

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		NOJIMA HIROSHI					
①研究代表者 氏名		野島 博		②所属研究機 関・部局・職 大阪大学・微生物病研究所・教授			
③研究 課題 名	和文	極微量重差分化法の開発と応用					
	英文	Development and application of nano-subtraction technique					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		27,700	13,800	13,800	13,800	13,800	82,900
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
野島 博		大阪大学・微生物病研究所・教授		分子生物学		分子生物学的諸実験 cDNA ライブラリー作製	
藪田 紀一		大阪大学・微生物病研究所・助手		細胞生物学		分子生物学的諸実験	
奥崎 大介		大阪大学・微生物病研究所・助手		生化学		細胞生物学的諸実験	
東岸 任弘		大阪大学・微生物病研究所・助手		分子遺伝学		分子遺伝学的諸実験	
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>本研究計画の目的は、この技術を基盤として以下の3つについて集中的に研究を行うことにある。</p> <p>① 重差分化法を1個の細胞を対象とした極微量試料を扱う至難な技術（極微量重差分化法）として洗練的に開発すること。PCR増幅を行わない点で特色ある技術にする。単なる技術の改善ではこのような至難の技は完成できないので、幾つかの革新的なノウハウの蓄積が要求されるであろう。科学研究費が交付される期間内のうち最初の3年でまず微量重差分化法として開発する。具体的には現在の1億個の細胞を出発点としたレベルから100個程度の細胞を出発点としたレベルにまで微量にする。最後の2年で極微量重差分化法として一個の細胞を対象にして経時的に転写誘導されてゆくmRNAを全てクローニングすることができるレベルにまで技術を高めて完成とする。</p> <p>② 重差分化法によって単離してきた遺伝子群の機能解析によって、この技術の有用性を証明してゆく。具体的にはこれまでに重差分化法によってクローニングしてきた分裂酵母の減数分裂を制御する <i>meu</i> 遺伝子群の機能解析、細胞周期チェックポイントを制御する遺伝子群（とくに <i>Lats2</i>, <i>Cyclin G</i>, <i>PP2A</i>）、癌の転移・悪性を制御する遺伝子群(<i>Connexin 26</i>, <i>MLZE</i>)などについて機能解析を進める。科学研究費が交付される期間内には各遺伝子について生理的意義の大筋を明らかにする。</p> <p>③ ゲノム情報を活用して極微量重差分化法の応用範囲を拡充する。拡充の対象として血液細胞に異常が現れる疾患を選び、これらに罹患している患者を対象として患者血液細胞特異的に発現される発現特化型 cDNA を重差分化法によって網羅的に単離する。科学研究費が交付される期間内にこれらを cDNA マイクロアレイとして貼り付けて、患者の病態と関連するハイブリダイゼーションパターンのデータ化を推進することで新たな血液診断システムの構築を図る。さらには、網羅的に単離された患者血液細胞発現特化型 cDNA のうちヒト全ゲノム塩基配列とは一致しない塩基配列（すなわち外来遺伝子由来）をコンピューターにより検索することで患者ゲノムに潜む未知の感染症遺伝子を直接クローニングする方法論を科学研究費が交付される期間内に完成する。</p>							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

(1) 微量および極微量重差分化法の開発：

これまでに、予定通り微量重差分化法としての技術開発には成功してきた（未発表）。特許はまだ提出していないので、詳細の記述は避けたいが、これまで目指してきたのは DNA ポリメラーゼを用いて両方の DNA 鎖を反復合成することで、増幅の際に量の偏りが生じる PCR を用いずに極微量の mRNA から cDNA ライブラリーを作成すること、および効率よい段階的なサブトラクションを行うことである。計画していた予備実験と最適化条件設定は順調に進めることができ、約数百個の細胞を用いたテストは成功した。技術開発を進めていった過程で、とくに時間がかかったのは T7RNA ポリメラーゼを使った増幅の最適化条件を決める実験と、この条件下で増幅した mRNA の最適なデオキシ化の条件設定であった。途中、予想外の技術的に困難な点が生じたが、幸いにしてこれをクリアでき、これらについて最適条件を設定できた。このデータを基盤として、今後 1 年くらいをかけて 1 - 10 個程度の細胞由来の RNA を用いた cDNA ライブラリー作製の最適化条件を系統的に条件を振って見出すとともに、こうして作った cDNA ライブラリーを T7RNA ポリメラーゼで調製した mRNA を用いて段階的サブトラクションに用いるときの最適化条件を探る予定である。

(2) すでに単離した遺伝子群の機能解析の展開：

- 2-① 分裂酵母の系：分裂酵母の減数分裂過程で特異的に転写誘導される遺伝子群を段階的サブトラクション法によって包括的に単離してきた 32 種類の *meu+* 遺伝子群とともに、ゲノム塩基配列より得たコイルドコイル蛋白質をコードする 7 種類の *mcp* 遺伝子群の機能解析を進めた(EMBO J, 2001, EMBO J., 2002)。一方、減数分裂チェックポイント制御を担うリン酸化カスケードを決定した。さらに、多種類のポリAを持つ非翻訳性RNA (pncRNA)を世界に先駆けて見出し、減数分裂の制御に注目してそれらの機能解析を行ってきた。その過程で、アンチセンス側で転写されている *pr1+* 遺伝子群、多重転写されている *eta2+* 遺伝子、サイズと発現時期が異なった 3 種類の転写産物が発現している Overlapped RNA など、珍しい現象を続々と発見してきた。現在、それらの制御機構を解析している。
- 2-② マウス精子形成も実験系：我々は段階的サブトラクション法によってマウス精子形成で特異的発現遺伝子群を 80 種類クローンした(EMBO Rep., 2002)。その半数は新規な遺伝子であった。そのひとつである *TISP40* がコードする bZip 型転写制御因子である Tisp40 は膜貫通領域から 20 アミノ酸 C 末端側に RXXL という S1P 認識配列が、膜貫通領域内には S2P 認識配列を持ち、Rip 経路を介して核内移行し、CREM の阻害と新たな転写標的の転写誘導を行うという興味深い性質を持つことを見出した。
- 2-③ Cx26 を標的としてオレアミド類（オレイン酸の類縁体）を出発物質とした新しいタイプの抗癌転移薬の開発に成功した。中でも MI-18, MI-22 と名づけた物質はマウス・メラノーマ BL6 という極めて高い転移性を示す癌においてさえ対象の 15% までも自然転移を抑制した。さらにヌードマウスにうえたヒトの胃癌細胞の増殖を阻害したことから、微小な転移癌の増殖を阻害することで自然転移を抑制していることが示唆された。興味深いことに、MI-18, MI-22 は組織培養条件下では細胞増殖を阻害せず、マウスに二ヶ月間腹腔内投与しても毒性はない。個体に生じた癌の増殖のみ阻害するという新種の抗癌剤である。
- 2-④ 細胞周期チェックポイント因子(Cyclin G, PP2A)について、機能解析を進めてきた。段階的サブトラクション法によって我々が初めて単離した癌抑制遺伝子 *LATS2* のノックアウトマウスを作製して、その表現型を観察してきた。類似な *LATS1* のノックアウトマウス作製も順調に進んでいるので今年度中に表現型の解析を終了したい。この他、Cyclin G, Lats1, Lat2 のモノクローナル抗体作製にも成功したので、これらを用いて分子細胞生物学的な実験を進めている。

(3) ゲノム情報を活用した極微量重差分化法の応用範囲を拡充：

段階的サブトラクション法により血液細胞特異的に発現している遺伝子群（発現特化型 PREB cDNA）を包括的に単離し、それらを貼り付けたマイクロアレイを作成することでタカラバイオ（株）による商品化に成功した（技術移転）。一方、慢性リウマチ、自己免疫性血小板減少性紫斑病(ITP)、全身性エリテマトーデス(SLE)、血管炎(Angiitis)という 4 種類の自己免疫疾患の患者（総勢 200 名以上）からインフォームド・コンセントをとったうえで血液を採取し、患者血液細胞が特異的に発現誘導されている遺伝子群（150 種類以上）を包括的に単離した。それらの約半数は新規遺伝子であり、さらに何種類かの遺伝子は全ての自己免疫疾患に共通に転写誘導されていた。そのうち *AILE1* と名づけた新規遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成したところある種の自己免疫疾患特有の症状を示した。現在、より詳細な解析を進めている。一方、数%は EST クローンが見当たらず、イントロンなど遺伝子が同定されていない領域にマップされた。これらはポリ A を持つ非翻訳性 RNA (pncRNA) である可能性が高い。さらに興味深いことに、ヒトの遺伝子ではない cDNA が幾つか単離されたことである。これらは自己免疫疾患特有の感染体由来である可能性が高いため、現在、解析中である。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

(1) 極微量重差分化法の開発 :

重差分化法を 1 個の細胞を対象とした極微量試料を扱う至難な技術 (極微量重差分化法) の開発は着実に進んでおり、 mRNA 増幅技術部分のみの特許を申請準備中である。これが完成すれば、たとえば増殖しない神経細胞や再生過程にある幹細胞について 1 個の細胞における遺伝子転写の動態が解析できるという点で、幅広い分野において大きなインパクトを与えると確信する。

(2) 新規なポリ A を持つ非翻訳性 RNA (pncRNA) の世界に先駆けた発見 :

本研究において我々は分裂酵母において 68 種類の non-coding RNA を見出し報告した (DNA Res, 2002)。この結果はしばらくの間英国サンガーセンターのゲノムプロジェクトのホームページの表紙において注目すべき論文として掲示されていた。その後、マウスの網羅的 cDNA 塩基配列決定プロジェクトにより、クローン化された 6 万種類以上の cDNA のうち、1 万 6 千種類は蛋白質をコードしない機能性 RNA である可能性が高いという報告がでて、我々の結果が分裂酵母に限らず、哺乳動物でも正しいことが証明された。分裂酵母の pncRNA の一つを解析していく過程で、減数分裂期にサイズと発現時期が異なった 3 種類の転写産物がオーバーラップして発現している約 5kb のゲノム領域を見出した。興味深いことにノーザン解析から、短いアンチセンス RNA が発現されはじめると同時に 3kb の mRNA バンドが急激に消失されることが分かった。この事実は、短いアンチセンス RNA が miRNA の前駆体として発現され、miRNA を生み出すことで RNA 干渉を起し、3kb の mRNA を分解している可能性が示唆される。このことは減数分裂における減数分裂特異的な転写の調節がアンチセンスな siRNA を介した RNA 干渉によって制御されているという新しい現象の発見につながるかもしれない。

(3) 自己免疫疾患の発症と関わるかもしれない新規なポリ A を持つ非翻訳性 RNA (pncRNA) の発見 :

我々が対象としている自己免疫疾患はどれも全く原因の分からない難治疾患である。これまでに単離してきた 150 種類以上の各種自己免疫疾患の患者血液細胞において特異的に転写誘導されている遺伝子の染色体上の配座を調べたところ、約半数はポリ A を持つ非翻訳性 RNA (pncRNA) である可能性が高くなった。現在、個々の pncRNA についてリアルタイム PCR によって個々の患者における特異性なのか、自己免疫疾患患者共通に転写誘導されているのかを調べつつある。

(4) 安全な抗癌転移抗癌薬の開発 :

我々が発見した新規なオレアミド類縁体は元来が食用オリーブ油などに多く含まれるオレイン酸の類縁体であるため安全性が高いことは予想していた。そして事実、きわめて安全であるにも関わらず、マウスに移植した転移の激しさで有名な癌細胞であるマウス・メラノーマ BL6 の自然転移と増殖を強力に阻害した。これまで数多くの抗癌転移薬の開発が手がけられてきたが、ほぼすべてにおいて実験転移という癌細胞の尾静脈注射による転移のテストに限られていた。これではヒトの癌転移を反映しないと考えた我々は最初から自然転移にこだわって、その原因遺伝子を段階的サブトラクション法を応用して単離し、コネキシン 26 の過剰発現が自然転移の原因であることを突き止めた (J.Clin.Invt., 2000; EMBO J., 2000)。そしてコネキシン 26 の特異的な阻害剤として新規なオレアミド類縁体を発見したのである (Carcinogenesis, 2004)。この発見はきわめて独創的であり、新しいタイプの抗癌薬の開発の流れを作る発見であると信ずる。

(5) 自己免疫疾患特異的なヒト由来でない (感染体由来) 遺伝子の発見 :

段階的サブトラクション法で包括的に単離してきた自己免疫疾患の患者血液細胞特異的な遺伝子の中にヒトのゲノムの無い、おそらく感染体由来の遺伝子を幾つか発見した。詳細な解析は進行中だが、自己免疫疾患の原因として感染体の関与は古くから予想されていることでもあり、この発見は病気の原因解明という実用性のみでなく、学問的・学術的にも当該分野に大きなインパクトを与えるであろう。

(6) 新しい血液 RNA 診断システムの構築 :

この提案は世界で初めて唯一の極めて独創的であり、幅広い分野に大きなインパクトを与えると信ずる。これまでに、約 300 種類の PREB をクローニングすることに成功した。この成果は特許化するとともに、タカラバイオ (株) に事業移転して「健康診断用 PREB-DNA チップ」として商品化することに成功したことは特筆に値しよう。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付けてください。)

英文原著論文：

- (1) Nojima, H.; Protein kinases and their downstream targets that regulate chromosome stability. In GENOME DYNAMICS, Karger Publishers, 2005, in press.
- (2) Yue, L., Daikoku, T., Hou, X., Li, M., Wang, H., Nojima, H., Dey, A.K., Das, S.K.: Progesterone regulated cell-specific expression of G-type cyclins becomes aberrant in the periimplantation mouse uterus missing Hoxa-10 Endocrinology, 146(5):2424-2433, 2005.
- (3) Gigena, M.S., Ito, A., Nojima, H., Rogers, T.: A B56 regulatory subunit of protein phosphatase 2A localizes to nuclear speckles in cardiac myocytes. Am. J. Physiol., 289(1):H285-94, 2005.
- (4) Nagamori, I., Yabuta, N., Fujii, T., Tanaka, H., Yomogida, K., Nishimune, Y. and Nojima, H.: Use Tisp40, a spermatid specific CREM-like transcription factor, functions through unfolded protein response element via Rip pathway. Genes Cells, 10(6):575-94, 2005.
- (5) Saito, T.T., Tougan, T. Okuzaki, D., Kasama, T. and Nojima, H.: Mcp6, a meiosis-specific coiled-coil protein of *Schizosaccharomyces pombe*, localizes at the spindle pole body and is required for horsetail movement and recombination. J. Cell Sci. 118(2):447-459, 2005.
- (6) Nojima, H.: G1 and S-phase checkpoints, chromosome instability, and cancer. In Methods in Molecular Biology, Checkpoint Controls and Cancer - Methods and Protocols. Humana Press, pp.3-49, 2004.
- (7) Toji, S., Yabuta, N., Kobayashi, T., Tamai, K. and Nojima, H.: The centrosome protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. Genes Cells, 9: 383-397, 2004.
- (8) Ito, A., Morita, N., Miura, D., Koma, Y.I., Kataoka T.R., Yamasaki, H., Kitamura, Y., Kita, Y. and Nojima, H. A derivative of oleamide potently inhibits the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells. Carcinogenesis, 25(10):2015-2022, 2004.
- (9) Saito, T.T., Tougan, T. Kasama, T., Okuzaki, D. and Nojima, H.: Mcp7, a meiosis-specific coiled-coil protein of fission yeast, associates with Meu13 and is required for meiotic recombination. Nuc. Acids Res., 32(11):3325-3339, 2004.
- (10) Okuzaki, D., Satake, W., Hirata, A. and Nojima, H.: Fission Yeast *meu14⁺* is required for proper nuclear division and accurate formation of forespore membrane during meiosis II. J. Cell. Sci., 116(13): 2721-2731, 2003.
- (11) Ito, A., Koma, Y., Watabe, K., Nagano, T., Endo, Y., Nojima, H., and Kitamura, Y.: A truncated isoform of the PP2A B56gamma regulatory subunit may promote genetic instability and cause tumor progression. Am. J. Pathol. 162(1): 81-91, 2003.
- (12) Ito, A., Koma, Y., Sohda, M., Watabe, K., Nagano, T., Misumi, Y., Nojima, H., and Kitamura, Y.: Localization of the PP2A B56gamma regulatory subunit to the Golgi complex: possible role in vesicle transport and migration. Am. J. Pathol. 162(2):479-489, 2003.

- (13) Ito, A., Jippo, T., Wakayama, T., Morii, E., Koma, Y.I., Onda, H., Nojima, H., Iseki, S., Kitamura, Y.: SgIGSF: a new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regulated by MITF. *Blood*, 101(4), 2601-2608, 2003.
- (14) Okuzaki, D., Watanabe, T., Tanaka, S. and., Nojima, H.: The *Saccharomyces cerevisiae* bud-neck proteins Kcc4 and Gin4 have distinct but partially-overlapping cellular functions. *Genes Genet. Sys.*, 78(2): 113-126, 2003.
- (15) Yabuta, N., Kajimura, N., Mayanagi, K., Sato, M., Gotow, T., Uchiyama, Y., Ishimi, Y., and Nojima, H. Mammalian Mcm2/4/6/7 complex forms a toroidal structure. *Genes Cells*, 8(5), 413-421, 2003.
- (16) Kakihara, Y., Nabeshima, K., Hirata, A. and Nojima, H.: Overlapping *omt1⁺* and *omt2⁺* genes are required for spore wall maturation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells*, 8(6): 547-558, 2003.

(A) 国際学会発表(招待講演) :

- (1) Hiroshi Nojima,
Blood RNA diagnosis for autoimmune diseases. 3rd International Symposium for Gene Therapy; Drug discovery for gene therapy” January 28, 2005. Osaka.
- (2) Hiroshi Nojima,
Development of Blood RNA diagnosis system for autoimmune diseases.
International Symposium on Therapeutic Strategy to the Best Advantage of Collaboration between basic Research and Clinical Research. February 8, 2005. Tokyo.
- (3) Hiroshi Nojima,
Meiosis recombination checkpoint of fission yeast. At XIX International Congress of Genetics (Melbourne). July 7th, 2003
- (4) Hiroshi Nojima, Daisuke Okuzaki, Takamune T. Saito, Takashi Kasama, Ayami Ohtaka, and Takahiro Tougan. Meiotic phosphorylation cascade mediated by Mek1 kinase in fission yeast. At POMBE 2004 (3rd International conference on fission yeast), San Diego, August 25th, 2004.
- (5) Hiroshi Nojima, Nobuyoshi Morita, Yusuke Ohba, Akihiko Ito and Yasuyuki Kita
Novel derivatives of oleamide potently inhibits the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells. The 34th International Symposium of “The Princess Takamatsu Cancer Research Fund”. November 16, 2004; Tokyo.

(B) 関連特許 :

- (1) 末梢血液細胞に示差的に発現されている遺伝子群、およびそれを用いた診断方法とアッセイ方法 (特願 2003-319066)
【発明者】野島博、【出願者】野島博、(株) ジーンデザイン、科学技術振興機構
【出願日】2003年(平成15年)9月10日
【国際特許出願日】2004年(平成16年)9月9日
米欧19ヶ国出願(国際出願番号 PCT/JP04/*****)
- (2) コネキシン26阻害活性を有する二量体型オレアミド誘導体と、その癌治療等への応用 (特願 2004-319630) 阪大番号: 20040074、【発明者】野島博、北泰行
【出願者】科学技術振興機構、【出願日】2004年(平成16年)11月2日
- (3) 全身性エリテマトーデス患者血液細胞で発現亢進している遺伝子群、およびその利用 (特願 2004-289398) 【発明者】野島博、恩田弘明、佐伯行彦、大島至郎
【出願者】科学技術振興機構、【出願日】2004年(平成16年)9月10日

(D) 達成した商品化

- (1) PREB-DNA チップ発売；タカラバイオ（株）平成16年8月30日
- (2) コネキシン26阻害活性を有するMI-22；和光純薬（株）平成17年中発売予定

(E) 関連新聞記事(見出し)：

- (1) 2004年11月15日：日刊工業新聞：マウスの皮膚がん細胞。転移を強力に抑制。阪大：副作用少ない薬剤開発。
- (2) 2004年9月27日：日刊工業新聞：血中RNAで病気診断。タカラバイオがチップ発売
- (3) 2004年1月9日：日刊工業新聞：芽はぐくむ研究室、血液健康診断用チップ開発
- (4) 2003年11月6日：日本経済新聞：血液RNAで疾病検査、チップ来年発売
- (5) 2003年（平成15年）5月5日：毎日新聞：東洋紡、遺伝子検査チップ開発、10月にも試験販売、血液関係の病気診断