

## 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

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討議している。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、その修正などの検討を加えている。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、双方の研究室は、それぞれの研究テーマの違いに加え、機能分化研究室は分子生物学手法による臨床検体を用いたトランスレーショナルリサーチ中心、形態発生研究室は生化学-細胞生物学的手法を用いた基礎研究中心、というそれぞれの特色をより明確にして、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ーショナルリサーチ

##### 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-ets; 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葉系幹細胞の性格を有するUET-13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（UET-13-EWS-ets）を確立し、EWS関連キメラ遺伝子が、間葉系幹細胞にEwing/PNET腫瘍様の形態変化、遺伝子発現プロファイリング変化を誘導することを示した。

本年は、同実験系の解析を更に進め、EWS/etsキメラ遺伝子の発現が間葉系幹細胞の浸潤能を増加させることを示した（Mol Cell Biol 印刷中）。さらに、Ewing/PNET腫瘍、神経芽腫、横紋筋肉腫の小児固形腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、Ewing/PNET腫瘍に特徴的に発現する遺伝子群を同定した。その中でWnt signalに関与するDickkopf-2（DKK-2）に着目し、同遺伝子がEwing/PNET腫瘍に特徴的に発現が高いこと、Luciferase assayにより、EWS/etsキメラ遺伝子により同遺伝子の転写調節領域が活性化されること、その活性化は、DKK-2の上流にある複数のets binding siteを介していることを示した。また、上記、UET-13-EWS-etsを用いて、EWS-etsによってDKK-2の発現が上昇することを示した。これらの結果から、DKK-2は、EWS-etsキメラ遺伝子の標的遺伝子の一つであることが示唆された。現在、DKK-2のEwing/PNET腫瘍発生における機能を解析中である。

##### 2.1.1.2 小児腫瘍の分子特性解析研究

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行なっている。本年は、小児白血病の臨床検体を中心に、SNPチップを用いたゲノム構造解析を行なった。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）144例、T細胞性ALL（T-ALL）63例、成熟B細胞性白血病/リンパ腫（B-ALL/NHL）32例の検索を終了し、現在その結果を解析中である。B-prec ALLでは、海外の報告と一致したゲノム構造異常の集積点以外に、未報告の領域での微小欠損や増幅を見い出しており、この中には人種

差等に起因する新たな異常が含まれている可能性がある。T-ALL や B-ALL/NHL についてはこれまで小児での詳細な報告がなく、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。今後、さらに症例数を増やして解析を進めるとともに、解析結果のデータベース化を図る。また、白血病以外の小児腫瘍症例の検体についても解析の準備を行なっている。

糖鎖は第3の生命の鎖と呼ばれ、ポストゲノム研究の対象として特に注目を集めているが、腫瘍研究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 (LC/MS) を用いた小児腫瘍の網羅的発現糖鎖解析研究に着手している。これは最新の糖鎖解析技術である。本年は、代表的な小児腫瘍である小児白血病の臨床検体を用いた測定条件を確定し、異なる病型の白血病臨床検体各3例程度の小規模な検索を行った。現在、その結果の解析を進めており、今後さらに症例数を増やして、小児白血病の発現糖鎖の特性解明を目指す。

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ている。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。今年、神経芽腫の細胞株を用いた詳細な産生糖鎖解析を行なった。9種類の神経芽腫細胞が産生する発現糖鎖の構造を薄層クロマトグラフィー、LC/MS を用いて解析し、26種類の糖鎖構造を同定した。この中には、これまで神経芽腫において発現が報告されていない構造が多数含まれている。今後も、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等とリンクしたデータベースを構築し、小児腫瘍のトランスレー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相関の報告があることから、小児悪性リンパ腫 (NHL) での発現について解析を行なっている。昨年までに、臨床検体の組織について定量 RT-PCR で検討し、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) では高発現であるが、Burkitt リンパ腫 (BL) ではほとんど発現を認めないことを明らかにした。本年は、細胞株を使った検討や、臨床検体のパラフィン切片に対する免疫蛍光多重染色等により、ALCL では、腫瘍組織中に浸潤している NK/細胞傷害性 T 細胞のみでなく、ALCL 細胞自体が Gln を発現していることを明らかにした。今後、Gln の発現と ALCL の細胞起原や予後との関連について検討していく。

