

小児腫瘍に関する研究

(主任研究者)

秦 順一 慶應義塾大学医学部病理学教室

(分担研究者)

(分担研究期間)

藤本純一郎	国立小児病院小児医療研究センター	平成 3～5 年度
梅澤明弘	慶應義塾大学医学部病理学教室	平成 3 年度
山田健人	慶應義塾大学医学部病理学教室	平成 4, 5 年度
加藤眞吾	慶應義塾大学医学部微生物学教室	平成 3～5 年度

研究の概要

小児腫瘍の発生母地は器官・組織の発生途上の組織である。従って、腫瘍でありながら、発生母地が本来有している分化成熟能を保持している。また、小児期は外因性の物質に暴露する機会ないしは期間が少なく、その発生機序には遺伝的な要因が密接に関連している。本研究ではこのような小児腫瘍の特性を念頭に置き、腫瘍の分化・成熟能および腫瘍発生に根源的に係わる分子・遺伝子の異常を追究する一方、このような研究から得た知見を基に、本腫瘍群の診断や病態の把握のための指標を確立することを目的に研究を行った。主な研究成果は以下のものである。

1. 配偶子の成熟途上で腫瘍化する胚細胞腫瘍の亜群である胎児性癌から体細胞および栄養膜細胞にまで分化する高次の分化能をもつヒト EC 細胞を樹立した。この細胞は分化能の多彩性から受精卵に匹敵する細胞であり、倫理的な制約で実験的な操作が許されないヒト初期胚の唯一の実験モデルである。この細胞の分化初期に係わる遺伝子を単離したところ、熱ショック蛋白 (HSP90) であった。本分子の細胞分化に対する機能を明らかにできた。
2. 小児の腫瘍では、同じ遺伝子の異常が腫瘍発生の原因となると同時に、奇形 (形成異常) の原因とも成る。小児腫瘍の中で、最も典型的な胎児性腫瘍である Wilms 腫瘍の原因遺伝子の一つとして WT1 遺伝子が単離された。本遺伝子は腎臓の器官形成のほか生殖器の発達にも関連することが判明した。Wilms 腫瘍と生殖器形成異常 (男性仮性半陰陽)、腎の機能障害を伴う Denys-Drash 症候群では前例、WT1 遺伝子の異常が同定され、今まで客観的な診断的指標が少なかった本症候群の遺伝子診断としての有用性が明らかとなった。
3. 思春期に好発し、未分化な細胞から成る Ewing 肉腫から、本腫瘍に特異な染色体転座によって構成される 2 種のキメラ遺伝子が高率に検出されることを明らかにした。この遺伝子の検出によって、指標に乏しい Ewing 肉腫の新たな分子診断法となることが明らかとなった。
4. 白血病、悪性リンパ腫などの血液腫瘍は、小児腫瘍の中の 60% を占めている。小児悪

性リンパ腫の中で最も頻度の高いバーキットリンパ腫では p53 遺伝子の異常と接着分子である CD45 の発現と予後とがよく相関した。本腫瘍の病態の指標として有用で、治療の指針を決定する因子としても重要であることが判明した。

5. 最近、各種の疾患に対する治療に用いられるようになった顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の個体での機能を明らかにするため、本遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスを新たに樹立した。遺伝子導入マウスの造血組織の検索によって、G-CSF の個体での機能がより一層明らかとなった。

研究報告

I. 研究目的

小児腫瘍は個体の正常発生・成熟からの逸脱によって生じることから、その発生機序に分子遺伝学的な要因が密接に係わっていると考えられている。また、分化途上の細胞が腫瘍発生を母地となっているため、正常細胞に匹敵する分化・成熟能を有している一方、形質が明確でない未分化な腫瘍細胞も少なくない。本研究ではこのような小児腫瘍の特性をかんがみ、これら腫瘍群を分子細胞病理学的な手段を用いて解析し、その発生機序の分子遺伝学的背景と腫瘍細胞の形質の特異性を明らかにする。このような手段でその特性を明らかにし、その発生機序を基礎的に解明することによって、腫瘍群を治癒可能にすることは、出生率が低下している現在、社会的な要請であると考えられる。とくに、発生母地が不明で、未分化な細胞から成る難治性小児腫瘍に対して、新しい理論に基づいてその形質を明らかにすること、また、その知見を応用した特異的診断法・治療法を開発することは、これら腫瘍群の制圧に急務を要することである。個体の発生とともに生じる小児腫瘍のこのような研究の成果によって、腫瘍発生の分子遺伝学的機序、特にがん抑制遺伝子の構造異常と病態との関連をも明確にすることができる。また、腫瘍細胞の分化、増殖に係わる分子・遺伝子群の同定によって正常細胞の分化と癌化の過程を明らかにできる。

このような研究の目的の達成のため以下の研究を行う。

1. ヒト EC 細胞の分化成熟機序の分子的背景 (秦、梅沢、山田)
2. Wilms 腫瘍および同腫瘍を合併する Denys-Drash 症候群における WT1 遺伝子の変異とその機能解析—遺伝子診断の確立も含めて— (加藤、秦)
3. 難治性腫瘍 Ewing 肉腫および関連腫瘍の分子診断の確立 (梅沢、秦)
4. 難治性小児造血器腫瘍の生物学的特徴の解明 (藤本、山田)

本研究の独創性はこのような研究によって得られた基礎的知見を難治性腫瘍の早期診断・治療法の改善に応用することを目的としていることにあり、このような立場での小児腫瘍の系統的且つ基礎的研究は現在まで行われていない。

II. 研究計画および材料と方法

1. ヒト EC 細胞の分化成熟機序の分子的背景

—ヒト初期胚の分化・成熟のモデルとして実験として—

われわれは、配偶子の成熟途上で腫瘍化するヒト胚細胞腫瘍のうち、多分化能を有する胎児性癌細胞 (以下、ヒト EC 細胞) NCR-G2、3 (以下、G2、3) 細胞を樹立し、以下の解析

を行う。

1) ヒト EC 細胞に特異的な指標および分化・増殖に関わる分子の確立

G2、G3 細胞を免疫原にして新たなモノクローナル抗体によってヒト EC 細胞に特異的な分子を確立し、その分子の分化誘導系での消長を検討するとともにその性状を生化学的に解析する。また、正常ヒト細胞での発現を免疫組織学的に検討する。さらに、得られた抗体のヒト EC 細胞の分化・成熟に対する機能を明らかにする。

