

ゲノム疾患治療研究部門 がん分子病態研究分野研究概況

教	授	稲	葉	俊	哉	
助	教	授	麻	生	博	也
助	手	松	井	啓	隆	
助	手	安	藝	大	輔	(平成17年11月1日～)
COE 研究員		竹	村	幸	敏	
大 学 院 生		尾	崎	佑	子	

当分野の研究テーマは、白血病の分子発症メカニズムの解明である。このため、白血病患者サンプルより出発して原因遺伝子を同定し、当該遺伝子産物の機能を解明する研究を進める。臨床→基礎研究のアプローチと同時に、造血細胞の増殖制御メカニズム、特にアポトーシス制御システムの解明から白血病発症メカニズムに迫る、基礎研究→臨床の二方向のアプローチを行っている。放射線による白血病発症の分子メカニズムの検討も重要課題であって、最終的な研究目標は次世代の白血病治療法開発に不可欠な基礎データを提供することである。同時に研究成果を再生・細胞工学や人工臓器開発などへ応用することも視野に入れている。いずれも分子細胞生物学的手法を用いるのはもちろんのこと、組織再生制御研究分野と密接に連携をとり、マウス個体レベルでも詳細な解析をおこなう。

こうした研究目的を達成するために、原医研を中心として2003年度より開始された21世紀COEプログラムの晩発障害サブグループの一員として活動を行っている。また、小児科や血液内科、生化学などと連携し、広島大学プロジェクトセンターの一環として白血病分子標的探索プロジェクトセンターの活動を継続している。

今年度はCOE枠の助手として安藝大輔を新規採用した。大学院前期過程の学生として尾崎佑子がメンバーに加わった。稲葉は病態代謝研究会の評議員をひき続き勤めた。

当研究分野における研究課題とその成果は以下の如くである。

1. 研究題目：7番染色体長腕欠失部位からの責任遺伝子候補の単離と遺伝子産物の機能解析

参加研究者：麻生博也、尾崎佑子、松井啓隆、竹村幸敏、安藝大輔、稲葉俊哉、本田浩章（組織再生制御研究分野）

目的：骨髄性白血病や骨髄異形成症候群では7番染色体長腕（7q）の欠失が多発する。放射線照射後や抗腫瘍剤による治療関連性白血病には7q欠損の頻度が半数近くに上ることは古くから知られている。この領域より原因となる癌抑制遺伝子を単離するため、2001年度より「長鎖PCR支援マイクロアレイCGH法」を開発し、候補遺伝子の単離を試みた結果、責任遺伝子候補として *MIKI*、*TITAN*、*Kasumi* の三遺伝子を同定したので、それらの遺伝子産物の機能解析を開始した。

方法と経過：7q共通欠失領域には、データベース上三つの遺伝子が存在したので *MIKI*、*Kasumi*、*Titan* と命名した。進化上脊椎動物以外には相同性のある遺伝子は認められない。まず魚類で *Miki* と *Titan* が融合した形の遺伝子が出現し、鳥類でも同様であるが、哺乳類になってマウスでは *Miki* と *Titan* は分離して別の遺伝子を形成し、さらにヒトまでに *Titan* が遺伝子重複を起こしてアミノ酸レベルで80%の相同性を有する *Kasumi* が新たな遺伝子として分離した。すなわち本遺伝子群は、進化上脊椎動物になって出現し、哺乳類になってからも遺伝子の構造を

大きく変えている新しい遺伝子である。いずれも既知遺伝子との相同性に乏しく既知モチーフを持たないため、たんぱく質一次配列からの機能の類推が不可能であった。

このためわれわれは細胞内局在と結合相手たんぱく質の同定を通じて、たんぱく質機能の類推を試みた。結合たんぱく質の同定では Miki と Kasumi はその N 末側の無構造領域（ループ）で Ku70 / Ku80 / DNA-PKcs 複合体と結合することが明らかになった。本複合体は細胞に二本鎖切断が生じた際、非相同組換え断端結合 (NHEJ) による修復過程で重要な役割を果たす。このため Titan / Kasumi は、DNA 損傷修復に関与していると考えられた。この仮説を支持するデータとして両者とも通常細胞質内に主に局在するが、放射線照射やマイトマイシン C 処理により核内に移行する現象が認められた。一方、Miki は間期には細胞質に局在するが、分裂期には紡錘糸に結合することが判明した。RNA 干渉法により MIKI の発現を抑制すると分裂前期での細胞周期の停止や赤道面の染色体配列の乱れが生じることから、MIKI は分裂制御にかかわる可能性が示された。

2. 研究題目：サイトカイン依存性アポトーシスのシグナル伝達メカニズム

参加研究者：松井啓隆、稲葉俊哉

背景：IL-3 依存性 Baf-3 細胞において、IL-3 受容体からのシグナルは、Bcl-2 ファミリーに属する細胞死誘導因子 Bim や細胞周期の停止に関わる p27^{KIP1} の mRNA 発現レベルを抑制することを通じてアポトーシスを抑制し、細胞分裂を促進する。両因子の mRNA 抑制は、mRNA 半減期の短縮によるものであることが明らかとなったので、そのメカニズムの解明を進めてきた。

経過：Bim の mRNA を結合させたビーズを用いて pull down アッセイを行い、質量解析器により分析を行った結果、ヒートショック関連蛋白 Hsc70 を mRNA 安定化因子として同定した。Baf-3 細胞中の Hsc70 の発現量は IL-3 の有無によらず一定であるため、IL-3 の標的因子が Hsc70 の RNA 結合能を抑制していると考え、シャペロン蛋白質と結合してその機能を調節するコシャペロンを検討した。その結果 Hsc70 を ATP 結合型に誘導する Bag-4 (SODD) や CHIP が、IL-3 存在下で Hsc70 とより強く結合するのに対して、IL-3 非存在下では ADP 結合型に誘導する、Hsp40 や Hip と強く結合することが判明した。Bag-4 の発現量は IL-3 依存性であったが、Hip、CHIP、Hsp40 の発現量は IL-3 の影響を受けていないことから、Baf-3 細胞では IL-3 受容体からのシグナルが Bag-4 の発現を促進し、Hip、CHIP、Hsp40 と Hsc70 の RNA 結合能を低下させて Bim や p27 の mRNA を不安定化させることによってその発現を抑制することが判明した。Hsc70 の mRNA 結合特異性を決定するシスエレメントの同定やサイトカインシグナルによるコシャペロンの機能制御メカニズムの解析を進めている。

3. 研究題目：8 ; 21 転座型 AML にみられる c-Kit 遺伝子変異の意義

参加研究者：麻生博也、稲葉俊哉

目的：8 ; 21 転座型 AML では高頻度に c-Kit のキナーゼ部位の変異が認められる。c-Kit 変異が臨床経過（予後）に影響を与えるか検討するとともに、イマチニブの有効性を試験管内実験で検証した。

方法と経過：8 ; 21 転座型白血病 47 例を検討し 12 例 (25.5%) にキナーゼ変異を認めた。8 ; 21-AML は化学療法に反応し、比較的予後良好である。ところが、c-Kit 変異を有した症例は完全寛解が得られるものの、寛解持続期間が短く、5 年以上の長期生存例は 1 例しかなかった。特筆すべきことに、c-Kit 変異を持つ新鮮白血病細胞や細胞株 (Kasumi-1) はイマチニブ (グリベックTM) に対する感受性を有していた。このため、寛解維持療法として、イマチニブ投与を行うことにより、予後が改善される可能性が考えられた。

4. 研究題目：Survivin 転写メカニズムの解明

参加研究者：安藝大輔、松井啓隆、稲葉俊哉、黒澤秀光（独協医大小児科）

目的：17 ; 19 転座型白血病で発現する E2A-HLF 融合転写因子は、アポトーシス抑制因子 survivin の発現を誘導する。この転写メカニズムを解明する。

方法と経過：Survivin は G2/M 期特異的に発現が誘導されることが知られているが、E2A-HLF の発現している白血病細胞では、全周期にわたって survivin が高発現していることが判明した。このメカニズムを解析するために、レポーターアッセイを行ったところ、翻訳開始点より 124bp 上流までの領域が細胞周期依存性発現に関与しているシス・エレメントを含むこと、ゲルシフトアッセイにより 42bp 上流にある CHR とよばれる領域に E2A-HLF の制御を受ける転写因子が結合していることが判明した。また T 細胞の分化と増殖にかかわる転写因子である Ikaros が Survivin の転写制御に関与している模様であり、解析を進めている。

5. 研究題目：Crem による Bim の発現制御

参加研究者：松井啓隆，稲葉俊哉，大浜喜代人（琉球大学第二内科）

目的：われわれのこれまでの研究により、Bim の発現は紫外線照射により抑制されることが判明した。その転写制御システムを検討する中で、Crem 転写因子の機能が重要である可能性が浮上したので、その詳細を解明する。