### 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 症例約 170 例の中央マーカー診断と検体保存、リンパ腫症例約 25 例のマーカー診断と検体保存に加えて、新たに始まった AML のマーカー中央診断と検体保存でも 30 例の検体を処理した。固形腫瘍に関しては、Ewing 肉腫 4 例、横紋筋肉腫 24 例の遺伝子診断と組織保存、小児腎腫瘍 32 例の検体保存を行った。

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関する研究、新規診断法開発に関する研究を行なっている。本年は、小児白血病の予後決定に関する新たな診断方法として、治療開始 8 日後の末梢血残存白血病細胞数の 4-カラーデジタルフローサイトメトリーを用いた定量法を確立し、実際に治療中の患者検体に対する解析を開始した。その他の新たな検査法開発にも着手している他、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た検討を行なっている。

当部と研究所および病院各部門との連携によって、成育医療センターが本邦での全国規模の小児腫瘍多施設共同研究において果たしている役割は、その推進の上で欠くべからざるものとなっており、今後さらに、小児腫瘍のトランスレーショナルリサーチの発展における貢献度が高くなるもの

と考えられる。

## 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、この培養系を用いて分化誘導した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）の機能について明らかにしてきた（Exp Hematol 28:1260, 2000; 同 34:508, 2006; 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IL-7が必須であることを明らかにした（Exp Hematol 2007）。

これまでに、ヒト骨髄造血幹細胞をサイトカインカクテル添加液体培養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、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を明らかにした。本年は、免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植したヒト型化モデルを用いて、このマウスへの放射線照射によって再構築されたヒト血球に誘導されるアポトーシスを検出し、このマウスがヒト血球に対する放射線照射の生物学的影響を生体内で解析するためのモデルとなり得ることを示した。現在、このモデルを用いて、上記放射線照射による遺伝子発現変化が実際に生体内でも起こっているかどうか、検討を行なっている。

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リンパ球と、末梢血由来のものとの特性の比較を継続して行った。網羅的発現遺伝子解析の結果、臍帯血由来の活性化CD4<sup>+</sup>細胞では、末梢血由来のものに比較してFoxp3遺伝子の発現が相対的に高いことが明らかとなり、現在機能との関連を含めさらに検討中である。

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、昨年までに、成熟B細胞性腫瘍株での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の活性化が拮抗的に作用することを示唆する結果を得ていたが、本年は、この現象をさらに確認するとともに、この過程での刺激伝達系の動態について解析し、BAFFによるアポトーシス抑制の分子機構について検討した。この結果、BAFF刺激により、従来報告されていたNF $\kappa$ B2の活性化を介するBcl2の発現誘導に加え、B細胞の生存に作用するCD40の発現増強が誘導されることを明らかにした。今後、BAFFとラフト双方の刺激伝達系のクロストーク機構を解明し、新規B細胞性腫瘍増殖制御法開発へ応用することを目指している。

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Nalm6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、Nalm6、Nalm16、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。この抗体はB-prec ALLの代表的抗原CD10に反応したが、CD10自体は大部分のB前駆細胞株に発現しているため、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る。本年は、CD10分子が高度にグリコシル化されており、細胞により糖鎖構造が異なること、また、CD10の持つendopeptidase活性にも違いがあることを明らかとした。上記の抗原特異性が糖鎖構造、endopeptidaseの活性化機構の差異にかかわるものではないかと考え、さらに検討中である。

### 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  $\beta$  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 12.5 日頃に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ために、同マウスの胎児を解析し、胎生 9.5 日ではほぼ正常な形態を示すが、一部では、既に神経上皮及び間葉のアポトーシスの増加が観察されること、胎生 12.5 日では、血球にも細胞死が認められ、循環器系形成不全や脳低形成も伴い、死亡することを明らかにした。

