

厚生労働科学研究研究費補助金
食品の安全性高度化推進研究事業

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 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 清河 信敬

平成 17 (2005) 年 3 月

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	-----5
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	-----8
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	-----11
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	-----14
安江 博	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----19

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
総括研究報告書

バイオフィラポ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 部長

研究要旨： バイオフィラポノイド(BFN)がトポイソメラーゼ II 抑制作用により、培養細胞に対して MLL 遺伝子の再構成を引き起こすことが報告されている。MLL 遺伝子の再構成は乳児白血病の発症に関与することから、妊娠母体の BFN 摂取と胎児の乳児白血病発症との関連性が推測される。そこで本研究では、生体が BFN を摂取した場合の血球系細胞に対する MLL 遺伝子の再構成作用について検討し、そ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”をさらに改良し、移植したヒト造血系細胞に対する BFN の効果を高感度サザンブロット解析により検討した結果、MLL 遺伝子切断が細胞株では確認されたが、正常血球では確認されなかった。また、RT-PCR、ligation-mediated PCR 等により切断された MLL 遺伝子の再構成について検討したが、検出されなかった。これまでの検討と合わせて、BFN は生体内でも血球細胞に MLL 遺伝子の切断を誘導するが、この効果は未熟な血球に限定されており、また切断が起こってもさらに他の遺伝子との再構成を起こす頻度は非常に低いものと推測される。乳児白血病の発症には BFN による MLL 遺伝子の切断のみでは十分ではなく、これに加えて宿主側の何らかの他の要因が必要であると考えられる。また、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、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い、ブタ CD3 遺伝子の解析を行った。

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

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的とする。

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 M-CSF+IL3+IL6+SCF 添加 4 週間培養し、接着細胞を未熟単球として、浮遊細胞を未熟骨髓球として用いた。また、マウス骨髓間質細胞株 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. NOD/SCID、NOG マウスを用いたヒト正常造血細胞再構築モデル

NOD/SCID あるいは NOG マウスに 3Gy の放射線照射を行った後、ヒト骨髓幹細胞およびヒト血球系細胞株を静注により移植し、一定期間後に末梢血、骨髓血および脾臓細胞を採取してヒト白血球 に対する抗体

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ポノイド(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

を用いた免疫蛍光染色を行い、ヒト造血細胞をセルソーターにより分取した。

3. サザンプロット解析

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プロット解析を行った。また NOD/SCID あるいは NOG マウスにヒト骨髓幹細胞およびヒト血球系細胞株を移植、生着させた後に BFN を腹腔内注射により投与し、24 あるいは 48 時間後に骨髓、末梢血、脾臓から回収したヒト由来血球のゲノム DNA を抽出して、上記と同様のサザンプロット解析を行った。サザンプロットの検出は DIG 標識-化学発光で行った。

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シーケンシング情報に基づき 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(LM-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、シャトルベ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-ベクターに 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-ベクタープライマーを用いたシーケンシングにより決定した。

6. 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 の結合
- 2) MitoCapture
- 3) 核 DNA の電気泳動
- 4) 核 DNA 含有量の測定による sub-diploid 細胞の検出

10. BFN によるマウスの骨髓抑制の検討

妊娠マウスに対して BFN を定期的に腹腔内注射により投与し、出産後の子ネズミについて生後 3 週間目の時点で骨髓細胞を回収し、各系統の細胞の割合および絶対数を測定した。

11. ブタ CD3 遺伝子の解析

年度までに解析したブタの発現遺伝子ライブラリーから、ヒト遺伝子との相同性を想定して CD3 ζ 、 η 鎖遺伝子のクローン同

定した。得られたクローンについては、全塩基を解析した。また、この配列をもとに、ブタ BAC ライブラリーから、当該遺伝子を含むクローンを選択し、ゲノム構造を解析した。

C. 研究結果

1. 細胞株への BFN 投与実験 (清河・山田)

種々の培養細胞株に対して Flavone 等の BFN 添加培養による MLL 遺伝子の切断、再構成について検討した結果、1) サザンプロット解析により特定の血球系細胞株で MLL 遺伝子の切断を認めるが、この切断には細胞選択性があり全く切断を認めない株もあること、2) FISH 法による解析により、切断を認めた場合でも MLL 遺伝子は完全には解離しないで存在していること、3) 切断を認めた場合でも、通常 PCR、LM-PCR/シーケンシングによる解析の範囲では、他の遺伝子との再構成は検出されないこと、が明らかとなった。

2. 正常ヒト造血細胞への BFN 投与実験 (清河・山田)

ヒト骨髓 CD34 陽性細胞から試験管内で種々の系統の血球細胞を分化誘導し、上記と同様に検討した結果、未熟骨髓球等の増殖のさかんな血球では MLL 遺伝子の切断が認められたが、成熟単球では認められなかった。また、切断が認められた場合でも、他の遺伝子との再構成は検出されなかった。

3. BFN によるヒト血液細胞のアポトーシス誘導 (清河・山田)

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ことから、BFN のヒト血球に体するアポトーシス誘導について検討した。この結果、多くの種類の BFN が様々な系統のヒト血球系細胞株、および正常ヒト血球にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

また、妊娠マウスに BFN を投与したところ、生まれてきた子マウスでは、対照群に比較して、有意な骨髓抑制を認めた。

4. ヒト造血再構築動物への BFN の投与実験

a) NOD/SCID マウスを用いたヒト造血系再構築モデル (山田・穂積・清河)

昨年度までに確立したヒト血球系細胞再構築 NOD/SCID、NOG マウスに BFN を投与し、ヒト血球を回収して MLL 遺伝子再構成について検討した。特に検出感度を向上させてサザンプロットによる解析を行った結果、BFN 感受性のヒト白血病細胞株 BV173 では MLL 遺伝子の切断が確認されたが、PCR、LM-PCR/シーケンシングによる検討では他の遺伝子との再構成を検出することはできなかった。また、CD34 陽性骨髓細胞を移植して再構築したヒト正常血球では、MLL 遺伝子の切断を確認できなかった。

b)免疫不全ブタの作出(清河・安江)

当初の計画では、昨年度の時点で免疫不全ブタの使用が可能となる見込みであったが、その作成に予想以上に時間がかかり、研究期間内に作出することができなかった。これまでに、RAG 遺伝子の改変によりリンパ球の分化・増殖が阻害されるシステムを構築し、これを導入したブタ繊維芽細胞株を樹立した。現在米国のベンチャー企業に依頼し、この細胞株の核を移植した RAG 障害クローンブタの作出を試みているが、この段階でうまく行かず、出産に至っていない。本年度、通常ブタを用いたブタ胎児へのヒト造血細胞移植実験の開始も考慮したが、諸家の報告からヒト胎児造血モデルとしては免疫不全ブタ使用の方が有利と判断し、その作出を待っている状態である。

