

朗 (山口大学). 化学療法による癌細胞の免疫感受性の増強. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 10月.

8) Nakano M, Saeki C, Oikawa T, Takahashi H, Homma S, Zeniya M. Significant role of intrahepatic activated NKT cells to induce autoreactive T cells in the liver in experimental AIH model mouse. 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Bangkok, Feb.

9) 西田純幸¹⁾, 小井戸薫雄, 原 一馬, 森本創世子, 坪井昭博¹⁾, 本間 定, 武田 裕¹⁾, 込田英夫, 永野浩昭, 岡 芳弘¹⁾, 大草敏文, 田尻久雄, 杉山治夫¹⁾ (¹⁾大阪大学). 睥癌に対するゲムシタビン併用 WT 1 ペプチドワクチン療法の臨床効果と免疫誘導. 第70回日本癌学会学術総会. 名古屋市, 10月.

IV. 著 書

1) Koido S, Homma S, Takahara A, Namiki Y, Komita H, Uchiyama K, Ohkusa T, Tajiri H. Chapter 13: Immunotherapy for Pancreatic Cancer. In: Sanjay SK editor. Pancreatic cancer: Molecular mechanism and targets. Rijeka: InTech, 2011. p.225-50.

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

白血病は初回の寛解導入療法で約90%に完全寛解が得られる。しかし、多くが再発を引き起こす。再発に至る過程で白血病細胞は多様な機構を使って生存・治療抵抗性を獲得する。白血病細胞の可塑性もその一つの要因に挙げられる。我々は白血病細胞の可塑性に関して転写因子 FLI-1 と MAP キナーゼの活性化という観点から研究を行ってきた。我々が樹立した巨核芽球性白血病由来の細胞株 JAS-R は接着により表現系の異なる2つの細胞集団 (赤芽球系の JAS-REN, 巨核芽球系の JAS-RAD) から構成されている。このような可塑性を容易に示す 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。

1. 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。これまでの研究で血液細胞, とくに血小板や赤血球の分化に必須であることが判明している。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。FLI-1 には isoform-1 と-2 が存在し, isoform-2 は細胞質のみに存在し, isoform-1 は逆に核にのみ存在する。FLI-1 が転写因子であることを考えれば, isoform-1 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, isoform-2 の機能はまだ解明されていない。そこで, われわれは各種白血病細胞株での FLI-1 の発現を検討した。すると慢性骨髄性白血病細胞株では FLI-1 の発現が isoform-2 のみで isoform-1 の発現は認められなかった。CML は造血幹細胞 (HSC) の腫瘍化と考えられており, HSC では FLI-1 isoform-1 が発現していないと予想される。また CML 細胞での分化阻害に FLI-1 が関与しているとも考えられる。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。現在までに, FLI-1 isoform-1 と MEK1 の活性変異体を同時に CML 細胞に遺伝子導入したところ, 接着細胞の増加と血小板への分化傾向を示した。またこれらの接着や分化には接着因子だけでなくベータ

アクチンの重合と脱重合が関与していることが判明している。

2. 巨核芽球系への可塑性に必要なシステム

JAS-REN-A (JAS-RENのクローン化) 細胞にMAPキナーゼ (ERK) を活性化するTPAを作用させたところ、多数の突起を有する接着細胞へと転換した。細胞表面抗原の解析ではCD235a (赤芽球) の減少とCD61 (巨核芽球) の増加が認められた。RT-PCRの解析でも β トロンボグロブリンや血小板第4因子など血小板系への分化を示唆する遺伝子の上昇が認められた。更に、MEK1の活性化変異体をレンチウイルスベクターを用いてJAS-REN-Aに導入したところ、同様の形態変化を示した。これらは赤芽球と巨核芽球の系統転換にMAPK系が重要な働きを担っていることを示している。

3. 可塑性の平衡

JAS-RENおよびJAS-RAD細胞の幹細胞としての可塑性を検討した。それぞれの亜群細胞の代表的な表面マーカーであるCD235aおよびCD61を用いて、それぞれの陽性細胞及び陰性細胞分画を分離した。4細胞分画の細胞をそれぞれに培養を行い、各細胞分画から出現する細胞を30日間培養し、経時的にFACS解析した。表面抗原陰性分画群からは約2週間でソーティング前の細胞ポピュレーションに復帰したが、CD235a陽性分画からは陰性分画の細胞はほとんど出現しなかった。また、JAS-RADにおけるCD61陽性細胞と陰性細胞の群からも同様に、陰性分画群からは陽性細胞が出現するが、陽性分画群からの陰性細胞の出現はほとんどなかった。

そこで、低酸素やマトリックスなどの培養条件を骨髄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も関与しているものと解析を行っている。

II. 抗腫瘍薬の分子薬理学的研究

1. エピジェネティック機構と抗腫瘍効果

我々は白血病や網膜芽細胞腫について、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 (HDACI) の単独および他の薬剤との併用における抗腫瘍作用を研究してきた。チロシンキナーゼ阻害薬や放射線はHDACIとの併用によりその効果が強く増強されることが判明した。これらの機序はヒストンだけでなくp53の

アセチル化が関与していることを突き止めた。すなわち、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。HDACIs (バルブロン酸と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。

