

[0017]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2002年

<https://doi.org/10.15017/6249>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 17, 2003-07. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :

ゲノム機能制御学部門
Department of Molecular Genetics

ゲノム集団遺伝学分野

Division of Molecular Population Genetics

平成 14 年度の異動は以下の通りである。学位取得後、酒井健司が研究生として加わった。大学院生として、古垣浩一、青木正幸が加わった。科研費派遣技術員として、秋永朋美、大石さやか、園田美紀、中井順子、福山可八子、山口寛子、また、研究補助員として徳安智子が参加し、主としてヒト多型解析センター業務に従事した。教官は 1 名であるが、ゲノムの高次構造と転写制御機構の解明、および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を目指し、平成 14 年度は以下の研究を行った。

A. ヘテロクロマチン構成因子の解析

遺伝情報を安定に保ち正確に発現して細胞機能を正常に維持するための機構の一つとして、ゲノム DNA の高次構造形成が挙げられる。クロマチン構造の変化をもたらす因子は遺伝子発現制御の基盤を成し、近年、複数のクロマチン構造変換因子複合体、ヒストンの修飾酵素が同定され、既知の転写因子とそれらの相互作用が明らかにされるに及び、遺伝子発現の制御機構が遺伝子特異的転写因子によるクロマチンの構造変化によって説明されるに至った。一方、クロマチンはその凝集の程度によりユークロマチンとヘテロクロマチンとに形態分類されている。発現が活性化されている遺伝子はユークロマチンの状態にあり、上に述べた転写制御機構は、主としてユークロマチンを舞台とするものである。ヘテロクロマチンは凝集したスポットとして観察され、遺伝子発現は不活化されており、複数のヘテロクロマチンに特異的なタンパクにより構成されている。ユークロマチンからヘテロクロマチン、あるいはその逆の変換過程は未だ不明であるが、局所的なクロマチン構造変換とは異なり、広い範囲にわたる遺伝子発現制御機構の一つとして興味深い。本分野では、この変換過程を調節する因子の同定を目指しているが、まず、未だ全容が不明なヘテロクロマチン構成因子の解析を進めている。

ヘテロクロマチンの主要因子として HP1 が同定されている。HP1 はそのクロモドメインを介しメチル化 H3-K9 と結合するが、H3-K9 のメチル化酵素 SUV39H1 とモクロモシャドウドメインを介して直接的に結合し、その結合には HP1 のダイマー形成が必要であることを示した。これは、効率良くヘテロクロマチンを形成あるいは維持するために重要な機構である。一方、SUV39H1 のメチル化活性を制御する因子として RNA ポリメラーゼ II の 1 サブユニットを同定し、転写制御との関わりを検討している。また、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))。本分野では、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すべく、Su(z)12 を焦点にあて解析し、Su(z)12 が HP1a と EZH2 に異なるドメインによって結合することを見出した。EZH2 は H3-K9,27 のメチル化酵素であり、PcG 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重要な結果と考えられた。

B. CpG マイクロアレイの作成と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は僅かに知

られているのみである。その理由は、全遺伝子のプロモーター領域を個々に検討することは数的に不可能であり、また、転写因子の活性化による遺伝子発現の変化を検出する方法は、あくまで間接的な解析法であるからである。一方、ヒトゲノム配列が総て明らかとなり、約 32,000 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・分化の過程においては、それらが総て標的となっているとは考え難い。よって、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し、転写制御のネットワークを緻密に理解するためには新しい手法が必要となる。これを実現するために、本分野では、ヒトの遺伝子プロモーター領域を主として含む CpG ライブラリーをアレイ化し、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。これを利用した転写因子標的遺伝子の網羅的同定が現在進められている。

C. 全ゲノム連鎖・相関解析による多因子疾患の遺伝要因の解明

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、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、他施設との共同研究により、以下の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）。①自己免疫性甲状腺炎（国立国際医療センター）②胃がん（国立国際医療センター）③糖尿病（神戸大学・春日雅人教授他）④心筋梗塞（九大循環器内科）⑤結核（九大小児科）。また、以下に示した原因が未知の家族性遺伝性疾患についても家系分析とこれまでの連鎖解析に基づいた候補染色体領域の解析を行っている。⑥家族性血球貪食性リンパ球症（佐賀医科大・石井榮一助教授他）。全ゲノムの配列情報は著しく膨大であり、これらを網羅的に効率よく解析するために、系統化された“ウエット”と“ドライ”の実験を組織立てている。

a. 自己免疫性甲状腺炎（橋本病・グレーブス病）の遺伝要因の解明

甲状腺特異的な自己免疫疾患である橋本病(HT)と Graves 病(GD)が、どのような遺伝要因をそれぞれ特異的にもち、また共有するかを明らかにし、臨床的・免疫学的に所見の異なるこれら 2 つの疾患が、同じ甲状腺を舞台として形成される分子機序を解明することを目的とする。そのために、罹患同胞対法による全ゲノム連鎖解析と、その結果に基づく相関検定による物理マッピングを行う。全ゲノム連鎖解析により、自己免疫性甲状腺疾患全体の疾患感受性遺伝子領域を 5q31-q33 に、また HT の疾患感受性遺伝子領域を 8q23-q24 に同定した。これらの疾患感受性遺伝子領域において、CA リピートマーカ―および gSNPs をゲノム情報より抽出し、相関検定を行い、統計遺伝学的に有意な相関を示す一群の SNPs を KIAA1485 遺伝子領域内に同定した。

b. 胃がんの遺伝要因の解明

細胞のがん化は、複数の遺伝要因と複数の環境要因とが多段階で相互作用を繰り返すことで引き起こされる。遺伝性がんあるいはがん多発家系を解析することにより、網膜芽細胞腫の原因遺伝子である Rb 遺伝子、ウィルムス腫瘍の WT-1 遺伝子あるいは家族性乳癌の原因遺伝子である BRCA-1、BRCA-2、などが同定され、がんの多発家系は発がんの遺伝要因を解明する上で貴重な研究対象となる。胃がん罹患同胞対を対象とした全ゲノム連鎖解析により感受性領域を 1p32、2q33-34、11p12-13、21q11 に同定した。21q を対象に相関検定を実施し、統計学的に有意な相関を示す一群の SNPs を複数の遺伝子領域内に同定した。これらの遺伝子と細胞がん化との関連を分子細胞生物学的実験により確認する。

業績目録

原著論文

1. Yamamoto K, Sonoda M. Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 301 (2): 287-292.
2. Remboutsika E, Yamamoto K, Harbers M, Schmutz M. The bromodomain mediates TIF1a-nucleosome interactions. *J. Biol. Chem.* 2002 Dec 27; 277 (52): 50318-50325
3. Yoshida K, Martin T, Yamamoto K, Dobbs C, Munz C, Kamikawaji N, Nakano N, Rammensee HG, Sasazuki T, Hanskin K, Kikutani H. Evidence for shared recognition of a peptide ligand by a diverse panel of non-obese diabetic mice-derived, islet-specific, diabetogenic T cell clones. *Int Immunol.* 2002 Dec; 14 (12): 1439-1447.
4. Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Yamamoto K, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Kodera Y. The clinical significance of human leukocyte antigen (HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood* 2002 Jun 1; 99 (11): 4200-4206

総説

1. 山本 健, 笹月健彦. 2002 .
日本人における HLA 多型と非血縁者間骨髄移植 .
今日の移植 15 , 166 - 171 .
2. 山本 健, 笹月健彦. 2002 .
非血縁者間骨髄移植における HLA 型適合と GvH 病 .
ゲノム医学 2 , 47 - 53 .
3. 山本 健, 笹月健彦. 2002
全ゲノムスキャンによる胃がん発症関連遺伝子の探索 .
Molecular Medicine 臨時増刊号「癌ゲノム学」, 42 - 51 .

著書

1. Yamamoto, K., and Sasazuki, T. 2002.
HLA and Autoimmune Thyroid Diseases.

The Genetics of complex thyroid diseases, (T. Akamizu, M. Kasuga, TF Davies Eds.), pp.55-63

Springer-Verlag, Tokyo

2. 山本 健, 笹月健彦 . 2002

HLA .

アレルギー病学 (山本一彦 編 .) 8 - 14

朝倉書店, 東京 .

学会発表

- 1 . 青木正幸, 山本 健, 笹月健彦 (2002, 10/25-27)
全ゲノムスキャンによる胃がん発症感受性領域の探索
(文科省特定領域研究「胃がん発症に關与する遺伝子の解明」班、共同研究)
第 9 回日本遺伝子診療学会大会, 京都 .
- 2 . 青木正幸, 山本 健, 酒井健司, 笹月健彦 (2002, 11/13-15)
全ゲノムスキャンによる胃がん発症関連遺伝子の探索
日本人類遺伝学会第 47 回大会, 名古屋 .
- 3 . 原田晴仁, 土屋朋子, 馬場 賀, 古垣浩一, 笹月健彦, 白澤專二 (2002, 11/13-15)
8q23-q24 領域に存在する自己免疫性甲状腺疾患感受性遺伝子の同定
日本人類遺伝学会第 47 回大会, 名古屋 .
- 4 . 古垣浩一, 白澤專二, 原田晴仁, 土屋朋子, 馬場 賀, 石川直文, 伊藤国彦, 窪田純久, 隈 寛
二, 赤水尚史, 酒井健司, 山本 健, 笹月健彦 (2002, 11/13-15)
橋本病の疾患感受性遺伝子の同定 8q23-q24 を中心として
日本人類遺伝学会第 47 回大会, 名古屋 .
- 5 . Ken Yamamoto (2002, 12/11-14)
Human Homologue of Drosophila PcG Gene Su(z) 12 Encodes Heterochromatin Associated Protein
第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜 .
- 6 . Ken Yamamoto, Masayuki Aoki, Kenji Sakai, Takehiko Sasazuki (2002, 11/21)
Genome-wide scan for gastric cancer susceptibility genes
25th Annual Meeting of Korean Society of Medical Genetics, Seoul, Korea
- 7 . Koichi Furugaki, Senji Shirasawa, Haruhito Harada, Tomoko Tsuchiya, Iwai Baba, Naofumi Ishikawa, Kunihiko Ito, Sumihisa Kubota, Kanji Kuma, Naofumi Akamizu, Kenji Sakai, Ken Yamamoto, Takehiko Sasazuki (2002, 11/21)
Identification of a susceptibility gene for Hashimoto thyroiditis on chromosome 8q23-q24
25th Annual Meeting of Korean Society of Medical Genetics, Seoul, Korea.
- 8 . Takehiko Sasazuki, Ken Yamamoto (2002, 11/6-11/8)
Analysis of Genetic Factors Involved in Gastric Cancer in the Japanese Population
US-Japan Seminar on Migration and Cancer

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、消化器疾患ならびに神経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モ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、E.胎生期マウス脳組織内環状DNAの意義の研究、などを行ってきた。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で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(附属)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医学部附属病院・歯学部附属病院と共同で早急に進めていく予定である。

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ールの作成

GM - CSF 免疫遺伝子治療臨床研究に参加頂き、生存中の3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3~4年経過しており、2名の患者はPS0の状態で良好な経過を辿っている。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、その臨床プロトコールを作成中である。

b. SAGE 法を用いた GM - CSF 免疫遺伝子治療増強遺伝子の同定とその効果の検討

SAGE(sequential analysis of gene expression)法は従来の subtraction 法に較べてより効率的に2群の mRNA 発現の違いを検出できる系と考えられている。我々は本系を用いてマウス自家腫瘍を縮小させる GM - CSF 遺伝子と協調できる遺伝子の同定を行ってきた。とくにこれらの中でケモカイン遺伝子である、TARC、RANTES の両遺伝子の GM - CSF 遺伝子との協調効果をマウス *in vivo* で証明した。これらの遺伝子は GM - CSF 免疫遺伝子治療増強遺伝子として今後組み合わせが可能であると考えられた。

c. GM-CSF を用いた遺伝子治療のマウスモデルに他療法を組み合わせた前臨床研究

癌の遺伝子治療において、腫瘍細胞に GM-CSF を導入し放射線を照射したワクチン細胞療法による抗腫瘍効果が認められ臨床応用が開始されている。今後は遺伝子治療のみならず、抗癌剤、各種免疫療法やミニ移植を含めた複合的な治療法が癌治療により有効であろうと考えられている。我々はマウスモデルを使用し、この複合的な治療法の確立のための前臨床研究を行ってきた。

d. GM-CSF 遺伝子治療で誘導される腫瘍抗原タンパク質を認識する抗体の解析

GM-CSF 遺伝子治療臨床研究において、患者血清中に腫瘍タンパク質と反応する抗体が、治療によって誘導されることが明らかにされている。このような抗体が反応する腫瘍抗原を単離するために、腎癌の発現ライブラリーを作成し、治療後患者血清でスクリーニングした結果、いくつかの抗原が候補として挙げられている。

e. 新規ウイルスベクターによる遺伝子導入法の確立

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る。

B. 血液疾患に対する遺伝子治療法開発研究

a. VSV-G シュードレンチウイルスベクターを用いたヒト造血幹細胞への遺伝子導入法の開発

ヒト造血幹細胞や初代白血病細胞への遺伝子導入は現行の遺伝子導入ベクターでは極めて困難である。我々は Verma 博士らが開発した VSV-G シュードレンチウイルスベクターを元にヒト造血幹細胞への遺伝子導入法を開発してきたが、本ベクターを改良することでヒト造血幹細胞や初代白血病細胞へほぼ 100% の効率で GFP(green fluorescent protein)遺伝子を導入することに成功した。本成果はヒト造血幹細胞を対象として、遺伝子治療法の開発にとって極めて重要な意味を持つものと考えている。

b. マキシザイムを用いたフィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病遺伝子治療法の開発

フィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病は白血病の中でも特に予後が悪い疾患であり、新規治療法の導入が必要であると考えられる。我々はリボザイムの進化型であるマキシザイムの開発を東大工学部・多比良教授らとの共同研究として行なってきた。今回フィラデルフィア陽性急性リンパ性白血病を標的としたマキシザイムを作製し、VSV-G シュードレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、白血病細胞にアポトーシスを誘導することができた。本研究は次世代の白血病にたいする標的遺伝子治療として期待が持てる。

c. PNH 遺伝子治療に関する研究

我々は PNH 遺伝子治療法開発を目的として、その原因遺伝子である PIG-A 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを作製し、PIG-A 欠損 K562 細胞に導入したところ、その表現型回復に成功した。今後は PNH 患者の骨髓細胞(造血幹細胞)に PIG-A 遺伝子を導入し、PIG-A 遺伝子の機能回復の可能性について検討する予定である。

C. 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、embryoid body (EB) formation およびストローマ細胞との共培養により、種々の血液細胞(赤芽球、顆粒球、単球、巨

核球、破骨細胞など)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率し、再生医療における ES 細胞の有効性及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

本邦において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 細胞樹立を試みて、困難であったコモンマーモセット受精卵採取の効率化に最近成功した。

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、これまでに bcr-abl 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを用いて、血液細胞株およびマーモセット骨髄細胞への遺伝子導入に成功した。今後は 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製する予定である。

D. ノックアウトマウスを用いた免疫関連分子の解析

a. CD30L ノックアウトマウスにおけるフェノタイプの解析

1. 肝臓、脾臓、リンパ節および腹腔内リンパ球における免疫担当細胞の構成をフローサイトメーターで解析した。
2. *Listeria monocytogenes* を腹腔内に投与して、感染前後における免疫担当細胞の変化を解析した。

b. CD30L と CD40L のダブルノックアウトマウスにおけるフェノタイプの解析

1. ダブルノックアウトマウス(CD3040DKO)とコントロールマウスについて経時的な体重の変化を測定した。
2. 特徴ある肺病変について病理学的に解析した。
3. 特徴ある肺病変について電子顕微鏡にて解析した。

E. 胎生期マウス脳組織内環状 DNA の意義

- a. 胎生期マウス脳組織内環状 DNA を抽出、解析して胎生 16 日前後に DNA 組み換えを起こすと考えられるゲノム領域をマウス染色体 16 番上に同定した。今後、この DNA 組み換えを起こす細胞群の同定をすすめる予定である。

症例報告

a. 中山 雅晴、酒井 健二、簗田 俊二

「再出血予防に内視鏡的クリップ結紮術が有効と思われた大腸憩室出血の 3 例」

消化器内視鏡 (2003, in press)

内視鏡的クリップ結紮術は大腸憩室出血に対して有効な治療法である。我々は、さらに近傍にある憩室に対してもクリップ結紮術を追加することで短期的な再出血を予防できる可能性があると思われた3例を経験したため報告した。

- b. 松坂浩史、板場壮一、本村廉明、牟田浩実、前田豊樹、千々岩芳春、末広陽子、西村純二、吉河康二 . 2002.

骨盤部放射線照射、回盲部切除後に巨赤芽球性貧血を来呈した一例 .

内科 . 第 8 9 卷、 第 2 号、374-377.

子宮頸癌術後放射線照射による放射線腸炎で回盲部一部切除後7年を経て発症した巨赤芽球性貧血を認めた例を報告し、回盲部の短切除であっても骨盤部放射線照射を行う場合、ビタミン B 1 2 欠乏による巨赤芽球性貧血に注意して長期の経過観察をする必要性を示した .

- c. 鈴木康代、吉川康二、前田豊樹、岡田全司、鈴木友和 . 2002.

アスペルギルスによる頭蓋内動脈炎の1剖検例 .

大分県医学会雑誌 . 第 2 0 卷、 1 号、 3 2 - 3 5 .

62 歳糖尿病患者でアスペルギルス副鼻腔炎から髄膜脳炎を来し死亡した症例を報告し、compromised host の副鼻腔炎に続発する神経症状に対してアスペルギルス感染症を念頭に置くよう警鐘を鳴らした .

業績目録

原著論文

1. Kawasaki C, Ohshima K, Muta H, Muta K, Deyev V, Podack ER, Kikuchi M. 2002.
Prognostic value of Bcl 10 rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma.
Leuk Lymphoma. 43(4), 823-826.
2. Ooi, J., Iseki, T., Ito, K., Mori, Y., Sato, H., Takahashi, T., Ishii, N., Tomonari, A., Tojo, A., Tani, K., Asano, S. 2002.
Successful unrelated cord blood transplantation for relapse after autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma.
Leuk Lymphoma. 43, 653-655.
3. Nagayama, H., Misawa, K., Tanaka, H., Ooi, J., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Yamada, Y., Kodo, H., Takahashi, TA., Yamashita, N., Shimazaki, S. and Asano, S. 2002.
Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim.
Bone Marrow Transplantation. 29, 197-204.
4. Duda, DG., Sunamura, M., Lozonschi, L., Yokoyama, T., Yatsuoka, T., Motoi, F., Horii, A., Tani, K., Asano, S., Nakamura, Y., Matsuno, S. 2002.
Overexpression of the p53-inducible brain-specific angiogenesis inhibitor 1 suppresses efficiently tumor angiogenesis.
Br. J. Cancer. 86, 490-496.
5. Ohata, J., Sakurai, J., Saito, K., Tani, K., Asano, S., Azuma, M. 2002.

Differential graft-versus-leukemia effect by CD28 and CD40 costimulatory blockade after graft versus-host disease prophylaxis.
Clin Exp Immunol. 129, 61-68.

6. Tani, K. 2002.
Immunotherapy using GM-CSF gene for metastatic renal cell cancer.
International Symposium:
Cancer Gene Therapy. 213-223, (Eds) Ochiai, T., Matsubara, H.
7. Kawai, K., Tani, K., Yamashita, N., Tomikawa, S., Eriguchi, M., Fujime, M., Okumura, K., Kakizoe, T., Clift, S., Ando, D., Mulligan, R., Yamauchi, A., Noguchi, M., Asano, S. and Akaza, H. 2002
Advanced renal cell carcinoma treated with granulocytemacrophage colony-stimulating factor gene therapy: A clinical course of the first Japanese experience.
Int. Journal of Urology. 9, 462-466.
8. Tomonari, A., Shirafuji, N., Iseki, T., Ooi, J., Nagayama, H., Masunaga, A., Tojo, A., Tani, K. and Asano, S. 2002.
Acquired pulmonary alveolar proteinosis after umbilical cord blood transplantation for acute myeloid leukemia.
American Journal of Hematology. 70, 154-157.
9. Nagayama, H., Ooi, J., Tomonari, A., Iseki, T., Tojo, A., Tani, K., Takahashi, T.A. and Asano, S. 2002.
Severe immune dysfunction after lethal neutron irradiation in a JCO nuclear facility accident victim.
Int. Journal of Hematology. 76, 157-164.
10. Podack ER, Strbo N, Sotosec V, Muta H. 2002.
CD30-governor of memory T cells?
Ann N Y Acad Sci. 975, 101-13.
11. Asada-Senju, M., Maeda, T., Sakata T., Hayashi, A. and Suzuki T. 2002.
Molecular analysis of the transferrin gene in a patient with hereditary hypotransferrinemia.
J. Hum. Genet. 47, 355-359.
12. Bai Y., Soda Y., Izawa K., Tanabe T., Kang X., Tojo A., Hoshino H., Miyoshi H., Asano S. and Tani K. 2003.
Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector.
Gene Therapy. (in press)
13. Kojima, T., Yamazaki, T., Tamura, Y., Ogura, S., Hizawa, N., Yamaguchi, E., Tani, K., Kinoshita, I., Nishimura, M. and Dosaka-Akita, H. 2003.
Tumor-Derived Gp96 Combined with GM-CSF Gene-Transduced Tumor Cells Inhibit Tumor Growth in Mice through Migration and Maturation of CD11c+ Cells.
Human Gene Therapy. (in press)
14. Yoshida Y., Nakamura T., Komoda M., Sato H., Suzuki T., Tsuzuku J.K., Miyasaka T., Yoshida E.H., Umemori H., Kunisaki R.K., Tani K., Ishii S., Mori S., Suganuma M., Noda T. and Yamamoto T. 2003.
Mice lacking a transcriptional corepressor Tob are predisposed to cancer
Genes&Development. 17, 1201-1206.
15. 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. and Asano S. 2003(submitted)

A novel Maxizyme vector targeting a *bcr-abl* fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.