2) ヒト EC 細胞の分化誘導系の確立

EC 細胞である G2、G3 細胞の分化誘導系をレチノイン酸（以下、RA）および N、N'-hexa-methylene-bis-acetamide（以下、HMBA）を用いて確立する。分化形質の発現は細胞表面抗原、各種細胞骨格蛋白、胚細胞腫瘍特異産生物質などを Northern blot hybridization、免疫組織化学、フローサイトメーターおよび生化学的定量によって評価する。

3) EC 細胞の器官形成能と系列細胞の分化・成熟過程の解析

細胞系列の同定に有用な b-galactosidase 遺伝子 (lacZ) を未分化 EC 細胞に効率よく発現するプロモーターにつないでプラスミドとし細胞内に導入し、組織・器官系列細胞への分化過程を *in vitro* および異種動物へ生着した腫瘍の組織、構成成分によって解析する。

方法：最も高次な多分化能を有する G3 細胞にレポーター遺伝子組み換えプラスミドを含むプラスミドをリン酸カルシウム沈殿法で導入した。導入したプラスミドは pEF1-lacZ および pEF1-neo である。導入後 G-418 で選択培養し、遺伝子導入細胞を得た。サブクローニングは EDTA-trypsin で単一の細胞にし、STO 細胞（マウス胎児細胞）上で培養した。遺伝子導入は X-gal 反応で確認した。これらの細胞を一定数、scid マウスに移植した。腫瘍の構成成分の形質証明には b-hCG、AFP、desmin 抗体による免疫組織学的検討を行った。

4) ヒト EC 細胞の分化初期に関わる遺伝子の単離

高次の分化能を有する G3 細胞の RA 添加初期に発現する遺伝子を subtracted hybridization によって単離する。単離した cDNA の塩基配列を決定する。これら単離された遺伝子の EC 細胞の分化過程での推移およびヒト正常組織の成熟過程での変化を mRNA レベルで解析する。また、その遺伝子群の機能を解析する。

以上の研究によって、体細胞分化と腫瘍の境界に存在するヒト EC 細胞に対する以上の検索を通じて、ヒト初期胚の分化・成熟機構の分子的背景を明らかにする。

2. Wilms 腫瘍および同腫瘍を合併する Denys-Drash 症候群における WT1 遺伝子の変異とその機能解析—遺伝子診断の確立も含めて—

Wilms 腫瘍はその発生に遺伝的背景をもち、各種奇形症候群と合併する典型的な「胎児性腫瘍」の一つである。本腫瘍の発生に関わる WT1 遺伝子の構造異常をサザンプロット法、および同遺伝子の Zn finger 領域の微小変異を SSCP-PCR 法でスクリーニング後、または PCR 産物の配列を決定し、その異常を同定した。材料は臨床経過の明らかな 50 例の Wilms 腫瘍組織および非腫瘍腎組織から抽出した DNA である。さらに、Denys-Drash 症候群、完

全型（腎障害、Wilms 腫瘍、生殖器形成異常（男性仮性半陰陽）の全てを伴った症例）1 例、不完全型（腎障害および Wilms 腫瘍の発生または生殖器形成異常どちらかを伴う）4 例の腫瘍組織、非腫瘍腎組織、白血球から抽出した DNA も検索に用いた。因みに、われわれが検索した症例数は本邦では最も多い。遺伝子異常と腫瘍の病態との法則性を明らかにし、特に Denys-Drash 症候群では遺伝子診断として確立することを目的とした。転写調節因子をコードする Zn-finger 領域で微小変異が同定された遺伝子については、その DNA への結合能など機能異常をゲルシフトアッセイで明らかにした。

3. 難治性腫瘍 Ewing 肉腫および関連腫瘍の分子診断の確立

思春期に好発し、難治性である Ewing 肉腫および関連腫瘍の本態を明らかにし、その分子診断を確立する目的で研究した。本腫瘍は特異的形質の明らかでない未分化な腫瘍細胞から成っているため、客観的診断法が確立されていない。本研究では Ewing 肉腫および関連腫瘍である末梢型神経上皮腫（以下、PENT）に共通して存在しているといわれている t(11:22) (q24;q12) において、転座部位から単離されたキメラ遺伝子である EWS-Flt1 および EWS・ERG をプローブとして 30 数例の腫瘍組織から RNA を抽出し、RT-PCR でその遺伝子の同定を試み、分子診断として確立することを試みた。

4. 難治性小児造血器腫瘍の生物学的特徴の解明

難治性小児造血器腫瘍の生物学的特徴の解明を細胞生物学的、遺伝子工学的手法を用いて解析し、病態解明と治療方針決定に有用な知見を得ることを目的とした。また、造血器腫瘍の発生あるいは増殖は、正常の造血機構と密接な関連を有すること、組み換え体サイトカインが治療に広く使用されていることなどの背景を鑑み、サイトカイン、とりわけ G-CSF の過剰発現が造血に及ぼす作用を検討できる実験系を作製することも目的として以下の研究を行った。

1) 小児造血器腫瘍とマーカー解析

小児白血病 115 例および小児パーキットリンパ腫 15 例の初発時サンプルを用いた、小児白血病の病型分類は、形態、組織化学、細胞系統マーカー所見により行なった。細胞マーカー発現はモノクローナル抗原を用いたフローサイトメーターあるいは凍結組織での免疫組織化学によった、患者の臨床情報は関連施設の担当医より得た、そのうち、小児白血病・悪性リンパ腫における機能分子であるリン酸化チロシン脱リン酸化酵素である CD45 分子および接着分子である CD54 の発現を検討し病態との関連を追及した。

2) 小児悪性リンパ腫における癌抑制遺伝子の変異とその臨床的意義

癌抑制遺伝子の中で腫瘍全般に最も普遍的に認められる p53 変異を小児パーキットリンパ腫で検討し病態および細胞マーカー発現との関係を以下のように解析した。14 例のパーキットリンパ腫の DNA につき p53 遺伝子のエクソン 5 から 9 を放射線標識 dCTP の存在下に PCR を施行し、反応物をポリアクリルアミド電気泳動で展開した。オートラジオグラフィで単一 DNA 断片バンドの移動度の変化を同定し (SSCP)、正常移動度とは異なるバンドを切り出し塩基配列を決定した (PCR-SSCP)。

