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		渉
大学院生	水	野	俊	行
大学院生	田	崎	達	也 (平成16年6月～)

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、現在までに本田・宮崎を中心に複数のトランスジェニックマウスとノックアウト・ノックインマウスを作製し表現型の解析を行っている。

再生医学の基礎検討に関しては、中河がES細胞から消化管幹細胞への *in vitro* での分化誘導・単離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のもとで網膜 cDNA ライブラリーより単離された遺伝子 ODAG を発現するトランスジェニックマウスの解析を行っている（大阪バイオサイエンス研究所・古川博士および原医研・ゲノム障害病理・宮川先生と共同研究）。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 PPAR の dominant negative form を発現するトランスジェニックマウスの解析を行っている（大阪大学整形外科教室妻木博士と共同研究）。第一外科からの大学院生の田崎達也は p130Cas (Cas) のコンディショナルノックアウトマウスを用いて組織特異的に Cas を欠失したマウスの解析を行っている。

当研究分野における研究課題は以下のごとくである。

1. 研究題目：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、不可避免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。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，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，t(9;22) で形成される BCR/ABL，t(8;21) で形成される AML1/ETO，t(3;21) で形成される AML1/EVI1，t(17;19) で形成される E2A/HLF，t(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. 研究題目：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．

4. 研究題目：前立腺組織再生に関わる遺伝子発現

参加研究者：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．ラットおよびマウスにおいて，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．またマウス前立腺組織のプロテオーム解析により新規の応答タンパク質を同定し，これらの初期発生過程での発現様式を明らかにした．

5. 研究題目：エストロゲン受容体遺伝子の発生学的発現変化とその調節機構

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い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．さらに，その lacZ 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 でのプロモーター機能を証明した．

6. 研究題目：ノックインを用いたマウス ES 細胞からの腸管幹細胞の単離

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，Musashi-1遺伝子座に green fluorescent protein (GFP) をノックインしたマウス ES (embryonic stem) 細胞を確立した．現在 LIF および feeder

細胞を除去して embryoid body を作製し、flowcytometry による GFP 陽性細胞の単離を行っている。この細胞の機能を in vitro で解析すると共に、腸管に放射線照射したマウスに上記 GFP 陽性細胞を移植し、in vivo での腸管再生能について検討する。

7. 研究題目：網膜視細胞特異的に ODAG を発現するトランスジェニックマウスの作製と解析

参加研究者：渡辺 渉，宮崎和子，本田浩章，宮川 清（原医研・ゲノム障害病理）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）

ODAG(Ocular development-associated gene) は原医研・ゲノム障害病理において網膜 cDNA ライブラリーから microarray 法を用いて単離された遺伝子であるが、その生物学的機能は不明である。我々は、網膜視細胞特異的プロモーターを用いて ODAG を発現するトランスジェニックマウスの作製を行った。眼球および網膜に興味ある表現型が得られており、現在その解析を行っている。

8. 研究題目：トランスジェニックマウスを用いた軟骨における PPAR dominant negative form の機能解析

参加研究者：水野俊行，本田浩章，越智光夫（大学院医歯薬学総合研究科・整形外科学講座），妻木範行（大阪大学医学部・整形外科学教室）

PPAR は核内受容体であり、細胞内の遺伝子ネットワークの活性を調整する。我々は軟骨における PPAR の役割を解析する目的で、軟骨特異的プロモーターを用いて PPAR dominant negative form を発現するトランスジェニックマウスを作製した。現在複数のマウスラインが得られており、表現型の解析を行っている。

9. 研究題目：コンディショナルノックアウトマウスを用いた乳癌におけるアダプター分子 Cas の機能解析

参加研究者：田崎達也，宮崎和子，本田浩章，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ような機能を果たしているかは未だに不明のままである。この問題を解決する目的で、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した。現在 Cas のコンディショナルノックアウトマウスに様々な組織で Cre を発現するマウスの掛け合わせしており、表現型の解析を行っている。