本年度は、免疫不全ブタが作出された際、その免疫系解析の手段としての抗ブタ白血球抗体作成およびブタ免疫関連遺伝子解析を引き続き行った。ブタ CD3 のゲノム構造を明らかにするために、ブタ BAC ライブラリーから、当該遺伝子を含むクローンを選択し、CD3 と鎖遺伝子のエクソン 2~8 下流の領域にかけて塩基配列を決定した。決定された塩基配列を解析し、エクソン、イントロンを明らかにし、さらに CD3 η 鎖のエクソン 8 についても明らかにした。ヒト、マウスと比較したところ、ゲノム構造については 3 種の間に差異は認められなかった。

D. 考察

今回の検討から、生体内においても BFN は増殖のさかんな未熟血球系細胞に対して MLL 遺伝子の切断を誘導するものの、成熟血球ではこの切断は起こりにくく、また切断が起こった場合でも、MLL 遺伝子が他の遺伝子と再構成を起こす頻度は非常に低いと推測される。さらに、BFN により遺伝子切断が起こった細胞は、アポトーシスによって死滅し、除去されるものと考えられる。従って、BFN には確かに MLL 遺伝子の切断を誘導する作用を持つが、これが直接乳児白血病の発症に結びつく可能性はこれまでの検討結果のみからは否定的と判断される。しかし、BFN は母体が摂取した場合胎児の骨髄抑制を誘導する可能性もあり、今後さらに慎重な検討が必要と考えられる。

当初計画していた免疫不全ブタを用いた母体の BFN 摂取の胎児造血系に対する検討は、研究期間内には行うことができなかった。しかし、このモデルは今後の食品安全確保研究事業に有用と考えられ、免疫不全ブタの作出はさらに継続中である。本研究で行った抗ブタ白血球抗体作成およびブタ免疫関連遺伝子解析は、今後免疫不全ブタが作出された場合にその免疫系解析の手段として有用と考えられる。また、CD3 の種間の相同性の比較から、ブタは、マウスと

ヒトの遺伝的関係よりも、ヒトに近いことが示唆された。他の遺伝子配列に於いても同様なことが観察されており、改めて、ブタはヒトのモデル動物として適していることが示唆された。

E. 結論

BFN は生体内でも血球細胞に MLL 遺伝子の切断を誘導するが、この効果は未熟な血球に限定されており、また切断が起こってもさらに他の遺伝子との再構成を起こす頻度は非常に低いものと推測される。乳児白血病の発症には BFN による MLL 遺伝子の切断のみでは十分ではなく、これに加えてホスト側の何らかの他の要因が必要であると考えられる。また、今回の研究で行った抗ブタ白血球単クローン抗体の作成、ならびにブタ免疫関連遺伝子の解析は、今後“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”が確立した場合、その解析手段として今後の食品安全確保研究事業に重要と考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* (in press).
- 2) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, 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. *Modern Pathol* 17:423-429, 2004.
- 3) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, 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 Immunol* 48:377-387, 2004.
- 4) Tang W, Kiyokawa N, Eguchi T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Enosawa S, Mimori K, Itagaki M, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Amemiya H, Fujimoto J. Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I a chain. *Hybridoma Hybridom* 23:187-191, 2004.
- 5) Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-

derived cells. *J Cell Sci* 117:3911-3922, 2004.

6)Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahshi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK₂ hampers PLC-g2 phosphorylation and Ca²⁺ influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112:575-582, 2004.

7)Tang W-R, Shioya N, Eguchi T, Ebata T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Takagaki Y, Enosawa S, Itagaki M, Taguchi T, Kiyokawa N, Amemiya H, Fujimoto J. Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor d-chains. *Veterinary Immunol Immunopathol* (in press).

8)Fujimaki R, Hayashi K, Watanabe N, Yamada T, Toyama Y, Tezuka K, Hozumi N. Expression of Cre recombinase in the mouse developing chondrocytes driven by the mouse a2(XI) collagen promoter. *J Bone Mineral Metabolism* (in press)

9)Maeda N, Watanabe M, Okamoto S, Kanai T, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Katsume A, Nuriya H, Sandhu J, Ishii H, Kohara M, Hibi T. Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone. *Liver International* 24:259-267, 2004.

10)Ito K, Nakazato T, Murakami A, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Ohigashi H, Ikeda Y, Kizaki M. Induction of apoptosis in human myeloid leukemic cells by 1'-acetoxychavicol acetate through a mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism. *Clinical Cancer Research* 10:2120-2130, 2004.

11)Du W, Hashiguchi A, Hattori Y, Ikeda Y, Kondoh K, Hozumi N, Sakamoto M, Hata J, Yamada T. Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and alteration by thalidomide treatment. *Pathology International* 54:285-294, 2004.

12)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 p53 at ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Research* 64:1071-1078, 2004.

13)Fujiwara N, Fusaki N, Hozumi N. CD72 stimulation modulates anti-IgM induced apoptotic signaling through the pathway of NF-kB, c-Myc and p27Kip1. *Microbiol Immunol* 48:59-66, 2004.

14)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*

91:133-139, 2004.

15)Kohyama M, Sugahara D, Sugiyama S, Yagita H, Okumura K, Hozumi N. Inducible costimulator-dependent IL-10 production by regulatory T cells specific for self-antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4192-4197, 2004.

16)Hozumi N, Tonegawa S. Pillars Article: Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *J Immunol* 173:4260-4264, 2004.

17)Shigenari A, Ando A, Renard C, Chardon P, Shiina T, Kulski JK, Yasue H, Inoko H. Nucleotide sequencing analysis of the swine 433-kb genomic segment located between the non-classical and classical SLA class I gene clusters. *Immunogenetics*. 55:695-705, 2004.

18)Fujisaki S, Sugiyama A, Eguchi T, Watanabe Y, Hiraiwa H, Honma D, Saito T, Yasue H. Analysis of a full-length cDNA library constructed from swine olfactory bulb for elucidation of expressed genes and their transcription initiation sites. *J Vet Med Sci* 66:15-23, 2004.

19)Nakano S, Kishi H, Ogawa H, Yasue H, Okano A, Okuda K. Trophinin is expressed in the porcine endometrium during the estrous cycle. *J Reprod Dev* 49:127-134, 2004.

20)Sarker N, Kiuchi S, Yasue H, Mitsuhashi T. Radiation hybrid map assignments of 11 ESTs obtained from a 28-day-old swine embryo cDNA library to the IMPRH map. *Anim Genet* 35:227-229, 2004.

2. 学会発表

1)山田健人, 近藤裕道, 高松めぐみ, 杜ぶん林, 安江博, 清河信敬, 藤本純一郎. in situ での抗原・核酸同時検出法とその自動化. 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月, 2004 年.

2)伊藤圭介, 仲里朝周, 宮川義隆, 山田健人, 池田康夫, 木崎昌弘. 植物由来新規合成化合物 ACA による白血病細胞のアポトーシス誘導とその分子機構の解析. 第 66 回日本血液学会総会, 第 46 回日本臨床血液学会総会, 京都, 9 月, 2004 年.

3)高鶴敏文, 香山雅子, 穂積信道. IL-10 を高産生する CD4+ICOS+Treg 細胞の末梢における分化誘導機構第 46 回免疫学会総会, 札幌, 12 月, 2004 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

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 部長

研究要旨： バイオフィラボノイド(BFN)がトポイソメラーゼ II 抑制作用により、培養細胞に対して MLL 遺伝子の再構成を引き起こすことが報告されている。MLL 遺伝子の再構成は乳児白血病の発症に関与することから、妊娠母体の BFN 摂取と胎児の乳児白血病発症との関連性が推測される。そこで本研究では、生体が BFN を摂取した場合の血球系細胞に対する MLL 遺伝子の再構成作用について検討し、そ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。“免疫不全マウスを用いたヒト造血系再構築モデル”に移植したヒト造血系細胞に対する BFN の効果を高感度サザンブロット解析により検討した結果、MLL 遺伝子切断が細胞株では確認されたが、正常血球では確認されなかった。また、RT-PCR、ligation-mediated PCR 等により切断された MLL 遺伝子の再構成について検討したが、検出されなかった。これまでの検討と合わせて、BFN は生体内でも血球細胞に MLL 遺伝子の切断を誘導するが、この効果は未熟な血球に限定されており、また切断が起こってもさらに他の遺伝子との再構成を起こす頻度は非常に低いものと推測される。乳児白血病の発症には BFN による MLL 遺伝子の切断のみでは十分ではなく、これに加えてホスト側の何らかの他の要因が必要であると考えられる。

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的とする。

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 M-CSF+IL3+IL6+SCF 添加 4 週間培養し、接着細胞を未熟単球として、浮遊細胞を未熟骨髄球として用いた。また、マウス骨髓間質細胞株 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. NOD/SCID, NOG マウスを用いたヒト正常造血細胞再構築モデル
NOD/SCID あるいは NOG マウスに 3Gy の放射線照射を行った後、ヒト骨髓幹細胞およびヒト血球系細胞株を静注により移植し、一定期間後に末梢血、骨髓血および脾臓細胞を採取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、ヒト造血細胞をセルソーターにより分取した。

3. 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。また NOD/SCID あるいは NOG マウスにヒト骨髓幹細胞およびヒト血球系細胞株を移植、生着させた後に BFN を腹腔内注射により投与し、24 あるいは 48 時間後に骨髓、末梢血、脾臓から回収したヒト由来血球のゲノム DNA を抽出して、上記と同様のサザンブロット解析を行った。サザンブロットの検出は DIG 標識-化学発光で行っ

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シーケンス情報に基づき 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(LM-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、シャトルベクターのマルチクロ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-ベクターに 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-ベクタープライマーを用いたシーケンシングにより決定した。

6. 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 の結合
- 2) MitoCapture
- 3) 核 DNA の電気泳動
- 4) 核 DNA 含有量の測定による sub-diploid 細胞の検出

10. BFNによるマウスの骨髄抑制の検討

妊娠マウスに対して BFN を定期的に腹腔内注射により投与し、出産後の子ネズミについて生後 3 週間目の時点で骨髄細胞を回収し、各系統の細胞の割合および絶対数を測定した。

C. 研究結果

1. 細胞株への BFN 投与実験 (清河・山田)

種々の培養細胞株に対して Flavone 等の BFN 添加培養による MLL 遺伝子の切断、再構成について検討した結果、1) サザンプロット解析により特定の血球系細胞株で MLL 遺伝子の切断を認めるが、この切断には細胞選択性があり全く切断を認めない株もあること、2) FISH 法による解析により、切断を認めた場合でも MLL 遺伝子は完全には解離しないで存在していること、3) 切断を認めた場合でも、通常 PCR、LM-PCR/シーケンシングによる解析の範囲では、他の遺伝子との再構成は検出されないこと、が明らかとなった。

2. 正常ヒト造血細胞への BFN 投与実験

(清河・山田)

ヒト骨髄 CD34 陽性細胞から試験管内で種々の系統の血球細胞を分化誘導し、上記と同様に検討した結果、未熟骨髄球等の増殖のさかんな血球では MLL 遺伝子の切断が認められたが、成熟単球では認められなかった。また、切断が認められた場合でも、他の遺伝子との再構成は検出されなかった。

3. BFNによるヒト血液細胞のアポトーシス誘導 (清河・山田)

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ことから、BFN のヒト血球に体するアポトーシス誘導について検討した。この結果、多くの種類の BFN が様々な系統のヒト血球系細胞株、および正常ヒト血球にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

また、妊娠マウスに BFN を投与したところ、生まれてきた子マウスでは、対照群に比較して、有意な骨髄抑制を認めた。

4. ヒト造血再構築動物への BFN の投与実験

a) NOD/SCID マウスを用いたヒト造血系再構築モデル (山田・穂積・清河)

昨年度までに確立したヒト血球系細胞再構築 NOD/SCID, NOG マウスに BFN を投与し、ヒト血球を回収して MLL 遺伝子再構成について検討した。特に検出感度を向上させてサザンプロットによる解析を行った結果、BFN 感受性のヒト白血病細胞株 BV173 では MLL 遺伝子の切断が確認されたが、PCR、LM-PCR/シーケンシングによる検討では他の遺伝子との再構成を検出することはできなかった。また、CD34 陽性骨髄細胞を移植して再構築したヒト正常血球では、MLL 遺伝子の切断を確認できなかった。

b) 免疫不全ブタの作出 (清河・安江)

当初の計画では、昨年度の時点で免疫不全ブタの使用が可能となる見込みであったが、その作成に予想以上に時間がかかり、研究期間内に作出することができなかった。これまでに、RAG 遺伝子の改変によりリンパ球の分化・増殖が阻害されるシステムを構築し、これを導入したブタ繊維芽細胞株を樹立した。現在米国のベンチャー企業に依頼し、この細胞株の核を移植した RAG 障害クローンブタの作出を試みているが、この段階でうまく行かず、出産に至っていない。本年度、通常ブタを用いたブタ胎児へのヒト造血細胞移植実験の開始も考慮したが、諸家の報告からヒト胎児造血モデルとしては免疫不全ブタ使用の方が有利と判断し、その作出を待っている状態である。本年度は、免疫不全ブタが作出された際、その免疫系解析の手段としての抗ブタ白血球

