分子発現制御学分野

Division of Cell Biology

分子発現制御学分野 (旧細胞学部門) では , 細胞の基本的性質である細胞周期と細胞死を制御する分子メカニズムを , 遺伝学的・生化学的・細胞生物学的・発生工学的手法を用いて研究を進めている . つまり細胞周期や細胞死の制御に関わっていると推測される分子の遺伝子を単離同定し , 最終的にはその遺伝子を破壊したマウス (ノックアウトマウス) を人工的に作製し , その異常を調べることによって , その分子の生理的役割を個体レベルで明らかにしようというものである . 特に免疫系と神経系の細胞の分化段階特異的な細胞周期と細胞死の制御因子の量的制御機構を , 選択的タンパク質分解の視点から取り組んでいる .

分子発現制御学分野は昨年に引き続き , 中山敬一教授 , 畠山鎮次助教授 , 嘉村巧助手 (2004 年 1 月より助教授に昇任) の教官を中心に大学院生 (12 名), さきがけ研究者 (1 名), 21 世紀 COE 上級研究員 (1 名), 日本学術振興会特別研究員 (1 名), 科学技術振興事業団派遣職員 (研究員 2 名 , 技術員 1 名 , 研究補助員 6 名 , 事務員 1 名) の体制で研究を進めている (2004 年 3 月 31 日現在).

その他の人事異動について ,新規参加者としては大学院生として 2003 年 4 月より雑賀徹(鳥大・医) が入学した . また 2003 年 10 月より白根道子 (それまで 21 世紀 COE 上級研究員) がさきがけ研究員に選ばれた . さらに恒松良祐と矢田雅佳 (前年度まで大学院生) を科学技術振興事業団派遣職員 (研究員) として 2003 年 4 月より雇用した (恒松良祐は 2003 年 10 月より２１世紀 COE 研究員に変更した). また西村直子 (前年度まで科学技術振興事業団派遣職員)

を研究支援推進員として雇用した．さらに科学技術振興事業団派遣職員（研究補助員）として篠原都子，光安理恵，倉光美恵を 2003 年 4 月より雇用した．また科学技術振興事業団派遣職員（事務員）として太田茜を 2003 年 11 月より雇用した．

次いで退職者として 2003 年 3 月末で大学院生の原太一，押川（旧姓金子）千恵が学位取得の上卒業した．また科学技術振興事業団派遣職員（研究補助員）であった石田典子は，2003 年 7 月 1 日付けで東北大学大学院医学系研究科助手として転任した．さらに日本学術振興会特別研究員であったアバスフォトバティは 2003 年 9 月 30 日に任期満了に伴い退職し，久留米大学医学部へ転任した．同じく日本学術振興会特別研究員であった押川清孝は，2004 年 3 月 31 日で退職し，徳島大学医学部へ転任した．科学技術振興事業団派遣職員（研究補助員）であった松下純恵と下原田加代子はそれぞれ 2003 年 4 月 30 日，9 月 30 日に退職した．科学技術振興事業団派遣職員（事務員）であった杉田知栄子は 2003 年 12 月 31 日に退職した．

1997 年 11 月より当研究室は科学技術振興事業団（JST）による戦略的創造研究推進事業（CREST）「脳を守る」の支援を受けていたが，2002 年 10 月 31 日をもって当研究課題は終了した．しかし 2002 年 11 月 1 日より，戦略的創造研究推進事業（CREST）「生物の発生・分化・再生」から引き続き支援を受けることが決定した．そこで研究員として恒松良祐（2003 年 4 月より），矢田雅佳（2003 年 4 月より），技術員として小山田浩二（継続），研究補助員として矢田（旧姓安河内）亮子（継続），下原田加代子（継続），松下純恵（継続），篠原都子（2003 年 4 月より），光安理恵（2003 年 4 月より），倉光美恵（2003 年 4 月より），木村美保子（継続），事務員として杉田知栄子（継続），太田茜（2003 年 11 月より）を JST 派遣職員として受

け入れている．

A．Skp2 の発現調節機構に関する解析

p27 のユビキチン化を司る酵素のコンポーネントである Skp2 は S〜G2 期に主に発現しており，それには mRNA 転写量の調節とタンパク質分解による調節があるらしいことが知られていた．われわれはこの転写レベルでの調節機構を詳細に調べる目的で，Skp2 遺伝子をクローニングし，その上流領域を調べたところ，転写開始点より-207〜-102 の領域を欠損することによってプロモーター活性が著しく低下することが判明した．さらに詳細に変異実験を行うことにより，-175〜-153 の間にトランス因子が結合し，転写量を増大させていることが示唆された．この領域には GA-binding protein（GABP）結合配列が含まれており，抗 GABP 抗体により EMSA 解析を行うと，スーパーシフトが検出された．GABP の Skp2 プロモーターへの結合は細胞周期特異的であり，GABP をある一定量比で過剰発現させると Skp2 の発現量が増大し，逆に siRNA を用いて GABP をノックダウンすると Skp2 の転写量が減少することから，GABP が細胞周期特異的な Skp2 遺伝子発現量の調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなった．

B．Skp2 の新たな標的としての p57 の発見

細胞周期ブレーキ p27 の類似分子である p57 については，現在までその発現制御機構がほとんど明らかになっていなかった．われわれは HeLa 細胞において p57 がユビキチン依存的に分解することを見出した．p57 は p27 と構造的に類似し，特にその分解調節領域（Degron）の配列がよく保存されていることから，p27 と同様 Skp2 によって認識され，ユビキチン化される

のではないかと仮定した．まず Skp2 ノックアウトマウスの中では p57 の蓄積が認められ，分解時間を計ると確かにSkp2 ノックアウトマウスではp57 の半減期が延長していた .さらにp57 は Skp2 に物理的に結合すること，それはスレオニン 310 番のリン酸化によること，等を生化学的に明らかにした．Skp2 を過剰に発現させると p57 の分解速度は速くなる．最終的に in vitro で p57 のユビキチン化反応を再構築することに成功し，恐らくスレオニン 310 番をリン酸化すると思われるサイクリン E･ CDK2 を同時に加えることにより，強力にユビキチン化が進むことが観察された .これらのことから p57 も p27 と同様に Skp2 の標的であることが明らかとなった．またわれわれと他グループとの共同研究により，p21 や p130 のユビキチン化にも Skp2 が重要な役割を果たしていることが示され，Skp2 は多くの細胞周期ブレーキを同時に破壊することによって細胞周期を進める強力な増殖促進分子であることが判明した．

C．β -TrCP1 ノックアウトマウスの作製と解析

SCF 複合体型ユビキチンリガーゼ (E3) は 4 量体から構成されるが，そのうち可変型コンポーネントである F-box タンパク質の一つβ-TrCP は最も初期から研究されてきた F-box タンパク質であり，従来βカテニンや IκBαをユビキチン化する機能があると考えられてきた．われわれはこのβ-TrCP 遺伝子のうち，β-TrCP1 遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製し，その解析を行った .β-TrCP1 ノックアウトマウスは予想に反して正常に発生し ,組織病理学的な異常は検出されなかった．生化学的には IκBαや IκBβの分解が部分的に遅延しており，NF-κB のβカテニンの核内における分解が障害され，Wnt 刺激後かなりの時間が経っても核内βカテニンの消失が認められないこと，等が認められた．このような予想外の軽微な異常は，恐らく類似の分子であ

るβ-TrCP2 の存在によるものであることが推測された．

D．ポリグルタミン病原因産物のユビキチン化に関わるユビキチン鎖伸長因子 E4B

ユビキチン鎖伸長因子(E4)は数年前に出芽酵母で初めて同定された全く新しいタイプのユビキチン化酵素であるが，高等生物においてはその存在や機能に関しては全く未知であった．われわれはポリグルタミン病の一つマシャドジョセフ病 (脊髄小脳変性症 3 型) の原因遺伝子産物 MJD1 がユビキチン化されることを明らかにした．その酵素を探索する過程で，酵母の E4 である Ufd2 に類似した分子 E4B/UFD2a が MJD1 のユビキチン化に必須であることを明らかにした．E4B は MJD1 の分解過程にとって律速段階の酵素であり，E4B の過剰発現は異常 MJD1 の分解速度を飛躍的に早め ,逆にドミナントネガティブ型の E4B(E4BΔ U)の過剰発現は MJD1 の分解を抑制する．この生化学的特性は細胞内での MJD1 の凝集性ともよく相関する．即ち，E4B を過剰発現させると異常 MJD1 は消失し，逆に E4BΔ U を過剰発現させると MJD1 の凝集は明らかに促進される．さらにこの現象を生体レベルで確認するため，ショウジョウバエの複眼に異常 MJD1 を発現させ，E4B の共発現の効果を検討した．E4B の共発現は異常 MJD1 による複眼の変性を抑制したことから ,E4B の効果は生体内でも有効であり ,最終的にヒトにおいて患者への遺伝子治療がこの神経変性疾患の根本的治療法に成りうることが示唆された．

業績目録

原著論文

1. Nakayama, K., Hatakeyama, S., Maruyama, S., Kikuchi, A., Onoe, K., Good, R. A., Nakayama, K. I. 2003.
Impaired degradation of inhibitory subunit of NF-κB (IκB) and β-catenin as a result of targeted disruption of the β-TrCP1 gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100, 8752-8757.
2. Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nakayama, K. I. 2003.
Degradation of $p57^{Kip2}$ mediated by SCF^{Skp2}-dependent ubiquitylation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100, 10231-10236.
3. Kitamura, K., Mizuno, K., Etoh, A., Akita, Y., Miyamoto, A., Nakayama, K. I., Ohno, S. 2003.
The second phase activation of protein kinase Cδ at late G1 is required for DNA synthesis in serum-induced cell cycle progression.
Genes Cells 8, 311-324.
4. Oshikawa, K., Matsumoto, M., Yada, M., Kamura, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. 2003.
Preferential interaction of TIP120A with Cul1 that is not modified by NEDD8 and not associated with Skp1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 303, 1209-1216.
5. Imaki, H., Nakayama, K., Delehouzee, S., Handa, H., Kitagawa, M., Kamura, T., Nakayama, K. I. 2003.
Cell cycle-dependent regulation of the Skp2 promoter by GA-binding protein.
Cancer Res. 63, 4607-4613.
6. Zhang, Y. W., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Morita, I. 2003.
A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2).
Cancer Res. 63, 1623-1630.
7. von der Lehr, N., Johansson, S., Wu, S., Bahram, F., Castell, A., Cetinkaya, C., Hydbring, P., Weidung, I., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Soderberg, O., Kerppola, T. K., Larsson, L. G. 2003.
The F-Box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription.
Mol. Cell 11, 1189-1200.
8. Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M., Hershko, A. 2003.
Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of $p21^{Cip1}$ in S phase.
J. Biol. Chem. 278, 25752-25757.
9. Foster, J. S., Fernando, R. I., Ishida, N., Nakayama, K. I., Wimalasena, J. 2003.
Estrogens down-regulate $p27^{Kip1}$ in breast cancer cells through Skp2 and through nuclear export mediated by the ERK pathway.

J. Biol. Chem. 278, 41355-41366.

10. Chang, T. S., Kim, M. J., Ryoo, K., Park, J., Eom, S. J., Shim, J., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Tomita, M., Takahashi, K., Lee, M. J., Choi, E. J. 2003.
p57^{KIP2} modulates stress-activated signaling by inhibiting c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein Kinase.
J. Biol. Chem. 278, 48092-48098.
11. Kato, K., Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Aoki, K., Ishikawa, F., Takase, K., Ariyama, H., Matsuda, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Gondo, H., Nakayama, K. I., Harada, M. 2003.
Intracellular signal transduction of interferon on the suppression of haematopoietic progenitor cell growth.
Br. J. Haematol. 123, 528-535.
12. Aoki, K., Shimoda, K., Oritani, K., Matsuda, T., Kamezaki, K., Muromoto, R., Numata, A., Tamiya, S., Haro, T., Ishikawa, F., Takase, K., Yamamoto, T., Yumioka, T., Miyamoto, T., Nagafuji, K., Gondo, H., Nagafuchi, S., Nakayama, K. I., Harada, M. 2003.
Limitin, an interferon-like cytokine, transduces inhibitory signals on B-cell growth through activation of Tyk2, but not Stat1, followed by induction and nuclear translocation of Daxx.
Exp. Hematol. 31, 1317-1322.
13. Watahiki, J., Yamaguchi, T., Irie, T., Takahashi, K., Nakano, H., Yagasaki, Y., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Maki, K., Tachikawa, T. 2003.
The role of p57^{Kip2} on mandibular growth in mice: By means of laser microdissection for hard tissues.
Orthod. Waves 62, 201-206.
14. Tsukuba, T., Okamoto, K., Okamoto, Y., Yanagawa, M., Kohmura, K., Yasuda, Y., Uchi, H., Nakahara, T., Furue, M., Nakayama, K., Kadowaki, T., Yamamoto, K., Nakayama, K. I. 2003.
Association of cathepsin e deficiency with development of atopic dermatitis.
J. Biochem. 134, 893-902.
15. Uchida, D., Hatakeyama, S., Matsushima, A., Han, H., Ishido, S., Hotta, H., Kudoh, J., Shimizu, N., Doucas, V., Nakayama, K. I., Kuroda, N., Matsumoto, M. 2004.
AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase.
J. Exp. Med. 199, 167-172.
16. Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M., Nakayama, K. I. 2004.
Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4.
EMBO J. 23, 659-669.
17. Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y. A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K. I., Aaronson, S. A., Lee, S. W. 2004.

ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway.
Nat. Cell Biol. 6, 121-128.

18. Tsunematsu, R., Nakayama, K., Oike, Y., Nishiyama, M., Ishida, N., Hatakeyama, S., Bessho, Y., Kageyama, R., Suda, T., Nakayama, K. I. 2004.
Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for Notch degradation during vascular development.
J. Biol. Chem. 279, 9417-9423.

総説

1. Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. 2003.
Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins.
J. Biochem. 134, 1-8.

2. 神武洋二郎, 中山敬一. 2003.

CDK インヒビターp27^{Kip1}のタンパク質分解による制御機構.

遺伝子医学 7, 231-237.

3. 原太一, 中山敬一. 2003.

細胞周期制御における CDK インヒビターp27^{Kip1}のタンパク質分解制御.

化学工業 54, 507-513.

4. 矢田雅佳, 中山敬一. 2003.

がんとユビキチン・プロテアソームシステム.

最新医学 (増刊)「臨床遺伝子学'03」 58, 2155-2165.

5. 松本雅記, 中山敬一. 2003.

安定同位体代謝ラベル法によるディファレンシャル・プロテオミクス.

実験医学 21, 2239-2244.

6. 押川清孝, 中山敬一. 2003.

PKC-δ 遺伝子欠損マウスと自己免疫疾患.

臨床免疫 40, 557-562.

7. 洲崎悦生, 中山敬一. 2003.

細胞周期の制御因子 $p27^{Kip1}$ と分解異常と癌.

Biotherapy 17, 546-555.

8. 西山正章, 白根道子, 中山敬一. 2004.

RNAi 技術を用いたアポトーシス経路の解明.

Molecular Medicine 41, 50-58.

9. 洲崎悦生, 中山敬一. 2004.

多発性骨髄腫の病態における NF-κB シグナルとユビキチン-プロテアソームシステム.

血液・腫瘍科 48, 255-261.

著書

1. 押川清孝, 中山敬一. 2003.

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免疫疾患

Annual Review 免疫 2004(奥村康・平野俊夫・佐藤昇志　編、中外医学社、東京)35-41

2. 松本雅記, 中山敬一. 2004.

定量のための標識法　B) in vivo ラベル法

実験医学 (別冊)「決定版！プロテオーム解析マニュアル」(礒辺俊明・高橋信弘　編、羊土社、東京) 125-132

3. 松本雅記, 中山敬一. 2004.

ユビキチン化修飾解析法

実験医学 (別冊)「決定版！プロテオーム解析マニュアル」(礒辺俊明・高橋信弘　編、羊土社、東京) 158-166

学会発表

1. 中山敬一 （2003，4/6）.

ノックアウトマウス作製によるユビキチンリガーゼの機能解析 .(シンポジウム)

日本医学会総会「蛋白質分解と分子細胞医学」, 福岡 .

2. Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Yada, M., Nakayama, K. I. （2003，4/24）.

Molecular interactions of U-box type ubiquitin ligase (E3) with molecular chaperones .

Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family" , Cold Spring Harbor, NY .

3. Kaneko, C., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Yada, M., Nakayama, K., Nakayama, K. I. （2003，4/24）.

Mice lacking UFD2a, a polyubiquitin chain assembly factor (E4), display cardiac apoptosis during development .

Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family" , Cold Spring Harbor, NY .

4. Kamura, T., Nakayama, K. I. （2003，4/25）.

Identification of a ubiquitin ligase, KPC, that regulates proteolysis of $p27^{Kip1}$ at the G0-G1 transition .(Invited speaker)

Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family" , Cold Spring Harbor, NY .

5. Okumura, F., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. （2003，4/25）.

Functional regulation of neurite inducer FEZ1 by U-box type ubiquitin ligase UFD2a .

Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family" , Cold Spring Harbor, NY .

6. Takahashi, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. （2003 , 4/25 ） .

SUMO-1 modification of thymine DNA glycosylase enhances its binding activity with PML .

Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family" , Cold Spring Harbor, NY .

7. Tsunematsu, R., Nakayama, K., Nishiyama, M., Oike, Y., Ishida, N., Hatakeyama, S., Bessho, Y., Kageyama, R., Suda, T., Nakayama, K. I. （2003 , 4/26 ） .

Target disruption of mouse Cdc4/Fbw7 results in abnormal vascular development by impaired degradation of Notch .(Invited speaker)

Cold Spring Harbor Symposium "The Ubiquitin Family" , Cold Spring Harbor, NY .

8. 中山敬一 （2003 , 5/13 ） .

細胞周期ブレーキ p27 の分解機構 .(シンポジウム)

日本分子生物学会第 3 回春季シンポジウム , 米子 .

9. 中山敬一, 白根道子 （2003 , 5/15 ） .

Bcl-2 のミトコンドリア局在を決定するイムノフィリン FKBP38 .(シンポジウム)

第 56 回日本生化学会大会 , 大津 .

10. 中山敬一 （2003 , 5/16 ） .

ポリグルタミン病タンパク質を分解する分子メカニズムの解明 .(シンポジウム)

第 44 回日本神経学会総会 , 横浜 .

11. Nakayama, K. I. （2003 , 5/30 ） .

Regulation of cell cycle by proteolysis of CDK inhibitor p27 .(Invited speaker)

The 2nd CREST Symposium on "Development, Differentiation and Regeneration" , Tokyo, Japan .

12. Taniuchi, I., Littman, D. R., Nakayama, K. I. (2003 , 5/30) .

Epigenetic gene regulation by Runt domain transcriptional factors .

The 2nd CREST Symposium on "Development, Differentiation and Regeneration" , Tokyo, Japan .

13. Shirane, M., Nakayama, K. I. (2003 , 5/30) .

Novel FYVE finger protein protrudin induces the protrusion in cells .

The 2nd CREST Symposium on "Development, Differentiation and Regeneration" , Tokyo, Japan .

14. Matsumoto, M., Nakayama, K. I. (2003 , 5/30) .

Systematic identification of ubiquitin-related proteome .

The 2nd CREST Symposium on "Development, Differentiation and Regeneration" , Tokyo, Japan .

15. Kaneko, C., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Yada, M., Nakayama, K., Nakayama, K. I. (2003 , 5/30) .

Mice lacking UFD2a, a polyubiquitin chain assembly factor (E4), display cardiac apoptosis during development .

The 2nd CREST Symposium on "Development, Differentiation and Regeneration" ,

Tokyo, Japan .

16. Okumura, F., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. （2003 , 5/30 ） .

Functional regulation of neurite inducer FEZ1 by U-box type ubiquitin ligase UFD2a .

The 2nd CREST Symposium on "Development, Differentiation and Regeneration" ,

Tokyo, Japan .

17. Tsunematsu, R., Nakayama, K., Nishiyama, M., Oike, Y., Ishida, N., Hatakeyama, S., Bessho, Y., Kageyama, R., Suda, T., Nakayama, K. I. （2003 , 5/30 ） .

Targeted disruption of mouse Cdc4/Fbw7 results in abnormal vascular development by impaired degradation of Notch .

The 2nd CREST Symposium on "Development, Differentiation and Regeneration" ,

Tokyo, Japan .

18. Nishiyama, M., Nakayama, K., Tsunematsu, R., Kikuchi, A., Nakayama, K. I. （2003 , 5/30 ） .

β-catenin-binding protein Duplin is essential at gastrulation during mouse development .

The 2nd CREST Symposium on "Development, Differentiation and Regeneration" ,

Tokyo, Japan .

19. 中山敬一 （2003 , 6/21 ） .

細胞周期ブレーキ p27 の分解機構と癌 .(特別講演)

第 79 回北海道癌談話会 , 札幌 .

20. 中山敬一 （2003 , 7/29 ） .

プロテオミクスを用いたタンパク質翻訳後修飾の解析 .(招待講演)

動物の遺伝子導入とその応用の開発研究会· 第 41 回定例会「プロテオミクス研究最前線」, 東京 .

21. 中山敬一 （ 2003 , 9/5 ） .

ユビキチン化による細胞周期の制御メカニズム .(基調講演)

第 7 回 Molecular Cardiovascular Conference , キロロ .

22. 中山啓子, 中山敬一 （ 2003 , 9/25 ） .

ノックインマウスを用いた p27 セリン 10 残基リン酸化についての検討 .(一般口演)

第 62 回日本癌学会総会 , 名古屋 .

23. 中山敬一 （ 2003 , 9/26 ） .

Mechanisms to control degradation of polyglutamine-containing protein .(シンポジウム)

第 46 回日本神経化学会 , 新潟 .

24. 中山敬一 （ 2003 , 9/27 ） .

細胞周期のブレーキ p27 の分解機構と がん .(モーニングレクチャー)

第 62 回日本癌学会総会 , 名古屋 .

25. 中山敬一, 白根道子 （ 2003 , 9/29 ） .

Bcl-2 の局在を決定するイムノフィリン FKBP38 .(招待講演)

平成 15 年度生理学研究所研究会「細胞死の誘導と制御-その分子機構と生理病理機能」, 岡

崎 .

26. 中山敬一 （2003，10/1）.

細胞増殖を制御するユビキチンリガーゼ群 .(特別講演)

国立遺伝学研究所研究集会「ユビキチン化を介した DNA 損傷応答のメカニズム」, 三島 .

27. Nakayama, K. I. （2003，10/28）.

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

Proteolysis in Cellular Regulation , Tokyo, Japan .

28. 中山敬一 （2003，11/1）.

静止期から増殖期へ：細胞周期エンジンがスタートするとき .(特別講演)

第 7 回キリン血液疾患セミナー，東京 .

29. Nakayama, K. I. （2003，12/1）.

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

COE International Symposium "Genome Stability and Mechanism of Chromosome Segregation" , Otsu, Japan .

30. 中山敬一, 矢田雅佳, 恒松良祐, 西山正章, 畠山鎮次, 中山啓子 （2003，12/10）.

癌タンパク質 Skp2 と癌抑制タンパク質 Sel-10 : 細胞周期を制御する二つの F-box タンパク質 .(シンポジウム)

第 26 回日本分子生物学会年会，神戸 .

31. 安達(玉盛)三美, 林田健太郎, 大水智恵, 中山敬一, 北嶋繁孝 （2003，12/10）.

Skp2 依存性 p27 分解低下による心筋細胞増殖抑制機構の解析 .(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会，神戸．

32. 神武洋二郎, 石田典子, 中山啓子, 中山敬一 （2003，12/10）．

p27 の局在および安定性に関与するセリン 10 リン酸化のノックインマウスを用いた機能解析．(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会，神戸．

33. 西山正章, 中山啓子, 恒松良祐, 菊池章, 中山敬一 （2003，12/10）．

β-Catenin 結合タンパク Duplin は原腸形成期におけるマウスの発生に必須である．(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会，神戸．

34. 畠山鎮次, 中山敬一 （2003，12/10）．

人工ユビキチンリガーゼによる Myc の特異的分解を利用した癌治療法の確立．(シンポジウム)

第 26 回日本分子生物学会年会，神戸．

35. 矢田雅佳, 畠山鎮次, 嘉村巧, 西山正章, 奥村文彦, 今木裕幸, 石田典子, 中山敬一（2003，12/11）．

二つの F-box タンパク質 Skp2 と Sel-10 によるがん遺伝子産物 c-Myc のユビキチン化機構．(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会，神戸．

36. 松本雅記, 小山田浩二, 畠山鎮次, 中山敬一 （2003，12/11）．

タンパク質翻訳後修飾のプロテオミクス解析 .(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

37. 原太一, 嘉村巧, 中山敬一 （2003 , 12/11）.

