

4-2-3 発生・分化研究部（形態発生研究室、機能分化研究室）

1. 研究体制

発生・分化研究部は、平成 14 年 3 月に部長：藤本純一郎および形態発生研究室長：清河信敬の 2 名体制で発足したが、機能分化研究室の設置が承認され、平成 15 年 5 月 1 日付けで大喜多肇が機能分化研究室長として慶應義塾大学医学部病理学教室より着任した。また、平成 15 年 6 月 1 日付けで藤本純一郎が副所長に昇任したが、発生・分化研究部長を併任する形となったため引き続き研究部の運営に当たっている。形態発生研究室では血液細胞の発生・分化と小児血液系腫瘍の発症機構に関する研究およびラフトを中心とした細胞機能の研究を、また機能分化研究室では小児固形腫瘍の特性解析とその発症機構に関する研究および初期発生における Bcl-2 関連 EAT 分子の機能解析を、それぞれ中心的な研究課題としているが、実際には両研究室が密接に協力しあって発生・分化研究部としての研究活動を行っている。以上の 3 名以外の本年度の発生・分化研究部の構成員は、竹野内寿美（流動研究員）、唐巍然（流動研究員）、田口智子（がん克服戦略リサーチレジデント）、片桐洋子（実験助手）、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。

2. 研究内容

2.1 小児がんの生物学的特徴に関する研究

2.1.1 小児血液腫瘍の増殖機序とその制御法開発

2.1.1.1 小児 B 細胞由来腫瘍

当研究部では、小児白血病の代表型である B 前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病(B-precursor ALL)の増殖機構解明と増殖制御法開発を目指し、同 ALL における pre-BCR 複合体構成分子を含む刺激伝達分子の発現特性についての検討を行ってきた(Blood 92:4317,1998、等)。また、やはり小児期に多いパーキットリンパ腫 (BL) 細胞について、細胞の生存と死を制御する刺激伝達機構における細胞膜糖脂質豊富マイクロドメイン (ラフト) の関与について明らかにしてきた (J Immunol 166:5567,2001、等)。

本年は、B 細胞分化抗原であるラフト構成分子 CD24 を介する B-precursor ALL のアポトーシス誘導と、pre-BCR によるその抑制、その調節における MAP キナーゼの関与について明らかにした研究成果が J Immunol に掲載された。

CD20 は代表的な B 細胞分化抗原であり、近年一部の成人低悪性度 B 細胞性リンパ腫に対してヒト型化抗 CD20 抗体を用いた治療が行われているが、その作用機序にアポトーシスの関与が推定されている。これに関し、BL 細胞株での CD20 誘導性アポトーシスと、これに対する他の分子の架橋刺激による修飾 (BCR, CD38, CD70 等の同時架橋により増強、逆に CD32, CD40 等の同時架橋により減弱) Caspase の活性化の調節の関与、について明らかにした研究成果が Leukemia に掲載された。CD24 や CD20 への直接的な刺激が白血病細胞にアポトーシスを誘導することは、ラフト関連分子が白血病治療における標的分子になりうることを示している。

2.1.1.2 バイオフラボノイドの遺伝子再構成作用に関する研究

年齢 1 歳未満の乳児に発症する白血病は乳児白血病と呼ばれ、高率に MLL 遺伝子の再構成が見られ、極めて治療抵抗性である。トポイソメラーゼ (Topo) II 抑制性抗癌剤の治療による二次性白血病の多くで同一の MLL 遺伝子の異常がみられることから、妊婦の Topo II 抑制物質摂取と同白血病発症との因果関係が強く示唆されている。これに関し、米国の R. Strick らが複数のバイオフラボノイド (BFN) が血液系細胞に Topo II 抑制作用を示し、MLL 遺伝子再構成を引き起こすことを報告した。BFN は日本茶やハーブ等にも豊富に含まれ、抗癌作用を持つ物質として健康食品に大量に添加されている。乳児白血病の発生頻度が東洋人に高いことを考慮すると、BFN の MLL 遺伝子再構成誘導作用の有無、乳児白血病発症との因果関係を明らかにし、妊娠中の BFN 摂取の安全性について検討することは、

