

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

研究課題  
「獲得免疫における高親和性抗体の産生機構と  
感染症防御への応用」

## 研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：阪口薫雄  
(熊本大学大学院医学薬学研究部  
感染・免疫学講座、教授)

## 1. 研究実施の概要

### 【研究のねらい】

免疫システムは異物、病原体、がん等の悪性新生物を識別し、排除することができる。この機能はこれまで人類に感染症予防において優れた恩恵を与えてきた。本研究では「抗原に特異的な抗体の親和性の亢進による免疫効果の向上」に焦点をあて、その機構を明らかにするとともに、リンパ細胞の高親和性抗体産生機能の飛躍的な上昇を企図した新しい分子治療戦略を展開する。具体的には、末梢のリンパ組織において発現するGANP分子が高親和性抗体産生に及ぼす分子機構を明らかにし、現在、重篤で難治とされている様々な感染症から我々を防御する方策を明示する為に研究を行った。さらに、免疫システムにおいては抗原の侵入に反応してダイナミックにリンパ細胞の増殖、遺伝子再構成、細胞の生存と死が変動することから、必然的に、このシステムの破綻は、重篤なリンパ腫を発症し、また自己認識の異常から生じる自己免疫疾患等の難病を発症することが予想される。本研究で焦点をあてるV領域遺伝子体細胞突然変異誘導、高親和性抗体産生に関与すると考えられたGANP分子の機能異常がこれら難病の原因解明に重要であると推測し研究を進めた。

### 【研究のねらいの正当性】

本研究プロジェクトでは全く新しいタイプの免疫関連分子 GANP の構造と発現パターンから、GAMP が胚中心 B 細胞にとって必要不可欠な分子機能を有しているのかの検証に焦点を絞って研究を進めた。分子機能をある程度特定した後に *in vivo* の免疫機能の解析を進めるのが通常であると考えられたが、我々はまず GANP 遺伝子欠損マウスを作製しそのマウスにおける T 細胞依存性抗原に対する親和性の獲得機能について調べた。この方法によって、まさに GANP 分子の生体における、そして免疫系における機能を確定することができた。次いで、GANP の過剰発現が抗体の親和性亢進にポジティブに働くことができるのかどうかを検証した。遺伝子欠損で抗体の親和性が低下してもそれは親和性の亢進に限定した機能であるとは言えず、細胞死や細胞増殖を制御している場合でも見られる現象である。GANP-トランスジェニックマウス(GANP<sup>Tg</sup> マウス)は我々の予想にたがわず、親和性亢進に大きく寄与することが明らかとなった。その効果は、HIV ペプチド抗原による実証試験で50～100倍の高親和性抗体を産生することを可能としていた。

第二に、この分子の作用点が①高親和性抗体産生 B 細胞の選別に関与するのか、それとも②V 領域遺伝子の体細胞突然変異(somatic hypermutation: SHM)誘導に関与するのかについて検証を行った。GANP 分子は 210-kDa の核内タンパク質であり様々な B 細胞機能分子との直接的に会合存在する。この2点の機能を制御することが明らかになった。①の B 細胞の選別に関して、protein phosphatase 2A (PP2A) の触媒サブユニットと直接会合する G5PR 分子を同定した。この分

子は GANP とともに胚中心 B 細胞で発現が上昇し、JNK から Bim の過剰活性化を抑止する機能を有していることが明らかになった。抗原への結合親和性の強弱の変化を検知する新規信号伝達制御経路として確認できた。②の V 領域遺伝子の SHM 導入への直接的な制御メカニズムについては後半の2年間を費やしたが、ニワトリ B 細胞株 DT40 細胞における検証から post AID で DNA に対する直接的作用を有することをほぼ実証できた。上記成果は研究開始時にねらっていた内容がほぼ正しいものであったことを示し、満足すべきものとなった。

第三に、GANP の DNA 損傷の制御機能、細胞の選別における機能の破綻が様々な免疫難病、悪性リンパ腫、血液疾患、その他のがん化のメカニズムと関連する可能性があるのではないかと当初の予想に関しても、ほぼ間違いないことが明らかになった。ヒトの Hodgkin 病と同様の疾患が GANP 異常発現マウスで発症し、Hodgkin 病自然発症マウスモデルとして確立することができた。ヒトの Hodgkin 病においても GANP の高発現を示し、この結果を裏付けた。腫瘍化に関する研究へと大きく展開した。その結果、乳がん、悪性黒色腫、胆管がん、脳内リンパ腫、グリオーマでその異常な発現が見られ、これらの腫瘍の発症と GANP の異常が密接に関連することが判明した。乳がんに関して焦点を絞り、実際の乳がん症例に関する検討を行ったところ120例の乳がん症例で GANP 発現の異常が認められ、乳がんの悪性度の進行に関連することが明らかになった。自然発症乳がんの約20%に異常が認められることを確認し、当初のねらいが外れていなかった事が示された。

第四に、本研究計画のテーマである「抗原に特異的な抗体の親和性の亢進による免疫効果の向上」に関して、当初のねらいで期待したものははるかに超えた成果を上げることができた。GANP 過剰発現による GANP<sup>Tg</sup> マウスでは高親和性抗体の産生が著しく増加することを示した (Sakaguchi et al., 2005)。しかも、その効果が V 領域遺伝子の SHM 誘導に直接効果を発揮する。DT40 細胞における解析からニワトリでは gene conversion と SHM の両者に効果を持ち、V 領域遺伝子の diversity の獲得のメカニズムに作用することが明らかになった。このような機能は AID のトランスジェニックマウスでも UNG の過剰発現でも見られないことから、GANP の作用点は V 領域遺伝子の SHM 誘導に最も直接的に影響を及ぼす領域であると考えられた。発見当初から GANP の遺伝子、タンパク質に関する基本特許を獲得していたことから、本事業も円滑に進めることが可能であった。GANP<sup>Tg</sup> マウスを用いると従来の野生型マウスと比較して nitrophenyl-ハプテン、HIV-ペプチド、その他様々な T 細胞依存性抗原を用いた解析から、抗原との結合親和性が50〜100倍に上昇した抗体を生み出すことが可能であった。さらに新興、再興感染症に対する診断や予防薬としても活用可能であると期待できた。その例を示すために国際的な共同研究を広範囲に行って高親和性抗体作製を行い有望なクローンを樹立している。我々が示したような親和性の高いモノクローナル抗体を樹立する技術は、世界でも類のないものである。この技術を一研究室の技術とするのではなく、国際的研究、医療技術、治療薬開発等に向けて活用するべく基礎研究を展開する。

## [研究成果]

上記項目で概説したが、成果としては当初の目的とねらいに従って達成できていると考えている。この研究は我々のオリジナルであり、最初に GANP の免疫系における機能を確定したことから、国際的な研究者が容易に参入できないものとなった。従って、GANP に関して現在発表されている論文のほぼ大部分が我々の研究成果である。このこと自体は研究の進展が期待どおりで他の追随を受けないものとなったことで一定の評価が得られたと言える。一方、我々の成果を広く免疫学、生物学、医学に展開し、一つの領域を形成するという基礎学問の発展の為には一般的な共通の分子基盤の理解が必要である。そこで、我々はこの GANP の機能を他の国際的評価の高い研究者との共同研究で確認し、その正当性の評価を受けることとした。その為には、GANP 分子の純化タンパク質を得ることが必要であった。最終年度1年間をかけてタンパク質精製を成功させることができたため、南カリフォルニア大学の Myron Goodman 教授との共同研究により *in vitro* における AID 機能の解析システムを用いて検証することにした。DT40 細胞での研究成果では、GANP が post AID で機能し、おそらくは AID の活性に何らかの制御効果を持つものと予想された。このような分子は、AID の分子機能を理解する上で、現在多くの研究者が追求しているものであり、GANP の機能の中に これ等を有していることを実証することができれば V 領域 SHM 誘導の全容の解明に最も重要な研究となると考えた。現在、GANP の高度純化タンパク質を用いて *in vitro* における AID 活性制御、single strand DNA 変異誘導の測定系において GANP 分子の持つ活性を確認している。これらの成果を GANP 分子機能の解明として本研究年度の最終成果としてまとめる。

## [研究成果のまとめ]

胚中心 B 細胞で選択的に発現上昇する GANP 分子は T 細胞依存性抗原に対する高親和性抗体の産生におそらく必須な分子である。この分子の機能の解明が完了したとは言えないが、GANP は DNA 修復に関わる機能、RNA 輸送などの RNA 代謝に関わる機能、細胞周期進展に関わる機能、転写制御機能、細胞内信号伝達制御に関わる機能を有する多機能分子であった。本研究で確定した成果は、GANP が抗体の高親和性誘導に関わる分子であり、細胞の選択と V 領域 SHM の制御を行う機能を持つことである。その作用点は限りなく AID 分子と密接であることが示唆された。この分子の異常な発現が様々な腫瘍の発症に関わり、今後、腫瘍の発症の分子メカニズムを解明する上で新たな糸口を提供するものと考えられた。さらに、派生的な成果であるが、従来と比べて50～100倍の高親和性のモノクローナル抗体を作製する技術を確立し、我が国の新規バイオテクノロジー技術として汎用できるシステムを樹立した。

## [ I ] 基礎研究

獲得免疫において抗原特異的抗体を産生することがその分子基盤である。1957年にバーネ

ットが提唱した「クローン選択説」は抗原特異的抗原受容体を発現する B 細胞が胎生期の肝臓や生後の骨髄内で発生、分化する過程で免疫グロブリン遺伝子の再構成による多様性によって保障されていると考えられてきた。その多様性は抗体の一次レパートリーと呼ばれ、100個ないし300個の V 領域遺伝子と D 領域、J 領域の各領域群の中から各々一つの遺伝子領域をランダムに再構成に用いて形成される。この際には初期 B 細胞で限定的に発現する遺伝子切断分子 RAG1 と RAG2 によって正確な遺伝子再構成が行われる。この一次レパートリーは数億種類以上の多様な抗体の特異性を獲得することが可能になり、これによって獲得免疫の機能のほぼ全容が説明できると考えられてきた。

しかし、近年の研究結果は、感染や異物排除に重要な抗体はこの一次レパートリーの抗体そのままではなく、一次レパートリーで形成された抗原特異的な B 細胞は単に抗原を特異的に認識するに過ぎないことが明らかになっている。ほぼすべての可溶性抗原に対する有効な抗体は末梢のリンパ組織で増殖・分化して獲得する高親和性の抗原受容体を発現している B 細胞から産生されるものであることが明らかになった。末梢のリンパ組織では、樹状細胞によって抗原提示を受けて活性化した T 細胞は B 細胞の V 領域遺伝子への高頻度の SHM を誘導するため、抗体の特異性の亢進が図られ、抗原に対する特異性、結合親和性が高まり、微量でも強力な抗体になることができる。さらに抗体は IgM クラスから IgG、IgA、IgE のクラスに転換するアイソタイプスイッチを行い、免疫応答で必要な抗体の effector 機能の成熟を図る。この抗原刺激で活性化された抗原特異的 B 細胞は、末梢リンパ組織の脾臓やリンパ節などに形成されるリンパ濾胞の胚中心に移動して急速に増殖・分化を行い、成熟した抗体を産生する B 細胞に分化、成熟する。この現象は二次抗体レパートリーとして解析され、抗原に特異的で高親和性の抗体がクラススイッチした形で産生されるに至る。

この二次抗体レパートリー形成の過程では抗原に対して、より親和性の高い抗体が産生される可能性がある代わりに、自己に対して反応する危険な自己抗体産生細胞に変貌する危険性ははらんでいる。しかし、生体ではあくまでも自己抗体産生クローンは排除され、免疫応答の対象となる抗原に対して、より高い親和性の抗体を産生することができる。末梢のリンパ組織における抗原特異的 B 細胞の二次成熟のプロセスを解明することは、獲得免疫反応を理解し、その破綻による免疫難病の解明に必須の要件であると言える。B 細胞の抗原刺激依存性の活性化、増殖、分化は末梢のリンパ組織に形成される胚中心によって行われる。この二次レパートリーの形成で抗体の多様性と親和性の獲得がどのように行われるのかについての分子機構の全容は解明されていない。まず、第一に考えられたメカニズムとして胚中心においても骨髄で行われたのと同様の免疫グロブリン遺伝子の再構成の機構が再発動されるとする考え方であった。一度再構成に成功した VH-DH-JH 部分や VL-JL 部分が B 細胞の抗原受容体の産生を行うが、胚中心内でその抗原に反応する B 細胞が再度遺伝子再構成を行い、異なった組み合わせの V 領域遺伝子再構成の組

み合わせを生み出すとする Receptor Editing/Receptor Revision の考えである。この考えは 20 世紀末にもっとも有力な考え方とされた。胚中心 B 細胞では centroblast 細胞で RAG1/RAG2 分子の発現が見られ、遺伝子再構成が起こっていることが示されたからである。しかし、このことは決して胚中心 B 細胞では起こっていないことが、RAG1-Green Fluorescence Protein (GFP) 遺伝子ノックインマウスによって証明された(研究推進者既発表論文)。免疫反応が激しく行れる胚中心では急激な B 細胞クローンの増殖と選別が進められるために、B 細胞のプールに間隙ができ、その場に骨髄から新しく産生されたばかりの B 細胞が動員されることによるものである。Receptor Editing/Receptor Revision は、自己反応性 B 細胞のレセプターを全面的にキャンセルして、新しい特異性を持つ B 細胞に生まれ変わる可能性を否定できないが、少なくとも抗原に反応している B 細胞の抗原に対する特異性を保ったまま、結合親和性を高める affinity maturation の基本機構としては考えにくい。

これに対するメカニズムとして、B 細胞クローンの V 領域遺伝子に点突然変異を入れる SHM がある。この機構は二次レパートリー形成の最も有力な仮説として長い間未知の重要課題として残されていた。①なぜ T 細胞では V 領域 SHM が起こらず、B 細胞にのみ起こるのか。②なぜ C 領域遺伝子には起こらないのか。③抗原に対する親和性がどのように高められるのか。④どのようにして抗原に対して高親和性の B 細胞を選別するのか。⑤抗原に対して結合性を失い、逆に自己抗原に対する特異性を獲得したりしないのか。これらを一元的に説明する研究は、本 CREST プロジェクトを開始した当時から国際的に活発に開始された。1999 年に胚中心 B 細胞に特異的に発現する cytidine deaminase が本庶らによって発見された。この分子は Apobec1 と類似した RNA editing 分子として activation-induced cytidine deaminase (AID) として解析されたが、遺伝子欠損マウスによって V 領域遺伝子の SHM が誘導されなくなること、クラススイッチ(class switch recombination; CSR) が起こらなくなることから SHM と CSR の第一義的機能分子であることが示された。現在、多くの研究者らによって AID が胚中心 B 細胞で発現すると遺伝子転写の活発な V 領域 DNA が部分的に二重鎖 DNA 解裂状態(バブル)を形成し、R-loop として AID が cytidine の脱アミノ化を行う。この結果 cytidine が uracil に転換されることから、その後起こる DNA 複製の際に C to T の transition 点突然変異が導入される。反対側の DNA 鎖では G to A 変異が起こることが示された。したがってほぼすべての変異がこれらの塩基に限られるものと予想される。しかし、実際には SHM は WRCY/RGYW で示されるコンセンサス配列に高頻度に導入されている。この事実は単なる偶然であるか、あるいは DNA 鎖の持つ立体的構造によるものと予想されている。その後 uracil に対して選択的な uracil-DNA glycosylase (UNG) が同定された。UNG は遺伝子欠損しても SHM が消失することはないが、変異の起こる塩基には transversion 点突然変異誘導が起こらなくなる。このときには error-prone DNA polymerases ( $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\iota$ ,  $\theta$ ) が関与することが様々な遺伝子欠損マウスによって示されている。したがって V 領域 SHM の起こる分子機序として Cytidine Deamination モデルが次の

ように考えられている。AID が SHM 開始の initiator であることは間違いなく、その後 UNG が必要なこと、error-prone DNA polymerase が胚中心 B 細胞で増加することが明らかになっている。しかし、このモデルを以ってしても、V 領域遺伝子の cytidine 以外の塩基の変異や、どうして WRCY モチーフに変異導入が蓄積するのか、一度高親和性抗原受容体の V 領域の SHM を維持するためにその後の SHM の導入をどのようにして速やかに停止させることができるのかについては説明できない。これらの課題は獲得免疫応答における抗体の成熟の分子機構を明らかにするために必須なものである。

## 2. 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

獲得免疫における高親和性抗体産生機序を細胞、分子レベルで明らかにし、免疫応答の分子機構を解明する。その破綻による免疫難病の病因解明、治療方略の策定を目指す。この目的のため胚中心 B 細胞で発現する GANP 分子の役割を解析した。B 細胞特異的な GANP 欠損マウスは T 細胞依存性の抗原(ウイルスなど大部分の病原体抗原に相当する)に対して、一応の抗体産生を行うことができるが、高親和性の抗体を産生することができず、より長期間の免疫応答が必要となる。モデル抗原としての最小単位(ハプテン)として、合成抗原 nitrophenyl-CG (NP-CG)を用いて解析し、GANP 欠損マウスでは結合力の高い高親和性抗体を産生できるかどうかを調べる。このマウスの V 領域遺伝子 DNA の二重鎖切断(DSB: double strand break)の頻度を調べ、DNA 修復系酵素の発現についても検証する。GANP が DNA の切断に必要なのか、それとも GANP の欠如により転写レベルで DNA 修復系酵素の発現が上昇し、結果、修復系が亢進して DSB が減少するのか、DSB の減少は突然変異の頻度に影響するのかを調べる。(初年度から3年度)(桑原グループ)

高親和性獲得では GANP 分子が V 領域変異を積極的に制御している機能とさらに変異細胞の生存を維持する機能を有しているかどうかを調べる。この両者の機能を遺伝子導入による *in vitro* の測定系により分子レベルでの獲得免疫の親和性亢進誘導の制御機構を解明する。*in vitro* での遺伝子再構成の誘導、抑制に関して  $\beta$ -galactosidase recombination システムを準備し調べる。このときに関与する分子を明らかにし、GANP 分子が加わっているのはどの遺伝子修復系であるのかを明らかにする。最も有力な制御系として、p53 を介在する経路から MDM2 や、ATM 経路から BRCA1、RAD51 等の分子群との関連を調べる。V 領域変異誘導には第一義的には AID 分子が重要であることから、GANP の AID との物理的、機能的な位置関係を示すことが最終的な解明になる。その点を重視して AID に焦点を当てて解析する。(3年度から最終年)(桑原グループ、前田グループ)

GANP 分子を過剰に発現する GANP<sup>Tg</sup> マウスから多くの情報を得る。外来導入遺伝子が多コピーで、GANP 分子の発現が高いと GANP<sup>Tg</sup> マウスは生存し得ないか、あるいは排除されて生まれて

こなかった。しかし、約2倍程度の発現上昇を認めるマウスが10数系統あり、このうちの2系統から情報を得た。ハプテンやペプチドを抗原として免疫して、そのマウスの脾臓 B 細胞とマウスミエローマとのハイブリドーマを作成して、実際の抗体の親和性獲得を抗体タンパク質レベルで解析した(トランスジェニックマウス及びコントロールマウスともに6,000クローン以上の融合細胞をスクリーニングする)。BIAcore による抗原に対する結合力を解離定数として算出する。通常のペプチド抗原を免疫して得られる抗体に比べて高い親和性の抗体が得られるかどうかを調べる。(2年度から最終年)(桑原グループ)

