札幌医学雑誌　84（1 － 6）1 ～ 5（2015）　doi：10.15114 / smj.84.1

総説

札幌医科大学における 38 年間の研究について

山 下 利 春
札幌医科大学医学部皮膚科学講座

Reflections on 38 years of research at Sapporo Medical University

Toshiharu YAMASHITA
Department of Dermatology, Sapporo Medical University School of Medicine

ABSTRACT

During my first 20 years at Sapporo Medical University, I was engaged primarily with tumor virology research in the Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute. In the subsequent 18 years, my focus has been on research of melanocytes and melanoma in the Department of Dermatology. I have been involved in many research fields including transforming genes of human adenoviruses and human papillomaviruses (HPVs), tumor suppressor genes, adenovirus vectors, melanin biosynthesis, molecular biology of melanoma, topical treatment of skin cancer, skin-whitening agent and reactive oxygen species (ROS) and diagnosis of xeroderma pigmentosum. In this present report, I describe several research projects with which I struggled until publications. These include expression of adenovirus transforming genes, structure and function of HPV16 E6E7 genes, construction of recombinant adenoviruses, depigmentation induced by cosmetics and diagnosis of complementation groups of xeroderma pigmentosum through the use of adenovirus vectors. It is my sincere hope that this manuscript will be able to provide some semblance of assistance and encouragement to young doctors and medical students.

(Accepted November 19, 2015)

Key words: human adenovirus, human papillomavirus, tumor suppressor genes, melanoma, melanin, recombinant adenovirus

1. はじめに

札幌医学雑誌編集主幹の三高俊広教授より「これまで指導されて来た研究について学生にも分かりやすい内容で紹介してください」と依頼された．大学卒業後，癌研究所分子生物学部門（現フロンティア医学研究所ゲノム医学部門）で 20 年間，医学部皮膚科学講座で 18 年間研究を続けられたのは極めて幸運であった．研究生活が長く，また 2 つの教室に在籍したため，研究内容は多岐に渡るが，そのうち苦労してパブリケーションまで漕ぎ着けた研究を中心に，いくつかの研究プロジェクトを分かり易くまとめたい．一研究者の苦労話が学生と若い研究者のある種の励ましになれば幸いである．

2. 癌研究所分子生物学部門

2.1. ノーザンブロットハイブダイゼーション

現在，遺伝子発現の解析にノーザンブロットハイブダイゼーションが使われることは少なくなり，real-time PCR が取って代わっている．しかし，細胞内で発現している特定の遺伝子の転写産物（mRNA）のサイズと発現量が一目で分かるノーザンブロットハイブダイゼーションが廃れることはないであろう．

大学卒業後，癌研究所分子生物学部門の大学院生となったが，教室に入って間もなく，藤永教授よりアデノウイルス 31 型による細胞のトランスホーメーション，学位論文としてアデノウイルスでトランスホームしたラット細胞の染色体解析を研究するよう指示された．既に教室の澤田幸治先生（当時）がアデノウイルス 31 型のトランスホーム遺伝子を同定されていたので[1]，その次の実験として，トランスフォーム細胞中で発現する E1A，E1B mRNA を検出する実験結果が求められていた．すなわち，ノーザンブロットハイブダイゼーションを成功させる必要があった．しかし，当時，この手技は教室あるいは道内では行われておらず困っていたところ，教室の関川賢二先生（当時）が，

英語論文から書き起こした実験プロトコールを渡してくれた. 関川プロトコールに従って, 注意深くアガロースゲルを作り，フィルターにブロッテイングし，^{32}P で標識したウイルス DNA とハイブリダイゼーションを行ない，X 線フィルムに合わせてディープフリーザーに 5 日間静置した．ホルムアルデヒドを加えたアガロースゲルは崩れやすく，泳動ガラス板からゲルを丁寧に剥がし，ブロッテイングスポンジの上に乗せる操作が最も難しかった．当時，癌研の 4 階に暗室があり，X 線フィルムはそこで現像していた．現像液の中から浮かび上がって来た太いバンドを見た時，確かな研究成果が得られた事を直感した．この結果を藤永教授に見せたところ，ひとこと「論文にするか」と仰ってくれた[2]．この経験から，論文のポイントは 1 つであること，そして，論文の “Materials and methods” に従えば同一の結果が得られることを実感した．

