

## 分子遺伝学 研究部

教授：山田 尚 分子腫瘍学，血液学  
講師：河野 毅 分子腫瘍学，血液学

### 教育・研究概要

#### I. 分子腫瘍学的研究

##### 1. 白血病細胞の可塑性

腫瘍細胞は多様な機構を使って治療抵抗性を獲得する。その一つとして、可塑性に基づく脱分化等が治療抵抗性を生じる可能性が挙げられる。我々が樹立した巨核芽球性白血病由来の細胞株 JAS-R はこのような可塑性を容易に示す細胞である。JAS-R は培養条件の変化によって巨核球と赤芽球との間の形質転換を示すが、非幹細胞から白血病幹細胞様形質の獲得も可能なようである。そこで、低酸素やマトリックスなどの培養条件を骨髓環境下と近似させることによって、JAS-R 細胞を白血病幹細胞、さらに、幹細胞の増殖生存を維持する支持細胞としての間葉系細胞へと変化させることができないかを検討している。低酸素下では、JAS-R 細胞は間葉系細胞カドヘリンの発現が誘導され、さらに Angiopoietin1 の誘導が可能である。これらの変化が治療抵抗性に関与しているものと解析を行っている。

##### 2. 転写因子 FLI-1 と血球分化

転写因子 FLI-1 はマウスに白血病を起こさせる friend leukemia virus の標的部位にある遺伝子として同定された。これまでの研究により血液細胞、とくに血小板や赤血球の分化に必須であることが分かっている。そのノックアウトマウスは血小板および血管の形成不全により胎生致死となる。そこで、われわれは FLI-1 の各種白血病細胞株での発現を検討した。すると慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞株の K562, KU812, TCC-S 細胞において発現パターンが異なることが判明した。FLI-1 には isoform1 と 2 が存在し、isoform2 は細胞質のみに存在し、isoform1 は逆に核のみに存在する。FLI-1 が転写因子であることを考えれば、isoform1 が転写因子として働いているであろうことは想像できるが、isoform2 の機能はまだ解明されていない。CML は造血幹細胞 (HSC) の腫瘍化と考えられており、HSC ではまだ FLI-1 isoform1 が発現していないことが予想される。また CML 細胞での分化阻害に FLI-1 が関与していると考えられる。そこで、FLI-1 の機能と CML の分子病理および HSC の制御に関して検討を進めている。

#### II. 分子薬理学的研究

##### 1. ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

網膜芽細胞腫は早期発見例が増加し、比較的予後良好な疾患となってきている。しかし、視機能の温存や放射線療法・化学療法に伴う二次がんの発生が重要な問題である。我々は、放射線療法における照射線量の低減をめざし研究を行っている。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 (HDACI) は単独で抗腫瘍作用があることが報告されている。HDACI はヒストンだけでなく p53 もアセチル化し安定化する。網膜芽細胞腫では p53 の変異が少ないがこれをユビキチン化し分解する MDM2, MDM4 が高発現している。以上を考慮し、HDACI と放射線療法の併用による殺細胞効果を網膜芽細胞腫の細胞株を用いて検討した。HDACIs (バルプロン酸と depsipeptide) は p53 をアセチル化し MDM2, MDM4 との結合を減弱した。この結果 p53 はユビキチン化から回避し安定化することが判明した。また HDACI と放射線療法の併用によりきわめて効率よく、網膜芽細胞腫のアポトーシスを誘導することに成功した。

##### 2. DNA トポイソメラーゼ I 阻害薬耐性機構の検討

DNA トポイソメラーゼ I 阻害薬耐性と DNA トポイソメラーゼ I 変異の関連を大腸がん細胞で検討している。DNA トポイソメラーゼ I 変異とその機能の関連を培養細胞および酵母を用いて検討し、遺伝子機能上の重要なアミノ酸部位の同定を試みている。現在までに、DNA トポイソメラーゼ I の各ドメインと耐性の関連が明らかになりつつある。

