厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合 研究事業

バイオフラボノイドの遺伝子再構成作用に関する研究

（H14-食品・化学-001）

平成14年度　総括研究報告書

主任研究者　清河　信敬

平成15（2003）年3月

別添 2

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合 研究事業

バイオフラボノイドの遺伝子再構成作用に関する研究

平成 14 年度　総括研究報告書

主任研究者　清河　信敬

平成 15（2003）年 3 月

別添 3

目次

I. 総括研究報告

バイオフラボノイドの遺伝子再構成作用に関する研究

----------1

清河　信敬

II. 分担研究報告

1. バイオフラボノイドのヒト造血細胞への作用の検討に関する研究

----------7

清河　信敬

2. バイオフラボノイドのヒト正常血液細胞への作用の検討に関する研究

----------11

山田　健人

3. ヒト造血再構築マウスを用いたバイオフラボノイドの作用解析に関する研究

----------15

穂積信道

4. 家畜によるヒト胎児造血モデル作成と応用に関する研究

----------17

安江　博

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----------19

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----------21

別添４

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合 研究事業）
総括研究報告書

バイオフラボノイドの遺伝子再構成作用に関する研究

主任研究者　清河　信敬　国立成育医療センター研究所
発生・分化研究部　形態発生研究室　室長

研究要旨：　最近、バイオフラボノイド(BFN)がそのトポイソメラーゼ II 抑制作用により、培養細胞株に対して MLL 遺伝子の再構成を引き起こすことが報告されている。乳児白血病の発症における MLL 遺伝子の関与を考えた場合、この報告は重要である。そこで本研究は、生体が BFN を摂取した場合の安全性や適正摂取量の評価について検討することを目的としている。初年度は、BFN による培養細胞株の MLL 遺伝子再構成誘導作用について追試、確認を行うとともに、BFN を生体に投与した場合の造血系細胞に対する作用の検討のための“ヒト骨移植 NOD/ SCID マウスを用いたヒト造血組織再構築モデル”を確立した。また、本研究では母体の BFN 摂取による胎児造血細胞への作用の検討のための“妊娠した免疫不全ブタを用いたヒト胎児造血系実験モデル”の確立を目指しているが、その準備段階として、免疫不全ブタ解析の上で重要なブタ免疫系遺伝子情報の解析、ならびに抗ブタ白血球単クローン性抗体の作成と解析を行った。

分担研究者
山田健人　慶應義塾大学病理学教室　講師
穂積信道　東京理科大学生命科学研究所・
　　生命工学技術研究部門　教授
安江　博　農林水産省・独立行政法人・農業
　　生物資源研究所・基礎研究部門
　　ゲノム研究グループ　上席研究官

A.　研究目的

年齢１歳未満の乳児に特徴的な乳児白血病の発症機構については、母体のトポイソメラーゼ(Topo)II 抑制物質摂取により誘導される胎児造血細胞の MLL 遺伝子再構成の関与が示唆されている。これに関連して、最近米国の R. Strick らが、健康食品などに含まれるバイオフラボノイド(BFN)が培養ヒト血液系細胞株に対して TopoII 抑制作用を示し、MLL 遺伝子の再構成を引き起こすことを報告しており、米国 NIH もこれに関心を示している。BFN は日本茶やハーブ等にも豊富に含まれること、乳児白血病の発生頻度は東洋人に高いことなどを考慮すると、同物質が MLL 遺伝子の構造変化に影響を及ぼす可能性、ならびにその結果血液細胞の増殖に及ぼす影響について早急に解明することが求められる。そこで本研究では、上記報告を追試するとともに、生体に BFN を投与した場合に、実際に血液系細胞に MLL 遺伝子再構成が起こるのか否かについて、NOD/ SCID マウスを用いたヒト造血組織再構築モデルや、妊娠した免疫不全ブタの胎児に外科的にヒト造血細胞を移植、再構築する妊娠モデル、等を用いた検討によって明らかにすることを目標とする。

初年度は、上記 BFN の MLL 遺伝子再構成誘導作用の追試確認実験を行うとともに、BFN の正常血液系細胞に対する効果、ならびに生体への投与にともなう血液系細胞への効果の検討を行うための準備実験を行った。

B.　研究方法

１）BFN が培養細胞株に MLL 遺伝子再構成を誘導し得るのか追試、確認を試みるため、P. Strick らの方法に従い、B 前駆細胞性白血病株 BV173 について、Flavone 等の BFN を 16 時間添加培養した後ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA から PCR で増幅した MLL 遺伝子の Break point cruster 領域(BCR)約 8kb を挟む 5'領域、3'領域のそれぞれの断片をプローブとして用いサザンブロット解析を行った。

2）ヒト正常血液系細胞に対する BFN の MLL 遺伝子再構成誘導効果の検討に用いるためのヒト骨髄幹細胞から各系統の血液系細胞を分化誘導、維持する培養条件を検討するため、骨髄幹細胞について種々のサイトカイン添加液体培養、メチルセルロース中でのコロニー形成培養、ST-2、PA-6、MS-5 等のマウス骨髄間質細胞株との共培養を行い、一定期間後に細胞を回収し、各系統のヒト血球系細胞に対する特異的単クローン性抗体（MoAb）を用いたフローサイトメトリー(FCM)および蛍光顕微鏡解析により、分化誘導される細胞の種類と頻度について検討した。

3）生体が BFN を摂取することによって造血細胞の遺伝子構造変化にもたらされる影響に関して検討するための動物モデルとして使用する目的で、NOD/SCID マウスに 3Gy の放射線照射を行った後ヒト臍帯血幹細胞を移植し、一定期間後に採取した末梢血および骨髄血に対してヒト白血球に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、それぞれに占めるヒト造血細胞の比率を FCM 解析によりモニターした。

4）母体が BFN を摂取した場合の胎児造血細胞への作用について検討するためのモデルとして使用する予定の免疫不全ブタの免疫状態の解析に用いるため、ブタ末梢血白血球を免疫源としてブタ血球に対する MoAb を作成した。得られたクローンは FCM 解析でのブタ白血球に対する反応性によりスクリーニングした。選択された抗体について、ブタ白血球の蛋白抽出液に対する免疫沈降によりその分子量を同定した。最終的な認識抗原の確認は、既存のブタ白血球抗原の cDNA を強制発現させた Cos7 細胞との反応性により行った。

5）これまでに報告のない染色体転座 t(11;X)(q23;q24)をもつ小児急性骨髄性白血病(AML)症例から樹立した細胞株 KOPM88 に対し、MLL 遺伝子の N 末および C 末にそれぞれを FITC、PE でラベルしたコスミドプローブを作製し、FISH を行った。MLL の Exon 5, 6 に reverse primer, Exon3 内 2 ヵ所に forward primer を設定し nested-RT-PCR を行なった。同株を NOD/SCID マウスに移植し、50～70 日後に末梢血と骨髄血を採取し、単核球を分離して抗ヒト血球抗体を用いた FCM を解析により白血病細胞の検出を試みた。

（倫理面への配慮）

正常骨髄および臍帯血由来幹細胞に関しては、インフォームドコンセントを得た上で市販されている細胞（米国 Clonetics 社製）を使用した。その他のヒト材料の使用にあたっては、三省庁合同で策定されたガイドラインを遵守するとともに、当該研究施設の倫理委員会の承認を受け、その規定に従って、インフォームドコンセントを得た上で倫理上、人権擁護上、充分配慮して行った。動物実験に関しては、動物愛護と動物福祉の観点から十分な配慮を行い、国が定める各種の関連法律ならびに当該研究施設の動物実験委員会および倫理委員会の承認を受け、「動物実験指針」に従って行った。

C.　研究結果

1.　培養細胞株への BFN 投与による MLL 遺伝子再構成誘導の検討（清河）

R. Strick らにより報告された BFN の培養細胞株に対する MLL 遺伝子再構成誘導作用について追試、確認するため、サザン解析で MLL 遺伝子 BCR 近傍の BamHI 断片のサイズの変化を検討することによって Flavone 等、一部の BFN による BV173 に対する MLL 遺伝子再構成誘導を確認をした。