方法と経過：ルシフェラーゼアッセイを用いた検討により、紫外線照射に反応して Bim の発現を抑制するシスエレメントが Bim 遺伝子の第一イントロン内に存在することが解明された。ゲルシフトアッセイの結果、この部位に結合する転写因子は Crem であることが判明した。これまで知られていなかったことであるが、Crem は紫外線照射により発現が抑制され、結果的に紫外線照射により Bim の発現は抑制される。その生物学的な意義が注目される。

6. 研究題目：拍動する心筋細胞を用いたカテコラミンの実時間的・超高感度測定システムの開発

参加研究者：松井啓隆，稲葉俊哉，満洲邦彦（東京大学工学部）

目的：Whole cell sensor を用いた、カテコラミンの実時間的・超高感度測定システムの開発し、このシステムをさらに展開させて、広く各種生理活性物質の微量測定システムの開発へと応用する。

方法と経過：多能性幹細胞（われわれは扱いやすさからマウスの embryonic carcinoma, EC 細胞を用いている）を心筋細胞に誘導分化させると培養フラスコ内で拍動する。この際の分時拍動数は培養液中のカテコラミン濃度に相関するので、拍動数を計測するシステムを用いて、カテコラミンの濃度を測定することができる。バックグラウンドを測定するためのアドレナリン受容体の発現を RNA 干渉法で抑制した EC 細胞の樹立を行っている。

A. 原 著

1. Inukai T.^{*1}, Inaba T., Dang J.^{*2}, Kuribara R.^{*3}, Ozawa K.^{*3}, Miyajima A.^{*4}, Wu W.^{*2}, Look AT.^{*2}, Arinobu Y.^{*1}, Iwasaki H.^{*1}, Akashi K.^{*5}, Kagami K.^{*6}, Goi K.^{*1}, Sugita K.^{*1}, Nakazawa S.^{*1} (^{*1}Department of Pediatrics, Yamanashi School of Medicine, ^{*2}Pediatric Oncology Department, Dana-Farber Center Institute, ^{*3}Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, ^{*4}Institute of Molecular and Cellular Bioscience, University of Tokyo, ^{*5}Kyusyu University, ^{*6}Aichi Cancer Center) TEF, an anti-apoptotic bZIP transcription factor related to the oncogenetic E2A-HLF chimera, inhibits cell growth by downregulating expression of the common β chain of cytokine receptors. Blood, 105: 4437-4444, 2005 (I)
2. Matsui H., Shinjyo T.^{*1}, Inaba T. (^{*1}Department of Internal Medicine, Ryukyu University Hospital) Structure of the human Bim gene and its transcriptional regulation in Baf-3, interleukin-3-dependent hematopoietic cells. Mol. Biol. Rep. 32: 79-85, 2005 (I)
3. Yamasaki M.^{*1}, Mishima K.H.^{*1}, Yamashita H.^{*2}, Kashiwagi K.^{*3}, Murata K.^{*1}, Minamoto A.^{*1}, Inaba T. (^{*1}Department of Ophthalmology and Visual Science, ^{*2}Department of Ophthalmology and Visual Science, Yamagata University School of Medicine, ^{*3}Department of Ophthalmology, University of Yamanashi Faculty of

Medicine) Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res.* 1050: 15-26, 2005 (I)

