

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 ^{*1}
助 手	原 田 浩 徳 (~平成 16 年 7 月 31 日)
助 手	松 井 啓 隆 ^{*2}
COE 研究員	竹 村 幸 敏 ^{*3}
大 学 院 生	山 崎 真 紀 子 ^{*4}
大 学 院 生	村 田 和 彦 ^{*4}

^{*1} 助手 (~平成 17 年 1 月 31 日), 助教授 (2 月 1 日 ~)

^{*2} COE 研究員 (~平成 16 年 7 月 31 日), 助手 (8 月 1 日 ~)

^{*3} COE 研究員 (8 月 1 日 ~)

^{*4} 眼科

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．

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昨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なっている．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，前教授時代より長年にわたって本分野を支えてきた麻生が助教授に昇格した．一層の活躍が期待される．3年間にわたって当分野に所属し，多大な業績のあった原田浩徳助手が，血液内科に帰任した．その後任としてCOEポスドクの松井啓隆が昇任した．また新しいCOEポスドクとして竹村幸敏を新規採用した．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：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，竹村幸敏，稲葉俊哉

背景：IL-3依存性 Baf-3細胞の IL-3受容体からのシグナルは，Ras/PI3K または Raf/MAPK 経路を経て 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} の発現を抑制する．この際，Bim や p27 の発現制御は mRNA レベルであるため，当初転写調節が重要な役割を果たしているものと考えたが，これらの遺伝子の発現制御領域内にサイトカイン依存的に機能するシスエレメントを同定することができなかった．そこで mRNA 半減期がサイトカインによって制御されている可能性を検討したところ，Hsc70 が中心的な役割を果たすユニークな mRNA 安定性制御システムが見つかったため，研究を進めた．

経過：Bim や p27 の 3' 非翻訳領域の mRNA を試験管内で合成して³²P でラベルし，Baf-3細胞の細胞質抽出液中での半減期を測定した．Cap アナログと poly(A) 鎖を付加した RNA では，IL-3存在下で培養した細胞抽出液中の半減期は 5 - 10分であったのに対し，IL-3非存在下では30分以上と大きな差が認められた．Cap と poly(A) 鎖なしでは，半減期はいずれの場合も 5 分程度に短縮した．この結果より，IL-3欠乏状態で培養した細胞抽出液中には Bim や p27 の mRNA を Cap および poly(A) 鎖依存的に安定化する因子が含まれている可能性が考えられる．そこで，mRNA を結合させたビーズを用いて pull down アッセイを行ない，質量解析器とウエスタンブロット法により，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 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 Ras，PI3-K，MAPK などを経由した 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開始している．

2. 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と候補遺伝子の解析

参加研究者：麻生博也，松井啓隆，竹村幸敏，稲葉俊哉

目的：白血病や骨髄異形成症候群では特定染色体の欠損が認められることは古くから知られている．特に放射線照射後や抗腫瘍剤による治療関連性白血病には 7 番長腕の欠失が多発する．こうした染色体欠失領域から，原因となる癌抑制遺伝子を単離する．

方法と経過：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などから 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した．これを貼り付けたチップを用いてアレイ CGH 法解析を行ない，微小欠失領域を同定する．これまで行ってきたパイロットスタディによって，チップの作成やターゲットのラベルなどのステップに山積していた技術的な課題が逐次解決され，シグナル強度が半分になる現象を捉えることに成功した．7 番染色体欠失のホットポイント約 25Mb 内にプローブを 268 個作成して患者検体について検討を行なったところ，複数の症例で特定のプローブのシグナルが半分に落ちることが判明した．このプローブはふたつの遺伝子をコードする領域と重なるため，これらの遺伝子を TITAN，MIK と命名した．その遺伝子産物機能の解明をめざし，遺伝子欠損マウスの作成，生化学的および生物学的性状の解析を開始した．また本法の有効性が明らかとなったので，5 番および 20 番染色体長腕に存在することが確実視される骨髄性白血病抑制遺伝子の同定を目指してプローブの作成を開始した．

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なうことにより，予後が改善される可能性が考えられた．

4. 研究題目：成人白血病における SHIP2アダプター蛋白変異の解明

参加研究者：原田浩徳，原田結花（国際放射線情報センター），新美寛正（血液内科研究分野），木村昭郎（血液内科研究分野），稲葉俊哉

背景：脱リン酸化活性を有するアダプター蛋白 SHIP2/PTPN11は，その恒常的活性化型点変異が Noonan 症候群や JMML に高率に認められることが報告され，注目されている．SHIP2点変異が成人白血病において果たす役割を検討した．

方法と経過：成人白血病では SHIP2の点変異はまれであったが，AML1転写因子の点変異を伴う MDS に限れば，約 15% に点変異を認めた．SHIP2の活性化は受容体型チロシンキナーゼの活性化と関連している可能性が示唆されている．そこで Baf-3細胞に c-Kit を遺伝子導入し，さらに SHIP2の点変異を導入して stem cell factor で刺激したところ，シグナルの減衰が遅延する現象が認められた．MDS の発症機序との関連をさらに詳細に検討する必要がある．

5. 研究題目：網膜神経節細胞 (RGC) 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（医学部・眼科），稲葉俊哉，三島弘（医学部・眼科）

背景：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とともに，エリスロポエチンによるアポトーシスの保護作用を検討した．

経過：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を確立した．こうして得られた細胞はエリスロポエチン受容体を発現していた．エリスロポエチンは BDNF と異なり，神経栄養因子としての機能を有さなかったが，グルタミン酸投与，NO 誘導性のアポトーシスから RGC を保護する機能を有していた．BDNF はサイトカイン欠乏による Bim の発現誘導を抑制したが，Epo はしなかった．この点が両サイトカインの神経栄養因子としての機能の有無に関係する可能性が大きい．にもかかわらず，Epo はストレス誘導性のアポトーシスを抑制する機能を有していることが明らかとなった．この際に Epo は BDNF と同様に，ストレス誘導によって生じる Bcl-2や Bcl-x の発現抑制を阻害することが判明した．網膜脳関門を通過できない BDNF と異なり，Epo は静脈投与によって RGC に達する利点がある．また薬剤としての応用経験も極めて豊富であるため，臨床応用が可能であると考えられた．

6. 研究題目：Hsp70の mRNA 安定性制御システムの解明

参加研究者：村田和彦（医学部・眼科），松井啓隆，稲葉俊哉

目的：項目1で述べたように，Hsc70が mRNA 安定性制御に重要な役割を果たしていることが見いだされたので，Hsc70と類似したタンパク質である Hsp70も mRNA 安定性制御機能を有していると考えられた．Hsp70の mRNA

の 3' 非翻訳領域には Hsc70/Hsp70 が結合する AUUUA 配列を有している。そこで Hsp70 がストレス応答の際に自らの mRNA を安定化させ、その発現量を増加させている可能性を検討した。

方法と経過：Hsp70 の熱ストレスによる誘導では HIF 転写因子による転写調節系が解明されているが、浸透圧ストレスによる発現誘導では、HIF は誘導されなかった。そこで Hsp70 の 3' 非翻訳領域を用いた pull down assay を行なったところ、浸透圧ストレス下では Hsp70 の結合が増加していること、mRNA 半減期が延長していることが判明した。

7. 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、満洲邦彦（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。

方法と経過：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。phyB の発色団であるフィトシアノルピン (PCB) の精製システムを確立した。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作成し、これらの蛋白を永久発現する Hela 細胞や Cos 細胞を樹立することを試みている。

