

200401151B

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14年度～16年度 総合研究報告書

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

バイオフィ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. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----11

III. 研究成果の刊行物・別刷

-----16

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）
（総合）研究報告書

バイオフラボノイドの遺伝子再構成作用に関する研究

主任研究者 清河 信敬 国立成育医療センター研究所
発生・分化研究部 部長

研究要旨： バイオフラボノイド(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。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プ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。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、同定と解析を行った。

分担研究者

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

A 研究目的

年齢1歳未満の乳児に特徴的な乳児白血病の発症機構については、母体のトポイソメラーゼ(Topo)II 抑制物質摂取により誘導される胎児造血細胞の MLL 遺伝子再構成の関与が示唆されている。これに関連して、最近米国の R. Strick らが、健康食品などに含まれるバイオフラボノイド(BFN)が培養ヒト血液系細胞株に対して TopoII 抑制作用を示し、MLL 遺伝子の再構成を引き起こすことを報告しており、米国 NIH もこれに関心を示している。BFN は日本茶やハーブ等にも豊富に含まれること、乳児白血病の発生頻度は東洋人に高いことなどを考慮すると、同物質が MLL 遺伝子の構造変化に影響を及ぼす可能性、ならびにその結果血液細胞の増殖に及ぼす影響について早急に解明することが求められる。そこで本研究では、上記報告を追試するとともに、生体に BFN を投与した場合に、実際に血液

系細胞に MLL 遺伝子再構成が起こるのか否かについて、NOD/SCID マウスを用いたヒト造血組織再構築モデルや、妊娠した免疫不全ブタの胎児に外科的にヒト造血細胞を移植、再構築する妊娠モデル、等を用いた検討によって明らかにすることを目的とする。

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 Flt3 ligand および SCF 添加3日間培養し、未熟骨髓球系細胞として用い、M-CSF+IL3+IL6+SCF 添加4週間培養し、単球系細胞として用いた。また、マウス骨髓間質細胞株 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. 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。サザンプロットの検出は DIG 標識-化学発光で行った。

3. FISH 解析

各細胞に Flavone 等の BFN を16時間添加培養後、サイトスピン標本を作成し、MLL

遺伝子の 5'側の断片を FITC で、3'側の断片を TRITC でそれぞれ標識した混合プローブを用いて、FISH 解析を行った。

4. PCR による既知の MLL 融合遺伝子の検出

これまでに TopoII 抑制剤の作用によって誘導されたと報告されている MLL 遺伝子の再構成による融合遺伝子の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

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. NOG マウスを用いた新たな小児白血病モデルの確立

KOPM88 白血病細胞株を 10%FBS 加 RPMI メディウムを用いて培養し、NOG マウスおよび NOD/SCID マウスに、2X10⁷ の細胞を移植した（静注、腹腔内注入、皮下注の単独およびその組合せ）。さらに NOD/SCID マウスにヒト骨を移植したマウスに対して、移植骨内または静注により移植を行なった。移植後 30~70 日に末梢血と骨髄血を採取し、単核球を分離し抗ヒト CD13 および CD33 抗体を用いてフローサイトメトリーを用いて、白血病細胞の検出を試みた。また、白血病浸潤に合併する DIC モデルを確立する目的で、本細胞株に種々のサイトカインを添加して分化マーカーの発現変化や増殖におよぼす影響について検討した。

7. 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

生体が BFN を摂取することによって造血細胞の遺伝子構造変化にもたらされる影響に関して検討するための動物モデルとして使用する目的で、NOD/SCID マウスに 3Gy の放射線照射を行った後ヒト臍帯血幹細胞を移植し、一定期間後に採取した末梢血および骨髄血に対してヒト白血球に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、ヒト白血球をセルソーターによって分取した。得られた細胞からゲノム DNA を抽出し、前述の方法でサザン解析および LM-PCR 解析を行った。

8. アポトーシス細胞の検出

BFN 投与 24 時間後の細胞について、以下

の方法でアポトーシス細胞を検出した。

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

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

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

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

9. 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。

10. 単クローン性抗体の作成

ブタ末梢白血球を免疫源として常法により MoAb を作成した。得られたクローンは FCM 解析でのブタ白血球に対する反応性によりスクリーニングした。選択された抗体について、ブタ白血球の蛋白抽出液に対する免疫沈降によりその分子量を同定した。最終的な認識抗原の確認は、既存のブタ白血球抗原の cDNA を強制発現させた Cos7 細胞との反応性により行った。

11. ブタゲノム構造解析およびブタ γ / δ T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの解析

BAC クローンをスクリーニングし、ブタ IL-16 遺伝子、CD3 ζ 遺伝子等を単離してその配列とゲノム構造を明らかにした。この結果を基に、ヒト、マウスの当該遺伝子のゲノム構造と比較した。また、昨年度から進めているブタ γ / δ T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーの解析を行い、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。

12. 倫理面への配慮について

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

C. 研究結果

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

R. Strick らにより報告された BFN の培養細胞株に対する MLL 遺伝子再構成誘導作用

について追試、確認するため、サザン解析で MLL 遺伝子 BCR 近傍の BamHI 断片のサイズの変化を検討することによって Flavone 等、一部の BFN による BV173 に対する MLL 遺伝子再構成誘導を確認した。しかし、種々の細胞株について同様の検討を行った結果、細胞株における MLL 遺伝子の切断には一定の選択性があり、赤白血病細胞株 K562 等ではこれを認めなかった。

サザン解析では、MLL 遺伝子の切断は確認できるが、他の遺伝子との再構成によって生じる融合遺伝子については検索することができない。そこで、他の方法を用いた検討を行った。まず、BV173 に対して MLL 遺伝子の BFN による遺伝子切断点分布領域 Breakpoint cluster region (BCR) の 5'側と 3'側をそれぞれ異なる波長の蛍光色素でラベルしたプローブを用いた FISH 法による解析を行ったが、Flavone 投与によるシグナルの分離を認めなかった。従って、大部分の細胞では BFN によって MLL 遺伝子の切断が起こっても、その完全な分離は起こらずに、そのまま近傍に存在している可能性が示唆された。

また、これまでに報告されている MLL 融合遺伝子についてプライマーを作成し、Flavone を投与後の BV173 核 DNA に対して PCR を行ったが、検索した範囲では遺伝子断片の増幅を認めなかったことから、既知の融合パートナーとの遺伝子再構成は起こっていない可能性が示唆された。

