

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

部長 清河信敬、形態発生研究室長 片桐洋子、機能分化研究室長 大喜多肇が中心となり、流動研究員、共同研究員、総勢約 10 名が研究活動を行った。研究所内外の各研究グループとの共同研究も積極的に推進した。すべての研究テーマは部長と室長の協議により決定し、室長が各構成員の日常的な研究を指導する体制を取っている。月に 1 度全員参加の定例会議を開催し研究実施状況、実験計画、学会報告・論文作成計画などを検討する。また、部長と室長は頻りに討議し、具体的研究計画の立案、研究の方向性の修正を行っている。各テーマは、相互の密接な関連性を持たせ全体として有機的に統一された研究の遂行を目指している。以上のように、部長および室長が協力しあい、ほぼすべての研究課題の推進にかかわっているが、機能分化と形態発生の両研究室は、それぞれの研究テーマの違いに加えて、分子生物学と生化学・細胞生物学的手法をそれぞれの特色とし、個性ある研究の推進を目指している。

2. 研究内容

2.1 小児がんのトランスレショナルリサーチ

2.1.1 小児腫瘍の生物学的特徴に関する研究

2.1.1.1. Ewing 肉腫/末梢性神経上皮腫瘍群 (Ewing/PNET 腫瘍) の特性解析研究

小児に好発する骨軟部肉腫 Ewing/PNET 腫瘍には特徴的な染色体転座があり、EWS 遺伝子と ets ファミリー転写因子とのキメラ遺伝子 (EWS-FLI1, -ERG, -E1AF, -ETV1, -FEV) が形成される。これまでに、本邦の同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やそのタイプ別の頻度を明らかにし、キメラ遺伝子の同定が最も確実な診断法であることを示した。EWS-ets キメラ遺伝子が転写因子として作用し helix-loop-helix motif を有する Id2 を標的遺伝子とすることを明らかにし、Ewing/PNET 腫瘍の発生や特性における重要性を示してきた (Oncogene 22:1-9, 2003)。さらに、Ewing/PNET 腫瘍の発生母地の候補である間質系幹細胞の性格を有する UET13 細胞を用いて、テトラサイクリン誘導性に各 EWS 関連キメラ遺伝子を発現誘導する実験系を確立した。

本年は、UET13 細胞に EWS/ETS キメラ遺伝子を発現させた際の形質変化について詳細に検討した。EWS/ETS の発現により骨髄間質細胞様の紡錘状形態が Ewing/PNET 腫瘍様に類円形ないし短紡錘形に変化し、網羅的発現プロファイリングでは遺伝子発現が骨髄間質細胞から Ewing/PNET 腫瘍のパターンに近づく傾向を認めた。キメラ遺伝子によって発現調節を受ける標的遺伝子候補約 400 個を絞り込んだところ、Id2 の他 Nkx2.2、c-Myc など過去に EWS/ETS の標的とされている遺伝子の多くに加え未報告の標的遺伝子候補が含まれており、新規診断マーカー、治療標的遺伝子を探索中である。

2.1.1.2 小児腫瘍の分子特性解析研究

本年から、小児腫瘍の保存検体を用いた網羅的な発現分子解析や特定分子の腫瘍における発現様式と病態における意義に関する検討を開始した。

代表的小児白血病である B 前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病 (B-prec ALL) と T 細胞性 ALL (T-ALL) に対するマイクロアレイを用いたゲノム構造解析に着手した。高感度アレイ CGH による T-ALL 解析では、10 例の解析を終了した時点で、未報告の領域での微小欠損や増幅を多数見出し、病態に関連する新規ゲノム異常が含まれている可能性がある。B-prec ALL については SNP チップを用いた解析を開始し、H19 年中に 200 例の解析を終了予定である。白血病以外的小児腫瘍症例の検体についても解析の準備中である。