小児腫瘍発症機構解明の観点にとどまらず、食品の安全性や国民の健康管理の面からも重要である。そこで培養細胞を用いてBFNによるMLL遺伝子の切断についてサザンブロット解析による追試を行い、さらに新規パートナー遺伝子との融合遺伝子の検出を含めたより詳細な解析方法として、ligation-mediated PCR法の確立を試みている。これと並行し、後述のin vitroで分化誘導したB前駆細胞を用いて、BFNのMLL遺伝子の切断について検討を開始した。

2.1.2 小児固形腫瘍の生物学的特徴に関する研究

本研究テーマは、大喜多室長が、前所属の慶應義塾大学医学部病理学教室在籍当時から継続して行っているものである。Ewing肉腫/末梢性神経上皮腫瘍群（以下Ewing/PNET腫瘍）は、小児に好発する骨軟部肉腫であり、原発性骨腫瘍としては骨肉腫に次ぐ頻度である。本腫瘍群には特徴的な染色体転座があり、EWS遺伝子とetsファミリーの転写因子とのキメラ遺伝子（EWS/FLI1, EWS/ERG, EWS/E1AF, EWS/ETV1, EWS/FEV）が形成される。病理学的にEwing/PNET腫瘍が疑われる症例の切除、生検材料よりこれらのキメラ遺伝子の発現をRT-PCR法にて同定し、塩基配列を決定した。それによって、我が国においてEwing/PNET腫瘍におけるキメラ遺伝子の発現が極めて高頻度であることを示し、そのタイプ別の頻度を明らかにしてきた。その結果、病理組織像を理解したうえで、キメラ遺伝子の同定という分子遺伝学的解析を行うことが最も確実な診断法であることを示してきた。

Ewing/PNET腫瘍の発生機序を解明するためキメラ遺伝子が転写を調節する標的遺伝子をcDNA microarray法にて探索し、HLH型分化抑制遺伝子であるId2がEwing肉腫細胞において特徴的に発現が上昇することを明らかにした。ルシフェラーゼ法によりキメラ遺伝子（EWS/FLI1, EWS/ERG, EWS/E1AF）がId2の転写を促進し、かつ、その転写促進にets consensus配列を利用していることを明らかにした。さらにクロマチン免疫沈降法によってキメラ遺伝子の産物とId2の転写調節配列がEwing肉腫細胞内で直接結合していることを示した。以上の結果から、Id2がキメラ遺伝子の標的遺伝子であり、Ewing/PNET腫瘍の発生とその生物学的態度に重要な役割を演じていると考えられた（Oncogene 22:1-9, 2003）。

上記のごとくEWS関連キメラ遺伝子の存在やその標的遺伝子の存在が明らかになりつつあるものの、それぞれが腫瘍性増殖にどのように関与するのか、そもそもEwing/PNET腫瘍の発生母地はどこなのかという課題は依然として残っている。そこで、Ewing/PNET腫瘍由来細胞株を用いて、前者についてはRNAiによるキメラ遺伝子発現抑制が細胞増殖に及ぼす効果を検討する、後者については既知の各種抗体等による網羅的発現分子解析を行い他の腫瘍と比較検討する、ことを具体的計画とし準備を行っている。

2.1.3 小児腫瘍の診断、情報発信ならびに検体保存

過去18年間にわたり関東地域の小児血液腫瘍の組織診断およびマーカー診断に関するレファレンスラボラトリーとして活動し、これまでに1600例以上の症例を解析し、その結果の蓄積を適宜論文発表で情報提供してきた（Br J Haematol 96:740, 1997, 等）。また、病院検査部の協力を得て、悪性リンパ腫を中心とする小児血液腫瘍のパラフィン切片を用いた最新マーカー診断法を確立してきた（医学検査 47:700, 1998, 等）。藤本は、日本Langerhans Cell Histiocytosis (LCH)治療研究グループの病理中央診断を担当している他、日本病理学会編纂の「小児悪性リンパ腫組織図譜」の改訂作業において中心的役割を担ってきた。

本年は未分化大細胞性リンパ腫の免疫学的、臨床的特徴に関する論文を2報報告し（Br J Haematol ; J Pediatr Hematol Oncol）未分化Bリンパ球に特異的に発現するPre-BCRの検出が前駆B細胞由来リンパ芽球性リンパ腫の診断に有用であることを示した研究成果がModern Patholにアクセプトされた。

本年、我が国における小児血液腫瘍の4大治療研究グループがインターグループとして日本小児白血病/リンパ腫治療研究グループ（Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group, JPLSG）を結成した。JPLSGは統一治療プロトコールに基づく根拠に根ざした医療を実践し、標準的治療法の確立を目指している。現在、小児白血病および悪性リンパ腫に対して複数のプロトコールが実施あ

るいは計画されている。当研究部は、JPLSG の中で病理中央診断事務局として活動することになっている。

小児固形腫瘍についても、統一治療プロトコルに基づく根拠に根ざした医療を実践し、標準的治療法の確立を目指した活動が開始されており、秦 順一研究所長が病理中央診断を担当している。現在、日本横紋筋肉腫研究グループ(Japanese Rhabdomyosarcoma Study Group, JRSG)が横紋筋肉腫に対する統一プロトコルの作成を行っているが、当研究部は横紋筋肉腫の胞巣型に認められる遺伝子変異 (PAX3-FKHR や PAX7-FKHR) 等の同定の作業を分担することになっている。

小児がんは希少疾患であり、治療成績は全体としては向上してきたが、依然として小児死因の主たるものである。また、極めて難治性の病型が存在すること、再発例の治療成績は不良であることなど、多くの課題がある。その克服には小児がんに関する基礎的研究の推進が必要であるが、そのためには小児がん組織ならびに細胞の体系的な保存システムの構築が必須である。上記の各研究グループ内でも検体保存の重要性は認識されており、血液腫瘍、固形腫瘍ともに当研究所内に検体保存設備を設置することを決めている。当研究部はその運用の責任を果たすことになる。

2.2 細胞機能制御、細胞分化制御に関する研究

2.2.1 ヒト B 細胞成熟システム構築と B 細胞初期分化解析

小児がんの研究を推進する上で、腫瘍細胞の特徴解析とその正常発生母体との比較は極めて重要であり、腫瘍細胞で特異的に起こっている現象を明らかにするのみならず、細胞系統発生、増殖および分化の調節機構の解明につながる。そこで、小児がんの中で最も頻度が高い B-precursor ALL の正常発生母体である前駆 B 細胞の成熟誘導培養系の確立とその中での機能分子探索を開始した。本年は、ヒト骨髄 CD34+細胞をマウス骨髄間質細胞株 MS-5 と共培養することにより、最終的に約 60% 程度の B 前駆細胞 (pro-B 細胞) を得ることが可能な培養系を確立した。

IGF は様々な細胞に作用する増殖因子であり、IGF binding protein(IGFBP)は IGF に結合してその機能調節を行う蛋白群である。RT-PCR 解析を行った結果 MS-5 で IGF-1 の発現を認めたため、この培養系に抗マウス IGF-1 抗体を添加したところ pro-B 細胞の誘導数が著しく減少し、この減少は遺伝子組み換え型ヒト IGF-1 の添加により回復した。抗ヒト IGF 受容体中和抗体や、ヒト IGF 受容体のキナーゼ活性抑制剤にも同様の抑制効果を認め、6 種類存在する IGFBP のうち、IGFBP3 添加で同様に pro-B 細胞の分化誘導が抑制された。以上の結果は、ヒト pro-B 細胞の分化誘導にも IGF-1 が重要であること、一部の IGFBP がこれに対する抑制作用を示すことを示唆する。骨髄間質細胞が IGFBP を産生することが報告されていることから、IGF-1 および IGFBP が B 細胞の初期分化の調節に重要な役割を担う可能性が考えられ、さらに検討中である。

2.2.2 Bcl-2 関連 EAT 分子の機能解析

本研究も大喜多肇室長が継続して行っているものである。ヒト初期胚のモデル実験系であるヒト胎児性癌細胞の分化初期に発現が上昇する遺伝子として単離された EAT 遺伝子は、bcl-2 関連遺伝子に属する。これまでに本遺伝子がマウスの線維芽細胞株においてアポトーシスを抑制することを明らかにしてきた (Jpn J Cancer Res 89:1326,1998) 。さらに、本遺伝子の個体レベルでの機能を明らかにする目的で、EF1 プロモーターによってほぼ全ての臓器で EAT を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製して解析を行ってきた。本年度は、同トランスジェニックマウスには、膵臓のランゲルハンス島の過形成が存在することを報告した (Mol Cell Endocrinol 203:105,2003) 。特にインスリンを分泌する細胞の過形成が顕著であり、生理学的検討と併せ、EAT の過剰発現が直接、膵ランゲルハンス氏島の過形成を惹起したと考えられた。EAT が培養細胞のみならず、個体レベルにおいてもアポトーシス抑制作用を有することが示唆された。

EAT 分子の機能をより詳細に解析することを目的として、現在、Cre-loxP システムを利用したコンディショナル・ノックアウトマウスを作製中である。本年度は、EAT の遺伝子座に loxP 配列を挿入したマウスの作製に成功した。

2.2.3 ベロ毒素による細胞機能修飾

平成8年の大阪府堺市での大流行に際し、当研究部では研究所内のプロジェクト研究としてこの課題に取り組み、Stxによる臓器障害機構の解明を多角的に試みてきた。特にStxの標的細胞の多様性、その細胞障害機構におけるアポトーシス誘導の関与を明らかにし、Stxの作用がA(酵素)サブユニットのRNA切断作用による細胞毒性のみではなく、B(結合)サブユニットが細胞膜上の糖脂質Gb3と結合することにより、ラフトを介する細胞内への刺激伝達を誘導す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きた。

本年は、Stx高感受性の腎癌由来細胞株ACHNを用いて、Stx1Bの結合による細胞内刺激伝達と細胞骨格系との関連に着目した解析を行った。この結果、Gb3を介する刺激伝達により、Ezrin、Paxillin、といった細胞骨格の形成にかかわる蛋白のリン酸化が起こり、この結果CD44、actin、tubulin、vimentin、cytokeratin等の細胞内局在が変化して細胞骨格の再構成が誘導され、細胞接着性の低下や仮足形成といった細胞の形態変化が起こることを明らかにした。以上の結果は、Stxの持つ作用におけるB subの役割が単に毒素の標的細胞への吸着のみではなく、細胞内刺激伝達を誘導することによって積極的に細胞に変化をもたらし得ることを示しており、Stx B subによる刺激伝達によって誘導される細胞変化の詳細や、その病態形成における意義についてさらに検討中である。今後は、ベロ毒素の作用ということに捕らわれず、ラフトを介する形態形成にかかわる刺激伝達に関する研究として展開してゆく予定である。

