放射線再生医学研究部門組織再生制御研究分野研究概況

教		授	本	田	浩	章
助	教	授	藤	本	成	明
助		手	宮	崎	和	子
助		手	中	河	啓	悟
大	学 院	生	渡	辺		涉
大	学 院	生	水	野	俊	行

本教室では「遺伝子改変マウスを用いた遺伝子の生物学的機能の解析」と「再生医学の臨床応用へ向けた基礎検討」を教室の柱として研究を進めている.遺伝子改変マウスについては、昨年よりトランスジェニックマウスに加えてノックアウトマウスの作製を開始した.宮崎がES細胞培養を、本田がマイクロインジェクションを行っており、現在までに作製した6種類のコンストラクト全てについて相同組み換えESクローン、キメラマウスおよびgermline transmissionによりヘテロマウスが得られている.この結果から、今後トランスジェニックマウスに加えてノックアウトマウスも問題なく作製できるものと考えている.

再生医学の基礎検討に関しては、中河が中心となって ES 細胞から消化管幹細胞への in vitro での分化の試みを行っている.藤本は広島大医歯薬学総合研究科・薬学生体機能分子動態学(太田,北村,吉原)と内分泌かく乱物質の代謝活性化と作用メカニズムに関する共同研究を行っている.

眼科からの大学院生の渡辺 渉は、網膜特異的プロモーターを用いてヒト網膜色素変性症の原因遺伝子である CRX の点突然変異体のトランスジェニックマウスマウスの作製を行っている(大阪バイオサイエンス研究所・古川博士およびWashington大学 Chen 博士と共同研究). 整形外科からの大学院生である水野俊行は軟骨特異的プロモーターを用いて軟骨 cDNA library より単離された遺伝子 PRELP を発現するトランスジェニックマウスの作製および解析を行っている(大阪大学整形外科学教室妻木博士及び Lund 大学 Aspberg 博士と共同研究).

本田は第44回原子爆弾後障害研究会において特別講演「原爆放射線と慢性骨髄性白血病」を行った.. 当研究分野における研究課題は以下のごとくである.

1.研究課題: CML トランスジェニックマウスモデルを用いたヒト慢性骨髄性白血病の急性転化に関わる遺伝子の解析

参加研究者:本田浩章,中河啓悟

慢性骨髄球性白血病(Chronic Myelogenous Leukemia: CML)はキメラ蛋白質である p210BCR/ABL により形質 転換した造血幹細胞の腫瘍である.CML は臨床的には穏やかな慢性期に始まるが,不可避的に致死的な急性転化へと進行する.付加的遺伝子異常が慢性期から急性転化への移行に関与すると考えられているが,その分子生物学的機構は不明である.我々はp210BCR/ABLのトランスジェニックマウスを作製し,再現性良くCMLを発症するモデルマウスの開発に成功した.このマウスにレトロウイルスを感染し内在性の遺伝子に取り込ませ不活化または過剰発現させることにより,CML 急性転化の原因となる遺伝子変異を解析する.実際には授乳を通じてレトロウイルスを伝搬する BXH2というマウス系統を使用する.BXH2の遺伝子学的背景を得るためには少なく

とも3代のバッククロスが必要であるが,これはすでに終了しており末梢血の血算を定期的に測定している.現在までに何匹かの p210BCR/ABL トランスジェニックマウスに白血病発症を認めており,レトロウイルス特異的なプライマーを用いてウイルスが挿入された遺伝子の同定を行っている.