2.　ヒト正常造血細胞の試験管内培養系、コロニー形成培養系の確立（清河・山田）

MS-5 との共培養により、造血幹細胞から約 70%の純度で B 前駆細胞が誘導されたが、他の間質細胞株との共培養では主に骨髄単球系細胞が分化誘導された。しかし、骨髄単球系細胞の分化誘導は、SCF および G-CSF 添加の液体培養でより効率的であった。巨核球は、MS-5 との共培養でもごく一部（５％以下）分化誘導されたが、TPO 添加液体培養の方がより効率的であった。

3.　NOD/SCID マウスを用いたヒト造血系再構築モデルの作成（山田・穂積）

生体が BFN を摂取することによって造血細胞の遺伝子構造変化にもたらされる影響に関して検討するための動物モデルとして使用する目的で、NOD/SCID マウスにヒト造血

系を再構築させる実験条件の検究では母体がBFN を摂取した場合の胎児造血細胞への作用について検討する目的で、妊娠した免疫不全ブタの胎児にヒト造血幹細胞を移植してヒト造血系を再構築するブタ妊娠モデルの確立を目指している。初年度は、現在他の研究事業で作成中であって次年度より本研究事業で使用可能見込の免疫不全ブタの免疫状態を解析するための、ブタ血球に対する MoAb の作成を行い、34 のクローンを得た。このうち、特にリンパ球の一部と反応する 7G3 および 6F10 について、それぞれの認識抗原がT 細胞抗原受容体(TCR)δ鎖、CD8α鎖であることを同定した。これらの抗体を用いてブタの免疫関連各組織における T 細胞の分布について検討した結果、ブタの末梢血、胸腺にはヒトやマウスに比較して TCRδ陽性 T 細胞が有意に多いという免疫系の特性が明らかとなった。

5. 白血病症例の MLL 遺伝子再構成の解析と NOD/SCID マウスへの移植による細胞増殖能の評価法の確立（山田・穂積）

これまでに報告のない染色体転座 t(11;X)(q23;q24)をもつ小児急性骨髄性白血病(AML)症例から樹立した細胞株 KOPM88 を用いて MLL 遺伝子再構成について解析し、同株の NOD/SCID マウスへの移植による AML モデル作成を試みた。同株細胞に対する FISH 解析の結果、FITC と PE のシグナルの離解が認められ、MLL 遺伝子の内部の insertion あるいは duplication が示唆された。また、RT-PCR の結果、250bp と 450bp の 2 本の band が得られた。それぞれのシークエンスの結果 MLL 遺伝子の Exon 8 と Exon 2 および Exon 6 と Exon 2 に 2 ケ所の切断点が明らかになり、MLL 遺伝子の tandem duplication が判明した。また KOPM88 を NOD/SCID マウスに移植したところ白血病細胞の生着、増殖を認めた。

D. 考察

1. 培養細胞株への BFN 投与による MLL 遺伝子再構成誘導の検討

現時点では、BFN による MLL 遺伝子再構成誘導効果は、細胞株の培養系に直接添加した場合にサザン解析によって確認されているのみである。今後この遺伝子再構成誘導効果がサザン解析における artifact ではないことを Fish 法や RT-PCR 法によって確認するとともに、実際に生体に BFN を投与した場合に血液系細胞に対して同様に MLL 遺伝子再構成誘導効果を示すのか否かについて明らかにする必要がある。

2. ヒト正常造血細胞の試験管内培養系、コロニー形成培養系の確立

骨髄単球系細胞、B 前駆細胞、巨核球等を骨髄幹細胞から効率的に分化誘導、維持するための培養条件を決定した。今後これらの培養条件を用いてヒト各種正常血液系細胞に対する BFN の MLL 遺伝子再構成誘導効果の検討を行ってゆく。

3. NOD/SCID マウスを用いたヒト造血系再構築モデルの作成

NOD/SCID マウスのヒト造血系再構築モデルに BFN を投与する実験系は生体内での BFN 代謝を含めた評価が出来る点で優れていると考えられる。今回の検討で移植後のマウス末梢血および骨髄にヒト白血球を 5-16%認めたことは、BFN 投与による MLL 遺伝子の再構成を解析しうる可能性を示しており、今後の研究への応用が期待される。

4. 免疫不全ブタ解析を目的としたブタ血球に対する MoAb の作成と性状解析

ブタの免疫状態をモニターするための抗ブタ白血球抗体の作成を行い、多数のクローンを得、この中に今回の目的に有用なクローンが複数含まれていることを確認した。現在、他のクローンについてもその性状解析と認識抗原の同定を行っている。これらの抗体は今後免疫不全ブタの免疫系解析を行う上で有用であると考えられ、今後これらの抗体を用いて、次年度に確立予定の免疫不全ブタの免疫状態の解析を行う。

5. 白血病症例の MLL 遺伝子再構成の解析と NOD/SCID マウスへの移植による細胞増殖能の評価法の確立

今回明らかにした MLL 遺伝子の tandem duplication は、新たに発見された異常であり、今後 MLL 遺伝子の異常にともなう白血病化のメカニズムを研究するうえで貴重な材料と考えられる。リンパ性白血病や悪性リンパ腫は、SCID マウスへ移植することで全身

に高度に浸潤する動物モデルが作成可能であるのに対し、これまで、AML は移植不可能であった。今回、NOD/ SCID マウスを用いることで、AML モデルが作成できたことは、通常の免疫不全マウスへの生着が困難な白血病細胞でも、NOD/ SCID マウスを用いることにより生着可能となり、その増殖能の評価、判定を行うことができることを示しており、今後、BFN によって誘導された MLL 遺伝子再構成が細胞増殖能におよぼす影響の評価に応用可能と考えられる。

E. 結論

BFN と乳児白血病発症との因果関係が科学的な根拠に基づいて推測されていることから、(特に妊婦の) BFN 摂取の安全性については早急に結論をださねばならないが、BFN の MLL 遺伝子再構成誘導効果は、現時点では非常に artificial な実験系で確認されているのみである。実際に、BFN が多くの日常的食品に含まれていることや、MLL の再構成に起因する乳児白血病の発症頻度は非常に低いことを考慮すると、この BFN の作用が実際にヒト生体内で血球系細胞に対しても発揮されるか否かについては、今後、より詳細な検討を行った上で、慎重に判断されなければならない。また、仮に、BFN が生体内でも MLL 遺伝子再構成誘導効果を示すことが確認された場合でも、摂取の是非というよりは、適正摂取量の決定という観点からの検討がより重要になってくると考えられる。これに関して、今年度の研究成果の多くは、BFN の生体内での作用に関して検討するための実験系確立に直接的に結びつくものであり、次年度、これらの成果を応用することによって、BFN の生体内での MLL 遺伝子再構成誘導作用の有無の確認や、MLL の適正摂取量の決定に関して本研究が進展することが期待される。また、本研究の成果は、BFN 摂取の安全性の評価のみでなく、より一般的に、生体の様々な化学物質摂取の安全性に関して検討するための動物実験モデルとして応用可能であり、今後の研究のさらなる進展によって、より広い分野で国民の健康増進、保持に役立つことが期待され、厚生労働行政にも大いに貢献できるものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Ohmi K, Nakajima H, Suzuki T, Furukawa S, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Inhibition of Shiga toxin cytotoxicity in human renal cortical epithelial cells by nitrobenzylthioinosine. J Infec Dis 185:785-796, 2002.

2) Matsuoka K, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Suzuki T, Mimori K, Nakajima H, Takenouchi H, Tang W, Katagiri YU, Fujimoto J. Rum1, an inhibitor of cyclin-dependent kinase in fission yeast, is negatively regulated by mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation at Ser and Thr residues. Eur J Biochem 269:3511-3521, 2002.

3) Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki K, Sekino T, Mimori K, Suzuki T, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimura J, Fujita H, Ishimoto K, Yamashiro Y, Fujimoto J. Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. Exp Hematol 30:1115-1123, 2002.

4)Katagiri YU, Ohmi K, Tang W, Takenouchi H, Taguchi T, Kiyokawa N, Fujimoto J. Raft.1, a monoclonal antibody raised against the raft microdomain, recognizes G-protein b1 and 2, which assemble near nucleus after Shiga toxin binding to human renal cell line. Lab Invest 82:1735-1745, 2002.

5) Nakao H, Kataoka C, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yamasaki S, Takeda T. Monoclonal antibody to shiga toxin 1, which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. Microbiol Immunol 46:777-780, 2002.

6)Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri YU, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J. Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. J Immunol 170:252-260, 2003

7) Mimori1 K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima N, Saito M, Katagiri YU, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y, Fujimoto J. Co-stimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. Leukemia (in press).