3) G-CSF トランスジェニックマウス作製

顆粒球増加作用・全般的な造血促進作用を持つ G-CSF の生体内作用の詳細あるいは長

期・大量投与時の作用等を検討するためトランスジェニックマウスを以下のように作製し解析した。SR α プロモーターに hG-CSF α DNA を接続したものをトランスジーンとし受精卵に注入して hG-CSF トランスジェニックマウス (G-TG) を確立した。造血能は、末血ヘモグラム、HE 標本、細胞マーカー、造血前駆細胞コロニー形成法、長期骨髄再構築法などの種々の方法により行なった。巨核球 DNA 量は抗マウス血小板抗体 1C2 と Propidium Iodine で二重染色しフローサイトメーターで解析した。G-DSF 受容体の mRNA 発現は逆転写酵素で cDNA を作成した後、PCR 増幅して解析した。

III. 研究の成果および考察

1. ヒト EC 細胞の分化成熟機序の分子的背景

1) ヒト EC 細胞に特異的な指標および分化・増殖に関わる分子の確立

ヒト EC 細胞には特異的な指標がなく、マウス EC 細胞ないしは初期胚から得られた抗体が用いられてきた。われわれは G2、G3 細胞を免疫原として、ヒト EC 細胞の膜分子を確認する 5 種の抗体 (2D7、2H2、5D4、6E2、4C4) を得た。これらの 5 種の抗体について免疫沈降法、SDS-PAGE、ウエスタンブロット法などによって、認識抗原の性格と分子量を解析した。その結果、2H2、2D7、5D4 抗体はいずれも細胞膜蛋白を認識していた。これらが認識する抗原はいずれも G3 細胞の RA による分化誘導に際して、その抗原量が減弱することがフローサイトメーターによって証明され、分化抗原であることが明らかになった。これらの抗体はいずれも胚細胞腫瘍のうち、胎児性癌、精上皮腫のみと反応した。また、2D7 は精巢の spermatogonia および未熟な卵細胞とも反応し、腫瘍を含めて胚細胞腫瘍に共通する分子を担っていることが証明された。一方、6E2 抗体は胚細胞腫瘍および正常胚細胞との反応性は 2D7 と同様であるが、加えて胚細胞腫瘍の発生母地としては想定されている intratubular malignant germ cell (ITMGC) とも反応した。今まで、特異的な指標のなかった ITMGC の同定にも有用性が期待できることが判明した。さらに、同抗体は免疫原の G3 細胞の細胞死を量依存的に惹き起こすことが MTT assay で明らかになった。この細胞死の性格および機序については、現在検討中である。いずれにせよ、胚細胞が共通に有する抗原が細胞死を誘導する機能的な分子であることは極めて興味深い。また、4C4 抗体は糖鎖を認識しているが、予後が比較的悪く、転移の頻度が高い胎児性癌とのみ特異的に反応し、未分化胚種/精上皮腫と鑑別が困難な胎児性癌の確定診断に用いることができる。本抗体はホルマリン固定-パラフィン包埋切片のほか細胞診にも応用可能で、臨床的に極めて有用である。

2) ヒト EC 細胞の分化能

1) 分化誘導系の確立と分化形質の発現:

G3 細胞は RA および HMBA の添加によって SSEA-1 の増加、2D7、SSEA-3、4 の減弱、cytokeratin、未熟筋原細胞に特異的細胞骨格蛋白である desmin、細胞外基質 type IV collagen、laminin などの分化形質が出現してした。また、特徴的な所見は RA $1 \times 10^{-5} M$ の濃度で 10 日間培養すると、通常の培養ではみられない hCG の産生が 3000 mIU/ml に達するほど高値を示したことである。この過程を mRNA レベルで解析すると蛋白レベルの産生に一致して 7-10 日目に一過性に強い hCG mRNA の発現がみられた。一方、G2 細胞は RA によって明らかな分化抗原の発現がみられなかったが、HMBA の添加によって極めて

顕著な形質変化がもたらされた。すなわち、HMBA $1 \times 10^{-2} \text{M}$ の濃度で 5 日間培養すると浮遊細胞塊は全て付着細胞に変化する。この変化は G3 細胞でも全く同様に生じた。これら細胞は著しい細胞骨格蛋白の発現増加によって特徴づけられる。すなわち、HMBA による不着 G2 細胞は筋肉特異蛋白である desmin のほか、神経特異蛋白である neurofilament (NFP) が蛋白および mRNA レベルで暴露時間依存性に増加していた。一方、RA 添加ではその発現は認められなかった。G3 細胞では RA の分化誘導でも蛋白および mRNA レベルで NFP の発現が見られたが、HMBA でより顕著であった。このようにわれわれのヒト EC 細胞では誘導因子の種類によって異なった分化形質が発現することが明らかになった。このような所見は他の EC 細胞によっても確認されている。Wister 研究所の Andrews らが樹立した NT2/D1 細胞の神経形質の発現は分化誘導因子の種類によって種々であったと報告されている。また、表面形質についても RA による分化では SSEA-3, 4 が低下し、lacto 系 glycolipid の SSEA-1 および ganglioside 系抗原が増加するのに対して、HMBA ではこのような変化は認められなかったという。このような結果から、ヒト EC 細胞の分化形質の発現は、その細胞が本来潜在している分化能力とともに分化誘導因子によっても規定されることが明らかになった。この機序が分子レベルで明らかになればヒト細胞の分化・成熟機構がさらに詳細にすることができる。