実際に V 領域遺伝子の突然変異導入率とその部位に違いが認められるかどうかを調べる。V 領域遺伝子の突然変異導入に関しては NP 抗体産生で用いられる VH186.2 の特に高親和性抗体産生に必要な33番目の Trp が Leu に変異する頻度を調べる。この結果をより確実なものとして実証するために、GANP<sup>Trs</sup> マウスで検討する。高親和性抗体の産生が著しく増加するのか、あるいは変化しないのかを調べる。VH186.2 領域の SHM 誘導、すなわち33番目の Trp が Leu への変異する頻度に着目する。その親和性の亢進を正確に測定するため、NP 特異的なモノクローナル抗体産生細胞を樹立する。VH186.2 において33番目の Trp から Leu への変異、その他さらに多くの変異が導入されているのかどうか、K<sub>D</sub> 値がどのように変化するのか、野生型抗体の高親和性が  $5 \times 10^{-7}$  M であるのに比してより高い親和性をもつ抗体が得られるかどうかを調べる。(2年度から3年度)(桑原グループ)

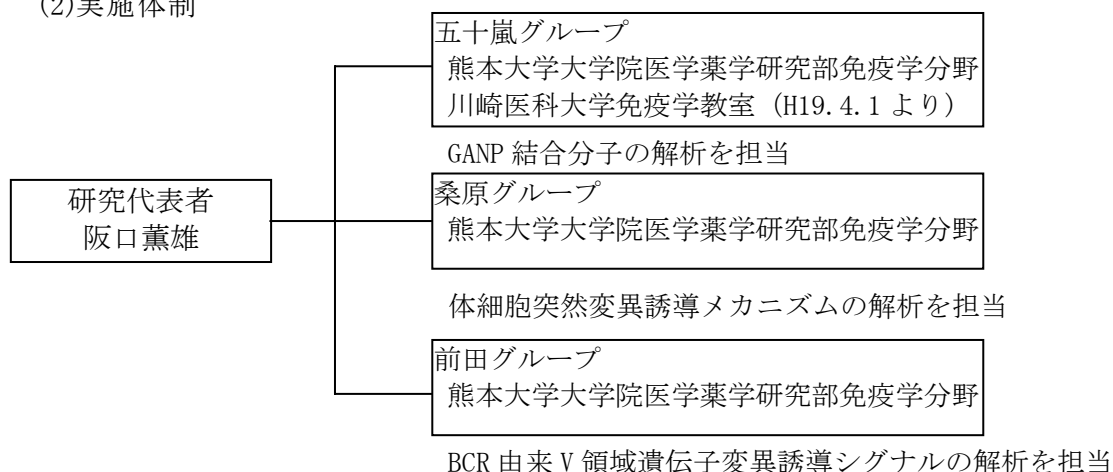
このうち最も高いクローンについてその抗体遺伝子の V 領域遺伝子を決定し、germ line 遺伝子に何個の遺伝子変異が導入されているかを調べる。このシステムを用いて、獲得免疫の機能的強化と自己免疫疾患治療という観点から、実用化の可能性を検討する。具体的には、このマウスを用いて従来の方法では得られない、超高親和性のモノクローナル抗体を作成して、様々な感染症の診断、治療に役立つプロトタイプの実験を行う。抗体の親和性の亢進を誘導することのできる動物はこれまで国際的に報告がなく、全く新しい技術の開発である可能性があるため、その効果について詳細に調べる。この技術が、モデル抗原以外で実際に活用することが可能であるかどうかを検証するため、当研究室のみならず、様々な国内外の研究者、国内企業と積極的な共同研究、連携研究等を推進する。HIV 抗原のエピトープに対する高親和性モノクローナル抗体を作製する。得られた抗 HIV 抗体の K<sub>D</sub> 値が優れているか、実際に HIV と結合するのか、さらに感染を中和する活性を有するかどうかを調べる。また、SARS コロナウイルスに対するモノクローナル抗体を作製する。様々な抗原に対する高親和性抗体を作製する新しい技術として国内拠点を形成する基盤を固める。以上の研究は、免疫応答において実際に高親和性をポジティブに増強する分子が存在することを初めて明らかにするものであり、その活用は本事業から生まれた新しい技術成果といえる。さらに、GANP 分子の活性のメカニズムの解析、免疫難病の自己免疫疾患発症におけるその原因解明の糸口として解析を進める。(3年度から最終年)(桑原グループ)



GANP 分子の異所性の発現亢進を様々なヒトの疾患で調べる。Hodgkin 病をはじめとする血液リンパ系腫瘍、ことに胚中心関連の疾患で高い発現が存在するかどうかを調べる。また、正常のヒト骨髄でその発現亢進が見られるかどうかを調べる。様々な白血病患者の骨髄で異常な発現亢進が認められれば造血系の腫瘍性疾患において、有力な診断マーカーとなる。悪性黒色腫 (malignant melanoma) の悪性度の判定に用いることができないかと考え、皮膚科専門医の協力を得て進める。GANP 分子が仮に p53 等の遺伝子修復系に包含される機能分子であるとするならば、アポトーシス制御を行うか、遺伝子修復を行って細胞を生かす方向に進めるかの両者の機能を細胞腫とその細胞の DNA 損傷ストレスの種類によって選択している可能性がある。この場合、GANP<sup>Tg</sup> マウスも *ganp* 遺伝子欠損ヘテロマウスもともに悪性腫瘍を発症する可能性がある。GANP 分子の異常な発現や機能異常が直接細胞の腫瘍化を誘導するかどうかを検討する。ヒトの長期生存経過では、様々な感染症に対する生体反応が遺伝子レベルでストレスを与え、発がんに至る事が推測されている。GANP 発現異常マウスを用いて感染実験を行うことによって、このストレス傷害がどのように作用しているのかを知ることが可能となり、良きマウスモデルを提供するものとして興味深い。(3年度から最終年) (桑原グループ)

GANP 分子の過剰発現を起こしたプラズマ細胞が自己免疫疾患マウスで見つっている。自己免疫疾患では自己抗原に対する抗体産生細胞が胚中心の marginal zone から検出されることが報告され、にわかに自己免疫と胚中心の機能が重要性を増している。自己免疫疾患の原因は多因子であるとされるが、感染が引き金となり、病原体の抗原性と近似した自己成分に対して抗体が産生されることもその一因と考えられる。GANP 分子の発現と自己免疫疾患 B 細胞の出現との関連を明らかにすることは、自己免疫疾患の治療を考える上で重要である。このことを明らかにするために、GANP 分子と結合し、その発現、および機能制御に重要な役割を果たすと考えられる分子群をプロテオミクス解析で同定する。会合分子の同定によって GANP の多機能を具体的に説明できるように分子経路を明らかにする。(2年度から最終年) (五十嵐グループ)

## (2)実施体制



研究実施は、熊本大学大学院医学薬学研究部免疫学分野の各グループが中心になって研究テーマを担当した。また研究を遂行する上で、学外の研究協力者として以下の諸先生方のご尽力を頂いたことに感謝致します。

相沢慎一

理化学研究所発生・再生科学総合研究センターボディプラン研究グループディレクター

江崎太一

東京女子医大学医学部解剖学・発生生物学教授

大島孝一

久留米大学医学部病理学講座教授

影下登志郎

熊本大学大学院皮膚機能病態学助教授(現・影下皮膚科クリニック院長)

河本 宏

理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター免疫発生研究グループディレクター

黒崎知博

理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター分化制御研究グループディレクター

園田英一朗

京都大学大学院医学研究科放射線遺伝学講座准教授

武田俊一

京都大学大学院医学研究科放射線遺伝学講座教授

竹田潤二

大阪大学大学院医学系研究科環境・生体機能学講座教授

竹森利忠

理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター免疫記憶研究グループディレクター

広瀬幸子

順天堂大学医学部病理・腫瘍学講座准教授

福永浩司

東北大学医学部薬理学講座教授

松岡雅雄

京都大学ウイルス研究所ウイルス感染症学教授

### 3. 研究実施内容及び成果

#### 1. GANP 分子の同定、発現

## 1) GANP 分子の同定

多くの可溶性抗原に対する抗体産生は末梢のリンパ組織における抗原特異的 B 細胞の活性化、増殖、分化の過程で成熟する。これには Th 細胞からの共刺激が必要である。CD40/CD40L の接触や IL-4、IL-5、IL-6、TGF $\beta$ などのサイトカイン刺激が重要であるとされている。これらは抗原の侵入や感染で急速に発達するリンパ濾胞にできる B 細胞集団であり、免疫応答の佳境では胚中心(Germinal center: GC)として検出される。個々では抗原に反応する単一クローンの B 細胞から10日～14日の期間に数十万個にまで拡大し、細胞分裂速度は生体の細胞としては最速の4～6時間に一回の分裂を行うとされている。分裂時期の細胞は centroblast と呼ばれ、中心動脈から近い部分で細胞が密に存在するため、染色では濃染されることから暗帯(dark zone)と呼ばれる領域を形成する。その後、増殖した細胞は直ちに分裂を停止して細胞周期の休止期に入り増殖を停止するとされる。この細胞集団は centrocyte と呼ばれ、中心からより遠位に存在して明帯(light zone)を形成している。抗原刺激を受けた B 細胞は胚中心で増殖してクローンの拡大を図る間に様々な遺伝子レベルでの変化による、大幅な機能革新を行う。①V 領域遺伝子に SHMを導入して、抗原に対して特異性の強化と結合親和性の向上を行う。②IgM クラスから IgG クラス、IgA クラス、IgE クラスへの転換を行う。③抗原特異的で高親和性の抗原受容体を発現する B 細胞をより選別して、増殖させて胚中心から排出する。④このとき、必然的に親和性の向上を図ることができなかった B 細胞クローンができることや、反対に自己の抗原に対して反応する自己反応性クローンの誕生を阻止することが必要である。⑤さらに、免疫応答では胚中心での B 細胞の増殖・分化を免疫応答の必要最低限度におさめておくという拡大停止の機能がもっとも重要であるといわれている。そのプロセスで胚中心の周辺部分に記憶 B 細胞として抗原特異的で高親和性抗原受容体を発現している状態を何年もの間、時には一生涯を通じて保有、維持することが不可欠である。従って、胚中心における B 細胞の分化・成熟を明らかにすることは、バーネットが当初の「クローン選択説」では考え及ばなかった問題として残されている二次抗体レパートリーの研究であり、免疫機能の破綻を明らかにし、癌や免疫難病の原因を解明し、また、ワクチンをはじめとする様々な免疫機能に基づく様々な疾患の予防や治療への応用を進める上できわめて重要な課題である。

胚中心における B 細胞分化の解析には何よりも B 細胞内での変化を確実に、分子レベルで捉えることが重要であると考え、本プロジェクトで、末梢のリンパ組織でその発現が上昇する機能分子を同定することを試みた。その方法とし、mRNA 転写の上昇あるいは減少する分子群を対象にすること、タンパク質としてその変化を同定すること、そして免疫応答で変化し、尚かつ、免疫応答に必須であるという条件で対象を絞った。その結果、マウスの腸管リンパ組織の胚中心領域でその発現が上昇する分子を認識するモノクローナル抗体(29-15)を作成した。この抗体で、免疫組織染色を行ったところ抗原免疫を行って形成させたリンパ濾胞、その中の胚中心領域でその発現が上昇していた。

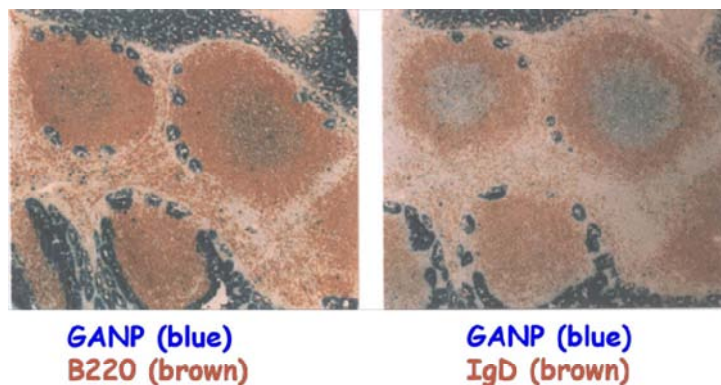


図1

しかし、胸腺やその他、非免疫のリンパ組織での発現は検出できない、胚中心の B 細胞特異的な分子を認識していると考えられた(図1)。この抗体が認識する抗原をコードする遺伝子をλgt11 フェージでタンパク質発現クローンのスクリーニングで同定した。候補クローンの遺伝子を用いて RNA *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、その mRNA は胚中心 B 細胞に発現が明らかに上昇していた。この mRNA の様々な器官や組織の細胞での発現を調べたところ、わずかながら、どの器官のどの組織の細胞にもユビキタスに発現していた。*In vitro* で培養する腫瘍細胞株で調べたところ、同様に高い発現をしている、増殖関連分子であることが示された。しかし、正常細胞では発現上昇が顕著なのは B 細胞であり T 細胞ではほとんど検出ができなかった。B 細胞を *in vitro* で刺激してその発現を見ると BCR 刺激、lipopolysaccharide (LPS) 刺激でその発現の上昇が見られるが、特に顕著な刺激は anti-CD40 抗体による刺激であった。この遺伝子の配列を決定したところ 210-kDa の核内タンパク質をコードすることが示唆され、これまでに報告されたいかなる分子とも異なり、新規の胚中心発現分子として Germinal center-associated Nuclear Protein (GANP)と命名し、データベース登録を行った。この分子のホモログ検索では一部 *Saccharomyces cerevisiae* の Suppressor of Actin(SAC)によって分類される SAC3 にその原型を見ることができる。SAC3 はその欠損によってアクチンの重合が抑えられ、分裂速度が極端に低下する変異株であるが、この遺伝子でコードされる分子は 150-kDa で THP1 分子と複合体を形成して酵母の mRNA 転送に関わることが報告されている。mRNA/SAC3/THP1 複合体は染色体 DNA から読み取られた RNA 転写産物を核膜に存在する nucleopore 複合体で構成される nuclear basket に誘導し、RNA/タンパク質複合体を核膜通過させて細胞質に誘導する核-細胞質輸送系に関与することが明らかになっている(図2)。本 CREST 研究開始時には GANP 分子の SAC3 様の機能については明らかではなかったものの、データベース上では GANP/SAC3 遺伝子ファミリーとして分類されている。

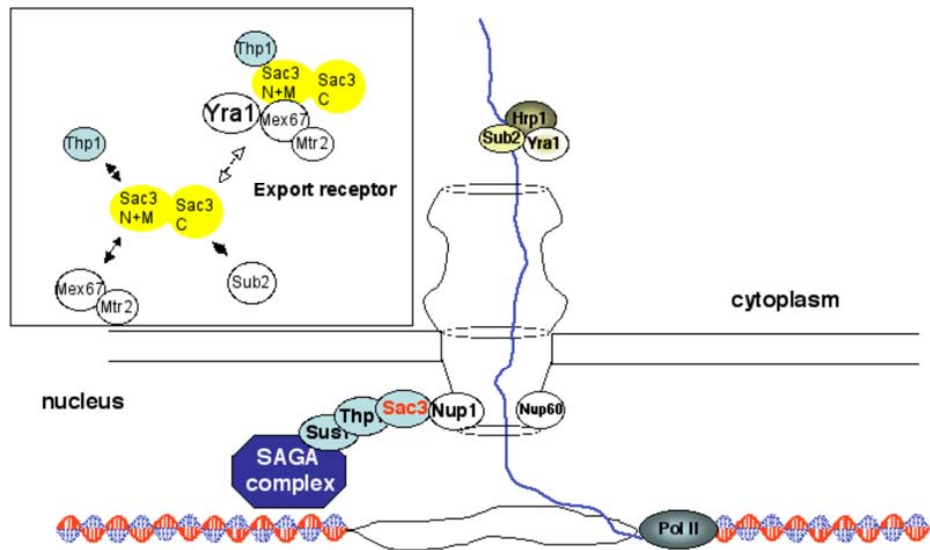


図2

## 2) GANP 分子の発現

*ganp* 遺伝子の発現は、様々な臓器、器官、組織からの RNA で Northern blot 解析を行った限りではユビキタスである。6-kb の単一のバンドとしてみられる。RNA スプライスバンドは正常のマウス RNA を用いる限り検出されない。*ganp* mRNA の発現制御領域の検索を遺伝子導入レポーター活性で行ったところ、成熟 B 細胞とプラズマ細胞の 5' 領域約 -737 bp にその活性制御が見られた。特に、-126 bp にある PU.1 コンセンサス領域が一つの制御点であることがゲルシフトアッセイによって分かった。さらに、PU.1 の強発現や anti-CD40 抗体刺激によって *ganp* のプロモーター活性が B 細胞で上昇することが明らかとなった。PU.1 制御は p53 の制御を受ける標的でもあることから細胞周期、細胞死、ならびに様々な遺伝子の発現制御への起点となりうることを示唆されている。

## 3) GANP 分子の局在

GANP 分子を特異的モノクローナル抗体で染色すると、その発現は胚中心組織では核内に存在する。腫瘍細胞株、繊維芽細胞で発現の局在を調べたところ、GANP 分子は細胞質と核内とともに発現している。GANP 分子には 2 箇所の核移行シグナルが存在し、細胞質局在型、細胞質・核内共局在型、核内局在型に分類される。その割合から細胞周期に伴って核と細胞質を移行する可能性が示唆された(研究推進者実験結果未発表)。

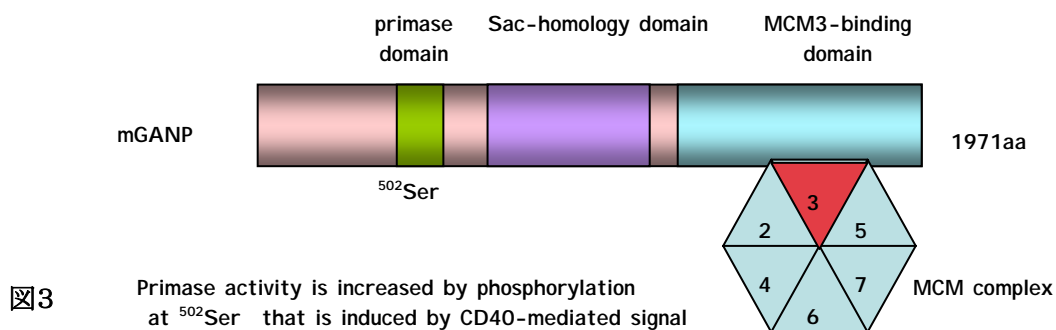
## 2. GANP 分子の免疫系における機能に関する最初の証拠

GANP 分子が B 細胞においてどのような機能を発揮するかに関して、初期の研究は V 領域の多様性の亢進に関わることが示唆された。ヒトの B 細胞リンパ腫である Daudi 細胞に *ganp* 遺伝子を導入した。遺伝子導入細胞の H 鎖 V 領域遺伝子の変異導入率を比較したところ、*ganp* 遺伝子導入細胞で高い変異を来すことがわかった。Daudi 細胞は AID を恒常的に発現している胚中心 B 細