16. Nagayama H., Sato K., Morishita M., Uchimaru K., Inazawa T., Yamasaki T., Enomoto M., Nakaoka T., Nakamura T., Maekawa T., Oyaizu N., Yamamoto A., Shimada S., Saida T., Kawakami Y., Tani K., Asano S., Takahashi T-A., Yamashita N. (Submitted)
Phase I clinical trial of immunotherapy with tumor lysate-pulsed monocyte-derived dendritic cells plus IL-2 in stage IV malignant melanoma patients.
Bone Marrow Transplantation.

総説

1. 谷 憲三郎. 2002.
GM-CSF 遺伝子治療の経験から.
実験医学、20、852-856.
2. 谷 憲三郎. 2002.
マキシザイムとその利用.
血液・免疫・腫瘍、7、17-22.
3. 谷 憲三郎. 2002.
がんの遺伝子治療の現状.
ファルマシア、38、413-416.
4. 谷 憲三郎. 2002.
マキシザイムを用いた白血病遺伝子治療法の開発.
医学のあゆみ、205、390-397.
5. 谷 憲三郎、浅野茂隆. 2002.
腎癌に対する免疫遺伝子治療臨床研究の現状.
医学のあゆみ、203、307-312.
6. 谷 憲三郎. 2002.
腎癌の免疫遺伝子治療臨床研究.
SRL 宝函、26、130-134.
7. 曾田 泰、白 元松、田辺 剛、三好浩之、多比良和誠、浅野茂隆、
谷 憲三郎. 2002.
新たな白血病治療法の開発：新規リボザイムであるマキシザイムの利用
臨床血液、43、973-981.
8. 谷 憲三郎. 2003.
遺伝子治療と細胞療法.
最新医学、58、64-75.

著書

1. 前田豊樹、谷 憲三郎. 2003.

学会発表

1. Tani K., Nakazaki Y., Hase H., Takahashi K., Monna M., Komine F., Kitamura R., Machida U., Ohata J., Soda Y., Watari K., Oyaizu N., Satoh N., Tojo A., Yamashita N., Maekawa T., Eriguchi M., Tomikawa S., Hanazawa K., Wakumoto Y., Kawai K., Azuma M., Hamada H., Okumura K., Kakizoe T., Akaza H., Fujime M., Mulligan R., Clift S., Ando D., Sherwin S. and Asano S. (2002.2.)
Clinical Studies of Immunogene Therapy Using Autologous GM-CSF Transduced Tumor Vaccines(GVAX) for Stage IV Renal Cell Cancer: Progress Report
The 5 US-Japan Gene Therapy Conference, Maryland.
2. 坂本 理笑子、牟田 浩実、小寺 隆元、千住 猛士、松坂 浩史、板場 壮一、前田 豊樹、千々岩 芳春、谷 憲三朗、吉河 康二、生山 祥一郎、畠中 正光、(2002.5.25)
特徴的画像所見を呈した結核性腹膜炎の一例
第 257 会日本内科学会九州地方会、北九州市.
3. Tani K. (2002.6.6)
Application of Chemokines in Immunotherapy.
The 5th Annual meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston.
4. Soda Y., Tani K., Bai Y., Takata I., Kuwabara Tl., Warashina M., Tanabe T., Saiki M., Chen M., Li X., Miyoshi H., Sugita K., Nakazawa S., Tojo A., Taira K., Asano S. (2002.7.19)
Death of Ph1-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia Cells with Transduction of Maxizyne Targeting Minor Bcr-Abl Fusion Gene Using a Third-Generation Lentiviral Vector System.
第 8 回日本遺伝子治療学会、東京.
5. Bai Y., Soda Y., Tani K., Saiki M., Nakazaki Y., Li X., Chen M., Izawa K., Sasaki E. Nishioka C., Oiwa M., Takahashi K., Tojo Al., Miyoshi H., Katagiri T., Takahashi T., Nakamura Y., Asano S. (2002.7.19)
Influence of Gene Transduction with a Third-Generation Selfinactivating Lentiviral Vector to the Gene Expression of Human CD34-Positive Hematopoietic Cells.
第 8 回日本遺伝子治療学会、東京.
6. Oyaizu N., Tani K., Nakazaki Y., Hase H., Takahashi K., Monma M., Ohata J., Watari K., Satoh N., Tojo A., Yamashita N., Maekawa T., Eriguchi M., Tomikawa S., Hanazawa K., Wakumoto Y, Kawai K., Azuma M., Kakizoe t., Okumura K., Akaza H., Fujime M., Mulligan R., Clift S., Ando D., Sherwin S., Asano S. (2002.7.20)
Immunohistochemical Determination of Anti-Renal Cell Carcinoma Immunity
Elicited by GM-CSF Gene Transduced Lethally Irradiated Autologous Tumor Cell Vaccine(GVAX).
第 8 回日本遺伝子治療学会、東京.
7. Li X., Tani K., Soda Y., Bai Y., Saiki M., Sasaki E., Izawa K., Nakazaki Y., Miyoshi H., Tojo A., Asano S. (2002.7.20)
Development of Gene Therapy Targeting Neutrophil Disorders Using Gene-Modified Neutrophils.
第 8 回日本遺伝子治療学会、東京.
8. Tani K. (2002.8.26)
Case reports on clinical studies of Immunogene Therapy using

autologous GM-CSF transduced tumor vaccines(GVAX) for stage IV renal cell cancer.

The 29th World Congress of the International Society of Hematology, Seoul.

9. 中村能久、吉田富、佐藤均、国崎玲子、谷憲三朗、森茂郎、野田哲生、山本雅. (2002.10.2)
新規癌抑制遺伝子候補 tob 遺伝子欠損マウスにおける染色体異常と腫瘍発生.
第61回日本癌学会総会、東京.
10. 谷憲三朗. (2002.10.18)
遺伝子解析の臨床的意義.
第40回日本癌治療学会、東京.
11. Tani K. (2002.12.8)
演題名なし。
The 44th annual meeting of the American Society of Hematology, Philadelphia.
12. 別府良人、長谷英徳、中崎有恒、谷憲三朗. (2002.12.11)
GM-CSF 遺伝子導入抗腫瘍動物モデルで形成された腫瘍の SAGE による遺伝子解析で発現増強していた chemokine の抗腫瘍効果における役割.
第25回日本分子生物学会年会、横浜.
13. Tani K. (2003.2.14)
Development of Novel Molecular Therapy Targeting Philadelphia Positive Acute Lymphocytic Leukemia.
NCI-JSPS Conference Program, Maui.

ゲノム創薬・治療学分野

Division of Molecular and Cell Therapeutics

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14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、松田貴雄のスタッフのほかに、上岡陽亮、近藤晴彦、上木原哲也の各医員、浅野間和夫、一戸昌元の大学院生、学外留学生の高橋晃で教室を構成した。

A. 活性化型 K-Ras を介する造腫瘍能獲得機構における Estrogen Receptor α の役割の解明と分子標的治療への応用 (加藤聖子、高橋晃、上岡陽亮、上木原哲也、有馬隆博、和氣徳夫)

【目的】

活性化型 K-Ras により造腫瘍能を獲得した NIH3T3 細胞をモデルに、発癌に重要なシグナル伝達を明らかにし、子宮体癌、卵巣癌の分子標的治療への応用を試みた。

【方法】

- 1) 活性化型 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、細胞増殖能を解析した。
- 2) 各蛋白の発現をウエスタンブロット法で、ER, p53 転写活性をルシフェラーゼアッセイで解析した。
- 3) 野生型 p53 を発現する子宮体癌 (Hec6, HHUA), 卵巣癌細胞株 (PA-1, KF) の ER 機能を MEK 阻害剤 (AF-1 機能を阻害), 抗エストロゲン剤 (AF-2 機能を阻害) で抑制し増殖能, mdm2 の発現量を解析した。

【成績】

- 1) 造腫瘍能を獲得した K12V 細胞は ER α の機能が亢進していた。K12VDNER 細胞では造腫瘍能は消失し p53 依存性, p21 依存性, p16 非依存性の細胞老化が誘導された。
- 2) K12V 細胞では mdm2 の発現, MDM2 と p53 との結合は mock 細胞に比べ亢進していたが, DNER の発現によりこの亢進は抑制された。
- 3) 子宮体癌, 卵巣癌細胞株に MEK 阻害剤と抗エストロゲン剤を投与すると増殖能はそれぞれの単独投与では有意差がなかった細胞株も, 同時投与では著明に抑制された。この時 p14ARF の発現が欠失した細胞株で mdm2 の発現抑制がみられた。

【結論】

- 1) Ras を介する造腫瘍能獲得機構に, ER による mdm2 発現増加及び p53-MDM2 結合亢進を介した p53 機能の抑制が関与することが示された。
- 2) 癌細胞の増殖能抑制には ER の AF-1, AF-2 機能の両方の阻害が必要であった。
- 3) ER-mdm2 経路の抑制は p14ARF の発現が欠失した癌細胞の治療の標的になることが示唆された。

B . cAMP による Progesterone Receptor B の発現制御と癌治療への応用 (高橋 晃 , 加藤 聖子 , 上岡陽亮 , 上木原哲也 , 有馬隆博 , 和氣徳夫)

【目的】

子宮体癌細胞においては Progesterone Receptor B (PRB) の発現低下が報告され , 発癌機構や治療効果との関連が示唆されている . そこで正常子宮内膜 , 子宮体癌細胞株及び卵巣癌細胞株を用いて , PRB の発現制御に関与するシグナル伝達を解析し , 治療への応用を検討した .