UBL-UBA タンパク質 KPC2 の $p27^{Kip1}$ 初期分解における役割の解明 .

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

38.小松朋子, 水崎博文, 向井徳男, 小川英知, 白川昌宏, 畠山鎮次, 中山敬一, 山本英樹, 菊池章,

諸橋憲一郎 （2003 , 12/12）.

Ad4BP/SF-1 の SUMO 化による協調的な転写活性化の制御 .(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

39. 中山啓子, 永濱裕康, 南嶋洋司, 石田典子, 中山敬一 （2003 , 12/12）.

遺伝子改変マウスを用いた細胞周期と細胞サイズについての解析 .(シンポジウム)

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

40. 押川清孝, 松本雅記, 矢田雅佳, 嘉村巧, 畠山鎮次, 中山敬一 （2003 , 12/12）.

Cul1 結合タンパク質 TIP120A は SCF 複合体形成を負に制御している .(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

41. 多田敬典, 岡野ジェイムズ洋尚, 中山敬一, 鹿島晴雄, 岡野栄之 （2003 , 12/12）.

神経系特異的新規ユビキチンリガーゼの機能解析 .

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

42. 嘉村巧, 原太一, 矢田雅佳, 中山啓子, 中山敬一 （2003 , 12/13）.

細胞増殖抑制因子 p27 の新たな分解因子の分離精製及び解析 .(シンポジウム)

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

43. 石田典子, 神武洋二郎, 中山啓子, 中山敬一 （ 2003 , 12/13 ） .

細胞内局在変化による p27 蛋白安定性の調節 .(シンポジウム)

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

44. 奥村文彦, 畠山鎮次, 中山敬一 （ 2003 , 12/13 ） .

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 .(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

45. 黒田範行, 内田大亮, 畠山鎮次, 松島明美, 石戸聡, 工藤純, 清水信義, 中山敬一, 松本満 （ 2003 , 12/13 ） .

AIRE(autoimmune regulator)は PHD ドメインを介して Ubiquitin E3 ligase 活性を発揮する .(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

46. 高橋秀尚, 畠山鎮次, 中山敬一 （ 2003 , 12/13 ） .

TDG の SUMO-1 との非共有結合は Nuclear body への局在化に必要である .(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会 , 神戸 .

47. 白根道子, 中山敬一 （ 2003 , 12/13 ） .

FYVE ドメインタンパク質 Protrudin と PI(5)P による神経突起形成機構 .(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会，神戸．

48. 金子千恵, 畠山鎮次, 松本雅記, 矢田雅佳, 中山啓子, 中山敬一 （2003，12/13）．

ユビキチン鎖伸長因子 E4B のノックアウトマウスによる解析．(一般口演)

第 26 回日本分子生物学会年会，神戸．

49. 中山敬一, 松本雅記 （2004，3/15）．

リン酸化とユビキチン化：タンパク質修飾のプロテオミクス．(招待講演)

プロテオミクス研究の最前線　〜熊本からの発信〜，熊本．

職員学生名簿 (2004 年 3 月 31 日現在)

分子発現制御学分野

教　　授	中山　敬一
助　教　授	畠山　鎮次
助　教　授	嘉村　巧
さきがけ研究者	白根　道子
学術振興会特別研究員	松本　雅記
学術振興会特別研究員	押川　清孝
21 世紀 COE 研究員	恒松　良祐
科技団派遣職員・研究員	矢田　雅佳
大学院生	原　太一
大学院生	押川　千恵
大学院生	高橋　秀尚
大学院生	西山　正章
大学院生	神武　洋二郎
大学院生	奥村　文彦
大学院生	栄　信孝

大学院生	洲崎　悦生
大学院生	小野山　一郎
大学院生	事柴　周平
大学院生	藤井　洋
大学院生	雑賀　徹
研究支援推進員	西村　直子
科技団派遣職員・研究補助員	矢田　亮子
科技団派遣職員・研究補助員	篠原　都子
科技団派遣職員・研究補助員	光安　理恵
科技団派遣職員・研究補助員	倉光　美恵
科技団派遣職員・研究補助員	木村　美保子
科技団派遣職員・事務員	太田　茜

増殖分化制御学分野

Division of Biochemistry and Molecular Biology

細胞は様々な外的刺激に対して多様な応答を示すが，情報の多様性に対し，伝達機構を構成する蛋白質は，分子構造から見ると基本的な幾つかのモジュール構造からなっていることが明らかになりつつある．この基本構造を介した分子間相互作用が，蛋白質上で統合されることで情報伝達機構の複雑な制御を可能にしていると考えられる．

このような観点から，増殖分化制御学分野では，細胞内情報伝達機構解明の良いモデルとして，食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化機構の研究を生化学的・分子生物学的・細胞生物学的手法を用いて行うとともに，構造生物学研究を構造生物学者とのコラボレーションにより進めている．更には，特に蛋白質のドメイン構造とその分子間相互作用の視点から，細胞の極性形成や細胞骨格の制御といった方面の細胞内情報伝達の研究にも取り組んでいる．

A．食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化の分子機構

食細胞 NADPH オキシダーゼは，病原性微生物の貪食時などにスーパーオキシド（高殺菌能をもつ種々の活性酸素の前駆物質）を生成する酵素系であり，その酵素本体は細胞膜に存在するシトクロム b_{558}（gp91^{phox} と p22^{phox} の 2 つのサブユニットから成る）である．オキシダーゼは細胞休止時には不活性型であり，その活性化には，特異的アダプター蛋白質(p47^{phox}，p67^{phox} と p40^{phox}:それぞれ SH3 ドメインをもつ)と低分子量 G 蛋白質 Rac が刺激依存性に細胞質から細胞膜に移行してシトクロム b_{558} と相互作用する必要がある．私達はこの系に関してアダプター蛋白

質による活性化機構を中心に研究を行ない，2003 年は以下のような成果を得ている．

シトクロム b_{558} と細胞質因子の相互作用は，p47^{phox} の SH3 ドメインと p22^{phox} 細胞質領域の proline-rich region(PRR)との結合に依存し ,この結合は NADPH オキシダーゼ活性化の ON/OFF を担う．私達は，更に，p47^{phox} の 2 つの SH3 ドメインが p22^{phox} の PRR を挟むように結合していることを明らかにした [投稿中]．また，p47^{phox} の SH3 ドメインは分子内相互作用によりその標的である p22^{phox} と結合できない状態になっている (autoinhibitory form) が，この form の 3 次構造決定も稲垣冬彦教授 (北大薬) との共同研究により決定した [Yuzawa *et al.*, 2004]．また，p47^{phox} の N 末領域に存在する PX ドメインが，phosphoinositides 結合能をもち，p47^{phox} の膜移行およびオキシダーゼ活性化に必須であることを示すとともに ,PX ドメインが SH3 ドメインとの分子内結合により負に制御されていることを明らかにした [Ago *et al.*, 2003]．

p67^{phox} の C 末 SH3 ドメインは p47^{phox} の PRR に結合するが，この結合には PRR 以外にその更にC末の領域が必要であること ,この結合はPRR近傍のリン酸化により制御されていること，それが食細胞 NADPH オキシダーゼの活性化調節に重要であること等を明らかにした [投稿中]．また，p47^{phox} と p67^{phox} の間には，上記以外に更に 2 つの (p47^{phox} の SH3 ドメインを介した) 比較的弱い相互作用が存在することを見い出している．

p40^{phox} は休止時細胞で p67^{phox} と会合しているが，この結合は，p67^{phox} の PB1 ドメイン (私達が見い出した新規なドメイン)と p40^{phox} の PC モチーフの間の全く新しいタイプの蛋白質間相互作用によるものであり，更に「p40^{phox} が，この相互作用によって，p67^{phox} と p47^{phox} の膜移行を促進させ，オキシダーゼ活性化を正に制御していること」を私達は示していた．2003 年は，PC

モチーフはあるタイプの PB1 ドメインに提示されるモチーフであることを明らかにした．則ち，PC モチーフを持たないタイプの PB1 ドメインがその保存されたリジン残基によって，別のタイプの PB1 ドメインの PC モチーフを認識し結合する (PB1−PB1 相互作用) わけである [Noda *et al.*，2003；Yoshinaga *et al.*，2003]．また，PC モチーフを持つタイプの PB1 ドメイン (酵母細胞極性蛋白質 Cdc24p と哺乳類細胞極性蛋白質 PKCι/λ) の 3 次構造を稲垣冬彦教授 (北大薬) との共同研究により決定した [Yoshinaga *et al.*，2003；Hirano *et al.*，2004]．

B．新規 NAD(P)H オキシダーゼの同定

gp91^{phox}は，N 末の 6 つの膜貫通領域 (ヘム結合部位を含む) と，C 末の FAD 結合ドメイン及び NADPH 結合ドメインからなる．現在，ヒトでは，私達が新規にクローニングした Nox4 を含め 5 つの gp91^{phox}ホモログが存在することが知られており、Nox (NA(D)PH オキシダーゼ) ファミリーと呼ばれている．しかしながら，gp91^{phox} (Nox2) 以外のオキシダーゼについては，その活性調節機構は殆ど分っていなかった．私達は，p47^{phox}及び p67^{phox}それぞれの新規ホモログを同定クローニングし (p41^{nox}及び p51^{nox}と命名)，これらが協同して gp91^{phox}/Nox2 や Nox1 を活性化しうることを見い出した [Takeya *et al.*，2003]．p41^{nox}と p51^{nox}は Nox1 に対する活性化能が高く，p47^{phox}と p67^{phox}は gp91^{phox}/Nox2 に対する活性化能が高い．また， p47^{phox}，p67^{phox}，及びそれぞれの新規ホモログが ,Nox3 の活性調節にも関与することを明らかにしている [投稿準備中]．

C．細胞極性決定の分子機構

私達は，線虫の極性決定に関与する蛋白質 Par6 のヒトホモログ 3 種をクローニングし，ヒト Par6 が，GTP 結合型の Rac/Cdc42 および atypical PKC （aPKC）と 3 者複合体を形成すること等を明らかにしていたが，2003 年は，Par6 と aPKC の結合は，先の A で述べた「PB1−PB1 相互作用」によるものであることを見出し [Noda *et al.*,2003]，この結合が上皮細胞の tight junction 形成に必要であることを示した．更に，稲垣冬彦教授（北大薬）との共同研究により、aPKC の 1 つである PKCι/λの PB1 ドメインの 3 次構造を決定するとともに [Hirano *et al.*, 2004]，Par6α の PB1 ドメインと PKCι/λの PB1 ドメインとの複合体の構造を解くことにも成功した [投稿準備中]．また，私達は aPKC や Par6 と結合して細胞極性決定に関与する Par3 の新規ホモログをクローニングし（Par3βと命名），Par3βが tight junction に局在すること等を見い出していたが、Par3βと Par3αは共に tight junction 形成に必須であること，この過程には新規な蛋白質−脂質相互作用が関与すること等を明らかにした [投稿中]．Par3 結合蛋白質を酵母 two-hybrid 法でスクリーニングして得られた 14-3-3 蛋白質（β，ε，θ，ζ等の分子種）が実際に Par3αと Par3βの両者に結合することを明らかにし，この結合が tight junction 形成に重要であることを示した [投稿準備中]．

D．formin 関連蛋白質 Fhos の機能解析

好中球の食作用は、遊走、捕食そして殺菌という一連の過程からなる複雑な細胞現象であり、各過程は細胞骨格のダイナミックな再構築を通じて密接に関連しているが、その連関機構には不明な点が多い。このような観点から、脾臓及び血球系細胞で高発現している新規 formin 相同蛋白質 Fhos について研究を進めている。formin 相同蛋白質は、四肢形成異常を来す変異マウスの原因遺伝子として報告された formin との相同性領域 FH(formin homology)1 及び 2 ドメイ

ンを有している蛋白質群であり、形態形成や極性形成、細胞質分裂に機能する。近年、酵母の formin 相同蛋白質が Rho ファミリーGTP 結合蛋白質の下流で、アクチン分子の核化・重合を促進することが示されている。私達は、Fhos がその N 末領域でアクチン繊維と直接結合してアクチン細胞骨格を制御することを見いだすと同時に、FH2 ドメインが直接相互作用し Fhos 同士の細胞内での相互作用に関与することを明らかにした[Takeya and Sumimoto, 2003]。さらに、Fhos1 と相同性の高い新規蛋白質 Fhos2 を単離し、Fhos1 とは異なる生化学的・生物学的特徴を有していることを見いだしている[投稿準備中]。また、Fhos の微小管細胞骨格との相互作用の分子機構に関しても研究を進めている。

業績目録

原著論文

1. Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D., and Sumimoto, H. 2003.
   Phosphorylation of $p47^{phox}$ directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation.
   Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4474–4479 (track II).
2. Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nunoi, H., and Sumimoto, H. 2003.
   Novel human homologues of $p47^{phox}$ and $p67^{phox}$ participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases.
   J. Biol. Chem. 278, 25234–25246.
3. Takeya, R., and Sumimoto, H. 2003.
   Fhos, a mammalian formin, directly binds to F-actin via the N-terminal region and forms a homotypic complex via the FH2 domain to promote actin fiber formation.
   J. Cell Sci. 116, 4567–4575.
4. Yoshinaga, S., Kohjima, M., Ogura, K., Yokochi, M., Takeya, R., Ito, T., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2003.
   The PB1 domain and the PC motif-containing region are structurally similar protein binding modules.
   EMBO J. 22, 4888–4897.
5. Noda, Y., Kohjima, M., Izaki, T., Ota, K., Yoshinaga, S., Inagaki, F., Ito, T., and Sumimoto, H. 2003.
   Molecular recognition in dimerization between PB1 domains.
   J. Biol. Chem. 278, 43516–43524.

6. Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2003.
Crystallization and preliminary crystallographic analysis of autoinhibited form of tandem SH3 domain of p47^{phox}.
Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 59, 1479–1480.
7. Etoh, T., Inoguchi, T., Kakimoto, M., Sonoda, N., Kobayashi, K., Kuroda, J., Sumimoto, H., and Nawata, H. 2003.
Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility in interventive insulin treatment.
Diabetologia 46, 1428–1437.
8. Mizukami, Y., Sumimoto, H., and Takeshige, K. 2004.
Induction of cytochrome CYP4F3A in all-trans-retinoic acid-treated HL60 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 314, 104–109.
9. Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Takeya, R., Sumimoto, H., Kishi, K., Tsunawaki, S., Hirayama, T., and Rokutan, K. 2004.
Role of NADPH oxidase 1 in oxidative burst response to Toll-like receptor 5 signaling in large intestinal epithelial cells.
J. Immunol. 172, 3051–3058.
10. Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2004.
A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47^{phox}, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase.
Genes Cells 9, 443–456.
11. Takamatsu, H., Takeya, R., Naito, S., and Sumimoto, H. 2004.
On the mechanism of cell lysis by deformation.
J. Biomech., in press.
12. Yuzawa, S., Yokochi, M., Fujioka, Y., Ogura, K., Kataoka, M., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2004.
Sequence-specific resonance assignments of the tandem SH3 domains in an autoinhibitory form of p47^{phox}.
J. Biomol. NMR 59, in press.
13. Hashida, S., Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Takikawa, T., Sumimoto, H., Inagaki, F., and Fujii, H. 2004.
Binding of FAD to cytochrome b_{558} is facilitated during activation of the phagocyte NADPH oxidase, leading to superoxide production.
J. Biol. Chem. 279, 26378-26386.
14. Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. 2004.
Solution structure of the tandem SH3 domains of p47^{phox} in an autoinhibited form.
J. Biol. Chem. 279, 29752-29760.
15. Hirano, Y., Yoshinaga, S., Ogura, K., Yokochi, M., Noda, Y., Sumimoto, H., and Inagaki, F.

2004.
Solution structure of atypical PKC PB1 domainand its mode of interaction with ZIP/p62 and MEK5.
J. Biol. Chem. 279, in press (doi:10.1074/jbc.M403092200).

16. Tanaka, H., Minakami R., Kanaya, H., and Sumimoto, H. 2004.
Catalytic residues of group VIB calcium-independent phospholipase A_2 (iPLA$_2\gamma$).
Biochem. Biophys. Res. Commun., in press.

総説

1. Takeya, R., and Sumimoto, H. 2003.
Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases.
Mol. Cells 16, 271–277.
2. Inoguchi, T., Sonta, T., Tsubouchi, H., Etoh, T., Kakimoto, M., Sonoda, N., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., Utsumi, H., and Nawata, H. 2003.
Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: Role of vascular NAD(P)H oxidase.
J. Am. Soc. Nephrol. 14 (Suppl 3), S227–S232.
3. Inoguchi, T., Tsubouchi, H., Etoh, T., Kakimoto, M., Sonta, T., Utsumi, H., Sumimoto, H., Yu, H.Y., Sonoda, N., Inuo, M., Sato, N., Sekiguchi, N., Kobayashi, K., and Nawata, H. 2003.
A possible target of antioxidative therapy for diabetic vascular complications-vascular NAD(P)H oxidase.
Curr. Med. Chem. 10, 1759–1764.

4. 住本 英樹. 2003.

感染防御に重要な活性酸素の生成–食細胞 NADPH オキシダ-ゼ活性化の分子機構-.

医学のあゆみ 205, 79-85.

5. 武谷　立、住本　英樹. 2004.

PX ドメインと食細胞

Surgery Frontier 11, 54-57.

著書

1. 紙　圭一郎、武谷　立、住本　英樹. 2003.

第５章：機能ドメイン、機能性残基の同定.

ポストシークエンスタンパク質実験法第４巻　構造・機能解析の実際, pp.73-84

東京化学同人.

翻訳

1. 武谷　立、住本　英樹. 2003.

第１８章：遺伝情報.

マッキー生化学　第３版　Trudy McKee, James R.McKee

市川厚 監修　福岡伸一 監訳, pp.559-604

化学同人.

学会発表

1. Hideki Sumimoto.(2003, 10/28- 10/31).
Reactive Oxygen Species as as Microbicidal Agents: molecular Mechanism for Activation of the Superoxide- Producing Phagocyte NADPH Oxidase.
(Invited Speaker)
The 16TH Naito Conference on Innate Immunity in Medicine and Biology[I], Kanagawa.
2. 湯澤　聡，高橋　清大，小椋　賢治，堀内　正隆，住本　英樹，藤田　尚志，稲垣　冬彦.

（2003, 12/10- 12/13）.

シンポジウム「タンパク質の高次構造変化による機能制御」

自然免疫の構造生物学.

第 26 回分子生物学会年会，神戸.

3. 吉永　壮佐，国府島　庸之，小椋　賢治，藤岡　優子，横地　政志，伊藤　隆司，住本　英樹，稲垣　冬彦. (2003, 12/10- 12/13).

   細胞極性を制御する PB1 ドメインの立体構造と分子認識機構.

   第 26 回分子生物学会年会，神戸.

4. 河原　司，桑野　由紀，美濃　久乃，近藤　茂忠，森田　恭子，中野　陽子，国府島　庸之，武谷　立，住本　英樹，六反　一仁. (2003，12/10-12/13) .

   ヘリコバクターピロリ菌のリポポリサッカライドによる新規調節因子 p41nox，及び Rac1 を介した胃粘膜上皮 Nox1 活性化の分子機構.

   第 26 回分子生物学会年会，神戸.

5. Pavlos Stampoulis, Hiroaki Terasawa, Hideki Sumimoto, Ichio Shimada. (2003, 12/10-12/13).

   IDENTIFICATION OF THE MEMBRANE INTERACTING INTERFACE OF P47PHOX PX DOMAIN BY TRANSFERRED CROSS SATURATION EXPERIMENTS.

   第 26 回分子生物学会年会，神戸.

6. 平野　良憲，吉永　壮佐，鈴木　展生，住本　英樹，稲垣　冬彦. (2003，12/10-12/13) .

   細胞極性に関与するタンパク質，aPKC と PAR-6 の PB1 ドメイン複合体の結晶構造解析.

   第 26 回分子生物学会年会，神戸.

7. 武谷　立，住本　英樹. (2003，12/10-12/13) .

   Fhos, a mammalian formin, directly binds to F-actin via aa region N-terminal to the FH1 domain and forms a homotypic complex via the FH2 domain to promote actin fiber formation.

第 26 回分子生物学会年会，神戸.

8. 国府島　庸之，住本　英樹.（2003，12/10-12/13）.

ヒト PAR3 の tight junction への局在機構.

第 26 回分子生物学会年会,神戸.

9. 田浦　政彦，武谷　立，紙　圭一郎，住本　英樹.（2003，12/10-12/13）.

食細胞 NADPH オキシダーゼ活性化タンパク質 p47phox の SH3 ドメイン近傍のアミノ酸

残基 Ile-152 と Thr-153 の役割.

第 26 回分子生物学会年会，神戸.

10. 上野　紀子，武谷　立，紙　圭一郎，住本　英樹.（2003，12/10/-12/13）.

活性酸素生成型 NAD(P)H オキシダーゼ Nox1 の活性化の分子機構.

第 26 回分子生物学会年会，神戸.

11. Hideki Sumimoto, Ryu Takeya.(2003, 10/15- 10/18).

シンポジウム「NADPH oxidase の新展開-その分子構造と活性化機構」

Role of protein- protein and protein-lipid interactions in activation of the NADPH oxidases Nox1 and Nox2.

第 76 回日本生化学会大会，横浜.

12. Kenji Ogura, Satoru Yuzawa, Hideki Sumimoto, Fuyuhiko Inagaki. (2003, 10/15-10/18).

シンポジウム「NADPH oxidase の新展開-その分子構造と活性化機構」

Structural biology of the phagocyte NADPH oxidase.

第 76 回日本生化学会大会，横浜.

13. Ryu Takeya, Noriko Ueno, Keiichiro Kami, Masahiko Taura, Motoyuki Kohjima, Tomoko Izaki, Hiroyuki Nunoi, Hideki Sumimoto. (2003, 10/15- 10/18).
Novel Human Homologus of $p47^{phox}$ and $p67^{phox}$ Participate in Activation of

Superoxide- producing NADPH Oxidases.

第 76 回日本生化学会大会, 横浜.

14. Noriko Ueno, Ryu Takeya, Hideki Sumimoto. (2003,10/15- 10/18).
Molecular mechanism for activation of the superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox1.

第 76 回日本生化学会大会, 横浜.

15. Satoru Yuzawa, Nobuo N Suzuki, Yuko Fujioka, Kenji Ogura, Hiroaki Kamikubo, Mikiko Kataoka, Hideki Sumimoto, Fuyuhiko Inagaki. (2003, 10/15- 10/18).
Structre of autoinhibited form of tandem SH3 domain of p47^{phox}.

第 76 回日本生化学会大会, 横浜.

16. Shukichi Hashida, Takayuki Takikawa, Satoru Yuzawa, Nobuo Suzuki, Yuko Fujioka, Hideki Sumimoto, Fuyuhiko Inagaki, Hirotada Fujii. (2003, 10/15- 10/18).
Quantitative analysis of FAD binding region in the phagocyte NADPH oxidase.

第 76 回日本生化学会大会, 横浜.

17. Motoyuki Kohjima, Yukiko Noda, Ryu Takeya, Naoaki Saito, Kosei Takeuchi, and Hideki Sumimoto.(2003, 7/14- 7/16).

PAR3β, a novel homologue of the cell polarity protein PAR3, localizes to tight junctions.
The 2nd Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, Fukuoka.

18. Ryu Takeya, Noriko Ueno, Keiichiro Kami, Masahiko Taura, Motoyuki Kohjima, Tomoko Izaki, Hiroyuki Nunoi and Hideki Sumimoto. (2003, 7/14- 7/16).
Novel human homologues of p47^{phox} and p67^{phox} participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases.
The 2nd Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, Fukuoka.

19. Keiichiro Kami, Ryu Takeya, Hideki Sumimoto and Daisuke Kohda. (2003, 7/14- 7/16).
Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by SH3 domains.
The 2nd Japan-Korea Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, Fukuoka.

20. 吉永　壮佐, 平野　良憲, 小椋　賢治, 国府島　庸之, 藤岡　優子, 横地　政志, 住本　英樹, 稲垣　冬彦. (2003, 6/23- 6/25).

ワークショップ「未来へはばたく若手の力　–蛋白質科学の今と未来-」

細胞極性を制御する新規ドメイン PB1 の立体構造と分子認識機構.

第 3 回日本蛋白質科学会年会 , 札幌.

21. 平野　良則, 吉永　壮佐, 小椋　賢治, 横地　政志, 野田　祐紀子, 住本　英樹, 稲垣　冬彦. (2003, 6/23- 6/25).

aPKC の PB1 ドメインの立体構造解析.