最近の研究では、エピジェネティックな修飾に関与する酵素の異常も数多く報告されている。エピジェネティックな調節機構の解明と共にそれらを制御する低分子化合物が開発されつつあり、これらの化合物の新たな抗腫瘍薬としての可能性を白血病細胞を中心に検討している。

2. DNAトポイソメラーゼI阻害薬耐性機構の検討

大腸がん由来細胞株を用いてカンプトテシンに対する耐性度の異なる細胞を作成した。これまでの研究により、低耐性度細胞は365アミノ酸に変異が導入されているが、新たに作成した株細胞の耐性はそれよりも100倍程度高いものであった。これらの耐性株における変異は初期に作成した365番目のアミノ酸変異に加えて、717番目のアミノ酸および412番目のアミノ酸に変異が導入されていた。そこで、これらの変異と薬剤耐性の生化学的意義をH2AXのリン酸化およびBiaCoreを用いた分子間結合で検討した。BiaCoreを用いたDNA、変異DNA Topoisomerase Iタンパク質およびカンプトテシンの分子間結合には差を見いだすことはできなかった。しかし、各耐性株をカンプトテシンで処理した場合のH2AXのリン酸化には差が認められ、変異とDNA障害の関連を検討している。

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 と直接相互作用をして、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進行性の神経変性疾患であり記憶障害、空間認識や注意力の低下、そして行動障害を伴う症候群である。病理組織学的には beta-Amyloid の沈着が目目される。これまでに認知や健忘とアルツハイマー病の関連は数多く検討されてきたが病初期におけるこれらの異常に関連しては不明な点が多く、また病勢の進行を予想する研究はほとんどない。

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は脳由来の因子であり神経細胞の成長や生存に関連する。また、BDNF はアルツハイマー病の進行にも関連すると考えられている。BDNF にはいくつかの一塩基多型 (SNP) が知られている。そこで、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。現在、AD 患者の臨床と関連すると思われる数個の遺伝子の遺伝学的な背景について検討している。

【点検・評価】

1. 点検

1) 研究

研究課題は①悪性腫瘍の診断および抗腫瘍薬の分子機構、②神経疾患の分子遺伝学的な解析である。

腫瘍に関しては腫瘍細胞自身の可塑性が薬剤耐性能の獲得に繋がると考えて研究を進めている。通常、臨症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、治療を含む増殖環境その他の影響によって腫瘍細胞は形質を転換するものと考えている。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の白血病細胞の分化・脱分化そして異なった細胞系列への転換について研究を進めている。この結果、巨核球と赤芽球の系統転換に関する分子機構の一端を明らかにすることができた。さらに、この転換に FLI-1 の isoform が重要であることを指摘できた。

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。本年度からはエピジェネティックな修飾に関連するであろう低分子化合物も対象に加えた。これらの薬剤の抗腫瘍効果の分子機構解明も研究課題である。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 の変異に伴う耐性度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を明らかにした。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考えている。

2) 学内への貢献

DNA シーケンシングの依頼件数は学内での分子生物学・遺伝学研究の活発化に伴い順調に増加している。本年度も研究者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。しかし、近年の臨床医学におけるゲノム情報の重要性から考えると、臨床医学関連の DNA シーケンシングの依頼は決して多いとはいえない。臨床教室への積極的な働きかけが必要と考えている。

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・実習を担当した。単なる教育参加ではなく、しかし、これからの慈恵医大の研究者を育てるという観点からのより積極的な取り組みが足りなかったと考えている。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。そして、学生・院生と教員がともに刺激し合える環境整備に取り組む必要がある。

2. 評価

本年度は学会発表が少なかった。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が、学会発表は他の研究者と直接に意見を交わすことのできる場であり、より積極的に学会発表を行わなければいけなかった。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。研究内容は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) Nagata T, Shinagawa S, Nukariya K, Nakayama R, Nakayama K, Yamada H. Association between nerve growth factor gene polymorphism and executive dysfunction in Japanese patients with early-stage Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2011; 32(6): 379-86.
- 2) Yamada O¹⁾, Ozaki K, Furukawa T¹⁾, Machida M¹⁾, Wang YH¹⁾, Motoji T¹⁾, Mitsuishi T¹⁾, Akiyama M, Yamada H, Kawauchi K¹⁾, Matsuoka R¹⁾ (¹Tokyo Women's Medical University). Activation of STAT5 confers imatinib resistance on leukemic cells through the transcription of TERT and MDR1. *Cell Signal* 2011; 23(7): 1119-27.
- 3) Nagata T, Shinagawa S, Nukariya K, Ochiai Y, Kawamura S, Agawa-Ohta M, Kasahara H, Nakayama K, Yamada H. Association between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphisms and executive function in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* 2011; 11(3): 141-9.

III. 学会発表

- 1) 河野 毅, 中山律子, 千葉美佳, 太田美幸, 山田 尚. 転写因子 FLI-1 の白血病細胞分化誘導における機能解析. 第128回成医会総会. 東京, 10月.
- 2) Yamada O¹⁾, Ozaki K, Akiyama M, Wang Y¹⁾, Kawauchi K¹⁾, Yamada H, Motoji T¹⁾ (¹Tokyo Women's Medical University). Measurement of telomere length using quantitative PCR in hematologic cells. 第73回日本血液学会学術集会. 名古屋, 10月. [臨血 2011; 52(9): 1323]