

報告書

平成13年度 丸木記念特別奨学研究費 A 研究実績報告書

複製欠損型単純ヘルペスウイルスベクターを用いた
造血器悪性腫瘍に対する遺伝子治療の研究

受賞者 鈴木 利哉 (埼玉医科大学血液内科学教室)

共同研究者 桑山 善夫*, 三角 素弘*, 別所 正美*

われわれは複製欠損型単純ヘルペスウイルスベクターを用いた造血器悪性腫瘍に対する遺伝子治療を研究している。造血器悪性腫瘍のうちとくに患者数の多い急性骨髄性白血病と悪性リンパ腫(ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫)を対象にしている。

従来の治療法である化学療法および造血幹細胞移植とは異なる治療法の戦略を確立することを目指している。われわれが遺伝子治療を用いて確立しようとしている治療法は免疫療法に近い性質をもつものであり、近年急速に普及しつつある造血器悪性腫瘍に対する rituximab などの抗体療法に近い治療法である。遺伝子治療により生体内の免疫反応を調節して造血器悪性腫瘍細胞に強制的にアポトーシスすなわち細胞死を誘導しようとするものである。従来の治療法では治療の効果に限界があるため腫瘍細胞の根絶は困難であったが、免疫反応を利用することにより無理なく悪性腫瘍細胞の根絶を達成することが期待される。

造血器悪性腫瘍細胞に複製欠損型単純ヘルペスウイルスベクターを用いて免疫調節遺伝子を導入する。複製欠損型単純ヘルペスウイルスベクターを選択した理由は特殊な感染方法によらずに効率良く外来遺伝子を造血器悪性腫瘍細胞に導入できることが期待されるからである。従来の遺伝子治療ではレトロウイルスベクターが頻用されてきた。X連鎖重症複合免疫不全症における遺伝子治療の臨床応用においてレトロウイルスベクターが挿入変異により LMO2 遺伝子を活性化させた結果、T細胞性白血病を発症させたことが報告された。これはレトロウイルスベクターが染色体遺伝子に組み込まれてしまうために発生する問題点であるが、単純ヘルペスウイルスベクターは染色体遺伝子に組み込まれないため二次的に腫瘍を発生させる可能性は少ないと考えられている。

今回の研究においてわれわれが試みた免疫調節遺伝子はヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子と変異

型 I κ B 遺伝子であり、どちらも不死化した造血器悪性腫瘍細胞にアポトーシスを誘導し治療効果を発揮することが期待される。

ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子はガンシクロビルと併用することにより、ガンシクロビルをリン酸化し、毒性物質に変えて造血器悪性腫瘍にアポトーシスを誘導する。これは自殺遺伝子療法とよばれる。アポトーシスの種々の経路のうち FAS を介する経路を経由すると考えられる (図1参照)。

変異型 I κ B 遺伝子産物は転写因子 NF- κ B に強く結合して NF- κ B の核内移行を妨げる。その結果 NF- κ B の恒常的な活性化によりアポトーシス抑制遺伝子が活性化されていたものが、活性を失いアポトーシスにおちいる。これは IAP 遺伝子などのアポトーシス抑制遺伝子の失活化が関与する (図1参照)。

われわれは造血器悪性腫瘍に対する以下の遺伝子治療実験を行った。(1)ホジキンリンパ腫細胞に対する変異型 I κ B 遺伝子導入、(2)非ホジキンリンパ腫細胞に対するヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子

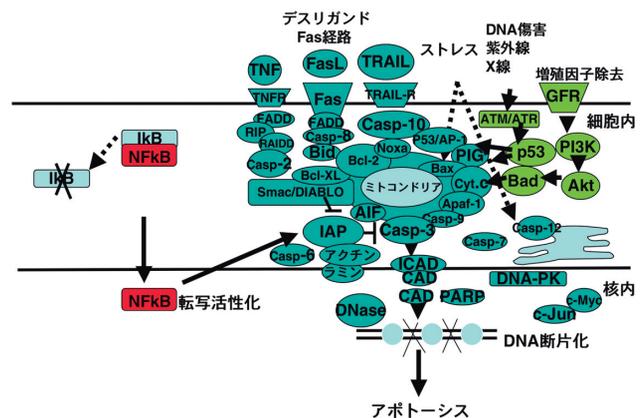


図1. アポトーシスと NF- κ B. (井出利憲 2004 年を改変)

導入, (3) 急性骨髄性白血病細胞に対する変異型I κ B遺伝子導入である.

