

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790919

研究課題名（和文） 細胞周期制御分子 Cdh1 の造血器特異的不活化による細胞分化制御機構の解明

研究課題名（英文） Analyzing the mechanism of cell differentiation in hematopoiesis through conditional gene-trap of the cell cycle regulator Cdh1.

研究代表者

石澤 丈 (ISHIZAWA JO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60445260

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞周期制御分子 Cdh1 と細胞分化・悪性腫瘍における偽性分化との関連に着目し、造血器を実験の舞台として選択し研究を行った。申請者はこれまでに Cdh1 造血器特異的不活化マウスの作製に成功し、正常造血細胞では Cdh1 不活化により遺伝子毒性ストレスに対する脆弱性が惹起されることを証明した。申請者はその後、Cdh1 の造血器悪性腫瘍における機能にも着目し、B 細胞性急性リンパ性白血病（以下 B-ALL/LBL）モデルマウスの悪性腫瘍細胞においてもやはり Cdh1 不活化による細胞脆弱性が引き起こされる可能性を示唆する現象を観察した。また、これらの悪性腫瘍細胞を二次移植・三次移植するとその予後が一次移植群と逆転した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the role of the cell cycle regulator Cdh1 in hematopoietic system, focusing on the relationship between Cdh1 and cell differentiation/pseudodifferentiation in malignancies. We generated *Cdh1* conditional gene-trap mice in which Cdh1 is downregulated specifically in hematopoietic cells, and proved that Cdh1 deficiency causes hematopoietic cell fragility against genotoxic stress. From the point of view of its role in hematological malignancies, we experienced the phenomenon suggesting that Cdh1 deficiency cause cell fragility also in B cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma (B-ALL/LBL) model mice. Furthermore, it is found that secondary and tertiary Cdh1-deficient B-ALL/LBL mice tend to reveal poorer prognosis than Cdh1-intact ones, which is the opposite result from that of primary B-ALL/LBL mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：血液腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

Cdh1 は細胞周期における M 期後期から G1 期にかけての anaphase promoting complex (APC) の活性化を担い、細胞周期に重要な役割を果たす。中でも最大の役割とされているのが、Cyclin A・Cyclin B・Skp2 などの細胞

周期回転に関わる分子を分解に導くことで cyclin dependent kinase (Cdk) 活性を低く保持し、G1 期の長さを一定時間に維持することである。また近年になり、最終分化に至った神経細胞の G0 期維持を担うこと (*J. Neurosci.* 25: 8115-, 2005)、またヘテロ接合性

Cdh1 ノックアウトマウスにおける脳室下層(神経幹細胞に富む)にある細胞の G0 期維持を担う可能性が報告され(*Nat Cell Biol.* 10: 802-811, 2008)、G0/G1 期制御因子としての機能が着目されつつある。そこで申請者は、Rb, E2F, Cdk inhibitor などの他の代表的な G0/G1 期制御因子(*Cell Cycle.* 6: 2932-8, 2007)と同様、**Cdh1 が細胞周期のみならず細胞分化や悪性腫瘍における偽性分化へも寄与する、という第一の仮説を立てた**。一方で、Cdh1 は近年がん抑制因子としての可能性が着目されてきている。特に大腸がん(*Am J Pathol.* 173: 217-228, 2008)・乳がん・悪性リンパ腫(*Am J Pathol.* 170: 1793-1805, 2007)のヒト病理検体を用いた報告では、主に Cdh1-Skp2-p27 といったプロテアソーム分解経路に着目した組織免疫染色結果から、ヒト悪性腫瘍検体における Cdh1 の不活化を示唆する報告があり、また上述のヘテロ接合性 Cdh1 ノックアウトマウスでは上皮がん・形質細胞増殖・骨髄異形成症候群の発症率が高い傾向が見られた。悪性腫瘍の病態に関連して、Cdh1 が悪性腫瘍(細胞株)における DNA 修復機構、特に G2/M チェックポイントを担うことも示されている(*Cell.* 134: 256-267, 2008)。更にはヒト線維芽細胞において(*Oncogene.* 27: 907-917, 2008)、また上述の Cdh1 ノックアウトマウスに関して、Cdh1 不活化により染色体異常が蓄積することも報告されており、癌抑制因子としての要素を裏付けている。しかし一方で、Cdh1 の下流分子に p16 の転写促進因子 Ets2 があり、Cdh1 の不活化によって神経細胞の細胞老化が促進されることも報告された(*Nat Cell Biol.* 10: 1083-9, 2008)。このことは、Cdh1 不活化がむしろ悪性腫瘍の増悪を抑える要素をも持つことを示唆する。更には、G0/G1 期制御因子として知られる p21 の不活化による細胞周期回転は必ずしも悪性腫瘍の増悪だけを引き起こすのではなく、白血球幹細胞の自己複製能を障害するとの報告(*Nature.* 457: 51-, 2009)がある。そこで申請者は、**Cdh1 不活化は必ずしもがん促進に働くだけでなく、悪性腫瘍細胞ないしはがん幹細胞の脆弱性の一因ともなる、との第二の仮説を立てた**。

