

4-2-2 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

平成17年3月付けで、前部長の藤本純一郎が副所長専任となり、これに伴って清河信敬（前形態発生研究室長）が部長に昇任、さらに本年度は17年11月付けで片桐洋子（前CREST）が形態発生研究室長に着任し、機能分化研究室長の大喜多肇を加えた3名を中心とする新しい研究体制のもと、竹野内寿美（流動研究員→共同研究員→CREST）、唐巍然（流動研究員、3月まで）、宮川世志幸（流動研究員、4月より）、北村紀子（流動研究員、5月より）、田口智子（がん克服戦略リサーチレジデント）、塩沢裕介（共同研究員）、松井淳（実験助手）、板垣光子（実験助手）、山内祥子（秘書）が研究活動を行った。

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B細胞性腫瘍の増殖機序とその制御法開発

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-prec ALL)はB前駆細胞に由来する。一方、やはり小児期に多いバーキットリンパ腫(BL)は初期活性化B細胞に由来する。当研究部では、両者のB細胞性腫瘍の増殖機構解明と増殖制御法開発を目指し、患者検体ならびに細胞株を用いた解析を行ってきた。これまでに、双方のB細胞特異的な刺激伝達機構について解析してきた他、ラフト（後述）に着目したアポトーシス誘導機構の解析を行ってきた(Exp Hematol 28:1260, 2000; J Immunol 166:5567, 2001; 同 170:252, 2003; Immunology 112:575, 2004, 等)。

本年度は、ラフトを介する新規B細胞増殖制御因子探索の目的で、B前駆細胞株から抽出したラフト構成成分を免疫原とした単クローン抗体作成を行った(岡山大学薬学部中尾浩史博士との共同研究)。pre-B細胞株NALM-6のラフト成分を用いて、細胞表面に反応する抗体1クローンと細胞質内に反応する抗体5クローンをそれぞれ樹立し、各抗体の性状解析を行っている。これまでに、細胞表面と反応する抗体はB-prec ALL細胞株の中の特定の株とのみ反応することが明らかになっており、認識抗原の同定を進めている。

また、バイオフィラノイド(BFN)は日本茶やハーブ等に豊富に含まれており、抗癌作用を持つ物質としていわゆる健康食品に大量に添加されている他、MLL遺伝子再構成誘導作用を持つ可能性も指摘されていることから、当部では、小児B細胞性腫瘍に対するBFNの作用についての解析を行っている。本年は、BFNがB細胞性腫瘍細胞株にアポトーシスを誘導すること、またその分子機構について解析を行った研究成果がLeukimia Resに掲載された。

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)。また、既知の各種抗体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なってきた。

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腫瘍の発生地母地はどこのかという課題は依然として残っている。そこで本年度は、種々のEWS関連キメラ遺伝子を発現する

Ewing/PNET 腫瘍由来細胞株を用いて、テトラサイクリン(Tet)による RNAi 発現誘導によってそれぞれのキメラ遺伝子をノックダウンする実験系を確立した。また、Ewing/PNET 腫瘍の発生母地の候補と考えられている間質系幹細胞の性格を有する UET13 細胞を用いて、Tet によって各 EWS 関連キメラ遺伝子を発現誘導する実験系を合わせて確立した(生殖医療研究部との共同研究)。現在これらの実験系を用いて、EWS 関連キメラ遺伝子が Ewing/PNET 腫瘍の発症あるいは細胞特性の獲得において果たす役割について解析を行っている。

2.1.3 小児腫瘍の診断、情報発信ならびに検体保存

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。全体的な治療成績は向上してきたが、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組織ならびに細胞の体系的な保存システムと、これを活用した基礎研究の推進が必要である。

我が国における小児血液腫瘍の治療研究は4つの大きなグループに分かれて行われてきたが、最近これら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、統一治療プロトコールに基づく根拠に根ざした医療の実践、標準的治療法の確立を目指すこととなった。当部は、これまでも、過去 20 年以上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のレファレンスラボラトリーとして活動し、最新の診断技術の確立に勤めるとともに、検査結果の蓄積を適宜論文発表することで情報発信を行ってきたが、上述のような小児血液腫瘍治療研究の再編の動きの中で、より重要な役割を担うこととなった。本年度より、東京小児がん研究グループ(TCCSG)のマーカー中央診断および検体保存施設としての活動を開始し、年間 150 例以上の白血病検体のマーカー診断と細胞保存を行った他、JPLSG の中では乳児白血病検体の保存施設、また藤本副所長ならびに中川病院検査科医長との連携によるリンパ腫検体保存施設としての役割を担っている。また、清河は免疫学的診断の標準化 WG にオブザーバーとして参加している。