2) EC 細胞の器官形成能と系列細胞の分化・成熟過程の解析

未分化 EC 細胞への外来遺伝子導入系の確立には、まず発現効率良いプロモーターを得ることが最も重要である。われわれは CAT assay によって多くのプロモーターの発現効率を検討した。その結果、polypeptid elongation factor α のプロモーターである pEF1 (EF1 α) を用いることによって未分化 EC 細胞へ効率よく遺伝子を導入できることが明らかになった。先に示した 2 種のプラスミドを G3 細胞に導入し、細胞の subcloning を行なったところ、 β -galactosidase が高発現するクローン 19E. 11B が得られた。これらの細胞は長期継代によっても lac Z 遺伝子の発現の強さは変わらず安定していた。同細胞を scid マウスに移植したところ、1-1.5 ヶ月で腫瘍を形成した。その組織像は EC、YST および一部には embryoid body 様構造や、hCG 産生の syncytiotrophoblastic giant cells、筋細胞の存在など多彩な像を示していた。これらの組織を構成する細胞は X-gal 反応または β -gal 抗体陽性であった。また、同一細胞で分化形質の指標となる抗体と β -gal 抗体が同時に陽性であることが二重染色で確かめられたことから、これらの多彩な組織が単一細胞に由来していることが証明された。以上、われわれが確立したヒト EC 細胞へのリポーター遺伝子導入→異種移植系は同細胞の組織・器官形成能を明らかにする上で極めて有用である。

3) ヒト EC 細胞の分化初期に関わる遺伝子の単離

G3 細胞の RA による分化誘導初期に関連する遺伝子を 3 種得た。その 1 つは HSP90b 遺伝子であった。RA 添加後 2 時間後から mRNA レベルで HSP90 の発現が増強し、その後 10 日間で G3 細胞は栄養膜細胞への分化を示すがその際、細胞レベルでは HSP90 の低発現群の増加と高発現群の減少が認められた。G3 細胞の分化において HSP90 の発現の減少または上昇のどちらが機能しているかを明らかにするため、HSP90 を強制発現ないしはアンチセンス遺伝子によってその発現を抑制した結果、アンチセンス DNA によってアポトーシスが生じ、それから免れた細胞は神経細胞に分化した。現在、HSP90 遺伝子の

動態、同蛋白の発現および分化形質の誘導の相互関連を詳細にしたいと考えている。因みに、HSP90 の発現を得ることができる加熱によっても、われわれが分化の指標としている hCG の発現を誘導できるか否かを検討するため、G3 細胞を 42°C の環境下で培養し経時的に hCG の定量を行なったところ、24 時間で RA の添加と同レベルの高い産生が認められた。さら、筋肉特異骨格蛋白である smooth muscle actin の発現を mRNA で確認できた。他の遺伝子については塩基配列の決定が最終段階に入っており、その機能解析を準備中である。

2. Wilms 腫瘍および同腫瘍を合併する Denys-Drash 症候群における WT1 遺伝子の変異とその機能解析—遺伝子診断への有用性—

1) サザンプロット・ハイブリダイゼーション (以下、サザン法) による変異の同定

サザン法による同定される家族歴や奇形症候群を伴わない孤発性 Wilms 腫瘍 (sporadic Wilms' tumor) での変異の頻度は欧米では低く、これまでの報告では 40 例～50 例に 1 例ぐらいである。本邦ではこれに比し、やや頻度が高い。われわれの解析では遺伝子の欠失 4 例ならびに重複 1 例であるが、その異常部位に一定のパターンはみられない。自験例では WT1 領域すべての欠失 1 例、WT1 内から始まり 3' 末端を越える欠失 2 例、WT1 内の欠失 1 例となっている。なお、重複例は今までのところわれわれの発見が世界で初めてである。この変異をもつ腫瘍は、ヌードマウスで変異を保存しながら安定して継代移植されている。同時に、世界で初めて WT1 異常をもつ Wilms 腫瘍細胞株として樹立された。この移植腫瘍と細胞株は、今後 WT1 の腫瘍発生に対する機能を解析する上で、極めて重要な手段となろう。

2) WT1 の微小変異の同定

サザン法では同定できない WT1 遺伝子の微小変異は PCR-SSCP 法によるスクリーニングと塩基配列の同定で検出される。われわれが同定した孤発性 Wilms 腫瘍での微小変異は 3 例で、exon9 の、exon10 の 5bp の欠失および exon10 の 23bp の重複であった。後 2 者はこの変異により正常の stop codon が失われていた。zinc finger domain である exon9, 10 の変異が多いが特定のホットスポットは認められなかった。³⁹⁴Arg→Trp は当初、Denys-Drash 症候群に特異的な変異と考えられていたが、われわれの成績から孤発性 Wilms 腫瘍でも同じ異常が認められることが明らかとなった。一方、Denys-Drash 症候群 5 例では WT1 の zinc finger domain の微小変異が全例で認められた。2 例は、それぞれ exon8・³⁵⁵Cys→Tyr および exon9・³⁸⁵Cys→Arg の変異であった。他の 3 例は alternative splice site である exon9 付近の exon-intron junction の intron 側の特定の部位に異常が認められた。minigene を作成して alternative splicing が生じているか否か詮索した結果、異常のものでは splicing が生じてないことが証明された。このことは intron の異常であっても junction 部では機能的に重大な異常が生じることを示す所見として注目される。いずれにせよ、Drash 症候群では報告例も含めほぼ 100%、zinc finger domain に何らかの異常がみとめられ、遺伝子診断への有用性を特に強調したい。一方、このような WT1 遺伝子の変異と腫瘍発生の直接の関連については、WT1 遺伝子の異常のほか、11p15 に主座を有す遺伝子 WT2、IGF-II などとの共同作用や結合蛋白である p53 との関連についても今後、解析する必要があるだろう。

