

## 分子遺伝学 研究部

教授：山田 尚 分子腫瘍学  
講師：河野 毅 分子腫瘍学

### 教育・研究概要

#### I. 分子腫瘍学的研究

##### 1. 巨核芽球性白血病の分化系統転換と血小板への分化誘導

我々は、巨核芽球性白血病由来の細胞株 JAS-R を樹立した。JAS-R には巨核球と赤芽球の両性格が認められ、細胞接着がこの形質転換に関与していた。すなわち、接着性細胞 JAS-RAD は巨核球系であり、浮遊性細胞 JAS-REN は赤芽球系であった。さらに興味あることには、JAS-RAD はエリスロポエチンを産生するが JAS-REN ではその産生が認められず、エリスロポエチンに部分的に依存して増殖していた。JAS-REN と JAS-RAD を転写因子の面から検討すると、JAS-RAD においては FLI1, GFI1, RUNX1 の発現が亢進していたが GATA1, FOG1, NFE2 の発現には両者の相違が認められなかった。このことは、後者の遺伝子群は巨核芽球および赤芽球の増殖に共通して必要なものであり、前者の遺伝子群が巨核芽球性質を規定していると推定された。現在、FLI1 の発現調節に注目してそのプロモーター領域の機能を解析している。

血球産生の恒常性の維持には造血幹細胞とその増殖の場としてのニッチの関係が重要である。白血病においても白血病幹細胞の存在とその増殖の場における細胞間接着が白血病幹細胞性の維持や治療抵抗性に関連していることが示唆されている。そこで、JAS-REN および JAS-RAD の抗腫瘍薬に対する感受性および SCID マウスを用いた白血病幹細胞性について検討を加えている。巨核芽球は他の血球と異なりそれ自体にニッチを形成する可能性も考えられ *in vivo* におけるホーミングに関しても検討している。

#### II. 分子薬理学的研究

##### 1. テロメラーズ阻害薬

陽イオン性ポルフィリン TMPyP4 はグアニンに富んだ DNA 領域に結合して DNA との間で安定した四重鎖構造を作る。染色体末端のテロメア部位にはグアニンが多いため TMPyP4 との親和性が強い。我々は白血病細胞を用いて TMPyP4 の抗腫瘍活性を検討した。TMPyP4 による増殖抑制効果は

テロメアの短縮に依存した現象ではないこと。TMPyP4 処理で c-Myc が顕著に抑制されること。このような TMPyP4 による遺伝子発現修飾が抗腫瘍活性に関連することを示した。今回、TMPyP4 の網膜芽細胞腫における抗腫瘍効果を検討した。TMPyP4 は直接的にアポトーシスを誘導し、その処理によって、ヒストン H2AX がリン酸化を受けることが判明した。また、TMPyP4 は膜芽細胞腫の放射線感受性を増強した。現在、これらの分子薬理機構に関して詳細な検討を加えている。

##### 2. ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

網膜芽細胞腫は小児の比較的予後良好な腫瘍である。放射線や多剤併用の化学療法を用いて進行期のがんにおいても視機能を温存した治療が可能となりつつある。しかし、小児に対するこれらの治療法では二次癌の発生が危惧される。バルプロン酸は古くから使用されている抗痙攣薬であるが、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害することが判明し、抗腫瘍薬としての期待が高まっている。そこで、我々は放射線の線量を下げる目的にバルプロン酸との併用療法を検討している。*in vitro* の実験では併用には相乗効果があり、線量を大幅に下げることができた。この作用機序にはバルプロン酸による p53 のアセチル化とそれに伴う蛋白質の安定化が関与している。現在、その詳細を検討している。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬は DNA 傷害性の抗腫瘍薬との併用でも有効なことを示してきた。DNA トポイソメラーゼ I 阻害薬の塩酸イリノテカン (CPT-11) は消化器がんをはじめ多くの固形腫瘍の治療に有効な薬剤である。そこでバルプロン酸との併用を検討した。両薬剤の併用投与は相乗効果を示した。CPT-11 の単独投与は抗アポトーシス作用を有する BCL2L1 を誘導するが併用でこの誘導は抑制されていることが判明した。

##### 3. グルココルチコイド

糖質コルチコイドは急性リンパ性白血病の治療に不可欠な薬であるがその抗腫瘍作用には不明な点が多い。そこで、2 例の小児白血病の患者より治療前、治療後の白血病細胞を分離し、寛解後に得られた B 細胞との間で、マイクロアレイを用いて発現解析を行った。その結果、白血病細胞で増加していた 26 遺伝子を同定し、さらに、このうち 5 遺伝子が糖質コルチコイドによって抑制されていることが判明した。これらの遺伝子は B 細胞の分化や増殖に関連したもので糖質コルチコイドによる発現抑制が細胞死につながった可能性が示された。

