

## 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 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790434

研究課題名（和文）新規急性B細胞性リンパ性白血病（B-ALL）のモデルマウスの作製

研究課題名（英文） A new mouse model of acute B lymphocytic leukemia (B-ALL)

研究代表者

倉田 盛人 (KURATA MORITO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40451926

研究成果の概要（和文）：

*Blnk* (*Bash/SLP-65*)はB細胞における癌抑制遺伝子として知られている。小児B-ALLにおいて*BLNK*の欠損があることが知られているが、マウスでノックアウト行ってもB-ALLの発症頻度は低く、腫瘍発症にはその他の協調遺伝子の存在が考えられている。

我々は、これまでにレトロウイルス変異導入システムを用いて、*Blnk*欠損に協調的に働く遺伝子として*Cebpb*を同定した。*Cebpb*はLAPとLIPの2つのアイソフォームを持つことが知られている。LAPとLIPのトランスジェニックマウスと*Blnk*欠損マウスを交配させることによって、LAPトランスジェニックかつ*blnk*欠損マウスを作成すると、早期にB-ALLを発症した。また、ALL未発症のマウス骨髄において、*Blnk<sup>ko/ko</sup>/LAP tg*では成熟B細胞の数の減少が見られ、IL-7R $\alpha$ 強陽性の割合が増加していることが明らかとなり、B細胞の成熟障害が背景にあることが考えられた。さらに、ヒトのB-ALL細胞株においても、*C/EBP $\beta$* をノックダウンさせることで、細胞の増殖を抑えることが明らかとなった。

これらのことより、*Blnk*欠損と*C/EBP $\beta$* LAPが協調的にB-ALL発症に関与することが明らかとなり、このことはヒトB-ALLにも応用可能であると思われる。

研究成果の概要（英文）：

*Blnk* (*Bash/SLP-65*) encodes an adaptor protein of the B-cell receptor signaling and functions as a tumor suppressor. Loss of function mutations of *BLNK* have been observed in human preB-ALL, however, only a subset of *Blnk* ko mice develop preB-ALL, suggesting that cooperative events with *Blnk* deficiency are required for complete leukemogenesis. Retroviral tagging was performed to identify the cooperative genes, and the *Cebpb* locus was the most frequent common integration site. *Cebpb* encodes two protein isoforms of LAP and LIP. Transgenic mice bearing LAP or LIP were generated, mated with *Blnk* ko mice, and transgenic expression of LAP significantly accelerated the ALL onset of *Blnk<sup>ko/ko</sup>* mice.

Moreover, significant decrease of mature B-cells and increase of IL-7R $\alpha$ -positive fractions in the bone marrow of non-neoplastic *Blnk<sup>ko/ko</sup>/LAP tg* mice was evident. Knockdown of *C/EBP $\beta$*  in a human preB-ALL cell line lacking *BLNK* expression suppressed cellular growth. These results indicate that *C/EBP $\beta$* LAP promotes leukemogenesis in the absence of *BLNK* including human B-ALL.

## 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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：①白血病 ②発がん ③B細胞

### 1. 研究開始当初の背景

白血病発症の一つの原因として染色体転座が知られており、実際に慢性骨髄性白血病の原因となる *bcr-abl* をマウスの骨髄幹細胞に導入して移植を行うと白血病を引き起こすことが知られている。このように、骨髄性白血病のモデルマウスは多く存在するものの、小児に比較的高頻度に発症する B 細胞性急性リンパ性白血病(B-ALL)のモデルは極めて少ないが現状である。このモデルマウスを作製することにより、新規治療のターゲット検索などに利用したいと考えている。

### 2. 研究の目的

白血病において、骨髄性白血病のモデルマウスは多く存在するが、小児に比較的高頻度の高い B 細胞性急性リンパ性白血病(B-ALL)のモデルは少ないのが現状である。これまでに、我々はヒトの B-ALL において高頻度に機能欠損が報告されている *BLNK* に着目し、レトロウイルス変異導入システムを用いて、*BLNK* 欠損と協調的に白血病を引き起こす候補遺伝子として *cebpb* を同定した。B-ALL における *BLNK*、*C/EBPβ* の関連性を解析することにより、モデルマウスを作成し、ヒトに応用可能な白血病発症の病態モデルの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### I : *C/EBPβ*(LAP・LIP)トランスジェニックマウスと *Blnk*(ko/ko)マウス交配による白血病発症マウスの解析

マウス骨髄移植は骨髄球系の白血病発症を検証するには有用な手段であるが、リンパ系の白血病を解析する上では困難を伴う可能性も考えられる。そこで、B 細胞特異的に、*C/EBPβ* を発現させるように、*LCK promoter + Ig heavy chain enhancer* を用いてトランスジェニックマウスの作成を行い、白血病発症について検討する。また、腫瘍発症におけるバックグラウンドの解析を行う。具体的には、B 細胞の成熟・分化について解析を行う。

