

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20790672
 研究課題名（和文） cyclin Cによるヒト造血幹細胞の機能制御メカニズムの解析
 研究課題名（英文） Analysis of functional regulatory mechanism of human hematopoietic stem cell by cyclin C

研究代表者

宮田 泰彦 (MIYATA YASUHIKO)
 名古屋大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：40467303

研究成果の概要（和文）： ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞でサイクリン C をノックダウンすることにより静止期細胞が増え未分化マーカーである CD34 の発現を維持することを見いだした。また *in vitro* における増幅や免疫不全マウスへの生着を改善することを明らかにした。以上よりサイクリン C がヒト造血幹細胞・前駆細胞の静止期を制御する重要な役割を担っていることを明らかにし、造血幹細胞においてサイクリン C の量および活性を調整することで造血幹細胞の増幅や生着を改善しうることを示した。

研究成果の概要（英文）： We have identified an important role of cyclin C (CCNC) in regulating human hematopoietic stem/progenitor cell (HSPC) quiescence, as knocking down CCNC expression in human cord blood CD34+ cells resulted in a significant increase in quiescent cells that maintain CD34 expression. CCNC knockdown also promotes *in vitro* HSPC expansion and enhances their engraftment potential in sublethally irradiated immunodeficient mice. Our studies establish cyclin C as a critical regulator of the G0/G1 transition of human HSPCs and suggest that modulating cyclin C levels may be useful for HSC expansion and more efficient engraftment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、細胞周期、サイクリン C、静止期、生着

1. 研究開始当初の背景

現在、造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell: HSC) は造血器腫瘍や再生不良性貧血などに対する HSC 移植や、複合免疫不全症などに対する遺伝子療法に使用されている。HSC の体外増幅やウイルスなどを用いた遺伝子導入には、サイトカインを用いた培養が行われている。サイトカインは HSC の生存に必要である一方、HSC を刺激し、自己複製能や生着能の高い G0 期から細胞周期へ動員して、細胞分裂を促進する。サイトカインにより刺激を受けた HSC は、骨髓微小環境のない体外培養系では G0 期に戻ることはなく、自己複製能や生着能は分裂と共に低下する。実際にこれらの問題は、体外増幅を用いた HSC 移植や HSC への遺伝子治療を行う上で大きな制約となっている。

ことから、体外増幅後の HSC を再び G0 期に移行させることや、G0 期を維持したまま遺伝子導入をすることが出来れば、移植 HSC の自己複製能を保ち生着率を改善できる可能性がある。

2. 研究の目的

研究では、short hairpin RNA (shRNA) 発現レンチウイルスによる cyclin C ノックダウンを行い、G0 期 HSC の増加が多分化能、自己複製能ならびに生着能に及ぼす影響について検討し、ヒト HSC の G0 期から G1 期への移行 (G0/G1 期移行) に対する cyclin C の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、short hairpin RNA 発現レンチウイルスベクターと臍帯血 CD34 陽性

細胞を用いてヒト正常造血幹細胞 (HSC) での cyclin C の発現を低下させる。この HSC を使い、in vitro の実験系だけでなく、免疫不全マウスへの移植を用いた in vivo 実験を行い、cyclin C の発現低下が HSC の多分化能、自己複製能および生着能にどのような影響を及ぼすか調べ、HSC における cyclin C の役割について検討した。

4. 研究成果

我々はヒト臍帯血より分離した CD34 陽性において静止期より細胞周期に入る際に、early G1 cyclin である cyclin D ではなく cyclin C の発現が亢進する事を見いだした。そこで cyclin C が造血幹細胞 (HSC) の静止期から細胞周期への導入を制御しているかどうか検討した。まず cyclin C に対する short hairpin RNA をレトロウイルスでの感染効率の低い HSC を含む CD34 陽性細胞にレンチウイルスにより導入し、cyclin C の発現を下げることに成功した。G1/S/G2M 期の割合には優位な差は認めなかったが、cyclin C ノックダウン群では静止期細胞の増加を認めた。週毎の増殖速度を検討したところ、初期では cyclin C ノックダウン群でやや低く、3 週以降では高かった。さらに累積増殖はノックダウン群で優位に高かった。培養細胞でのコロニー系性能は培養後期でノックダウン群で著しく高く、自己複製能が亢進していることが示唆された。CFC アッセイや表面マーカー解析では、顆粒球系・赤芽球系とも分化には著変なく、自己複製の亢

進は分化ブロックを伴うものではなかった。CD34 陽性細胞をより未分化な HSC を含む CD38 陰性群と分化した progenitor である CD38 陽性群とで比較を行った。CD38 陰性群では培養 5 週目の CD34 陽性率やコロニー形成能が著しく高く、これは CD38 陽性群では認められなかった。以上より、cyclin C は HSC を含む未分化な分画で重要な役割を果たしていることが示唆された。また免疫不全マウスへの移植実験ではノックダウン群において移植 6 週間後のヒトキメリズムが優位であった。このことから cyclin C をノックダウンする事で HSC の生着を亢進させる事が明らかになり、cyclin C を阻害する事で生着率を向上させられる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1) Miyata Y, Liu Y, Jankovic V, Sashida G, Lee JM, Shieh JH, Naoe T, Moore M, Nimer SD.

Cyclin C Regulates Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Quiescence. *Stem Cells*. 2010 査読有 Vol.28 pp308-317

2) Tanizaki R, Nomura Y, Miyata Y, Minami Y, Abe A, Hanamura A, Sawa M, Murata M, Kiyoi H, Matsushita T and Naoe T
Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and re-establishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOD / SCID / IL-2R γ c^{-/-} mice. *Cancer Science*. 2010 査読有 101:631-8.

3) Sashida G, Liu Y, Elf S, Miyata Y, Ohyashiki K, Izumi M, Menendez S, Nimer SD. ELF4/MEF activates MDM2 expression and blocks oncogene-induced p16 activation to promote transformation. 2009 査読有 *Mol Cell Biol*. 29(13): 3687-99.

4) Liu Y, Elf SE, Asai T, Miyata Y, Liu Y, Sashida G, Huang G, Di Giandomenico S, Koff A, Nimer SD.
The p53 tumor suppressor protein is a critical regulator of hematopoietic stem cell behavior. *Cell Cycle*. 2009 査読無 Oct 1;8(19):3120-4

〔学会発表〕 (計 6 件)

1) 倉橋 伸悟

PAX5-PML Acts as a Dual Dominant-Negative Form of Both PAX5 and PML. 51st American Society of Hematology Annual Meeting 2009年12月5日 ニューオーリンズ (米国)

2) Liu Yan

Akt-Mediated Phosphorylation of Bmi1 Regulates Its Chromatin Association and Growth Promoting Properties. 51st American Society of Hematology Annual Meeting 2009年12月5日 ニューオーリンズ (米国)

3) 早川 文彦

MAP キナーゼシグナル経路によるリンパ球系転写因子 Pax5 の機能調節 第71回日本血液学会 2009年10月25日 京都国際会議場 (京都)

4) 倉橋 伸悟

Oncogenic fusion protein PAX5-PML acts as a dominant negative on both PAX5 and PML. 第71回日本血液学会 2009年10月24日京都国際会議場 (京都)

5) 谷崎 亮平

Reversible expression of CD34 in Ph-positive human leukemia cells transplanted into NOG mice. 第71回日本血液学会 2009年10月23日京都国際会議場 (京都)

6) 宮田 泰彦

Cyclin C Regulates Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Quiescence. 第7回幹細胞シンポジウム 2009年5月16日 泉ガーデンギャラリー (東京)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 泰彦 (MIYATA YASUHIKO)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40467303