

FKHRL1は胚形成、分化、腫瘍発生などに関連する転写因子で、CML細胞のBCR-ABLからのリン酸化シグナル伝達経路の下流にリン酸化された不活化状態で存在している。CML細胞ではイマチニブ投与によりFKHRL1は脱リン酸化されて核内へ移行し、転写因子としての活性を持ちアポトーシスが誘導される。これに対しイマチニブ耐性CML細胞ではアポトーシスの誘導は観察されず、FKHRL1のリン酸化も解除されないことから、FKHRL1が脱リン酸化を受けずに転写因子としての活性を持たないことがイマチニブ耐性機序の一つではないかと仮定し、イマチニブ耐性CML細胞において活性型FKHRL1を核内へ誘導することによりアポトーシスを誘導できるかを検討した。

FKHRL1のリン酸化部位に変異を加え、エストロゲンレセプターを結合した活性型FKHRL1-TMERをイマチニブ耐性CML細胞株K562/SR, KCL22/SR, KU812/SRに遺伝子導入し、stable cloneを得てtamoxifenによる活性型FKHRL1の核内発現誘導系を樹立した。これらの細胞はtamoxifen濃度に依存して細胞増殖が抑制され、細胞周期がG0/G1で停止した後、アポトーシスが誘導された。また、この際にFKHRL1の標的遺伝子の一つであるTNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)の発現亢進がReal-Time PCR, Western blott法で確認された。TRAILの発現亢進はCML細胞にイマチニブを投与した際にも認められ、イマチニブ耐性CML細胞では認められなかった。そこでTRAIL発現ベクターを作成し、イマチニブ耐性CML細胞に遺伝子導入してTRAILを発現させるとアポトーシスが誘導された。またこの際にcaspase-3, caspase-9, PARPの活性化が認められたが、caspase-8の活性化は認められず、TRAILとデスレセプターの結合を介した既知の経路とは別のシグナル伝達経路によるものと推察された。

以上より、FKHRL1を介したTRAILの発現がイマチニブの作用機序のひとつであることが明らかとなった。またFKHRL1が脱リン酸化を受けずに活性化されないことがイマチニブ耐性機序の一つと考えられ、活性型FKHRL1を用いることによりイマチニブ耐性を克服できる

可能性がある。

成人T細胞性白血病の大規模DNAチップ解析による病期進展機構解明

人間生物学系専攻3年 崔 永林

成人T細胞白血病(ATL)は最も難治性なヒト悪性腫瘍の一つであり、比較的症状の乏しい「くすぶり型」、「慢性型」と、腫瘍細胞の全身臓器への浸潤など多彩な症状を呈する「急性型」とに分けられる。一旦急性型へと移行したATLは極めて予後不良であるが、この病期進展メカニズムは殆ど不明のままである。DNAチップを中心としたゲノミクス技術はATLの発症および病期進展機構の解明の上でも重要な役割を果たすと期待される。しかしながらDNAチップ解析はその鋭敏な感度のため偽陽性結果を生じることも多い。効率の良いATLのゲノミクス解析のためには、各病期のATL患者末梢血より分化レベルの揃ったATL細胞のみを純化して比較することが重要であろう。

我々は慢性型、急性型ともに末梢血CD4陽性分画の殆どがATLクローンによって占められることに着目し、これら病期の患者末梢血よりCD4陽性分画のみを純化するATL細胞バンク事業を開始した。本バンクに属する慢性型19例、急性型22例の純化細胞をアフィメトリクス社HGU133A&B DNAチップを用いて解析し、約3万3千種類のヒト全遺伝子発現量を測定した。さらに同様に純化した健康人末梢血CD4陽性細胞3例、およびそれぞれをPHA刺激により活性化させた3例についてもDNAチップ解析を行った。これら計47例のデータセットよりATL慢性型と急性型とを最も区別する遺伝子セットを抽出し、同遺伝子群の発現パターンより作成した仮想空間にサンプルを投射したところ、両病期のサンプルは乖離した場所に位置することが明らかになった。すなわち慢性型と急性型のATLは遺伝子発現プロファイルが大きく異なることが示された。

