

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23710067

研究課題名（和文）

胸腺リンパ腫発症における放射線照射の標的細胞の同定とその幹細胞様性質の解析

研究課題名（英文）

Identification of cells of origin in lymphomas and the target of  $\gamma$ -radiation

研究代表者

郷 梨江香 (GO RIEKA) 新潟薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：40584769

研究成果の概要(和文):放射線誘発胸腺リンパ腫の発がん母体細胞の由来を明らかにするため、胸腺細胞特異的ながん抑制遺伝子 *Bcl11b* 片アレル欠失となるモデルマウスを作製し、放射線照射後の胸腺リンパ腫発症過程について解析した。発がん母体として特定の胸腺未分化細胞を、またその未分化細胞から生じる前リンパ腫細胞は増殖・分化能を保持することを明らかにした。一方、*Bcl11b* 片アレル欠失により未分化胸腺細胞は照射後の細胞周期停止に異常を示し、この停止異常が発がん母体細胞としての役割に貢献すると考えられた。

研究成果の概要(英文): Cell of origin in  $\gamma$ -radiation induced mouse thymic lymphomas remains obscure. In this study, we generated mouse models in which loss of one *Bcl11b* allele occurs in thymocytes at different developmental stages and examined expansion and differentiation of premalignant thymocytes after irradiation. We showed that thymocytes at the immature stage were cells of origin and premalignant thymocytes retained the capacity to proliferate and differentiate. Also, loss of *Bcl11b* allele in thymocytes led to impaired cell cycle arrest at S phase after irradiation, suggesting that the impairment contributes to the development of the premalignant thymocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

|       | 直接経費    | 間接経費    | 合計      |
|-------|---------|---------|---------|
| 交付決定額 | 3600000 | 1080000 | 4680000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学/放射線・化学物質影響科学 2003/A

キーワード：放射線発がん、発がん母体細胞、*Bcl11b* 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

放射線がターゲットとする細胞を明らかにすることは、発がん機構を考える上で重要であるが、不明確なままであった。未分化な骨髄幹細胞がそのターゲットと一般に考えられているが、*LMO2* 遺伝子の過剰発現マウスでは胸腺内細胞が分化能や自己複製能を獲得し、骨髄からの未分化細胞の供給なしに胸腺内で増殖・分化が進行することが報告されている。放射線誘発によるマウス胸腺リンパ腫の発症機構の解析から、放射線照射後初期の萎縮胸腺内に異常増殖する胸腺前リン

パ腫細胞が出現することを明らかにしてきたが、この前リンパ腫細胞に胸腺リンパ腫の発生母体細胞が含まれていると考えられた。この発がん母体細胞の形成にはがん抑制遺伝子 *Bcl11b* の片アレル欠失が必要であった。*Bcl11b*<sup>KO/+</sup> マウスは放射線照射に対する感受性が高く、照射後早期に前リンパ腫細胞の形成および胸腺リンパ腫の発症が見られる。

## 2. 研究の目的

胸腺リンパ腫における発がん母体細胞の由来が骨髄の未分化細胞由来か胸腺内の分化細胞由来かを明らかにするため、特定の分

化段階にある胸腺細胞特異的に *Bcl11b*<sup>fl0/+</sup> となるマウスを利用し、発がん母体細胞の同定を行う。さらに、照射後に形成される胸腺前リンパ腫細胞がもつ性質を明らかにし、がん幹細胞との関連性や発がん機構について解析する。

### 3. 研究の方法

(1) *Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup>、*CD4-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスの作製

当研究室で作製済みであった、*Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウス (Katsuragi et al.) と 2 種類の Cre マウスを交配し、それぞれ産仔を実験に用いた。*Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスは胸腺内の DN2 (CD4-, CD8-, CD44+, CD25+) 段階以降の胸腺細胞で Cre が発現し、胸腺細胞特異的に *Bcl11b*<sup>fl0/+</sup> となる。*CD4-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスは、DP (CD4+, CD8+) 段階以降の胸腺細胞で *Bcl11b*<sup>fl0/+</sup> となる。