胞由来の腫瘍細胞である。AID の存在下で V 領域遺伝子の変異を導入することから、胚中心 B 細胞の抗原に対する抗原受容体の成熟に機能することが示唆された (論文未発表)。

### 3. GANP 分子の構造

遺伝子配列上、および我々の研究、その他の研究者の報告を総合して現在考えられる GANP 分子の機能ドメインは多岐にわたっている (図3)。近年、一般的にタンパク質の機能モジュールの解析が進んだことから単一分子が複数の分子機能を有することはごく普通のこととなっているが、それにしても 210-kDa というかなり大きな分子の機能の全容を、タンパク質モジュール解析から演繹し、明解に決定するに至ってはいない。



#### 1) MCM 結合領域

ヒトの *ganp* 遺伝子は第 21 染色体の長腕に位置し総延長 50-kb に及んで 28 エキソンでコードされる。この遺伝子領域から C 末端側の 80-kDa タンパク質をコードする MAP80 (MCM3AP) が報告されており、この領域には真核細胞での Minichromosome Maintenance complex (MCM) と直接結合することが明らかにされている。MCM 複合体は MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MCM6、MCM7 の 6 量体で構成され、DNA 複製に必須な DNA ヘリカーゼ複合体である。MAP80 (MCM3AP) はまた MCM3 分子のアセチル化を起こして DNA 複製機能を維持する活性を有することが報告されている。我々の研究で、ヒトの B 細胞株では *map80* mRNA は 6-kb の *ganp* mRNA と同一の遺伝子領域から読み取られた variant mRNA であるものの、イントロンには MAP80 特有の転写開始点があるものと推定された。*ganp* と *map80* の mRNA は、その発現挙動はほぼ同一であるがヒト MAP80 は現在タンパク質分子としての明らかな存在が確認できていない。一方、マウスにおいては末梢の B 細胞や細胞株、さらには様々な正常組織において MAP80 に関してそのタンパク質の存在のみならず mRNA の存在すら確認できていない。RNA splicing に関してはヒトとその他のほ乳動物において相当の違いがあることが知られており、このことがヒトにおける限られたゲノム遺伝子を基にした分子発現の多様性に寄与しているものと示唆される。しかし、少なくともマウスを基盤とした免疫応答を検討する際には MAP80 の分子発現をあまり考慮する必要がなく、また、その領

域の機能を明らかにする上においても遺伝子の特定領域の欠損クローンを用いる解析を可能としている。全長の遺伝子でコードされる 210-kDa の GANP 分子も MAP80 と同様に MCM 複合体を直接結合する。また同様に MCM3 へのアセチル化活性を保有している。

## 2) RNA プライマーゼ領域

GANP 分子には上述の MAP80 や酵母 SAC3 には存在しない固有の RNA プライマーゼ相同領域が存在する。この領域のリコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* で RNA プライマーゼ活性測定系で調べたところ、RNA プライマーゼ活性が確認できた。そして、RNA プライマーゼ活性がこの領域に存在する 502 番目のセリン残基のリン酸化によって制御されていることを明らかとした。そのリン酸化されるセリンをアラニンに一アミノ酸置換して、リン酸化の生じないリコンビナントタンパク質では全く RNA プライマーゼ活性を示さなかった。GANP の保有する RNA プライマーゼ領域と MCM 複合体と結合するドメインは、 $\alpha$  RNA プライマーゼと DNA polymerase  $\alpha$ /MCM 複合体による DNA 複製機構に相当する新しい分子活性であると推定され、GANP は tentative に  $\beta$  RNA プライマーゼとして分類されている(図4)。

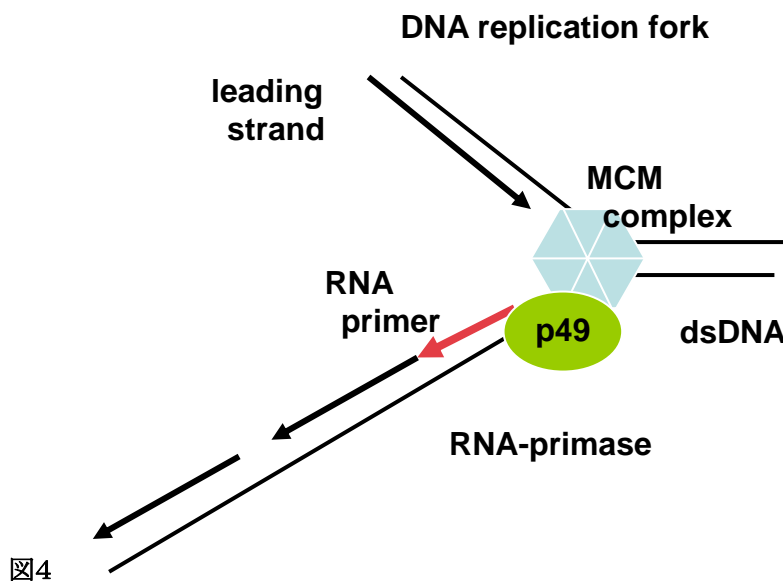


図4

興味深いことに GANP 分子のセリン 502 は CDK2 によって選択的にリン酸化されるコンセンサス配列を示し、そのリン酸化を検出することのできる特異的モノクローナル抗体によって B 細胞ではセリン 502 の領域のリン酸化は CD40 分子を介する信号伝達によって活性化されることが明らかになった。また、抗原刺激を行って脾臓のリンパ濾胞に胚中心を形成させて、GC-B 細胞における GANP のセリン 502 のリン酸化を検出したところ、胚中心領域の centroblast が存在する暗帯の領域で高リン酸化が検出された。このことは centroblast では細胞周期が活発に回転し、CDK2 が活性化されることによって GANP 分子の活性化が行われていることを示している。また、Lyn 欠損の DT40 細胞を用いて調べた結果から、Lyn からの信号伝達によって PU.1 の発現が上昇すること、そして PU.1



が GANP のプロモーターに結合して *ganp* の転写を上昇させることが判明し、*ganp* の発現上昇とその活性化において新たな経路が見出された。このことは B 細胞における GANP の活性化の上流シグナルも密接に胚中心の B 細胞活性化刺激と関連していることを示唆している。

### 3) SAC3 相同領域

ヒトもマウスも同様に GANP 分子の中央部分約 70-kDa の領域は酵母の SAC3 分子と 23% の相同が認められる。この領域の機能解析を行う上で、まずは哺乳動物における GANP/SAC3 ファミリー分子群を検索した。その結果マウスでは SHD1、Leng8 の 2 種類の相同遺伝子が存在していた。*shd1* 遺伝子は、ヒトでは第 11 染色体短腕に位置し、SAC3 相同領域のみを有する 45-kDa タンパク質をコードする。SHD1 分子の機能解析は、GANP 分子の相同領域の機能の推定に役立つものと考えた。*shd1* 遺伝子の発現がユビキタスであること、細胞周期の進展で変動することを明らかにした(図5)。さらに、細胞周期のサイトキネーシスと同調している。

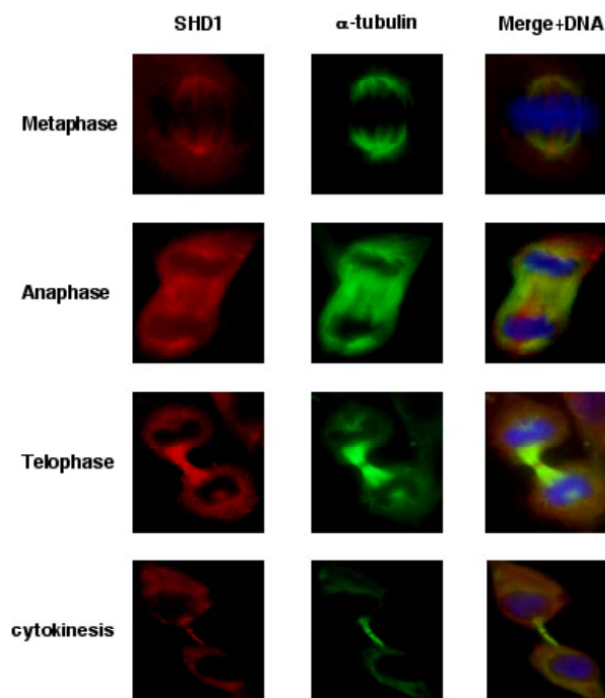


図5

SHD1 分子を RNAi 処理した NIH-3T3 細胞は細胞周期の M 期に異常を来す。Centrosome の複製が障害され、染色体分配の異常が起こる。図は電顕による centrosome の複製異常を示す(図6)。その結果、核の aneuploidy を来し、細胞分裂異常となる。酵母の SHD1 相同分子においても centrin と相同分子が直接会合することが報告され、我々の結果を支持するものである。GANP 分子の SAC3 領域が同一の機能を持つのか、あるいはその他の機能ドメインを保有する為に異なる機能表現をするのかについてはまだ結論を得ていないが、これまでの preliminary な実験結果から GANP 固有の分子機能を行うものと考えている。



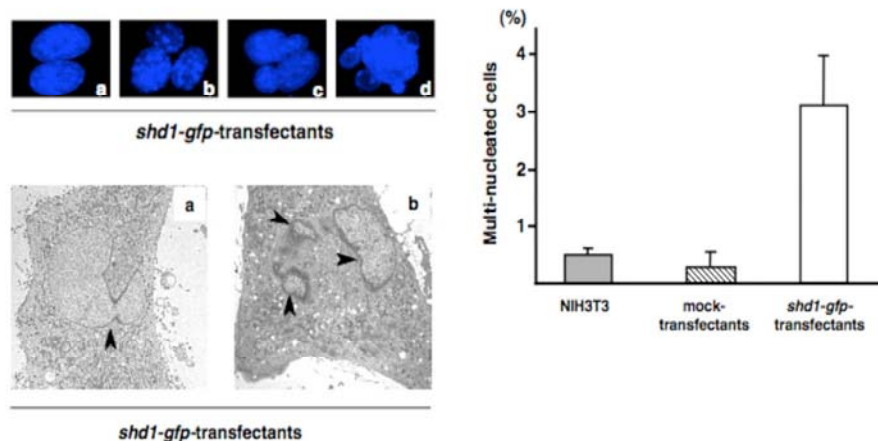


図6

#### 4) Histone acetylase 領域

*ganp* 遺伝子のエクソン20から24までのセグメントでコードされる領域はヒストンアセチル化活性領域 (histone acetylation activity domain: HAT domain) 様の構造を有する。80-kDa の MAP80 相当部分では MCM3 分子のアセチル化を起こす活性を有することが明らかになっている。GANP においても HAT 活性が存在するものと想定されたことから、その活性を *in vitro* および細胞内活性として測定したところ、GANP 分子は確かに HAT 活性が存在していた。GANP の HAT 活性が、様々な細胞腫のどのような分子のアセチル化を誘導し、どのような遺伝子の転写制御に影響するかについての詳細な検討は現在も継続中であるが、この HAT ドメインは細胞内で様々な分子の遺伝子発現を制御するという確証を得ている。

#### 5) 結合分子の同定

免疫反応において、GANP 分子が必須な機能を有することが明らかになった。(後述研究成果:論文発表済)。210-kDa の GANP 分子が持つ分子機能を詳細に検討する目的で GANP 分子に結合する機能分子の同定をおこなった。最初にとった方法は GANP 分子を350アミノ酸で構成される7カ所の領域に絞り、各々の領域と物理的に会合する分子を酵母ツーハイブリット法によって探索を行った。GANP 分子の前半の領域自体に DNA と直接、あるいは DNA を含む複合体と強固に結合する性質を有する可能性があり、その領域と会合するタンパク質の同定は成功していない。第5番目の領域と結合する分子をコードする cDNA を単離した。この分子は PP2A の触媒サブユニットと結合する制御ユニット B' と類似していたので GANP5-region-associated protein phosphatase regulatory subunit として、G5PR と命名した。

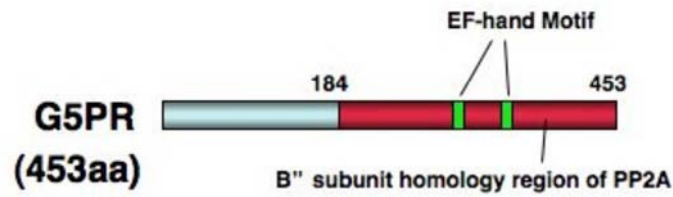


図7

さらに、GANP と結合する分子の同定をプロテオミクス技術によって試みた。tobacco etch virus (TEV)-calmodulin 結合ベクターにマウス *ganp* cDNA 全長を挿入して、293T 細胞に遺伝子導入して Tag-GANP タンパク質を精製した。最終的に純化 GANP タンパク質に会合する分子を SDS-PAGE で分離した(図8)。

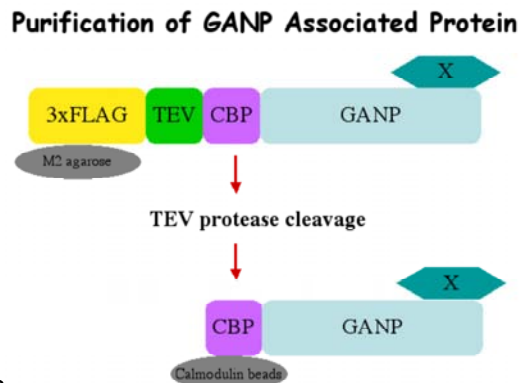


図8

MALDI-TOF-MASS システムを用いて、会合するタンパク質分子群のアミノ酸配列を決定した。その結果、複数のタンパク質バンドを用いて共通に得られる配列から PRMT5 分子が同定できた。PRMT5 は asymmetric arginine methyl transferase ファミリーの一つで histone タンパク質を含め、様々なタンパク質のアルギニンにメチル基を導入する活性を有する(図9)。この分子の機能、B 細胞分化における機能に関して解析を進めた(研究推進者論文投稿中)。この詳細は別の項目で詳細に説明する。

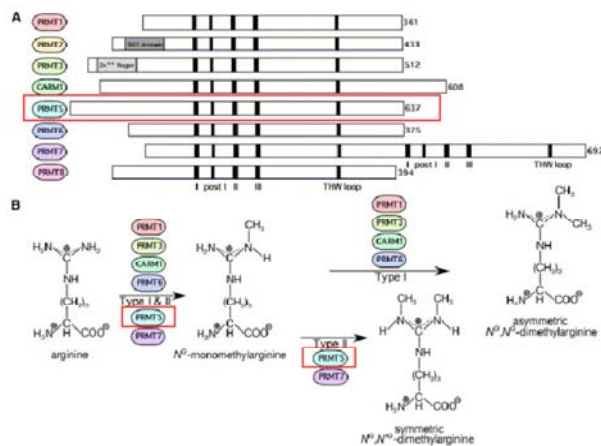


図9 Bedford MT and Richard S, Molecular Cell, 18:263-272, 2005 より

#### 4. GANP 分子の免疫系における機能

##### 1) 免疫における役割(高親和性抗体産生)

*ganp* 遺伝子を欠損したマウスを通常の targeting vector を用いて作成した。ホモ欠損マウスは多臓器発生機能異常による胎生致死であった。ヘテロ欠損マウスは誕生することができ、ほぼ正常と同じように成長し、生きることができる。この結果は GANP が胎児発生の時期に必要な分子であることを示している(研究推進者成果発表済)。GANP 分子の免疫系における機能を知るため、B 細胞で特異的に GANP の発現を欠損する conditional targeting マウスを作製した(図10)。

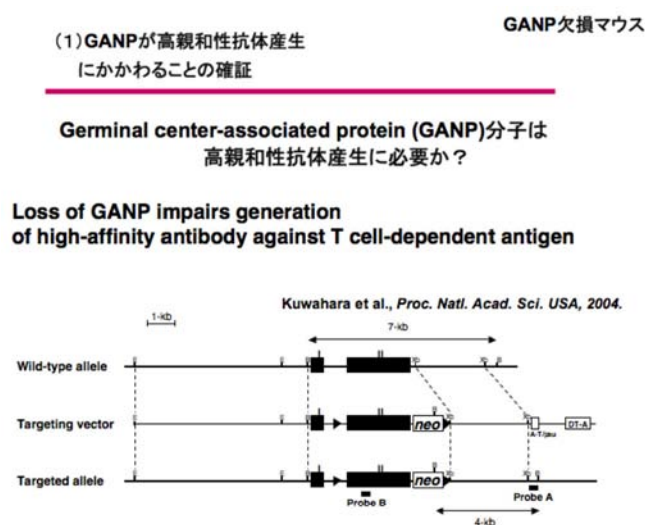


図10

CD19-Cre マウスとの交配で作製した B 細胞特異的 GANP (B-GANP) 遺伝子欠損マウスでは B 細胞の分化・増殖系に顕著な異常は認められなかった。この段階では、骨髄内のリンパ細胞の分化発達、末梢の組織における分化にも異常は認められなかった。T 細胞非依存性抗原(T cell-independent antigen: TI-Ag)である TNP-Ficoll による免疫で抗原特異的な抗体産生を各アイソタイプで調べたところ遺伝子欠損マウスでは低下していない。むしろ上昇傾向にあることがわかった。一方、T 細胞依存性抗原(T cell-dependent antigen: TD-Ag)で免疫するとその胚中心形成は遷延し通常は9日から14日で十分に成熟した胚中心を数多く形成するのに対して、B-GANP 遺伝子欠損マウスでは16-19日に及んでサイズの大きな胚中心を形成する。胚中心内における B 細胞の成熟機能が低下したと考えられた。このとき形成される胚中心では TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が増加しており、有効でない B 細胞抗原受容体を発現している B 細胞を除去する作業も進行していることが示された。

GANP が抗体の成熟に必要なかどうかを TD-Ag である nitrophenyl-chicken  $\gamma$ -globulin (NP-CG) で免疫して産生する抗体の NP-ハプテンに対する結合親和性を ELISA 測定で調べた。免疫後の血清を 2-NP-conjugated BSA と 25-NP-conjugated BSA のコートしたプレートで測定し、その抗原結合力を比較したところ、B-GANP 遺伝子欠損マウスではコントロールと比較して高い親和性の抗

体を産生することができなかった(図11)。

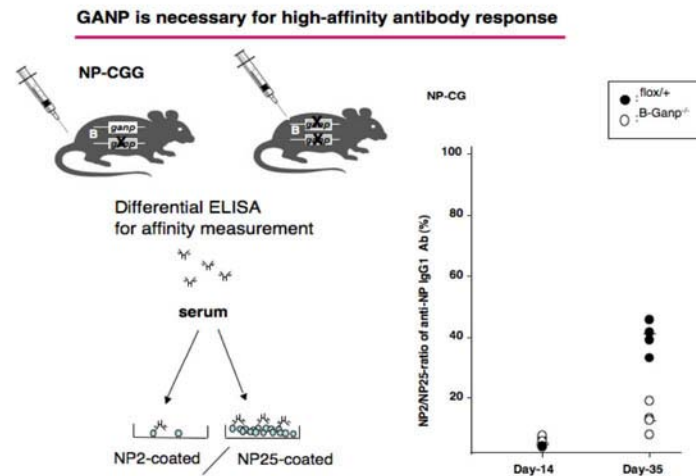


図11

次に、免疫後の脾臓を採取し、フローサイトメーターで GC-B 細胞を純化して、使用される VH186.2 領域の遺伝子配列を調べた。C57BL/6 バックグラウンドのマウスでは NP 抗原特異的な高親和性 B 細胞の用いる遺伝子は IgG、λ-light 鎖である。特に顕著なことは VH 領域ではほぼ全例 VH186.2 を用いることが報告されている(図12)。このシステムで GC-B 細胞の親和性亢進に GANP が効果を持っているのかどうか検証した。

