

## 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25年 5月31日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591046

研究課題名（和文）

癌抑制分子 Cbl の腫瘍化制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Analysis of the tumor regulatory molecule, c-Cbl.

研究代表者

鈴木 隆浩 (SUZUKI TAKAHIRO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：40345210

研究成果の概要（和文）：

c-Cbl は E3 ユビキチンリガーゼとして機能する分子であり、造血細胞において様々なチロシンキナーゼ活性を抑制する作用を持つ。これらの機能は Cbl の N 末端側のドメインが担っているが、Cbl には C 末端側に様々なキナーゼによって著明にリン酸化されるチロシン残基が存在し、この構造は Crk や Cas などの細胞骨格制御分子に類似している。そこで我々は Cbl の細胞骨格制御への関与について Cbl 欠損細胞を用いて検討を行った。

その結果、Cbl 欠損細胞はインテグリン刺激後のアクチン再構成が遅延していることが明らかとなり、Cbl 欠損造血細胞は SDF1 やフィブロネクチンへの走化能が低下している事が判明した。さらに、Cbl 欠損未分化造血細胞は Rac 活性が低下することにより骨髄へのホーミング能が低下することが明らかとなった。そして、Cbl から Rac へのシグナルは Cbl の Tyr700 と Tyr774 の 2 カ所のチロシン残基によって伝達されていることが明らかとなった。

今回の研究成果により、我々は Cbl が C 末端側に存在する Tyr700 と Tyr774 の 2 カ所のチロシンを介して Rac を活性化し、未分化造血細胞の骨髄へのホーミングおよびケモカインへの走化性を制御していることを明らかにした。この成果は、Cbl による血液腫瘍発症メカニズムの解明に役立つものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

c-Cbl is known as a ubiquitin E3 ligase and functions as a negative regulator for signals induced by various activated tyrosine kinases in hematopoietic cells by promoting ubiquitination and proteasomal degradation of these kinases. This negative regulation is mediated by tyrosine kinase binding and RING finger domains located in the NH<sub>3</sub>-half of the molecule, but c-Cbl has tyrosine residues that are phosphorylated upon activation of various kinases in the COOH-terminal half. These tyrosine molecules can interact with signaling molecules, and several reports have indicated that this interaction may be important for cytoskeletal regulation. However, the biological significance of these interactions remains mostly unclear in hematopoietic cells.

Here, we showed that c-Cbl-deficient cells exhibited altered actin rearrangements after  $\beta$ 1-integrin stimulation and that lineage negative hematopoietic cells in c-Cbl-deficient mice were defective in chemotaxis and homing to the bone marrow microenvironment. c-Cbl was observed as an upstream regulator of Rac in cytoskeletal regulation, since Rac activity was significantly impaired in these cells and these defective phenotypes were rescued by transduction of active Rac. Furthermore, we found that Tyr700 and Tyr774 residues in c-Cbl were essential for the activation of Rac, possibly by interacting with CrkL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：血液学

キーワード：癌、細胞骨格、未分化造血幹細胞、Cbl

1. 研究開始当初の背景

c-CblはマウスB細胞白血病を引き起こすがんウイルス遺伝子 v-cbl の細胞内ホモログとして同定された分子であり、RING finger 部位を介した E3 ユビキチンリガーゼ活性によってチロシンキナーゼ分解を促進し、その活性を抑制することが分かっている。

最近、骨髄異形成症候群 (MDS) において Cbl 変異症例が存在することが判明し、Cbl と腫瘍発生の関係に注目が集まるようになった。Cbl 変異が腫瘍発生に関与するメカニズムとしては、主にユビキチン化障害によるチロシンキナーゼ制御障害が想定されているが、その詳細は依然不明である。

興味深いことに Cbl は様々なチロシンキナーゼによってリン酸化を受けるが、リン酸化が最も著明な部位は C 末端側に存在しており、この部位は Cas や Crk など腫瘍化や細胞骨格制御に関係する分子に類似している。そこで今回我々は、Cbl ノックアウト (Cbl KO) マウスを利用して、Cbl が造血細胞の細胞骨格制御に関係するメカニズムの解析を試みた。

2. 研究の目的

上述のように、Cbl は他の細胞骨格制御分子に類似した構造を持つが、腫瘍化には増殖関連分子の異常の他に、周囲の微小環境との関係破壊も影響することが分かっている。そこで我々は、Cbl KO マウス由来の線維芽細胞および未分化造血細胞を用いて、Cbl が細胞骨格制御にどのように関係しているのか、またこれが造血細胞の腫瘍化にどのように関係するのか明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

Cbl KO マウスにおける細胞骨格関連シグナルの状態を検討するため、KO マウスから胎児線維芽細胞 (MEF) を樹立し、フィブ

ロネクチン刺激を加えて、その細胞形態の変化について検討を行った。また、Cbl KO マウスから、Lin<sup>-</sup>細胞、KSL 細胞などの未分化造血細胞を分離し、これらの細胞の SDF1 やフィブロネクチンへの遊走能、骨髄へのホーミング能、Rac 活性について検討を行った。さらに、KO 細胞に様々な Cbl 変異体を導入し、Cbl KO 細胞に認められる異常が Cbl のどの部位に由来するものなのか検討した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、適切な拡散防止措置のもとに行っている。また、動物実験については動物福祉に配慮し、法令及び施設の規定に沿って研究を行った。