(2) 発がん実験

8 週齢の *Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスに  $\gamma$  線 3Gy を 1 回全身照射し、照射後 300 日まで経過観察を行った。胸腺リンパ腫の発症は、努力呼吸の有無で判定した。これらの胸腺リンパ腫細胞や脾臓細胞の TCR  $\beta$  鎖組換えパターンや分化能について解析を行った。また、胸腺リンパ腫を発症したマウスの胸腺および脾臓の組織染色を行い、腫瘍組織の構造変化について解析した。

(3)  $\gamma$  線照射後初期の萎縮胸腺内細胞の解析

8 週齢の *Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> および *CD4-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスに  $\gamma$  線 3Gy を 1 回全身照射した。照射後 60 日で胸腺を摘出して以下に示す解析を行い、前リンパ腫細胞の出現の判定とその特徴の解析を行った。

①胸腺前リンパ腫細胞(クローナル増殖細胞)の検出

胸腺細胞から DNA を抽出し、T 細胞レセプターである TCR  $\beta$  遺伝子座の V(D)J 組換えパターンを PCR 法によって解析した。正常胸腺細胞ではすべての V(D)J 組換え 6 パターンが 6 本のバンドとして検出できるが、限られた特定の組換えパターンのみを示すときは、クローナル増殖する前リンパ腫細胞と判定した。

②胸腺前リンパ腫細胞の分化能の判定

CD4、CD8、TCR  $\beta$  の分化マーカーを用いてフローサイトメトリーにより、胸腺細胞を各分化段階に分類し、クローナル増殖する前リンパ腫細胞の分化について解析を行った。

また、DP 細胞で生じる TCR  $\alpha$  鎖の VJ 組換えパターンを調べるため、 $\gamma$  線照射後の胸腺細胞から RNA を抽出した。組換え頻度の高い V 領域と C 領域にプライマーを設定し、半定量的 RT-PCR 法により VJ 組換えパターンの解析を行った。

③胸腺前リンパ腫細胞の増殖能の判定

$\gamma$  線照射後 60 日のマウスに BrdU 100 $\mu$ l (10mg/ml) を腹腔投与し、1 時間後に胸腺を摘出した。上述の分化マーカーおよび BrdU 抗体を用いてフローサイトメトリーによる解析を行い、各分化段階の胸腺細胞における細胞増殖能を調べた。

(4) *Bcl11b* 遺伝子の LOH 解析

$\gamma$  線照射後の前リンパ腫細胞および胸腺リンパ腫細胞について、LOH 解析により *Bcl11b* の野生型アレル消失の有無を調べた。

(5)  $\gamma$  線照射直後の胸腺細胞における細胞周期の解析

8 週齢の *Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> および *CD4-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスに BrdU 100 $\mu$ l (10mg/ml) を腹腔投与し、1 時間後に  $\gamma$  線 1Gy を 1 回全身照射した。照射後 4 時間で胸腺を摘出し、*Bcl11b* 片アレル欠失が細胞周期停止に及ぼす影響について、フローサイトメトリーによる解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 発がん実験

*Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスに  $\gamma$  線 3Gy 1 回を全身照射して経過観察を行ったところ、照射後 300 日までに 5 頭中 4 頭において胸腺リンパ腫の発症を認めた (図 1)。*Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスは、胸腺内 DN2 段階以降の胸腺細胞において *Bcl11b*<sup>fl0/+</sup> となることから、骨髄の未分化細胞ではなく DN2 段階以降の胸腺内細胞が発がん母体細胞となり得ることが示唆された。