2.2. HPVの癌遺伝子の構造と発現

1989 年 NIH から帰国した当時，子宮頚癌の原因として HPV が注目されていた．HPV の *E6*，*E7* 遺伝子の構造，発現，機能と HPV E6 が結合不活化する p53 の研究プロジェクトをいくつか開始した．それらのうち，いくつかの研究は成功し[3-5]，いくつかの研究は他の研究グループに先を越された[6,7]．具体的な研究プロジェクトについて述べたい．研究者人口の限られていた皮膚型 HPV に関しては，HPV5 型と 8 型の E7 蛋白質が RB 蛋白質と結合し，初代ラット細胞を不死化出来ることを初めて報告した[3,4]．また，新しい方法で変異を導入した p53 機能の研究もほぼそのままの形で投稿論文にアクセプトされた[5]．一方，当時は優れた思いつきと考えた HPV16 E6E7 の発現と機能の研究は，結果的に複数の研究グループとの競争になった．

HPV16 の E6E7 領域から，それぞれ E6，E7 の 2 つ蛋白質をコードする 2 種類の E6E7 mRNA（E6*I/E7, E6*II/E7）が転写される（図 1）．ウイルス癌遺伝子産物である E7 発現に，これら mRNA のどちらが重要であるか興味がもたれた．この研究は，藤永教授と相談し，北大産婦人科の山田　俊大学院生（当時）の研究テーマとなった．まず, 1 コピーの HPV16 DNA を細胞 DNA に組み込んでいる子宮頚癌細胞株 SiHa より RNA を精製し，2 種類の cDNA，E6*I/E7，E6*II/E7 をそれぞれ合成し，発現ベクターにクローニングした．比較のために，スプライス部位を変換した変異 E6E7 cDNA も合成した．これら組み換えプラスミドからの E7 発現をウェスタンブロッテイングで，不死化活性を H-*ras* 共同トランスフォーメーション活性により検討した．その結果，E6*I/E7 mRNA を転写する 1 つのスプライト部位が E7 発現に重要である事が明らかになった[7]．しかし, 1991 年, シアトルで開催されたパピローマウイルスワークショップで，我々の演題を含めて殆ど同じ内容の研究が 3 題発表され，口演に採択された演題は早々と J Virol に掲載されてしまった[8]．一方，我々の研究はかなり難産で，アクセプトまでさらに数年を要した[7]．

2.3. 組み換えアデノウイルスの作製

1995 年，第四内科学講座（新津洋司郎教授）からアルバートアインシュタイン医科大学に留学していた高橋　稔先生が帰国され，新津洋司郎教授（当時）と藤永教授の取り計らいで，癌研 4 階のセミナー室で髙橋先生の研究報告を聞くことが出来た．研究に行き詰まり新しい方法論を模索していた当時の私にとって，高

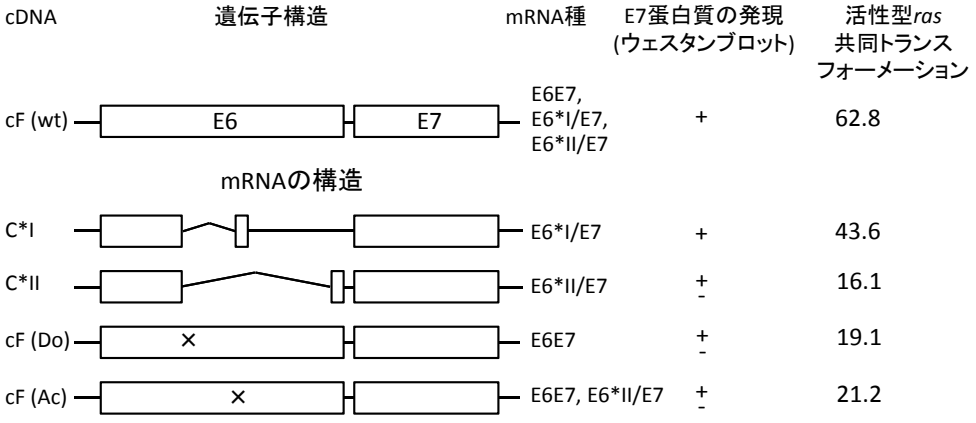

図 1. HPV16 E6E7 cDNA の構造，mRNA，および発現する E7 蛋白質の解析.
E7 蛋白質の発現は Western blot と *ras* 共同トランスフォーメーションで検討した.
ボックスはコード領域，^ はイントロン，X は変異を導入したスプライス部位.
トランスフォーメーションはトランスフォーメーションコロニー /G418 耐性コロニー (%)で比較した.
Yamada T et al: Virus Genes 10:15-25, 1995.

