

γ 線照射後の萎縮胸腺のクローナル増殖と分化停止における *Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型の影響

郷 梨江香

新潟大学大学院医歯学総合研究科

遺伝子制御講座分子生物学分野

(主任：木南 凌教授)

Bcl11b Heterozygous Genotype Promotes Clonal Expansion and Differentiation Arrest of Thymocytes in γ -irradiated Mice

Rieka Go

Department of Molecular Genetics,
Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Ryo KOMINAMI)

要 旨

Bcl11b は Zn フィンガー転写因子をコードする、ハプロ不全ながん抑制遺伝子である。*Bcl11b*^{KO/KO} マウスでは胸腺細胞の分化停止が生じる。胸腺細胞の分化停止は、多くの他の遺伝子ノックアウトマウスの実験でも報告されているが、それらの遺伝子には Wnt/ β -catenin シグナルに関わる遺伝子も含まれる。ヒトの T 細胞性白血病においても、*Bcl11b* 遺伝子座の変異が確認されている。しかし、その変異がどのようにしてリンパ腫の発生に関与しているかは明らかでない。この機構を解明するためにマウスに γ 線照射を行い、*Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型が胸腺細胞の増殖や分化にどのような影響を与えるのかを検討した。TCR β 鎖の D-J 組み換えアッセイとフローサイトメトリーによる解析の結果から、 γ 線照射後の萎縮胸腺には、2 種類の異なる性質をもつクローナル増殖細胞が存在することが明らかになった。1 つはクローナル増殖をしながらも、胸腺細胞の分化能を保持している細胞であり、もう 1 つはクローナル増殖し、かつ胸腺細胞の分化が停止している細胞である。前者の胸腺細胞は自己複製能と細胞分化能をもつことから、がん幹細胞との関連が考えられる。さらに、*Bcl11b*^{KO/+} マウスの胸腺細胞において、がん遺伝子として知られる β -catenin の発現が高いことが確認された。*Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型は β -catenin の発現を上昇させ、胸腺細胞の分化や増殖に影響を与えていることが示唆される。

キーワード： *Bcl11b*, クローナル増殖, 細胞分化停止, β -catenin

Reprint requests to: Rieka Go
Department of Molecular Genetics
Graduate School of Medical and Dental Sciences
Niigata University
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科分子生物学分野
郷 梨江香

緒 言

がんの形成には細胞の自律性増殖が必要であるが、アポトーシスの抑制といった過程なども複雑に関わっている¹⁾。一方、このがんの進行にはいくつかの遺伝子変異の蓄積がみられ、がん形成の基礎となっている²⁾。白血病やリンパ腫は造血系のがんであり、慢性期から急性期への移行には変異を伴い、悪性転化という点では少なくとも2段階の発がん過程をとる^{3)–5)}。この移行には細胞の分化停止が生じる。慢性期の白血病細胞は、がん細胞の特徴である自己複製能をもつが、正常な血液細胞に分化する能力を保っている⁶⁾。

Bcl11b 遺伝子は、放射線誘発マウス胸腺リンパ腫の解析から単離されたハプロ不全ながん抑制遺伝子である^{7)–9)}。*Bcl11b*^{KO/KO} マウスでは胸腺細胞が DP 細胞まで正常に分化せず、未分化な状態で停止する¹³⁾¹⁴⁾。*Bcl11b*^{KO/+} マウスではこのような特徴は見られないが、放射線誘発によってリンパ腫形成の促進⁹⁾と、胎児で胸腺細胞の分化異常が見られる¹⁹⁾。*Bcl11b* 遺伝子欠損によるこのような細胞分化の異常は、がん化を促進する働きであると考えられる。しかし、一方で *Bcl11b*^{KO/KO} マウスではアポトーシスが誘発されることが示されており、これはがんの形成を抑制する働きである。これらの表現型は、preTCR シグナルの低下が原因であると考えられている¹³⁾¹⁴⁾。胸腺細胞の分化停止は、多くの他の遺伝子ノックアウトマウスの実験でも報告されているが、それらの遺伝子には Wnt/ β -catenin シグナルに関わる遺伝子も含まれる^{20)–23)}。

胸腺リンパ腫は細胞がクローナルに増殖しているため、TCR β 鎖の VDJ 組み換えパターンは可能な 6 パターンのうちのひとつしか見られない²⁴⁾。このような限定された VDJ 組み換えパターンは放射線照射後初期の萎縮胸腺にも見られ²⁴⁾²⁵⁾、これらの胸腺細胞の多くで *Bcl11b* の片アレル消失が起こっている。しかし、このことがリンパ腫の形成にどのように関与しているかは不明である。本論文では、放射線誘発の発がん初期過程の萎縮胸腺において、*Bcl11b*^{KO/+} 遺伝子型が胸腺

細胞のクローナル増殖、分化停止を引き起こすこと、その現象に β -catenin 発現の上昇が関与していることを報告する。

材料と方法

1. 実験動物および γ 線照射

Bcl11b^{KO/+} マウス (BALB/c background) と MSM 野生型マウスを交配し、*Bcl11b*^{KO/+} および *Bcl11b*^{+/+} のマウスを作成した。8, 10 週齢で γ 線 3Gy1 回照射を行った。 γ 線照射後 30, 60, 80 日で胸腺を左右に分けて摘出し、以下の解析を行った。

