

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790908

研究課題名 (和文) 白血病におけるインテグリン関連アダプター分子の役割と治療への応用

研究課題名 (英文) Role of the integrin-mediated adapter protein in leukemia

研究代表者

瀬尾 幸子 (SEO SACHIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60401121

研究成果の概要 (和文) : Cas-L 欠損 p210Bcr-Abl トランスジェニックマウスにおいては、好中球の著明な臓器浸潤が認められており、それは Cas-L 欠損好中球で明らかに遊走能が増加し、接着能が低下していることためと考えられた。また、Cas-L 欠損細胞では脾臓へのホーミングが野生型の細胞に比べて増加する傾向にあった。一方、Cas-L の有無で Bcr-Abl 陽性骨髄前駆細胞の増殖能に差は認められなかった。

研究成果の概要 (英文) : We detected the significant infiltration of neutrophils to several tissues in Cas-L-deficient p210Bcr-Abl transgenic mice. Cas-L-deficient neutrophils showed the activated migration and the decreased adhesion ability. Moreover, in homing assay, bone marrow cells from Cas-L-deficient mice were detected in the spleen more than cells from wild-type mice. In proliferation assays and colony assays, there are no differences between Bcr-ABL positive cells and Cas-L-deficient Bcr-ABL positive cells. Therefore, the aberrant cell motility was considered to be the reason of extreme neutrophil infiltration in Cas-L-deficient p210Bcr-Abl transgenic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：血液内科学

## 1. 研究開始当初の背景

当研究室において癌遺伝子 v-crk による形質転換細胞内チロシンリン酸化蛋白質としてクローニングされた p130Cas (Crk associated substrate) は、Cas-L (Cas-lymphocyte type)/Hef1/NEDD9, Efs/sin と共に Cas ファミリーを形成している。Cas-L は ATL (成人 T 細胞性白血病/リンパ腫) 由来の細胞株において  $\beta 1$  インテグリン

によりチロシンリン酸化される蛋白質として同定された (JEM, 184:1365-75;1996)。Cas-L は接着斑におけるアダプター蛋白質であり、インテグリン下流のシグナル伝達に重要な働きをしている。その他、T/B 細胞レセプター、G 蛋白結合レセプター、TGF (Transforming growth factor)- $\beta$ 、レチノイン酸などから入るさまざまなシグナル伝達に関与していることが明らかとなって

いる。我々は Cas-L 遺伝子欠損マウスを作製し、Cas-L がリンパ球の遊走およびホーミングに重要であり、また成熟 B 細胞の分化にも重要であることを明らかにした (J Immunol, 175:3492-501;2005)。さらに我々は Cas-L がリンパ球系のみならず骨髄球系の細胞にも発現し、その遊走に関与していることを明らかにした (J Cell Biochem, 105:121-8;2008)。近年、Cas-L は乳癌、皮膚癌の転移に重要な働きをしていることが明らかとなってきた (Nature, 436:518-24;2005, Cell, 125:1269-81;2006)。我々との共同研究グループにより Cas-L 遺伝子欠損マウスを用いた実験において、Cas-L 遺伝子欠損マウスでは乳癌の肺転移が少なく、生存率が上がることが証明された (現在投稿中)。また Cas-L は神経細胞の成熟においても重要な役割を果たしており、近年は神経芽細胞腫、アルツハイマー病やパーキンソン病の病因に関与していることが示唆されている (Human Mol Genetics, 17:2863-67;2008, Devel Dyn 231:564-75;2004)。

