

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	手	麻	生	博	也
助	手	原	田	浩	徳
医	員	原	田	結	花 ^{*1}
大	学	山	崎	真	紀子 ^{*2}
大	学	松	井	啓	隆
大	学	今	川		潤 ^{*3}
大	学	村	田	和	彦 ^{*2} (平成14年4月1日～)
研	究	大	浜	喜	代人

^{*1}医学部 附属病院輸血部

^{*2}医学部 眼科

^{*3}原医研 内科

平成14年4月1日の当研究所の改組に伴い、旧分子細胞遺伝研究分野はがん分子病態研究分野へと名称が変更された。今年度は眼科より大学院生一名（村田和彦）を新たに受け入れた。

当分野の研究テーマは、1. 白血病の分子発症メカニズムの解明、2. 増殖因子欠乏や小胞体ストレスにより誘導される細胞死制御機構の解明を二本柱とするものである。1. では臨床部門との連携のもと、白血病の発症メカニズムを臨床側から基礎研究の方向へと発展させてゆくことを意図したものである。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。2. ではアポトーシス制御システムの解明から白血病や眼科疾患などのヒト疾患の発症メカニズムへと研究を進める、基礎研究から臨床への方向性を意識したものであるが、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、マウス個体のレベルでも詳細な解析をおこなうものである。

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：Bim の発現制御システムの解明

参加研究者：松井啓隆、大浜喜代人、稲葉俊哉

目的：造血前駆細胞のサイトカイン依存的な生存を支配する重要な Bcl-2 スーパーファミリー因子である Bim の発現制御システムを解明する。

方法：Bim の発現制御分子メカニズムはサイトカイン依存的な mRNA 発現量の調節であるが、転写調節であるか、mRNA レベルの調節であるかをプロモーター活性の測定や、nuclear run off assay, mRNA 寿命の解析により解明す

る。

経過: DNase 高感受性領域解析により、2ヶ所のプロモーター、4ヶ所の遠隔エンハンサーの候補領域を同定した。レポーターアッセイを行なったところ、上流側の転写開始点より数百ベース上流に極めて転写促進活性の強い領域を同定した。実際の健康な造血細胞では Bim の発現は弱いことからこの部位の活性を抑制するサイレンサー領域があることが予想される。われわれは想定されるサイレンサー領域が第一イントロン内に存在することを確認したが、予測に反してこの領域の抑制活性はサイトカイン依存性ではなかった。Nuclear run off アッセイではサイトカイン存在下での強い転写活性を示唆する結果が出たことからサイトカイン依存的な mRNA の寿命調節が重要であると考え、この方面からの検討を進めている。

2. FOXO3a 転写因子の白血病発症への関与

参加研究者：今川潤，稲葉俊哉

目的: FOXO3a 転写因子は6q21に座位するが、サイトカイン依存的にリン酸化され、細胞周期調節因子 p27やアポトーシス制御因子 Bim の転写調節に重要な役割を果たしている。また6;11転座において MLL-FOXO3a キメラを形成することが知られている。そこで6q-白血病を中心に白血化に対する FOXO3a 遺伝子の関与を検討する。
方法: FOXO3a の結合サイトをプローブとして当該因子の DNA 結合能を有する（脱リン酸化された）蛋白量を半定量できるゲルシフトアッセイ系を確立する。各種白血病やその細胞株の核抽出液を用いて DNA に結合した FOXO3a の蛋白量を検討する。

経過: FOXO3a のゲルシフトアッセイ系はこれまでもいいシステムが報告されていないが、われわれが試みた結果でも過剰発現の実験系でバンドは出るものの、内在的な発現では十分に信頼できる系とは言えず、時間をかけて最適化を試みたが良好な結果を得ることができていない。

3. 研究題目：網膜神経節細胞の神経栄養因子および小胞体ストレスによる生存維持機構の解明

参加研究者：山崎真紀子，村田和彦，稲葉俊哉，津間本裕一（医学部・眼科），三島弘（医学部・眼科）

目的: 緑内障の発症に神経栄養因子由来の生存シグナル欠乏や小胞体ストレスに由来する網膜神経節細胞のアポトーシスが関与している可能性が考えられているので、その分子メカニズムを解明する。

方法: 材料として新生ラットの網膜より分離した神経節初代培養細胞を用い、網膜神経節細胞を90%以上の純度で100万個程度分離できる実験系の確立を図る。こうして得られた細胞を BDNF 存在下および非存在下で培養し、経時的にサンプルを採取してイムノブロット法、免疫沈降法、real time RT-PCR 法などにより、シグナル伝達段階の重要な因子（PI3-K, Ras, Akt など）および Bcl-2スーパーファミリー因子の発現とリン酸化などを検討する。またラットやマウスの虚血再還流モデルを確立し、小胞体ストレスに関与するたんぱく質の発現を検討する。