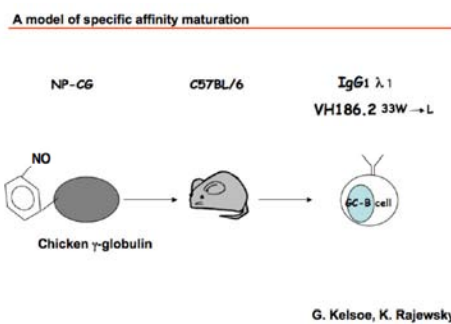


図12

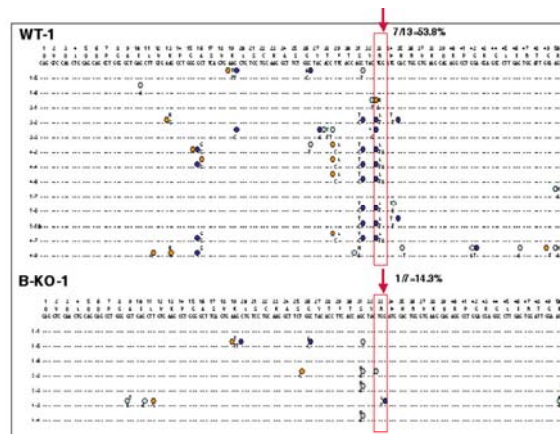


図13

野生型の C57BL/6 マウスの VH186.2 の高親和性変異は 33 番目の Trp が Leu への変異であるのに対し、B-GANP 遺伝子欠損マウスではその頻度が著しく低下し、また、VH 領域で全体の変異も低下している(図13)。

B 細胞の増殖能を、*in vitro* の増殖測定系で調べたところ、anti-IgM 抗体、LPS に対して全く低下していなかった。一方、anti-CD40 抗体による刺激ではその増殖に著しい低下が見られ、GANP 分子は胚中心における刺激、とりわけ CD40/CD40L の相互作用によって機能が発揮される

ものと考えられる(研究推進者論文報告済)。

高親和性抗体産生における GANP の機能を確認するための手段として、GANP 分子の発現が通常以上に増加した場合は、さらに抗体の抗原に対する結合親和性を高めることが可能なのかどうかを検証することを考えた。もしも、V 領域遺伝子の変異率が上昇するならば Daudi 細胞で観察した SHM に対しても直接的な分子機能によるものであることを示す結果となる。マウス *ganp* cDNA を Ig プロモーター、Ig イントロンエンハンサーの下流に接続し遺伝子導入マウス(GANP<sup>Tg</sup>マウス)を作製した(図14)。このマウスも健常生まれ、順調に成長した。B 細胞初期分化、末梢リンパ組織における分化や細胞数に異常は認められなかった。TD-Ag で刺激して胚中心の形成を調べると、正常と比較してやや小型であるものの、成熟した胚中心が十分形成されていた。NP-CG を免疫して TD-Ag に対する応答を ELISA 法で調べた。B-GANP 遺伝子欠損マウスとは反対に、NP ハプテンに対する高親和性抗体の産生が亢進していた。このマウスの脾臓に形成された GC-B 細胞を単離して V 領域遺伝子の SHM 頻度を比較した。GANP<sup>Tg</sup>マウスでは VH186.2 遺伝子の変異の頻度が上昇し、33番目の Trp から Leu への変異誘導の頻度も上昇していた(図14)。

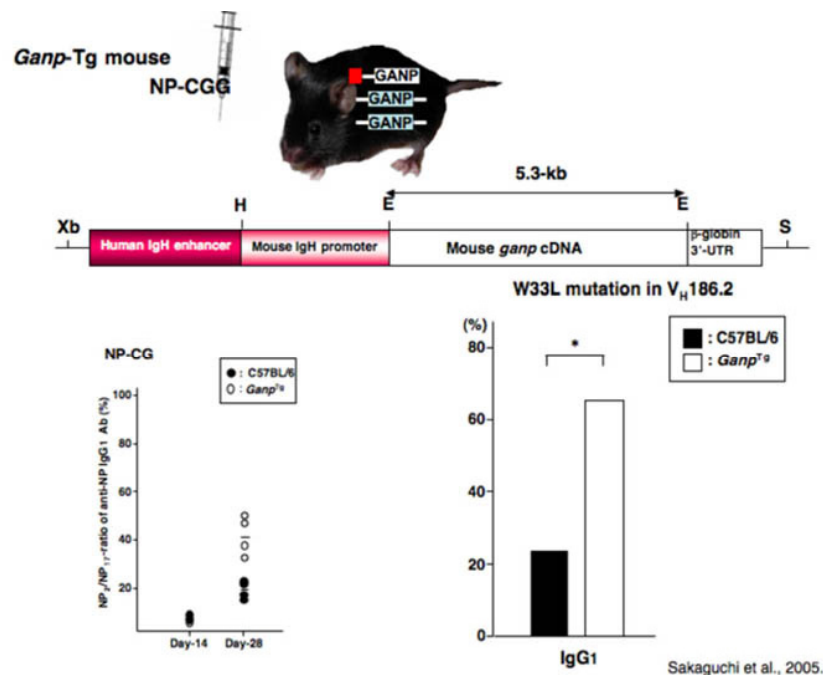


図14

さらにこれらの B 細胞は実際に NP 抗原に反応するクローンであるのか、そして、その結合親和性は野生型のマウス由来の抗体に比較してどの程度上昇しているのかを調べる目的で、NP-CG 免疫を行ったマウスの脾臓 B 細胞と P3U1 細胞のハイブリドーマを樹立した。すべてのデータは同腹の野生型 C57BL/6 マウスを用いて比較検討した。それぞれ 600 クローンずつのハイブリドーマ細胞の培養上清を differential ELISA 法でスクリーニングし第一段階として上位 50 クローンを培養し再検討した。最終的に 25 クローン程度から産生抗体を精製し、抗原特異性、NP 抗原に対する結



合親和性を BIAcore によって検討した。その結果、すべての抗体が NP 抗原に対する結合特性を有し、高い親和性を示した。GANP<sup>Tg</sup> マウス由来のハイブリドーマは、 $K_D$ =association constant/dissociation constant =  $1 \times 10^{-9}$  M に達する抗体を生み出した(図 15)。



図15

さらに興味深いことに GANP<sup>Tg</sup> マウス由来のハイブリドーマの抗体は VH186.2 の33番目の Trp から Leu の変異を伴わない抗体であっても VH186.2 で33番目の Trp から Leu 変異を有する野生型の最高の結合親和性を示すクローンに劣らない高親和性抗体を生み出していた。また VH186.2 ではなく、non canonical な VH7183 ファミリーのこれまで知られていない VH 領域を用いて高い親和性の抗体を産生することに成功していた。これらはすべて VH 内の点突然変異の数が多く、16-18個のアミノ酸置換を誘導するクローンであった(図16)。以上の結果は、GANP の発現増加が直接 B 細胞内で V 領域遺伝子の SHM 誘導に関わり、その結果、高親和性抗体を産生する確率が高まるものと推定された。

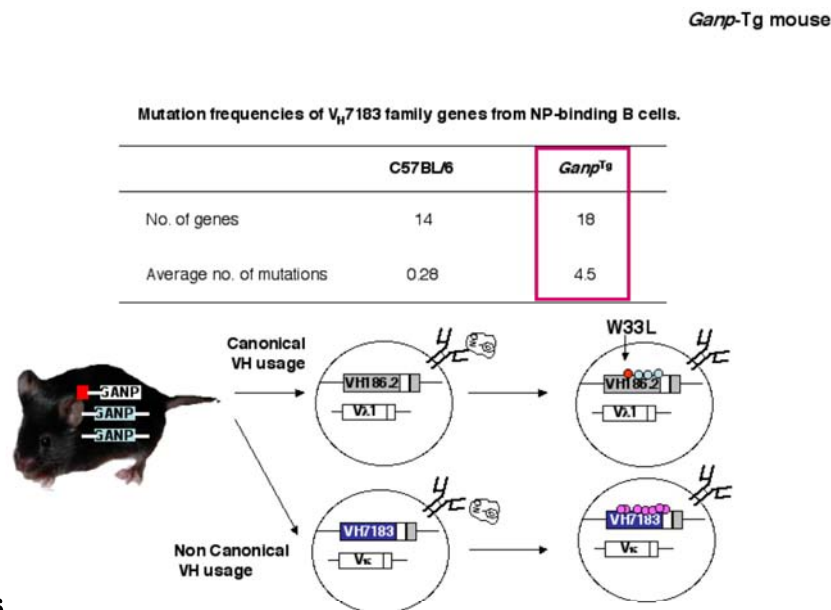


図16

以上の2つの遺伝子改変マウスの研究成果は GANP 分子が抗原特異的高親和性抗体の産生に

関与する機能分子であるということを確認するものである。

抗体の V 領域遺伝子の SHM 誘導機構の解析は CSR のそれと比較して進展が遅れている。AID が第一義的であることは疑う余地はないが、その後の変異導入に関わる分子メンバーがまだ不足しているためと考えられる。AID による cytidine の脱アミノ化から生じる uracil への単一の塩基置換ですべてを説明することはできない。UNG の作用で DNA 鎖の切断が生じることが重要であるとされるものの、その切断は V 領域遺伝子の DSB によるとは考えられない。また、変異導入の際の DNA 修復も現在のところ、single chain base exchange repair によるとする仮説が有力である。DSB に対して AID が影響を与えるかどうかについては、初期の D. Schatz ら、H. Jacobs らの仕事はあまりにも拙速であった為に現在一顧だにされなくなっている。しかし、DNA 損傷における DSB の修復機能が如何に関連するかは検証していかなければならない。GANP の存在は免疫応答中の GC-B 細胞 V 領域遺伝子の DSB 導入あるいは DNA 修復に影響を及ぼすのかどうかを調べた。B-GANP 遺伝子欠損マウスを NP-CG で免疫し、GC-B 細胞を高度に純化した。成熟 GC-B 細胞マーカーである GL-7 や PNA に加えて、さらに CD95/Fas の発現をマーカーとして精製を行って解析したところ、抗原刺激依存性に GC-B 細胞の VH186.2 領域に DSB が高率におこることを確認した。これは胚中心に循環してくる GL-7 陽性の骨髄内で遺伝子再構成を行った新鮮で早期に配属した B 細胞集団では認められなかった。また C 領域には DSB は起こっていなかった。B-GANP 遺伝子欠損マウスでは V 領域 DSB は低下し、逆に GANP<sup>Tg</sup> マウスの B 細胞では V 領域 DSB の頻度が著しく上昇していた(図17)。

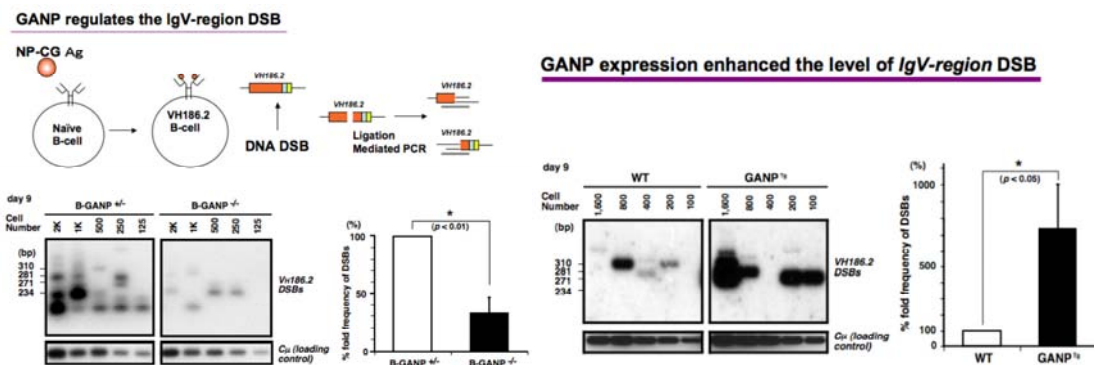


図17

この結果、GANP 分子は V 領域特異的に起こる DNA 損傷に対して影響を及ぼすことが判明し、V 領域 DSB の修復が V 領域 SHM 誘導に関連する可能性を残すものであった。

## 2) GANP の V 領域遺伝子に対する機能

上記結果は、GANP が V 領域遺伝子に何らかの影響を及ぼし SHM に対して増進を図る機能を有するものと推定されるが、個体レベルの現象が B 細胞レベル、あるいは試験管内の系で機能するかどうかの検定が残されていた。そこで B 細胞レベルでの解析をニワトリ B 細胞株 DT40 細胞を

用いて検証した。ニワトリの *ganp* 遺伝子の解析を行い、発現、分子量、遺伝子転写開始点を決定した。細胞の調整に関しては京都大学の武田俊一教授らの支援を得て行った。DT40 細胞は培養中に V 領域遺伝子の多様化が進む細胞である。ニワトリではブタやウシと同じく、V 領域遺伝子の多様性は数多くの VH、DH、JH 群を用いるのではない。ごく限られた数の V 領域しか持たず、その多様性はプロモーターの存在しない *pseudo-V* 領域遺伝子断片の遺伝子配列をコピーして多様性を高めるといふ gene conversion の機構を駆使している。Gene conversion もまた AID によって開始されることが報告されていて、cytidine の脱アミノ化が起こりそれを UNG によって認識される、あるいは glycosyl 化されることが必要とされている。UNG が機能しない場合はヒトやマウスと同じく SHM を高めてその多様性を充進させることが知られている。また、DT40 細胞は相同組換えを用いて様々な分子の欠損細胞株を樹立することが比較的容易であり、これまで様々な細胞株が樹立されている。Gene conversion と SHM を検出する方法は、IgM のλ鎖に点突然変異導入がある CL18 クローンを用いることによって可能である。細胞表面に発現している IgM の loss 又は gain の変動を測定することで評価できる。相同組換え法によってニワトリ *ganp* 遺伝子欠損細胞の作製を試みた。ヘテロ欠損株を樹立することができたが、別の選別薬剤を用いる第二次相同組換えでは、76クローンをういた試みはすべて成功せず、DT40 細胞の GANP ホモ欠損細胞ラインの樹立は、マウス遺伝子欠損ラインの樹立とともに不可能であることが示唆された。この GANP ヘテロ欠損 DT40 細胞では gene conversion の頻度が著しく低下していた。そこで、*ganp* cDNA を遺伝子導入すると gene conversion を促進させることができるのかを調べたところ、確かに GANP の発現増加が V 領域遺伝子の gene conversion 誘導に関連することが示された。種々の遺伝子欠損細胞を用いた解析より、その機能が AID の存在に依存し UNG の存在に影響を受けることが明らかになり、GANP の機能ターゲットが post AID pre/at UNG であることが判明した(図18)。GANP が AID の機能を positive に制御することが明らかになったので、現在その活性を南カリフォルニア大学の Myron Goodman 教授らのグループと共同研究を進めている。Goodman 研究室は *in vitro* で cytidine deamination を測定する実験系を樹立し、AID による cytidine deamination が単鎖状 DNA(ssDNA)を標的にすることを証明した。そこで、*In vitro* で GANP タンパク質を高純度に得る必要があるため、最終年度はこの研究に焦点を絞って行った。その結果、これまで困難であった全長 GANP タンパク質を glutathione s-transferase(GST)及び Flag タグ付きで、SDS-PAGE で一本となるレベルで精製することに成功した。GANP 分子が V 領域遺伝子の SHM 誘導に関連するどのような分子活性を有しているのか、さらにどのような機能分子と会合するのか、AID の活性を賦活化するのか、それとも抑制するのか、あるいは post AID として重要な DNA 損傷修復機能を発揮するのかを明らかにする為に実験の最終過程に入っている。(研究推進者論文発表準備中)



V領域突然変異誘導の脱アミノ化モデルにおけるGANPの作用点

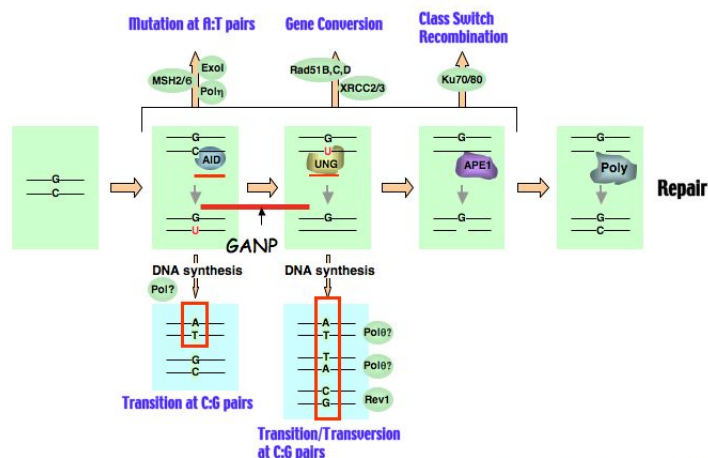


図18

Source: Neubergner *et al.*

### 3) GANP のクラススイッチに及ぼす影響

GANP 分子の活性標的は AID の下流であることから当然、GANP の機能が抗体のクラススイッチに影響することが予想された。これについては GANP の存在が関連するという結果があるが、その機能が GANP のどの分子機能によるのかはまだ明らかになっていない。SAC3 相同領域が持つ機能の確定を、酵母ホモログの機能から推定して行なった。酵母では RNA polymerase II によって転写された RNA は、間をおかずに SAC3、THP1 を含むトランスポーター複合体と結合した形で存在する(図2)。GANP の DNA 相同組換えにおける効果を、 $\beta$ -galactosidase のタンデムな挿入を行った *in vitro* 測定系を用いて検証した(図19)。GANP は extrachromosomal に存在する DNA も、染色体に integrate された DNA もともに DNA の DSB によって生じる組換えに対して抑制効果を持っていた(図20)。この機能は、殊に SAC3 相同領域に由来する機能であると推定された(図21)。この機能が V 領域遺伝子の SHM と CSR の頻度にどのように影響するかは未確定であるが、GANP には多くの分子機能を保有することが明らかになった。

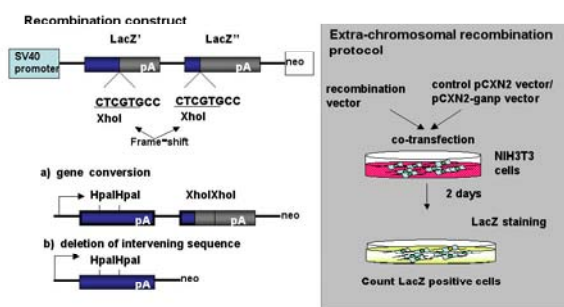


図19

Effect of GANP upon DNA homologous recombination in NIH3T3 cells using extra-chromosomal recombination assay