4. 研究成果

Cbl KO 胎児線維芽細胞は、フィブロネクチン刺激後のアクチン再構成が遅延することが明らかとなった。これは、Cbl が細胞骨格の制御に関わっていることを示している。

そこで、次に Cbl KO マウスから分化マーカー陰性の未分化造血細胞を分離し、SDF1 やフィブロネクチンへの遊走能を検討したところ、未分化造血細胞においても遊走能が低下していることが判明した。

さらに、これらの未分化造血細胞をマウスに移植したところ、Cbl KO 細胞は骨髄へのホーミング能が低下していた。

細胞骨格の制御や骨髄へのホーミングには Rac が関係していることが知られているため、Cbl KO 未分化造血細胞における Rac 活性を検討したところ、活性がコントロールに比較して有意に低下している事が明らかとなった。これらの細胞に活性型 Rac を再導入するとホーミング能が回復することから、Cbl は Rac を介して細胞骨格を制御していることが明らかとなった。

そこで、Cbl の Rac 制御に関わる部位を明らかにするため、Cbl の C 末端側にある 3 カ所のチロシン残基をそれぞれ変異させた変異体を導入して、表現型の回復を検討したところ、Tyr700 と Tyr774 の同時変異体でのみ表現型の回復が認められなかった。このことにより、Cbl から Rac へのシグナルは Cbl C 末端側に存在する Tyr700 と Tyr774 によって制御されていることが明らかとなった。

以上のことから、Cbl は Tyr700 あるいは Tyr774 を介したシグナル伝達系によって Rac 活性を制御し、細胞骨格の制御、および造血細胞の骨髄ホーミングに関与していることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 8 件)

Ueda Y, Mizutani C, Nannya Y, Kurokawa M, Kobayashi S, Takeuchi J, Tamura H, Ogata K, Dan K, Shibayama H, Kanakura Y, Niimi K, Sasaki K, Watanabe M, Emi N, Teramura M, Motoji T, Kida M, Usuki K, Takada S, Sakura T, Ito Y, Ohyashiki K, Ogawa H, Suzuki T, Ozawa K, Imai K, Kasai M, Hata T, Miyazaki Y, Morita Y, Kanamaru A, Matsuda A, Tohyama K, Koga D, Tamaki H, Mitani K, Naoe T, Sugiyama H, Takaku F.

Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes.

Leuk Lymphoma. 2012 Oct 31. [Epub ahead of print]

Oka S, Muroi K, Sato K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Fukushima N, Fukushima N, Tanaka A, Ozawa K.

Flow Cytometric Analysis of Kappa and Lambda Light Chain Expression in Endoscopic Biopsy Specimens before the Diagnosis of B-Cell Lymphoma.

J Clin Exp Hematop. 2012;52(2):127-31.

Kobayashi H, Matsuyama T, Oka S, Fujiwara S, Oh I, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Ozawa K, Muroi K.

Autologous hematopoietic recovery with aberrant antigen expression after allogeneic bone marrow transplantation.

J Clin Exp Hematop. 2012;52(1):81-3

Sato K, Muroi K, Oka S, Sasazaki M, Hosonuma R, Ozaki K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Ozawa K.

A pilot study of a novel therapy using mesenchymal stromal cells for steroid-resistant graft-versus-host disease. Jichi Med. Univ. Journal. 2011 34:149-157.

Sato K, Ozaki K, Fujiwara S, Oh I, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Muroi K, Ozawa K.

Incidental carcinomas detected by PET/CT scans in patients with malignant lymphoma.

Int J Hematol. 2010 Nov;92(4):647-50.

Tatara R, Nagai T, Kobayashi H, Hatano K, Suzuki T, Muroi K, Ozawa K.

AA amyloidosis associated with macroglobulinemia.

Int J Hematol. 2010 Nov;92(4):675-7.

Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Naikauch H, Koeffler HP, Sanada M.

Deregulated Intracellular Signaling by Mutated c-CBL in Myeloid Neoplasms.

Clin Cancer Res. 2010 Aug 1;16(15):3825-3831.

Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP.

Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms.

Cell Cycle. 2010 Mar 23;9(6):1051-1056.

#### 〔学会発表〕(計 10 件)

鈴木隆浩.

「鉄過剰症と鉄キレート療法—その病態と診療—」

第 60 回 日本輸血・細胞治療学会東海支部例会 (2013 年 2 月 9 日、名古屋)

鈴木隆浩.

