

プログラム・抄録集

第3回次世代シグナル伝達医学 グローバル COE 研究討論会

会 期:平成23年7月11日(月)~12日(火)
会 場:兵庫県立淡路夢舞台国際会議場

神戸大学グローバル COE プログラム

「次世代シグナル伝達医学の教育研究国際拠点」

-基礎・臨床医学実質融合による Clinician-Scientist の育成-

第3回 次世代シグナル伝達医学グローバル COE 研究討論会

日時:平成23年7月11日(月)～12日(火)

場所:兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 レセプションホール B(2F)

◇1日目 (7/11)

13:20～	開会の挨拶 東 健 拠点リーダー
◆13:30～ 感染症とがん WG 座長:森 康子(医学研究科 臨床ウイルス学分野 教授)	
各発表・質疑 16分	「ヘリコバクターピロリ菌の全ゲノム解析」 東 健(医学研究科 消化器内科学分野 教授)
	「転写メディエーターによる乳腺正常上皮および乳癌細胞の増殖調節」 伊藤 光宏(保健学研究科病態解析学領域 細胞機能・構造科学分野 教授)
	「ヒトヘルペスウイルス感染とその制御法の開発に向けた研究」 森 康子(医学研究科 臨床ウイルス学分野 教授)
◆14:20～ がんと神経・筋疾患 WG 座長:南 博信(医学研究科 腫瘍・血液内科学分野 教授)	
各発表・質疑 10分	「キナーゼ阻害薬の獲得耐性」 向原 徹(医学研究科 腫瘍・血液内科学分野 特命准教授)、南 博信(同 教授)
	「ゲノム DNA 損傷に対する細胞応答を制御するシグナル伝達機構」 菅澤 薫(バイオシグナル研究センター ゲノム生理学分野 教授)
	「細胞周期および転写制御における DNA 修復遺伝子の役割」 錦織 千佳子(医学研究科 皮膚科学分野 教授)
	「癌の浸潤および神経分化における Wnt5a-Ror シグナルの機能」 南 康博(医学研究科 細胞生理学分野 教授)
	「コンドロイチン硫酸による Dickkopf-1 高発現乳ガン細胞の浸潤能の制御」 北川 裕之(医学研究科 薬物動態学分野 客員教授 (神戸薬科大学))
◆特別講演 座長:東 健(拠点リーダー)	
15:10-15:50	「ナチュラルヘルパー細胞 -Th2 型の自然免疫反応にかかわる新しいリンパ球-」 小安 重夫 先生 (慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室 教授)
15:50-16:00	質疑応答
16:00-16:20	《 コーヒーブレイク 》
◆特別講演 座長:南 康博(拠点サブリーダー)	
16:20-17:00	「シグナル伝達と mRNA 代謝制御」 山本 雅 先生 (東京大学医科学研究所 癌細胞シグナル分野 教授)
17:00-17:10	質疑応答
◆特別講演 座長:清野 進(拠点サブリーダー)	
17:10-17:50	「代謝を制御するシグナル伝達における Klotho の機能」 鍋島 陽一 先生 (財団法人先端医療振興財団 先端医療センター長)
17:50-18:00	質疑応答
18:30-	《 レセプション (@ ホワイエ) 》 ※始まる前に1F 玄関前にて写真撮影をいたします。 ☆挨拶・乾杯 根木 昭 神戸大学医学研究科長
19:00-20:30	ポスター発表(自由討論形式) ※演題は P25,26. (演題番号 奇数-19:00～19:45、偶数-19:45～20:30 にそれぞれ発表をお願いします。)

◇2日目 (7/12)

◆8:30～ 感染症と代謝疾患 WG 座長:堀田 博(医学研究科 微生物学分野 教授)	
各発表質疑 12分	「C型肝炎ウイルスが酸化ストレスを介して糖新生亢進を惹起する分子機序について」 堀田 博(医学研究科 微生物学分野 教授)
	「インスリン抵抗性とインスリン分泌不全の発症におけるケモカインの関与についての検討」 小川 渉(医学研究科 糖尿病・内分泌内科学分野 准教授)
	「細胞浸潤における接着分子 AMICA の細胞内ドメインの役割」 西岡 恵理(株式会社 カン研究所 研究員)
	「SLE の病因」 塩沢 俊一(保健学研究科/医学部附属病院リウマチセンター 教授)
◆9:20～ 総合診断センターWG 座長:伊藤 智雄(医学研究科 病理診断学分野 教授)	
各発表質疑 12分	「総合診断センターの戦略」 伊藤 智雄(医学研究科 病理診断学分野 特命教授)
	「320列面検出器型 CT (Area-Detector CT) 及び MRI による新たな機能および分子イメージング法の開発」 大野 良治(医学研究科 放射線医学分野 特命准教授)
	「膵癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発」 堀 裕一(保健学研究科/医学研究科 肝胆膵外科学 准教授)
	「メタボロミクスを用いた炎症性腸疾患の病態解析」 吉田 優(医学研究科 病因病態解析学分野 准教授)
10:10-10:30	《 コーヒーブレイク 》
◆10:30～ 代謝疾患と神経・筋疾患 WG 座長:平田 健一(医学研究科 循環器内科学分野 教授)	
各発表・質疑 8分	「神経伝達物質放出における超高速小胞融合プロセス制御」 匂坂 敏朗 (医学研究科 膜動態学分野 教授)
	「Epac2 を介するインスリン分泌機構: インクレチンとスルホニル尿素薬のインタープレイ」 清野 進(医学研究科 細胞分子医学分野 教授)
	「ネクチン様分子(Nect)による血管内皮機能制御」 力武 良行 (医学研究科 シグナル伝達学分野 准教授)
	「筋・骨連関の研究の展開」 梶 博史 (近畿大学医学部再生機能医学講座 主任教授, 医学研究科 糖尿病・内分泌内科学/細胞分子医学分野 客員教授)
	「Duchenne 型筋ジストロフィーに対する低分子化合物によるエクソンスキッピング誘導治療」 竹島 泰弘 (医学研究科 小児科学分野)
	「腸管免疫修飾による制御性 T 細胞の誘導を介した動脈硬化の治療」 平田 健一 (医学研究科 循環器内科学分野 教授)
◆11:20～ 若手研究者発表 座長:力武 良行(医学研究科シグナル伝達学分野 准教授)	
11:20-11:45	「新規血管遺伝子の同定」 植村 明嘉 (医学研究科 血管生物学分野 グローバル COE 特命助教)
11:45-11:50	質疑応答
11:50-	閉会の挨拶 清野 進 拠点サブリーダー

感染症とがん WG

「ヘリコバクターピロリ菌の全ゲノム解析」

神戸大学大学院医学研究科 消化器内科学分野

東 健、吉田 優

東京大学大学院新領域創成科学研究科

メディカルゲノム専攻

小林 一三

ヘリコバクターピロリ菌は胃発がん因子であるが、ピロリ菌感染による胃発がんリスクは地域により大きく異なり、東アジアでは高く、欧米では低い。その理由の一つとして、ピロリ菌の違いが挙げられている。これまで、ピロリ菌の病原因子 CagA は、ピロリ菌感染により、ピロリ菌の 4 型分泌装置により、菌体内から感染胃粘膜上皮細胞内に注入され、上皮細胞内でチロシンリン酸化され、SHP-2 と結合することが認められ、CagA-SHP-2 複合体により、細胞内シグナル伝達系にさまざまな変化が生じ、増殖刺激作用を示すことが明らかにされてきた。また、CagA には主に、東アジア型と欧米型の 2 つの分子多型が存在し、東アジア型の CagA を有するピロリ菌感染による胃発がんリスクが高いことが認められた。

今回、日本のピロリ菌（4 株）の全ゲノムを解析し、報告されている欧米等のピロリ菌（20 株）と比較し、病態との関連を検討した。

全ゲノム解析による系統樹解析においても、東アジア株は欧米株と大きくことなり、特に、ピロリ菌の外膜蛋白遺伝子 *oipA*、*hopMN*、*babABC*、*sabAB*、*vacA-2* 等において、遺伝子変異が強く、東アジアで欧米と大きく異なっていた。また、日本株において特徴的にモリブデン酸化還元関連遺伝子が欠如していた。