さらに、BFN による MLL 遺伝子の切断の断端の遺伝子配列を確認するとともに、新規パートナー遺伝子との遺伝子再構成の検出およびその発生頻度の検討が可能方法として、ligation-mediated (LM-) PCR 法の確立を行った。TopoII 抑制剤による MLL 遺伝子の切断の BCR は BamHI による 8.2kb 断片の 5'側から約 7kb の位置に限定されていることから、研究方法の項に記載したごとく核 DNA を BamHI で消化した後、切断端を平坦化、アルカリフォスファターゼ処理してアダプターを ligation し、BCR 近傍 5'側のプライマーとアダプター内の配列のプライマーで PCR を行い、増幅された遺伝子断片を T-vector にクローニングしてシーケンシングを行うことにより BCR における切断の有無および他の遺伝子との組み替えの有無が同時に解析可能である。しかし、検討した結果、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. ヒト正常造血細胞の試験管内培養系の確立と BFN による MLL 遺伝子再構成誘導の検討 (清河・山田)

マウス骨髄間質細胞株 MS-5 との共培養により、造血幹細胞から約 70%の純度で B 前駆細胞が誘導された。骨髄単球系細胞の分化誘導は、SCF および G-CSF 添加の液体培養

でより効率的であった。巨核球は、TPO 添加液体培養が効率的であった。そこで、これらの培養法を用いて骨髄幹細胞から種々の血球を分化誘導し、Flavone、Luteolin 等の BFN を投与して MLL 遺伝子のサザンプロット解析を行った。この結果、未熟骨髄球では BFN による MLL 遺伝子の切断が認められるのに対して、成熟単球系細胞ではこれを認めず、培養細胞株の場合と同様に一定の選択性があることが示唆された。さらに、LMP 法を用いて遺伝子再構成について検討したが、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. NOD/SCID マウスを用いたヒト造血系再構築モデルの作成 (山田・穂積)

生体が BFN を摂取することによって造血細胞の遺伝子構造変化にもたらされる影響に関して検討するための動物モデルとして、NOD/SCID マウスにヒト造血系を再構築させる実験条件の検討を行った。NOD/SCID マウスに放射線照射し、ヒト造血幹細胞を移植したところ、3-22%と高いキメリズムでヒト造血細胞が検出されることが確認された。さらに、ヒト海綿骨を NOD-SCID マウスの皮下に移植した HuBone-NOD-SCID マウスにヒト造血幹細胞を移植したところ、マウスの末梢血、脾臓に多数のヒト CD45⁺、CD19⁺、CD68⁺ 細胞の定着が確認された。この他、HuBone/NOD-SCID マウスには、乳がん細胞株を始めとする種々のヒト腫瘍細胞が高い頻度で生着することが確認された。

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

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

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。

5. 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)

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/シークエ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。

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

上記の研究の過程で BV173 細胞を BFN 処理すると細胞死が誘導されることが観察された。そこで、種々の細胞株と BFN の組み合わせで、Annexin V の結合、sub-diploid 細胞の検出、ミトコンドリア膜透過性の変化、核 DNA の断片化等により検討したところ、Flavone 等の BFN が BV173 を始めとする特定の細胞株にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、種々の細胞株、正常細胞について同様の検討をした結果、多くの種類の BFN が様々な系統のヒト血球系細胞株や、骨髄幹細胞から分化誘導した未熟骨髄球系細胞および B 前駆細胞等の正常ヒト血球細胞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 を反復投与したところ、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。

7 免疫不全ブタの作出およびその解析システムの構築 (清河・安江)

本究では母体が BFN を摂取した場合の胎児造血細胞への作用について検討する目的で、妊娠した免疫不全ブタの胎児にヒト造血幹細胞を移植してヒト造血系を再構築するブタ妊娠モデルの確立を目標とした。当初の計画では、第 2 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。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

一方、免疫不全ブタの免疫状態を解析するためのツールとして、ブタ血球に対する MoAb の作成を行い、34 のクローンを得た。このうち、特にリンパ球の一部と反応する 7G3 および 6F10 について、それぞれの認識抗原が T 細胞抗原受容体 (TCR) δ 鎖、CD8 α 鎖であることを同定した。これらの抗体を用いてブタの免疫関連各組織における T 細胞の分布について検討した結果、ブタの末梢血、胸腺にはヒトやマウスに比較して TCR δ 陽性 T 細胞が有意に多いという免疫系の特性が明らかとなった。また、この他 γ δ T 細胞のサブセットを認識する 3E12 およびブタ MHC class I を認識する 4G8 抗体も同定した。

また、ブタ免疫関連遺伝子の単離と解析を行った。ブタ γ / δ T 細胞由来完全長 cDNA ライブラリーから新たに 2000 クローン解析し、計約 5000 クローンの配列データを得た。これを基に、pre-Tcell receptor, α -chain precursor の全 cDNA 配列を決定、解析した。また、ブタ BAC ライブラリーを用いたゲノム遺伝子の単離、解析を行い、IL-16 や CD3 のゲノム構造を明らかにした。

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今回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。

今回の検討では、NOD/SCID マウスを用いたヒト造血系細胞の移植モデルを構築した他、同マウスがヒト骨、種々の癌細胞等の移植モデル構築に適していることが明らかとなった。今後、これらのモデルは、食品の安全性推進事業に有用性が高い動物モデルとなることが期待される。

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免疫不全マウスを用いたヒト組織の移植系は、今後の食品安全性推進事業に有用性が高いと考えられる。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. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Ohmi K, Nakajima H, Suzuki T, Furukawa S, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J. Inhibition of Shiga toxin cytotoxicity in human renal cortical epithelial cells by nitrobenzylthioinosine. *J Infect Dis* 185:785-796, 2002.
- 2) Matsuoka K, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Suzuki T, Mimori K, Nakajima H, Takenouchi H, Tang W, Katagiri YU, Fujimoto J. Rum1, an inhibitor of cyclin-dependent kinase in fission yeast, is negatively regulated by mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation at Ser and Thr residues. *Eur J Biochem* 269:3511-3521, 2002.
- 3) Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki K, Sekino T, Mimori K, Suzuki T, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimura J, Fujita H, Ishimoto K, Yamashiro Y, Fujimoto J. Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. *Exp Hematol* 30:1115-1123, 2002.
- 4) Katagiri YU, Ohmi K, Tang W, Takenouchi H, Taguchi T, Kiyokawa N, Fujimoto J. Raft 1, a monoclonal antibody raised against the raft microdomain, recognizes G-protein b1 and 2, which assemble near nucleus after Shiga toxin binding to human renal cell line. *Lab Invest* 82:1735-1745, 2002.
- 5) Nakao H, Kataoka C, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yamasaki S, Takeda T. Monoclonal antibody to shiga toxin 1, which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. *Microbiol Immunol* 46:777-780, 2002.