「骨髄異形成症候群の現状と将来」

第 50 回 日本癌治療学会学術集会 シンポジウム (2012 年 10 月 25 日～27 日、横浜)

鈴木隆浩、上原英輔、岡部 寛、上田真寿、佐藤一也、尾崎勝俊、永井 正、室井一男、小澤敬也

「エクリズマブ治療で溶血改善後に患者事情で治療を中止した PNH の一症例」

第 74 回 日本血液学会学術集会 (2012 年 10 月、京都)

Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Ueda M, Nagai T, Ozawa K

The Bone Marrow Hematopoietic Microenvironment is Functionally

Impaired in Iron-overloaded Mice.  
53<sup>rd</sup> ASH Annual Meeting and Exposition,  
December 10-13, 2011, San Diego.

Suzuki T.

"Impacts of Blood Transfusion and Iron  
Overload on MDS Patients and  
Hematopoiesis."

The 2nd JSH International Symposium  
2011 in Nagasaki, April 23-24, 2011,  
Nagasaki.

Uehara E, Suzuki T, Okabe H, Ueda M,  
Nagai T, Sanada M, Ogawa S, Ozawa K.  
c-Cbl REGULATES INTERACTION OF  
IMMATURE HEMATOPOIETIC CELLS  
WITH THE BONE MARROW  
MICROENVIRONMENT BY Rac  
GTPase-MEDIATED CYTOSKELETAL  
SIGNALS.

16<sup>th</sup> Annual Meeting of JSJT, July 1-2,  
2010, Utsunomiya.

Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Omori T,  
Ueda M, Nagai T, Sakata Y, Ozawa K  
Hematopoietic Disturbance in  
Iron-Overload  
The 1st JSH International Symposium  
2010 in Akita, July 16-17, 2010, Akita.

Uehara E, Suzuki T, Sasazaki M, Okabe H,  
Hatano K, Ueda M, Nagai T, Sanada M,  
Ogawa S, Ozawa K.  
c-Cbl regulates interaction of  
hematopoietic cells with the bone marrow  
microenvironment by Rac-mediated  
signals.

72<sup>th</sup> Annual Meeting of JSH, September  
24-26, Yokohama.

Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Ueda M,  
Nagai T, Ozawa K  
Hematopoietic Disturbance in  
Iron-Overload  
72<sup>th</sup> Annual Meeting of JSH, September  
24-26, Yokohama.

鈴木隆浩.

「骨髄異形成症候群 (MDS) の治療選択」  
第 72 回日本血液学会学術集会 (2010 年 9  
月、横浜)

[図書] (計 14 件)

鈴木隆浩. 骨髄形成症候群. 今日の治療と看  
護 (第 3 版). 657-660, 南江堂, 東京, 2013.

鈴木隆浩. 遺伝性球状赤血球症. 別冊日本臨

床 血液症候群 I (第 2 版). 175-178, 日本  
臨牀社, 大阪, 2013.

鈴木隆浩. 骨髄異形成症候群. 今日の治療指  
針 2013 (山口徹ら 総編集). 600-602, 医  
学書院, 東京, 2013.

鈴木隆浩. 低リスク MDS の治療方針. EBM  
血液疾患の治療 2013-2014 (金倉 譲ら編).  
15-21, 中外医学社, 東京, 2012.

鈴木隆浩. 輸血後鉄過剰症に対する鉄キレ  
ート療法: 予後と造血能の改善効果. Annual  
Review 2012 血液. 71-79, 中外医学社, 東  
京, 2012.

鈴木隆浩. 自己免疫性溶血性貧血. 今日の治  
療指針 2012 (山口徹ら 総編集). 571-572,  
医学書院, 東京, 2012.

鈴木隆浩. 鉄過剰症と鉄キレート療法. 最新  
医学別冊 再生不良性貧血 (小澤敬也 編).  
174-183, 最新医学社, 大阪, 2011.

鈴木隆浩. 低リスク MDS の治療. 白血病・リ  
ンパ腫・骨髄腫—今日の診断と治療—第 4 版  
(木崎昌弘 編). 216-225, 中外医学社, 東  
京, 2011.

鈴木隆浩. MDS の化学療法. 骨髄異形成症候  
群 (MDS) 診療 up-to-date (松田 晃編).  
114-121, 中外医学社, 東京, 2011.

鈴木隆浩. 自己免疫性溶血性貧血: 温式、冷  
式. 血液専門医テキスト (日本血液学会 編).  
163-166, 南江堂, 東京, 2011.

鈴木隆浩. 鉄キレート療法. 血液専門医テキ  
スト (日本血液学会 編). 445-447, 南江堂,  
東京, 2011.

鈴木隆浩. 輸血後鉄過剰症に対する鉄キレ  
ート療法. 難治性貧血の診療ガイド (「難治性貧  
血の診療ガイド」編集委員会 編). 237-245,  
南江堂, 東京, 2011.

鈴木隆浩. 鉄キレート療法. 骨髄異形成症候  
群 (MDS) のマネジメント (松田 晃編).  
117-124, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2011.

鈴木隆浩. 輸血後鉄過剰症の治療. 血液診療  
エキスパート「貧血」 (金倉譲編). 239-242,  
中外医学社, 東京, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 隆浩 (SUZUKI TAKAHIRO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：40345210