

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	稻 葉 俊 哉
助 教 授	麻 生 博 也
助 手	松 井 啓 隆
助 手	安 藝 大 輔
C O E 研究員	竹 村 幸 敏
大 学 生	長 町 安 希 子
大 学 生	尾 崎 佑 子

(～平成19年3月31日)

(平成18年4月1日～)

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・細胞工学や創薬に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度より開始された21世紀C O E プログラムの晚発障害サブグループの一員として活動を行なっている。また、小児科や血液内科、生化学などと連係し、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。

今年度は大学院後期過程の学生として長町安希子がメンバーに加わった。またC O E 研究員の竹村幸敏が東京大学総合文化研究科の特任助手に採用され転任した。稻葉は病態代謝研究会の評議員をひき続き勤めた。また染色体ネットワーク会議委員を拝命した。

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（その1 Kasumi/Titan）

参加研究者：麻生博也、尾崎佑子、松井啓隆、竹村幸敏、長町安希子、安芸大輔、稻葉俊哉、本田浩章（組織再生制御研究分野）

目的：骨髓性白血病や骨髓異形成症候群（M D S）では7番染色体長腕（7q）の欠失が多発する。とりわけ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

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P C R支援マイクロアレイC G H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。いずれも進化上、脊椎動物のみに存在する遺伝子であるが、*Kasumi* はマウス以降に *Titan* が遺伝子重複を起こして生じた、アミノ酸レベルで70%の相同性を有する関連遺伝子であるので、遺伝子産物の機能解析は *Kasumi/Titan* と *Miki* に分けて行った。

方法と経過：*Kasumi/Titan* は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 *Titan* と *Kasumi* はその N 末端側の無構造領域（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）による修復過程で枢要な役割を果たす。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。また、RNA 干渉法による *Kasumi* の発現抑制細胞では、放射線感受性の軽度の上昇や、姉妹染色分体交換頻度の上昇が認められた。しかし、細胞レベル・生化学レベルでの分析では見られる表現系が軽度なこともあって、研究の進みの遅れが顕著になってきた。幸いにして組織再生研究分野の支援のもと、*Titan* 欠損マウスの作成に成功したので、マウス個体レベルでの解析を先行させる予定である。

2. 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（その2 *Miki*）

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

目的：*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。RNA 干渉法により *Miki* の発現を抑制すると分裂前中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重要な蛋白質であることが示唆された。そこで *Miki* の生化学的・生物学的機能と、白血病発症との関連解明に焦点を当て、重点的に研究を推進した。

方法と経過：*Miki* の発現抑制は中心体の成熟障害と分離速度の低下をもたらし、染色体散乱やロゼット形成などを引き起こし、細胞分裂を前中期で停止させた。これは、MDS や AML でしばしばみられる特徴的な分裂異常である。この結果、二核・多核・小核細胞の出現や、染色体の不分離などが生じると考えられた。*Miki*^{+/−} ES 細胞を用いて作成したキメラマウスでも、骨髄細胞中に分裂像異常が認められることから、1 アレルの欠失（haploinsufficiency）でも表現型が生じることが示唆された。脊椎動物では PAR 化と PAR 化を触媒する PAR-polymerase (PARP) の一種 tankyrase-1 が、細胞分裂の円滑な進行に必須であることが解明されているが、*Miki* は tankyrase-1 の基質として PAR 化を受け、紡錘糸に結合することが解明された。yeast two hybrid 法による *Miki* の結合たんぱく質の解析では、*Miki* はトランスゴルジネットワークで機能するタンパク質と結合することが解明され、*Miki* が中心体形成と分離に果たす役割は、ゴルジ体と中心体間の輸送システムに深く関与すると考えられた。

3. 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、稻葉俊哉

背景：IL-3 依存性 Baf3 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 アッセイを行ない、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。Baf3 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依存的であったが、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。以上の結果をまとめてMol. Cell誌で報告した。引き続き、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。

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（獨協医大小児科）

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とよばれるサイレンサー領域にE2A-HLFにより負の制御を受ける転写抑制因子が結合していることが判明した。survivin抑制機能を有する小分子化合物を用いて、更なる解析を進めている。

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tron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、満渕邦彦（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關するので、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細胞の樹立を行い、本細胞を用いた測定システムを確立した。