糖鎖は、第 3 の生命の鎖と呼ばれ、腫瘍においてもその機能の重要性が今後一層明らかになると予想される。当部では、マススペクトロメトリーを用いた小児腫瘍の網羅的発現糖鎖解析研究に着手した。これは新しい解析技術であり、現在代表的な小児腫瘍の細胞株を用いて、検出系開発のた

めの基礎実験を行っており、確立され次第小児腫瘍の保存検体の発現糖鎖解析に着手する。これと並行し、糖鎖プライマー法による培養細胞の発現糖鎖研究に着手した。この技術は、糖鎖合成前駆体を培養細胞に与え、細胞内でこの前駆体に糖鎖伸長をさせた後、培地中に分泌された大量の糖鎖を回収する方法であり、構造解析が容易である。現在、神経芽腫、リンパ腫、白血病の細胞株を用いた検討を行っている。

今後は以上のような小児腫瘍の網羅的分子解析を積極的に行っていく。数年内に多くの有用な情報が得られるものと期待され、将来的に発現遺伝子情報を合わせたデータベースを構築し、小児腫瘍のトランスレショナルリサーチへの活用を目指す。

granulysin (Gln) はNK細胞や細胞傷害性T細胞が産生する toxic granule の一種で、標的細胞への apoptosis 誘導作用により、抗菌や抗腫瘍効果（腫瘍に対する自然免疫）の一端を担う。成人腫瘍で腫瘍組織中の Gln の発現量と予後との関連の報告があることから、小児悪性リンパ腫 (NHL) 組織での発現につき定量 RT-PCR により検討したところ、亜型により Gln 発現に差を認め、全身性未分化大細胞性リンパ腫 (ALCL) では高発現であったが、Burkitt リンパ腫 (BL) ではほとんど発現を認めなかった。ALCL では腫瘍組織中へのNK/細胞傷害性T細胞の浸潤が強い可能性と ALCL 細胞自体にも Gln が発現している可能性が示唆され、検討中である。予後との関連について検討することにより、新たな予後予測法、治療法開発への応用が期待される。

2.1.2 小児腫瘍の中央分子診断、検体保存ならびに情報発信

成育医療センターは、JPLSG、TCCSG、JRSG、JESS、JWiTS、JNBSG 等の小児腫瘍治療研究グループと連携し、全国レベルでの小児腫瘍の中央病理分子診断、検体保存の中心的役割を担っており、当部もその多くの部分を担当している。

本年は、ALL 症例 160 例の中央マーカー診断と検体保存、リンパ腫症例 20 例のマーカー診断と同 43 例の検体保存、Ewing 7 例、横紋筋肉腫 18 例、ウイルス腫瘍 12 例の遺伝子診断と組織保存を行った。AML の中央診断と検体保存も年末に開始された。また、各種小児腫瘍の分子診断法の標準化や精度管理法について検討しており、小児白血病の 4-カラーデジタルフローサイトメトリーによるマーカー診断法や、Ewing 肉腫、胞巣型横紋筋肉腫、ALCL 等に特徴的なキメラ遺伝子の RT-PCR 検出法についてすでに整備を完了し、さらに検出感度向上のための検討を行っている。新たな検査法開発にも着手しており、ホルマリン固定パラフィン切片を用いた Chromogenic in situ hybridization 法による神経芽腫の MYCN 遺伝子増幅検出法の検討、Wilms 腫瘍の WT1 等の遺伝子変異を PCR-sequencing により網羅的に解析して診断や予後予測に応用する検討を行い、全く新たな発想による診断法としてマススペクトロミーによる異常遺伝子産物の検出、診断法の開発に着手した。将来的に、前述の保存検体に対する分子特性解析の成果を新規診断法に応用することを視野に入れている。