2. 研究題目: 白血病融合転写因子産物の疾患モデルマウスの作製とその解析

参加研究者: 宮崎和子,本田浩章,稲葉俊哉,平井久丸(東京大学医学部血液·腫瘍内科,逝去),三谷絹子(獨協医科大学血液内科)

ヒト造血器腫瘍では疾患特異的な染色体異常,特に染色体転座が数多く認められ,これらのほとんどが融合遺伝子を形成することが明らかとなってきた.我々はこれらのうち, (9;22)で形成される BCR/ABL, (8;21)で形成される AML1/ETO, (3;21)で形成される AML1/EVI1, (17;19)で形成される E2A/HLF, (1;19)で形成される E2A/PBX1などの融合遺伝子産物について新しく開発した後天的に誘導可能なノックインの手法を用いて疾患モデルマウスの作製を試みている.すでに BCR/ABL, AML1/EVI1, E2A/HLFについてはノックインマウスが得られている.これらのマウスは,上記融合遺伝子産物の個体における白血病発症の分子メカニズムを解明する手がかりになると共に,転座型白血病に対する新たな治療法の開発に向けて役立つものと考えられる.

3.研究課題:コンディショナルノックアウトマウスを用いたアダプター分子 Cas の機能解析

参加研究者:宮崎和子,本田浩章,平井久丸(東京大学医学部血液・腫瘍内科,逝去),堺 隆一(国立がんセンター研究所・細胞増殖因子研究部)

Cas(Crk-associated substrate)は癌遺伝子である Crk および Src により形質転換した線維芽細胞で高いチロシンリン酸化を受けるアダプター蛋白質として同定された.我々は Cas のノックアウトマウスを作製し,Cas の生物学的機能はアクチン繊維の束状化であることを明らかにした.しかし,Cas ノックアウトマウスは胎生致死となってしまうため,Cas が成体の様々な組織においてどの様な機能を果たしているかは未だに不明のままである.我々は Cas のコンディショナルノックアウトマウスを作製する事によりこの問題を解決しようと考えている.すでにヘテロマウスが得られており,現在ヘテロマウスと B6マウスとの交配により得られた受精卵への FLP のmicroinjection により FRT で囲まれた Neo 遺伝子の欠失を行っている.Cas を組織特異的に欠失させることにより,細胞増殖,細胞分化,細胞の homing,細胞の遊走など様々な生体機能に新たな知見を加えることが出来ると考えられる.

4. 研究課題: ノックインマウスを用いた造血幹細胞より単離された polycomb 遺伝子 Hemp の機能解析

参加研究者: 宮崎和子,本田浩章, Ihor R. Lemischka (Department of Molecular Biology, Princeton University, USA)

Hemp は Princeton 大学の Lemischka らにより作製された高度に純化された造血幹細胞特異的 cDNA library から 単離された polycomb に属する遺伝子である.この遺伝子の生物学的機能解析の目的で,我々は Hemp の MBT ドメインを欠失しそこに GFP を挿入したノックインマウスを作製した.ヘテロマウス同士の交配の結果から Hemp/GFP ノックインマウスは胎生致死であると考えられる.胎生のどの時期にどのような原因で死亡するかに ついて現在解析を行っている.

5.研究課題:エストロゲン受容体遺伝子の発生学的発現変化と調節機構

研究参加者:藤本成明

肝臓や前立腺などの臓器再生過程においては幹および前駆細胞を介した活発な細胞増殖と分化が行われる、特に前立腺はこの過程がアンドロゲン依存性であり、ホルモン応答遺伝子が幹細胞機能に関わっている。ラットモデルにおいて、前立腺の各葉特異的にアンドロゲン応答する遺伝子群を同定した、今後、前立腺の幹細胞群での

これら遺伝子の発現を細胞レベルで解析していく必要がある.

6.研究課題:エストロゲン受容体遺伝子の発生学的発現変化と調節機構

参加研究者:藤本成明

エストロゲンは,性腺の発生において中心的な役割を果たすが,その受容体の一つである ER の発現調節機構につてはよく知られていない.そこで,マウス ER の遺伝子上流域2.2kbpをクローニングし解析した結果,この領域が発現プロモーターとして機能することが見いだ された.現在,このプロモーターレポーターを導入したトランスジェニックマウスを作成して, in vivo での機能解析をおこなっている.