【方法】

- 1) 患者の同意を得て , 手術時採取した子宮内膜を初代培養した細胞 , 子宮体癌細胞株 (HHUA , SNGM) , 卵巣癌細胞株 (SKOV , KM , MCAS) を用いた .
- 2) PR を誘導する報告のある cAMP で刺激した際の PRB , p27 , サイクリン D , サイクリン E の発現変化をウエスタンブロット法及び RT-PCR 法を用いて比較検討した .
- 3) cAMP 刺激時の細胞増殖能及び細胞周期調節を非刺激時と比較検討した .

【成績】

- 1) 正常子宮内膜において , 腺上皮 , 間質細胞共に cAMP 添加により PRB の発現が誘導された .
- 2) 解析した子宮体癌 , 卵巣癌細胞株全例で cAMP 刺激により PRB , p27 の発現増加とサイクリン D の発現減少が認められた .
- 3) 上記全ての細胞株において , cAMP 添加により細胞増殖能は有意に抑制された . さらに HHUA , SNGM において G1 期への集積が認められた .

【結論】

- 1) 子宮体癌及び卵巣癌細胞の細胞増殖能の制御に cAMP→PR→p27→cyclinD1 のシグナル伝達路が関与していることが示された .
- 2) cAMP による PRB の誘導が細胞増殖を負に制御し , 癌治療に応用できる可能性が示唆された .

C . ORF12 遺伝子の子宮内膜癌老化誘導能の検討 (加藤秀則 , 浅野間和夫 , 近藤晴彦 , 松田 貴雄 , 和氣徳夫)

【目的】

我々は , 子宮内膜癌一番染色体長腕の共通欠失部位より内膜癌抑制遺伝子候補として ORF12 を同定した . この遺伝子が内膜癌抑制遺伝子たり得るか否かについて検討した .

【方法】

- 1) 子宮内膜癌 7 株については RT-PCR で , 症例はゲノム PCR で ORF12 を増幅しシーケンサーにて塩基配列を検討した .
- 2) ORF12 発現ベクターを内膜癌細胞株 HHUA および Ishikawa に導入し , a) 増殖能 , 形態の変化 , b) テロメア活性の変化 , c) 細胞死に関与する p16 , p21 , p53 遺伝子の発現変化について検討した .

【成績】

1) 子宮内膜癌 7 株のうち 1 株は、発現の消失があり他の 1 株では塩基の欠失がみられ、残り 5 株中 4 株でアミノ酸変異を伴う塩基置換が観察された。1 番染色体長腕に LOH が観察された 10 例の検討では 3 例で、ORF12 遺伝子エクソン 1 - 3 の欠損が観察され他の 7 例にも塩基変異が観察された。

2) ORF12 導入 HHUA および Ishikawa クローンでは、a) 細胞が平坦化した多核細胞が多数出現し、老化死のマーカーである β -gal 染色が陽性で、b) テロメア活性は親株に比して抑制され、c) p16, p53 遺伝子の発現変化はなく、p21 の変化も一定の傾向は見られなかった。

【結論】

内膜癌の 40% 程度に 1q42 の欠失が観察されるが、そのほとんどが ORF12 の遺伝子変異をもつと考えられること、この遺伝子を内膜癌細胞に導入すると細胞老化を誘導することより、ORF12 は内膜癌抑制遺伝子のひとつと考えられた。細胞老化に關与する p16, p21, p53 の発現変化は起こらないため、これら遺伝子の下流で細胞老化誘導に働くことも示唆された。

D. サイクリン D サブタイプの内膜癌化に伴う発現変化と分子標的治療への基礎的検討(加藤秀則, 近藤晴彦, 浅野間和夫, 松田貴雄, 和気徳夫)

【目的】

細胞周期の G1→S 移行に不可欠な分子であるサイクリン D1, D2, D3 の正常子宮内膜と内膜癌での発現パターンを比較する。癌に特徴的な変化があればこれを利用して癌細胞の増殖を阻害できるか否かを検討する。

【方法】

1) 正常子宮内膜増殖期 6 例, 分泌期 6 例, 内膜癌細胞株 5 株, 内膜癌標本 28 例を対象とした RNA, 蛋白を抽出し, RT-PCR とウエスタンブロットを行い発現を解析した。

2) サイクリン D 阻害剤である 7-hydroxy coumarin を内膜癌細胞株 HHUA に添加し細胞増殖の変化を FACS にて解析した。

3) サイクリン D1 を選択的に阻害する目的で siRNA を合成し, 内膜癌細胞株 HHUA と対照の癌細胞株 SKOV, ME180 に添加し細胞増殖の変化を同様に解析した。

【成績】

1) 卵巣癌, 頸癌細胞株ではサイクリンのサブタイプの発現変化に一定の傾向はみられなかった。内膜癌細胞株, 内膜癌症例では D1 の発現が強くみられ, D2 の発現が消失しているものがほとんどであった。D3 は全例で発現していなかった。

2) 一方, 正常子宮内膜では増殖期, 分泌期とも全例 D1, D2 の双方を発現していた。D3 の発現はみられなかった。

3) D1 のみ発現する内膜癌細胞株 HHUA に 7-hydroxycoumarin を添加したところ 1 日目で G1 期の細胞が 49.8% から 63.2% に増加し, 3 日目では subG1 期が 89.4% と多くの細胞で細胞死が観察された。

4) HHUA に D1Si を添加したところ 7-hydroxycoumarin 添加と同様な変化と細胞死が観察されたが D2 では基本的に変化はなかった。対照の SKOV, ME180 (D1, D2 とも発現している) ではそれぞれ

れの Si 単独では変化がみられなかった。

【結論】

- 1) 内膜癌に伴いサイクリンの発現パターンが D1 に特異的に変移する。内膜癌では全例でみられたことより、内膜癌の発癌機構に連動した特徴的变化であることが示唆された。
- 2) 内膜癌で唯一発現しているサイクリン D1 の発現を阻害すると細胞は G1 に集積しやがて apoptosis へ向かった。他のサイクリンサブタイプを発現する細胞では変化が見られなかった。
- 3) D1 ノックアウトマウスが正常に発育するとの報告と今回の我々の検討より、子宮内膜癌に対するゲノム創薬に D1 を標的とするものの有用性が示唆された。

E. 胞状奇胎発生に関与する遺伝子群 (加藤秀則, 近藤晴彦, 浅野間和夫, 松田貴雄, 和氣徳夫)

【目的】

胞状奇胎は精子のみの雄核発生から成り立ち, 正常受精胚と異なり胎児部分を有さず水腫化した絨毛組織のみからなり立つ。この発生機構を解明することは正常胎盤の発生機構を解明する一助となり, また母親刷り込み遺伝子の機能を考える上にも役立つ。

【方法】

正常胎盤絨毛と胞状奇胎絨毛より RNA を抽出し Cy3, Cy5 でラベルした後, Incyte 社製マイクロアレイスライドを用いて発現プロファイルを検討した。

【成績】

- 1) 胞状奇胎絨毛で特徴的に発現の消失しているものは IGFBP, TSSC3, LIM/homeogene などであった。母親刷り込み遺伝子は理論的には全て発現がないはずであったが, 消失していたのは TSSC3 のみであった。
- 2) 一方, 胞状奇胎絨毛で特徴的に発現の上昇しているものは GRO2, CTGA1 などの癌関連遺伝子であった。
- 3) 細胞骨格蛋白もあるものは有為に発現低下し, またあるものは上昇していた。

【結論】

これらの変化は絨毛の旺盛な増殖と水腫化を起こす胞状奇胎の病理学的特徴の背景となるものと考えられた。またインプリント遺伝子の発現は正常絨毛とは異なった制御が行われている可能性が示唆された。

F. ゲノムインプリント機構の解明について (有馬隆博, 上木原哲也, 加藤聖子, 和氣徳夫)

ゲノムインプリントは, DNA やクロマチンの修飾や高次構造の変化に基づくエピジェネティックな現象と考えられている。また, 個体発生過程や出生直後にインプリントが破綻すると, 種々の先天異常や悪性腫瘍が生ずることも報告されている。

- 1) 新生児一過性糖尿病 (TNDM) の遺伝的病因として 6 番染色体長腕 (6q24) の父親からの片親性ダイソミーとの関連性に注目し, 我々はこの領域がゲノムインプリントを受けていることを報告

し、この疾患の候補遺伝子であることを示した。今回この領域のインプリント機構の解明とこの疾患の発症機構に関し、詳細な検討を行うことを目的とする。また、モデルマウスの作成を行い、疾患の病態メカニズムの解析と治療法の確立を研究目的とする。

微小インプリントセンターに直接結合する蛋白質の同定はインプリント全般における機構の解明に重要である。また、最近複数の転写因子がメチル化 DNA と複合体を作ることが報告されている。そこでマウス生殖細胞を用い、どの転写因子を介しどの様な経路で遺伝子発現調節をしているかを明らかにする。

2) 前述のヒト染色体 6q24 は種々の悪性腫瘍において LOH の頻度が高いことが報告されている。この領域内に存在する ZAC 遺伝子は癌抑制遺伝子として機能することが報告されている。また、G1 arrest 及びアポトーシスを誘導する転写因子で、我々はこの遺伝子がインプリント遺伝子であることを報告した。ZAC は p53 と類似の生物学的特徴を有することから、そのシグナル伝達経路について解析している。また、CDK インヒビターの 1 つでインプリントを受ける Kip2 も ZAC 同様癌抑制遺伝子である。さらに Kip2 は Lit1 (インプリント遺伝子) により発現調節を受けている。これらの遺伝子間シグナル伝達経路について、卵巣癌細胞を用い検討している。

3) インプリントを受ける遺伝子のほとんどは胎盤発生過程で発現する。胎盤形成はゲノムインプリントの役割を知る上で重要である。実際にいくつかのインプリント遺伝子の KO mouse では胎盤形成不全などの異常も報告されている。我々はマウス胎盤幹細胞 (TS 細胞) を用い、胎盤の分化に伴うインプリント遺伝子の発現様式の変化について解析している。また、ヒト胎盤幹細胞の樹立も手がけている。

G . HTF12 スプライシング変異遺伝子の絨毛癌細胞増殖抑制効果の検討 (松田貴雄、浅野間和夫、近藤晴彦、加藤秀則、和氣徳夫)

【目的】

7q11.21 領域に存在する HTF12 遺伝子は絨毛癌細胞株に導入するとその増殖を抑制する。この遺伝子はクルツペル関連ボックスと Zn フィンガードメインを有する ZNF 遺伝子ファミリーに属する。選択的スプライシングによって 3 つのサイズの mRNA が存在するが、正常絨毛細胞で発現している mRNA (HTF12-1) と癌細胞に導入して効果のある mRNA (HTF12-2) が異なるため、この 3 つの mRNA の作用の相違について検討した。