#### II : ヒト材料を用いた *BLNK* 欠損の検索と *C/EBPβ* 発現の詳細な解析

ヒト B-ALL の細胞株を用いて、*BLNK* と *C/EBPβ* の解析を行う。また、ノックアウト実験などを行い機能的な解析を行う。

#### III : *BLNK* 欠損と *C/EBPβ*(LAP・LIP)の協調するシグナルの同定

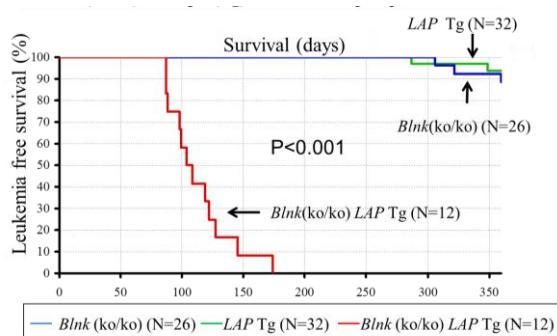
siRNA で *C/EBPβ* のノックダウンと *BLNK* 欠損により増強するシグナルとの協調作用のキャンセルを検証する。キャンセル効果が確認できた場合、そのシグナルの出来る限り上流までさかのぼり、既知の *BLNK* のシグナルカスケードと *C/EBPβ* のカスケードを繋げることを目標とする。

協調作用がタンパク質同士の会合により調節されている可能性も考えられ、その場合は免疫沈降法などで検証をおこなう。

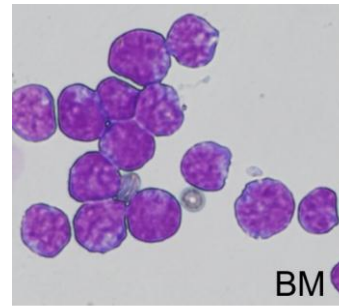
#### 4. 研究成果

我々は、これまでに BLNK 欠損状態と腫瘍化に相乗的に働く因子として C/EBPβ(LAP・LIP)を同定してきた。ただし、C/EBPβは single exon の分子であり、LAP の exon は LIP を含有してしまうが、各々の配列をいれたトランスジェニックマウスでは、各々の分子のみの発現が確認されることをウェスタンブロット法にて確認した。blnk(ko/ko)と交配させることによって、”LAP-Tg”, “LIP-Tg”, “blnk(ko/ko)+LAP-Tg”, “blnk(ko/ko)+LIP-Tg” の genotype を有するマウスの作成に成功した。

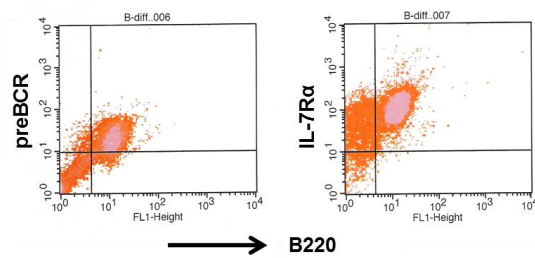
1) BLNK ノックアウトマウスと交配を行い blnk(ko/ko)+LAP(Tg)の作製を行った。その結果、”blnk(ko/ko)+LAP(Tg)”において、blnk(ko/ko)より早期に B-ALL 発症に誘導に成功した。blnk 欠損と LAP が協調的に働くことにより腫瘍を誘導したことが考えられる。



形成された腫瘍は、形態学的には繊細なクロマチンをもつ芽球の増生が見られる。

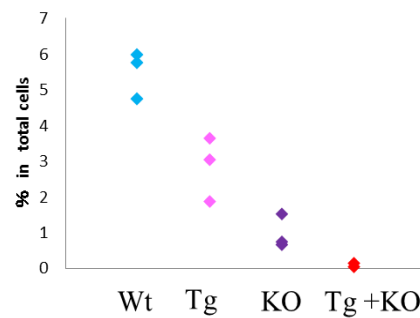


フローサイトメーターにおいて、B220+, preBCR+, IL-7Rα+, IgM+, CD24+, CD43+, CD3-, Mac-1-, Gr-1-を呈する。



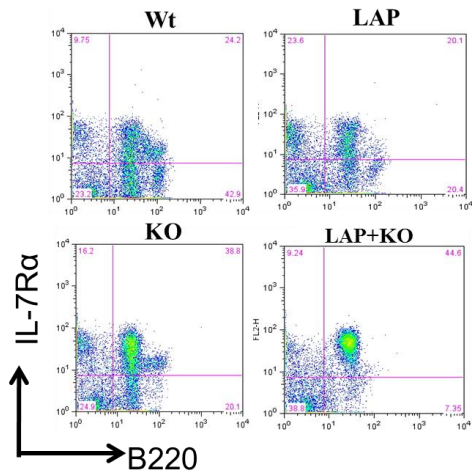
B-ALL (preB-ALL)のマウスモデルと考えられる。腫瘍発症において、blnk 欠損と LAP が協調的に働くことが考えられる。

2) B-ALL 未発症のマウス骨髄において、Blnk<sup>ko/ko</sup>/LAP tg では、IgM 陽性 B220<sup>high</sup> の成熟 B 細胞の減少が見られる。



(Tg ; LAP Tg, KO; blnk<sup>ko/ko</sup>, Tg+KO; LAP Tg+ blnk<sup>ko/ko</sup>).

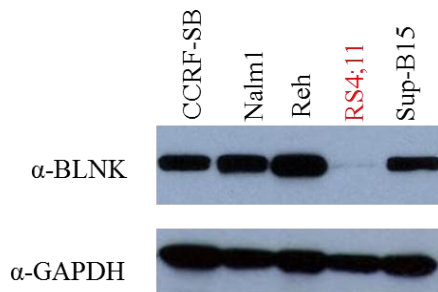
また、B220 陽性細胞中における、IL-7Rα 陽性の細胞が LAP Tg+ blnk<sup>ko/ko</sup> において非常に高いことが明らかとなった。



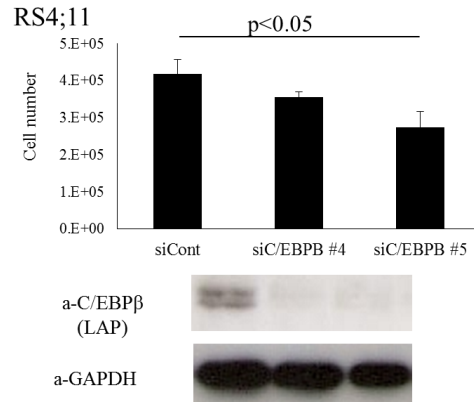
B細胞における高度な分化障害が認められる。また、ウエスタンブロット法により、下流のSTAT5のリン酸化が亢進していることが確認された。

### 3) ヒト B-ALL 細胞株における解析

RS4;11 という B-ALL の細胞株において、ウエスタンブロットにより、BLNK の発現低下が認められる。



RS4;11にsiRNAでC/EBPβをノックダウンすると細胞数が減少することがあきらかとなった。この現象は、BLNK欠損のないRehでは観察されない。



ヒトにおいても、C/EBPβとBLNK欠損が協調的に腫瘍増殖に働いている可能性が考えられる。

今回、我々は、“*blnk(ko/ko)*+LAP(Tg)”を用いることにより、新規のB-ALLのモデルマウスの作成に成功した。

C/EBPβのノックダウンにより、細胞分裂に関与する分子の発現低下などは見られるが、詳細な協調作用のメカニズムについて今後、さらなる検討を加えていきたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計5件)

1. 倉田盛人 北川昌伸 後飯塚僚 北村大介 中村卓郎 The role of *C/Ebpb* in *Blnk* deficient pre-B ALL and B-cell differentiation. 第71回日本癌会総会; 2012. 札幌.
2. 倉田盛人 北川昌伸 後飯塚僚 北村大介 中村卓郎 preB 細胞性リンパ性白血病 (preB-ALL) 発症における BLNK と C/EBPβ の協調作用 第101回日本病理会総会; 2012. 東京.
3. Morito Kurata, Yohei Kanno, Tomoko Takahara, Yukari Yamazaki, Daisuke Kitamura, Takuro Nakamura

*The role of C/Ebpb and Blnk cooperation in the pre-B ALL.* Ninth international workshop on molecular aspects of myeloid stem cell development and leukemia. 2012 Cincinnati, USA.

4. 倉田盛人 北川昌伸 後飯塚僚  
北村大介 中村卓郎 プレB細胞性リンパ性白血病発症における C/ebp  $\beta$  と BLNK/IL-7 シグナルの協調作用について. 第70回日本癌学会総会; 2011. 名古屋.
5. 倉田盛人 北川昌伸 後飯塚僚  
北村大介 中村卓郎 B細胞性リンパ性白血病発症における BLNK と C/EBP  $\beta$  の協調作用について 第100回日本病理学会総会; 2011. 横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉田盛人 (Kurata Morito)

東京医科歯科大学 医歯学総合研究科  
包括病理学

研究者番号 : 40451926