

ence: RNA Metabolism in Neurological Disease. Chicago, Oct.

- 3) 岡野ジェイムス洋尚, (シンポジウム 30: 幹細胞技術を応用した分子・病態解析) 霊長類疾患モデルの作製と解析, 治療戦略の開発, 第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, 3 月.

#### IV. 著 書

- 1) 岡野ジェイムス洋尚, 1 章: 神経科学の基礎 3. 学習と再学習に関わる領域 ②可塑性の実態 神経再生に関わる可塑性の分子基盤, 里字明元<sup>1)</sup>, 牛場潤一<sup>1)</sup> (<sup>1</sup> 慶應義塾大) 監修, 神経科学の最前線とリハビリテーション: 脳の可塑性と運動, 東京: 医歯薬出版, 2015, p.40-4.

### 基盤研究施設 (分子遺伝学)

教 授: 山田 尚 分子腫瘍学・血液学  
准教授: 鐘ヶ江裕美 分子ウイルス学・遺伝子治療

#### 教育・研究概要

##### I. 抗腫瘍薬の分子薬理学的研究

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。

我々はその一つである, Bromodomain and Extra-terminal domain protein (BET) 阻害薬の I-BET151 について白血病, 多発性骨髄腫, さらに乳癌に対する増殖抑制効果を検討している。I-BET で処理された細胞においてはさまざま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。我々は, 単球系白血病細胞株 U937 細胞を用いて I-BET151 に対する耐性株 (U-937R 細胞) の作製に成功した。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 の抑制は起こらない。ChIP 解析の結果よりこの耐性化の機構には, 細胞増殖に関与する MAPK, PI3K 及び NF $\kappa$ B が関与している可能性が示唆された。そこで, インヒビターを用いた薬剤感受性を評価した結果, 特に NF $\kappa$ B への依存性が強く認められた。また, U937R 細胞では BRD4 蛋白質が高度に発現していたことも明らかになり, I-BET151 に対する耐性能獲得にはプロモドメイン蛋白質が関与していた可能性も強く示唆された。

##### II. 発がんに関する分子腫瘍学的研究

我々は, 先天奇形症候群に合併した悪性腫瘍の発生メカニズムを解明するために, 次世代シーケンサーを用いた Cancer Panel による網羅的癌関連遺伝子の解析を進めている。特に, Maffucci 症候群

に合併した急性骨髄性白血病, Gorlin 症候群に発症した髄芽腫, Phacomatosis pigmentokeratotic に合併した Wilms 腫瘍などの遺伝子解析を行った。

### Ⅲ. アデノウイルスベクターを用いた発現制御システムの開発

アデノウイルスベクターは多くの細胞に効率的に遺伝子導入が可能であり、遺伝子治療を始め基礎研究においても有用性が高いベクターである。我々は、アデノウイルスベクターを用いた発現制御システムの開発を進めており、特に iPS 細胞からの神経細胞分化誘導効率化と B 型肝炎ウイルス (HBV) に対する治療法の開発を行っている。細胞分化誘導においては、多くの分化誘導遺伝子の発現は誘導時のスイッチとして働く時のみ必要であり、短期間に高度に発現することが誘導効率の上昇と癌化リスクの低下の観点から重要である。また、iPS 細胞からの誘導においては目的の神経細胞に分化誘導された細胞の濃縮も必須であり、未熟な細胞を排除するための発現制御システムの開発も進めている。

HBV による B 型肝炎は、肝細胞癌への移行がハイリスクであり、HBV の完全排除が望ましいが、環状 2 本鎖 DNA (cccDNA) として核内にウイルスゲノムが安定に保持されており、この cccDNA の排除が必須である。本研究では、HBV ゲノム複製を高効率に検出するシステムの開発とゲノム編集技術を応用した cccDNA の完全排除及び抗 HBV 薬のスクリーニングを進めている。

#### 「点検・評価」

##### 1. 研究

本年度は、悪性腫瘍の診断および抗腫瘍薬と神経疾患の分子遺伝学的な解析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。

抗腫瘍薬の研究では、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おり、耐性細胞への感受性を示す薬剤も複数同定した。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ると考えており、これらの結果は日本血液学会の総会で発表した。

またアデノウイルスベクターの研究については、アデノウイルスベクターを用いた場合に運動ニュー

ロンへの誘導効率が通常法と比べて 7 倍上昇することを示した。B 型肝炎治療法の開発については、cccDNA を 90% 以上排除可能な CRISPR/Cas9 システムの確立に成功するとともに、HBV の逆転写阻害薬についても候補の同定に成功した。これらの結果は、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会) 及び 2015 International Meeting Molecular Biology of Hepatitis B Viruses で発表した。

##### 2. 学内への貢献

本施設では、DNA シークエンス及び個体識別検査の受託とともに、次世代シークエンサー、セルソーター及び X 線照射装置の管理・運営を業務として行っている。DNA シーケンシングの依頼件数は順調に増加しており、今年度は 8,000 件以上の解析を問題なく終了し提供した。また、固体識別検査も 200 件以上の依頼があり、順調に推移している。次世代シークエンサーは本格的な運用が開始され、70 件以上の解析を行い、セルソーターについても順調に利用が増えている。これらの共通機器の管理・運営は今年度おおむね順調に推移し、学内の研究の進展に寄与できたと考えている。

##### 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。

## 研 究 業 績

### I. 原著論文

- 1) Akiyama M, Yamaoka M, Terao MY, Ohshima W, Yokoi K, Arakawa Y, Takita J (Univ Tokyo), Suzuki H, Yamada H. Somatic mosaic mutations of *IDH1* and *NPM1* are associated with cup-like acute myeloid leukemia in a patient with Maffucci syndrome. *Int J Hematol* 2015; 102(6): 723-8.
- 2) Akiyama M, Yamaoka M, Terao MY, Yokoi K, Inoue T, Hiramatsu T, Ashizuka S, Yoshizawa J, Katagi H, Ikegami M, Ida H, Nakazawa A<sup>1)</sup>, Okita H<sup>1)</sup>, Matsumoto K<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Natl Ctr Child Health Development). Paraneoplastic syndrome of angiomatoid fibrous histiocytoma may be caused by *EWSR1-CREB1* fusion-induced excessive interleukin 6 production. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37(7): 554-9.

