

[0021]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2006年

<https://doi.org/10.15017/15429>

---

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 21, 2007-05. Medical Institute of Bioregulation,  
Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



## 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 18 年度から平成 19 年度にかけての異動は以下の通りである。古野憲司と政次俊宏が学術研究員として研究に加わった。派遣技術職員の大西真理が辞した。また、JST 研究補助員として、美浦真紀子が研究に加わった。以上により、教員 1 名、ポスドク 2 名、大学院生 1 名、テクニカルスタッフ 5 名となった。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

がん、自己免疫病、糖尿病、アレルギーなどは、複数の遺伝要因と環境要因の相互作用によって発症する多因子疾患である。これらの疾患の遺伝要因を明らかにするためには、遺伝学的解析法が必須であり、その手法を用いて疾病発症関連遺伝子を同定し、発症機序の分子レベルでの解明とそれに基づく新しい診断・治療・予防法の基盤技術を開発することは有意義である。これまでは、既知の知識に基づいて選択された疾患候補遺伝子を個別に解析する手法が主流であったが、特に、大規模ゲノム解析に必要な多検体同時解析法の進展により、網羅的・物理的に疾患関連遺伝子を探索することが可能となった。

本分野では、平成 18 年度にイルミナ社の SNP タイピングシステム（特定領域）とアフィメトリックス SNP タイピングシステム（JST 森班）を導入し、高密度 SNP タイピングによるゲノム解析を開始した。

#### a. 多施設共同研究におけるゲノム解析

平成 18 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）。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）、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）、2 型糖尿病（ゲノム特定・神戸大学・春日雅人）、2 型糖尿病（21COE・九大・高柳涼一）、統合失調症（ゲノム特定・九大・服巻保幸）、心筋梗塞（ゲノム特定・愛知学院大・横田充弘）、家族性血球貪食性リンパ球症（愛媛大・石井榮一）、大腸がん（CREST・九大・森正樹）、遺伝性眼疾患（九大・吉田茂生）、2 型糖尿病（国立国際医療センター・加藤規弘）、血栓症（九大・大中佳三）、骨密度（九大・大中佳三）（共同研究のため詳細は省略）。

#### b. 胃がん関連遺伝子のゲノム的解析と分子病態の解明

胃がん発症には複数の遺伝要因と環境要因の多段階にわたる相互作用が関与する。我々は、以前より、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。また、新たに高密度 SNP アレイを用いた CGH によって、発がん関連遺伝子をスクリーニングしている。平成 18 年度は、これまでに 21 番染色体より同定した胃がん発症関連遺伝子 STCH について機能解析を進めた。

STCH は HSP70 と異なり、C 末側にペプチド結合ドメインを有さず、生物学的な分子機能はよく知られていないが、STCH を安定過剰発現した 293 細胞では、増殖は正常であるものの、TRAIL やセラミド、Thapsigargin などによって誘導される細胞死に対して高感受性を示したことから、細胞死のシグナル伝達に参与する分子と考えられた。また、胃がん細胞において、体細胞変異 668del12bp(del223V-226L)を認めしたが、del223V-226L は、STCH 分子の ATP 結合ドメインのうち、HSP70 ファミリー間で保存された Phosphate2 部位の 4 アミノ酸欠損であり、ATP 結合能が著しく低下していた。del223V-226L 安定過剰発現細胞ではアポトーシス感受性が低下しており、アポトーシス感受性獲得における ATP 結合ドメインの重要性が示された。胃がん細胞においては STCH の発現は有意に低下しており、これらのことから、遺伝子変異あるいは多型による STCH の機能低下、発現低下が発がんの一段階に参与する可能性が示唆された。

## B. PcG 関連分子によるエピジェネティック転写制御の研究

ポリコーム遺伝子群（以下 PcG）と HP1 分子をはじめとするヘテロクロマチン構成因子は、ともにショウジョウバエの変異体から同定されたクロマチン関連分子であり、タンパク複合体を形成して遺伝子発現を抑制的に制御する。この遺伝子発現抑制は細胞分裂後も維持され、クロマチンメモリーとして機能し、細胞の正常な分化・増殖に必須である。近年、我々は、PcG の一つである SU(Z)12 が、PcG とヘテロクロマチン構成因子による 2 つのエピジェネティック遺伝子発現制御を機能的にリンクさせる重要な分子であることを報告した。本年度は、SU(Z)12 を中心とした転写制御機構をさらに詳細に解析する目的で、SU(Z)12 と機能的に相互作用する分子を探索した。HP1 分子との結合ドメイン(VEFS ドメイン)を欠いた SU(Z)12 を bait として、酵母 2 ハイブリッドスクリーニングを、HeLa 細胞 cDNA ライブラリーを対象として実施し、プロテインメチロソーム複合体の構成因子である Mep50 を同定した。Mep50 は 6 個の WD リピートを有する分子であり、SU(Z)12 が、Mep50 の C 末側 3 個の WD リピートドメインと結合することを明らかにした。さらに Mep50 がヒストン H2A と特異的に結合すること、プロテインアルギニンメチル化酵素の一つである PRMT5 と結合し、PRMT5 による転写抑制を仲介する分子であることなどを明らかにした。これらのことから、SU(Z)12 が、Mep50 と PRMT5 による転写抑制に関連していることが示唆され、PcG 複合体の一因子としての機能のみならず、他の転写抑制複合体の要素として機能している可能性が示された。

## 業績目録

### 原著論文

1. I. Ueda, U. Kohdera, S. Hibi, T. Inaba, K. Yamamoto, T. Sugimoto, A. Morimoto, E. Ishii, S. Imashuku. 2006.  
A novel perforin gene mutation in a Japanese family with hemophagocytic lymphohistiocytosis.  
*Int. J. Hematol.* 83, 51-54.
2. H. Mizumoto, D. Hata, K. Yamamoto, R. Shirakawa, A. Kumakura, M. Shiota, A. Yokoyama, H. Matsubara, M. Kobayashi, R. Nishikomori, S. Adachi, T. Nakahata, T. Kita, H. Horiuchi, M. Yasukawa, E. Ishii. 2006.  
Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with the MUNC13-4 mutation.  
*Eur. J. Pediatr.* 165, 384-388.
3. K. Furuno, T. Masatsugu, M. Sonoda, T. Sasazuki, K. Yamamoto. 2006.  
Association of Polycomb group SUZ12 with WD-repeat protein MEP50 that binds to histone H2A selectively in vitro.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1051-1058.
4. S. Yoshida, Y. Yamaji, A. Yoshida, R. Kuwahara, K. Yamamoto, T. Kubata, T. Ishibashi. 2006.  
Novel triple missense mutations of GUCY2D gene in Japanese family with cone-rod dystrophy: possible use of genotyping microarray.  
*Mol. Vis.* 12, 1558-1564.
5. S. Yoshida, Y. Yamaji, A. Yoshida, Y. Ikeda, K. Yamamoto, T. Ishibashi. 2006.  
Rapid detection of SAG 926delA mutation using real-time polymerase chain reaction.  
*Mol. Vis.* 12, 1552-1557.
6. K. Kusuhara, 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.
7. 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. Kodaera. 2007.  
Japan marrow donor program. 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.
8. 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.* in press.
9. K. Furuno, H. Takada, K. Yamamoto, K. Ikeda, T. Ohno, V. Khajooee, Y. Mizuno, T. Hara. 2007.

Tissueinhibitor of metalloproteinase 2 and coronary artery lesions in Kawasaki Disease.  
J. Pediatr. in press.

10. 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. in press.

## 学会発表

1. T. Hara, K. Kusuhara, K. Yamamoto. (2006, 5/6-9).  
Genetic susceptibility to tuberculosis in Japanese: a gene-based analysis.  
the 38th European Human Genetics Conference (EHGC) , Amsterdam, Natherlands.
2. K. Kusuhara, T. Hara, K. Yamamoto. (2006, 8/6-10).  
Genetic susceptibility to tuberculosis in Japanese: a gene-based analysis.  
11th International Congress of Human Genetics, Brisbane, Australia
3. I. Ueda, T. Ghim, L.H. Peng, Matthew M.K. Shing , S.S.Chuang, M.T.Lin, K. Yamamoto, T. Inaba, A. Morimoto, E. Ishii, S. Imashuku. (2006, 10/6-8).  
Perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL): Asian collaborative study.  
第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会, 福岡.
4. I. Ueda<sup>1</sup>, H. Horiuchi, A. Morimoto<sup>1</sup>, M. Yasukawa, K. Yamamoto, T. Inaba<sup>1</sup>, K. Hatta<sup>1</sup>, S. Imashuku, E. Ishii. (2006, 10/15-17).  
Update of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) studies in Japan.  
Histiocyte Society 22nd Annual Meeting, Buenos Aires, Argentina.
5. I. Ueda, T. Ghim, L.H. Peng, Matthew M.K. Shing, S.S.Chuang, M.T. Lin, J. Teo, K. Yamamoto, T.Inaba, A.Morimoto, E.Ishii, S.Imashuku.(2006, 12/8-10).  
Perforin mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis(FHL): Collaborative study in Asia.  
2nd Congress of Asian Society for Pediatric Research, Yokohama
6. 政次俊宏, 山本 健 (2006, 9/28-30).  
E2F6 転写制御に関わる SUZ12-EZH2 複合体.  
第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜.
7. 山方伸茂, 山本 健 (2006, 9/28-30).  
新規小胞体局在分子 STCH の機能解析.  
第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜.
8. 山本 健 (2007, 3/30).  
Update on genetic analysis for HLH.  
第 2 回 H L H 講演会, 東京.

## 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．腫瘍溶解性ウイルスを用いた遺伝子治療法開発研究、C．小型霊長類コモンマームセットを用いた再生医療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九州大学病院各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．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計画している。現在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。

##### b．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。

#### **c .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）分子の前臨床研究**

近年，米国を中心に各種固形癌に対する GM - CSF を用いた遺伝子免疫療法（癌ワクチン療法）が行われ，一部の症例にて抗腫瘍効果を呈しているが，その詳細な分子学的機序は不明である．我々は，SAGE（Serial Analysis of Gene Expression）法を用いて，レトロウイルスにより GM-CSF 遺伝子を導入した WEHI3B 腫瘍細胞（マウス白血病細胞）に高発現する遺伝子の中で，抗腫瘍免疫誘導の関与が示唆されたケモカインとして知られる TARC 及び RANTES の 2 分子に注目した．TARC または RANTES と GM CSF を同時に遺伝子導入した WEHI3B 細胞をマウスに皮下接種し，腫瘍増殖曲線及び生存率曲線を作成し，GM - CSF 遺伝子単独導入群に対する両分子の相乗的抗腫瘍効果を認めた．また，WEHI3B 細胞移植マウスに対して行った癌ワクチン治療の検討にて，組換え TARC タンパク，または組換え RANTES タンパクと GM - CSF 遺伝子導入細胞を同時に皮下投与した群において，GM CSF 遺伝子単独導入群に対し，有意な腫瘍抑制効果と生存率の延長を認めた．免疫不全マウス（BALB/c, SCID）を用いて，同様の癌ワクチン療法を行ったが，GM-CSF 遺伝子単独導入群及び TARC, RANTES 併用群の抗腫瘍効果は認めず，GM-CSF 及び TARC, RANTES の有する抗腫瘍効果が適応免疫と関与していることが示唆された．また，各免疫学的解析（細胞障害性試験（クロミウム遊離試験），Cytometric Bead Array 法による炎症性サイトカイン測定，ELISPOT 法）を行った．まだ詳細なメカニズムは不明であるが，TARC 及び RANTES は，最終的に腫瘍局所への Effector T 細胞（CTL）の遊走及び活性化を促進し，GM-CSF の有する抗腫瘍効果を増強している可能性が示唆された．

#### **d . GM-CSF 遺伝子導入腫瘍細胞を用いたマウス腎癌モデルに対する癌ワクチン療法（ウイルスベクター比較：アデノウイルス及びセンダイウイルス）**

癌免疫遺伝子療法において，腫瘍細胞に GM-CSF を導入し，放射線を照射したワクチン細胞療法による抗腫瘍効果が認められ様々な固形癌において臨床応用が開始されている．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（F）の 2 つのウイルスベクターを用い，それぞれの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を認めた．

#### **e . 著明な骨髄線維化を来した類上皮血管内皮腫症例における血清ヒアルロン酸値の測定**

我々は多発生肝腫瘍及び著明な骨髄線維化を来した類上皮血管内皮腫症例を経験した．本症例では肝，骨髄生検組織において著明なヒアルロン酸の沈着と血清ヒアルロン酸値の上昇を認めた．類上皮血管内皮腫は血管内皮細胞由来の稀な腫瘍であり，軟部組

織，肺，肝，骨，縦隔などでの発生が報告されている．骨髄病変を認めた報告はこれまでに3例を認めるのみであり，骨髄線維化を来した症例は我々が検索し得た限りでは本症例が初めてである．血清ヒアルロン酸値は線維化の進行とともに著明に上昇し，本症例での線維化機構に重要な働きをしている事が示唆された．

## **B．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実施中である．  
(詳細は特許申請等の関連から省略)

## **C．小型霊長類コモンマーモセットを用いた再生医療開発研究**

### **a．コモンマーモセット(CM)ES細胞株からの血球分化誘導実験**

(財)実験動物中央研究所との共同研究により新たに樹立した CM ES 細胞株を用いて血球分化誘導実験を行った．これまでに CM ES 細胞株にレンチウイルスベクターを用いて tal1/scl 遺伝子を強制発現させることにより，非常に効率良く種々の血球細胞へと分化誘導できることを明らかにした．現在，モデル動物を用いた in vivo での詳細な解析を行っており，再生医療における有効性及び安全性について検討を行っている．また，リンパ球や血小板といった成熟血球分化に特化した誘導系についても検討中である．

### **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**

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．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．

## **業績目録**

### **原著論文**

- 1． Kang X., Xinru Xiao, X., Harata M., Bai, Y., Nakazaki Y., Soda, Y., Kurita, R., Tanaka T., Komine, F., Izawa K., Kunisaki R., Setoyama M., Nishimori H., Natsume A., Makoto Sunamura M., Lozonshi L., Saitoh I., Tokino T., Asano S., Nakamura Y., Tani K. 2006  
Antiangiogenic activity of BAI1 in vivo: implications for gene therapy of human glioblastomas  
Cancer Gene Ther 13: 385-392
- 2． Nagano, K., Itagaki, C., Izumi, T., Nunomura, K., Soda, Y., Tani, K., Takahashi, N., Takenawa, T.,

- Isobe, T. 2006  
Rb plays a role in survival of Abl-dependent human tumor cells as a downstream effector of Abl tyrosine kinase.  
Oncogene 25:493-502
- 3 . Nakayama M, Both GW, Banizs B, Tsuruta Y, Yamamoto S, Kawakami Y, Douglas JT, Tani K, Curiel DT, Glasgow JN. 2006  
An adenovirus serotype 5 vector with fibers derived from ovine atadenovirus demonstrates CAR-independent tropism and unique biodistribution in mice.  
Virology. 350:103-115
- 4 . Kunisaki, R., Ikawa, S., Maeda, T., Nakazaki, Y., Kurita, R., Harata, M., Shutoh, Y., Bai, S.Y., Soda, Y., Tanabe, Y., Dohi, T., Kato, R., Ikawa, Y., Sekihara, H., Asano, S., Tani, K., 2006  
p51/p63, a novel p53 homologue, potentiates p53 activity and is a human cancer gene therapy candidate .  
J Gene Med. 8: 1121-1130
- 5 . Nakazaki, Y., Hase, H., Inoue, H., Beppu, Y., Meng Xin K, Sakaguchi, G., Ryo Kurita, R., Asano, S., Nakamura, Y., Tani, K. 2006  
Serial analysis of gene expression in progressing and regressing mouse tumors implicates the involvement of RANTES and TARC in antitumor immune responses.  
Mol Ther 14: 599-606
- 6 . Kurita, R., Sasaki, E., Yokoo, T., Hiroyama, T., Takasugi, K., Imoto, H., Izawa, K., Dong, Y., Hashiguchi, T., Soda, Y., Maeda, T., Suehiro, Y., Tanioka, Y., Nakazaki, Y., Tani, K. 2006  
Tall/scl gene transduction using a lentiviral vector stimulates highly efficient hematopoietic cell differentiation from common marmoset (*Callithrix jacchus*) ES cells.  
Stem Cells 24: 2014-2022.
- 7 . Moon Y, Cho SG, Lee JW, Min WS, Kim CC, Lee HK, Kim YG, Chang HS, Chae HS, Kim HY, Tani K., 2006  
Protective effect of irradiated renal carcinoma expressing hepatitis B surface antigen against renal-cell carcinoma-mediated tumors.  
Cancer Biother Radiopharm. 21:211-216
- 8 . 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. 2007.  
A case of Cronkhite-Canada Syndrome associated with schizophrenia  
Int Med 46:175-180
- 9 . Ishii, H., Mimori, K., Inoue, H., Inageta, T., Ishikawa, K., Semba, S, Druck, T., Trapasso, F., Tani, K., Vecchione, A., Croce, C.M., Mori, M., Huebner, K. 2006  
Fhit Modulates the DNA Damage Checkpoint Response.  
Cancer Res 66:11287-11292
- 10 . Zang, X., Soda, Y., Takahashi, K., Bai, Y., Mitsuru, A., Igura, K., Satoh, H., Yamaguchi, S., Tani, K., Tojo, A., Takahashi, T. 2006  
Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the

differentiation abilities of immortalized cells

Biochem Biophys Res Commun 351: 853-859

- 11 . Tanaka, T., Okabe, T., Gondo, S., Fukuda, M., Yamamoto, M., Umemura, T., Tani, K., Nomura, M., Goto, K., Yanase, T., Nawata, H. 2006

Modification of glucocorticoid sensitivity by MAP kinase signaling pathways in glucocorticoid-induced T-cell apoptosis.

Exp Hematol. 34:1542-1552,

- 12 . Ito T, Kawabe K, Arita Y, Hisano T, Igarashi H, Funakoshi A, Sumii T, Yamanaka T, Takayanagi R. 2007

Related Articles, Links Abstract Evaluation of pancreatic endocrine and exocrine function in patients with autoimmune pancreatitis.

Pancreas. 34(2):2549

## 総説

- 1 . Horn, P.A., Tani, K., Martin, U., Niemann, H. 2006. Meeting Report: Nonhuman Primates: Embryonic stem cells and transgenesis. Cloning and Stem Cells 8:124-129
- 2 . 谷 憲三郎 .2006 .トランスレーショナルリサーチとしての GM - CSF 遺伝子治療 . 泌尿器外科 , 714-720
- 3 . 谷 憲三郎 . 2006 . 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 , Vol . 12 . 70-80
- 4 . 谷 憲三郎 . 2006 . 腎癌に対する遺伝子治療の現状 . Biotherapy , 20 . 293-299
- 5 . 中村 貴文, 谷 憲三郎 , 2006 . DDS と細胞療法 . 最新医学 , 61 . 99-105

## 特許等

- 1 . U.S. Department of Commerce  
Title of invention : Methods for acceleration of stem cell differentiation  
First named inventor : Tani, K. et al.  
Application number: 11/377,847  
Filing date: March 15,2006
- 2 . 腫瘍マーカーとしての抗 NASP 抗体及び抗 TMF 抗体  
特願 2005-061605,2005/03/04  
特開 2006-242869,2006/09/14  
発明者 谷 憲三郎他

## 学会発表

- 1 . Tomoko Yokoo , Ryo Kurita , Erika Sasaki, Kashiya Takasugi, Hideyuki Imoto, Yoshikuni Tanioka, Yasushi Soda, Kenzaburo Tani  
“Production of megakaryocytes and platelets from common marmoset (*Callithrix jacchus*) ES cells by constitutive expression of *tal1/scl* gene”  
American Society of Gene Therapy(ASGT) 9th Annual Meeting in Baltimore, June, 2006

2. Tomoko Yokoo, Ryo Kurita, Youko Suehiro, Kashiya Takasugi, Tatsuo Oikawa, Hideyuki Imoto, Takafumi Nakamura, Yoshikuni Tanioka, Erika Sasaki, Kenzaburo Tani.  
“Production of megakaryocytes and platelets from common marmoset (*Callithrix jacchus*) ES cells by constitutive expression of *tal1/scl* gene.”  
第 12 回 日本遺伝子治療学会(JSGT), 東京, 2006 年 8 月
3. Ryo Kurita, Tomoko Yokoo, Erika Sasaki, Yan Dong, Youko Suehiro, Yoshikuni Tanioka, Yasushi Soda, Norio Komatsu, Kenzaburo Tani.  
“Production of megakaryocytes and platelets from common marmoset (*Callithrix jacchus*) ES cells by constitutive expression of *tal1/scl* gene.”  
American Society of Hematology, 48<sup>th</sup> Annual Meeting, Orlando, Dec. 2006
4. 横尾朋子, 栗田良, 末廣陽子, 高杉香志也, 寛山隆, 井本英志, 及川達夫, 伊澤清子, 中崎有恒, 中村貴史, 谷岡功邦, 佐々木えりか, 谷憲三朗  
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  
第 68 回日本血液学会、福岡、2006.10
5. 久野晃聖, 末廣陽子, 高杉香志也, 立川義倫, 谷憲三朗  
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  
バイオセラピー学会, 福岡, 2006.11
6. 末廣陽子, 立川義倫, 安部康信, 大島孝一, 牟田耕一郎, 谷憲三朗  
著明な骨髓線維化を来した肝類上皮血管内皮腫の 1 例  
第 68 回日本血液学会 / 第 48 回日本臨床血液学会合同総会  
福岡市, 2006 年 10 月

## 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18年度は、講師・加藤聖子、助手・浅野間和夫の教官のほかに、大学院生・山口真一郎、大神達寛、米田智子、田中義弘で教室を構成した。

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 Hec1, 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齢 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齢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 (投稿準備中)。

### 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限局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析を行ったが 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が関わること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 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 の発現抑制が関わり、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 /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 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 ~) 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. 酢酸メドロキシプロゲステロン (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。

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。

ウェスタンブロットにおいて、大腸癌細胞株ではプロゲステロン受容体 (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。

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。

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。

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．

non-R1 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．

## 業績目録

### 原著論文

1. T.Arima, K.Yamasaki, R.M.John, K.Kato, K.Sakumi, Y.Nakabeppu, N.Wake, T.Kono. 2006.  
The Human HYMAI/PLAGL1 differentially methylated region acts as an imprint control region in mice.  
Gnomics. 88, 650-658.
2. T.Arima, K.Hata, S.Tanaka, M.Kusumi, E.Li, K.Kato, K.Shiota, H.Sasaki, N.Wake. 2006.  
Loss of the maternal imprint in Dnmt3L(mat<sup>-/-</sup>)mice leads to a differentiation defect in the extraembryonic tissue.  
Dev Biol. 297, 361-373.
3. T.Ogura, H.Kobayashi, Y.Ueoka, K.Okurgawa, K.Kato, T.Hirakawa, S.Hashimoto, S.Taniguchi, N.Wake, H.Nakano. 2006.  
Adenovirus-mediated calponin h1 gene therapy directed against peritoneal dissemination of ovarian cancer. : bifunctional therapeutic effects on peritoneal cell layer and cancer cells.  
Clin Cancer Res. 12, 5216-5223.
4. H Kato , T Inoue, K Asanoma, C Nishimura, T Matsuda, N Wake.2006.  
Induction on human endometrial cancer cell senescence through modulation of HIF-1alpha activity by EGLN1.  
Int J Cancer, 118, 1144-1153.
5. H Kato, T Inoue, K Asanoma, T Matsuda, Y Yoshikawa, N Wake.2006.  
Activation of STAT3/5 Signal Pathways in Complete Mole and Repression in Choriocarcinoma Cell Lines.  
The journal of Reproductive Medicine, 51, 41-48
6. 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 (SP cells) in human normal endometrial cells.  
Human Reproduction, 22, 1214-1223.
7. 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.

8. 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. in press

## 総説

1. 大神達寛、加藤聖子、和氣徳夫. 印刷中  
『よくわかる卵巣癌のすべて』: 発癌遺伝子と腫瘍抑制遺伝子  
永井書店

## 学会発表

1. 加藤聖子, 加藤圭次, 有馬隆博, 大神達寛, 山口真一郎, 浅野間和夫, 和氣徳夫 (2006.4/22-25)  
子宮体癌発生機構における活性化型 K - Ras の関与 - 癌幹細胞の観点から  
第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜.
2. 須賀新, 加藤聖子, 宮国泰香, 山田由季, 卜部麻子, 加塚有紀, 金田容秀, 宮井健太郎, 寺尾泰久, 荻島大貴, 木下勝之, 和氣徳夫 (2006.4/22-25)  
子宮体癌の増殖機構におけるエストロゲンの関与  
第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜.
3. 浅野間和夫, 山口真一郎, 加藤聖子, 大神達寛, 和氣徳夫 (2006.4/22-25)  
子宮体癌の癌化機構における NECC1 遺伝子の関与  
第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜.
4. 大神達寛, 加藤聖子, 山口真一郎, 浅野間和夫, 和氣徳夫 (2006.4/22-25)  
婦人科癌細胞に対する Mithramycin A の増殖抑制効果  
第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜.
5. 山口真一郎, 浅野間和夫, 加藤聖子, 大神達寛, 和氣徳夫 (2006.4/22-25)  
子宮体癌抑制遺伝子としての NECC1  
第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会, 横浜.
6. 加藤聖子 (2006.5/13)  
子宮内膜発癌機構における stem-like-cell の関与  
子宮内膜疾患研究会, 東京.
7. 大神達寛, 加藤聖子, 和氣徳夫 (2006.8/6)  
婦人科癌細胞に対する Mithramycin A の増殖抑制効果  
第 5 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会, 東京.
8. 加藤聖子, 和氣徳夫 (2006.9/30)  
子宮体癌細胞の side population 細胞の解析  
第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜.
9. 浅野間和夫, 山口真一郎, 加藤聖子, 大神達寛, 和氣徳夫 (2006.9/30)

子宮内膜癌の癌化機構における NECC1 遺伝子の関与

第 65 回日本癌学会学術総会，横浜.

10. 加藤聖子，田中義弘，山本奈理，梅崎美奈，内田聡子，和氣徳夫 (2006.11/18)  
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  
第 17 回婦人科骨粗鬆症研究会学術集会，東京.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.