2. 研究の目的

Cdh1 の細胞分化・悪性腫瘍への寄与を解明する目的。

3. 研究の方法

細胞分化解析に最適な実験系として、自身の臨床の専門分野でもある造血器を選択した。平成 20 年当時所属研究室に既に存在していた Cdh1 gene trap(以下、GT)マウスは胎生致死(10.5 日前後)であり胎生肝や成獣造血の解析が不可能であった。そこで申請者は、造血器特異的 Cdh1 GT マウスの作製に着手

した。すなわち、Cdh1 GT マウス由来の ES 細胞に Cdh1 cDNA をノックインし胎生致死を回避できるマウスを作製、このマウス(以下、Cdh1^{fl/fl} マウス)では Cre リコンビナーゼ下においてのみ Cdh1GT が再現されるように cDNA 配列を配置した。これらと Mx1-Cre マウスとを交配し、テストマウス(Mx1-Cre (+); Cdh1^{fl/fl} マウス)とコントロールマウス(Mx1-Cre (-); Cdh1^{fl/fl} マウス)とを作製し、pIpC 腹腔内 5 日間連日投与により day7 までには Cdh1 タンパク量の低下が起こり、その低下が機能的にも有意である(すなわちユビキチン化の標的タンパクの蓄積を引き起こす)ことを確認した。この系を用いて、悪性腫瘍の研究に先行し、まずはこのマウスを活用した成獣正常造血の解析から着手した。また、造血器悪性腫瘍の解析の舞台としては、既に所属研究室内で手法が確立されていた myc 誘導性の B-ALL/LBL モデルマウスの系をまずは選択した。具体的には、上記コントロールマウス由来の Cdh1 正常骨髄細胞と、テストマウス由来の Cdh1 不活化骨髄細胞とにそれぞれ myc がん遺伝子をレトロウイルスベクター(IRES ベクターにより GFP を同時発現させ sorting に活用できる)により導入し、放射線照射した正常マウスに尾静脈より移植する系を用い、その表現型の比較解析を行った。

4. 研究成果

(1)まずは、正常造血において得られた知見を列記する。また、これらの結果は *Cancer Science* 誌に発表した。

造血器特異的 Cdh1 不活化マウスにおいて、pIpC 投与後 4 カ月までの末梢血検査を行ったところ、白血球及びその分画(Mac1, Gr1, B220, CD3, CD4/8 で FACS 解析も施行)・赤血球・血小板数に変化を生じなかった。

しかし骨髄造血細胞に着目すると、Cdh1 不活化によって骨髄有核細胞、特に成熟系譜細胞の有意な細胞数低下が認められ、その現象が放射線照射下で助長されることが判明した。

また、放射線照射下における骨髄細胞数減少は G2/M チェックポイント機構の破綻による分裂期細胞崩壊が主要因となっていることを証明した。

すなわち、Cdh1 は、(放射線照射ないしは生理的条件下における)遺伝子毒性ストレスに対し、G2/M チェックポイントを介した正常造血細胞の保護機能を有していることを証明した。

しかし未だ解釈が不十分な点として、の放射線照射下での骨髄細胞数低下の内訳として「長期及び短期造血再構築能を持つ造血器細胞」(以下、long-term 及び short-term

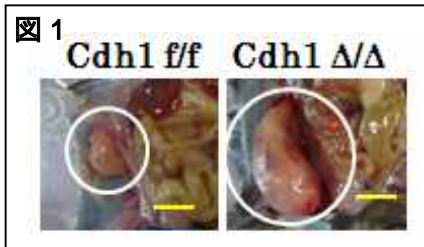
HSC) が特異的に減少したという点がある。一方、生理的条件(放射線非照射)下ではむしろ short-term HSC が増加傾向を示し、また Cdh1 不活化骨髓細胞を用いた colony replating assay においてコロニー形成能が Cdh1 正常骨髓細胞に比して低下した。このことは、Cdh1 不活化により幹細胞分画での細胞周期回転の亢進と自己複製能の低下が惹起されたことを示唆する。造血器幹細胞において、G0 期からの細胞周期への脱出がその自己複製能を低下させ、かつ遺伝子毒性ストレスへの脆弱性を惹起することは既に報告されている事実である(Cell Stem Cell. 4: 37-48, 2009)。従って申請者はこの結果を受けて、Cdh1 不活化により long-term HSC における G0 期からの脱出が惹起された結果として、放射線非照射下では short-term HSC への分化が進み、放射線照射下では short-term 及び long-term HSC の脆弱性が顕在化するという新たな作業仮説を構想し、Cdh1 不活化骨髓幹細胞における G0 期プロファイリングを計画している。