3. 難治性腫瘍 Ewing 肉腫および関連腫瘍の分子診断の確立

Ewing 肉腫および関連腫瘍である PNET は好発年齢、好発部位などが殆ど同様であり、形態像も特異な形質を示さない裸核状の小円形細胞から成る。PNET は本来、神経形質を示す腫瘍であり、その点が Ewing 肉腫との相違とされてきた。しかしながら最近、Ewing 肉腫細胞が *in vivo* 環境下で、神経に分化することが判明し、両腫瘍が近縁の腫瘍であることが判明しつつある。一方、Ewing 肉腫のような未分化な腫瘍は確定診断のための指標に乏しく、客観的な診断手段の急務である、このような点をかんがみ、本腫瘍にしばしば生ずる t(11:22)(q24;q12)における、キメラ遺伝子を同定することによって本腫瘍の分子診断の確立ならびに腫瘍発生の機序との関連を明らかにした。材料は電顕を含む形態像、免疫組織化学的方法によって Ewing 肉腫および PNET と診断された腫瘍組織である。転座部位から単離されたキメラ遺伝子である EWS-Fli1 および EWS-ERG を RT-PCR でその同定を試みた。その結果、Ewing 肉腫では 80%以上に EWS-Fli1 または EWS-ERG が同定され、一方 PNET では 50%であった。この結果、これらキメラ遺伝子の同定が、今まで指標の無かった Ewing 肉腫の分子診断として極めて有用であることが判明した。また、PNET においても半数の症例が陽性で、Ewing 肉腫との関連が確認された。因みに、Ewing 肉腫および PNET としばしば鑑別上問題となる他の「小円形細胞腫瘍群」では、これらの遺伝子は全く検出されなかった。キメラ遺伝子の腫瘍発生への機能と機序の解明は今後の課題である。

4. 難治性小児造血器腫瘍の生物学的特徴の解明

1) 小児白血病での CD45 発現様式と病態との関連

小児白血病 115 例は形態、組織化学所見、細胞マーカー所見により B 細胞型急性白血病 89 例、T 細胞型急性白血病 13 例および急性非リンパ球性白血病 13 例と分類されたが、それらの症例における CD45 発現には特徴があった。症例全体では CD45 が明瞭に陽性となる群と陰性化あるいは減弱化する群が存在した。陽性率で見ると腫瘍細胞での CD45 陽性率が 61%以上となる群 (CD45 陽性群、69 例) と 40%以下の群 (CD45 減弱群、46 例) とに分れ、41~60%となる症例は認めなかった。CD45 発現と病型分類の関係を検討した所、B 細胞白血病 89 例中、CD45 減弱群は約半数の 43 例認めた。一方、非 B 細胞型白血病 26 例では CD45 減弱群はわずか 3 例のみであった。すなわち、CD45 減弱群の大部分 (46 例中 43 例) は B 細胞系白血病であることが判明した。なお、B 細胞型白血病はそのほとんどが CD10 陽性、sIgM 陰性の B 前駆細胞型白血病である。また、CD45 発現様式 (陽性群 29 例と減弱群 28 例に分類) と年齢、性、初診時白血球数、血清 LDH 値などとの関連を検討した結果、CD45 減弱群は陽性群に比べ、有意に低年齢 ($p < 0.01$)、低白血球数 ($p < 0.01$)、低 LDH 値 ($p < 0.05$) を示した (χ^2 検定)、一方、性差とは相関は認められなかった。無病生存率を Kaplan-Mier 法で解析し generalized Wilcoxon 法で検定した結果、3 年生存率は CD45 減弱群が 71.0%、CD45 陽性群 47.0%で減弱群が有意に良好であった ($P < 0.05$)。

2) 小児パーキットリンパ腫における接着分子 CD54 発現、p53 変異と病態

15 例のパーキットリンパ腫につき接着分子である ICAM-1 (CD54) の発現を検討した結果、9 例が陰性、6 例が陽性であった。p53 遺伝子変異は 14 例につき解析可能であった

が、5例に変異を認めた。変異はエクソン7と8にのみ認められ、エクソン5、6および8には見られなかった。塩基配列を決定したところ、いずれも1塩基変異によるアミノ酸の置換を伴う型であった。興味深いことに p53 変異を認める症例はすべて CD54 が陰性の症例であった。すなわち、CD54 陰性 9 例のうち 5 例に p53 変異を認めたが、CD54 陽性 5 例には p53 変異は検出されなかった。また、予後調査の結果、15 例中 6 例が 21 箇所以内に死亡していたがそのうち 4 例が p53 変異症例であった。さて、CD45 は受容体型チロシン脱リン酸化酵素であることが判明し注目を集めている。今回の解析で小児の代表的悪性腫瘍である Common ALL の約半数に CD45 の減弱・消失が判明した。この減少・消失は AML や T-ALL ではほとんど見られないことから、腫瘍化に伴う一般的な特徴とは考えにくい。また、正常骨髄に存在する CD10 陽性 B 前駆細胞にはその全てに CD45 が発現していることからこの減弱・消失は B 細胞の腫瘍化に伴った現象であると考えられる。すなわち、B 前駆細胞型白血病に特有の分子メカニズムによって発現低下が引き起こされていると想定される。白血病細胞での CD45 発現減弱の意義は未知であるが、予後とも相関することはそれが悪性増殖と関係することを強く示唆している。パーキットリンパ腫では接着分子である CD54 と p53 変異が疾患の予後に強く関連する可能性が得られた。p53 遺伝子変異は、産生される変異型 p53 蛋白が細胞周期の制御を攪乱することにより腫瘍の悪性度を増加させると考えられている。すなわち、p53 変異を有する悪性腫瘍は一般に癌のプログレッションに有利に作用すると考えられていることより、p53 変異を持つパーキットリンパ腫が予後不良のことは理解が可能である。しかし、興味深いことは p53 変異例が CD54 発現と関係することである。腫瘍細胞の増殖は、増殖の場での環境との相互作用が重要である知見が多く示されつつあることを考慮に入ると、CD54 発現低下が局所での増殖あるいは他臓器への進展に有利に作用し遺伝子変異が起りやすい条件を提供している可能性も考えられる。

3) hG-CSF トランスジェニックマウス (G-TG) の作製と造血能

G-TG では hG-CSF の mRNA が全ての臓器で発現し、血清中に約 1,000pg/ml の hG-CSF を産生していた。正常の約 10 倍の巨脾がみられ、組織学的には拡大した赤脾髄に種々の分化段階の顆粒球・赤芽球が充満するとともに成熟巨核球も増加していた。白脾髄は相対的萎縮を示すがリンパ球絶対数は T、B 細胞とも増加していた。末血では白血球増多（正常の 10~15 倍）を認め成熟顆粒球がその大部分を占めたが、マーカー解析から T、B 細胞絶対数も数倍に増加していた。一方、赤血球数・血小板数は不変であった。造血前駆細胞の定量では、脾細胞の CFU-GM が約 1,000 倍、CFU-E、BFU-E が各々約 10 倍、20 倍に増加していた。CFU-S では、CFU-S (day14) が脾臓、末血で各々約 13 倍、30 倍増加していた。CFU-S (day14) の増加は造血幹細胞の増加を反映していると想定されたため、幹細胞定量法としてより信頼性の高い長期骨髄再構築実験を行なった。正常マウス末血単核球を 5 百万個移植すると 60 日後の生存率は 50%であった。一方、G-TG の末血単核球を移植した場合は、わずか 5 千個の細胞で同様の生存率が達成され、5 百万個の場合は生存率が 100%であった。即ち、G-TG の末血中には正常マウスに比較し造血幹細胞が 1,000 倍多く含まれていることになる。また、移植後に生き残ったマウスの骨髄細胞を用いてさらに CFU-S アッセイを行なった結果、出現した脾臓コロニーの全てに hG-CSF トランスジェンが証明された。