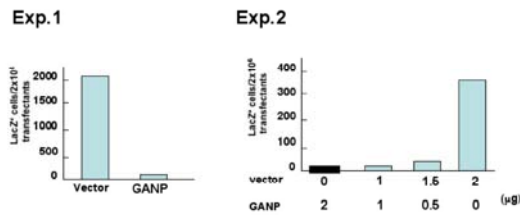


図20

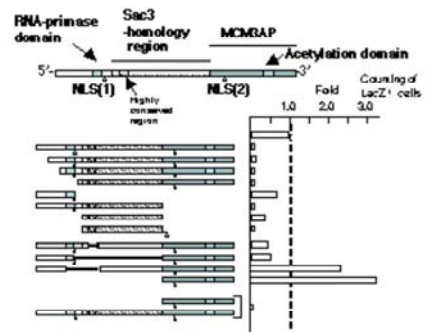


図21

#### 4) GANP の遺伝子転写制御機構

GANP 分子の機能として、RNA メタボリズムに関わる機能に加えて転写制御機能があげられる。研究開始時から Nco-R タンパク質と同様に Bromo ドメイン様の構造と LXXLL モチーフが存在することからであった。初期の解析は転写制御分子の探索に費やした。プロテオミクス解析から同定したアルギニンメチル化酵素 PRMT5 は重要な機能を保有していた。

PRMT5 は GANP とともに GC-B 細胞においてその発現が上昇する。PRMT5 は JAK3 と直接結合し、STAT6 の活性化を促す機能を有している。STAT6 のアルギニンメチル化が STAT6 を活性化して IL-4 の信号伝達の増強を促進する。GANP 分子は PRMT5 に遅れて発現するが PRMT5 に結合して PRMT5 のアルギニンメチル化反応を抑制する。GANP は IL-4 で誘導される AID や intron Cε の転写を制御することが明らかになり、胚中心での過剰な IgE へのクラススイッチや過剰な AID 発現による DNA 損傷に対して防御的に働く可能性が示唆される(図22) (論文投稿中/reviced)。

A Model of GANP Complex



図22

#### 5) 胚中心における高親和性 B 細胞の選別

抗原特異的な B 細胞が胚中心で V 領域遺伝子の SHM を獲得した後に高親和性抗体を産生する様に成熟したとしてもそれを感知して、選別する機構が存在しなければ無駄に変異し続けるし

かない。あるいは一度高親和性を獲得したとしてもさらに AID の攻撃を受けると逆にその特異性を失ったり、別の抗原に反応するB細胞に変化してしまう可能性がある。胚中心では、自己免疫性抗体の産生を阻止する機構が必須であり、この現象は peripheral tolerance として長い間その分子機構の解明が急がれて来た。これには胚中心における選別の基盤として抗原抗体複合体を濾胞樹状細胞の表面に存在する補体受容体に装着することが重要であると考えられ、follicular dendritic cell network の網を抗原に反応するかどうかを検証しつつぐり抜けることが必要であるとされる。一方、B細胞側とすれば、B細胞に内在する抗原受容体からの生存シグナルを fine tuning することが必要である。この機能に関わると考えられる最も有力な機能分子が、GANP 分子と会合する分子として単離した G5PR であった。G5PR は骨髄の未熟 B 細胞、新生児 B 細胞にはその発現は高くないが、成熟 B 細胞、ことに濾胞 B 細胞に発現上昇する。発現上昇の信号は BCR 刺激であり、Btk 変異マウスである CBA/N マウスでは発現が上昇しない。

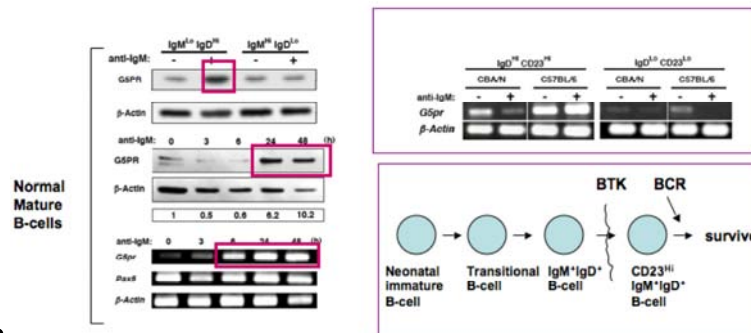


図 2 3

この分子の過剰発現を WEHI-231 細胞株で行うと、anti-IgM 抗体による activation induced cell death (AICD)が阻止される。この結果は、G5PR は抗原に反応する成熟 B 細胞で上昇し細胞の生存に何らかの機能を有することが示された(図23)。このことを *in vivo* で証明する為に B 細胞特異的に *g5pr* 遺伝子を欠損したマウスを作成した。このマウスは脾臓が小さく成熟 B 細胞も減少していた(図24)。

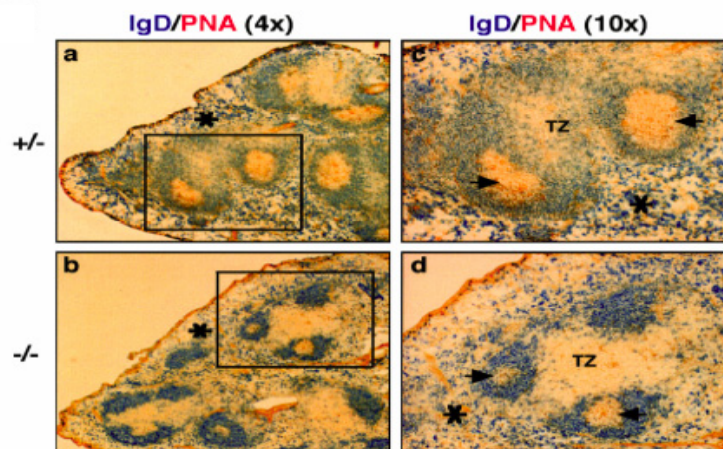


図24

B 細胞の抗原刺激による増殖能には正常 B 細胞と比べて遜色が見られない。LPS 刺激による増殖においても変わりがないが、anti-IgM 抗体で刺激した際に細胞の増殖は著しく低下していた。これ

は抗原受容体刺激による AICD によることが明らかになった。

**G5PR is necessary for inhibition of BCR-induced apoptotic signals of JNK and Bim hyperactivation**

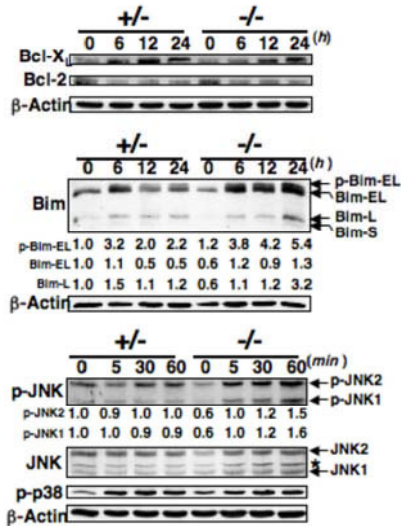


図25

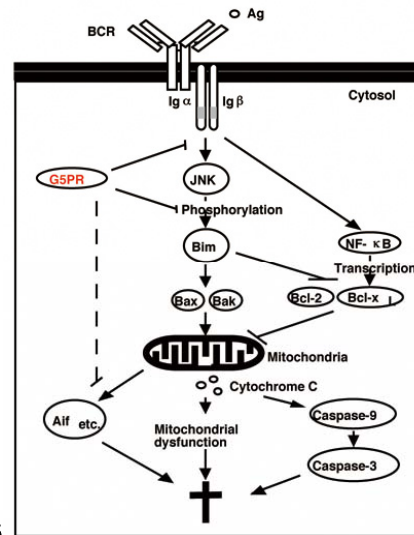


図26

G5PRはPP2Aの脱リン酸化酵素活性を正又は負に制御すると考えられる。おそらくBCR信号伝達経路を制御するものと考えられ、その第一段階の標的分子が何かを既知の生存シグナル、細胞死シグナルの経路を調べた。MAPKファミリーではERK、p38の信号には影響を与えず、B細胞増殖の鍵を握るとされるCARMA1、Cyclin D2の活性化にも変化がなかった。一方、細胞死制御ではJNKの活性化が亢進していて、その下流の標的として proapoptotic 分子である Bim のリン酸化が亢進していることが明らかになった(図25)。これらから抗原刺激を受けて活性化された末梢の成熟B細胞はBCRの信号を受けると細胞死を誘導するため、JNKの一時的な活性化を促す。その信号は抗原刺激に対するB細胞の細胞死に対する閾値を低下させることにつながる。

一方、抗原と強力に結合をしたB細胞は同時にCD40/CD40Lの共刺激を受け、GANPの発現を上昇させ、同時にその結合分子であるG5PRの発現を高めるものと考えられる。G5PRはJNKの過剰なリン酸化を抑え、B細胞が細胞死に陥るのを抑制する。その信号の閾値はBTK活性化に依存するものと考えられる。従って、CBA/NマウスのようなBCR信号系に欠損がある場合は胚中心における高親和性抗体産生能力が低下するものと考えられる。JNKの過剰なリン酸化を抑制することによってBimの活性化が止まり、Bcl-2/Bcl-XLが維持されると同時にBaxのapoptosis誘導信号は回避される(図26)。この結果G5PRによる高親和性B細胞クローンの選別が行われるものと考えられる。GC-B細胞の生存と選別という抗体産生の重要ステップの解明の端緒が明らかにされた。

## [II] 応用研究

### 1. GANP 分子異常に関連する難病、免疫難病の研究

#### 1) Hodgkin 病の発症と GANP 異常

B 細胞の腫瘍として慢性リンパ性白血病、Burkitt リンパ腫、Hodgkin 病、その最終分化細胞の腫瘍として多発性骨髄腫がある。特に Hodgkin 病で腫瘍細胞は non-T、non-B の表現型を示すとは言いながら免疫グロブリン遺伝子の再構成の存在と数多くの V 領域遺伝子の SHM の痕跡を残して非産生的な免疫グロブリン遺伝子発現を伴うことが知られているが、その発症原因や多核の Reed-Sternberg (R/S) 細胞がどのようなメカニズムで出現してくるのかについては明らかにされていない。Epstein-Barr ウイルスが関与するという仮説が有力であり、ウイルスゲノムから産生される LMP1、LMP2 が重要であることが明らかになっている。実際これらの遺伝子を導入したマウスで Hodgkin 病様の病態が現れる。これらは NF- $\kappa$ B の活性化を促し腫瘍化していることが知られているが、その標的信号は何か、腫瘍発症の第一原因は何かについてはまだ明らかでない。一方、免疫グロブリン遺伝子で multiple な遺伝子再構成がおこること、そしてその遺伝子の V 領域に SHM の蓄積がおこり、その結果変異過剰となって抗体タンパク質を産生しない状態になっている。さらに、大きな疑問として残されているのは R/S 細胞が出現するメカニズムである。

GANP<sup>Tg</sup> マウスを長期観察してみると、有意に長寿である。これは抗体の親和性が高いため炎症の程度が常に低い状態にある為と考えられる。しかし、老齢期に入る前に高頻度にリンパ腫を発症することが観察された。この腫瘍細胞は B リンパ細胞由来と考えられ、免疫グロブリン遺伝子の再構成を確認できる。しかし、細胞表面には免疫グロブリンタンパク質を発現していない。組織には R/S 細胞様の細胞が検出され、Hodgkin 病を発症するマウスモデルであると診断された(図27 上段・中段)。細胞株を樹立してみると、多核で常に V 領域遺伝子の SHM が培養中に継続しておこることが確認された(図27下段)。ヒトの臨床検体でも GANP の高発現と腫瘍化には何らかの因果関係が存在するのかを調べた。その結果、ヒトの Hodgkin 病細胞、R/S 細胞に GANP の高発現が確認された。GC-B 細胞では AID の発現と GANP の高発現が継続すると V 領域遺伝子への SHM 誘導が高まるが、その状態で増殖シグナルが継続した場合、その他の遺伝子への変異導入の頻度が高まって、時には何らかの oncogene の活性化、癌関連遺伝子の異常を引き起こすものと考えられた。



## Continuous over-expression of *ganp* associated with lymphomagenesis

Fujimura, S., et al., *Cancer Res.*, 65: 5925-5934, 2005.

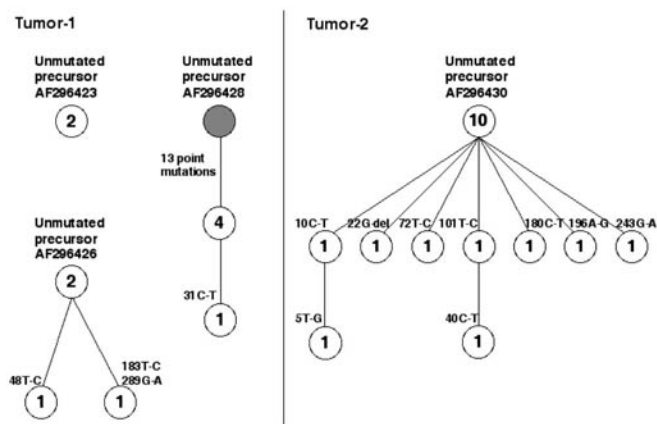
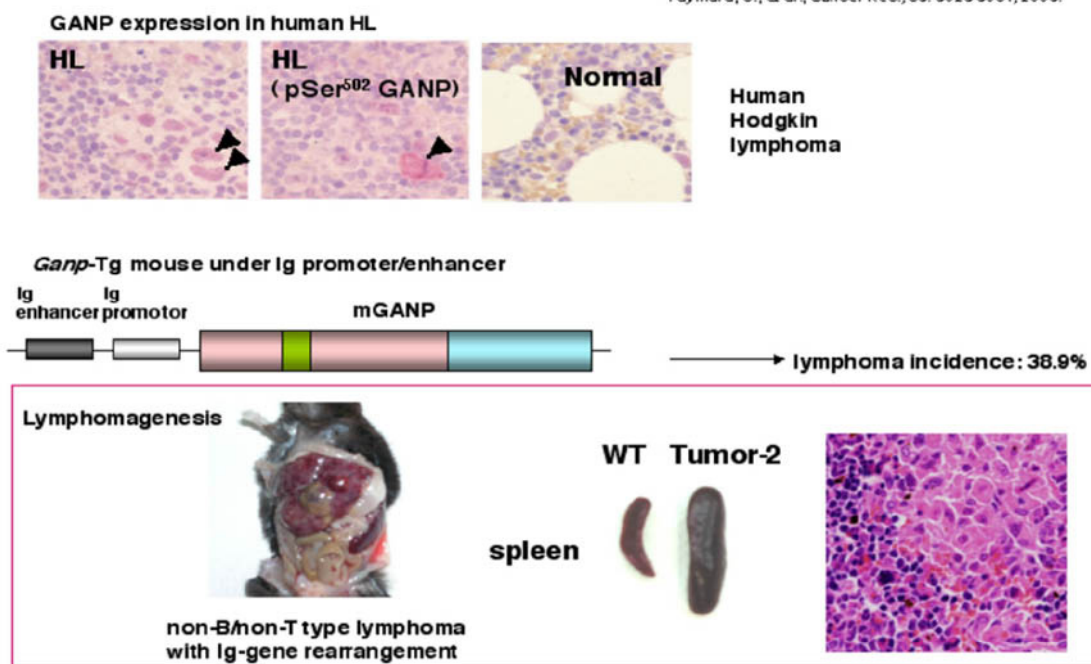


図27

ヒトの血液系、リンパ組織系の腫瘍でも GANP の発現上昇を来している疾患が見られた(図28左)。表にその一覧を示す(図28右)。ここで、興味深いことは Myelodysplastic syndrome (MDS) において著しく発現上昇をしていることである。MDS はその悪性化を常に疑っておかなければならない要注意疾患であるが、その悪性化の進行を容易にモニターする予知診断マーカーを持たない。GANP が MDS の悪性進行に関連するのであれば、それを迅速に追跡する方法が確立されて危険を早急に察知し、対策を立てることが可能になるかもしれない。その為にも GANP 分子の腫瘍化における分子機能の解明が待たれる。

LN				BM		Table Expression of GANP and pSer <sup>502</sup> GANP in patients with various hematological diseases			
B lineage		T lineage		Myeloid		Patients		GANP	pSer <sup>502</sup> GANP
HL	HL (pSer <sup>502</sup> GANP)	ALCL		AML (M7)		Lymph node B-cell lymphoma	DLBCL-1	++	-
							DLBCL-2	+/+	-
							MCL-1	++	+/+
							BL-1	++	-
							BL-2	++	-
							FL-1	+	+/+
							HL-1	+	+
							HL-2	+	+
						Lymph node NK/T-cell lymphoma	ALCL-1	++	+/+
							ALCL-2	++	+/+
							ATLL-1	+	+
							ATLL-2	+	-
							Lennert lymphoma-1	+	-
						γSTCL-1	-	-	
						Bone marrow	AML (M1)-1	+/+	-
							AML (M7)-1	++	+/+
							AML from MDS-1	++	+
							MDS-1	++	-
							MM-1	+	+/+
							CML-1	+/+	-
						Normal	-	-	

図28

## 2) 悪性黒色種と GANP 発現異常

悪性度の進行が臨床病像で厳しく変化する腫瘍として黒色腫(melanoma)が重大である。良性の黒色腫から様々な侵襲を受けて悪質転換するものと考えられ、腫瘍化の分子機序を理解する上でよい臨床サンプルを提供する。まず GANP の発現を黒色腫細胞株で調べたところ正常の細胞である melanocyte ではその発現は低レベルであったが、腫瘍となった細胞株ではその発現上昇が見られた。色素細胞の癌化において GANP 発現の上昇は何らかの密接な関連を持つことを支持するものと考えられる。詳細な観察を行うと、GANP もリン酸化 GANP (Ser502 のリン酸化特異的抗体で染色) の発現も共に細胞質と核内の両方に見られるが、悪性度の高い腫瘍由来の悪性黒色腫細胞株では細胞質における GANP の発現はほとんどなく、ほぼ核内に集中して発現している傾向にある(図29)。日本人の症例として臨床サンプル54例での検討によると良性の腫瘍である melanocyte nevus から悪性化した primary melanoma 細胞や metastatic melanoma 細胞で GANP の発現が著しく上昇している傾向にある(図30)。

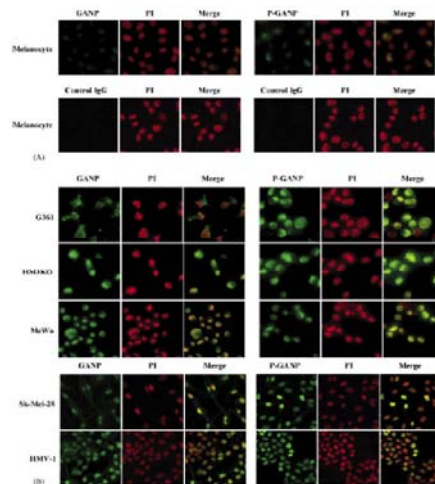


図29

Fig. 1. GANP and P-GANP expressions in human melanocytes (A) and melanoma cell lines (B). The cell swabs from melanocytes and these cell lines were stained with anti-GANP or anti-P-GANP mAb in combination with Alexa488-conjugated goat anti-rat IgG Ab. Counter-staining was done by PI.

