

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

急性骨髄性白血病（AML）の予後は腫瘍化の標的となった正常幹細胞や前駆細胞などの分化段階と遺伝子異常などによって規定される。AMLの内でも成人巨核芽球性白血病は極めて予後が悪く，通常の化学療法のみでは治癒は期待できない。我々は白血病細胞の分化系統転換に関して転写因子 FLI-1 と情報伝達系 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）を構成する。この 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. 巨核芽球系への可塑性に必要なシステム

クローン化 JAS-REN-A 細胞の MAP キナーゼ系を TPA および活性型 MEK で活性化させた。細胞は多数の突起を有する接着細胞へと転換し，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。 β トロンボグロブリンや platelet factor4 など血小板系への分化を示唆する遺伝子発現の上昇が認められた。しかし，赤芽球への分化を示す慢性骨髄性白血病細胞株 K562 と KU812 を用いた同様の実験では，十分な巨核芽球への分化を見いだすことはできなかった。そこで我々は転写因子 FLI-1 に注目してさらに検討を行った。

2. 巨核球分化に果たす FLI-1 isoform の役割の検討

K562 および KU812 では FLI1 の発現は isoform2 のみで isoform1 は認められなかった。両細胞に FLI-1 isoform1 と MEK1 の活性変異体をレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入したところ，単独導入でも接着細胞の増加と血小板への分化傾向が見られ，併用によりその傾向は増強された。また，巨核芽球への形質転換は NFE2 などの赤芽球系の転写因子の抑制を伴っていた。以上から，巨核芽球分化には FLI-1 の isoform1 が重要な働きを担っていることが明らかとなった。

3. 増殖環境と可塑性の平衡

細胞増殖および可塑性の調節と増殖環境の関連を検討した。増殖環境としてファイブロネクチンおよび酸素分圧を検討した。JAS-R 細胞の代表的な表面マーカーである CD235a および CD61 を使いファックスソーターを用いて 4 細胞分画（JAS-REN: CD235a+ CD61-/CD235a- CD61-）（JAS-RAD: CD235a+ CD61+/CD235a- CD61+）に分取し，正常ディッシュ，ファイブロネクチンディッシュ，さらに，20%酸素，1%酸素条件下で培養を行い，各細胞分画から出現する細胞を経時的に FACS 解析した。CD235a および CD61 陽性細胞群は 20%酸素条件では増殖が可能であったが，1%条件では，増殖が抑制される傾向にあった。さらに，CD235a および CD61 両陰性細胞群ではほとんどの細胞が分化傾向を示さずに陰性の形質を保っていた。

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明らかにしてきた。近年，全ゲノム解析から多くの腫瘍においてエピジェネティックな変化が重要であることが数多く報告されている。エピジェネティックな転写調節機構は細胞の運命を決定づける働きがあることは広く知られているので，がんの悪性度や薬剤耐性にも重要な働きを担っていることが想定される。

アセチル化ヒストンを認識し転写やゲノムの安定性に重要な遺伝子の一つに BRD4 がある。この BRD4 とヒストンとの会合を阻止する低分子化合物の開発が進んでいる。我々はその一つである I-BET151 について，白血病，多発性骨髄腫，更に乳癌に対する増殖抑制効果を検討している。I-BET151 は急性単球性白血病細胞株（JAM911）の増殖を強く抑制する。JAM911 は予後不良な MLL-AF9 の遺伝子変異を有する細胞株であり，この種の白血病への効果が期待できるものと考えている。

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421番目のアミノ酸に変異が導入されていた。全ての変異を有するDNA Topoisomerase Iの活性は最大で1/8まで低下していた。興味あることに、421番目のアミノ酸変異は自然界においてカンプトテシンを産生する植物のそれと同様なものであった。

3. 電離放射線障害とテロメラーゼ活性の関連

テロメアとテロメラーゼは従来から考えられてきた染色体末端の保護作用と老化の指標としての働きに加え、DNA損傷に対する修復機能に関連することが明らかになりつつある。放射線治療は網膜芽細胞腫に対する重要な治療手段であるが患児に対する二次的な障害等を考慮して、その照射線量は極力抑えることが理想である。このような状況から、我々は網膜芽細胞腫の細胞株を用いて、線量とDNA損傷の程度、そして、テロメラーゼ活性とその活性化に関連したシグナル系について検討を加えた。放射線量は10Gyを境として低線量ではhTERTのAKTによるリン酸化が優位であるが、10Gyを超えた状況ではhTERTのPP2Aによる脱リン酸化が優位な状況であり、DNA損傷の程度に応じてテロメラーゼの活性に変化が生じていることを見いだした。