【方法】

5RACE 法を用いて 3 種類の異なる遺伝子上流領域のフラグメントを得てこれをプローブにして cDNA ライブラリーよりスプライシング変異 (HTF12-1, 2, 3) を得た。これらをそれぞれ絨毛癌細胞株 CC1 に導入してその増殖に対する効果を検討した。得られたプロモーター領域の配列を転写因子データベースで検索を行った。

【成績】

- 1) HTF12-1, 2, 3 は導入によっていずれも絨毛癌増殖抑制効果が認められた。
- 2) HTF12-1, 2, 3 のプロモーターはそれぞれ配列が異なった。
- 3) CC1 細胞に分化を誘導するフォルスコリンを添加すると同様の細胞形態の変化が認められるが、

HTF12-2 の発現は認められなかった。

【結論】

HTF12-2 は絨毛の合胞体化を促進するフォルスコリンによって発現が増加するが、その作用とは異なる作用で絨毛癌細胞の増殖を抑制する事が示唆された。選択的スプライシングで Zn フィンガードメインの数が異なるが、絨毛癌細胞の増殖抑制には関係しないと考えられた。

H .Matrix metalloproteinase (MMP) の活性化における ras を介するシグナル伝達経路の関与 (上岡陽亮, 加藤聖子, 高橋晃, 上木原哲也, 有馬隆博, 和氣徳夫)

【目的】

癌細胞の浸潤・転移に Matrix metalloproteinase(MMP)の活性化が深く関わる事が知られている。我々は MMP の活性化における ras を介するシグナル伝達経路の関与について検討した。

【方法】

- 1) 卵巣癌細胞株 SKOV を肝細胞増殖因子(HGF)で刺激し, Gelatin zymography で MMP2, 9 の活性を解析した。また ras dominant negative(ras DN) を発現するアデノウイルスを感染させ, Ras の関与を解析した。
- 2) 活性型 K, H-ras をマウス線維芽細胞 NIH3T3, ラット子宮内膜細胞 RENT-4 に形質導入して MMP2, 9 の活性を解析した。
- 3) MEK, PI3K 阻害剤を SKOV 細胞, RENT-4 細胞に添加して MMP2, 9 活性と細胞浸潤能への影響を検討した。
- 4) 活性型 Raf, Ral-GDS, PI3K を発現するレトロウイルスを NIH3T3 細胞に感染させ, MMP2, 9 活性への影響を検討した。
- 5) 活性型および dominant negative 型 rhoA を SKOV 細胞に形質導入し, MMP2, 9 活性と細胞運動能・浸潤能への影響を検討した。

【成績】

- 1) SKOV 細胞で HGF 刺激により MMP2, 9 活性の亢進がみられたが, ras DN の発現に伴い活性化が消失した。
- 2) 活性型 ras の形質導入により MMP2 の活性化がみられた。
- 3) MMP2 の活性化は PI3K 阻害剤で顕著に, MEK 阻害剤で部分的に抑制された。浸潤能は PI3K 阻害剤で顕著に抑制された。
- 4) PI3K の活性化により MMP2 の顕著な活性化と MMP9 の活性化が, Raf, Ral-GDS の活性化により MMP2 の活性化がみられた。
- 5) 活性型, dominant negative 型 rhoA の発現により細胞運動能はそれぞれ亢進・抑制されたが, MMP2, 9 活性への影響はみられなかった。

【結論】

- 1) MMP2, 9 の活性化には ras が関与する。
- 2) MMP2 の活性化には Ras の下流で PI3K を介する経路が重要である。

3) rhoA の活性は MMP2, 9 の活性化に関与しない。

I. 正常子宮内膜および子宮体癌における DCC 発現の検討 (近藤晴彦, 加藤秀則, 浅野間和夫, 松田貴雄, 和気徳夫)

【目的】

癌抑制遺伝子である DCC は Netrin-1 などのリガンドと結合しアポトーシスの抑制に作用する。正常子宮内膜およびその癌化過程での DCC の関与を検討した。

【方法】

正常子宮内膜組織 20 例, 子宮体癌組織 28 例に対して, RT-PCR 法および免疫染色にて DCC 及び Netrin-1 の発現を検討した。また, DCC 及び Netrin-1 欠損している癌細胞株にこれらを導入し表現型の変化を観察した。

【成績】

1) 正常子宮内膜での DCC 発現は分泌期後期で消失する傾向を認めた。RT-PCR でも同様の発現パターンを示した。Netrin-1 は月経周期を通じてすべての正常子宮内膜で発現がみられた。Netrin-1 は子宮内膜間質でも発現が見られた。

2) 子宮体癌においては RT-PCR 28 例中 14 例で, 免疫染色で 4 例中 4 例に DCC 発現の消失を認めた。Netrin-1 はほとんどの癌で発現があり一部の癌細胞株ではその発現が消失しているものもみられた。

3) Netrin-1, DCC 両方の発現を欠損している Ishikawa, SKGIIIa 細胞に DCC を発現させるとアポトーシスが誘導された。さらに Netrin-1 を追加発現させるとこれが回避されることが明らかとなった。

【結論】

1) 正常子宮内膜の正常機能維持に DCC と Netrin-1 が関与していることが示唆され, 双方の発現のバランスにより細胞死が回避されている可能性が示唆された。

2) 子宮体癌における DCC 発現の消失から, 子宮内膜癌化あるいはその進展過程に DCC 発現の消失が関与することが示された。癌細胞は DCC の発現を消失することにより, 生存シグナルである Netrin-1 が存在しない子宮外でも増殖できる能力を合目的に獲得していることが考えられた。

J. 絨毛特異的 cDNA ライブラリーの解析 (浅野間和夫, 松田貴雄, 近藤晴彦, 加藤秀則, 和気徳夫)

【目的】

我々はヒト絨毛組織で発現を認め, 絨毛癌細胞株にて発現を認めない遺伝子群の cDNA ライブラリーを作成した。この中の各クローンについて解析を行い絨毛癌化機構に関与する遺伝子の単離を目的とする。

【方法】

- 1) 我々が作成した cDNA ライブラリーの各クローンについてノーザン・プロット・ハイブリダイゼーションを行い，胎盤特異的発現を示すものを選択した．
- 2) 胎盤特異的発現を示すものの内，機能などが知られていない 1 遺伝子 (NECC1) の発現を胎盤，胞状奇胎，絨毛癌の各組織，ヒトの各臓器について RT-PCR，ノーザン・プロットを用いて検討した．
- 3) NECC1 の全長を同定し，遺伝子座を決定した．
- 4) 絨毛癌細胞株に NECC1 を導入し，その形態，細胞増殖能，造腫瘍能の変化を検討した．
- 5) 分化マーカーを用いて遺伝子導入株の表現型を検討した．
- 6) ヒト正常絨毛組織を用いて NECC1 の発現を in-situ-hybridization で検討した．

【成績】

- 1) 絨毛特異的な発現を示す遺伝子として Hman gingiva cDNA (NECC1)，Human interferon-inducible peptide (6-16) gene，Human placental lactogen，Wilms' tumor related protein (QM)，Osteopontin が得られた．
- 2) NECC1 の発現はヒト胎盤の他，脳，肺，子宮など高発現を認め，胞状奇胎，絨毛癌組織で発現を認めなかった．
- 3) NECC1 は染色体 4q11-12 にマッピングされた．
- 4) NECC1 を絨毛癌細胞株 (Bewo) に遺伝子導入したところ細胞の形態に変化を来した．また，検討した Bewo，CC1 の 2 株において細胞増殖能は影響を受けなかったが，造腫瘍能が抑制され，復帰変異株で抑制が解除されることがわかった．
- 5) NECC1 導入株は分化マーカーとしての hPL (Human placental lactogen) の発現を獲得した．
- 6) NECC1 の発現は syncytiotrophoblast に局在し，間質や cytotrophoblast には認めなかった．

【結論】

- 1) 胎盤組織で発現するが，絨毛癌化に伴い遺伝子の欠失からその発現が認められなくなる遺伝子群を同定した．
- 2) この遺伝子群の中に絨毛癌の癌化抑制遺伝子の候補 NECC1 遺伝子を同定した．
- 3) NECC1 遺伝子は絨毛の分化機序にも関わることが in vitro，in vivo とともに示唆された．

業績目録

原著論文

1. Kato K, Horiuchi S, Takahashi T, Ueoka Y, Arima T, Matsuda T, Kato H, Nishida J, Nakabeppu Y, Wake N. 2002.
Contribution of estrogen receptors (ER α) to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation and its implication for escape from senescence by modulating the p53 pathway.
J. Biol. Chem., 277, 13, 11217-11224
2. Kato H, Terao Y, Ogawa M, Matsuda T, Arima T, Kato K, Yong Z, Wake N.

2002.

Growth-associated Gene Expression Profiles by Microarray Analysis of Trophoblast of Molar Pregnancies and Normal Villi.

International Journal of Gynecological Pathology. 21, 3, 255-260

3. Drewell RA, Arney KL, Arima T, Barton SC, Brenton JD, Surani A. 2002. Novel conserved element upstream of the H19 gene are transcribed and act as mesoderm enhancers. Development, 129, 1205-1213
4. Zhou Y, Kato H, Asanoma K, Kondo H, Arima T, Kato K, Matsuda T, Wake N. 2002. Identification of FOXC1 as a TGF- β 1 responsive gene and its involvement in negative regulation of cell growth Genomics, 80, 5, 465-472
5. Asanoma K, Matsuda T, Kondo H, Kato K, Kishino T, Niikawa N, Wake N, Kato H. 2003. NECC1, a candidate choriocarcinoma suppressor gene which encode homeodomain consensus motif. Genomics, 81, 15-25
6. Kato K and Wake N. 2003. Contribution of estrogen receptor α and progesterone receptor-B to oncogenic K-Ras-mediated NIH3T3 cell transformation. Cell and Molecular Biology of Endometrial Carcinoma : Springer-Verlag Tokyo, 207-218
7. Ueoka Y, Kato K and Wake N. 2003. Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via Ras mediated pathway. Molecular and cellular endocrinology, 202, 80-88

総説

1. 上岡陽亮, 和氣徳夫 . 2002 .
C . 産科疾患の診断・治療・管理 1 . 異常妊娠 (6) 胞状奇胎・および娩出後管理
日本産科婦人科学会専門医制度 研修コーナー 研修医のための必修知識
日本産科婦人科学会雑誌 54 , N19-24
2. 有馬隆博, 和氣徳夫 . 2002 .
インプリントの破綻と腫瘍発生-DNA メチル化と腫瘍発生 ゲノムインプリンティング④
医学のあゆみ 202 4 231-235
3. 有馬隆博 . 2002 .
新生児一過性糖尿病とゲノムインプリンティング ゲノムインプリンティング TOPICS
医学のあゆみ 202 4 252-254
4. 高橋 晃, 加藤聖子, 和氣徳夫 . 2002 .
癌遺伝子と癌抑制遺伝子
医学書院 婦人科検査マニュアル 1 . 婦人科腫瘍の検査 6 . 遺伝子診断 ,