A. 原著

1. Niki, M.^{1,2}, Di Cristofano A.¹, Zhao M.³, Honda H., Hirai, H.⁴, Aelst, L.V.³, Cordon-Cardo, C.², and Pandolfi, P.P.^{1,2} (¹Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, ²Department of Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, ³Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, ⁴Department of Hematology & Oncology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo): Critical role of Dok-1 and Dok-2 in leukemia suppression. *J. Exp. Med.* 20: 1689-95, 2004. (A, G, I)
2. Fujimoto, N., Asano, K.¹, Usui, T.¹, Honda, H., Kitamura, S.² (¹Dept. Urology, ²Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat estrogen receptor gene. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 93, 151-158, 2005. (R, A, G, I)
3. Fujimoto, N., Suzuki, T.¹, Honda, H., Kitamura, S.¹ (¹Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima

- University School of Medicine): Estrogen enhancement of androgen responsive gene expression in hormone induced hyperplasia in the ventral prostate of F344 Rats. *Cancer Sci.* 95, 711-715, 2004. (R, A, G, I)
- 4 . Fujimoto, N., Igarashi, K.¹, Kanno, J.¹, Honda, H., Inoue, T.¹ (¹Div. Toxicology, NIHS) Identification of estrogen responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91, 121-129, 2004.(I)
 - 5 . Fujimoto, N., Jinno, N.¹, Kitamura, S.¹ (¹Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Activation of ERE responses by thyroid hormone with increase in estrogen receptor levels in a rat pituitary cell line, GH3. *J. Endo.* 181, 77-83, 2004.
 - 6 . Kitamura, S.¹, Kato, T.¹, Iida, M.¹, Jinno, N.¹, Suzuki, T.¹, Ohta, S.¹, Fujimoto, N., Hanada, H.¹, Kashiwagi, K.¹, Kashiwagi, A.¹. (¹Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole. *Life Sci.* 76, 1589-1601, 2005. (R, A, G, I)
 - 7 . Kitamura, S.¹, Jinno, N.¹, Suzuki, T.¹, Sugihara, K.¹, Ohta, S.¹, Kuroki, H.¹, Fujimoto, N. (¹Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology*, 208, 377-387, 2005. (R, A, G, I)
 - 8 . Suzuki, T.¹, Kitamura, S.¹, Khota, R.¹, Sugihara, K.¹, Fujimoto, N.¹, Ohta, S.¹ (¹Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 203, 9-17, 2005. (A, G, I)
 - 9 . Kitamura, S.¹, Suzuki, T.¹, Sanoh, S.¹, Kohta, R.¹, Jinno, N.¹, Sugihara, K.¹, Yoshihara, S.¹, Fujimoto, N., Watanabe, H., Ohta, S.¹ (¹Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol. Sci.*, 84, 1-12, 2005. (A, G, I)
 - 10 . Miyazaki M.¹, Kawamoto, H.², Kato, Y.¹, Itoi, M.³, Miyazaki, K., Masuda, K.⁴, Tashiro, S.⁵, Ishihara, H.¹, Igarashi, K.⁵, Amagai, T.³, Kanno, R.¹ and Kanno M.¹ (¹Dept. of Immunology and ⁵Biomed. Chemistry, Grad. School of Biomed. Sciences, Hiroshima Univ., ²Lab. for Lymphocyte Development, RIKEN Res. Center for Allergy and Immunology, ³Dept. of Immunology and Microbiology, Meiji Univ. of Oriental Medicine, ⁴Dept. of Immunology and Cell Biology, Grad. School of Biostudies, Kyoto Univ.): Polycomb group gene mel-18 regulates early T progenitors expansion by maintaining Hes-1 expression. *J. Immunology*, 174, 2507-2516 (I)
 - 11 . Matsubara, T.¹, Suardita K.², Ishii, M.², Igarashi, A.², Oda, R.³, Nishimura, M.⁴, Saito, M.⁵, Nakagawa, K., Yamanaka, K.², Miyazaki, K., Shimizu, M.², Tsuji, K.¹, Nakamura, K.⁶, Kato, Y.^{1,2}. (¹JST, ²Dept. Dent. and Med. Biochem., Grad. School of Biomed. Sciences, Hiroshima Univ., ³Dept. of Operative dent., ⁴Dept. of Prosthetic dent., Grad. School of Biomed. Sciences, Hiroshima Univ., ⁵Dept. Operative dent. and Endodontics Kanagawa Dental College, ⁶Dept. of Orthopedic Surgery, Grad. School of Medicine, Univ. of Tokyo): Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J. Bone. Miner. Res.*, 313(3): 503-508, 2004 (I)
 - 12 . Higashi Y, Kimura M, Hara K, Noma K, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Sueda T, Goto C, Matsubara H, Murohara T, Yoshizumi M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-

dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 2004 Mar 16;109(10):1215-1218. (I)