#### 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 Survival Motor Neuron 1 (SMN1) 遺伝子の欠損または突然変異で起こる主に小児科領域で比較的頻度の高い進行性の筋力低下と筋萎縮を呈する常染色体劣性遺伝の神経変性疾患である。ヒトには、SMN1 とほぼ相同な SMN2 遺伝子が存在するが、SMA 発症を防ぐことはできない。何故なら、両遺伝子間には 5 つの塩基配列の違いがあるが、第 7 エクソンの 6 番目の塩基が SMN2 ではシトシン (C) からチミン (T) に置換されていて、SMN2 から転写される殆どの mRNA は第 7 エクソンを欠き、これらからは正常に機能する SMN が産生されないためである。RNA 結合タンパク質は RNA の代謝のあらゆるプロセスにおいて関与してその反応を制御

している。スプライシング抑制性因子でRNA結合タンパク質であるhnRNP A1/A2はSMN1/2の第7エクソンのスプライシングに直接関与してその制御を調節していることが解明された。RNAi技法でA1を減少させるとエクソン7のスプライシングが促進し、エクソン7を含むmRNAが増加することが示された。一方で、hnRNP A2は上記のエクソン7の制御以外の別のプロセスに於いても、特に細胞質内でSMNのmRNAとの直接の相互作用をして、翻訳レベルでSMNの発現調節に関与している事が判った。この解析を進めると、A2は通常の状態ではSMN1/2のmRNAと細胞質内で結合して、SMNの翻訳を促進していることがわかった。この事実は、SMAの治療法を考える上でこれまで考えられてきた制御機構のプロセスとは異なり、RNA結合タンパク質を介した新たな調節機構であり、新たな分子標的として治療法の開発に繋がる発見と考えられる。

## 2. 認知症の遺伝学的検討

アルツハイマー病は病理組織学的に規定できる疾患である。しかし、その発症と脳機能への影響に関する病態は不明な点が多い。そこで、Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)の遺伝子多型を検討し、臨床病型の相関について検討を加えている。その結果、一つのSNPが前頭脳機能の病勢進行と関連する結果を見出した。

### 「点検・評価」

#### 1. 点検

##### 1) 研究

がん治療においてがん幹細胞の存在が注目されている。がん幹細胞自身は自己再生能を有し薬剤耐性を持つため、その根絶は極めて困難で、再発や薬剤耐性の原因と考えられている。通常、臨床的な腫瘍の構成はがん幹細胞を頂点とする階層構造によって成り立つと考えられてきた。我々はこの点について疑問を持ち、環境その他の影響によって腫瘍細胞は脱分化および分化を示すものと研究に取り組んでいる。我々が樹立した巨核芽球性白血病細胞株JAS-Rはこのような研究に適した細胞である。この細胞を用いて骨髄類似の培養環境下で、白血病細胞の分化、脱分化そして異なった細胞系列への分化について研究を進めている。我々の研究が白血病の病態解析のみでなく、将来的な治療法の開発へもつながる大きなインパクトを与えることのできる研究と考えている。

抗腫瘍薬の研究ではテロメラーゼ阻害薬、ヒスト

ン脱アセチル化酵素阻害薬そしてDNA-トポイソメラーゼ-I阻害薬を中心に研究を進めている。これらの薬剤の抗腫瘍効果の分子機構解明が研究課題である。ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬と他剤との併用による治療効果の増強やその機序の解析、DNA-トポイソメラーゼ-Iの変異に伴う耐性の強さ等に一定の結果を得ることができた。今後は臨床応用が可能な投与方法等の開発が必要と考えている。

脊髄性筋萎縮症に関する研究では、SMN2による蛋白質産生不足にhnRNP A1/A2がスプライシングおよび翻訳の両面において関与していることが判明した。このことは有効な治療法のない疾患に対して新たな治療法開発の手掛かりになるものと考えている。

アルツハイマー病では遺伝子多型と病型・病態との関連を精神科との共同で検討している。BDNFの一部のSNPが患者の前頭葉機能と関連していることを見出した。これらの研究からは患者の治療・予防に貢献できる新たな知見が得られるものと期待している。