一方、血液疾患における Cas-L の役割も徐々に明らかになってきている。ATL 細胞で発現の高い Cas-L は HTLV-1 でコードされている癌遺伝子 Tax と結合し、Tax による NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することが知られている (Oncogene, 24:1262-71;2005)。また Cas-L は以前より白血病関連遺伝子 Bcr-Abl によりチロシンリン酸化されることが知られていた。我々は Cas-L 遺伝子欠損マウスと Bcr-Abl トランスジェニックマウスを交配することにより、Cas-L 遺伝子欠損マウスにおいて、骨髄球系細胞の著明な臓器浸潤を認め、白血病の進行が早まることを明らかにしている。一方で白血病幹細胞における Cas-L の役割は未だ明らかになっていない。Golemis らは Cas-L がセリン・スレオニンキナーゼである Aurora A を活性化するという報告し (Nat Cell Biol, 7:937-946;2005)、さらに Cas-L と Aurora A の結合が HDAC(histone deacetylase)6 も活性化することを明らかにしている (Cell, 129:1351-63;2007)。Aurora A、HDAC6 共にその活性化が白血病と関与していることが知られており、現在 Aurora-A 阻害薬および HDAC6 阻害薬は Bcr-Abl 陽性白血病をはじめとした白血病に対する新規薬剤として開発されている。筆者のこれまでの解析により Cas-L は造血幹細胞レベルでは発現が弱い、成熟細胞においては高発現することが明らかとなっている。Cas-L の造血幹細胞における過剰発現が白血病発症あるいは進行に関与している可能性も考えられる。実際、急性骨髄性白血病における VLA-4( $\alpha 4\beta 1$  インテグリン)の発現が白血病の治療抵抗性の指標となるとの報告 (Nat

Med, 9:1158-65;2003)があり、 $\beta 1$  インテグリンにより活性化された Cas-L が腫瘍の悪性化に関与している可能性がある。Cas-L のファミリー蛋白質である p130Cas は過剰発現することにより乳癌のエストロゲン抵抗性に関与していることが報告 (J Natl Cancer Inst, 92:112-20;2000)されており、Cas-L の過剰発現が治療抵抗性を導く可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

### (1) Cas-L の造血幹細胞および前駆細胞における機能を明らかにする

我々は Cas-L 遺伝子欠損マウスを用いて、Cas-L の成熟リンパ球および好中球における機能を明らかにしてきた。しかしながら造血幹細胞あるいは造血前駆細胞における Cas-L の機能は全く分かっていない。Cas-L の造血幹細胞および造血前駆細胞における機能を明らかにする。また Cas-L が造血幹細胞において過剰発現した際の変化について、細胞レベルおよび個体レベルで明らかにしていく。

### (2) Cas-L の骨髄性白血病あるいは骨髄増殖性疾患における機能を明らかにする

筆者は p210Bcr-Abl トランスジェニックマウスと Cas-L 遺伝子欠損マウスとの交配により、Cas-L の欠損が白血病細胞の臓器浸潤を促進させることを明らかにしたが、白血病幹細胞レベルでの Cas-L の機能はまだ明らかになっていない。p210Bcr-Abl トランスジェニックマウスを用いて、幹細胞レベルでの Cas-L の発現量、リン酸化に変化がないか、さらに Cas-L の上流および下流シグナル伝達経路に変化がないかを確認する。また、Cas-L の発現・リン酸化に差があった場合、Cas-L に影響を与えているシグナル経路を明らかにする。さらに、Cas-L を過剰発現させることにより、治療抵抗性が出現するか否かの検討を行う。一方で、患者検体を用いて白血病における Cas-L の発現、およびリン酸化の変化を調べる。その際、同時に Aurora A、HDAC6 の解析も行い、これら分子との関連を明らかにし、臨床応用への道を探る。

## 3. 研究の方法

### (1) Cas-L の正常造血幹細胞および前駆細胞における機能を明らかにする。

①Cas-L が正常造血幹細胞および造血前駆細胞においてどのような発現分布を示しているか確認し、その機能解析を Cas-L 遺伝子欠損マウス由来の造血幹細胞を用いることで比較検討を行う。

②Cas-L が過剰発現した場合に造血幹細胞の機能がどのように変化するか、また Cas-L が関与しているシグナル伝達系がどのように

変化を来すのかを検討する。

(2) Cas-Lの白血病あるいは骨髄増殖性疾患における機能を明らかにする。

①p210Bcr-Abl トランスジェニックマウス由来の白血病細胞を用いて、幹細胞レベルでのCas-Lの発現量、リン酸化に変化がないか、さらにCas-Lの上流および下流のシグナル伝達における変化を確認する。Cas-L 遺伝子欠損マウスとの交配により、Cas-Lの有無が白血病幹細胞の動態に影響を与えていないか確認する。

