

## 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

本年の発生・分化研究部の構成員は、藤本純一郎(副所長、発生・分化研究部長併任)、清河信敬(形態発生研究室長)、大喜多肇(機能分化研究室長)、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(CREST)、塩沢裕介(共同研究員)、松井淳(実験助手)、板垣光子(実験助手)、大枝ゆり(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

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、特にCD24、CD20等に注目して明らかにしてきた(J Immunol 166:5567,2001、等)。

BLNKはB細胞の刺激伝達において重要な役割を担っており、その欠損がALL発症に関与している可能性が報告されている。そこで、複数のB-precursor ALL細胞株におけるBLNKの発現を検討した結果、強発現している株から、ほとんど発現していない株まで様々な発現状況が明らかになった。そこで、pre-BCRを発現するpre-B ALL株のうち、BLNK強発現株NALM-17と同欠損株HPB-NULLを用いて、pre-BCR刺激伝達系におけるBLNKの役割について検討した。この結果、抗 $\mu$ 鎖抗体によるpre-BCR架橋刺激により、細胞内蛋白のチロシンリン酸化やMAPキナーゼ系の活性化は同等に起こるものの、PLC-2および細胞質内Ca<sup>++</sup>の濃度の上昇はBLNK発現株のみで認められた。以上の結果は、BLNKがpre-BCR刺激伝達系においてPLC-2を介するCa<sup>++</sup>の濃度の上昇に重要な役割を担っていることを示している。現在、BLNKのB前駆細胞の刺激伝達における機能や、B-precursor ALLの細胞特性における意義についてさらに検討中である。以上の成果はImmunologyに掲載された。

###### 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TopoII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TopoII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。そこで当研究部では、厚生労働科学研究費の補助を受けてBFNの遺伝子再構成作用に関する研究を行った。

ヒト白血病由来培養細胞株、invitroで分化誘導したB前駆細胞や未熟骨髄球系細胞を用いた細胞培養系での検討と平行して、生体へのBFN投与によるMLL遺伝子再構成作用の評価方法としてNOD-SCIDマウスにヒト骨髄幹細胞を移植したヒト造血系再構築モデルを確立し、これを用いた解析

を行った（慶応大学病理山田博士らとの共同研究）。サザンブロット解析の結果、BFNは増殖のさかんなヒト血球系細胞でMLL遺伝子の切断を起こすが確認されたが、FISH解析では切断された同遺伝子は完全な解離はせずにそのまま近傍に存在していることが示唆され、またRT-PCR、ligation-mediated PCRで解析した範囲では他の遺伝子との再構成を確認することはできなかった。一方、以上の検討の過程で、ヒト白血病由来培養細胞株および分化誘導したヒト血球に対してBFNを添加培養すると、アポトーシス誘導が起こることが明らかとなった。このアポトーシスはさまざまな種類の白血病細胞に起こり、ミトコンドリアの膜障害やカスパーゼの活性化を伴っており、BFNの持つTopoII抑制作用以外の作用も関与している可能性が示唆された。従って、BFNは特定の血球系細胞にMLL遺伝子の切断を起こすものの、そのほとんどは遺伝子再構成を起こすことなくアポトーシスにより排除されてしまう可能性が考えられる。MLL遺伝子の再構成には単に同遺伝子が切断されるのみではなく、これに加えて別のステップが必要であると推測される。以上の成果はLeukemia Researchにin pressとなっている。

### 2.1.2 小児固形腫瘍の生物学的特徴に関する研究

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、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。さらに、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探索し、HLH型分化抑制遺伝子であるId2がキメラ遺伝子の標的遺伝子のひとつであることを報告してきた（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中である。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、CD56, CD65, CD99, CD117がEwing肉腫細胞で高発現であることが明らかにした。

### 2.1.3 小児腫瘍の診断、情報発信ならびに検体保存

過去19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1700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 Hematol 121:94-96, 2003等）。本年は、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報告した（Modern Patholに掲載）。

昨年、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が、この活動に藤本は免疫学的診断の標準化ワーキンググループ(WG)委員として、また清河は同オブザーバーおよびMRD小WG委員として参加している。現在、ALCL、乳児白血病、成熟B細胞性リンパ腫、未熟B細胞性リンパ腫のプロトコールが開始され、発生・分化研究部は、JPLSGの中で病理中央診断事務局として活動している。また、本年度から清河が責任者となってTCCSGのマーカー中央診断を担当している。

小児固形腫瘍についても、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た活動が開始されており、秦順一研究所長（現総長）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を用いた治療研究を行っているが、発生・分化研究部では大喜多が責任者となり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) の同定をキメラ遺伝子解析担当施設として担当しており、横紋筋肉腫の確定診断に貢献している。また、日本ユイグ肉腫研究グループ (Japanese Ewing Sarcoma Study Group, JESS) が、Ewing/PNET 腫瘍群に対する治療研究を準備中であり、大喜多が同腫瘍特異的キメラ遺伝子 (EWS/FLI1, EWS/ERG, EWS/ETV1, EWS/E1AF, EWS/FEV) の解析を担当する予定である。さらに、日本ウィルムス腫瘍スタディグループ (JWITS) においても遺伝子研究・検体保存を担当するために準備をしている。小児がんは年間の発生数が 2,000 名程度と希少疾患である。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、予後良好群として包含される病型の中にも再発する場合があります。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。このような課題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、固形腫瘍ともに国立成育医療センター研究所内に検体保存設備を設置することが決まっており、発生・分化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。これまでに、この培養系を用いて IGF および IGF binding protein (IGFBP) が B 細胞の初期分化の調節に果たす役割について検討した。現在は、IL-7 や oncostatin-M 等に注目した検討を行っている他、造血支持に関わる遺伝子の導入によって MS-5 の持つ造血支持能がどのように変化するか、解析を行っている。