8) Mori T, Kiyokawa N, Shimada H, Miyauchi J, Fujimoto J. Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research Institute for Child

Health and Development. Br J Hematol (in press).
9) Honma D, Uenishi H, Hiraiwa H, Watanabe S, Tang W, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yause H, Sakimura K. Cloning and characterization of porcine common γ chain gene. J Interf Cytok Res (in press)..
10) Yuasa H, Takakura N, Shimomura T, Suenobu S, Yamada T, Nagayama H, Oike Y , Suda T. Analysis of human TIE2 function on hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. Biochem Biophys Res Commun 298:731-737, 2002.
11) Shibara R, Hashiguchi A, sakamoto J, Yamada T, Umezawa A, Hata J. Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms tumor. J Med Genetics 39:E83, 2002.
12) Zhao C, Hashiguchi A, Kondoh K,Du W, H. J, Yamada T. Exogenous expression of heat shock protein 90kDa retards the cell cycle and impairs the heat shock response. Exper Cell Res 275:200-214, 2002.
13) Kakimoto T, Hattori Y, Okamoto S, Sato N, Kamata T, Yamaguchi M, Morita K, Yamada T, Takayama N, Uchida H, Shimada N, Tanigawara Y, Ikeda Y. Thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma: Association of plasma concentrations of thalidomide and angiogenic growth factors with clinical outcome. Jpn J Cancer Res 93; 1029-1036, 2002
14) Sato N, Hattori Y, Du W, Yamada T, Kamata T, Kakimoto T, Okamoto S, Kawamura C, Kizaki M, Shimada N, Ote Y, Hata J, Ikeda Y. Elevated level of basic fibroblast growth factor in multiple myeloma correlates with increased disease activity. Jpn J Cancer Res 93:459-466, 2002.
15) Yamaoka T, Yoshino K, Yamada T, Yano M, Matsui T, Yamaguchi T, Moritani M, Hata J, Noji S, Itakura M. Transgenic expression of FGF8 and FGF10 induces transdifferentiation of pancreatic islet cells into hepatocytes and exocrine cells. Biochem Biophys Res Commun 292:138-43, 2002.
16) Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ohta T, Takeuchi T, Hata J, Kadowaki T, Koyasu S. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity to intestinal parasites in Pik3r1 deficient mice. Nature Immunology 3:295-304, 2002.
17) Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Shirasaki Y, Kondo K, Yamada T Various amplification of direct PCR using Blood Samples. Clinical Laboratory 48: 377-384, 2002
18) Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. J Immunology 170: 2170-2178, 2003.
19) Nguyen H, Hay J, Gallinger S, Sandhu J, Hozumi N. Isolation of human single chain antibodies (scFv) against human TNF-a from human peripheral blood lymphocyte-SCID mice. Human Antibodies 11: 65-72, 2002.
20) Takamiya R, Murakami M, Goda N, Makino N, Kajimura M, Takamiya Y, Yamaguchi T, Ishimura Y, Hozumi N, Suematsu M. Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: An anti-inflamatory role. Am J Physiol 283: H861-H870, 2002.

2. 学会発表

1）桐洋子，大見和宏，田口智子，唐巍然，清河信敬，藤本純一郎：ラフト／マイクロドメインを認識する単クローン抗体 Raft. 1. 第 91 回日本病理学会総会，横浜，3 月 26-28 日，2002.
2）三森謙一，清河信敬，田口智子，中島英規，唐巍然，藤本純一郎：Langerhance cell histhiocytosis および Langerhance cell における claudin の発現．第 91 回日本病理学会総会，横浜，3 月 26-28 日，2002.
3）中尾浩史，清河信敬，竹田多恵，藤本純一郎：志賀毒素の標的細胞への結合に関する試み．第 75 回日本細菌学会総会，横浜，4 月 4-6 日，2002.
4）片桐洋子，清河信敬，田口智子，中島英規，中尾浩史，藤本純一郎：シガ毒素受容体 Gb3 の架橋刺激によるラフトを介した細胞内刺激伝達．第 75 回日本細菌学会総会，横浜，4 月 4-6 日，2002.
5）田口智子，清河信敬，斎藤正博，中島英規，片桐洋子，藤本純一郎：G-CSF は単球における LPS 受容体を介した刺激伝達を修飾しそのサイトカイン分泌を調節する．第 75 回日本細菌学会総会，横浜，4 月 4-6 日，2002.
6）関野貴臣，清河信敬，田口智子，古川漸，藤本純一郎：腎皮質上皮細胞におけるベロ毒素の細胞内逆行性輸送と NBTI によるその阻害に関する検討．第 105 回日本小児科学会学術集会，名古屋，4 月 19-21 日，2002.
7）田口智子，清河信敬，藤本純一郎：腎尿細管上皮細胞に対するベロ毒素の新たな細胞障害作用：毒素の結合によって誘導される細胞内刺激伝達をともなった細胞死．第 37 回日本小児腎臓病学会学術集会，神戸，7 月 4-6 日，2002.
8）清河信敬，中尾浩史，藤本純一郎：核酸輸送阻害財 nitorobenzylthio-inosine は Shiga toxin の細胞内逆行性輸送を阻害することによりその毒性を抑制する．第 49 回毒素シンポジウム，7 月 10-12 日，岐阜，2002.
9）鈴木恭子，清河信敬，斎藤正博，田口智子，松井淳，竹野内寿美，唐巍然，片桐洋子，塩沢祐介，藤村純也，鈴木東洋，藤田宏夫，山城雄一郎，藤本純一郎：

G-CSF が単球のサイトカイン分泌に及ぼす作用に関する検討．第 64 回日本血液学会総会，横浜，年 9 月 12-15 日，2002．

10）田口智子，清河信敬，藤本純一郎：B 前駆細胞抗原受容体を介した AKT の活性化．第 64 回日本血液学会総会，横浜，年 9 月 12-15 日，2002．

11）鈴木恭子，清河信敬，田口智子，松井淳，塩沢祐介，竹野内寿美，唐巍然，片桐洋子，藤村純也，鈴木東洋，藤田宏夫，山城雄一郎，中島敏治，斎藤博久，斎藤正博，藤本純一郎：G-CSF によって単球に誘導される分子発現に関する検討．第 44 回日本小児血液学会，東京，10 月 18-19，2002．

12）田口智子，清河信敬，松井淳，唐巍然，竹野内寿美，三森謙一，江端智彦，板垣光子，片桐洋子，中島敏治，斎藤博久，藤本純一郎：B 細胞分化における MAPK フォスファクターゼの成熟度依存的な発現．第 44 回日本小児血液学会，東京，10 月 18-19，2002．

13）三森謙一，清河信敬，田口智子，竹野内寿美，松井淳，唐巍然，板垣光子，片桐洋子，宮内潤，藤本純一郎:LCH 細胞およびヒト正常 Langerhance 細胞における claudin，occludin の発現．第 44 回日本小児血液学会，東京，10 月 18-19，2002．

14）森鉄也，清河信敬，藤本純一郎：単一施設で診断した小児 ALCL 例に対し選択された治療と転帰の後方視的解析．第 44 回日本小児血液学会，東京，10 月 18-19，2002．

15）片桐洋子，大見和宏，田口智子，唐巍然，清河信敬，藤本純一郎：ラフト／マイクロドメインを認識する単クローン抗体 Raft．1．第 75 回日本生化学大会，京都，10 月 14-17 日，2002．

16）田口智子，清河信敬，片桐洋子，藤本純一郎：pre-B 細胞における AKT 刺激伝達系の活性化とその細胞死制御への関与に関する検討．第 32 回日本免疫学会総会，東京，年 12 月 4-6 日，2002．

17）鈴木恭子，清河信敬，田口智子，松井淳，塩沢祐介，唐巍然，片桐洋子，藤田宏夫，山城雄一郎，中島敏治，斎藤博久，斎藤正博，藤本純一郎：G-CSF の単球のサイトカイン分泌に対する選択的調節機構に関する検討．第 32 回日本免疫学会総会，東京，年12月4-6日，2002．

18）唐巍然，塩谷順彦，清河信敬，田口智子，竹野内寿美，松井淳，板垣光子，江端智彦，片桐洋子，江口智子，安江博，高垣洋太郎，藤本純一郎：ブタ T 細胞抗原受容体δ鎖に対する単クローン性抗体 7G3 の樹立とその解析．第 32 回日本免疫学会総会，東京，年 12 月 4-6 日，2002．

19）山田健人，杜旻林，橋口明典，近藤健介，穂積信道，須田年生，秦順一:多発性骨髄腫における血管新生の機能解析．第 91 回日本病理学会総会，横浜，3 月 26-28 日，2002．

20）杜旻林，橋口明典，穂積信道，韓旻昴，秦順一，山田健：ヒト骨髄ストローマ細胞を用いた腫瘍間質の生体内再構築人．第 91 回日本病理学会総会，横浜，3 月 26-28 日，2002．

21）橋口明典，趙沈，秦順一，山田健人：ストレス蛋白 HSO90 の細胞増殖抑制．第 91 回日本病理学会総会，横浜，3 月 26-28 日，2002．

22）浮山越史，秦順一，穂積信道，須田年生，山田健人，遠藤昌夫：In vivo ヒト神経芽腫血管新生モデル作製と遺伝子導入による血管新生抑制と腫瘍抑制効果．第３９回日本小児外科学会，東京，6 月 5-7 日，2002.