②白血病細胞にCas-Lを過剰発現させることにより、腫瘍の進行および治療抵抗性に変化が生じるか否かの検討を行う。

③患者検体を用いて白血病におけるCas-Lの発現、およびリン酸化の変化を調べる。その際、同時にAurora A, HDAC6の解析も行い、これらの分子との関連を探る。

#### 4. 研究成果

(1) Cas-Lの正常造血幹細胞および前駆細胞における機能について

Cas-Lが正常造血幹細胞および造血前駆細胞においてどのような発現分布をしているか確認するため、マウス骨髄細胞を各分化段階(HSC, CMP, GMP, MEP, CLP)でソーティングし、定量PCRにて発現量を確認した。その結果CLPでは比較的高発現していたが、他の分画では発現を認めるものの弱い発現のみであった。一方、定量PCRを施行した際、同時にCasの発現も確認したところ、Casが造血幹細胞で発現されていることが明らかとなっており、Cas-L欠損状態におけるCasの相補的役割を明らかにしていくことも必要であると考えられた。

また、Cas-Lの有無における骨髄増殖能の変化を明らかにするため、コロニーアッセイを行なったが、Cas-L遺伝子欠損骨髄細胞の増殖能に差は認められなかった。

(2) Cas-Lの白血病あるいは骨髄増殖性疾患における機能について

①Cas-Lの骨髄増殖性疾患における機能を明らかにするため、p210Bcr-AblトランスジェニックマウスとCas-Lノックアウトマウスの交配を行ない、p210Bcr-Abl陽性造血幹細胞および前駆細胞のCas-L有無における動態を比較した。その結果、p210Bcr-Abl陽性造血幹細胞および前駆細胞においてCas-Lの欠損はコロニーアッセイ、サイトカインによる増殖試験では明らかな差は認めなかった。また、アポトーシスに関しても有意差はなかった。

Cas-L欠損 p210Bcr-Ablトランスジェ

ニックマウスにおいては、白血病進行が早まることが明らかとなっており、その原因として脾臓、肺など様々な臓器への著明な好中球の浸潤がその原因の一つと考えられた。そこで、Cas-L欠損好中球の機能解析を行ったところ、好中球に対する遊走刺激因子(fMLP)を用いた遊走実験では、Cas-L欠損好中球では明らかに遊走能が増加していた。また好中球の接着能の検討も行なった。好中球に対する重要な接着因子(VCAM-1)を用いて接着能を調べたところCas-L欠損好中球では著明に接着能が低下していた。これらのことからCas-L欠損好中球では骨髄から他の臓器への浸潤が起こりやすい可能性が考えられた。またさらにこれらのことを確認するためにCas-L欠損好中球およびCas-L欠損造血幹細胞を用いたホーミング実験を行った。その結果、Cas-Lを欠損した細胞においては脾臓へのホーミングが野生型の細胞に比べて増加する傾向にあったが、著明に増加しているといえるまでには至らなかった(論文投稿中)。

② Bcr-Abl陽性細胞株K562にCas-Lを恒常的に過剰発現させた細胞株を作製し、Cas-Lの過剰発現が増殖に影響を及ぼすか検討を行なった。その結果、過剰発現株と野生株で増殖に有意差は認められなかった。また細胞周期に変化が生じていないか検討を行ったが、明らかな差異は認められなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Izumchenko, E., Singh, MK., Plotnikova, OV., Tikhmyanova, N., Little, JL., Serebriiskii, IG., Seo, S., Kurokawa, M., Egleston, BL., Klein-Szanto, A., Pugacheva, EN., Hardy RR., Wolfson, M., Connolly, DC., Golemis, EA. NEDD9 promotes oncogenic signaling in mammary tumor development. *Cancer Res.* 69, 7198-206 (2009)査読有

[学会発表] (計1件)

①第29回The American Society for Cell Biology. JL. Little, E Izumchenko, S Seo, M Kurokawa, BL. Egleston, A Klein-Szanto, EA. Golemis. HEF1/NEDD9 is required for initiation of HER2/*Neu*-dependent mammary tumors, and supports the luminal progenitor cell population. (米国,

Philadelphia, 2010.12.14)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬尾 幸子 (SEO SACHIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60401121

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: