

## 分子遺伝学 研究部

教授：山田 尚 分子腫瘍学，血液学

### 教育・研究概要

#### I. 発がん性に関する分子腫瘍学的研究

##### 1. 増殖環境と可塑性の平衡

急性骨髄性白血病（AML）は正常造血幹細胞や前駆細胞に様々な遺伝子異常が生じ発症する。その臨床病態は両者の性質によって規定される。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。JAS-R における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 の代表的な表面マーカーである CD235a および CD61 を使い細胞を 4 分画（JAS-REN: CD235a+CD61-/CD235a-CD61-）（JAS-RAD: CD235a+CD61+/CD235a-CD61+）に分離し、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 解析して環境に伴う各細胞群の運命を検討した。1%酸素下，ファイブロネクチンディッシュで培養した場合に CD235a-CD61+ 陽性細胞群が最も多くなり，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。これらの結果を白血病の増殖母体である骨髄と比較すると興味深い結果である。造血幹細胞ニッチは白血病細胞にとっても重要な環境であることが推察され，このニッチに対する修飾も治療上考慮しなくてはいけない点と考える。

#### 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。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報告されている。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。急性単球性白血病細胞株（JAM911）は予後不良な MLL-AF9 の遺伝子変異を有する細胞株である。JAM911 は I-BET151 の暴露により G1 期停止をを起こし，更にアポトーシスに陥る。この効果は時間依存性であった。I-BET151 で処理された細胞においては様々な遺伝子の発現が変化し，とりわけ，c-MYC の発現抑制が顕著であった。更に，抗腫瘍効果の分子機構を検討するために，単球性白血病細胞株 U937 を用いて I-BET151 に対する耐性株の作成を行った。低濃度の I-BET151 からスタートし，薬剤濃度を徐々に上げて作成した。現在までに親株に対して 100 倍以上の耐性を示している。

##### 2. DNA トポイソメラーゼ I 阻害薬耐性機構の検討

DNA トポイソメラーゼ I を標的にした抗腫瘍薬としてカンプトテシンやインドカルバゾール系薬剤がある。我々は今までにカンプトテシン抵抗性大腸がん細胞 DLDSNR6 を作成し Gly365Ser 変異の存在を報告してきた。今回，この細胞の薬剤耐性を更に高め，その分子生物学的な変化を検討した。この細胞は 30 $\mu$ M のカンプトテシン存在下で増殖が可能であるが，その増殖速度は極めて遅延したものであった。また，従来の変異に加えて，Gly717Arg 変位を有し，さらに一部の細胞では Gln421Arg が認められた。全ての変異を有する細胞では DNA トポイソメラーゼ I の活性は最大で 1/8 まで低下していた。これらの 3 か所の変異を有する細胞はインドカルバゾール系薬剤に対しても最も強い抵抗性を示した。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

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てきた。DNA 損傷に対し修復関連因子がアクセスするためにはクロマチンの構造変換が必要であり，この変化は DNA 損傷応答の開始と修復機転に極めて重要なステップであろう。クロマチン構成タンパクの 1 つであるヒストン H2AX は，放射線により損傷を受けるとリン酸化されるだけでなく，アセチル化も誘導される。ヒストン H2AX のアセチル化はプロモドメインによって認識され，BET を介したクロマチン構造変換関連因子の誘導によりクロマチンの構造変換が生じる。そこで，I-BET151 が照射線照射の効果をどのように修飾するかを検討している。

### 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変異によって起こり, 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。

いままでの研究で, スプライシング因子である hnRNP A2 は SMN2 の第 7 エクソンの制御に hnRNP A1 と共に関わっているだけでなく, 単独で SMN1 及び SMN2 の SMN タンパク質への転写効率の制御に関与していることが示唆された。線維芽細胞に於いて, RNAi による A2 の特異的ノックダウンは SMN の発現量の著しい減少を招く。RT-PCR アッセイ法やウリジンのアナログによるパルスラベル法による解析の結果, 転写活性のレベルでは, SMN と GAPDH (コントロール) 遺伝子間に差は見られなかったが, メチオニンのアナログによるパルスラベル法による解析では, SMN のタンパク質産生量はコントロールに比べて明らかに減少している事が解った。更に, リボゾームと SMN2 の mRNA との相互関係を調べるため, 細胞質抽出液をショ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為には, 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。また, hnRNP A2 は RNA 結合タンパク質であるため, タグを付加した A2 タンパク質を強制発現し, そのタグを基に A2 に関わる RNA-タンパク質の複合体を分離精製し, RT-PCR 法で SMN1/2 の mRNA との関連を調べた。その結果, A2 と SMN1/2 の mRNA は直接相互関係していることが解った。更に, この複合体を MALDI-TOF 質量分析器で解析した結果, A2 は他の RNA 結合タンパク質 hnRNP C1/2 や hnRNP M と相互関係していることが解った。更に詳しく調べてみると, A2 と C1/2 や M とのかかわりは RNA 依存性の相互関係であることが解った。A2 が SMN1/2 の mRNA との結合部位を RNA プルダウン法で解析してみると, mRNA も 3'-非翻訳領域に存在する A2 の結合コンセンサス配列にきわめて近い UUUAGG (A) に結合していることが解った。この配列を含まない 3' 非翻訳領域はルシフェラーゼアッセイ法では, 転写効率が減少することが解り,

