

厚生労働科学研究費補助金
食品安全確保研究事業

バイオフィ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15年度 総括研究報告書

主任研究者 清 河 信 敬

平成16 (2004) 年 3 月

目 次

I	総括研究報告	
	ハイオフラホノイト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	ハイオフラホノイトのヒト造血細胞への作用の検討に関する研究	-----12
	清河 信敬	
2	ハイオフラホノイトのヒト正常血液細胞への作用の検討に関する研究	-----18
	山田 健人	
3	ヒト造血再構築マウスを用いたハイオフラホノイトの作用解析に関する研究	-----21
	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	-----24
	安江 博	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	-----26
IV	研究成果の刊行物・別刷	-----29

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
総括研究報告書

ハ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)がそのトポイノメラーゼ 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。本年度は種々の培養ヒト正常細胞に対する BFN の MLL 遺伝子切断作用についてサザンブロット解析を行うとともに、より高感度な遺伝子再構成検出法の確立を行った。また、培養細胞株を用いて BFN の MLL 遺伝子再構成誘導によって生じるキメラ遺伝子のパートナー遺伝子の探索を試みた。一方、初年度に確立した“免疫不全マウスを用いたヒト造血系再構築モデル”をさらに改良するとともに、これにヒト造血系細胞を移植して BFN の効果を検討する実験を開始した。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か、その解析手段として重要な抗ブタ白血球単クローン性抗体の作成と解析、ならびにブタ免疫関連遺伝子の単離、同定と解析を引き続き行った。

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、母体のトポイノメラーゼ(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ハイオフラボノイド(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。

本年度は1) BFN の種々の正常血液系細胞および培養細胞に対する遺伝子切断効果の解析、ならびに遺伝子再構成によって生じるキメラ遺伝子探索を行うとともに、2) “免疫不全マウスを用いたヒト造血系再構築モデル”をさらに改良してこれにヒト造血系細胞を移植し、BFN の

生体への投与にともなう血液系細胞への効果の検討実験を開始し、3) “妊娠した免疫不全ブタを用いたヒト胎児造血系再構築モデル”の確立ならびにその解析に向けた準備実験の実施を目的とした。

B 研究方法

1 試験管内培養によるヒト骨髄幹細胞からの正常造血細胞の分化誘導

骨髄幹細胞を Flt3 ligand および SCF 添加 3 日間培養し、未熟骨髄球系細胞として用い、M-CSF+IL3+IL6+SCF 添加 4 週間培養し、単核系細胞として用いた。また、マウス骨髄間質細胞株 MS-5 との共培養により B 前駆細胞を分化誘導した。巨核球は TPO 添加培養により分化誘導した。

2 ササンフロント解析

各細胞に Flavone 等の BFN を 16 時間添加培養後、ゲノム DNA を抽出した。PCR で増幅した MLL 遺伝子の Break point cluster 領域(BCR)約 8kb を含む 5'領域、3'領域のそれぞれの断片をプローブとして用いてササンフロント解析を行った。

3. FISH 解析

各細胞に Flavone 等の BFN を 16 時間添加培養後、サイトスピンドットを作成し、MLL 遺伝子の 5'側の断片を FITC で、3'側の断片を TRITC でそれぞれ標識した混合プローブを用いて、FISH 解析を行った。

4 PCR による既知の MLL 融合遺伝子の検出

これまでに TopoII 抑制剤の作用によって誘導されたと報告されている MLL 遺伝子の再構成による融合遺伝子のノックエンス情報に基づき PCR プライマーを合成し、BFN 処理した培養細胞株 BV173 の核 DNA に対する PCR を行った。

5. ligation-mediated PCR

抽出した核 DNA を BamHI で消化して断端を DNA ポリメラーゼ klenow fragment により平坦化したのち、自己結合を防ぐため子牛小腸由来アルカリフォスファターゼによって脱リン酸化した。この断片に、ノックアウトヘクターのマルチクローニングサイトの配列に由来するアダプターを T4 ライゲースにより結合した後、MLL

遺伝子 BCR 近傍の 5'側の配列とアダプター内の配列をプライマーとして PCR を行い、増幅された遺伝子断片を T-ヘクターに TA-クローニングし、大腸菌コンピテント細胞に導入、クローン化するとともに増幅、精製して、各クローンに挿入された遺伝子断片の配列を T-ヘクタープライマーを用いたノックエンスにより決定した。

6. NOG 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 10%FBS 加 RPMI 培地を用いて培養し NOG 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。移植後 30~70 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。また、白血病浸潤に合併する DIC モデルを確立する目的で、本細胞株に種々のサイトカインを添加して分化マーカーの発現変化や増殖におよぼす影響について検討した。

7 フラホノイドによるヒト血液細胞の生体内 MLL 遺伝子再構成

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、1-3Gy 照射 NOG および NOD/SCID マウスへ各種ヒト白血病細胞株およびヒト造血幹細胞を移植し、フラホノイド類 (Fisetin, Flavone, Quercetin, Luteolin) の連続投与後、ヒト造血細胞を抗ヒト血球抗体を用いた蛍光染色により、フローサイトメトリー解析でモニターした。

8 アポトーシス細胞の検出

BFN 投与 24 時間後の細胞について、以下の方法でアポトーシス細胞を検出した。

- 1) 蛍光標識 Annexin V を反応させ、結合細胞を FCM により検出した。
- 2) MitoCapture を用いて、ミトコントリア膜透過性の変化した細胞を FCM により検出した。

3) 核 DNA を抽出してアガロース電気泳動を行い、その断片化を検出した。

4) 細胞を70%エタノールで固定してプロピウムイオダイドで核DNAを染色し、FCMにより核DNA含有量を測定してsub-diploid細胞を検出した。

9 単クローン性抗体の作成

ブタ末梢血白血球を免疫源として常法により 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。

10 ブタ IL-16 遺伝子のゲノム構造解析およびブタ γ/δ T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの解析

当該遺伝子を含む BAC クローンをスクリーニングし、ブタ IL-16 遺伝子の配列とゲノム構造を明らかにした。この結果を基に、ヒト、マウスの当該遺伝子のゲノム構造と比較した。また、昨年度から進めているブタ γ/δ T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの解析を継続して行った。得られた成果を基に、pre-Tcell receptor alpha-chain precursor の全 cDNA 配列を決定した。

11 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、インフォームト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、インフォームト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 細胞株への BFN 投与実験

初年度に、Flavone 等の一部の BFN がヒト B 前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病(ALL)細胞株 BV173 に対して MLL 遺伝子の切断を誘導することがサザンブロットで確認されたことから、BFN および細胞株の種類を増やし、同様の確認を行った。Strick らの報告に一致して、BFN による MLL 遺伝子の切断には一定の選択性があり、赤白血病細胞株 K562 等ではこれを認めなかった。