抗体作成およびブタ免疫関連遺伝子解析を引き続き行った。

D. 考察

今回の検討から、生体内においてもBFNは増殖のさかんな未熟血球系細胞に対してMLL遺伝子の切断を誘導するものの、成熟血球ではこの切断は起こりにくく、また切断が起こった場合でも、MLL遺伝子が他の遺伝子と再構成を起こす頻度は非常に低いと推測される。さらに、BFNにより遺伝子切断が起こった細胞は、アポトーシスによって死滅し、除去されるものと考えられる。従って、BFNには確かにMLL遺伝子の切断を誘導する作用を持つが、これが直接乳児白血病の発症に結びつく可能性はこれまでの検討結果のみからは否定的と判断される。しかし、BFNは母体が摂取した場合胎児の骨髄抑制を誘導する可能性もあり、今後さらに慎重な検討が必要と考えられる。

当初計画していた免疫不全ブタを用いた母体のBFN摂取の胎児造血系に対する検討は、研究期間内には行うことができなかった。しかし、このモデルは今後の食品安全確保研究事業に有用と考えられ、免疫不全ブタの作出はさらに継続中である。本研究で行った抗ブタ白血球抗体作成およびブタ免疫関連遺伝子解析は、今後免疫不全ブタが作出された場合にその免疫系解析の手段として有用と考えられる。

E. 結論

BFNは生体内でも血球細胞にMLL遺伝子の切断を誘導するが、この効果は未熟な血球に限定されており、また切断が起こってもさらに他の遺伝子との再構成を起こす頻度は非常に低いものと推測される。乳児白血病の発症にはBFNによるMLL遺伝子の切断のみでは十分ではなく、これに加えて宿主側の何らかの他の要因が必要であると考えられる。また、今回の研究で行った抗ブタ白血球単クローン性抗体の作成、ならびにブタ免疫関連遺伝子の解析は、今後“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”が確立した場合、その解析手段として今後の食品安全確保研究事業に重要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* (in press).

2) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T,

Takenouchi H, Mimori K, Tang W, 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. *Modern Pathol* 17:423-429, 2004.

3) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, 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 Immunol* 48:377-387, 2004.

4) Tang W, Kiyokawa N, Eguchi T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Enosawa S, Mimori K, Itagaki M, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Amemiya H, Fujimoto J. Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I a chain. *Hybridoma Hybridom* 23:187-191, 2004.

5) Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J. Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells. *J Cell Sci* 117:3911-3922, 2004.

6) Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahashi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK hampers PLC-g2 phosphorylation and Ca^{2+} influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112:575-582, 2004.

7) Tang W-R, Shioya N, Eguchi T, Ebata T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Takagaki Y, Enosawa S, Itagaki M, Taguchi T, Kiyokawa N, Amemiya H, Fujimoto J. Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor d-chains. *Veterinary Immunol Immunopathol* (in press).

2. 学会発表

1) in situでの抗原・核酸同時検出法とその自動化。山田健人, 近藤裕道, 高松めぐみ, 杜ぶん林, 安江博, 清河信敬, 藤本純一郎。第27回日本分子生物学会年会, 東京, 11月, 2003年。

G. 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

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
分担研究報告書

バイオフィラポ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

要旨：NOG マウスを用いて新たなヒト血球移植モデルの構築を試み、MLL キメラ遺伝子の構造と siRNA による発現抑制に関する検討を行った。NOG マウスを用いることによって、よりキメリズムの高い新たな小児白血病モデルを確立することが可能であり、今後の食品安全確保事業に有用性が高いと考えられる。

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、フラポノイドが、母体のトポイソメラーゼ(Topo)II 抑制を通じて、本遺伝子再編成に関わっている可能性が指摘され、特に米国の R. Strick らが、健康食品などに含まれるバイオフィラポノイドが培養ヒト血液細胞に対して 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た。したがって、このフラポノイドの白血病発症への関与の有無や実態およびそのメカニズム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。

われわれはこれまでに、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おり、MLL 遺伝子の tandem duplication をもつことが判明した。また本細胞株は、G-banding 法では X 染色体との転座が疑われていたが、FISH 解析の結果、X 染色体の異常は Xq25 の欠失と考えられた。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、われわれはヒト骨髄を 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. 本細胞株における MLL 遺伝子発現抑制を試み、細胞増殖や分化形質の変化、マウスでの病態の変化を観察することで、MLL 遺伝子の機能を明らかにする。
3. 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、フラポノイド類の投与後、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 マウスにヒト骨髄を移植したマウスに対して、移植骨髄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。

2. MLL キメラ遺伝子の構造と siRNA による発現抑制

本細胞株には、MLL 遺伝子の duplication があるが、実際に発現している異常な mRNA を検討し、さらに siRNA による発現抑制を試みた。MLL の Exon 5, 6 に forward primer, Exon3 に 2 箇所 reverse primer を設定し nested-PCR を行なった。1st-PCR は forward primer ML.3.1c: 5'-AGGAGAGAGTTTACCTGCTC-3', reverse primer ML.5.3: 5'-GGAAGTCAAGCAAGCAGGTC-3', 2nd-PCR は forward primer ML.3.2c: 5'-ACACAGATGGATCTGAGAGG-3', reverse primer ML.6.1: 5'-GTCCAGAGCAGAGCA

AACAG-3'を用いて行った。

3. フラボノイドによるヒト血液細胞の生内 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 マウスおよび NOD/SCID マウスへ造血幹細胞を移植し、ヒト造血をモニターした。

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

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。また白血病細胞の浸潤パターンも NOG マウスを用いると変化が見られ、より広範な臓器への浸潤が見られた。

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、TNF-alpha, GM-CSF, M-CSF により分化誘導した本細胞を NOG マウスへ移植した。その結果、分化誘導の有無に係わらず、全ての白血病細胞移植マウスにおいて、正色素性正球性貧血が認められ、血小板数は対照マウスの 70-80% となった。しかし、マウスに出血傾向、D ダイマー上昇、微小血栓形成は観察されなかった。

2. MLL キメラ遺伝子の構造と siRNA による発現抑制

PCR の結果、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 ケ所の切断点の両側にまたがる mRNA が発現していることが判明した。そこで、この切断点前後で siRNA を作成し、in vitro での発現抑制を試みた。その結果、2 種類の siRNA が MLL 発現を抑制する傾向があることを見出した。現在、この siRNA を恒常的に発現するベクターの構築を試みており、恒常的な MLL 発現抑制による細胞増殖、分化形質の変化、一次顆粒の変化、さらには、in vivo での白血病進展や病態への効果を観察する予定である。

3. フラボノイドによるヒト血液細胞の生内 MLL 遺伝子再構成

NOG および NOD/SCID マウスへヒト血球細胞を移植した結果、現時点では 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、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。また白血病における重篤な合併症の一つである DIC 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る。今回、ヒトで確定診断に必要な項目を満たすような DIC は再現できなかったが、血小板数の減少が見られたことから、これまでのマウスでの DIC モデル作成法を応用して、よりヒト病態に近い白血病に随伴する DIC モデルを目指す予定である。

2. MLL キメラ遺伝子の構造と siRNA による発現抑制

MLL 遺伝子の 2 ケ所の切断点の両側にまたがる mRNA を標的にして、siRNA を作成し、2 種類の siRNA が MLL 発現を抑制する傾向があることを見出した。この siRNA は、MLL 遺伝子の白血病細胞のがん化や増殖、進展での機能解析に有用と思われ、本細胞における MLL 発現抑制の細胞生物学的な成果を踏まえて、in vivo での白血病進展や病態への関与についても明らかにする予定である。

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

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 マウスを用いることによって、よりキメリズムの高い新たな小児白血病モデルを確立することが可能であり、今後の食品安全確保事業に有用性が高いと考えられる。

F. 健康危惧情報
該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)Fujimaki R, Hayashi K, Watanabe N, Yamada T, Toyama Y, Tezuka K, Hozumi N. Expression of Cre recombinase in the mouse developing chondrocytes driven by the mouse $\alpha 2(\text{XI})$ collagen promoter. J Bone Mineral Metabolism (in press)

2)Maeda N, Watanabe M, Okamoto S, Kanai T, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Katsume A, Nuriya H, Sandhu J, Ishii H, Kohara M, Hibi T. Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone. Liver International 24:259-267, 2004.

3)Ito K, Nakazato T, Murakami A, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Ohigashi H, Ikeda Y, Kizaki M. Induction of apoptosis in human myeloid leukemic cells by 1'-acetoxychavicol acetate through a mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism. Clinical Cancer Research 10:2120-2130, 2004.

4)Du W, Hashiguchi A, Hattori Y, Ikeda Y, Kondoh K, Hozumi N, Sakamoto M, Hata J, Yamada T. Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and alteration by thalidomide treatment. Pathology International 54:285-294, 2004.

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 p53 at ser-15 residue by reactive oxygen species. Cancer Research 64:1071-1078, 2004.

2. 学会発表

1)山田健人, 近藤裕道, 高松めぐみ, 杜ぶん林, 安江博, 清河信敬, 藤本 純一郎. in situ での抗原・核酸同時検出法とその自動化. 第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 12月, 2004年.

2)伊藤圭介, 仲里朝周, 宮川義隆, 山田健人, 池田康夫, 木崎昌弘. 植物由来新規合成化合物 ACA による白血病細胞のアポトーシス誘導とその分子機構の解析. 第66回日本血液学会総会, 第46回日本臨床血液学会総会, 京都, 9月, 2004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

ヒト造血再構築マウスを用いたバイオフィラポ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。昨年度までに、ヒト造血系再構築モデル、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。今年度は、“HuBone/NOD-SCID マウス”を用いて、ヒト骨芽細胞にアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行い、その分化誘導の制御に関する検討を行った。

A. 研究目的

バイオフィラポノイドは乳児白血病でよくみられる MML 遺伝子再構成によく類似した変異を誘導する。バイオフィラポノイドの遺伝子再構成のメカニズムの解明にはヒト造血系細胞を再構築されたマウスモデルを基礎にして、ヒト造血系細胞の分化を詳細に解析できる実験系の確立が強く望まれる。我々は NOD-SCID マウスの皮下にヒト海面骨を移植し(HuBone/NOD-SCID マウス)、ヒト造血系再構築モデルマウスの開発に貢献してきた。このモデルマウスではドナー由来のヒト骨リモデリングとヒト造血系細胞の部分的再構築が観察される。本年度は ヒト間葉系幹細胞(human mesenchymal stem cell: hMSC) を遺伝子操作することにより、骨芽細胞分化誘導から骨形成に至るメカニズムの解明と、さらにこれらの細胞を HuBone/NOD-SCID マウスのヒト骨に移植し、ヒト骨形成再構築の *in vivo* モデルの確立を試みた。

B. 研究方法

ヒト骨に移植する hMSC (Osiris Inc.) は、移植骨内での識別のために GFP をレトロウイルスベクターで導入した。BMP2 の I 型レセプター-ALK6 の Gln204 を Asp に置換した ALK6(QD) は BMP シグナルを恒常的に伝達する。この遺伝子をアデノウイルスベクターで hMSC に導入した。human bone marrow stromal cells (hBMSC) は本研究の分担者である山田博士から分与していただいた。Notch シグナルを恒常的に伝達する GFP/Notch (IC) と HES1 遺伝子も同様にアデノウイルスベクターで導入した。これらの遺伝子を導入された細胞の分化を解析するためコラーゲンゲルの 3 次元培養を行った。

ヒト骨への移植は次のように行った。hMSC をコンフルエントにまで増殖させる。解析されるべき遺伝子をもつアデノウイルスベクターを感染させ、翌日、細胞をトリプシン処理し、細胞を回収した。さらに少量の培地に懸濁し、注射針を用いて移植骨片内に細胞を移植した。細胞移植 2 週間後にテトラサイクリン(30mg/kg) を腹腔内へ投与した。

6 週目に回収した移植骨は固定後、日立研究所(柏)の協力を得て、マイクロ CT スキャンニングにより内部構造の 3 次元解析を行った。組織学的検索のために HE 染色を行った他、TRAP 染色により破骨細胞の活性化を調べた。

C. 研究結果

1. hMSC の骨芽細胞への分化

Notch (IC) + ALK6 (QD) をもつアデノウイルスベクターを hMSC に感染後 1 週間培養を行った。GFP/Notch (IC) は効率よく発現し、核への集積が観察された。Notch(IC) と ALK6(QD)は hMSC に強い細胞凝集を誘導し、さらにアルカリフォスファターゼの発現がみられた。両者を組み合わせた場合は、さらに強い骨芽細胞の分化と石灰化が認められた。これらの結果から Notch(IC) と ALK6(QD) は単独でも hMSC に対する強い分化誘導活性を有するが、両者を共発現させた場合、さらにその効果が高まることが明らかとなった。

2. コラーゲン培養

Notch(IC) + ALK6(QD) の遺伝子導入は hMSC の骨芽細胞への分化を促進することが明らかとなった。しかし、通常の培養条件では強い細胞凝集活性と石灰化のため、長期間の培養を維持することが困難であった。そこで生体内条件に近い環境での分化

を検討するためコラーゲン内に Notch(IC), ALK6(QD)を共発現させた hBMSC を包埋し長期間の培養を行った。通常培養では約 20 日間程度が限界だが、3次元コラーゲン培養では約 100 日間にわたって維持することができ、強い石灰化と骨様のシートの形成が観察された。このように BMP と Notch シグナルは間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を強力に促進することが分かった。

