

初代培養 MSC は生物学的にヘテロな集団であり、その中には多分化能及び増殖能を携えた真の MSC が存在しているか可能性があり、その細胞表面マーカーの候補を同定できた。MSC を用いた壊死骨再生治療は、イヌのモデルにおいて顕著な有効性を示し、ヒト病態への応用が期待される。

F. 健康危険情報

本研究は現時点においてヒトを対象としておらず、本項目には該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Aoyama, T., Bojian Liang, B., Okamoto, T., Matsusaki, T., Nishijo, K., Ishibe, T., Yasura, K., Nagayama, S., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes. J. Bone Miner. Res., in press
- 2) Aoyama, T., Okamoto, T., Nagayama, S., Nishijo, K., Ishibe, T., Yasura, K., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. Methylation in the core-promoter region of the chondromodulin-I gene determines the cell-specific expression by regulating the binding of transcriptional activator, Sp3. J. Biol. Chem., 279: 28789-97, 2004.
- 3) 戸口田淳也、青山朋樹：臨床応用をめざした間葉系幹細胞の基礎と治療実験. 医学のあゆみ 209 : 937-941、2004.

2. 学会発表

- 1) 戸口田淳也：運動器再生医療のための間葉系幹細胞の基礎. 第 48 回日本リウマチ学会(2004.4.15 岡山)
- 2) 嶋靖子、岡本健、石部達也、青山朋樹、西庄功一、安良興、嶋靖子、柴田弘太郎、中山富貴、中村孝志、清野透、戸口田淳也：骨髄間葉系幹細胞の癌化機構の解析. 第 37 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2004.7.15 東京)
- 3) 嶋靖子、岡本健、青山朋樹、西庄功一、石部達也、柴田弘太郎、中山富貴、中村孝志：骨髄間葉系幹細胞の癌化機構の解析. 第 63 回日本癌学会総会 (2004.9.29 福岡)
- 4) 青山朋樹、梁伯堅、松崎尚志、安良興、中村孝志、戸口田淳也：PGF2 は EP2 リセプターを介して関節軟骨の増殖を促進する. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2004.10.21 東京)
- 5) 嶋靖子、岡本健、石部達也、中村孝志、

清野透、戸口田淳也：間葉系幹細胞の癌化機構の解析. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2004.10.22 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究に関しての知的財産権の出願・登録及びその予定は現時点ではない。

足場への細胞応用、細胞分化誘導

分担研究者 牛田 多加志 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨骨再生治療の基本戦略は骨芽細胞やその前駆細胞をセラミックの三次元担体に播種し、作製された生体外培養骨を移植することにあるが、良好な再生骨組織を得るためには、足場材料の内部に均一に細胞を播種、細胞の分化を制御し、かつ深部にまで十分に栄養を供給することが重要である。本研究では骨髄間質細胞およびセラミックビーズから構成されるシート状の骨エレメントを構築し、シート積層培養骨の作製を行った。 2.5×10^5 - 2.5×10^6 cells/cm² の細胞播種条件および骨分化培養により、操作性に優れたシート状骨エレメントが構築され、積層培養骨の移植により初期形状の維持と移植細胞の骨分化が確認された。

A. 目的

均一な粒径のセラミックビーズと細胞および細胞が産生する細胞外マトリックスからなる細胞ビーズシートを作製、シート間に血管誘導層を介在させ積層することで、内部まで細胞を保持しながら、血管導入用の大きなスペースを持ち、移植後速やかに血管が侵入して内部からも骨形成が進む三次元培養骨を構築する。

B. 方法

リン酸カルシウムとポリビニルアルコールのスラリーを液体窒素上に滴下すると、微小なリン酸カルシウムビーズが得られる。これを焼結することで、多孔質・球状のリン酸カルシウムビーズが形成される。細胞

はヒトより採取した骨髄を 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1ng/ml b-Fibroblast Growth Factor (b-FGF) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 中で 2 週間初代培養、接着性の細胞のみを 2~5 回継代培養した骨髄間質細胞を用いた。粒径 300 μ m の β -TCP ビーズを一層敷き詰めた容器に細胞を播種・培養することで、シート状の組織（細胞ビーズシート）が形成されるかを検討した。 2.5×10^5 , 2.5×10^6 , 2.5×10^7 cells/cm² の間で、細胞ビーズシートを作製するために最適な細胞数を調べた。また、シートを骨芽細胞分化培地（10% FBS, 100nM dexamethasone, 0.05mM ascorbic acid, 10mM β -glycerophosphate, 1ng/ml b-FGF を加えた DMEM）中で培養することで、

骨への分化を誘導した。10x10mm のビーズシートを6枚積層、シート間には type I atelo-collagen を介在させた厚さ 10mm の立方形培養骨を免疫不全マウスに皮下移植、8週間後に摘出し形状の比較を行った。

C. 結果

細胞播種濃度 2.5×10^5 - 2.5×10^6 cells/cm² の範囲で良好なシート形成が認められた。 2.5×10^7 cells/cm² では細胞は接着せず、シートの形状は得られなかった。 2.5×10^5 cells/cm² の濃度で細胞を播種し、3日間の培養の後、骨芽細胞分化培地中で2週間培養すると、鉗子にて把持が可能な程度の強度を持った細胞ビーズシートが作製された。ゲル単独およびゲル中に細胞とビーズを懸濁・封入したサンプルでは移植後8週の観察で初期形状が維持できなかったのに対し、ビーズシートの積層にて作製したものでは立方形状が保持されていた。血流量の定量的な解析に至っていないが、組織学的に中心部まで移植ヒト細胞の壊死を伴わない均一な存在が確認され、辺縁部中心ではあるがビーズ周囲にヒト細胞由来の骨新生が確認された。

D. 考察

細胞ビーズシートのシート形状は、細胞播種が容易な上、栄養分散において有利であり、良好な移植前培養環境を保つことができる。介在層に生理活性物質等の血管誘導因子を添加することで、より深部まで早期の骨形成が期待される。

E. 結論

新しいコンセプトの培養骨エレメントとしてセラミックビーズと細胞からなる細胞ビーズシートの開発を行い、作製条件を決定した。シートを積層した三次元培養骨の移植実験より、ビーズ周囲の骨形成と中心部まで均一な細胞分布が得られていることが確認できた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) Bone tissue engineering based on bead-cell sheets composed of calcium phosphate beads and bone marrow cells, Katsuko S.Furukawa, Shunsuke Miyauchi, Daisuke Suzuki, Yoshikazu Umezu, Tsuneo Shinjo, Takashi Ushida, Miki Eguchi, Tetsuya Tateishi, Materials Science and Engineering C 24:437-440 2004
- 2) Novel bone graft model using bead-cell sheets composed of tricalcium phosphate beads and bone marrows, Shunsuke Miyauchi, Katsuko S. Furukawa, Yoshikazu Umezu, Yasuyuki Ozeki, Takashi Ushida, Tetsuya Tateishi, Materials Science and Engineering C 24:875-879 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