### 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 Infec 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てラフトの機能解析を試み、ヒト腎癌細胞株 ACHN のラフトの免疫により、三量体 GTP 結合蛋白  $\beta$  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ことが明らかになった (Glycoconjugate J 印刷中)。アジュヴァントとの混合が不要で同系マウスにも免疫応答を誘導できるラフト免疫法は抗腫瘍免疫療法に応用可能と考え、ラフト免疫の腫瘍細胞に対する宿主マウスの拒絶能を検証した。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、C57BL/6 マウスと悪性黒色腫 B16BL6 細胞の組み合わせで腫瘍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が確認された。異なる組み合わせでは抗腫瘍効果は見られず、上記のモデルでは、ラフト免疫は抗原特異性を有していることが示唆された。しかし、極めて強い免疫原性を有する ACHN 細胞のラフト免疫は EL4 や B16BL6 の拒絶にも効果があった。そこで、ACHN ラフト免疫により誘導される非特異的な免疫応答を検証したところ、樹状細胞の活性化は認められなかったが、 $\gamma/\delta$  T 細胞が活性化され IL-4 を産生している事が観察された。ACHN ラフト免疫は  $\gamma/\delta$  T など、自然免疫を賦活化する効果があることが示唆され、更に検討を行っている。今後、小児腫瘍に対するラフト免疫による抗腫瘍免疫療法の開発を目指す。

## 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特性解析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きた。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、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 エピトープが膜タンパク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す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の分子機構における 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 単クローン抗体は特異性や染色性においてプローブとして十分ではなかった。これに対して、ヒト EC 細胞 NCR-G3 を免疫原として樹立された単クローン抗体 6E2 (マウス IgG3,  $\kappa$ ) の特性解析を行なった結果、この抗体が SSEA-4 を認識すること、また抗原特異性、反応性にすぐれていることが明らかとなった。そこで、この抗体を直接蛍光標識して未固定のマウス着床前胚を染色し、共焦点レーザー顕微鏡によって SSEA-4 の局在を観察したと

ころ、受精卵の卵割に伴いその分布が割球界面域に移動することが明らかとなり、この抗体を用いてマウス胚上でのラフトの動態を観察することが可能であることが示された (Biochem Biophys Res Commun 2007)。今後、この抗体が初期発生や多能性幹細胞研究における有用な SSEA-4 検出ツールとして汎用されることが期待される。一方、同抗体がマウス胚発生に及ぼす機能的効果について検討したところ、同一サブクラスコントロール抗体共存下培養では受精卵の 90%以上が正常に胚盤胞まで発生したのに対し、6E2 共存下培養では卵割は完全に阻害された。今後、この実験系において 6E2 抗体による SSEA-4 分子の架橋で誘導される反応を解析することにより、これまで不明であった初期発生における SSEA-4 の機能解明へ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 (gp91 遺伝子の補充療法) 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を担当している。これまでに、実際に治療で使用するレトロウイルスベクターを用いて、種々の前臨床試験を実施するとともに、実地に即した効率的導入条件の設定、等を行ってきており、本年もその研究を継続した。

本研究は、すでに確立された方法の確認や至適化作業の要素が強く、本来研究業績には結びつき難い側面を持っているが、その中でもいくつかの基礎的な問題点に着目して独自の研究を展開している。本年は、現在レトロウイルスベクター導入の際に必須の導入補助剤となっている遺伝子組み換え型ファイブロネクチンの作用に関する分子機構解析を行い、ヒト造血幹細胞に同ベクターを導入する際のインテグリンの動態とその役割、添加するサイトカインの効果について検討を行い、その成果を学会報告した。現在、免疫不全マウスへの移植系を用いて、造血幹細胞の由来の差 (骨髄、G-CSF 誘導末梢血、臍帯血) による幹細胞としての能力の差や、ウイルス導入の際に添加するサイトカインカクテルの違いによる未分化性維持に対する影響、等に関する検討を行っており、今後さらに、将来実施予定の他の先天性疾患に対する遺伝子治療にも応用可能な基盤情報を得るための研究を展開していく。