3. HuBone/NOD-SCID マウスモデルを用いた in vivo 実験

Notch(IC) + ALK6(QD) + β gal を発現するレトロウイルスベクターを感染させた hMSC を HuBone/NOD-SCID マウスのヒト移植骨内に移植した。移植骨を回収後、マイクロ CT により骨量を測定した。コントロール hMSC を移植された骨では 40%程度の骨量の減少が認められた。さらに、TRAP 染色によっても多数の破骨細胞の存在が確認された。一方、Notch(IC) + ALK6(QD) 導入 hMSC 移植骨では骨量の増加が観察された。間葉系細胞は Osteoclast Differentiation Factor (ODF) 発現し、破骨細胞前駆細胞上に発現する Receptor Activator of NF- κ B (RANK) を刺激し破骨細胞分化を促進する。hMSC 移植骨では、ODF/RANK 相互作用のメカニズムにより破骨細胞の分化が増強したことにより骨吸収が増加し、骨量の減少が引き起こされたのではないかと考えられる。Notch(IC) + ALK6(QD)を導入しないコントロール移植骨では顕著な破骨細胞分化と骨吸収が認められたことを考えると Notch(IC) + ALK6(QD)遺伝子の hMSC への導入は骨形成の促進を誘導したものと思われる。

D. 考察

今回我々は遺伝子操作することにより in vivo 実験系を用いて、hMSC に骨芽細胞の分化を誘導することに成功した。この結果をさらに発展させることにより、ヒト白血病の遺伝子治療の前臨床モデルの確立やバイオフラボノイド作用機序の in vivo 実験も可能になるであろう。

E. 結論

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/疾患モデルの確立しており、これらのモデルは本研究のみならず、広く食品安全確保研究事業に有用と考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1)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 Immunol* 48:59-66, 2004.

2)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 p53 at ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Research* 64:1071-1078, 2004.

3)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* 91:133-139, 2004.

4)Ito K, Nakazato T, Murakami A, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Ohigashi H, Ikeda Y, Kizaki M. Induction of apoptosis in human myeloid leukemic cells by 1'-acetoxychavicol acetate through a mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism. *Clinical Cancer Research* 10:2120-2130, 2004.

5)Kohyama M, Sugahara D, Sugiyama S, Yagita H, Okumura K, Hozumi N. Inducible costimulator-dependent IL-10 production by regulatory T cells specific for self-antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4192-4197, 2004.

6)Du W, Hashiguchi A, Hattori Y, Ikeda Y, Kondoh K, Hozumi N, Sakamoto M, Hata J, Yamada T. Tumor angiogenesis in the bone marrow of multiple myeloma patients and alteration by thalidomide treatment. *Pathology International* 54:285-294, 2004.

7)Maeda N, Watanabe M, Okamoto S, Kanai T, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Katsume A, Nuriya H, Sandhu J, Ishii H, Kohara M, Hibi T. Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone. *Liver International* 24:259-267, 2004.

8)Hozumi N, Tonegawa S. Pillars Article: Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *J Immunol* 173:4260-4264, 2004.

9)Fujimaki R, Hayashi K, Watanabe N, Yamada T, Toyama Y, Tezuka K, Hozumi N. Expression of Cre recombinase in the mouse developing chondrocytes driven by the mouse $\alpha 2(XI)$ collagen promoter. *J Bone Mineral Metabolism* (in press)

10)Hozumi N, Baba T, Fujisaki N. Actin and myosine are in vivo substrates of SHP-1 after mIgM cross-linking. *The Proceedings of the 12th International Congress of Immunology, Medimond International Proceedings*, 177-180, 2004.

11)Hozumi N, Kohyama M. Regulatory T cells and regulation of the immune response to self-antigen. *Recent Development in Immunology. Research Signpost* 6, 45-60,

2004.

2. 学会発表

1)高鶴敏文, 香山雅子, 穂積信道. IL-10
を高産生する CD4+ICOS+Treg 細胞の末
梢における分化誘導機構第 46 回免疫学
会総会, 札幌, 12月, 2004年.

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

H. 知的財産の出願・登録状況

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 CD3 遺伝子群のなかの基本となる CD3 ζ 鎖遺伝子、CD3 η 鎖遺伝子の解析を行った。CD3 ζ 鎖には ITAMs が 3 個あり、マウス、ヒトのそれらとアミノ酸配列を比較したところ、全体的に相同性は高く、特に機能的部位 (ITAMs) の配列はほとんど違いが見られなかった。CD3 η 鎖は CD3 η 鎖のアミノ酸配列の長さ、配列に種差が見られたが、スプライシングシグナル配列は、種間で完全に保存されていた。

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バイオフィラポノイド (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免疫不全ブタの作製を継続して試みている。また、これと平行して、畜産農家で飼育されているブタのなかに、免疫不全ブタがいないかどうかについて遺伝学的解析法を用いて検索している。本研究では、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。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。本年度は、免疫系の遺伝子である、CD3 ζ 、 η 鎖遺伝子を同定し、その分子とヒト、マウスのそれらとの相同性を調査した。

B. 研究方法

昨年度までに、炎症のキー遺伝子の 1 つである IL-16 遺伝子の全 cDNA 配列およびゲノム構造を明らかにした。また、 γ/δ -T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリー胸腺由来の RNA より得られた pre-Tcell receptor, alpha-chain precursor の全 cDNA 配列を明らかにした。本年度は、T 細胞の TCR 複合体の構成因子である分化成熟過程に関与し

ている CD3 ζ 、 η 鎖遺伝子について解析を行った。解析手法としては、まず、昨年度までに解析したブタの発現遺伝子ライブラリーから、ヒト遺伝子との相同性を想定して CD3 ζ 、 η 鎖遺伝子のクローン同定した。得られたクローンについては、全塩基を解析した。また、この配列をもとに、ブタ BAC ライブラリーから、当該遺伝子を含むクローンを選択し、ゲノム構造を解析した。

C. 結果

マウス、ヒトでは CD3 遺伝子群は T 細胞の分化成熟過程で TCR α/β 鎖が再構成し、細胞表面上に発現する時期から成熟 T 細胞まで継続的に発現しており、T 細胞の分化成熟、T 細胞機能に深く関与していると考えられている。CD3 には α 、 β 、 ϵ 、 ζ 、 η 鎖があり、成熟 T 細胞では CD3 α 鎖は CD3 β 鎖- ϵ 鎖もしくは CD3 ζ 鎖- η 鎖のダイマーを形成し、他の CD3 分子、TCR と 8 量体を形成し細胞表面上に発現する。CD3 各鎖には Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motifs (ITAMs) と呼ばれるモチーフがあり、T 細胞活性化のシグナル伝達にかかわっていることが知られている。特に CD3 ζ 鎖には ITAMs が 3 個あり、シグナル伝達を質的、量的に調節している機能が担われているという仮説に基づいて現在研究が行われている。