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、Survival Motor Neuron 1 (SMN1) 遺伝子の欠損または変異によって起こり、小児科領域では頻度が多く、脊髄の運動ニューロンが特異的に進行性に変性脱落をきたす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、SMN2 遺伝子は第7エクソン上の一塩基の違いから全長のメッセンジャーRNAが少量しか作られず、その少量のmRNAからは機能的なSMNタンパク質が健康人の20~30%しか作られないため、SMAの発症を防ぐことができない。これまでの我々の研究成果より、上記のSMN2の転写産物上の第7エクソンの6番目の塩基チロシン (SMN1ではシトシン) は、RNA結合タンパク質であるhnRNP A1/A2に依存的なエクソン性のスプライシング・サイレンサー (ESS) を形成することが解った。スプライシング反応に抑制的に作用する

hnRNP A1/A2がこのESSを介して第7エクソンのスプライシング反応を抑制して、SMN2から転写されるSMNのmRNAにはエクソン7がほとんど含まれていない。*In vivo*でRNAiの技法を使ってA1そしてA2の発現量を著しく減少させると、エクソン7のスプライシングが促進する。

この結果を基に、RNAiによるA1/A2の発現量の減少がSMNの発現量の増加につながるのではないかと考え、SMA患者由来の繊維芽細胞株を使って、RNAiの実験を試みた。その結果、hnRNP A1をノックダウンすると、予想通りにSMNのエクソン7のスプライシングは促進し、SMNタンパク質の産生量は増加した。一方で、hnRNP A2を特異的にノックダウンさせると、驚いたことにエクソン7のスプライシングは促進したが、SMNの産生量は著しく減少した。その後、このA2の減少に基づくSMNの産生量の減少がどのように制御されているかを分子生物学的解析法で解明を進めた。A2に対する特異的なRNAiの効果によって、SMN2遺伝子からの転写活性はGAPDH遺伝子に比べて減少していなかった。次に、特異的なA2の発現量の減少効果が、SMN2のmRNAの安定化に及ぼす影響を解析した。その結果、mRNAの安定性には影響を及ぼしていなかった。次に、リボゾームとSMN2のmRNAとの相互関係を探るべく、細胞質抽出液をシヨ糖濃度勾配分画法を使って分析した。その結果、A2に特異的なRNAi処理後SMN2のmRNAとポリリボゾームとの分子間相互作用は、何も処理していないサンプルに比べて租になっていることが解った。このことは、SMNのmRNAが効果的に翻訳されるためには、hnRNP A2がmRNAとリボゾームとの分子間相互関係には必要であることが解った。

現在までに、SMNのタンパク質発現までの過程において、最初に記載したエクソン7のスプライシングの調節機構やバルブロン酸が作用していると考えられるSMN1/2遺伝子の転写機構については様々な小分子が開発され、臨床試験が行われたが、効果的な薬はまだ存在しない。今回の我々の発見した新しいSMN産生の調節機構はこれからのSMAの薬の開発に於いて、新しい薬剤のターゲットとなりえることが期待される。この研究は、文部科学省の科学研究費補助金の支援を受けて行われている。

2. 認知症の遺伝学的検討

アルツハイマー病 (AD) 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。これまでに認知や

健忘とADの関連は数多く検討されてきたが病初期の病勢の進行を予想する研究はほとんどない。

我々はBrain-derived neurotrophic factor (BDNF) や Neurotrophin-3 の一塩基多型(SNP)に注目して、Amnesic mild cognitive impairment (A-MCI) と Mild AD の相違を検討している。その結果、一塩基多型が前頭脳機能の病勢進行とに関連する結果を見出した。

〔点検・評価〕

1. 点検

1) 研究

研究は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、治療を含む増殖環境変化は腫瘍細胞の形質を転換するものと考えている。すなわち、通常増殖の腫瘍細胞の幹細胞化である。我々が樹立した巨核芽球性白血病細胞株 JAS-R は骨髓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系統転換が可能であることを見だし、更に、巨核球と赤芽球の系統転換に 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 Bromodomain とヒストンとの会合を阻害する低分子化合物にも研究を開始した。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、更に、電離放射線とテロメラーゼの関連について、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。病初期における患者の前頭葉機能と BRDF をはじめとする遺伝子多型について興味ある結果を得ることができた。

2) 学内への貢献

DNA シーケンシングの依頼件数は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。本年度、次世代シーケンサーが導入された。幅広く、学内の研究に役立てていただけるように準備を進めている。

3) 教育

各教員が学部・大学院への教育・実習を担当した。学生・院生の側からのニーズと教員側からの学問的興味にやや乖離が見られる点があった。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

