

発生・分化研究部（形態発生研究室、機能分化研究室）

【研究の概要】

発生・分化研究部は、国立小児病院小児医療研究センター病理病態研究部病理研究室を母体として成立したため、本年は旧病理研究室時代の研究の多くを継続して行った。特に、糖脂質豊富マイクロドメイン/ラフトを介した刺激伝達に関する研究、G-CSFの単球に対する作用に関する研究、および細胞周期調節に関する研究が進展し、多くの研究成果が得られた。

新研究部では、初期発生から個体形成に至る細胞、器官の発生ならびに成熟機構とその異常発生機構の解明を行い、成育疾患の診断、治療に結びつく研究を行うことを目的としている。現在、小児固型腫瘍も含めた小児腫瘍の病態解明を主体としつつ、そこで得られた情報を細胞・器官の発生および成熟機構の解明に応用できる研究体制の確立を進めている。このような研究成果は必然的に各種の幹細胞あるいは前駆細胞を用いた再生医学研究にも情報を提供すると考えている。また、本研究部では、「細胞表面分子に着目し、それへの刺激が細胞機能にどのように影響し、かつその情報が疾患の診断や病態解明、細胞機能の制御にどのように応用できるか」をアプローチの基本として研究をおこなっている。

本年の構成員は、藤本純一郎(部長)、清河信敬(形態発生研究室長)、竹野内寿美(流動研究員)、田口智子(開放融合研究員)、唐巍然(開放融合研究員)、片桐洋子(重点支援協力員、平成15年1月より開放融合研究員)、鈴木恭子(共同研究員、順天堂大学医学部小児科)、塩沢祐介(共同研究員、順天堂大学医学部小児科)、吉原宏樹(共同研究員、慶應義塾大学医学部小児科)、松井淳(実験助手)、板垣光子(実験助手)、松井翼(実験助手)、曾根美恵(秘書)および山内祥子(秘書)であった。なお、機能分化研究室長は現在公募中である。

以下に、平成14年の研究内容および成果を概説する。

(1) 造血機構とその破綻の分子基盤

顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の作用解析

これまでに、ヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)トランスジェニックマウス(G-TG)の作成・解析(Lab Invest 74:384, 1996)を通じて、各種成熟血球や造血幹細胞の増加作用、immuno-modulatorとしてのアロ抗原認識免疫反応抑制作用(Blood 89:1446, 1997; Eur J Immunol 26:115, 1996)などを明らかにしてきた。

本年は、G-CSFのimmuno-modulatorとしての機能に関連して、同因子が単球に直接作用し、そのサイトカイン分泌を選択的に制御することを健常人の末梢血より分離精製した正常単球およびヒト単球系細胞株を用いて検討し、G-CSF自体は単球のサイトカイン分泌を誘導しないが、LPS刺激によるTNF- α 、IL-12の分泌を抑制しIL-10、MCP-1の分泌を増強すること、IL-8、IL-6、IL-1の分泌には影響しないことを明らかにした研究成果がExp Hematolに掲載された。また、この調節作用について、細胞内刺激伝達および発現遺伝子プロファイルの変化の観点からさらに検討中である。将来的には、骨髄移植における拒絶反応に対する治療への応用が期待される。

巨核球分化ならびに血小板産生の調節の分子機構の解析

G-TGの解析において巨核球の成熟異常を認めたことを出発点とし、G-CSFによって誘導される巨核球核多倍体化の異常の解析(Stem Cells 14:124, 1996)、ラット・マウス血小板膜糖蛋白V(GPV)特異抗体1C2の作成(Hybridoma 14:361, 1995、同19:455, 2000)、巨核球に系統づけられた段階から一

貫して発現する GPIIb と、より分化した段階になって始めて発現してくる GPV の各プロモーターの解析(Exp Hematol 28:802, 2000)、これを用いた成熟巨核球・血小板に選択的、且つ異なる分化段階で任意の蛋白を発現させるプラスミドベクターの構築、等をおこなってきた。

本年は、上記ベクターに green fluorescence protein (GFP) 遺伝子をレポーターとして挿入し、これを用いて TG の樹立を試みた。いずれの TG もすでに出生しており、GPV プロモーター+GFP を導入した TG では GFP が巨核球および血小板に特異的に発現していることが確認された。また、GPIIb プロモーター+GFP については現在解析中である。この実験系は、今後巨核球・血小板の分化機構について検討するうえで有用である。

B 細胞の増殖・分化における蛋白質リン酸化・脱リン酸化の意義

B 前駆細胞に由来する B 前駆細胞性急性性リンパ芽球性白血病(B-precursor ALL)は小児白血病の代表型である。また、初期活性化 B 細胞に由来するバーキットリンパ腫 (BL) も小児期の腫瘍として重要である。そこで当研究部ではこれらの B 細胞性腫瘍の発症機構と B 細胞分化の制御機構に関する研究として、B 細胞の刺激伝達系の特性について、特に蛋白チロシンリン酸化・脱リン酸化に着目して解析している(Blood 92:4317, 1998; Exp Hematol 28:55, 2000)。また、BL 細胞は大腸菌産生志賀毒素 (Stx) によりアポトーシスが誘導されるが、この反応に糖脂質豊富マイクロドメイン/ラフトを介する刺激伝達が関与していることを明らかにした (Exp Hematol 28:1260, 2000、他項参照)。

CD24 は B 細胞分化抗原のひとつで、B 前駆細胞から静止期 B リンパ球まで一貫して発現するが、抗原刺激による活性化に伴って消失する。初期活性化 B 細胞に由来する腫瘍である BL 細胞には CD24 陽性と陰性の症例が存在する。当研究部では、CD24 がラフトを介して細胞内へ刺激伝達し、BL 細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした (J Immunol 166:5567, 2001)。さらに、B 前駆細胞 (pro-B および pre-B) でも CD24 によってアポトーシスが誘導されることを明らかにするとともに、この刺激伝達に MAP キナーゼ (MAPK) 群が関与することを明らかにした。

本年は、CD24 誘導性アポトーシスにおける MAPK の関与についてさらに検討した。CD24 の架橋刺激により MAPK ファミリーのうち ERK、p38 MAPK が活性化するが、両者の活性化の様式は異なり、ERK は刺激後早期に弱く活性化するのに対し、p38 MAPK はこれよりも遅れてより強く活性化した。また、pre-BCR 刺激では ERK のみが強く活性化されるとともに、CD24 誘導性アポトーシスに対する抑制効果を認める。そこで、CD24 によるアポトーシスと MAPK との関係について解析するため、種々の MAPK 抑制因子 (MEK 阻害剤 PD98059、p38 MAPK 阻害剤 SC68376)、活性化因子 (p38 MAPK 活性化剤 anisomycin) の効果を検討した。この結果、CD24 誘導性アポトーシスは、ERK を抑制した場合および p38 MAPK を活性化した場合には増強し、p38 MAPK を抑制した場合には減弱することが明らかになった。以上の結果から、pre-B ALL 細胞において ERK は細胞の生存に、p38 MAPK は細胞死に、それぞれ関与すること、CD24 架橋では両者とも活性化されるものの p38 MAPK の活性化の方がより強く起こることから細胞死が誘導されることが示唆された。以上の成果は、J Immunol にアクセプトされた。Pre-BCR と CD24 はともに B 細胞の分化の調節にかかわる分子であり、両者による pre-B 細胞のアポトーシスの制御は、pre-B 細胞の段階での、クローン選択機構に関与しているものと推測される。

小児血液腫瘍の診断と情報発信

過去 16 年間にわたり、小児白血病・悪性リンパ腫のマーカー診断と病理診断に取り組んできた。その結果、関東地区におけるレファレンスラボラトリーとして認識されている。このような取り組みは研究業績としては認識されにくいだが、国立研究機関の業務と位置付けてきた。また、適宜、その成果を論文として発表してきた(Br J Haematol 96:740, 1997; Leuk Lymphoma 21:449, 1996; Blood 86:1954,

1995, など)。さらに、病理検査科の技師とともにマーカー診断の有用性について成果をまとめ共同研究として臨床検査技師関連の学会、論文に発表してきた(医学検査 47:700, 1998; 検査と技術 27:1122, 1999)。現在、日本 Langerhans Cell Histiocytosis (LCH)治療研究グループの中央診断を担当している他、藤本は日本病理学会編纂の「小児悪性リンパ腫組織図譜」の、新 WHO 分類に準拠した改訂作業に改訂小委員会委員長として参加し、2002 年 10 月発刊の「小児腫瘍組織カラーアトラス第 1 巻・悪性リンパ腫、白血病および関連病変」作成に従事した。

