

through induction of FLI-1 in human leukemia JAS-R cells. 第 67 回日本癌学会総会. 名古屋, 10 月. [日癌会総会記 2008; 67 回: 267]

- 6) Arakawa Y, Saito S, Yamada H, Aiba K. Combination of camptothecin and valproic acid suppresses the induction of Bcl-XL and induces apoptosis in MCF-7 cells. 第 67 回日本癌学会総会. 名古屋, 10 月. [日癌会総会記 2008; 67 回: 53]

分子免疫学研究部

准教授: 斎藤 三郎 免疫学, アレルギー学
講師: 大野 裕治 免疫薬理学
(兼任)
准教授: 黒坂大太郎 臨床免疫学
(兼任)

教育・研究概要

I. インターロイキン 31 の機能解析

IL-31 がアトピー性皮膚炎や脱毛の発症にどのように関与しているか解析を進めている。最初に IL-31 過剰発現 (IL-31Tg) マウスを作成して IL-31 の機能を調べた。IL-31Tg マウスは剛毛, 薄毛あるいは脱毛などの毛髪所見や激しい搔痒行動, さらには血 IgE レベルも上昇することが観察された。次に, これらの所見は rIL-31 を投与した正常マウスにおいても再現されることを確認した。

この研究において, IL-31 の機能は IL-31 レセプターを発現している細胞によって規定されることが推測された。しかしながら, IL-31R の発現動態はメッセージレベルでの推測であり, 蛋白レベルでの確に解析できる抗体は今のところない。そこで, IL-31 の機能を実証するために IL-31 に対して中和活性をもつ抗体のスクリーニングをも試みた。その結果, IL-31 に対して結合活性をもったポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作成し ELISA のシステムを確立できたが, IL-31 に対して中和活性をもつ抗体は, 残念ながら今のところ得られていない。

現在は, リガンドではなくレセプターに着目し, レセプターに対する抗体を作成することで IL-31 の機能を解明する, あるいは IL-31 の機能を制御する研究を進めている。

II. 蛋白質分泌ベクターの作成

蛋白質作成法には様々あるが, どの方法を用いて作成するかは実験の目的, 方法により選択する必要がある。特に免疫応答を解析する上で, 目的とした蛋白質を作成する方法の選択は頭の痛い問題である。それは, 目的とした蛋白質の正しい高次構造の維持および免疫応答を引き起こす微量狭雑物の混在など考慮する必要性から生じる。

当研究部で解析しているサイトカインの Interleukin 31 (IL-31) は, 優れた生産蛋白質の細胞外への放出特性を持つ。そこでこの特徴を生かした細胞外蛋白質放出ベクターの作成に着手した。最初に

蛍光蛋白質と融合させた、様々なサイトカインの蛋白質放出効率を比較検討したが、それらの中で、IL-31 誘導体は際立った蛋白質放出効率をもつことが判明した。

次に、IL-31 の細胞外への蛋白質分泌に影響を及ぼす領域を決定する為、変異体を作成し解析を行なった。IL-31 の非調節性蛋白質放出活性は、糖鎖修飾配列と IL-31 のシグナル配列の協奏的效果により生じている事が判明した。そこで、これらの知見をもとに IL-31 をベースとした非調節性蛋白質発現ベクターの作成を試みた。

ヒト癌抑制遺伝子 p 53 蛋白質を浮遊性細胞である FreeStyle 293-T 細胞で発現させた所、発現した p53 蛋白質の約 30% が培地中に放出されること、放出された蛋白質は 1 ステップカラムで簡便に純化されること、さらには精製した蛋白質は DNA 配列特異的結合活性があることなどが明らかになった。また、EGFP 蛍光蛋白質、ヒト Myc 蛋白質、ヒトアポトーシス誘導蛋白質 (Taip-3) が培地中に高効率で放出され、簡便に精製されることも確認できた。これらの非調節的細胞外蛋白質放出は接着細胞である Cos-1, HEK-293 細胞においても認められた。