2.2.4 細胞膜糖脂質豊富マイクロドメイン(ラフト)の役割

ラフトは、スフィンゴ脂質(SL)、コレステロールに富む脂質で構成される細胞膜中のマイクロドメイン構造で、GPI結合蛋白、Src-型チロシンキナーゼ、G蛋白、等の刺激伝達関連分子が集中して存在することから、刺激伝達に重要な役割を担うことが推測される。当研究部では、Stxの機能的受容体Gb3がラフトの構成分子であるSLのひとつであることに端を発し、ACHN細胞やBL細胞、B前駆細胞に関してラフトを介する刺激伝達機構を明らかにしてきた(J Biol Chem 274:35278,1999)。一方、各種の細胞機能におけるラフト構造の重要性が認識されてきたが、それを構成する分子に関する情報は乏しい。我々はStx高感受性の腎癌由来細胞株ACHNより抽出したラフトを免疫原として複数の単クローン性抗体を作成し、細胞機能と関連する分子探索を試みた。1回の細胞融合から31クローンの抗体を確立し、このうち21クローンが脂質に対する抗体(ひとつのクローンをRaft.2と命名)であったが、驚くべきことにすべて同一の糖脂質、すなわちmonosialosyl galactosylgloboside(SSEA-4)を認識するものであった(Glycoconj J 18:347,2001)。本年は、ACHN由来ラフトの脂質成分の中での同脂質の割合が低いにもかかわらず、非常に高い免疫原性を示す理由に関して、抗原認識におけるラフトの特殊性という観点からマウスを用いた検討を行った。

2.3 再生医療、移植医療に関する研究

2.3.1 多能性幹細胞の分化と形態形成の分子機構

国立成育医療センターが設立され、その機能のひとつとしてヒトES細胞の樹立が国策として提言され、研究所としても、幹細胞による治療に関する研究をひとつの柱と位置付けているが、当研究部でこれまでに行ってきた細胞分化機序解明についての研究成果や技術などは幹細胞研究にも十分応用可能である。また、幹細胞を含む未分化細胞の維持、増殖、分化に関する研究は発生・分化研究部のテーマとしてふさわしい。そこで発生・分化研究部発足にともない新たな研究課題として取り組みを開始した。胎児性癌(EC)細胞はES細胞に類似した潜在的な多分化能を持つ細胞で、初期発生のモデルとして用いられる。細胞骨格は単に細胞の形態を維持するのみならず、接着に伴う細胞内への刺激伝達の足場として、細胞運動や形態変化にも重要な役割を果たす。そこで、ESおよびEC細胞の種々の条件での分化誘導に伴う細胞骨格系分子を中心とした刺激伝達関連分子発現の変化について、蛍光免疫組織染色-共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を行った結果、両者において細胞接着関連分子Fascinが特徴的に発現することが明らかになった。この発現は分化依存的であり、初期

発生における細胞の形態維持や変化において Fascin が何らかの異なる役割を担っている可能性を示すと考えられ、現在その機能的意義について検討中である。

前述のラフトを免疫原として得られた Raft.2 抗体は SSEA-4 を認識する。SSEA-4 は本来マウス EC 細胞の分化マーカーであり、最近ではヒト ES 細胞を規定するマーカーのひとつとして注目されている。そこで、マウス EC 細胞株やヒト EC 細胞株を用いて SSEA-4 の反応性を解析した結果、本来、細胞膜上に糖脂質あるいは糖蛋白として存在すべき SSEA-4 エピトープが細胞質内で特定の場所に存在することを見いだした。現在、その分子の解析を行っている。

2.3.2 免疫不全ブタ開発ならびにブタ免疫システム解析

開放的融合研究（平成 9-14 年度）から継続し、「免疫不全ブタの作出と再生医学への応用」プロジェクトを農業生物資源研究所安江博士との共同研究として行っている。このブタは免疫不全マウス等に代わる大規模ヒト細胞移植系として、再生医療モデルや各種のヒト疾患モデル作製への応用が期待される。これまでにブタの免疫機構解析への応用を目的とした抗ブタ血球モノクローナル抗体として、6F10 (CD8)、7G3 (TCR- 鎖定常部位)、3E12 (ブタ α -T 細胞亜群) 等を樹立した。本年はブタ MHC クラス I 分子を認識する抗体 4G8 を同定し、その性状解析を行った。