一方、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 (Japan Rhabdomyosarcoma Study Group, JRSG) が横紋筋肉腫に対する統一プロトコー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、日本ユウイング肉腫研究グループ (Japan Ewing Sarcoma Study Group, JESS)においても、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)の解析を担当している。両グループでは、診断用に採取された検体の余剰分を組織バンクとして保管し、将来のトランスレーショナルリサーチに役立てる予定である。さらに、日本ウィルムス腫瘍スタディグループ (JWiTS)においても大喜多が委員として参加し、遺伝子研究あるいは検体保存を担当するために準備をしている。また、日本神経芽腫研究グループ (Japan Neuroblastoma Study Group, JNBSG)においても、検体センター、組織バンクとしての機能を担うべく準備中である。

2.2 細胞機能制御、細胞分化制御に関する研究

2.2.1 ヒト正常血球成熟システム構築とその解析

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。そこで当部では、小児がんの中で最も頻度が高い B-pre 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おこなっている。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)を得ることが可能である。これまでに、この培養系を用いて IGF-1 および IGF binding

protein (IGFBP)の作用について検討し、ヒト pro-B 細胞の分化誘導に対して IGF1 および IGFBP-6 が重要であること、逆に IGFBP-3 が抑制的に作用することを明らかにした (Exp Hematol, in press)。本年度はさらに、IL-7 や oncostatin-M 等に着眼した検討を行った他、Jagged-1 等の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、解析を行った。

一方、間質細胞株を用いずに、造血細胞を維持、分化誘導する培養系についても検討を行っている。本年度は、骨髄 CD34+細胞から分化誘導した単球系細胞の in vitro の実験における有用性について検討し、骨髄 CD34+細胞を IL-3, IL-6, M-CSF, GM-CSF, Flt3-L のサイトカインカクテルを添加した液体培養により単球系細胞を効率的に分化誘導できることを明らかにするとともに、得られた細胞には未熟単球と考えられる浮遊系の細胞と成熟マクロファージと考えられる接着系細胞が含まれていること、培養期間やサイトカインのコンビネーションを変化させることにより異なるサイトカイン分泌能を示す分画を得られることを明らかにした。また、接着因子を培養プレートに固相化することによって支持細胞を用いずに造血細胞の増殖、分化を誘導する細胞培養系の構築に関する検討を開始しており、ALCAM と Flt-3 の組合せによってマクロファージ系細胞が、また Fibronectin と SCF, IGF, IL-9 の組合せによって巨核球前駆細胞が、それぞれ効率的に分化誘導、増殖支持されることが明らかにし、さらに詳細な検討を行っている。

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 α プロモーターによってほとんど全ての臓器で EAT を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した結果、この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が明らかとなった。特にインスリンを分泌する β 細胞の過形成が顕著であった。血液中のインスリン値が上昇傾向にあり過形成となった β 細胞は機能を有することが判明した。本マウスにグルコース負荷によるインスリン耐性試験を行ったところ、インスリン耐性は正常と考えられた。従って、この過形成は、インスリン耐性によってではなく、EAT の過剰発現によって直接、惹起された可能性が高いと考えられた。以上の結果から、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し、膵ランゲルハンス島の過形成を惹起していることが示唆された (Mol Cell Endocrinol 203:105, 2003)。そこで、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の作製を開始し、昨年までに 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。

本年度は、5.5 日胚以降に胚盤葉上層由来細胞において Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスと EAT loxP マウスを交配することにより EAT を胚盤葉上層由来の細胞全てでノックアウトした。同マウスは、胎生 12.5 日目頃に死亡すると考えられた。同マウスでは、循環器系の形成不全が認められ、神経上皮及び間葉細胞に顕著なアポトーシスの増加が観察された。それらによる器官形成不全が死因と考えられた。さらに詳細に、本分子の器官形成過程における機能を解析している。