本ベクターを用いることにより、目的とした蛋白質を哺乳細胞に無血清培地で産生分泌させ、活性を保持したまま精製できることが可能となった。

III. ヒノキ科花粉アレルゲンに対する交差反応性

これまで日本人スギ花粉症患者の外国産ヒノキ科花粉アレルゲンに対する交差反応性を、スギ花粉症患者末梢血単核球を用いて T 細胞レベルで検討してきた。抗体レベルでの交差反応性を、患者血清を用いてウェスタンブロット法にて解析したが、非特異的反応が強くこれまでに納得する結果が得られていない。この原因として、抗体価が低い、IgG の抗体量は IgE に比較して 1000 倍以上あるため、あるいは技術的未熟さ等によることが考えられる。

最近、患者末梢血を用いた好塩基球活性化テスト (BAT) がアレルギーの発症に関与するアレルゲンの同定に有効な検査法であることが報告された。BAT の原理は、好塩基球に結合した IgE をアレルゲンで架橋すると好塩基球表面の活性化マーカーである CD203c の発現増強が認められる。この CD203c の発現増強をフローサイトメトリーによって測定する検査法である。

解析した結果、日本人のスギ花粉症患者のほとんどが外国産ヒノキ科花粉アレルゲンに交差反応を示すことが明らかになった。さらに、BAT は intact

な状態でアレルゲンと IgE 抗体の反応を解析できる、ウェスタンブロット法や皮内反応試験に代わる有用な検査法となることが示唆された。

「点検・評価」

免疫の基礎研究から応用研究まで、様々な手法を用いて研究を進めている。基礎研究では研究室一丸となって IL-31 の機能解析を進めているが、アレルギーの発症に IL-31 がどのくらい関与するのか未だに明らかにできなかった。それは、IL-31 の機能を阻害する特異的抗体あるいは拮抗薬がないためである。しかしながら、その過程において新たな興味ある展開も生まれた。IL-31 の優れた生産蛋白質の細胞外への放出特性を持つ特徴を生かした細胞外蛋白質放出ベクターの作成であり特許を申請している。さらに、基礎研究として自然免疫が獲得免疫にどのような影響を及ぼすのかを PGD2 のレセプターの観点から追及しており、炎症初期の非特異的反応が抗原特異的ヘルパー T 細胞の特徴に影響する事を見出している。応用研究においては、耳鼻科、眼科、皮膚科、小児科および内科等との共同研究により、アレルギーや自己免疫疾患に対する病態および発症機構の解明などの研究を進展させることができた。特に、臨床系大学院生や他の教員が数多く当研究部を利用するようになり、開かれた研究室として機能は十分に果たされたと思う。

当研究室は少人数ではあるが、研究室配属、選択実習、免疫学実習など実習に費やす時間は多く、教育に十分貢献できたと思う。研究は、夢のあるいくつかのテーマに集約して進めることができたが、獲得した研究費や研究量に比べ本年度も少ししか形として残すことができなかったことは猛省しなければならない。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Yamada K, Akiyama N, Yamada S, Tanaka H, Saito S, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Taip2 is a novel cell death-related gene expressed in the brain during development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 369(2): 426-31.
- 2) Ikeshima-Kataoka H, Shen JS, Eto Y, Saito S, Yuasa S. Alternation of inflammatory cytokine production in the injured central nervous system of tenascin-deficient mice. *In Vivo* 2008; 22(4): 409-13.
- 3) Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari

M, Nasul R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagak N, Shimokata K, Nagai H. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice—Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate—. *Eur J Pharmacol* 2008; 578(1) : 87-96.

4) Manome Y, Furuhashi H, Hashimoto A, Funamizu N, Suzuki R, Ishizawa S, Akiyama N, Kobayashi T, Watanabe M. Application of therapeutic insonation to malignant glioma cells and facilitation by echo-contrast microbubbles of levovist. *Anticancer Res* 2009; 29(1) : 235-42.