### III. 分子神経学的研究

#### 1. 脊髄性筋萎縮症に関する研究

脊髄性筋萎縮症 (Spinal muscular atrophy : SMA) は進行性の筋力低下・筋萎縮を呈する常染色体劣性遺伝の疾患である。原因遺伝子 (SMN1) と関連遺伝子 (SMN2) が同定されており、エキソン7のスプライシングの分子調節機構が病因上の問題となっている。詳細な研究の結果, SMN2 ではほとんどの mRNA がエキソン7を欠落し, これは1塩基の変換に伴う hnRNP A1 依存性スプライシング・サイレンサーの創作に起因していることが示された。現在, hnRNP A1/A2 による SMN2 の mRNA の安定化と SMN 蛋白質への翻訳調節についての研究を通して, 新しい治療法の開発や新たな研究システムの構築を目指して取り組んでいる。

#### 「点検・評価」

##### I. 点検

##### 1. 研究

がんに関する研究では, 我々が樹立した巨核芽球性白血病細胞株 JAS-R を用いて, 興味ある結果を明らかにすることができた。白血病細胞は浮遊細胞として増殖する。このため増殖環境に対する研究の発展が立ち遅れていたが, 我々の研究で白血病細胞においても増殖環境との相互作用が増殖や分化に大きく関与していることを示せた。このことは今後の白血病研究に大きなインパクトを与えることができたものと考えている。

抗腫瘍薬の研究ではテロメラーズ阻害薬およびヒストン脱アセチル化酵素阻害薬を中心に新たな臨床応用への可能性を示すことができた。今後は併用療法にともない増強した抗腫瘍効果の作用機序をさらに詳細に研究し新たな治療法へとつながる道筋を明らかにしたいと考えている。

平成19年度より, 新たに神経学に関する研究分野を開くことができた。遺伝学的立場からこれらの病因および治療法の開発に向けた研究の活性化を図りたいと考えている。

##### 2. 学内への貢献

学内での分子生物学・遺伝学的研究の活発化に伴い DNA シーケンシングの依頼が急激に増加している。本年度もこれらの要望に質を落とすことなく対応することができた。学内における研究の基礎となるものであり, 教員・研究者への, 尚一層の便宜を図りたいと考えている。

##### 3. 教育

今年度も, 学部・大学院への教育・実習に参加で

きた。教員が増えたこともあり, より重い責任を果たしたいと考えている。

### II. 評価

本年度も研究の分野ではある程度の成果を挙げることができた。これからは, 基礎的な研究成果を如何に臨床医学の分野に還元するかが問われる。研究成果の臨床応用に向け, 更なる努力を行う必要があると決意している。

### 研究業績

#### I. 原著論文

- 1) Akiyama M, Yamada O (Tokyo Women's Medical Univ.), Agawa M, Yuza Y, Yanagisawa T, Eto Y, Yamada H. Effects of prednisolone on specifically expressed genes in pediatric acute B-lymphoblastic leukemia. *J Pediatric Hematol Oncol* 2008; 30(4): 313-6.
- 2) Kawano T, Ahmad R, Nogi H, Agata N, Anderson K, Kufe D. MUC1 oncoprotein promotes growth and survival of human multiple myeloma cells. *Int J Oncol* 2008; 33(1): 153-9.
- 3) Agata N, Ahmad R, Kawano T, Raina D, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks death receptor-mediated apoptosis by inhibiting recruitment of caspase-8. *Cancer Res* 2008; 68(15): 6136-44.

#### II. 総説

- 1) 山田 尚. Imatinib の成功に学ぶ分子標的治療薬の現状と将来. *日薬理誌* 2008; 132(6): 339-42.

#### III. 学会発表

- 2) 尾崎幸次<sup>1)</sup>, 山田 修<sup>2)</sup>, 川内喜代隆<sup>3)</sup>, 秋山政晴, 山田 尚, 松岡留美子<sup>1)</sup>(<sup>1</sup>女子医大). HL60 の分化に伴うテロメラーズ活性は Akt と PKC により調節される. 第70回日本血液学会学術集会. 京都, 10月. [臨血 2008; 49(9): 995]
- 3) 河野 毅, Kufe D (ハーバード大医), 山田 尚. MUC1 は Bcr-Abl の安定性制御により CML の病因に寄与する. 第70回日本血液学会学術集会. 京都, 10月. [臨血 2008; 49(9): 1143]
- 4) 山田順子, 岩瀬さつき, 河野 毅, 山田 尚. 接着刺激に伴う赤芽球・巨核球-系統分岐制御機構の解析. 第70回日本血液学会学術集会. 京都, 10月. [臨血 2008; 49(9): 988]
- 5) Horiguchi-Yamada J, Kawano T, Yamada H. Adherence to ECM influences on lineage switching

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

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

## 分子免疫学研究部

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

### 教育・研究概要

#### I. インターロイキン 31 の機能解析

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

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

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

#### II. 蛋白質分泌ベクターの作成

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

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