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、O157 等の腸管出血性大腸菌が産生するベロ毒素 (Stx) の細胞作用研究に端を発し、細胞膜上の機能的構造である細胞膜糖脂質豊富マイクロドメイン (ラフト) に関する研究を展開してきた (J Biol Chem 276:42915, 2001; J Infec Dis 185:785-796, 2002, J Cell Sci 117:3911, 2004, 等)。近年はラフトを免疫原とした単クローン抗体の作製を通して、ラフトの機能解析を試みており、ヒト腎癌由来細胞株 ACHN のラフトを免疫することにより、二つのユニークな抗体、すなわち三量体 GTP 結合蛋白の β 鎖 ($G\beta$) を認識する Raft.1 抗体および SSEA-4 抗原を認識する Raft.2 抗体を樹立した。

これらの抗体の樹立を通して明らかになったのは、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があること、すなわち① (通常は抗体ができにくいと考えられる) 一次構造が種を超えて高度に保存されている分子に対しても抗体が産生されること、② 特定の細胞から調製したラフトでは 1 種類の糖脂質を認識抗原とする monospecific な抗体の産生が誘導されること、③ 同

分子に対する抗体でも従来の免疫法とは異なる糖鎖構造エピトープを認識する抗体が産生されること、④syngenic strain 由来の細胞から調製したラフトに対しても抗体価が上昇すること、である。そこで、ラフトの免疫原としての特殊性に関する検討を開始した。Balb/c マウスに syngenic myeloma である P3U1 細胞を接種すると、腫瘍を形成する。ところが、抽出した P3U1 のラフト成分をあらかじめ免疫してから P3U1 細胞を接種したところその増殖が完全に押さえられた。また、C57BL/6 マウスと syngenic T lymphoma である EL4 細胞の組合せでも、同様の効果が得られた。以上の結果はラフト免疫による抗腫瘍活性の誘導効果を示すと考えられ、この点に着目してさらに検討を進めている。

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

ヒト胚性幹(ES)細胞の樹立とこれを用いた再生医療研究の推進は、国立成育医療センターの重要な使命の一つとして位置付けられている。当研究部でも、これまでに行ってきた細胞分化機構に関する研究の成果や技術を応用して、多能性幹細胞の未分化性維持、増殖、分化に関する研究を行っている。これまでに胎児性癌(EC)細胞/ES 細胞の分化に伴った細胞骨格系の変化を解析してきた他、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を行っている。

また、ラフトを免疫原として樹立した Raft.2 抗体が多能性幹細胞のマーカーである糖鎖 SSEA-4 を認識することに端を発し、EC 細胞株での SSEA-4 の発現について解析した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた反応部位の詳細な検討、免疫沈降、二次元電気泳動、MALDI-Qq-TOF MS/MS 解析等を行った結果、Raft.2 抗体がマウス EC 細胞 F9 の細胞質内に発現する 34/67 laminin receptor (laminin binding protein, LBP) を認識していることが明らかになった(Biochem Biophys Res Commun)。以上の結果は、これまで細胞膜糖脂質上のみが存在すると考えられてきた SSEA-4 エピトープが、細胞質内蛋白上にも存在することを示している。また、細胞外マトリックスである laminin は初期発生に重要な役割を担っていることから、LBP 上に SSEA-4 エピトープが存在することは、従来単に分化マーカーという位置付けであった SSEA-4 抗原が、初期発生において何らかの機能を果たしている可能性を示すものと考え、この点についてさらに検討を進めている。

2.3.2 造血幹細胞を用いた慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療推進のための基盤研究

本年度から、センター全体で推進する高度先駆的医療の手始めとして、慢性肉芽腫症に対する遺伝子治療プロジェクトが開始され、発生・分化研究部では遺伝子治療臨床研究実施に向けての基盤研究の一部を担当することになった。本年は、実際に治療で使用する予定の gp91 遺伝子導入用ウイルスベクターを用いて、骨髄 CD34 細胞への感染実験を行い、gp91 遺伝子の導入を受けた同細胞が、in vitro で成熟好中球に分化することを確認した。今後は、より効率的な遺伝子導入の条件設定や、gp91 遺伝子の導入を受けた造血幹細胞の in vitro および in vivo での特性解析を行うことで、本プロジェクトの推進に貢献していく予定である。