7.研究課題:ES 細胞へのノックインを用いた腸管系幹細胞の単離と再生医学への応用

参加研究者: 中河啓悟, 本田浩章

Musashi-1は慶応大学の岡野らにより単離された遺伝子であり,腸管(および神経)幹細胞のマーカーとして認識されている.我々は放射線感受性臓器の再生医学の基礎検討を行うため,ES 細胞を用いて Musashi-1遺伝子座に GFP のノックインを試みている.目的の ES 細胞が得られた場合,LIF および feeder 細胞を除去して embryoid body を作製し,flowcytometry を用いて GFP 陽性細胞を単離する.この細胞の機能を in vitro で解析すると共に,被爆モデルとして腸管に放射線照射したマウスを作製し,上記 GFP 陽性細胞を移植することにより腸管再生の有無について検討する.

8.研究課題:トランスジェニックマウスを用いたヒト網膜色素変性症モデルマウスの作製

参加研究者:渡辺 渉,宮崎和子,本田浩章,三嶋 弘(大学院医歯薬学総合研究科・視覚病態学講座),古川 貴久(大阪バイオサイエンス研究所), Shimming Chen (Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Washington University School of Medicine, USA)

CRX (cone-rod homeobox) は網膜視細胞に特異的に発現している転写因子であり,網膜細胞の分化のみならずロドプシンなどの網膜光受容に必須のタンパクの遺伝子発現に関わっている事が報告されている.更に crx 遺伝子の変異は常染色体優勢 cone-rod dystrophy (CORD) など網膜変性疾患で同定されている.本研究では網膜特異的プロモーターを用いて網膜色素変性症から単離された CRX の変異体 (168番のアミノ酸に 2 塩基欠損があるもの)のトランスジェニックマウスを作製し,網膜色素変性症のモデルマウスを作製しようとするものであり,現在ファウンダーマウスの作製を行っている.

原著

- 1. Inokuchi, K.*¹, Dan, K.*¹, Takatori, M.*¹, Takahuji, H.*¹, Uchida, N.*¹, Inami, M.*¹, Miyake, K.*¹, Honda, H., Hirai, H.*², and Shimada, T.*¹ (*¹Dept. Internal Medicine, Nippon Medical School, *²Dept. Hematology and Oncology, University of Tokyo): Novel transgenic mice expressing P230 Bcr/Abl developed myeloproliferative disorder: longer disease latency, thrombocytosis and mild leukocytosis. Blood 102: 320-323, 2003. (A, I)
- 2 . Fujimoto, N. and Honda, H.: Effects of environmental estrogenic compounds on growth of a transplanted estrogen responsive pituitary tumor cell line in rats. Food Chem. Toxicol. 41: 1711-1717, 2003. (A, G, I)
- 3 . Fujimoto, N., Kohta, R. , Kitamura, S. , and Honda, H. (Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA) . Life Science 74: 1417-1425, 2004(R, A, G, I)

