

zation-Asia Pacific) Advanced School of Neuroscience. Bandar Sunway, Nov.

- 4) 岡野ジェイムス洋尚. (特別企画1:再生医学) 遺伝子改変霊長類によるヒト疾患モデルの作成と治療戦略の開発. 第115回日本皮膚科学会総会. 京都, 6月.
- 5) 岡野ジェイムス洋尚. (招待講演) 幹細胞システムと先進的モデル動物を用いた臓器再生戦略. 日本関節運動学的アプローチ (AKA) 医学会第38回学術集会. 東京, 10月.
- 6) 太田裕貴, 畑 純一, 岡野ジェイムス洋尚. 臨床的治療戦略を応用した低侵襲マーマーモセット研究. 第6回日本マーマーモセット研究会大会. 東京, 12月.

## 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
講師: 鹿島 剛	RNA工学

### 教育・研究概要

#### I. 抗腫瘍薬の分子薬理学的研究

近年, 全ゲノム解析から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り, 特に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おり, 実践的な治療にも応用され始めている。しかし, 薬剤耐性機構の解析や耐性の克服に向けた取り組みは未だ行われていない。

我々は, BRD阻害薬の1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。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。この耐性株の分子生物学的特徴として, BRD2, BRD4, NFkappaB, IkappaBタンパクの発現がみられた。BRDタンパクの増加は耐性を獲得する際に重要であり, 増加したBRDがNFkappaBシグナル経路を活性化することで耐性株における増殖を維持しているものと推測された。各種阻害薬を用いた薬剤感受性の検討から, IkappaB kinase (IKK) 阻害剤に対して親株と比べ耐性株 U-937R が強い細胞増殖抑制を示したことから, 耐性株におけるNFkappaBp65タンパクの核内移行が検出されたことから, U-937R では細胞増殖におけるNFkappaBシグナル経路への依存度が高まった結果, IKK阻害剤が強い細胞増殖抑制効果を示したことも整合性のある所見であると考えられた。本研究の結果は, BRD阻害剤耐性細胞を克服するために有用な所見であると考えられる。また, NFkappaBの活性化により抗アポトーシス作用が高まった耐性株に対するNFkappaB阻害薬を併用したI-BET151耐性の克服は, 今後のBRD阻害剤の可能性の拡大とその治療法の発展に寄与する成果であると考えている。

## II. アデノウイルスベクター (AdV) を用いた発現制御システムの開発

AdV は遺伝子治療だけでなく基礎研究にも応用可能なベクターである。特に肝臓細胞への遺伝子導入効率が高いことが知られており、我々は、肝細胞癌への移行リスクが極めて高い B 型肝炎ウイルス (HBV) に対する遺伝子治療用ベクターの開発を進めている。HBV は培養細胞での増殖効率が極めて悪いので、HBV ゲノム複製の定量には 1 週間以上の培養が必要とされており、高感度で特異性の高い複製 HBV ゲノムの検出系の確立が必須であった。我々はウイルスが出芽するために必要である S タンパク質の開始コドン領域に変異を加える事により、複製した HBV ゲノムが細胞内に蓄積する様工夫をした S 非発現 HBV ゲノム搭載 AdV を作製し、複製した HBV ゲノムを定量した結果、わずか 3 日で複製 HBV ゲノムの検出及び定量に成功し、HBV103-AdV システムと命名した。また、AdV はヒト初代肝臓細胞への HBV 高効率遺伝子導入も可能であり、HBV103-AdV システムによる抗 HBV 薬のハイスループットスクリーニングを行い、現在数種類の有用性が期待できる化合物を同定している。更に、本法を用いて CRISPR/Cas9 による HBV ゲノム複製抑制効率を検討した結果、90% という高い抑制率を示しており、HBV ゲノム完全排除型遺伝子治療への応用可能性も示された。

また、AdV は iPS 細胞や神経細胞へも高い効率で遺伝子導入が可能であるため、AdV を応用した iPS 細胞から神経細胞への分化誘導効率の上昇に成功した。iPS 細胞から誘導した神経細胞には未熟な細胞が混在しているため、神経細胞特異的プロモーターから Puromycin 耐性遺伝子を発現する AdV を用いて濃縮する方法の確立も行っている。これらの目的のために、既に 22 の AdV を作製したが、これらのベクターは今後の神経細胞分野における研究だけでなく、疾患 iPS 細胞からの効率的な神経細胞分化誘導による病態解析にも応用が可能であると考えている。

### 〔点検・評価〕

#### 1. 研究

本年度は、BET 阻害薬耐性化機構の解析を主に行った。また、他の薬剤との併用効果につい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。これらの研究の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いる。

また AdV の研究については、B 型肝炎治療法の開発において有用性の高い、高効率複製 HBV ゲノム検出系である、HBV103-AdV システムの確立に成功した。本法を用いて、複製 HBV ゲノムである 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恣意種類の候補化合物の同定に成功した。iPS 細胞からの神経細胞分化誘導及び濃縮についても AdV の作製及び評価を行った。これらの結果は、日本ウイルス学会総会、分子生物学会総会で発表した。

#### 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、今年度はこれまでとほぼ同数の 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については、これまで高額なキットを購入したユーザーのみを対象として解析を受託していたが、当施設にてキットを購入し、ユーザーには利用者負担のみを請求する方式に変更した。その結果、問い合わせ数も増加するとともに新規ユーザーも増え、70 件以上の解析を行った。また、セルソーターについても、これまで義務化していた説明会出席を使用前に当研究室担当者が行う方式に変更し、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) Shinagawa S, Kobayashi N, Nagata T, Kusaka A, Yamada H, Kondo K, Nakayama K. DNA methylation in the NCAPH2/LMF2 promoter region is associated with hippocampal atrophy in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment patients. *Neurosci Lett* 2016; 629: 33-7.
- 2) Suzuki A<sup>1)</sup>, Shibata N<sup>1)</sup>, Kasanuki K<sup>1)</sup>, Nagata T,