サザン解析では、MLL 遺伝子の切断は確認できるか、他の遺伝子との再構成によって生じる融合遺伝子については検索することができない。そこで、他の方法を用いた検討を行った。まず、BV173 に対して MLL 遺伝子の BFN による遺伝子切断点分布領域 Breakpoint cluster region (BCR) の 5'側と 3'側をそれぞれ異なる波長の蛍光色素でラベルしたプローブを用いた FISH 法による解析を行ったか Flavone 投与による γ/δ T 細胞の解離を認めなかった。従って、大部分の細胞では BFN によって MLL 遺伝子の切断が起こっても、その完全な解離は起こらずに、そのまま近傍に存在している可能性が示唆された。また、これまでに報告されている MLL 融合遺伝子についてプライマーを作成し、Flavone を投与後の BV173 核 DNA に対して PCR を行ったか、検索した範囲では遺伝子断片の増幅を認めなかったことから、既知の融合パートナーとの遺伝子再構成は起こっていない可能性が示唆された。

そこで、BFN による MLL 遺伝子の切断の断端の遺伝子配列を確認するとともに、新規パートナー遺伝子との遺伝子再構成の検出およびその発生頻度の検討が可能な方法として、ligation-mediated (LM-) PCR 法の確立を行った。TopoII 抑制剤による MLL 遺伝子の切断の BCR は BamHI による 8.2kB 断片の 5'側から約 7kB の位置に限定されていることから、研究方法の項に記載したごとく核 DNA を BamHI で消化した後、切断端を平坦化 アルカリフォスファターゼ処理してアダプターを

ligation し、BCR 近傍 5'側のプライマーとアダプター内の配列のプライマーで PCR を行い、増幅された遺伝子断片を T-vector にクローニングしてノークエンニングを行うことにより BCR における切断の有無および他の遺伝子との組み替えの有無が同時に解析可能であり、多数のクローンを解析することによってその発生頻度を明らかにすることができる。BFN 処理前の BV173 細胞を用いた予備実験により MLL 遺伝子の BamHI による 82kB 断片の BCR 近傍領域の特異的増幅が確認されたことから、BFN 処理細胞を用いた検討を開始した。現在、T-vector クローンのノークエンニングを順次行っている。

2 正常ヒト造血細胞への BFN 投与実験

細胞株での実験結果に基づき、初年度に確定した培養方法を用いて骨髓幹細胞から種々の血球を分化誘導し、このうち、回収細胞数が多かった未熟骨髓球および成熟単球系細胞について Flavone、Luteolin 等の BFN を投与して MLL 遺伝子のサザンブロット解析を行った。この結果、前者では BFN による MLL 遺伝子の切断が認められるのに対して、後者ではこれを認めず、培養細胞株の場合と同様に一定の選択性があることが示唆された。そこでさらに、前述の LMP 法を用いて MLL 遺伝子の切断の頻度について検討するとともに、新規パートナー遺伝子の探索を含めた遺伝子再構成による融合遺伝子の検出およびその頻度の検討を行っている。

また、B 前駆細胞、巨核球等の他の系統の造血細胞については、最終的に細胞ソーティングにより純化した場合に得られる細胞数が非常に少ないため、サザンブロット解析は行わずに、先に LMP 法により解析することとし、現在そのサンプルを調製中で 順次ノークエンニングを行う予定である。

3 NOG 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 NOG マウスおよび NOD/SCID マウスに移植し 30~70 日後に末梢血と骨髓血の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結果、NOG マウスへ移植した場合、NOD/SCID マウスへ移植した時よりも、より早期 (30 日後) にヒト白血病細胞の出現が認められた。さらに移植骨に放射線照射 (8Gy) を行なった場合には、その移植骨髓への白血病細胞の出現までの期間が短縮した。

また、ヒト骨組織を移植した NOD/SCID マウス (HuBone/NOD-SCID マウス) の移植ヒト骨へ乳癌細胞を移植した後、2 周から 28 周まで時間を追って腫瘍の増殖と病理組織像を解析したところ、移植ヒト骨組織内で乳癌細胞の増殖を認め、抗ヒト CD34 抗体を用いた免疫組織学的染色によりヒト血管内皮細胞の極めて活発な増殖が確認され、抗ヒト CD68 抗体によりヒト破骨細胞の分化と骨吸収像が観察された。しかし抗マウス CD34、CD68 抗体では陰性であった。この結果から、悪性腫瘍血管新生と破骨細胞の分化はヒト由来のものであることが確認された。またこれらの病理像はマウス骨ではみられなかった。活発な血管新生と破骨細胞増殖がみられたので Matrix Metalloproteinase (MMP) を抗 MMP 抗体による免疫組織学染色とザイモグラムにより同定した。これらの実験から MMP-2、-3、-10 が確認された。血管新生には $\alpha v \beta 3$ インテグリンの関与が知られている。悪性腫瘍に対して、血管新生阻害を標的にした治療法が最近注目を浴びている。この方法は化学療法と異なり副作用が少ない。抗ヒト $\alpha v \beta 3$ モノクローナルキメラ抗体 (7E3 この抗体の v 領域はヒト、 C 領域はマウスから成る) を使用して血管新生阻害により乳癌細胞増殖を阻止できるかどうか検討した。この抗体はヒトインテグリンに特異性がみられマウスインテグリンは認識しないことが分かっている。乳癌細胞を移植された HuBone/NOD-SCID マウスの腹腔内に 7E3 抗体とコントロール抗体を每周 1 回、5 週間継続して投与した。経時的に腫瘍を回収し、重量、サイズを計測すると共に病理組織学的にも解析した。コントロー

ル抗体投与群と比較して 7E3 キメラ抗体投与群では、腫瘍の重量は 1/3 分の 1 に減少していた。以上の結果から、NOD/SCID マウスへのヒト組織/細胞移植によって、様々なヒト組織の in vivo モデルを確立できる可能性が示された。

また、白血病浸潤に合併する DIC モデルを確立する目的で、KOPM88 細胞株の増殖・分化におよぼすサイトカインの影響について検討した。その結果、TNF-alpha, GM-CSF, M-CSF により、分化マーカーである myeloperoxidase, neutrophil elastase, MAC387 の発現誘導が認められ、G-CSF では発現低下が見られた。そこで、現在、TNF-alpha, GM-CSF, M-CSF により分化誘導した本細胞を NOG マウスへ移植後、DIC の発症について観察している。

4 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

NOG および NOD/SCID マウスへ各種ヒト白血病細胞株およびヒト造血幹細胞を移植し、フラボノイド類 (Fisetin, Flavone, Quercetin, Luteolin) の連続投与後、ヒト造血をモニターしており、現在のところ、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 3-22% 認めている。

5 BFN による培養白血病細胞および正常造血系細胞のアポトーシス誘導の検討

上記 1 の研究の過程で BV173 細胞を BFN 処理すると細胞死が誘導されることか観察された。そこで、種々の細胞株と BFN の組み合わせで、Annexin V の結合、sub-diploid 細胞の検出、ミトコンドリア膜透過性の変化、核 DNA の断片化等により検討したところ、Flavone 等の BFN が BV173 を始めとする特定の細胞株にアポトーシスを誘導することが明らかとなった (論文準備中)。この結果は以下の 2 つの観点から重要と考えられる。