- 13 . Jitsuiki D, Higashi Y, Goto C, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M. Effect of edaravone, a novel free radical scavenger, on endothelium-dependent vasodilation in smokers. *Am. J. Cardiol.* 2004 Oct 15;94(8):1070-1073. (I)

B . 会発表

- 1 . 本田浩章「造血管腫瘍の最先端研究：モデルマウスを用いた造血管腫瘍発症の分子機構の解析」第63回日本癌学会総会シンポジウム，福岡，2004 9. (R,A,G)
- 2 . Araki, M.¹, Sugihara, K.¹, Kitamura, S.¹, Fujimoto, N., Ohta, S.¹ (¹Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Endocrine-disrupting activity in hospital sewage. *International Symposium of the Environmental Risk of Endocrine Disrupter*, Kyoto, 2005 (R, A, G)
- 3 . 浅野耕助¹，藤本成明，碓井 亞¹ (¹広島大医歯薬学総合研究科泌尿器科学) ラットエストロゲン受容体 遺伝子プロモーターの同定 (日本内分泌学会雑誌 80, 402). 第12回日本ステロイドホルモン学会，大阪，2004 (R, A, G)
- 4 . 鈴木智晴¹，藤本成明，本田浩章，太田 茂¹，北村繁幸¹ (¹広島大医歯薬学総合研究科薬学): ラット前立腺各葉における特異的遺伝子発現とそのアンドロゲン応答性 (日本内分泌学会雑誌 80, 415). 第12回日本ステロイドホルモン学会，大阪，2004 (R, A, G)
- 5 . 藤本成明，本田浩章，五十嵐勝秀¹，菅野 純¹，井上 達¹ (¹国立衛医研安全センター): エストロゲンによるラット前立腺過形成とアンドロゲン応答遺伝子発現 (日本癌学会総会記事 318). 第63回日本癌学会総会，福岡，2004 (R, A, G)
- 6 . 藤本成明，鈴木智晴¹，本田浩章，北村繁幸¹ (¹広島大医歯薬学総合研究科薬学): ラット前立腺におけるアンドロゲン応答遺伝子発現に対するエストロゲンの相乗作用 (日本内分泌学会雑誌 80, 140). 第77回日本内分泌学会学術総会，京都，2004 (R, A, G)
- 7 . 浅野耕助¹，藤本成明，碓井 亞¹ (¹広島大医歯薬学総合研究科泌尿器科学): ラットのエストロゲン受容体 遺伝子プロモーターの同定 第77回日本内分泌学会学術総会 (日本内分泌学会雑誌 80, 202). 京都，2004(R, A, G)
- 8 . Fujimoto, N., Honda, H., Kitamura, S.¹ (¹Dept. Xenob. Metab. Mol. Toxicol., Inst. Pharm. Sci., Hiroshima University School of Medicine): Cloning and characterization of the 5'-flanking region of rat estrogen receptor beta gene. *16th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Seefeld, Austria, 2004 (R, A, G)
- 9 . Miyazaki M.¹, Kawamoto H.², Kato Y.¹, Itoi M.³, Miyazaki K., Masuda K.⁴, Tashiro S.⁵, Ishihara H.¹, Igarashi K.⁵, Amagai T.³, Kanno R.¹ and Kanno M.¹ (¹Dept. of Immunology and ⁵Biomed. Chemistry, Grad. School of Biomed. Sciences, Hiroshima Univ., ²Lab. For Lymphocyte Development, RIKEN Res. Center for Allergy and Immunology, ³Dept. of Immunology and Microbiology, Meiji Univ. of Oriental Medicine, ⁴Dept. of Immunology and Cell Biology, Grad. School of Biostudies, Kyoto Univ.): Polycomb group gene mel-18 controls Notch signaling in early T progenitor expansion. *The 12th International Congress of Immunology*, Montreal, 2004.7. (R,G)

10. 宮崎和子, 宮崎正輝¹, 菅野雅元¹, 宮武昌一郎², 加藤幸夫³, 本田浩章 (¹広島大院・医歯薬・免疫, ²都臨床研・免疫, ³広島大院・医歯薬・探索医 (口腔生化)) 「 T 細胞分化における転写因子 DEC1および DEC2の機能解析」第27回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004. 12. (R, G)