76-80

5. 和氣徳夫 . 2002 .
婦人科癌-探索医療の現状と将来 Ⅰ. レクチャーシリーズ-どうあるべきか 21 世紀の女性医療-
日本産科婦人科学会雑誌・研修コーナー54 , 9 , N233-237
6. 浅野間和夫 , 加藤秀則 , 和氣徳夫 . 2002 .
癌遺伝子治療への臨床応用
産婦人科の実際 51 , 10 , 1407-1413
7. 加藤秀則 , 近藤晴彦 , 和氣徳夫 . 2002 .
婦人科がんのリスク因子
今月の臨床 婦人科がん健診 , 57 , 1 , 26-29

著書

1. 有馬隆博 , 和氣徳夫 . 2002 .
胎児の成長・発達-胎盤の発生 (ゲノムインプリンティングの役割)
新女性医学大系 (中山書店) 29 , 38-47
2. 浅野間和夫 , 松田貴雄 , 和氣徳夫 . 2002 .
絨毛癌の分子機構
新女性医学大系 (中山書店) 41 , 423-432
3. 上岡陽亮 , 和氣徳夫 . 印刷中 .
絨毛性疾患 : 婦人科腫瘍学
エビデンス婦人科学 (メジカルビュー社)

学会発表

1. 上岡陽亮 , 高橋 晃 , 有馬隆博 , 加藤聖子 , 和氣徳夫 (2002/1/25)
多剤耐性腹膜癌の一例
第 11 回大分婦人科悪性腫瘍研究会 , 大分
2. 和氣徳夫 (2002/3/2)
p53 安定化シグナルを応用した癌分子標的療法の開発
第 2 1 回新潟婦人科腫瘍研究会 , 新潟
3. 和氣徳夫 , 加藤聖子 , 山吉麻子 , 村上章 (2002/4/6-9)
婦人科癌-探索医療の現状と将来 (Molecular targeted therapy by using p53 stabilization signalling)
第 54 回日本産科婦人科学会学術講演会生涯研修プログラム , 東京
4. 加藤秀則 , 近藤晴彦 , 浅野間和夫 , 松田貴雄 , 和氣徳夫 (2002/4/6-9)
サイクリン D の子宮内膜癌化に伴う発現パターンの変化と癌遺伝子治療への応用の基礎的

検討

第 54 回日本産科婦人科学会学術講演会，東京

5. 加藤聖子，二宮ユミ子，高橋 晃，上岡陽亮，有馬隆博，和氣徳夫
(2002/4/6-9)
子宮内膜細胞のアポトーシス誘導における Ras 蛋白を介するシグナル伝達系の関与
第 54 回日本産科婦人科学会学術講演会，東京
6. 有馬隆博，高橋 晃，上岡陽亮，加藤聖子，和氣徳夫 (2002/4/6-9)
RLGS 法を用いたインプリント遺伝子の単離及び同定
第 54 回日本産科婦人科学会学術講演会，東京
7. 松田貴雄，浅野間和夫，近藤晴彦，周勇，加藤秀則，和氣徳夫 (2002/4/6-9)
7q11.21 領域に存在する絨毛癌抑制遺伝子の解析
第 54 回日本産科婦人科学会学術講演会，東京
8. 上岡陽亮，加藤聖子，高橋晃，有馬隆博，和氣徳夫 (2002/4/6-9)
Matrix metalloproteinase (MMP) の活性化における ras の関与
第 54 回日本産科婦人科学会学術講演会，東京
9. 高橋 晃，加藤聖子，堀内新司，上岡陽亮，有馬隆博，木下勝之，和氣徳夫 (2002/4/6-9)
子宮体癌細胞の増殖制御機構におけるプロゲステロンレセプターB(PRB)の関与
第 54 回日本産科婦人科学会学術講演会，東京
10. 浅野間和夫，松田貴雄，近藤晴彦，加藤秀則，和氣徳夫 (2002/4/6-9)
絨毛癌の癌化抑制および絨毛分化に関わる新規候補遺伝子 NECC1
第 54 回日本産科婦人科学会学術講演会，東京
11. 松田貴雄，有馬隆博，近藤晴彦，浅野間和夫，加藤秀則，和氣徳夫 (2002/4/21)
インスリン抵抗性を伴った多嚢胞性卵巣症候群患者に対する運動療法の試み
第 59 回日本不妊学会九州支部会，福岡
12. Ueoka Y, Kato K, Wake, N (2002/5/17-18)
Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via ras mediated pathway.
Vth Sapporo International Symposium on Ovarian Function, Sapporo
13. 和氣徳夫 (2002/5/26)
p53 安定化シグナルを標的としたゲノム創薬
第 113 回日本産科婦人科学会東北連合地方部会，福島
14. 加藤聖子，和氣徳夫 (2002/6/1-2)
活性化型 Ras を介する造腫瘍能獲得機構における Estrogen Receptor α の役割の解明と分子標的治療への応用
第 7 回生殖医学フォーラム，静岡
15. 浅野間和夫，松田貴雄，近藤晴彦，加藤秀則，和氣徳夫 (2002/6/1-2)
絨毛の増殖・分化に関わる新規遺伝子の単離
第 7 回生殖医学フォーラム，静岡

16. 加藤秀則，浅野間和夫，近藤晴彦，和氣徳夫 (2002/6/21-23)
プロテアーゼを用いた造脘術を行った脘欠損症の3例
第59回日本産科婦人科学会九州連合地方部会・第53回日本産婦人科医会九州ブロック会，
沖縄
17. 加藤秀則，和氣徳夫 (2002/6/27-28)
サイクリンDの子宮内膜癌化に伴う発現パターンの変化と癌遺伝子治療への応用の基礎的
検討
第6回がん分子標的治療研究会，北海道札幌市
18. 加藤聖子，和氣徳夫 (2002/6/27-28)
活性化型Rasを介する造腫瘍能獲得機構におけるEstrogen Receptor α の役割の解明と分子
標的治療への応用
第6回がん分子標的治療研究会 パネルディスカッション，北海道札幌
19. 松田貴雄，浅野間和夫，近藤晴彦，加藤秀則，和氣徳夫 (2002/8/22-23)
多嚢胞性卵巣症候群の排卵障害に対するインスリン抵抗性改善の効果
第26回日本産婦人科栄養・代謝研究会，熊本
20. Kiyoko Kato and Norio Wake (2002/8/30-31)
Contribution of estrogen receptor and progesterone receptor to cellular
transformation and its implication for application to cancer therapy of
endometrial carcinoma
第20回日本ヒト細胞学会国際シンポジウム，東京
21. 和氣徳夫 (2002/9/7-8)
p53安定化シグナルを標的としたゲノム創薬
日産婦鹿児島地方部会，鹿児島
22. 加藤聖子，和氣徳夫 (2002/9/26-27)
活性化型Rasを介する造腫瘍能獲得機構におけるEstrogen Receptor α の役割の解明と分子
標的治療への応用
日本婦人科内分泌懇話会，札幌
23. 加藤聖子，和氣徳夫 (2002/10/1-3)
活性化型Rasを介する造腫瘍能獲得機構におけるEstrogen Receptor α の役割解明とp53シ
グナル伝達系の関与
第61回日本癌学会，東京
24. 松田貴雄，浅野間和夫，和氣徳夫 (2002/10/3-4)
ドウシエンヌ型筋ジストロフィーの出生前診断〜次回着床前診断の可能性を念頭に置いた
遺伝子検査手技の選択と工夫
第47回日本不妊学会学術講演会，岐阜
25. 浅野間和夫，松田貴雄，和氣徳夫 (2002/10/3-4)
多嚢胞性卵巣症候群患者に対するインスリン抵抗性改善の試み〜薬物療法と温泉運動療法
のインスリン抵抗性改善効果の比較

第47回日本不妊学会学術講演会，岐阜

26. 松田貴雄，吉河康二（2002/10/18-20）
多型を用いたドゥシェンヌ型筋ジストロフィーの出生前遺伝子診断
第9回日本遺伝子診療学会，京都
27. 松田貴雄，浅野間和夫，近藤晴彦，加藤秀則，和氣徳夫（2002/11/21-22）
STRフラグメント解析を用いた胞状奇胎の診断システムの構築
第20回日本絨毛性疾患研究会，福岡
28. 加藤秀則，近藤晴彦，浅野間和夫，松田貴雄，和氣徳夫（2002/11/21-22）
マイクロアレイによる正常絨毛と胞状奇胎での遺伝子発現プロファイルの差異の解析
第10回日本胎盤学会学術集会，福岡
29. 和氣徳夫（2003/3/13-14）
絨毛性疾患の発生機序について
平成14年度国立遺伝学研究所研究会「エピジェネティックスの分子機構と疾患」，静岡

発生工学分野

Division of Embryonic and Genetic Engineering

発生工学分野は、平成 13 年 4 月の改組によって、旧附属発生工学実験施設から研究分野に昇格し、研究組織としての活動を開始した。また一方で感染防御研究センター発生工学実験室として、以前より行っているサービス業務として発生工学的技術供与（トランスジェニックマウスやノックアウトマウス作製）、マウス胚保存業務、マウス飼育維持の管理業務等を行っている。

発生工学分野は中山敬一教授（兼任）、中山啓子助教授、谷内一郎助手の教官を中心に研究支援推進員（1 名）、研究補助員（2 名）の体制で研究を進めており、一方感染防御研究センター発生工学実験室として、中山敬一が室長を、中山啓子が副室長を務め、さらに技術室より山田ユカリが技官として派遣されており、サービス業務を進めている。

本年度の人事異動について、2002 年 4 月 1 日付けで New York 大学より谷内一郎が助手に赴任した。また中山啓子は 2003 年 1 月 1 日付けで東北大学大学院医学研究科に転出となり、その後は非常勤職員として務めている。

A. PKC- δ ノックアウトマウスにおける自己免疫疾患の発症メカニズムの解明

プロテインキナーゼ C（以下 PKC）は細胞の増殖や分化、分泌、アポトーシス、等の多くの細胞機能に関わる細胞内シグナル伝達分子である。また PKC を活性化するホルボールエステルは有名な発がんプロモーターとして知られている。そのファミリーは、conventional PKC（cPKC： α 、 β 、 γ ）と novel PKC（nPKC： δ 、 ϵ 、 η 、 θ ）、さらに atypical PKC（aPKC： λ 、 ζ ）に大別される。cPKC は Ca^{2+} と diacylglycerol（DAG）が活性化に必要であるのに対して、nPKC では DAG のみで活性化を受け、 Ca^{2+} は活性に関与しない。また、aPKC は Ca^{2+} も DAG も活性化を引き起こさない。PKC はその構造や発現、活性調節等の点で研究が進んでおり、多くの細胞機能制御に関わっているとされるが、では多くの PKC 分子に基質特異性がどのくらいあり、各々のサブタイプにおける特異的基質はあるのか、あるとすればそれは何かという基本的な問題に対しては、未だに不明な点が多い。そこでわれわれは、ジーンターゲットングによって特定の PKC 遺伝子を破壊し、その生理的機能を明らかにすることを試みた。

PKC の多くは、何故か神経系と免疫系に発現しているものが多く、PKC- δ も同様である。の多くは細胞増殖を促進するシグナル伝達に関与することが示唆されてきたのに対し、PKC- δ だけは、細胞の増殖を停止させたり、細胞の分化や細胞死を誘導することが細胞を用いた実験から明らかとなっており、PKC の中で特異的な機能を持つと考えられていた。われわれは PKC- δ 遺伝子（17 エクソンから成る）の第 1、2 エクソンを欠損した ES 細胞を作製し、それを用いて PKC- δ ノックアウトマウスを作製した。PKC- δ ノックアウトマウスは正常に誕生・成長したが、脾臓及びリンパ節が異常に腫大していることが明らかとなった。これらの臓器よりリンパ球を調製し解析を行ったところ、B リンパ球のみが異常に増加し、T リンパ球数やその他の血球細胞の分化は正常に起こっていた。組織的には、脾臓やパイエル板の B リンパ球領域に、非刺激時の正常マウスではほとんど認められない胚中心（抗原によって B リンパ球が刺激されたときに認められる構造物）が多数認めら

れた。この PKC- δ ノックアウトマウスの B リンパ球を、B リンパ球を先天的に欠損したマウス (RAG-1 ノックアウトマウス) へ移植すると、PKC- δ ノックアウト B リンパ球は、このマウスの中でも異常な増殖を示した。このことは PKC- δ ノックアウトマウスでみられた B リンパ球の異常増殖は、B リンパ球固有の性質であり、周囲の環境要因に起因するものではないことを示している。なお、以前アポトーシス時に PKC- δ がカスパーゼによって切断されて活性化を受けるという報告があったが、PKC- δ ノックアウトマウスにおいては調べた限り、アポトーシスの感受性には変化は認められなかった。

PKC- δ ノックアウトマウスの B リンパ球を体外で培養すると、抗 IgM や LPS (リポポリサッカライド) の刺激に対して過剰な増殖反応を示す。このとき B リンパ球では IL-6 の mRNA 量、タンパク質量共に上昇していることが明らかとなった。IL-6 の転写量は主に 2 つの転写因子 NF- κ B と NF-IL-6 によってコントロールされているが、前者には特に異常はなく、後者の DNA 結合能が正常に比して亢進していることがわかった。NF-IL-6 は以前から PKC によって 240 番目のセリンがリン酸化を受けること、そのリン酸化によって DNA 結合能が低下することが知られており、われわれの結果は PKC- δ が欠損していることによって、NF-IL-6 のリン酸化が低下し、その結果として DNA 結合能が高まった結果 IL-6 の産生量が増大したものと推測される。これを裏付けるように、B 細胞株に PKC- δ を発現させると、NF-IL-6 の DNA 結合能は低下する。

PKC- δ ノックアウトマウスは、血清中の IgG1 と IgA が高値を示し、さらに加齢と共に自己抗体 (特に抗ウロマチン抗体) を産生することが明らかとなった。腎臓の糸球体では免疫グロブリンや補体の沈着が認められ、メサンギウムの増殖を伴う自己免疫性腎炎の病理像を示した (図 2 3)。また全身に リンパ球の異常な浸潤があり、これらの異常は、程度の差こそあれ IL-6 トランスジェニックマウスにおける異常 (IL-6 の過剰分泌、B リンパ球増加、血清 IgG1 高値、自己免疫性腎炎、多臓器における B リンパ球浸潤、等) にほぼ一致することから、PKC- δ が欠損していると IL-6 の異常分泌が起こり、最終的に自己免疫疾患になると考えられる。つまり正常な状態においては、PKC- δ は B リンパ球が過剰に抗原に反応しないように、IL-6 の発現量を下げることによってシグナル伝達の適正なレベルを保ち、自己免疫疾患を防ぐべく免疫系を調節している大切な制御分子であることが、これらの研究から明らかとなった。

業績目録

原著論文

1. Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K., Nakayama, K. I. 2002. Phosphorylation of p27^{Kip1} on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J. Biol. Chem.* 277, 14355-14358.
2. Miyamoto, A., Nakayama, K., Imaki, H., Hirose, S., Jiang, Y., Abe, M., Tsukiyama, T., Nagahama, H., Ohno, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. 2002. Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase C δ . *Nature* 416, 865-869.
3. Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K. I., Takahashi, R. 2002.

- CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity.
Mol. Cell 10, 55-67.
4. Masuda, T. A., Inoue, H., Sonoda, H., Mine, S., Yoshikawa, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Mori, M. 2002.
Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis.
Cancer Res. 62, 3819-3825.
 5. Chi, T. H., Wan, M., Zhao, K., Taniuchi, I., Chen, L., Littman, D. R., Crabtree, G. R. 2002.
Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes.
Nature 418, 195-199.
 6. Nakamichi, I., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. 2002.
Formation of Mallory body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18.
Mol. Biol. Cell 13, 3441-3451.
 7. Garcia-Fernandez, L. F., Losada, A., Alcaide, V., Alvarez, A. M., Cuadrado, A., Gonzalez, L., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Fernandez-Sousa, J. M., Munoz, A., Sanchez-Puelles, J. M. 2002.
Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C δ .
Oncogene 21, 7533-7544.
 8. Shimoda, K., Kamesaki, K., Numata, A., Aoki, K., Matsuda, T., Oritani, K., Tamiya, S., Kato, K., Takase, K., Imamura, R., Yamamoto, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Gondo, H., Nagafuchi, S., Nakayama, K. I., Harada, M. 2002.
Tyk2 is required for the induction and nuclear translocation of Daxx which regulates IFN- α -induced suppression of B lymphocyte formation.
J. Immunol. 169, 4707-4711.
 9. Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M. J., Bae, S. C., Komori, T., Ito, Y., Littman, D. R. 2002.
Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development.
Cell 111, 621-633.
 10. Taniuchi, I., Sunshine, M. J., Festenstein, R., Littman, D. R. 2002.
Evidence for distinct CD4 silencer functions at different stages of thymocyte differentiation.
Mol. Cell. 10, 1083-1096.
 11. Tomari, S., Nagahama, H., Shu, Y., Hoshi, S., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Nagata, M. 2002.
Glomerular differentiation in p27 and p57 double-mutant metanephroi.
Anat. Embryol. 206, 31-36.
 12. Kanayama, N., Takahashi, K., Matsuura, T., Sugimura, M., Kobayashi, T., Moniwa, N., Tomita, M., Nakayama, K. 2002.
Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice.
Mol. Hum. Reprod. 8, 1129-1135.
 13. Matsuura, T., Takahashi, K., Nakayama, K., Kobayashi, T., Choi-Miura, N. H., Tomita, M., Kanayama, N. 2002.
Increased expression of vascular endothelial growth factor in placentas of p57(Kip2) null embryos.
FEBS Lett. 532, 283-288.
 14. Shirane, M., Nakayama, K. I. 2003.
Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis.
Nature Cell Biol. 5, 28-37.

15. Seto, Y., Nakajima, H., Suto, A., Shimoda, K., Saito, Y., Nakayama, K. I., Iwamoto, I. 2003. Enhanced Th2 cell-mediated allergic inflammation in Tyk2-deficient mice. *J. Immunol.* 170, 1077-1083.
16. Kaneko, C., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Yada, M., Nakayama, K., Nakayama, K. I. 2003. Characterization of the mouse gene for the U-box-type ubiquitin ligase UFD2a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 297-304.

総説

1. 石田典子, 中山敬一. 2002.
CDK インヒビターp27^{Kip1}の分解制御と癌.
医薬ジャーナル Medical Front Line 「ユビキチン代謝系の破綻と疾病 -癌・免疫病から神経病まで-」 38, 26-33.
2. 中山敬一, 宮本顕友, 中山啓子. 2002.
Bリンパ球の増殖を抑制するシグナル伝達分子 PKC-δ.
実験医学 20, 1438-1441.
3. 中山啓子, 宮本顕友, 中山敬一. 2002.
PKC-δノックアウトマウスにおける B 細胞の過剰増殖と自己免疫疾患.
細胞工学 21, 778-779.
4. 畠山鎮次, 中山敬一. 2002.
ユビキチン・プロテアソーム系による細胞機能調節.
実験医学 (増刊)「プロテオミクス時代のタンパク質研究」 20, 2053-2067.
5. 原太一, 中山敬一. 2002.
CDK インヒビターp27^{Kip1}の分解制御と癌.
Molecular Medicine 39, 1288-1289.
6. 宮本顕友, 中山啓子, 中山敬一. 2002.
自己免疫疾患と PKC-δ.
感染・炎症・免疫 32, 302-303.
7. 宮本顕友, 中山啓子, 中山敬一. 2003.
B 細胞へのトレランス誘導と PKC-δ.
臨床免疫 39, 236-240.
8. 中山敬一, 中山啓子. 2003.
細胞周期を制御する二大ユビキチンリガーゼ: APC/C と SCF 複合体.
実験医学「次々と解明されるユビキチンの多彩な役割」 21, 358-364.
9. 高橋秀尚, 中山敬一. 2003.
ユビキチンシステムによる細胞内タンパク質分解制御 - 炎症免疫に関与する機構 -.
感染・炎症・免疫 33, 12-22.
10. 白根道子, 中山敬一. 2003.
イムノフィリン FKBP38 による Bcl-2 のミトコンドリア局在化とアポトーシス抑制.
医学のあゆみ 255, 274-275.

11. 白根道子, 中山敬一. 2003.
Bcl-2 をミトコンドリアに局在化させる分子.
実験医学 21, 494-496.
12. 白根道子, 中山敬一. 2003.
カルシニューリン阻害分子 FKBP38 による Bcl-2 のミトコンドリア局在化とアポトーシス抑制.
細胞工学 22, 308-309.
13. Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. 2003.
U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 302, 635-645.

著書

1. 松本雅記, 中山敬一. 2003.
発生工学プロテオミクス：ノックアウトマウスを利用した新時代のプロテオミクス.
実験医学 (別冊)「注目のプロテオミクスの全貌を知る！」 165-173.