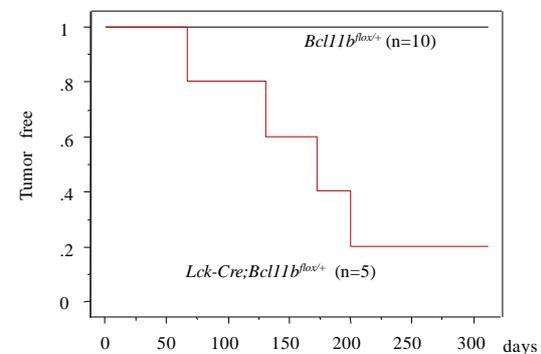


図 1.  $\gamma$  線照射後マウスの生存曲線

(2)  $\gamma$  線照射後初期の萎縮胸腺内細胞の解析

*Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスにおいて、 $\gamma$  線照射後、胸腺リンパ腫が発症したことから、照射後初期に見られる萎縮胸腺の解析を行った。 $\gamma$  線照射後 60 日の *Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> および *CD4-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスの胸腺を摘出し、その胸腺細胞数をコントロール群である非照射および  $\gamma$  線照射後の *Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスと比較した。*Lck-Cre;Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスの胸腺細胞数はコントロール群の胸腺細胞数と比べて有意に減少しており、胸腺が萎縮した状態であった (図 2)。一方、

*CD4-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスの胸腺細胞数は、コントロール群と同程度であり、胸腺の萎縮は見られなかった。

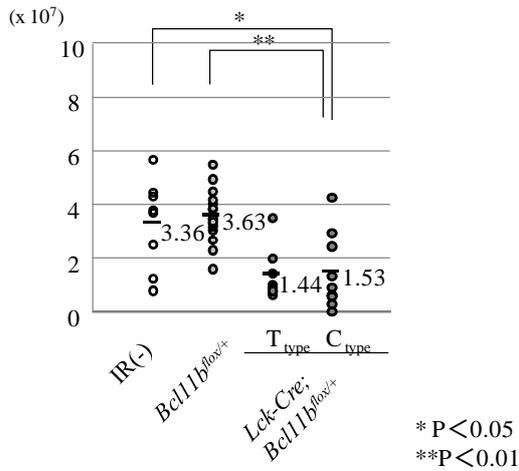


図 2.  $\gamma$ 線照射後胸腺細胞数の比較

次に、 $\gamma$ 線照射後の胸腺細胞における TCR  $\beta$  鎖の組換えパターンの解析を行った。すると、*Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスの 50% (9/18 サンプル)において、限られた特定の V(D)J 組換えパターンのみが検出され (C type とする)、クローナル増殖する胸腺細胞の存在が認められた (図 3)。

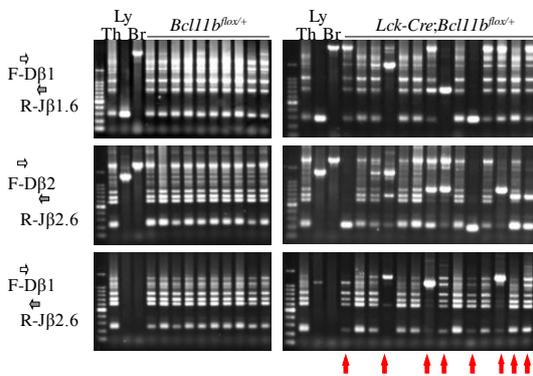
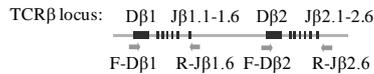


図 3. TCR  $\beta$  鎖の DJ 組換えパターン解析

一方、*CD4-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスにおいては、全てのサンプルで V(D)J 組換えパターンはコントロール群と同様に複数の組換えパターンが見られた (T type とする)。以上から、 $\gamma$ 線照射後、*Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスにおいて胸腺前リンパ腫細胞が出現することが示された。*Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*は、胸腺 DN2 段階以降の胸腺細胞でのみ、*Bcl11b<sup>KO/+</sup>*となるため、これ以降に発がん母体細胞が含まれていると考えられた。一方、*CD4-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスでは前リンパ腫細胞は出現しないと

考えられたため、DP 段階以降の胸腺細胞は、発がん母体細胞とはならないと判断した。

しかし、*Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスの前リンパ腫細胞の分化についてフローサイトメトリー解析で調べると、これらの前リンパ腫細胞は、TCR  $\beta$  発現の高い DP 以降 CD8SP までの分化細胞から主に構成されていた (図 4)。

