

生体応答情報技術開発サブチーム

Subteam for BioSignal Integration

サブチームリーダー 土 井 貴 裕

DOI, Takahiro

生体は常に外界からの刺激にตอบสนองして生命の維持を行っているが、そこには複雑な情報伝達ネットワークが関与している。この外界からの刺激によって活性化される伝達経路のネットワーク機構を解析することは、様々な生体応答および各種リソース（実験モデル動物、実験モデル植物、細胞材料）の特性の解明に繋がる。これを目的として、遺伝子発現からタンパク動態まで含めた特性プロファイリングのための網羅的解析システムを構築する。この解析システムを遺伝子、細胞、組織そして個体の各レベルに適用し、個々のバイオリソースの詳細な情報を得て、付加価値の飛躍的向上を図る。それと共に、すべての結果のデータベース化を行い、より有用情報の抽出が可能なバンクとして提供し得るシステムを構築する。さらに、生体内情報伝達系の解析を個体レベルにより行い、その異常が及ぼす生体応答への影響、がんを初めとする各種疾患の発症のメカニズムの解明に寄与する。さらに得られた情報を個体レベルにおいて再構築し、ヒト疾患モデルマウスとして診断、治療の進歩に貢献するバイオリソースの開発を図る。

1. 生体応答における情報伝達経路とそのネットワーク機構の解析（土井）

生体は、外界からの種々のストレスに対応して、その機能を維持するために、さまざまな機構を有している。中でも、腫瘍壊死因子（TNF）を初めとするサイトカインは、その情報伝達経路において転写因子群を活性化することによって、生体維持のために重要な役割を担う遺伝子群の発現を調節する。特に、腫瘍壊死因子 TNF および転写因子 NF- κ B/RelA サブユニットは密接に関連しながら外界からの刺激に対する生体応答に重要な役割を担っている。本年度は、TNF の情報伝達系における NF- κ B の役割を解析することを目的として、TNF および NF- κ B/RelA 依存性遺伝子発現の解析を行った。その結果、MIP-2、PDGF-JE、Gro-1 等のケモカイン、Brca-1、A20 や等既知、未知を含めて約 60 種類の遺伝子を同定した。

2. 発がん過程における情報伝達ネットワーク機構の解析

発がん過程においては、様々な因子が関与する複雑なネットワーク機構の存在が想定されている。我々は、転写因子 NF- κ B とがん抑制遺伝子 PTEN の発がんネットワーク機構における機能を解明することを目的として解析を行っている。

(1) 転写因子 NF- κ B の発がん抑制機構の解析（土井、三瀬）

従来、転写因子 NF- κ B はがん細胞の増殖に関与することが示されてきた。我々は、その欠損マウスに腫瘍が多発することから、転写因子 NF- κ B の発がん抑制機構を想定して解析を行っている。NF- κ B/RelA 欠損線維芽細胞は、野生型にくらべトランスフォームが高率に起こり、免疫不全マウスに移植すると腫瘍塊を形成することを見いだした。しかも増殖速度は、*in vitro* においても、*in vivo* での腫瘍塊形成においても極めて速く、悪性度の高さが推察された。チップアレイによる遺伝子発現プロファイル解析の結果、腫瘍化した RelA 欠損細胞は、細胞周期関連、がん関連遺伝

子、アポトーシス抑制遺伝子群等の発現上昇が顕著に見られた。このことから、転写因子 NF- κ B が発がん抑制機構を担っていることが示唆された。

(2) RNA 干渉法を用いた PTEN 遺伝子の機能解析（土井、三瀬）

がん抑制遺伝子 PTEN は、がん発症に関与していることが示唆されているものの、PTEN 欠損マウスが胎生期のごく初期に致死となるために、その機能解析が困難であった。我々は、PTEN の発現を有効に抑制する RNA 干渉法を開発し、その発現をほとんど欠失した細胞を作出して解析を行った。この細胞は、接着能の喪失という発現型を呈した。これには、FAK ならびにアクチンファイバーの減少といった細胞骨格系の異常が関与していることを見だし、PTEN による細胞骨格の制御機構における機能が示唆された。さらにチップアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から、この現象が RNA 干渉法における非特異的な発現抑制によるものではないことを検定した。

3. 免疫制御機構における情報伝達ネットワーク機構の解析（土井、三瀬）

生体は、外界から侵入してくる病原体に対し、自然免疫ならびに獲得免疫の機構によりこれを排除することによって、感染に対する生体防御を営んでいる。この機構には様々な遺伝子群のネットワークが関与し、数々の転写因子がそれらを制御している。本年度は、転写因子 NF- κ B がこのシステムで果たす役割を解析することを目的として研究を行った。NF- κ B/RelA を欠失したリンパ球は、*in vitro* において各種増殖刺激に正常に反応する。そのリンパ球を有するマウス個体に *Leishmania major* を感染させたところ、TH1 型リンパ球が誘導されず、感染が進行し致死となった。さらに、このリンパ球では、感染防御に必須である IL-12、IL-6 ならびに窒素酸化物の産生能が著しく低下していることを見いだした。このことから、NF- κ B/RelA が感染防御機構に大きな役割を果たしていることが示唆された。

4. アポトーシスにおける情報伝達ネットワーク機構の解析 (土井, 三瀬)

