

- 2) Okano HJ. Impaired axonal transport in Purkinje cells of HuC knockout mice. Neuroscience 2014 (Society for Neuroscience 2014 Annual Meeting). Washington D.C., Nov.

IV. 著 書

- 1) 岡野ジェイムス洋尚. 第1章：神経細胞内病態と脳内環境 5. 遅発性小脳失調症モデル動物にみられる軸索変性の病態. 高橋良輔¹⁾, 漆谷 真¹⁾ (¹京都大), 山中宏二 (名古屋大), 樋口真人 (放射線医学総合研究所) 編. 遺伝子医学 MOOK 26: 脳内環境－維持機構と破綻がもたらす疾患研究. 大阪：メディカルドゥ, 2014. p.48-52.

基盤研究施設（分子遺伝学）

教 授：山田 尚 分子腫瘍学・血液学

教育・研究概要

I. 発がんに関する分子腫瘍学的研究

1. 白血病の分子機構

骨髄増殖性腫瘍（MPN）は慢性骨髄性白血病（CML）、真性多血症（PV）、骨髄線維症（MF）、本態性血小板増多症（ET）に代表される慢性の血球増殖をきたす疾患である。近年、各病態に特徴的な遺伝子異常が報告されその発がん機構と共に、分子治療薬の開発が成功している疾患群でもある。しかし、各疾患間には相互のオーバーラップも知られ、臨床病態の理解と治療の選択が難しい症例も存在する。この様な症例に対しても遺伝子検査が重要で、その結果は治療の選択や病態の理解に有用である。我々は JAK2V617F 変異を有する MF 症例に新たに BCR-ABL 変異を獲得した症例を経験した。本症例における変異クローンの出現過程および治療によるクローンの消失過程を検討し、MPN における疾患相互の関連および増殖性の特徴を明らかにした。

また、我々は先天性疾患に合併した白血病に対して、次世代シーケンサーを用いた腫瘍遺伝子の網羅的な変異解析を行っており、診断の難しい疾患や病態の解析が難しい疾患に関して分子遺伝学的検討を加えている。

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。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発がんにおいて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働きを担っている遺伝子としてプロモドメインを有する遺伝子群がある。このうちでも悪性腫瘍の領域では BRD4 の働きが注目されている。BRD4 はアセチル化ヒストンと会合するがこ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1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。JAM911 は我々が樹立した MLL-AF9 の転座を有する白血病細胞株であ

り I-BET151 の暴露により G1 期停止を起こし、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する。とりわけ、c-MYC の発現抑制は顕著であり、この変化が増殖抑制に重要な働きを担っていると考えられる。I-BET151 の抗腫瘍効果をさらに詳細に検討するため、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耐性株を作成した。現在、親株に対して 100 倍以上の耐性を示している。本耐性株細胞では I-BET151 の投与に伴い親株で認められる c-MYC や BCL2 の抑性は起こらない。また、この耐性に多剤耐性遺伝子の関与は考え難く、その耐性獲得の機序は現在のところ不明である。耐性機構の 1 つの可能性としては、増殖に関して耐性株細胞では親株とは異なる情報伝達系の関与があるものと想定している。

Ⅲ. 分子神経学的研究

1. 脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy: SMA) に関する研究

SMA は、Survival Motor Neuron 1 (SMN1) 遺伝子の欠損または変異により、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。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、機能的な SMN タンパク質が健康人の 20~30% しか作られない。このため、SMA の発症を防ぐことができない。これまでの研究成果より、異常 SMN2 mRNA 転写は、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) の形成が主たる原因であった。しかし、RNAi を使って A1 そして A2 の発現量を著しく減少させると、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 タンパク質への翻訳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いた。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と、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粗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必要なことを示している。更に、A2 と SMN1/2 の mRNA は直接的に相互関係していることが解った。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も判明した。A2 と 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も判明した。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。

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。BDNF のプロモーター領域のメチル化を AD と正常コントロールとの間で検討すると、AD に於ける同部位のメチル化は正常群に比べ優位に高いことが判明した。さらに精神神経学的な検査結果との間には逆相関の関係があることが判明した。このことはメチル化に代表されるエピジェネティックな制御機構の破たんが AD の発症に関与することを示している。今後は他の精神的な検査マーカーとの関連に関して研究を進める予定である。

「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、の2つの柱を中心に研究を進めた。腫瘍に関しては造血器腫瘍、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。白血病について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行った。また、腫瘍細胞の薬剤抵抗性の獲得と最適化併用化学療法の開発を行った。

抗腫瘍薬の研究では、Bromodomain and Extra-terminal domain protein (BET) 阻害薬の研究が主である。この低分子化合物は一部の造血器腫瘍に対して、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ている。本年度はBET阻害薬に対する耐性株の作成、並びに耐性機序の解析を行った。これらの研究成果は将来の白血病をはじめとする悪性腫瘍の治療に有用であろう。これらの結果は日本血液学会の総会で発表した。

SMA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。

AD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BDNF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。さらにADとBDNFプロモーター領域のメチル化との関連についても研究を進展させた。また、眼科との共同研究では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、個体識別検査も順調に推移している。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でき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、法医学講座、悪性腫瘍治療