このような取り組みと関連するが、この 2 年間に小児血液腫瘍の病理中央診断システムの構築に大きな進歩が見られた。わが国では TCCSG(東京小児がん研究グループ)、CCLSG(小児癌白血病研究グループ)、JACLS(小児白血病研究会)、KYCCSG(九州・山口小児がん研究グループ)が小児血液腫瘍に関する代表的な治療研究グループであり、小児血液腫瘍患者の 90%以上はいずれかのグループ内で治療されている。関東地区では TCCSG が主たる組織であるが、藤本が悪性リンパ腫についての病理中央診断医となった。また、根拠に基づく医療(Evidence Based Medicine)実施の必要性が各グループで論議されるようになり、上記のグループがインターグループとして JPLSG(Japan Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group)として最近結集した。これら根拠に根ざした治療研究の推進を援助することを目的として、平成 14 年度の厚生労働科学研究費補助金・効果的医療技術の確立推進臨床研究事業の中で「小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立に関する研究」班(主任研究者:堀部敬三、国立名古屋病院小児科医長)が成立した。藤本は、「小児造血器腫瘍の病理学的診断の標準化」を分担課題として参加することになり、病理学的診断の標準化ワーキンググループ(代表)、免疫学的診断の標準化ワーキンググループ(委員)、悪性リンパ腫プロトコール作成委員ならびに班全体のコアメンバーとして参加している。病理学的診断の標準化については、血液腫瘍を専門とする病理医 8 名で構成される病理中央診断会議を設置して藤本が代表を務めている。また、病理中央事務局を国立成育医療センター研究所内に置くことが決定されている。上記の効果的医療技術の確立推進臨床研究事業では「小児肉腫に対する至適治療確立に関する研究」班も本年度成立し小児固型腫瘍についても治療研究が開始することとなったが、病理中央診断の責任者は当研究所長の秦 順一が担当している。これらの経緯は、国立成育医療センター研究所が小児腫瘍診断のわが国における拠点機関として認識されていることを示しており、国立研究機関の任務として注目される。

(2) ペロ毒素による臓器障害機構に関する研究

最近が目立った流行がないためあまり話題にはならないが、Stx 産生性大腸菌感染症は決して減少してはならず、年間発症数および死亡者数でみた場合にはむしろ増加傾向にあり、同感染症の病態解明は以前緊急かつ重要な課題である。当研究部では、旧病理研究室時代から、培養細胞を用いた基礎実験と患者検体に対する多角的な解析を通じて Stx による臓器障害機構の解明を試みている。これまでに、Stx が多様な細胞種に対して直接作用し、アポトーシスを誘導することを明らかにするとともに(Kidney Int 53:1681, 1998; J Infect Dis 178:178, 1998; 同 180:1902, 1999 等)、Stx の作用が A サブユニットの持つ RNA 切断酵素活性のみでなく、B サブユニットの結合によって細胞内への刺激伝達が誘導されることを世界に先駆けて明らかにし、その詳細の解明に取り組んでいる(次項参照)。また、この Stx B サブユニットの作用を A サブユニットの作用と独立に解析するための Stx1 B サブユニットの遺伝子組み替え型蛋白の作成と簡便な精製方法の開発や(Prot Exp Pur 22:267, 2001)、表面プラズモン共鳴(BiaCore)を用いた Stx1 と Stx2 の受容体 Gb3 に対する結合特性の比較解析等を行ってきた(J Biol Chem 276:42915, 2001)。

本年は、正常尿管上皮由来初期培養細胞(HRCEC)における Stx1 の細胞内逆行性輸送経路について解析し、一旦細胞内に取り込まれた Stx1 の一部が再生エンドゾームを經由して細胞外に排出される輸送経路が存在すること、ヌクレオシド輸送阻害剤である nitrobenzylthioinosine がこの Stx1 の細胞外への排出を促進する結果、Stx1 の細胞毒性が低下することを明らかにした論文が J Infect Dis に掲載された。以上の成果は、Stx1 の細胞傷害機構における新知見であるとともに、新規治療法開発への応用が期待される。

また、Stx1 B サブユニットの結合によって誘導される細胞内刺激伝達がどのような変化をもたらすのか検討した結果、アクチン細胞骨格の変化によって細胞形態の変化や接着性の低下が誘導されることを明らかにし、その詳細についてさらに検討を行っている。

(3) 細胞膜糖脂質豊富マイクロドメイン/ラフトを介する刺激伝達機構の研究

細胞膜糖脂質豊富マイクロドメイン/ラフトは、スフィンゴ脂質、コレステロール等の脂質に富む細胞膜中のマイクロドメイン構造で、密度勾配超遠心法によって界面活性剤不溶性分画として分離される。ラフトは多様な細胞現象にかかわることが推測されているが、様々な刺激伝達関連分子が集中して存在することから、刺激伝達の場としても重要であることが示唆されている。当研究部ではこれまでに、Stx の機能的受容体 Gb3 がラフトの構成分子であるスフィンゴ脂質のひとつであることに端を発し、ヒト尿管上皮由来腫瘍細胞株 ACHN やバーキットリンパ腫(BL)細胞を用いて、Stx の結合によってこれらの細胞に、細胞内刺激伝達が誘導されることを明らかにし、その機構の詳細や細胞死誘導との関連について検討してきた (J Biol Chem 274:35278, 1999, Exp Hematol 28:1260, 2000)。さらに、B細胞において GPI 結合型蛋白の架橋刺激によってラフトを介するアポトーシス誘導刺激が伝達されることを明らかにし、その分子機構の解析を行ってきた(前述)。また、Stx に高感受性を示す腎癌由来細胞株 ACHN より分離抽出したラフトの成分を免疫原として複数の単クローン性抗体を作成し、このうち脂質に対する単クローン性抗体がすべて同一の糖脂質 monosialosyl galactosylgloboside (SSEA-4 と同義) を認識するものであり、ラフトの脂質成分の中で、同脂質が占める割合は低いにもかかわらず、この脂質が非常に高い免疫原性を示すことが明らかにした (Glycoconj J 18:347, 2001)。