23）Hozumi N, Yasuda M, Morimura N, Watanabe N, Fujimaki R, Hata J, Yamada T, Tezuka K: Enhanced calcification and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells by Notch. The 5th Annual Meeting of The Tissue Engineering Society of International, Kobe, Dec. 8-10, 2002.

24）重成敦子，安藤麻子，椎名隆，Rogel-Gaillard Clair Chardon Patrick，安江博，猪子英俊：ブタ SLA クラス I 遺伝子領域のゲノムの構造解析．第 25 回日本分子生物学会，横浜，12 月 11-14 日，2000．

25）渡部聡，本間大輔,安江博：ウニ・アリールスルファターゼ遺伝子インスレーターの哺乳類細胞におけるエンハンサーブロッキング機能の解析．第 25 回日本分子生物学会，横浜，12 月 11-14 日，2000．

26）山本竜司，上西博英，初瀬洋美，高垣洋太郎，佐藤英明，安江博：ブタ T 細胞レセプターα鎖遺伝子の解析 ii)1 ヶ月齢、5 ヶ月齢ブタ胸腺 cDNA の多様性．第25回日本分子生物学会，横浜，12 月 11-14 日，2000

G.　知的財産の出願・登録状況

1.　特許取得

無し

2.　実用新案登録

無し

3.　その他

無し

別添 5

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合 研究事業）
分担研究報告書

バイオフラボノイドのヒト造血細胞への作用の検討

主任研究者　清河　信敬　国立成育医療センター研究所
発生・分化研究部　形態発生研究室　室長

研究要旨：　最近、バイオフラボノイド(BFN)がそのトポイソメラーゼ II 抑制作用により、培養細胞株に対して MLL 遺伝子の再構成を引き起こすことが報告されている。乳児白血病の発症における MLL 遺伝子の関与を考えた場合、この報告は重要である。そこで本研究は、生体が BFN を摂取した場合の安全性や適正摂取量の評価について検討することを目的としている。初年度は、BFN による培養細胞株の MLL 遺伝子再構成誘導作用について追試、確認を行うとともに、BFN を生体に投与した場合の造血系細胞に対する作用の検討に用いる造血幹細胞からの各種ヒト正常細胞を分化誘導するための実験条件を確立した。また、本研究では母体の BFN 摂取による胎児造血細胞への作用の検討のための“妊娠した免疫不全ブタを用いたヒト胎児造血系実験モデル”の確立を目指しているが、その準備段階として、免疫不全ブタ解析の上で重要な抗ブタ白血球単クローン性抗体の作成と解析を行った。

H.　研究目的

年齢 1 歳未満の乳児に特徴的な乳児白血病の発症機構については、母体のトポイソメラーゼ(Topo)II 抑制物質摂取により誘導される胎児造血細胞の MLL 遺伝子再構成の関与が示唆されている。これに関連して、最近米国の R. Strick らが、健康食品などに含まれるバイオフラボノイド(BFN)が培養ヒト血液系細胞株に対して TopoII 抑制作用を示し、MLL 遺伝子の再構成を引き起こすことを報告しており、米国 NIH もこれに関心を示している。BFN は日本茶やハーブ等にも豊富に含まれること、乳児白血病の発生頻度は東洋人に高いことなどを考慮すると、同物質が MLL 遺伝子の構造変化に影響を及ぼす可能性、ならびにその結果血液細胞の増殖に及ぼす影響について早急に解明することが求められる。そこで本研究では、上記報告を追試するとともに、生体に BFN を投与した場合に、実際に血液系細胞に MLL 遺伝子再構成が起こるのか否かについて、NOD/ SCID マウスを用いたヒト造血組織再構築モデルや、妊娠した免疫不全ブタの胎児に外科的にヒト造血細胞を移植、再構築する妊娠モデル、等を用いた検討によって明らかにすることを目標とする。

初年度は上記 BFN の MLL 遺伝子再構成誘導作用の追試確認実験を行うとともに、BFN の正常血液系細胞に対する効果ならびに生体への投与にともなう血液系細胞への効果の検討を行うための準備実験を行った。

I.　研究方法

1）BFN が培養細胞株に MLL 遺伝子再構成を誘導し得るのか追試、確認を試みるため、P. Strick らの方法に従い、B 前駆細胞性白血病株 BV-173 について、Flavone 等の BFN を 16 時間添加培養した後ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA から PCR で増幅した MLL 遺伝子の Break point cruster 領域(BCR)約 8kb を挟む 5'領域、3'領域のそれぞれの断片をプローブとして用いサザンブロット解析を行った。

2）ヒト正常血液系細胞に対する BFN の MLL 遺伝子再構成誘導効果の検討に用いるためのヒト骨髄幹細胞から各系統の血液系

細胞を分化誘導、維持する培養条件を検討するため、骨髄幹細胞について種々のサイトカイン添加液体培養、メチルセルロース中でのコロニー形成培養、ST-2、PA-6、MS-5 等のマウス骨髄間質細胞株との共培養を行い、一定期間後に細胞を回収し、各系統のヒト血球系細胞に対する特異的単クローン性抗体（MoAb）を用いたフローサイトメトリー(FCM)および蛍光顕微鏡解析により、分化誘導される細胞の種類と頻度について検討した。

3）母体が BFN を摂取した場合の胎児造血細胞への作用について検討するためのモデルとして使用する予定の免疫不全ブタの免疫状態の解析に用いるため、ブタ末梢血白血球を免疫源としてブタ血球に対する MoAb を作成した。得られたクローンは FCM 解析でのブタ白血球に対する反応性によりスクリーニングした。選択された抗体について、ブタ白血球の蛋白抽出液に対する免疫沈降によりその分子量を同定した。最終的な認識抗原の確認は、既存のブタ白血球抗原の cDNA を強制発現させた Cos7 細胞との反応性により行った

4）倫理面への配慮について、正常骨髄および臍帯血由来幹細胞に関しては、インフォームドコンセントを得た上で市販されている細胞（米国 Clonetics 社製）を使用した。

C. 研究結果

1. 培養細胞株への BFN 投与による MLL 遺伝子再構成誘導の検討

R. Strick らにより報告された BFN の培養細胞株に対する MLL 遺伝子再構成誘導作用について追試、確認するため、サザン解析で MLL 遺伝子 BCR 近傍の BamHI 断片のサイズの変化を検討することによって Flavone 等、一部の BFN による BV-173 に対する MLL 遺伝子再構成誘導を確認をした。

2. ヒト正常造血細胞の試験管内培養系、コロニー形成培養系の確立

MS-5 との共培養により、造血幹細胞から約 70%の純度で B 前駆細胞が誘導されたが、他の間質細胞株との共培養では主に骨髄単球系細胞が分化誘導された。しかし、骨髄単球系細胞の分化誘導は、SCF および G-CSF 添加の液体培養でより効率的であった。巨核球は、MS-5 との共培養でもごく一部（５%以下）分化誘導されたが、TPO 添加液体培養の方がより効率的であった。