学会発表、論文数共に満足のいくものではなかった。広く、世界と交流を図り、研究を進める必要がある。また、研究費の獲得も十分ではなかった。成果を出して、次のステップに進めるように努力しなければいけない。また、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) Hayashi T, Gekka T, Kozaki K, Ohkuma Y, Tanaka I, Yamada H, Tsuneoka H. Autosomal dominant occult macular dystrophy with an RP1L1 mutation (R45W). *Optom Vis Sci* 2012; 89(5): 684-91.
- 2) Kobayashi N, Nagata T, Shinagawa S, Nakayama R, Kondo K, Nakayama K, Yamada H. Association between neurotrophin-3 polymorphisms and executive function in Japanese patients with amnesic mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2012; 34(3-4): 190-7.
- 3) Nagata T, Shinagawa S, Nukariya K, Yamada H, Nakayama K. Association between BDNF polymorphism (Val66Met) and executive function in patients with amnesic mild cognitive impairment or mild Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2012; 33(4): 266-72.
- 4) Kobayashi N, Nagata T, Shinagawa S, Oka N, Shimada K, Shimizu A, Tatebayashi Y, Yamada H, Nakayama K, Kondo K. Increase in the IgG avidity index due to herpes simplex virus type 1 reactivation and its relationship with cognitive function in amnes-

tic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 2013; 430(3): 907-11.

- 5) Nagata T, Shinagawa S, Kuerban B, Shibata N, Ohnuma T, Arai H, Nakayama K, Yamada H. Age-related association between apolipoprotein E ϵ 4 and cognitive function in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2013; (1): 66-73.

III. 学会発表

- 1) 荒川泰弘, 山田 尚. DNA トポイソメラーゼ I 同一分子内に 3 箇所の変異をもつ, カンプトテシン高度耐性大腸癌細胞株. 第 71 回日本癌学会学術総会. 札幌, 9 月.
- 2) Yamada O¹⁾, Ozaki K, Akiyama M, Kawachi K¹⁾, Yamada H, Motoji T¹⁾ (¹Tokyo Women's Medical Univ), Vainshenker W (Inst Natl Sante Recherche Med). Emergence of CML in a PMF patient with JAK2V617F mutation before therapeutic manipulation. 第 74 回日本血液学会学術集会. 京都, 10 月.
- 3) Kashima T, Nakayama R, Agawa-Ohta M, Yamada H. hnRNP A2 mediated transcriptional control of survival motor neuron; Cellular fuction of RNA binding protein hnRNP A2. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡, 12 月.

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：秋山 暢丈 免疫学, 分子生物学
 准教授：黒坂大太郎 臨床免疫学
(兼任)
 講師：大野 裕治 免疫薬理学
(兼任)

教育・研究概要

I. インターロイキン 31 の機能解析 Functional analysis of interleukin (IL)-31

インターロイキン 31 (IL-31) は, T 細胞から産生され, かゆみや脱毛を誘発し, アトピー性皮膚炎や気管支炎などのアレルギー疾患に関与するサイトカインである。

IL-31 の機能を解析するために作製した IL-31 過剰発現 (IL-31Tg) マウスにおいては, これまで報告されてきた激しい搔痒行動および脱毛の他に, 抗原非特異的 IgE 抗体産生の増強が認められた。IL-31Tg で観察された多面的機能は, リコンビナント IL-31 (rIL-31) を正常マウスに投与することで検証している。さらに, M2 マクロファージが IL-31 の標的細胞となり Th2 細胞への分化を促すことで, 抗原非特異的 IgE 抗体産生の増強が誘導されることが示唆された。

一方, 当研究部では IL-31 または IL-31RA のかわりにレポーター遺伝子 LacZ をノックインしたマウス, IL-31-LacZ ノックインマウス 2 系統と IL-31RA-LacZ ノックインマウス 2 系統を作成している。現在遺伝的背景を均一にするために戻し交配をしている。IL-31RA-LacZ ノックインヘテロマウスでは, X-gal 染色により毛根部に IL-31RA が強く発現していることを観察している。さらに, IL-31RA-LacZ ノックインマウスでは, rIL-31 投与により脱毛症状が認められないことを確認している。今後は, アトピー性皮膚炎の症状発現に IL-31 がいかに関与するのか, 他の炎症細胞を含めて IL-31 の機能を解明したい。

II. スギ花粉症緩和米を用いた第一相臨床研究

スギ花粉症緩和米の安全性については, エームス試験, 染色体異常試験, 小核試験, マウス 13 週間反復投与毒性試験, カニクイザル 26 週間反復投与毒性試験, ラット生殖・発生毒性試験において, 対照 (遺伝子非組換えキタアケ米) との比較により確認している。