そこで、本年度は、ブタの CD3 ζ 鎖- η 鎖遺伝子の解析を試みた。前年度までに作製した γ/δ T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの解析データを基に、候補配列の検索を行った。検索により候補配列を含む cDNA クローンを選択し、その塩基配列を決定した。その配列をもとにアミノ酸配列を推定し、現在 CD3 ζ 鎖遺伝子の配列が公開されている他の動物種とアミノ酸配列を

比較したところ、全体的に相同性は高く、特に機能的部位 (ITAMs) の配列はほとんど違いが見られなかった(ブタとヒトでは、84.3%。ブタとマウスでは、74.7%。因みに、ヒトとマウスでは、80.4%。)

ゲノム構造を明らかにするために、ブタ BAC ライブラリーから、当該遺伝子を含むクローンを選択し、CD3 ζ 鎖遺伝子のエクソン 2~8 下流の領域にかけて塩基配列を決定した。決定された塩基配列を解析し、エクソン、イントロンを明らかにし、さらに CD3 ζ 鎖のエクソン 8 についても明らかにした。ヒト、マウスと比較したところ、ゲノム構造については3種の間に差異は認められなかった。

CD3 η 鎖遺伝子は、CD3 ζ 鎖遺伝子とエクソン 8 が違う選択的スプライシング産物であり、現在のところその機能は明らかにされていない。CD3 ζ 鎖のゲノム配列より、アミノ酸配列を予測し、CD3 η 鎖のアミノ配列と既知の他動物種のそれらと比較した。その結果 CD3 η 鎖のアミノ酸配列には長さ、配列共に種差が見られた。一方、スプライシングシグナル配列については、CD3 ζ 鎖遺伝子の場合には種差が認められたが、CD3 η 鎖遺伝子の場合には100%保存されていた。

D. 考察

CD3 ζ 鎖遺伝子のゲノム解析で CD3 ζ 鎖エクソン 8 の下流に、CD3 ζ 鎖エクソン 8 の存在を確認した。このゲノム構造は、ヒト、マウスに共通であった。CD3 ζ 鎖遺伝子のアミノ酸配列は種間での相同性が高く、殊に、機能的部位 (ITAMs) の配列はほとんど違いが見られなかった。しかしながら、スプライシングシグナル配列には種差が認められた。一方、CD3 η 鎖のアミノ酸配列には長さ、配列共に種差が見られたが、CD3 ζ 鎖遺伝子のスプライシングシグナル配列100%保存されていた。これらのことを総合すると、CD3 ζ 鎖遺伝子及び CD3 η 鎖遺伝子は、種間で共通性が高く、免疫機構の重要且つ基盤的な役割を果たしている可能性が高いことが示唆される。また、種間の相同性の比較から、ブタは、マウスとヒトの遺伝的関係よりも、ヒトに近いことが示唆された。他の遺伝子配列に於いても同様なことが観察されており、改めて、ブタはヒトのモデル動物として適していることが示唆された。

E. 結論

マウス、ヒトでは CD3 遺伝子群は T 細胞の分化成熟過程で TCR ζ 鎖が再構成し、細胞表面上に発現する時期から成熟 T 細胞まで継続的に発現しており、T 細胞の分化成熟、および、T 細胞の機能維持に深く関与していると考えられている。本研究で、ブタ CD3 ζ 鎖遺伝子、CD3 η 鎖遺伝子について解析した。

CD3 ζ 鎖には ITAMs が 3 個あり、マウス、ヒトのそれらとアミノ酸配列を比較したところ、全体的に相同性は高く、特に機能的部位 (ITAMs) の配列はほとんど違いが見られなかった。CD3 η 鎖は CD3 η 鎖のアミノ酸配列の長さ、配列に種差が見られたが、スプライシングシグナル配列は、種間で完全に保存されていた。以上のことから、ブタの CD3 遺伝子群は、ヒト、マウスでの機能とほぼ同等の機能を持っていると考えられる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimogiri, T., Bosak, N., Morisson, M., Okamoto, S., Kawabe, K., Maeda, Y., Vignal, A., and Yasue, H. (2004) Assignment of CPS1, OTC, CRYD2, ARG2 and ASS genes to the chicken RH map. *Genetics Selection Evolution* 36:593-599
- 2) Shigenari, A., Ando, A., Christine, R., Patrick, C., Shiina, T., Jerzy K Kulski, Yasue, H., and Inoko, H. (2004) Nucleotide sequencing analysis of the swine 433-kb genomic segment located between the non-classical and classical SLA class I gene clusters *Immunogenetics* 55:695-705
- 3) Nishibori, M., Hayashi, T., Tsudzuki, M., Yamamoto, Y., and Yasue, H. (2004) Complete nucleotide sequence of Helmeted Guineafowl (*Numida meleagris*) mitochondrial genome. *Journal of Poultry Science* 41, 259-268.
- 4) Wada, Y., Yamada, Y., Nishibori, M., and Yasue, H. (2004) Complete Nucleotide Sequence of Mitochondrial Genome in Silkie Fowl (*Gallus gallus* var. domesticus). *Journal of Poultry*, 41: 76-82.
- 5) Fujisaki, S., Sugiyama, A., Eguchi, T., Watanabe, Y., Hiraiwa, H., Honma, D., Saitou, T., and Yasue, H. (2004) Analysis of a full-length cDNA library constructed from swine olfactory bulb for elucidation of expressing genes and their transcription initiation sites. *Journal of Veterinary Medical Science* 66(1):15-23
- 6) Sarker, N., Kiuchi, S., Yasue, H. and Mitsuhashi, T. (2004) Radiation hybrid map assignments for 11 ESTs obtained from a 28 day-old swine embryo cDNA library to ImpRH map *Animal Genetics*, 35, 227-229
- 7) Leelamanit, W., Neelasaewee, S., Boonyom, R., Panyim, S., Hayashi, T., Yasue, H. and Amano, K. (2004) The NADH Dehydrogenase Genes of *Apis mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata*, *A. laboriosa* and *A. florea*: Sequence Comparison and Genetic Diversity *J. Anim. Genet* 31(2):3-12
- 8) Tang, W. R., Kiyokawa, N., Eguchi, T., Matsui, J., Takenouchi, H., Honma, D., Yasue, H., Enosawa, S., Mimori, K., Itagaki, M., Taguchi, T., Katagiri, Y. U., Okita, H.,

Amemiya, H., and Fujimoto, J. (2004) Development of Novel Monoclonal Antibody 4G8 against Swine Leukocyte Antigen Class I α chain Hybridoma and Hybridomics 23:3 187-191

2. 学会発表

1) Bosak N., Faraut T., Fujisaki S., Kiuchi S., Hiraiwa H., Hayashi T., and Yasue H. A high-resolution comparative gene map between swine chromosome region 2q1.1-q2.1 and homologous segment of human chromosome 19 p-arm. 第 11 回国際植物及び動物ゲノム学会 2004/1/10-1/14 米国 サンディエゴ