3. 免疫不全ブタ解析を目的としたブタ血球に対する MoAb の作成と性状解析

本研究では母体が BFN を摂取した場合の胎児造血細胞への作用について検討する目的で、妊娠した免疫不全ブタの胎児にヒト造血幹細胞を移植してヒト造血系を再構築するブタ妊娠モデルの確立を目指している。初年度は、現在他の研究事業で作成中であって次年度より本研究事業で使用可能見込の免疫不全ブタの免疫状態を解析するための、ブタ血球に対する MoAb の作成を行い、34 のクローンを得た。このうち、特にリンパ球の一部と反応する 7G3 および 6F10 について、それぞれの認識抗原が T 細胞抗原受容体(TCR)δ鎖、CD8α鎖であることを同定した。これらの抗体を用いてブタの免疫関連各組織における T 細胞の分布について検討した結果、ブタの末梢血、胸腺にはヒトやマウスに比較して TCRδ陽性 T 細胞が有意に多いという免疫系の特性が明らかとなった。

D. 考察

1. 培養細胞株への BFN 投与による MLL 遺伝子再構成誘導の検討

現時点では、BFN による MLL 遺伝子再構成誘導効果は、細胞株の培養系に直接添加した場合にサザン解析によって確認されているのみである。今後この遺伝子再構成誘導効果がサザン解析における artifact ではないことを Fish 法や RT-PCR 法によって確認するとともに、実際に生体に BFN を投与した場合に血液系細胞に対して同様に MLL 遺伝子再構成誘導効果を示すのか否かについて明らかにする必要がある。

3. ヒト正常造血細胞の試験管内培養系、コ

ロニー形成培養系の確立

骨髄単球系細胞、B 前駆細胞、巨核球等を骨髄幹細胞から効率的に分化誘導、維持するための培養条件を決定した。今後これらの培養条件を用いてヒト各種正常血液系細胞に対する BFN の MLL 遺伝子再構成誘導効果の検討を行ってゆく。

3. 免疫不全ブタ解析を目的としたブタ血球に対する MoAb の作成と性状解析

ブタの免疫状態をモニターするための抗ブタ白血球抗体の作成を行い、多数のクローンを得、この中に今回の目的に有用なクローンが複数含まれていることを確認した。現在、他のクローンについてもその性状解析と認識抗原の同定を行っている。これらの抗体は今後免疫不全ブタの免疫系解析を行う上で有用であると考えられ、今後これらの抗体を用いて、次年度に確立予定の免疫不全ブタの免疫状態の解析を行う。

E. 結論

BFN と乳児白血病発症との因果関係が科学的な根拠に基づいて推測されていることから、(特に妊婦の) BFN 摂取の安全性については早急に結論をださねばならないが、BFN の MLL 遺伝子再構成誘導効果は、現時点では非常に artificial な実験系で確認されているのみである。実際に、BFN が多くの日常的食品に含まれていることや、MLL の再構成に起因する乳児白血病の発症頻度は非常に低いことを考慮すると、この BFN の作用が実際にヒト生体内で血球系細胞に対しても発揮されるか否かについては、今後、より詳細な検討を行った上で、慎重に判断されなければならない。また、仮に、BFN が生体内でも MLL 遺伝子再構成誘導効果を示すことが確認された場合でも、摂取の是非というよりは、適正摂取量の決定という観点からの検討がより重要になってくると考えられる。今後、BFN の生体内での作用について解析可能な実験系を駆使して、以上の様な点についてさらに検討を行う。

H. 健康危険情報

該当事項なし

I. 研究発表

1. 論文発表

1) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Ohmi K, Nakajima H, Suzuki T, Furukawa S, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Inhibition of Shiga toxin cytotoxicity in human renal cortical epithelial cells by nitrobenzylthioinosine. J Infec Dis 185:785-796, 2002.

2) Matsuoka K, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Suzuki T, Mimori K, Nakajima H, Takenouchi H, Tang W, Katagiri YU, Fujimoto J. Rum1, an inhibitor of cyclin-dependent kinase in fission yeast, is negatively regulated by mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation at Ser and Thr residues. Eur J Biochem 269:3511-3521, 2002.

3) Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki K, Sekino T, Mimori K, Suzuki T, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimura J, Fujita H, Ishimoto K, Yamashiro Y, Fujimoto J. Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. Exp Hematol 30:1115-1123, 2002.

4) Katagiri YU, Ohmi K, Tang W, Takenouchi H, Taguchi T, Kiyokawa N, Fujimoto J. Raft. 1, a monoclonal antibody raised against the raft microdomain, recognizes G-protein b1 and 2, which assemble near nucleus after Shiga toxin binding to human renal cell line. Lab Invest 82:1735-1745, 2002.

5) Nakao H, Kataoka C, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yamasaki S, Takeda T. Monoclonal antibody to shiga toxin 1, which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. Microbiol Immunol 46:777-780, 2002.

6) Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri YU, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J. Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. J Immunol 170:252-260, 2003

7) Mimori1 K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima N, Saito M, Katagiri YU, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y, Fujimoto J. Co-stimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. Leukemia (in press).

8) Mori T, Kiyokawa N, Shimada H, Miyauchi J, Fujimoto J. Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research Institute for Child

Health and Development. Br J Hematol (in press).

9) Honma D, Uenishi H, Hiraiwa H, Watanabe S, Tang W, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yause H, Sakimura K. Cloning and characterization of porcine common γ chain gene. Cytokines (in press).

2. 学会発表

1) 桐洋子, 大見和宏, 田口智子, 唐巍然, 清河信敬, 藤本純一郎: ラフト／マイクロドメインを認識する単クローン抗体 Raft. 1. 第 91 回日本病理学会総会, 横浜, 3 月 26-28 日, 2002.

2) 三森謙一, 清河信敬, 田口智子, 中島英規, 唐巍然, 藤本純一郎: Langerhance cell histhiocytosis および Langerhance cell における claudin の発現. 第 91 回日本病理学会総会, 横浜, 3 月 26-28 日, 2002.

3) 中尾浩史, 清河信敬, 竹田多恵, 藤本純一郎: 志賀毒素の標的細胞への結合に関する試み. 第 75 回日本細菌学会総会, 横浜, 4 月 4-6 日, 2002.

4) 片桐洋子, 清河信敬, 田口智子, 中島英規, 中尾浩史, 藤本純一郎: シガ毒素受容体 Gb3 の架橋刺激によるラフトを介した細胞内刺激伝達. 第 75 回日本細菌学会総会, 横浜, 4 月 4-6 日, 2002.

5) 田口智子, 清河信敬, 斎藤正博, 中島英規, 片桐洋子, 藤本純一郎: G-CSF は単球における LPS 受容体を介した刺激伝達を修飾しそのサイトカイン分泌を調節する. 第 75 回日本細菌学会総会, 横浜, 4 月 4-6 日, 2002.

6) 関野貴臣, 清河信敬, 田口智子, 古川漸, 藤本純一郎: 腎皮質上皮細胞におけるベロ毒素の細胞内逆行性輸送と NBTI によるその阻害に関する検討. 第 105 回日本小児科学会学術集会, 名古屋, 4 月 19-21 日, 2002.

7) 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎: 腎尿細管上皮細胞に対するベロ毒素の新たな細胞障害作用：毒素の結合によって誘導される細胞内刺激伝達をともなった細胞死. 第 37 回日本小児腎臓病学会学術集会, 神戸, 7 月 4-6 日, 2002.

8) 清河信敬, 中尾浩史, 藤本純一郎: 核酸輸送阻害財 nitorobenzylthio-inosine は Shiga toxin の細胞内逆行性輸送を阻害することによりその毒性を抑制する. 第 49 回毒素シンポジウム, 7 月 10-12 日, 岐阜, 2002.

9) 鈴木恭子, 清河信敬, 斎藤正博, 田口智子, 松井淳, 竹野内寿美, 唐巍然, 片桐洋子, 塩沢祐介, 藤村純也, 鈴木東洋, 藤田宏夫, 山城雄一郎, 藤本純一郎: G-CSF が単球のサイトカイン分泌に及ぼす作用に関する検討. 第 64 回日本血液学会総会, 横浜, 年 9 月 12-15 日, 2002.

10) 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎: B 前駆細胞抗原受容体を介した AKT の活性化. 第 64 回日本血液学会総会, 横浜, 年 9 月 12-15 日, 2002.

11) 鈴木恭子, 清河信敬, 田口智子, 松井淳, 塩沢祐介, 竹野内寿美, 唐巍然, 片桐洋子, 藤村純也, 鈴木東洋, 藤田宏夫, 山城雄一郎, 中島敏治, 斎藤博久, 斎藤正博, 藤本純一郎: G-CSF によって単球に誘導される分子発現に関する検討. 第 44 回日本小児血液学会, 東京, 10 月 18-19, 2002.