4) G-TG で見られた巨核球増加と巨核球 DNA プロイディー変化

G-TG 脾臓では巨核球が正常マウスの数十倍に増加しているものの末血血小板数には変動が見られなかった。さらに、骨髄巨核球数は G-TG では正常マウスの約半数に減少していることが判明した。脾臓巨核球は血小板産生に関与しない可能性が高いこと、巨脾による血小板プールを考慮に入れると G-TG では血小板産生が亢進している可能性が示唆されたので、DNA プロイディー検索により巨核球の成熟度を検討した。その結果、G-TG 骨髄の巨核球 DNA プロイディーは 8N がピークであり正常の 16N よりもより幼若な段階であった。巨核球の平均 DNA 量の変化が hG-CSF のマウスへの投与によっても再現できるか否かを検討したところ、10 μ g/day、5 日間投与により 8N 型巨核球が増加すること、IL6 による巨核球 DNA 量の増加を hG-CSF が抑制することが判明した。巨核球系への hG-CSF の直接作用か否かを知る目的でマウス巨核芽球由来細胞株 2 株 (L8057 および C2) につき G-CSF 受容体 mRNA の発現を RT-PCR で検討した結果、いずれの株にも発現が認められた。G-CSF は臨床で多用されているサイトカインであるが白血病細胞にはその受容体が発現し G-CSF により増殖が引き起こされる症例も存在する。また、G-CSF の生体内作用は全てが解明されたわけではなく臨床応用が継続される現状ではその作用の解明、長期投与による影響の解明は急務である。本研究ではこのような問題を解決すべく G-TG を作製した。G-TG はリンパ球を含む多くの細胞系統の造血を亢進し、幹細胞の末血への動員も亢進していることより hG-CSF 作用解析のモデルとなりうる。短期間の観察では腫瘍の発生は見られていないが、より体系的な解析が必要である。今回、巨核球分化に焦点をあて hG-CSF の作用も検討したが巨核球系白血病に G-CSF 受容体が存在することが初めて明らかとなった。このことは、巨核球系白血球にも G-CSF 受容体が存在する可能性を示唆しており症例のより詳細な検討が望まれる。

研究成果

(秦 順一、梅澤明弘、山田健人、加藤眞吾)

1. Fujimoto, J., Kiyokawa, N, Fujita, H, Imai, K. Matsubayashi, Y, Kokai, Y, Hata, J.: Immunological properties of hemotopoietic malignancies in childhood. In Childhood Leukemia Present problems and future prospects eds. Kobayashi, N, Akera, T, et al, pp69-76 Klumer Academic Publisher, Boston, 1991
2. Mochida, Y., Tsuchida, Y., Hata, J., Komura, M., Nishiura, M., Characterization of a radioimmunoassay to determine plasma total renin. Tumor Biol. 12:75-81, 1991
3. Akasaka, Y., Fujimoto, J., Harigaya, K., Enomoto, Y., Watanabe, Y., Hata, J.: Monoclonal antibody against bone marrow stromal cells -Its production and characterization-, Acta Pathol. Jpn. 41:499-506, 1991
4. Takahashi, K., Hata, J., Mukai, K., Sawasaki, Y.: Close similarity between cultured human omental mesothelial cells and endothelial cells in cytochemical

- markers and plasminogen activator production. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27:542-548, 1991
5. Kaneko, Y., Homma, C., Maesaki, N., Sakurai, M., Hata, J.: The correlation of chromosome abnormalities with histologic and clinical fetures in Wilms' tumor and other childhoof renal tumors. *Cancer Res.* 54:542-548, 1991
 6. Teresa, W.C. Hashimoto, K., Umehara, K., Hata, J.: Murine cytomegalovirus infection model in Balb/c mice 3. Immunoglobulin production during infection. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 16:11-20, 1991
 7. Hara, S., Adachi, Y., Kaneko, Y., Fujimoto, J., Hata, J.: Evidences for heterogeneous groups of neural differentiation of Ewing's sarcoma. *Brit. J. Cancer* 64: 1025-1030, 1991
 8. Kikuchi, H., Akasaka, Y., Nagai, T., Kato, S., Iri, H., Umezawa, A., Hata, J.: Genomic Changes of the WT-gene in Wilms' tumors and their correlation with histology. *Amer. J. Pathol.* 140:781-784, 1992
 9. Umezawa, A., Maruyama, T., Segawa, K., Shadduck, R. K., Waheed, A., Hata, J.: Multipotent bone marrow stromal cells is able to induce hematopoiesis in vivo. *J. Cell Phyol.* 151:197-205, 1992
 10. Mukai, M., Torikata, C., Iri, H., Hata, J., Naito, M., Shimoda, T.: Immuno-histochemical identification of aggregated actin filaments in formalin-fixed paraffin-embedded sections. (1) A study of infantile digital fibromastosis by a new pretreatment. *Amer.J. Surg. Pathol.* 16:110-115, 1992
 11. Ogishima, T., Suzuki, H., Hata, J., Mitani, F., Ishimura, Y.: Zone specific expression of Aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-450 11b in rat adrenal cortex: Histochemical basis for functional zonation. *Endocrinology* 130:2671-2677, 1992
 12. Nakanoma, T., Nakamura, K., Deguchi, N., Fujimoto, J., Hata, J., Tazaki, H.: Immunological analysis of tumor infiltrationong lymphocytes(TIL) in seminoma using monoclonal antibodies. *Virchow Arch A* 421:409-413, 1992
 13. Fujita, H., Hata, J., Kokai, Y., Matsubayashi, Y., Takebe, Y., Fujimoto, J.: Expression pattern of SRa promotor in human embryonal carcinoma and transgenic tissue in mice. *Acta Pathol. Jpn.* 42:712-718, 1992