(2) また、myc がん遺伝子誘導性の B-ALL/LBL マウスにおける Cdh1 不活化の意義を解析した結果は以下のようである。これまでのところ、Cdh1 正常 B-ALL/LBL マウスの表現型と比較し、以下の現象を観察している。

Cdh1 不活化骨髓細胞(図中は Cdh1 Δ/Δと記載)を起源とした場合、

B-ALL/LBL が同様の表現型として同程度に発症した

Cdh1 正常群に比して巨大なリンパ節腫瘍を形成する傾向にあり(図 1)、かつその腫瘍が自然退縮する現象が見られた



一次移植群(図中は 1° BMT と表記)については、Cdh1 Δ/Δ の群の方が予後良好(p 値 < 0.01)であった。しかし腫瘍細胞を二次移植・三次移植するとその予後は逆転(図中は 2° BMT 3° BMT)し、Cdh1 Δ/Δ の群の方が予後不良(p 値 < 0.05)となった(図 2)。

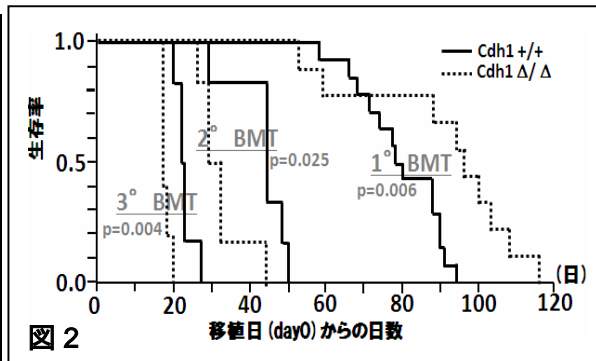


図 2

本実験開始当初の仮説は「(正常細胞で証明した) Cdh1 不活化に伴う遺伝子毒性ストレスに対する造血細胞の脆弱性が、myc がん遺伝子という遺伝子毒性ストレスによっても顕在化し、その結果白血病発症は抑制される」というものであった。しかしに記載の如く、本実験系では仮説に反して Cdh1 不活化骨髓細胞由来の B-ALL/LBL を発症し得た。これは非常に意義深い結果である。というのも、Oncomine のデータベースよりヒト臨床検体のマイクロアレイデータを検索すると、ヒト B-ALL/LBL 検体においても Cdh1 高発現と低発現の両群が存在し、申請者の得た結果に合致する。従って、本実験系は Cdh1 発現量の高低という観点において、ヒト B-ALL/LBL の病態モデルとなりうると考える。

の腫瘍の自然消退、図 2 における一次移植群で Cdh1 Δ/Δ 群が予後良好であることは、腫瘍細胞がより脆弱であることを示唆している。このことから申請者は Cdh1 不活化に伴う G2/M チェックポイントを内在させたまま B-ALL/LBL が発症しており、そのことが腫瘍細胞の脆弱性を生んでいるという新たな作業仮説を立てた。そこで、本実験系を活用し、放射線照射あるいは遺伝子毒性を持つ薬剤に対する反応を比較検討することで、Cdh1 の B-ALL/LBL における「予後因子」並びに「治療標的」としての可能性を検証したいと考えている。

また図 2 において、二次移植以降の予後が反転したことについても、上記作業仮説に基づき G2/M チェックポイントの破綻が、植え継ぎ実験の過程で遺伝子変異の可能性を高め、より悪性度の高い腫瘍細胞が形成されていくという可能性を探求している。申請者は、既に一次移植における両群の B-ALL/LBL 細胞を mRNA マイクロアレイ解析にかけ、DNA 修復機構の要とされる Rad9 に有意差があることを確認している。今後は、DNA 修復機構やチェックポイント、ゲノム不安定性という事象に焦点を絞り、更なる解析を進める計画である。

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)

- 1) Ishizawa J, Kuninaka S, Sugihara E, Naoe H, Kobayashi Y, Chiyoda T, Ueki A, Araki K, Yamamura K, Matsuzaki Y, Nakajima H, Ikeda Y, Okamoto S and Saya H: The cell cycle regulator Cdh1 controls the pool sizes of hematopoietic stem cells and mature lineage progenitors by protecting from genotoxic stress. **Cancer Sci** 102: 967-974, 2011, 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

- 1) Jo Ishizawa, Eiji Sugihara, Norisato Hashimoto, Shinji Kuninaka, Shinichiro Okamoto and Hideyuki Saya, Role of the Cell Cycle Regulator Cdh1 in Physiology and Pathology of Hematopoiesis, American Society of Hematology annual meeting 2011, 2011.12.10-13, poster #2419, San Diego

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

石澤 丈 (ISHIZAWA JO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 60445260