生体用担体及び細胞培養方法（特開2004-267562）

遺伝子導入効率に対する基盤的研究

分担研究者 渡辺 研

国立長寿医療センター研究所

運動器疾患研究部 骨機能再建研究室長

研究要旨 前年度までに、遺伝子導入による脱分化・増殖能誘導に対する危険性を考慮し、タンパク質の細胞への直接導入法（Protein Transduction:PT）について検討を行ってきたが、本年度においてはPT法による細胞分化への効果についての検討を行った。

A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞の細胞寿命の延長に際して、高効率の遺伝子導入法を検討する事により、少量の幹細胞を効果的に増幅させる方法について検討を行う。

B. 研究方法

Msx2 の N 末端側にタンパク質導入配列（TAT）を付したものを pGEX-6P1 ベクターに挿入し、大腸菌において、GST タンパクと TAT-Msx2 の融合タンパク質として産生させた。同様に点変異体（T147A）型 Msx2 も PCR 法を用いて作製し、GST-TAT 融合タンパク質として調製した。グルタチオンセファロースにより精製を行った後、GST タンパク部分を除去するため、Precision プロテアーゼにより 4℃にて反応させ、Msx2 もしくは TAT-Msx2 タンパク質を得た。タンパク質は SDS-PAGE 法により、純度・濃度を検定した。細胞への導入については、間接蛍光抗体法ならびにウエスタンブロッティング法により検討を行った。脂肪細胞分化は、脂肪細胞株（3T3-L1）を用い、分化誘導は 15% FCS および MDI（0.5 mM methylisobutylxanthine, 1 mM dexamethasone, 1 mg/mL insulin）を含む phenol red-free aMEM で培養することにより行った。脂肪細胞分化は脂肪滴を Oil-Red O で染色することにより評価した。筋細胞

分化は、筋芽細胞株（C2C12）を用い、通常の 15%FCS を 2% horse serum へ変えることにより細胞融合・筋管形成の誘導を行った。

（倫理面への配慮）

当該分担研究課題では、ヒトゲノム・遺伝子解析を対象としておらず、また、材料採取等に伴う動物実験は、国立長寿医療センター動物実験施設指針等に則り、材料、モデルともに、動物愛護上の配慮をしたうえで行った。

C. 研究結果

前年度までに TAT-Msx2 の PT により、培地添加後、2 時間以内に 70% 程度の細胞へ導入が可能であることが示されていたため、本年度においては導入分子機能について、間葉系細胞の分化系を用いて検討を行った。3T3-L1 細胞の MDI 添加による脂肪細胞分化系において、分化培地（MDI 含有培地）へ転換後 1 日後より、最終濃度 1 μg/mL の TAT-Msx2 もしくは GST bacterial lysate を添加して培養を続けたところ、無添加、GST 群では Oil Red 染色脂肪滴が顕著に蓄積したのに対し、TAT-Msx2 群では脂肪分化が顕著に抑制されていた。しかしながら、分化し、細胞質に大量に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞の脱分化は誘導されなかった。一方、C2C12 細胞の筋分化系では、細胞融合

ならびに筋管形成し、最終分化した筋細胞へ TAT-Msx2 を添加したところ、筋管の形態変化ならびに一部単核細胞の増加といった Msx2 遺伝子導入による脱分化誘導と一致した現象が見られた。Msx2 には頭蓋形態形成異常を伴う先天疾患で検出されている機能異常型点変異体が知られている。その中には DNA 結合能の低下した T147A 型についても検討を行ったところ、野生型 Msx2 同様に脂肪細胞分化抑制能があることがわかった。

D. 考察

遺伝子導入法により強制発現させた Msx2 同様に PT 法により導入した Msx2 も機能することが示された。この PT による Msx2 導入細胞を *in vivo* での分化試験成績は得られなかったが、目的でもある *ex vivo* での効果としては一定の成果が得られたものと考えられる。また、T147A 型 Msx2 でも同様の効果が得られたことにより、分化抑制機能には DNA 結合能はあまり寄与しないことが示された。これは遺伝子導入により得られた知見と一致している。野生型 Msx2 の強制発現系では骨芽細胞分化促進能もあるが、T147A 型 Msx2 ではその機能が消失しており、骨芽細胞分化には DNA 結合が必要であることが示唆される。今後、機能亢進型変異 (P148H) ー骨芽細胞分化誘導型を用いて有効的に骨芽細胞分化を他の系譜の細胞 (脂肪細胞など) より誘導を試みる予定である。また、T147A 型 Msx2 は骨芽細胞以外の細胞系譜 (軟骨細胞など) への分化誘導の際は、有効である可能性がある。

E. 結論

PT 法により導入された Msx2 は、内在性もしくは遺伝子導入により発現した Msx2 と同様に、核局在し、脱分化・分化抑制機能を発揮することが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Watanabe, K. and Hishiyama, A. (2005) Mouse models of senile osteoporosis. *Mol. Aspects Med. in press.*
- 2) Sasaki, A., Hinck, L., and Watanabe, K. (2005) RunMAGE-D the members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins. *J. Recept. Signal. Transduct. in press.*
- 3) Hishiyama, A. and Watanabe, K. (2004) Progeroid syndrome as a model for impaired bone formation in senile osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 22, 399-403.

学会発表

Shinotsuka C, Hishiyama A, Mizuno K, Aburatani H, Ikeda K, Watanabe, K. Induction of multipotent stem cells through dedifferentiation of mesenchymal cells by Msx2 protein transduction. The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10月1日～5日 Seattle, Washington, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

足場の製剤化に関する研究

分担研究者 久保田 直樹 中外製薬株式会社製品育成研究部 課長

研究要旨 損傷を受けた部位や病変部位を多能性幹細胞で再生させるという再生医療の概念は、胎生幹細胞や胎児あるいは成熟ヒト骨髄由来間質性幹細胞などを用いた試みが広がり、ますます注目を集めつつある。本分担研究では扁平骨あるいは長管骨に人為的に作製した骨欠損部の骨再生について、多孔性材料(デバイス)を包埋させた場合と、細胞を予めデバイスに播種させておいた場合とを比較検討し、デバイスと細胞をあわせて用いることの有用性を明らかにすることを目的としている。本年度は、骨欠損部に存在することが想定される骨髄細胞に着眼し、薬物が骨代謝に影響を及ぼす可能性について検討した。具体的に、我が国の骨粗鬆症治療の基本薬として広く用いられる一方、分化誘導作用が明らかにされているビタミン D 誘導体の、アルファカルシドール(ALF)と、強い骨量増加作用を有するビタミン D 誘導体として開発中の化合物(ED-71)を用いて、動物実験モデルにおいて検討した。その結果、ビタミン D 誘導体は、骨を融解する破骨細胞活性を抑制し、骨を作る骨芽細胞活性を維持することによって骨量を増加させることと、同時に骨髄中に細胞群の変化を引き起こし、脂肪細胞を減少させることが明らかとなった。以上のことから、骨再生の過程において、ビタミン D 誘導体を添加すると、さらに効率よく再生骨形成を促す可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトの骨粗鬆症のモデルとして汎用される、動物モデルを用い、ビタミン D あるいはその誘導体が骨髄細胞分化に及ぼす影響を検討した。また、ビタミン D 受容体欠損細胞株を用い、ビタミン D の骨髄細胞分化に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1-1. 卵巣摘除ラットの作成とビタミン D 誘導体投与による骨髄細胞の変化

雌性ラット(Wistar-imamichi、動物繁殖研究所)を10ヶ月令にて入手し、体重を指標としてコンピュータを用いた層別連続的無作為法により、各実験群の平均体重および分散がほぼ等し

くなるように1群7の8群に配分した。投与開始2週間前に、エーテル麻酔下で背部皮膚を切開し、両側卵巣を摘出した(偽手術群は切開のみ)。水は給水器にて自由摂取とし、飼料もCE-2(日本クレア社製、ガンマ線滅菌済み)をステンレス製給餌器に入れ自由に摂取させた。

両側の卵巣摘除後14日から12週間、1週間に5日(月～金曜日)、1日1回、8:00～12:00の間に、ディスプレイ注射筒およびラット用ゾンデを用いて、投与液を強制経口投与した。ビタミン D 誘導体のALF [1 α -hydroxyvitamin D₃]あるいはED-71 [2 β -(3-hydroxypropoxy)-1 α 、25-dihydroxyvitamin D₃]はそれぞれMCT (medium chain triglyceride、日清製油)溶液とした。投与用量はそれぞれ1 mL/kgで、ALFは0.1、0.2、

0.4 mg/kg, ED-71 は 0.05, 0.1, 0.2 mg/kg と
なるように、各個体の投与液量は投与日に最も
近い体重を用いて算出した。最終投与の翌日に
剖検を行い、骨標本、血清および尿を採取した。

腰椎 L2-L4 の平均骨密度は、二重 X 線骨塩定
量装置(DCS-600; アロカ社製)にて測定した。骨
吸収マーカーの尿中デオキシピリジノリン排泄
量は、絶食下で採取した 24 時間蓄積尿をオステ
オリンクス(住友)によって測定した。血清オス
テオカルシンは rat osteocalcin ELISA kit (ア
マシャム; RPNJ 404)にて測定した。脛骨近位部
の脱灰病理標本を作製し hematoxylin and eosin
(HE)染色にて骨髄脂肪と骨梁構造を検討した。

1-2. ビタミン D 受容体欠損細胞株を用いた、 ビタミン D の骨髄細胞分化に及ぼす影響の検討

ビタミン D は骨粗鬆症のほか、皮膚炎、慢性
腎不全、骨軟化症などの治療薬として使われる。
いろいろな細胞に作用して強力な分化誘導作用
を示す。また、リンパ球系細胞の増殖・分化へ
の影響を与え、免疫機能を調整している。これ
らの働きは細胞核内に存在するビタミン D 受容
体と結合することによって起こると考えられて
いるが、解明されていない点も多い。

条件的不死化細胞は、トランスジェニックマ
ウスとビタミン D 受容体の遺伝子を欠損したノ
ックアウトマウスを交配させ、SV40T 抗原遺伝
子を持った同受容体欠損マウスを得られたもの
で、対照として、抗原遺伝子と受容体を併せ持
つマウスを用い、常法に従って細胞株が樹立さ
れた。なお、SV40 と呼ばれるウイルスのガン抗
原遺伝子を持つトランスジェニックマウスは、
すべての組織や臓器の細胞が不死化する可能性
がある。さらに、本研究のように、温度感受性
の SV40T 抗原を発現したトランスジェニックマ
ウスを用いると、不死化細胞は培養温度を調節
することにより分化形質も制御可能となること
から、極めてユニークで有用な実験ツールであ
る。また、増殖性ととも分化形質の維持され
た、いろいろな分化段階の細胞の株化が可能で
ある。

実際、両マウスの細胞株とも 33°C で増殖し、
39°C では増殖を停止したので、抗原遺伝子が細
胞増殖を制御していることが確認できた。

両細胞株を分化の状態にさせるため、培養容
器の培養面をほぼすべて覆った後 39°C に培養温
度を移行させて、受容体がない細胞株とある細
胞株の脂肪細胞への分化能を調べた。さらに、

受容体を介したビタミン D の脂肪細胞分化への
影響を調べるために、培養温度を 39°C に移行す
ると同時に、活性型ビタミン D を添加した。い
ずれも、脂肪細胞数を計測するために、オイル
レッド O 染色法で赤色に染まった脂肪細胞を顕
微鏡下で計数した。

(倫理面への配慮)

ラットを実験動物として本研究に使用するに
あたり中外製薬株式会社動物実験指針を遵守し
て実施した。

全ての実験の研究内容は、組換え DNA 安全委
員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従
った施設において行われていることが承認され
ている。

C. 研究結果

1-1. 卵巣摘除ラットの作成とビタミン D 誘導体 投与による骨髄細胞の変化

卵巣を摘出したラットにおいては、閉経後の
骨粗鬆症患者に見られる変化と同様に、骨吸収
と骨形成のいずれもが亢進した結果、骨量が減
少していることが観察された。このとき、2 種
類のビタミン D 誘導体はいずれも骨吸収を抑制
し、骨形成を維持あるいは促進して、その結果
として骨量の減少抑制効果を示すことが明らか
となった。

また、脛骨近位部の病理組織標本を注意深く
観察すると、卵巣を摘出してプラセボを投与し
た動物群に比して ALF を投与した群では、骨梁
が太く密になったことに加え、骨髄の脂肪細胞
の減少が観察された。以上のことから、ビタミン
D は骨代謝関連細胞のみならず、骨髄細胞中
の脂肪細胞の数に影響を及ぼした可能性が考え
られた。