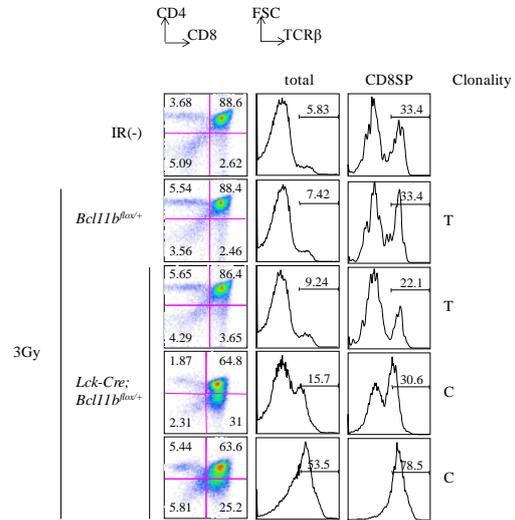


図 4.  $\gamma$ 線照射後胸腺細胞の分化パターン

*Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*の前リンパ腫細胞が DP 以降の分化した表現型を示したことから、DP 段階で生じる TCR  $\alpha$  鎖の VJ 組換えパターンについて半定量的 RT-PCR 法で調べた。すると、これらの前リンパ腫細胞においても、コントロール群と同様に複数の組換えパターンが検出された (図 5)。これらのことから、*Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*の前リンパ腫細胞は、胸腺未分化細胞から DP 以降の細胞へ分化する能力を保持していると考えられた。

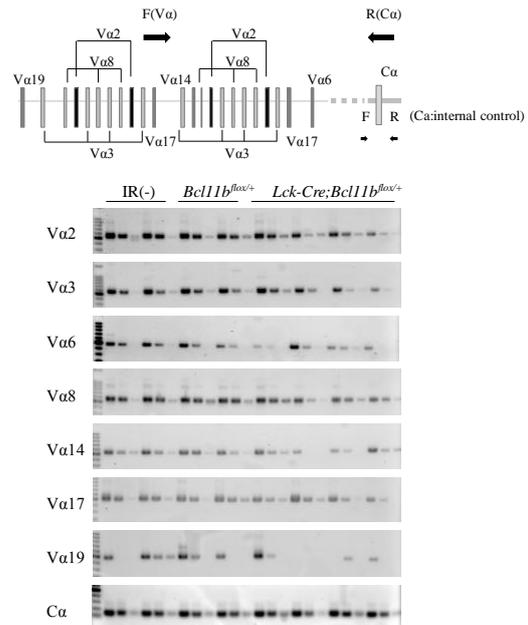


図 5. TCR  $\alpha$  鎖の VJ 組換えパターン解析

次に、 $\gamma$ 線照射後の *Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>* マウス前リンパ腫細胞の細胞増殖能について BrdU の取り込みをフローサイトメトリーを用いて解析した。これらの前リンパ腫細胞においては BrdU の取り込みが高く、特に TCR  $\beta$  発現の高い分化の進行した胸腺細胞において取り込みが増加していた(図 6)。通常、野生型マウスにおけるこれら分化胸腺細胞の BrdU 取り込みは低い。 $\gamma$ 線照射後の胸腺前リンパ腫を構成する分化細胞は、細胞増殖が亢進していると考えられた。

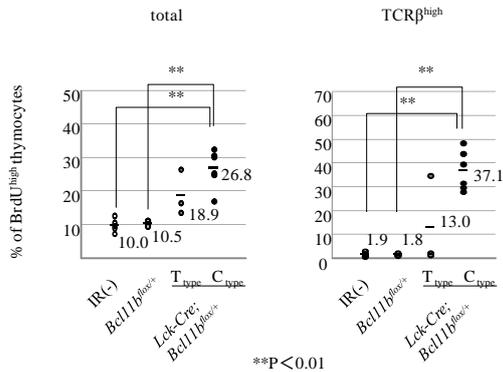


図 6.  $\gamma$ 線照射後胸腺細胞の BrdU 取り込み

### (3) 胸腺リンパ腫発症マウス胸腺の解析

$\gamma$ 線照射後、*Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスでは胸腺リンパ腫を発症したが、これらのマウスの胸腺および脾臓細胞における TCR  $\beta$  鎖組換えパターンの解析を行った(図 7)。その結果、前リンパ腫では胸腺内に留まっていると考えられた異常増殖胸腺細胞(クローナル増殖胸腺細胞)が脾臓にも存在することが認められた。また、胸腺および脾臓の組織 HE 染色から、胸腺リンパ腫発症マウスの胸腺および脾臓で、これらの異常増殖細胞の浸潤により正常な構造が消失していることが明らかとなった(図 8)。