2.2 細胞分化、細胞機能の制御機構に関する研究

2.2.1 造血細胞の分化成熟機構解析と小児血液腫瘍の増殖制御法開発

血球成熟機構について、特に B 細胞分化に着目し、ヒト造血幹細胞の液体培養系解析、骨髄間質細胞との共培養系による B 前駆細胞の分化誘導について検討してきた。また、分化誘導した B 前駆細胞や、種々の B 細胞腫瘍株を用いて、その増殖制御機構についての基礎研究を行い、B 細胞の特有の刺激伝達系や、アポトーシス誘導における細胞膜糖脂質豊富マイクロドメイン (ラフト) 機能について明らかにしてきた (Exp Hematol 28:1260, 2000; J Immunol 166:5567, 2001; 同 170:252, 2003; Immunology 112:575, 2004, 等)。

本年は、骨髄間質細胞株との共培養によるヒト骨髄幹細胞から B 前駆細胞 (pro-B 細胞) を分化誘導する系での IGF-1、IGF binding protein の作用に関する検討が Exp Hematol に掲載された。また、IL-7 や oncostatin-M に着目した検討を継続している。

ヒト骨髄幹細胞をサイトカインカクテル添加液体培養系で増幅する系を用い、放射線照射による遺伝子発現変化について網羅的に解析した。放射線照射により細胞周期チェックポイントや細胞傷

害修復機構関連遺伝子に加え、様々なサイトカインやケモカイン遺伝子が発現上昇していることが明らかになった。この結果は、放射線被曝に対する造血幹細胞の積極的な修復反応を反映するものと考え、検討中である。

臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法の実用化研究の一環として、臍帯血から誘導した活性化Tリンパ球の特性を、末梢血由来のものと比較した。網羅的発現遺伝子比較解析の結果、両者のサイトカイン発現が遺伝子レベルで大きく異なることが明らかになり、機能との関連を含め検討中である。

B-cell activating factor (BAFF)はTNFファミリーサイトカインで、成熟B細胞の生存や腫瘍発生に関与する。同受容体(R)とラフトの関連に着目して成熟B細胞性腫瘍株で検討した結果、B細胞抗原受容体やCD20等ラフト関連刺激伝達系を介するアポトーシス誘導に対し、BAFFRの活性化は拮抗的に、抑制は相乗的に作用することが示唆された。双方の刺激伝達系のクロストーク機構解明によって新規B細胞性腫瘍増殖制御法開発への応用が期待される。また、B前駆細胞/腫瘍におけるBAFFRの発現は明らかではないが、一部のB-prec ALL細胞株にその発現を認めたため、同ALLのBAFFR機能についても検討中である。

ラフトを介するアポトーシス誘導シグナル回路解析の一端として、B前駆細胞株NaIm6から調製したラフトを免疫原に単クローン抗体を樹立し性状解析を行っている。このうち2E6抗体は、NaIm6、NaIm16、KM3、BALM18等一部のB細胞腫瘍株にのみ反応し、その他の血液腫瘍株や正常血球とは全く反応しない。本年は、この抗体がB-prec ALLの代表的抗原CD10に反応することを明らかにした。しかし、CD10自体は大部分のB前駆細胞株に発現しているため、この抗体はCD10の中でも特殊な抗原構造を有するもののみを認識する可能性があり、この特殊性が糖鎖構造にかかわるものではないかと考え、検討中である。

Ebstein Barr virus (EBV)感染によるB細胞の増殖、細胞死制御への影響について解析した。EBV感染、非感染のBL細胞株について網羅的遺伝子発現の比較解析を行い、EBV+株で特徴的に発現上昇、低下している遺伝子群を抽出したところ、上昇を認めた遺伝子群の中に細胞周期チェックポイントに関わる分子が含まれていた。EBV感染による不死化のメカニズムにはチェックポイント刺激伝達系の修飾が関与することが報告されているが、この修飾が遺伝子発現レベルでも起こっている可能性が考えられ、解析中である。