1-2. ビタミン D 受容体欠損細胞株を用い た、ビタミン D の骨髄細胞分化に 及ぼす影響の検討

脂肪細胞へ分化した細胞数は、ビタミン D 受
容体がある細胞株では $1854 \pm 287 \text{ cell/cm}^2$ であ
ったのに対し、ビタミン D 受容体がない細胞株
では $7740 \pm 27 \text{ cell/cm}^2$ と明らかに増加してい
た。さらに、ビタミン D 受容体を介したビタミン
D の脂肪細胞分化への影響を調べるために、
培養温度を 39°C に移行すると同時に、活性型ビ
タミン D を添加したところ、ビタミン D 受容体
がある細胞株では脂肪細胞へ分化した細胞数が
 $806 \pm 170 \text{ cell/cm}^2$ と著しく減少したが、ビタミ
ン D 受容体がない細胞株では $6934 \pm 1737 \text{ cell/cm}$

²とほとんど影響を受けなかった。

以上の結果から、ビタミン D はその受容体を介して脂肪細胞の分化を抑制していると考えられた。

D. 考察

本年度、我々は、間葉系細胞にビタミン D を作用させることによって脂肪細胞分化が抑制されること、さらに、その作用はビタミン D 受容体を介する可能性を明らかにすることが出来た。骨欠損部における骨形成については、担体に細胞を染み込ませて足場を形成することが重要であると報告してきたが、今回、骨粗鬆症治療薬として広く用いられているビタミン D に再生骨を形成させる上で有利な細胞種構成を提供できる可能性を認めたことは、興味深い。

今後、他の成長因子や担体および添加物などの検討を継続していくことで、骨石灰化を確実にするための条件の最適化が可能であると考え

E. 結論

ビタミン D は破骨細胞や骨芽細胞に作用するばかりではなく、間葉系細胞に作用して脂肪細胞への分化を抑制し、骨量を増加させたことから、骨の形成においては、間葉系細胞の足場とともにビタミン D のような外来因子が重要な役割をする可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ 研究成果に関する一欄表

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	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
梅澤明弘	第3章 再生医療のキーテクノロジー技術編5		細胞分離・幹細胞工学、「図解再生医療工学」	(株)工業調査会	東京	2004	
梅澤明弘	⑥再生医療とエピジネティクス エピジネティクス	佐々木裕之		シュプリンガー・フラーク東京	東京	2004	229-234
梅澤明弘	7章再生治療モデル、「ヒト疾患モデル-難病の病態解明と診断・治療への応用」	秦 順一	間葉系幹細胞を用いた細胞治療	文光堂	東京	2004	
清野 透	遺伝子医学MOOK 1 第1章1-3), 細胞周期と細胞の不死化	田畑泰彦編	「再生医療へのブレイクスルー」	メディカルドゥ	東京	2004.	pp37-41

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Kuroda, M., Oikawa, K., Yoshida, K., Takeuchi, A., Tekeuchi, M., Usui, M., Umezawa, A., and Mukai, K.	Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL.	Cancer letter	in press		2005
Terai, M., Uyama, T., Sugiki, T., Li, X-K., Umezawa, A., and Kiyono, T. Correspondence to AU.	Immortalization of human fetal cells: The life span of umbilical-cord-blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway.	Mol. Biol. Cell,	16	1491-1499	2005
Tsuchiya, K., Mori, T., Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., Matsuno, T., Sakamoto, M., and Umezawa, A Correspondence to AU.	Custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet.	Cell Tissue Res,	316	141-153,	2004
Sakurai, K., Iizuka, S., Shen, J-S., Meng, X-L., Mori, T., Umezawa, A., Ohashi, T., and Eto, Y.	Brain transplantation of genetically modified bone marrow stromal cells corrects CNS pathology and cognitive function in MPS VII mice.	Gene Therapy,	11 (19)	1475-1481,	2004
Oikawa, K., Ohbayashi, T., Kiyono, T., Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K.	Expression of a Novel Human Gene, Human Wings Apart-Like (hWAPL), Is Associated with Cervical Carcinogenesis and Tumor Progression.	Cancer Res,	64	3545-3549,	2004

Takeda, Y., Mori, T., Imabayashi, H., Kiyono, T., Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and Umezawa, A. Correspondence to AU.	Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?	J Gene Med,	6(8)	833-845,	2004
Higuchi, A., Hamamura, A., Shindo, Y., Kitamura, H., Yoon, B-O., Mori, T., Uyama, T., and Umezawa, A.	Photon-modulated changes of cell attachments on poly(spiropyran-co-methylmethacrylate) membranes,	Biomacromolecules	5(5)	1770-1774	2004
梅澤明弘	ヒト幹細胞を用いた再生医療	昭和学会誌	64 (1)		2004
梅澤明弘、竹田征治	骨髄間質細胞の可塑性	実験医学	22 (1)	12-16	2004
梅澤明弘、五條理志	間葉系幹細胞の基礎と臨床	Molecular Medicine	40 (12)		2004
梅澤明弘	骨芽細胞から神経細胞への分化	再生医療	3(1)	61-68	2004
梅澤明弘	書評「絵で分かる 血液のはたらき」	医学のあゆみ	209 (2)	115	2004
梅澤明弘	第1部必要な基礎知識 9 遺伝子変異	病理と臨床臨時増刊号	22	47-53	2004
梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平	骨再生・形状システムの構築—生分解性ハイブリッドシートを用いて。	医学のあゆみ	209 (12)	964-967	2004
梅澤明弘	骨をつくる—細胞移植の基盤研究とバイオマテリアルによる臨床応用	医学のあゆみ	209 (12)	929	2004
梅澤明弘、槌谷宏平、牛田多加志、陳国平	再生医療の現状と化学工学への期待	化学工学	68 (8)	414-417	2004
梅澤明弘、竹田征二	単離間葉系幹細胞心筋細胞への分化	生体の科学	55 (4)	329-333	2004

梅澤明弘	骨髓間葉系幹細胞を用いた再生医療	顕微鏡	39 (2)	84-87	2004
梅澤明弘	精子形成に関わるエピジネティクス	Hormone frontier in genecolo gy	11 (3)	231- 234	2004
梅澤明弘	骨髓間葉細胞の現状と展望	治療学	38 (10)	1056- 1060	2004
小室一成、山下潤、桜田一洋、梅澤明弘	「座談会」細胞移植 細胞移植の現状と課題—基礎から臨床へ—	治療学	38 (10)	1133- 1143	2004
Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, Harada H, Noguchi T, Toyoda M, Sato S, Teranaka T.	Immortalization of Cementoblast Progenitor Cells With Bmi-1 and TERT.	J Bone Miner Res.	20	50-7	2005
Kuroda, M., Kiyono, T, Oikawa, K., Yoshida, K., and Mukai, K.	The human papillomavirus E6 and E7 inducible oncogene, <i>hWAPL</i> , exhibits potential as a therapeutic target.	Br. J. Cancer Res.		in press	
Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T., Galloway D.A.	Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex.	Genes Dev.,	18	2269- 2282,	2004
Hara S, Nakashima S, Kiyono T, Sawada M, Yoshimura S, Iwama T, Sakai N.	Ceramide triggers caspase activation during gamma-radiation-induced apoptosis of human glioma cells lacking functional p53.	Oncol Rep.	12	119-23,	2004.
Kawabe, A., Shimada, Y., Soma, T., Maeda, M., Itami, A., Kaganoi, J., <u>Kiyono, T.</u> and Imamura, M.	Production of prostaglandinE2 via bile acid is enhanced by trypsin and acid in normal human esophageal epithelial cells.	Life Sci	75	21-34	2004
Sugimoto N, Tatsumi Y, Tsurumi T, Matsukage A, <u>Kiyono T.</u> Nishitani H, Fujita M.	Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding.	J Biol Chem,	279	19691- 7	2004
Oikawa, K., Ohbayashi, T., <u>Kiyono, T.</u> , Nishi, H., Isaka, K., Umezawa, A., Kuroda, M., and Mukai, K.	Expression of a novel human gene, <i>hWAPL</i> , is associated with cervical carcinogenesis and tumor progression.	Cancer Res.,	64	3545-9,	2004.
Hara, S., Nakashima, S., <u>Kiyono, T.</u> , Sawada, M., Yoshimura, S., Yamada, J.,	p53-independent ceramide formation in human glioma cells during gamma-radiation-induced apoptosis.	Cell Death Differ.	11	853-61	2004

Iwama, T., Banno, Y., Shinoda, J., and Sakai, N.					
Sawada, M., <u>Kiyono, T.</u> , Nakashima, S., Shinoda, J., Naganawa, T., Hara, S., Iwama, T., and Sakai, N.	Molecular mechanisms of TNF- α -Induced ceramide formation in human glioma cells.	Cell Death Differ.	11	997-1008	2004
Takeda, Y., Mori, T. Imabayashi, H, <u>Kiyono, T.</u> , Gojo, S., Miyoshi, S., Ita, M., Segawa, K., Ogawa, S., Sakamoto, M., Nakamura, S., and Umezawa, A.	Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?	J. Gene Med.,	6	833-45	2004
Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Fujita, M., <u>Kiyono, T.</u> , Nishiyama, Y., and Tsurumi T.	Inhibition of S-phase cyclin-dependent kinase activity blocks expression of Epstein-Barr virus immediate-early and early genes, preventing viral lytic replication.	J. Virol.	78	104-115	2004
<u>清野 透</u>	上皮系細胞の増殖制御と不死化	細胞	36	437-440	2004
<u>清野 透</u>	遺伝子導入によるヒト細胞寿命の延長	医学のあゆみ	209	931-936,	2004
Kotobuki, N.,	Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics.	Biomaterials	26(7)	779-785	2005
Nishikawa, M.,	Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined with marrow mesenchymal cells: quantitative and three-dimensional image analysis.	Cell Transplant	13(4)	367-376	2004
Kihara, T.,	Three-dimensional visualization analysis of in vitro cultured bone fabricated by rat marrow mesenchymal stem cells.	Biochem Biophys Res Commun	316(3)	943-948	2004
Katsuko S.Furukawa, Shunsuke Miyauchi, Daisuke Suzuki, Yoshikazu Umezu, Tsuneo Shinjo, <u>Takashi Ushida</u> , Miki Eguchi, Tetsuya Tateishi,	Bone tissue engineering based on bead-cell sheets composed of calcium phosphate beads and bone marrow cells,	Materials Science and Engineering C	24	437-440	2004
Shunsuke Miyauchi, Katsuko S. Furukawa, Yoshikazu Umezu, Yasuyuki Ozeki, <u>Takashi Ushida</u> , Tetsuya Tateishi	Novel bone graft model using bead-cell sheets composed of tricalcium phosphate beads and bone marrows,	Materials Science and Engineering C	24	875-879	2004
Aoyama, T., Bojian Liang, B., Okamoto, T., Matsusaki, T., Nishijo, K., Ishibe, T., Yasura, K., Nagayama, S., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J.	PGE2 signal through EP2 promotes the growth of articular chondrocytes.	J. Bone Miner. Res.,	in press		
Aoyama, T., Okamoto, T., Nagayama, S., Nishijo, K., Ishibe, T., Yasura, K., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J.,	Methylation in the core-promoter region of the chondromodulin-I gene determines the cell-specific expression by regulating the binding of transcriptional activator, Sp3.	J. Biol. Chem.,	279	28789-97.	2004

戸口田淳也、青山朋樹	臨床応用をめざした間葉系幹細胞の基礎と治療実験.	医学のあゆみ	209.	937-941	2004
Watanabe K Hishiya A	Mouse models of senile osteoporosis	Molecular Aspects of Medicine			2005
Sasaki A Hinck L Watanabe K	RumMAGE-D the members: Structure and Function of a New Adaptor Family of MAGE-D Proteins.	Journal of Receptor and signal transduction			2005
Hishiya A Watanabe K	Progeroid syndrome as a model for impaired bone formation in senile osteoporosis	Journal of Bone Mineral and Metabolism	22	399-403	2004

IV 研究成果の刊行物・別冊



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Cancer Letters xx (2004) 1–8

CANCER
Letters
www.elsevier.com/locate/canlet

Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene *hWAPL*

Masahiko Kuroda^{a,b,c,*}, Kosuke Oikawa^{a,b,c}, Keiichi Yoshida^{a,c}, Aya Takeuchi^d, Masaru Takeuchi^d, Masahiko Usui^d, Akihiro Umezawa^{c,e}, Kiyoshi Mukai^a

^aDepartment of Pathology, Tokyo Medical University, 6-1-1 Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8402, Japan

^bCREST Research Project, Japan Science and Technology Corporation, 4-1-6 Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

^cShinanomachi Research Park, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

^dDepartment of Ophthalmology, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishi-shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

^eNational Research Institute for Child Health and Development, 3-35-31 Taishido, Setagaya-ku, Tokyo 154-8567, Japan

Received 28 April 2004; received in revised form 26 July 2004; accepted 5 August 2004

Abstract

hWAPL is a human oncogene associated with uterine cervical cancer. Here, we demonstrate that *hWAPL* transcription is induced by 3-methylcholanthrene (3-MC) in the cervical carcinoma-derived cell line SiHa. *hWAPL* transcription was analyzed with evaluation of the mRNA and heterogeneous nuclear RNA (hnRNA) levels by quantitative real time PCR analysis. Flow cytometric analysis suggested that the alteration of *hWAPL* mRNA levels is independent of cell cycle profile. We also found that DMSO and some components of FBS affect *hWAPL* transcription. Interestingly, when the aryl hydrocarbon receptor (AhR) function was inhibited by α -naphthoflavone (ANF), the induction of *hWAPL* transcription by 3-MC was greater than that in AhR-functioning normal cells. These observations suggest that there are complex mechanisms regulating the transcription of *hWAPL*. Furthermore, mRNA level of a mouse homolog of *hWAPL* in mouse uterus was induced by 3-MC injection into the abdominal cavity. Thus, some effects from 3-MC exposure on uterus may be mediated by the unscheduled overexpression of *hWAPL*.

