにおいて TLR 依存性の TNF- α 産生を選択的に抑制していることを明らかにしていた。そこで、マクロファージにおける I κ BNS の機能を解析した。I κ BNS をマクロファージに発現させると、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に減少していた。さらに I κ BNS を発現した細胞では、NF- κ B の DNA 結合能に障害が認められた。さらに、I κ BNS は IL-6 プロモーターに p50 NF- κ B サブユニットと共に恒常的に会合していることがクロマチン免疫沈降法の解析から明らかになった。さらに、RNAi による I κ BNS のノックダウンマクロファージでは、LPS

刺激依存性の IL-6 産生が特異的に増加していた。以上の結果から、正常大腸粘膜固有層マクロファージに恒常的に発現している I κ BNS がマクロファージ系細胞において、IL-6 産生の抑制に特異的に関与していることが明らかになった。Bcl-3 も大腸粘膜固有層マクロファージに恒常的に発現していることから、この細胞では、I κ BNS、Bcl-3 の核に発現する I κ B ファミリー分子が、TLR 応答性をそれぞれ負に制御していることが明らかになった。

B. Toll-like receptor (TLR)を介した自然免疫系の感染防御における役割

TLRシグナルの結核感染における役割を、TLRを介した自然免疫系の活性化が消失するMyD88/TRIFの二重欠損マウスを作成し、解析した。正常マウス、MyD88 欠損マウス、TRIF 欠損マウス、およびMyD88/TRIF 二重欠損マウスに、結核菌を感染させて、その生死をみると、MyD88 欠損マウスで正常マウス、TRIF 欠損マウスに比べて感受性が高まっていた。MyD88/TRIF 二重欠損マウスでは、MyD88 欠損マウスと比べてもさらに感受性が高くなっていることを見出した。この結果は、TLRを介した自然免疫系の活性化が、結核感染制御に重要な役割を担っていることを示している。現在、このメカニズムを解析中である。

業績目録

原著論文

1. Hokuto, I., Ikegami, M., Yoshida, M., Takeda, K., Akira, S., Perl, A. T., Hull, W. M., Whitsett, J. A. 2004.
Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia.
J. Clin. Invest. 113, 28-37.
2. Into, T., Kiura, K., Yasuda, M., Kataoka, H., Inoue, N., Hasebe, A., Takeda, K., Akira, S., Shibata, K. 2004.
Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- κ B activation.
Cell. Microbiol. 6, 187-199.
3. Akazawa, T., Masuda, H., Saeki, Y., Matsumoto, M., Takeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Takahashi, T., Azuma, I., Akira, S., Toyoshima, K., Seya, T. 2004.
Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice.
Cancer Res. 64, 757-764.
4. Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., Raz, E. 2004.
Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis.
Gastroenterology 126, 520-528.

5. Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Hiramatsu, R., Leroith, D., Takeda, K., Akira, S., Kasuga, M. 2004.
Role of Stat3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo.
Nat. Med. 10, 168-174.
6. Liu, B., Mori, I., Hossain, M. J., Dong, L., Takeda, K., Kimura, Y. 2004.
Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity.
J. Gen. Virol. 85, 423-428.
7. Robben, P. M., Mordue, D. G., Truscott, S. M., Takeda, K., Akira, S., Sibley, L. D. 2004.
Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype.
J. Immunol. 172, 3686-3694.
8. Yukawa, K., Hoshino, K., Kishino, M., Mune, M., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Tanaka, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., Akira S. 2004.
Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy.
Int. J. Mol. Med. 13, 515-520.
9. Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A. 2004.
Toll-like receptors are temporally involved in host defense.
J. Immunol. 172, 4463-4469.
10. Li, Y., Ishii, K., Hisaeda, H., Hamano, S., Zhang, M., Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Hemmi, H., Takeda, K., Akira, S., Iwakura, Y., Himeno, K. 2004.
IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9?
Gene Ther. 11, 941-948.
11. Ikushima, H., Nishida, T., Takeda, K., Ito, T., Yasuda, T., Yano, M., Akira, S., Matsuda, H. 2004.
Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is down-regulated after operation.
Surgery 135, 376-385.
12. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Miyagi, K., Kinjo, T., Yara, S., Koguchi, Y., Miyazato, A., Shibuya, K., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Saito, A. 2004.
Interferon- γ production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18.
Microbes. Infect. 6, 339-349.