1) 最近、TopoII 抑制剤による遺伝子再構成がその TopoII 抑制作用に直接起因するものではなく、アポトーシス誘導に伴った核 DNA の切断によるものであるとする報告があり、BFN によるアポトーシス誘導が MLL 遺伝子の切断に関与している可能性がある。

2) この現象は BFN の持つ抗癌作用に一致するものと考えられるが、アポトーシス誘導が癌細胞のみでなく正常血球にも起こるとすれば、遺伝子再構成誘導作用とは別に、その食品添加物としての安全性に問題が生じることが予想される。

そこで、骨髄幹細胞から分化誘導した未熟骨髄球系細胞および B 前駆細胞に対する BFN によるアポトーシス誘導について検討したところ、いずれの細胞にも一定の割合でアポトーシスが誘導されることか明らかとなった。今後前述の 2 点に関し、さらに詳細な検討を行っていく。

6 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

本研究では母体か 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おり、そのためのブタ免疫系解析の手段としてのブタ血球に対する MoAb の作成と解析を行っている。本年度は、新たに $\gamma\delta$ T 細胞のサブセットを認識する 3E12 およびブタ MHC class I を認識する 4G8 抗体を同定した。前者は T 細胞亜群分布の解析に有用であり、また後者はブタにヒト血球を移植した際のキメリズム解析に応用可能である。特に、4G8 と抗ヒト CD45 抗体を組み合わせることにより、ヒトおよびブタ白血球を種々の割合で混合した場合に 0.5% までのキメリズムの検出が可能であった。

7 ブタ IL-16 遺伝子のゲノム構造解析およびブタ γ/δ T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの解析

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テス (紅斑性狼瘡)、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する研究が行われている。本年度はブタ IL-16 遺伝子のゲノム構造の解析を、当該遺伝子を含む BAC

クローンを用いて行い、19454 塩基の配列を決定した。この配列と昨年度決定した cDNA 配列との比較から、ブタ IL-16 遺伝子は7つのエクソンから構成されていることがわかった。ヒト、マウス IL-16 遺伝子も同様に7つのエクソンから構成されており、同じ構造であることが判った。イントロン領域に存在する分散型反復配列(SINE, LINE)を検索し、ブタ、ヒト、マウスで比較したところ、分散型反復配列がゲノムのほぼ同じ場所にブタとヒトに共通して存在することか明らかとなった。しかしながら、マウスには、それらの配列は認められないことから、IL-16 遺伝子構造から判断する限り、ヒトとマウスとの遺伝的関係より、ヒトとブタとの遺伝的関係の方が近いことか示唆された。

本年度は昨年度に引き続き、ブタ γ/δ T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーから新たに 2000 クローン解析し、計約 5000 クローンの配列データを得た。これを基に、pre-Tcell receptor, alpha-chain precursor の全 cDNA 配列を決定した。pre-Tcell receptor, alpha-chain precursor cDNA の翻訳領域は、684 塩基からなり、pre-Tcell receptor, alpha-chain precursor は 228 アミノ酸から構成されていることが示された。翻訳領域の塩基配列レベルでのヒトとの相同性は 70% であった。アミノ酸レベルの相同性は 68% であった。同様に、ヒトとマウスとの相同性は、塩基レベルで 77%、アミノ酸レベルで 76% であることから、ヒト-マウスの遺伝的近縁度はヒト-ブタのそれより高いと判断される。この結果は、common- γ 鎖及び IL-16 遺伝子の解析結果とは対立しているように思われる。しかしながら、詳細に検討すると、領域(トメイン)によって相同性が大きく異なっており、平均的相同性からは、遺伝的距離を求めることに問題があると思われる。

D 考察

1 細胞株への BFN 投与実験

昨年に引き続き、細胞株を用いて BFN による MLL 遺伝子再構成誘導作用の詳細についての解析を行った。この結果、BFN

による MLL 切断は特定の細胞株にのみ起こる可能性が示唆され、また Fish 法や RT-PCR 法による解析では、切断後の遺伝子再構成は検出されなかったことから、MLL 遺伝子の切断が起こっても、さらに他の遺伝子との再構成にいたる頻度は非常に低い可能性が考えられる。この点に関しては、より感度の高い LM-PCR や RT-PCR によってさらに詳細な検討を行う必要がある。

2 正常ヒト造血細胞への BFN 投与実験

培養系において分化誘導した種々の正常血球に対する BFN の MLL 遺伝子切断作用について検討した結果、その作用には一定の細胞選択性が存在する可能性が示唆された。今後、さらに多様な血球に対する BFN の効果について解析し、どのような細胞に MLL 遺伝子切断が生じやすいのか明らかにするとともに、上記培養細胞株と同様に LM-PCR や RT-PCR による遺伝子再構成の詳細に関する検討を行う必要がある。

3 NOD/SCID マウスを用いた新たな小児白血病モデルの確立

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ホノイト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。そこで昨年度、我々はヒト骨-造血系を NOD-SCID マウスで再構築する実験を試みた。これまでモデル動物へのヒト骨髓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かったが、我々はヒト海綿骨をマウスの皮下に移植することによって、同組織中にヒト造血系細胞が定着し、またヒト造血系コロニー活性がマウス骨髓中に検出されることを確認した。以上の結果は、移植されたヒト骨髓が NOD-SCID マウス生体内で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を示すと思われる。本年度の研究成果はこれをさらに発展させ、リンパ性白血病や悪性リンパ腫か、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ことを確認した。一方、骨髄性白血病の移植はこれまでほとんど不可能であったが、今回 NOD/SCID マウスを用いることで、骨髄性白血病モデル作成が可能であることを確認した。さらに NOG マウスは浸潤がより早く見られることから、より簡便なモデルとして期待できる。この早期の発症は治療や合併症の発症機構の解明 治療法の開発にとっても重要と思われた。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。また、NOD-SCID マウスに移植したヒト骨組織がヒト乳癌細胞の生存 増殖を支持する環境を提供することを明らかにした。この結果は、NOD-SCID マウスへのヒト組織移植系が、様々なヒト組織の *in vivo* 実験モデル確立に応用可能である可能性を示しており、今後、ハイオフラホノイトの造血系以外のヒト体細胞に対する遺伝子再構成誘導作用に関する検討や、MLL 遺伝子再構成に起因する白血病細胞の治療モデルの確立、等の研究への発展が期待される。

4 フラホノイドによるヒト血液細胞の生体内MLL遺伝子再構成

造血幹細胞を移植した NOG マウスおよび NOD/SCID マウスへフラボノイトを投与後、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ト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 3-22%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。

5 BFN による培養白血病細胞および正常造血系細胞のアポトーシス誘導の検討

今回の検討から、BFN が血液系細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかになった。この作用は、従来から言われている BFN の抗癌作用に関係するも

のと推定されるか、遺伝子再構成作用との関連も含めて、その分子機構についてさらに詳細に検討する必要がある。また、今回の検討で、BFN が一部の正常血球に対してもアポトーシスを誘導する可能性が示唆されたことは、遺伝子再構成誘導作用とはまた別の観点から、その食品添加物としての安全性について検討する必要性を示すものと考えられる。

6 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、これまでに多数のクローンを得ている。今回新たに同定した $\gamma\delta$ T 細胞のサブセットを認識する 3E12 およびブタ MHC class I を認識する 4G8 抗体は、いずれも本研究で確立をめざす免疫不全ブタへのヒト血球移植モデルの解析に有用である。また、最近移植医療において新たな臓器供給源としてブタが注目されており、今後幅広い医療分野においてこれらの抗体の研究ツールとしての有用性が高まることが期待される。

7 ブタ IL-16 遺伝子のゲノム構造解析およびブタ γ/δ T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの解析

common- γ 鎖及び IL-16 遺伝子のゲノム構造は、これまでの知見、すなわち、ブタとヒトとの類似性はマウスとヒトとのそれより高いことを支持している。しかしながら、pre-Tcell receptor alpha-chain precursor の翻訳領域における配列の相同性で見ると、種の類似性は上記と逆のことが示唆された。本研究で同定された翻訳領域はトメインによる類似性の差異が顕著なことから、今後、各動物種における pre-Tcell receptor alpha-chain precursor の機能的な差異も視野に入れて検討していく必要があると考えられる。

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たさねばならな

いが、現時点では BFN の MLL 遺伝子切断作用については細胞培養系で確認されているものの、さらに他の遺伝子との再構成が誘導される頻度は非常に低い可能性が考えられる。一方、今回の検討で BFN の血球系細胞に対するアポトーシス誘導作用が明らかとなり、別の観点からの摂取の安全性に対する検討も必要と考えられる。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。現時点では、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。また、これまでに樹立した“免疫不全マウスを用いたヒト造血系再構築モデル”は、造血組織のみならず種々のヒト体細胞の移植-再構築に応用可能であることが明らかとなり、今後 BFN のみならず様々な食品添加物や化学物質の安全性評価へ応用可能と考えられ、厚生労働行政に大きく貢献することが期待される。また、本研究では“妊娠した免疫不全ブタを用いたヒト胎児造血系再構築モデル”の準備実験としてブタ血球に対する単クローン性抗体の作成と解析や、ブタ免疫関連遺伝子の単離-同定と解析を行っているが、最近新たな移植臓器供給源としてブタが注目されていることから、この研究成果は今後再生医療の分野でも有用性が高くなるものと期待される。

F 健康危険情報

該当事項なし

G 研究発表

1 論文発表

1) 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

- 2) Mimori 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 17 1164-1174, 2003
- 3) 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 121 94-96, 2003
- 4) Furusawa T, Hosoe M, Ohkoshi K, Takahashi S, Kiyokawa N, Fujimoto J, Amemiya H, Suzuki S, Tokunaga T Catalytic RAG1 mutants obstruct V(D)J recombination in vitro and in vivo Mol Immunol 39 871-878 2003
- 5) 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 23 101-111, 2003
- 6) Ohtomo Y, Kawamura R, Kaneko K, Yamashiro Y, Kiyokawa N, Taguchi T, Mimori K, Fujimoto J Nephrotic syndrome associated with human parvovirus B19 infection Pediatr Nephrol 18 280-282, 2003
- 7) Mori T, Sugita K, Kimura K, Fuke T, Miura T, Kiyokawa N, Fujimoto J Isolated central nervous system (CNS) relapse in a case of childhood systemic anaplastic large cell lymphoma without initial CNS involvement J Pediatr Hematol Oncol 25 975-977, 2003
- 8) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang WR, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma Mod Pathol (in press)
- 9) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang WR, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Katagiri YU, Okita H, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J Characterization of a Shiga-toxin 1-resistant Stock of Vero cells Microbiol Immuno (in press)
- 10) Fukuma M, Abe H, Okita H, Yamada T, Hata J Monoclonal antibody, 4C4-mAB, specifically recognizes keratan sulfate proteoglycan on human embryonal carcinoma cells J Pathol 201 90-98, 2003
- 11) Yajima K, Hirose H, Fujita H, Seto Y,

- Fujita H, Ukeda K, Kawai T, Yamamoto Y, Yamada T, Saruta T Effects of combination therapy with peroxisome-proliferator-activated-receptor (PPAR) gamma and PPAR alpha agonists on food intakes, body weight change, metabolic parameters, and glucose-stimulated insulin secretion in C57BL/6J and db/db mice *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284 E966-971, 2003
- 12) 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 Immunol* 170 2170-2178 2003
- 13) Matsushita K, Okita H, Suzuki A, Shimoda K, Fukuma M, Yamada T, Urano F, Honda T, Sano M, Iwanaga S, Hata J, Umezawa A Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene *Mol Cell Endocrinol* 203 105-116 2003
- 14) Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, Hata J Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor *Pathol Int* 53 214-220, 2003
- 15) Yoshinouchi M, Yamada T, Kizaki M, Fen J, Koseki T, Ikeda Y, Nishihara T, Yamato K In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by e6 siRNA *Mol Therapy* 8 762-768, 2003
- 16) Du W, Hattori , Hashiguchi A, Kondoh K, Hozumi N, Ikeda Y, Sakamoto M, Hata J, Yamada T Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment *Pathol Int* (in press)
- 17) Baba T, Fusaki N, Shinya N, Iwamatsu A, Hozumi N Actin tyrosine dephosphorylation by the Src homology 1-containing protein tyrosine phosphatase is essential for actin depolymerization after mIgM cross-linking *J Immunol* 170 3762-368 2003
- 18) Fujii Y, Wakahara S, Nakao T, Hara T, Ohtake H, Komurasaki T, Kitamura K, Tatsuno A, Fujiwara N, Hozumi N, Ra C, Kitamura D, Goitsuka R Targetting of MIST to Src-family kinases via SKAP55-SLAP-130 adaptor complex in mast cells *FEBS Lett* 540 111-116, 2003
- 19) Baba T, Fusaki N, Shinya N, Iwamatsu A, Hozumi N Myosin is an in vivo substrate of the protein tyrosine phosphatase (SHP-1) after mIgM cross-linking *Biochem Biophys Res Comm* 304 67-72, 2003
- 20) Watanabe N, Tezuka Y, Matsuno K, Miyatani S, Morimura N, Yasuda M, Fujimaki R, Kuroda K, Hiraki Y, Hozumi N, Tezuka K Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch *J Bone Miner Metab* 21 344-352, 2003
- 21) Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species *Cancer Res* (in press)
- 22) Fujiwara N, Fusaki N, Hozumi N CD72 stimulation modulates anti-IgM induced apoptotic signaling through the pathway of NF- κ B, c-Myc and p27Kip1 *Microbiol Immuno* (in press)
- 23) Sugiyama S, Kohyama M, Oda M, Azuma T, Wither JE, Hozumi N Molecular basis of antigen recognition by insulin specific T cell receptor *Immunol Lett* (in press)
- 24) Hiraiwa H, Sawazaki T, Suzuki K, Fujishima-Kanaya N, Toki D, Ito Y, Uenishi H, Hayashi T, Awata T, Yasue H Elucidation of correspondence between swine chromosome 4 and human chromosome 1 by assigning 27 genes to the ImpRH map, and development of microsatellites in the proximity of 14 genes *Cytogenet Genome Res* 101 84-89, 2003
- 25) Tanaka M, Matsumoto T, Yanai S, Domukai M, Toki D, Hayashi T, Kiuchi S, Yasue H, Uenishi H, Kobayashi E, Awata T Conservation of the synteny between porcine chromosome 7 and human chromosomes 6, 14 and 15 demonstrated by radiation hybrid mapping and linkage analysis *Anim Genet* 34 255-263, 2003
- 26) Uenishi H, Hiraiwa H, Yamamoto R, Yasue H, Takagaki Y, Shiina T, Kikkawa E, Inoko H, Awata T Genomic structure around joining segments and constant regions of swine T-cell receptor alpha/delta (TRA/TRD) locus *Immunology* 109 515-526, 2003
- 27) Bosak N, Faraut T, Mikawa S, Uenishi H, Kiuchi S, Hiraiwa H, Hayashi T, Yasue H Construction of a high-resolution comparative gene map between the swine chromosome 6 precentromeric region and human chromosome 19 q-arm with RH mapping of 51 genes *Cytogenet Genome Res* 102 109-115, 2003
- 2 学会発表
- 1) 片桐洋子, 竹野内寿美, 田口智子, 瀧河信敬, 藤本純一郎 新たに樹立した単クローン性抗体 Raft1 を用いた GTP タンパク β 鎖の細胞内局在の検討 第 92 回日本病理学会総会, 福岡, 4 月, 2003
- 2) 片桐洋子, 竹野内寿美, 田口智子, 瀧河信敬, 藤本純一郎 抗ラフトクローン性抗体を用いた Six の結合による細胞内刺激伝達の解析 第 76 回日本細

- 菌学会総会, 熊本, 4月, 2003
- 3) 竹野内寿美, 田口智子, 片桐洋子, **清河信敬**, 奥田圀爾, 藤本純一郎 Stx B サブユニットの結合による actin 細胞骨格の再構成の誘導 第 76 回日本細菌学会総会, 熊本, 4月, 2003
 - 4) **清河信敬**, 田口智子, 三森謙一, 藤本純一郎 副刺激受容体による CD20 誘導性アポトーシスの調節 第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会, 大阪, 8月, 2003
 - 5) 田口智子, 竹野内寿美, **清河信敬**, 藤本純一郎 ヘロ毒素受容体 Gb3 は腎尿管上皮系細胞において細胞骨格の再構成にかかわる細胞内への刺激を伝達する 第 38 回日本小児腎臓病学会学術集会 東京, 7月, 2003
 - 6) **Kiyokawa N**, Takenouchi H, T Taguchi, Y Katagiri, Fujimoto Intercellular signaling events in target cells mediated by binding of Shiga toxin The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 8月, 2003
 - 7) 田口智子, **清河信敬**, 藤本純一郎 B 細胞初期分化における IGF および IGF binding protein の役割 第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会 大阪, 8月, 2003
 - 8) 田口智子, **清河信敬**, 鈴木恭子, 中島敏治, 斎藤博久, 藤本純一郎 網羅的遺伝子発現解析による小児 B 前駆細胞性急逝リンパ芽球性白血病の特性の検討 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋, 9月, 2003
 - 9) 吉原宏樹, **清河信敬**, 田口智子, 竹野内寿美, 森 鉄也, 高橋孝雄, 大喜多肇, 藤本純一郎 Anaplastic large cell lymphoma における 5c11 抗原の発現に関する検討 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10月, 2003
 - 10) 松井淳, **清河信敬**, 田口智子, 藤本純一郎 パイオフラボノイドによる B 前駆細胞型 ALL 細胞のアポトーシス誘導 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10月, 2003
 - 11) 鈴木恭子, **清河信敬**, 田口智子, 塩沢裕介, 斎藤正博, 中島敏治, 森 鉄也, 斎藤博久, 藤本純一郎 GeneChip を用いた小児 B 前駆細胞性急逝リンパ芽球性白血病の特性の検討 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10月, 2003
 - 12) Katagiri YU, Takenouchi H, Taguchi T, **Kiyokawa N**, Fujimoto J Involvement of G protein β chain in signaling pathways of Six binding to Gb3 in raft microdomains of human renal cell line 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 10月, 2003
 - 13) 田口智子, **清河信敬**, 藤本純一郎 IGF1 および IGF 結合蛋白の B 細胞初期分化に対する作用に関する検討 第 33 回日本免疫学会総会, 福岡, 11月, 2003
 - 14) Hata T, Kawasaki H, Tsunoda K, Ishii K, **Yamada T**, Nishikawa T, Amagai M Non-pathogenic anti-Dsg3 monoclonal IgG antibodies become pathogenic and induce pemphigus vulgaris phenotype in combination Society for Investigative Dermatology, Rhodo Island, April, 2004
 - 15) 川崎洋, 角田和之, **山田健人**, 天谷雅行 ナイーブ細胞移植による天疱瘡モデルマウスより単離した抗Dsg3モノクローナル抗体の解析 第10回分子皮膚科学フォーラム, 東京, 11月, 2003年
 - 16) 藤崎誠一郎, 平岩秀樹, 齋藤敏之, 近藤裕道, **山田健人**, **安江博**, ブタチュープリンヘータポリペプチド遺伝子の同定及び嗅球と海馬における発現 第26回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月, 2003年
 - 17) 吉野内光夫, **山田健人**, 金芽 中村圭一郎 本郷淳司, 児王順一, 平松祐司, 大和建嗣 RNA interference によるHPV陽性子宮頸癌に対する新しい遺伝子標的治療の礎的検討 第61回日本癌学会総会, 名古屋, 9月, 2003年
 - 18) 桑原睦, 近藤健介, 中田勇二, 橋口明典, 杜ブン林, **穂積信道**, 坂元亨宇, **山田健人** MLL 遺伝子再構成を伴う小児急性骨髄性白血病モデル 第61回日本癌学会総会 名古屋, 9月, 2003年
 - 19) 杜ブン林, 橋口明典, **穂積信道**, 坂元亨宇, 秦順一, **山田健人** ヒト骨髄ストローマ細胞による神経芽腫 Schwann 性間質の生体内再構築 第61回日本癌学会総会 名古屋, 9月, 2003年
 - 20) 橋口明典, **山田健人**, 伊藤守, 坂元亨宇 HSP90変異体遺伝子導入マウスにおける抗がん剤の作用 第61回日本癌学会総会, 名古屋 9月, 2003年
 - 21) Murai K, Kameyama Y, Komoto J, **Yamada T**, Katahira K, Ohmori H, Shimodaira E Biocompatibility of Ti-6Al-4V Alloy Modified by Fine Particle Bombardment (FPB) World Conference on Titanium, Hamburg, Germany, July, 2003
 - 22) 杜ブン林, 服部豊, **穂積信道**, 坂元亨宇, 秦順一, **山田健人** 多発性骨髄腫における血管新生と血管新生抑制治療 第92回日本病理学会総会, 福岡, 4月, 2003年
 - 23) **山田健人**, 渡辺昌 田辺信介, 飯田隆雄, 大喜多肇, 坂元亨宇, 秦順一 日本人における内分泌攪乱物質の暴露と腸肝循環での代謝 吸収 第92回日本病理学会総会, 福岡, 4月, 2003年
 - 24) 香山雅子, 竹鶴敏文, **穂積信道** 自己反応性 CD4 陽性 T 細胞からの IL-10 産生には ICOS 分子が関与している 第 33 回日本免疫学会総会, 福岡, 11月, 2003
 - 25) 竹鶴敏文, 香山雅子, **穂積信道** 末梢で分化する自己反応性 CD4+T 細胞は、ICOS を高発現している 第 33 回日本免疫学会総会, 福岡, 11月, 2003
 - 26) 中野直子, 園尾卓, 志村絵理, **穂積信道** 抗原特異的抑制性 T 細胞の分化と自己免疫応答制御 第 33 回日本免疫