A. 原著

1. Harada H., Harada Y.^{*1}, Niimi H.^{*2}, Kyo T.^{*3}, Kimura A.^{*2}, Inaba T. (^{*1}International Radiation Information Center, ^{*2}Department of Hematology/Oncology, ^{*3}4th Internal Medicine, Hiroshima Red Cross & Atomic Bomb Survivors Hospital) High incidence of somatic mutations in the AML/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. Blood 103: 2316-2324, 2004 (I)
2. Matsunaga T.^{*1}, Inaba T., Matsui H., Okuya M.^{*2}, Miyajima A.^{*2}, Funabiki T.^{*3}, Endo M.^{*4}, Inukai T.^{*5}, Look AT.^{*6}, Kurosawa H.^{*1} (^{*1}Division of Hematology, Department of Pediatrics, Dokkyo University School of Medicine, ^{*2}Institute of Molecular and Cellular Bioscience, University of Tokyo, ^{*3}Department of Pediatrics, Yokohama City University, ^{*4}Department of Pediatrics, Iwate Medical University, ^{*5}Department of Pediatrics, Yamanashi School of Medicine, ^{*6}Pediatric Oncology Department, Dana-Farber Center Institute) Regulation of annexin II by cytokine-initiated signaling pathways and E2A-HLF oncoprotein. Blood 103: 3185-3191, 2004 (I)
3. Takeshita A.^{*1,2}, Naitou K.^{*1}, Matsui H., Shinjyo K.^{*1}, Sahara N.^{*1}, Matsui H., Ohnishi K.^{*1}, Beppu H.^{*3}, Ohtsubo K.^{*3}, Horii T.^{*2}, Maekawa M.^{*2}, Ohno R.^{*4} (^{*1}Department of Internal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, ^{*2}Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, ^{*3}Centre for Molecular Biology and Cytogenetics, SRL, Inc., ^{*4}Aichi Cancer Center) Deletion 6p23 and add (11) (p15) leading to NUP98 translocation in a case of therapy-related atypical chronic myelocytic leukemia transforming to acute myelocytic leukemia. Cancer Genet. Cytogenet. 152: 56-60, 2004 (I)
4. Kuribara R.^{*1}, Honda H.^{*2}, Matsui H., Shinjyo T.^{*3}, Inukai T.^{*4}, Sugita K.^{*4}, Nakazawa S.^{*4}, Hirai H.^{*5}, Ozawa K.^{*1} (^{*1}Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, ^{*2}Department of Developmental Biology, RIRBM, ^{*3}Department of Internal Medicine, Ryukyu University Hospital, ^{*4}Department of Pediatrics, Yamanashi School of Medicine, ^{*5}Tokyo University) Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. Mol. Cell Biol. 24: 6172-6183, 2004 (I)

- 5 . Matsushita T.^{*1}, Okada T.^{*1}, Inaba T., Mizukami H.^{*1}, Ozawa K.^{*1}, Colosi P.^{*2}. (^{*1}Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School, ^{*2}Avigen Inc., Alameda, CA, USA) The Adenovirus E1A and E1B19K genes provide a helper function for transfection-based AAV vector production. J. Gen. Virol. 85: 2009-2014, 2004 (I)
- 6 . 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, *in press*
- 7 . 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., *in press*

B . 学会発表

- 1 . 廣瀬衣子^{*1}, 犬飼岳史^{*1}, 稲葉俊哉, 黒澤秀光^{*2}, 濱 麻人^{*3}, 陳 基明^{*4}, 永利義久^{*5}, 大塚欣敏^{*6}, 稲田浩子^{*7}, 今泉益泉^{*8}, 齊藤正博^{*9}, 川村尚久^{*10}, 多和昭雄^{*11}, 小田 慈^{*12}, 柳井文男^{*13}, 宮島雄二^{*14}, 大竹正俊^{*15}, 宮地良介^{*16}, 森本 哲^{*17}, 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, ^{*3}名大, ^{*4}日大, ^{*5}九州がんセンター, ^{*6}東大医科研, ^{*7}久留米大, ^{*8}東北大, ^{*9}順大, ^{*10}大阪労災病院, ^{*11}国立大阪病院, ^{*12}岡山大, ^{*13}福岡大, ^{*14}安城更生病院, ^{*15}仙台市立病院, ^{*16}産業医大, ^{*17}京都府立医大): 高カルシウム血症を合併した小児急性リンパ性白血病の検討 第46回 臨床血液学会総会・第66回 日本血液学会総会, 京都, 2004年9月17日 - 19日
- 2 . 原田浩徳^{*1}, 原田結花^{*2}, 新美寛正^{*3}, 許 泰一^{*3}, 木村昭郎^{*3}, 稲葉俊哉 (^{*1}広島大学医学部附属病院, ^{*2}国際放射線情報センター, ^{*3}血液内科, ^{*4}広島赤十字・原爆病院 第四内科): AML1/RUNX1の点突然変異は MDS 病態を決定する 第46回 臨床血液学会総会・第66回 日本血液学会総会, 京都, 2004年9月17日 - 19日
- 3 . 松井啓隆, 稲葉俊哉: ヒートショック関連蛋白による mRNA 半減期調節とサイトカインによる造血細胞の生死決定: 第46回 臨床血液学会総会・第66回 日本血液学会総会, 京都, 2004年9月17日 - 19日
- 4 . 麻生博也, 今川 潤^{*1}, 原田結花^{*2}, 原田浩徳^{*3}, 許 泰一^{*4}, 稲葉俊哉: (^{*1}血液内科, ^{*2}国際放射線情報センター, ^{*3}医学部附属病院, ^{*4}広島赤十字・原爆病院 第四内科) イマチニブ治療の新たな分子標的: 急性骨髄性白血病の KIT 変異と PDGFRA-ITD 第46回 臨床血液学会総会・第66回 日本血液学会総会, 京都, 2004年9月17日 - 19日
- 5 . 松井啓隆, 稲葉俊哉: ヒートショック関連蛋白による mRNA 半減期調節とサイトカインによる造血細胞の生死決定 第63回 日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日 - 10月1日
- 6 . 麻生博也, 原田浩徳^{*1}, 許 泰一^{*2}, 稲葉俊哉 (^{*1}医学部附属病院, ^{*2}広島赤十字・原爆病院 第四内科): イマチニブ治療の新たな分子標的: 急性骨髄性白血病の KIT 変異と PDGFRA-ITD 第63回 日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日 - 10月1日

7. 竹下明裕^{*1,*2}, 内藤健助^{*1}, 松井啓隆, 新庄 香^{*1}, 佐原直日^{*1}, 大西一功^{*1}, 前川真人^{*2}, 直江知樹^{*3}, 大野竜三^{*4} (^{*1}浜松医大・内, ^{*2}浜松医大・臨床検査学, ^{*3}名大・院医, ^{*4}愛知がんセンター): 急性前骨髄球性白血病患者由来細胞に対する gentsuzumab ozogamicin の in vitro 殺細胞効果 第63回 日本癌学会学術総会, 福岡, 2004年9月29日 - 10月1日
8. Matsui H., Inaba T.: Regulation of mRNA stability by heat shock cognate protein 70 (Hsc70) under the control of cytokines. The 46th Annual meeting of the American Society of Hematology, December 4-7, 2004, San Diego.
9. Asou H., Kyo T.^{*1}, Inaba T. (^{*1}Internal Medicine, Hiroshima Red Cross & Atomic Bomb Survivor's Hospital): t(8;21)-positive AML with mutant kit is a novel therapeutic target of imatinib mesylate. The 46th Annual meeting of the American Society of Hematology, December 4-7, 2004, San Diego.

C. その他

1. 稲葉俊哉: 緊急被曝医療と後障害フォローアップ: 臨床サイドの課題 第45回原子爆弾後障害研究会シンポジウム 長崎 (2004.6.6)
2. 稲葉俊哉: ヒートショック蛋白による mRNA 半減期調節と造血細胞の生死決定 東京医科歯科大学 東京 (2004.6.30)
3. 稲葉俊哉: 「ポスト・キメラ」時代の白血病研究 東京医科歯科大学 東京 (2004.6.30)
4. 稲葉俊哉: シャペロン・コシャペロンによるアポトーシス誘導因子 Bim の mRNA 安定性調節メカニズム 日本アポトーシス研究会シンポジウム 名古屋 (2004.7.31)
5. 稲葉俊哉: mRNA 安定性調節を介した細胞増殖・細胞死の制御 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15年度班会議, 東京, (2004.11.19)
6. 稲葉俊哉: MDS 分子治療標的の同定 原爆症に関する調査研究班 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 (2005.1.28)