© 2004 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: 3-Methylcholanthrene (3-MC); *hWAPL*; Uterine cervical cancer; Aryl hydrocarbon receptor (AhR); α -naphthoflavone (ANF)

1. Introduction

Previously, we have isolated and characterized a novel human gene termed *hWAPL* [1]. Our initial observations suggested that *hWAPL* expression is associated with uterine cervical cancer, although the mechanism was not clear. *hWAPL* is the human homolog of the *wings apart-like (wapl)* gene in

* Corresponding author. Address: Department of Pathology, Tokyo Medical University, 6-1-1 Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8402, Japan. Tel.: +81 3 3351 6141x425; fax: +81 3 3352 6335.

E-mail address: kuroda@tokyo-med.ac.jp (M. Kuroda).

Drosophila melanogaster. The protein encoded by *wapl* controls heterochromatin organization and was identified as a modifier of both PEV and chromosome inheritance [2,3]. Thus, hWAPL is also expected to be involved in heterochromatin maintenance and epigenetic control.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are carcinogenic and immunotoxic chemicals widely distributed in the environment [4]. 3-Methylcholanthrene (3-MC) is one of the most toxic and the best-studied compounds in the PAHs. Most of the toxic effects of PAHs are mediated by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) [5]. When PAHs bind to the AhR, the ligated AhR translocates from the cytoplasm to the nucleus where it switches its partner molecule from heat shock protein 90 kD (Hsp90) to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) [6]. The resulting AhR/Arnt heterodimer binds a specific DNA sequence, designated xenobiotic responsive element (XRE), in the promoter region of target genes to enhance their expression [6]. On the other hand, several studies have suggested the existence of AhR independent pathways for PAH toxicity [7,8]. In all cases, many of the putative target genes responsible for the toxicity symptoms have yet to be identified.

In the present study, we demonstrate that *hWAPL* is a target gene of 3-methylcholanthrene. The results suggest that carcinogenesis by 3-MC may involve alterations of *hWAPL* gene expression.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

3-Methylcholanthrene (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) for cultured cells and in olive oil for treatment of mice. Aphidicolin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan), Nocodazole (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) and α -naphthoflavone (Sigma) were prepared in DMSO.

2.2. Cell cultures

The human uterine cervical carcinoma-derived cell lines, SiHa, CaSki and HeLa cells, were obtained from American Type Culture Collection (ATCC),

and grown in DMEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Trace Scientific Ltd, Melbourne, Australia) at 37 °C in a 5% CO₂ environment. Where indicated, SiHa cells were grown in DMEM supplemented with 10% charcoal/dextran treated FBS (CTF) (Biosource, Rockville, MD) or 0.4% (w/v) bovine serum albumin (BSA) (Trace) instead of FBS.

2.3. Immunoblot analysis

Protein samples were prepared as previously described [9]. Immunoblot analysis was performed as previously described [1].

2.4. Flow cytometric analysis

To determine cell cycle profiles, cells at different time points were harvested, washed, and fixed with a solution containing 70% ethanol and 30% PBS. After incubation overnight at 4 °C, cells were suspended in staining buffer (propidium iodide, 50 μ g/ml; RNaseA, 0.1%; glucose, 1 mg/ml in PBS). Then, after incubation for 30 min at room temperature, the cells were analyzed with a FACS Vantage flow cytometer using the Cell Quest acquisition and analysis program (BD Biosciences, San Jose, CA).

2.5. Animals and treatment

C57/BL6 female mice (6 weeks old) were purchased from Oriental Yeast Co., Ltd (Tokyo, Japan). The mice received a single intraperitoneal injection of 1 ml of olive oil containing 3-MC at a dose of 80 mg/kg of body mass. The control mice were injected with olive oil alone. Uterus samples were harvested 24 and 48 h after injection and subjected to real time PCR analysis.

2.6. RNA isolation and quantitative real time PCR

First strand cDNA synthesis was performed as described [10] using M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen Japan, Tokyo, Japan) with Oligo (dT)₁₇ (for Figs. 1–3 and 6) or Random Primers (Invitrogen) (for Figs. 4 and 5).

Real time PCR analysis for *hWAPL* and human β -actin mRNAs was performed as described [1]

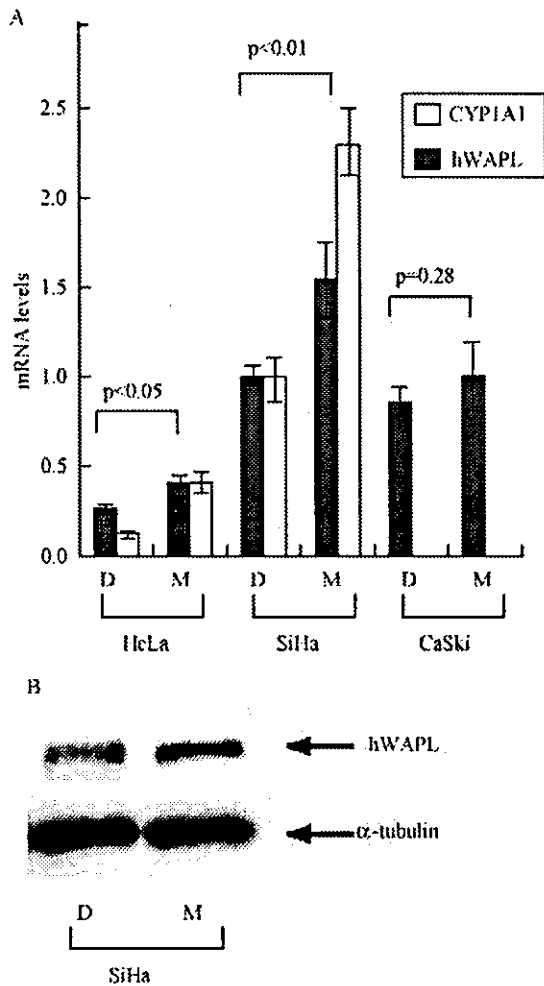


Fig. 1. Effects of 3-MC on *hWAPL* expression in the human cervical cancer-derived cell lines. D, DMSO alone; M, 3-MC. (A) HeLa, SiHa and CaSki cells were treated with 0.1% DMSO alone or 1 μM of 3-MC for 6 h. Then, the *hWAPL* and *CYP1A1* mRNA levels in the cells were evaluated by quantitative real time PCR analysis. Data were normalized to the mRNA levels of SiHa cells treated with DMSO alone that was arbitrarily set to 1 in the graphical presentation. Bars, s.e. (B) SiHa cells were treated with 0.1% DMSO alone or 1 μM 3MC for 6 h, and then the protein samples were prepared and subjected to western blotting analysis. α-tubulin was also shown as a loading control.

except for the 40 PCR cycles at 95 °C for 3 s and 68 °C for 30 s. Real Time PCR analysis for human *CYP1A1* mRNA and *hWAPL* hnRNA was also performed with the same PCR protocol. The nucleotide sequences of primers specific for human *CYP1A1* mRNA were previously described [11].