14. Umezawa, A., Hata, J.: Expression of gap-junction protein (connexin 43 or al gap junction) is downregulated at the transcriptional level adipocyte differentiation of H-1/A marrow stromal cells. *Cell Structure and Function* 17:177-184, 1992
15. Ogata, T., Hawkins, J. R., Taylor, A., Matsuo, N., Hata, J., Goodfellow, P.N.: Sex reversal in a child with 46, X, Yp+ karyotype: support for exstence of a gnes(s), located in distal Xp, involved in testis formation. *J. Med. Genet.* 29:226-230, 1992.
16. Hata, J., Fujumoto, J., Ishii, E., Kokai, Y., Matsubayashi Y., Abe, H., Kusakari, S., Yamada, T., Umezawa, A., Kikuchi, H., Maruyama, T.: Differentiation of human germ cell tumor cells in vivo and vitro. *Acta Histochem. Cytochem.* 25:563-576, 1992
17. Tsuchida, Y., Shimizu, K., Hata, J., Honna, T. and Nishiura, M.: Renin production in congenital mesoblastic nephroma in comparison with that in Wilms' tumor. *Pediat. Pathol.* 1993 (In press)
18. Akasaka, Y., Kikuchi, H., Nagai, T., Hiraoka, N., Kato, S., Hata, J.: A point mutation found in the WT gene in a sporadic Wilms' tumor without genito-urinary abnormalities was identical with the most frequent point mutation in Denys-Drash syndrome. *FEBS LETTERS* 317:39-43, 1993
19. Tsuchida, Y., Shimizu, K., Hata, J., Honna, T. and Nishiura, M.: Renin production in congenital mesoblastic nephroma in comparison with that in Wilms' tumor. *Pediat. Pathol.* *Pediat. Pathol.* 13:155-164, 1993
20. Matsuo, K., Ikeshima, H., Shimoda, K., Umezawa, A., Hata, J., Maejima, K., Nojima, H., Takano, T.: Expression of the rat calmodulin gene II in the central nervous system: a 294-base promotoeer and 68-base leader segment mediates neuronspecific gene expression in transgenic mice. *Molec. Brain Res.* 20:9-20, 1993
21. Ikeshima, H., Shimoda, K., Matsuo, K., Hata, J., Maejima, K., Takano, T.: Spermatocyte-specific transcription by calmodulin gene II promoter in transgenic mice. *Molec Cell Endocriol.* 99:49-53, 1994
22. Ikeshima, H., Yuasa, S., Matsuo, K., Kawamura, K., Hata, J., Takano, T.: Expression of three nonallelic genes coding calmodulin exhibits similar

localization on the central nervous system of the rats.

J. Neurosci. Res. 36:111-119, 1993

23. Wenk, J., Andrews, P.W., Casper, J., Hata, J., Pera, M., Keitz A., Damjanov, I., Federson, B.A.: Glycolipids of germ cell tumors: extended globo-series glycolipids are a hall mark of human embryonal carcinoma cells. Int. J. Cancer 57:1-9, 1994
24. Hiraoka, N., Maukai, M., Hosada, Y., Hata, J.: Phyllodew tumors of the breast containing the intracytoplasmic inclusion bodies identical with infantile digital fibromatosis, Amer J. Sur, Pathol. 18:506-511, 1994
25. Mitani, F., Suzuki, H., Hata, J., Ogishima, T., Shimada, H., Ishimura, Y.: A novel cell layer without corticosteroid synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: Histochemical detection and possible physiologic role. Endocrinology 135:431-438, 1994
26. Horiuchi, Y., Nakashima, J., Ishii, T., Hata, J., Tazaki, H.: Primitiveneuroectodermall tumor of the retroperitoneal cavity. Urology 44:127-129, 1994
27. Hachitanda, Y., Ishimoto, K., Hata, J., Shimada, H.: One hundred detected through mass screening system in Japan. Cancer (in press)
28. Nakano, T., Umezawa, A., Abe, H., Suzuki, N., Yamada, T., Nozawa, S., Hata, J.: A monoclonal antibody which specifically reacts with human embryonal carcinomas, spermatogonia and oocytes is able to induce human EC cell death. Differentiation (in press)
29. Kikuchi, H., Akasaka, Y., Kurosawa, Y., Yoneyama, H., Kato, S., Hata, J.: A critical mutation in both alleles is not sufficient to cause Wilms' tumor. FEBS Letters (submitted)
30. Yamada, T., Suzuki N., Hiraoka, N., Matsuoka, K., Fukushima, S., Hata, J.: Apoptosis of human embryonal carcinoma cells with in vitro differentiation. Differentiation (in press)
31. Umezawa, A., Maruyama, T., Imai, S., Takano, T., Hata, J.: Involvement of mcl1, Bcl-2 related gene, in the differentiation of human embryonal carcinoma cells. (in preparation)

