

# 平成18年度自治医科大学大学院医学研究科 研究奨励賞研究成果報告

## 発癌過程において Rad9 が P53 と競合的に働く DNA チェックポイント異常の解明

地域医療学系専攻 3年 石川 和宏

### 1. 背景と研究目的

頭頸部扁平上皮癌の発癌には環境変異原の関与が知られており、また治療として根治手術が望めない場合、抗癌剤・放射線照射に代表される DNA 損傷による癌細胞のアポトーシス誘導を基盤とした介入が行われる。また *TP53* 遺伝子はヒトの癌の過半数で何らかの変異のある非常に重要な癌抑制遺伝子で、頭頸部癌でもその変異が以前より報告されている。一方、頭頸部癌では第11番染色体長腕13領域の遺伝子増幅がしばしば認められ、発癌と治療抵抗性の双方に重要な役割を果していることが示唆されている。DNA 損傷後に機能するチェックポイント蛋白質 Rad9は当初放射線照射後の感受性を制御する因子として分裂酵母で同定された蛋白質 scRad9のホモログであり、多彩な機能をもつが、加えて p53タンパク質の転写標的である *P21* プロモーター領域に結合することが報告された。さらに、Rad9をコードする *RAD9* 遺伝子はこの第11番染色体長腕13領域に位置しており頭頸部癌では *RAD9* が癌遺伝子として機能している可能性がある。以上の背景から Rad9 と p53の関連を含め、*P21* 遺伝子転写制御と細胞周期調節への関与と癌細胞でのチェックポイント異常の解明を目的とした。

### 2. 研究方法

胎児性腎糸球体細胞株293細胞と Rad9プラスミド（野生型、リン酸基変異型）を用いて Western blot, ルシフェラーゼプロモーターアッセイ, RT-PCR, 免疫沈降法, クロマチン免疫沈降法で解析した。また頭頸部癌細胞株を用いて免疫染色を行った。

### 3. 結果

Rad9は p53と共通した DNA 配列への結合能

があることを確認した。また Rad9と p53は直接結合して複合体を形成し、*P21* 遺伝子プロモーター領域に結合して *P21* 遺伝子の転写制御を行っていることが示唆された。さらにこの転写調節には Rad9C 末端のリン酸化修飾が関与すると考えられた。頭頸部癌細胞株の免疫染色法では Rad9は核に強く発現し、当遺伝子座の近傍に位置する Cyclin D1も細胞質に強く発現していた。一方 p21蛋白質の発現異常を認めた。

### 4. 考察

Rad9はリン酸化修飾を通じて *P21* 転写等の DNA 損傷に対するチェックポイント応答に関わり、また頭頸部癌においては第11番染色体の遺伝子増幅と過剰発現の結果 Rad9の強発現とチェックポイント異常が生じ、細胞増殖異常とゲノム不安定性に関与することが示唆された。また頭頸部癌ではこの病態が発癌と治療抵抗性の分子基盤の1つであると考えられる。

## アデノ随伴ウイルスの染色体部位特異的組込み機構を利用した安全な遺伝子治療法の開発

地域医療学系専攻 3年 小原 陽子

### I. 背景

近年、多くの新患を対象として遺伝子治療の研究が進められている。目的とする治療用遺伝子を長期間安定に発現させるには、自己複製能を持つ幹細胞のゲノムに遺伝子を組み込ませることが望ましい。一般的なレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入法で転写が活発な遺伝子の近傍に組み込まれやすく、発癌例も報告されている。従って、幹細胞への安全性の高い遺伝子導入法の開発が期待されている。

### II. 目的

ヒト第19番染色体の AAVS1領域へ選択的に組み込まれることが知られている、野生型アデ

ノ随伴ウイルス (AAV) を利用した安全性の高い遺伝子導入法を開発することを目的とした。標的とする幹細胞には、間葉系幹細胞 (MSC) を、治療用遺伝子として血液凝固第Ⅸ因子遺伝子 (FIX) を選択した。

### Ⅲ. 方法

AAVS1特異的組込みには、AAVの複製に関与する非構造蛋白質である Rep と AAV ゲノムの両端にある ITR が必要であり、この AAV の配列を利用したプラスミドベクターを作製して FIX 遺伝子を AAVS1領域へ特異的に組み込ませた。AAVS1領域に FIX が組み込まれたクローンを樹立し、FIX 発現量、発現持続期間、および挿入変異の有無を解析した。

### Ⅳ. 結果

AAV の配列を利用したプラスミドベクターに FIX 遺伝子を組み込み、ヒト MSC 由来細胞株にリポフェクション法にて導入した。樹立した MSC クローンの AAVS1領域に FIX 遺伝子が組み込まれたか PCR 法、サザンハイブリダイゼーション法にて解析し、シーケンシングにて確認した。クローンの FIX 発現を RT-qPCR 法、培養上清中の FIX 活性と抗原量測定で確認し、親株と比較して増加を認めた。AAVS1領域は細胞骨格関連遺伝子 *Myosin binding subunit 85* (MBS85) の一部分に相当し、外来遺伝子挿入による影響を、MBS85 mRNA の定量、細胞形態、細胞増殖能等の解析を行い親株と比較したが、親株と比較し変化は認められなかった。

### Ⅴ. 考察

MSC の AAVS1領域に特異的に治療遺伝子を組み込ませることができ、導入遺伝子の発現が確認された。また、遺伝子導入による形質等の変化は認められず、本法は安全性が高いと示唆される。

## ゲノミクス技術を用いた胃癌の遺伝子異常の解明

地域医療学系専攻3年 倉科憲太郎

### 1. 目的・背景

消化器悪性腫瘍では根治切除後にも関わらず予後不良である症例が少なくない。悪性腫瘍のゲノム DNA では様々な染色体コピー数異常 (癌遺伝子の増幅・癌抑制遺伝子の欠失) が生じることが知られているが、FISH 法、CGH 法など従来の解析法では微細なゲノム異常の検出は困難であった。近年、SNP タイピングアレイを用いた構造異常解析が開発され、高解像度での染色体コピー数変化やヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity : LOH) の検出が可能となった。本研究では、長期予後と関連する染色体コピー数変化の同定を目指した。

### 2. 研究方法

胃癌95症例の正常粘膜および腫瘍よりそれぞれゲノム DNA を抽出したのち、約262,000個の SNP プローブが搭載された Mapping 250K Nsp array (Affymetrix 社) にハイブリダイズさせた。得られた各 SNP プローブにおけるシグナル強度をもとに各 SNP プローブ部位における染色体コピー数を予測した。染色体コピー数データは、ゲノム DNA をテンプレートとする定量的リアルタイム PCR により検証を行った。また、染色体コピー数データと解析対象となった各症例の転帰との関連を解析し、予後と関連する構造異常の検出を試みた。

### 3. 結果

染色体コピー数解析の結果、症例間で共通したコピー数変化を示す部位が複数同定された。これらの領域には既知のものを含め、癌遺伝子の増幅や癌抑制遺伝子の欠失が多数観察された。また、共通のゲノム異常部位に存在する癌関連遺伝子のゲノム量を計測した結果、予測染色体コピー数とリアルタイム PCR により算出されたゲノム量は高い相関を示した。

生存解析の結果、Cox の比例ハザード解析からは8番染色体のごく一部の領域の増幅があると長期予後が悪くなることが明らかとなった ( $P < 0.00001$ )。この領域のほかに、9番染色体の欠失が予後と関連していることが示唆された。

### 4. 考察

今回我々が用いた SNP タイピングアレイによる網羅的解析法により、平均11.4kbp の高解像度でコピー数変化を示す部位を同定すること

が可能であった。染色体コピー数変化の予測と実際の測定値は高い相関を示しており、本解析法が妥当であることが検証された。また、長期予後とリンクする領域のコピー数変化をみることにより、予後の異なる症例を抽出する、あるいは再発のモニタリングに応用できる可能性がある。

## ヒストン脱アセチル化酵素の白血病発症における役割の解明と分子標的療法への応用

地域医療学系専攻3年 和田 妙子

### 1. 目的・背景

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は真核細胞の遺伝子発現の制御に重要な役割を果たす酵素である。最近、HDAC に対する阻害剤 (HDACi) が開発され、造血器腫瘍に対する臨床応用が期待されている。HDACi は白血病細胞には著明な細胞死を誘導するが、臨床治験の結果では血液毒性は比較的軽度で、正常造血幹細胞には影響を及ぼさないと考えられる。このことから我々は、HDAC の量的もしくは時空的な発現異常が白血病の発症に関与するという仮説を立て、血球分化における HDAC の役割と白血化に至る分子機構の解明を目的として研究を行った。