学会発表

1. 中山敬一 (2002, 4/25) .
新規ユビキチンリガーゼ p140/p50 複合体による p27 の分解機構 . (シンポジウム)
CREST シンポジウム「脳を守る」, 東京 .
2. 原太一, 嘉村巧, 中山啓子, 畠山鎮次, 押川清孝, 中山敬一 (2002, 4/25) .
G0-G1 期における Skp2 非依存性 p27^{Kip1} 分解システムの解明 .
CREST シンポジウム「脳を守る」, 東京 .
3. 石田典子, 原太一, 嘉村巧, 吉田稔, 中山啓子, 中山敬一 (2002, 4/25) .
CRM1 との結合、及び核外移行に重要な CDK インヒビター-p27 の Ser10 部位のリン酸化 .
CREST シンポジウム「脳を守る」, 東京 .
4. 嘉村巧, 原太一, 松本雅記, 石田典子, 畠山鎮次, 中山啓子, 中山敬一 (2002, 4/25) .
p27 の新たな分解因子の分離精製及び解析 .
CREST シンポジウム「脳を守る」, 東京 .
5. 金子千恵, 畠山鎮次, 矢田雅佳, 中山啓子, 中山敬一 (2002, 4/25) .
マウス U-ボックス型ユビキチンリガーゼ UFD2a のゲノム DNA のクローニングとその解析 .
CREST シンポジウム「脳を守る」, 東京 .
6. 恒松良祐, 中山啓子, 西山正章, 畠山鎮次, 別所康全, 影山龍一郎, 尾池雄一, 須田年生, 中山敬一 (2002, 4/25) .
Notch シグナリングを制御するユビキチンリガーゼ Sel-10 のノックアウトマウスにおける血管形成の異常 .
CREST シンポジウム「脳を守る」, 東京 .
7. Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nakayama,

- K. I. (2002 , 5/16) .
Novel ubiquitin ligase GKL1/GKL2 regulates proteolysis of p27^{Kip1} at the G0-G1 transition .
(Invited speaker)
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle" , Cold Spring Harbor, NY .
8. Hara, T., Kamura, T., Nakayama, K., Oshikawa, K., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. (2002 , 5/16) .
Degradation of p27^{Kip1} at the G0-G1 transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway .
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle" , Cold Spring Harbor, NY .
9. Imaki, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2002 , 5/16) .
Analysis of mouse Skp2 promoter .
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle" , Cold Spring Harbor, NY .
10. Nakayama, K., Minamishima, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. (2002 , 5/16) .
Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice .
Cold Spring Harbor Symposium "The Cell Cycle" , Cold Spring Harbor, NY .
11. 中山敬一 (2002 , 5/22) .
細胞周期を制御する 2 つの F-box タンパク質のノックアウトマウスを用いた解析 .(シンポジウム)
第 55 回日本細胞生物学会大会 , 横浜 .
12. 宮本顕友, 中山敬一 (2002 , 5/28) .
PKC-delta 遺伝子欠損マウスにおける自己寛容の破綻 .(公募講演)
第 10 回東京免疫フォーラム , 東京 .
13. 中山敬一 (2002 , 7/8) .
ポリグルタミン病原因遺伝子産物の分解を制御する新たなユビキチン化因子 E4 .(シンポジウム)
第 25 回日本神経科学大会 , 東京 .
14. 中山敬一 (2002 , 9/27) .
発生工学プロテオミクス : ノックアウトマウスを利用した新時代のプロテオミクス .(シンポジウム)
機能プロテオミクス , 東京 .
15. 中山敬一 (2002 , 10/2) .
G0-G1 移行期において p27 分解を制御する新規ユビキチンリガーゼ KPC の発見 .(シンポジウム)
第 61 回日本癌学会総会 , 東京 .
16. 白根道子, 中山敬一 (2002 , 10/15) .
カルシニューリン阻害分子 FKBP38 による Bcl-2 のミトコンドリア膜移行及びアポトーシス抑制 .(シンポジウム)
第 75 回日本生化学会大会 , 京都 .

17. 今居讓, 祖田真理子, 畠山鎮次, 中山敬一, 高橋良輔 (2002 , 10/15) .
常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) と小胞体関連分解の異常 . (シンポジウム)
第 75 回日本生化学会大会 , 京都 .
18. 中山敬一 (2002 , 10/16) .
p27 の分解を制御する新規ユビキチンリガーゼ KPC の発見 . (シンポジウム) 第 75 回日本生
化学会大会 , 京都 .
19. 畠山鎮次, 松本雅記, 中山敬一 (2002 , 10/16) .
分子シャペロンと相互作用する U-ボックス型ユビキチンリガーゼ群 . (シンポジウム)
第 75 回日本生化学会大会 , 京都 .
20. Nakayama, K. I. (2002 , 11/5) .
KPC regulates proteolysis of p27 at the G0-G1 transition . (Invited speaker)
The 19th Radiation Biology Center International Symposium "Bioregulation of Radiation
Response: Crisis Control in the cell cycle" , Kyoto, Japan .
21. 中山敬一 (2002 , 11/11) .
細胞増殖のブレーキ p27 の分解調節と癌 . (招待講演)
第 1 回 JJK カンファレンス , 東京 .
22. Nakayama, K. I. (2002 , 11/27) .
Mechanisms to control degradation of polyglutamine-containing protein . (Invited
speaker)
1st International Workshop "Frontiers in Molecular Neuropathology" , Wako, Japan .
23. Taniuchi, I., Osato, M., Sunshine, M.-j., Zou, Y.-r., Egawa, T., Festenstein, R., Ito, Y.,
Littman, D. (2002 , 12/4) .
Roles of Runt-domain transcription factors, Runx3 and Runx1, in epigenetic gene
regulation . (シンポジウム)
第 32 回日本 免疫学会総会 , 東京 .
24. 宮本顕友, 中山啓子, 広瀬幸子, 大野茂男, 畠山鎮次, 中山敬一 (2002 , 12/4) .
PKC- δ 遺伝子欠損マウスにおける B 細胞の過剰増殖と自己寛容の破綻 . (ワークショップ)
第 32 回日本免疫学会総会 , 東京 .
25. Nakayama, K. I. (2002 , 12/10) .
Identification of a ubiquitin ligase, KPC, that regulates proteolysis of p27 at the G0-G1
transition . (Invited speaker)
Ubiquitin & Cancer: NCI Workshop , Rockville, MD .
26. 中山敬一 (2002 , 12/10) .
二種類の SCF 型ユビキチンリガーゼによる細胞周期制御 . (シンポジウム)
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
27. 金子千恵, 畠山鎮次, 松本雅記, 矢田雅佳, 中山啓子, 中山敬一 (2002 , 12/10) .
ポリユビキチン鎖伸長因子 E4B ノックアウトマウスの解析 .
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
28. 中山啓子, 嘉村巧, 恒松良祐, 原太一, 石田典子, 中山敬一 (2002 , 12/12) .

- 遺伝子改変マウスを用いた G0-G1 移行期制御機構の解析 . (ワークショップ)
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
29. 畠山鎮次, 松本雅記, 矢田雅佳, 山中篤志, 谷村禎一, 大島靖美, 垣塚彰, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
U-ボックス型ユビキチンリガーゼと神経変性疾患 . (ワークショップ)
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
30. 恒松良祐, 中山啓子, 西山正章, 尾池雄一, 畠山鎮次, 石田典子, 別所康全, 影山龍一郎, 須田年生, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
Notch シグナリングを制御するユビキチンリガーゼ Sel-10 のノックアウトマウスにおける血管形成の異常 . (ワークショップ)
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
31. 矢田雅佳, 畠山鎮次, 千住覚, 西村泰治, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
c-Myc の Myc box1 に結合し転写活性を抑制する UACA の同定と機能解析 .
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
32. 高橋秀尚, 畠山鎮次, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
SUMO-1 結合タンパク質としての Thymine DNA glycosylase の同定と、その SUMO-1 修飾による機能変化 .
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
33. 押川清孝, 松本雅記, 畠山鎮次, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
F-box タンパク質 FWD1 と結合する HnRNP-U のユビキチン化における役割 .
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
34. 石田典子, 原太一, 嘉村巧, 吉田稔, 中山啓子, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
CDK インヒビター p27^{Kip1} の Ser10 部位のリン酸化は G1 期の核外移行に重要である .
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
35. 白根道子, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
BH3 及び FYVE finger ドメインを有する新規タンパク質 FKAP の細胞生物学的解析 .
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
36. 奥村文彦, 畠山鎮次, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
U-ボックス型ユビキチンリガーゼ UFD2a による神経軸索誘導因子 FEZ1 の機能調節 .
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
37. 原太一, 嘉村巧, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
UBL-UBA タンパク質 KPC2 はポリユビキチン結合タンパク質である .
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
38. Fotovati, A., 中山啓子, 中山敬一 (2002 , 12/12) .
Reduced fertility due to defective germ cell production in mice deficient in Skp2 .
第 25 回日本分子生物学会年会 , 横浜 .
39. Nakayama, K. I. (2003 , 1/9) .

Two ubiquitin ligases control proteolysis of p27 .(Invited speaker)

German-Japanese Cancer Workshop on Modification of Signalling Cascades in Cancer ,
Tokyo, Japan .

40. 中山敬一 (2003 , 1/24) .

神経細胞における増殖制御機構の解明 .(シンポジウム)

CREST 終了シンポジウム「脳を守る」, 東京 .

41. 畠山鎮次, 松本雅記, 矢田雅佳, 山中篤志, 中山敬一 (2003 , 1/24) .

U-ボックス型ユビキチンリガーゼと神経変性疾患 .

CREST 終了シンポジウム「脳を守る」, 東京 .

42. 白根道子 (2003 , 1/24) .

カルシニューリン阻害分子 FKBP38 による Bcl-2 のミトコンドリア局在化 .

CREST 終了シンポジウム「脳を守る」, 東京 .

43. 松本雅記, 中山敬一 (2003 , 1/24) .

プロテオミクスによるユビキチン関連タンパク質の網羅的解析 .

CREST 終了シンポジウム「脳を守る」, 東京 .

44. 石田典子, 畠山鎮次, 中山敬一 (2003 , 1/24) .

Cyclin F と結合する Ubiquitin-domain protein (UDP)、GdX の細胞学的解析 .

CREST 終了シンポジウム「脳を守る」, 東京 .

45. 中山敬一 (2003 , 2/4) .

細胞周期ブレーキ p27 の分解機構 .(シンポジウム)

文部科学省 がん研究に係る特定領域研究 公開合同シンポジウム, 東京 .

46. 中山敬一 (2003 , 3/7) .

Two ubiquitin ligases control degradation of CDK inhibitor p27 .(シンポジウム)

第 1 回東京大学医科学研究所・九州大学生体防御医学研究所合同シンポジウム, 福岡 .