A. 原 著

1. Niimi, H.*¹, Harada, H.*¹, Harada, Y.*², Ding ,Y.*¹, Imagawa, J.*¹, Inaba, T., Kyo, T.*³, Kimura, A.*¹ (*¹ Department of Hematology/Oncology, *² International Radiation Information Center, *³ Department of Internal Medicine, Hiroshima Red Cross Hospital and Atomic Bomb Survivors Hospital, Hiroshima) Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia* 20: 635-644, 2006
2. Minoda, Y.*¹, Saeki, K.*¹, Aki, D., Takaki, H.*¹, Sanada, T.*¹, Koga, K.*¹, Kobayashi, T.*¹, Takaesu, G.*¹, Yoshimura, A.*¹ (*¹ Division of Molecular and Cellular Immunology, The Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University) A novel Zinc finger protein, ZCCHC11, interacts with TIFA and modulates TLR signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344: 1023-1030, 2006
3. Inukai T.*¹, Hirose K.*¹, Inaba T., Kurosawa, H.*², Hama A.*³, Inada, H.*⁴, Chin, M.*⁵, Nagatoshi, Y.*⁶, Ohtsuka, Y.*⁷, Oda, M.*⁸, Goto, H.*⁹, Endo, M.*¹⁰, Morimoto, A.*¹¹, Imaizumi, M.*¹², Kawamura, N.*¹³, Miyajima, Y.*¹⁴, Otake, M.*¹⁵, Miyaji, R.*¹⁶, Saito, M.*¹⁷, Tawa, A.*¹⁸, Yanai, F.*¹⁹, Goi, K.*¹, Nakazawa, S.*¹, Sugita, K.*¹ (*¹ Dept. of Pediatrics, University of Yamanashi, Faculty of Medicine, *² Dept. of Pediatrics, Dokkyo Medical University, *³ Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, *⁴ Department of Pediatrics, Kurume University School of Medicine, *⁵ Department of Pediatrics, Nihon University School of Medicine, *⁶ Section of Pediatrics, National Kyushu Cancer Center, *⁷ Div. of Cellular Therapy, Institute of Medical Science, University of Tokyo, *⁸ Department of Pediatrics, Okayama University Medical School, *⁹ Department of Pediatrics, Yokohama City University School of Medicine, *¹⁰ Department of Pediatrics, Iwate Medical University School of Medicine, *¹¹ Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science, *¹² Department of Hematology and Oncology, Miyagi Children's Hospital, *¹³ Department of Pediatrics, Osaka Rosai Hospital, *¹⁴ Section of Pediatrics, Anjo Kosei Hospital, *¹⁵ Department of Pediatrics, Sendai City Hospital, *¹⁶ Department of Pediatrics, University of Occupational and Environmental Health School of Medicine, Kitakyushu, *¹⁷ Department of Pediatrics and Adolescent, Juntendo University School of Medicine, *¹⁸ Section of Pediatrics, National Hospital Organization Osaka National Hospital, *¹⁹ Department of Pediatrics, Fukuoka University School of Medicine) Hypercalcemia in childhood acute lymphoblastic leukemia: frequent implication of PTHrP and E2A-HLF from translocation 17;19. *Leukemia* 21:288-96, 2006.
4. Matsui, H., Asou, H., Inaba, T. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by Heat shock cognate protein 70. *Mol. Cell* 25: 99-112, 2007
5. 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
6. 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 2006 文光堂
7. 稲葉俊哉 7q欠失責任遺伝子候補の単離（分担）高久史磨, 溝口秀昭, 坂田洋一, 金倉譲, 小島誠二 Annual Review 2007 血液, pp.95-101, 2007 中外医学社

B. 学会発表

1. 麻生博也, 尾崎祐子, 松井啓隆, 安藝大輔, 竹村幸敏, 大杉美穂*¹, 稲葉俊哉 (*¹ 東京大学医科学研究所癌細胞

シグナル分野) 骨髄性白血病で高頻度に消失する 7 番長腕責任遺伝子候補の性状解析 第65回 日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 平成18年9月28日-30日 横浜