- 学会総会, 福岡, 11月, 2003
- 27) 園尾榮, 中野直子, **穂積信道** APL による Rap-1 の活性化 第 33 回日本免疫学会総会, 福岡, 11月, 2003
- 28) 房木ノエミ, 藤原成芳, 後飯塚僚, **穂積信道** CD72 の二つのチロシンリン酸化サイトからの, 異なるシグナル伝達と Raft 局在変化についての解析 第 33 回日本免疫学会総会, 福岡 11月, 2003
- 29) 馬場猛, 房木ノエミ, 岩松明彦, **穂積信道** BCR 刺激後, ミオシンはチロシンフォスファターゼである SHP-1 の基質となる 第 33 回日本免疫学会総会 福岡, 11月, 2003
- 30) 北島正弘, 木内幸子, 藤崎誠一郎, 平岩秀樹, 丸山公明, **安江博** RH マノピングによるヒト 14 番染色体 q 21- q 23 領域に対応するブタ染色体領域の検索 動物遺伝育種学会, 東京, 11月, 2003年

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

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
分担研究報告書

バイオフィ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、バイオフィラボノイド(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おり、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。本年度は種々の培養ヒト正常細胞に対する BFN の MLL 遺伝子切断作用についてササンプロト解析を行うとともに、より高感度な遺伝子再構成検出法の確立を行った。また、培養細胞株を用いて BFN の MLL 遺伝子再構成誘導によって生じるキメラ遺伝子のパートナー遺伝子の探索を試みた。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か、その解析手段として重要な抗ブタ白血球単クローン性抗体の作成と解析を引き続き行った。

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ィラボノイド(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か求められる。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。

本年度は BFN の種々の正常血液系細胞および培養細胞に対する遺伝子切断効果の解析、ならびに遺伝子再構成によって生じるキメラ遺伝子探索を行うとともに、BFN の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実験系確立にかかわる種々の準備実験を行った。

B 研究方法

1. 試験管内培養によるヒト骨髓幹細胞からの正常造血細胞の分化誘導

骨髓幹細胞を Flt3 ligand および SCF 添加 3 日間培養し、未熟骨髓球系細胞として用い、M-CSF+IL3+IL6+SCF 添加 4 週間培養し、単球系細胞として用いた。また、

マウス骨髄間質細胞株 MS-5 との共培養により B 前駆細胞を分化誘導した。巨核球は TPO 添加培養により分化誘導した。

2. サザンブロット解析

各細胞に Flavone 等の BFN を 16 時間添加培養後、ゲノム DNA を抽出した。PCR で増幅した MLL 遺伝子の Break point cluster 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てサザンブロット解析を行った。

3. FISH 解析

各細胞に Flavone 等の BFN を 16 時間添加培養後、サイトスピンドットを作成し、MLL 遺伝子の 5'側の断片を FITC で、3'側の断片を TRITC でそれぞれ標識した混合プローブを用いて、FISH 解析を行った。

4. PCR による既知の MLL 融合遺伝子の検出

これまでに TopoII 抑制剤の作用によって誘導されたと報告されている MLL 遺伝子の再構成による融合遺伝子のノークエンス情報に基づき PCR プライマーを合成し、BFN 処理した培養細胞株 BV173 の核 DNA に対する PCR を行った。

5. ligation-mediated PCR

抽出した核 DNA を BamHI で消化して断端を DNA ポリメラーゼ klenow fragment により平坦化したのち、自己結合を防ぐため子牛小腸由来アルカリフォスファターゼによって脱リン酸化した。この断片に、*NotI*ヘクターのマルチクローニングサイトの配列に由来するアダプターを T4 ライゲースにより結合した後、MLL 遺伝子 BCR 近傍の 5'側の配列とアダプター内の配列をプライマーとして PCR を行い、増幅された遺伝子断片を T-ヘクターに TA-クローニングし、大腸菌コンピテント細胞に導入、クローン化するとともに増幅、精製して、各クローンに挿入された遺伝子断片の配列を T-ヘクタープライマーを用いたノークエニングにより決定した。

6. 単クローン性抗体の作成

ブタ末梢血白血球を免疫源として常法により 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。

7. アポトーシス細胞の検出

BFN 投与 24 時間後の細胞について、以下の方法でアポトーシス細胞を検出した。

1) 蛍光標識 Annexin V を反応させ、結合細胞を FCM により検出した。

2) MitoCapture を用いて、ミトコンドリア膜透過性の変化した細胞を FCM により検出した。

3) 核 DNA を抽出してアガロース電気泳動を行い、その断片化を検出した。

4) 細胞を 70%エタノールで固定してプロピウムイオダイトで核 DNA を染色し、FCM により核 DNA 含有量を測定して sub-diploid 細胞を検出した。

8. 倫理面への配慮について

本研究では、正常骨髄および臍帯血由来幹細胞に関しては、インフォームト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. 細胞株への BFN 投与実験

初年度に、Flavone 等の一部の BFN がヒト B 前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病(ALL)細胞株 BV173 に対して MLL 遺伝子の切断を誘導することがサザンブロットで確認されたことから、BFN および細胞株の種類を増やし、同様の確認を行った。Strick らの報告に一致して、BFN による MLL 遺伝子の切断には一定の選択性があり、赤白血病細胞株 K562 等ではこれを認めなかった。

サザン解析では、MLL 遺伝子の切断は確認できるが、他の遺伝子との再構成によって生じる融合遺伝子については検索することかできない。そこで、他の方法を用いた検討を行った。まず、BV173 に対して MLL 遺伝子の BFN による遺伝子切断点分布領域 Breakpoint cluster region

(BCR) の 5'側と 3'側をそれぞれ異なる波長の蛍光色素でラベルしたプローブを用いた FISH 法による解析を行ったが、Flavone を投与によるノグナルの解離を認めなかった。従って、大部分の細胞では BFN によって MLL 遺伝子の切断が起こってもその完全な解離は起こらずに、そのまま近傍に存在している可能性が示唆された。また、これまでに報告されている MLL 融合遺伝子についてプライマーを作成し、Flavone 投与後の BV173 核 DNA に対して PCR を行ったが、検索した範囲では遺伝子断片の増幅を認めなかったことから、既知の融合パートナーとの遺伝子再構成は起こっていない可能性が示唆された。

そこで、BFN による MLL 遺伝子の切断の断端の遺伝子配列を確認するとともに、新規パートナー遺伝子との遺伝子再構成の検出およびその発生頻度の検討が可能な方法として、ligation-mediated (LM-) PCR 法の確立を行った。TopoII 抑制剤による MLL 遺伝子の切断の BCR は BamHI による 8.2kB 断片の 5'側から約 7kB の位置に限定されていることから、研究方法の項に記載したごとく核 DNA を BamHI で消化した後、切断端を平坦化、アルカリフォスファターゼ処理してアダプターを ligation し、BCR 近傍 5'側のプライマーとアダプター内の配列のプライマーで PCR を行い、増幅された遺伝子断片を T-vector にクローニングしてノクエンノグを行うことにより BCR における切断の有無および他の遺伝子との組み替えの有無が同時に解析可能であり、多数のクローンを解析することによってその発生頻度を明らかにすることができる。BFN 処理前の BV173 細胞を用いた予備実験により MLL 遺伝子の BamHI による 8.2kB 断片の BCR 近傍領域の特異的増幅が確認されたことから、BFN 処理細胞を用いた検討を開始した。現在、T-vector クローンのノクエンノグを順次行っている。

2 正常ヒト造血細胞への BFN 投与実験

細胞株での実験結果に基づき、初年度に確定した培養方法を用いて骨髓幹細胞

から種々の血球を分化誘導し、このうち、回収細胞数が多かった未熟骨髄球および成熟単球系細胞について Flavone、Luteolin 等の BFN を投与して MLL 遺伝子のサザンブロット解析を行った。この結果、前者では BFN による MLL 遺伝子の切断が認められるのに対して、後者ではこれを認めず、培養細胞株の場合と同様に一定の選択性があることが示唆された。そこでさらに、前述の LMP 法を用いて MLL 遺伝子の切断の頻度について検討するとともに、新規パートナー遺伝子の探索を含めた遺伝子再構成による融合遺伝子の検出およびその頻度の検討を行っている。

また、B 前駆細胞、巨核球等の他の系統の造血細胞については、最終的に細胞ソーティングにより純化した場合に得られる細胞数が非常に少ないため、サザンブロット解析は行わずに、先に LMP 法により解析することとし、現在そのサンプルを調製中で、順次ノクエンノグを行う予定である。

3 BFN による培養白血病細胞および正常造血系細胞のアポトーシス誘導の検討

上記 1 の研究の過程で BV173 細胞を BFN 処理すると細胞死が誘導されることが観察された。そこで、種々の細胞株と BFN の組み合わせで、Annexin V の結合、sub-diploid 細胞の検出、ミトコンドリア膜透過性の変化、核 DNA の断片化等により検討したところ、Flavone 等の BFN が BV173 を始めとする特定の細胞株にアポトーシスを誘導することが明らかとなった（論文準備中）。この結果は以下の 2 つの観点から重要と考えられる。

1) 最近、TopoII 抑制剤による遺伝子再構成がその TopoII 抑制作用に直接起因するものではなく、アポトーシス誘導に伴った核 DNA の切断によるものであるとする報告があり、BFN によるアポトーシス誘導が MLL 遺伝子の切断に関与している可能性がある。

2) この現象は BFN の持つ抗癌作用に一致するものと考えられるか、アポトーシス誘導が癌細胞のみでなく正常血球にも起こるとすれば、遺伝子再構成誘導作用

とは別に、その食品添加物としての安全性に問題が生じることが予想される。

そこで、骨髄幹細胞から分化誘導した未熟骨髄球系細胞および B 前駆細胞に対する BFN によるアポトーシス誘導について検討したところ、いずれの細胞にも一定の割合でアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。今後前述の 2 点に関し、さらに詳細な検討を行っていく。

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

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おり、そのためのブタ免疫系解析の手段としてのブタ血球に対する MoAb の作成と解析を行っている。本年度は、新たに $\gamma\delta$ T 細胞のサブセットを認識する 3E12 およびブタ MHC class I を認識する 4G8 抗体を同定した。前者は T 細胞亜群分布の解析に有用であり、また後者はブタにヒト血球を移植した際のキメリズム解析に応用可能である。特に、4G8 と抗ヒト CD45 抗体を組み合わせることにより、ヒトおよびブタ白血球を種々の割合で混合した場合に 0.5% までのキメリズムの検出が可能であった。

D 考察

1 細胞株への BFN 投与実験

昨年に引き続き、細胞株を用いて BFN による MLL 遺伝子再構成誘導作用の詳細についての解析を行った。この結果、BFN による MLL 切断は特定の細胞株にのみ起こる可能性が示唆され、また Fish 法や RT-PCR 法による解析では、切断後の遺伝子再構成は検出されなかったことから、MLL 遺伝子の切断が起こっても、さらに他の遺伝子との再構成にいたる頻度は非常に低い可能性が考えられる。この点に関しては、より感度の高い LM-PCR や RT-PCR によってさらに詳細な検討を行う必要がある。

2 正常ヒト造血細胞への BFN 投与実験

培養系において分化誘導した種々の正常血球に対する BFN の MLL 遺伝子切断作用について検討した結果、その作用には一定の細胞選択性が存在する可能性が示唆された。今後、さらに多様な血球に対する BFN の効果について解析し、どのような細胞に MLL 遺伝子切断が生じやすいのか明らかにするとともに、上記培養細胞株と同様に LM-PCR や RT-PCR による遺伝子再構成の詳細に関する検討を行う必要がある。

3 BFN による培養白血病細胞および正常造血系細胞のアポトーシス誘導の検討

今回の検討から、BFN が血液系細胞に対してアポトーシスを誘導することか明らかになった。この作用は、従来から言われている BFN の抗癌作用に関係するものと推定されるか、遺伝子再構成作用との関連も含めて、その分子機構についてさらに詳細に検討する必要がある。また、今回の検討で、BFN が一部の正常血球に対してもアポトーシスを誘導する可能性が示唆されたことは、遺伝子再構成誘導作用とはまた別の観点から、その食品添加物としての安全性について検討する必要性を示すものと考えられる。