ホジキンリンパ腫の異常な増殖の中心をなすReed-Sternberg細胞やHodgkin細胞の増殖に転写因子NF- κ Bが関与している. ホジキン細胞株に対する単純ヘルペスウイルスベクターTOI κ B (図2)による変異型I κ B遺伝子導入によりNF- κ Bの発現が抑制され, ホジキンリンパ腫の増殖を抑制することが証明された(論文①).

非ホジキンリンパ腫細胞に対するヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子を導入したところ, 非ホジキンリンパ腫, そのなかでもとくに低悪性度リンパ腫症例細胞において, 単純ヘルペスウイルスベクターTOZ.1 (図3)は効率の良い自殺遺伝子療法を達成することができた. 殺腫瘍効果が最もすぐれていたのは慢性リンパ性白血病の症例であり, 殺腫瘍効果は47.2%に達した. (論文②).

急性骨髄性白血病ではサイトカインの自己分泌やI κ B分解機構の異常などにより恒常的なNF- κ Bの活性化がおり細胞の異常増殖が生じている. NF- κ Bの活性化を抑制することを目的として変異型I κ B遺伝子を発現する複製欠損型単純ヘルペスウイルスベクターTOI κ Bを急性骨髄性白血病細胞に感染させたと

ころ, 90%以上の白血病細胞を感染48時間以内に細胞死に至らしめることができた(論文③). その抗白血病効果は急性骨髄性白血病治療の中心的な薬剤であるcytosine arabinosideの10倍近いものである. 変異型I κ Bを発現する複製欠損型単純ヘルペスウイルスベクターTOI κ Bによるアポトーシス誘導の分子細胞学的な機序をあきらかにすることに成功した. 急性骨髄性白血病症例では従来の治療法に反応しない治療抵抗性の症例があるが, われわれの遺伝子治療によるアポトーシス誘導は大変有望な画期的治療法になることが期待される. 今後症例細胞および白血病やリンパ腫のモデル動物を対象とした実験を行ない, 有効性と安全性を確認し臨床応用を目指したい.

文 献

- ① Motohiro Misumi, Yoshio Kuwayama, Toshiya Suzuki, Kanae Sakate, Katsuhiko Yoshida, Kunitake Hirasima, Shusuke Moriuchi, Joseph C Glorioso, and Masami Bessho. Gene therapy for Hodgkin's lymphoma by means of replication-defective herpes simplex virus-1 overexpressing mutant I κ B α . *Blood* 98 Suppl 1: 405b-406b, 2003.
- ② Motohiro Misumi, Toshiya Suzuki, Shusuke Moriuchi, Joseph C Glorioso, and Masami Bessho. In vitro thymidine kinase/ganciclovir-based suicide gene therapy using replication-defective herpes simplex virus-1 against leukemic B-cell malignancies (MCL, HCL, B-CLL). *Leukemia Research* 27:695-699, 2003.
- ③ Yoshio Kuwayama, Toshiya Suzuki, Shusuke Moriuchi, Joseph C Glorioso, and Masami Bessho. I κ B-mediated apoptotic gene therapy against acute myelogenous leukemia using replication-defective HSV-1 vector expressing TK and mutant I κ B α . *Cellular and Molecular Biology* 2004, in press

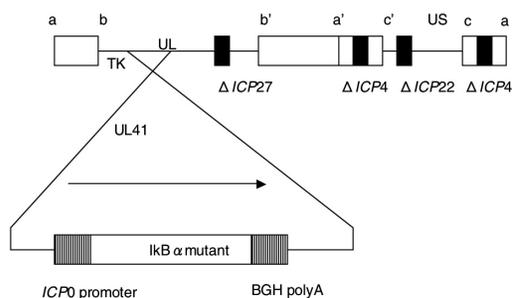


図2. TOI κ Bの構造.