### 2.2.2 Bcl-2 関連 EAT 分子の機能解析

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、膵臓のランゲルハンス島のベータ細胞の過形成が惹起されることを報告してきた (Mol Cell Endocrinol 203:105, 2003)。EAT 分子の機能をより詳細に解析することを目的として、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と EAT のノックアウトマウス (ヘテロ接合性) の作製に成功した。

### 2.2.3 細胞膜糖脂質豊富マイクロドメインの役割

当部では、当時、小児医療研究センター 病理病体研究部 病理研究室であった平成 8 年の大阪府堺市でのベロ毒素 (Stx) 産生性大腸菌 0157 感染症の大流行の際、研究所内のプロジェクト研究として Stx による臓器障害機構の解明に取り組んできた。この研究の過程で、Stx の標的細胞の多様性や、その細胞障害機構におけるアポトーシス誘導の関与を示し (Kidney Int 53:1681, 1998; J Infect Dis 178:178, 1998、等)、Stx の受容体 Gb3 への結合特性や細胞内への取り込みと細胞内逆行性輸送機構について解析してきた (J Biol Chem 276:42915, 2001; J Infect Dis 185:785-796, 2002)。

さらに Stx の作用が単に RNA 切断酵素活性による細胞毒性のみではなく、細胞膜上の糖脂質 Gb3 と結合することにより、糖脂質豊富マイクロドメイン（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（J Biol Chem 274:35278, 1999; Exp Hematol 28:1260, 2000、等）。発生・分化研究部へ改組後は、これまでの研究成果は細胞の発生・分化機構におけるラフトを介する刺激伝達の役割という形で継承され発展している。特にラフトを免疫原としてどのような単クローン性抗体が作製されるか検討を行い、ラフトを免疫源にすると通常では考えられないような特殊な抗原提示が行われる可能性を明らかにして、この点についてさらに検討を進めている他、三量体 GTP 結合蛋白の鎖（G）に対する Raft.1 抗体および SSEA-4 抗原を認識する Raft.2 抗体を樹立し、これを用いた検討を行っている。

一方、ヒト尿管上皮由来腫瘍細胞株 ACHN 等を用いて、Stx1 の結合サブユニットである B サブユニット（Stx1 B）の遺伝子組み替え体により Gb3 を刺激し解析する実験系は、ラフト研究におけるユニークなモデルであり、“ラフトを介する刺激伝達による細胞変化”という位置づけで、継続して研究を行っている。

昨年は、Stx 高感受性の腎癌由来細胞株 ACHN を用いて、Stx1 B 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い、Gb3 を介する刺激伝達により、Ezrin を始めとする細胞骨格の形成にかかわる蛋白のリン酸化や再構成が誘導され、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。

本年は、さらに検討を進め、この現象は抗 Gb3 抗体でも同様に誘導されること、また細胞膜上に発現する Gb3 プールの一時的な架橋で起こることを明らかにした。また、この ezrin のリン酸化および細胞内局在変化は、ラフト構造の攪乱剤 MBD や各種キナーゼの抑制剤により抑制されることから、ラフトを介して Src-PTK PI3 キナーゼ RHO-キナーゼを経て ezrin がリン酸化され、細胞膜の接着分子に結合し、そこで actin の重合が起こる、という刺激伝達経路がこの細胞骨格系の変化に関与していることが推測された。一方、PI3 キナーゼ抑制剤により ACHN 細胞を処理すると Stx1 の細胞内輸送の著しい遅延が認められた。以上の結果は、Stx1 の B サブユニットの細胞への結合が単に毒素の吸着にとどまらず、ラフトを介して細胞骨格系の変化を誘導する刺激が伝達されることを示すとともに、この刺激伝達がペロ毒素本体の細胞内輸送を促進するなどの効果により、その毒性の発揮に寄与している可能性を示す。この研究成果は、J Cell Sci に掲載された。

今後は、ペ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や細胞分化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。

## 2.3 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(FC)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。

当部では、これまでに EC/ES 細胞の分化に伴った細胞骨格系の変化を解析している他、マウス ES 細胞を骨髄間質細胞株上で血球に効率的に分化誘導する実験系について検討中である。

また、前述のように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に存在

する蛋白上にも存在することを見だし、この蛋白が laminin 結合蛋白であることを明らかにし、さらに検討中である。

### **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  $\alpha$ -T 細胞亜群)、ブタ MHC クラス I 分子を認識する抗体 4G8 等を樹立し、その性状解析を行い、Hybridoma Hybridom、Veterinary Immunol Immunopathol に論文として発表した。