アポトーシスの経路においては, 様々な遺伝子群が関与している。中でも, 転写因子 NF- κ B はアポトーシスに拮抗する働きを持つ代表的な因子である。我々は, この転写因子 NF- κ B によって制御されているアポトーシス関連遺伝子群の解析を通して, アポトーシスの経路を解明することを目的としている。本年度は, マクロファージのアポトーシスの機構の解析に取り組んでいる。NF- κ B/RelA を欠失したマクロファージは, 細菌の細胞壁の成分であるリポポリサッカライド (LPS) ならびに腫瘍壊死因子 (TNF) によってアポトーシスが誘導されることを見いだした。さらに, その経路ではカスパー 8 が活性化されており, カスパー依存性のアポトーシスであることが明らかとなった。現在, LPS によってカスパーが活性化される機構ならびに RelA によって制御されている抗アポトーシスの機構について解析を進めている。

5. ヒト疾患モデルマウスの開発 (土井, 三瀬)

我々がこれまでに作出した転写因子 NF- κ B/RelA および c-Rel ならびに腫瘍壊死因子を欠損する数系統のマウスは, 通常の飼育室では生後数週間にて死亡する。これらのマウスの解析の結果, いずれも病原性の低い菌による感染が起こっていることを見だし, これらのマウスが従来にない免疫不全マウスであることが判明した。さらに解析の結果, 好中球の遊走能の低下, サイトカインの産生能の低下, 等免疫能, 特に自然免疫機構の異常が見られた。これらのマウスについて, 免疫不全病の新しいモデルマウスとしての確立を目指して現在さらなる解析を進めている。

Living organisms receive constant external stimulation and maintain themselves in response to such stimulation through a complex network of signal transduction. One of our main goals is to develop new technologies for the elucidation of signal transduction mechanisms in bioresponses through the analysis of gene and protein expression using the microchip array technique. Another goal is elucidation of the effects on lives of irregular cytokine networks and the mechanisms of diseases such as cancer through analysis of cytokine signal transduction pathways. Yet another goal is to develop model mice for human diseases by reconstructing irregular signal transduction networks in vivo for the purpose of developing novel diagnosis and treatment techniques. During this year, we analyzed the expression profiling of TNF-induced and RelA-mediated genes with cDNA chip array experiments using RNA samples derived from embryonic fibroblast cells derived from wild type and RelA knockout mice. There were about 60 genes significantly upregulated with TNF through RelA, e.g., A20 and MIP-2. We found that TNF/RelA deficient cells were highly transformed and mice lacking those factors frequently developed tumors. Through analysis of gene expression profiling using cells derived from those mice, it was demonstrated that cell cycle-related genes, cancer-related genes, and anti-apoptotic genes were upregulated in those cells. These data indicate that NF- κ B may play a critical role in tumor suppression. We analyzed the function of PTEN using the RNA interference method for elucidation of the mechanism of tumorigenesis by PTEN. The cells in which

PTEN expression was drastically inhibited by transfection of the RNAi vector for PTEN showed irregular shape, lost regular FAK and actin fibers, and finally died. This demonstrates that PTEN physically plays a critical role in cytoskeleton maintenance and cell adhesion. Gene expression profiling analysis of the PTEN-knockdown cells also allowed us to confirm that these phenotypes were not induced as Off-target events.

We next analyzed the immunological function of NF- κ B in defense against infection. We generated mice with bone marrow consisting of RelA deficient hematopoietic cells and infected those mice with *Leishmania major*. The infected mice showed apparent swelling and had no TH1 type lymphocytes, while the normal mice had both TH1 and TH2 after infection. RelA deficient lymphocytes did not produce IL-12, IL-6 or Nitric Oxide. Analysis of macrophages lacking RelA, showed that these cells were apoptotic with LPS or TNF. These data demonstrate that NF- κ B plays a critical role in defense against infection.

Research Subjects

1. Analysis of the network mechanism in bioresponse against the stimulation from outside
2. Analysis of the network mechanism for tumorigenesis
 - (1) Analysis of the roles of NF- κ B as a factor for tumor suppression
 - (2) Analysis of the roles of PTEN as a factor for tumor suppression
3. Functional analysis of the roles of NF- κ B in innate immunity
4. Development of the new model mice for the immune deficient disease

Staff

Head

Dr. Takahiro DOI

Members

Dr. Setsuko MISE^{*1}

Ms. Noriko UCHIYAMA^{*2}

Ms. Yuko YASUDA^{*3}

Ms. Junko NIIKURA^{*3}

Ms. Rika YAMANAKA^{*3}

^{*1} RIKEN Fellow

^{*2} BioResource Technical Staff

^{*3} Assistant

口頭発表 Oral Presentations

(国内会議)

三瀬節子, 小幡裕一, 土井貴裕: “RNAi による PTEN の一時的な発現抑制は細胞の基質面への接着を抑制する”, 第 63 回日本癌学会学術総会, 福岡, 9–10 月 (2004).

土井貴裕, Old L. J., Jongeneel V., 吉木淳: “腫瘍壊死因子 (TNF), 転写因子 NF- κ B 経路によるがん化防御機構の解析”, 第 63 回日本癌学会学術総会, 福岡, 9-10 月 (2004).

土井貴裕, 三瀬節子, 小幡裕一: “PTEN ノックダウン細胞の接着能の喪失とその分子的機序”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).

土井貴裕, 吉木淳, 平岩典子, 清澤秀孔: “マウスがん組織におけるアンチセンス RNA の発現解析”, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2004).

土井貴裕, 三瀬節子, 黒田悦史, 杉浦勉, 山下優毅, 小幡裕一: “Leishmania 感染に対する NF- κ B B/RelA による防御機構”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).

土井貴裕, 三瀬節子, 小幡裕一: “マクロファージの Lipopolysaccharide 誘導性細胞死における NF- κ B B/RelA の機能”, 第 34 回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 12 月 (2004).