

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。

## C 結果

### 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日後に末梢血と骨髄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、その移植骨髄への白血病細胞の出現までの期間が短縮した。

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。

### 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

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。

## D 考察

### 1 NOD/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、骨髄性白血病の移植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か、NOGマウスは、さらに浸潤が早く見られることから、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。

### 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

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。

## E 結論

NOG および 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。特に、NOG マウスを用いることによって、移植したヒト造血系細胞の増殖のための期間が短縮される可能性が示された。この実験系は今後ハイオフラボノイドを含む内分泌攪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か期待される。

## F 健康危惧情報

該当事項なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

- 1) 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

- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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)
- 2 学会発表
- 1) 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
- 2) 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
- 3) 藤崎誠一郎, 平岩秀樹, 齋藤敏之, 近藤裕道, **山田健人**, 安江博 プ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
- 4) 吉野内光夫, **山田健人**, 金芬, 中村圭一郎, 本郷淳司, 児玉順一, 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
- 5) 桑原睦, 近藤健介, 中田勇二, 橋口明典, 杜ブノ林, 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
- 6) 杜ブノ林, 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
- 7) 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
- 8) Murai K, Kameyama Y, Komotori 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
- 9) 杜ブノ林 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
- 10) **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
- H 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（食品安全確保研究事業）

分担研究報告書

ヒト造血再構築マウスを用いたハイオフラボノイト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骨組織を移植した“HuBone/NOD-SCID マウス”に種々のヒト体細胞および組織を移植して維持することにより、種々のヒト組織/疾患モデルの確立を試みている。昨年度はヒト造血系再構築モデルを確立した。本年度は乳癌の骨転移モデルを確立し、その、乳癌の骨転移と増殖のメカニズム解明に関する研究や、乳癌の *in vivo* 治療研究における有用性を明らかにした。この結果は、NOD-SCID マウスへのヒト組織/細胞移植系が、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、ハイオフラボ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。

**A 研究目的**

ハイオフラボノイド（ヒタミンP）は健康食品などに含まれている。この化学物質は小児白血病の一部の症例で観察される MLL 遺伝子の再構成に類似した変異を誘導することが知られている。この遺伝子再構成と病理病態の解明のためには、ヒト造血系 悪性腫瘍細胞を移植された *in vivo* 実験モデルの確立が強く望まれる。我々は NOD-SCID マウスにヒト細胞 組織を移植し、ヒト病態モデル動物の開発に貢献してきた。特にヒト海綿骨のマウス皮下への移植は興味深い。移植ヒト骨ではトナー由来の骨リモテリングだけでなく、ヒト血管新生も維持される。またマウス造血系組織ではヒト由来の造血系細胞の再構築がみられる。本年度は、この HuBone/NOD-SCID マウスモデルをさらに発展させ、ヒト悪性腫瘍細胞の *in vivo* 実験モデルの確立のための研究を中心に行った。

**B 研究方法**

慶応大学病院で肺癌手術時に不要となる肋骨(5mm<sup>3</sup>)をインフォームトコンセントを得て採取し、NOD-SCID マウスの皮下に移

植する。骨移植1週間後、ヒト乳癌細胞（この乳癌細胞は HuBone/NOD-SCID マウスへの移植により継代している）をヒト骨内に移植し、2-28週まで経時的にマウスから移植骨を回収して組織標本を作成し、一般組織染色および免疫組織化学的解析を行う。

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か、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）。また、動物実験については同実験動物管理委員会の承認を得ている。

**C 研究結果**

乳癌の予後を決定する大きな因子として骨転移があげられる。乳癌は前立腺癌、肺癌等とならなくて骨転移が頻繁にみられ、骨転移の有無は乳癌治療の戦略の決定に極めて重要である。我々はヒト疾患部からの乳癌細胞を用いて、乳癌の骨転移と増殖のメカニズムの解明を目的として *in vivo* 実験モデルの確立を試みた。ヒト肺癌手術時に不要となる肋骨をインフォームトコンセントを得て採取し、NOD-SCID マウスの皮下に移植した。骨移植後、1週間以上経って