Primers specific for *hWAPL* hnRNA are 5'-GAGAT-TACACCCTGCACTCC-3' and 5'-TTGCTCCCACTTACTATGGCC-3'. For mouse cDNAs, we used primers specific for the mouse homolog of *hWAPL* mRNA, 5'-ACCTGGTGGAGTATAGTGCCC-3' and 5'-TGGCAGAGACACCCAAGAAGC-3' (The nucleotide sequences were obtained from mKIAA0261 in Database), mouse β-actin mRNA, 5'-AGCCTTCCTTCTTGGGTATGG-3' and 5'-CACTTGGCGGTGCACGATGGAG-3', and mouse *CYP1A1* mRNA, 5'-TTTGGTTTGGGCAAGCGA-3' and 5'-GTCTAAGCCTGAAGATGC-3'. Reaction mixtures were denatured at 95 °C for 30 s then subjected to 40 PCR cycles at 95 °C for 3 s, 68 °C for 30 s, and 86 °C for 6 s for mouse *WAPL* mRNA, and at 95 °C for 3 s, 68 °C for 30 s, and 85 °C for 6 s for mouse β-actin and *CYP1A1* mRNAs, respectively. *hWAPL*, mouse *WAPL* and human and mouse *CYP1A1* mRNA levels and *hWAPL* hnRNA level were normalized to human and mouse β-actin signals, respectively. The absence of PCR products after the PCR on non-reverse-transcribed total RNA served as a routine check for contaminating genomic DNA. We performed the experiments to determine mRNA and hnRNA levels in triplicate.

The data were analyzed using Student's *t* test, and *P*s < 0.05 were considered to indicate significant differences.

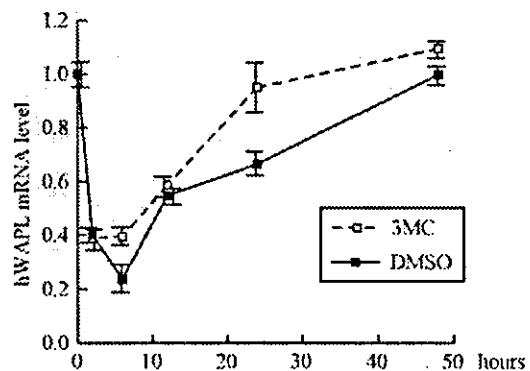


Fig. 2. Kinetics of *hWAPL* mRNA levels in SiHa cells at several time points after treatment with DMSO alone or 1 μM of 3-MC. The *hWAPL* mRNA levels in the cells were evaluated by quantitative real time PCR analysis. Data were normalized to the mRNA level at 0 h that was arbitrarily set to 1 in the graphical presentation. Bars, s.e.