研究部など学内グループの研究進展に寄与できていると考える。

3) 教育

学部教育では、教員各自が得意分野における実習、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（バイオインフォマティックス）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、論文数共に満足のものではなかった。研究結果発表に対する積極性に問題があったと考える。広く内外の学会活動に参加して研究を進める必要があると考えている。また、研究費の獲得も十分ではなかった。成果を発表して多くの研究者と議論を深め、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。その第一歩として腫瘍・血液内科との間で組織バンクに関する試みをスタートさせている。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Nagata T, Kobayashi N, Shinagawa S, Yamada H, Kondo K, Nakayama K. Plasma BDNF levels are correlated with aggressiveness in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *J Neural Transm* 2014; 121(4): 433-41.
- 2) Takahashi H¹⁾, Hayashi T, Tsuneoka H, Nakano T, Yamada H, Katagiri S, Fujino Y (Tokyo Kosei Nenkin Hosp), Noda Y (Univ of Tokyo), Yoshimoto M (Tokyo Teishin Hosp), Kawashima H¹⁾ (¹Jichi Medical Univ). Occult macular dystrophy with bilateral chronic subfoveal serous retinal detachment associated with a novel RP1L1 mutation (p.S1199P). *Doc Ophthalmol* 2014; 129(1): 49-56.
- 3) Nagata T, Kobayashi N, Ishii J, Shinagawa S, Nakayama R, Shibata N¹⁾, Kuerban B¹⁾, Ohnuma T¹⁾, Kondo K, Arai H¹⁾ (¹Juntendo Univ), Yamada H, Nakayama K. Association between DNA methylation of the BDNF promoter region and clinical presentation in Alzheimer disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2015; 5(1): 64-73.
- 4) Yamada O¹⁾, Mahfoudhi E²⁾, Plo I²⁾, Ozaki K, Nakatake M¹⁾, Akiyama M, Yamada H, Kawauchi K¹⁾ (¹Tokyo Women's Medical Univ), Vainchenker W²⁾

(²INSERM, UMR). Emergence of a BCR-ABL translocation in a patient with the JAK2V617F mutation: evidence for secondary acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F clone. J Clin Oncol 2014; 32(21): e76-9.

- 5) Tamai M, Kawano T, Saito R, Sakurai K, Saito Y, Yamada H, Ida H, Akiyama M. Phosphoglycerate kinase deficiency due to a novel mutation (c. 1180A>G) manifesting as chronic hemolytic anemia in a Japanese boy. Int J Hematol 2014; 100(4): 393-7.

Ⅲ. 学会発表

- 1) Hishiki H, Agawa M, Arakawa Y, Ozeki K, Yamada J, Yamada H. Analysis of bromodomain inhibitor I-BET151 resistance U937 cells. 第76回日本血液学会学術集会. 大阪, 10月. [臨血 2014; 55(9): 1432]
- 2) Akiyama M, Yamaoka M, Terao Y, Ohyama W, Yokoi K, Yamada O, Takita J (Univ of Tokyo), Yamada H. Molecular characteristics of cup-like acute myeloid leukemia in a girl with Maffucci syndrome. 第76回日本血液学会学術集会. 大阪, 10月. [臨血 2014; 55(9): 1426]

基盤研究施設 (分子細胞生物学)

教授: 馬目 佳信	分子細胞生物学・脳神経科学
教授: 坪田 昭人	肝臓病学
准教授: 岩本 武夫	生化学・分子生物物理
准教授: 立花 利公	微細形態学
講師: 池田 恵一	分子細胞生物学・内分泌学
講師: 藤岡 宏樹	分析化学

教育・研究概要

I. 脳腫瘍細胞へのドラッグデリバリー

昨年度まで超音波を用いた脳腫瘍細胞への核酸デリバリーを行う装置を開発してきた。本年度は別な機械的刺激による腫瘍細胞へのドラッグデリバリーについて検討した。細胞内に遺伝子やタンパクなどの高分子を導入することは分子細胞生物学上非常に重要な技術である。従来、遺伝子においてはウイルスベクターなど生物学的性質を利用した方法が用いられてきたが、安全性の問題や遺伝子操作に伴う問題等からタンパクやドラッグ等を直接導入する方法の開発も盛んになっている。これまでウイルスを用いない方法としてはマイクロバブルと併用した超音波や電気穿孔法を用いていたが、今回、細胞膜に増感剤を含んだナノ剣山を圧迫し、物理エネルギーを照射して穿孔する方法の導入効率、導入過程を微細学的に検討した。その結果、一過性の膜穿孔の過程が明らかとなった。

II. 胆管がん細胞の化学療法剤への挙動

胆管がんは、胆管上皮から発生する比較的にまれな悪性腫瘍であるが2012年、20～30歳前後の印刷会社の元従業員に、胆管癌が多発して死亡していることが明らかになった。使用していた大量の洗浄剤に含まれる化学物質「ジクロロメタン」「1,2ジクロロプロパン」との関連が指摘されており対策が望まれている。このような疾患の発生原因や治療方法を調べるため分子細胞生物学的アプローチは有用であるが、胆管がんについては生化学的性質と微細形態が共に明らかにされている細胞株は少ないのが問題である。本年度、本学で樹立された細胞株について微細形態と化学療法剤ゲムシタビンの代謝に関する鍵エンザイムを測定した。