以上より、ピロリ菌の宿主との相互作用に関与する遺伝子を中心として、地域における環境の適応により、ピロリ菌の遺伝子変化が生じてきていることが示唆された。

転写メディエーターは RNA ポリメラーゼ II ホロ酵素のサブ複合体であり、様々な細胞内シグナルを最終的に統合してそれらのシグナルを RNA ポリメラーゼ II コア酵素複合体に伝達する、細胞内シグナル伝達の終点である。メディエーターの約 30 個のサブユニットのうち、MED1 サブユニットは核内受容体特異的コアクチベーターとしてエストロゲン受容体 (ER α) 依存性の乳癌発生・増殖を誘導すること、一方、MED24 は MED23 および MED16 とサブモジュールを形成し MED1 のシグナルの下流に位置すること、MED24 サブモジュールはメディエーター内でシグナルを増強することにより MED1 と対照的にジェネラルな転写増強機能を持つことが知られている。乳腺特異的ノックアウトマウスは乳腺発生およびミルク産生に著しい異常を呈するが、MED1 の核内受容体結合能を特異的に破壊した変異マウス (MED1 (LX) マウス) を作製し調べたところ、MED1 と ER α の結合能は思春期の乳腺の伸長を担うが妊娠時・出産後の乳腺の変化には不要であること、また MED1 がその発現量の差により、また ER α 結合能依存性に、発生過程で乳腺上皮の分化系統を決定すること、すなわち MED1 発現が多いと腺管細胞に、少ないと基底細胞に分化することがわかった。

MED1 および MED24 ノックアウトマウスはいずれも胎生致死であるが、いずれのヘテロマウスも乳腺に異常を認めない。一方、私はこれまでに細胞培養系のある遺伝子発現において、MED1 と MED24 の間に遺伝子量依存性が存在することを証明している。そこで、個体内でもこれらの遺伝子量依存性が存在するのか、ダブルヘテロマウスを検索した。ダブルヘテロマウスはほぼ正常に発育し、妊娠性にも異常はなかった。メスマウスの乳腺を調べたところ、エストロゲン依存性の乳腺発育がダブルヘテロマウスで著明に遅延し、これらの乳腺上皮では BrdU の取込みが減少し、DNA 合成が遅延していた。また、初代培養乳腺上皮細胞はエストロゲン依存性の遺伝子発現と DNA 合成が著明に低下していた。しかし、妊娠後の変化には異常がなく、これらの表現型は MED1 (LX) マウスの表現型に類似していた。次に種々の乳癌細胞を調べたところ、MED1 と MED24 は基底細胞型を含めいずれにも強く発現し、MED1 および MED24 依存性の癌細胞増殖を認めた。以上の結果より、MED1 と MED24 サブモジュールの間には、リガンド依存性の ER α 機能において、また正常乳腺細胞と乳癌細胞の増殖において、機能的協調関係が存在することが強く示唆される。

感染症とがん WG

「ヒトヘルペスウイルス感染とその制御法の開発に向けた研究」

神戸大学大学院医学研究科 臨床ウイルス学分野

森 康子、河端暁子、林 麻佑子、太田 恵美、小柳津裕子、湯華民

ヒトヘルペスウイルス 6 (human herpesvirus-6:HHV-6)は、乳幼児期に初感染し、我々の生体内に潜伏感染している。ほぼ 100%の成人の生体内にウイルスは感染しているとされている。HHV-6 は、その生物学的特徴のため HHV-6A および HHV-6B に分けられている。実際、我々の生体内に潜伏感染しているのはほとんどが HHV-6B である。近年、移植医療の発展に伴い、潜伏感染していたウイルスが、再活性化し、ヒトに病気を引き起こし問題となっている。特に移植後の HHV-6 脳炎は後遺症を残すことでも問題になっている。また、HHV-6 は、乳児期の突発性発疹の原因ウイルスであるが、乳児においても HHV-6 初感染による脳症が報告されており問題視されている。HHV-6 は、移植後に加えて薬剤性過敏症症候群の経過中にも再活性化することが知られている。

しかし、HHV-6 感染症に対する効果的な制御法は今のところ開発されていない。

我々は効果的な制御法の開発に繋げるためにウイルス感染機構の解析を行っている。

今回は、我々が同定した新たな HHV-6 特異的糖タンパク質のウイルス感染における重要性を報告する。

キナーゼ、特に受容体型チロシンキナーゼ (Receptor Tyrosine Kinase, RTK) を標的とした抗悪性腫瘍薬の役割は、様々ながん種の治療において拡大しつつある。キナーゼ阻害薬は一般に、標的分子に特定の変化をもった腫瘍に高い抗腫瘍効果を示す一方で、例外なく二次耐性を獲得することが臨床上大きな問題となっている。我々の研究室では、様々なキナーゼ阻害薬の獲得耐性機構と、その克服法を探る研究を続けている。

抗 HER2 モノクローナル抗体であるトラスツズマブは、HER2 陽性乳がんおよび胃がんの治療に用いられる。我々は、HER2 陽性トラスツズマブ感受性乳がん細胞株である BT474 から、獲得耐性株 (BT474-TR) を樹立した。BT474 と BT474-TR のタンパク抽出液におけるタンパク発現プロファイルを、MASCOT MS/MS ion search にて決定し比較したところ、両細胞間で 2 倍以上の発現量の差異があり、 $p < 0.0001$ となるタンパクは 8 種類同定された。現在、その一部について機能解析を行っている。

IGF-1R のチロシンキナーゼ阻害薬である NVP-AEW541 (NVP541) は、現在臨床開発途上にある新規化合物である。以前我々は、16 種類の乳がん細胞株をスクリーニングし、IGF-1R とそのアダプタータンパクである IRS-1 が共に強発現している MCF-7 のみ、NVP541 に高感受性であることを報告した。今回 MCF-7 から NVP541 耐性株 (MCF-7-NR) を樹立し、親株とのシグナル伝達の比較を行った。その結果、MCF-7-NR では IRS-1 の発現レベルが親株に比べ低下することが分かった。また、NVP541 により MCF-7-NR ではリン酸化型 Akt は親株と同様抑制されるものの、m-TOR-S6K は抑制されないこと、一方で mTOR 阻害薬である RAD001 には高い感受性を示すことが分かった。さらに、MCF-7-NR では Tyro3 受容体によってトリガーされるシグナルが耐性に関わっていることが示唆された。

多標的キナーゼ阻害薬である foretinib は、現在臨床開発途上にある新規化合物であり、MET が主な標的分子と考えられている。我々は、MET 遺伝子増幅をもち foretinib および MET 選択的阻害薬 PHA665752 に高感受性を示す MKN-45 胃がん細胞株から、それぞれに対する獲得耐性株を樹立した

(MKN-45-FR、MKN-45-PR)。興味深いことに、MKN-45-FR と MKN-45-PR とともに、耐性化するとそれぞれ foretinib、PHA665752 存在下には親株 MKN-45 と同等の増殖速度を保つ一方で、薬剤を添付しない培養液内では、増殖速度が著しく損なわれることが分かった。細胞周期分布を調べたところ、MKN-45-PR は薬剤(-)培養液では、G2 細胞周期停止となっていることが示唆された。現在、そのメカニズムについて研究を進めている。

ゲノム DNA に損傷が生じると、細胞は損傷を修復して生存を図るか、自らアポトーシスの引き金を引くかの選択を迫られる。重度の損傷を受けた細胞がその生存を優先すれば、突然変異や染色体異常の蓄積によってがんを引き起こす一方、軽度の損傷による細胞死が亢進すれば、早期老化や神経変性の原因となりうる。生命にとってこの精妙なバランスの維持はきわめて重要であり、その破綻がさまざまな病態を引き起こす原因となりうるということが近年明らかになってきている。

細胞がゲノム損傷を受けた際に発せられるシグナルの実体、特に DNA 修復機構に関わるタンパク質因子の翻訳後修飾等を介した関与についてはほとんど明らかになっていない。我々は昨年までに、ファンconi貧血症 (FA) の原因遺伝子産物の一つで、細胞の DNA 損傷応答に関わる FANCD2 タンパク質が細胞死の誘導に伴ってカスパーゼ 3 依存的に複数か所で切断されることを見出した。今回はこの FANCD2 切断部位の同定と、それぞれの部位に変異を導入した非切断型 FANCD2 タンパク質発現細胞の DNA 損傷応答を解析した結果を中心に報告する。

私たちは、転写因子に着目し、その発癌への関与を探っている。特に修復異常により生ずる DNA 損傷がその後の生体のレスポンスにどのような影響を及ぼすかに焦点を当てて研究を行って来た。環境中の多くの物質による酸化ストレスの発癌への関与、炎症に伴う酸化ストレスの発癌への影響は良く知られているが、その詳細な機序については不明な点も多い。今回、私たちは酸化的 DNA 損傷である 8-oxoG を修復する事の出来ない *ogg1* ノックアウトマウスを用いて、酸化的 DNA 損傷が多く生じる事でどのような遺伝子発現の変化が生じるかを網羅的に解析する事を目的として、*ogg1* 欠損マウスと野生型とに中波長紫外線 (UVB) を照射することによりマウス皮膚の如何なる遺伝子の発現が両者で異なるのかをマウス全ゲノムアレイによる遺伝子プロファイリングを行なった。照射マウスより抽出した RNA を用いてマウス全ゲノムアレイによる遺伝子プロファイリングを行い、いくつかの遺伝子を抽出した。その中には炎症に関与する遺伝子が多く含まれた。また、紫外線によって生じた酸化的 DNA 損傷の存在により変動する重要遺伝子のひとつとして真皮に存在する分泌型のプロテオグリカンをコードする遺伝子 versican に着目し、それについて、より詳細に検討した。Versican は 紫外照射後の *ogg1* ノックスとマウスで有意に強く発現しており、紫外線炎症の局所では versican が好中球と共局在した。Versican の発現を p53 が調節しているという報告もある事から、転写因子のひとつ、p53 遺伝子との関連についても解析を進めている。

液性因子である Wnt5a は、その受容体である Ror-ファミリー受容体型チロシンキナーゼ (Ror1, Ror2) に結合し、 β -カテニン非依存的な Wnt シグナル経路 (非古典経路) を活性化することにより、増殖、分化、運動、極性などの細胞機能を制御することが知られている。我々は、間葉系由来癌細胞である骨肉腫細胞 (SaOS-2, U2OS 細胞) においては、Wnt5a および Ror2 が構成的に発現し、Wnt5a-Ror2 シグナルが恒常的に活性化していることが、骨肉腫細胞の浸潤能に寄与していることを明らかにした。また、上皮様癌細胞 (A431 細胞) は Wnt5a, Ror2 を発現していないが、上皮間葉転換に伴い Wnt5a, Ror2 を発現し、Wnt5a-Ror2 シグナルの恒常的活性化により、癌細胞の運動能、浸潤能が亢進することを見出した。これらの知見から、癌の浸潤における Wnt5a-Ror2 シグナルの機能が明らかになってきたが、Ror1 あるいは Wnt5a-Ror1 シグナルの役割については不明であった。

最近になり、本 WG における向原、南(博)両先生のグループとの共同研究により、乳癌の中でも近年関心を集めているトリプルネガティブ乳癌 [エストロゲン受容体 (-)、プロゲステロン受容体 (-)、HER2 (-)] において Wnt5a, Ror1 が選択的に発現しており、Ror1 または Wnt5a-Ror1 シグナルがトリプルネガティブ乳癌細胞の特質に関与し、治療標的となる可能性を示唆する知見を得たので、その成果について紹介したい。

また、発生過程の脳皮質における神経幹前駆細胞の増殖および幹前駆細胞性の維持において Wnt5a-Ror1/Wnt5a-Ror2 シグナルが重要な役割も担うことを見出したので、併せて紹介するとともに、本 WG の目的の 1 つである「癌と神経疾患における共通の分子機構の解明」に向けた Wnt5a-Ror シグナルの機能について今後の展望を討論したい。

神戸薬科大学 生化学研究室/神戸大学大学院医学研究科 薬物動態学分野
北川 裕之、灘中 里美

コンドロイチン硫酸(CS)は、コアタンパク質に結合したプロテオグリカン (PG) 分子として細胞表面や細胞外マトリクスに存在している。CS の構造上の特徴は様々な部位で硫酸化修飾を受けることであり、この修飾により構造に多様性がもたらされる。硫酸化構造の合成異常は発生過程において異常を引き起こしたり、様々な病気の原因になることが報告されている。おそらく、多くの細胞間シグナル分子や形態形成因子は、CS の硫酸化構造を特異的に認識して、細胞内シグナル伝達を調節しているのだと考えられる。我々は最近、ある特定の構造をもつ CS によって拡散やシグナル伝達が調節される分子の一つとして Wnt3a を見いだした 1, 2)。

Wnt シグナルの調節はある種の癌や様々な病気と密接に結びついており、Wnt シグナルによって癌細胞の増殖能や浸潤能が促進することが報告されている。Wnt シグナルのアンタゴニストとして Dickkopf-1 (Dkk-1) が知られており、Dkk-1 のような Wnt シグナル調節分子も糖鎖と結合し、その活性が制御される可能性が考えられた。そこで本研究では、CS が Dkk-1 による Wnt シグナルを制御する可能性について調べた。Dkk-1 を介した Wnt シグナルの調節に果たす CS の機能的役割を調べるため、Dkk-1 を発現する乳がん細胞の浸潤能および細胞内 Wnt シグナルに与える CS の影響について解析した。

1) Nandanaka, S., et al. (2008) J. Biol.Chem. 283, 27333-27343.

2) Nandanaka, S., et al. (2011) J. Biol.Chem. 286, 4199-4208.

特別講演 I

「ナチュラルヘルパー細胞 –Th2型の自然免疫反応にかかわる新しいリンパ球–」

慶應義塾大学医学部 微生物学・免疫学教室
教授 小安 重夫

我々は、腸間膜に代表される脂肪組織中に、これまでに報告のないリンパ球集積を発見し、この組織をFALC (fat-associated lymphoid cluster) と名付けた。さらに、FALC中に大量のTh2サイトカインを発現する細胞集団を見いだした。この細胞は一般的な血球細胞系の分化マーカー (Lineage markers) を持たず、c-Kit, IL-2受容体, IL-7受容体, IL-33受容体などを発現する。この細胞はIL-2によって増殖し、IL-5, IL-6, IL-13などのTh2サイトカインを恒常的に発現するという特徴を持つ。この細胞群がナチュラルキラー細胞と同様にIL-2で増殖し、細胞傷害活性ではなく、ヘルパー活性を示すことから、我々はこの細胞群をナチュラルヘルパー (Natural Helper: NH) 細胞と名付け、さらにその機能を解析してきた。これまでのところ、NH細胞が恒常的に発現するIL-5は自然抗体を生産するB1細胞の維持に機能し、IL-5とIL-6はIgAの産生増強にかかわることを示した。さらに、腸管寄生虫感染においては、上皮細胞や内皮細胞から産生されるIL-33に反応して大量のIL-5やIL-13を生産し、IL-5は好酸球増多を、IL-13は杯細胞の過形成を介して寄生虫に対する初期防御に機能することを明らかにした。本講演では、これまでの研究を紹介するとともに、近年色々な報告がされている類似の自然免疫系の細胞群についても概観したい。

参考文献

- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H. and Koyasu, S. (2010) Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺Sca-1⁺ lymphoid cells. **Nature** 463:540-544.
- Koyasu, S., Moro, K., Tanabe, M. and Takeuchi, T. (2010) Natural Helper Cells: a new player in the innate immune response against helminth infection. **Adv. Immunol.** 108:21-44.
- Koyasu, S. and Moro, K. (2011) Innate Th2-type immune responses and the Natural Helper Cell, a newly identified lymphocyte population. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.** 11:109-114.
- Koyasu, S. and Moro, K. (2011) Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. **Immunology** 132:475-481.

特別講演Ⅱ

「シグナル伝達と mRNA 代謝制御」

東京大学医科学研究所 癌細胞シグナル分野
教授 山本 雅

遺伝子発現は様々な仕組みで制御されている。転写制御研究について多くの知見が蓄積しており、また翻訳開始制御に関しても様々に研究がなされてきた。そのような中、近年外来情報に依存した遺伝子発現制御の一つとして mRNA の安定性制御が注目されている。

我々は EGF 受容体等受容体型チロシンキナーゼを介する細胞内シグナル伝達系を解析してきた。その過程で、EGF 刺激依存的に活性化される Erk1/2 MAP キナーゼ標的蛋白質として Tob を見出した。Tob は細胞増殖抑制活性をもつ蛋白質である。さらに我々は Tob 会合蛋白質とし CCR4-NOT 蛋白質複合体 (2 MDa) を見出した。CCR4-NOT 複合体は、哺乳動物では CNOT1~CNOT3, CNOT6, CNOT6L, CNOT7~10 の 9 個のサブユニットからなり、核内受容体と会合し転写制御に関わることが示されている。一方で、CCR4-NOT 複合体は deadenylase 活性をもち mRNA の安定性を制御することが分かってきた。我々は deadenylase 活性に注目して CCR4-NOT 複合体の生体における機能や、deadenylase の作用機構に関する研究を進めている。その一環として、CCR4-NOT 複合体のすべてのサブユニットについてそれぞれを改変したマウスを作成している。本講演では、特に CNOT3 改変マウスが瘠せ形質を示すことに注目しながら、シグナル伝達から遺伝子発現制御と進んできた我々の研究を紹介する。

特別講演Ⅲ

「代謝を制御するシグナル伝達における Klotho の機能」

先端医療振興財団先端医療センター
先端医療センター長 鍋島 陽一

動物個体は恒常性を維持することによってその生理機能、活動性を維持し、健康を保持している。液性（代謝）応答は生体恒常性維持にとって重要な機構であり、中でもミネラル、脂質、糖・エネルギー代謝の恒常性維持は健康の保持にとって極めて重要であり、その機能低下は老化、加齢疾患の発症に深く関わっている。

α -Klotho は腎臓、上皮小体、脈絡叢（脳）で主に発現しており、これらの組織の細胞内、細胞膜上に存在し、更に、膜貫通ドメインの直上でプロセスされて血液、脳脊髄液、尿より同定される。最近のヒト、マウスの解析結果は、「 α -Klotho は Na^+ , K^+ -ATPase（細胞内タイプ）、FGF23/FGFR（細胞膜上タイプ）と結合しており、その機能制御を介してカルシウム・リン恒常性を維持するための多段階の制御機構を統御する因子と機能している」との結論を支持している。

α -Klotho はグリコシダーゼファミリーの一員であり、結合相手の糖鎖を認識・結合し、シグナルを伝えるレクチン、とりわけ、硫酸化グルクロン酸を認識するレクチンとして機能している。この糖鎖は α -Klotho、FGF23 の複合体形成を安定化させることによって FGF23 の腎臓への集積、生理濃度でのシグナル伝達を実現している。また、 α -Klotho、FGF23、FGFR1 から成る 3 者複合体の構造を可視化し、2 個の α -Klotho/FGF23 複合体の 4 つの Glycosidase 様ドメインがリングを作り、2 個の FGFR1 を取り巻くことによって FGFR1 を二量体化／活性化していることを示唆する結果を得ている。

β -Klotho は肝臓、膵臓、脂肪で発現しており、肝臓において FGF15/19（ヒト）のシグナル伝達の制御に必須の分子として機能しており、コレステロールから胆汁酸を合成する Cyp7a1 の発現を負に制御している。また、第 3 の FGF19 ファミリーメンバー（FGF23, FGF19, FGF21）である FGF21 は糖代謝制御、飢餓応答、エネルギー代謝の制御に関わると推定されており、そのシグナル伝達に β -Klotho が必用であるとの報告もあったが、 β -Klotho ノックアウトマウス、FGF21 ノックアウトマウスの解析結果はその可能性をサポートしない。

α -Klotho、 β -Klotho の発見以来、全く予期せぬ方向へと研究が進展した。本講演では、Klotho family の発見を契機として明らかとなった新たな生体応答システム、恒常性維持機構とその分子基盤となる分子間認識機構について議論する。

C型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎や肝硬変、肝細胞癌を引き起こすのみならず、2型糖尿病の発症に関与することも知られている。その要因として高血糖状態の持続によるインスリン抵抗性の関与が示唆されているが、その分子機序は不明な点が多い。我々はこれまでに、HCV感染が肝細胞に酸化ストレスを引き起こすこと、及び糖新生の律速酵素である phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK) 及び glucose-6-phosphatase (G6Pase) の遺伝子転写を増強し、持続的に糖新生の亢進を引き起こすことを見出した。今回、HCV感染に伴う酸化ストレスが肝細胞の糖新生に及ぼす影響について詳細に解析するとともに、この現象に HCV NS5A タンパク質がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

転写因子 forkhead box O1 (FoxO1) は PEPCK 及び G6Pase の転写調節を介して糖代謝を制御することが知られている。また、FoxO1 が活性化された Akt /PKB によりリン酸化されると、核内から細胞質へ移行し不活性型になる。HCV感染細胞では、Akt がリン酸化され活性化されているにも関わらず、FoxO1 のリン酸化が抑制され、FoxO1 の核内蓄積が認められた。すなわち、HCV感染が Akt 経路ではなく、他のシグナル伝達経路により FoxO1 の転写活性を持続させると考えられた。また、我々は HCV感染による JNK の活性化を見出した。そこで、JNK 特異的阻害剤 (SP600125) を用いて JNK の活性化を阻害したところ、HCV感染による FoxO1 リン酸化の抑制及び FoxO1 の核内蓄積が解除された。さらに、我々は HCV感染による ROS 産生の増加も見出した。そこで、抗酸化剤 NAC を用いて ROS の産生を阻害したところ、HCV感染による JNK 活性化が抑制され、それに伴い、FoxO1 リン酸化の抑制及び FoxO1 の核内蓄積が解除された。

また、我々は HCV NS5A の単独発現が、ROS 産生の誘導、JNK 経路の活性化及び FoxO1 のリン酸化抑制、核内蓄積を起こし、それに伴い、糖新生律速酵素である PEPCK 及び G6Pase の遺伝子転写亢進とグルコース産生の増加を引き起こすことを見出した。

以上の結果から、HCV感染は、酸化ストレスの誘導 (ROS 産生の亢進) を介して JNK を活性化し、これが FoxO1 のリン酸化を抑制し核内に留め、その転写活性を亢進させ、糖新生律速酵素遺伝子群の転写促進を介して糖新生を亢進させると考えられた。この糖新生促進には、通常インスリンシグナル経路で重要な役割を果たしている Akt/PKB は関与していないと考えられた。また、HCVによる糖新生の亢進に NS5A が関与していることが示唆された。現在、JNK 経路による FoxO1 リン酸化の抑制に関わるシグナル伝達機構について、さらに解析を進めている。

【背景と目的】

肥満者や2型糖尿病患者では高感度CRPや炎症性サイトカインなどの炎症マーカーの血中濃度が上昇することが知られており、2型糖尿病を始めとした種々の代謝異常の発症に「軽微な慢性炎症」が関与する可能性が注目されている。ケモカインは白血球の遊走や接着などの制御を通じて、炎症の形成に関与するサイトカインであり、ヒトでは40種以上の分子が同定されている。本研究では肥満・2型糖尿病モデル動物において、中和抗体により各種のケモカインの機能を抑制することにより、ケモカインのインスリン抵抗性やインスリン分泌能への影響を検討することを試みた。

【方法と結果】

5種のケモカインに対する中和抗体を肥満・2型糖尿病モデル動物に2週間に亘って腹腔内投与した後、糖負荷試験により耐糖能について評価したところ、2種のケモカイン抗体によりマウスの耐糖能が悪化することが明らかとなった。いずれのケモカイン中和抗体も摂餌量や体重には影響を及ぼさなかったが、1種のケモカイン抗体はインスリン分泌能を低下させることにより、耐糖能を悪化させることが明らかとなった。このケモカイン抗体はインスリン分泌が強く障害される糖尿病モデルマウスのインスリン分泌能や耐糖能には影響を及ぼさなかったことから、肥満による代償性のインスリン分泌亢進に関与する可能性が示唆された。一方、もう1種のケモカイン抗体はインスリン分泌能には影響を与えず、インスリン抵抗性を増強することにより耐糖能を悪化させることが明らかとなった。この中和抗体の投与により、肝臓や内臓脂肪ではTh1/Th2比が増加するとともに、インスリン抵抗性を誘導する炎症性サイトカインの発現が亢進していたことから、肝臓や内臓脂肪でのインスリン抵抗性の増強が耐糖能の悪化を誘導した可能性が示唆された。

【結語】

肥満・2型糖尿病モデル動物のインスリン分泌やインスリン抵抗性の制御に関わるケモカインを同定した。

炎症時には、免疫細胞は血液中から血管内皮細胞を経由して組織内へ移行する。この細胞浸潤は、病態や状況に応じて多くの接着分子と細胞遊走因子により制御される炎症の重要な過程である。

私たちは、活性化 T 細胞に発現する AMICA (Adhesion molecule, interacts with CXADR antigen) が、内皮細胞や上皮細胞に発現する細胞間接着分子 CAR (Coxsackie and adenovirus receptor) のカウンターレセプターであること、T 細胞の内皮細胞への接着や細胞浸潤を誘導することを明らかにした。さらに内皮細胞上の CAR と T 細胞上の AMICA が内皮細胞-T 細胞の接触部位でリング様接着構造を形成すること、このとき AMICA とインテグリン LFA-1 がリング様構造に共局在することを見出した。また AMICA-CAR の相互作用により、固相化 ICAM-1 上での LFA-1 依存的な細胞接着や細胞運動が誘導されること、AMICA とケモカインの共刺激により細胞の伸展と強い接着が誘導され細胞運動能が低下することも見出した。AMICA-CAR の相互作用は、T 細胞の内皮細胞ジャンクション直上での接着や運動を促進する一方、ケモカイン刺激と協調することで T 細胞の内皮細胞ジャンクション上面での運動停止と細胞浸潤の開始を誘導すると考えられる。

次に、細胞接着や細胞浸潤における AMICA 細胞内ドメインの役割を検討した。AMICA 細胞内ドメイン欠損変異体を用いた実験から、AMICA による T 細胞の内皮細胞への接着、細胞浸潤の誘導には、細胞内ドメインが不可欠であることを明らかにした。AMICA の細胞内ドメインは、PI 3-kinase SH2 ドメインに結合する YXXM モチーフを有する。AMICA 細胞内の 2 つのチロシン残基 Y334、Y355 をフェニルアラニンに置換した変異体を用いた実験から、AMICA は YXXM モチーフ内の Y355 依存的に PI 3-kinase と結合することを明らかにした。さらに、AMICA の PI 3-kinase 結合領域は、AMICA による細胞浸潤の誘導、LFA-1 依存的な細胞接着や細胞運動の誘導に必要であることを明らかにした。以上の結果から、AMICA は PI 3-kinase を介して、LFA-1 の活性化を誘導し、細胞接着や細胞運動を制御して T 細胞の内皮細胞への接着、浸潤を誘導していることが示唆された。

SLE は、多彩な自己抗体産生を特徴とする代表的膠原病で、病因は長い間不明であった。私達はこの度、SLE の原因を解明しその「自己臨界点説」を電子ジャーナル PLoS ONE に昨年 12 月 31 日発表した (Tsumiyama K, Miyazaki Y, Shiozawa S. Self-organized criticality theory of autoimmunity. PLoS ONE 4(12):e8382, 2009)。自己臨界点 self-organized criticality は制御工学の用語で、免疫システムの安定性には限界（臨界点）があつて、システムが抗原（病原体）によって臨界点を越えた過剰刺激を受けると、破綻して必然的に膠原病が発症することを証明しています。医学研究の解析研究法と違い、制御工学（システム生物学）は、分子固有の構造や機能を直接問題にしないで、分子をシグナル（信号）とみてシグナル間相互作用をダイナミカルに研究する。

この見方からすると、SLE の発症病因は明快です。SLE は特定の抗原によって誘導されるのではなく、抗原は何でも構わない。要は抗原が免疫システムに過重負荷を強いるような形でからだに侵入してくるか否かが問題で、CD4 T 細胞に過重負荷がかかると T 細胞受容体 T cell receptor (TCR) が末梢組織で再度の V(D)J 遺伝子再構成を起こして、自己応答性を獲得して autoantibody-inducing CD4 T (aiCD4 T) 細胞が生成する。すなわち、当初の抗原特異的応答が、この時点で抗原非特異的（自己応答性）となって多彩な自己抗体が産生される。このキイとなる aiCD4 T 細胞を誘導する抗原は、その人の HLA クラス II 分子の抗原提示 antigen presentation 能力で決まります。また同様に、ループス腎炎などの組織傷害が生じるか否かも、CD8 T 細胞がエフェクター cTL に最終分化できるかどうか依存するから、HLA クラス I 分子の antigen cross presentation 能力（註 1）によって決まる。その人の antigen presentation および antigen cross presentation の能力が SLE の発症を左右すると結論される。

考えてみると、人などの生命体は発祥の昔から周囲と拒絶・受容を繰り返して現在に至っており、私達の防御応答も進化の過程で獲得した機構に拠っているはずで、ここに突然「自己免疫」という新たな概念の入る余地はなく、従って先入観に依らないで見れば、SLE も同じ機構の変調に因って発症するはずである。しかるに、MacKey はノーベル賞の Burnet 博士の「クローン選択説」を受けて「自己免疫疾患」を提唱したが、その後の研究はこの空想の産物である「自己免疫性」の証明に拘泥されて著しく立ち遅れた。たとえば、「自己臨界点説」によれば、麻疹ウイルスによって発症する SLE があり得るが、もし麻疹を病変局所に発見しても誰も麻疹が原因とは思わない。こうした先入観の是正が今、膠原病研究に求められている。

註 1 : antigen cross presentation は、本来ならば HLA クラス II 分子上に抗原提示されて CD4 T 細胞（ヘルパー T 細胞）を活性化すべき外来抗原が、HLA クラス I 分子上に提示されて CD8 T 細胞（細胞傷害性 T 細胞 cTL）を活性化するような通常と異なる（クロスした）抗原提示の仕方をいいます。

総合診断センターWG 【Overview】

「総合診断センターの戦略」

チームリーダー

神戸大学大学院医学研究科病理部 伊藤 智雄

G-COE 次世代シグナル伝達医学の教育研究国際拠点の総合診断センターのミッションは大きく二つにわかれ、1) 各チームへの支援、2) 自らの研究遂行があげられる。

1) 各チームへの支援

i) 基礎・臨床融合を行い、トランスレーショナルリサーチを行っていく上で、研究対象となる疾患の正確な診断・分類は欠かすことができないものである。疾患の診断には臨床診断、画像診断、病理診断の集学的診断が有効である。これら CRP triangle (Clinician-Radiologist-Pathologist) による診断を研究に生かしてゆくことが、ミッションの一つに挙げられる。

ii) 病理学的手法のセンター化：これまで病理部内に先端組織染色センターをすでに設置し、各チームからの様々な染色・検鏡の依頼を受託できるようにしている。近年は免疫多重染色による組織鑑別法の検討を進めており、成果が挙げられており、その一部を紹介する。

2) 新たな診断的手技の開発

各チームより下記のごとく報告を行う。

総合診断センターWG 【放射線チーム】

「320 列面検出器型 CT (Area-Detector CT) 及び MRI による新たな機能および分子イメージング法の開発」

神戸大学大学院医学研究科 放射線医学分野

大野 良治、杉村 和朗

機能イメージングとは形態画像と機能画像の融合である。また、分子イメージングには PET/CT や MRI などを用いて様々な基礎医学の知見の画像化或いは生体内の水分子などのブラウン運動などの可視化などを行っている。

現在、我々は胸・腹部領域を中心に 320 列面検出器型 CT (Area-Detector CT) による機能イメージング法や MRI による分子イメージング法の開発および基礎研究を行うと共に、臨床応用を試みている。今回の研究発表ではその開発状況や臨床応用検証結果などを踏まえて、今後の展望などに関して報告する。

総合診断センターWG 【肝胆膵外科チーム】

「膵癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発」

神戸大学大学院保健学研究科/医学研究科 肝胆膵外科 堀 裕一
神戸大学大学院医学研究科 肝胆膵外科 具 英成

癌組織にも正常組織と同様に幹細胞の存在が示唆され、従来の治療法に抵抗性を示すことが報告されている。我々は癌幹細胞を標的とした新たな治療法開発を目的とし、抗癌剤に抵抗する患者の癌性胸腹水から初代ヒト膵癌幹細胞株を樹立した。まず、細胞株の幹細胞としての characterization をおこなった。さらに、Notch 阻害剤やフラボノイドのケルセチンの効果を colony formation や増殖能で評価した。樹立したヒト膵癌幹細胞株は、多くの点で既存のヒト膵癌細胞株と異なっており、幹細胞や微小環境(ニッチ)を標的とした治療法の開発に有用である。

総合診断センターWG 【質量分析総合センター】

「メタボロミクスを用いた炎症性腸疾患の病態解析」

神戸大学大学院医学研究科 消化器内科学/病因病態解析学分野
吉田 優

質量分析総合センターでは、質量分析を用いた生体構成分子の網羅的解析法の開発及びその医学応用研究を行っている。蛋白質の網羅的解析プロテオミクスについては、キャピラリーカラムを用いた極微量速液体クロマトグラフィーにより分離を行い、イオントラップ型-飛行時間型のハイブリッド型質量分析計によるタンデムマス解析を実施している。この手法により、従来のタンパク質同定解析に加え、シグナル伝達等に重要な役割を果たす、リン酸化部位など翻訳後修飾部位を同定するシステムを開発した。低分子代謝物の網羅的解析メタボロミクスについては、ガスクロマトグラフ質量分析計を用い、生体試料中の代謝物網羅的解析手法を確立した。本手法により、血清中の糖、有機酸、アミノ酸、脂肪酸など 120 種の自動半定量解析が可能となり、膵がん(1)、肺がん(2)、炎症性腸疾患(3)などにおいて、疾患特異的代謝物の変動を明らかにした。今回の研究発表では、メタボロミクスを用いた炎症性腸疾患の病態解析について報告する。

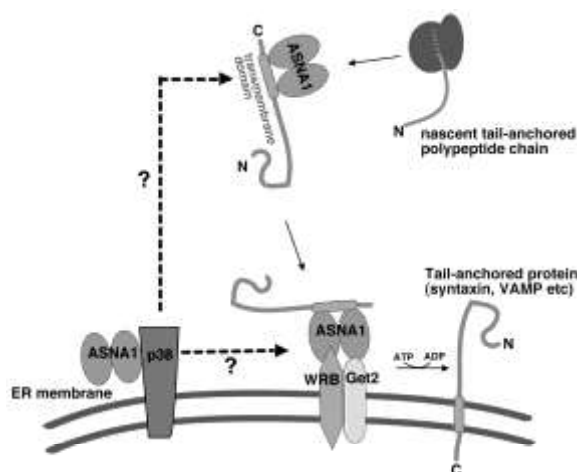
Reference

1. Nishiumi S, et al. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics*. 2010 Nov;6(4):518-28.
2. Hori S, et al. A metabolomic approach to detect early stages of lung cancers. *Lung Cancer*. (in press)
3. Shiomi Y, et al. A GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. *Inflamm Bowel Dis*. (in press)

神経伝達物質は、シナプス小胞が SNARE 複合体の働きによりシナプス前膜へ融合することで放出される。神経終末には多数のシナプス小胞が存在するが、極わずかな数のシナプス小胞だけが、 Ca^{2+} の流入に応答してサブミリ秒という超高速でシナプス前膜に融合する。このことは大部分のシナプス小胞では SNARE 複合体の働きが抑制されている一方、シナプス小胞の融合時には SNARE 複合体の働きが増強されることを示している。しかしながら、超高速膜融合に至る分子機構については不明な点が多い。私どもは、SNARE 制御分子トモシンに着目し、シナプス小胞融合プロセスにおける SNARE 複合体の制御機構の解明に取り組んでいる。現在、トモシンによる SNARE 依存性の膜融合反応の制御活性を、SNARE タンパク質を組み込んだリポソームによる試験管内再構成系を用いて検討しており、トモシンが膜融合の速度を加速する活性を有することを見いだしつつある。得られた結果をもとに、トモシンを介した神経伝達物質放出における超高速膜融合プロセスの制御機構について報告したい。

上述のごとく、SNAREタンパク質は小胞輸送において必須の役割をしているが、SNAREタンパク質そのものも積み荷タンパク質として小胞輸送でシナプス前膜やシナプス小胞へと運ばれている。その膜輸送の開始点は、積み荷タンパク質の小胞体膜への埋め込みである。とりわけシンタキシンやVAMP2などC末端側に膜貫通領域をもつタンパク質はTail-anchored proteinとよばれ、トランスロコンを介さずに小胞体膜へ埋め込まれる。近年、その膜埋め込み機構の解析が急激な勢いで行われ、細胞質に存在するASNA1 ATPaseが、小胞体膜への埋め込みの実行分子として機能していることが明らかになった。ASNA1は翻訳直後のTail-anchored proteinのC末膜貫通領域を認識し、ATP依存的に小胞体膜に埋め込む。この際、小胞体膜側の受容体としてWRBおよび酵母Get2が同定されている。

しかしながら、これらの分子のみで必要十分なのか？酵母Get2に対応するほ乳動物のホモログ分子は存在するのか？など依然として不明な点が多い。私どもは最近、これらの問題についての取り組みを開始した。ASNA1をリガンドにしたアフィニティークロマトグラフィー法により、分子量38kDaの膜タンパク質(p38)を精製した。これまでの予備的解析の結果、p38は小胞体膜に局在し、細胞質領域でASNA1と結合していることが明らかになった（右図）。現在、Tail-anchored proteinの小胞体膜への埋め込みプロセスにおけるp38の生理機能について詳細な検討を行っている。得られた結果をもとに、小胞体作用点とする膜輸送制御についての私どもの新たな取り組みについて報告したい。



インスリン分泌においてはグルコース応答性インスリン分泌 (glucose-induced insulin secretion: GIIS) が最も基本的なメカニズムである。一方、GIIS を増強するシステムも生理的なインスリン分泌の調節に重要である。例えば 消化管ホルモンである GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) や GLP-1 (glucagon-like peptide 1) などのインクレチンは膵β細胞内 cAMP シグナルを活性化してインスリン分泌を増強するが、その作用はプロテインキナーゼ A (PKA) 依存性と PKA 非依存性メカニズムにより発揮される。後者には cAMP 依存的に低分子量 G タンパク質 Rap1 を活性化する Epac2 (cAMP-GEFII) が関与する。我々は Epac2 が血糖降下薬として広く使用されているスルホニル尿素 (SU) 薬によって活性化され、Epac2 を欠損させたマウスでは SU 薬によるインスリン分泌作用や血糖降下作用が減弱することを見いだした。これらの結果は SU 薬によるインスリン分泌作用には ATP 感受性 K⁺チャネルを閉鎖するメカニズムに加えて、Epac2 を介するメカニズムも重要であること、さらに、Epac2 が SU 薬とインクレチン/cAMP シグナルの共通の標的であることを示している。SU 薬で治療されている 2 型糖尿病患者に対して最近開発されたインクレチン関連薬を併用すると多くの症例において SU 薬単独治療に比し、より良い血糖改善効果が認められること、しかもある種の症例では重篤な低血糖を招来することが報告されていることから、Epac2 を介するインスリン分泌機構の解明は臨床的にも重要な課題である。我々は SU 薬と GLP-1 あるいは Epac 選択的 cAMP アナログを組み合わせるとそれぞれ単独処置に比し、Rap1 活性やインスリン分泌が明らかに増強されことを見いだしている。したがって SU 薬とインクレチン/cAMP シグナルは Epac2 を介し協調的に作用すると考えられる。現在、種々の Epac2 の変異体を作製し、それらを蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) の原理を利用した Epac2 FRET の活性化、Rap1 活性化、³H 標識 SU 薬の結合、ドッキングシミュレーションなどで評価することにより、Epac2 上での SU 薬結合部位の同定と SU 薬と cAMP の相互作用の解明を試みている。

神戸大学大学院医学研究科

生化学・分子生物学講座 シグナル伝達学分野

生化学・分子生物学講座 分子細胞生物学分野

内科学講座 循環器内科学分野

力武 良行

血管壁内腔表面を単層状に覆う血管内皮細胞は、血管の恒常性維持に中心的な役割を果たしている。血管内皮機能は、がんや糖尿病、動脈硬化など、さまざまな病態に関与している。私共は、細胞接着分子ネクチンと構造が類似するが、異なる機能を有するネクチン様分子 (Nec1) に着目し、血管内皮細胞におけるNec1の役割について解析している。Nec1 はインテグリンや増殖因子受容体と相互作用して、細胞内シグナルの活性化を制御している。Nec1には、Nec1-1〜5の5つのアイソフォームが存在する。私共は、Nec1-5は血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体と相互作用し、VEGFにより誘導される細胞内シグナルの活性化を調節して、血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成、アポトーシスを制御し、新生血管の重要な調節因子であることを見出している。さらに最近、Nec1-5以外のNec1分子についても機能解析をすすめており、本発表では新しく得られた知見についても紹介したい。

筋組織と骨代謝の関連を示唆する臨床所見を発端に筋組織と骨代謝の相互関連について、筋肉が特異的に骨化する進行性骨化性線維異形成症(FOP)という BMP 受容体の一つである ALK2 の恒常活性型変異を原因とする遺伝性疾患を手がかりとして研究を進めてきた。具体的には筋骨化を局所性に調節する因子の探索とその機構の解明、さらに筋組織から産生されることにより骨アナボリックに働く体液性因子の同定とその臨床的意義の解明を目標としている。

筋骨化を局所性に調節する因子については、FOP の原因となる筋骨化シグナルを活性化すると考えられる恒常活性型変異 ALK2 をマウス筋芽細胞株で過剰発現することにより発現が増加し、筋芽細胞や筋管細胞で有意に発現する因子を抽出した。そのうち Tmem119 はもともと私共が骨芽細胞で副甲状腺ホルモンや Smad3 により誘導される骨芽細胞分化促進因子として同定していたが、抽出した因子に含まれていた。機能解析の結果、Tmem119 は筋芽細胞において、BMP の非存在下においても、骨芽細胞への分化、石灰化を促進し、その機序として BMP-2 の誘導及び骨芽細胞分化因子の Runx2 や Osterix 以降の経路に作用することにより筋骨化を促進することが示唆された。さらに他の抽出された因子について、検討を進めている。また、プラスミノゲンやそのアクチベーターなどは組織修復、再生に関与する。私共は線溶系関連因子欠損マウスを用いて、筋骨化への組織線溶系の関与について、検討を進める予定である。

筋から産生される全身性骨形成因子の探索については、いくつかの因子について、分化した骨芽細胞の機能や石灰化を促進すること、またその因子の発現を調節した筋芽細胞培養上清にも同様の活性が存在することを見だし、臨床検体を使用した検討を含めた研究が進行中である。

【緒言】 Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は進行性の筋萎縮を呈し、10 歳前後で歩行不能となり、20 歳前後で呼吸不全・心不全を呈する極めて重篤な遺伝病である。その原因はジストロフィン遺伝子の異常であり、骨格筋でジストロフィンが欠損している。我々は DMD に対して、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導して、ジストロフィンを発現させる方法を世界に先駆けて開発し、臨床での有効性を明らかにした。この方法は、DMD 患者が有するジストロフィン mRNA のアウトオブフレームの遺伝子の異常を、エクソンスキッピング誘導により mRNA のアミノ酸読み取り枠を維持するインフレームに修正し、サイズの小さなジストロフィンの産生をはかるものである。

一方、アンチセンスオリゴヌクレオチドは分子量が大きいという核酸医薬に特有の避けられない性質があるため、エクソンスキッピング誘導能を有する低分子量化合物が発見できれば、高分子化合物の欠点が克服できる優れた治療薬となるものと大きく期待されていた。昨年の本会において、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物 TG003 に関して報告した。今回、TG003 の臨床への応用を拡大するために、他のエクソンに対するスキッピング誘導能に関して解析した。

【方法】 エクソン内あるいはエクソン／イントロン境界部に変異を有するジストロフィン遺伝子のエクソンを組み込んだ、スプライシング解析用プラスミドを作成。作成したプラスミドを導入した HeLa 細胞に、TG003 を添加し、エクソンスキッピング誘導能の検討を行った。

【結果と考察】 ジストロフィン遺伝子に微小変異を有する 20 種のエクソンに関して、TG003 のエクソンスキッピング誘導能を検討した。その結果、3 つの微小変異を有するエクソンのスキッピングを誘導し得ることが明らかとなった。今回得られた結果は、“低分子化合物を用いてエクソンスキッピングを誘導する” という新たな治療法の可能性をさらに推進するものであった。

動脈硬化は慢性炎症性疾患であるとされるが、炎症や免疫反応に直接介在する治療法は未だに臨床応用されていない。動物実験などで様々な免疫反応・免疫担当細胞の動脈硬化における役割が解明されつつあり、それらを標的にした治療法開発が期待される。近年、T リンパ球、さらにその中で免疫抑制性機能をもつ制御性 T 細胞(regulatory T cell; Treg)と動脈硬化との関連が注目され、さかんに研究がなされている。我々は、この Treg を任意に誘導することで動脈硬化が予防できることを利用し、様々な方法により Treg 誘導を介した新規動脈硬化予防法、治療法を開発する研究を進めている。その中で、腸管免疫を修飾することで動脈硬化を予防しようとする方法を紹介する。

1. 自己免疫疾患である I 型糖尿病の治療法として臨床治験もされた抗 CD3 抗体を動脈硬化マウスに少量短期間経口投与した。抗体投与で、腸管にて TGF- β 産生 LAP 陽性 CD25 陽性細胞が増加し、動脈硬化が抑制できた。動脈硬化巣のマクロファージや T 細胞の含有率は低下し、さらに脾臓でのサイトカイン産生の表現型も変化した。短期抗体投与の影響は、投与後 10 週でも一部で継続して認められ、免疫機能の短期的修飾のみならず、長期的な効果も示唆された。

2. 血中ビタミン D3 (VitD3) 濃度が低いと、心血管イベント発生率が上昇することが臨床研究で示されており、VitD3 投与に動脈硬化予防効果があるのではないかと仮説をたて実験を行った。動脈硬化マウスに VitD3 を経口投与することで、腸管リンパ節での Treg が増加し、さらに動脈硬化は抑制された。VitD3 腹腔内投与では Treg は誘導されなかった。Treg 誘導の機序として、腸管での樹状細胞の免疫寛容への表現型変化の関与が示唆された。

上記のように、腸管を介した Treg 誘導と動脈硬化抑制との関連が示唆され、今まで循環器疾患治療の対象としてほとんど意識されなかった腸管免疫の修飾が動脈硬化予防に利用できる可能性が示された。