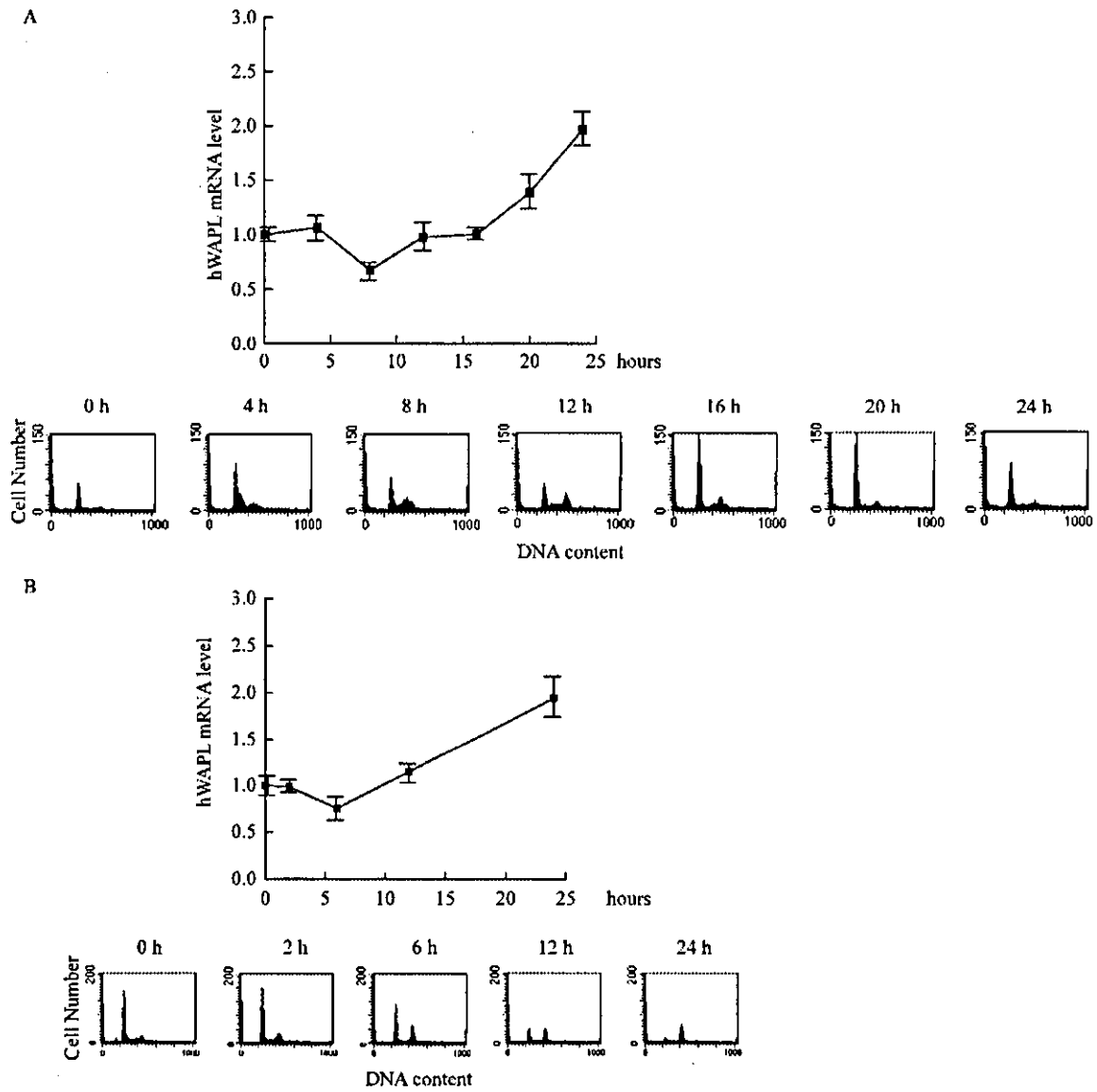


Fig. 3. Cell cycle profiles and *hWAPL* mRNA levels. *hWAPL* mRNA levels in the cells were determined by real time PCR analysis. Data were normalized to the mRNA level at 0 h that was arbitrarily set to 1 in the graphical presentation. Bars, *s.e.*. Cell cycle profiles of the cells at each time points were also confirmed by flow cytometric analysis. (A) Kinetics of *hWAPL* mRNA levels in SiHa cells at 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 h after releasing from G1 arrest by 1 µg/ml aphidicolin treatment. (B) Kinetics of *hWAPL* mRNA levels in SiHa cells at 0, 2, 6, 12 and 24 h after 50 ng/ml nocodazole treatment.

3. Results and discussion

To examine whether 3-MC affects *hWAPL* expression, we treated various human uterine cervical cancer-derived cell lines with dimethylsulfoxide (DMSO) alone or 3-MC for 6 h. Then, we calculated

the amounts of the *hWAPL* mRNAs in the cells by quantitative real time PCR analysis, and found that *hWAPL* mRNA levels were increased in the 3-MC-treated cells (Fig. 1A). The increases in *hWAPL* mRNA levels in SiHa cells was most remarkable among the cell lines examined. Because the *CYPIA1* gene is

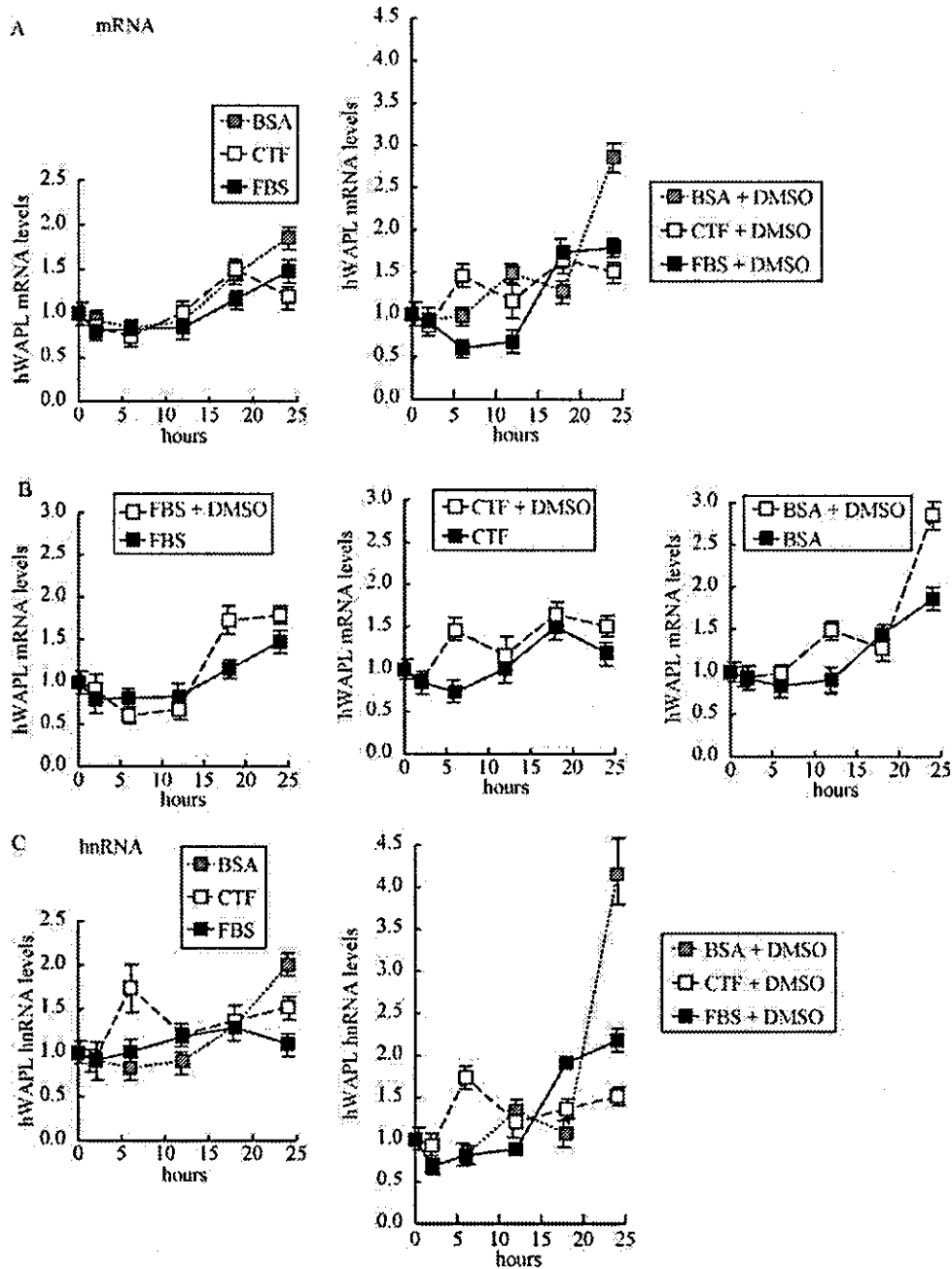


Fig. 4. Effects of FBS, CTF, BSA and DMSO on *hWAPL* mRNA and hnRNA levels in SiHa cells. *hWAPL* mRNA and hnRNA levels in SiHa cells at 0, 2, 6, 12, 18 and 24 h after replacing the growth medium to a fresh medium supplemented with FBS, CTF or BSA with or without 0.1% DMSO were determined by real time PCR analysis. Data were normalized to the mRNA and hnRNA level at 0 h that was arbitrarily set to 1 in the graphical presentation. Bars, s.e. (A) Kinetics of the *hWAPL* mRNA levels in the cells grown in the growth medium supplemented as indicated. (B) Graphical representation of the effects of DMSO on the kinetics of *hWAPL* mRNA levels in the cells grown in the growth medium supplemented with FBS, CTF or BSA. (C) Kinetics of the *hWAPL* hnRNA levels in the cells grown in the growth medium supplemented as indicated.