- 6) Yuasa H, Takakura N, Shimomura T, Suenobu S, Yamada T, Nagayama H, Oike Y, Suda T. Analysis of human TIE2 function on hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun* 298:731-737, 2002.
- 7) Shibara R, Hashiguchi A, sakamoto J, Yamada T, Umezawa A, Hata J. Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms tumor. *J Med Genetics* 39:E83, 2002.
- 8) Zhao C, Hashiguchi A, Kondoh K, Du W, H. J, Yamada T. Exogenous expression of heat shock protein 90kDa retards the cell cycle and impairs the heat shock response. *Exper Cell Res* 275:200-214, 2002.
- 9) Kakimoto T, Hattori Y, Okamoto S, Sato N, Kamata T, Yamaguchi M, Morita K, Yamada T, Takayama N, Uchida H, Shimada N, Tanigawara Y, Ikeda Y. Thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma: Association of plasma concentrations of thalidomide and angiogenic growth factors with clinical outcome. *Jpn J Cancer Res* 93:1029-1036, 2002.
- 10) Sato N, Hattori Y, Du W, Yamada T, Kamata T, Kakimoto T, Okamoto S, Kawamura C, Kizaki M, Shimada N, Ote Y, Hata J, Ikeda Y. Elevated level of basic fibroblast growth factor in multiple myeloma correlates with increased disease activity. *Jpn J Cancer Res* 93:459-466, 2002.
- 11) Yamaoka T, Yoshino K, Yamada T, Yano M, Matsui T, Yamaguchi T, Moritani M, Hata J, Noji S, Itakura M. Transgenic expression of FGF8 and FGF10 induces transdifferentiation of pancreatic islet cells into hepatocytes and exocrine cells. *Biochem Biophys Res Commun* 292:138-43, 2002.
- 12) Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ohta T, Takeuchi T, Hata J, Kadowaki T, Koyasu S. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity to intestinal parasites in *Pik3r1* deficient mice. *Nature Immunology* 3:295-304, 2002.
- 13) Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Shirasaki Y, Kondo K, Yamada T. Various amplification of direct PCR using Blood Samples. *Clinical Laboratory* 48: 377-384, 2002.
- 14) Nguyen H, Hay J, Gallinger S, Sandhu J, Hozumi N. Isolation of human single chain a4tibodies (scFv) against human TNF-a from human peripheral blood lymphocyte-SCID mice. *Human Antibodies* 11: 65-72, 2002.
- 15) Takamiya R, Murakami M, Goda N, Makino N, Kajimura M, Takamiya Y, Yamaguchi T, Ishimura, Hozumi N, Suematsu M. Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: An anti-inflammatory role. *Am J Physiol* 283: H861-H870, 2002.
- 16) Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri YU, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto

- J. Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *J Immunol* 170:252-260, 2003.
- 17) Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima N, Saito M, Katagiri YU, Ioyama 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.
- 18) Mori T, Kiyokawa N, Shimada H, Miyauchi J, Fujimoto J. Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research Institute for Child Health and Development. *Br J Hematol* 121:94-96, 2003.
- 19) Furusawa T, Hosoe M, Ohkoshi K, Takahashi S, Kiyokawa N, Fujimoto J, Amemiya H, Suzuki S, Tokunaga T. Catalytic RAG1 mutants obstruct V(D)J recombination in vitro and in vivo. *Mol Immunol* 39:871-878, 2003.
- 20) Honma D, Uenishi H, Hiraiwa H, Watanabe S, Tang W, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yause H, Sakimura K. Cloning and characterization of porcine common γ chain gene. *J Interf Cytok Res* 23:101-111, 2003.
- 21) Ohtomo Y, Kawamura R, Kaneko K, Yamashiro Y, Kiyokawa N, Taguchi T, Mimori K, Fujimoto J. Nephrotic syndrome associated with human parvovirus B19 infection. *Pediatr Nephrol* 18:280-282, 2003.
- 22) Mori T, Sugita K, Kimura K, Fuke T, Miura T, Kiyokawa N, Fujimoto J. Isolated central nervous system (CNS) relapse in a case of childhood systemic anaplastic large cell lymphoma without initial CNS involvement. *J Pediatr Hematol Oncol* 25:975-977, 2003.
- 23) 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.
- 24) 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) γ and PPAR α 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.
- 25) Tsunoda K, Ota T, Aoki M, Yamada T, Nagai T, Nakagawa T, Koyasu S, Nishikawa T, Amagai M. Induction of pemphigus phenotype by a mouse monoclonal antibody against the amino-terminal adhesive interface of desmoglein 3. *J Immunology* 170: 2170-2178, 2003.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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 ImprRH map, and development of microsatellites in the proximity of 14 genes. *Cytogenet Genome Res* 101:84-89, 2003.
- 34) 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.
- 35) Uenishi H, Hiraiwa H, Yamamoto R, Yasue H, Takagaki Y, Shiina T, Kikkawa E, Inoko H, Awata T. Genomic structure around joining segments and constant regions of swine T-cell receptor α/δ (TRA/TRD) locus. *Immunology* 109:515-526, 2003.
- 36) 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.
- 37) 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).
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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 BLNK₅ hampers PLC- γ 2 phosphorylation and Ca²⁺ influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112:575-582, 2004.
- 43) 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 δ -chains. *Veterinary Immunol Immunopathol* (in press).
- 44) 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 α 2(XI) collagen promoter. *J Bone Mineral Metabolism* (in press)
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) 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.
- 55) 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.
- 56) 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) 桐洋子, 大見和宏, 田口智子, 唐巍然, 清河信敬, 藤本純一郎: ラフト/マイクロド

- メインを認識する単クローン抗体 Raft. 1. 第 91 回日本病理学会総会, 横浜, 3 月 26-28 日, 2002.
- 2) 三森謙一, 清河信敬, 田口智子, 中島英規, 唐巍然, 藤本純一郎: Langerhance cell histiocytosis および Langerhance cell における claudin の発現. 第 91 回日本病理学会総会, 横浜, 3 月 26-28 日, 2002.
- 3) 中尾浩史, 清河信敬, 竹田多恵, 藤本純一郎: 志賀毒素の標的細胞への結合に関する試み. 第 75 回日本細菌学会総会, 横浜, 4 月 4-6 日, 2002.
- 4) 片桐洋子, 清河信敬, 田口智子, 中島英規, 中尾浩史, 藤本純一郎: シガ毒素受容体 Gb3 の架橋刺激によるラフトを介した細胞内刺激伝達. 第 75 回日本細菌学会総会, 横浜, 4 月 4-6 日, 2002.
- 5) 田口智子, 清河信敬, 斎藤正博, 中島英規, 片桐洋子, 藤本純一郎: G-CSF は単球における LPS 受容体を介した刺激伝達を修飾しそのサイトカイン分泌を調節する. 第 75 回日本細菌学会総会, 横浜, 4 月 4-6 日, 2002.
- 6) 関野貴臣, 清河信敬, 田口智子, 古川漸, 藤本純一郎: 腎皮質上皮細胞におけるペロ毒素の細胞内逆行性輸送と NBTI によるその阻害に関する検討. 第 105 回日本小児科学会学術集会, 名古屋, 4 月 19-21 日, 2002.
- 7) 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎: 腎尿管上皮細胞に対するペロ毒素の新たな細胞障害作用: 毒素の結合によって誘導される細胞内刺激伝達をともなった細胞死. 第 37 回日本小児腎臓病学会学術集会, 神戸, 7 月 4-6 日, 2002.
- 8) 清河信敬, 中尾浩史, 藤本純一郎: 核酸輸送阻害剤 nitorobenzylthio-inosine は Shiga toxin の細胞内逆行性輸送を阻害することによりその毒性を抑制する. 第 49 回毒素シンポジウム, 7 月 10-12 日, 岐阜, 2002.
- 9) 鈴木恭子, 清河信敬, 斎藤正博, 田口智子, 松井淳, 竹野内寿美, 唐巍然, 片桐洋子, 塩沢祐介, 藤村純也, 鈴木東洋, 藤田宏夫, 山城雄一郎, 藤本純一郎: G-CSF が単球のサイトカイン分泌に及ぼす作用に関する検討. 第 64 回日本血液学会総会, 横浜, 年 9 月 12-15 日, 2002.
- 10) 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎: B 前駆細胞抗原受容体を介した AKT の活性化. 第 64 回日本血液学会総会, 横浜, 年 9 月 12-15 日, 2002.
- 11) 鈴木恭子, 清河信敬, 田口智子, 松井淳, 塩沢祐介, 竹野内寿美, 唐巍然, 片桐洋子, 藤村純也, 鈴木東洋, 藤田宏夫, 山城雄一郎, 中島敏治, 斎藤博久, 斎藤正博, 藤本純一郎: G-CSF によって単球に誘導される分子発現に関する検討. 第 44 回日本小児血液学会, 東京, 10 月 18-19, 2002.
- 12) 田口智子, 清河信敬, 松井淳, 唐巍然, 竹野内寿美, 三森謙一, 江端智彦, 板垣光子, 片桐洋子, 中島敏治, 斎藤博久, 藤本純一郎: B 細胞分化における MAPK フォスファクターゼの成熟度依存的な発現. 第 44 回日本小児血液学会, 東京, 10 月 18-19, 2002.
- 13) 三森謙一, 清河信敬, 田口智子, 竹野内寿美, 松井淳, 唐巍然, 板垣光子, 片桐洋子, 宮内潤, 藤本純一郎: LCH 細胞およびヒト正常 Langerhance 細胞における claudin, occludin の発現. 第 44 回日本小児血液学会, 東京, 10 月 18-19, 2002.
- 14) 森鉄也, 清河信敬, 藤本純一郎: 単一施設で診断した小児 ALCL 例に対し選択された治療と転帰の後方視的解析. 第 44 回日本小児血液学会, 東京, 10 月 18-19, 2002.
- 15) 片桐洋子, 大見和宏, 田口智子, 唐巍然, 清河信敬, 藤本純一郎: ラフト/マイクロドメインを認識する単クローン抗体 Raft. 1. 第 75 回日本生化学大会, 京都, 10 月 14-17 日, 2002.
- 16) 田口智子, 清河信敬, 片桐洋子, 藤本純一郎: pre-B 細胞における AKT 刺激伝達系の活性化とその細胞死制御への関与に関する検討. 第 32 回日本免疫学会総会, 東京, 年 12 月 4-6 日, 2002.
- 17) 鈴木恭子, 清河信敬, 田口智子, 松井淳, 塩沢祐介, 唐巍然, 片桐洋子, 藤田宏夫, 山城雄一郎, 中島敏治, 斎藤博久, 斎藤正博, 藤本純一郎: G-CSF の単球のサイトカイン分泌に対する選択的調節機構に関する検討. 第 32 回日本免疫学会総会, 東京, 年 12 月 4-6 日, 2002.
- 18) 唐巍然, 塩谷順彦, 清河信敬, 田口智子, 竹野内寿美, 松井淳, 板垣光子, 江端智彦, 片桐洋子, 江口智子, 安江博, 高垣洋太郎, 藤本純一郎: プタ T 細胞抗原受容体 δ 鎖に対する単クローン性抗体 7G3 の樹立とその解析. 第 32 回日本免疫学会総会, 東京, 年 12 月 4-6 日, 2002.
- 19) 山田健人, 杜旻林, 橋口明典, 近藤健介, 穂積信道, 須田年生, 秦順一: 多発性骨髄腫における血管新生の機能解析. 第 91 回日本病理学会総会, 横浜, 3 月 26-28 日, 2002.
- 20) 杜旻林, 橋口明典, 穂積信道, 韓旻昂, 秦順一, 山田健: ヒト骨髄ストローマ細胞を用いた腫瘍間質の生体内再構築. 第 91 回日本病理学会総会, 横浜, 3 月 26-28 日, 2002.
- 21) 橋口明典, 趙沈, 秦順一, 山田健人: ストレス蛋白 HSO90 の細胞増殖抑制. 第 91 回日本病理学会総会, 横浜, 3 月 26-28 日, 2002.
- 22) 浮山越史, 秦順一, 穂積信道, 須田年生, 山田健人, 遠藤昌夫: In vivo ヒト神経芽腫血管新生モデル作製と遺伝子導入による血管新生抑制と腫瘍抑制効果. 第 39 回日本小児外科学会, 東京, 6 月 5-7 日, 2002.
- 23) Hozumi N, Yasuda M, Morimura N, Watanabe N, Fujimaki R, Hata J, Yamada T, Tezuka K: Enhanced calcification and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells by Notch. The 5th Annual Meeting of The Tissue Engineering Society of International, Kobe, Dec. 8-10, 2002.
- 24) 重成敦子, 安藤麻子, 椎名隆, Rogel-Gaillard Clair Chardon Patrick, 安江博, 猪子英俊: プタ SLA クラス I 遺伝子領域のゲノムの構造解析. 第 25 回日本分子生物学会, 横浜, 12 月 11-14 日, 2000.
- 25) 渡部聡, 本間大輔, 安江博: ウニ・アリ

- ールスルファターゼ遺伝子インスレーターの哺乳類細胞におけるエンハンサープロモーター機能の解析. 第 25 回日本分子生物学会, 横浜, 12月11-14日, 2000.
- 26) 山本竜司, 上西博英, 初瀬洋美, 高垣洋太郎, 佐藤英明, 安江博: プタ T 細胞レセプター α 鎖遺伝子の解析 ii) 1 ヶ月齢, 5 ヶ月齢 プタ胸腺 cDNA の多様性. 第 25 回日本分子生物学会, 横浜, 12月11-14日, 2000.
- 27) 片桐洋子, 竹野内寿美, 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎. 新たに樹立した単クローン性抗体 Raft1 を用いた GTP タンパク β 鎖の細胞内局在の検討. 第 92 回日本病理学会総会, 福岡, 4月, 2003.
- 28) 片桐洋子, 竹野内寿美, 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎. 抗ラフトクローン性抗体を用いた Six の結合による細胞内刺激伝達の解析. 第 76 回日本細菌学会総会, 熊本, 4月, 2003.
- 29) 竹野内寿美, 田口智子, 片桐洋子, 清河信敬, 奥田園爾, 藤本純一郎. Stx B サブユニットの結合による actin 細胞骨格の再構成の誘導. 第 76 回日本細菌学会総会, 熊本, 4月, 2003.
- 30) 清河信敬, 田口智子, 三森謙一, 藤本純一郎. 副刺激受容体による CD20 誘導性アポトーシスの調節. 第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会, 大阪, 8月, 2003.
- 31) 田口智子, 竹野内寿美, 清河信敬, 藤本純一郎. ペロ毒素受容体 Gb3 は腎臓細管上皮系細胞において細胞骨格の再構成にかかわる細胞内への刺激を伝達する. 第 38 回日本小児腎臓病学会学術集会, 東京, 7月, 2003.
- 32) Kiyokawa N, Takenouchi H, T. Taguchi, Y. Katagiri, Fujimoto. Intercellular signaling events in target cells mediated by binding of Shiga toxin. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 淡路島, 8月, 2003.
- 33) 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎. B 細胞初期分化における IGF および IGF binding protein の役割. 第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会, 大阪, 8月, 2003.
- 34) 田口智子, 清河信敬, 鈴木恭子, 中島敏治, 斎藤博久, 藤本純一郎. 網羅的遺伝子発現解析による小児 B 前駆細胞性急進リンパ芽球性白血病の特性の検討. 第 62 回日本癌学会総会, 名古屋, 9月, 2003.
- 35) 吉原宏樹, 清河信敬, 田口智子, 竹野内寿美, 森 鉄也, 高橋孝雄, 大喜多 肇, 藤本純一郎. Anaplastic large cell lymphoma における 5c11 抗原の発現に関する検討. 第 45 回日本小児血 36) 松井淳, 清河信敬, 田口智子, 藤本純一郎. バイオフラボノイドによる B 前駆細胞型 ALL 細胞のアポトーシス誘導. 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10月, 2003.
- 37) 鈴木恭子, 清河信敬, 田口智子, 塩沢裕介, 斎藤正博, 中島敏治, 森 鉄也, 斎藤博久, 藤本純一郎. GeneChip を用いた小児 B 前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病の特性の検討. 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10月, 2003.
- 38) Katagiri YU, Takenouchi H, Taguchi T, Kiyokawa N, Fujimoto J. Involvement of G protein β chain in signaling pathways of Six binding to Gb3 in raft microdomains of human renal cell line. 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 10月, 2003.
- 39) 田口智子, 清河信敬, 藤本純一郎. IGF1 および IGF 結合蛋白の B 細胞初期分化に対する作用に関する検討. 第 33 回日本免疫学会総会, 福岡, 11月, 2003.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 藤崎誠一郎, 平岩秀樹, 齋藤敏之, 近藤裕道, 山田健人, 安江博. プタチュープリンベ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.
- 43) 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.
- 44) 桑原陸, 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.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) 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.
- 50) 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.

51) 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.

52) 中野直子, 園尾楽, 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.

53) 園尾楽, 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.

54) 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.

55) 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.

56) 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.

57) 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.

58) 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 による白血球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.

59) 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.

60) 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

61) 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)

62) 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)

63) 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)

64) 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)

65) 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)

66) 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)

67) 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)

68) 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)

69) 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)

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

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
Sekino T, Kiyokawa N, Taguchi T, Ohmi K, Nakajima H, Suzuki T, Furukawa S, Nakao H, Takeda T, Fujimoto J.	Inhibition of Shiga toxin cytotoxicity in human renal cortical epithelial cells by nitrobenzylthioinosine.	J Infect Dis	185:6	785-796	2002
Matsuoka K, Kiyokawa N, Taguchi T, Matsui J, Suzuki T, Mimori K, Nakajima H, Takenouchi H, Tang W, Katagiri YU, Fujimoto J.	Rum1, an inhibitor of cyclin-dependent kinase in fission yeast, is negatively regulated by mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation at Ser and Thr residues.	Eur J Biochem	269:14	3511-3521	2002
Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki K, Sekino T, Mimori K, Suzuki T, Nakajima H, Katagiri YU, Fujimura J, Fujita H, Ishimoto K, Yamashiro Y, Fujimoto J.	Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion.	Exp Hematol	30:10	1115-1123	2002
Katagiri YU, Ohmi K, Tang W, Takenouchi H, Taguchi T, Kiyokawa N, Fujimoto J.	Raft-1, a monoclonal antibody raised against the raft microdomain, recognizes G-protein b1 and 2, which assemble near nucleus after Shiga toxin binding to human renal cell line.	Lab Invest	82:12	1735-1745	2002
Nakao H, Kataoka C, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yamasaki S, Takeda T	Monoclonal antibody to shiga toxin 1, which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity	Microbiol Immunol	46:11	777-780	2002
Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri YU, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J.	Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells.	J Immunol	170:1	252-260	2003
Yuasa H, Takakura N, Shimomura T, Suenobu S, Yamada T, Nagayama H, Oike Y, Suda T.	Analysis of human TIE2 function on hematopoietic stem cells in umbilical cord blood.	Biochem Biophys Res Commun	298:5	731-737	2002
Shibara R, Hashiguchi A, sakamoto J, Yamada T, Umezawa A, Hata J.	Correlation between a specific Wilms tumor suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms tumor.	J Med Genetics	39:12	E83	2002
Zhao C, Hashiguchi A, Kondoh K, Du W, Hata J, Yamada T.	Exogenous expression of heat shock protein 90kDa retards the cell cycle and impairs the heat shock response.	Experimental Cellular Research	275:2	200-214	2002
Kakimoto T, Hattori Y, Okamoto S, Sato N, Kamata T, Yamaguchi M, Morita K, Yamada T, Takayama N, Uchida H, Shimada N, Tanigawara Y, Ikeda Y.	Thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma: Association of plasma concentrations of thalidomide and angiogenic growth factors with clinical outcome.	Jpn J Cancer Res	93:9	1029-1036	2002
Sato N, Hattori Y, Du W, Yamada T, Kamata T, Kakimoto T, Okamoto S, Kawamura C,	Elevated level of basic fibroblast growth factor in multiple myeloma correlates with increased disease	Jpn J Cancer Res	93:4	459-466	2002