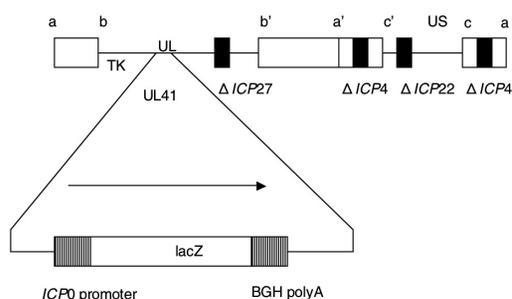


図3. TOZ.1の構造.

謝 辞

本研究は平成13年度丸木記念特別奨学研究費Aにより行われた. 研究の一部は日本新薬株式会社の奨学研究費により行われた. 研究は医動物学教室平山謙二教授(現長崎大学熱帯医学研究所)のご援助を頂いた. 研究は埼玉医科大学ゲノム医学センター(村松正實所長)において行われた. 米国ピッツバーグ大学医学部分子生物学グロリオソ主任教授との国際共同研究として施行された.

報告書

平成13年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

肝壊死, 再生, 線維化および発癌の病態連繋におけるオステオポンチンの意義
— トランスジェニックマウスを用いた検討 —

受賞者 持田 智 (埼玉医科大学消化器・肝臓内科学教室)

共同研究者 松井 淳*, 稲生 実枝*, 内木 佳代子*,

名越 澄子*, 藤原 研司*

はじめに

オステオポンチンはRGD配列を有する細胞外マトリックスであるが, マクロファージに対してはケモカインとして作用する^{1,2)}. 従来, 肝はオステオポンチンを発現しない臓器とされてきたが²⁾, 筆者らはラット障害肝では活性化したクッパー細胞, マクロファージ及び星細胞にその発現が認められることを見出した^{3,4)}. また, マウスではオステオポンチン遺伝子に多型性が認められ⁵⁾, その発現が異なるalleleの系を用いた実験から, マクロファージの肝浸潤に際して本因子はMCP-1やMIP-1 α など他のケモカインより重要な働きをしていることを証明した. 一方, オステオポンチンはTh1免疫応答の開始に必須であることがAshkarらによって報告され, 本因子はサイトカイン及びケモカインのネットワークにおいて中心的役割を担うことが明らかになった⁶⁾.

劇症肝炎や肝移植後肝不全に特徴的な広汎肝壊死の成立には, 活性化したクッパー細胞や浸潤肝マクロファージの惹起する類洞内凝固及びこれに起因する微小循環障害が関与する⁷⁻¹⁰⁾. 筆者らは, その対策として肝類洞を標的とした抗凝固療法を確立し¹¹⁻¹³⁾, その臨床応用に努めてきた. この一連の研究の過程で, マクロファージの肝浸潤や活性化にはオステオポンチンの発現と, これに引き続くTh1系の免疫応答が重要であることを証明した. また, Th1系の免疫応答は劇症肝炎のみならず, 慢性肝炎や肝硬変の進展にも寄与することが報告されている. 従って, オステオポンチンは肝壊死, 線維化の病態連繋においてサイトカイン, ケモカイン・ネットワークの中核として機能していると推定される. また, 肝硬変の再生結節内の肝細胞や高分化型肝細胞癌もオステオポンチンを発現することか

*埼玉医科大学消化器・肝臓内科学教室

ら, オステオポンチンが肝再生や肝発癌の過程も調節している可能性が示唆される.

そこで, 肝病態の成立におけるオステオポンチンの役割をより明確にするために, 筆者らは本因子を過剰発現するトランスジェニック・マウスを確立した¹⁴⁾. このマウスの自然経過と各種肝病態を誘導した際の経過を評価することにより, 肝壊死, 線維化, 再生及び肝発癌の病態連繋におけるオステオポンチンの意義を検討した.

1. トランスジェニック・マウスの作成とその病態

マウス・オステオポンチンの全長cDNAをcloningし, これをhuman serum amyloid P component (hSAP) promoterを有する発現vector (PLG1-hSAP) に入れた. これをB6マウスの受精卵にmicroinjectionし, 仮親の卵管に移植したところ52匹を出産した. マウスOsteopontin-DNAの遺伝子配列からprimerを設定, 尾から抽出したDNAでPCRを行った. 52匹中6匹でオステオポンチン-DNAが検出された. この6系統をB6と掛合せヘテロのF1を得たが, 4系統がトランスジェニックであり, そのうち3系統で継代繁殖が可能であった.

トランスジェニック・マウスの各臓器homogenateでオステオポンチン発現をWestern blot法で検討したところ, 肝で顕著な発現が認められ, 生理的に本因子を発現している腎より強度であった. オステオポンチンの肝濃度(平均[最低~最大])をELISAにより測定したところ, トランスジェニック・マウスでは1,139 ng/g liver [34 ~ 15,600] であり, 生理的にオステオポンチン発現が高度である腎の約10倍高値であった. 血漿オステオポンチン濃度 (ng/mL: 平均[最低~最大]) は対照 (3,001 [1,525 ~ 5,375]) に比してトランスジェニック・マウス (7,890 [1,150 ~ 55,000]) が有意に高値

であり、特に肝の発現が高度であった系統は何れも10,000以上を示した。また、肝におけるオステオポンチンの発現細胞を、単離細胞と用いたWestern blot法と免疫組織染色で検討したところ、非実質細胞ではなく、肝細胞に発現が認められた。

肝を顕微鏡観察したところ、トランスジェニック・マウスは12週令より門脈域にリンパ球が浸潤し、48週令ではリンパ濾胞を形成した。また、24週令以降のマウスでは肝小葉に巣状壊死が観察された。免疫組織染色を行ったところ、浸潤リンパ球はCD4陰性、CD8及びMHC class IIが陽性であり、活性化CTLに相当することが判明した。また、MHC class IIの染色性はKupffer細胞でも増強しており、同様に活性化していると考えられた。血清中の抗核抗体を蛍光抗体法で評価したところ、12週令のトランスジェニック・マウスは50%で陽性であり、本マウスは自己免疫性肝炎のモデルになると考えられた。なお、本トランスジェニック・マウスでは病変も肝外病変も出現することが明らかとなった。脾とリンパ節は腫大し、肺、唾液腺、腎には多数のCTL浸潤が観察された。これらの臓器はC型慢性肝炎でもしばしば肝外病変が見られることから、その成立機序を検討する際にも有用なモデルになる可能性がある。

II. トランスジェニック・マウスにおける広汎肝壊死の誘発

肝組織を用いてDNA microarrayによる解析を行ったところ、IL-18などTh1系cytokine及びIL-10などTh2系cytokineのmRNA発現は、トランスジェニック・マウスと対照で差異が認められなかった。しかし、トランスジェニック・マウスはconcanavalin Aを静注した際の血清IFN- γ 濃度上昇が対照に比して高度であった一方で、IL-10濃度上昇が軽度であり、より広汎な肝壊死が惹起された。また、トランスジェニック・マウスでは、雌は雄に比してIFN- γ 上昇や肝障害が高度であり、IL-10上昇が軽度であった。従って、本トランスジェニック・マウスではconcanavalin-A投与後にはTh1/Th2免疫応答が破綻し、広汎肝壊死が成立すると思われた¹⁵⁾。

一方、DNA microarrayによる解析では、トランスジェニック・マウスの肝はcalpain発現が対照の30%まで低下していたが、metallothionein発現が3倍増強していた。また、GDP dissociation inhibitorやglutathione S-transferaseの発現も2倍以上増強していた。このため、四塩化炭素を投与した際に出現する肝障害はトランスジェニック・マウスが対照マウスに比して軽度であり、本マウスはTh1免疫応答と細胞防御系との関連を研究する際にも有用と考えられた。

III. ヒト・オステオポンチン遺伝子の解析

Th1系の免疫応答はC型慢性肝炎の発症に関与するが、インターフェロン治療によってウイルスが排除される際にも重要な役割を果たしている。肝細胞にオステオポンチンを過剰発現するトランスジェニック・マウスの病態を考慮すると、ヒトにおける肝炎の発症やインターフェロン治療の有効性も、肝におけるオステオポンチン発現を介して遺伝的に制御されている可能性がある。そこで、先ず、インターフェロン治療を実施していないC型慢性肝炎患者20例を対象に、direct sequencing法によりオステオポンチン遺伝子のpromoter領域の塩基配列を解析し、nt -155, -443, -616, -1,748の4ヶ所にSNPsを見出した¹⁶⁾。次いで、同様にIFN未施行のC型慢性肝炎患者156例を対象にinvader法でこれらSNPsのalleleを同定し、全176例で各SNPsと肝炎活動性との関連を検討した。nt -155, -616, -1,748の3SNPsは、D'値および r^2 値が0.937以上であり、強い連鎖不均衡を呈していた。一方、nt -443のSNPに関しては肝炎活動性と関連があり、血清ALT値が2年間以上にわたって正常値の症例はT/Tが13%、C/Tが75%であったのに対して、80 IU/L以上に上昇した症例ではT/Tが44%、C/Tが40%であった。このSNPは登録されていない新たなものであり、肝炎活動性を規定している可能性がある(工業所有権出願番号:P2003332067)¹⁶⁾。

更に、インターフェロン治療を実施したC型慢性肝炎76例を対象に、上記SNPsと治療効果との関連を検討した。nt -1,748のalleleがG/A、G/Gの症例では治癒率が82%であり、Aの症例における43%に比して有意に高率であった。Genotype 1b、高ウイルス量の難治性症例に限定してもこの差異は認められた。また、nt -443がT/Tの症例は治癒率が86%であり、C/T、C/Cの症例における53%より有意に高率であった。1b、高ウイルス量でも同様であった。なお、nt -1,748がG/A、G/G、nt -443がT/Tの両者を満たす症例は全例が治癒し、両SNPsの組み合わせによる治療効果の予測はpositive predictive valueが100%であった。

まとめ

肝細胞にオステオポンチンを過剰発現するトランスジェニックマウスは肝炎を自然発症し、抗核抗体が陽性であることから、自己免疫性肝炎のモデルになると考えられた。本マウスでは免疫応答がTh1優位にシフトしており、concanavalin-Aを投与すると対照マウスに比して広汎な肝壊死が誘発される。一方、ヒトでもオステオポンチン遺伝子のpromoter領域にSNPsが認められ、肝炎の活動性やインターフェロン治療の効果と関連していた。肝におけるオステオポンチンの発現はpromoter SNPsにより遺伝的に制御されており、こ

れが肝炎の発症やインターフェロン治療の効果を規定している可能性がある。

文 献

1. Butler WT. The nature and significance of osteopontin. *Connective Tissue Research* 23: 123-136, 1989.
2. Uede T, Katagiri Y, Iizuka J, et al. Osteopontin, a coordinator of host defense system: A cytokine or an extracellular adhesive protein? *Microbiol. Immunol* 41: 641-648, 1997.
3. Kawashima R, Mochida S, Matsui A, et al. Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: A possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 527-531, 1999.
4. Wang YH, Mochida S, Kawashima R, et al. Increased expression of osteopontin in activated Kupffer cells and hepatic macrophages during macrophage migration in *Propionibacterium acnes*-treated rat liver. *J Gastroenterol* 35: 696-701, 2000.
5. Singh RP, Ratarca R, Schwartz J, et al. Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. *J Exp Med* 171: 1931-1942, 1990.
6. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287: 860-864, 2000.
7. Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. Sinusoidal endothelial cell damage by activated hepatic macrophages in rat liver necrosis. *Gastroenterology* 104:1466-1471, 1993.
8. Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. Blood coagulation equilibrium in rat liver micro-circulation as evaluated by endothelial cell thrombomodulin and macrophage tissue factor. *Thromb Res* 80: 113-123, 1995.
9. Mochida S, Ohno A, Arai M, et al. Role of adhesion molecules in the development of massive hepatic necrosis in rats. *Hepatology* 23: 320-328, 1996.
10. Mochida S, Arai M, Ohno A, et al. Deranged blood coagulation equilibrium as a factor of massive liver necrosis following endotoxin administration in partially hepatectomized rats. *Hepatology* 29: 1532-1540, 1999.
11. Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. Blood coagulation equilibrium in rat liver micro-circulation as evaluated by endothelial cell thrombomodulin and macrophage tissue factor. *Thromb Res* 80: 113-123, 1995.
12. Yamanobe F, Mochida S, Ohno A, et al. Recombinant human tissue factor pathway inhibitor as a possible anticoagulant targeting hepatic sinusoidal walls. *Thromb Res* 85: 493-501, 1997.
13. Arai M, Mochida S, Ohno A, et al. Selective bowel decontamination of recipients for prevention against liver injury following orthotopic liver transplantation: Evaluation with rat models. *Hepatology* 27: 123-127, 1998.
14. Mochida S, Yamamoto T, Mimura S, et al. Transgenic mice expressing osteopontin in hepatocytes as a model of autoimmune hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 114-120, 2004.
15. Mimura S, Mochida S, Inao M, et al. Imbalance of Th1 and Th2 immune reactions may provoke massive liver necrosis in osteopontin transgenic mice. *J Gastroenterology* (in press).
16. Mochida S, Hashimoto M, Matsui A, et al. Genetic polymorphisms in promoter region of osteopontin gene may be a marker reflecting hepatitis activity in chronic hepatitis C Patients. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 1079-1085, 2004.

報告書

平成13年度 丸木記念特別奨学研究費 A 研究実績報告書

末梢血幹細胞移植併用化学療法を補完する進行卵巣癌に対する
新たな細胞治療

受賞者 大久保 光夫 (埼玉医科大学総合医療センター 輸血・細胞治療部門)

共同研究者 竹田 省¹⁾, 前田 平生²⁾

本研究は①自己末梢血幹細胞移植: Peripheral blood stem cell transplantation (以下PBSCT) 併用化学療法, ②腫瘍抗原に反応するT細胞の認識するエピトープの検出法, ③合成ペプチドとサイトカインによるTh1細胞の*ex vivo*での活性化法を確立し, 進行卵巣癌に対する新たな細胞治療を計画する事を目的とした。ここに, 丸木記念特別奨学研究費を授与していただいたことに感謝し, 研究実績の概要を報告する。

我々は進行卵巣癌に対して, auto-PBSCTを併用したcarboplatin (AUC: 8.75)とetoposide (960 mg/m²)によるcyclic semi-high dose chemotherapyとこれらに引き続いてcytoreductive surgeryを63例に行った。このうち17例が5年間の経過観察期間に達した。その結果, overall response rateは70.6%, 5年生存率は52.9%と良好であった。(K. Ikeba, M. Okubo, S. Takeda, K. Kinoshita, H. Maeda. Five-year results of cyclic semi-high dose neoadjuvant chemotherapy supported by autologous peripheral blood stem-cell transplantation in patients with advanced ovarian cancer. Int. J. Clin. Oncol. 9: 113-119. 2004.) しかし, 22%の症例に再発が認められたことから, この療法を補う細胞治療の研究を行った。

従来のPBSCT療法ではCD34陽性細胞で代表される造血幹細胞のみが使われているに過ぎなかった。しかし, CD34陽性細胞動員療法で得られた末梢血単核球分画をCD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD25, CD45RO, CD45RAについてフローサイトメトリーで解析すると, 動員された末梢血単核球分画にはCD4陽性CD45RA陽性T細胞が多く含まれている事が明らかとなった。この細胞群を活性化できれば, CD4陽性T細胞による抗原特異的な免疫反応の機構を利用した細胞療法が可能であると考えられた。

CD4陽性T細胞が認識する癌抗原のエピトープを検索する方法を確立するためには, HLA-DR分

子と癌抗原が固定されたモデルとなる実験系が必要であった。そこで我々は, 子宮癌関連抗原のヒトパピローマウイルスタイプ16 E7蛋白(以下E7)内に, HLA-DRに提示されCD4陽性T細胞が認識するepitopeを検出する実験法を確立した。この実験により, E7のアミノ酸配列のうち, HLA-DRB1*0901と親和性の高いmotifを内包するE7 61-80アミノ酸配列: CDSTLRLCVQSTHVDIRTLEで単核球を刺激すると, Th2タイプT細胞が0.3-2.4%にまで増加することが確認できた。さらに, 単核球をこのepitope peptideとIL-12とともに培養するとTh1タイプのT細胞の増加が認められた。これらの結果から, 癌抗原にはTh1とTh2タイプのT細胞に共通なepitopeが存在し, IL-12刺激で細胞障害活性をもつTh1タイプT細胞を誘導できる事から, 抗原特異的CD4陽性Th1タイプT細胞による癌の治療が可能であると考えられた。(M. Okubo, M. Sato, H. Inoku, R. Hirata, M. Yanagisawa, S. Takeda, K. Kinoshita, H. Maeda. Analysis of HLA-DRB1*0901-binding HPV-16 E7 helper T cell epitope. J. Obstet. Gynaecol. Res. 30: 120-129. 2004.)

共通するHLAなどの遺伝子背景が明らかではない卵巣癌において, 特異的な癌抗原を探索するのは当初困難であったが, 対象をcarcinogenic antigenから卵巣癌特異的tumor marker分子として, その卵巣癌腫瘍マーカーのアミノ酸配列のうち, 既報のalgorithmからCD4陽性T細胞のepitopeを推定し, これをcodeする合成peptideを作成し上記のE7 peptide刺激と同様の実験系で解析したところ, 10例中8例の卵巣癌患者でCD4陽性Th1タイプT細胞が認識する共通のepitopeを決定できた。このことから, 抗原ペプチドpeptideとcytokine刺激を*ex vivo*にて行い, 活性化したT細胞を体内に戻すことによって, 抗腫瘍効果, 特に主な癌組織(臓器)を切除した後の転移の抑制に対しての治療が可能となると思われた。

1) 埼玉医科大学総合医療センター総合周産期母児医療センター, 2) 同総合医療センター 輸血・細胞治療部門

報告書

平成13年度 丸木記念特別奨学研究費 A 研究実績報告書

RNA ポリメラーゼ II の転写制御と疾患の分子機構

受賞者 久武 幸司 (埼玉医科大学分子生物学教室)

共同研究者 禾 泰壽*, 濱田 光浩*, 福田 綾*

当研究では TFIID のヘリカーゼおよびキナーゼ活性の転写活性化因子による調節を中心に研究を進め、TFIIDのヘリカーゼの転写活性化での役割を明らかにした。TFIIDに含まれる2つのヘリカーゼ (ERCC3 および ERCC2) の変異により色素性乾皮症, Cockayne 症候群, TTD 等の疾患が引き起こされる。これらの疾患では DNA の修復異常と共に転写異常がみとめられるが、その分子メカニズムを TFIID の変異体を用いることによって明らかにした。当研究の結果、TFIIDは転写活性化の際、ERCC3ヘリカーゼを介して promoter escape を促進することが明らかとなった。また、PC4はアクチベーターのない基本転写では転写のレプレッサーとしても作用するが、この活性と TFIID が拮抗することが知られていた。TFIIDの変異体を用いた解析より、TFIIDのヘリカーゼ活性がPC4の転写抑制活性と拮抗することが明らかとなった。このことより、PC4の転写抑制機構に新しいモデルを提唱することが出来た。一方、アクチベーター存在下ではPC4は強力なコアクチベーターとして作用するが、このメカニズムを *in vitro* 転写系を用いて解析した。PC4は転写活性化の際に PIC (preinitiation complex) の形成を促進するのみならず、promoter escape でも作用することを明確にした。この過程でも PIC 形成と同様に TFIIA と TAFs が必要である。アクチベーターの数を少なくすると転写活性化は著しく減少するが、このときには PIC の形成は促進されておらず、promoter escape のみが転写活性化のターゲットとなる。また、アクチベーターが協調性を示すのは、PIC 形成と promoter escape を同時に促進するためであることが分かった。PC4は TFIID と相互作用し、PC4のコアクチベータードメインと一致し、この相互作用が重要であることが示された。またPC4と TFIID の相互作用はアクチベーターの相互作用と異なり、PC4のリン酸化では消失せずむしろ強まることが示された。以上の結果より、転写の制御には TFIID の ERCC3 が重要な働きをして

*埼玉医科大学分子生物学教室

いることが明らかとなり、この遺伝子の変異で引き起こされる色素性乾皮症, Cockayne 症候群, TTD 等の疾患で見られる転写の異常は promoter escape での転写制御の異常が関与していることが示唆された。

GAL4-VP16 の *in vitro* 転写活性化系はモデル系としては優れているが、GAL4-VP16は人工的なアクチベーターであるため生体内で起こる転写制御の解析には必ずしも最適とは言えない。そこでこの系を発展させ、より生理的現象に直結する転写制御を解析し、病態に關与する因子を同定するために、c-fos 遺伝子のエンハンサー・プロモーターに G-less cassette をつなぎ簡単に *in vitro* 転写が行いうる鋳型 DNA を作製した。また c-fos に作用する転写因子群 (ATF1, SRF, Elk-1, CREB) の cDNA を用いてそれらの転写因子を全てバキュロウイルス発現系にて大量発現・精製した。DNase I footprint および gel shift アッセイにより、ATF1, SRF, Elk-1, CREB は MAP kinase によるリン酸化とは無関係に DNA に結合することを明らかにした。ATF1, SRF, Elk-1, CREB を c-fos 遺伝子の非クロマチン鋳型の転写系にてアッセイすると、これらの因子の転写活性化能には MAP kinase によるリン酸化が必須であることが示された。またこれらの因子は単独では転写活性化能が低いが、同時に c-fos のエンハンサーに結合すると協調的に作用し c-fos 遺伝子の転写を強く活性化する。さらに、この活性化にはコアクチベーターが3種類必要であることを見いだした。そのうちの2つは p300/CBP と Mediator 複合体であるが、もう一つは新規のコアクチベーターで、RNA 結合タンパク質 NF90/NF45 を含む複合体であり、c-fos 遺伝子に特異的に働き、主に Elk-1/SRF の転写活性を上げる。既に他の研究により NF90/NF45 は PKR によって制御されることが分かっており、当研究の結果とあわせると、PKR から NF90/NF45 を介して c-fos に至る新たなシグナル伝達系があることが明らかとなった。従来より、幾つかの病態で PKR の活性化と c-fos の転写上昇が報告されていた。例えば、Alzheimer 病や Huntington 病などの神

経変性疾患では neuron 内で PKR の活性化が何らかの形で関与しているのみならず, c-fos の発現が上昇していることが分かっている. NF90/NF45 は PKR から c-fos へのシグナル伝達に関与することによって, これらの病態に深く関与していると思われる.

さらに, クロマチンの構造変化による転写制御機構の解析を行うために, *in vitro* で c-fos 遺伝子上にクロマチンを再構成する系を立ち上げた. この系を用いて core histone の修飾による c-fos の転写制御を調べるために, core histone を大腸菌で発現させて組換え

体のクロマチンを再構成する系を開発した. さらに, histone のアミノ末端 tail のアセチル化, リン酸化, メチル化の部位に変異を入れ, これらの修飾が起きない histone も作製している. 現在, c-fos を活性化するキナーゼがどの因子のどの残基に作用し, いかにして c-fos の転写を活性化するのかを解析しており, preliminary な結果としてクロマチンにした c-fos 遺伝子上では MAP kinase は ATF1, SRF, Elk-1, CREB をリン酸化するだけでは転写活性化はできず, クロマチンを修飾することが必要である結果を得ている.