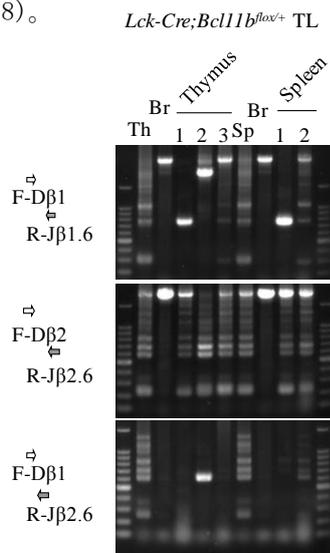


図 7. TCR  $\beta$  鎖の DJ 組換えパターン解析

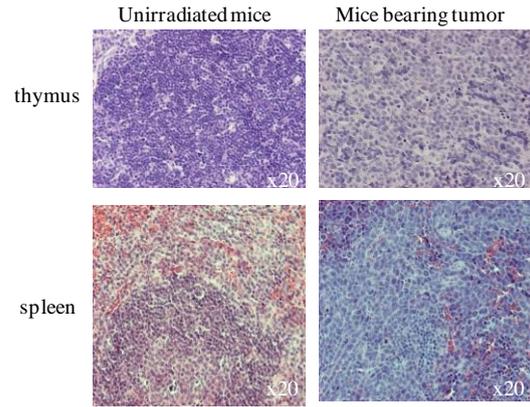


図 8. 胸腺リンパ腫発症マウスの胸腺および脾臓の組織像

### (4) *Bcl11b* 遺伝子の LOH 解析

$\gamma$ 線照射により生じた *Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>* マウスの前リンパ腫細胞および胸腺リンパ腫細胞において、がん抑制遺伝子 *Bcl11b* の野生型アレル消失の有無を調べるため、LOH 解析を行った。前リンパ腫細胞および胸腺リンパ腫細胞のいずれも野生型アレルの消失は認められず、*Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスの胸腺リンパ腫発症においても *Bcl11b* がハプロ不全型がん抑制遺伝子であることを確認した(図 9)。

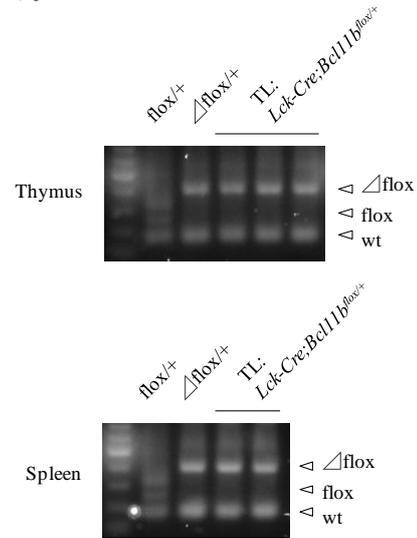


図 9. *Bcl11b* 遺伝子の LOH 解析

### (5) *Bcl11b* 片アレル欠失が細胞周期停止に及ぼす影響

胸腺リンパ腫の発症母体細胞の形成には *Bcl11b* 遺伝子片アレル欠失が必要であるが、このことが放射線照射後の胸腺細胞に及ぼす影響について解析した。BrdU を腹腔内投与した *Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスに、 $\gamma$ 線 1Gy を照射し、照射 4 時間後の胸腺細胞について細胞周期解析を行った。*Lck-Cre;Bcl11b<sup>lox/+</sup>*マウスの ISP(CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>, TCR  $\beta$  low)分画で