13. Gorogawa, S., Fujitani, Y., Kaneto, H., Hazama, Y., Watada, H., Miyamoto, Y., Takeda, K., Akira, S., Magnuson, M. A., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y., Hori, M. 2004.
Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 319, 1159-1170.
14. Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., Akira, S. 2004.
The roles of two I κ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection.
J. Exp. Med. 199, 1641-1650.
15. Kishino, M., Yukawa, K., Hoshino, K., Kimura, A., Shirasawa, N., Otani, H., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Maeda, M., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., Mune, M. 2004.
Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury.
J. Am. Soc. Nephrol. 15, 1826-1834.
16. Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Yamamoto, S., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saito, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Muta, T., Takeda, K., Akira, S. 2004.
Regulation of Toll/IL-1 receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I κ Bz.
Nature 430, 218-222.
17. Okamoto, M., Furuichi, S., Nishioka, Y., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S. U., Takeda, K., Akira, S., Ryoma, Y., Moriya, Y., Saito, M., Sone, S., Sato, M. 2004.
Expression of Toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a Streptococcal preparation.
Cancer Res. 64, 5461-5470.
18. Yang, R., Murillo, F. M., Lin, K.-Y., Yutzy IV, W. H., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B. S. 2004.
Human papillomavirus type-16 virus-like particles activate complementary defense responses in key dendritic cell subpopulations.
J. Immunol. 173, 2624-2631.
19. Sato, N., Takahashi, N., Suda, K., Nakamura, M., Yamaki, M., Ninomiya, T., Kobayashi, Y., Takada, H., Shibata, K., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., Noguchi, T., Udagawa, N. 2004.
MyD88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1a.

- J. Exp. Med. 200, 601-611.
20. Nakasone, C., Kawakami, K., Hoshino, T., Kawase, Y., Yokota, K., Yoshino, K., Takeda, K., Akira, S., Saito, A. 2004.
Limited role for interleukin-18 in the host protection response against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice.
Infect. Immun. 72, 6176-6180.
 21. Yang, R., Murillo, F. M., Cui, H., Blosser, R., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B. 2004.
Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88.
J. Virol. 78, 11152-1160.
 22. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I., Liesenfeld, O. 2004.
Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control.
Eur. J. Immunol. 34, 3197-3207.
 23. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., Nishioka, K. 2004.
In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model.
Gene Ther. 11, 1753-1762.
 24. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., Nishioka, K. 2004.
In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity.
Gene Ther. 11, 1763-1771.
 25. Chaisson, M. L., Branstetter, D. G., Derry, J. M., Armstrong, A. P., Tometsko, M. E., Takeda, K., Akira, S., Dougall, W. C. 2004.
Osteoclast differentiation is impaired in the absence of IKK α .
J. Biol. Chem. 279, 54841-54848.
 26. Wieland, C. W., Knapp, S., Florquin, S., De Vos, A. F., Takeda, K., Akira, S., Golenbock, D. T., Verbon, A., Van Der Poll, T. 2004.
Non-mannose-capped lipoarabinomannan induces lung inflammation via Toll-like receptor 2.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 170, 1367-1374.

27. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., Maeda, M. 2005.
The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy.
Int. J. Mol. Med. 15, 73-78.
28. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., Saito, A. 2005.
Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in *in vitro* responses of macrophages to *Legionella pneumophila*.
Infect. Immun. 73, 352-361.
29. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang, X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S. 2005.
STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy.
Int. J. Mol. Med. 15, 225-230.
30. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., Harada, M. 2005.
Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling.
Stem Cells 23, 252-263.
31. Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., Watanabe, M. 2005.
MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis.
J. Gastroenterol. 40, 16-23.
32. Hirotani, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., Takeda, K. 2005.
The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria.
J. Immunol. 174, 3650-3657.
33. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., Kikutani, H.: 2005.
Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice.
Immunity 22, 305-316.
34. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., Maeda, M. 2005.
Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in STAT6-deficient mice.

Int. J. Mol. Med. 15, 819-825.

35. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., Barsh, G. S. 2005.

PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons.

J. Clin. Invest. 115, 951-958.

総説

1. Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S. 2004.

TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling.

Mol. Immunol. 40, 861-868.

2. Takeda, K., Akira, S. 2004.

TLR signaling pathway.

Seminar Immunol. 16, 3-9.

3. Takeda, K., Akira, S. 2004.

Microbial recognition by Toll-like receptors.

J. Dermatol. Sci. 34, 73-82.

4. Akira, S., Takeda, K. 2004.

Toll-like receptor signaling.

Nat. Rev. Immunol. 4, 499-511.

5. Akira, S., Takeda, K. 2004.

Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice.

C. R. Biol. 327, 581-589.

6. Takeda, K. 2005.

Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity.

Cur. Med. Chem. AIAA. 4, 3-11.

7. Takeda, K., Akira, S. 2005.

Toll-like receptors in innate immunity.

Int. Immunol. 17, 1-14.

8. Takeda, K. 2005.

Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors.

J. Endotoxin Res. 11, 51-55.

9. 竹田潔、審良静男. 2004

LPS トレランスの分子機構

- 臨床免疫、41 (2), 175-179.
10. 竹田潔. 2004.
TLR を介した自然免疫反応のイニシエーションとは？
分子消化器病、1 (2), 11-18.
 11. 竹田潔. 2004.
Toll-like receptor を介した自然免疫系のシグナル伝達経路
分子細胞治療、3 (3), 67-71.
 12. 竹田潔. 2004.
新たな研究室を開くにあたり「新たなブレイクスルーをめざして」
日本免疫学会会報、12(1), 16.
 13. 桑田啓貴、竹田潔 2004.
IL-10 のターゲットとしての Bcl3 の役割
免疫 2005、41, 206-213.
 14. 桑田啓貴、竹田潔. 2005.
TLR と炎症性腸疾患
炎症と免疫、13, 60-65.
 15. 竹田潔. 2005.
Toll-like receptor から病気をみる
炎症と免疫、13, 35-36.
 16. 竹田潔. 2005.
Toll-like receptor と自然免疫
呼吸、24, 3-9.
 17. 竹田潔. 2005.
加齢は易感染要因か？自然免疫の観点から
ジェロントロジーニューホライズン、17 (2), 8-11.
 18. 竹田潔. 2005.
感染防御における Toll-like receptor の役割
最新医学、60, 86-95.
 19. 竹田潔. 2005.
ノックアウトマウスから学んできたこと
日本免疫学会会報、13(1), 4.
 20. 竹田潔. 2005.
自然免疫による病原体認識機構、その1「自然免疫と Toll-like receptor」
ヘルシスト、29, 18-22.

著書

1. Takeda, K., Akira, S. 2004.
Toll-like receptors: ligands and signaling.
Innate Immune Response to Infection 257-270.
2. Takeda, K., Akira, S. 2004.
Biological roles of the STAT family in cytokine signaling.
Handbook of Experimental Pharmacology 166, 97-121.

学会発表

1. 竹田潔 (2004.4.22).
自然免疫系の病原体認識とシグナル伝達 (招待講演)
第6回 IBD 若手研究会、仙台
2. Kiyoshi Takeda (2004.7.2).
Regulation of chronic intestinal inflammation by innate immune cells. (invited)
13th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, Osaka
3. 竹田潔 (2004.7.6).
Toll-like receptor による自然免疫応答の制御
第2回九州大学生体防御医学研究所・東京大学医科学研究所「感染・免疫・ゲノム」合同シンポジウム、東京
4. 山本雅裕、竹田潔、審良静男 (2004.7.13)
Toll-like receptor を介した細胞内シグナル伝達機構と遺伝子発現制御
第25回日本炎症・再生医学会、東京
5. Kiyoshi Takeda (2004.7.9-10)
Innate immune recognition by Toll-like receptors (Organizer)
Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 1st Meeting 「Innate Immunity at Mucosal Surface, Tokyo
6. 竹田潔 (2004.7.17)
自然免疫系による病原体認識とシグナル伝達
第2回肝臓病研究会シンポジウム、東京
7. 竹田潔 (2004.7.30-31)
Toll-like receptor と感染防御 (招待講演)
第28回阿蘇シンポジウム、熊本
8. 竹田潔 (2004.8.2-5)
自然免疫系の作用機構
日本免疫学会サマースクール2004、千葉
9. Kiyoshi Takeda (2004.8.29-9.2)

Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors (Invited)

The 3rd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan

10. 竹田潔 (2004.9.10-11)
自然免疫系と炎症性腸疾患
第1回LSRD研究会、神戸
11. Kiyoshi Takeda (2004.10.24-27)
Toll-like receptors for mucosal immunity (Invited)
2004 KOSEF-JSPS Asian Science Seminar, Development of Mucosal Vaccines, Seoul, Korea
12. 竹田潔 (2004.10.29)
自然免疫系による病原体認識機構 (招待講演)
第13回腸内フローラシンポジウム、東京
13. 竹田潔 (2004.11.10)
Toll-like receptorによる自然免疫系の制御 (特別講演)
第6回宮崎膠原病懇話会、宮崎
14. Kiyoshi Takeda (2004.11.12)
Regulation of innate immunity by Toll-like receptors (invited)
International Mini-Symposium : Advanced Research on Innate Immunity, Kumamoto, Japan
15. Kiyoshi Takeda (2004.11.15-18)
Evolution and integration of innate immune recognition systems: The Toll-like receptors (Symposium; Invited)
The 8th conference of the International Endotoxin Society, Kyoto, Japan
16. 竹田潔 (2004.11.20)
Toll-like receptorと自然免疫制御 (招待講演)
第54回臨床アレルギー研究会、大阪
17. 竹田潔 (2004.11.25)
Toll-like receptorによる自然免疫系の活性化機構 (シンポジウム、招待講演)
第17回日本バイオセラピー学会学術集会総会、北九州
18. 竹田潔 (2004.11.27)
Toll-like receptorによる自然免疫系の制御機構 (招待講演)
第9回京滋臓器不全研究会、京都
19. 竹田潔 (2004.12.1-3)
遺伝子改変による免疫系シグナル伝達機構の解析 (免疫学会受賞講演)
第34回日本免疫学会学術集会、札幌

20. Kiyoshi Takeda (2004. 12.9)
Involvement of Toll-like receptor-mediated activation of innate immunity in mycobacterial infection.
40th anniversary of Japan-US, Program for Tuberculosis and Leprosy panel, Kyoto, Japan
21. 竹田潔 (2005.3.3)
Toll-like receptorによる自然免疫系の制御機構 (招待講演)
第17回日本神経免疫学会、福岡
22. 竹田潔 (2005.3.4)
腸内フローラとToll-like receptor (招待講演)
第84回関西実験動物研究会、京都
23. Kiyoshi Takeda (2005.3.12)
Regulation of Toll-like receptor-mediated innate immune responses. (Invited)
Symposium on regulation of antibody production and alteration of genomic information, Kyoto, Japan