本年は、前述のラフトの成分を免疫原として作成した単クローン性抗体のうち蛋白に対する Raft.1 抗体について解析を行った。2次元電気泳動を用いた解析では Raft.1 の認識抗原は分子量 32k で、アクチンよりやや塩基性のタンパクであることが判明し、MALDY-TOF MS による解析の結果、Raft.1 が GTP 結合タンパク 1、2 鎖(G-) を認識することが明らかとなった。この結果に基づき、リコンビナント蛋白との反応性も確認した。これまでに G- 1、2 に対する単クローン性抗体の樹立については報告がなく、Raft.1 は世界初の抗体となった。ACHN 細胞では G- 1、2 は細胞膜上の他、細胞質内にフィラメント状に分布するが、ACHN 細胞に Stx を結合させると、G- は核近傍へ移行して集積することが明らかとなった。現在、この反応の Stx による細胞傷害作用あるいは刺激伝達における意義について検討中である。以上の研究成果は Lab Invest に掲載された。

(4) 免疫不全家畜の作出に関する研究

開放的融合研究「個体発生のゲノム機能と分子機構」の中で、「免疫不全家畜の作出と再生医学への応用」プロジェクトに関し、農業生物資源研究所と共同で研究を行い、これまでに、ブタの免疫機構解析への応用を目的として抗ブタ血球モノクローナル抗体を多数樹立している。この中からリンパ球に特異性の高い2クローンを選択し、種々の細胞、組織に対する反応性や、免疫沈降による抗原の分

子量の同定等の解析の結果、7G3 抗体がブタ / -T 細胞を、6F10 抗体が CD8 陽性 T 細胞をそれぞれ認識することが判明している。

本年は、7G3 陽性細胞の cDNA ライブラリーから得られたブタ TCR- 鎖の cDNA を用いてその遺伝子組換え体を作成し、7G3 との反応性を検討した。この結果、同抗体が TCR- 鎖を認識する抗体であることが分子生物学的に確認された。また、他のクローンの解析を行い、3E12 抗体がブタ / -T 細胞の亜群を認識する事が明らかとなった。

(5) 細胞周期調節の分子機構に関する研究

当研究部では、巨核球核多倍体化の分子機構の研究を出発点として、M 期の調節に関する研究を行ってきた。特に、分裂酵母のサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体 Cdc2/Cdc13 の抑制因子である rum1 がその過剰発現によって核の多倍体化と、細胞の極端な伸長による悍状化といった形態変化を起こすことから、その機能に着目した解析を行っており、これまでに 1) MAP キナーゼが rum1 を *in vitro* でリン酸化すること、2) そのリン酸化部位は Thr -13 および Ser -19 残基であること、3) 双方のリン酸化されるアミノ酸残基をグルタミン酸に置換することによって構造的に両部位がリン酸化された状態を模倣する変異体蛋白では、CDK 抑制作用が、野生型蛋白に比して著しく減弱していること、を明らかにしてきた。

本年は酵母に rum1 の野生型とリン酸化模倣型蛋白を発現させて、それぞれの細胞内における作用を検討した。酵母に野生型 rum1 を高発現させると、核の多倍体化とともに長い悍状体を示すが、リン酸化模倣型蛋白を高発現させた場合にはこの作用が抑制され、正常酵母と比較してほとんど変化が認められなかった。以上の結果は、Thr -13 および Ser -19 のリン酸化が酵母細胞内でも rum1 の活性を抑制すること、すなわち MAP キナーゼが *in vivo* でも rum1 の機能を調節していることを示唆する。また、rum1 は Cdc2/Cdc13 と結合してその機能を抑制するが、欠失変異体を用いたプルダウンアッセイの結果、Thr -13 および Ser -19 のリン酸化による rum1 の機能抑制が、Cdc2/Cdc13 に対する結合の抑制によるものでは無いことが示唆された。本研究は CDK 抑制因子の新たな機能調節機構について明らかにしたものであり、以上の成果は Eur J Biochem に掲載された。