	#	GANP			P-GANP			
		Strong (%)	Moderate (%)	Weak (%)	Strong (%)	Moderate (%)	Weak (%)	
Melanocytic nevus	14	0	10 (71)	4 (29)	0	8 (57)	6 (43)	$p = 0.001$ $p = 0.974$
Primary melanoma	36	3 (8)	28 (78)	5 (14)	11 (31)	22 (61)	3 (8)	
Metastatic melanoma	9	2 (22)	6 (67)	1 (3)	3 (33)	5 (56)	1 (11)	

#: total number of lesions; %: percentage of lesions.

図30

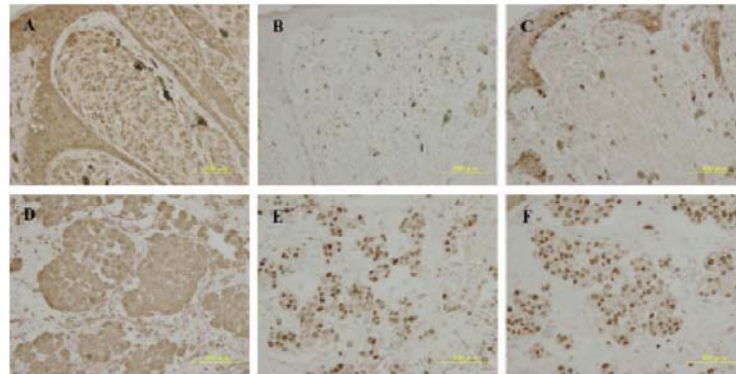


Fig. 5 Linkage of high cytoplasmic P-GANP expression with the melanoma cells highly expressing MCM3 and Ki67 markers. (A) Nuclear localization of P-GANP in melanoma cells. (B) MCM3 and Ki67 positive cells at the serial section of (A). (C) Ki67 positive cells at the serial section of (A). (D) Cytoplasmic localization of P-GANP in melanoma cells. (E) MCM3 positive cells at the serial section of (D). (F) Ki67 positive cells at the serial section of (D).

図31

病理組織標本では、GANP の高発現が観察できても、細胞増殖をせず Ki67、MCM3 を発現していない領域では GANP の発現は細胞質に多い。一方、Ki67 や MCM3 は悪性化の指標であるが、これらの発現の高い領域の細胞では GANP の発現は核内に局限している(図31)。(研究推進者論文発表済)

### 3) 寄生虫感染で発症する胆管がんと GANP 発現異常

GANP の過剰な発現、その発現が核内に集積する状況は血液系腫瘍、皮膚がんにおいて悪性化の指標となるものと考えた。このことから、臨床検体での検討をさらに進めたところ、胆管がんにおいてもその傾向にあることが判明した。胆管がんはアジア地域では肝吸虫 (liver fluke) である *Oisthorchis viverrini*、*O.felineus*、*Clonorchis sinensis* の感染によって誘発される悪性腫瘍である。発癌の原因としてタバコをのぞけば、感染症が最もその重大な因子であり 2002 年の統計では全腫瘍発症の 17.8% を占めるとされる。純然たる感染症が発症要因となる腫瘍として、アジア地域で川魚を食する生活習慣によっておこる胆道系のがんがある。タイ北東部のコンケン州のチー川流域にある Nong Ruea 郡、Phu Wiang 郡、Mancha Khiri 郡、Chonnabot 郡では 10 万人あたり 300 人以上の胆管がん発症率である。その発症メカニズムはおおむね次の様に理解されている。Liver fluke の感染が長期継続する中で寄生虫が起こす物理的侵襲によって胆管粘膜に潰瘍を形成し、上皮細胞の悪性化を促す。一方、寄生虫から分泌される様々な物質が上皮細胞その他に NO 産生、活性酸素を産生させる。それに加えて重要な要因として免疫反応、炎症反応が産生する NO



も加わり、また繊維化を誘導し胆汁の鬱滞を引き起こす。それらが長期に及んで上皮細胞の DNA 損傷に至ると考えられている。GANP 分子がこの感染症に起因する腫瘍化においてどのように機能しているのかを調べた。Melanoma の場合と同様に病理組織学的、臨床病像の悪性化の進展に伴って GANP の発現が著しく増加していた。

Well differentiated type、moderately differentiated type、poorly differentiated type の3型に分類して調べたところ、poorly differentiated type の胆管がん組織でその発現が著しく上昇していた。また、これらの細胞は NO ストレスを来す刺激により細胞の生存が著しく低下し、GANP の存在が DNA 損傷誘導の phase あるいは修復過程の少なくともいずれかに密接に関連していることを示唆している。この結果は、ニワトリ DT40 細胞における様々な DNA 損傷関連分子欠損細胞において確認を行った。(研究推進者論文投稿予定)

#### 4) 乳がん と GANP 異常

以上の結果は GANP の過剰発現が腫瘍化では悪性化に関連するという可能性を指示するものであり、抗体の V 領域 SHM 誘導にポジティブに関与するという観点から矛盾するものではない。ところが GANP のヘテロ欠損マウスの観察から矛盾すると思われる結果が得られた。ホモ欠損マウスは胎児死亡をする。ヘテロ欠損マウスは誕生し、一見正常に成長し行動する。しかし、60週齢を過ぎる頃から雌に限って腫瘍を発症する。その腫瘍は全例乳腺組織由来で乳がんの自然発症を起こすマウスであることが判明した。単一遺伝子のヘテロ欠損で乳がんを起こすマウスはまれで p53 欠損マウスにおいても他の遺伝子異常を伴ったときに発症するのみである。従って、GANP ヘテロ欠損マウスでは GANP の機能異常が何らかの細胞増殖、細胞分裂、さらには遺伝子の異常を起こす素因となり、それが乳腺組織での発癌誘導を引き起こしたものと推定された。この乳がん細胞の細胞株を *in vitro* で樹立して細胞増殖、細胞周期や染色体の数、様々な乳がん関連遺伝子の異常等について検討した。その他の癌関連遺伝子の変異、欠失については明らかにならなかったが、細胞周期に異常を来し、polyploidy が認められ、GANP の発現が細胞周期進行に重要な機能を担っていることが示唆された。その異常を調べる為に、HeLa 細胞で内在性 GANP の発現を RNAi 法で抑制したところ、染色体分配に顕著な異常が認められ、早期染色体分離が起こっていた。GANP は染色体のセントロメアの結合保持に必要な機能分子 centrin、shugoshin 等のセントロメア結合複合体のタンパク質成分の発現や機能に必要であることが考えられる。この研究は GANP の免疫グロブリン遺伝子の V 領域の SHM 誘導における DNA 複製の効果を調べる上でも重要である。(研究推進者論文投稿中)

果たして、実際の乳がん症例で GANP の発現の上昇あるいは低下が見られるかを日本人の乳がん症例92例において検討した。乳がんでも限局型乳がん(breast cancer in situ)、浸潤型乳がん(breast cancer without metastasis)、転移を伴う浸潤型乳がん(breast cancer with metastasis)

に分類して、GANPの発現を免疫組織染色、Real-Time RT-PCR法で検討した。その結果、乳がんの悪性度が進行した場合 GANPの発現低下が著しいことが判明した。乳腺組織では正常状態から GANP の発現が高く、それと比較して転移を伴う浸潤型乳がんにおける発現低下は顕著である。この結果は GANP が V 領域遺伝子の点突然変異を導入する機能を有していて、炎症状態での GANP は遺伝子変異誘導に促進的に働くこととともに、乳腺で見られるような GANP の発現が高い組織での発現低下は、細胞周期の変調を来し結果的にがん化や悪性度の進展につながることを示唆している。この問題は今後の研究の必要性を示唆するものであるが、いずれにしても、乳がん発症が女性の癌の最も重要かつ喫緊の課題となっている現代、GANP が自然発癌の重要な鍵を握る分子であることは間違いないと考えている。実際、乳がん発症に BRCA1、BRCA2、p53、Rb 等の癌関連遺伝子の関与が明確な症例は高々7-15%にしか及ばないと言われている。

### [III] 社会貢献、新産業創成

本研究計画の成果の大きな柱として GANP 分子の発現を制御することによって高親和性抗体産生が可能であるということである。この分子機構として基礎研究では GANP 分子の全容が理解される様になった。末梢のリンパ組織で抗原と遭遇した抗原特異的な B 細胞クローンは単一細胞から10日前後で10万個以上の GC-B 細胞集団となる。このとき抗原刺激と、IL-4 等の Th2 サイトカインと T 細胞の CD40/CD40L 刺激、BAFF 刺激を受けつつ高親和性の V 領域を獲得する。刺激を受けた胚中心では、B 細胞内に AID が発現上昇する。GANP は AID の機能を制御、補足することによって V 領域の SHM と CSR の誘導を制御する。このとき V 領域の広範にわたる変異導入によって抗原に対する親和性の亢進をはかり、同時にその細胞内での変異を V 領域に限局し、細胞周期進行を維持しているものと考えられる。NP ハプテンによる解析では数倍から10倍程度の上昇と予想されたので、実際にこのことが他の抗原に対して一般的に適合することなのかは興味あることである。もしも、一般的ならば、この親和性抗体増強効果を生体の免疫賦活効果として応用できないか、また、遺伝子導入などの技術によって immunomanipulation の先端技術として開発できないかという期待がもたれる。また、抗原特異的なモノクローナル抗体を容易に作製することができれば、免疫学のみならず、生物学、工学、医療、医薬、公衆衛生、食品衛生などに広範囲に活用可能な技術となる(図32)。

## モノクローナル抗体課題

### モノクローナル抗体作製技術

- 1) 1986年 特異性  
マウスによるハイブリドーマ細胞の樹立とクローニング
- 2) 1990年- 抗原性  
ヒト型抗体への変換(キメラ化、ヒト型化、ヒト化)  
遺伝子操作による作製(ファージライブラリー等)
- 3) 2000年代-  
親和性が低い、  
安定性の長期化、  
生産コスト 現在、  
樹立困難(抗原性が低い)抗体の作製  
対象分子 一糖鎖、細胞表面エピトープ、Linearな構造

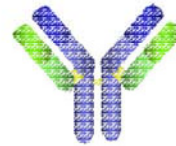


図32

1976年に Kohler と Milstein によって開発されたモノクローナル抗体作製技術は、岡田が見いだした細胞が融合してヘテロカリオンとして生き続けるという現象に基づいている。この一技術がその後の分子生物学の発展にどれだけ寄与してきたかは言うまでもない。さらに、モノクローナル抗体を用いた分子標的治療は、抗体のヒト型化という問題を解決したことで一層の飛躍を遂げつつあり、今や、リウマチ、膠原病、ウイルス感染、肺がんなどの癌治療、血液疾患など多くの難知性疾患の最も信頼できる治療法となりつつある。今世紀に入り一層の研究展開が進められている中で、最も解決しておかなければならない課題は抗体の親和性を高めるということである。安定に、抗原特異的に、しかも高感度に結合親和性を発揮する抗体を作成することができれば我が国の科学技術の進展、技術の優位性、経済効果を高めることに貢献できるものと考えている(図32)。

### 親和性の向上を目指して

- 1) マウスに強力な免疫を誘導する
- 2) 高親和性B細胞を純化する
- 3) 高親和性抗体産生を誘導するマウスを用いる
- 4) 一度作製したモノクローナル抗体の遺伝子に変異を導入する



- 5) ★ GANP<sup>tg</sup>mouseを用いた高親和性抗体技術  
方法: 通常のマウスでのモノクローナル抗体作成と同じ  
抗原投与方法、細胞融合方法、スクリーニング方法は同一  
高親和性B細胞クローンの算出は実証済み

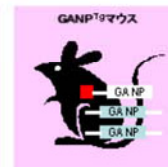


図33

現在、多くの研究者、バイオベンチャー企業において用いられている手段は1) マウスに強力に免疫できる技術を開発する。2) 高親和性 B 細胞、記憶 B 細胞を濃縮・純化する。あるいは、一度作成したモノクローナル抗体産生細胞の V 領域遺伝子に遺伝子操作で変異を入れて検証する try and error 方式が用いられている。また phage display 法を用いることも盛んに行われている。もう一つの試みとして高親和性抗体を産生する動物を用いる方法があげられる(図33)。GANP<sup>tg</sup> マウスが高



GANPTgマウスによる抗エイズ抗体作製

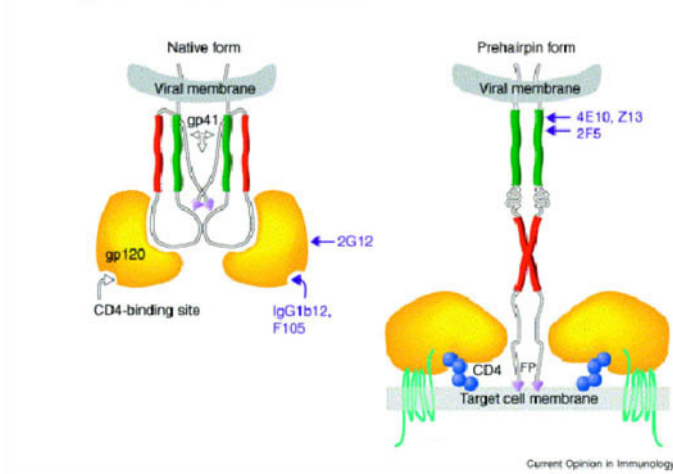


図36

抗原エピトープとしてはまず HIV 感染に対する中和活性が最もよく研究される linear peptide エピトープで検証することにした。gp120 が CD4 と結合する際にウイルス膜から gp41 が伸展し、CD4 陽性 T 細胞膜上の CD4 と CXCR4 の両者と強固に結合し、ウイルス感染が成立する(図36)。これまでの多くの研究から gp41 部分、gp120 部分の特定の領域に対するモノクローナル抗体が感染阻止に有効であることが知られている。本実験では、NL4-3 ペプチドエピトープに対する抗体を作製することとした。これに対応する合成ペプチドを Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) と結合したのち GANPT<sup>g</sup> マウスに免疫し、細胞融合によって抗原特異的なモノクローナル抗体を 2,000 クローン樹立して高親和性抗体クローンを選別した。コントロールには C57BL/6 マウスを用いそれぞれの抗体を選別した後、抗体を精製し、NL4-3 ペプチド抗原を装着したマイクロチップを用いた BIAcore 測定を行った(図 37)。図は抗体がチップに結合する結合速度を結合定数とし、その後バッファのフローの条件でどの程度長い間抗体が結合し続けるかを解離定数として算出し、抗体の結合親和性を表している。GANPT<sup>g</sup> マウスにおいて、様々な程度の結合親和性モノクローナル抗体産生細胞が樹立されたが、中でも著しく親和性が高い( $K_D = 9.90 \times 10^{-11}$  M)抗体を産生することができた(図 37)。

GANPTgマウスによる抗エイズ抗体作製

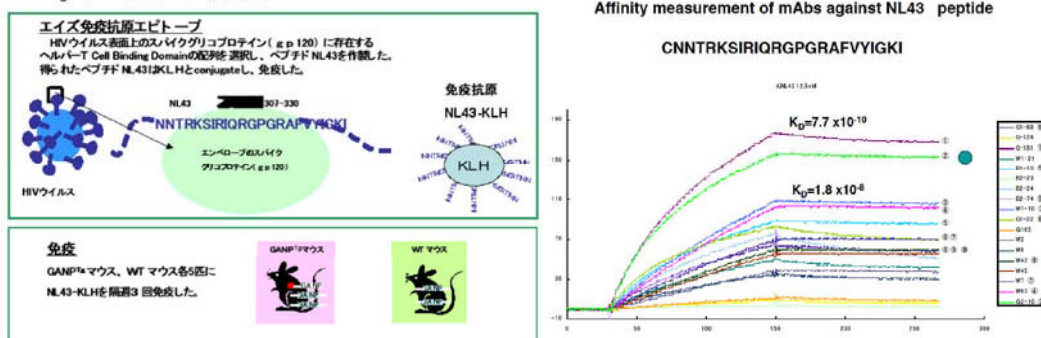


図37

これらの抗体は確かに HIV のウイルスエピトープに結合する活性が高く、その結合は免疫したウイ

ルス抗原に高度に特異的であった(図38)。実際これらのモノクローナル抗体が HIV の感染にどの程度有効なのかを検証するため、*in vitro* のウイルス感染を阻止する実験系で調べた。BIAcore で高い親和性を示した V3-G2-1、V3-G2-25 抗体は HIV ウイルスの中和活性が極めて高い有効な抗体であった。特に V3-G2-25 抗体は緑のカラムで示す様に 0.5 μg/ml の低濃度で中和活性 85% と非常に高い活性を示した。これは C57BL/6 マウスを用いて作製したコントロールの条件で得られる最高の活性を示す V3-W1-8 抗体を 50 μg/ml の濃度で使用した時の効果にほぼ匹敵する高い活性である。言い換えると100分の1の量で同等の効果を示すことになる。この様に高い親和性をペプチド抗原の単なる免疫によって得ることは通常は困難であり、このような最高レベルの高親和性抗体を研究室レベルで容易に作製することが可能であることを実証したものと意義深い。また、実際の治療や予防においてヒト型化して作製することも可能であり、そのような抗体薬剤の商品化を行う際にも、100分の1のコストで作製、商品化することが可能である。

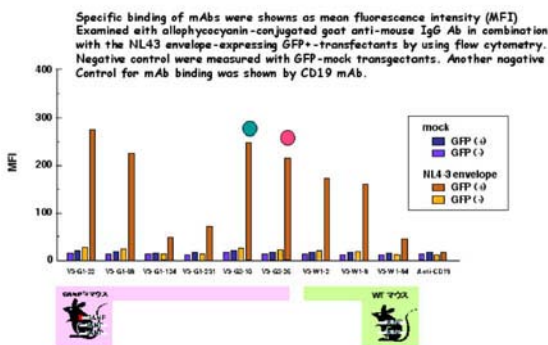
GANPTgマウスによる抗エイズ抗体作製

Table 1 Affinities of anti-HIV V3-epitope mAbs.

Name of mAb	H-chain	L-chain	V <sub>H</sub> usage	*K <sub>D</sub> (M)
<b>GANPTg</b>				
V3-G1-22	γ1	κ	V <sub>H</sub> J558.6	1.77 x 10 <sup>-6</sup>
V3-G1-68	γ2b	κ	n. t.	4.81 x 10 <sup>-7</sup>
V3-G1-124	γ2a	κ	n. t.	1.01 x 10 <sup>-6</sup>
V3-G1-165	γ1	κ	n. t.	1.14 x 10 <sup>-7</sup>
V3-G1-181	γ2b	λ	n. t.	1.09 x 10 <sup>-8</sup>
V3-G1-231	γ2b	κ	n. t.	2.07 x 10 <sup>-6</sup>
V3-G2-10	γ2b	κ	V <sub>H</sub> Sm7	9.90 x 10 <sup>-11</sup>
V3-G2-25	γ2a	κ	V <sub>H</sub> Sm7	1.51 x 10 <sup>-10</sup>
<b>C57BL/6</b>				
V3-W1-2	γ2b	κ	V <sub>H</sub> J558.B2	9.81 x 10 <sup>-8</sup>
V3-W1-7	γ2b	κ	n. t.	3.11 x 10 <sup>-9</sup>
V3-W1-8	γ2b	κ	n. t.	7.58 x 10 <sup>-9</sup>
V3-W1-10	γ2b	κ	n. t.	1.83 x 10 <sup>-9</sup>
V3-W1-21	γ2a	κ	n. t.	9.70 x 10 <sup>-9</sup>
V3-W1-43	γ2b	κ	n. t.	8.25 x 10 <sup>-9</sup>
V3-W1-45	γ2b	κ	n. t.	5.09 x 10 <sup>-9</sup>
V3-W1-63	γ2b	κ	n. t.	5.67 x 10 <sup>-9</sup>
V3-W1-64	γ2b	κ	n. t.	2.81 x 10 <sup>-5</sup>

\*K<sub>D</sub>s were calculated using BIAcore sensorgram. n. t.: not tested.