#### 2) 学内への貢献

学内での分子生物学・遺伝学研究の活発化に伴いDNAシーケンシングの依頼が増加している。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と考えている。また、DNA断片の正確な測定による、個体識別の依頼も順調に増加した。現状において提供可能な技術やその臨床的応用に関して、十分な情報提供ができなかった点は大きな反省材料である。遺伝子解析は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。

#### 3) 教育

各教員が学部・大学院への教育・実習に参加した。単なる教育参加ではなく、学生とのより密な接触これからの課題である。学生・院生の側からのニーズと教員側からの学問的興味を合致するように、更なる工夫が必要である。

#### 2. 評価

本年度は例年に比べ発表原著論文が少なかった。研究は論文によって完結し、更に、多くの医師・研究者からの批判によって次のステップに進めるものであることを考えると、一層の努力を払い研究を進めることが必要であろう。また、社会的に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。研究内容もより臨床医学に根差したものでなければいけない。その意味では、今まで以上に臨床教室との連携を模索し、社会に貢献する姿勢を

打ち出す必要があると考えている。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Rocha-Sousa A<sup>1)</sup>, Hayashi T, Gomes NL<sup>1)</sup>, Penas S<sup>1)</sup>, Brandão E<sup>1)</sup>, Rocha P<sup>1)</sup>, Urashima M, Yamada H, Tsuneoka H, Falcão-Reis F<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Hospital de São João). A novel mutation (Cys83Tyr) in the second zinc finger of NR2E3 in enhanced S-cone syndrome. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2011; 249(2): 201-8.
- 2) Ahmad R, Rajabi H, Kosugi M, Joshi MD, Alam M, Vasir B, Kawano T, Khabanda S, Kufe D. MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an autoinductive regulatory loop. Sci Signal 2011; 4(160): ra9.
- 3) Akiyama M, Kawano T, Mikami-Terao Y, Agawa-Ohta M, Yamada O (Tokyo Women's Med. Coll.), Ida H, Yamada H. Erythropoietin activates telomerase through transcriptional and posttranscriptional regulation in human erythroleukemic JAS-REN-A cells. Leuk Res 2011; 35(3): 416-8.
- 4) Kawano T, Akiyama M, Agawa-Ohta M, Mikami-Terao Y, Iwase S, Yanagisawa T (Saitama Med. Univ.), Ida H, Agata N, Yamada H. Histone deacetylase inhibitors valproic acid and depsipeptide sensitize retinoblastoma cells to radiotherapy by increasing H2AX phosphorylation and p53 acetylation-phosphorylation. Int J Oncol 2010; 37(4): 787-95.

### III. 学会発表

- 1) Horiguchi-Yamada J, Kawano T, Yamada H. Transcriptional regulator DACH1 plays a role for cell survival of human megakaryocytic leukemia cells. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Osaka, Sept.
- 2) Kashima T, Yamada H. hnRNP A2 modulates SMN synthesis at translation level. The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Kobe, Dec.
- 3) 勝見重昭<sup>1)</sup>, 山田 修<sup>1)</sup>, 尾崎幸次, 久保朱音<sup>1)</sup>, 王 艶華<sup>1)</sup>, 秋山政晴<sup>1)</sup>, 川内喜代隆<sup>1)</sup>, 山田 尚, 清水 悟<sup>1)</sup>, 泉二登志子<sup>1)</sup>, 松岡瑠美子<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>東京女子医大). 急性骨髄性白血病細胞の薬剤感受性とテロメレース. 第72回日本血液学会学術集会. 横浜, 9月. [臨血 2010; 51(9): 1125]
- 4) 河野 毅, 太田美幸, 中山律子, 秋山政晴, 岩瀬さつき, 山田順子, 山田 尚. 白血病細胞の分化とMLLT3の関連. 第72回日本血液学会学術集会. 横浜, 9月. [臨血 2010; 50(9): 1222]

- 5) Horiguchi-Yamada J, Kawano T, Iwase S, Yamada H. Transcriptional regulator DACH1 is involved in cell survival of human megakaryocytic leukemia cells. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Yokohama, Sept. [臨血 2010; 51(9): 1013]