は、G1 期および S 期に相当する BrdU+ FSC small/BrdU+ FSC large 細胞の割合が、*Bcl11b*<sup>lox/+</sup>マウスの ISP 細胞と比較して有意に増加していた(図 10)。これらの結果から、*Lck-Cre*;*Bcl11b*<sup>lox/+</sup> マウスの ISP 細胞では、 $\gamma$  線照射後に生じる細胞周期停止が減弱することが示めされた。*Bcl11b* 片アレル欠失による細胞周期停止の異常が、一部の胸腺細胞に DNA 損傷を蓄積させる要因となり、胸腺前リンパ腫細胞の形成を促進すると考えられた。

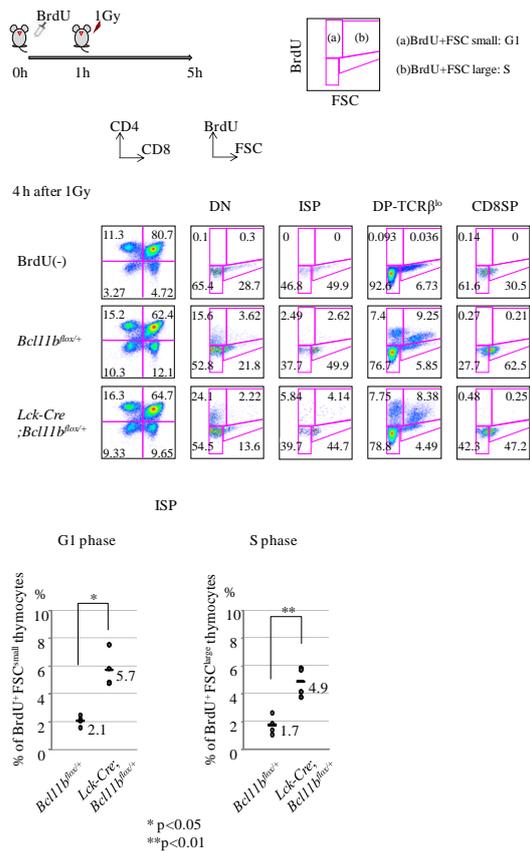


図 10.  $\gamma$  線照射直後の胸腺細胞における細胞周期解析

## 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 2 件)

1. Go R, Hirose S, Katsuragi Y, Obata M, Abe M, Mishima Y, Sakimura K, Kominami R. Cell of origin in radiation-induced premalignant thymocytes with differentiation capability in mice conditionally losing one *Bcl11b* allele. *Cancer Sci*. 査読有 (in press)  
doi: 10.1111/cas.12193.
2. Go R, Takizawa K, Hirose S, Katsuragi

Y, Aoyagi Y, Mishima Y, Kominami R. Impairment in differentiation and cell cycle of thymocytes by loss of a *Bcl11b* tumor suppressor allele that contributes to leukemogenesis. *Leuk Res*. 査読有 36 (2012) 1035-40.  
doi: 10.1016/j.leukres.2012.04.028.

[学会発表] (計 4 件)

1. 郷 梨江香 「放射線誘発胸腺リンパ腫発症における放射線照射の標的細胞、発がん母体細胞の同定」 日本放射線影響学会第 55 回大会 2012 年 9 月 7 日 東北大学(宮城県)
2. 郷 梨江香 「分化胸腺細胞が放射線誘発胸腺リンパ腫の発がん母体細胞、放射線照射の標的細胞と成り得る」 日本放射線影響学会第 54 回大会 2011 年 11 月 18 日 神戸商工会議所会館(兵庫県)
3. 郷 梨江香 「Cells in the thymus of the gamma-radiation target and of origin in lymphoma in *Bcl11b* heterozygous mice」 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日 名古屋国際会議場(愛知県)
4. Rieka Go 「Cells in the thymus of the gamma-radiation target and of origin in lymphoma in *Bcl11b* heterozygous mice.」 14th International Congress of Radiation Research 2011 年 9 月 1 日 The Palace of Culture and Science(ポーランド)

[図書] (計 1 件)

中村 卓郎(編集委員) 株式会社エル・アイ・シー「series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用ーがん」 2012 年 p.417-426(木南凌、郷梨江香)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

郷 梨江香 (GO RIEKA)

研究者番号 : 40584769

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし