

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
研究課題「病態における膜マイクロドメイン
糖鎖機能の解明」

研究終了報告書

研究期間 平成16年10月～平成22年3月

研究代表者：本家 孝一
高知大学教育研究部医療学系・教授

§ 1 研究実施の概要

糖脂質は、生体膜上でコレステロールや膜タンパク質と会合して、膜マイクロドメイン(脂質ラフト)とよばれる超分子アッセムブリーを形成し、膜輸送や細胞接着やシグナル伝達のためのプラットフォームを提供する。本研究課題は、脂質ラフトに対する抗体の作製や膜マイクロドメイン指向性プローブによる膜マイクロドメインの可視化を目指すとともに、癌やウイルス感染の免疫における膜マイクロドメインの機能に関わる糖鎖の役割を解明することを目的とした。研究実施体制は、糖鎖機能解析法グループ(リーダー:本家孝一、高知大学)、免疫制御グループ(リーダー:宇高恵子、高知大学)、抗体産生グループ(リーダー:藤本純一郎、国立成育医療センター研究所)の3グループで行ない、各研究グループが互いに連携しながら独自の研究を推進した。

本家グループは、藤本グループが開発した脂質ラフト免疫法により、マウス精子形成細胞膜マイクロドメインに対する単クローン抗体を作製し、得られた抗体が認識するタンパク質抗原を5種類同定した。このうちの1種類は新規タンパク質であった。また、本家グループの久下は、脳の雄化に関与する分子としてマスキュリン遺伝子をクローニングしたが、このマスキュリン遺伝子をラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞に強制発現させると神経様突起伸長を促進することを見出した。このように突起伸長した PC12 細胞から調製した膜マイクロドメインを免疫することにより、突起先端の膜マイクロドメインに局在する脂質を認識する単クローン抗体を得た。このように、ラフト免疫法では、精子形成細胞上で硫酸化糖脂質と相互作用する分子に対する抗体を作るという当初の思惑は外れたが、新規分子に対する興味深い抗体が得られた。一方、同グループで発見した膜マイクロドメイン指向性プローブによる Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応を用いて、生細胞の細胞膜上で会合する分子群を同定する方法を開発した。EMARS 法の応用例として、同一の抗原に対する2種類の単クローン抗体を作用させたときに集積してくる分子群が異なることを見出した。EMARS 法は、標識試薬としてアリアルアジドピオチンを用いた場合、外来性の HRP のみならず内在性酵素でも活性化されるという欠点があったが、この欠点の解消に成功した。

宇高グループは、未熟胸腺細胞の CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) あるいは CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th) への分化決定の際、T 細胞レセプター (TCR) が胸腺上皮細胞上に発現する MHC 分子のクラスを見分ける方法として、MHC class II 分子が膜マイクロドメイン会合性に提示されることが Th 細胞への分化決定に必要であることを明らかにした。また、悪性腫瘍や難治性ウイルス感染症に対して特異的 CTL を誘導するための、HLA class I 分子結合性ペプチドを免疫源としたペプチド免疫療法に関して、膜マイクロドメインに局在する糖脂質 GD1a に結合する百日咳全菌体ワクチンを免疫賦活剤として添加することにより、Th1 優勢の免疫反応の場を作ることで、腫瘍制御活性を高めることができた。この改良法について、初期臨床第 I/II 相試験を行った。

藤本グループは、独自に考案したラフト免疫法の特性を解析し、単一の糖脂質に対する抗体が出来やすいこと、自己抗原に対しても免疫応答が誘導されること、クラススイッチを伴う典型的な免疫反応であることを明らかにした。本方法により抗 G タンパク β 1, 2 鎖単クローン抗体 Raft.1 及び抗 sialylGb5Cer 単クローン抗体 Raft.2 を得た。G タンパク β 1, 2 鎖は一次構造が種を超えてよく保存されたタンパクなので、これまで、単クローン抗体の産生は困難とされていた。Raft.2 は Laminin Binding Protein にも反応し、SSEA-4 エピトープがタンパクにも担われていることを示唆するものである。さらに、アジュヴァントとの混合が不要で、同系抗原に対しても免疫応答が誘導可能というラフト免疫法の利点を生かして本方法の抗腫瘍免疫療法への応用をマウスで検討し、明確な抗腫瘍効果を確認した。抗原非特異的抗腫瘍効果を有するヒト腎癌由来細胞株 ACHN のラフト免疫は、被免疫マウスの自然免疫を強化し、腹腔マクロファージを活性化し、腹腔細胞の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を惹起した。抗腫瘍免疫療法の免疫方法に応用可能と期待される。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

生体膜上で、糖脂質は、リン脂質と比べて互いに会合しやすい性質をもつ。コレステロールや膜タンパク質が加わり、膜マイクロドメインとよばれる超分子アッセムブリーを形成し、これが機能ユニットとなってさまざまな生物機能を発揮するようになる。具体的には、糖脂質は細胞膜外層に局在するが、細胞膜外層の接着分子や細胞増殖因子受容体や、細胞膜内層の Src チロシンキナーゼファミリーやGタンパク質などの機能タンパク質分子と共に動的秩序体を形成し、細胞接着やシグナル伝達のプラットフォームを提供する。

本研究は、さまざまな生理現象や病態における膜マイクロドメインの糖鎖機能を解明することを目的とする。第一のアプローチとして、密度勾配超遠心で分画した界面活性剤抵抗性膜マイクロドメイン (DRM) 画分を丸ごとマウスに免疫して、膜マイクロドメインに対する単クローン抗体を作製することにより、膜マイクロドメイン構成分子に対する抗体作製を行う。ラフト免疫法は、単に構成分子がわかるだけでなく、抗体を用いて生細胞における膜マイクロドメインの動態を追うためのリソースとなる。第二のアプローチとして、生細胞上で特定の糖脂質が形成する分子複合体を解析するための新しいマイクロドメイン指向性プローブの開発を行う。第三のアプローチとして、抗糖鎖単鎖抗体を細胞内膜で発現させることにより、あるいは糖鎖遺伝子の発現を抑制することにより、特定の糖鎖を介する膜マイクロドメインの形成を制御する方法の確立を目指す。

このように、生細胞上の膜マイクロドメインの動態を解析あるいは制御するための新しい研究手法を開発するとともに、膜マイクロドメインが重要な役割を担っている免疫学、ウイルス学という他の領域との融合研究を通して、膜マイクロドメインにおける糖鎖機能を解明する。

糖鎖機能解析法(本家)グループ:

糖脂質硫酸転移酵素 CST のノックアウトマウスの異常から、硫酸化糖脂質がミエリン膜と軸索膜の接合と精子形成に必須であることがわかったが、詳細な分子メカニズムは依然不明である。局所で、硫酸化糖脂質が未知のタンパク分子と会合してつくる超分子アッセムブリーが、ミエリン膜-軸索膜相互作用や精母細胞-セルトリ細胞相互作用に働いていると思われる。この分子メカニズム解明の第一歩として、硫酸化糖脂質を含む膜マイクロドメインの構造とその形成プロセスを明らかにする。このため、硫酸化糖脂質のセミノリピドを含むマウス精子形成細胞膜マイクロドメインに対する単クローン抗体を作製し、セミノリピドと相互作用するタンパク分子に対する抗体を得る。

膜マイクロドメイン指向性プローブを開発して、特定の膜マイクロドメインに会合する分子を可視化する。

ヒト腎癌細胞は CST 遺伝子の発現が高度に亢進しており、最終産物の硫酸化糖脂質が蓄積している。硫酸化糖脂質は、癌細胞表面のみならず細胞内にも発現しており、細胞内のタンパク質輸送や膜輸送に働いている可能性が示唆される。抗硫酸化糖脂質単鎖抗体を細胞内で発現させること、あるいは siRNA で CST 遺伝子の発現を抑えることにより硫酸化糖脂質の発現を阻害して、腎癌細胞への影響を調べる。

ウイルス感染制御(今井)グループ:

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、NK/Tリンパ腫、上咽頭癌、胃癌など多様なヒト腫瘍疾患の発生に関与する。EBVがBリンパ球に持続感染すると、B細胞

の細胞膜にEBV遺伝子産物のlatent infection membrane protein (LMP)のLMP1とLMP2Aを発現するようになる。これらLMPは複数回膜を貫通する膜内在性タンパクで膜マイクロドメインに局在すると報告され、EBV潜伏感染に好都合な環境の維持、不死化、癌形質の発現に重要な役割を果たすと考えられている。これらLMPが膜マイクロドメインに局在するメカニズムと意義を明らかにする。

免疫制御(宇高)グループ:

胸腺細胞によるMHC class Iとclass II分子の識別に、MHC分子自身の構造の違いの他に、それらが置かれた反応場の違いが、胸腺細胞に異なる反応を誘導する可能性を想定し、MHC分子の脂質ラフト局在性と、その機能との相関について明らかにする。

抗体産生(藤本)グループ:

膜マイクロドメインに対する単クローン抗体の作成と膜マイクロドメインに対する免疫応答を利用した治療戦略の構築を目標に掲げた。細胞系統の異なる種々の細胞株から膜マイクロドメインを調製し、マウスに免疫して、それぞれのマイクロドメインに特異的な糖脂質やタンパク質に対する抗体を作成する。一方、抗糖脂質抗体特異性を抗血清レベルで調べてパネル化し、その中から必要な単クローン抗体を作成する。さらに、このマイクロドメイン特有の免疫反応を担癌モデルあるいは自己免疫疾患モデルなどに応用し、腫瘍細胞増殖制御や自己反応性リンパ球除去が可能か否かを検討する。

(2)新たに追加・修正など変更した研究構想

1) 事情により、平成18年度まで参加していたウイルス感染制御(今井)グループがチームから外れ、平成19年度から3グループで研究を推進した。

2) (本家グループ) 当グループの久下は、脳の性分化に伴って雄ラット新生児の脳視索前野に時期部位特異的に発現するマスキュリンを発見した。このマスキュリン遺伝子を神経系培養細胞株であるPC12細胞に強制発現させると、神経突起伸長が促進されるとともに、マスキュリンの一部は膜マイクロドメインに集積することがわかった。そこで、平成18年度から膜マイクロドメインにおけるマスキュリンの機能とマスキュリンに付加している糖鎖の役割を解明する。

3) (宇高グループ) TCR活性化の“場”を提供する膜マイクロドメインで抗原を提示する際に、ガングリオシドGD1aと結合する百日咳全菌体ワクチンを免疫賦活剤として添加することにより、Th1誘導型の応答を惹起させて、免疫誘導能の高いペプチド免疫療法を開発する。

4) (藤本グループ) ラフト免疫はラフト被免疫マウスの自然免疫を増強し、抗腫瘍効果を発揮するように思われたので、ラフト被免疫マウスの樹状細胞、 $\gamma\delta$ -T細胞、B1細胞、マクロファージなど、自然免疫担当細胞の免疫応答を解析する。さらに、胎生期に重要な働きをしていると考えられるLaminin Binding Proteinが、その糖タンパク質糖鎖上にStage-Specific Embryonic Antigen-4 (SSEA-4)エпитープを担っているという知見が得られたので、マウス初期発生におけるSSEA-4及びSSEA-4の局在する膜マイクロドメインの機能解明を行う。

§3 研究実施体制

(○：研究代表者または主たる共同研究者)

(1)「糖鎖機能解析研究」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	本家 孝一	高知大学教育研究部 医療学系生化学講座	教授	H16.10～
	宮原 馨	高知大学教育研究部 医療学系生化学講座	助教	H16.10～
	久下 英明	高知大学教育研究部 医療学系生化学講座	助教	H16.10～
	小谷 典弘	高知大学医学部 システム糖鎖生物学教育 研究センター	特任准教授	H17.10～
	山下 竜幸	高知大学教育研究部 医療学系生化学講座 高知大学医学部 システム糖鎖生物学教育 研究センター	CREST 研究員 特任助教	H17.4～
	赤堀 佳奈	高知大学教育研究部 医療学系生化学講座	CREST 技術員	H17.4～H21.3
	和田(旧姓 石原) 由香里	高知大学教育研究部 医療学系生化学講座	チーム事務員	H16.10～
	仁尾 景子	高知大学教育研究部 医療学系生化学講座	研究補助員	H19.4～H21.3
	山下 竜右	高知大学大学院	大学院生 JST-RA	H18.12～
	矢野 小代里	高知大学大学院	大学院生	H18.4～H20.3
	長友 大樹	高知大学大学院	大学院生	H18.4～H20.3
	石浦 嘉人	高知大学大学院	大学院生	H20.4～
	姜 松林	高知大学大学院	大学院生	H18.9～