- 4 . Fujimoto, N., Honda, H., and Kitamura, S. ("Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Effects of environmental estrogenic chemicals on AP1 mediated transcription with estrogen receptors alpha and beta. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 88: 53-59, 2004. (R, A, G, I)
- 5 . Kitamura, S. ', Suzuki, T. ', Fujimoto, N., and Ohta, S. '(''Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Antiandrogenic activity of the organophosphorus pesticide fenthion and related compounds, and the effect of metabolism. Env. Health. Persp.111: 503-508, 2003. (R, A, G, I)
- 6 . Kitamura, S. , Ohmegi, M. , Sanoh, K. , Sugihara, K. , Yoshihara, S. , Fujimoto, N., and Ohta, S. , Topet. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine ; Estrogenic Activity of Styrene Oligomers after Metabolic Activation by Rat Liver Microsomes. Env. Health. Persp. 111: 329-334, 2003. (R, G, I)
- 7 . Kitamuram, S. , Sanoh, S. , Kohta, R. , Suzuki, T. , Sugihara, K. , Fujimoto, N., and Ohta, S. , (Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Metabolic activation of proestrogenic diphenyl and related compounds by rat liver microsomes. J. Health Sci. 49: 298-310, 2003. (R, G, I)
- 8 . Sanoh, S. , Kitamura, S. , Sugihara, S. , Fujimoto, N., and Ohta, S. , Topet. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Estrogenic Activity of Stilbene Derivatives. J. Health Sci. 49: 359-367, 2003. (R, G, I)
- 9 . Fujimoto, T. T., Kitamura, S. Sanoh, S. Sanoh, S. Sugihara, K. Yoshihara, S. Fujimoto, N., and Ohta, S. Chool. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Estrogenic activity of an environmental pollutant, 2-nitrofluorene, after metabolic activation by rat liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 303: 419-426, 2003. (R, G, I)
- 10 . Kawamoto, T.⁻¹, Noshiro, M.⁻¹, Sato, F.⁻¹, Maemura, K.⁻², Takeda, N.⁻², Nagai, R.⁻², Iwata, T.⁻¹, Fujimoto, K.⁻¹, Furukawa, M.⁻¹, Miyazaki, K., Honma, S.⁻³, Honma, K.⁻³, and Kato, Y.⁻¹ (⁻¹Dept. Dent. and Med. Biochem., Grad. School of Biomed. Sciences, Hiroshima Univ., ⁻²Dept. of Cardiovascular Med., Grad. School of Med., Tokyo Univ., ⁻³Dept. Physiology, Grad. School of Med., Hokkaido Univ.) A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313: 117-124, 2004 (I)
- 11 . Sanada, M.⁻¹, Higashi, Y.⁻², Nakagawa, K., Tsuda, M.⁻¹, Kodama, I.⁻¹, Kimura, M.⁻³, Chayama, K.⁻³, and Ohama, K.⁻¹ (⁻¹Dept. of Obstetrics and Gynecology, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. ⁻²Dept. of Cardiovascular Physiology and Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. ⁻³Dept. of Medicine and Molecular Sciences, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science.) A comparison of low-dose and standard-dose oral estrogen on forearm endothelial function in early postmenopausal women. J. Clin. Endocr. Metab. 88: 1303-1309, 2003. (I)
- 12 . Sanada, M.⁻¹, Higashi, Y.⁻², Nakagawa, K., Kodama, I.⁻¹, Tsuda, M.⁻¹, Nagai, N.⁻¹, Chayama, K.⁻³, and Ohama, K.⁻¹ (⁻¹Dept. of Obstetrics and Gynecology, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. ⁻²Dept. of Cardiovascular Physiology and Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. ⁻³Dept. of Medicine and Molecular Sciences, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science.) Comparison of forearm endothelial function between premenopausal and postmenopausal women with or without hypercholesterolemia. Maturitas. 44: 307-315, 2003.(1)