Binding activity of the mAbs against HIV-envelope



neutralizing activities of the mAbs against the V3 epitope of HIV-1 gp120

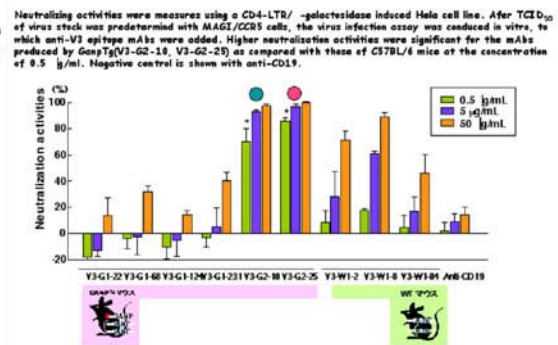
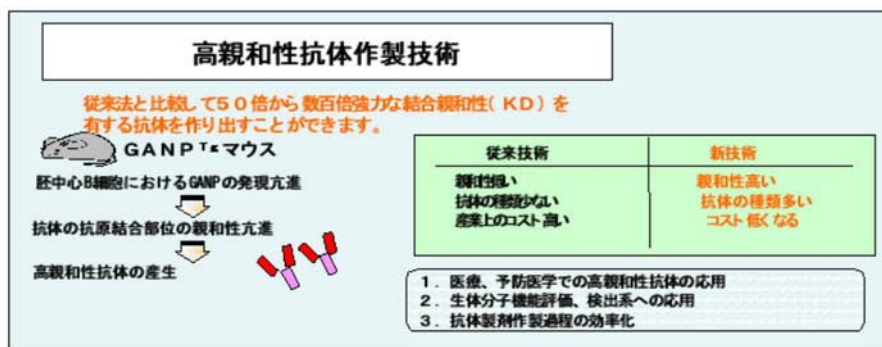


図38

今回は、エイズ治療薬の新しい可能性について試みたが、このような抗体を他のウイルスに対して作成することが可能であるといえる。





(1) GANP遺伝子特許: PCT/JP99/04634 『GANP蛋白質』

(2) GANPマウス特許: PCT/JP03/014221

『GANP遺伝子導入トランスジェニック哺乳動物及びその利用』

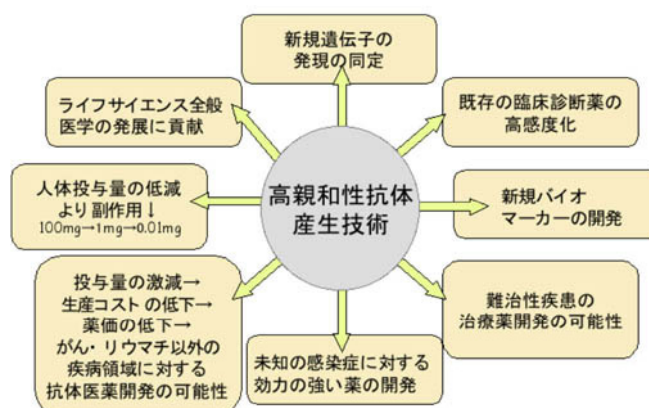


図39

本研究計画から派生した高親和性抗体作製技術は予想以上の結果であり、この我が国発の知的財産をGANP特許の取得後、創薬創出の技術として発展させる為に、研究室レベルからより広く内外の研究者、製薬企業、バイオテクノロジーベンチャー企業において活用できる仕組みを種々検討し、最終的に商品化することとした。高親和性抗体を安価に、そして容易に作成することが可能であるこの技術は抗体試薬の分野でのコストダウンや副作用の軽減、投与量の減少においてライフサイエンス、医学全般に貢献できるとともに、既存の臨床診断薬の高感度化、新規バイオマーカーの開発、難治性疾患の治療薬の開発、感染症に対する強力な標的治療薬の開発、さらには新規機能分子の探索に有効であると期待される(図39)。幸いにも、これまでのところ内外の施設からの要望に答えることができ、様々な抗原に対するモノクローナル抗体の創出につながっている。

#### 4. 研究参加者

##### ①阪口研究グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
阪口 薫雄	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	教授	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成14年11月～ 平成20年3月
五十嵐 英哉	川崎医科大学 免疫学教室	准教授	GANP 分子との結合分 子の解析	平成14年11月～ 平成20年3月
松井 健	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	D4	GANP 分子との結合分 子の解析	平成14年11月～ 平成20年3月
西山 規子	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)D4	GANP 分子との結合分 子の解析	平成14年11月～ 平成16年3月
藤村 睦	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)研究員	BCR由来V領域遺伝子 変異誘導シグナル	平成14年11月～ 平成17年12月
新里 晴子	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	CREST 研究補助員	GANP 分子との結合分 子の解析	平成15年2月～平 成19年3月
石井 俊司	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	CREST 研究補助員	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成15年4月～平 成15年9月
藤井 洋	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)D4	GANP 分子との結合分 子の解析	平成15年4月～平 成16年3月
山下 武士	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)研究員	BCR由来V領域遺伝子 変異誘導シグナル	平成15年4月～平 成16年3月
川谷 洋右	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)研究員	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成15年4月～平 成16年3月
乾 誠治	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)助教授	BCR由来V領域遺伝子 変異誘導シグナル	平成15年4月～平 成17年3月
熊本 靖子	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	CREST 研究補助員	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成15年4月～平 成17年11月
Huq Faisal Mahmudul	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)CREST 研究員	BCR由来V領域遺伝子 変異誘導シグナル	平成15年4月～平 成18年3月
岡元 信和	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)D4	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成15年4月～平 成19年3月



邢 岩	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	研究員	BCR由来V領域遺伝子 変異誘導シグナル	平成15年4月～平 成20年3月
川庄 由起	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	CREST 研究補助員	GANP分子との結合分 子の解析	平成15年5月～平 成19年6月
Sefat`e`Khuda	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	CREST 研究補助員	GANP分子との結合分 子の解析	平成15年7月～平 成16年3月
吉田 尊	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)D4	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成15年11月～ 平成19年3月
桑原 一彦	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	准教授	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成15年11月～ 平成20年3月
立石 実穂子	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	CREST 研究補助員	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成16年4月～平 成16年9月
王 曉丹	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	D4	BCR由来V領域遺伝子 変異誘導シグナル	平成16年4月～平 成20年3月
原口 晴美	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	(前)D2	GANP分子との結合分 子の解析	平成16年11月～ 平成19年3月
戸田 哲平	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	D3	GANP分子との結合分 子の解析	平成16年11月～ 平成20年3月
前田 和彦	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	助教	BCR由来V領域遺伝子 変異誘導シグナル	平成17年4月～平 成20年3月
東 ふき子	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	チーム 事務員		平成17年5月～平 成20年3月
青木 美香	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	CREST 研究補助員	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成18年5月～平 成19年9月
江田 和史	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	M2	BCR由来V領域遺伝子 変異誘導シグナル	平成18年10月～ 平成20年3月
大田 和貴	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	D2	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成18年10月～ 平成20年3月
中屋 照雄	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	D1	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成19年4月～平 成20年3月
北畠 正大	熊本大学医学 薬学研究部免 疫学分野	助教	体細胞突然変異誘導メ カニズムの解析	平成19年6月～平 成20年3月

## 5. 招聘した研究者等

該当なし

## 6. 成果発表等

(1) 原著論文発表 (国内誌 0件、国際誌19件)

1. Fujimura, S., K. Kuwahara, T. Ezaki, K. Tomita, S. Hirose, and N. Sakaguchi.  
Spontaneous increase of plasma-like cells with high GANP expression in the extrafollicular region of lymphoid organs of autoimmune-prone mice.  
*J Autoimmun* 20:291-301. 2003.
2. Hua, D.R., S. Inui, T. Yamashita, K. Maeda, K. Takagi, J. Takeda, and N. Sakaguchi.  
T cell-specific gene targeting reveals that alpha4 is required for early T cell development.  
*Eur J Immunol* 33:1899-1906. 2003.
3. Khuda, S.E., M. Yoshida, Y. Xing, T. Shimasaki, M. Takeya, K. Kuwahara, and N. Sakaguchi.  
The Sac3 homologue shd1 is involved in mitotic progression in mammalian cells.  
*J Biol Chem* 279:46182-46190. 2004.
4. Kuwahara, K., S. Fujimura, Y. Takahashi, N. Nakagata, T. Takemori, S. Aizawa, and N. Sakaguchi.  
Germinal center-associated nuclear protein contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor in T cell-dependent responses.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1010-1015. 2004.
5. Mirnics, Z.K., E. Caudell, Y. Gao, K. Kuwahara, N. Sakaguchi, T. Kurosaki, J. Burnside, K. Mirnics, and S.J. Corey.  
Microarray analysis of Lyn-deficient B cells reveals germinal center-associated nuclear protein and other genes associated with the lymphoid germinal center.  
*J Immunol* 172:4133-4141. 2004.
6. Fujimura, S., Y. Xing, M. Takeya, Y. Yamashita, K. Ohshima, K. Kuwahara, and N. Sakaguchi.  
Increased expression of germinal center-associated nuclear protein RNA-primase is associated with lymphomagenesis.  
*Cancer Res* 65:5925-5934. 2005.
7. Igarashi, H., K.L. Medina, T. Yokota, M.I. Rossi, N. Sakaguchi, P.C. Comp, and P.W. Kincade.  
Early lymphoid progenitors in mouse and man are highly sensitive to glucocorticoids.  
*Int Immunol* 17:501-511. 2005.
8. Kawatani, Y., H. Igarashi, T. Matsui, K. Kuwahara, S. Fujimura, N. Okamoto, K. Takagi, and N. Sakaguchi.  
Cutting edge: double-stranded DNA breaks in the IgV region gene were detected at lower frequency in affinity-maturation impeded GANP<sup>-/-</sup> mice.

- J Immunol* 175:5615–5618. 2005.
9. Maeda, K., Y. Baba, Y. Nagai, K. Miyazaki, A. Malykhin, K. Nakamura, P.W. Kincade, N. Sakaguchi, and K.M. Coggeshall.  
IL-6 blocks a discrete early step in lymphopoiesis.  
*Blood* 106:879–885. 2005.
  10. Sakaguchi, N., T. Kimura, S. Matsushita, S. Fujimura, J. Shibata, M. Araki, T. Sakamoto, C. Minoda, and K. Kuwahara.  
Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in the Ganp gene-transgenic mouse.  
*J Immunol* 174:4485–4494. 2005.
  11. Xing, Y., H. Igarashi, X. Wang, and N. Sakaguchi.  
Protein phosphatase subunit G5PR is needed for inhibition of B cell receptor-induced apoptosis.  
*J Exp Med* 202:707–719. 2005.
  12. Yamashita, T., S. Inui, K. Maeda, D.R. Hua, K. Takagi, and N. Sakaguchi.  
The heterodimer of alpha4 and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells.  
*Biochem Biophys Res Commun* 330:439–445. 2005.
  13. Ezaki, T., K. Kuwahara, S. Morikawa, K. Shimizu, N. Sakaguchi, K. Matsushima, and K. Matsuno.  
Production of two novel monoclonal antibodies that distinguish mouse lymphatic and blood vascular endothelial cells.  
*Anat Embryol (Berl)* 211:379–393. 2006.
  14. Huq Ronny, F.M., H. Igarashi, and N. Sakaguchi.  
BCR-crosslinking induces a transcription of protein phosphatase component G5PR that is required for mature B-cell survival.  
*Biochem Biophys Res Commun* 340:338–346. 2006.
  15. Kageshita, T., K. Kuwahara, M. Oka, D. Ma, T. Ono, and N. Sakaguchi.  
Increased expression of germinal center-associated nuclear protein (GANP) is associated with malignant transformation of melanocytes.  
*J Dermatol Sci* 42:55–63. 2006.
  16. Yamashita, T., S. Inui, K. Maeda, D.R. Hua, K. Takagi, K. Fukunaga, and N. Sakaguchi.  
Regulation of CaMKII by alpha4/PP2Ac contributes to learning and memory.  
*Brain Res* 1082:1–10. 2006.
  17. Yoshida, M., K. Kuwahara, T. Shimasaki, N. Nakagata, M. Matsuoka, and N. Sakaguchi.  
GANP suppresses DNA recombination, measured by direct-repeat  $\beta$ -galactosidase gene construct, but does not suppress the type of recombination applying to immunoglobulin genes in mammalian cells.  
*Genes Cells* 12:1205–1213. 2007.
  18. Fujimura, S., T. Matsui, K. Kuwahara, K. Maeda, and N. Sakaguchi.

Germinal center B-cell-associated DNA hypomethylation at transcriptional regions of the AID gene.

*Mol Immunol* in press

19. Xing Y., X. Wang, H. Igarashi, H. Kawamoto, and N. Sakaguchi  
Protein phosphatase subunit G5PR that regulates the JNK-mediated apoptosis signal is essential for the survival of CD4 and CD8 double-positive thymocytes.  
*Mol Immunol* in press

(2) その他の著作物

1. 桑原一彦、阪口薫雄  
胚中心 B 細胞の親和性成熟に関する RNA プライマーゼ GANP  
実験医学 22 巻 5 号、p. 88-93
2. 桑原一彦、阪口薫雄  
抗原特異的 B 細胞の活性化と GANP 分子の免疫応答における機能  
Molecular Medicine 臨時増刊号「免疫 2004」、p. 40-48

(3) 学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 4件、国際会議 1件)

Nobuo Sakaguchi

「Molecular mechanism of GANP in generation of affinity maturation of B cells during T cell-dependent antibody response.」

Symposium- The Frontier of B cell Research- Lecture Hall of Institute of Medical Sciences, University of Tokyo, October 19, 2004 (Invited speaker)

Nobuo Sakaguchi

「Critical role of GANP in generation of BCR-affinity maturation in germinal center B cells.」  
Session I: DNA recombination in B cells. The second international symposium. DNA metabolism and Chromatin Dynamics in Cellular Responses. Hiroshima University 21<sup>st</sup> century COE program -Radiation Casualty Medical Research Center- Koujin Conference Hall on Kasumi Campus, Hiroshima University, December 16<sup>th</sup>, 2004 (Invited speaker)

Nobuo Sakaguchi

「Role of GANP in generation of high-affinity antibody.」

First symposium of CREST project, Japan Science and Technology Agency, The Shinagawa conference center, Great Hall, Shinagawa, Tokyo, December 17<sup>th</sup>, 2004 (Symposium speaker)

Nobuo Sakaguchi

「New technology for generation of high-affinity antibodies against viruses.」

INFECTION-Symposium on emerging and reemerging infectious diseases. Lecture Hall, Institute of Medical Sciences, University of Tokyo, March 3<sup>rd</sup>-4<sup>th</sup>, 2005 (Invited speaker)

Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)

「Germinal center-associated nuclear protein GANP is involved in affinity maturation of antibody by regulation of V-region DNA double-strand break during immune responses.」  
10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine, Crete, Greece, October 15<sup>th</sup>, 2005 (Invited speaker)

② 口頭発表 (国内会議29件、国際会議 2件)

桑原一彦、藤村 睦、高橋宣聖、竹森利忠、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、国立感染研・免疫、科技団・戦略)  
「B細胞特異的 GANP 欠損マウスにおける親和性成熟の異常」  
第33回日本免疫学会総会、福岡国際会議場／マリンメッセ福岡、2003年12月8日～10日

五十嵐英哉、Paul W. Kincade、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、Oklahoma Medical Research Foundation、科技団・戦略)  
「Early events in adult lymphopoiesis require NF-kappaB」  
第33回日本免疫学会総会、福岡国際会議場／マリンメッセ福岡、2003年12月8日～10日

桑原一彦、藤村 睦、大島孝一、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、福岡大・医・病理、科技団・戦略)  
「胚中心発現 GANP 分子のリンパ腫形成における evidence」  
第62回日本癌学会総会、名古屋、2003年9月25日

五十嵐英哉、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・戦略)  
「年齢依存的初期リンパ系細胞分化の NF-kappaB 要求性」  
第62回日本癌学会総会、名古屋、2003年9月25日

桑原一彦、藤村 睦、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、科技団・戦略)  
「胚中心発現 GANP 分子のリンパ腫形成における evidence」  
第7回がん分子標的治療研究会総会、東京、2003年6月3日

乾 誠治、丁 栄華、山下武士、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・戦略)  
「プロテインホスファターゼ調節分子 alpha4 の T 細胞特異的遺伝子破壊マウスは T 細胞分化障害を示す」  
第1回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、札幌、2003年7月29日

桑原一彦、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、科技団・戦略)  
「抗体親和性成熟における GANP 分子の役割」  
第34回日本免疫学会総会、ロイトン札幌／北海道厚生年金会館、2004年12月1日～3日

五十嵐英哉、Xing Yan、Huq Faisal Mahmudul、前田和彦、王晓丹、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・戦略)  
「GANP 結合分子 G5PR は抗原受容体からの増殖シグナルを positive に制御する」  
第34回日本免疫学会総会、ロイトン札幌／北海道厚生年金会館、2004年12月1日～3日

五十嵐英哉、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技団・戦略)  
「脱リン酸化酵素結合 G5PR 分子の転写調節機能と B 細胞活性化制御」  
第63回日本癌学会総会、福岡国際会議場他、9/30/2004

桑原一彦、藤村 睦、大島孝一、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、福岡大・医・病理、科技団・戦略)  
「持続的 GANP 発現異常はリンパ腫瘍誘導因子となる」  
第63回日本癌学会総会、福岡国際会議場他、2004年9月29日～10月1日

Nobuo Sakaguchi, Mikoto Yoshida, Yousuke Kawatani, Satoru Fujimura, Takeshi Matsui, Hideya Igarashi, and Kazuhiko Kuwahara  
(熊本大・院医薬・免疫、CREST・JST)  
「Critical role of GANP in generation of BCR-affinity maturation in germinal center B cells.」  
Keystone Symposia, B cell development, Function and Disease.  
Sheraton Steamboat Resort, Steamboat Springs, Colorado, USA. March 27-April 3, 2005

桑原一彦、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、CREST・JST)  
「RNA プライマーゼ GANP の発現低下による乳癌発症」  
第9回がん分子標的治療研究会総会、国立京都国際会館、2005年7月1日

桑原一彦、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、CREST・JST)  
「RNA プライマーゼ GANP のヘテロ欠損マウスにおける乳癌発症」  
第9回基盤的癌免疫研究会総会、慶応義塾大学三田キャンパス北館ホール、2005年7月14日