- 3) Suzuki T<sup>1)</sup>, Kikuguchi C<sup>1)</sup>, Sharma S<sup>1)</sup>, Sasaki T<sup>1)</sup>, Tokumasu M<sup>1)</sup>, Adachi S<sup>2)</sup>, Natsume T<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Natl Inst Advanced Industrial Sci Tech), Kanegae Y, Yamamoto T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Okinawa Inst Sci Tech). CNOT3 suppression promotes necroptosis by stabilizing mRNAs for cell death-inducing proteins. *Sci Rep* 2015; 5: 14779.
- 4) Suzuki M<sup>1)</sup>, Kondo S<sup>1)</sup>, Pei Z<sup>1)</sup>, Maekawa A<sup>1)</sup>, Saito I<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Univ Tokyo), Kanegae Y. Preferable sites and orientations of transgene inserted in the adenovirus vector genome: The E3 site may be unfavorable for transgene position. *Gene Ther* 2015; 22(5): 421-9.
- 5) Ichise H<sup>1)</sup>, Hori A<sup>1)</sup>, Shiozawa S<sup>1)</sup>, Kondo S<sup>1)</sup>, Kanegae Y, Saito I<sup>1)</sup>, Ichise T<sup>1)</sup>, Yoshida N<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Univ Tokyo). Establishment of a tamoxifen-inducible Cre-driver mouse strain for widespread and temporal genetic modification in adult mice. *Exp Anim* 2016; 65(3): 231-44. Epub 2016 Feb 29.
- 6) Suzuki R<sup>1)</sup>, Saito K<sup>1)</sup>, Matsuda M<sup>1)</sup>, Sato M (Natl Inst Agrobiological Sci), Kanegae Y, Shi G<sup>2)</sup>, Watashi K<sup>1)</sup>, Aizaki H<sup>1)</sup>, Chiba J<sup>1)</sup>, Saito I (Univ Tokyo), Wakita T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Tokyo Univ Sci), Suzuki T<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Hama-matsu Univ Sch Med). Single-domain intrabodies against hepatitis C virus core inhibit viral propagation and core-induced NFκB activation. *J Gen Virol* 2016; 97(4): 887-892. Epub 2016 Feb 9.
- viridae) アデノウイルスベクターを基盤としたウイルスゲノム複製評価系による抗HBV剤の探索. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡, 11月.
- 5) 近藤小貴<sup>1)</sup>, 鈴木まりこ<sup>1)</sup>, 山崎 学<sup>2)</sup>, 柴崎正勝<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>微生物化学研究所), 斎藤 泉<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>東京大), 鐘ヶ江裕美. (Poster: Hepadnaviridae) AdVを用いた効率的HBV複製ゲノム検出法の開発. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 福岡, 11月
- 6) 前川 文<sup>1)</sup>, 近藤小貴<sup>1)</sup>, 鈴木まりこ<sup>1)</sup>, 斎藤 泉<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>東京大), 鐘ヶ江裕美. (ポスター発表: バイオテクノロジー, 新領域, 進化-5) 遺伝子工学, 核酸工学, ゲノム編集) Cas9高発現アデノウイルスベクター及び多数 guide RNA 同時発現によるゲノム編集効率の最適化とその応用. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12月.
- 7) 鈴木まりこ<sup>1)</sup>, 近藤小貴<sup>1)</sup>, 斎藤 泉<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>東京大), 鐘ヶ江裕美. (ポスター発表: 疾患生物学-3) 感染症) HBV-AdV システムを用いた効率的なHBVゲノム複製. BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12月.

### Ⅲ. 学会発表

- 1) 菱木光太郎, 阿川美幸, 荒川泰弘, 尾崎幸次, 植谷恵美, 山田順子, 山田 尚. (ポスター47: AML (基礎)) Characterization of bromodomain inhibitor I-BET151 resistant U937 cells (プロモドメイン阻害薬 I-BET151 に対する耐性 U937 株の特徴). 第77回日本血液学会学術集会. 金沢, 10月.
- 2) Suzuki M<sup>1)</sup>, Kondo S<sup>1)</sup>, Yamasaki M<sup>2)</sup>, Saito I<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Univ Tokyo), Shibasaki M<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Inst Microbial Chemistry), Kanegae Y. (Poster) Efficient production of the replicating HBV genome using "HBV-AdV system". 2015 International Meeting Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Bad Nauheim, Oct.
- 3) Maekawa A<sup>1)</sup>, Kondo S<sup>1)</sup>, Suzuki M<sup>1)</sup>, Saito I<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Univ Tokyo), Kanegae Y. (Poster) Multiplex guide RNAs targeting HBV genome expressed using adenovirus vector improve the efficiency of CRISPR/Cas9 system. 2015 International Meeting Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Bad Nauheim, Oct.
- 4) 山崎 学<sup>1)</sup>, 松田法恵<sup>1)</sup>, 近藤小貴<sup>2)</sup>, 鈴木まりこ<sup>2)</sup>, 鐘ヶ江裕美, 斎藤 泉<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>東京大), 野本明男<sup>1)</sup>, 柴崎正勝<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>微生物化学研究所). (Poster: Hepadna-