Kizaki M, Shimada N, Ote Y, Hata J, Ikeda Y.	activity.				
Yamaoka T, Yoshino K, Yamada T, Yano M, Matsui T, Yamaguchi T, Moritani M, Hata J, Noji S, Itakura M.	Transgenic expression of FGF8 and FGF10 induces transdifferentiation of pancreatic islet cells into hepatocytes and exocrine cells.	Biochem Biophys Res Commun	292:1	138-143	2002
Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ohta T, Takeuchi T, Hata J, Kadowaki T, Koyasu S.	Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity to intestinal parasites in Pik3r1 deficient mice.	Nature Immunology	3:3	295-304	2002
Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Shirasaki Y, Kondo K, Yamada T.	Various amplification of direct PCR using Blood Samples.	Clinical Laboratory	48:5	377-384	2002
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	170:3	2170-2178	2003
Nguyen H, Hay J, Gallinger S, Sandhu J, Hozumi N.	Nguyen H, Hay J, Gallinger S, Sandhu J, Hozumi N.	Human Antibodies	11:3	65-72	2002
Takamiya R, Murakami M, Goda N, Makino N, Kajimura M, Takamiya Y, Yamaguchi T, Ishimura Y, Hozumi N, Suematsu, M.	Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: An anti-inflammatory role.	Am J Physiol	283:3	H861-H870	2002.
Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri YU, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J.	Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells..	J Immunol	170	252-260	2003
Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima N, Saito M, Katagiri YU, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y, Fujimoto J.	Co-stimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells.	Leukemia	17	1164-1174	2003
Mori T, Kiyokawa N, 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, Kiyokawa N, Fujimoto J, Amemiya H, Suzuki S, Tokunaga T.	Catalytic RAG1 mutants obstruct V(D)J recombination in vitro and in vivo.	Mol Immunol	39	871-878	2003
Honma D, Uenishi H, Hiraiwa H, Watanabe S, Tang W, Kiyokawa N, Fujimoto J, Yause H, Sakimura K	Cloning and characterization of porcine common g chain gene.	J Interf Cytok Res	23	101-111	2003
Ohtomo Y, Kawamura R, Kaneko K, Yamashiro Y, Kiyokawa N, Taguchi T, Mimori K, Fujimoto J.	Nephrotic syndrome associated with human parvovirus B19 infection.	Pediatr Nephrol	18	280-282	2003
Mori T, Sugita K, Kimura K, Fuke T, Miura T, Kiyokawa N, Fujimoto J.	Isolated central nervous system (CNS) relapse in a case of childhood systemic anaplastic large cell lymphoma without initial CNS involvement.	J Pediatr Hematol Oncol	25	975-977	2003
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
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	Am J Physiol Endocrinol Metab	284	E966-971	2003

	intakes, body weight change, metabolic parameters, and glucose-stimulated insulin secretion in C57BL/6J and db/db mice.				
Tsumoda 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
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
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
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
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
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.	Targeting 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, 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
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
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
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
Uenishi H, Hiraiwa H, Yamamoto R, Yasue H, Takagaki Y, Shiina T, Kikkawa E, Inoko H, Awata T.	Genomic structure around joining segments and constant regions of swine T-cell receptor alpha/delta (TRA/TRD) locus.	Immunology	109	515-526	2003
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.
Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang	Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells.	Leukemia Research	in press		

W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J.					
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



ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Biochemical and Biophysical Research Communications 298 (2002) 731–737

BBRC

www.academicpress.com

Analysis of human TIE2 function on hematopoietic stem cells in umbilical cord blood

Hiromi Yuasa, Nobuyuki Takakura, Taizou Shimomura, Souichi Suenobu, Taketo Yamada, Hitomi Nagayama, Yuichi Oike, and Toshio Suda*

Department of Hematopoiesis, Institute of Molecular Genetics and Embryology, Kumamoto University, Kumamoto 860-0811, Japan
Department of Cell Differentiation and Pathology, The Sakaguchi Laboratory, Keio University School of Medicine, 160-1582, Japan

Received 30 September 2002

Abstract

To investigate the behavior of hematopoietic stem cells (HSCs) in cord blood (CB), we analyzed the expression and function of TIE2, a tyrosine kinase receptor. A subpopulation of Lineage (Lin)^{-low}CD34⁺ cells in CB expressed TIE2 (18.8%). Assays for long-term culture-initiating cells (LTC-IC) and cobble-stone formation revealed that Lin^{-low}CD34⁺TIE2⁺ cells showed to have a capacity of primitive hematopoietic precursor cells in vitro. When Lin^{-low}CD34⁺TIE2⁺ cells were cultured on the stromal cells, they transmigrated under the stromal layers and kept an immature character for a few weeks. By contrast, Lin^{-low}CD34⁺TIE2⁻ cells differentiated immediately within a few weeks. Finally, we confirmed that 1×10^4 Lin^{-low}CD34⁺TIE2⁺ cells were engrafted in non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice, while 1×10^4 Lin^{-low}CD34⁺TIE2⁻ cells were not. Taken together, we conclude that TIE2 is a marker of HSCs in CB. A ligand for TIE2, Ang-1 promoted the adhesion of sorted primary Lin^{-low}CD34⁺TIE2⁺ cells to fibronectin (FN), and this adhesion may play a critical role in keeping HSCs in an immature status under the stromal cells.

© 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Hematopoietic progenitors; Cell adhesion; Proliferation

Hematopoietic stem cells (HSCs) are defined as cells having hematopoietic reconstitution capacities after transplantation [1,2]. In mice, stem cell assays have been developed to evaluate the repopulating capacity in bone marrow cells [3]. On the other hand, human hematopoietic stem cell assays have been limited. Several in vitro assays have been designed in parallel to better characterize the hierarchy of human hematopoietic primitive cells. One of these is the long-term culture-initiating cell (LTC-IC) assay, which defines a population of primitive progenitors remaining after long-term culture [4–7]. More recently, xenograft assays have been developed to test the engrafting capacities of human cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice [8–12].

Definition of the hematopoietic hierarchy has been facilitated by the identification of differentiation antigens [13–16]. It has been generally considered that primitive hematopoietic cells lack lineage makers, assuming that they appear after commitment or during late stages of differentiation. Development of the hematopoietic cells is closely related to angiogenesis, suggesting the existence of common progenitors, hemangioblasts [17]. Endothelial cells are thought to be critical for hematopoiesis, since mice lacking the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor tyrosine kinase Flk-1 and Flt-1 die of defects in endothelial and hematopoietic cell function [18,19]. Furthermore, Flk-1 has been shown to be essential for both endothelial and hematopoietic stem cell development [20]. We and other groups have characterized the other subfamilies of endothelial receptor tyrosine kinases [21,22], TIE2/Tek. Mice lacking TIE2 die from defects in angiogenesis and vascular remodeling, as

* Corresponding author. Fax: +81-3-5363-3474.