12) 田口智子, 清河信敬, 松井淳, 唐巍然, 竹野内寿美, 三森謙一, 江端智彦, 板垣光子, 片桐洋子, 中島敏治, 斎藤博久, 藤本純一郎: B 細胞分化における MAPK フォスファクターゼの成熟度依存的な発現. 第 44 回日本小児血液学会, 東京, 10 月 18-19, 2002.

13) 三森謙一, 清河信敬, 田口智子, 竹野内寿美, 松井淳, 唐巍然, 板垣光子, 片桐洋子, 宮内潤, 藤本純一郎:LCH 細胞およびヒト正常 Langerhance 細胞における claudin, occludin の発現. 第 44 回日本小児血液学会, 東京, 10 月 18-19, 2002.

14) 森鉄也, 清河信敬, 藤本純一郎: 単一施設で診断した小児 ALCL 例に対し選択された治療と転帰の後方視的解析. 第 44 回日本小児血液学会, 東京, 10 月 18-19, 2002.

15) 片桐洋子, 大見和宏, 田口智子, 唐巍然, 清河信敬, 藤本純一郎: ラフト／マイクロドメインを認識する単クローン抗体 Raft. 1. 第 75 回日本生化学大会, 京都, 10 月 14-17 日, 2002.

16) 田口智子, 清河信敬, 片桐洋子, 藤本純一郎: pre-B 細胞における AKT 刺激伝達系の活性化とその細胞死制御への関与に関する検討. 第 32 回日本免疫学会総会, 東京, 年 12 月 4-6 日, 2002.

17) 鈴木恭子, 清河信敬, 田口智子, 松井淳, 塩沢祐介, 唐巍然, 片桐洋子, 藤田宏夫, 山城雄一郎, 中島敏治, 斎藤博久, 斎藤正博, 藤本純一郎: G-CSF の単球のサイトカイン分泌に対する選択的調節機構に関する検討. 第 32 回日本免疫学会総会, 東京, 年 12 月 4-6 日, 2002.

18) 唐巍然, 塩谷順彦, 清河信敬, 田口智子, 竹野内寿美, 松井淳, 板垣光子, 江端智彦, 片桐洋子, 江口智子, 安江博, 高垣洋太郎, 藤本純一郎: ブタ T 細胞抗原受容体δ鎖に対する単クローン性抗体 7G3 の樹立とその解析. 第 32 回日本免疫学会総会, 東京, 年 12 月 4-6 日, 2002.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

バイオフラボノイドのヒト正常血液細胞への作用の検討に関する研究

分担研究者　山田　健人　慶應義塾大学・医学部・病理学教室・講師

研究要旨：　これまでに報告のない MLL 遺伝子関連の転座を持つ急性骨髄性白血病の細胞株を樹立、解析を行い、MLL 遺伝子の新規再構成様式を見いだした。ヒト骨移植免疫不全 NOD-SCID マウスにヒト白血病細胞やヒト正常血液系細胞を移植、生着させ、バイオフラボノイドを生体に投与した際のヒト造血細胞に対する作用を検討するモデル動物実験系を確立した。

A.　研究目的

小児白血病は、近年の治療法の進歩により約 70％が治癒可能である。しかし一部の小児白血病は治療抵抗性であり、その予後はいまだ不良である。特に乳児白血病に多い 11q23 染色体転座をもつ白血病は極めて予後不良であり、その細胞・分子レベルでの原因の解明と治療法確立のための疾患モデルの確立が急務である。さらに最近、フラボノイドが本遺伝子再編成に関わっている可能性が指摘され、その実態および機構を明らかにすることは、小児白血病の予防、診断、治療において極めて重要である。

われわれは最近、播種性血管内凝固症候群(DIC)を合併した 11q23 転座をもつ小児急性骨髄性白血病症例から、これまでに報告のない染色体転座 t(11;X)(q23;q24)を発見した(Leukemia Res 23:85-88,1999)。さらに本症例より白血病細胞株 KOPM88 を樹立したところ、この細胞株は症例同様の染色体転座を有していた。さらに本細胞株は、この症例における DIC の成因と考えられる細胞内一次顆粒を多数有しており、白血病が惹起する DIC の発生機序やモデルの作成を通じた治療の研究にきわめて有用であると考えられた。しかし、これまで免疫不全マウスを用いたヒト骨髄性白血病の疾患モデルは作成が困難であったが、われわれはヒト骨を NOD-SCID マウスへ移植することで、ヒト急性骨髄性白血病モデルの作成に成功した。

そこで本研究においては、以下を遂行することを目的とした。

1.　本症例における MLL 遺伝子の転座先の X 染色体遺伝子を同定し、全塩基配列を決定する。またこの新たな MLL キメラ遺伝子の発癌における機能を明らかにする。

2.　ヒト骨を移植した NOD/SCID マウスへ本白血病細胞株を移植し、新たな小児骨髄性白血病モデルを確立する。また白血病に合併する DIC モデルの確立を目指す。

3.　NOD/SCID マウスへ各種白血病細胞株および臍帯血幹細胞を移植し、フラボノイドを含む内分泌撹乱物質の投与後、ヒト血液細胞ならびに白血病細胞における MLL 遺伝子再構成の有無を検討する。

B.　研究方法

MLL 遺伝子の N 末および C 末に S1363 および LB140 コスミドプローブを作製し、前者を FITC、後者を PE でラベルし、KOPM88 細胞の FISH を行った。また、同細胞から抽出した RNA より合成した cDNA に対して、MLL の Exon 5, 6 に forward primer, Exon3 に 2 カ所に reverse primer を設定し nested-PCR を行なった。1st-PCR は forward primer (ML.3.1c: 5'-AGGAGA GAGTTTACCTGCTC-3'), reverse primer (ML.5.3: 5'-GGAAGTCAAGCAAGCAGTC -3'), 2nd-PCR は forward primer (ML.3.2c: 5'-ACACAGATGGATCTGAGAGG-3'), reverse primer (ML.6.1: 5'-GTCCAGAGC AGAGCA AACAG-3')を用いて行った。

KOPM88 白血病細胞株を 10%FBS 加 RPMI メディウムを用いて培養し、SCID マウスおよび NOD/SCID マウスに、2X107 の細胞を移植した（静注、腹腔内注入、皮下注の単独およびその組合せ）。さらに NOD/SCID マウスにヒト骨を移植したマウスに対して、移植骨内または静注により移植を行なった。NOD/SCID マウスに生着した KOPM88 白血病細胞をヒト血球に対する単クローン性抗体を用いたフローサイトメトリー解析により検出した。各種白血病細胞株および正常臍帯血幹細胞についても同様に移植し、その生着の確認を行った。

倫理面への配慮として、ヒト骨組織は慶応義塾大学病院における外科手術で得られているが、この研究に関しては同大学の倫理委員会の承認を得ている（平成１２年５月１０日）。正常骨髄および臍帯血由来幹細胞に関しては、インフォームドコンセントを得た上で市販されている細胞（米国 Clonetics 社製）を使用した。動物実験については実験動物管理委員会の承認を得ている。

C. 結果

1. FISH 法および RT-PCR によるによる MLL キメラ遺伝子の構造解析

MLL 遺伝子の N 末および C 末をそれぞれ FITC、PE でラベルしたプローブを用いて KOPM88 細胞の FISH を行ったところ、正常の MLL 遺伝子では両シグナルは重なるが、FITC と PE のシグナルの離解が認められ、MLL 遺伝子の内部に insertion あるいは duplication がある可能性を示唆した。

樹立した細胞株は FISH により MLL 遺伝子の tandem duplication あるいは insertion の可能性が高いと考えられたため、PT-PCR を行い検索した。MLL の Exon 5，6 に forward primer, Exon3 に 2 カ所に reverse primer を設定し nested-PCR を行なった結果、約 250bp と 450bp の 2 本の band が得られた。これらの 2 本の band を p-GEM T-vector にサブクローニングし、シークエンスをおこなった。その結果、MLL 遺伝子の Exon 8 と Exon 2 および Exon 6 と Exon 2 に 2 ケ所の切断点が明らかにり、この細胞株は MLL 遺伝子の tandem duplication を持つことが判明した。一方、G-banding 法では X 染色体との転座が疑われていた。したがって 11q23 が MLL の tandem duplication のみの異常であれば、X 染色体の異常は、Xq25 の欠失が推測された。