- 13 . Higashi, Y. 1, Nakagawa, K., Kimura, M. 2, Noma, K. 2, Sasaki, S. 2, Hara, K. 3, Goto, C. 1, Oshima, T. 3, Chayama, K. 2, and Yoshizumi, M. 1 (1)Dept. of Cardiovascular Physiology and Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. Dept. of Medicine and Molecular Sciences, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. Dept. of Clinical Laboratory Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. Low body mass index is a risk factor for impaired endothelium-dependent vasodilation in humans: role of nitric oxide and oxidative stress. J. Am. Coll. Cardiol. 42: 256-263, 2003. (1)
- 14 . Noma, K.", Higashi, Y.", Jitsuiki, D.", Hara, K.", Kimura, M.", Nakagawa, K., Goto, C.", Matsuura, H.", Oshima, T.", Yoshizumi, M.", and Chayama, K." ("Dept. of Medicine and Molecular Sciences, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. Dept. of Cardiovascular Physiology and Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. Dept. of Clinical Laboratory Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. Smoking activates Rho-kinase in smooth muscle cells of forearm vasculature in humans. Hypertension 41: 1102-1105, 2003.
- 15 . Kimura, M.¹, Higashi, Y.², Hara, K.¹, Noma, K.¹, Sasaki, S.¹, Nakagawa, K., Goto, C.², Matsuura, H.¹, Oshima, T.³, Yoshizumi, M.², and Chayama, K.¹(¹Dept. of Medicine and Molecular Sciences, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. ²Dept. of Cardiovascular Physiology and Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. ³Dept. of Clinical Laboratory Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science.) PDE5 inhibitor sildenafil citrate augments endothelium-dependent vasodilation in smokers. Hypertension 41: 1106-1110, 2003.(1)
- 16 . Goto, C.⁻¹, Higashi, Y.⁻¹, Kimura, M.⁻², Noma, K.⁻², Hara, K.⁻², Nakagawa, K., Kawamura, M.⁻¹, Chayama, K.⁻², Yoshizumi, M.⁻¹, and Nara, I.⁻¹ (⁻¹Dept. of Cardiovascular Physiology and Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. ⁻²Dept. of Medicine and Molecular Sciences, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science.) The effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. Circulation 108: 530-535, 2003. (I)
- 17. Matsuda, K.", Teragawa, H.", Fukuda, Y.", Nakagawa, K., Higashi, H.", and Chayama, K." ("Dept. of Medicine and Molecular Sciences, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. Dept. of Cardiovascular Physiology and Medicine, Hiroshima University Gaduate School of Biomedical Science. Leptin causes nitric-oxide independent coronary artery vasodilation in humans. Hypertension Res. 26: 147-152, 2003. (1)

B. 学会発表

- 1.本田浩章,宮崎和子:融合遺伝子形成型白血病に対する新たなマウスモデルの作製 ワークショップ「個体レベルでの新しい病理形態学的がん研究の推進と支援に関する委員会」(文科省特定領域研究「発がんと防御」主催),蓼科,2004(R,A,G)
- 2. 藤本成明, 本田浩章, 五十嵐勝秀 ', 菅野 純 ', 井上 達' ('国立衛医研安全センター): ラット下垂体細胞エストロゲン応答遺伝子の cDNA マイクロアレイによる解析(日本内分泌学会雑誌 79, 10404). 第76回日本内分泌学会学術総会,横浜,2003(R,A,G)
- 3. 藤本成明,本田浩章,五十嵐勝秀一,菅野 純一,井上 達一 (一国立衛医研安全センター):エストロゲン応答ラット下垂体細胞 GH 3における低濃度ビスフェノールA(BPA)応答遺伝子のcDNAマイクロアレイによる検索.内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム,湘南,2003(R,A,G)

- 4. 藤本成明,本田浩章,五十嵐勝秀一,菅野 純一,井上 達一(「国立衛医研安全センター): cDNA マイクロアレイによるエストロゲン依存性下垂体腫化関連遺伝子の検索(日本癌学会総会記事2644PP),第62回日本癌学会総会,名古屋,2003.(R,A,G)
- 5.幸田龍紀¹¹,北村繁幸¹¹,鈴木智晴¹¹,佐能正剛¹¹,杉原数美¹¹,太田 茂¹¹,藤本成明 (¹¹広島大医歯薬学総合研究科薬学):スチルベン誘導体の内分泌攪乱活性発現における構造要因およびその代謝的活性化.環境ホルモン学会第6回研究発表会,仙台,2003.(R,A,G)
- 6.北村繁幸", 鈴木智晴", 幸田龍紀", 佐能正剛", 杉原数美", 吉原新一", 太田 茂", 藤本成明 ("広島大 医歯薬学総合研究科薬学): エストロゲン活性を示すビスフェノール類の構造と活性の相関性およびその前駆物 質の活性化.環境ホルモン学会第6回研究発表会, 仙台, 2003. (R, A, G)
- 7. 北村繁幸",幸田龍紀",鈴木智晴",佐能正剛",杉原数美",吉原新一",藤本成明,太田 茂"("広島大医 歯薬学総合研究科薬学): ビスフェノールおよびスチルベン誘導体のエストロゲン活性の構造相関活性(要旨 集 P1II-098). 日本薬学会第124回年会,大阪,2004(R,G)
- 8. 杉原数美,幸田龍紀,上京田渚,田春玲子,北村繁幸,藤本成明,太田 茂:紫外線吸収剤ベンゾフェノン誘導体のエストロゲン活性と代謝的活性化(要旨集 P.1 II-108).日本薬学会第124回年会,大阪,2004.(R,G)
- 9. Kawamoto, T.', Miyazaki K', Shen, M.', Sasabe, E.', Honma, S.', Sato, F.', Suardita, K.', Fujimoto, K.', Noshiro, M.', and Kato, Y.'('Dept. Dent. and Med. Biochem., Grad. School. Biomed. Sciences, Hiroshima Univ., 'Dept. Physiology, Grad. School Med., Hokkaido Univ.) DEC1 and DEC2 are regulators for differentiation of cartilage, adaptation to hypoxia, and circadian rhythm. 国際骨代謝学会·日本骨代謝学会第1回合同国際会議2003,大阪,2003年6月(R,G)
- 10 . Sardita, K.¹, Fujimoto, K.¹, Oda, R.², Shimazu, A.³, Miyazaki, K., Kawamoto, T.¹, and Kato, Y.¹(¹¹Dept. Dent. and Med. Biochem., Grad. School. Biomed. Sciences, .²Dept. Operative Det., 3Dept. of Preventive Dent. Grad. School of Biomed. Sciences, Hiroshima Univ.) Effects of overexpression of membrane-bound transferring-like protein (MTf) on chondrogenic differentiation. 国際骨代謝学会・日本骨代謝学会第1回合同国際会議2003, 大阪,2003年6月(R,G)
- 11. Miyazaki, K., Kawamoto, T.˙¹, Tanimoto, K.˙², Kato, Y.˙¹, and Honda H(˙¹Dept. Dent. and Med. Biochem., Grad. School. Biomed. Sciences, ˙²Dept. Trans. Cancer Res. RIRBM, Hiroshima Univ.): Identification of Functional Hypoxia Response Elements in the Promoter Region of the DEC1 and DEC2 Genes. 第 4 回文部科学省特定領域研究「がん」 6 領域 若手研究者ワークショップ,蓼科,2003年 8 月(R, G)
- 12. 岩田倫幸¹¹²,河本 健¹¹,宮崎和子,笹部衣里¹¹,藤本勝巳¹¹,能城光秀¹¹,栗原英見¹²,加藤幸夫¹¹(¹¹広島大院・医歯薬・探索医(口腔生化),¹²先進医(歯周)) DEC 1の過剰発現は間葉系幹細胞の骨分化を促進する: 第45回歯科基礎医学会,盛岡市,2003年9月(R,G)
- 13. ケトゥスアルディタ¹¹,藤本勝巳¹¹,尾田 良¹²,島津 篤¹³,宮崎和子,河本 健¹¹,加藤幸夫¹¹(「広島大院・医歯薬・探索医(口腔生化)、 ¹²顎口頚医(保存)、 ¹³病態情報医(予防): 膜結合型トランスフェリン様タンパク(MTf)の強制発現およびRNAiの軟骨分化に対する影響:第17回日本軟骨代謝学会,東京,2004年3月(R,G)

注)原著,学会発表の文末記号の(R)は放射線実験系を用いた研究,(A)は放射線照射動物実験系を用いた研究,(G)は遺伝子実験系施設を用いた研究,(C)は国際放射線情報センター関連の研究,(I)はカレントコンテンツにリストされた論文の略号です.