A2 の結合配列は SMN 遺伝子上だけでなく他の遺伝子上でも翻訳活性を促進する働きがあることが解った。これらの結果から, SMN (1/2) 遺伝子の発現に於いて, 効果的な SMN のタンパク質産生には hnRNP A2 そして hnRNP C1/2 は必要不可欠であることが示唆された。また, SMN の mRNA の 3'-非翻訳領域にある A2 の結合配列は翻訳上の促進配列 (Translation Enhancer Sequence, TES) として働いていることが解った。

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。最近, hnRNP A2 の突然変異による家族性の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) が同定され, 我々の上記の結果から, A2 の減少と運動神経細胞の変性への SMN の関わりが今後議論されるであろう。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た。

#### 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。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 の相違を検討してきたが, さらにこれらの遺伝子のエピジェネティックな状態と疾病との関連を検討している。

### 「点検・評価」

#### 1. 点検

##### 1) 研究

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, が研究の中心である。腫瘍に関しては造血管腫瘍, 網膜芽細胞腫について, その分子病態の解明を遺伝情報の解析から取り組んでいる。本年度は次世代シーケンサーを用いた腫瘍遺伝子の網羅的解析を白血病を中心に解析した。また, 腫瘍細胞の薬剤抵抗性の獲得と腫瘍細胞の可塑性との関連についてセルソーターを用いて分離した細胞を様々な環境条件で培養することにより可塑性の仕組みを解明しようと試みた。

抗腫瘍薬の研究では, Bromodomain 阻害薬の研究を行っている。これらの低分子化合物は一部の造血管腫瘍に対して, 極めて低濃度で増殖を抑制する。その機序を網羅的遺伝子発現の解析から検討している。また, 他の薬剤との併用効果に関しても検討を

加えることができた。

これらの研究の成果は将来の当該疾患の治療に有用であろう。

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。その分子機構についても詳細な研究を進めることができた。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た。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。また、眼科との共同研究で網膜疾患や角膜疾患に関連した遺伝学的な研究を加えることができた。

## 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。この方法は研究に使用する培養細胞の正統性を担保する最も信頼性のある方法で学内研究の信頼性確保に貢献しているものと考えている。次世代シーケンサーは本格的な運用が開始され、解剖学講座、小児科学講座など学内グループとの共同研究を進めた。

## 3) 教育

学部教育では、教員各自が実習、演習、チュートリアルおよび講義を担当して教育に参加した。大学院教育では共通カリキュラムの一部を担当し、また、大学院生の研究指導を行っている。

## 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。研究結果の発表に問題があったと考える。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と考えている。また、基礎講座とは異なる立場なので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) Arakawa Y, Ozaki K, Okawa Y, Yamada H. Three

missense mutations of DNA topoisomerase I in highly camptothecin-resistant colon cancer cell sublines. *Oncol Rep* 2013; 30(3): 1053-8.

2) Nagata T, Shibata N<sup>1)</sup>, Shinagawa S, Nakayama R, Kuerban B<sup>1)</sup>, Ohnuma T<sup>1)</sup>, Arai H<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ), Nakayama K, Yamada H. Genetic association between Neurotrophin-3 polymorphisms and Alzheimer disease in Japanese patients. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2013; 3(1): 272-80.

3) Akiyama M, Ozaki K, Kawano T, Yamada O<sup>1)</sup>, Kawauchi K<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Women's Medical Univ), Ida H, Yamada H. Telomerase activation as a repair response to radiation-induced DNA damage in Y79 retinoblastoma cells. *Cancer Lett* 2013; 340(1): 82-7.

4) Shibata N<sup>1)</sup>, Nagata T, Shinagawa S, Ohnuma T<sup>1)</sup>, Shimazaki H<sup>1)</sup>, Komatsu M<sup>1)</sup>, Kuerban B<sup>1)</sup>, Tomson K<sup>1)</sup>, Nakayama K, Yamada H, Arai H<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ). Genetic association between APOA1 and APOD polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Neural Transm* 2013; 120(11): 1599-603.

5) Ohkuma Y, Hayashi T, Sakai T, Watanabe A, Yamada H, Akahori M<sup>1)</sup>, Itabashi T<sup>1)</sup>, Iwata T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>National Institute of Sensory Organs), Noda T (National Hosp Organization Tokyo Medical Center), Tsuneoka H. Retinal angiomatous proliferation associated with risk alleles of ARMS2/HTRA1 gene polymorphisms in Japanese patients. *Clin Ophthalmol* 2014; 8: 143-8.

6) Ogasawara M, Matsumoto Y<sup>1)</sup>, Hayashi T, Ohno K, Yamada H, Kawakita T<sup>1)</sup>, Dogru M<sup>1)</sup>, Shimazaki J (Tokyo Dental College), Tsubota K<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Keio Univ), Tsuneoka H. KRT12 mutations and in vivo confocal microscopy in two Japanese families with Meesmann corneal dystrophy. *Am J Ophthalmol* 2014; 157(1): 93-102.

### III. 学会発表

1) Yamada H, Agawa M, Arakawa Y, Ozaki K, Kawano T, Yamada J. The bromodomain inhibitor I-BET151 blocks growth of MLL-AF9 harboring JAM911 cells. 第75回日本血液学会学術集会. 札幌, 10月. [臨血 2013; 54(9): 1139]