2. Hu-Bone SCID マウスを用いた新たな小児白血病モデルの確立

KOPM88 白血病細胞株を SCID マウスおよび NOD/SCID マウス、さらに NOD/SCID マウスにヒト骨を移植したマウスに対して移植し、移植後 50～70 日に末梢血と骨髄血を採取し、単核球を分離し抗ヒト CD13 および CD33 抗体を用いてフローサイトメトリーを用いて、白血病細胞の検出を試みたところ、白血病細胞の生着が認められた。さらに移植骨に radiation 照射（8Gy）を行なった後、白血病細胞を移植し、その移植骨髄への白血病細胞の移植を行なったところ、さらに白血病の発症までの期間が短縮した。

3. フラボノイドによるヒト血液細胞の生体内 MLL 遺伝子再構成

NOD/SCID マウスへ各種白血病細胞株および臍帯血幹細胞を移植し、フラボノイドの投与後、ヒト血液細胞における MLL 遺伝子再構成の有無を検討するための、予備的実験として、3Gy 照射 NOD/SCID マウスへ臍帯血幹細胞を移植し、ヒト造血をモニターした。その結果、4 ヶ月後においてマウス末梢血および骨髄にヒト白血球を 5-16%認めた。

D. 考察

1. FISH 法および RT-PCR によるによる MLL キメラ遺伝子の構造解析

MLL 遺伝子の tandem duplication をもつ細胞株を確立した。MLL 遺伝子の tandem duplication は、小児急性白血病のなかで最も多い遺伝子異常のひとつである。しかし、これまでに MLL 遺伝子の tandem duplication をもつ細胞株の報告はない。したがってこの細胞株は今後、MLL 遺伝子の

tandem duplication と白血病化のメカニズムを研究するうえで貴重な材料と考えられる。また KOPM88 細胞株は、株化後も一次顆粒に富んだ細胞質を保持しており、前骨髄球細胞株としても有用である。またこの分化形質は、MLL 遺伝子単独の異常では説明が困難であり、X 染色体の異常、おそらく Xq25 の欠失による可能性が高い。

2. Hu-Bone SCID マウスを用いた新たな小児白血病モデルの確立

リンパ性白血病や悪性リンパ腫は、SCID マウスへ移植することで全身に高度に浸潤する動物モデルが作成可能である。一方、骨髄性白血病はこれまでほとんど不可能であった。最近、NOD/SCID マウスを用いることで、骨髄性白血病モデルが可能になりつつあるが、このことは白血病治療や合併症の発症機構の解明・治療法の開発にとって必須である。特に DIC などの疾患群に代表される重篤な合併症は、生体モデルを用いることで初めて分子レベルでの解析が可能であり、そのためにも本モデルは極めて有用と考えられる。

3. フラボノイドによるヒト血液細胞の生体内 MLL 遺伝子再構成

臍帯血幹細胞を移植した NOD/SCID マウスへラボノイドを投与後、ヒト血液細胞における MLL 遺伝子再構成の有無を検討する系は、生体内でのフラボノイド代謝を含めた評価が出来る点で優れていると考えられる。この系において、マウス末梢血および骨髄にヒト白血球を 5-16%認めたことは、MLL 遺伝子の再構成頻度にもよるものの、PCR のみならず、FISH、フローサイトメーター、サザンブロット法でも再構成を解析しうる可能性を示しており、期待される。

E. 結論

これまでに報告のなかった、新たな MLL 遺伝子の再構成の様式を明らかにした。この新たな MLL キメラ遺伝子は、今後発癌における MLL 遺伝子の機能を明らかにする上で重要な材料と考えられる。また、ヒト骨を移植した NOD/SCID マウスを用いて、ヒトの正常造血環境や白血病細胞を再構築した実験モデルを確立した。この実験系は今後バイオフラボノイドを含む内分泌撹乱物質の生体への投与が造血系に与える作用について検討する上で非常に有用な実験系になることが期待される。

F. 健康危惧情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yuasa H, Takakura N, Shimomura T, Suenobu S, Yamada T, Nagayama H, Oike Y , Suda T. Analysis of human TIE2 function on hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. Biochem Biophys Res Commun 298:731-737, 2002.
2) Shibara R, Hashiguchi A, sakamoto J, Yamada T, Umezawa A, Hata J. Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms tumor. J Med Genetics 39:E83, 2002.
3) Zhao C, Hashiguchi A, Kondoh K,Du W, H. J, Yamada T. Exogenous expression of heat shock protein 90kDa retards the cell cycle and impairs the heat shock response. Exper Cell Res 275:200-214, 2002.
4) Kakimoto T, Hattori Y, Okamoto S, Sato N, Kamata T, Yamaguchi M, Morita K, Yamada T, Takayama N, Uchida H, Shimada N, Tanigawara Y, Ikeda Y. Thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma: Association of plasma concentrations of thalidomide and angiogenic growth factors with clinical outcome. Jpn J Cancer Res 93; 1029-1036, 2002
5) Sato N, Hattori Y, Du W, Yamada T, Kamata T, Kakimoto T, Okamoto S, Kawamura C, Kizaki M, Shimada N, Ote Y, Hata J, Ikeda Y. Elevated level of basic fibroblast growth factor in multiple myeloma correlates with increased disease activity. Jpn J Cancer Res 93:459-466, 2002.
6) Yamaoka T, Yoshino K, Yamada T, Yano M, Matsui T, Yamaguchi T, Moritani M, Hata J, Noji S, Itakura M. Transgenic expression of FGF8 and FGF10 induces transdifferentiation of pancreatic islet cells into hepatocytes and exocrine cells. Biochem Biophys Res Commun 292:138-43, 2002.
7) Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ohta T, Takeuchi T, Hata J, Kadowaki T, Koyasu S. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity to

intestinal parasites in Pik3r1 deficient mice. Nature Immunology 3:295-304, 2002.
8) Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Shirasaki Y, Kondo K, Yamada T Various amplification of direct PCR using Blood Samples. Clinical Laboratory 48: 377-384, 2002.
9) Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. J Immunology 170: 2170-2178, 2003.

2. 学会発表

1）山田健人，杜旻林，橋口明典，近藤健介，穂積信道，須田年生，秦順一：多発性骨髄腫における血管新生の機能解析．H. 第 91 回日本病理学会総会，横浜，3 月 26-28 日，2002．
2）杜旻林，橋口明典，穂積信道，韓旻昴，秦順一，山田健：ヒト骨髄ストローマ細胞を用いた腫瘍間質の生体内再構築人．第 91 回日本病理学会総会，横浜，3 月 26-28 日，2002．
3）橋口明典，趙沈，秦順一，山田健人：ストレス蛋白 HSO90 の細胞増殖抑制．第 91 回日本病理学会総会，横浜，3 月 26-28 日，2002．
4）浮山越史，秦順一，穂積信道，須田年生，山田健人，遠藤昌夫：In vivo ヒト神経芽腫血管新生モデル作製と遺伝子導入による血管新生抑制と腫瘍抑制効果．第３９回日本小児外科学会，東京，6 月 5-7 日，2002.
5) Hozumi N, Yasuda M, Morimura N, Watanabe N, Fujimaki R, Hata J, Yamada T, Tezuka K: Enhanced calcification and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells by Notch. The 5th Annual Meeting of The Tissue Engineering Society of International, Kobe, Dec. 8-10, 2002.