② 研究項目：

- 1) 膜マイクロドメイン抗体の作製とエピトープの決定
- 2) 膜マイクロドメイン指向性プローブの開発と応用
- 3) 糖鎖機能阻害にもとづく膜マイクロドメインの機能制御

(2)「免疫制御研究」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	宇高 恵子	高知大学教育研究部 医療学系免疫学講座	教授	H16.10～
	駒庭 学志	高知大学教育研究部 医療学系免疫学講座	助教	H16.10～H21.3
	平地 泰子	高知大学医学部	研究補助員	H16.10～H19.3
	片岡 佐誉	高知大学総合研究センター	技術専門職員	H16.10～
	矢野 有紗	高知大学大学院	大学院生	H17.4～H20.3
	小松 利広	高知大学医学部	研究補助員	H18.4～
	田村 昌子	高知大学医学部	研究補助員	H18.4～
	福田 絵美	高知大学教育研究部 医療学系免疫学講座	助教	H20.7～H21.12

② 研究項目:

- 1) 胸腺細胞分化決定における糖脂質マイクロドメインの役割
- 2) ラフト指向性の Th1 誘導型ペプチド免疫療法の開発
- 3) 成熟 T 細胞の抗原認識におけるラフトの役割
- 4) 糖脂質マイクロドメインを反応場とした、NK 細胞による子宮内膜のホメオスタシス

(3)「抗体産生研究」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	藤本 純一郎	国立成育医療センター研究所	副所長	H16.10～
	清河 信敬	国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部	部長	H16.10～
	片桐 洋子	国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 形態発生研究室	室長	H16.10～
	大喜多 肇	国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 機能分化研究室	室長	H16.10～
	竹内 寿美	国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部	CREST 技術 員	H17.11～H18.3
	中里 恵子	国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 機能分化研究室	研究補助員	H19.1～
	佐藤 伴	国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部 千葉大学大学院	流動研究員 大学院生 JST-RA	H19.4～

② 研究項目:

- 1) 膜マイクロドメインに対する単クローン抗体の作製と応用
- 2) 膜マイクロドメインに対する免疫応答の解析と応用

3) 着床前胚におけるSSEA-4の動態解析

(4)「ウイルス感染制御研究」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	今井 章介	高知大学医学部 微生物学講座	教授	H16.10～H19.3
	黒田 正幸	高知大学医学部 微生物学講座	助教	H16.10～H18.12
	堂野 純孝	高知大学大学院	大学院生	H16.10～H17.3
	Nasimuzzaman Md	高知大学大学院	大学院生	H16.10～H17.3
	石浦 嘉人	高知大学大学院	大学院生	H17.10～H19.3 H20.4～ 本家Gに参加

② 研究項目:

EBウイルス関連腫瘍における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明

§ 4 研究実施内容及び成果

3.1 糖鎖機能解析研究（高知大学 本家グループ）

研究項目1)膜マイクロドメイン抗体の作製とエピトープの決定

(1)研究実施内容及び成果

①マウス精子形成細胞膜マイクロドメインに対する単クローン抗体の作製

膜マイクロドメイン(脂質ラフト)を生化学的に扱う方法として、低温下で、Triton X-100 等の中性界面活性剤を用いて細胞膜をホモジェナイズした後、ショ糖密度勾配超遠心にかけて浮遊してくる界面活性剤不溶画分(detergent resistant membrane: DRM)を分画する方法がある。このDRMには、スフィンゴ(糖)脂質、コレステロール、GPIアンカーやアシル化修飾を受けたタンパク質(srcファミリーキナーゼやGタンパク質)などが分画され、膜脂質の物性や生物機能を考えると、膜マイクロドメインが単離されているかのように見える。しかし、DRMは界面活性剤によるアーティファクトだという指摘がある。仮にそうではないとしても、膜マイクロドメインは不均一で多様であるから、異なる全ての膜マイクロドメインを十把一絡げに集めることになるので、観察される分子が同一のクラスターの中にある保証はない。また、形態学的に観察される膜マイクロドメインと生化学的に解析されるDRMは直接リンクしておらず、膜マイクロドメインの実態が十分に捉えられているとはいえない。

膜マイクロドメインで営まれる分子メカニズムを解明するために、まず、膜マイクロドメインを構成する分子を調べる必要がある。膜マイクロドメイン構成分子を明らかにするアプローチとして、DRMに回収されるタンパク質をプロテオミクスの技術で網羅的に解析する方法が行われているが、種類と量は判明するものの機能解析には至っていない。我々は、別のアプローチの“ラフト免疫法”を採用した。これは、DRMを丸ごとマウスに免疫して、膜マイクロドメイン構成分子に対する単クローン抗体を産生するアプローチである。本法は、国立生育医療センター研究所の片桐と藤本らが開発した方法で、膜マイクロドメインの細胞外側のみならず細胞内側の分子に対する抗体も得られ、膜

脂質と膜タンパク質に対する抗体が得られる特徴がある(藤本グループの項を参照)。

我々は硫酸化糖脂質を生合成する糖脂質硫酸転移酵素 CST のノックアウトマウスを作出して、CST が脳におけるサルファタイドの生合成にも精巣におけるセミリピドの生合成にも働き、サルファタイドが脳のミエリン膜と軸索膜の接合に、セミリピドが精子形成に必須であることがわかったが、これら硫酸化糖脂質がどのような分子メカニズムで生物機能を発揮するかは依然不明である。局所で、硫酸化糖脂質が何らかのタンパク質分子と会合してつくる超分子アッセムブリーが、ミエリン膜-軸索膜相互作用や精母細胞-セルトリ細胞相互作用に働いていると想像される。

そこで、CST ノックアウトマウスで異常のみられたマウス精巣におけるセミリピドの分子メカニズム解明の第一歩として、ラフト免疫法を用いて硫酸化糖脂質を含む膜マイクロドメインの構造を調べることにした。まず、精巣特異的な硫酸化糖脂質のセミリピドが DRM に分画されることを確認した。そこで、マウス精巣から分画した DRM を、マウスに2回免疫して、ドットプロットで免疫源の DRM と反応する 192 クローンのハイブリドーマを得た(1次スクリーニング)。

ドットプロットで陽性であった抗体クローンは、2次スクリーニングとして、DRM 脂質に対する反応性と DRM タンパク質に対する反応性を調べた。DRM タンパク質に対する反応性はウエスタンブロットティングで調べた。さらに、免疫組織化学で精細管に対する染色性を調べた。1次スクリーニングで陽性であったクローンのうち、25-30%が硫酸化糖脂質に反応した。ウエスタンブロットティングでタンパク質のバンドを明確に呈するものは数%にとどまった。これらスクリーニングでの陽性クローンについて、抗原エピトープの決定を試みたが、これらの抗体を固相化したイムノアフィニティークロマトは無効なことが多かった。得られた抗体は全て IgM であった。精製できたものは、電気泳動にかけて銀染色したバンドを切り出し、ゲル内消化の後、マススペクトルメトリーを用いて PMF 法あるいは MS/MS 法で解析した。

これまで分子が特定できたものは、膜マイクロドメインを裏打ちする細胞骨格タンパク質の myosin-11、ミトコンドリア酵素の dihydrolipoamide S-acetyltransferase、精巣特異的なシャペロンのカルメジン、転写因子の transforming acidic coiled-coil containing protein 3(TACC3)、250kDa より大きい新規タンパク質の5種で、いずれも細胞膜の膜マイクロドメインに含まれているとは思われないものであった。最後の TACC3 と未知タンパク質は、同一クローン 5E10 のエピトープであったが、110kDa の TACC3 は、子マウスの精巣と CST-KO 成獣マウス精巣でのみ観察され、成獣マウスの精巣では見られず、一方、250kDa より大きい新規タンパク質は成獣マウスの精巣でのみ観察された。TACC3 と未知タンパク質のアミノ酸配列は異なり、何故同一クローン抗体とクロスするのは不明である。

②神経細胞突起先端膜マイクロドメイン脂質に対する単クローン抗体の作製

当グループの久下らは、ラット脳の性分化に関わる分子を追及する目的で、テストステロンを投与した新生児雌ラットの視床下部前思索野領域で発現する分子を、mRNA のサブトラクション法を用いてマスキュリンを発見した。このマスキュリン遺伝子を PC12 細胞に強制発現させると、神経様突起が伸長し、マスキュリンは突起先端の膜マイクロドメインに集積することを見出した。マスキュリンには5箇所の N-グリコシル化ポテンシャルサイトが存在したが、実際には、215 番目、282 番目、300 番目の3箇所のアスパラギンに N 型糖鎖が結合していることがわかった。このうち、少なくとも1本は複合型糖鎖が付いていることがわかった。これらのアスパラギンに変異導入して糖鎖が付かないようにすると、突起先端に運ばれず細胞内の小胞体に留まることを見出した。

マスキュリンを強制発現させた PC12 細胞から DRM を単離して、マウスに免疫し、免疫源の DRM と反応するクローンを得た(1次スクリーニング)。1次スクリーニング陽性クローンで免疫組織染色を行い、突起先端と反応する抗体#15を得た。#15が認識する抗原 Ag15 は DRM 画分に回収された。さらに、Ag15 の発現は、PC12 細胞を神経成長因子 NGF で刺激すると誘導されることを見出した。免疫組織染色により、Ag15 はラット脳組織の神経細胞に存在し、マウス脳海馬の初代培養神経細胞にも存在していることが観察された。免疫組織化学において、Ag15 はメタノール処理で消失することから脂質様物質と推定された。パラフォルムアルデヒド固定後メタノール処理すると、細胞体内

部の Ag15 は消失したが、突起先端に局在する Ag15 は残存することから、突起先端の Ag15 はアミノ基を有している可能性が想定された。

生化学的解析では、NGF で刺激した PC12 細胞由来の Ag15 は、クロロホルム/メタノールで抽出され、Folch 分配上層に分画された。一方、脳組織由来の #15 反応物質は調べたラット、マウス、ウシ、ブタの全てに存在しており、Folch 分配上層と下層の二つの画分に分離された。#15 反応性は、Folch 分配下層のほうが Folch 分配上層よりも圧倒的に高かった。

ブタ脳の Folch 分配下層の #15 反応物質は、DEAE-Sephadex A25 カラムクロマトで酸性画分に分離され、proteinase K 耐性、アルカリ処理耐性であった。TLC ではサルファタイドとほぼ同じ移動度を示したが、移動度の近いサルファタイド、GD3 lactone、PC、PI、lysoPE のいずれでもなかった。CST-KO マウス脳の粗抽出脂質は #15 反応性が非常に低下していたことから、#15 がサルファタイドとクロスするか、何らかの物質がサルファタイドと結合して #15 反応性を獲得するようになる可能性が考えられた。

NGF で刺激した PC12 細胞由来の Ag15 とブタ脳 Folch 分配下層の #15 反応物質は、DEAE-Sephadex A25 カラムクロマトを素通りしたが、アミノ基修飾蛍光試薬の 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD) を反応させた後は、酸性画分にシフトした。この結果と上述した免疫組織化学の結果から、PC12 細胞由来 Ag15 とブタ脳 Folch 分配下層 #15 反応物質は、アミノ基をもつことが示唆された。2回の DEAE-Sephadex A25 カラムクロマトの後、シリカゲルクロマトと逆相クロマトを用いて精製を行い、物質の同定を試みている。

(2)研究成果の今後期待される効果

得られた抗体は、精子形成と神経機能を調べるための有用なツールとなる。マスキュリン KO マウスは、マスキュリンの生理機能を解明するための重要なリソースを提供する。