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、これまでに多数のクローンを得ている。今回新たに同定した $\gamma\delta$ T 細胞のサブセットを認識する 3E12 およびブタ MHC class I を認識する 4G8 抗体は、いずれも本研究で確立をめざす免疫不全ブタへのヒト血球移植モデルの解析に有用である。また、最近移植医療において新たな臓器供給源としてブタが注目されており、今後幅広い医療分野においてこれらの抗体の研究ツールとしての有用性が高まることが期待される。

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か、現時点では BFN の MLL 遺伝子切断作用については細胞培養系で確認されているものの、さらに他の遺伝子との再構成が誘導される頻度は非常に低い可能性が考えられる。一方、今回の検討で BFN の血球系細胞に対するアポトーシス誘導作用が明らかとなり、別の観点からの摂取の安全性に対する検討も必要と考えられる。実際に、BFN か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。現時点では、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。また、本研究では“妊娠した免疫不全ブタを用いたヒト胎児造血系再構築モデル”の準備実験としてブタ血球に対する単クローン性抗体の作成と解析を行っているが、最近新たな移植臓器供給源としてブタが注目されていることから、この研究成果は今後再生医療の分野でも有用性が高くなるものと期待される。

F 健康危険情報

該当事項なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) 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
- 2) Mimori 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 17 1164-1174, 2003

- 3) 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 121 94-96, 2003
 - 4) Furusawa T, Hosoe M, Ohkoshi K, Takahashi S, Kiyokawa N, Fujimoto J, Amemiya H, Suzuki S, Tokunaga T Catalytic RAG1 mutants obstruct V(D)J recombination in vitro and in vivo Mol Immunol 39 871-878 2003
 - 5) 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 23 101-111, 2003
 - 6) Ohtomo Y, Kawamura R, Kaneko K, Yamashiro Y, Kiyokawa N, Taguchi T, Mimori K, Fujimoto J Nephrotic syndrome associated with human parvovirus B19 infection Pediatr Nephrol 18 280-282, 2003
 - 7) Mori T, Sugita K, Kimura K, Fuke T, Miura T Kiyokawa N, Fujimoto J Isolated central nervous system (CNS) relapse in a case of childhood systemic anaplastic large cell lymphoma without initial CNS involvement J Pediatr Hematol Oncol 25 975-977, 2003
 - 8) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang WR, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma Mod Pathol (in press)
 - 9) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang WR, Suzuki T, Nakajima H, Saito M, Ohmi K, Katagiri YU, Okita H, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J Characterization of a Shiga-toxin 1-resistant Stock of Vero cells Microbiol Immuno (in press)
- 2 学会発表
- 1) 片桐洋子, 竹野内寿美, 田口智子, 瀧河信敬, 藤本純一郎 新たに樹立した単クローン性抗体 Raft1 を用いた GTP タンパク β 鎖の細胞内局在の検討 第 92 回日本病理学会総会, 福岡, 4 月, 2003
 - 2) 片桐洋子, 竹野内寿美, 田口智子, 瀧河信敬, 藤本純一郎 抗ラフトクローン性抗体を用いた Six の結合による細胞内刺激伝達の解析 第 76 回日本細菌学会総会, 熊本, 4 月, 2003
 - 3) 竹野内寿美, 田口智子, 片桐洋子, 瀧河信敬, 奥田園爾, 藤本純一郎 Stx B サブユニットの結合による actin 細胞骨格の再構成の誘導 第 76 回日本細

- 菌学会総会, 熊本, 4月, 2003
- 4) **清河信敬**, 田口智子, 三森謙一, 藤本純一郎 副刺激受容体による CD20 誘導性アポトーシスの調節 第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会, 大阪, 8月, 2003
 - 5) 田口智子, 竹野内寿美, **清河信敬** 藤本純一郎 ヘロ毒素受容体 Gb3 は腎尿管上皮系細胞において細胞骨格の再構成にかかわる細胞内への刺激を伝達する 第 38 回日本小児腎臓病学会学術集会, 東京, 7月, 2003
 - 6) **Kiyokawa N**, Takenouchi H, T Taguchi, Y Katagiri, Jfujimoto Intercellular signaling events in target cells mediated by binding of Shiga toxin The Awaji International Forum on Infection and Immunity 淡路島, 8月, 2003
 - 7) 田口智子 **清河信敬**, 藤本純一郎 B 細胞初期分化における IGF および IGF binding protein の役割 第 65 回日本血液学会総会 第 45 回日本臨床血液学会総会, 大阪, 8月, 2003
 - 8) 田口智子, **清河信敬**, 鈴木恭子, 中島敏治, 斎藤博久, 藤本純一郎 網羅的遺伝子発現解析による小児 B 前駆細胞性急逝リンパ芽球性白血病の特性の検討 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋, 9月, 2003
 - 9) 吉原宏樹 **清河信敬**, 田口智子, 竹野内寿美, 森 鉄也, 高橋孝雄, 大喜多 肇 藤本純一郎 Anaplastic large cell lymphoma における Sc11 抗原の発現に関する検討 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10月, 2003
 - 10) 松井淳, **清河信敬** 田口智子, 藤本純一郎 ハイオフラボノイトによる B 前駆細胞型 ALL 細胞のアポトーシス誘導 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10月, 2003
 - 11) 鈴木恭子, **清河信敬**, 田口智子, 塩沢裕介, 斎藤正博, 中島敏治, 森 鉄也, 斎藤博久, 藤本純一郎 GeneChip を用いた小児 B 前駆細胞性急逝リンパ芽球性白血病の特性の検討 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10月, 2003
 - 12) Katagiri YU, Takenouchi H, Taguchi T, **Kiyokawa N**, Fujimoto J Involvement of G protein β chain in signaling pathways of Six binding to Gb3 in raft microdomains of human renal cell line 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 10月, 2003
 - 13) 田口智子 **清河信敬**, 藤本純一郎 IGF1 および IGF 結合蛋白の B 細胞初期分化に対する作用に関する検討 第 33 回日本免疫学会総会, 福岡, 11月, 2003

H 知的所有権の取得状況

- 1 特許取得
無し
- 2 実用新案登録
無し
- 3 その他
無し

バイオフィ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 ヒト骨移植免疫不全 NOG および 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、ハイオフィ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、フラホ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(11X)(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。そこで本年度は、以下を遂行することを目的とした。

1 ヒト骨髄性白血病のマウス疾患モデルでは、ヒト白血病細胞移植後の発症までの時間

が長い。そこで、新たに開発されたNOGマウスを宿主とした、本モデルの確立を試み、さらに、このモデルにおいて白血病浸潤に合併するDICモデルの確立を目指す。

2 NOG および NOD/SCID マウスへ各種白血病細胞株および造血幹細胞を移植し、フラホノイド類の投与後、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

1 NOG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10%FBS加RPMIメディウムを用いて培養し、NOG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。移植後30~70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。また、白血病浸潤に合併するDICモデルを確立する目的で、本細胞株に種々のサイトカインを添加して分化マーカーの発現変化や増殖におよぼす影響について検討した。

2 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

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、1-3Gy照射NOGおよびNOD/SCIDマウスへ各種