32. Maruyama, T., Umezawa, A., Satoshi, K., Kikuchi, H., Nozaki, M., Hata, J.: Heat shock induces differentiation of human embryonal carcinoma cells. (in preparation)
33. Yamada, T., Kaneko, H., Iizuka, K., Matsubayashi, Y., Kokai, Y. and Fujimoto, J.: Lymphocytosis and elevation of hematopoietic stem cell number in mice transgenic for human granulocyte colony-stimulating factor. Manuscript in preparation.
34. 秦 順一: ヒト胚性腫瘍細胞の分化, 実験医学 9:1036-1041, 1991
35. 秦 順一: テラトーマー遺伝子から個体へー
あいみつく 12:4-8, 1991
36. 秦 順一: 小児固形腫瘍, 特に「小円形細胞腫瘍群」の形態学的特徴と鑑別診断, 小児がん 27:555-560, 1991
37. 秦 順一, 赤坂喜清, 菊池春人, 石井栄三郎, 藤本順一郎: 肉腫型 Wilms 腫瘍 (腎芽型・不全亜型), 小児外科 24:183-191, 1992
38. 秦 順一, 榎本康弘; 病理組織診断における電子顕微鏡の有用性, 方法・取り扱い法, 病理と臨床 10 (臨時増刊号): 2-7, 1992
39. 秦 順一; 病理組織診断における電子顕微鏡の有用性, 生殖器疾患胚細胞腫瘍を中心に, 病理と臨床 10 (臨時増刊号): 292-295, 1992
40. 秦 順一; 病理組織診断における電子顕微鏡の有用性, 横紋筋肉腫, 病理と臨床 10 (臨時増刊号); 412-413, 1992
41. 秦 順一; 病理組織診断における電子顕微鏡の有用性, 小児腫瘍, 病理と臨床 10 (臨時増刊号): 440-477, 1992
42. 秦 順一; 腫瘍マーカーとその臨床の実験 小児固形腫瘍マーカー Modern Physician 12:1025-1030, 1992
43. 秦 順一: 杉本哲朗: Ewing 肉腫, 鈴木利光, 関口守正, 野沢志朗編「ヒトがん細胞株とその特性」, 中外医学社, 1992
44. 秦 順一: 胎児性癌, 藍沢茂雄, 森永正次郎編, 「取り扱い規約に沿った腫瘍鑑別診断

アトラス, 辜丸」, 文光堂, 1992

45. 秦 順一: 病理学的にみた動脈硬化, 五島雄一郎編, 「目でみる動脈硬化」, メギカルビュー社, 1993
46. 秦 順一; 先天性代謝異常と悪性腫瘍: 分子遺伝学, 小児科診療 56:797-801, 1993
47. 細田泰雄, 日比紀文, 大原 信, 浜田慶城, 土本寛二, 山田高也, 鈴木達也, 岩男 泰, 秦 順一, 土屋雅春: 実験的大腸炎 (haptan-induced colitis) における免疫担当細胞の動態, 第1報, 消化器と免疫 26:68-72, 1993
48. 秦 順一: Drash 症候群, 小児科診療 96 (増刊号)
49. 秦 順一, 山田健人, 梅沢明弘: ヒト胎児性癌細胞の分化, 細胞 25:428-433, 1993
50. 山田健人, 秦 順一: アポトーシス—その分子機構から治療への応用まで—, Human Cell 6:320-324, 1993
51. 秦 順一: 腎芽腫不全型 (肉腫型 Wilms 腫瘍), 藍沢茂雄, 清水興一 里佳昭編, 「取り扱い規約に沿った腫瘍鑑別診断アトラス, 腎臓」, 文光堂, 1994
52. 秦 順一, 菊池春人, 米山浩志, 黒沢祥浩, 赤坂喜清: 小児泌尿器癌の癌遺伝子—Wilms 腫瘍を中心に—, 臨床泌尿器科, 48:51-56, 1994
53. 秦 順一, 菊池春人, 米山浩志, 福澤龍二, 赤坂喜清; Wilms 腫瘍と WT1 遺伝子, 小児科診療 (in press)

(藤本純一郎)

1. Miyashita, T., Mizutani, M., Asada, J., Fujimoto, T., Imaba, T. and Furukawa, T.: Monoclonal blast cell proliferation in transient myeloproliferative disorder. In Haematology and Blood Transfusion vol. 35: Modern Trends in Human Leukemia IX, eds. R. Neth et al. pp33-37, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1992.
2. Watanabe, S., Mizuno, S., Oshima, L-H., Tsunematsu, Y., Fujimoto. J. and Komiyama, A.: Leukemia and other malignancies among a GH users. J. Pediat Endocrinol. 6:99-108, 1993.
3. Miura, T., Nakamura, M., Tsunematsu, Y., Fujimoto, J., Meguro, T. and Yamada, K.: Hypofibrinogenemia in a girl with Langerhans cell histiocytosis during

- etoposide and prednisolone therapy. Acta Paediatrica Japonica 35:148-150, 1993.
4. Kaneko, H., Iizuka, K., Kokai, Y., Fujimoto, J., et al.: Vaccination with a synthetic T-cell receptor V-region peptide: Immunomodulation or vaccination? Transplantation proceeding (in press.)
 5. Kaneko, H., Fujimoto, J., Iizuka, K., Kimura, H. and Kokai, Y.: Engraftment of rat bone marrow cells in mice transgenic for granulocyte-colony stimulating factor. Transplantation proceeding (in press.)
 6. Yamaoka, T., Nishimura, C., Yamashita, K., Itakura, M., Yamada, T., Fujimoto, J. and Kokai, Y. Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA. Diabetologia (in press.)
 7. Ohta, M., Ii, S., Yamaoka, t., Ono, K., Koka,i Y., Fujimoto, J. et al.: Galactose-induced albuminuria in transgenic mice expressing human aldose. Diab. Res. Clin. Prac. (submitted)
 8. Kaneko H, Kokai Y, Iizuka K, Morohashi T and Fujimoto, J.: Non-phenotypic detection of osteopetrotic (op/op) mutation by using PCR-SSCP analysis. Lab, Anim. (submitted)
 9. Kaneko, H., Sugita, K., Kiyokawa, N., Iizuka, K., Takada., K., Saito, M., Yoshimoto, K., Itakura, M., Kokai, Y. and Fujimoto, J.: High correlation of p53 mutation or CD54 expression with clinical outcome in Burkitt's lymphomas in childhood. Manuscript in preparation.
 10. Iizuka K, Kokai Y, Kaneko H, Yamada T, Matsubayashi Y, Kimura H and Fujimoto, J. Immunosuppressive effect of granulocyte colony-stimulating factor in hybrid resistance. Manuscript in preparation.
 11. 金子英雄, 藤本純一郎: 原発性免疫不全症とリンパ増殖性疾患. 臨床医 18:158-161, 1992.
 12. 藤本純一郎: Ki-1 (CD30) 陽性未分化大細胞型リンパ腫. 医学のあゆみ 164:204, 1993.
 13. 藤本純一郎: 未分化大細胞型リンパ腫 (いわゆる Ki-1 リンパ腫).

血液・腫瘍科 25:155-162, 1993.