2) Hirota K., Tozaki T., Raudespp T., Hasegawa T., Yoshizawa M., Chowdhary B. P. & Yasue H. Mapping HSA10 genes in horse to obtain an improved horse-human comparative map. 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表, (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎 東京 御茶ノ水)

3) Yasue H., Kiuchi S., Hiraiwa H. and Hayashi T. Assignment of 106 genes localized in HSA10 to a swine RH (IMpRH) map to generate a dense human-swine comparative map 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表, (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎 東京 御茶ノ水)

4) Du Z.-Q., Vincent-Naulleau S., Le Roy P., Vignoles F., Crechet F., Simogiri T., Yasue H., Renard C., Leplat J., Bouet S., Gruand J., Milan D., Horak V., Chardon P., Frelat G. and Geffrotin C. A Genome-Wide Scan for the Hereditary Cutaneous Melanoma in the MeLiM Swine Model. 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表 (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎東京 御茶ノ水)

5) Kitajima M., Kiuchi S., Fujisaki S., Hiraiwa H., Hayashi T., Maruyama K. and Yasue H. Construction of a high resolution comparative gene map between human chromosome 14 and swine chromosomes using RH mapping 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表 (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎 東京 御茶ノ水)

6) Tamada Y., Nishibori M., Yasue H. & Wada Y. Polymorphism of mitochondrial D-loop region of Silkie fowls. 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表 (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎 東京 御茶ノ水)

7) Yamamoto R., Sato E., Takagaki Y. & Yasue H. Cloning and comparative analysis of swine pre-T-cell receptor α -chain gene 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表 (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎 東京 御茶ノ水)

8) Nishibori M., Shimogiri T., Hayashi T. & Yasue H. Molecular evidence for hybridization of species in the genus Gallus 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表 (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎 東京 御茶ノ水)

9) Raudsepp T., Goh G., Lee E.J., Brinkmeyer C., Santani A., Ashley Gustafson-Seabury., Wagner M., Yasue H., Tozaki T., Penedo C., Lyons L., Young A., Leeb T., Adelson D.,

Womack J. E., Skow L.C., Mickelson J. & Chowdhary B.P. The second generation whole genome radiation hybrid (RH) and comparative map of the horse. 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表 (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎 東京 御茶ノ水)

10) Shimogiri T., Kiuchi S., Hiraiwa H., Hayashi T., Takano Y., Maeda Y., & Yasue H. Assignment of 99 genes localized in HSA17 to a swine RH (IMpRH) map to generate a dense human-swine comparative map 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表 (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎 東京 御茶ノ水)

11) Takagaki Y., Hatsuse H., Watanabe M., Yamamoto R., Kameyama K., Akiyama M., Omori T., Yamada S., Shimizu M., Uenishi H., Awata T., & Yasue H. Porcine T cell receptor genes: the genomic structure and the expression in piglets 第 29 回国際動物遺伝学会 口頭発表 (2004/9/11~2004/09/16 明治大学駿河台新学舎 東京 御茶ノ水)

12) 近藤裕道、安江 博、藤本純一郎、高松めぐみ、杜 ぶん林、坂本亨宇、山田健人 *in situ* での抗原・核酸同時検出法とその自動化 第 63 回日本癌学会学術総会 (2004/9/30 福岡国際会議場)

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

雑誌

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						
発表者氏名	論文タイトル名		発表誌名	巻号	ページ	出版年	
Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J.	Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells.		Leukemia Research	in press			
Tang W, Kiyokawa N, Eguchi T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Enosawa S, Mimori K, Itagaki M, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Amemiya H, Fujimoto J.	Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I a chain.		Hybridoma Hybridoma	23	187-191	2004	
Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahshi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J.	Deficiency of BLNK hampers PLC-g2 phosphorylation and Ca ²⁺ influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells.		Immunology	112	575-582	2004	
Tang W-R, Shioya N, Eguchi T, Ebata T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Takagaki Y, Enosawa S, Itagaki M, Taguchi T, Kiyokawa N, Amemiya H, Fujimoto J.	Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor d-chains.		Veterinary Immunol Immunopathol	in press			
Takenouchi H, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Katagiri YU, Okita H, Okuda K, Fujimoto J.	Shiga toxin binding to globotriaosyl ceramide induces intracellular signals that mediate cytoskeleton remodeling in human renal carcinoma-derived cells.		J Cell Sci	117	3911-3922	2004	
Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, 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 Immunol	48	377-387	2004	
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	17	423-429	2004	
Fujimaki R, Hayashi K, Watanabe N, Yamada T, Toyama Y, Tezuka K, Hozumi N.	Expression of Cre recombinase in the mouse developing chondrocytes driven by the mouse a2(XI) collagen promoter		J Bone Mineral Metabolism	in press			

Maeda N, Watanabe M, Okamoto S, Kanai T, Yamada T, Hata J, Hozumi N, Katsume A, Nuriya H, Sandhu J, Ishii H, Kohara M, Hibi T.	Hepatitis C virus infection in human liver tissue engrafted in mice with an infectious molecular clone.	Liver International	24	259-267	2004
Ito K, Nakazato T, Murakami A, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Ohigashi H, Ikeda Y, Kizaki M.	Induction of apoptosis in human myeloid leukemic cells by 1'-acetoxychavicol acetate through a mitochondrial- and Fas-mediated dual mechanism.	Clinical Cancer Research	10	2120-2130	2004
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	54	285-294	2004
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	64	1071-1078	2004
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	48	59-66	2004
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	91	133-139	2004
Kohyama M, Sugahara D, Sugiyama S, Yagita H, Okumura K, Hozumi N.	Inducible costimulator-dependent IL-10 production by regulatory T cells specific for self-antigen.	Proc Natl Acad Sci USA	101	4192-4197	2004
Hozumi N, Tonegawa S.	Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions.	J Immunol	173	4260-4264	2004
Shigenari A, Ando A, Renard C, Chardon P, Shiina T, Kulski JK, Yasue H, Inoko H.	Nucleotide sequencing analysis of the swine 433-kb genomic segment located between the non-classical and classical SLA class I gene clusters.	Immunogenetics	55	695-705	2004
Fujisaki S, Sugiyama A, Eguchi T, Watanabe Y, Hiraiwa H, Honma D, Saito T, Yasue H.	Analysis of a full-length cDNA library constructed from swine olfactory bulb for elucidation of expressed genes and their transcription initiation sites.	J Vet Med Sci	66	15-23	2004
Nakano S, Kishi H, Ogawa H, Yasue H, Okano A, Okuda K..	Trophinin is expressed in the porcine endometrium during the estrous cycle	J Reprod Dev	49	127-134	2004
Sarker N, Kiuchi S, Yasue H, Mitsuhashi T.	Radiation hybrid map assignments of 11 ESTs obtained from a 28-day-old swine embryo cDNA library to the IMPRH map.	Anim Genet	35	227-229	2004