2. 松井啓隆, 稲葉俊哉, 麻生博也 サイトカインによるmRNA安定性制御機構と白血病への関与 第65回 日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 平成18年9月28日-30日 横浜
3. Inaba, T., Asou, H. Isolation and characterization of candidate myeloid tumor suppressor genes from the commonly deleted region of chromosome 7q. The 68th Annual Meeting of Japanese Society of Hematology and The 48th Annual Meeting of Japanese Society of Clinical Hematology (Symposium), Fukuoka, October 6-8, 2006.
4. 松井啓隆, 麻生博也, 稲葉俊哉 サイトカインによるmRNA安定性制御機構と白血病への関与 第68回日本血液学会・第48回臨床血液学会合同総会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 平成18年10月6日-8日 福岡
5. 高橋和也^{*1}, 合井久美子^{*1}, 佐藤広樹^{*1}, 本名浩子^{*1}, 黒田 格^{*1}, 廣瀬衣子^{*1}, 赤羽弘資^{*1}, 根本 篤^{*1}, 古市嘉行^{*1}, 犬飼岳史^{*1}, 杉田完爾^{*1}, 中澤眞平^{*1}, 稲葉俊哉, 松井啓隆, 小山敏子^{*2} (*¹山梨大学医学部 小児科, *²埼玉社会保険病院 免疫研究室) 11q23転座型白血病細胞株におけるFlt-3 inhibitor PKC412のアポトーシス誘導機構の解析 第68回日本血液学会・第48回臨床血液学会合同総会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 平成18年10月6日-8日 福岡
6. 渡辺直子^{*1}, 北浦次郎^{*1}, 原田浩徳^{*2}, 小埜良一^{*1}, 米野由希子^{*1}, 佐藤 均^{*4}, 稲葉俊哉, 中島秀明^{*3}, 野坂 哲哉^{*1}, 北村俊雄^{*1} (*¹東京大学医科学研究所 細胞療法分野, *²広島大学原爆放射線医科学研究所 血液腫瘍内科, *³東京大学医科学研究所 研究拠点, *⁴東京大学医科学研究所 メディカルゲノム 病態医療科学分野) AML1点変異はマウスBMTモデルにおいてMDS/AMLを発症させる 第68回日本血液学会・第48回臨床血液学会合同総会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 平成18年10月6日-8日 福岡
7. 張 晓春^{*1}, 犬飼岳史^{*1}, 赤羽弘資^{*1}, 廣瀬衣子^{*1}, 黒田 格^{*1}, 本名浩子^{*1}, 合井久美子^{*1}, 宇野佳奈子^{*1}, 八木田秀雄^{*2}, 奥村 康^{*2}, 稲葉俊哉, 黒澤秀光^{*3}, 遠藤幹也^{*4}, 後藤裕明^{*5}, 加賀美恵子^{*1}, 杉田完爾^{*1}, 中澤眞平^{*1} (*¹山梨大学医学部 小児科, *²順天堂大学 医学部 免疫学, *³獨協医科大学 小児科, *⁴岩手医科大学 小児科, *⁵横浜市立大学 医学部 小児科) 17;19転座型急性リンパ性白血病 (ALL) のTRAIL感受性 第68回日本血液学会・第48回臨床血液学会合同総会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 平成18年10月6日-8日 福岡
8. 廣瀬衣子^{*1}, 犬飼岳史^{*1}, 赤羽弘資^{*1}, 張 晓春^{*1}, 黒田 格^{*1}, 本名浩子^{*1}, 合井久美子^{*1}, 稲葉俊哉, 黒澤秀光^{*2}, 遠藤幹也^{*3}, 後藤裕明^{*4}, 加賀美恵子^{*1}, 杉田完爾^{*1}, 中澤眞平^{*1} (*¹山梨大学 医学部 小児科, *²獨協医科大学 小児科, *³岩手医科大学 小児科, *⁴横浜市立大学 医学部 小児科) 17;19転座型ALLにおけるE2A-HLF融合転写因子によるLMO2遺伝子の過剰発現 第68回日本血液学会・第48回臨床血液学会合同総会 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 平成18年10月6日-8日 福岡
9. Asou, H., Matsui, H., Ozaki, Y., Takemura, T., Nagamachi, A., Aki, D., Oosugi, M.^{*1}, Inaba, T. (*¹ Div. of Oncology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo) Abnormal mitosis and genetic instability induced by downregulation of candidate myeloid tumor suppressor genes isolated from the Long arm of chromosome 7. 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 9-12, 2006.

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 「骨髓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 (2006. 7. 14) (2007. 1. 26)
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 川崎医科大学 岡山 (2006. 11. 24)
3. 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18年度班会議, 京都, (2006. 11. 17)