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
   無し
2. 実用新案登録
   無し
3. その他
   無し

厚生労働省研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

ヒト造血再構築マウスを用いたバイオフラボノイドの作用解析に関する研究

分担研究者　穂積　信道　東京理科大学・生命科学研究所・
生命工学技術研究部門・教授

研究要旨：　免疫不全 NOD-SCID マウスの皮下にヒト海綿骨を移植した。移植ヒト骨内では移植以前の組織像が維持されていた。またマウス脾臓の免疫組織学的検索で、多数のヒト由来の CD45$^+$, CD19$^+$, CD68$^+$細胞の定着が確認された。

A. 研究目的

バイオフラボノイド（ビタミンP）は健康食品等に多く含まれている。しかしバイオフラボノイドは乳児白血病で多く見られるMML遺伝子の再構成と極めてよく類似した変異を誘導することが報告されている。この分子の化学物質の in vivo における機能解明のためにはヒト造血系を再構築されたマウスモデルを確立する必要がある。本研究はヒト海綿骨を NOD-SCID マウスの皮下に移植し(HuBone-NOD-SCID マウス)、ヒト造血系を再構築する。さらにこのマウスモデルを用いて、バイオフラボノイドのヒト造血系細胞に対する効果を研究することを目的としている。

B. 研究方法

慶応大学病院で肺癌手術、心臓手術、あるいは大腿骨骨頭置換手術時に不要となる海綿骨 (5mm^3)を NOD-SCID マウスの皮下に移植する。移植後、４、５，６，８周後にマウスから移植骨を回収し組織学的解析を行う。これらのマウスから同時に脾臓を採取し、ヒト膜表面マーカーに特異的な抗体を用いてヒト造血細胞の定着を確認する。HuBone-NOD-SCID マウスのヒト骨に性の異なるドナーの骨髄細胞を移植し、性染色体特異的（X、Y）プローブを用いて移植骨髄細胞とドナー骨髄細胞を区別できる実験系を確立する。

倫理面への配慮として、ヒト骨組織は慶応義塾大学病院における外科手術で得られているが、この研究に関しては同大学の倫理委員会の承認を得ている（平成１２年５月１０日）。動物実験については実験動物管理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

骨移植後６周では組織学的検索により移植前の骨組織と同じ組織像であることが確認された。またマウスの脾臓を免疫組織化学的解析を行ったところ多数のヒトCD45$^+$, CD19$^+$, CD68$^+$細胞の定着が確認された。マウス骨とヒト骨を接触させて移植しておきマウス特異的プローブで Fluorescence in situ Hybridization (FISH)実験を行ったが、移植後いかなる時期においてもマウス細胞のヒト細胞への定着は７％を越えることはなくマウス・ヒトキメリズムは予想よりもはるかに低いことが明らかとなった。HuBone-NOD-SCID マウスのヒト骨（女性）にヒト CD34$^+$ 骨髄細胞（男性）を移植し、XあるいはY染色体特異的プローブを用いての FISH 実験で男性、女性由来の骨髄細胞を明確に区別できることが分かった。

D. 考察

ヒト難病発症機構の研究や新しい治療戦略の開発にはヒト病態動物モデルの開発が必須である。また本研究事業の目的であるバイオフラボノイドによる遺伝子再構成に対する作用機構の解析にはヒト造血細胞を用いての in vivo 実験が要求される。そこで我々は、ま

ずヒト造血系を NOD-SCID マウスで再構築する実験を試みた。ヒト骨髄細胞移植によるヒト造血系の再構築は困難で満足のいく成果は得られていない。そこで我々はヒト海綿骨をマウスの皮下に移植した。その結果、ヒト造血系細胞のマウス脾臓への定着やヒト造血系コロニー活性がマウス骨髄細胞で検出された。この成功は移植されたヒト骨髄がヒト造血系細胞の再構築に必要な微少環境を提供することによるものと思われる。本研究によりヒト造血系再構築が NOD-SCID マウスで可能になった。我々が開発した動物モデルは本研究事業のようなプロジェクトだけでなく遺伝子治療や造血系疾患の前臨床モデルとしても発展が可能であると期待される。

E. 結論

ヒト海綿骨を NOD-SCID マウスの皮下に移植することによりヒト造血系を再構築できることが分かった。マウス脾臓ではヒト造血系細胞の定着が確認され、さらにマウス骨髄細胞ではヒト由来の造血コロニー活性も確認された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nguyen H, Hay J, Gällinger S, Sandhu J, Hozumi N. Isolation of human single chain antibodies (scFv) against human TNF-a from human peripheral blood lymphocyte-SCID mice. Human Antibodies 11: 65-72, 2002.

2) Takamiya R, Murakami M, Goda N, Makino N, Kajimura M, Takamiya Y, Yamaguchi T, Ishimura Y, Hozumi N, Suematsu M. Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: An anti-inflamatory role. Am J Physiol 283: H861-H870, 2002.

2. 学会発表

1) 山田健人, 杜旻林, 橋口明典, 近藤健介, 穂積信道, 須田年生, 秦順一:多発性骨髄腫における血管新生の機能解析. 第 91 回日本病理学会総会, 横浜, 3 月 26-28 日, 2002.

2) 杜旻林, 橋口明典, 穂積信道, 韓旻昴, 秦順一, 山田健: ヒト骨髄ストローマ細胞を用いた腫瘍間質の生体内再構築人. 第 91 回日本病理学会総会, 横浜, 3 月 26-28 日, 2002.

3) 浮山越史,秦順一,穂積信道,須田年生, 山田健人,遠藤昌夫: In vivo ヒト神経芽腫血管新生モデル作製と遺伝子導入による血管新生抑制と腫瘍抑制効果. 第 3 9 回日本小児外科学会, 東京, 6 月 5-7 日, 2002.

4) Hozumi N , Yasuda M, Morimura N, Watanabe N, Fujimaki R, Hata J, Yamada T, Tezuka K: Enhanced calcification and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells by Notch. The 5th Annual Meeting of The Tissue Engineering Society of International, Kobe, Dec. 8-10, 2002.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

厚生労働省研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

家畜によるヒト胎児造血モデル作成と応用

分担研究者　安江　博　農林水産省・独立行政法人・農業生物資源研究所・
基礎研究部門ゲノム研究グループ　上席研究官

要旨　本研究で確立を目指す、免疫不全ブタ胎児を用いたヒト造血再構築モデル確立のための準備実験として、ブタ免疫系分子の遺伝子情報に関する検討を行った。ブタ IL-16 および IL-2 受容体γ鎖遺伝子を単離解析し、ブタγ/δT 細胞の cDNA ライブラリーを構築して約3000クローンの遺伝子配列の決定を行った。

A. 研究目的

乳児白血病の発症は、胎児期に母親が接取したトポイソメラーゼ II の抑制物質により引き起こされる MLL 遺伝子の変異と密接に関連していることが示唆されている。バイオフラボノイド（BFN）は健康食品に多く含まれが、培養細胞レベルではトポイソメラーゼ II を抑制し、白血病で認められるものと同じ MLL 遺伝子の変異を起こすことが報告されている。一方、ブタは最近ヒト疾患のモデル動物として、また再生医療、異種移植に不可欠な動物として注目を集めている。そこで本研究では、妊娠免疫不全ブタをモデル動物として、その胎児にヒト造血系を再構築し、母体の BFN 摂取が胎児の造血系に及ぼす作用を解析することを最終的な目標とする。この免疫不全ブタは現在他の研究費による研究において作成中であるが、次年度中には本研究における使用が可能となる見込みである。そこで初年度は、免疫不全ブタを解析する上で重要なブタ免疫系分子の遺伝子に関する情報の解析を行った。

B. 研究方法

ブタの免疫系がヒトとどの程度相同かを免疫系に関わる遺伝子を解析して調べる。本年度は、炎症のキー遺伝子の１つである、IL-16 の遺伝子について解析をおこなった。ブタリンパ球由来の完全長ｃＤＮＡライブラリーから、ヒト IL-16 と相同性のあるクローンを選択し、その配列の解析を行った。また、その異常が免疫不全の原因となるIL-2受容体γ鎖（common-γ鎖）についてブタの同遺伝子を単離、解析した。さらに、ブタγ/δT 細胞を分離してその cDNA ライブラリーを構築し、同細胞に発現する遺伝子について解析を行った。

C. 結果

IL-16 は、1982 年に Center と Cruikshank によって発見された T 細胞の化学遊走物質である。IL-16 は、喘息、リウマチ関節炎、全身性エリテマトーデス（紅斑性狼蒼）、大腸炎、アトピー皮膚炎および多発性硬化症などを発症している患部において高頻度に検出され、これらの症例との関連性を明らかにしようと研究が行われている。また、IL-2 レセプター、HLA-DR 発現、T cell レセプター/ CD3 依存型活性化の上方制御や HIV-1 ウイルスの転写抑制にも関わっている。

本年度はブタ IL-16 の cDNA を含むクローンを選択し配列解析を行った。その結果、ヒトではコーディング領域が１８９３bp であるのに対して、ブタでは、１９０８bp であった。相同性は８０％以上であった。この推定アミノ酸配列は 635 アミノ酸（推定分子量 MW=67,177）でヒト、マウスなどのものと高い相同性を示した。また、IL-16