から疾患部から得られた乳癌細胞をヒト骨内に移植した(この乳癌細胞はHuBone/NOD-SCIDマウスの移植ヒト骨への移植により継代している)。癌細胞移植後、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。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た。また癌細胞増殖部位では、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。破骨細胞の増殖はTartrate Resistant Acidphosphatase(TRAP)染色によっても確かめられた。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サ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13分の1に減少していた。

#### D 考察

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髄中に検出されることを確認した。以上の結果は、移植されたヒト骨髄が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、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、ハイオフラボノイド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。

#### E 結論

ヒト疾患部位からの乳癌細胞をNOD-SCIDマウスの皮下に移植されたヒト骨内へ移植し、乳癌の*in vivo* 実験モデルを確立した。腫瘍増殖部位では活発なヒト血管新生とヒト破骨細胞の増殖が確認された。ヒト $\alpha v \beta 3$  インテグリンに対するキメラ抗体の投与は、ヒト骨内での乳癌細胞の増殖を阻止することが確認された。この動物モデルはヒト悪性腫瘍細胞の*in vivo* モデルとして幅広い応用が可能になると思われる。これらの結果を基にして、ヒト悪性腫瘍の骨転移モデルを確立すべく研究を続けている。

#### F 健康危険情報

該当なし

## G 研究発表

### 1 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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)
- 6) Fujiwara N, Fusaki N, **Hozumi N** CD72 stimulation modulates anti-IgM induced apoptotic signaling through the pathway of NF- $\kappa$ B, c-Myc and p27Kip1 Microbiol Immuno (in press)
- 7) 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)
- 8) 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)

## 2 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 中野直子, 園尾榮 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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

## 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（食品安全確保研究事業）

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。本年度はブタ IL-16 遺伝子のゲノム構造を明らかにした。また、昨年度作製した cDNA ライブラリーの解析を進め、計 5000 クローンの配列を決定した。この成果を基に、pre-Tcell receptor, alpha-chain precursor の全 cDNA 配列を明らかにした。

A 研究目的

乳児白血病の発症は、胎児期に母親が摂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。健康食品に多く含まれるハイオフラボノイド (BFN) は、培養細胞レベルでトポイソメラーゼ II を抑制し、白血病で認められるように MLL 遺伝子の変異を起こすことが報告されている。ところで、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。現在我々は、他の研究費による研究において妊娠免疫不全ブタを作製しており、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。そこで本研究は、この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。まず本研究を遂行する上で、免疫不全ブタにおける免疫系分子の遺伝子に関する情報を取得することは重要である。したがって、初年度は、免疫系の遺伝子を同定し、その分子のヒトとの相同性を調査した。

B 研究方法

昨年度は、炎症のキー遺伝子の 1 つである IL-16 遺伝子の全 cDNA 配列を明らかにした。本年度は、ブタ IL-16 遺伝子のゲノム構造を明らかにするために、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  $\gamma/\delta$ 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。

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。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 つのエキ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 つのエキ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が明らかとなった。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が示唆された。

本年度は昨年度に引き続き、ブタ $\gamma/\delta$ 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- $\gamma$ 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(ドメイン)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

common- $\gamma$ 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ド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

ブタの免疫系分子の遺伝子情報に関する解析を行い、IL16 および common- $\gamma$ 鎖遺伝子を単離、解析した。また、 $\gamma/\delta$ T細胞分離してその cDNA ライブラリーを構築し、解析を行っている。これらの情報は、今後免疫不全ブタ作出の上で重要であるのみならず、免疫不全ブタが確立された場合、その免疫状態の解析やモニタリングに有用である。