若手研究者発表

「新規血管遺伝子の同定」

神戸大学大学院医学研究科 血管生物学分野

グローバル COE 特命助教 植村 明嘉

抗 VEGF 薬の普及に伴い、眼内血管新生病変に対する薬物療法の有効性が実証されると同時に、新規創薬標的分子の探索にむけた熾烈な研究開発競争が展開されている。特にマイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析により、血管新生に関連する新規遺伝子が次々と同定され、創薬標的分子としての可能性を示唆する研究論文が相次いで報告されている。しかしマイクロアレイ法は様々な問題点を内包しており、膨大な量にのぼる遺伝子発現データベースを如何に活用するかが、研究開発の成否を大きく左右する。我々はフローサイトメトリー法とマイクロアレイ法を組み合わせることにより、網膜新生血管内皮細胞に発現する遺伝子データベースを構築した上で、独自のソフトウェアにより新生血管に特異的な遺伝子群を抽出した。さらに、in situ hybridization 法や遺伝子組換えマウスの解析により、生体内血管新生における各遺伝子の発現部位・機能を同定し、創薬標的分子の絞り込みを行っている。特に、血管内皮細胞の運動を制御すると考えられる低分子量 G 蛋白質、およびその活性化を制御するシグナル伝達分子に注目し、新生血管内皮細胞に特異的に発現するいくつかの新規遺伝子を同定することに成功した。本口演では、新規血管遺伝子を同定するために我々が行ってきた研究内容につき報告する。

ポスター演題 ☆7月11日(月) (※自由討論形式)

NO.	TITLE	NAME
P-1	Analysis of signaling pathways by mass spectrometry	波多野 直哉 質量分析センター GCOE 研究員(リサーチ・アソシエイト)
P-2	Molecular analysis of MMP-13 gene expression by Wnt5a-Ror2 signaling in human osteosarcoma cells	山形 薫 細胞生理学 GCOE 研究員(リサーチ・アソシエイト)
P-3	The projects of UVA effects on DNA damages with Ogg1 KO mice and drug induced cyclobutane pyrimidine dimers on XPA KO mice	国定 充 皮膚科学 GCOE 研究員(リサーチ・アソシエイト)
P-4	The role of TLR4 on innate immunity against H5N1 influenza virus infection	牧野 晶子 人獣共通感染症学 GCOE 研究員(リサーチ・アソシエイト)
P-5	Growth Suppressive Effect of the Liver Plasma Membrane Fraction: Implication for Tumor Dormancy	信谷 健太郎 分子細胞生物学 GCOE 研究員(リサーチ・アソシエイト)
P-6	Role of chondroitin sulfate in experience-dependent plasticity	宮田 真路 薬物動態学 GCOE 研究員
P-7	Role of BMPER in Osteogenic Differentiation of Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells	小林 成美 循環器内科学 GCOE 研究員
P-8	Hepatitis C Virus Infection Promotes Hepatic Gluconeogenesis through an NS5A-Mediated, FoxO1-Dependent Pathway	Deng Lin 微生物学 GCOE 研究員
P-9	Characterization of neutralizing antibody for human herpesvirus 6	河端 暁子 臨床ウイルス学 GCOE 研究員
P-10	Roles of Endothelial Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecules in the Homeostasis of Neurovascular Unit	宮田 宗明 シグナル伝達学 GCOE 研究員
P-11	Roles for post-translational modifications in regulation of the xeroderma pigmentosum group C gene product	秋田 眞季 ゲノム生理学 GCOE 研究員
P-12	Anti-CXCL13 antibody can protects against gastric lymphoid follicles induced by Helicobacter infection	山本 幸司 消化器内科学 GCOE 研究員
P-13	SEQUENCE HETEROGENEITY OF NS5A OF HCV GENOTYPES 2A AND 2B AFFECTS RVR AND SVR TO PEG-IFN/RBV COMBINATION THERAPY	El Shamy Ahemed Mohamed Mossad 微生物学 GCOE 研究員
P-14	Establishment of metabolomics-based diagnostic system for pancreatic diseases.	小林 隆 消化器内科学 GCOE 特別研究員
P-15	Regulation of metabolite profile by an APC gene mutation in colorectal cancer	吉江 智郎 消化器内科学 GCOE・RA(博士課程 4 年)
P-16	Development of MALT lymphoma after “Helicobacter heilmannii” infection	竹中 完 消化器内科学 GCOE・RA(博士課程 4 年)
P-17	Expression and function of chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2 in the development of atherosclerosis	Dyah Samti Mayasari 循環器内科学 GCOE・RA(博士課程 3 年)
P-18	Analysis of human herpesvirus-6(HHV-6)- induced cell signaling and immune suppression	林 麻佑子 臨床ウイルス学 GCOE・RA(博士課程 2 年)
P-19	The Novel Role of Aldosterone on Salt Sensitive	Dwi Aris Agung Nugrahaningsih 循環器内科学 GCOE・RA(博士課程 2 年)
P-20	Reduced heparan sulfate expression contribute to osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cell in vascular calcification	Eko Purnomo 循環器内科学 GCOE・RA(博士課程 2 年)
P-21	Protective role of high-density lipoprotein (HDL) in cardiomyocytes as a novel therapeutic target for heart failure	中島 英人 循環器内科学 GCOE・RA(博士課程 3 年)

ポスター演題（続き） ☆7月11日(月)（※自由討論形式）

NO.	TITLE	NAME
P-22	Elucidation of pancreatic beta-cell fate using inducible Cre/loxP system	田村 香楠子 細胞分子医学 GCOE・RA(博士課程 1 年)
P-23	The understanding of gastrointestinal cancers by metabolomics	氣比 恵 消化器内科学 GCOE・RA(博士課程 2 年)
P-24	The effect of Spirulina platensis on ultraviolet response using mouse model	Flandiana Yogiarti 皮膚科学 GCOE・RA(博士課程 2 年)
P-25	Roles of vascular endothelial protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in endothelial cells	Kemala Isnainiasih Mantilidewi シグナル統合学 GCOE・RA(博士課程 2 年)
P-26	Investigation of molecular mechanisms of athero-protection by regulatory T cells and development of novel strategies for preventing atherosclerosis through modulation of intestinal immune system.	笠原 和之 循環器内科学 GCOE・RA(博士課程 2 年)
P-27	Regulation of Cardiac Homeostasis by Nectin-like Molecule (Nec1)	山名 祥太 循環器内科学 GCOE・RA(博士課程 2 年)
P-28	Role of Nectin-like Molecules(Nec1s) in the Development of Diabetic Nephropathy	福田 旭伸 分子細胞生物学 GCOE・RA(博士課程 1 年)
P-29	Induction of cAMP responsiveness in islet-like structure (pseudoislet) constituted from clonal beta-cells	Wufuerjiang Aini 細胞分子医学 大学院生(博士課程 2 年)
P-30	Roles of Noc2 in GLP-1 secretion	岸本 亜野 細胞分子医学 大学院生(修士課程 2 年)
P-31	Identification of biomarkers for type 2 diabetes by metabolome analysis	吉田 衣里 細胞分子医学 大学院生(修士課程 2 年)
P-32	Hepatitis C virus infection suppresses glucose transporter 2 gene expression by downregulation of hepatocyte nuclear factor 1 α	松井 千絵子 微生物学分野 大学院生(博士課程 1 年)
P-33	Requirement of antigen cross-presentation for lupus tissue injuries: essential role of endosomal trafficking and proteosomal degradation	積山 賢 保健学研究科病態解析学 特命助教
P-34	TNF α modulates the expression of circadian clock genes in RA synovial cells	吉田 幸祐 保健学研究科病態解析学 特命助教
P-35	The de novo revision of TCR α but not TCR β is responsible for generating autoantibody-inducing CD4 ⁺ (aiCD4 ⁺) T cell that causes systemic autoimmunity	生戸 健一 保健学研究科病態解析学 特命助教
P-36	Autoantibody-inducing CD4 ⁺ T (aiCD4 ⁺ T) cell have the important role for the cause of systemic lupus erythematosus	宮崎 由実 保健学研究科病態解析学大学院生(博士課程 2 年)
P-37	Anti-U1RNP autoantibody interferes the splicing of Angiopoietin-1 (Ang-1) and produces the 269Gly inserted splicing variant Ang-1/ins associated with Japanese patients with mixed connective tissue disease (MCTD)	奥山 樹 保健学研究科病態解析学大学院生(修士課程 1 年)