E-mail address: sudato@sc.itc.keio.ac.jp (T. Suda).

well as vessel integrity between 9.5 and 10.5 days postcoitum (d.p.c.) [23,24]. Our previous study also suggested that TIE2 plays an essential role in the development of definitive hematopoiesis in the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region [25], including omphalomesenteric/vitelline artery at 9.5 d.p.c. TIE2 expressing cells from the AGM region differentiate into hematopoietic and endothelial cells *in vitro* [26]. Moreover, mice lacking a ligand for the TIE2 receptor, angiopoietin-1 (Ang-1), display angiogenic deficits similar to but slightly less severe than mice lacking TIE2 [27]. TIE2 controls the ability of endothelial cells to recruit periendothelial supporting cells to stabilize the structure of blood vessels and modulate their function. In this study, we characterize human HSCs in CB, which express TIE2 and clarify the effect of Ang-1 on HSCs.

Materials and methods

Cell preparation. Human umbilical CB cells were harvested in sterile blood bags containing citrate-dextrose solution as the anti-coagulant (SC-207; Terumo, Tokyo, Japan). Written informed consent was obtained from all pregnant women. Cells were centrifuged over Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech) for 30 min at 400g [28]. Obtained mononuclear cells were suspended in staining medium containing 5% of fetal bovine serum (FBS; JRH Bio-

sciences, Lenexa, KS) in phosphate-buffered saline (PBS) and used in the following experiment. Before staining, Fc receptors on cells were blocked with $5\mu\text{g}/10^6$ cells of purified anti-mouse CD16/CD32 Fc receptor (FcR) (Becton-Dickinson Pharmingen, San Diego, CA) for 30 min on ice. Cells were stained with CD34-FITC (Nichirei, Tokyo, Japan) and incubated for 20 min on ice. After being washed twice with PBS, the cells were mixed with anti-fluorescein isothiocyanate (FITC) MicroBeads and incubated with for 15 min on ice. CD34⁺ cells were isolated by magnetic cell separation (auto MACS; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Separation of CD34⁺ cells was carried out according to manufacturer's recommendations. The residual depleted mononuclear cells served as CD34⁻ cells.

Antibodies and reagents. The following antibodies (all antibodies are mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) unless otherwise stated) and reagents were used for immunofluorescent staining: mouse IgG1k-FITC, mouse IgG1k-phycoerythrin (PE), mouse IgG1k-biotin, CD45-FITC, CD45-PE, CD45-biotin, streptavidin-APC, CD4-PE, CD8-PE, CD13-PE, CD14-PE, CD19-PE, CD20-PE, CD33-PE, Glycophorin A-PE, CD34-FITC, and purified TIE2 (Nichirei, Tokyo, Japan). A mixture of CD4, CD8, CD13, CD14, CD19, CD20, CD33, and Glycophorin A were used as lineage makers (Lin).

Cell staining and flow cytometry. MACS-selected CD34⁺ cells were flushed, resuspended in staining buffer (PBS containing 5% FBS), and stained with FITC-CD34 mAb (NU-4A), PE-lineage markers, and the biotinylated anti-TIE2 mAb, followed by allophycocyanin-conjugated streptavidin (Becton-Dickinson Pharmingen). FACS analysis and cell sorting were performed on a FACS vantage (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with 488 argon and 632 He/Ne lasers. About 1×10^5 cells were analyzed using CellQuest software (Becton-Dickinson). The fluorescence intensity of

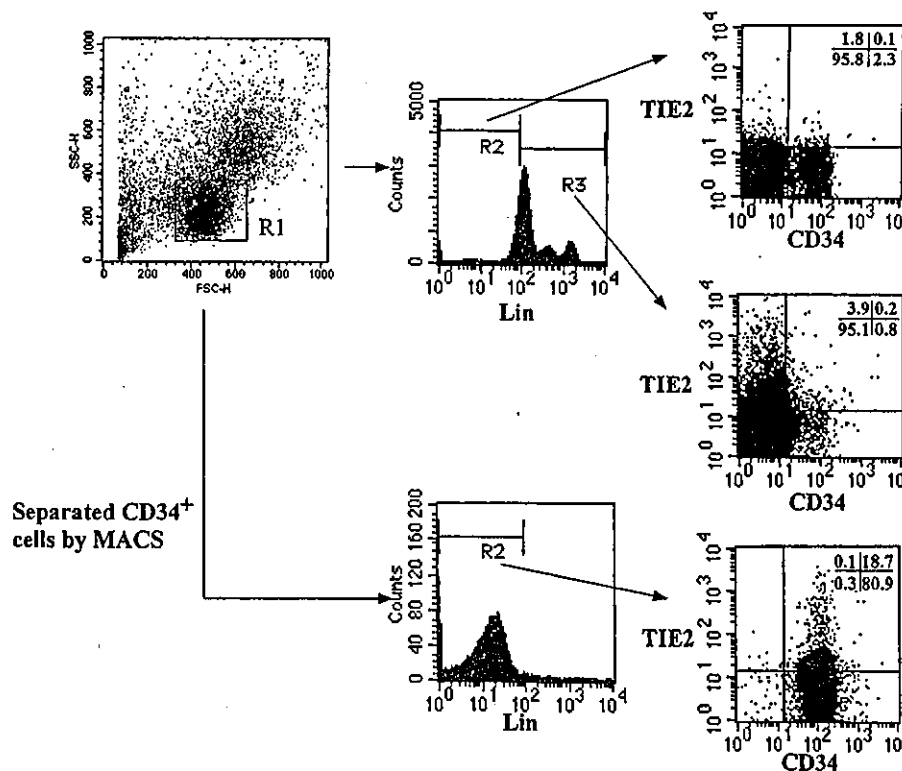


Fig. 1. Flow cytometry of TIE2-positive cells in CD34⁺ hematopoietic progenitors in cord blood. R1 defines a blast gate which excludes cells with high SSC and debris with low FSC. R2 and R3 define Lin^{-/low} cells and Lin⁺ cells, respectively. The lower panels show the FACS pattern of CD34⁺ cells separated by MACS. Percentage of cells in each quadrant indicated is a representative of triplicate experiments.

individual cells was measured and dead cells were gated out using forward/side scatter channels at the time of data analysis and sorting.

Colony assay in methylcellulose culture. Sorted cells were plated in methylcellulose medium [29]. Briefly, cells were embedded in 1 ml of 1.3% methylcellulose (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI), 30% FBS, 1% deionized BSA (Sigma), 50 mM 2-mercaptoethanol (2-ME), 20 ng/ml IL-3, 2 U/ml recombinant human erythropoietin (Epo), and 50 ng/ml SCF in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Life Technologies). The culture dishes were incubated in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO₂.

Limiting dilution assay. Sorted cells were cultured on a stroma cell line, MS5 cells in IMDM containing SCF, IL-6, G-CSF, and Epo. Cultures were scaled down from 100 to 0.5 in 0.2 ml for a limiting dilution assay. When the recovered cells were composed of at least three lineages, such as erythroid, myeloid, and lymphoid cells, we scored these as positive wells containing multipotential hematopoietic progenitors.

Culture of *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁺ and *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁻. CD34-enriched cells were incubated with antibodies to CD34, lineage markers and TIE2, and divided by a FACS vantage into *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁺ and *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁻ populations. The stromal cell line, MS5, was maintained in α -modified minimum essential media (α -MEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% FBS. Sorted cells were seeded on MS5 feeder layers (200 cells/well on a 6-well dish) in IMDM supplemented with 10% FBS containing SCF, IL-6, G-CSF, and Epo. The cells were incubated in a humidified incubator in the presence of 5% CO₂.

After 10 days, cocultured cells were subcultured using 0.05% trypsin-EDTA (Gibco-BRL). Following removal of spent culture, the cell sheet was coated with trypsin for approximately 5 min, the dish then stood upright. Following removal of trypsin, the dishes were observed using a phase contrast microscope to confirm complete cell detachment. Then, dishes were rinsed with an appropriate volume of IMDM supplemented with 10% FBS. Cell suspension collected in a polypropylene tube was washed twice. Then the cells were seeded on MS5 feeder layers in IMDM supplemented with 10% FBS containing SCF, IL-6, G-CSF, and Epo. After more than 10 days of culture, 10% of them were subcultured as described above.

Production of recombinant fusion protein. Recombinant fusion proteins of the extracellular domain of human surface molecules and the Fc part of human Ig were designed. TIE2-Fc and CD4-Fc were produced by COS7 cells in serum-free conditioned medium as previously described [22] and purified over protein A-Sepharose columns (Bio-Rad, Hercules, CA). Their purity and disulfide-linked dimerization were assessed by Coomassie brilliant blue staining of SDS gels.

Adhesion of TIE2⁺ cells in culture. *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁺ cells and *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁻ cells were sorted by FACS vantage. Both were incubated in the presence or absence of human recombinant Ang-1* [30] (300 ng/ml, provided by G.D. Yancopoulos in Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY) with or without TIE2-Fc (10 μ g/ml) for 10 min at 37°C. Cells incubated as above were cultured on human FN-coated (coated for 1 h at 10 μ g/ml, IWAKI glass, Chiba, Japan) plate for 10 min at 37°C. Before applying the cell to the plate, FN-coated plate was preincubated with 2% BSA in PBS prior to receiving cells. For the evaluation of adherence to FN, floating cells were harvested by gentle pipetting after culturing for 10 min and then counted under microscope.

Detection of LTC-ICs in the sorted fractions. The presence of long-term culture-initiating cells (LTC-IC) was assessed by culturing the sorted fractions on the murine MS-5 stromal cells as previously described [31]. Cultures were initiated at limiting dilutions by plating 0.5–100 cells per well (96-well plates). Wells were maintained at 37°C, 5% CO₂, and fed weekly by half medium change. The content in clonogenic progenitors of each well was assessed after 5 weeks in culture by plating non-adherent and adherent cells in methylcellulose

assay supplemented with IL-3, Epo, and SCF. A positive well was defined as a well that contained at least one clonogenic progenitor cell.

Transplantation of human cells in NOD/SCID mice. Fourteen-week-old NOD/SCID mice were kept in specific pathogen-free conditions and maintained on acidified water and irradiated food. Animal experiments were performed in accordance with institutional guidelines approved by the Animal Care Committee of Kumamoto University School of Medicine. Mice received a sublethal dose of 300 cGy total body irradiation using a Gamma Cell 40 (Nordion International, Kanata, Ont., Canada) equipped with two opposing ¹³⁷Cs sources. In each experiment, six donors were used. Human *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁺ cord blood cells or *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁻ cord blood cells were resuspended in RPMI1640 (Gibco-BRL) containing 0.1% BSA, and a cell dose from 2 \times 10³ to 1 \times 10⁵ cells/mouse was transplanted into mice by tail vein injection within 2 h after irradiation in a volume of 200 μ l RPMI1640/0.1% BSA per mouse. Bone marrow (BM) cells from the recipient mice were analyzed after 12 weeks by flow cytometry. A mouse was considered positive if at least 0.1% human cells (CD45⁺) were detected in comparison with the isotype control.

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm SD (standard deviation). When comparing the data from two populations, paired, two-tailed Student's *t* tests were used to determine levels of significance. A *p* value of <0.05 was considered statistically significant.

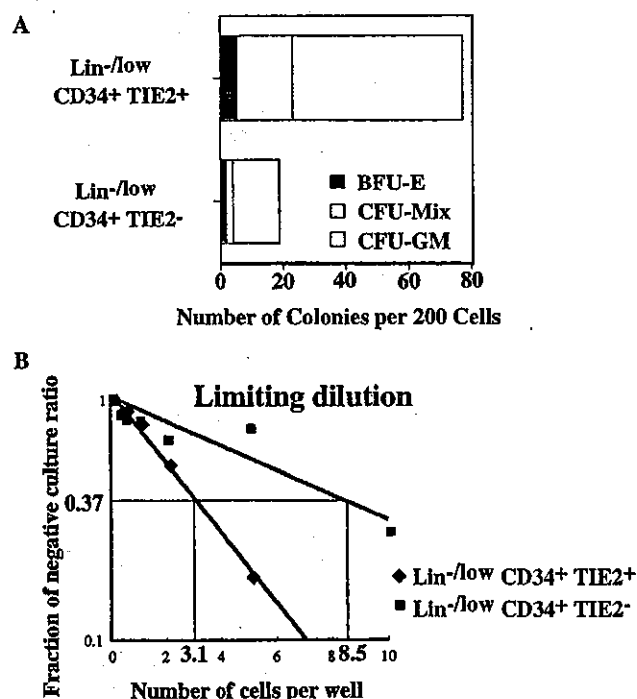


Fig. 2. (A) Colony formations in methylcellulose medium by 200 *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁺ and *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁻ cells in the presence of 30% FBS and SCF, IL-3, and Epo. The *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁺ cell population contained all types of committed progenitors containing GFU-GM (including CFU-G, CFU-M, and CFU-GM), BFU-E, and CFU-Mix. In contrast, the *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁻ cell population contained a few CFU-GM. (B) Limiting dilution analysis of the *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁺ cells and TIE2⁻ cells. The frequencies of multipotential hematopoietic progenitors in *Lin*^{-low}CD34⁺TIE2⁺ cells and TIE2⁻ cells were 1/3.1 and 1/8.5 according to the Poisson analysis, respectively.