バイオフィラボノイド(BFN)は日本茶やハーブ等に豊富に含まれ、抗酸化作用等を持つため健康食品として市販されている。これまでにBFNの血液系細胞に対するTopo II抑制作用とMLL遺伝子再構成誘導、乳児白血病発症への関与に関する研究の過程でflavone等、種々のBFNがB細胞腫瘍株にアポトーシスを誘導することを報告した(Leukimia Res 29:573, 2005)。本年は、この分子機構について解析し、BFNがPh1陽性の様々なタイプの白血病細胞株にカスパーゼ3の活性化を伴うアポトーシスを誘導すること、これに先立って細胞内蛋白に一過性チロシンリン酸化の増強が起こることを見出した。このチロシンリン酸化に伴う刺激伝達がアポトーシス誘導に関与している可能性を考え、検討中である。

BFNの一種である大豆イソフラボンはホルモン様作用を示すため、その過剰摂取は逆に人体に悪影響を及ぼすとして、妊婦や乳幼児は食事以外の摂取は控えることが食品安全委員会により推奨された。そこで、大豆イソフラボンの主成分の一つgenisteinの作用について検討し、妊娠マウスへの投与により出生してきた仔マウスに軽度造血抑制を認めた。胎児造血系に対する作用についてさらに解析中である。

2.2.2 発生・分化におけるBcl-2関連EAT分子の機能解析

EATは、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bcl-2関連遺伝子で、これまでに本遺伝子がマウス線維芽細胞株にアポトーシスを抑制することを報告した(Jpn J Cancer Res 89:1326, 1998)。さらに、個体レベルでの機能解明を目的に、全臓器でEATを過剰発現するトランスジェニックマウス(TG)を作

製し、膵臓におけるインスリン分泌細胞を主体とするランゲルハンス島の過形成を明らかにし、EAT が膵ランゲルハンス島にアポトーシス抑制効果による過形成を惹起していることを示した(Mol Cell Endocrinol 203:105, 2003)。そこで、さらに詳細な機能解析を目的に、Cre-loxP システムを利用し、5.5 日胚以降に胚盤葉上層由来細胞全てにおいて EAT をノックアウトしたマウスを作製し、このマウスが胎生致死となることを示した。

本年は、胎生致死の原因を明らかにする目的で、同マウスの胎児を週数ごと詳細に解析した結果、胎生 9.5 日目まではほぼ正常な形態を示すが、胎性 10.5 日目より神経上皮及び間葉の細胞死の増加が観察され、さらに循環器系形成不全や脳低形成を伴い、12.5 日目頃までに死亡することが判明した。免疫組織化学、in situ hybridisation 等により、本分子の器官形成過程における機能を解析中である。

2.2.3 細胞機能におけるラフトの役割についての解析

当部では、ペロ毒素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ラフトに関する研究を展開してきた(J Biol Chem 276:42915, 2001; J Infect Dis 185:785-796, 2002, J Cell Sci 117:3911, 2004, 等)。ラフトを免疫原とした単クローン抗体の作製を通じたラフトの機能解析を試み、ヒト腎癌細胞株のラフトの免疫により、三量体 GTP 結合蛋白 鎖を認識する Raft.1 抗体、sialylGb5/SSEA-4 抗原を認識する Raft.2 抗体を樹立した。

上記抗体樹立過程で、ラフトを免疫源にすると特殊な抗原提示が行われる可能性があること、すなわち一次構造が種を超えて高度に保存されている抗体ができ難い分子に対しても抗体が産生され、特定の細胞から調製したラフトでは単一の糖脂質を認識抗原とする monospecific な抗体の産生が誘導され、同じ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、同系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、が示唆された。アジュヴァントとの混合が不要であることから、ラフト免疫法は抗腫瘍免疫療法に応用可能と考え、腫瘍細胞のラフトをマウスに免疫し、その腫瘍細胞に対する宿主マウスの拒絶能を検証した。これまで、腫瘍形成を認める Balb/c マウスと骨髄腫 P3U1 細胞、C57BL/6 マウスと T リンパ腫 EL4 細胞の組合せについて、細胞のラフトをあらかじめ免疫してから細胞を接種すると腫瘍形成が完全に抑制されることを確認した。

本年は、マウス腫瘍拒絶、転移実験に汎用される C57BL/6 マウスと悪性黒色腫 B16BL6 細胞の組合せで同様の効果が認められることを確認し、この抗腫瘍効果の分子機構について検討した。EL4 細胞のラフト免疫は同細胞の主な糖脂質 GD2 を始めとしてラフト成分に対する抗体の産生を誘導するが、B16BL6 細胞のラフトを免疫しても必ずしも抗体価は上昇しないので、ラフト免疫の抗腫瘍効果は単に抗体依存性ではないことが示唆された。ラフト免疫を受けても膵臓内 NK 細胞の細胞数増加や IFN- γ 産生上昇はみられず、NK 細胞による非特異的腫瘍細胞傷害は否定的であった。一方、異種腫瘍細胞のラフト接種では抗腫瘍効果はみられなかったため、ラフト免疫による抗腫瘍効果は抗原特異的と考えられた。ラフト免疫の分子基盤についてさらに検討中である。

2.3 再生医療、遺伝子治療に関する研究

2.3.1 多能性幹細胞の分化と形態形成の分子機構解析

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。当研究部では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や、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している。また、マウスおよびヒト EC 細胞株での SSEA-4 の発現について詳細に解析した結果、同エピトープが、細胞質内蛋白 34/67 laminin receptor (laminin binding protein) 上にも発現することを示した(Biochem Biophys Res Commun, 332:1004, 2005)。この結果は、これまで細胞膜糖脂質上のみ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、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果たしている機能を解明す

る糸口として期待される。

ヒト ES 細胞の特性やヒト胚発生分子機構における SSEA-4 の機能解明には、その検出ツールが必須であるが、従来標準的に使用されている抗 SSEA-4 単クローン抗体は実験ツールとして特異性や染色性において十分とは言えない。本年は、ヒト EC 細胞 NCR-G3 を免疫原として樹立され、ヒト EC 細胞、精原細胞、卵母細胞等と反応するマウス IgG3, 単クローン抗体 6E2 が、SSEA-4 を認識することを明らかにし、その性状解析を行った。6E2 抗体は抗原特異性、反応性にすぐれ、直接蛍光標識可能であり、未固定のマウス着床前胚の染色が可能であった。共焦点レーザー顕微鏡での観察の結果、SSEA-4 が割球の界面域に集中的に局在することを示した。6E2 抗体の今後の汎用や初期発生研究への貢献、これまで不明であった SSEA-4 の機能解明の進展が期待される。

2.3.2 造血幹細胞を用いた遺伝子治療推進のための基盤研究

センター全体で推進する高度先駆的医療の魁として、慢性肉芽腫症に対する造血幹細胞を用いた遺伝子治療プロジェクトが開始されているが、発生・分化研究部はその基盤研究の一部を担当している。

本年は、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入法について、当センターにおけるより効率的な条件の設定を完了し、コロニーアッセイを用いて実際に治療で使用するベクターでの gp91 遺伝子の導入効率を確認した。レトロウイルスベクター導入には細胞が分裂することが必須で、造血幹細胞への導入の場合はサイトカインを添加して一定期間培養するが、この間、幹細胞としての多分化能を最大限維持しつつ、細胞を増殖させなくてはならず、そのためのサイトカインカクテルには様々なものが報告されているが、評価は定まっていない。そこで、SCF, Flt3L, TPO の三者を基本とし、1) IL6+IL6R, 2) IL3 をそれぞれ加えた場合のレトロウイルス感染効率、未分化性の維持、細胞増殖、等の効果について比較した結果、前者の方が全体の導入効率に加えて、より未分化性が維持されている CD34+CD133+細胞への導入効率もやや高かった。現在、免疫不全 NOG マウスへの移植系を用いて、それぞれのカクテルの未分化性維持に対する効果を機能的に検討しており、本プロジェクトの推進のみならず、今後行われる予定の他の先天性疾患に対する遺伝子治療にも大いに貢献できると考えている。