#### F 健康危惧情報

該当事項なし

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

- 1) Homma D, Uenishi H, Hiraiwa H, Watanabe S, Tang W, Kiyokawa N, Fujimoto J, **Yasue H**, Sakimura K Cloning and characterization of porcine common  $\gamma$  chain gene J Interf Cytok Res 23 101-111, 2003
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Uenishi H, Hiraiwa H, Yamamoto R, **Yasue H**, Takagaki Y, Shina 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
- 5) 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) 藤崎誠一郎, 平岩秀樹, 齋藤敏之, 近藤裕道, 山田健人, **安江博** ブタチューブ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
- 2) 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 マッピングによるヒト 14 番染色体 q21-q23 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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taguchi T, <b>Kiyokawa N</b> , 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
Mimori K, <b>Kiyokawa N</b> , 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
Mori T, <b>Kiyokawa N</b> , Shimada H, Miyauchi J, Fujimoto J	Anaplastic large cell lymphoma in Japanese children: Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research Institute for Child Health and Development	Br J Hematol	121	94-96	2003
Furusawa T, Hosoe M, Ohkoshi K, Takahashi S, <b>Kiyokawa N</b> , 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
Honma D, Uenishi H, Hiraiwa H, Watanabe S, Tang W, <b>Kiyokawa N</b> , Fujimoto J, <b>Yause H</b> , Sakimura K	Cloning and characterization of porcine common $\gamma$ chain gene	J Interf Cytok Res	23	101-111	2003
Ohtomo Y, Kawamura R, Kaneko K, Yamashiro Y, <b>Kiyokawa N</b> , Taguchi T, Mimori K, Fujimoto J	Nephrotic syndrome associated with human parvovirus B19 infection	Pediatr Nephrol	18	280-282	2003
Mori T, Sugita K, Kimura K, Fuke T, Miura T, <b>Kiyokawa N</b> , 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
<b>Kiyokawa N</b> , 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)		
Sekino T, <b>Kiyokawa N</b> , 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)		
Fukuma M, Abe H, Okita H, <b>Yamada T</b> , Hata J	Monoclonal antibody, 4C4-mAB, specifically recognizes keratan	J Pathol	201	90-98	2003



	sulfate proteoglycan on human embryonal carcinoma cells				
Yajima K, Hirose H, Fujita H, Seto Y, Fujita H, Ukeda K, Kawai T, Yamamoto Y, <b>Yamada T</b> , 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
Tsunoda K, Ota T, Aoki M, <b>Yamada T</b> , 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
Matsushita K, Okita H, Suzuki A, Shimoda K, Fukuma M, <b>Yamada T</b> , 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
Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, <b>Yamada T</b> , Hata J	Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor	Pathol Int	53	214-220	2003
Yoshinouchi M, <b>Yamada T</b> , 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
Du W, Hattori Hashiguchi A, Kondoh K, <b>Hozumi N</b> , Ikeda Y, Sakamoto M, Hata J, <b>Yamada T</b>	Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and its alteration by thalidomide treatment	Pathol Int	(in press)		
Baba T, Fusaki N, Shinya N, Iwamatsu A, <b>Hozumi N</b>	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
Fujii Y, Wakahara S, Nakao T, Hara T, Ohtake H, Komurasaki T, Kitamura K, Tatsuno A, Fujiwara N, <b>Hozumi N</b> , 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
Baba T, Fusaki N, Shinya N, Iwamatsu A, <b>Hozumi N</b>	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
Watanabe N, Tezuka Y, Matsuno K, Miyatani S, Morimura N, Yasuda M, Fujimaki R, Kuroda K, Hiraki Y, <b>Hozumi N</b> , Tezuka K	Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch	J Bone Miner Metab	21	344-352	2003
Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, <b>Hozumi N</b> , 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)		
Fujiwara N, Fusaki N, <b>Hozumi N</b>	CD72 stimulation modulates anti-IgM induced apoptotic signaling through the pathway of NF- $\kappa$ B, c-Myc and p27Kip1	Microbiol Immuno	(in press)		
Sugiyama S, Kohyama M, Oda M, Azuma T, Wither JE, <b>Hozumi N</b>	Molecular basis of antigen recognition by insulin specific T cell receptor	Immunol Lett	(in press)		

Hiraiwa H, Sawazaki T, Suzuki K, Fujishima-Kanaya N, Toki D, Ito Y, Uenishi H, Hayashi T, Awata T, <u>Yasue H</u>	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
Tanaka M, Matsumoto T Yanai S, Domukai M, Toki D, Hayashi T, Kiuchi S, <u>Yasue H</u> 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
Uenishi H Hiraiwa H Yamamoto R, <u>Yasue H</u> Takagaki Y Shina 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
Bosak N Faraut T, Mikawa S Uenishi H, Kiuchi S Hiraiwa H Hayashi T <u>Yasue, H</u>	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

20031189

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。