Nobuo Sakaguchi, Yousuke Kawatani, Mikoto Yoshida, Satoru Fujimura, Yang Xing, Hideya Igarashi, Yoshimasa Takahashi, Toshitada Takemori, and Kazuhiko Kuwahara  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)  
「Critical role of GANP in generation of high affinity B cells against T cell-dependent antigen.」  
12th International Congress of Immunology, Montreal, Canada, July 19<sup>th</sup>～23<sup>th</sup>, 2004

桑原一彦、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)  
「RNA プライマーゼ GANP の発現低下による乳癌発症」  
第64回日本癌学会総会、ロイトン札幌他、2005年9月14日～16日

五十嵐英哉、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)  
「G5PR 欠損 B 細胞における抗原受容体刺激惹起性の Bim 活性化異常によるアポトーシス誘導」  
第64回日本癌学会総会、ロイトン札幌他、2005年9月14日～16日

阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、CREST・JST)  
「Molecular mechanism of affinity maturation of the antigen specific germinal center B cells during T cell-dependent antigen response.」  
RCAI International Symposium on Immunology, パシフィコ横浜 (横浜みなとみらい)、2005年12月13日～15日



Kazuhiko Maeda, Yoshihiro Baba, Yoshinori Nagai, Nobuo Sakaguchi, Paul W. Kincade, and Mark k. Coggeshall

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, Immunology and Cancer, Oklahoma Med. Res. Fund., RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, CREST•JST)

「IL-6 blocks a discrete early step in lymphopoiesis.」

第35回日本免疫学会総会、パシフィコ横浜(横浜みなとみらい)、2005年12月13日～15日

吉田 尊、桑原一彦、藤村 睦、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)

「抗体のクラススイッチに関わる GANP の役割」

第35回日本免疫学会総会、パシフィコ横浜(横浜みなとみらい)、2005年12月13日～15日

桑原一彦、岩瀬弘敬、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、乳腺内分泌外科、科技構・戦略)

「二重鎖切断分子 GANP 欠損と腫瘍発症」

第65回日本癌学会総会、パシフィコ横浜、2006年9月28日～30日

Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST•JST)

「Molecular mechanism of B-cell maturation in germinal centers of lymphoid follicles during T-cell-dependent immune responses.」

The 22<sup>nd</sup> International Kumamoto Medical Bioscience Symposium, The 3<sup>rd</sup> Japan-China Cooperative Life Science Symposium in Kumamoto, Asia-Africa International Network Symposium in Kumamoto of JSPS Asia and Africa Science Platform Program, Kumamoto, Japan, October 23, 2006

Hideya Igarashi, Teppei Toda, Takeshi Matsui, Xing Yan, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST•JST)

「GANP regulates JAK/STAT signal transduction pathway in germinal center B cells.」

第36回日本免疫学会総会、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)、2006年12月11日～13日

Kazuhiko Maeda, Kazufumi Eda, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST•JST)

「The molecular role of GANP in IgV region gene diversification.」

第36回日本免疫学会総会、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)、2006年12月11日～13日

Mikoto Yoshida, Kazuhiko Kuwahara, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST•JST)

「Role of GANP in regulation of DNA repair mechanism associated with Ig class-switch recombination.」

第36回日本免疫学会総会、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)、2006年12月11日～13日

阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)

レビュートーク「B細胞抗原受容体の成熟と自己寛容維持の分子機構」

第36回日本免疫学会総会、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)、2006年12月11日～13日

Xing Yan, Wang Xiaodan, Hideya Igarashi, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST•JST)

「Protein phosphatase subunit G5PR is required for survival of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive thymocytes.」

第66回日本癌学会総会、パシフィコ横浜、2007年10月3日～5日

阪口薫雄、戸田哲平、前田和彦、五十嵐英哉、桑原一彦  
(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略、川崎医科大学免疫学)

「自己免疫疾患におけるB細胞抗原レセプターのediting」

第35回日本臨床免疫学会総会、ホテル阪急エキスポパーク、2007年10月19日～20日

Kazuhiko Kuwahara, Kazutaka Ohta, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)

「Lack of THP1 protein associated with GANP impairs B cell maintenance.」

第37回日本免疫学会総会、グランドプリンスホテル新高輪、2007年11月20日～22日

Masahiro Kitabatake, Hideya Igarashi, Teppei Toda, Mareki Ohtsuji, Hiromichi Tsurui, Sachiko Hirose, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST, Dept. Immunol., Kawasaki Medical School, Dept. Pathol., Juntendo University Grad. Sch. Med.)

「Role of G5PR in the development of autoimmune disease.」

第37回日本免疫学会総会、グランドプリンスホテル新高輪、2007年11月20日～22日

Xing Yan, Wang Xiaodan, Hideya Igarashi, Hiroshi Kawamoto, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST, Lab. Lymph. Develop., RIKEN Research Center for Allergy and Immunology )

「Protein phosphatase subunit G5PR regulates the JNK-mediated apoptosis signal and is required for survival of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive thymocytes.」

第37回日本免疫学会総会、グランドプリンスホテル新高輪、2007年11月20日～22日

Kazuhiko Maeda, Kazufumi Eda, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)

「IgV region diversification by Germinal center-Associated Nuclear Protein.」

第37回日本免疫学会総会、グランドプリンスホテル新高輪、2007年11月20日～22日

③ ポスター発表 (国内会議27件、国際会議 8件)

桑原一彦、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、科技団・戦略)

「胎仔期におけるDNAプライマーゼGANPの発現と機能」

第36回日本発生生物学会、ロイトン札幌、2003年6月11日～10日

藤村 睦、桑原一彦、Xing Yan、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、科技団・戦略)

「GANP分子発現増強による悪性リンパ腫形成」

第33回日本免疫学会総会、福岡国際会議場／マリンメッセ福岡、2003年12月8日～10日

吉田 尊、桑原一彦、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、科技団・戦略)

「GANP関連分子SHD-1のリンパ細胞における細胞増殖制御」

第33回日本免疫学会総会、福岡国際会議場／マリンメッセ福岡、2003年12月8日～10日

川谷洋右、五十嵐英哉、桑原一彦、岡元信和、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、科技団・戦略)

「胚中心におけるV領域DSB誘導の制御メカニズムの解析」

第33回日本免疫学会総会、福岡国際会議場／マリンメッセ福岡、2003年12月8日～10日

臼井健司、戸村道夫、黒部裕、北川哲也、斉藤ふみ、五十嵐英哉、阪口薫雄、高浜洋介

(徳島大・ゲノム機能研、熊本大・院医薬・免疫、科技団・戦略)

「胸腺組織のタイムラプス可視化による胸腺内細胞動態の解析」

第33回日本免疫学会総会、福岡国際会議場／マリンメッセ福岡、2003年12月8日～10日

Yousuke Kawatani, Hideya Igarashi, Kazuhiko Kuwahara and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)

「Regulation of double strand DNA breaks in immunoglobulin V region gene by GANP expression in germinal center B cells.」

12th International Congress of Immunology, Montreal, Canada, July 19<sup>th</sup>～23<sup>th</sup>, 2004

Mitoko Yoshida, Sefat-e-Khuda, Kazuhiko Kuwahara, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)

「Regulation of lymphocyte proliferation by GANP-related protein, SHD1.」

12th International Congress of Immunology, Montreal, Canada, July 19<sup>th</sup>～23<sup>th</sup>, 2004

Seiji Inui, Ding RonHua, Takeshi Yamashita and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)

「T cell specific gene targeting reveals that alpha4, a phosphatase regulator, is required for early T cell development.」

12th International Congress of Immunology, Montreal, Canada, July 19<sup>th</sup>～23<sup>th</sup>, 2004

Kazuhiko Kuwahara, Satoru Fujimura, Yang Xing, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, PREST and CREST・JST)

「Transgenic expression of GANP caused lymphomagenesis.」

12th International Congress of Immunology, Montreal, Canada, July 19<sup>th</sup>～23<sup>th</sup>, 2004

Hideya Igarashi, Xing-Yan, Koichi Nakajima and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST, Dept. Immunol., Osaka City University Grad. Sch. Med.)

「Identification of molecules that regulate affinity maturation of germinal center B cells.」

12th International Congress of Immunology, Montreal, Canada, July 19<sup>th</sup>～23<sup>th</sup>, 2004

川谷洋右、五十嵐英哉、桑原一彦、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技団・戦略)

「胚中心におけるV領域 double strand break (DSB)誘導の制御の意義」

第63回日本癌学会総会、福岡国際会議場他、2004年9月29日～10月1日

山下武士、乾 誠治、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技団・戦略)

「ホスファターゼ調節分子 alpha4 の脳神経細胞調節機能の解析」

第63回日本癌学会総会、福岡国際会議場他、2004年9月29日～10月1日

藤村 睦、桑原一彦、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、科技団・戦略)  
「胚中心関連分子 GANP の転写調節機能と B 細胞分化への関与の検討」  
第34回日本免疫学会総会、ロイトン札幌／北海道厚生年金会館、2004年12月1日～3日

吉田 尊、桑原一彦、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、科技団・戦略)  
「遺伝子相同組換えにおける GANP の機能」  
第34回日本免疫学会総会、ロイトン札幌／北海道厚生年金会館、2004年12月1日～3日

Xing Yan、五十嵐英哉、王晓丹、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技団・さきがけ、科技団・戦略)  
「プロテインフォスファターゼ結合分子 G5PR の B 細胞特異的欠損マウスの作製」  
第34回日本免疫学会総会、ロイトン札幌／北海道厚生年金会館、2004年12月1日～3日

藤村 睦、松井 健、五十嵐 英哉、桑原一彦、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)  
「DNA 脱メチルによる B 細胞分化段階的な遺伝子発現」  
第35回日本免疫学会総会、パシフィコ横浜(横浜みなとみらい)、2005年12月13日～15日

Xing Yan, Hideya Igarashi, Xiaodan Wang, and Nobuo Sakaguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)  
「Protein phosphatase component G5PR plays a crucial role in the inhibition of BCR-induced apoptosis accompanied with the activation of JNK and Bim.」  
第35回日本免疫学会総会、パシフィコ横浜(横浜みなとみらい)、2005年12月13日～15日

桑原一彦、吉田 尊、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)  
「抗体の親和性亢進における GANP の分子生物学的機能」  
第35回日本免疫学会総会、パシフィコ横浜(横浜みなとみらい)、2005年12月13日～15日

五十嵐 英哉、戸田哲平、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)  
「自己免疫疾患マウスにおける腹腔 B-1 細胞の receptor editing と生存についての分子制御」  
第35回日本免疫学会総会、パシフィコ横浜(横浜みなとみらい)、2005年12月13日～15日

Nobuo Sakaguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)  
「Molecular mechanism of affinity maturation of antigen specific B-cells in germinal center.」  
The Annual Meeting of The American Association of Immunologists (AAI), Boston, USA, April-13<sup>th</sup>, 2006

五十嵐英哉、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)  
「RNA プライマーゼ GANP に会合するアルギニンメチル化酵素 PRMT5 の同定と機能の解析」  
第65回日本癌学会総会、パシフィコ横浜、2006年9月28日～30日

岡元信和、五十嵐英哉、阪口薫雄

(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)  
「RNA プライマーゼ GANP による転写調節機能についての解析」  
第65回日本癌学会総会、パシフィコ横浜、2006年9月28日～30日

邢岩、王晓丹、五十嵐英哉、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略)  
「T 細胞特異的 G5PR 欠損マウスにおける胸腺細胞の分化異常および細胞死亢進のメカニズム」  
第65回日本癌学会総会、パシフィコ横浜、2006年9月28日～30日

前田和彦、岡元信和、武田俊一、阪口薫雄  
(熊本大・院医薬・免疫、科技構・戦略、京都大学・医・放射線遺伝学)  
「高親和性抗体の獲得機構と DNA 修復経路に関する検討」  
第65回日本癌学会総会、パシフィコ横浜、2006年9月28日～30日

Okamoto Nobukazu, Hideya Igarashi, and Nobuo Sakaguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)  
「GANP is a master regulator for normal division process of mammalian cells.」  
第36回日本免疫学会総会、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)、2006年12月11日～13日

Kazuhiko Kuwahara, Mikoto Yoshida, and Nobuo Sakaguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)  
Identification of a novel GANP-associated THP1 protein that is necessary for B-cell maintenance.  
第36回日本免疫学会総会、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)、2006年12月11日～13日

Xing Yan, Wang Xiaodan, Hideya Igarashi, and Nobuo Sakaguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)  
「G5PR is indispensable for differentiation and survival of T lineage cells.」  
第36回日本免疫学会総会、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)、2006年12月11日～13日

Wang Xiaodan, Xing Yan, Hideya Igarashi, and Nobuo Sakaguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)  
「Role of G5PR in the survival of T cells in early T lineage cell development.」  
第36回日本免疫学会総会、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)、2006年12月11日～13日

Teppei Toda, Hideya Igarashi, and Nobuo Sakaguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST)  
「Generation of mature follicular B-cells with early B-lineage cell phenotype.」  
第36回日本免疫学会総会、大阪国際会議場(グランキューブ大阪)、2006年12月11日～13日

Xing Yan, Wang Xiaodan, Hideya Igarashi, Hiroshi Kawamoto, and Nobuo Sakaguchi  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST, Lab. Lymph. Develop.,  
RIKEN Research Center for Allergy and Immunology )  
「Requirement of the protein phosphatase-2A component G5PR for survival of early T lineage cells  
during differentiation in the thymus.」  
13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil, August 21-25, 2007

Kazuhiko Maeda and Nobuo Sakaguchi.  
(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST・JST )  
「Germinal center-associated nuclear protein GANP regulates immunoglobulin V-region gene

conversion in chicken DT40 cells.]

13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil, August 21-25, 2007

Kazuhiko Kuwahara, Hirotaka Iwase, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Dept. Breast Endocrine Surg., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST•JST)

「Characterization of ganp gene abnormality in human breast cancer.」

第66回日本癌学会総会、パシフィコ横浜、2007年10月3日～5日

Kazuhiko Maeda, Shunichi Takeda, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST•JST, Dept. Radiation Genetics, Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

「Regulation of IgV region diversification by GANP.」

第66回日本癌学会総会、パシフィコ横浜、2007年10月3日～5日

Kazutaka Ohta, Kazuhiko Kuwahara, Teruo Nakaya, Masahiro Kitabatake, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST•JST)

「Leng8: a novel nuclear protein of Sac3/GANP family is up-regulated in germinal center B cells.」

第37回日本免疫学会総会、グランドプリンスホテル新高輪、2007年11月20日～22日

Kazufumi Eda, Kazuhiko Maeda, and Nobuo Sakaguchi

(Dept. Immunol., Grad. Sch. Med. Sci., Kumamoto University, CREST•JST)

「Germinal center-Associated Nuclear Protein is associated with the non-homologous end joining pathway.」

第37回日本免疫学会総会、グランドプリンスホテル新高輪、2007年11月20日～22日

#### (4) 特許出願

##### ①国内出願 (0件)

なし

##### ②海外出願 (0件)

なし

#### (5) 受賞等

##### ① 受賞

受賞者: 阪口薫雄

賞名: 研究助成金

対象課題: SARS ウィルス高感度感染症検出システムの開発

授与団体名: (財)三井生命厚生事業団

受賞月日: 平成 18 年 7 月

受賞者: 五十嵐英哉

賞名: 平成 17 年度熊本医学会奨励賞



対象課題:脱リン酸化酵素結合分子 G5PR の機能解析  
授与団体名:熊本医学会  
受賞月日:平成 18 年 2 月

受賞者:桑原一彦  
賞名:研究助成金  
対象課題:非遺伝性乳癌新規発症機構の解明とそれに基づく早期診断へのアプローチ  
授与団体名:(財)神澤医学研究振興財団  
受賞月日:平成 17 年 12 月

受賞者:桑原一彦  
賞名:研究助成金  
対象課題:新規乳癌診断法研究開発に関する分科会  
授与団体名:熊本県バイオシーズ調査研究  
受賞月日:平成 17 年 11 月

受賞者:桑原一彦  
賞名:医学研究助成金  
対象課題:早期胆管癌診断に求められる高親和性モノクローナル抗体の応用  
授与団体名:財団法人 黒住医学研究振興財団  
受賞月日:平成 17 年 10 月

受賞者:桑原一彦  
賞名:研究助成金  
対象課題:悪性黒色腫における胚中心関連分子 GANP の異常リン酸化とゲノム不安定性に及ぼす影響の解析と遺伝子導入による悪性黒色腫発症モデルマウスの作製  
授与団体名:(財)ノバルティス科学振興財団  
受賞月日:平成 17 年 2 月

受賞者:桑原一彦  
賞名:研究助成金  
対象課題:国際感染症防疫における高親和性抗体の樹立-致死的感染症類鼻疽症に対する診断・治療への応用-  
授与団体名:(財)東京生化学研究会  
受賞月日:平成 16 年 12 月

## ② 新聞報道

2007年9月7日、熊本日々新聞、「HIV抗体販売を開始」

## (6) その他特記事項

トランスジェニック社(神戸)  
<http://www.transgenic.co.jp/jp/products/ganp/index.html>

## 7. 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成18年10月23日	The 22 <sup>nd</sup> International Kumamoto Medical Bioscience Symposium, The 3 <sup>rd</sup> Japan-China Cooperative Life Science Symposium in Kumamoto, Asia-Africa International Network Symposium in Kumamoto of JSPS Asia and Africa Science Platform Program	熊本市	200人 (延べ)	熊本医学生物学シンポジウム、日中交流生命科学研究会、アジア・アフリカ国際ネットワークシンポジウムがジョイントシンポジウムとして開催され、感染防御について基礎分野、臨床分野で活躍する研究者をアメリカ、アジア、アフリカ、国内から招待して活発な討論会が行われた。

謝辞

我々が見いだした胚中心B細胞機能分子に関する研究を採択していただき、ご支援頂いたことに、研究総括委員長の岸本忠三先生、前委員長の山西弘一先生、領域アドバイザーの審良静男先生、内山卓先生、笹月健彦先生、高津聖志先生、野本明男先生に改めて感謝致します。独自の研究で創造性に富む研究を実施する環境は、本来の科学研究の推進に欠かせない条件であることを改めて再認識した次第です。GANPは210-kDaという大きな分子で既知の機能ドメインを示さない分子であることから、研究を進める上で研究員達が思わぬ苦難の道を歩んだ足跡です。幸いにも最終年度ようやく最終的な成果に関しての予備結果を判読している現在になって、今更ながらこのような支援の有難さを認識した次第です。そして、ようやく GANP の分子機能を明らかにできそうなところに漕ぎ着けました。大変重要な研究を推進させて頂いたのだということが実感できていて、一層、感謝の念が深まります。また、研究の進展を常に社会貢献を目的に推進することに勤めましたが、そのことから、新たなバイオテクノロジー技術の創出、産業育成という、今我が国が求めている目的に沿うことができていることを省みるにつれても大変幸福な5年間の研究を推進できたものと幸甚きわまりないところです。これからもこの研究を途絶させるのではなく、さらに一層発展させるべく勤めて参りたいと存じますのでよろしくご指導、ご鞭撻賜りますようお願い致します。