### 2. 方法

1) 血液細胞における HDAC 発現とその制御機構の解明: ① RT-PCR, ノーザン法, ウェスタン法, 免疫染色を用いて種々の血液細胞, 白血病細胞 (細胞株, 臨床検体) における各種 HDAC の発現をスクリーニングした。② HDAC1, HDAC3 のプロモーター領域を単離し, luciferase assay を用いて転写制御機構を解析した。

2) 造血幹細胞における HDAC の機能と白血化への関与の解明: ① 純化した造血幹細胞に HDAC1 を強発現させ, 増殖・分化への影響を観察した。② siRNA を用いて白血病細胞における HDAC1 の発現を抑制し, 増殖・分化への影響を観察した。③ 造血幹細胞における HDAC1 強発現の効果, Ly-5.1/Ly-5.2 移植系を

用い *in vivo* で確認した。

### 3. 結果・考察

1) 血液細胞における HDAC 発現とその制御機構の解明

① 正常造血幹細胞/前駆細胞において HDAC の発現はきわめて低く, 特に蛋白レベルでは検出限度以下であった。一方, committed progenitors においては発現が認められたが, 顆粒球・単球では再度発現が低下した。② 急性白血病においては細胞株, 臨床検体ともに HDAC の強発現を認めた。HL-60, U937 を顆粒球ないし単球系に分化させると, HDAC の発現は著明に低下した。一方, K562 を赤芽球・巨核球系に分化させた場合は, HDAC の発現は抑制されなかった。③ HDAC1 プロモーターは TATA less で, GC box, CCAAT box, GATA および MZF-1 の結合配列を認めた。プロモーター活性は Sp-1, GATA-1 によって活性化され, GATA-2, MZF-1, C/EBP  $\alpha$ , C/EBP  $\beta$  によって抑制された。また GATA-1 による HDAC1 転写活性化は, GATA-2 + MZF-1 によって著明に抑制された。これらのことから, 造血幹細胞における HDAC1 の発現抑制は GATA-2, MZF-1 によるものであり, HDAC1 は正常な血球分化において, 分化の方向付けに関与していると考えられる。さらに, 白血病における HDAC1 の発現異常は, GATA-2, MZF-1, C/EBP 等の機能異常によると推測される。

2) 造血幹細胞における HDAC の機能と白血化への関与の解明

① 純化した造血幹細胞に HDAC1 を強発現させたが, 明らかな増殖の促進は認めなかった。② C57BL/6 (Ly-5.1) マウス由来の造血幹細胞にレトロウイルスを用いて HDAC1 を発現させ, 放射線照射した C57BL/6 (Ly-5.2) マウスに移植した。移植後約 2 か月以降で, HDAC1 発現群において有意の白血球減少が認められている。このことより, HDAC1 の異常発現は顆粒球系分化を抑制すると考えられた。今後, HDAC1 強発現単独で白血病が発症するかどうかを観察してゆく。また HDAC1 は分化抑制すなわち白血化における class II 異常として働いていると思われ, 増殖促進性遺伝子異常 (class I 異常) の存在によって白血病の発症が

促進される可能性が高い。この点を検証するため、HDAC1 + FLT3-ITD を同時発現させての移植実験を行う予定である。

## 視床下部弓状核グルコース感受性ニューロンにおける低グルコース感知機構の解明

地域医療学系専攻4年 栗田 英治

### 1. 研究目的

グルコース感受性ニューロン (GSN) は、細胞外グルコース濃度低下を感知して電気活動を増加させるニューロンである。視床下部弓状核の GSN の90%以上は neuropeptide Y を含有しており、摂食亢進に重要な役割を担っていることが推定される。しかしその低グルコース感知の詳細な細胞内シグナル伝達機構は未解明である。本研究は、低グルコース感受機構におけるグルコース代謝、細胞内エネルギー産生、起電性  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase (NKA)、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル (VDCC) の関与を明らかにすることを目的とした。また、GSN の低グルコース感知機構の生体摂食調節における役割を検討した。

### 2. 研究方法

i) ラット弓状核よりニューロンを急性単離し、fura-2蛍光により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )、SBFI 蛍光により  $[\text{Na}^+]_i$ 、自家蛍光により NAD(P)H 濃度を測定した。低グルコース刺激 ( $8.3\text{mM} \rightarrow 2.8\text{mM}$ ) により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  が増加したものを GSN と判定した。ii) 各種阻害剤をラットの第3脳室内に投与し摂食量を測定した。

### 3. 研究結果

i) GSN において、①高グルコース存在下 ( $8.3\text{mM}$ ) においてもグルコース代謝の律速酵素である glucokinase の阻害剤 mannoheptulose ( $10\text{mM}$ ) の添加により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加が惹起された。②低グルコース刺激により NAD(P)H 濃度が減少し、さらに高グルコース存在下においても電子伝達系阻害剤 cyanide ( $100\mu\text{M}$ ) の添加により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加が惹起された。③低グルコース刺激により  $[\text{Na}^+]_i$  が増加し NKA の

抑制が示唆され、さらに高グルコース存在下においても NKA 阻害剤 ouabain ( $100\mu\text{M}$ ) の添加により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加が惹起された。④低グルコース刺激による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加は、L-type VDCC 阻害剤 nifedipine ( $10\mu\text{M}$ )、N-type VDCC 阻害剤  $\omega$ -conotoxin ( $500\text{nM}$ ) により抑制された。ii) *in vivo* 実験において、mannoheptulose ( $30\mu\text{mol}$ )、および、ouabain ( $0.5\text{nmol}$ ) の脳室内投与により摂食量の有意な増加を認めた。

### 4. 結論

低グルコース感受機構として、glucokinase を介したグルコース代謝の低下→細胞内エネルギー低下→起電性 NAK 活性低下→脱分極による VDCC 活性化→  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加、というシグナル伝達が示唆される。また、この機構による GSN の活性化は生体の摂食亢進に関与していることが示唆される。

## 一過性 ST2タンパク質過剰発現マウスの作成と ST2が間質性肺炎に及ぼす効果の検討

地域医療学系専攻4年 間藤 尚子

### 1 研究目的

ST2遺伝子は、線維芽細胞の増殖開始過程において発現される遺伝子として、1989年に富永によりクローニングされた。近年、ST2遺伝子産物の一つである分泌型 ST2タンパク質の投与により、敗血性ショックモデルマウス及び関節炎モデルマウスにおける炎症性サイトカインの産生が抑制され、病態が改善したと報告された。これより ST2タンパク質は抗炎症効果を介して生体防御に寄与する可能性が示唆されていた。ヒトにおいては、敗血性ショック、重度の外傷などの他、特発性肺線維症の急性増悪時においても血清 ST2タンパク質の増加が報告された。以上より肺を主座とする炎症においても、ST2タンパク質が関与している可能性が考えられ、急性肺障害に対し ST2タンパク質が如何なる効果を示すかを、*in vivo* で検討した。

### 2 研究方法

#### (1) ST2タンパク質過剰発現マウスの作成

ST2タンパク質の効果を明らかにするため、

C57BL-6/N に hydrodynamic injection 法により ST2 遺伝子を導入し、一過性に ST2 タンパク質を過剰発現するマウスの作成を試みた。尚、本法によって導入遺伝子が発現することを確認するため、pGL3 コントロールベクターを導入し、*in vivo* imaging system (IVIS) にてルシフェラーゼの発光を検出した。また、発現の局在を検討するため pCAGGS-LacZ を導入し、各臓器の X-gal 染色を行った。続いて、pCAGGS (empty vector) をコントロールとし、pCAGGS-mouse ST2 (mST2) を導入し、経時的に血漿を採取し、ST2 タンパク質濃度を測定した。

## (2) ST2 タンパク質過剰発現マウスに対する急性肺障害の惹起と評価

(1)の方法により ST2 遺伝子を導入したマウスに対し、プレオマイシンを気管内に投与し (1 mg/1 kg)、急性肺障害の惹起を行った。

プレオマイシンを投与後、14 日間観察し生存率の検討を行った。また、プレオマイシン投与 1, 3 日後に、気管支肺胞洗浄液を採取し、細胞数、細胞分画の検討、炎症性サイトカイン及びアルブミンの測定を行った。また、投与 1, 7 日後に肺の組織切片を作成し、病理組織学的検討を行った。

## 3 研究成績

### (1) ST2 タンパク質過剰発現マウスの作成

hydrodynamic injection 法により pGL3 コントロールベクター及び pCAGGS-LacZ を導入した結果、肝臓に最も強く遺伝子の発現が認められたが、肺及びその他の臓器には発現が確認されなかった。同様に pCAGGS-mST2 を導入した結果、12-24 時間をピークとする血漿 ST2 タンパク質の増加を認め、以降は漸減するが 21 日間は検出が可能であった。また、導入 24 時間後の気管支肺胞洗浄液、肺粗抽出液においても有意に ST2 タンパク質濃度の上昇を認めた。

### (2) ST2 タンパク質が急性肺障害へ及ぼす効果の検討

コントロールマウス及び ST2 タンパク質過剰発現マウスに急性肺障害を惹起した結果、コントロールマウスの生存率は 38.9% であったが、ST2 タンパク質過剰発現マウスでは 84.1% と有意に生存率の向上を認めた。また、気管支肺胞洗浄液の細胞数を比較した結果、好中球数の著

明な減少を認め、加えて気管支肺胞洗浄液中の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  濃度の減少、アルブミン濃度の減少を認めた。組織学的検討では、プレオマイシン投与後 1 日目には肺胞間質へ浸潤する好中球がコントロールマウスと比較し明らかに減少していた。また、7 日目には炎症範囲の進展及び膠原線維の出現が、抑制されている傾向を認めた。

## 4 考察・結論

本実験で用いた hydrodynamic injection 法は、大量の溶媒と共に遺伝子を投与するため、容量負荷による循環不全及び肝障害が副作用としてあげられるが、本研究で用いた条件では問題となる副作用は認められなかった。また、ST2 タンパク質は分泌型タンパク質であるため、本法により肝臓で ST2 遺伝子が発現した後に循環血液中へ分泌されたと考えられた。

尚、ST2 タンパク質過剰発現マウスはコントロールマウスと比較し、急性肺障害を惹起後の生存率が有意に改善していた。気管支肺胞洗浄液の分析及び組織学的検討の結果、ST2 タンパク質の存在下では、好中球の組織への浸潤が抑制され、炎症性サイトカインの産生及び血漿成分の漏出が抑制されたことから、これらの作用が炎症の進展を阻害し、肺の破壊を抑制することで呼吸機能を保持し最終的に生存率の向上に寄与したと推測された。以上の結果から、ST2 タンパク質が急性肺障害の治療薬として有効である可能性が示唆された。なお、ST2 タンパク質が作用する細胞は本研究では同定されておらず、今後の課題としたい。また、炎症後の線維化に対する効果に関しては、さらなる検討が必要と考えられる。

## モンゴルの小児における B, C, D 型肝炎ウイルス感染に関する全国横断研究

環境生態学系専攻 4 年 Dambadarjaa Davaalkham

### 1. 背景

B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染と、肝硬変や肝細胞癌 (HCC) を含むその合併症は、モンゴルにおける重大な公衆衛生問題となってい

る。そこで、B型肝炎の慢性キャリアー及び合併症を予防するために、1991年に全乳児を対象としたB型肝炎ワクチン接種が、拡大予防接種プログラムの一環として導入された。しかし、このプログラムの導入後に出生した子どもにおけるB型肝炎感染状況に関するデータは非常に少なく、特にモンゴルでの全国的な調査はこれまで全く行われていない。

## 2. 目的

我々は、モンゴルにおけるB型肝炎予防接種プログラムの効果を評価し、B型肝炎感染減少のための影響力と課題を明らかにすることを目的として、モンゴル全国の小学生についての代表性のある無作為サンプルを対象とした全国的な横断研究を実施した。

## 3. 方法

モンゴルの全ての公立小学校から、無作為に25校を選定して、学校ベースの全国的横断研究を行った。血清検体のB型肝炎s抗原(HBsAg)、B型肝炎s抗体(Anti-HBs)、B型肝炎c抗原(Anti-HBc)については chemiluminescence immunoassay を使用した。

## 4. 結果

1145人(男児592人、女児553人、年齢は7から12歳)について採血を行うことができた。これは調査対象者の93%であった。全体として、子供たちの15.8%はB型肝炎に感染していて、そのうち5.2%はHBs抗原のキャリアーであった。男児は、女児と比較して、有意に高い有病率だった。田舎に住んでいる子どもは、都市部に住んでいる子どもより、有意に有病率が高いことがわかった。スケジュール通りに完全に接種されたかどうかについては、大都市圏と比べると田舎や、県の中心地では、有意に低い結果であった。出生時の予防接種をスケジュールよりも遅れて接種された子どもの割合は、田舎では有意に高い結果だった。

## 5. 結論

モンゴルの子どものB型肝炎感染の有病率は、全出生児を対象としたB型肝炎予防接種により、過去に報告されているレベルより大きく減少した。しかし、予防接種済みの子どものB型肝炎感染の割合が、田舎において都市部より有意に高いことがわかった。