研究項目2) 膜マイクロドメイン指向性プローブの開発と応用

(1)研究実施内容及び成果

膜マイクロドメインへのアプローチとして、生きている細胞の膜マイクロドメインにおいて、実際のどの分子とどの分子が会合しているかを明らかにできないかと考えた。これまで細胞膜マイクロドメインに局在する分子の分布と動態は、電子顕微鏡、一分子追跡法、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)、原子間力顕微鏡などによって調べられているが、これらの手法は予め対象とする分子を知っていなければならない。化学架橋剤を用いると、任意の分子と相互作用する未知分子の同定が可能であるが、架橋剤のサイズや形状がボトルネックとなり有効例が少ない。我々は、これらの欠点を解消する、生きている細胞の細胞膜上で任意の分子と近接する分子を同定する新規の方法を開発した。

アリールアジド基は、紫外線照射によって活性化されるので、通常、光アフィニティーラベリングに用いられるが、著者らは、アリールアジド基が西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の作用でラジカルを生じることを見つけ、Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応と命名した。

EMARS 反応による生細胞の細胞膜上任意分子と近接する分子を同定する方法の原理を図 1 に示す。生きている細胞に、細胞表面に存在する任意の分子 (標的分子) に対する HRP 標識抗体を添加し、HRP を固定する。そこへ、ビオチンタグを付けたアリールアジドを添加すると、細胞表面に固定化された HRP によってアリールアジド基が活性化され、ラジカルを生じる。ラジカルは、水など周囲の分子と反応してすぐに消滅するので、HRP と近接した分子とだけ反応してビオチン化する。ここまでの反応を細胞が生きている状態で行う。この後、細胞膜を可溶化して、ビオチン化した分子をストレプトアビジンで検出すると、標的分子と近接する分子を同定することができる。図は、抗

体アレイを用いて標識分子を特定する方法を示している。

標的分子からどれくらいの距離の分子がビオチン化されるかを免疫電子顕微鏡で調べると、およそ 200 nm 以内の分子がビオチン化されることがわかった。この距離は、ちょうど刺激を受けて寄り集まった膜マイクロドメインの大きさに相当することから、著者らは、膜マイクロドメインが活性化されたときにリクルートされる分子を同定するのに非常に有用な方法であると考えている。

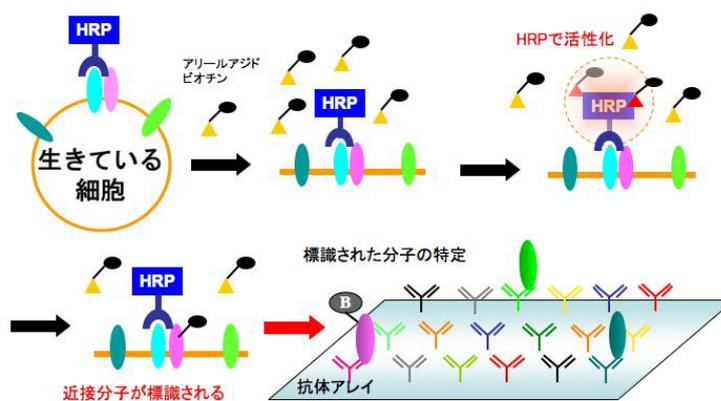


図1 EMARS法の原理

EMARS 法の応用例として、実際の医療現場で治療ターゲットとなっているB細胞リンパ腫細胞上の CD20 分子に、異なる抗 CD20 単クローン抗体を結合させると、CD20 の近傍に会合する分子群が異なることを見出した。このため、抗体間の作用の違いが生じるのではないかと推測している。

また、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンと異なる細胞外マトリクスをコーティングしたディッシュの上で HeLa 細胞を培養すると、インテグリンの近傍に会合する分子が異なることを見出した。これらの実験結果は、同一の膜タンパク質が、外的刺激の変化に応じて、多様な機能を発揮できることを示唆している。

第一世代 EMARS 標識試薬のアリアルアジド-ビオチンは、市販品の 1-[4-Azidosalicylamido]-6-[biotinamido]-hexan (Pierce 社) を使用した。この化合物のビオチン部分を fluorescein に置き換えたアリアルアジド-フルオレセインを、第二世代 EMARS 標識試薬として合成した。アリアルアジド-フルオレセインを使用すると、アリアルアジド-ビオチン使用時にみられた内在性酵素による非特異的標識の問題が解消し、網羅的分析が可能となった。さらに、アリアルアジド-フルオレセインで標識すると、標識タンパク質を蛍光イメージアナライザーで直接検出することが可能になった。また、フルオレセイン標識タンパク質は抗フルオレセイン抗体ビーズを用いて精製濃縮できることを確かめた。

網羅的分析のスキームとして以下を想定している。アリアルアジド-フルオレセインを用いて EMARS 法で近接分子を標識した後、界面活性剤で細胞膜を可溶化して、標識タンパク質を、抗フルオレセイン抗体ビーズを用いて精製濃縮する。精製したフルオレセイン標識タンパク質を電気泳動にかけ、ゲルピッカーで蛍光スポットを検出して切り出す。こうして切り出したゲルをトリプシンで消化して、溶出してくるペプチド断片を MS/MS 質量分析で解析して標識タンパク質を同定する。あるいは、精製したフルオレセイン標識タンパク質をリジルエンドペプチダーゼ等で大きく断片化して、HPLC で蛍光標識ペプチドを分離した後、トリプシンで消化して MS/MS 分析で標識タンパク質を同定する。

(2)研究成果の今後期待される効果

EMARS 法を利用すると、外的刺激や膜環境の変化に応じて細胞表面に局在する特定分子と相互作用する分子群がどのように変化するかがわかり、その変化に起因してどのようなシグナルが発信されるかを調べると、これまでの研究手法では得られない革新的な情報が得られる可能性がある。つまり、同一の膜タンパク質が、外的刺激の変化に応じて、多様な生物機能を発揮できることを示すことができる。EMARS 法は簡便な方法なので、幅広い医療や細胞生物学への応用が見込める。

研究項目3)糖鎖機能阻害にもとづく膜マイクロドメインの機能制御

(1)研究実施内容及び成果

ヒトの腎癌細胞で CST 遺伝子の発現が非常に亢進しており、このため CST 活性が高く硫酸化糖脂質が蓄積している。硫酸化糖脂質は、腎癌細胞表面のみならず細胞内にも発現していることがわかり、細胞内のタンパク質輸送や膜輸送に働いている可能性が示唆された。抗硫酸化糖脂質単鎖抗体を細胞内で発現させることにより、あるいは siRNA で CST 遺伝子の発現を抑えることにより硫酸化糖脂質の発現を阻害して、腎癌細胞への影響を調べることを目指した。

硫酸化糖脂質に対する単鎖抗体 scFv を以下のように作製した。精製したサルファタイドを硫酸化糖脂質欠損マウスに免疫し、単クローン抗体 DI8 (IgG3) を得た。DI8 抗体は、脂質部分の違いを認識せずサルファタイドとセミノリピドともに同程度に反応したが、中性糖脂質やガングリオシドや他の硫酸化糖鎖とは結合しなかった。硫酸化糖脂質の SM2 とは結合しなかったため、DI8 抗体は非還元末端ガラクトース 3-硫酸構造を認識すると思われた。DI8 の H 鎖と L 鎖の可変部をコードする遺伝子を得、単鎖抗体 scFv をファージディスプレイシステムで発現させ、最終的に、可溶性 scFv 抗体が元の DI8 抗体の特異性を保持することを示した。

得られた抗硫酸化糖脂質単鎖抗体の遺伝子をヒト腎癌細胞内で発現させたが、腎癌細胞表面における硫酸化糖脂質の発現を抑制することができなかった。このため、研究を siRNA による CST 遺伝子の発現抑制にシフトさせた。

共同研究者の静岡県立大学の鈴木隆教授らが、siRNA で MDCK 細胞 (イヌ腎臓遠位尿細管由来) の CST 遺伝子の発現を抑えることにより、サルファタイドの発現を阻害すると、インフルエンザ A ウイルスの増殖が抑制されることを示した。ウイルス遺伝子 (RNA) の複製からパッケージングにかけての異常が示されているが、サルファタイドがどの過程に寄与しているかは不明である。

(2)研究成果の今後期待される効果

siRNA 技術と EMARS 法を組み合わせることにより、ヒト腎癌細胞における硫酸化糖脂質の病理機能を解明できるかもしれない。言い換えると、内在性膜環境を変化させることで (硫酸化糖脂質があるときとないときで)、膜タンパク質の会合状態が変化し、それに起因して発信シグナルが変容することを示すことができるかもしれない (図 2)。

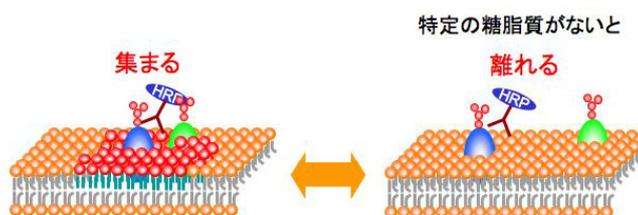


図2 膜環境の変化に伴う膜タンパク質会合の変化

3.2 免疫制御研究 (高知大学 宇高グループ)

研究項目1) 胸腺細胞分化決定における糖脂質マイクロドメインの役割

(1)研究実施内容及び成果

未熟胸腺細胞は、胸腺上皮細胞が発現する MHC 分子に対する反応性に応じて、それぞれが持つ T 細胞レセプター (TCR) が class I 分子に反応するものであれば、CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に、class II 分子に反応するものであれば、CD4 陽性のヘルパー T 細胞 (Th) に分化する。この分化決定の際に、TCR が MHC class の違いをいかに認識しているか、は明らかになっていなかった。

我々は、認識する TCR 側ではなく、リガンド側の MHC 分子の提示のされ方に class の違いがある可能性を考え、分子の構造を調べたところ、class II 分子の膜貫通部に、Cys が種を超えて強く保

存されていることに気がついた。この Cys は、palmitoyl 化され、その結果、ラフトに会合性になることがわかった。さらに、この Cys を置換すると、MHC class II 分子のラフト会合性が失われることがわかった。

次に、in vitro の胸腺分化実験を行い、MHC class II 分子を認識して本来、CD4 陽性の Th へ分化するはずの TCR を持つ胸腺細胞が、ラフト会合性を失った Cys → Ser 置換 MHC class II 分子を認識した場合には、誤って CTL に分化してしまうことがわかった。物理的、代謝的にラフトの形成を抑制した場合にも同様に、polyclonal な、Th から CTL へ分化の転換が起こる傾向があることがわかった。したがって、同じ TCR を使いながら、胸腺上皮細胞に提示される MHC 分子が、ラフトを反応場とした場合と、そうでない場合では、異なる分化決定のシグナルが送られることが示唆された。

(2)研究成果の今後期待される効果

未熟胸腺細胞の認識に、MHC class II 分子によるラフト会合性の抗原提示が、このように重大な影響を持つものであれば、末梢の成熟 Th 細胞の抗原認識においても、重要な意味をもつ可能性がある。今後、末梢の成熟 T 細胞を解析して、同様に MHC class II 分子のラフト会合性が重要であることが明らかになれば、ラフトの物性を変えたり減少させたりする操作により、アレルギーや自己免疫疾患の軽減の工夫ができるかもしれない。

研究項目2) ラフト指向性の Th1 誘導型ペプチド免疫療法の開発

(1)研究実施内容及び成果

悪性腫瘍や難治性ウイルス感染症に対して、細胞傷害性 T 細胞(CTL)を誘導する、MHC class I 分子結合性ペプチドを用いた免疫療法の臨床研究が世界で広がっている。しかし、CTL の数は増えても、細胞傷害活性に乏しいなど、十分な効果が得られるまでには至っていない。我々は、Ganglioside GD1a に結合する百日咳菌のラフト指向性と、LPS 等による抗原提示細胞を賦活する活性、および、Th 細胞を誘導する異物蛋白質を併せ持つ百日咳全菌体ワクチンを、免疫賦活剤として添加することにより、所属リンパ節に、Th1 誘導型の免疫応答の場を作ることにより、CTL の誘導活性を高める工夫を試みた。動物実験により、in vivo の固形腫瘍の拒絶においても、従来のペプチド単独投与に比べ、有意な腫瘍拒絶反応がみられた(Yano et al. 2007)。

これを受けて、固形悪性腫瘍(WT1 ペプチドを使用)および、慢性 C 型肝炎(HCV ペプチドを使用)に対するペプチド免疫療法の臨床初期第 I/II 相試験を開始した。これまでに集計の終わった31例の固形悪性腫瘍患者について、重篤な有害事象は観察されず、安全に投与できる見通しが立った。治療効果の評価としては、治療後3ヶ月後の RECIST 判定で、少なくとも6回投与した31例中10例(31%)で、SD (stable disease)と判定され、以前に行ったペプチド単独投与では、19例中4例(21%)であったことと比較して、ある程度の治療効果が期待できる可能性が示唆された。HCV ペプチドの臨床研究は、愛媛大との共同研究により行っている。

(2)研究成果の今後期待される効果

① 悪性固形腫瘍および、C 型肝炎ウイルスに対する免疫療法の臨床研究

上記、臨床初期第 I/II 相試験の結果を受けて、悪性腫瘍に対する免疫療法については、疾患別に治療効果を調べることに重きを置いた、臨床第 I/II 相試験を開始した。HCV ペプチドについては、上記の前試験の結果を受けて、臨床効果を見やすくするため、標準治療である PEG-IFN α とリバビリンの併用療法に、ペプチド免疫療法を重ねて併用する治療法について、2009年10月から、新規臨床研究を開始した。これらの臨床研究の結果次第では、新規ペプチド免疫療法の実用化が期待できる。

② 新規免疫賦活剤の開発

百日咳全菌体ワクチンを免疫賦活剤として加えるペプチド免疫療法では、第3者抗原を加えることで、ペプチド特異的 CTL の誘導をはかったものであるが、この方法では、悪性固形腫瘍やウイルス感染症に対する免疫応答の一部の反応を増強するに過ぎない。

今後に向けて現在、抗原特異的ヘルパーT 細胞の誘導もはかる、新規免疫賦活剤の開発をはかっている。第1段階のワクチンとしては、百日咳菌に抗原遺伝子を組み込んだリコンビナントの作製を進めている。

3.3 抗体産生研究（国立成育医療センター研究所 藤本グループ）

研究項目 ラフト免疫法の特性解析とその応用

(1) 研究実施内容及び成果

①膜マイクロドメインを免疫原とすると monospecific な糖鎖に対する抗体が産生され、糖脂質に対する単クローン抗体作製には有利な免疫反応と考えられる。ラフト免疫法に応用可能な膜マイクロドメインの選択や、抗体出現のカイネティックスなど、ラフト免疫法の基礎的な特性解析を行った。

ヒト腎癌由来細胞株 ACHN、サル腎臓由来細胞株 Vero、ヒト PreB 細胞株 NALM6 及び NALM16、ヒト T 白血病細胞株 Jurkat 及び Molt4、ヒト異形大細胞株 Karpas299、マウスリンパ腫 EL4 及び RL-2、マウス骨髄腫 P3U1、マウス黒色腫 B16 から 1% Triton に不溶性の低密度膜画分として膜マイクロドメインを調製した。その PBS 懸濁液を、Balb/c マウスに1週間の間隔をおいて 1～5 回皮下注入し、尾静脈または眼窩より採血して得た血清をフローサイトメトリー、TLC 免疫染色、Dot-blot 免疫染色により解析した。ACHN、Vero 細胞のラフト免疫では sialylGb5Cer のみを、EL4 細胞のラフト免疫では GD2 のみを認識する抗血清がえられた。NALM6 や Karpas299 細胞のラフト免疫でも、単一のシアル酸含有糖脂質に対する抗血清が得られたが、糖脂質の同定までにはいたらなかった。11種の細胞のうち5種の細胞で単一の糖脂質に反応する抗体が産生されることを確認した。C57BL/6 マウスでも同様の結果が得られ、ラフト免疫の monoglycolipid-specific な抗体産生誘導は、宿主マウスの系統を問わないようである。

抗体出現のカイネティックスを解析したところ、免疫2回目で IgM 抗体が出現し、3回目で最高値を示し、4回目以降は減少した。一方、IgG 抗体は2回目から徐々に増加して行った。IgM から IgG へのクラススイッチが起きていることが確認され、典型的な T-B 共役型の抗体産生反応であると考えられる。同系抗原である EL4 の膜マイクロドメインを免疫された C57BL/6 マウスの血清中に抗 DNA 抗体の上昇はみられず、その他自己免疫疾患様の症状もみられなかったため、monospecific な抗糖鎖抗体の産生は自己免疫疾患ではないことが示唆された。

②ACHNラフト免疫で得られた単クローン抗体 Raft.2 両抗体を利用して、SSEA-4 エピトープのタンパク分子上での発現を解析した。

Raft.2 の認識抗原である sialylGb5Cer は、SSEA-4 のエピトープを担っている。マウス及びヒト EC 細胞の F9 と NCR-G3 に発現する SSEA-4 を、Raft.2 を用いて TLC 免疫染色、フローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡観察、Western 解析をした。マウス EC 細胞は未分化状態にあり、SSEA-4⁺・SSEA-4⁻といわれている。現に TLC 免疫染色では sialylGb5Cer は確認されず、Raft.2 の反応する糖脂質も認められなかった。ところが、Western 解析で分子量 40k 近辺のバンドに反応し、シアル酸を除くと反応しなくなった。2次元 Western 解析で SSEA-4⁺と考えられた分子は MALDI-TOF/MS 解析により、Laminin Binding Protein (LBP) と同定された。シアリダーゼ処理した LBP には、Raft.2 は結合せず、F9 細胞を ¹⁴C-ガラクトース存在下で培養すると、LBP は ¹⁴C-ガラクトース標識された。これらの結果は、マウス F9 の LBP が SSEA-4 エピトープを発現していることを支

持するものである。laminin は初期発生の過程において重要な細胞外マトリックスである。胚体における laminin 受容体の候補の一つと考えられる LBP が SSEA-4 修飾を受けているという今回の知見は初期発生における SSEA-4 の機能を考える上で大変興味深い。

③同系腫瘍細胞から調製した膜マイクロドメインのラフト免疫で、腫瘍細胞に対する液性免疫及び細胞性免疫応答が誘導されるかどうか検証し、抗腫瘍免疫療法への応用のための基礎実験を行った。

C57BL/6 マウス由来細胞株 EL4、B16、Balb/c マウス由来細胞株 P3U1、RL-2 から調製した膜マイクロドメインを同系マウスに免疫し、尾静脈より採取した血清をフローサイトメトリー解析した。いずれの血清中にも、膜マイクロドメインを調製した細胞に対する抗体価の上昇が観察された。

次に、同系腫瘍細胞のラフト免疫を施したマウスに腫瘍細胞を移入し、マウスの生存率を測定した。Balb/c 由来マウス骨髄腫 P3U1 の膜マイクロドメインで免疫された Balb/c マウスは、P3U1 の移入7週後の担癌率が0/3であるのに対し、PBS を皮下注射されただけのコントロールマウスは2/3であった。C57BL/6 由来 B16 黒色腫の脂質ラフトで免疫された C57BL/6 マウスは B16 移入後 33.3%が寛解し、死亡マウスの平均生存日数は 44±11.7 日であったのに対し、コントロールマウスでは、全マウスが死亡し、平均生存日数は 23.5±2.9 日であった。同じく C57BL/6 由来 EL4リンパ腫の脂質ラフトで免疫された C57BL/6 マウスは、EL4 移入後 66.7%が寛解し、死亡マウスの平均生存日数は 27±6 日であったのに対し、コントロールマウスでは、全マウスが死亡し、平均生存日数は 21.3±1.6 日であった。一方、B16 黒色腫の膜マイクロドメインで免疫しておいたマウスには EL4 の腫瘍移入に対して全く抵抗性を示さなかった。ラフト免疫には抗腫瘍効果があり、抗原特異性もあることが示唆された。

④抗原非特異的抗腫瘍効果のある ACHN ラフト免疫で誘導される免疫応答を、自然免疫担当細胞の活性化状態や、腫瘍細胞傷害活性を中心に解析した。

抗腫瘍効果がみとめられない異種異系ラフト免疫のコントロールとして、ACHN 細胞の膜マイクロドメインを免疫し、EL4 や B16 移入したところ、予期せぬことが観察された。ACHN 細胞ラフト免疫された C57BL/6 マウスは、同系腫瘍細胞 EL4 や B16 の増殖に抵抗性を示したのである。ACHN 細胞の膜マイクロドメインで C57BL/6 マウスを免疫すると、sialylGb5Cer を認識抗原とする monoglycolipid-specific な抗糖脂質抗体産生が誘導されるが、腫瘍拒絶実験に用いた同系胸腺腫 EL4 にも黒色腫 B16 にも sialylGb5Cer は発現していない。ラフト免疫マウスに EL4 細胞 2×10^3 個を移入し、生存率を非免疫マウスと比較した。非免疫マウスは6匹中4匹が33.5日(±5.9日)で死亡したが、免疫マウスでは6匹すべてが寛解した。同様に、B16 細胞 1×10^4 個を移入したところ、全非免疫マウスが平均29日(±4.2日)で死亡したが、免疫マウス6匹中2匹が33.5日(±1.4日)で死亡したのみで、他4匹は寛解した。ACHN 細胞のラフト免疫は非特異的抗腫瘍能を誘導し、特殊な免疫原性を有していると推測された。

カビ由来抗生物質 filipin は、コレステロールに結合して膜マイクロドメインの機能的構造を阻害し、Src 型キナーゼ Yes などの膜アンカリング分子の脂質ラフトへの局在を抑制する。Filipin 処理 ACHN 細胞から調製したラフト免疫では、上記のような抗腫瘍効果はみられなかった。ACHN 膜マイクロドメインの特殊な免疫原性の維持には、膜マイクロドメインの機能的構造が必須であると考えられる。

ヒト ACHN 細胞のラフトを免疫されたマウスは、自然免疫が賦活化されていると考えられ、自然免疫担当細胞の免疫応答をフローサイトメトリーで解析した。免疫マウスの脾臓樹状細胞は PMA/ionomycin 刺激で CD40 の発現が上昇し、 $\gamma \delta$ -T 細胞では IL-4 産生が亢進していた。

腹腔内細胞の活性化を検討した。C57BL/6 マウス(n=3)に、ACHN 膜マイクロドメインの PBS 懸濁液を腹腔内投与し、24時間後、48時間後の腹腔内細胞を FITC 標識抗-B220、APC 標識抗-CD11b、PE 標識抗-CD11c または PE 標識抗-F4/80 で三重染色し、マクロファージ、B1 細胞、

CD11b⁺/Gr-1⁺細胞集団の CD40、CD86 の発現の変化をフローサイトメトリーで解析した。また、 γ δ -T 細胞の細胞質内 IFN- γ 及び IL-17 の発現の変化をフローサイトメトリーで解析した。B220⁻/CD11b⁺/F4/80⁺マクロファージ上には24時間後には CD40 が発現し、48時間後も発現は持続していた。CD86 は24時間後に一過性に発現が増強した。腹腔内マクロファージは ACHN 膜マイクロドメイン投与により活性化することが示された。B220⁺/CD11b⁺B1 細胞や B220⁻/CD11b⁺/Gr-1⁺細胞は24時間後に一過性の CD86 の発現亢進がみられた。B220⁻/CD11c⁺ 樹状細胞、 γ δ -T 細胞の活性化は確認されなかった。膜マイクロドメイン投与24時間後で倍増する B220⁻/CD11b⁺/Gr-1⁺細胞集団は未同定であるが、好中球、単球、未熟ミエロイド細胞のいずれかと考えられる。膜マイクロドメイン投与24時間後、48時間後のマウス血清内の IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α を ELISA 法により測定したところ、IL-6 及び IL-17 の産生が一過性に亢進していた。ACHN 膜マイクロドメイン腹腔内投与で腹腔内マクロファージは活性化することが示され、抗原非特異的抗腫瘍効果への関与が示唆された。

膜マイクロドメイン投与マウスの腹腔細胞の EL4 に対する傷害活性を、死細胞の放出する LDH で測定した。抗腫瘍効果のない NALM6 膜マイクロドメイン投与マウスの腹腔細胞には EL4 に対する細胞傷害活性はなかったが、ACHN 膜マイクロドメイン投与マウスの腹腔細胞には明らかに細胞傷害活性がみられた。

⑤ヒト EC 細胞 NCR-G2 を免疫原として得られた単クローン抗体 6E2 (マウス IgG3 κ 型) は、sialylGb5Cer を認識する新規抗 SSEA-4 抗体であることを証明し、6E2 を使ってマウス着床前胚における膜マイクロドメインの動態解析を行った。

6E2 は、NCR-G2 以外にも ACHN、Vero などの腎臓由来の細胞やヒト赤血球から調製したスフィンゴ糖脂質の sialylGb5Cer と同じ移動度を示すバンドにのみ反応した。精製 sialylGb5Cer に反応し、GM1b やその他のガングリオシドには反応しなかったため、6E2 は sialylGb5Cer を認識抗原としていることが明らかになった。フローサイトメトリー、免疫組織染色にも応用可能で、反応性特異性に優れ、多方面への汎用が期待される。

マウス着床前胚を未固定のまま Alexa 標識 6E2 でパルス染色し、SSEA-4 の動態を解析した。割球全面に均一に分布していた SSEA-4 は、30分後には界面への集積が始まり、90分でほぼ完全に界面へと移行していた。さらに培養を続けると SSEA-4 は割球内部へと取り込まれて行った。SSEA-4 は活発に割球表面上を割球界面へと移動していることが示唆された。この集積は methyl- β -cyclodextrin で完全に阻害された。

さらに、6E2 共存下培養胚の発生率を測定し、6E2 による架橋の発生に与える影響を検証した。15B2 (マウス IgG3 κ コントロール抗体) や抗-E カドヘリン抗体存在下で2細胞期胚を培養しても胚は正常に発生したが、6E2 存在下では50 μ g/ml で卵割が遅延し始め、100 μ g/ml では卵割が停止し、発生は完全に阻害された。6E2 が50 μ g/ml 以上培地中に存在すると、本来細胞全体に分布しているはずの F-アクチンが割球界面に集積し、E カドヘリンの割球界面への集積が完全に阻害された。SSEA-4 の継続した強力な架橋は、着床前胚の正常な発生を阻害することが明らかになった。

Cre-loxP システムにより卵特異的に E カドヘリン遺伝子欠損した雌マウスと flox 雄マウスとの交配で得られた E カドヘリン欠損8細胞期胚では、SSEA-4 の割球界面への集積は減衰し、割球の頭頂部に多く分布していた。E カドヘリンと SSEA-4 は互いに強調して、割球界面へ集積していると考えられる。

SSEA-4 は単なる未分化表面マーカーではなく、膜マイクロドメインの構成成分として初期発生に積極的に関与する機能分子であり、E カドヘリンとともに胚発生に積極的に関与している可能性が示唆された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

膜マイクロドメインを免疫原とすると単一の糖脂質(糖鎖エピートプ)にたいする抗体だけが産生されることがある、という新たな知見は、血液型物質に対する自然抗体生成の解明のヒントになる可能性がある。また、適当な細胞を選んで膜マイクロドメインを調製すれば、糖脂質に対する単クローン抗体が容易になると期待される。

ラフト免疫はアジュヴァントとの混合なしに同系腫瘍細胞を排除する免疫応答が誘導できるので、抗腫瘍免疫療法応用への可能性があると思われる。しかしながら、腫瘍細胞移入まえに免疫しておく必要があるので、寛解後の再発抑止に有効と考えられる。また、ACHN 細胞のラフト免疫の自然免疫を賦活する効果は、ACHN 細胞の膜マイクロドメイン構造にあると考えられ、膜マイクロドメイン内の責任分子を同定することは、現在臨床応用への基礎実験が進行中の癌ペプチド免疫療法の免疫方法に大きな前進をもたらすものと期待される。

哺乳類着床前胚で、SSEA-4を含む膜マイクロドメインの発生への関与を示した例は我々の報告が初めてである。Alexa 標識の可能な 6E2 の使用で可能になった。ES 細胞、iPS 細胞、EC 細胞の未分化検定や品質管理に、細胞表面未分化抗原 SSEA-4 の発現の有無は必須である。新規抗 SSEA-4 単クローン抗体 6E2 は、TLC 免疫染色、フローサイトメリー、免疫組織染色にも応用可能で、反応性特異性に優れ、汎用が期待される。

3. 4 ウイルス感染制御研究 (高知大学 今井グループ)

研究項目 EB ウイルス関連腫瘍における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明

(1) 研究実施内容及び成果

Epstein-Barr ウイルス(EBV)は、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、NK/Tリンパ腫、上咽頭癌、胃癌など多様なヒト腫瘍疾患の発生に関与する。EBV がBリンパ球に持続感染すると、B細胞の細胞膜に EBV 遺伝子産物の latent infection membrane protein (LMP)の LMP1と LMP2A を発現するようになる。これら LMP は複数回膜を貫通する膜内在性タンパクで膜マイクロドメインに局在すると報告され、EBV 潜伏感染に好都合な環境の維持、不死化、癌形質の発現に重要な役割を果たすと考えられている。

そこで、EBV 潜伏感染膜タンパク質 LMP1 および LMP2A が、本当に宿主細胞の膜マイクロドメインに局在するかどうかを調べた。さらに、レトロウイルスベクター(SIN-RV)に組み込んで導入した LMP1、LMP2A 発現上皮細胞株を用い、膜マイクロドメインの攪乱について検討した。このため、LMP1 発現胃癌細胞株 NUGC-3 とコントロール細胞(同一ベクターでルシフェラーゼ遺伝子を導入したもの)の糖脂質組成と遺伝子発現プロファイル(DNA マイクロアレイによる)を比較検討した。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 19 件)

1. Zhang, Y., Hayashi, Y., Cheng, X., Watanabe, T., Wang, X., Taniguchi, N., **Honke, K.**: Testis-specific sulfoglycolipid, seminolipid, is essential for germ cell function in spermatogenesis. *Glycobiology* 15, 649–654 (2005)

2. Cheng, X., Zhang, Y., Kotani, N., Watanabe, T., Lee, S., Wang, X., Kawashima, I., Tai, T., Taniguchi, N., **Honke, K.**: Production of a recombinant single-chain variable-fragment (scFv) Antibody against sulfoglycolipid. *J. Biochem.* 137, 415–421 (2005)

3. Gao, C. X., Miyoshi, E., Uozumi, N., Takamiya, R., Wang, X., Noda, K., Gu, J., **Honke, K.**, Wada, Y., Taniguchi, N.: Bisecting GlcNAc mediates the binding of annexin V to Hsp47. *Glycobiology* 15,

1067–1075 (2005)

4. Eguchi, H., Ikeda, Y., Ookawara, T., Koyota, S., Fujiwara, N., **Honke, K.**, Wang, P. G., Taniguchi, N., Suzuki, K.: Modification of oligosaccharides by reactive oxygen species decreases sialyl Lewis X-mediated cell adhesion. *Glycobiology* 15, 1094–1101 (2005)

5. Tang, W-R., Shioya, N., Eguchi, T., Ebata, T., Matsui, J., Takenouchi, H., Honma, D., Yasue, H., Takagaki, Y., Enosawa, S., Itagaki, M., Taguchi, T., **Kiyokawa, N.**, Amemiya, H., **Fujimoto, J.**: Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor δ -chains. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 113-127 (2005)

6. Matsui, J., **Kiyokawa, N.**, **Takenouchi, H.**, Taguchi, T., Suzuki, K., Shiozawa, Y., Saito, M., Tang, W-R., Katagiri, Y.U., Okita, H., **Fujimoto, J.**: Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Res.* 29, 573-581 (2005)

7. **Katagiri, Y.U.**, **Kiyokawa, N.**, Nakamura, K., **Takenouchi, H.**, Taguchi, T., Okita, H., Umezawa, A., **Fujimoto, J.**: Laminin binding protein, 34/67 laminin receptor, carries stage-specific embryonic antigen-4 epitope defined by monoclonal antibody Raft.2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 1004-1011 (2005)

8. Li, W., Nakagawa, T., Koyama, N., Wang, X., Jin, J., Mizuno-Horikawa, Y., Gu, J., Miyoshi, E., Kato, I., **Honke, K.**, Taniguchi, N., Kondo, A.: Down-regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in α 1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity. *Glycobiology* 16, 1007-1019 (2006)

9. Taguchi, T., Takenouchi, H., Matsui, J., Tang, W.R., Itagaki, M., Shiozawa, Y., Suzuki, K., Sakaguchi, S., **Katagiri, Y.U.**, Takahashi, T., Okita, H., **Fujimoto, J.**, and **Kiyokawa, N.**: Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in pro-B-cell development. *Exp. Hematol.* 34, 508-518 (2006)

10. Ihara, H., Ikeda, Y., Toma, S., Wang, X., Suzuki, T., Gu, J., Miyoshi, E., Tsukihara, T., **Honke, K.**, Matsumoto, A., Nakagawa, A., Taniguchi, N.: Crystal structure of mammalian α 1,6-fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology* 17, 455-466 (2007)

11. Taguchi, T., **Takenouchi, H.**, Shiozawa, Y., Matsui, J., Kitamura, N., Miyagawa, Y., **Katagiri, Y.U.**, Takahashi, T., **Okita, H.**, **Fujimoto, J.**, **Kiyokawa, N.**: Interleukin-7 contributes to human pro-B-cell development in a mouse stromal cell-dependent culture system. *Exp Hematol.* 35, 1398-1407 (2007)

12. Suzuki, K., **Kiyokawa, N.**, Taguchi, T., **Takenouchi, H.**, Saito, M., Shimizu, T., **Okita, H.**, **Fujimoto, J.**: Characterization of monocyte-macrophage-lineage cells induced from CD34+ bone marrow cells in vitro. *Int. J. Hematol.* 85, 384-389 (2007)

13. Hashii N, Kawasaki N, Nakajima Y, Toyoda M, **Katagiri Y**, Itoh S, Harazono A, Umezawa A, Yamaguchi T. Study on the quality control of cell therapy products. Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated into human cells by nano-flow liquid chromatography/Fourier transformation ion cyclotron mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1160, 263-269 (2007)

14. **Sato B**, **Katagiri YU**, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, **Okita H**, Umezawa A, Hata J-I, **Fujimoto J**, Toshimori K, **Kiyokawa N.**: A novel monoclonal anti-SSEA-4 antibody, 6E2, preferentially stained interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 364, 838-843 (2007)

15. **Kotani N**, Gu J, Isaji T, **Udaka K**, Taniguchi N, **Honke K**.: Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(21), 7405-7409 (2008)
16. Takahashi T, Murakami K, Nagakura M, Kishita H, Watanabe S, **Honke K**, Ogura K, Tai T, Kawasaki K, Miyamoto D, Hidari KI, Guo CT, Suzuki Y, Suzuki T.: Sulfatide is required for efficient replication of influenza A virus. *J. Virol.* 82(12), 5940-5950 (2008)
17. **Katagiri YU**, Nakajima H, **Sato B**, Miyagawa Y, Horiuchi Y, **Okita H**, **Fujimoto J**, **Kiyokawa N**. The detergent-insoluble microdomains, rafts, can be used as an effective immunogen. *Glycoconj. J.* 25(6), 495-501 (2008)
18. **Komaniwa S.**, Hayashi H., Kawamoto H., Sato S.B., Ikawa T., Katsura Y. and **Udaka K**. Lipid-mediated presentation of MHC class II molecules guides thymocytes to the CD4 lineage. *Eur. J. Immunol.* 39, 1-7 (2009)
19. Shida K, Misonou Y, Korekane H, Seki Y, Noura S, Ohue M, **Honke K** and Miyamoto Y.: Unusual accumulation of sulfated glycosphingolipids in colon cancer cells. *Glycobiology* 19(9):1018-1033 (2009)
- (2)その他の著作物(総説、書籍など)(国内(和文)誌 10件、国際(欧文)誌 7件)
1. **Honke K**, Zhang, Y., Cheng, X., **Kotani N**, Taniguchi, N.: Biological roles of sulfoglycolipids and pathophysiology of their deficiency. *Glycoconj. J.* 21, 59-62 (2004)
2. **Katagiri YU**, **Sato B**, Miyado K, Akutsu H, **Okita H**, Umezawa A, **Fujimoto J**, **Kiyokawa N**. Functional significance of stage-specific embryonic antigens in the development of preimplantation embryos. *Trends Glycosci. Glycotech.* 20, 131-139 (2008)
3. **Honke K**: Sulfatide synthase. in “*Experimental Glycoscience. Glycobiology* (eds. Taniguchi N, et al.)”, pp.94-96, Springer, Tokyo, 2008
4. **Honke K**: Neuronal function of sulfatide. in “*Experimental Glycoscience. Glycobiology* (eds. Taniguchi N, et al.)”, pp.182-184, Springer, Tokyo, 2008
5. **Honke K**: Glycoconjugates in spermatogenesis. in “*Experimental Glycoscience. Glycobiology* (eds. Taniguchi N, et al.)”, pp.275-277, Springer, Tokyo, 2008
6. **Honke K**: KO mice of cerebroside sulfotransferases. in “*Experimental Glycoscience. Glycobiology* (eds. Taniguchi N, et al.)”, pp.389-390, Springer, Tokyo, 2008
7. **Honke K** and Taniguchi N: Animal models to delineate glycan functionality. In “*The Sugar Code* (ed. By Gabius H-J)”, pp.385-401, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009
8. **本家孝一**、平原幸恵、張彦龍、程新耀、谷口直之：糖脂質硫酸転移酵素ノックアウトマウスにおけるミエリン形成異常. **蛋白質・核酸・酵素** 49, 2445-2450 (2004)
9. **本家孝一**：硫酸化糖鎖の生合成と機能. **生化学** 77, 1382-1395 (2005)
10. **今井章介**, **黒田正幸**, **山下竜右**, **石浦嘉人**：Dominant-negative EBNA1によるEBウイルス腫瘍の抑制. **ウイルス** 55, 239-250 (2005)
11. **本家孝一**：硫酸化糖鎖の生物学的機能. **硫酸と工業** 59, 191-201 (2006)
12. **片桐洋子**, **大喜多 肇**, **藤本純一郎**, **清河信敬**：細胞膜マイクロドメイン(ラフト)

を免疫原とした抗体作成方法. THE LUNG 14 (2), 220-223 (2006)

13. 本家孝一: 不妊症と糖鎖異常. **実験医学** 25, 1060-1065 (2007)

14. 本家孝一、山下竜幸: 膜マイクロドメインにおける硫酸化糖脂質の機能. 蛋白質・核酸・酵素 53(12), 1542-1546, 2008

15. 本家孝一、小谷典弘、山下竜幸: 膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明をめざして. 遺伝子医学 MOOK11 臨床糖鎖バイオマーカーの開発-糖鎖機能の解明とその応用(成松 久編集) pp.81-85、メディカルドゥ、大阪, 2008

16. 小谷典弘、本家孝一: 生細胞膜上分子間相互作用の生化学的可視化技術. 細胞工学 27(11), 1168-1174, 2008

17. 小谷典弘、本家孝一: 生細胞膜上の分子間相互作用を簡便に解析する. 蛋白質・核酸・酵素 54(1), 65-71, 2009

(3)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 20 件、国際会議 11 件)

1. Honke, K. (Kochi University Medical School): Biological functions of sulfated glycolipids and pathophysiology of their deficiency. 4th International Symposium on Glycosyltransferases, Le Touquet, France, November 4-6, 2004

2. Honke, K. (Kochi University Medical School): Biological functions of sulfoglycolipids. Symposium of the Resource Center 470: Glycostructures in Biological Systems XIII, Hamburg, Germany, December 1-3, 2004

3. Honke, K. (Kochi University Medical School): Expression of Gal3ST-2 suppresses metastatic properties of human lung cancer cells. 2nd Netherlands-Japan Workshop on Recent Advances in Glycobiology, Utrecht, The Netherlands, April 17-21, 2005

4. Honke, K. (Kochi University Medical School), Zhang, Y., Taniguchi, N.: Biological functions of sulfoglycolipids revealed by gene disruption of cerebroside sulfotransferase. XVIII International Symposium on Glycoconjugates, Florence, Italy, September 4-9, 2005

5. Honke, K. (Kochi University Medical School): Biological roles of sulfoglycolipids in myelin formation and spermatogenesis. Pacificchem 2005, Hawaii, USA, December 15-20, 2005

6. Honke, K. (Kochi University Medical School): Physiological functions of sulfated glycolipids and pathophysiology of their deficiency. Minisymposium on "Chance and Necessity of Carbohydrate Recognition", 78th Annual Meeting of Japan Biochemistry Society, Kobe, Japan, October 19-22, 2005

7. Udaka, K. (Kochi University Medical School): Raft-associated presentation of MHC class II molecules guides thymocytes to the CD4 lineage. KTCC :Workshop of Kyoto T Cell Conference 2005, Kyoto, Japan, April 8-10, 2005

8. Honke, K. and Ikeda, N. (Kochi University Medical School): Control of cancer metastasis by remodeling of carbohydrate chains. 5th International Symposium on Glycosyltransferases. Tsukuba, June 25-28, 2006

9. Honke, K. (Kochi University Medical School): Control of cancer metastasis by remodeling of cell surface carbohydrate chains. NIH Workshop “Frontiers in Glycomics: Bioinformatics and Biomarkers in Disease” Bethesda, USA, September 11-13, 2006
10. Honke K, Kotani N (Kochi University Medical School), Taniguchi N: The EMARS reaction: A novel method to identify cis-interaction of cell surface molecules in living cells. 27th Sapporo Cancer Seminar, Sapporo, Japan, July 11-13, 2007
11. Honke K (Kochi University Medical School): A simple method to analyze cell surface molecular clustering in living cells. 2008 SJTU-RIKEN Workshop, Shanghai, China, Nov 7, 2008
12. 藤本純一郎 (国立成育医療センター研究所) : 小児悪性リンパ腫の病理診断 (モーニングレクチャー) . 第 20 回小児がん学会, 第 46 回日本小児血液学会, 同時期開催, 京都, 11 月 21-23 日, 2004.
13. 宇高恵子(高知大学医学部):胸腺細胞のヘルパーT細胞への分化にはMHCクラスII分子の脂質装飾が重要、第5回日本蛋白質科学会年会、福岡、6.30-7.2、2005
14. 宇高恵子(高知大学医学部) : MHC結合性ペプチド予想プログラムの開発と臨床応用、日本細菌学会中国四国支部総会、高知、10.6、2005
15. 今井章介(高知大学医学部) : EBウイルス学-解明されたことと残された課題, 第11回西日本小児がんセミナー, 大阪, 2.19, 2005
16. 今井章介(高知大学医学部) : 難治性EBウイルス関連疾患の治療-基礎から. 第46回日本臨床ウイルス学会 ワークショップ「難治性EBウイルス関連疾患の病態と治療」, 福岡, 6.4, 2005
17. 今井章介 : EBウイルスの多様性 - Latency I と II. 第12回 Japan Herpesvirus Infection Forum (JHIF) パネルディスカッション, 小樽, 8.19-20, 2005
18. 今井章介 : EBウイルス血清抗体測定に関する問題点. ウイルス検査技術連絡会 EBウイルス抗体サーベイ研修会, 東京, 9.9, 2005
19. 宇高恵子(高知大学医学部):C型肝炎に対するペプチド免疫治療の開発、第4回肝臓病研究会シンポジウム、東京、7.22, 2006
20. 宇高恵子(高知大学医学部) : MHC結合性ペプチド予想プログラムの開発と臨床応用、日本細菌学会中国四国支総会、高知、10.6、2005
21. 本家孝一(高知大学医学部) : 硫酸化糖脂質の生物機能. 第12回長崎大学バイオフィオーラム、長崎、9月8日、2006
22. 本家孝一(高知大学医学部) : 硫酸化糖脂質の生物機能. 日本薬学会 生体機能と創薬シンポジウム2006、福岡、9月8-9日、2006
23. 宇高恵子(高知大学医学部) : C型肝炎に対するペプチド免疫治療の開発. 第4回肝臓病研究会シンポジウム (特別講演)、東京、7月22日、2006
24. 今井章介(高知大学医学部) : EBウイルス関連疾患に対する新たな治療戦略、第80回日

本感染症学会総会・学術講演会 シンポジウム, 東京、4月20日、2006

25. 今井章介(高知大学医学部): EB ウイルス関連腫瘍性疾患に対する新たな治療戦略、第18回 Young Oncologist Conference (特別講演) 和歌山、6月16日、2006
26. 今井章介(高知大学医学部): EB ウイルス関連腫瘍性疾患に対する新たな治療戦略、第40回日本ウイルス学会北海道支部会夏期シンポジウム (特別講演) 北海道有珠郡大滝村 8月18日、2006
27. 本家孝一(高知大学医学部): 硫酸化糖脂質の生物機能、BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会)ワークショップ、横浜、12月11-15日、2007
28. 本家孝一(高知大学医学部): 生きている細胞の細胞表面で会合している分子を見つける. 理研ケミカルバイオロジーセミナー、和光、5月23日、2008
29. 宇高恵子(高知大学医学部): HLA クラス I 結合性ペプチドの計算予測を活用した、がんの免疫療法の開発. 日本生物物理学会第46回年会シンポジウム 福岡、12月3-5日、2008
30. 本家孝一、小谷典弘(高知大学医学部): 細胞膜上で会合する分子の解析と分子細胞生物学への応用. BMB2008(第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会)シンポジウム、神戸、12月9-11日、2008
31. 本家孝一、小谷典弘(高知大学医学部): 膜マイクロドメインにおける分子会合を解析するための生化学的アプローチ、第82回日本生化学会大会(シンポジウム)、神戸、10月21-24日、2009

② 口頭発表 (国内会議 20件、国際会議 5件)

1. Udaka, K.(Kochi University Medical School) and Tomoya Miyakawa.: β 2-microglobulin and MHC class I-peptide complex formation. 平成16年度日本学術振興会: 二国間学術交流セミナー「透析アミロイドーシス: 分子病理から治療基盤へ」ミラノ、イタリア、12.10、2004
2. Iiyama, T. and Udaka, K. (Kochi University Medical School), Takeuchi, T., Ohtsuki, Y., Nakajima, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Oji, Y., Sugiyama, H., and Shuin T.: A Phase I/II Randomized Trial of WT1-Peptide Based Immunotherapy in HLA-A*2402 Patients including Urological Cancers, SUO 6th Annual Meeting, Maryland, Dec 2-3, 2005
3. Mashiba T., Udaka K. (Kochi University Medical School), Hiasa Y., Hirachi Y., Satta Y., Osoda T., Kataoka S., Kohara M. and Onji M.: Identification of novel CTL epitopes in hepatitis C virus by a genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine. The Liver Meeting 2006 AASLD(米国肝臓学会議), Boston, 10.26-31, 2006
4. Hirahara Y, Bansal R, Ikenaka K, Wada Y, Honke K (Kochi University Medical School): Oligodendrocyte development in cerebroside sulfotransferase-null mice: A role for the sulfoglycolipid, sulfatide in oligodendrocytes and CNS myelin. Glycobiology and Sphingobiology 2007, Tokushima, Japan, Feb 27-Mar 1, 2007
5. Kotani N, Gu J, Isaji T, Taniguchi N, Honke K (Kochi University Medical School): Biochemical visualization of cis-interactions between cell surface molecules in living cells. XIX International Symposium on Glycoconjugates. Cairns, Australia, July 15-20, 2007