4. Mashima R.^{*1}, Saeki K.^{*2}, Aki D., Minoda Y.^{*2}, Takaki H.^{*2}, Sanada T.^{*2}, Kobayashi T.^{*2}, Aburatani H.^{*3}, Yamanashi Y.^{*1}, Yoshimura A.^{*2} (^{*1}Department of Cell Regulation, Tokyo Medical and Dental University, ^{*2}Division of Molecular and Cellular Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, ^{*3}Division of Genome Science, Research Center for Advanced Science and Technology, The university of Tokyo) FLN29, a novel interferon- and LPS-inducible gene acting as a negative regulator of toll-like receptor signaling. *J.Biol. Chem.* 280: 41289-41297, 2005 (I)
5. Aki D., Mashima R.^{*1}, Saeki K.^{*1}, Minoda Y.^{*1}, Yamauchi M.^{*1}, Yoshimura A.^{*1} (^{*1}Division of Molecular and Cellular Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University) Modulation of TLR signaling by the C-terminal Src kinase (Csk) in macrophages. *Genes Cells.* 10, 357-368, 2005 (I)
6. Ohishi M.^{*1,3}, Matsumura Y.^{*1}, Aki D., Mashima R.^{*1}, Taniguchi K.^{*1}, Kobayashi T.^{*1}, Kukita T.^{*2}, Iwamoto Y.^{*3}, Yoshimura A.^{*1} (^{*1}Division of Molecular and Cellular Immunology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, ^{*2}Oral cellular and Molecular Biology, Department of Oral Biological Sciences, Faculty of Dental Sciences, Kyushu University, ^{*3}Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine, Kyushu University) Suppressor of Cytokine signaling-1 and-3 regulate osteoclastogenesis in the presence of inflammatory cytokines. *J.Immunol.* 174, 3024-3031, 2005 (I)
7. Niimi H.^{*1}, Harada H.^{*1}, Harada Y.^{*2}, Ding Y.^{*1}, Imagawa J.^{*1}, Inaba T., Kyo T.^{*3}, Kimura A.^{*1} (^{*1}Dept. of Hematology and Oncology, ^{*2}International Radiation Information Center, ^{*3}Dept.of Internal Medicine, Hiroshima Red Cross Hospital) Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia*, in press 2006 (I)
1. 麻生博也, 稲葉俊哉 AML に対するイマチニブ治療の可能性 (総説) 血液・腫瘍科 50 : 326-331, 2005
2. 稲葉俊哉, 松井啓隆 Bim と白血病分子標的-サイトカイン依存性アポトーシスのキープレイヤー (総説) 別冊・医学のあゆみ, 血液疾患 - state of arts (ver.3), 2005 年 9 月 15 日発行 pp.244-247, 2005
3. 稲葉俊哉 アポトーシス (分担) 仲野徹編, 再生医療のための分子生物学 (再生医療の基礎シリーズ 3) pp.36-51, 2006 コロナ社
4. 稲葉俊哉 アポトーシスの制御機構 (分担) 浅野茂隆, 池田康夫, 内山卓監修 三輪血液病学 (第 3 版) pp.103-107 文光堂 2006

B. 学会発表

1. 麻生 博也, 竹村 幸敏, 松井 啓隆, 稲葉 俊哉 長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法を用いた骨髄性白血病における 7q 欠損遺伝子候補の同定 第 64 回日本癌学会総会 ロイトン札幌 平成 17 年 9 月 14 日 - 16 日 札幌 (G)
2. 松井 啓隆, 竹村 幸敏, 麻生 博也, 稲葉 俊哉 ヒートショック蛋白による mRNA 半減期調節と発がん 第 64 回日本癌学会総会 ロイトン札幌 平成 17 年 9 月 14 日 - 16 日 札幌 (G)