II. 総 説

1) 斎藤三郎, 秋山暢丈. 【アレルギー反応の誘導要因】IL-31の多面的機能. *臨免疫・アレルギー科* 2008; 50(6) : 640-3.

III. 学会発表

- 1) 斎藤三郎, 秋山暢丈, 神野英生, 大野裕治. IL-31は血清IgEレベルを増強する. 第38回日本免疫学会総会・学術集会. 京都, 12月.
- 2) 秋山暢丈, 大野裕治, 斎藤三郎. インターロイキン-31のシグナル配列を利用した蛋白質分泌ベクターの作成. 第125回成医会総会. 東京, 10月.
- 3) 飯倉克人, 谷野千鶴子, 佐藤哲夫, 勝沼俊雄, 中川秀巳, 永田欣也, 秋山暢丈, 斎藤三郎. 喘息患者末梢血単核球のIL-31産生能. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京, 11月.
- 4) 斎藤三郎, 秋山暢丈, 大野裕治, 神野英生, 谷野千鶴子, 飯倉克人. IL-31投与によるマウス血清IgEレベルの上昇. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京, 11月.
- 5) 小澤 仁, 永田欣也, 平井博之, 小島慈之, 熊谷智彰, 遠藤朝彦, 今井 透, 野原 修, 浅香大也, 吉村 剛, 森山 寛, 斎藤三郎. 好塩基球活性化テストを用いたスギ花粉特異的免疫療法の効果判定. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会. 東京, 11月.
- 6) Saito S, Akiyama N, Kohno H, Ohno Y. IL-31 increases IgE levels in mice. XXVII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI 2008). Barcelona, June.

分子細胞生物学研究部

教授： 馬目 佳信 分子細胞生物学, 微細形態学, 生化学
 准教授： 小幡 徹 生化学, 内分泌学, 機器分析
 准教授： 佐々木博之 細胞生物学
 講師： 渡邊美智子 細胞生物学
 ポスドク： 藤岡 宏樹 ナノサイエンス

教育・研究概要

I. 超音波による脳腫瘍のセラグノスティックシステムの開発

超音波は外部から体内深部に物理的エネルギーを安全に与えることができる優れた道具である。このエネルギーにマイクロバブルなど音響化学物質と組み合わせることによりキャビテーションの発生を効率良く上げられることが判明している。この性質を利用し、マイクロバブルと超音波の組み合わせによって脳腫瘍、特にグリオーマに対して治療（セラピー）と診断（ディアグノーシス）とを同時に行なうことができる新規セラグノスティックシステムの開発を進めている。マイクロバブルは超音波造影剤として用いられているが、強い強度で超音波を作用させると振動が起り、最終的にバブルは破壊される。その際に強いエネルギーを放出するため、腫瘍細胞に直接外力を加えて、細胞膜を穿孔、細胞を死に至らしめることができる。この治療過程も超音波自身で観察することができるため、超音波による観察と治療を同時に行うことができる装置の製作を開始した。

II. 3次元培養による脳腫瘍細胞株の比較

腫瘍細胞を生体内に近い条件で培養するため3次元培養を開発し実験への適用を進めている。3次元で培養することにより超音波などが脳腫瘍組織に与える影響などを詳細に把握することが可能である。これまでに生体適合性が高く組織に吸収される性質を持つゼラチンの3次元担体を利用した独自の培養法を提唱し脳腫瘍細胞の微細形態変化について観測してきた。3次元培養を行うと通常の二次元の培養では認められないようなグリア線維のネットワークや細胞外基質の放出などが認められることなどが観察されている。今回、よく実験で用いられる4種のグリオーマ株をこの方法で培養・比較してみると腫瘍細胞株間の形態学の差を明らかにすることができ