一方急性型特異的に発現する遺伝子を抽出したところ、成長因子受容体をコードする遺伝子

が同定された。興味深いことに、ATL 患者末梢血における本受容体リガンド蛋白濃度を測定したところ、ATL 患者の多くで血中レベルが亢進していることが確認された。同受容体を血液細胞株に強制発現させた場合にも、同リガンド依存性の DNA 合成が確認された。

これらの知見は ATL の病期進展機構に新たな視野を開くものであり、適切にデザインされたゲノミクス解析が有用である事を示唆するといえる。

大腸癌における DNA 異常メチル化のゲノムワイドスクリーニング

地域医療学系専攻 4 年 鯉沼 広治

(目的) 通常大腸癌とは異なる臨床学的、分子生物学的背景を有する「メチル化陽性大腸癌」の発癌メカニズムを探るため、それに関与するメチル化遺伝子の同定を目的とした。

(方法) メチル化遺伝子数が極端に異なると予想される hMLH1メチル化陽性大腸癌と同陰性大腸癌の癌組織を対象として MCA-RDA 法を行い、その 2 群間でメチル化レベルの異なる DNA 断片のスクリーニングを行った。得られたゲノム断片が遺伝子の 5'側 CpG island に相同性を持つ場合、その遺伝子のメチル化状態を多数の癌および正常粘膜において検証した (COBRA 法)。癌抑制遺伝子の候補に関してはメチル化と遺伝子発現との関連を Real-time RT-PCR にて検討した。

(結果) DNA 断片を 288 個クローニングし、5' CpG を含む 70 遺伝子を同定した。うち 41 遺伝子についてメチル化プロファイルを作成したところ、28 遺伝子は異常メチル化遺伝子と考えられた。hMLH1メチル化陽性癌サンプルは、他のほとんどの遺伝子にもメチル化を認める特殊な大腸癌群であった。28 遺伝子は 3 つのグループに分けることができた。①メチル化状態が hMLH1 に相同性の高いグループ、②多くの癌でメチル化を認めるが正常粘膜には認めないグループ、③癌および正常粘膜にもメチル化を認めるグループである。癌抑制遺伝子の候補と考

えられた BMP3 は多くの癌でメチル化を認め、正常粘膜には認めなかった。癌における BMP3 発現量は、正常粘膜に比べ有意に低下していたが ($p=0.02$)、メチル化の有無により発現量に差を認めなかった。

(考察) 癌組織を用いた MCA-RDA 法により、28 個の癌特異的メチル化クローンが同定できた。これは細胞株を用いた実験報告に比べ非常に好成績であり、癌組織を実験材料に用いた解析を積極的に行うべきだと考えられた。TGF-beta superfamily に属する BMP3 において、異常メチル化と発現量低下との相関が認められなかった理由として、BMP3 を不活化する他の要因 (LOH や点突然変異) が関与している可能性と、COBRA 法で検証した CpG site が発現調節に直接的に関与する部位ではない可能性が考えられた。メチル化プロファイルから得られた 3 つの遺伝子グループでは、①は hMLH1 と協調してあるいは同時期に発癌に関与している可能性、②は癌特異的メチル化遺伝子群、③グループは発癌に至る前からメチル化が存在したと考えられた。特に MIG2 は、hMLH1メチル化患者の癌と正常粘膜特異的にメチル化を認め、メチル化関連大腸癌危険群の早期診断マーカーとなる可能性がある。

(結論) 大腸癌新鮮凍結組織を用いたメチル化遺伝子のスクリーニングにより、癌特異的メチル化を認める多数の遺伝子が同定された。メチル化関連大腸癌の発癌過程でこれらのメチル化遺伝子がどのように関与しているかについては、今後の重要な検討課題であると考えられる。

ガラニン様ペプチドによる NPY ニューロン刺激と脂肪嗜好性における役割

地域医療学系専攻 4 年 倉持 素樹

Galanin-like peptide (GALP) は、摂食亢進因子である galanin とアミノ酸配列の一部を共有するペプチドとして発見された。GALP をラットの脳室内へ投与すると強い摂食亢進作用を示すが、その作用発現機序や生理的な意義はわかっていない。本研究では、GALP による摂