6. 藤木文博、坪井昭博、川上学、中島博子、オリガエリセーバ、伊藤憲、李哲雨、辰巳直也、坂口直、宇高恵子(高知大学)、尾路祐介、岡芳弘、杉山治夫：WT1 特異的 CD4+ヘルパーT 細胞を誘導できる HLA-class II 拘束性 WT1 ペプチドの同定. 札幌、日本免疫学会総会 12.1~3 (2004)
7. 坪井昭博、岡芳弘、中島博子、ELISSEEVA Olga、田口哲也、大崎匡、許泰一、川上学、尾路祐介、宇高恵子(高知大学)、青笹克之、川瀬一郎、杉山治夫：悪性腫瘍に対する WT1 ワクチン療法の第一相臨床試験. 日本免疫学会総会 札幌、12.1~3 (2004)
8. 田口智子、清河信敬、藤本純一郎(国立成育医療センター研究所)：ヒト BLNK 陰性 pre-B 細胞株の解析. 第 34 回日本免疫学会総会、札幌、12 月 1~3 日、2004.
9. 片桐洋子、清河信敬、唐巍然、竹野内寿美、田口智子、大喜多肇、藤本純一郎(国立成育医療センター研究所発生・分化研究部)：抗 sialylGb5 単クローン抗体 Raft.2 によって検出される EC 細胞上の SSEA-4 抗原 第 9 4 回日本病理学会、横浜、4 月 14 日~16 日、2005
10. 片桐洋子、北村紀子、田口智子、竹野内寿美、大喜多肇、藤本純一郎、清河信敬(国立成育医療センター研究所発生・分化研究部)：ディタージェント不溶性マイクロドメイン/ラフトは効果的な免疫原になりうる 第 7 8 回日本生化学会、神戸、10 月 19 日~22 日、2005
11. 飯山達雄、執印太郎、宇高恵子(高知大学医学部)、竹内保、大舩祐治、杉山治夫：WT1 抗原を標的とした泌尿器科癌に対するペプチドワクチン療法の第 I/II 相臨床試験、第 77 回日本泌尿器科学会四国地方会、松山、7.9、2005.
12. 飯山達雄、宇高恵子(高知大学医学部)、竹内保、大舩祐治、杉山治夫、執印太郎：WT1 抗原を標的とした泌尿器科癌に対するペプチドワクチン療法の第 I / II 相臨床試験、第 70 回日本泌尿器科学会東部総会、花巻、9.28-30、2005.
13. 飯山達雄、宇高恵子(高知大学医学部)、竹内保、大舩祐治、杉山治夫、執印太郎：WT1 抗原を標的とした泌尿器科癌に対するペプチドワクチン療法の第 I / II 相臨床試験、第 57 回日本泌尿器科学会西日本総会、岡山、11.17-19、2005.
14. Iiyama T., Udaka K. (高知大学医学部), Tsuboi H., Oka Y., Nishida S., Oji Y., Sugiyama H.: WT1-peptide based immunotherapy in HLA-A*2402 patients with urological carcinomas. 第 36 回日本免疫学会総会、大阪、12 月 11-13 日、2006
15. 片桐洋子、北村紀子、竹野内寿美、宮川世志幸、田口智子、大喜多肇、藤本純一郎、清河信敬(国立成育医療センター研究所発生・分化研究部)：ディタージェント不溶性マイクロドメイン/ラフトは効果的な免疫源となりうる. 第 95 回日本病理学会、東京、4 月 30 日-2 月 2 日、2006
16. 佐藤伴^{1, 3}、片桐洋子¹、宮戸健二²、阿久津英憲²、中島英規¹、大喜多肇¹、秦順一¹、藤本純一郎¹、梅澤明弘²、年森清隆³、清河信敬¹ (¹国立成育医療センター研究所発生・分化研究部、²同生殖医療研究部、³千葉大学院医学研究科形態形成学)：新規抗 SSEA-4 単クローン抗体 6E2 のマウス着床前胚との反応性. 第 27 回日本糖質学会年会、福岡. 8 月 1 日-3 日、2007

17. 矢野有紗、小松利広、宇高恵子(高知大学医学部): 抗腫瘍ペプチド免疫療法における百日咳ワクチンのCTL誘導活性、第37回日本免疫学会総会、東京、11. 20-12、2007(予定)
18. 小谷典弘、顧建国、伊佐治知弥、宇高恵子、谷口直之、本家孝一(高知大学医学部): 新規細胞膜上分子間相互作用解析法による分子間相互作用の生化学的可視化. BMB2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会)、横浜、12月11-15日、2007(予定)
19. 本家孝一(高知大学医学部): 生細胞上で細胞表面分子間相互作用を同定する新規方法. 第7回国際バイオフォーラム、東京、7月2日、2008
20. 高橋忠伸、村上宏起、本家孝一(高知大学医学部)、小倉潔、田井直、川崎一則、左一八、郭潮潭、鈴木康夫、鈴木隆: 硫酸化糖脂質スルファチドはインフルエンザウイルスの増殖を促進する. BMB2008(第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会)、神戸、12月9日-11日、2008
21. 片桐洋子、佐藤伴、中島英規、宮川 世志幸、堀内 保臣、大喜多肇、藤本純一郎、清河信敬(国立成育医療センター研究所): ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の糖鎖の多様性. 第97回日本病理学会総会、金沢、5月15日-17日、2008
22. 小笠原尚、金子智典、片桐洋子、大喜多肇、中島英規、佐藤伴、石田秀治、木曾真、佐藤智典、藤本純一郎、清河信敬(国立成育医療センター研究所): マウスEC細胞F9の分化に伴う脂質生合成の変動. 第28回日本糖質学会年会、筑波、8月18日-20日、2008
23. 佐藤伴、片桐洋子、宮戸健二、阿久津英憲、大喜多肇、藤本純一郎、梅澤明弘、年森清隆、清河 信敬(国立成育医療センター研究所): 卵割期マウス初期胚におけるSSEA-4の動態. 第51回日本脂質生化学会、名古屋、7月30日-31日、2009.
24. 佐藤伴、片桐洋子、宮戸健二、阿久津英憲、大喜多肇、藤本純一郎、梅澤明弘、年森清隆、清河 信敬(国立成育医療センター研究所): マウス初期胚におけるSSEA-4の動態. 第82回日本生化学会大会、神戸、10月21日-24日、2009
25. 山下竜右、小谷典弘、石浦嘉人、本家孝一(高知大学医学部): 細胞外マトリックスを介した細胞接着時におけるb1インテグリン受容体型チロシンキナーゼ相互作用の網羅的解析、第82回日本生化学会大会、神戸、10.21-24、2009
26. 片桐洋子、石垣宏仁、恩田恵子、伊藤靖、藤本純一郎、小笠原一誠、清河信敬(国立成育医療センター研究所): 同系腫瘍細胞及びヒト腎癌由来細胞株ACHNラフト免疫により誘導される免疫応答、第39回日本免疫学会総会、大阪、12月2日-4日、2009

③ ポスター発表 (国内会議 18 件、国際会議 12 件)

1. Udaka, K. (Kochi University Medical School): Raft-associated presentation of MHC class II molecules guides thymocytes to the CD4 lineage. KTCC :Workshop of Kyoto T Cell Conference 2005, Kyoto, Japan, April 8-10, 2005
2. Akahori, K., Yamashita, T., kuge, H., and Honke, K. (Kochi University Medical School): Production of monoclonal antibodies against the lipid raft fraction recovered from PC12 cells

expressing Masculin. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006

3. Yano, K., Kuge, H., and Honke, K. (Kochi University Medical School): N-glycosylation of Masculin expressed in PC12 cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006

4. Wang, X., Gu, J., Miyoshi, E., Honke, K. (Kochi University Medical School), and Taniguchi, N.: Core fucosylation regulates EGF receptor-mediated intracellular signaling. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006

5. Watanabe, T., Ihara, H., Miyoshi, E., Honke, K. (Kochi University Medical School), Taniguchi, N., and Taguchi, T.: A specific detection of GlcNAc1-6Man1 branches in N-linked glycoproteins based on the specificity of N-acetylglucosaminyltransferase VI. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006

6. Tadano-Aritomi, K., Hisaki, H., Suzuki, C., Iida-Tanaka, N., Honke, K. (Kochi University Medical School), Nishizawa, K., Ishizuka, I.: Over-expression of sulfoglycolipids confers resistance against hyper- and hypotonic stresses to MDCK cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006

7. Yamamoto, K., Higashi, S., Kioji, M., Tsunozumi, J., Honke, K. (Kochi University Medical School), and Miyazaki, K.: Binding of active matrilysin to cell surface cholesterol sulfate is essential for its membrane-associated proteolytic action and induction of homotypic cell adhesion. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, June 18-23, 2006

8. Miyagawa Y, Okita H., Katagiri YU., Umezawa A, Hata J, Fujimoto J., and Kiyokawa N. (Natl. Res. Instit. for Child Health & Development): Identification of the candidate genes involved in the defect of cell regulatory systems in Ewings family tumor. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, Japan. June 18-23, 2006

9. Katagiri YU., Kitamura N, Miyagawa Y, Takenouchi H., Okita H., Fujimoto J., and Kiyokawa N. (Natl. Res. Instit. for Child Health & Development): The advantages of using detergent-insoluble microdomains, rafts as immunogens. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, Japan. June 18-23, 2006

10. Udaka K. (Kochi Univ. Med. Sch.), Mashiba T., Miyakawa T., and Osada T.: Computational prediction of T cell epitope peptides for designing hepatitis C virus vaccine. FABS & BSJ 2006 (第5回東アジア生物物理学会議), Ginowan, Nov 12-16, 2006

11. Katagiri, Y.U., Sato, B., Okita, H., Fujimoto, J., Kiyokawa, N. (Natl. Res. Instit. for Child Health & Development): The immunological effects of subcutaneous injection with raft microdomains Glycobiology and Sphingobiology 2007-Hakomori Commemorative Forum, Tokushiima, Japan. Feb.27-Mar.1, 2007

12. Kotani N., Ishiura Y., Yamashita R., Honke K. (Kochi Univ. Med. Sch.): Characterization of cell surface molecular interactions in B-cell lymphoma cells. Meeting on Clinical and Translational Research on Cancer: Glycomics Applications. Mie, Japan, March 24-27, 2009

13. Udaka, K.(Kochi Medical School) Size of repertoire overlap between HLA-A2 and A24 molecules. 第35回日本免疫学会総会、札幌、12.1-3、2005

14. 藤木文博、坪井昭博、川上学、中島博子、オリガエリセーバ、伊藤憲、李哲雨、辰巳直也、坂口直、宇高恵子(高知大学)、尾路祐介、岡芳弘、杉山治夫。:WT1 特異的 CD4+ヘルパーT 細胞を誘導できる HLA-class II 拘束性 WT1 ペプチドの同定。第 35 回日本免疫学会総会、札幌、12.1-3、2005
15. 坪井昭博、岡芳弘、中島博子、ELISSEEVA Olga、田口哲也、大崎匡、許泰一、川上学、尾路祐介、宇高恵子(高知大学医学部)、青笹克之、川瀬一郎、杉山治夫:悪性腫瘍に対する WT1 ワクチン療法の第一相臨床試験。第 35 回日本免疫学会総会、札幌、12.1-3、2005
16. 宇高恵子(高知大学医学部):胸腺細胞のヘルパーT 細胞への分化には MHC クラスII 分子の脂質装飾が重要。第 5 回日本蛋白質科学会年会、福岡、6.30-7.2、2005
17. 竹野内寿美、清河信敬、大喜多肇、藤本純一郎 (国立成育医療センター研究所発生・分化研究部): マウス EC 細胞株 F9 の分化誘導に伴う接着因子の発現の変化。第 38 回日本発生生物学会、仙台、6 月 2 日-4 日、2005
18. 野口安史、小松利広、駒庭学志、弘井誠、金哲、宇高恵子(高知大学医学部):CD4 T細胞の腫瘍内浸潤にかかわる MHC class II 分子発現細胞の解析。第 36 回日本免疫学会総会、大阪、12.11-13、2006
19. Mashiba T., Udaka K. (Kochi Medical School), Miyakawa T., Satta Y., Kataoka S., Kohara M. and Onji M.: Identification of novel CTL epitopes in hepatitis C virus by genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine. 第 36 回日本免疫学会総会、大阪、12.11-13、2006
20. Katagiri YU., Taguchi T, Fujimoto J., and Kiyokawa N. (国立成育医療センター研究所発生・分化研究部): The detergent-insoluble raft microdomains can be used as effective immunogens for developing anti-lipid antibodies. 第 36 回日本免疫学会総会、大阪、12 月 11-13 日、2006
21. 宮川世志幸, 大喜多肇, 梅澤明弘, 藤本純一郎, 秦順一, 清河信敬 (国立成育医療センター研究所発生・分化研究部): ヒト間葉系幹細胞培養系を用いた Ewing 肉腫病態関連候補因子群に関する網羅的解析。第 65 回日本癌学会総会、横浜。9 月 28-30 日、2006
22. Kataoka S., Yano A., Mashiba T., Onji M., Kohara M., Udaka K.(Kochi Medical School): A mouse model of peptide immunotherapy for hepatitis C Virus. 第 37 回日本免疫学会総会、東京、11. 20-12、2007
23. 小谷典弘、顧建国、伊佐治知弥、宇高恵子、谷口直之、本家孝一 (高知大学医学部): 細胞膜上分子間相互作用生化学的可視化法の開発。第 27 回日本糖質学会年会、8 月 1-3 日、福岡、2007
24. 片桐洋子、佐藤伴、川崎ナナ、伊藤さつき、中島英規、大喜多肇、藤本純一郎、清河信敬 (国立成育医療センター研究所): ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の多様性。第 27 回日本糖質学会年会、福岡、8 月 1 日-3 日、2007
25. 小谷典弘、石浦嘉人、山本晴美、小堤保則、本家孝一 (高知大学医学部): EBウイルス陽性 B細胞リンパ腫における糖鎖関連遺伝子の発現。BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会)、神戸、12 月 9 日-11 日、2008