3. Matsui, Hiroataka, Inaba, Toshiya Regulation of mRNA stability by cytokines and its implications in leukemogenesis.
第 67 回日本血液学会・第 47 回臨床血液学会合同総会 合同シンポジウム パシフィコ横浜 平成 17 年 9 月 17 日 - 19 日 横浜 (G)
4. 原田 浩徳^{*1}, 原田 結花^{*2}, 新美 寛正^{*1}, 丁 曄^{*1}, 許 泰一^{*3}, 稲葉 俊哉, 木村 昭郎^{*1} (^{*1} 広島大学 原爆放射線医科学研究所 血液内科, ^{*2} 広島大学 原爆放射線医科学研究所 国際放射線情報センター, ^{*3} 広島赤十字・原爆病院) AML1/RUNX1 点変異を持つ MDS/AML の多段階発症機構 第 67 回日本血液学会・第 47 回臨床血液学会合同総会 パシフィコ横浜 平成 17 年 9 月 17 日 - 19 日 横浜 (G)
5. 赤羽 弘資^{*1}, 犬飼 岳史^{*1}, 根本 篤^{*1}, 本名 浩子^{*1}, 合井 久美子^{*1}, 杉田 完爾^{*1}, 中澤 眞平^{*1}, 清河 信敬^{*1}, 藤本 純一郎^{*2}, 後藤 裕明^{*3}, 遠藤幹也^{*4}, 稲葉 俊哉 (^{*1} 山梨大学医学部 小児科, ^{*2} 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部, ^{*3} 横浜市立大学医学部 小児科, ^{*4} 岩手医科大学 小児科) t(17;19) 由来 E2A-HLF 融合遺伝子による CD33 発現の誘導 第 67 回日本血液学会・第 47 回臨床血液学会合同総会 パシフィコ横浜 平成 17 年 9 月 17 日 - 19 日 横浜 (G)
6. 麻生 博也, 竹村 幸敏, 松井 啓隆, 稲葉 俊哉 長鎖 PCR 支援マイクロアレイ CGH 法を用いた骨髄性白血病における 7q 欠損遺伝子候補の同定 第 67 回日本血液学会・第 47 回臨床血液学会合同総会 パシフィコ横浜 平成 17 年 9 月 17 日 - 19 日 横浜 (G)
7. 湯地 晃一郎^{*1,2}, 加登 大介^{*1}, 高木 伸介^{*1}, 久住 英二^{*1}, 松村 有子^{*1}, 沖 俊彦^{*2}, 渡辺 直子^{*2}, 麻生 博也, 稲葉 俊哉^{*1}, 増岡 和宏^{*1}, 和氣 敦^{*1}, 宮腰 重三郎^{*1}, 北村 俊雄^{*2}, 谷口 修一^{*1} (^{*1} 虎の門病院 血液科, ^{*2} 東京大学 医科学研究所 細胞療法分野) 家族性骨髄異形成症候群の解析 第 67 回日本血液学会・第 47 回臨床血液学会合同総会 パシフィコ横浜 平成 17 年 9 月 17 日 - 19 日 横浜 (G)
8. 根本 篤^{*1}, 犬飼 岳史^{*1}, 赤羽 弘資^{*1}, 高橋 和也^{*1}, 佐藤 広樹^{*1}, 合井 久美子^{*1}, 子鹿 学^{*1}, 飯島 純^{*1}, 張 暁春^{*1}, 葉袋 周^{*1}, 加賀美 恵子^{*1}, 稲葉 俊哉, 杉田 完爾^{*1}, 中澤 眞平 (^{*1} 山梨大学医学部 小児科) imatinib は CDK4 と Bim を介して Ph¹-ALL に対する効果を発揮する 第 67 回日本血液学会・第 47 回臨床血液学会合同総会 パシフィコ横浜 平成 17 年 9 月 17 日 - 19 日 横浜 (G)
9. 稲葉俊哉 放射線被曝後白血病の分子発症機序：最近の進歩 21COE プログラム長崎大学・広島大学合同国際シンポジウム 日本放射線影響学会第 48 回大会 平成 17 年 11 月 17 日 広島 (R, G)
10. 佐伯和子^{*1}, 福山聡^{*1}, 安芸大輔, 小林隆志^{*1}, 吉村昭彦^{*1} (^{*1} 九州大学 生医研 免疫制御) 新規ラフト局在タンパク質 Raftlin の遺伝子欠損マウス作製とリンパ球における機能解析 第 28 回日本分子生物学会年会 平成 17 年 12 月 7 日 - 10 日
11. 西中村瞳^{*1}, 小林隆志^{*1}, 佐伯和子^{*1}, 安芸大輔, 吉村昭彦^{*1} (^{*1} 九州大学 生医研 免疫制御) STAT3 による TLR4 シグナル抑制機構の解析 第 28 回日本分子生物学会年会 平成 17 年 12 月 7 日 - 10 日

C. その他

1. 麻生博也, 稲葉俊哉：MDS 分子治療標的の同定 厚生労働科学研究費補助金, 難治性疾患克服研究事業「骨髄異形成症候群に対する画期的治療法に関する研究班 (MDS 班)」班会議 東京 (2005. 7. 8) (2006. 1. 20) (R, G)

2. 稲葉俊哉：7 番染色体長腕領域より単離した白血病抑制遺伝子候補の生化学的性状 東京医科歯科大学 東京
(2005. 9. 16) (G)
3. 稲葉俊哉：7 番染色体長腕領域より単離した白血病抑制遺伝子候補の生化学的性状 東京血液学セミナー 東京
(2005. 9. 21) (G)
4. 麻生博也, 稲葉俊哉：7 番染色体長腕領域より単離した白血病抑制遺伝子候補の生化学的性状 厚生労働省
がん研究助成金「造血器腫瘍における染色体転座関連遺伝子の基礎的・臨床的研究」班 平成 16 年度班会議
東京 (2005. 10. 28) (G)
5. 麻生博也, 稲葉俊哉：7 番染色体長腕領域より単離した白血病抑制遺伝子候補の生化学的性状 厚生労働省
原爆症に関する調査研究班 (2006. 2. 17) (R, G)