経過: 網膜神経節初代培養細胞は安定して分離・培養が可能となった。この実験系を用いてグルタミン酸投与によるアポトーシスをエリスロポエチンが抑制することを見出した。同時にエリスロポエチン受容体が RGC に発現することを確認した。治療目的に用いる可能性が出てきたので、そのシグナル伝達経路を検討している。

4. 研究題目：光刺激によるアポトーシス誘導システムを目指した光生体スイッチの開発

参加研究者：稲葉俊哉，満渕邦彦（東大・国際産学共同研究センター）

目的: 人工臓器などの作成において微細な形態作成を可能とするため、大規模集積回路制作（LSI）に用いられているシステムを応用し、レーザー光線による細胞のアポトーシス誘導システムを開発する。

方法: 植物の光スイッチであるフィトクロム B（phyB）と PIF3の結合システムを動物細胞に導入して光スイッチを作成する。

経過: phyB の発色団であるフィトシアノルビン（PCB）の精製を行なった。phyB-GFP キメラ蛋白を発現した動物細胞を PCB 存在下に赤色光照射することによって、phyB-GFP を細胞質より核に移行させることに成功した。

GFP 部分を転写因子に置き換えることにより、この現象を用いた分子スイッチを開発中である。

5. 研究題目：長鎖 PCR 応用アレイ CGH による造血器腫瘍微小欠失部位からの責任遺伝子の単離

参加研究者：麻生博也，高橋規郎（放影研），稲葉俊哉

目的：白血病や骨髄異形成症候群，特に治療関連性白血病にみられる 7 番欠失領域より，原因となる癌抑制遺伝子を単離する。

方法：当研究所の白血病細胞コレクションより得られたサンプルから DNA を抽出し，アレイ CGH 解析を行う。アレイの probe は，染色体 7q21.3-7q31.1 の間，約 25 Mb の領域に 50-100kb の間隔で，繰り返し配列を排除した領域を選び，約 5 Kb 長の長鎖 PCR 産物をクローニングすることにより作成する。これを貼り付けたチップを用いてアレイ CGH 法を，白血病症例について行ない，微小欠失領域を同定する。

経過：作成した約 20 個のプロープを用いてパイロットスタディを行った。チップの作成やターゲットのラベルなどに技術的な課題が山積していたが逐次解決し，シグナルが半分になる現象を捉えることに成功した。プロープ数を増やし，実験システムの改良を進めている。

6. 研究題目：白血病細胞株を利用した遺伝子標的治療のモデル確立

参加研究者：麻生博也，谷岡真紀（医学部学生），稲葉俊哉

目的：当教室で樹立した白血病細胞株（kasumi-5, 6 & 7）の性状解析をゲノム異常の検索を中心に行い，遺伝子標的治療のモデルを確立する。

方法：1) Kasumi-5 は t(4;11)(q21;p15) を有し，NUP98-GAP1GDS1 融合遺伝子を発現する T-ALL 細胞株で，GAP1GDS1 の活性化が，RhoA の恒常的活性化がこの細胞株に特異的に起こっているかを検討する。2) Kasumi-6 は C/EBP α の DNA 結合部位に点突然変異をもつ AML M2 細胞株で，正常の C/EBP α 遺伝子を細胞内で強制発現させることにより起こる細胞変化を観察する。3) Kasumi-7 は 9p21 領域に欠失をもつ B-ALL 細胞株で，この領域から癌抑制遺伝子を単離する。

経過：Kasumi-5 ではその増殖が，RhoA-kinase inhibitor により抑制され，細胞では，RhoA の恒常的活性化が起こっていることを証明した。解析結果をまとめて投稿する準備を進めている。Kasumi-6 では，異常なサイズの C/EBP α が発現していることが判明した。これが点突然変異によるものであることを解明し，白血病発症との関連を論じた論文を発表した。

7. 研究題目：AML 1 転写因子による造血幹細胞分化機序及び造血器腫瘍発症機序の解明

参加研究者：原田浩徳，原田結花，本田浩章（予防腫瘍研究分野），稲葉俊哉

目的：正常造血発生・分化における AML1 の役割と，AML1 変異体による白血病 / 骨髄異形成症候群（MDS）の発症機序を解明する。

方法：1) AML1 の標的遺伝子として同定した新規膜 4 回貫通型蛋白 ART-1 の転写調節機構を検討する。2) AML1 変異体による白血病モデルとして，loxP site 間に neoR 遺伝子を挿入したコンディショナルノックインマウスを作成する。

経過：1) 造血幹細胞に発現する血球特異的膜蛋白 ART-1 は，AML1 によって転写活性化され，8;21 転座型白血病でみられる AML1/ETO により拮抗的に抑制されていることを明らかにした。また，ART-1 は転写因子 MZF-2 にも制御されており，AML1 と MZF-2 により協調的に転写調節されていることを解明した。さらに，AML1 と MZF-2 の相互作用について検討している。ART-1 に対するモノクローナル抗体を作成し，造血細胞における発現パターンを検討した。

2) 原爆被爆や化学療法・放射線療法後に続発する白血病 / MDS において，高頻度に AML1 遺伝子の点突然変異が生じていること，AML1 点突然変異体の転写活性機能が低下していることを明らかにし，論文発表した。また

これまで変異がないとされていた C 末側にも MDS で高頻度に変異が存在することを発見し、検討を進めている。また、AML1 点突然変異体及び AML1 融合変異体 (AML1/ETO, AML1/Evl) の Cre-loxP システムによるコンディショナルノックインマウスの作成を進めている。

8. 研究題目：白血病に関わる転写因子複合体の解析

参加研究者：大浜喜代人，原田浩徳，原田結花，稲葉俊哉

目的：白血病に関わる転写因子複合体の全貌を解明することにより，白血病発症の分子メカニズムを解明する。

対象とするのは AML1 転写因子・キメラ・変異蛋白と E2A 転写因子・E2A キメラ転写因子である。

方法：細胞内にタグつきの上記転写因子を発現させ，核抽出液を精製後，タグに対する抗体を用いて転写因子複合体を単離し，質量分析器で構成蛋白を同定する。

経過：細胞内にタグつき蛋白を発現させることに予想以上に難渋した。樹立した細胞を大量培養し分析を行い，構成たんぱく質の候補を同定した。現在個々の候補蛋白について解析を進めている。

A. 原著

1. Yokoyama, T. ^{*1}, Tanahashi, M. ^{*1}, Kobayashi, Y. ^{*1}, Yamakawa, Y. ^{*1}, Maeda, M. ^{*2}, Inaba, T., Kiriya, M. ^{*1}, Fukai, I. ^{*1}, Fujii, Y. ^{*1}. (^{*1}Dept. of Surgery II, Nagoya City Univ. Med. Sch. ^{*2}Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Chukyo Hospital) The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes. Immunol Lett. 81: 107-113, 2002 (I)
2. Yamaguchi, T. ^{*1}, Okada, T. ^{*2}, Takeuchi, T. ^{*3}, Tonda, T. ^{*4}, Ohtaki, M. ^{*5}, Shinoda, S. ^{*6}, Masuzawa, T. ^{*7}, Ozawa, K. ^{*8}, Inaba T. (^{*1}Dept. of Surgical Neurology, Jichi Med. Sch. ^{*2}Div. of Genetic Therapeutics, Center of Molecular Medicine, Jichi Med. Sch., ^{*3}Dept. of Anatomy, Jichi Med. Sch. ^{*4}Dept. of Environmental and Biometrics, RIRBM) Enhancement of thymidine kinase-mediated killing of malignant glioma by BimS, a BH3-only cell death activator. Gene Therapy 10: 375-385, 2003 (I)
3. Asou, H., Gombart, A.F. ^{*1}, Takeuchi, S. ^{*2}, Tanaka, H. ^{*3}, Tanioka, M. ^{*3}, Matsui, H., Kimura, A. ^{*3}, Inaba, T., Koeffler, H.P. ^{*1} (^{*1}Div. of Hematol. Oncol., Cedars-Sinai Med. Center ^{*2}Dept. of 3rd Internal Medicine, Kochi Med. Sch. ^{*3}Dept. of Hematol. Oncol. RIRBM) Establishment of the acute myeloid leukemia cell line Kasumi-6 from a patient with a dominant negative mutation in the DNA-binding region of the C/EBP α gene. Genes Chrom. & Cancer 36: 167-174, 2003 (R, G, I)
4. Harada H, Harada Y ^{*1}, Tanaka H ^{*2}, Kimura A ^{*2}, Inaba T (^{*1}Division of Blood Transfusion Service, Univ. Med. Hosp., ^{*2}Dept. Hematology/Oncology): Implications of somatic mutations in the *AML1* gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome / acute myeloid leukemia. Blood 101 (2) , 673-680, 2003. (R, G, I)
5. Taniguchi K ^{*1}, Kobayashi M ^{*2}, Harada H, Hiraoka A ^{*3}, Tanihiro M ^{*3}, Takata N ^{*3}, Kimura A (^{*1}Hiroshima College of Medical Technology, ^{*2}Hiroshima University Graduate School of Education, ^{*3}Division of Blood Transfusion Service, Univ. Med. Hosp.): Human neutrophil antigen-2a expression on neutrophils from healthy adults in western Japan. Transfusion 42 (5), 651-657, 2002. (I)

B. 学会発表

1. Harada, H., Harada, Y. ^{*1}, Tanaka, T. ^{*2}, Kimura, A. ^{*2}, Inaba, T. (^{*1}Division of Blood Transfusion Service, Univ. Med. Hosp., ^{*2}Dept. Hematology/Oncology): Implications of somatic mutations in the *AML1* gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome / acute myeloid leukemia. The 29th World Congress of the International

Society of Hematology, Seoul, Korea, 2002. (8.25-27.2002) (Intern. J. Hematol. 76 (Suppl. 1): 48, 2002) (R, G)

2. 原田浩徳, 原田結花^{*1}, 田中英夫^{*2}, 木村昭郎^{*2}, 稲葉俊哉 (^{*1}医病・輸血部, ^{*2}血液内科): AML1遺伝子点突然変異による続発性 AML/MDS の臨床的特徴と発症メカニズム. 第64回日本血液学会総会, 横浜, 2002. (9.13.2002) (臨床血液 43 (8): 110, 2002) (R, G)
3. 犬飼岳史^{*1}, 根本 篤^{*1}, 宇野佳奈子^{*1}, 高橋和也^{*1}, 佐藤広樹^{*1}, 古市嘉行^{*1}, 小鹿 学^{*1}, 飯島 純^{*1}, 合井久美子^{*1}, 加賀美恵子^{*1}, 稲葉俊哉, 杉田完爾^{*1}, 中澤眞平^{*1} (^{*1}山梨医科大学) Philadelphia 染色体陽性白血病細胞に対する STI571の抗白血病作用は造血因子によってレスキューされる 第64回日本血液学会総会, 第44回日本臨床血液学会総会, 横浜 2002年9月12-15日 (Jap. J of Clin. Hematol. 43 Supple. 8: 153, 2002)
4. 松井啓隆, 大浜喜代人, 今川 潤, 新城哲治^{*1}, 稲葉俊哉 (^{*1}琉球大学医学部第二内科) 細胞死誘導因子 Bim のサイトカイン依存性発現調節メカニズムの解析 第61回日本癌学会総会, 東京 2002年10月1-3日 (Jan. Cancer Res. 93 Supple. pp.90) (R, G)
5. Tanvira Sultana^{*1}, 原田浩徳, 伊藤欣朗^{*1}, 田中英夫^{*1}, 許 泰一^{*2}, 木村昭郎^{*1} (^{*1}血液内科, ^{*2}広島赤十字・原爆病院): MDS と MDS 由来急性骨髄性白血病における CD34++ 細胞上の G-CSF レセプターの発現と機能の解析. 第42回日本血液学会中国四国地方会, 岡山, 2003. (3. 1. 2003) (I)

C. その他

1. 稲葉俊哉「白血病基礎研究：現状と将来」九州小児白血病セミナー 福岡11. 22, 2002
2. Toshiya Inaba: Pathways regulating cytokine-dependent cell survival and their involvement in leukemogenesis. US/Japan Cancer Seminar, Hawaii 2. 14, 2003
3. 稲葉俊哉: AML1点突然変異モデルマウス作成による続発性造血器腫瘍発症機構の解析 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14年度班会議, 東京, 2002. (11.1.2002)
4. 稲葉俊哉: 放射線誘発 MDS と孤発例 MDS にみられる AML1遺伝子点突然変異部位の相異 原爆症に関する調査研究班 平成13年度班長会議, 広島, 2003. (2.19.2003)
5. 原田浩徳: 特集「転写因子 RUNX1」AML1/MTG8による赤血球系の分化抑制機序. 分子細胞治療 1(2): 160-166, 2002. (R, G)
6. 原田浩徳, 原田結花^{*1}, 木村昭郎^{*2}, 稲葉俊哉 (^{*1}医病・輸血部, ^{*2}血液内科): 被爆後造血器腫瘍と AML1転写因子. 放射線生物研究 37(3): 251-263, 2002. (R, G)
7. 原田浩徳: AML1による新規膜蛋白 ART-1の転写調節機構. 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14年度班会議, 東京, 2002. (11.1.2002) (R, G)