26. 只野-有富桂子、久樹晴美、野呂知加子、鈴木実、本家孝一 (高知大学医学部)、石塚稲夫、岡崎具樹:CGT欠損マウスにおける精子形成停止に伴うプロテオーム変化. BMB2008(第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 12月9日-11日, 2008
27. 山下竜幸、仁尾景子、宮原馨、本家孝一 (高知大学医学部) :Production of monoclonal antibodies for membrane microdomains of murine spermatogenic cells. BMB2008(第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 12月9日-11日, 2008
28. 片桐洋子、佐藤伴、中島英規、宮川世志幸、堀内保臣、大喜多肇、藤本純一郎、清河信敬(国立成育医療センター研究所):ヒトB前駆細胞株に発現するCD10の糖鎖の多様性. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 5月15日-17日, 2008
29. 片桐洋子、佐藤伴、川崎ナナ、伊藤さつき、中島英規、大喜多肇、藤本純一郎、清河信敬(国立成育医療センター研究所):ヒトB前駆細胞株NALM6に発現するCD10分子のneutralendopeptidase活性と糖鎖構造. BMB2008(第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 12月9日-11日, 2008
30. 佐藤伴、片桐洋子、宮戸健二、阿久津英憲、中島英規、大喜多肇、秦順一、藤本純一郎、梅澤明弘、年森清隆、清河信敬(国立成育医療センター研究所):マウス着床前胚におけるSSEA-4とE-cadherinの抗体架橋に伴う動態の解析. BMB2008(第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 12月9日-11日, 2008
31. 片桐洋子、佐藤伴、伊藤千鶴、大喜多肇、藤本純一郎、年森清隆、清河信敬、(国立成育医療センター研究所):An epitope of monoclonal antibody MC121 recognizing a sperm maturation-associated antigen, 54k sialoglycoprotein, is carried by glycosphingolipids of human erythrocytes. (第82回日本生化学会大会合同大会), 神戸, 10月21日-24日, 2009

(4)知財出願

①国内出願 (1件)

特願 2007-017667 細胞膜上分子と相互作用する化合物の検出方法
出願者: 国立大学法人高知大学、国立大学法人大阪大学
出願日: 平成19年1月29日

②海外出願 (1件)

PCT/JP2008051002
24/1/08

Honke K (Kochi Univ), Kotani N (Kochi Univ), Taniguchi N (Osaka Univ)

Method for detection of compound interacting with molecule located on cell membrane

③その他の知的財産権

他に記載すべき知的財産権があればご記入下さい。(実用新案 意匠 プログラム著作権 等)

(5)受賞・報道等

“受賞や新聞報道等について、具体的に記入してください。”

①受賞

小谷典弘(高知大学医学部)、日本糖質学会第11回ポスター賞、平成20年

②マスコミ(新聞・TV等)報道

本家孝一(高知大学医学部)
平成20年5月21日 高知新聞朝刊
平成20年6月2日 朝日新聞朝刊
平成20年6月6日 科学新聞

宇高恵子(高知大学医学部)

平成21年1月19日 ラジオ出演
「ワクチンで“がん”に挑む」NHK総合「私も一言!夕方ニュース」

③その他

片桐洋子(国立成育医療センター)
平成21年10月12日~16日 瀋陽薬科大学にて講演、セミナー

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

<公開可能なもの>

(藤本グループ) 新規抗SSEA-4単クローン抗体6E2は、理研細胞バンクに寄託(平成21年4月手続き)

②社会還元的な展開活動

§6. 研究期間中の主な活動

“ワークショップ、シンポジウム、その他チーム内ミーティング(主なもの)を行った場合、

月日、名称、場所、参加人数、目的や内容などを記入。”

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成17年3月11日	本家チーム会議	高知大学医学部	15名	チーム内における研究戦略の策定および研究成果の評価、研究者間交流
平成18年3月2日	本家チーム会議	高知大学医学部	20名	チーム内における研究戦略の策定および研究成果の評価、研究者間交流
平成20年3月21日	第1回高知システム糖鎖生物学教育研究センター(KSGC)シンポジウム	高知大学医学部	40名	招待講演者5名
平成21年3月9日	本家チーム会議	高知大学医学部	20名	チーム内における研究戦略の策定および研究成果の評価、研究者間交流
平成21年3月19日	第2回KSGCシンポジウム	高知大学医学部	40名	招待講演者3名

§ 7 結び

1) 研究の目標等から見た達成度

①膜マイクロドメイン抗体の作製とエピトープの決定（本家グループ）

達成度 70%

ラフト免疫法を用いてマウス精子形成細胞膜マイクロドメインに対する抗体を作製する研究に関して、硫酸化糖脂質のセミノリピドと相互作用する分子に対する単クローン抗体を得るという当初の目標は達成できなかったが、精子形成に関わる新規分子に対する抗体が得られた。

マスキュリン発現 PC12 細胞膜マイクロドメインに対する抗体を作製する研究に関して、マスキュリンと相互作用する分子に対する単クローン抗体を得るという当初の目的は達成できていないが、神経突起先端に局在するおそらく新規の脂質に対する抗体が得られた。

ラフト免疫法により、当初の目標設定のように特定分子と相互作用する分子の抗体を得ることはできなかった。しかしその一方、ラフト免疫法は、従来法では得られない新規分子に対する抗体が得られる可能性が示された。

②膜マイクロドメイン指向性プローブの開発と応用（本家グループ）

達成度 100%

HRP による Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応を発見し、生細胞の細胞膜上で会合する分子群を同定する方法の原理開発に成功した。さらに、標識試薬を改良して、網羅的解析への道を開いた。

③糖鎖機能阻害にもとづく膜マイクロドメインの機能制御（本家グループ）

達成度 70%

硫酸化糖脂質に対する単鎖抗体 scFv を作製したが、得られた単鎖抗体の遺伝子をヒト腎癌細胞内で発現させて腎癌細胞表面における硫酸化糖脂質の発現を抑制することはできなかった。

共同研究者の静岡県立大学の鈴木隆教授らが、siRNA で MDCK 細胞の CST 遺伝子の発現を抑えることにより、サルファタイドの発現を阻害すると、インフルエンザ A ウイルスの増殖が抑制されることを示した。

④胸腺細胞分化決定機構における糖脂質マイクロドメインの役割（宇高グループ）

達成度 100%

未熟胸腺細胞が CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) あるいは CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th) へ分化決定される際、T 細胞レセプター (TCR) が胸腺上皮細胞上に発現する MHC 分子のクラスを見分けるとき、MHC class II 分子が膜マイクロドメイン会合性に提示されることが Th 細胞への分化決定に必要なことを明らかにした。

⑤膜マイクロドメイン免疫応答を利用した治療戦略（藤本グループ）

達成度 100%

ラフト免疫法の特性を明らかにし、抗腫瘍免疫療法への応用をマウスで検討した結果、ラフト免疫に明らかな抗腫瘍効果を確認した。ラフト免疫は、被免疫マウスの自然免疫を強化し、腹腔マクロファージを活性化することを発見した。

⑥EBウイルス関連腫瘍における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明（今井グループ）

達成度 30%

EBV 遺伝子産物の latent infection membrane protein (LMP)の LMP1 と LMP2A をレトロウイルスベクター (SIN-RV)に組み込んで導入、LMP1、LMP2A 発現上皮細胞株を作製した。LMP1 発現胃癌細胞株 NUGC-3 とコントロール細胞の間の糖脂質組成と遺伝子発現プロファイル (DNA マイクロアレイによる)を比較検し、遺伝子発現に差違を見出したが、事情により研究を中断した。

2) 得られた成果の意義等の自己評価

本研究課題で得られた成果により、細胞膜から発信される生物情報は、個々の分子からではなく、分子周囲の微少環境も含めた膜マイクロドメインから生じること、この膜マイクロドメインの形成に糖鎖が重要な役割を演じていることが確認できた。個々の研究成果の意義は以下のとおりである。

①膜マイクロドメイン抗体の作製とエピトープの決定（本家グループ）

得られた抗体は、精子形成と神経ネットワーク形成を調べるためのプローブとして利用できる。

②膜マイクロドメイン指向性プローブの開発と応用（本家グループ）

幅広く医学や細胞生物学に応用可能な分子間相互作用の解析法を開発した。

③糖鎖機能阻害にもとづく膜マイクロドメインの機能制御（本家グループ）

CST ノックアウトマウスにサルファタイドを免疫することにより、IgG の硫酸化糖脂質単クローン抗体を得ることができた。糖鎖に対する単鎖抗体は結合親和性が弱く、架橋等の工夫が必要であることがわかった。

④胸腺細胞分化決定機構における糖脂質マイクロドメインの役割（宇高グループ）

MHC 分子の認識が、分子単独ではなく、周囲の微少環境も含めて行われることが実証された。

⑤膜マイクロドメイン免疫応答を利用した治療戦略（藤本グループ）

分子単独で免疫しても惹起出来ない効果が、膜マイクロドメイン (脂質ラフト) の形で免疫すると得られることがわかった。このことは、今後のワクチン開発に重要なヒントを与える。

3) 今後の研究の展開

本家グループは、得られた抗体が認識する新規分子の機能解明、KO マウス解析によるマスキュリンの機能解明、EMARS 法の医学への応用、正常腎集合管細胞と腎細胞癌細胞におけるサルファタイドの機能解明をテーマとして研究を進め、膜マイクロドメインにおける糖鎖機能について一層掘り下げた研究を行う。

宇高グループは、東北薬科大学の井ノ口仁一グループとの共同研究で、糖脂質改変動物の T 細胞機能を調べることにより、T 細胞機能における糖脂質マイクロドメインの役割を明確にする。

藤本グループは、ラフト免疫法による免疫応答のメカニズムを、とくに自然免疫の観点から追究する。

4) 研究代表者としてのプロジェクト運営

① チーム全体の研究遂行

小さなチームであったので、グループ間の連携がうまく行き、チーム内で共同研究も行なった。チーム会議は3回高知大学で開催した。藤本グループは、領域全体会議や全国学会時に打ち合わせを行い、研究の進捗状況の把握に努めた。宇高グループは、同じ学内であるので頻りに議論を重ね、糖脂質研究者と共同研究を開始する際に仲介を行った。

② 研究費の使い方

初年度に大型機器の共焦点レーザー走査型顕微鏡を導入し、チーム内の高知大学グループで共同使用した。研究費の半分は人件費・謝金に費やした。

若手研究者の育成

本研究に参加した助教1名が、高知大学医学部システム糖鎖生物学教育研究センター特任准教授に昇任した。博士研究員1名が、同センター特任助教に採用された。技術員1名（修士課程修了者）は、同センターの技術補佐員としてCREST研究を継続している。

チーム全体で、11名の大学院生（7名博士課程、4名修士課程）が参加した。1名が博士課程終了後、高知大学教育研究部医療学系助教に採用された。



本家グループメンバー（下段中央が本家）平成 21 年 7 月

CREST 経費で購入した
共焦点レーザー走査型顕微鏡
(オリンパス社 FV-1000)