第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌.

22. 吉田　慎一, 鈴木　展生, 小椋　賢治, 横地　政志, 住本　英樹, 稲垣　冬彦. (2003, 6/23- 6/25).

NMR 法による p67*phox* の TPR ドメインと低分子量 G タンパク質 Rac との相互作用研究.

第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌.

23. 湯沢　聡, 鈴木　展生, 藤岡　優子, 小椋　賢治, 住本　英樹, 稲垣　冬彦. (2003, 6/23- 6/25).

好中球活性酸素発生系における制御タンパク質 p47*phox*(151-340)の構造解析.

第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌.

24. 小椋　賢治, 鳥飼　真之介, 湯沢　聰, 住本　英樹, 稲垣　冬彦. (2003, 6/23- 6/25).

p47*phox* のタンデム SH3 ドメインと p22*phox*PRR の相互作用.

第 3 回日本蛋白質科学会年会, 札幌.

25. 住本　英樹. (2003, 4/4- 4/6).

レクチャー「脂溶性シグナル分子と分子細胞医学」

活性酸素生成型 NADPH オキシダーゼ活性化の分子機構.

第 26 回日本医学会総会, 福岡.

26. 住本 英樹. (2003, 4/1- 4/3).

シンポジウム「内因性抗菌物質と innate immunity」

innate immnunity において重要な活性酸素産生とその調節の分子機構.

第 76 回日本細菌学会総会, 熊本.

増殖分化制御学分野

教　　授	住 本　英 樹
助　　手	武 谷　立
助　　手	紙　圭 一 郎
共 同 研 究 員	水 上　令 子
大 学 院 生	国府島　庸之
〃	山 崎　朋 子
〃	伊 崎　智 子
〃	上 野　紀 子
〃	田 浦　政 彦
〃	山本　麻太郎
〃	上坂　十四夫

科学技術振興機構派遣職員	西納　美奈子
〃	鹿毛陽子
研究補助員	松尾　美樹
〃	吉浦　奈津子

分子腫瘍学分野

Division of Molecular and Surgical Oncology

細胞機能制御学部門 (分子腫瘍学分野) では、(１) 癌の基礎研究、(２) 癌の遺伝子診断法の確立、(３) 新しい治療の開発、を研究の 3 つの柱と位置づけ研究を推進している。人事面では、平成 16 年 3 月に助手・ 白石　猛が佐賀県立好生館病院へ、大学院生・ 山口博志が新中間病院へ、医員・ 西田康二郎が壱岐公立病院へ、それぞれ転出した。また、小川和彦 (琉球大学、研究員) が母教室へ復帰した。一方、平成 16 年 4 月より松山　歩 (医員)が米国留学より帰国し着任、さらに大町貴弘(慈恵医大・ 医員)、家田敬輔 (群馬大学・ 大学院)が着任し、現在総員 14 名で臨床・ 研究を進めている。

A.　癌の基礎的研究

a.　疾患関連遺伝子のマイクロアレイによる包括的解析

1.　DNA microarray 法を用いた遺伝子解析

DNA マイクロアレイ法は多数 (〜数万) の遺伝子の発現を一度に解析できる方法である。教室では胃癌検体を用いて癌関連遺伝子 マイクロアレイ解析を行ったところ、癌の悪性度のクラスタリングを行う過程で、遺伝子によって加重を変えて解析をすることで、リンパ節転移・ 進行度・ 予後を反映する遺伝子群の抽出に成功した (Inoue H et al. Clin Cancer Res 2002) 。現在各癌腫における、大規模な prospective study を実施中である。

2.　DNA microarray 法を用いた肝炎・ 肝硬変特異的な遺伝子発現プロファイル解析

肝炎・ 肝硬変合併肝癌の手術において術前肝予備能を正確に把握することを目的として、肝炎・ 肝硬変合併肝癌における併存病変の遺伝子発現プロファイル解析を行っている。これにより肝炎から肝硬変、また肝硬変から肝癌発症に至る系統的機能解析を行うことができ、同時に従来の肝機能評価を超える新しい診断基準を確立したい。

b.　癌の治療を困難にしている癌の多様性の解析

1. ラット多段階発癌モデルによる発癌機構と癌多様性のメカニズム解明

癌の多様性は癌治療を困難にしている。われわれの作成したラット多段階発癌モデルを用い、それらの腫瘍(パピローマ→進行食道癌)組織における遺伝子発現パターンを、特に LMD (Laser Microdissection)法と DNA microarray を応用して解析している。多段階発癌と癌多様性のメカニズム解明に取り組んでいる。

2.　LMD と DNA microarray を用いた消化器癌多様性のメカニズム解明

消化器癌における腫瘍内の癌多様性、あるいは原発巣と転移巣の違いを明らかにする目的で LMD 法、T7 遺伝子増幅法、DNA microarray を応用した解析をスタートした。（ Mori M et al. Surgery 2002 ）

c.　腫瘍組織における各種遺伝子の解析

1.　Skp2 遺伝子の消化器癌における発現の意義

これまで p27 遺伝子の発現低下が胃癌においてリンパ節転移陽性症例に多いことを明らかにしてきたが(Mori M et al. Nat Med 1997)、さらに p27 の発現に関与する skp2・cks1 について胃癌組織で発現の亢進を認め、p27 の発現低下と極めて強い相関を示すことを明らかにした。（ Masuda M et al. Cancer Res 2002 ）

2.　消化器癌・乳癌における Matrix metalloprotainase ファミリー発現と癌の悪性度

MMP family　(MMP-1, 2, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14) の発現を食道癌の同一検体を用いて解析した。(Yamashita K, Clin Cancer Res 2000) その結果、予後に関わる因子 (MMP-7, 11, 13, 14)の中で特に MT1-MMP が中心的な役割を果たすと考えられたため遺伝子導入株を作成し詳細な解析を行っている。

また最近では、チロシンキナーゼ EGFR が、MMP-7 により活性化されることを明らかにした。

3.　消化器癌・乳癌における血管新生因子発現の意義

癌の浸潤・転移において腫瘍血管新生は重要であるが、その血管新生を抑制する因子として MMP-12 によって産生される angiostatin が重要である (Etoh T,Cancer Res 2001)。 大腸癌における MMP-12 の発現を検討した結果、癌組織で発現が亢進していること、更にその発現が予後とは逆相関を示すことが明らかになったため、その意義を現在検討している。

4.　癌の脱分化に伴う組織脂肪酸構成の変化に関する検討

肝細胞癌では脱分化に伴ってリノール酸の減少、γ-リノレン酸、ジホモ-γ-リノレン酸の増加を認め、さらに、ジホモ-γ-リノレン酸をアラキドン酸へ変換する酵素である△-5不飽和化酵素が脱分化の進行に伴って発現が増強することを明らかにした（Utsunomiya T et al. Clin Cancer Res 2001）。現在、△-5 不飽和化酵素遺伝子導入株の作成、DNA microarray 法による解析を行っている。

5. ヒト消化器癌における新規肝転移関連遺伝子 CMAP 発現の検索とその臨床的意義

ヒト大腸癌や原発性肝癌の CMAP 発現を定量的 RT-PCR 法で測定したところ、CMAP 高値は深達度、組織学的低分化、肝転移と相関し、予後も有意に不良であった (Utsunomiya T,Clin Cancer Res 2002) 今後、CMAP の遺伝子発現による癌細胞の変化について解析する予定である。

6. Pyrimidine nucleotide phosphorylase (PyNPase) の発現とその意義

PyNPase は癌組織において亢進し、癌の悪性度を反映することが知られている。我々は DNA マイクロアレイを施行し PyNPase と共通して変化を示す ROCK1 を同定した。PyNPase の癌組織における過剰発現による悪性度の増強は ROCK1 による motility の亢進を介していることが示唆された。(Yoshinaga K,Cancer Res submit)

7. FHIT/FRA3B 領域におけるゲノム解析と癌における遺伝子欠失機序の解明

我々はヒト 3 番染色体 3p14.2 領域から癌関連遺伝子 FHIT を単離し ,癌組織で FHIT が欠落していることを明らかにした （Inoue H et al PNAS 1998,Mimori K et al PNAS 1999,Shiraishi T et al. PNAS 2001）。一方、機能面に介して Fhit 蛋白は caspase の亢進を介して apoptosis に関連することがわかってきた。また Fhit が遺伝子修復酵素 Msh2 と密に関連することを明らかにした（Mori M., Mimori K., et al. Cancer Res 2001）

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

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

9. 発生分化誘導因子アクチビンの消化器癌における意義の解明

アクチビンが癌で高発現し癌の悪性度と相関することを明らかにした。activin A を癌細胞に遺伝子導入し DNA microarray を行ったところ、MMP-7 が activin A 発現に強く関与することを明らかにした。このメカニズムを解明するために Vanderbilt 大学の Matrisian 教授と共同解析をすすめている。

10. α-fetoprotein (AFP) 産生消化器癌の検討

AFP 産生胃癌は早期に肝転移を起こし予後不良であるが、AFP 産生及び肝転移をきたす機序は不明である。AFP 導入株と親株において DNA マイクロアレイを施行し、機序の解明を試みている。

d. 新しい癌関連遺伝子の同定

1. Differential Display (D.D 法) を用いた癌関連遺伝子の検索

教室ではこれまで cystatin B、G-protein γ 7、hIRH/SDF-1 遺伝子をクローニングしてきた。引き続いて MAL, DEN4 、更に protease (serine-3) をクローニングしたので、解析を進めているところである。(Mimori k., et al. Oncogene 2003)

2. SAGE 法を用いた新規遺伝子の検索

教室ではこれまで cDNA subtraction 法、Differential Display 法を用いて各種癌関連遺伝子をクローニングしてきた。近年開発された SAGE 法はより効率よく重要な遺伝子をクローニングできる手法である。本法を用いて食道癌進展に重要な新規遺伝子のクローニングを開始している。

e. 疾患感受性遺伝子の同定・検索

われわれは消化器癌を対象として、環境中の発癌物質の代謝酵素遺伝子を含め、様々な癌関連遺伝子 (L-myc, NAT2, COMT, DH3, ALDH2, p53 など) の多型性検索に取り組んでいる。癌へのかかり易さを遺伝子多型の観点から予測できるようになれば、発癌のハイリスク群をより客観的に評価することが可能となり、将来発癌に対する予防策を講じる一助となることが期待される。

f. 放射線化学療法感受性・抵抗性遺伝子の検索

食道癌において放射線感受性の違いをもたらす遺伝子 Hepatoma derived growth factor (HDGF) をクローニングした (Matsuyama A,Cancer Res 2001)。本年度は乳癌について放射線耐性株を作成し DNA microarray を用いて放射線感受性・抵抗性規定遺伝子群を同定した。現在、これらの遺伝子を搭載した診断用マイクロアレイの作成中である。

B. 癌の遺伝子診断法の確立

a. 癌の微小転移の検出

病理診断で転移陰性のリンパ節に対し遺伝子診断 (CEA と MAGE 遺伝子の RT-PCR 法) を用い微小転移を検出してきた。n0 症例の術後再発予測に遺伝子診断が有用であ

った。また、乳癌細胞が最初に転移するセンチネルリンパ節を色素注入法 (活性炭 CH40)にて同定し、遺伝子診断を行っている（Kataoka A, Int J Oncol 2000）。

b.　術中迅速遺伝子診断法の開発

従来 6 時間以上かかっていた RT-PCR 法による微小転移診断を短縮し、術中に迅速に診断する方法を開発している。（１）材料の迅速な処理法（２）迅速な RT 法の工夫（３）リアルタイム PCR 法の導入などで、1 時間内外で処理出来るようになったが、より正確かつ迅速な実験法の工夫を開発中である。

C.　新しい治療法の開発

a.　腫瘍拒絶抗原を用いた癌特異的免疫療法

1.　MAGE ペプチドと樹状細胞を用いた癌ペプチドワクチン療法

腫瘍拒絶抗原 MAGE ペプチドを用いた DC ワクチン療法を世界に先駆けて臨床応用し、進行再発消化器癌 23 症例に行ったところ副作用は全く認めず高い評価を受けている（Sadanaga N,Clin Cancer Res 2001）。治療効果については転移性肺癌の縮小、再発リンパ節の縮小した症例も認めた。DC ワクチンと OK-432 投与の併用により、効果的な抗原提示能をもった成熟樹状細胞の誘導を試みている。

