

[0022]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2007年

<https://doi.org/10.15017/10326>

---

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 22, 2008-05. 九州大学生体防御医学研究所  
バージョン :  
権利関係 :



## I 各部門の研究活動の概況および業績

ゲノム機能制御学部門  
Department of Molecular Genetics

## ゲノム集団遺伝学分野

### Division of Molecular Population Genetics

ゲノム集団遺伝学分野では、ゲノムの一次配列情報を利用した統計遺伝学的手法による疾患関連遺伝子の同定、およびエピジェネティックな転写制御機構について研究を行っている。平成 19 年度から平成 20 年度にかけての異動は以下の通りである。大学院生として、手柴理沙（小児外科）、北島秀俊（第 3 内科）が、JST 研究補助員として、美浦真紀子が研究に加わった。古野憲司（学術研究員）が小児科に帰局した。コラボレーション 2 において研究活動を行っている。

#### A. 単一遺伝病、多因子疾患のゲノム解析

##### a. 多施設共同研究におけるゲノム解析

平成 19 年度に実施した、ゲノム解析に関わる他施設との共同研究は以下の通りである（敬称略）。①自己免疫性甲状腺炎（ゲノム特定・国立国際医療センター・笹月健彦）、②自己免疫性甲状腺炎（オーダーメイド医療実現化プロジェクト・福岡大学・白澤専二）③2型糖尿病（ゲノム特定・神戸大学・春日雅人）、④2型糖尿病（21COE・九大・高柳涼一）、⑤統合失調症（ゲノム特定・九大・服巻保幸）、⑥心筋梗塞（ゲノム特定・愛知学院大・横田充弘）⑦家族性血球貪食性リンパ球症（愛媛大・石井榮一）、⑧大腸がん（CREST・九大・森正樹）、⑨2型糖尿病（国立国際医療センター・加藤規弘）、⑩血栓症（21COE・九大・大中佳三）、⑪骨密度（21COE・九大・大中佳三）、⑫多系統萎縮症（ゲノム特定・東大・辻省次）、⑬腎臓がん（九大・横溝晃）、⑭横隔膜ヘルニア（九大・増本幸二）。

##### b. 胃がん関連遺伝子のゲノム的解析と分子病態の解明

ノンパラメトリック連鎖解析および連鎖不平衡を利用した Gene-based 相関検定によって、胃がん発症を規定する遺伝要因を探索し、統計遺伝学的に同定された遺伝子について発がんとの関連を検討している。21 番染色体より同定した胃がん発症関連遺伝子 STCH についてノックアウトマウスを作成し、個体レベルでの機能解析を進めている。また、高密度 SNP アレイを用いた高解像度の胃がんゲノム構造異常の解析を進め、新規発がん関連遺伝子の同定を進めている。

#### B. エピジェネティック転写制御の研究

ヒストンメチル化酵素 SET9 が、ある転写共役因子の複数のリジン残基をモノメチル化することを見出し、これによる分子機能変化を解析している。

## 業績目録

### 原著論文

1. K. Furuno, K. Ikeda, S. Hamano, K. Fukuyama, M. Sonoda, T. Hara, T. Sasazuki, K. Yamamoto. 2008.  
Onecut transcription factor OC2 is a direct target of T-bet in type-1 T-helper cells.  
Genes and Immunity, in press.
2. K. Miyake, Y. Horikawa, K. Hara, K. Yasuda, H. Osawa, H. Furuta, Y. Hirota, K. Yamagata, Y. Hinokio, Y. Oka, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, Y. Yamada, Y. Seino, H. Maegawa, A. Kashiwagi, K. Yamamoto, K. Tokunaga, J. Takeda, H. Makino, K. Nanjo, T. Kadowaki, M. Kasuga. 2008.  
Association of TCF7L2 polymorphisms with susceptibility to type 2 diabetes in 4,087 Japanese subjects.  
J. Hum. Genet. 53, 174-180.
3. K. Kusuvara, K. Yamamoto, K. Okada, Y. Mizuno, T. Hara. 2007.  
Association of IL12RB1 polymorphisms with susceptibility to and severity of tuberculosis in Japanese: a gene-based association analysis of 21 candidate genes.  
Int. J. Immunogenet. 34, 35-44.
4. Y. Morishima, T. Yabe, K. Matsuo, K. Kashiwase, H. Inoko, H. Saji, K. Yamamoto, E. Maruya, Y. Akatsuka, M. Onizuka, H. Sakamaki, H. Sao, S. Ogawa, S. Kato, T. Juji, T. Sasazuki, Y. Kodera; Japan Marrow Donor Program. 2007.  
Effects of HLA Allele and Killer Immunoglobulin-Like Receptor Ligand Matching on Clinical Outcome in Leukemia Patients Undergoing Transplantation With T-cell-Replete Marrow From an Unrelated Donor.  
Biol. Blood Marrow Transplant. 13, 315-328.
5. K. Shide, K. Shimoda, K. Kamezaki, H. Kakumitsu, T. Kumano, A. Numata, F. Ishikawa, K. Takenaka, K. Yamamoto, T. Matsuda, M. Harada. 2007.  
Tyk2 mutation homologous to V617F Jak2 is not found in essential thrombocythaemia, although it induces constitutive signaling and growth factor independence.  
Leuk Res. 31, 1077-1084.
6. K. Furuno, H. Takada, K. Yamamoto, K. Ikeda, T. Ohno, V. Khajoe, Y. Mizuno, T. Hara. 2007  
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and coronary artery lesions in Kawasaki disease.  
J. Pediatr. 151, 155-160.

7. E. Ishii, S. Ohga, S. Imashuku, M. Yasukawa, H. Tsuda, I. Miura, K. Yamamoto, H. Horiuchi, K. Takada, K. Ohshima, S. Nakamura, N. Kinukawa, K. Oshimi, K. Kawa. 2007.  
Nationwide survey of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan.  
Int. J. Hematol. 86, 58-65.
8. A. Yokomizo, K. Yamamoto, N. Kinukawa, T. Tsunoda, H. Koga, S. Naito. 2007.  
Association analysis of glutathione-S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism with urothelial cancer susceptibility and myelosuppression after M-VAC chemotherapy.  
Int. J. Urol. 14, 500-504.

## 学会発表

1. 古野憲司, 菅野康吉, 山本健 (2007, 9/12-15) .  
Illumina317KSNP アレイを用いた胃癌細胞染色体の遺伝子異常プロファイリング.  
日本人類遺伝学会第 52 回大会, 東京.
2. 山方伸茂, 山本健 (2007, 10/3-5) .  
胃癌感受性遺伝子 STCH の発現解析.  
第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜.
3. 山本健 (2007, 9/8) .  
ゲノムワイドな多因子疾患発症関連遺伝子同定戦略.  
山形大学 21 世紀 COE プログラム「分子疫学研究拠点合同シンポジウム  
ー山形大学、九州大学、自治医科大学ー」, 山形.

## ゲノム病態学分野

### Division of Molecular and Clinical Genetics

当分野では、血液・腫瘍性疾患ならびに消化器疾患患者を対象に臨床ならびに基礎研究を行っている。研究内容としては、新規治療法開発を目的に、A. 悪性腫瘍に対する遺伝子・免疫細胞治療の基礎および臨床研究、B. 霊長類 ES 細胞を用いた再生医療開発研究、C. 腫瘍溶解性ウイルスを用いた遺伝子治療法開発研究、などを行っている。これらの基礎ならびに臨床研究を積極的に進めることで、特に腫瘍性疾患に対するより効果的かつ安全な治療法を開発できるものと考えている。なお、われわれの研究内容を含めた九州大学で開発された新規医療技術を難病で苦しんでいる患者さんへ円滑かつ早期に還元していくためには、九州大学病院内での新システムの構築が重要であるため、このトランスレーショナルリサーチ機構構築も、当研究分野の臨床部門である先端分子細胞治療科を介して九州大学病院各診療部門の協力を得ながら早急に進めている。

#### A. 悪性腫瘍に対する遺伝子・免疫細胞治療の基礎および臨床研究

##### a. 進行・再発固形腫瘍（消化器がん・肺がん・子宮頸がん）に対する Cyclophosphamide 併用新規腫瘍関連抗原由来エピトープペプチドカクテルを用いた腫瘍特異的強化ワクチン療法第 I 相臨床試験

近年の集学的治療法の進歩により、悪性腫瘍の治療成績は年々向上している。しかし、手術療法、化学療法、放射線療法等既存の一般的治療法に対する治療抵抗例や再発例などに対しては有効な治療法は無く、症状緩和療法主体の対症療法に留まっているのが現状である。したがって、これら現在の治療法では治癒が望めない症例に対して、新しい治療法を開発することが社会的にも強く要請されている。本研究は、他に有効な治療法のない進行・再発固形腫瘍、特に消化器がん・肺がん・子宮頸がん患者で HLA-A\*2402 を有している患者を対象に、Cyclophosphamide 投与後、HLA-A\*2402 拘束性で KOC1, TTK, CO16 (URC10), DEPDC1, MPHOSPH1 由来の腫瘍関連抗原エピトープペプチドカクテルを皮下接種し、IL-2 を投与する。この方法の安全性を検証する第 I 相臨床試験である。3 患者コホートの Cyclophosphamide 3 段階用量漸増試験とし、副次目的として、投与された患者のペプチドに対する特異的細胞および液性免疫反応誘導の可否および臨床効果についても検討する。本臨床試験の特徴はこれまで同定されることが困難であった固形腫瘍特異的に発現している新規腫瘍抗原を標的とすることに加え、制御性 T 細胞排除を目的とした Cyclophosphamide の前投与を併用することにある。併せてペプチド投与により誘導された活性化リンパ球をさらに増殖させる

目的で IL-2 全身投与を行う。すなわち、本研究は腫瘍免疫に対する免疫寛容の排除と腫瘍抗原特異的免疫療法を組み合わせた新しい世代の抗腫瘍免疫療法と位置づけられ、進行固形腫瘍におけるがん特異的免疫療法の有効性を検討するものとして極めて有意義であると思われる。なお平成 20 年 4 月 1 日段階で 1 段階を無事に終了している。

#### **b. RNF43 ペプチドパルス樹状細胞ならび RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第一相臨床研究**

強力な抗原提示細胞である樹状細胞に大腸癌に対して高発現している新規遺伝子として同定された腫瘍抗原ペプチド・Ring finger protein (RNF) 43 ペプチドを提示させ末梢血リンパ球と共培養することにより RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を誘導し、その後この活性化リンパ球および RNF43 ペプチドパルス樹状細胞を患者に投与するとともに、制御性 T 細胞の排除のため低容量シクロホスファミド投与、活性化免疫細胞クローンの維持のための樹状細胞の追加投与と IL-2 全身投与をおこない、本治療法の安全性および抗腫瘍免疫誘導効果の有無を *in vitro* 検査ならびに臨床効果の観点から検討する臨床研究を実施中である。これ迄に第一例目の臨床研究が終了し、その免疫反応についての解析を行うとともに臨床研究参加患者のエントリーを続けている。

#### **c. 悪性リンパ腫を対象とした新規腫瘍抗原を用いた免疫細胞療法の確立**

悪性リンパ腫の治療成績は分子標的治療薬や新規の抗がん剤の開発により年々目覚ましく向上してきている。しかし、治療不応例や移植後再発例は依然として予後不良であり今後はその治療法開発が重要な課題になると考えられる。免疫細胞療法は、各種固形癌において新規の治療法として注目されており、悪性リンパ腫においても LMP-1, LMP-2, idiotype を標的にした臨床研究で一部に有効例が報告されている。本研究では悪性リンパ腫の腫瘍抗原特異的活性化リンパ球療法の開発を目的とし、現在マイクロアレイにより同定された複数の新規腫瘍抗原において悪性リンパ腫での発現を検討中である。高発現を認めた腫瘍抗原に関して腫瘍抗原特異的活性化リンパ球を作製し抗腫瘍免疫誘導効果を解析する。また、今後化学療法ならびに放射線治療抵抗性の悪性リンパ腫患者を対象とした第 I 相臨床研究を展開し、本治療法の安全性、完遂性および抗腫瘍免疫誘導効果の有無を *in vitro* 検査（免疫系解析）ならびに臨床効果の観点から検討する計画である。

#### **d. GM-CSF 遺伝子導入細胞を用いた癌ワクチン療法の効果増強因子としてのケモカイン (TARC 及び RANTES) 分子に関する研究 (Inoue H. et al.)**

GM-CSF (顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子) 遺伝子導入マウス腫瘍細胞は *in vivo* においてその腫瘍形成能を消失する。我々はこれまで、ケモカイン分子である TARC 或いは RANTES 遺伝子を GM-CSF 遺伝子と同時に遺伝子導入したマウス癌細胞を接種したところ、*in vivo* においてそれらの腫瘍形成が抑制されたことを報告した。今回、我々は将来の臨床応用を目的とし、組換え TARC または RANTES 蛋白を予め  $\gamma$  線

照射した GM-CSF 遺伝子導入ワクチン細胞に付加し混合接種することで、担癌マウスにおけるワクチン抗腫瘍効果が増強されるか否かを検証した。1×10<sup>5</sup>個の WEHI3B 細胞を皮下接種後、3×10<sup>6</sup>個のレトロウイルスによる GM-CSF 遺伝子導入 WEHI3B ワクチン細胞に組換え TARC または RANTES 蛋白を混合した混合ワクチンを 4 日おきに計 4 回皮下接種した。ワクチン治療経過中に目立った有害事象は認められなかった。ケモカイン混合ワクチン投与群マウスは、GM-CSF ワクチン単独投与群マウスより有意に長く生存した。ケモカイン混合ワクチン投与群マウス脾細胞を *in vitro* において WEHI3B 細胞で再刺激すると、GM-CSF 単独ワクチン群と比較し有意に高い IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , 及び TNF- $\alpha$  の発現を認め、自然免疫及び獲得免疫系の活性化が示唆された。また、ケモカイン混合ワクチン治療後の局所腫瘍の免疫染色において GM-CSF 遺伝子単独治療群よりも有意に多数の CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の浸潤を認めた。TARC 及び RANTES は担癌マウスにおける GM-CSF 遺伝子導入腫瘍ワクチンによる免疫学的抗腫瘍効果を増強し、臨床的に有用であることが示唆された。

#### **e. GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞を用いたマウス悪性腫瘍モデルに対する癌ワクチン療法の開発 (アデノウイルスベクターとセンダイウイルスベクターの比較)**

(Inoue et al.)

免疫遺伝子療法において、腫瘍細胞に GM-CSF 遺伝子を導入し、放射線を照射したワクチン細胞を用いた抗腫瘍効果が認められ、様々な固形癌において臨床試験が進行している。ウイルスを含めた様々な遺伝子導入法がある中で、我々は GM-CSF 遺伝子導入ベクターとしてアデノウイルス (E1(-)) 及びセンダイウイルス( $\Delta$ F)の 2 つのウイルスベクターを用いた腫瘍ワクチン細胞 (RENCa: マウス腎癌細胞) を作成し、遺伝子導入効率及びマウス自家腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果の比較検討を行い、両ベクターにおいて同等の抗腫瘍効果があることを明らかにした。

#### **f. HIV プロテアーゼ活性検出の為に *in vitro* translation システムの確立**

(Iga et al., )

HIVはAIDSの病原体であり、Highly active antiretroviral therapy (HAART)と呼ばれる多剤併用抗 HIV-1化学療法の標的の一つである HIV-1 protease (PR)は、ウイルス構造タンパクのプロセシング機能を有しており、ウイルス複製に必須である。本論文において我々は *in vitro* transcription/translation に基づいたHIV-1 PRの表現型決定の方法について述べる。このシステムではアッセイに用いる基質とPRの両者が *in vitro* transcription/translation によって調製される。Protease活性はELISAによって定量化される基質の切断量によって評価される。このアッセイ系は安全迅速で特別な施設を必要としない。我々のこの迅速HIV-1 PR表現型アッセイ系は薬剤耐性評価や新規薬剤開発に有意義であると思われる。

#### **g. Single CX3CL1-Ig DNA投与はIn vivoにおけるT細胞プライミングを増強する**

(Iga et al., )

抗原刺激においてワクチン効果を決定する獲得免疫反応の確立は有効なT細胞プライミングに依存する。先ず我々はCX3CR1の唯一のリガンドであるCX3CL1を発現する

CX3CL1-Ig DNAのウイルスもしくは腫瘍抗原との同時投与がin vivo抗原特異的T細胞増殖およびエフェクター作用を誘導し、腫瘍チャレンジを防御しうることを明らかにした。さらにCX3CL1-Igと抗原の筋組織とリンパ器官での早期発現がin vivoでのCD14+CD11c+骨髄系樹状細胞の遊走の増強を誘導すること（CD8alpha+CD11c+リンパ系樹状細胞では認めない）を明らかにした。すなわち、CX3CL1-Igは樹状細胞をリンパ器官への有効にリクルートさせることにより、T細胞プライミングを増強し、ワクチン効果を増大させることのできる新規アジュバントとして期待しうる。

#### **h. 脾腫ならびに汎血球減少症を伴うGraves病はB細胞リンパ増殖性疾患を模倣する (Suehiro Y et al.)**

汎血球減少、脾腫、リンパ増殖性疾患(末梢血中CD5+B cells 9%, 骨髄中CD10+B cells 35%, sIL-2 5, 185 U/ml)を併発した甲状腺機能亢進症(Graves病)を経験した。甲状腺亜全摘出後に汎血球減少の改善とsIL-2の低下(504U/ml)、さらに術後15ヶ月には末梢血中CD5+B cells 8%, 骨髄中CD10+B cells 2%と減少を認めた。これらの臨床経過から本症例は、甲状腺機能亢進症に伴うポリクローナルなBリンパ球の増殖と考えられ興味深い症例であった。

### **B. 霊長類ES細胞を用いた再生医療開発研究**

#### **a. コモンマーモセット胚性幹(ES)細胞を用いた血小板分化誘導系の検討 (Yokoo T, et al.,)**

ES細胞は再生医療の共通細胞ソースとして期待されているが、臨床応用までには有効性と安全性に関する慎重な前臨床研究の実施が必要である。この観点より我々は小型霊長類・コモンマーモセット(CM)に着目し、CMES細胞からの効率良い血球分化誘導系について検討を行ってきた。当研究室のこれまでの研究で、CMES細胞にtal1/sc1遺伝子を強制発現させることにより、血球細胞への分化能が飛躍的に増大することが分かっていた。そこで本研究ではCMES細胞から効率的な血小板産生系を確立し、新規輸血療法開発に向けた前臨床研究を試みることを目的とした。tal1/sc1遺伝子は巨核球・血小板分化にも関与する遺伝子であることから、まず初めにtal1/sc1遺伝子を恒常的に発現するCMES細胞株(以下、ES-tal1/sc1細胞)の樹立を行った。続いて得られたES-tal1/sc1細胞を用いてトロンボポエチン存在下、接着培養法により分化誘導を行った結果、胞体突起を有したCD41(巨核球・血小板マーカーの一つ)陽性細胞及び血小板産生様細胞が観察された。CD41陽性細胞の産生数を増加させるため、巨核球・血小板分化に重要なgata1, runx1, NF-E2遺伝子の強制発現実験を行ったが、顕著な差は認められなかった。現在さらなる分化誘導条件を検討するとともに、ES細胞由来の分化細胞(巨核球・血小板)中のvWF因子の発現についても光顕、電顕レベルで検討中である。

#### **b. ヒト胎児肝臓由来レンチウイルス発現ライブラリーを用いた新たな造血因子の探索：造血分化誘導因子探索を目的としたヒト胎児肝臓由来レンチウイルス発現ライブラリーの構築**

近年の遺伝子治療の進歩に伴い、遺伝子導入法と再生医療とを組み合わせた将来的な治療法の開発が可能となっている。この観点からこれまでに我々は非ヒト霊長類コモンマーモセット (CM) ES細胞にレンチウイルスベクターを用いて *tal1/scl* 遺伝子を導入することにより、*in vitro*において効率良く血球系細胞へと分化誘導する系を開発してきた。しかし、同細胞を免疫不全 (NOG) マウスに骨髄内投与した結果、*in vivo*において造血再構築を行う為にはさらなる血球分化誘導の効率化が必要であると考えられた。そこで本研究ではCMES細胞から血球分化誘導に有用な第二、第三遺伝子のスクリーニングを行う為に、ヒト胎児肝臓由来レンチウイルスcDNA発現ライブラリーの作製を行った。本研究により構築されたヒト胎児肝臓由来レンチウイルスcDNA発現ライブラリーは独立したクローン数として  $>8 \times 10^7$ 、平均cDNA長約2.1kbから構成され、一部(40遺伝子分)をDNA配列解析した結果では、約60%が全長タンパク質をコードしており、細胞内酵素や酵素阻害因子、細胞膜タンパク質など多岐の分子が含まれていた。さらに同ライブラリーからウイルスを産生させ、293T細胞に感染させたところ、遺伝子導入されたcDNAの平均長は約1kbであり、Glycophorin A抗体を指標としたフローサイトメーター解析からは、導入されたライブラリー遺伝子がタンパク質レベルでも正しく発現していることが示された。現在、このライブラリーを用いてCMES細胞株の血球高分化能を指標にスクリーニングを行っているところである。高力価ヒト胎児肝臓由来レンチウイルス発現ライブラリーを作成し、上記のCM ES細胞株とを用いて*in vitro*造血能を指標に新たな造血因子の探索を行っている。

#### **c. ヒト ES 細胞を用いた遺伝子導入による造血幹細胞・分化血球誘導系の確立**

平成19年11月より文部科学省の承認を得て、ヒトES細胞をもちいた研究を開始した。現在ヒトES細胞を用いた遺伝子導入による造血幹細胞・分化血球誘導系の確立をめざした研究を実施中である。

#### **d. 白血病モデル非ヒト霊長類モデルの作製**

白血病治療法の開発を目的として、白血病モデルコモンマーモセットの作出に取り組んでいる。これまでに東京大学医科学研究所との共同研究により、白血病原因遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを数種類構築した。今後、遺伝子導入した骨髄細胞を自家移植する予定である。さらに独立行政法人霊長類研究所との共同研究でヒト成人T細胞性白血病モデルをカニクイサルに作出中である。

## C. 腫瘍溶解性ウイルスを用いた遺伝子治療法開発研究

現在当科では腫瘍溶解性ウイルスを用いた遺伝子治療法の開発研究を実施中である。  
(詳細は特許申請等の関連から省略)

### 業績目録

#### 原著論文

1. Nakayama M, Muta H, Somada S, Maeda T, Mutoh T, Shimizu K, Suehiro Y, Hisano T, Kurita R, Shiraishi T, Mori M, Yoshikawa Y, Tsunetomi N, Uchida A, Tani K. A case of Cronkhite-Canada Syndrome associated with schizophrenia Int Med 46:175-180, 2007.
2. Suehiro Y, Tachikawa Y, Abe Y, Ohshima K, Muta K, Tani K. Epithelioid hemangioendothelioma presenting with severe myelofibrosis and a high serum hyaluronan level. Eur J Haematol 79:349-353, 2007
3. Tanaka, T., Gondo, S., Okabe, T., Shirohzu, H., Morinaga, H., Nomura, M., Tani, K., Takayanagi, R., Nawata, H., Yanase, T. SF-1/ Ad4BP transforms human bone marrow mesenchymal cells into steroidogenic cells. J Mol Endocrinol. 2007 ( in press)
4. Kudo S, Konda R, Obara W, Kudo D, Tani K, Nakamura Y, Fujioka T. Inhibition of tumor growth through suppression of angiogenesis by brain-specific angiogenesis inhibitor 1 gene transfer in murine renal cell carcinoma. Oncol Rep 18:785-791, 2007
5. Maeda T, Sugano M, Guan JZ, Oyama J, Higuchi Y, Makino N, Hatakenaka M, Muta H, Nakayama M, Nakazaki Y, Kurita R, Hiroyama T, Suzuki T, Tani K. Familial Turner mosaicism 46XX/45XO with brain calcification. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 19:342-343, 2007
6. Iga M, Boissonnas A, Mahé B, Bonduelle O, Combadière C, Combadière B. Single CX3CL1-Ig DNA administration enhances T cell priming in vivo. Vaccine. 2007 Jun 6;25(23):4554-4563. Epub Apr 30, 2007
7. Matsuda Z, Iga M, Miyauchi K, Komano J, Morishita K, Okayama A, Tsubouchi H. Review. In vitro translation to study HIV protease activity. Methods Mol Biol. 375:135-149, 2007
8. Okazaki T, Sakamuro D. Induction of Fas (CD95/APO-1) ligand is essential for p53-dependent apoptosis in an in vitro renal carcinoma model system. J Cancer Res Clin Oncol. 133 :581-588. 2007
9. Park JY, Farrance IK, Fenty NM, Hagberg JM, Roth SM, Mosser DM, Wang MQ, Jo H, Okazaki T, Brant SR, Brown MD. NFKB1 promoter variation implicates shear-induced NOS3 gene expression and endothelial function in prehypertensives and stage I hypertensives. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293:H2320-2327, 2007
10. Sun, X, Somada, S., Shibata, K., Muta, H., Yamada, H., Yoshihara, H., Hobnrad, K., Nakamura, K., Takayanagi, R., Tani, K., Podack, E., Yoshikai, Y. A Critical Role of CD30 Ligand/CD30 in Controlling Inflammatory Bowel Diseases in Mice. Gastroenterology 134:447-458, 2008
11. Maeda T, Yamada H, Akao N, Iga M, Endo T, Koibuchi T, Nakamura T, Odawara T, Iwamoto A, Fujii T. Unusual radiological findings of Fasciola hepatica infection with huge cystic and multilocular lesions. Intern Med. 47(5):449-52. Epub, 2008
12. Inoue H, Iga M, Xin M, Asahi S, Nakamura T, Kurita R, Nakayama M, Nakazaki Y, Takayama K, Nakanishi Y, Tani K. TARC and RANTES enhance antitumor immunity induced by the GM-CSF-transduced tumor vaccine in a mouse tumor model. Cancer Immunol Immunother, 2008

13. Ohtsuka R, Abe Y, Shiratsuchi M, Suehiro Y, Karube K, Muta K, Nishimura J, Takayanagi R. Graves' disease with splenomegaly and pancytopenia, mimicking B-cell lymphoproliferative disease Rinsho Ketsueki. 49(2):104-108, 2008
14. Kim YT, Yoshida H, Kojima M, Kurita R, Nishii W, Muramatsu T, Ito H, Park SJ, Takahashi K. The Effects of Mutations in the Carboxyl-Terminal Region on the Catalytic Activity of Escherichia coli Signal Peptidase IJ Biochem. 143:237-242,2008
15. Inue, H., Iga, M., Xin, M., Asahi, S., Nakamura, T., Kurita, R., Nakayama, M., Nakazaki, Y., Takayama, K. Nakanishi, Y., Tani, K. TARC and RANTES Enhance Antitumor Immunity Induced by the GM-CSF- Transduced Tumor Vaccine in a Mouse Tumor Model. Cancer Immunol Immun. 2008 (in press)

## 総説

1. 谷憲三朗、トランスレーショナルリサーチとしての免疫遺伝子治療・細胞療法、日本アフェレンシス学会 26:232-237, 2007
2. 谷憲三朗、遺伝子療法領域におけるトランスレーショナルリサーチ、Frontiers in Gastroenterology 12:70-80:2007
3. 谷憲三朗、細胞療法：その現状とトランスレーショナルリサーチからの今後の展望、血液フロンティア18：17-19 2008
4. 谷憲三朗、遺伝子治療領域における細胞療法の現状、血液フロンティア18：61-68 2008
5. 谷憲三朗、世界と日本における遺伝子治療の現状、学士鍋142：6-10 2007

## 学会発表

1. 岡田美智代, 栗田良, 及川達夫, 横尾朋子, 末廣陽子, 佐々木えりか, 谷憲三朗  
新しい造血因子探索を目的としたヒト胎児肝レンチウイルス発現ライブラリーの構築  
第69回日本血液学会、横浜、2007. 10
2. Ryo Kurita, Tatsuo Oikawa, Michiyo Okada, Tomoko Yokoo, Norio Komatsu, Yoshikuni Tanioka, Erika Sasaki, and Kenzaburo Tani Construction of a high performance lentiviral cDNA library derived from human fetal liver American Society of Gene Therapy(ASGT) 10th Annual Meeting in Seattle, June
3. 横尾朋子, 栗田良, 谷憲三朗  
コモンマーモセット ES 細胞への遺伝子導入による血球分化誘導系の現状と今後の展開  
「宮崎大学医学部／九州大学生医研 造血器腫瘍研究合同セミナー」2007. 11. 17 (熊本)
4. Hiroyuki Inoue, Takafumi Nakamura, Terumasa Hisano, Meng Xin, Saori Asahi, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoshikazu Yonemitsu, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani.  
Non-transmissible SeV encoding murine GM-CSF, another potent vector system to produce autologous tumor vaccines. American Society of Gene Therapy(ASGT) 10th Annual Meeting in

Seattle, June 2007.

5. Hiroyuki Inoue, Mutsunori Iga, Meng Xin, Ryo Kurita, Masaharu Nakayama, Yoko Suehiro, Yukoh Nakazaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Kenzaburo Tani.

TARC and RANTES enhance immunological antitumor effect induced by GM-CSF transduced leukemia vaccine in mouse model. American Society of Hematology(ASJT) Annual Meeting and Exposition in Atlanta, December 2007.

6. Hiroyuki Inoue, Takafumi Nakamura, Terumasa Hisano, Meng Xin, Saori Asahi, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoshikazu Yonemitsu, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani.

In vivo antitumor vaccine effects of non-transmissible SeV encoding GM-CSF in mouse renal cell carcinoma models. 2007年6月29日第13回 日本遺伝子治療学会 場所：愛知県立がんセンター

7. Hiroyuki Inoue, Terumasa Hisano, Mustunori Iga, Meng Xin, Saori Asahi, Ryo Kurita, Koichi Takayama, Yoshikazu Yonemitsu, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani.

Non-transmissible SeV(dF)-transduced autologous GM-CSF cancer vaccine cells as a candidate for immune gene therapy. 2007年10月2日 第66回 日本癌学会学術総会 場所：パシフィコ横浜

## ゲノム創薬・治療学分野

### Division of Molecular and Cell Therapeutics

当部門は、ヒトリプロダクションの分子機構及びその異常に基づく疾患の病態の解明、遺伝子診断さらには遺伝子治療の開発を目的としている。

平成19年度は、講師・加藤聖子、助教・浅野間和夫の教官のほかに、大学院生・田中義弘、山口真一郎、大神達寛、米田智子、高尾知佳で教室を構成した。9月には浅野間助教が米国カンザス大学に留学した。

我々は以下のテーマで、Ras/エストロゲンシグナルや幹細胞を標的としたゲノム創薬に取り組んでいる。

#### A. 子宮体癌細胞の stem like cell の同定と生物学的特性の解析

最近、Hoechst33342 の取り込みの低い分画の細胞 (side population cells, 以下 SP 細胞) を分離する方法により癌幹細胞の同定が報告されている。我々は子宮体癌細胞の SP 細胞を分離しその特性の解析と特異的に発現する遺伝子の検索を行った。方法は 1) 子宮体癌細胞株 Hecl, ラット子宮内膜細胞株 RENT4 細胞に活性化型 [<sup>125</sup>I]K-Ras を形質導入し造腫瘍能を獲得した RK12V 細胞を用いた。2) 各細胞を Hoechst33342 で染色後 flow cytometry で SP 及び nonSP 細胞を分離後培養し、形態・細胞増殖能・ヌードマウス上の造腫瘍能を解析した。3) RK12V-SP 細胞に特異的に発現している遺伝子群を microarray 法で解析した。4) 各 SP 及び nonSP 細胞、ヌードマウス上の腫瘍の各種蛋白発現を免疫染色法で解析した。

結果は 1) ヒト子宮体癌細胞, RK12V 細胞に SP 細胞が存在し, nonSP 細胞に比べ分化マーカーの発現の低下・不均等分裂・長期増殖能の性質を示した。2) 各 SP 細胞は nonSP 細胞に比べ造腫瘍能が著明に亢進しており, 上皮様構造と間質に富む腫瘍を形成しそれぞれの分化マーカーの発現もみとめられた。3) 各 SP 細胞は nonSP 細胞に比べ腫瘍間質形成に関与する遺伝子群の発現亢進がみとめられた。以上より 1) 子宮体癌細胞の SP 細胞は, 不均等分裂, 上皮・間質への多分化能, 著明な造腫瘍能, 浸潤能を持ち cancer stem like cell と考えられ, 腫瘍間質形成に関与する遺伝子群の機能が癌幹細胞の形質発現に重要であると考えられた。

#### B. 栄養膜細胞の分化におけるホメオボックス遺伝子 NECC1 の機能解析

我々はヒト絨毛癌の造腫瘍能抑制ならびに胎盤栄養膜細胞の分化に関わるホメオボックス遺伝子として NECC1 を単離, 同定した (Asanoma et al. 2003)。NECC1 は 73 アミノ酸からなる小さな蛋白質であり, コンセンサスモチーフとしてホメオドメインのみ

をもつ。ECC1 欠失変異マウスの胎盤は胎齡 9.5 日より 11.5 日にかけて栄養膜巨細胞層の過形成と海綿状栄養膜細胞層，栄養膜迷路層の低形成を認めこの傾向は胎齡が進むにつれて顕著になった。この結果は NECC1 が栄養膜細胞の巨細胞への分化を抑制することを示唆している。ラットの絨毛癌細胞株 Rcho-1 とマウスの栄養膜幹細胞株 (TS 細胞) を *in vitro* で分化させるモデルを検討したところいずれでも未分化状態では NECC1 を発現しておらず，分化に伴い発現が誘導される。Rcho-1 と TS に NECC1 を遺伝子導入し，分化刺激を与えるといずれも巨細胞への分化において抑制効果を認めた。心筋細胞において NECC1 により機能抑制される分化促進因子である SRF (serum response factor) を TS 細胞に導入すると分化が誘導された。SRF が栄養膜細胞の巨細胞への分化を促進し，NECC1 がこれを抑制し適切な分化調節を司るという新たなメカニズムが明らかになった。

### C. 子宮内膜細胞の癌化における NECC1 遺伝子の機能解析

我々は NECC1 が絨毛癌において発現抑制されており，絨毛癌の造腫瘍能を抑制すると報告したがその他の癌種においても発現抑制が報告されている。我々は NECC1 が正常内膜腺細胞に局限した発現をしており子宮内膜癌で発現が抑制されていることを見出した。子宮内膜癌で NECC1 の発現が抑制されているメカニズムの解明を行ったが DNA レベルでの欠損や変異は認めなかった。一般的に癌抑制遺伝子の発現抑制には転写調節領域のメチル化に関わる人が多いが我々は子宮内膜癌細胞株ならびに組織検体において NECC1 の転写調節領域の高メチル化状態を見出した。また子宮内膜癌細胞株を 5-aza-dC 処理により脱メチル化すると NECC1 の発現が再現された。乳癌細胞株 MCF7 においては  $17\beta$  estradiol (E2) から，エストロゲン受容体 (ER) Src, PI3 キナーゼ，SRF (serum response factor) を介して c-fos を転写活性化し，Cyclin D1 の発現を上げ，細胞周期を促進する経路が報告されている。そこで我々はエストロゲン感受性腫瘍である乳癌細胞，子宮内膜癌細胞において NECC1 は SRF の機能を阻害することで細胞増殖を負に制御するのではないかと考えた。実際，アデノウイルスベクターを用いて NECC1 を遺伝子導入した MCF7，子宮内膜癌細胞株に E2 刺激を与え，細胞増殖特性を検討したところ，細胞増殖、BrdU 取込み率が抑制された。また c-fos, Cyclin D1, Cyclin B1, Cyclin A などの各サイクリンの発現が抑制され，pRb のリン酸化，CDK4 (cyclin dependent kinase 4) のキナーゼ活性も抑制された。c-fos の SRE (serum responsive element) 配列をルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子に組込んだレポーターを子宮内膜癌細胞株に遺伝子導入し E2 刺激における Luc 活性を検討したところ NECC1 は SRE のうち，SRF 結合部位を介して抑制した。不死化子宮内膜細胞株の NECC1 の発現を shRNA を用いてノックダウンすると c-fos の転写活性化が上昇し，細胞増殖能が促進した。以上の結果より子宮内膜癌の癌化機構に NECC1 の発現抑制に関わり，細胞増殖

に有利に働くことが示唆された（投稿準備中）。

#### D. SP1 阻害剤（Mithramycin）の癌細胞増殖抑制効果

子宮体癌・卵巣癌の造腫瘍能獲得には Ras/MEK/ER $\alpha$ /MDM2 シグナル伝達系が関与する。このシグナル伝達系において MEK 阻害剤と抗エストロゲン剤の併用は ER $\alpha$  の不活化を介して MDM2 発現を抑制し、p53 の活性化から細胞老化による細胞死を誘導する。SP1 は MDM2 の転写因子のひとつであるが、その SP1 の選択的阻害剤（Mithramycin）が癌細胞増殖に与える効果や作用機構を解析した。

まず実験に用いたすべての癌細胞株（Hec1, Hec6, HHUA, KF, SKOV）において、高濃度の Mithramycin（600nM）は MDM2 の発現を予想どおり抑制した。すべての細胞株において、はるかに低濃度の Mithramycin（10nM $\sim$ ）でその増殖が抑制されたが、この濃度においては MDM2 の発現は p53 依存性に増加した。次に Mithramycin は野生型 p53 を有する細胞株において p53 の下流の標的遺伝子を活性化し、アポトーシスおよび細胞周期停止を誘導した。これにより野生型 p53 を有する細胞株において、Mithramycin はその細胞増殖抑制効果を強く示した。最後に MDM2-P2 プロモーター領域の遺伝子多型（SNP309）は SP1 の結合部位への親和性が増すことによりその活性亢進を示すものであるが、この SNP309 の存在により Mithramycin によって活性化される p53 機能が減弱することが示唆された。

以上より、Mithramycin は濃度・細胞種によって多様な作用機構を示すが、広範な抗腫瘍効果を示し、婦人科癌でも臨床応用可能と考えられた。

#### E. 子宮体癌の発生要因（遺伝子多型）に関する研究

一塩基多型（single nucleotide polymorphisms : SNPs）はヒトゲノム中に 300 万から 1000 万ヶ所存在していると推定され、特に病気に関係する遺伝子を探求するために有用な標識とされる。SNPs が遺伝子発現に影響を及ぼしたり（量的な変化）、タンパクの働きに影響を及ぼす（質的な変化）場合、病気のリスク診断や薬剤の使い分けの診断に利用することが出来る。

そこで、子宮体癌の危険因子として重要とされるエストロゲンに関与する遺伝子や癌抑制遺伝子、癌遺伝子などについて関連解析を行うこととした。まず、p53 の negative regulator として作用する MDM2 の P2 プロモーター領域に存在し、MDM2 の発現量に影響を及ぼすとの報告のある SNP309 の対立遺伝子頻度を解析している。さらにサンプル数を増やし、対象の遺伝子領域に存在する多数の SNPs について連鎖不均衡を考慮しながら関連解析し、日本人における子宮体癌と強い関連性を示す SNPs やハプロタイプを見出すことを目標としている。

## F. 酢酸メドロキシprogesteron (MPA) の大腸癌抑制作用機序の検討

米国の大規模臨床試験で報告されている、MPA による大腸癌抑制作用の分子生物学的機序を明らかにするために、大腸癌細胞株 HT29, HCT116 を用いて実験を行ったところ以下の知見を得た。

- ①細胞数計測, WST-1 アッセイにおいて, 20nM MPA (MPA) は Estradiol の存在に関わらず細胞増殖の抑制を認めた。
- ②ウェスタンブロットにおいて, 大腸癌細胞株ではprogesteron受容体 (PR), アンドロゲン受容体 (AR) の発現を認めたが, 糖質コルチコイド受容体, 鉱質コルチコイド受容体の発現は認められなかった。siRNA により PR, AR の発現をそれぞれ knockdown した大腸癌細胞に対し WST-1 アッセイを行ったところ, MPA に対する感受性が部分的に低下した。
- ③細胞周期解析において, MPA により G0/G1 期分画の集積と S 期分画の減少を認めた。SubG1 分画の集積は認めなかった。
- ④ウェスタンブロットにおいて, MPA によりサイクリン E 発現の低下, p21 発現の増加を認めた。サイクリン D, p27 の発現の変化は認めず, p16 発現は最初から認められなかった。
- ⑤免疫沈降法において, MPA により p21 と cdk2 相互作用の増加を認めた。
- ⑥non-RI キナーゼアッセイによりリコンビナント Rb 蛋白リン酸化能を測定したところ, MPA により cdk2 キナーゼ活性の低下を認めた。

以上の知見により, MPA は HT29, HCT116 において, AR または PR を介して p21 発現増加及びサイクリン E の発現低下をもたらし, cdk2 キナーゼ活性低下により Rb 脱リン酸化状態が保たれることにより G1→S 期移行に必要な蛋白群の合成が抑制されることにより細胞増殖抑制効果をもたらされる可能性が示された。

## G. 栄養膜幹細胞 (TS) におけるインプリント遺伝子 TSSC3 の機能解析

TSSC3 (tumor-suppressing STF cDNA3) は正常母性発生のインプリント遺伝子で, ヒトでは雄核発生起因の全奇胎で完全消失していることを以前報告している。ヒト正常胎盤における細胞性栄養膜細胞では顕著に発現し, 合胞体栄養膜細胞での発現が消失していることがわかっている。近年, TSSC3 遺伝子の欠損がマウス胎盤の overgrowth に関与することが報告されたことから, TSSC3 が絨毛幹細胞の分化・増殖また絨毛組織構造への関与が考えられた。

まずマウス栄養膜幹細胞 (TS 細胞) の *in vitro* での分化モデルを用いて TSSC3 の発現変化を確認したところ, TSSC3 は分化初期で発現が上昇し, 分化が進むにつれて発現が低下した。これはマウス胎盤の迷路層栄養膜細胞に発現する Gcm1 と同様の発現を TSSC3 が示しており, TSSC3 が迷路層栄養膜細胞で発現しているという既知の結果と一

致した。TS細胞でのTSSC3の発現はsiRNAを用いてノックダウンさせると巨細胞への分化マーカーを促進させる傾向がみられた。またTS細胞に未分化条件下でアデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入すると前駆細胞への分化を促進させる効果を認めた。これらのことから、TSSC3はTS細胞の分化初期段階での影響に関与することが考えられ、現在TSSC3により影響を受ける遺伝子との関係を明らかにしている。

## 業績目録

### 原著論文

1. K.Kato, M.Yoshimoto, K.Kato, S.Adachi, A.Yamayoshi, T.Arima, K.Asanoma, S.Kyo, T.Nakahata, N.Wake. 2007.  
Characterization of side population cells in human normal endometrium.  
Human Reproduction. 22, 1214-1223.
2. S.Suga, K.Kato, A.Yamayoshi, S.Adachi, K.Asanoma, S.Yamaguchi, T.Arima, K.Kinoshita, N.Wake. 2007.  
An inhibitory effect on cell proliferation by blockage of the MAPK / Estrogen Receptor / MDM2 signal pathway in gynecologic cancer.  
Gynecologic Oncology. 105, 341-350.
3. A.Yamayoshi, K.Kato, S.Suga, A.Ichinose, T.Arima, T.Matsuda, H.Kato, A.Murakami, N.Wake. 2007.  
Specific apoptosis induction in HPV-positive cervical carcinoma cells by photodynamic antisense regulation.  
oligonucleotides. 17, 66-79.
4. 加藤聖子、田中義弘、山本奈理、梅崎美奈、内田聡子、和氣徳夫。 2007。  
ビスフォスフォネート（アレンドロネート）の癌細胞への効果の検討。  
Osteoporosis Japan. 15, 88-90.
5. K.Asanoma, H.Kato, S.Yamaguchi, CH.Shin, ZP.Liu, K.Kato, T.Inoue, Y.Miyanari, K.Yoahikawa, K.Sonoda, K.Fukushima, N.Wake. 2007.  
HOP/NECC1, a novel regulator of mouse trophoblast differentiation.  
J Biol Chem. 17, 24065-24074.
6. Y.Tanaka, K.Kato, R.Mibu, S.Uchida, K.Asanoma, K.Hashimoto, M.Nozaki, N.Wake. 2008.  
Medroxyprogesterone acetate inhibits proliferation of colon cancer cell lines by modulating cell cycle-related protein expression.  
Menopause. in press.

## 総説

1. 加藤聖子. 2007.  
ここまできた分子標的治療 子宮体癌.  
臨床婦人科産科, 61, 1257-1261.

## 学会発表

1. 加藤聖子, 大神達寛, 山口真一郎, 米田智子, 浅野間和夫, 和氣徳夫  
(2007, 4/14-17)  
子宮体癌細胞の stem like cell の同定と生物学的特性の解析.  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会, 京都.
2. 山口真一郎, 浅野間和夫, 加藤聖子, 大神達寛, 米田智子, 和氣徳夫  
(2007. 4/14-17)  
子宮体癌における HOP/NECC1 遺伝子の関与とその制御について.  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会, 京都.
3. 井上貴史, 浅野間和夫, 加藤聖子, 小林裕明, 和氣徳夫, 加藤秀則 (2007. 4/14-17)  
p21 発現に伴う細胞内活性酸素種の変化と癌細胞死誘導能との解析.  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会, 京都.
4. 大神達寛, 加藤聖子, 米田智子, 山口真一郎, 浅野間和夫, 和氣徳夫  
(2007. 4/14-17)  
SP1 阻害剤(Mithramycin)の癌細胞増殖抑制効果.  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会, 京都.
5. 田中義弘, 加藤聖子, 内田聡子, 梅崎美奈, 山本奈理, 野崎雅裕, 和氣徳夫  
(2007. 4/14-17)  
子宮内膜症間質細胞の GnRH アナログ添加による遺伝子発現変化の網羅的解析.  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会, 京都.
6. 浅野間和夫, 山口真一郎, 加藤聖子, 福嶋恒太郎, 大神達寛, 米田智子,  
和氣徳夫 (2007. 4/14-17)  
ホメオボックス遺伝子 NECC1 のマウス栄養膜細胞における働き.  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会, 京都.
7. 梅崎美奈, 加藤聖子, 山本奈理, 田中義弘, 松下幾恵, 中村博子, 内田聡子,  
小川伸二, 小林裕明, 梅津隆, 和氣徳夫 (2007. 4/14-17)  
子宮内膜症合併卵巣明細胞腺癌, 類内膜腺癌症例の検討.  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会, 京都.
8. 竹内正久, 上岡陽亮, 矢幡秀明, 内田聡子, 加藤聖子, 小川伸二, 小林裕明,  
和氣徳夫 (2007. 4/14-17)

- 腹腔鏡下付属器腫瘍手術におけるクリティカルパスの有用性の検討.  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会, 京都.
9. 内田聡子, 山本奈理, 田中義弘, 加藤聖子, 和氣徳夫 (2007. 4/14-17)  
卵巣チョコレート嚢胞摘出術後の子宮内膜症再発に関する検討.  
第 59 回日本産科婦人科学会学術講演会, 京都.
10. 松下幾恵, 内田聡子, 山本奈理, 田中義弘, 小林裕明, 加藤聖子, 和氣徳夫  
(2007. 4/22)  
単純子宮頸部摘出術後に不妊治療を開始した一例.  
第 64 回日本生殖医学会九州支部会, 福岡.
11. 田中義弘, 加藤聖子, 橋本和法, 内田聡子, 野崎雅裕, 和氣徳夫 (2007. 5/12)  
塩酸ラロキシフェン (RLX) の子宮内膜症間質細胞に及ぼす影響に関する検討  
第 3 回 SERM 学術研究会学術集会, 東京.
12. Kiyoko Kato, Norio Wake (2007.10/3-5)  
Endometrial cancer side population cells show the phenotype of cancer stem-like cell  
第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜.

## 発生工学分野

### Division of Embryonic and Genetic Engineering

がんは死因の第1位であり、また増加の一途にあることから、人類にとって最も脅威な疾患である。我々は分子生物学、細胞生物学、生化学や発生工学の技術を駆使して、発がんの分子メカニズムの研究を行っている。

多くの癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常は、がんの発症のみならず、様々ながん以外の疾患の発症や個体の発生・分化などにも深く関わっていることが分かってきている。我々はこれまでにがん関連遺伝子シグナルである PTEN/PI3 キナーゼ経路分子の遺伝子改変動物を作成して、これらシグナルの異常が、がんの発症のみならず、自己免疫病・アルコール性脂肪性肝炎・心不全などの種々の疾患や病態の発症に関与することを見出してきた。これらの動物は、これら疾患のマウスモデルとして、疾患本態の解明に、新規治療薬の開発に非常に有用である。

平成19年度から鈴木聡（教授）、河原康一（助教）、西尾美希（学術研究員）、神崎元果（技術補佐員）、平成20年度からは濱田浩一（助教）が着任し、研究を開始した。

平成19年度は主に、以下の研究成果を報告した。

#### A. 生体におけるがん抑制遺伝子 PTEN の機能解析

多くのサイトカイン、インスリンなどのホルモン、抗原、インテグリンなど、様々な刺激によって、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ（phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K）が細胞膜の内側にリクルートされる。リクルートされた PI3K は細胞膜の構成脂質であるホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸（PI-4,5-P<sub>2</sub>, PIP<sub>2</sub>）の3位をリン酸化してホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸（PI-3,4,5-P<sub>3</sub>, PIP<sub>3</sub>）を産生する。PIP<sub>3</sub> は二次メッセンジャーとしてはたらく、Akt/PKBをはじめとするさまざまな下流の細胞内シグナル伝達系を活性化することにより細胞の増殖、生存、遊走、代謝などの多様な情報伝達の役割を果たす。

PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) は、多くの悪性腫瘍においてその DNA 変異が認められるがん抑制遺伝子である。またその DNA 変異のみならず、蛋白発現低下～消失が全悪性腫瘍の約半数で認められることから、PTEN は p53 に匹敵するがん抑制遺伝子の代表格に位置づけられるようになってきた。また PTEN の先天的変異は Cowden 病、Bannayan-Zonana 症候群、Lhermitte-Duclos 病、Proteus 症候群などの、過誤腫を伴い高率に悪性化する疾患群をひきおこすことが知られている。生化学的には、PTEN はその主な基質を PIP<sub>3</sub> とする脂質ホスファターゼであり、細

胞膜レベルで PI3K 経路を負に制御する。

我々は PTEN の生体における機能を解析するために PTEN 全身欠損マウスを作製したが、このマウスは胎生早期に致死となったことから (Cell 1998, Curr Biol 1998)、各種組織における PTEN の機能を明らかにするために次に PTEN<sup>flox</sup> マウスを作製した (Immunity 2001, J. Exp. Med. 2003, Cancer Res 2003, JCI 2004, Genes Dev 2005, Cancer Res 2006)。

#### **a. 肺胞上皮細胞における PTEN の機能解析**

がんの死因の 1 位は肺がんであり、増加の一途をたどっている。また肺がんのうち最多のものは肺腺がんであり、その約 7 割で PTEN 蛋白質の発現の低下～消失をみることで報告されている。そこで我々は肺における PTEN の役割を明らかにするために、我々の作製した PTEN<sup>flox</sup> マウスと、(tetO)<sup>7</sup>-Cre トランスジェニックマウスや SP-C-rtTA トランスジェニックマウスとを交配することによって、ドキシサイクリン投与によって肺胞細気管支上皮細胞特異的に PTEN を欠損するマウスを作製した。胎生期にドキシサイクリンを投与した PTEN 欠損マウス (E10-16) の 90% は生後 2 時間以内に低酸素血症で死亡した。残り 10% の生存マウスや、また肺形態形成が終了した生後にドキシサイクリンを投与した PTEN 欠損マウス (P21-27) では、ほぼ全例において自然肺腺がんを発症した。さらにこれら PTEN 欠損マウスでは発がん剤 (ウレタン) 投与による早期腫瘍形成も加速していた。組織学的・生化学的解析によって、肺胞細気管支上皮細胞や筋線維芽細胞の過形成、肺胞上皮細胞の分化障害、サーファクタント蛋白の産生障害を認めることを明らかにし、これらによって、低酸素血症が引き起こされたものと考えられた。さらに PTEN 欠損マウスでは肺幹細胞 (BASC) の増加を認めた。これまでに肺腺がんは肺幹細胞 (BASC) 由来であることが示されていることを考えあわせると、PTEN 欠損による肺幹細胞 (BASC) の増加が肺腺がん発症の一因である可能性が示唆された。PTEN 欠損マウスでは、細胞増殖や幹細胞維持に関わる Akt、c-Myc、Bcl-2、Shh の活性化や発現亢進をみ、また肺の形態形成や分化成熟阻害に働く Spry2 の発現亢進をみた。さらに PTEN 欠損マウスでみられた肺腺がんでは高頻度に K-ras の変異が認められた。このように PTEN 欠損による肺幹細胞 (BASC) の増加によって、肺幹細胞に K-ras など他のがん関連遺伝子の変異がおりやすくなり、これによって、肺腺がんがおこる可能性が考えられた (J. Clin. Invest. 2007)。

#### **b. NKT 細胞における PTEN の機能解析**

腫瘍が進展するには、腫瘍細胞は免疫監視担当細胞の攻撃から回避される必要がある。たとえば NKT 細胞の多くを占める V $\alpha$ 14iNKT 細胞の欠損したマウスでは、腫瘍の転移が加速することが知られている。そこで我々は腫瘍免疫監視担当細胞のうち NKT 細胞

に注目し、NKT細胞におけるPTENの機能を明らかにすることとした。

まず我々はT細胞特異的PTEN欠損マウス(LckCrePTENfloxマウス)では、T細胞のみならず、 $V\alpha 14$ iNKT細胞においても高率にPTENを欠損できることを見出した。そこで我々はこのマウスを用いて $V\alpha 14$ iNKT細胞におけるPTENの機能を解析することとした。PTENの欠損した $V\alpha 14$ iNKT細胞は著しい成熟障害を認めた。また成熟した $V\alpha 14$ iNKT細胞の単位細胞あたりの増殖能や、サイトカイン産生能などのNKT細胞の機能も著しく障害され、これらの障害はPI3K p110 $\gamma$ 、PI3K p110 $\delta$ に依存性であった。さらに *in vivo*においても、PTENヘテロ欠損マウスやホモ欠損マウスでは、 $\alpha$ GalCer (NKT細胞活性化剤)投与によるIFN $\gamma$ 産生が著しく障害されていた。また、樹状細胞によって提示された $\alpha$ GalCerは、PI3Kを活性化することも見出し、さらにPTENのヘテロ欠損した $V\alpha 14$ iNKT細胞やホモ欠損した $V\alpha 14$ iNKT細胞では、メラノーマ細胞の肺転移抑制能が著しく障害されていることを見出した。このようにPTEN/PI3K経路は腫瘍免疫監視に重要なシグナルであり、PTENが先天的にヘテロ変異したCowden病患者では、高頻度に発がんすることのみならず、一旦発がんしたのちも $V\alpha 14$ iNKT細胞による腫瘍免疫監視能の障害を伴うために、がんがさらに進展しやすい危険性があることを初めて提唱した(Blood 2007)。

## B. PTEN と結合する分子の同定と、PTEN 制御機構の解析

PTENはその遺伝子異常によるよりも蛋白発現異常による異常が圧倒的に多いことからPTEN蛋白質の発現制御が急務である。さらにPTENの機能の活性化機構についての報告はほとんどない。そこで我々はPTENと結合する分子を、マス解析や酵母ツーハイブリッド解析によって数多く同定しており、これら分子の機能解析を *in vitro*のみならず、遺伝子改変動物を作製することによって *in vivo*でも解析することによって、PTEN制御機構を明らかにしようとしている。

## C. PTEN 以外のがん抑制遺伝子の機能解析

我々はPTEN以外の複数の新規がん抑制遺伝子の遺伝子欠損マウスの作製を終えており、これら遺伝子機能の解析にも着手しはじめた。

## 業績目録

### 原著論文

1. Yanagi S, Kishimoto H, Kawahara K, Sasaki T, Sasaki M, Nishio M, Yajima N, Hamada K, Horie Y, Kubo H, Mak TW, Nakano T, Nakazato M, Suzuki A. 2007  
Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas.  
*J. Clin. Invest.* 117(10), 2929-40.
2. Kishimoto H, Ohteki T, Yajima N, Kawahara K, Natsui M, Kawarasaki S, Hamada K, Horie Y, Kubo Y, Arase S, Taniguchi M, Vanhaesebroeck B, Mak TW, Nakano N, Koyasu S, Sasaki T, and Suzuki A. 2007  
The Pten/PI3K pathway governs the homeostasis of Valpha14iNKT cells  
*Blood* 109(8), 3316-24,
3. Xue L, Nolla H, Suzuki A, Mak TW, Winoto A. 2008  
Normal development is an integral part of tumorigenesis in T cell-specific PTEN-deficient mice.  
*Proc. Natl. Acad. Sci USA* 105(6) 2022-2027.
4. Plum L, Rother E, Munzberg H, Wunderlich FT, Morgan DA, Hampel B, Shanabrough M, Janoschek R, Konner AC, Alber J, Suzuki A, Krone W, Horvath TL, Rahmouni K, Bruning JC. 2007  
Enhanced Leptin-Stimulated Pi3k Activation in the CNS Promotes White Adipose Tissue Transdifferentiation.  
*Cell Metabolism* 6(6):431-445.
5. Sasaki M, Ohnishi M, Tashiro F, Niwae H, Suzuki A, Miyazaki J, Kobayashi T, Tamura S. 2007  
Disruption of the mouse protein Ser/Thr phosphatase 2C $\beta$  gene leads to early pre-implantation lethality.  
*Mechanisms of Development* 124(6), 489-99.
6. Watanabe S, Horie Y, Kataoka E, Sato W, Dohmen T, Ohshima S, Goto T, Suzuki A. 2007  
Non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma: lessons from hepatocyte-specific phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient mice.  
*J. Gastroenterology and Hepatology* Suppl 1:S96-S100.

### 総説

1. Suzuki A, Nakano T, Mak TW, Sasaki T. 2008  
Portrait of PTEN: Messages from Mutant Mice.  
*Cancer Science* 9(2)209-13.
2. Suzuki A, Hamada K, Sasaki T, Mak TW, Nakano T 2007  
Role of Pten/PI3K pathway in endothelial cells  
*Biochemical Society Transaction* 35(Pt 2), 172-176.
3. Sasaki T, Sasaki J, Watanabe K, Suzuki A 2007

Non-invasive visualization of the lipid product of class I PI3K in transgenic mouse models.

*Biochemical Society Transaction* 35(Pt 2),215-8.

4.河原康一、濱田浩一、佐々木雄彦、鈴木 聡 2007

PTEN/PI3K 経路による血管制御.

*医学のあゆみ in press.*

## 学会発表・招待講演

1. Suzuki, A. (2008.2)

Functions of PTEN in various tissues.

Pohang Conference on Cellular Signaling – Phospholipid-mediated signaling- Ligands & diseases, Pohang, Korea

2. Yanagi S., Nakazato M., Suzuki A (2007.5.18-23)

PTEN function in bronchioalveolar epithelium.

American Thoracic Society International Conference (Mini-symposium), San Francisco

3.Anezaki Y, Ohshima S, Takeuchi S, Goto T, Ishii H, Dhomen T, Kataoka E, Sato W, Yoneyama K, Shibuya T, Yamada I, Iizuka M, Suzuki A, Watanabe S, Horie Y (2007.4.11-15) Sex differences in hepatocyte-specific Pten-deficient mice showing steatohepatitis without ethanol challenge.

42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Barcelona.

4. Ishii H, Ohshima S, Anzaki Y, Dhomen T, Kataoka E, Sato W, Yoneyama K, Shibuya T, Yamada I, Goto T, Iizuka M, Suzuki A, Watanabe S, Horie Y (2007.4.11-15)

Eicosapentaenoic acid improves steatohepatitis in newly established mice model of nonalcoholic steatohepatitis.

42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Barcelona.

5. Ohshima S, Dohmen T, Gota T, Anzaki Y, Ishii H, Kataoka E, Sato W, Yoneyama K, Shibuya T, Yamada I, Iizuka M, Suzuki A, Watanabe S, Horie Y(2007.4.11-15)

N-acetyl-cystein blocks progression of NASH by reducing reactive oxygen species. An examination using hepatocyte-specific Pten deficient mice.

42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Barcelona.

6. 鈴木聡 井上多恵、柳重久、河原浩一、佐々木雅人、西尾美希、夏井美幸、真鍋求、中里雅光、仲野徹、佐々木雄彦(2007. 12),

PTEN による組織幹細胞制御

BMB2007 (第 80 回日本生化学会・第 30 回日本分子生物学会合同総会) ワークショップ ‘細胞制御のオーガナイザーとしてのホスファターゼスーパーファミリー, 横浜

7. 佐々木雄彦、渡辺健一、高須賀俊輔、佐々木純子、鈴木聡(2007. 12),

ホスホイノシチドホスファターゼの生理機能

BMB2007 (第 80 回日本生化学会・第 30 回日本分子生物学会合同総会) ワークショップ ‘細胞制御のオーガナイザーとしてのホスファターゼスーパーファミリー, 横浜

8. Akira Suzuki (2007.10)

Function of tumor suppressor gene PTEN in various tissues.

第 66 回日本癌学会総会シンポジウム, 横浜

9. 柳重久、中里雅光、鈴木聡 (2007.5)

細気管支肺胞上皮における PTEN の機能解析 (ミニシンポジウム)

第 47 回日本呼吸器学会学術総会、東京

10. 柳重久、中里雅光、鈴木聡 (2007.7)

細気管支肺胞上皮における PTEN の機能解析

第 10 回日本臨床分子医学会学術総会、和歌山

11. 鈴木聡、岸本恕征、樗木俊聡、矢島伸之、河原康一、夏井美幸、谷口克、仲野徹、小安重夫、佐々木雄彦 (2007.10)

PTEN/PI3K 経路による Valpha14iNKT 細胞の制御

第 69 回日本血液学会、臨床血液学会総会、横浜

12. 柳重久、中里雅光、鈴木聡 (2008.2)

細気管支肺胞上皮特異的 PTEN 欠損マウスでの肺癌発症機序解析

第 4 回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎

13. 柳重久、岸本恕征、佐々木雄彦、仲野徹、中里雅光、鈴木聡 (2007.5)

PTEN による肺形態形成・肺幹細胞・肺癌発症の制御

幹細胞シンポジウム, 淡路島

14. 鈴木聡 (2007.3)

肺胞細気管支上皮による PTEN の機能解析

日本プロテインホスファターゼ研究会, 津

15. 鈴木聡 (2007.9)

PTEN/PI3 キナーゼ経路異常による発癌と疾患 ～臨床医科学特別賞受賞講演～

臨床医科学フォーラム, 京都

16. 鈴木聡 (2007.6)

PTEN/PI3 キナーゼ経路による生体制御

第 9 回愛媛オンコロジーフォーラム、松山

17. 鈴木聡 (2007.5)

PTEN/PI3 キナーゼ経路による生体制御

日本生化学会東北支部会, 仙台

18. 鈴木聡 (2007.9)

PTEN/PI3 キナーゼ経路による生体制御

群馬大学秋田大学グローバル COE シンポジウム、前橋

19. 鈴木聡 (2008.3)

PTEN/PI3キナーゼ経路による生体制御

日本耳鼻咽喉科学会秋田県地方部会、秋田

20. 鈴木聡 (2007.11)

PTEN/PI3 キナーゼ経路による生体制御

弘前大学医学部, 弘前

21. 鈴木聡 (2007.8)

PTEN/PI3 キナーゼ経路による生体制御

第一三共製薬社内講演, 東京

22. 鈴木聡 (2007.5)

PTEN/PI3 キナーゼ経路による生体制御

宮崎大学医学部, 宮崎