橋　稔先生の話は渡りに船であった．早速，髙橋先生から組み換えアデノウイルスの作製方法を教えていただき，工夫を重ねて自分なりに，かなり緻密な組み替えアデノウイルスの作製法，プラーク形成単位（pfu）の測定法を確立した．組み換えアデノウイルスを用いた最初の論文は，アデノウイルス 5 型 E4 遺伝子の機能に関する論文であった[9]．この実験技術のお陰で，東京大学免疫学教室[10]，札幌医大第四内科学講座[11]，癌研究所（フロンティア医学研究所）ゲノム医科学部門[12-17]，NIH[18, 19] と，多くの優れた共同研究に参加させて頂き，共同研究者に加えて貰うことができた．

3. 皮膚科学講座

3.1. メラニン合成蛋白質の細胞内輸送と細胞内機能

皮膚科学講座の神保孝一教授（現名誉教授）のご厚情により，1999 年 4 月より癌研究所分子生物学部門から医学部皮膚科学講座に移る事ができた．早速役に立ったのは，メラニン合成酵素であるチロシナーゼ，チロシナーゼ関連蛋白質（TYRP-1，TYRP-2）を発現する組み換えアデノウイルスの作製であった．これら組み換えアデノウイルスを使用して，TYRP の小胞体輸送に Rab7 が関係すること（廣崎邦紀先生の学位論文），TYRP 蛋白質がチロシナーゼによる細胞毒性を抑制すること（Hejamazin Hejazy Rad 先生の学位論文）が見出された[20, 21]．

3.2. ロドデノール誘発性脱色素斑の研究

神保先生の厚生労働省の研究班「メラノーマ標的ナノ微粒子（NPrCAP/ML）によるメラノーマ温熱免疫療法の開発（H17ナノ-004）に関する研究」の班員にして頂き，第一病理学講座の佐藤昇志教授（当時），田村保明先生（当時）とともに，筱井泰江大学院生（現助教）による B16F1 マウスメラノーマ腫瘍の細胞死誘導と免疫学的解析の研究を指導した[20]．このときの実験が，2013 年末以降のカネボウ化粧品による白斑（ロドデノール誘発性脱色素斑）の病態解明に役立った．

カネボウ化粧品に含まれるメラニン合成抑制物質 4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール（一般名 rhododendrol，商品名ロドデノール）により，使用部位を中心に白斑が多発する事が判明し，2013 年 7 月に化粧品会社による自主回収が発表された．当科には 160 名以上の患者が受診し，2 年以上経過した 2015 年 10 月現在でも，未だ 50 名以上の患者さんが外来加療を続けている．ロドデノール誘発性脱色素斑は，化粧品を使用する顔面，頸部～項部，手背～前腕に生ずる完全あるいは不完全脱色素斑である．完全脱色素斑部を生検しメラノサイト特異的な免疫染色を行うと，メラノサイトが完全に消失している症例がみられる．メラノサイトの消失は，化粧品会社の提示したチロシナーゼ競合阻害説（一時的なメラニン合成阻害）では説明が付かず，ロドデノールがメラノサイトを傷害する何らかの病態が推測された．そこで，各種のヒトメラノサイト，メラノーマ細胞を用いて，細胞障害性，メラニン合成阻害，細胞周期，活性酸素（ROS）産生について解析を始めた．しかし，早くから研究を始めていた他の研究グループが，チロシナーゼを高発現するメラノサイトがロドデノールによる細胞傷害を受けやすいことを報告した[22]．我々はかなり遅れて研究を開始したが，藤田保健衛生大学の伊藤祥輔先生（名誉教授）若松一雅教授との共同研究によって，ロドデノールがチロシナーゼの基質になり細胞毒性を持つ代謝産物を産生すること[23-25]，ロドデノール代謝産物がロドデノールよりも強力な細胞傷害活性を示すこと[26] を明らかにすることが出来た．これらの結果から，ロドデノールによる白斑は，当初推測されてきた競合阻害によるメラニン合成抑制によるものではなく，ロドデノールがチロシナーゼ代謝産物を通じて細胞障害を起こす病態によることが明らかとなった（図 2）．

3.3. アデノウイルスベクターによる色素性乾皮症の相補群診断

色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum：XP）は，1987年にMoriz Kaposiが患者 4 例を記載したのが最初であるが，その後，1968 年に Cleaver が XP 細胞のヌクレオチド除去修復の欠損を報告し，1975 年には Kraemer が A～G 群に分類した．DNA トランスフェクションによって *XPA* 遺伝子がクローニングされたのは 1999 年で，これが *XP* 遺伝子の最初の同定となった[27]．日本には，XP-A 群とバリアント群（XP-V，DNA polymerase eta（pol η 機能の欠損）が多いが，その他の群も散見される．XP は光線過敏症症候群の代表であり，露光部に皮膚癌が多発することが知られている．このため，早期診断（相補群診断および遺伝子診断）と徹底した遮光（遺伝相談と生活指導）が極めて重要である．

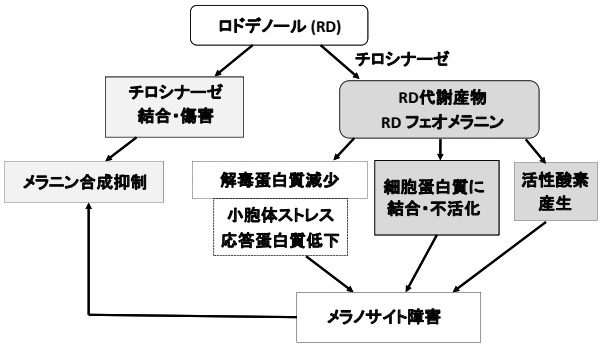

図 2. ロドデノールによる細胞障害のメカニズム

XP は乳児期の光線過敏症により疑われ，皮膚科で診断される事が多いが，正確な相補群診断と遺伝子診断のできる施設は限られている．現在，XP の診断は，細胞融合法あるいは“host cell reactivation assay”と呼ばれる XP プラスミドとリポータープラスミドによる *in vitro* アッセイにより診断される[28, 29]．しかし，紫外線感受性の低い XP-E 群と pol η 機能の欠損する XP-V 群の診断は困難である．

我々は 8 群の XP cDNA をそれぞれクローニングし，これらを高発現する組み換えアデノウイルスを作製した．各群由来の XP 細胞に，これら組み換えアデノウイルスを感染させ，紫外線 C（UVC）を照射すると，XP-A，-B，-C，-D，-F，-G 群由来細胞は，それぞれ対応するXPを発現するアデノウイルスによってのみ相補され，容易に鑑別する事が出来た．残された課題は XPE と XP-V の鑑別診断である．XPE（DDB2）と結合し，ユビキチンリガーゼ活性を獲得する DDB1 cDNA をクローニングし，XPE と同時に XPE 細胞に導入し強発現させたが，XPE 細胞の UVC 抵抗性は促進されなかった．いくつかの共発現を試みた結果，XPE と XPA を同時発現させると，XPE の UVC 抵抗性が促進される事が明らかとなった．ほかの XP 群細胞では，XPA 発現の影響は見られないので，XPE 機能に特徴的な所見と思われる．これらにより，XP が疑われる患者より得られた線維芽細胞に各群 XP アデノウイルスを感染させ，UVC を照射すれば，ヌクレオチド除去修復欠損性 XP は，一回の感染実験で診断が可能となった[30]．XP-V は臨床的にヌクレオチド除去修復欠損（A ～ G）群と異なることから，直接，遺伝子診断可能である．しかし，XP-V 細胞に XPV アデノウイルスを感染させ，カフェインとフローサイトメトリーを用いると，A ～ G群と鑑別する事ができる[30]．

4. おわりに

医学生物学には多数の研究分野があり，いつの時代になっても研究者は苦労しながら研究を続けている．私は目立たないひとりの研究者であったが，幸運にも，癌研究所分子生物学部門と皮膚科学講座で 38 年間の長きに渡り研究を続けることが出来た．結果的に研究領域は幅広いものとなったが，長く研究を続けて来られたのはいくつかの幸運があったように思う．振り返って考えると，行き詰まりを感じた時には，恩師が現れて，新しい研究分野，新しい実験方法，新しい研究室を提供して下さった．忍耐強く研究を続けて来た賜物と考えている．

参考文献

1. Sawada Y, Yamashita T, Kanda F, Sekikawa K, Fujinaga K: Mapping of restriction fragments and transforming ability of adenovirus 31. Tumor Res 1981; 16: 7-17.
2. Yamashita T, Fujinaga K: Establishment and characterization of rat cell lines transformed by the left-end DNA fragments of adenovirus type 31. Gann (Cancer Science) 1983; 74: 77-85.
3. Nishikawa T, Yamashita T, Yamada T, Kobayashi H, Ohkawara A, Fujinaga K: Tumorigenic transformation of primary rat fibroblasts by human papillomavirus type 8 E7 gene in collaboration with the activated H-ras gene. Jpn J Cancer Res (Cancer Science) 1991; 82: 1340-1343.
4. Yamashita T, Segawa K, Fujinaga Y, Nishikawa T, Fujinaga K: Biologic and biochemical activity of E7 genes of the cutaneous human papillomavirus type 5 and 8. Oncogene 1993; 8: 2433-2441.
5. Kawamura M, Yamashita T, Segawa K, Kaneuchi M, Shindoh M, Fujinaga K: The 273rd codon mutants of p53 show growth modulation activities not correlated with p53-specific transactivation activity. Oncogene 1996; 12: 2361-2367.
6. Furuhata T, Yamashita T, Hirata K, Sugawara K, Fujinaga K: Effect of retinoic acid on the growth and the expression of the human papillomavirus 16 E6 and E7 genes of the cervical carcinoma cell lines. Tumor Res 1993; 28: 63-76.
7. Yamada T, Yamashita T, Nishikawa T, Fujimoto S, Fujinaga K: Biologic activity of papillomavirus type 16 E6/E7 cDNA clones isolated from SiHa cervical carcinoma cell line. Virus Genes 1995; 10: 15-25.
8. Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, Schiller JT: The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. J Virol 1991; 65: 4860-4866.
9. Takahashi M, IIanY, Chowdhury NR, Guida J, Horwitz M, Chowdhury JR: Long term correction of bilirubin-UDP-glucuronosyl-transferase deficiency in Gunn rats by administration of a recombinant adenovirus during the neonatal period. J Biol Chem 1996; 271: 26536–26542.
10. Yamano S, Tokino T, Yasuda M, Kaneuchi M, Takahashi M, Niitsu Y, Fujinaga K, Yamashita T: Induction of transformation and p53-dependent apoptosis by adenovirus type 5 early region 4 ORF6/7 cDNA. J Virol 1999; 73: 10095-10103.
11. Takahashi M, Sato T, Segawa T, Lu Y, Sato Y, Iyama S, Yamada Y, Fukaura J, Takahashi S, Miyanishi K, Yamashita T, Sasaki K, Kogawa K, Hamada H, Kato J, Niitsu Y: E1B-55K-deleted adenovirus expressing E1A-13S by AFP-enhancer/promoter is capable of highly specific replication in AFP-producing hepatocellular carcinoma and eradication of established tumor. Mol Ther 2002; 5: 627-634.
12. Sasaki Y, Morimoto I, Ishida S, Yamashita T, Imai K, Tokino T: Adenovirus-mediated transfer of the p53 family genes, p73 and p51/p63 induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cell lines: Potential application to gene therapy of colorectal cancer. Gene Ther 2001; 8: 1401-1408.
13. Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I, Yamashita T, Kojima T, Kihara C, Tanaka T, Imai K, Nakamura Y, Tokino T: The

p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. J Biol Chem 2002; 277: 719-724.
14. Sasaki Y, Mita H, Toyota M, Ishida S, Morimoto I, Yamashita T, Tanaka T, Imai K, Nakamura Y, Tokino T: Identification of the interleukin-4 receptor gene as a direct target for p73. Cancer Res 2003; 63: 8145-8152.
15. Oshima Y, Sasaki Y, Negishi H, Idogawa M, Toyota M, Yamashita T, Wada T, Nagaya S, Kawaguchi S, Yamashita T, Tokino T: Antitumor effect of adenovirus- mediated p53 family gene transfer on osteosarcoma cell lines. Cancer Biol Ther 2007; 6: 1058-1066.
16. Maruyama R, Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Ohe-Toyota M, Yamamoto E, Nojima M, Fujikane T, Sasaki Y, Yamashita T, Watanabe Y, Hiratsuka H, Hirata K, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Tokino T: Cytoplasmic RASSF2A is a proapoptotic mediator whose expression is epigenetically silenced in gastric cancer. Carcinogenesis 2008; 29: 1312-1318.
17. Adachi K, Toyota M, Sasaki Y, Yamashita T, Ishida S, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Hinoda Y, Saito T, Imai K, Kudo Y, Tokino T: Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene. Oncogene 2004; 23: 7791-7798.
18. King KE, Ponnamperuma RM, Yamashita T, Tokino T, Lee LA, Young MF, Weinberg WC: deltaNp63g functions as both a positive and negative transcriptional regulation and blocks in vitro differentiation of murine keratinocytes. Oncogene 2003; 22: 3635-3644.
19. King KE, Ponnamperuma RM, Gerdes MJ, Tokino T, Yamashita T, Baker CC, Weinberg WC. Unique domain functions of p63 isotypes that differentially regulate distinct aspects of epidermal homeostasis. Carcinogenesis 2006; 27: 53-63.
20. Hirosaki K, Yamashita T, Wada I, Jin H-Y, Jimbow K: Tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 require Rab7 for their intracellular transport. J Invest Dermatol 2002.119: 475-480,
21. Rad HH, Yamashita T, Jin H-Y, Hirosaki K, Wakamatsu K, Ito S, Jimbow K: Tyrosinase-related proteins suppress tyrosinase-mediated cell death of melanocytes and melanoma cells. Exp Cell Res 2004; 298: 317-328.
22. Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nakayama E, Okura M, Jimbow K: N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol induces apoptosis in B16F1 cells and mediates tumor-specific T-cell immune responses in a mouse melanoma model. J Dermatol Sci 2012; 67: 51-60.
23. Ito S, Ojika M, Yamashita T, Wakamatsu K: Tyrosinase-catalyzed oxidation of rhododendrol produces 2-methylchromane-6, 7-dione, the putative ultimate toxic metabolite: Implications for melanocyte toxicity. Pigment Cell Melanoma Res 2014; 27: 744-53.
24. Ito S, Gerwat W, Kolbe L, Yamashita T, Ojika M, Wakamatsu K: Human tyrosinase is able to oxidize both enantiomers of rhododendrol. Pigment Cell Melanoma Res 2014; 27: 1149-53.
25. Ito S, Okura M, Nakanishi Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T: Tyrosinase-catalyzed metabolism of rhododendrol (RD) in B16 melanoma cells: production of RD-pheomelanin and covalent binding with thiol proteins. Pigment Cell Melanoma Res 2015; 28: 295-306.
26. Okura M, Yamashita T, Ishii-Osai Y, Yoshikawa M, Sumikawa Y, Wakamatsu K, Ito S: Effects of rhododendrol and its metabolic products on melanocytic cell growth. J Dermatol Sci 2015; 80(2): 142-149.
27. Tanaka K, Miura N, Satokata I *et al.* Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature* 1990; 348: 73-76.
28. De Weerd-Kastelein EA, Keijzer W, Bootsma D. Genetic heterogeneity of xeroderma pigmentosum demonstrated by somatic cell hybridization. *Nat New Biol* 1972; 238: 80-83.
29. Carreau M, Eveno E, Quilliet X *et al*. Development of a new easy complementation assay for DNA repair deficient human syndromes using cloned repair genes. Carcinogenesis 1995; 16: 1003-1009.
30. Yamashita T, Okura M, Ishii-Osai Y, Hida T. Diagnosis of eight groups of xeroderma pigmentosum by genetic complementation using recombinant adenovirus. J Dermatol(in press)

別刷請求先：山下利春
〒060-8543 札幌市中央区南 1 条西 16 丁目
札幌医科大学医学部皮膚科学講座
TEL：011-611-2111（内線 3460）
FAX：011-613-3739
E-mail：yamasita@sapmed.ac.jp