- Shinagawa S, Kobayashi N, Ohnuma T<sup>1</sup>, Takeshita Y<sup>1</sup>, Kawai E<sup>1</sup>, Takayama T<sup>1</sup>, Nishioka K<sup>1</sup>, Motoi Y<sup>1</sup>, Hattori N<sup>1</sup>, Nakayama K, Yamada H, Arai H<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ). Genetic association between presenilin 2 polymorphisms and Alzheimer's disease and dementia of Lewy body type in a Japanese population. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2016; 6(1): 90-7.
- 3) Suzuki K<sup>1</sup>, Yamamoto K<sup>1</sup>, Arakawa Y, Yamada H, Aiba K, Kitagawa M<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ). Antimyeloma activity of bromodomain inhibitors on the human myeloma cell line U266 by downregulation of MYCL. *Anticancer Drugs* 2016; 27(8): 756-65.
- 4) Takeshita Y<sup>1</sup>, Shibata N<sup>1</sup>, Kasanuki K<sup>1</sup>, Nagata T, Shinagawa S, Kobayashi N, Ohnuma T<sup>1</sup>, Suzuki A<sup>1</sup>, Kawai E<sup>1</sup>, Takayama T<sup>1</sup>, Nishioka K<sup>1</sup>, Motoi Y<sup>1</sup>, Hattori N<sup>1</sup>, Nakayama K, Yamada H, Arai H<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ). Genetic association between RAGE polymorphisms and Alzheimer's disease and Lewy body dementias in a Japanese cohort: a case-control study. *Int J Geriatr Psychiatr* 2016 Oct 4. [Epub ahead of print]
- 5) Kobayashi N, Shinagawa S, Nagata T, Shimada K, Shibata N<sup>1</sup>, Ohnuma T<sup>1</sup>, Kasanuki K<sup>1</sup>, Arai H<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ), Yamada H, Nakayama K, Kondo K. Usefulness of DNA methylation levels in COASY and SPINT1 gene promoter regions as biomarkers in diagnosis of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *PLoS One* 2016; 11(12): e0168816.
- 6) Suzuki M<sup>1</sup>, Kondo S<sup>1</sup>, Yamasaki M<sup>2</sup>, Matsuda N<sup>2</sup>, Nomoto A<sup>2</sup> (<sup>2</sup>Inst Microbial Chem), Suzuki T (Hamamatsu Univ Sch Med), Saito I<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Univ Tokyo), Kanegae Y. Efficient genome replication of hepatitis B virus using adenovirus vector: a compact pregenomic RNA-expression unit. *Sci Rep* 2017; 7: 41851.
- in spinal muscular atrophy. 第22回日本遺伝子細胞治療学会学術集会. 東京, 7月.
- 4) 菱木光太郎, 小池 優, 長谷川智子, 吉田 博, 山田 尚. プロモドメイン阻害薬 I-BET151 に対する耐性 U937 株の特徴. 第17回日本検査血液学会学術集会. 福岡, 8月. [日検血会誌 2016: 17(学術集会): S143]
- 5) 菱木光太郎, 植谷恵美, 阿川美幸, 尾崎幸次, 荒川泰弘, 鐘ヶ江裕美, 秋山政晴, 山田 尚. プロモドメイン阻害薬 I-BET151 耐性 U937 細胞の樹立とその分子生物学的特徴. 第133回成医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2016: 131(6): 164]
- 6) 鈴木まりこ<sup>1</sup>, 前川 文<sup>1</sup>, 鐘ヶ江裕美, 斎藤 泉<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京大). (ポスター) shRNAs を複数同時発現する単一型アデノウイルスベクターの HBV 複製阻止への応用. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 10月.
- 7) 前川 文<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. (口頭) Cas9 と多重 guide RNA 搭載アデノウイルスベクターを用いた高効率 HBV DNA 除去システム. 第64回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 10月.
- 8) 前川 文<sup>1</sup>, 斎藤 泉<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京大), 鐘ヶ江裕美. (ポスター) Cas9 及び多重 guide RNA 発現アデノウイルスベクターを用いた高効率 HBV DNA 除去システム. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月.
- 9) 鐘ヶ江裕美, 前川 文<sup>1</sup>, 鈴木まりこ<sup>1</sup>, 斎藤 泉<sup>1</sup>, 近藤小貴<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京大). (口頭) ゲノム編集による遺伝子治療の最前線. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月.
- 10) 鐘ヶ江裕美, 前川 文<sup>1</sup>, 鈴木まりこ<sup>1</sup>, 斎藤 泉<sup>1</sup>, 近藤小貴<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京大). (ポスター) ゲノム編集による遺伝子治療の最前線. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 11月.

### III. 学会発表

- 1) Kanegae Y, Maekawa A (Univ Tokyo). (Oral) The application of genome editing for gene therapy. 第22回日本遺伝子細胞治療学会学術集会. 東京, 7月.
- 2) Kondo S<sup>1</sup>, Maekawa A<sup>1</sup>, Suzuki M<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Univ Tokyo), Kanegae Y. (Poster) Improvement of the efficiency in CRISPER/Cas9 system against Hepatitis B virus using adenovirus vector. 第22回日本遺伝子細胞治療学会学術集会. 東京, 7月.
- 3) Kashima T, Agawa-Ohta M, Kanegae Y, Yamada H. (Poster) hnRNP A1 and A2 are potential targeted proteins for regulatory increasing of SMN synthesis