2.　新規腫瘍拒絶抗原ペプチドの同定

MAGE-1, -2, -3, -4 遺伝子については治療に有効なペプチドを同定し、治療への応用段階にある。NY-ESO-1 についても消化器癌において MAGE と同程度の発現が認められることから、日本人に多い HLA-A24 拘束性 NY-ESO-1 ペプチド合成を行い、現在有効なペプチドの同定を試みている。

3.　効果的な DC･ペプチドワクチン療法の開発

担癌患者では免疫能が低下しているため、よりよい治療効果が望めない。Balb/c マウスの大腸癌担癌モデルを用いた解析の結果、担癌マウス由来の DC では健常マウス由来の DC に比較して機能低下していたが、OK-432 の投与により DC の抗原提示能の増強、腫瘍内 T リンパ球の増加を伴う抗腫瘍効果が得られることがわかった（Mashino K,Mol Ther 2002）。よって、今後は DC ワクチン OK432 の併用を加えていきたい。

4.　新規腫瘍拒絶抗原の検討とペプチドワクチン療法対象症例の拡大

腫瘍拒絶抗原として最近報告された NY-ESO-1, LAGE-1, SSX, SCP-1 についてその消化器癌、乳癌組織における発現を解析したが、免疫染色によると heterogeneous な発現が観察され、複数抗原を標的とした治療の必要性が考えられた（Mashino K,Br J Cancer 2001）。さらに MAGE-1, -3 発現陰性症例に SCP-1 発現が比較的高率に認め

られペプチド・ワクチン療法の症例拡大の可能性が示唆された。

5.　胃癌における fractalkine　の発現と腫瘍の進展の解明

癌免疫の主役であるリンパ球や NK 細胞の腫瘍内への浸潤は少ないことがわかっている。CD8 陽性リンパ球や NK 細胞の遊走因子である fractalkine の発現を大腸癌で検索したところ、fractalkine 発現低下例では有意に 5 年生存率が低下していることを見いだした。

b.　アデノウイルスベクターを用いた癌の遺伝子治療法の開発

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

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

2. Fhit アデノウイルスベクターを用いた抗腫瘍効果 の機序の解析

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

3. G protein γ7 とアデノウイルスベクターを用いた抗腫瘍効果 の機序の解析

G proteinγ7 は各種消化器癌組織において発現の低下する遺伝子として当科において単離した。(Shibata K,BBRC 1998)G proteinγ7 の遺伝子導入では p27 を介した G1/S 期の抑制を介して細胞増殖が抑制された。(Shibata K, Cancer Res 1999, Utsunomiya T, Arch Surg 2002) 実際の治療を想定して Ad- G proteinγ7 の投与を行いその効果を検討する。

4.　MAGE-3 を発現するアデノウイルス・ベクターを用いた新しい癌特異的免疫遺伝子治療の開発

当科では世界に先駆け MAGE ペプチドワクチン療法を臨床応用しているが、HLA タイプの適合しない患者には実施できない。そこで対象症例の拡大のため、MAGE 遺伝子ウイルスベクターを樹状細胞に投与することで適応症例の拡大を計るための基礎的検討を行っている。

c.　再生医学の外科応用

肝臓以外の消化管あるいは乳腺の再生をめざし、アメリカ･マサチューセッツ工科大学　トナー教授との共同研究をスタートさせた。

業績目録

原著論文

1. Yoshinaga K, Mimori K, Yamashita K, Utsunomiya T, Inoue H, Mori M., 2003
   Clinical significance of the expression of activin A in esopageal carcinoma.
   Int J Oncol 22: 75-80
2. Mimori K, Inoue H, Ishii H, Mori M., 2003
   INI-1, a partner gene of ALL-1, is highly conserved in human acute leukemia.
   Oncology Rep 10: 551-553
3. Mimori K, Inoue H, Shiraishi T, Matsuyama A, Mafune K, Tanaka Y, Mori M., 2003
   Microsatellite instability is often observed in esophageal carcinoma patients with allelic loss in the FHIT/FRA3B locus.
   Oncology 64: 275-279
4. Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, and Croce CM., 2003
   Promoter hypermethylation of RASSF1A in esophageal squamous cell carcinoma.
   Clin Cancer Res 9: 1441-1445
5. Yamashita K, Sunil Upadhay, Mimori K, Inoue H, Mori M., 2003
   Clinical significance of secreted protein acidic rich cystein in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression.
   Cancer 97(10): 2412-2419
6. Mimori K, Shiraishi T, Mashino K, Sonoda H, Yamashita K, Yoshinaga K, Masuda T, Utsunomiya T, Alonso MA, Inoue H, Mori M., 2003

MAL gene expression in esophageal cancer suppresses motility, invasion and tumorigenicity and enhances apoptosis through the Fas pathway.
Oncogene 22: 3463-3471

7. Yoshinaga K, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Utsunomiya T, Mori M., 2003
Platelet-derived endothelial cell growth factor mediates Rho-associated coiled-coil domain kinase messenger mRNA expression and promotes cell motility.
Ann Surg Oncol 10(5): 582-587
8. KamMori M, Nakamura KI, Ogawa T, Mafune KI, Tatutomi Y, Obara T, Onoda N, Fujiwara M, Izumiyama-Shimomura N, Mori M, Kaminishi M, Takubo K., 2003
Demonstration of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human parathyroid tumours by in situ hybridization with a new oligonucleotide probe.
Clin Endocrinol 58: 43-48
9. Isomoto H, Tomita M, Sugimachi K, Ogawa M, Yamada K, Nakagoe T, Mori M, Takano S, Kakegawa T., 2003
Pre-and post-operative adjuvant chemotherapy in colorectal cancer.
Int J Oncol 23(4): 1103-1108
10. Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, and Croce CM., 2003
Allele loss and promoter hypermethylation of VHL, RAR-β, RASSF1A, and FHIT tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma.
Cancer Res 63: 3724-3728
11. Yamaguchi H, Tanaka F , Sadanaga N, Ohta M, Inoue H, Mori M., 2003
Stimulation of CD40 Inhibits Fas- or chemotherapy-mediated apoptosis and Increases cell motility in human gastric carcinoma cells.
Int J Oncol 23: 1697-1702
12. Yamashita K, Mimori K, Inoue H, Mori M, Sidransky D., 2003
A tumor-suppressive role for trypsin in human cancer progression.
Cancer Res 63(20): 6575-6578
13. Hatakenaka M, Adachi T, Matsuyama A, Mori M, Yoshikawa Y., 2003

Xanthogranulomatous cholecystitis: importance of chemical-shift gradient-echo MR imaging.
Eur Radiol 13: 2233-2235

14. Masuda T, Inoue H, Nishida K, Sonoda H, Yoshikawa Y, Kakeji Y, Utsunomiya T, Mori M., 2003
Cyclin-dependent kinase 1 gene expression is associated with poor prognosis in gastric cancer.
Clinical Cancer Research 9(15): 5693-5698
15. Matsuyama A, Shiraishi T, Trapasso F, Kuroki T, Alder H, Mori M, Huebner K, Croce CM., 2003
Fragile site orthologs FHIT/FRA3B and Fhit/Fra14A2: Evolutionarily conserved but highly recombinogenic.
Proc Natl Acad Sci(USA) 100(25): 14988-14993
16. Mimori K, Tanaka Y, Yoshinaga K, Masuda T, Yamashita K, Okamoto M, Inoue H, Mori M., 2004
Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer.
Ann Oncol 15: 236-241
17. Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Inoue H, Mori M., 2004
Identification of HLA-A24-restricted Cytotoxic T Lymphocyte Epitope from Cancer-Testis Antigen, NY-ESO-1, and Induction of a Specific AntituMori Mmune Response.
Clin Cancer Res 10: 890-896
18. Yamashita K, Tanaka Y, Mimori K, Inoue H, Mori M., 2004
Differential expression of MMP and uPA systems and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma.
Int J Cancer 110(2): 201-207
19. Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, Alder H, Rattan S, Cesari R, Nolli ML, Williams NN, Mori M, Kanematsu T, Croce CM., 2004
The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreaticcarcinogenesis.
Clin Cancer res 10 (7): 2459-2465

20. Ishii H, Mimori K, Vecchione A, Sutheesophon K, Fujiwara T, Mori M, Furukawa Y., 2004
Effect of exogenous E2F-1 on the expression of common chromosome fragile site genes, FHITand WWOX.
Biochem Biophys Res Comm 316 (4): 1088-1093

21. Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, Alder H, Rattan S, Cesari R, Nolli ML, Williams NN, Mori M, Kanematsu T, Croce CM., 2004
The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis.The Tumor Suppressor Gene WWOX at FRA16D Is Involved in Pancreatic Carcinogenesis.
Clin Cancer res 10 (7) 2459-2465

22. Yoshinaga K, Sonoda H, Masuda T, Yamashita K, Mimori K, Utsunomiya T, Inoue H, Mori M:N-cadherin mediated by activin A in vitro and in vivo and associated with tumor aggressiveness in esophageal carcinoma.
Clin Cancer Res(in press)

23. Inoue H, Shibuta K, Matsuyama A, Yoshinaga K, Sadanaga N, Ueo H, Graham F. Barnard, Mori M:
Genetic susceptibility of Catechol-O-Methyltransferase (COMT) polymorphism in Japanese patients with breast cancer.
Int J Cancer (in press)

24. Tanaka F, Sonoda H, Mimori K, Shiraishi T, Ishii H, Croce CM, Ihoue H, Mori M:
In vivo and in vitro inhibition of human cancer cell growth using adenoviral vector expressing FHIT gene: mechanism analysis using microarray.
Mol Ther (in press)

25. Haraguchi N, Inoue H, Mimori K, Tanaka F, Utsunomiya T, Yoshikawa K, Mori M:
Analysis of gastric cancer with cDNA microarray.
Cancer Chemoth Pharm (in press)

26. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka Y, Tanaka F, Inoue H, Murayama S, Mori M:
Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression esophageal carcinoma.

Br J Cancer(in press)

総説

1. 宇都宮　徹、森　正樹: 2002/2003
   コンピューター支援外科学の展開.
   Cancer Frotier　4: 114-117.
2. 田中文明、山口博志、太田光彦、井上　裕、森　正樹: 2003
   抗癌剤全身投与と樹状細胞局注による癌特異的免疫化学療法
   ーマウス大腸癌を用いた基礎的研究とヒトへの応用の展開の可能性ー.
   Biotherapy　17(1): 9-14.
3. 太田光彦、三森功士、岸原文明、井上　裕、森　正樹: 2003
   胃癌の生物学的悪性度に関する最新の知見.
   胃と腸　38(1): 95-106.
4. Omata M, Mori M: 2003
   Study of hepatobiliary disease in the postgenome sequencing era.
   J Gastroenterol　38(15): 67.
5. 白石　猛、森　正樹: 2003
   微小転移の術中検出　ー再発しない癌手術を目指してー.
   医学のあゆみ　205(9): 591-594.
6. 太田光彦、森　正樹: 2003
   大腸癌関連遺伝子と遺伝子診断.
   Medical Science Digest　29(8): 304-308.
7. 山下継史、森　正樹: 2003
   食道癌関連遺伝子の発現メカニズムの解析.
   Cancer Frontier　5(1): 62-68.
8. 森　正樹、奥野清隆: 2003
   マイクロアレイを用いた遺伝子診断と治療への応用.
   日本外科学会雑誌　104(9): 635.
9. 森　正樹: 2003
   胃術後障害.

MEDICAMENT NEWS　第 1777 号: 11.

10. 田中文明、森　正樹: 2003
消化器癌治療における免疫学の応用.
現代医療　35(11): 2613-2617.

11. 吉永敬士、森　正樹: 2003
転移能と運動能.
日本臨床　61(8): 94-99.

12. 井上　裕、三森功士、白石　猛、森　正樹: 2004
転移癌.
Mebio　21(1): 56-64.

13. 赤座英之、市川智彦、鶴尾　隆、島田　安博、森脇久隆、森　正樹、野口眞三郎、中村清吾、西條長宏、曽根三郎、磯西成治、大橋靖雄、樋之津史郎、Euler Mikael von、Blackedge George.: 2004
分子標的診断.
癌と化学療法　31(1): 125-133.

14. 森　正樹: 2004
診断・治療における分子生物学の応用.
ドクターサロン　48(4): 299-303.

15. 小川和彦、増田隆明、井上　裕、村山貞之、森　正樹: 2004
がん組織における CDK インヒビターp27 の分解.
現代医療　36(4): 947-952.

16. 三森功士、増田隆明、森山紀之、森　正樹: 2004
微量癌細胞検出の臨床的意義.
外科　66(5): 497-501.

著書

1. 森　正樹: 2003
胃手術後障害.
今日の治療指針: 2003 年　322-323
医学書院, 東京都.

2. 黒木　保、井上　裕、森　正樹: 2003
発癌機構.
消化器外科学レビュー:　3-7
総合医学社, 東京都.
3. 増田隆明、三森功士、森　正樹: 2003
分子マーカーによる微小転移の診断(リンパ節・血液・骨髄).
乳癌の最新医療: 先端医療シリーズ 21・癌　58-63
先端医療技術研究所, 東京都.
4. 太田光彦、三森功士、森　正樹: 2003
遺伝子変異.
新しい診断と治療の ABC　　胃癌: 14(消化器 2)　43-52
最新医学社, 東京都.
5. 森　正樹: 2004
腸管癒着省.
今日の治療指針　2004 年: 2004 年版　345-346
医学書院, 東京都.
6. 黒木　保、井上　裕、森　正樹: 2004
発癌機構.
消化器外科学レビュー:　3-7
総合医学社, 東京都.

学会発表

1. 三森功士、山下継史、吉永敬士、園田英人、岡本正博、白石　猛、田中文明、岸原文明、宇都宮　徹、井上　裕、森　正樹: 2003.2.8.
胃癌の浸潤転移における MMP7 の役割と治療標的としての意義
第 75 回日本胃癌学会総会.東京.
2. 増田隆明、田中文明、宇都宮　徹、井上　裕、森　正樹: 2003.2.8.
AFP 悪制度との関連と AFP を標的とした癌免疫治療の可能性
第 75 回日本胃癌学会総会.東京.
3. 森　正樹: 2003.4.23.

消化器癌における DNA チップを用いた研究と臨床応用
第 92 回日本病理学会総会.福岡.

4. 森　正樹: 2003.6.5.
食道癌の分子標的
第 103 回 日本外科学会.札幌.

5. 井上　裕、吉永敬士、増田隆明、田中文明、三森功士、岸原文明、宇都宮 徹、森正樹: 2003.6.5.
胃癌における術前生検遺伝子診断法の開発とその妥当性の検討
-術前生検組織と切除胃癌組織のマイクロアレイ発現プロフィルの比較-
第 103 回日本外科学会.札幌.

6. 三森功士、山下継史、増田隆明、吉永敬士、井上　裕、森　正樹: 2003.6.27.
Matrilysin の細胞外基融解以外の癌進展機構における様々な役割について
第 12 回日本がん転移学会学術集会.金沢.

7. 田中文明、山口博志、太田光彦、岸原文明、宇都宮　徹、井上　裕、森　正樹: 2003.7.16.
癌抗原ペプチドと樹状細胞を用いた進行消化器癌に対する治療の安全性・有効性検討
第 58 回　日本消化器外科学会.東京.

8. 宇都宮　徹、岡本正博、吉永敬士、松山　歩、井上　裕、森　正樹: 2003.7.16.
肝切除術に対する生体反応としての肝再生　ー分子機構の網羅的解析と制御への展開
第 58 回　日本消化器外科学会.東京.

9. 森　正樹: 2003.9.24.
放射線感受性の分子腫瘍マーカー
第 23 回日本分子腫瘍マーカー研究会.名古屋.

10. 宇都宮徹、岡本正博、井上裕、吉永敬士、橋本雅司、渡邊五朗、江崎卓弘、脇山茂樹、福澤謙吾、森　正樹: 2003.11.13.
慢性肝障害合併肝癌の治療方針決定のための分子遺伝学的肝機能評価法
第 65 回　日本臨床外科学会.福岡.

11. 三森功士、増田隆明、片岡明美、西田康二郎、大野真司、宇都宮徹、井上裕、森正樹: 2003.11.14.
乳癌の血中微量癌細胞検出法の確立と再発早期発見への臨床応用

第 65 回　日本臨床外科学会.福岡.

12. 森　正樹、増田隆明、白石　猛、田中文明、三森功士、宇都宮　徹、井上　裕: 2003.12.10.
p27 の翻訳後制御の重要性と癌悪制度診断への応用
第 26 回　日本分子生物学会年会.神戸.

老化制御学分野

Division of Molecular and Clinical Gerontology

当部門の臨床分野は循環器疾患・呼吸器疾患・神経疾患を中心に診療している．研究分野は，動脈硬化の研究で動物の下肢筋肉に抗サイトカイン遺伝子を導入し，血管新生の研究を行いその有効性を確認した． 他に，冠動脈再狭窄モデルにおいても内膜障害に対する抗サイトカイン遺伝子治療を試みている .心不全に関する研究では心肥大から ,収縮不全に至る過程での細胞内情報伝達系の解明や ,ダール心不全ラットにおけるアンギオテンシン変換酵素阻害薬の効果を研究している .また，心筋細胞肥大における受容体活性化 Ca^{2+}チャネル Transient Receptor Potential 蛋白質の役割などの研究を行っている .また ,心筋線維化などの心筋再構築についての研究では細胞外基質蛋白の遺伝子発現と形態的変化の関係についての研究っを行っている .当分野で行っている遺伝子治療の開発は現在問題になっている生活習慣病に対する循環器病への応用可能になると確信している．

臨床的研究では心不全患者の末梢リンパ球サイトカイン産生能を Flow Cytometry 法で検討し，心不全の発症・進展に関与している可能性を示唆している．また，更年期障害の病態解明のため ,ホルモン補充療法を行っている患者の動脈硬化の進展について検索中である．

人事面では ,2003 年 6 月より門上俊明助手が大分県立病院循環器内科に赴任した．米国 New York 大学に留学のため末松延裕助手が，2004 年 4 月 31 日に退職した．2004 年 5 月 1 日から，前田豊樹助手が，九州大学病院先端分子・細胞治療科から当分野に赴任する .人事面での動きに伴い ,慢性神経疾患の診療と神経細胞の分化制御に関する研究も今後当科で展開していく．

A． 動脈硬化の成因・治療に関する研究

a． サイトカインと血管

TNF に拮抗する soluble TNF receptor 1 の遺伝子を内皮細胞に導入することにより，内皮細胞の増殖が促進され，また，酸化 LDL に対して抵抗性を示す事

を見いだした．即ち，in vivo の研究において，soluble TNF receptor 1 に血管新生の可能性があることが明らかになった．その後，ラット下肢虚血モデルを用いて，soluble TNF receptor 1 の遺伝子を下肢筋肉に注射し，in vivo における血管新生の効果も明らかにした．また，TNF が内皮増殖に関与している可能性が報告されているので，現在，ラット頸動脈結紮モデルを用い，超音波にて，soluble TNF receptor 1 の遺伝子を血管に導入し，soluble TNF receptor 1 に血管リモデリングに対する効果を検討中である．その他，血管新生に関する，VEGF，HGF のレセプターが，チロシンリン酸化されることにより活性化されるため，現在，抗チロシンフォスファターゼによる in vivo における血管新生の効果も検討中である．これらの結果は，将来の虚血性血管病の遺伝子治療に役立つものと考えられる．

B. 心不全の成因・治療に関する研究

a. 心筋梗塞におけるサイトカインの影響

心筋梗塞において TNF の増加がみられ，心筋のアポトーシスを起こし心筋梗塞の程度の要因になっていることが知られている．Soluble TNF receptors は TNF に拮抗するため，soluble TNF receptor 1 の遺伝子をラットの心筋梗塞モデルに導入することにより，心筋梗塞の梗塞範囲が減少することを明らかにした．また，ラットの虚血再環流モデルを用いて，soluble TNF receptor 1 の遺伝子を導入し，同様の効果を見た．現在，soluble TNF receptor 1 の慢性心筋梗塞に対する，梗塞サイズ，心機能への影響を検討している．これらの結果は，将来の心筋梗塞の遺伝子治療に役立つものと考えられる．

C． 心筋リモデリングにおける心筋線維化の分子機序

今回，新生児ラット心筋より心筋細胞および線維芽細胞を個別に単離し，48 時間低酸素条件(95%N2+ 5%CO2)にて培養し，再酸素化(95%Air + 5%CO2) における各細胞の障害における脳性ナトリウム利尿ホルモン(BNP)の発現様式とその制御機構について検討した．併せてリモデリングに関与する TNF-a，IL-1b

などのサイトカインや MMP， TIMP の発現を検討した．BNP の発現は再酸素後 3 時間後に最も強く mRNA と蛋白の発現を，認め以後漸減した．同時に培養液中に collagen I， III の分泌も認めた．MMP， TIMP の発現は再酸素後 30 分より発現を認めた．現在，ACE 阻害剤，Angiotensin II 拮抗薬 MMP 阻害剤の前処置における BNP の発現効果について検討しているが，チアゾリヂン誘導体である PPAR-r agonist である Pioglitazone (0 .1-10 uM)の前処置においては有意に減少した．この変化は NFκ-B の抑制剤で消失することから，NFκ-B 経路を介していると考えている．

D． 心筋肥大から心不全に至る細胞内情報伝達機構の解析

培養細胞，心不全動物モデルを用いて，心筋細胞肥大から心不全に至る細胞内シグナル伝達解析を細胞レベル一個体レベルで行っている．

a． ミオシンフォスファターゼによる不全心筋収縮調節の異常

三重大学第一内科において作製された心筋ミオシンフォスファターゼサブユニット MYPT2 のトランスジェニックマウスが心不全に陥ることがわかった．現在この心不全心筋の収縮調節異常の細胞内機序を，スキンドファイバーを用いた収縮実験で解析している[三重大学第一内科との共同研究]．

b． 高血圧性心不全におけるアンギオテンシン変換酵素阻害薬の効果

ダール心不全ラットにアンギオテンシン変換酵素阻害薬を長期投与すると心肥大・心筋リモデリングが抑制され，心不全発症が抑制されるが，その細胞内機序は十分解明されていなかった．我々は，筋小胞体 Ca^{2+}-ATPase 活性調節蛋白質である phospholamban のリン酸化が不全心筋で低下しており，アンギオテンシン変換酵素阻害薬はこのリン酸化を正常化することにより筋小胞体の Ca^{2+}取り込み能を回復させ，心機能を保持している可能性を明らかにした[論文発表済み]．

c．心筋細胞における受容体活性化 Ca^{2+}チャネル TRP 蛋白質の役割

Transient Receptor Potential (TRP) 蛋白質はアゴニスト-GTP 結合蛋白質刺激により活性化される Ca^{2+}チャネルとして報告されており，心筋細胞にも発現しているがその機能は不明である．我々はダール高血圧ラット心筋において TRP7

mRNA の発現が亢進していることを見いだし，TRP7 がアンギオテンシン II→ GTP 結合蛋白質→ 心肥大のシグナル伝達に関与しているという仮説を立てた．現在，ラット培養心筋細胞に TRP7 遺伝子を過剰発現させ，TRP7 の機能を形態学的・ 生理学的・ 分子生物学的面から解析する実験を進めているが，TRP7 過剰発現細胞においてアンギオテンシン II 刺激により肥大よりむしろアポトーシスが効率に起こることが判明した．今後，アンギオテンシン II→ TRP7 からアポトーシスに至る情報伝達系を解明していく予定である．

d． カルシニューリン活性化機構の解明-バイオイメージングを用いて

カルシニューリンはアゴニスト-GTP 結合蛋白質刺激で誘導される心筋細胞肥大の重要な細胞内転写調節因子である．我々はカルシニューリンと GFP の融合蛋白質を作製，培養心筋細胞に発現させ，Living cell においてアゴニスト刺激時のカルシニューリンの細胞内動態を観察している .今後 FRET を利用してカルシニューリン活性化機構をさらに解明していく予定である．

E．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モセット 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，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． 胎生期マウス脳組織内環状 DNA 産生領域の DNA 組み換えの検出とその生理学的意義の探索

胎生期マウス脳組織内環状 DNA を抽出，解析して胎生１６日前後に環状 DNA を生み出す特定のゲノム領域をマウス染色体１６番上に同定した．この領域は，ALCAM(Activated leukocyte cell adhesion molecule) 遺伝子の 150kb 下流に位置し ,ヒト 3 番染色体に分節状に相同性を示す orthologous な領域である .広範囲のゲノム PCR 検索で ,この環状 DNA 産生領域を含む領域が胎生１８日以降に欠失することを確認した .マウス胎生脳組織を対象とした FISH 法により，この環状 DNA 産生ならびに欠失を引き起こす DNA 組み換えを起こす細胞群の同定を試みている．

G． 不全心における Toll-like receptor (TLR) 4 の役割

心筋梗塞及び心不全患者において血中及び心筋中の炎症性サイトカイン濃度が上昇していることが報告され ,これらのサイトカインは自身が心筋収縮抑制作用を持ち ,さらに誘導性一酸化窒素またはパーオキシナイトライトを産生し心筋収縮力を低下させることが明らかにされてきたがその機序ついては依然不明であった .共同研究者である Harvard Univ． Ralph Kelly 準教授らは梗塞心や不全心においてグラム陰性菌菌体成分リポポリサッカライド（LPS）の受容体である TLR が正常心に比較し過剰に発現している事を報告している .この受容体は単にグラム陰性菌感染時における宿主側の免疫応答を司るだけでは無く ,壊死心筋を直接認識する Pattern Recognition Receptor (PRR)としての役割が示唆されている．

a． 実験的マウス心筋梗塞モデル及び心不全モデルを用いた解析

TLR-4 欠損マウスを用いて実験的心筋梗塞モデルを作成し ,通常マウスと比較し炎症免疫細胞の浸潤が減弱し最終的に梗塞サイズが減少する事を報告した .現在，そのシグナル伝達において下流にある転写因子 NF-κB 及び AP-1 の転写活性 ,さ

らにはさらなる下流にあるこれらの炎症性サイトカイン及びケモカインの発現の差異について検討中である．

b． 培養心筋細胞を用いた受容体発現機構の解析

TLR-4 が低酸素下にて培養心筋細胞にて通常と比べて過剰に発現する事を突き止めており,この事はさらに不全心における免疫反応を増幅させる役割を示唆し炎症性サイトカインの発現の機序に迫る知見と考えられる.以上の事は,現在まで不明であった不全心における増悪因子である炎症性サイトカインの発現の機序を明らかにする初めての研究であり,従来の心不全治療とは全く異なる新しい免疫学的見地からの治療法を提供する臨床的にも重要視される研究と考えられる．

H. 心不全患者の末梢リンパ球サイトカイン産生能

心不全患者の血漿中炎症性サイトカイン濃度は上昇しており,これが心不全の発症･進展に関与している可能性が示唆されている.炎症性サイトカインは不全心筋自体での産生が亢進していることが報告されているが,末梢リンパ球の役割については不明であった．我々は Flow Cytometry を用いて末梢リンパ球のサブセット解析及び炎症性サイトカイン（TNF-α， IFN-γ）産生能を測定している．現在までに，心不全患者で CD4/CD8 ratio の上昇，CD4 陽性リンパ球での TNF-α産生能及び CD3 陽性細胞での IFN-γ亢進が見られ，これらは血漿中 TNF-α濃度及び心不全の重症度と相関していた.リンパ球の機能異常が心不全の病態に関与している可能性が強く示唆される[論文投稿中]．現在，リンパ球サイトカイン産生亢進の機序を明らかにするために Th1/Th2 サブセット,単球の CD14 ,Toll-like receptor 4 の発現，血中 soluble CD14，IL-12 濃度とリンパ球 TNF-α産生能との関連を解析中である．

I． 心不全患者における温熱療法の効果について

温熱療法は,末梢血管を拡張させる事により,血管抵抗を減少させ,心負荷を軽減する事が期待されている.そこで我々は慢性心不全でかつ運動が困難な症　例を対象に，単純泉（40 度）に週 5 日，10 分間入浴してもらい，心不全の程度，

心機能，末梢血管の状態を治療開始前後で比較検討したところ，現在までに，血管内皮細胞機能の改善を示唆する所見が得られている．この事は，温熱効果により末梢血管血流が反復的に増加する事により血管内皮細胞から放出される一酸化窒素が増加することで不全心に対し有益な効果をもたらす事が考察される．

業績目録

原著論文

1. S. Satoh, Y. Ueda, N. Suematsu, J. Oyama, T. Kadokami, M. Sugano, Y. Yoshikawa, N. Makino. 2003.
Beneficial Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on Sarcoplasmic Reticulum Function in the Failing Heart of the Dahl Rat.
Circ J 67: 705-711.

2. S. Satoh, Y. Ueda, M. Koyanagi, T. Kadokami, M. Sugano, Y. Yoshikawa, N. Makino. 2003.
Chronic inhibition of Rho kinase blunts the process of left ventricular hypertrophy leading to cardiac contractile dysfunction in hypertension-Induced heart failure.
J Mol Cell Cardiol 35: 59-70.

3. Masahiro Sugano, Keiko Tsuchida, Naoki Makino. 2004
Effects of soluble TNF-alpha receptor 1 on apoptosis induced by oxidized LDL in endothelial cells.
Mol Cell Biochem. 258: 57-63.

4. Masahiro Sugano, Keiko Tsuchida, Naoki Makino. 2004
Intramuscular gene transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 activates vascular endothelial growth factor receptor (KDR/flk-1) and accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia.

Circulation . 109: 797 – 802 .

5. Masahiro Sugano , Keiko Tsuchida , Tomoji Hata , Naoki Makino . 2004
In vivo transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats .
FASEB J . 18: 911-913 .

6. Masahiro Sugano , Keiko Tsuchida , Naoki Makino . 2004
Local delivery of soluble TNF-alpha receptor 1 gene reduces infarct size following ischemia/reperfusion injury in rats .
Mol Cell Biochem . in press

7. Oyama J , Blais C Jr , Liu X , Pu M , Kobzik L , Kelly RA , Bourcier T . 2004
Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice .
Circulation . 4 Feb 17;109(6):784-9 .

8. 前田 豊樹 . 2003
GTP シクロヒドロラーゼ I 欠損症の遺伝子治療の基礎研究 .
Progress in Medicine 23: 2788-2793 ,

9. Maeda , T ., Hatakenaka , M ., H . Muta , H ., Nakayama , M ., Nakazaki , Y ., Hiroyama , Y ., Suzuki , Y . and Tani K . 2004
Clinically mild , atypical , and aged craniofacial syndrome is diagnosed as
Crouzon syndrome by identification of a point mutation in the fibroblast growth factor receptor 2 gene (*FGFR2*) .
Internal Medicine (in press) .

10. Maeda , T ., Mutoh , T ., Muta , H ., Nakayama , M ., Nakajima , Y ., Ikuta , T ., Yasuda , M ., Etoh , T ., Shimizu , K ., Nakazaki , Y ., Hiroyama , T ., Somada , S ., Kurita , R ., Shiratsuchi , M ., Nishimura ,

J. and Tani, K. 2004
An 85-year-old Japanese female with Ph-1-positive CML with del (5q) successfully treated by intermittent imatinib therapy.
J. Am. Geriat. Soc. (in press).

11. 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. (in press).

12. Maeda, T., Chijiiwa, Y., Tsuji, H., Sakoda, S., Tani, K and Suzuki, T. 2004
Somatic DNA recombination yielding circular DNA and deletion of a genomic region in embryonic brain.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press).

学会発表

1. S. Satoh, N. Suematsu, J. Oyama, T. Kadokami, M. Sugano, T. Inoue, N. Makino. Increased production of tumor necrosis factor- in peripheral lymphocytes in patients with heart failure. ESC (European Society of Cardiology) Congress 2003; 30 August - 3 September, 2003: Vienna, Austria.

2. S. Satoh, N. Suematsu, J. Oyama, N. Makino. Predominance of helper T cell with increased productivity of TNF- and IFN- in lymphocytes in heart failure. The 20th Annual Meeting of the Japanese Section, Internal Society for Heart Research; 22 – 24 November, 2003: Tokyo, Japan.

3. S．Satoh，N．Suematsu，J．Oyama，T．Kadokami，N．Shimoyama，M．Okutsu，O．Wakisaka，T．Inoue，N．Makino．Activated peripheral helper T cell associated with increased productivity of tumor necrosis factor- and interferon- in patients with heart failure．第６８回日本循環器学会総会，２００４年３月２７日〜２９日，東京．

4．前田豊樹．GTP シクロヒドロラーゼⅠ欠損症の遺伝子治療の基礎研究．第 11 回カテコールアミンと神経疾患研究会．2003 年 4 月 19 日．

5．第 67 回日本循環器学会学術集会(福岡)(2003， 3/28-30)Soluble TNF-alpha receptor 1 limits infarct size following ischemia-reperfusion injury．Masahiro Sugano， Tomoji Hata， Naoki Makino．

6．第 67 回日本循環器学会学術集会（福岡）(2003， 3/28-30) Increased angogenesis after intramuscular gene transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 in a rat model of hindlimb ischemia .Masahiro Sugano， Naoki Makino．

7．第 7 回日本適応学会 （米子）(2003， 6/6-7) 心筋の虚血再灌流障害における TNF-alpha の影響と Soluble TNF-alpha receptor 1 による予防効果．菅野公浩，畑 知二，土田 啓子，牧野 直樹

8．第 26 回心筋代謝研究会 （東京）(2003， 7/15-16) 菅野 公浩，土田 啓子，牧野 直樹．Soluble TNF-alpha receptor 1 による新たな血管新生遺伝子治療の開発

9．XIIIth International Symposium on Atherosclerosis． Kyoto 2003， 9/28-10/2． Masahiro Sugano， Keiko Tsuchida， Naoki Makino． Intramuscular gene transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 upregulates the receptor for vascular endothelial growth factor (KDR/flk-1) in a rat model of hindlimb ischemia

10． The 76th Scientific Sessions of American Heart Association， Orlando，USA．2003 (11/9-12) Masahiro Sugano，Keiko Tsuchida，Naoki Makino．Intramuscular gene transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia

11． The 76th Scientific Sessions of American Heart Association， Orlando，USA． 2003 (11/9-12) Masahiro Sugano， Tomoji Hata， Keiko Tsuchida，Naoki Makino． In vivo gene transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 alleviates infarct size following ischemia-reperfusion injury

12． The 20th Annual meeting of the Japanese Section Internationl Society for Heart Research．Tokyo 2003，11/22-24．Masahiro Sugano，Tomoji Hata， Keiko Tsuchida， Naoki Makino． Soluble TNF-alpha receptor 1 improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats

13． Sugano M， Koyanagi M， Hata T， Makino N． In vivo transfection of soluble TNF-alpha receptor 1 gene prevents acute myocardial infarction．第 7 回日本適応学会 （米子）(2003， 6/6-7)

14． Sugano M， Suematsu H， Oyama J， Satoh S， Makino N． TNF-alpha Inhibits Activation of Hepatocyte Growth Factor Receptor and Hepatocyte Growth Factor-Induced Endothelial Cell Proliferation． 第 68 回日本循環器学会学術集会（東京）(2004， 3/27-29)

15． Sugano M， Suematsu H， Oyama J， Satoh S， Sugano M， Makino N． activated peripheral helper T cell associated with increased productivity of tumor necrosis factor-a and interferon –r in patients with heart failure．第 68 回日本循環器学会学術集会（東京）(2004， 3/27-29)

16．Makino N，Abe N，Sugano M，Satoh S．Effects of Pioglitazone on aortic

stiffness , carotid intima-media thickness and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus . 第68回日本循環器学会学術集会(東京)(2004 , 3/27-29)

17 . Makino N . Sugano M , Oyama J , Suematsu H Satoh S , Makino N . PPAR-r ligands attenuated brain natriuretic peptide production and after remodeling in cardiac fibroblasts in hypoxia-reoxygenation . 第 68 回日本循環器学会学術集会 (東京)(2004 , 3/27-29)

著書

1 . Makino N , Sugano M , Masutomo K , Hata T , Fushiki S Matrix degradative enzyme activities on cardiac remodeling in heart failure . edited by PK Singal , IMC Dixon , LA Kirshenbaum , NS Dhalla in Cardiac Remodeling and Heart Failure . Kluwer Academic Publishrs , Boston , pp305-317 , 2003

2 . 前田豊樹 , 谷 憲三朗 . ゲノム医学 . 田村隆明 , 山本 雅編 . 分子生物学イラストレイテッド改訂第 2 版 . pp361-373 . 羊土社 , 東京 , 2003 .

所員名簿

老化制御学分野

教授	牧野　直樹
助教授	菅野　公浩
講師	佐藤　真司
助手	尾山　純一
助手	前田　豊樹
助手(休職)	小柳　雅孔
研究補助員	田口　幸代
研究補助員	土田　啓子
研究補助員	上田　安子
研究補助員	宮崎　裕美子