2. フローサイトメトリー解析

1 ~ 2 $\times 10^6$ 個の胸腺細胞を 2 % FCS および 0.2 % NaN₃ 含有 PBS に浮遊し、各モノクローナル抗体 (CD4, CD8, TCR β , β -catenin, IL-7R α) を添加し、反応させた。細胞周期の解析は、マウスに BrdU100 μ l (10mg/ml) を腹腔投与し、1 時間後に胸腺を摘出した。摘出した胸腺は、BrdU Flow kit (BD pharmingen) を用いて処理した。FACScan (Becton - Dickinson) flow cytometer で解析を行い、データ処理には Flow-Jo (Tree-Star, Inc) を使用した。

3. VDJ 組み換えパターンの決定と LOH 解析

以前の方法に順じて²⁴⁾²⁵⁾、polymerase chain reaction (PCR) 法により TCR β 鎖の D-J 組み換えパターンを決定した。*Bcl11b* の LOH 解析は、mit marker (D12mit53, D12mit279) を用いた PCR 法で行い、Molecular Image FX (Bio-Rad Laboratories) で定量解析した。

結 果

1. γ 線照射後の胸腺細胞数の解析

γ 線照射後 14, 30, 60, 80 日で胸腺を摘出し、*Bcl11b*^{KO/+} および *Bcl11b*^{+/+} マウスそれぞれの胸腺細胞数を比較した (図 1)。*Bcl11b*^{+/+} では、照射後 30 日で細胞数が非照射の細胞数と同程度

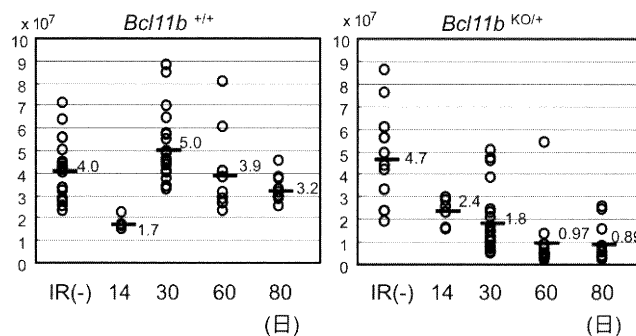


図1 γ 線照射後の胸腺細胞数
(左) *Bcl11b*^{+/+}マウスの胸腺細胞数. (右) *Bcl11b*^{KO/+}マウスの胸腺細胞数. グラフ内の数字は, 平均値 (単位 $\times 10^7$ 個).

まで回復し, その後80日まで細胞数は維持されていた. 一方 *Bcl11b*^{KO/+}では, 細胞数の回復が不完全であった. 照射後30日の細胞数の平均は, *Bcl11b*^{+/+}で 5.0×10^7 個, *Bcl11b*^{KO/+}で 1.8×10^7 個であり, *Bcl11b*^{KO/+}で有意に減少していた ($P = 9.93 \times 10^{-8}$). その後80日まで細胞数は回復しなかった. *Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型では胸腺細胞数の回復が悪く, 胸腺の萎縮した状態が維持されることが示された.

2. VDJ 組み換えパターンの解析および *Bcl11b* 遺伝子座の LOH 解析

γ 線照射後の胸腺細胞のクローナル増殖を見るため, VDJ 組み換えアッセイを3種類の primer を用いて行なった (図2A). γ 線照射されていない胸腺細胞では, D領域からJ領域の間で組み換えを起こして, 6種類の組み換え部位に対応した6つの異なるバンドがみられる (Lane Th). 加えて, 組み換えを起こしていない germ line のバンドが1つ見られる. 一方, Lymphoma では1つのバンドのみ検出される (lane Ly). Brain では, 組み換えが起こらないため, germ line のバンドが1つ見られる (Lane Br). 照射後30日の *Bcl11b*^{KO/+}

マウスの胸腺では20例のうち2例で1つまたは数個の限られたバンドを示した. これはクローナル増殖を起こした細胞が存在することを示す (以後, C type とする). 17例は, 正常な胸腺と同じ組み換えパターンを示した (以後, T type とする). 残りの1例はTおよびC type の判定が困難であり, これを C/T type とした. 照射後80日において *Bcl11b*^{KO/+}胸腺では, 10例のうち6例がC type を示した. さらに時間経過とともに, *Bcl11b*^{KO/+}におけるC type 胸腺の増加が見られた (図2B). *Bcl11b*^{+/+}では, 照射後30, 80日ともにすべてT type を示した. これらのことから, *Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型が γ 線照射後の胸腺細胞のクローナル増殖を促進することが示された.

次に, これら *Bcl11b*^{KO/+}マウスの萎縮胸腺細胞での *Bcl11b* 遺伝子の野生型アレル欠失について mit marker を用いて調べた. 40例で解析を行い, 4例で野生型アレルの消失が見られた (図2C). これらの萎縮胸腺はすべてC type を示した. 胸腺細胞数は平均 0.2×10^7 個であり, 図1で示した *Bcl11b*^{KO/+}マウスの胸腺細胞数と比べても著しく減少していた. *Bcl11b*^{KO/KO}マウスにおいてアポトーシスが誘発されることから, この減少

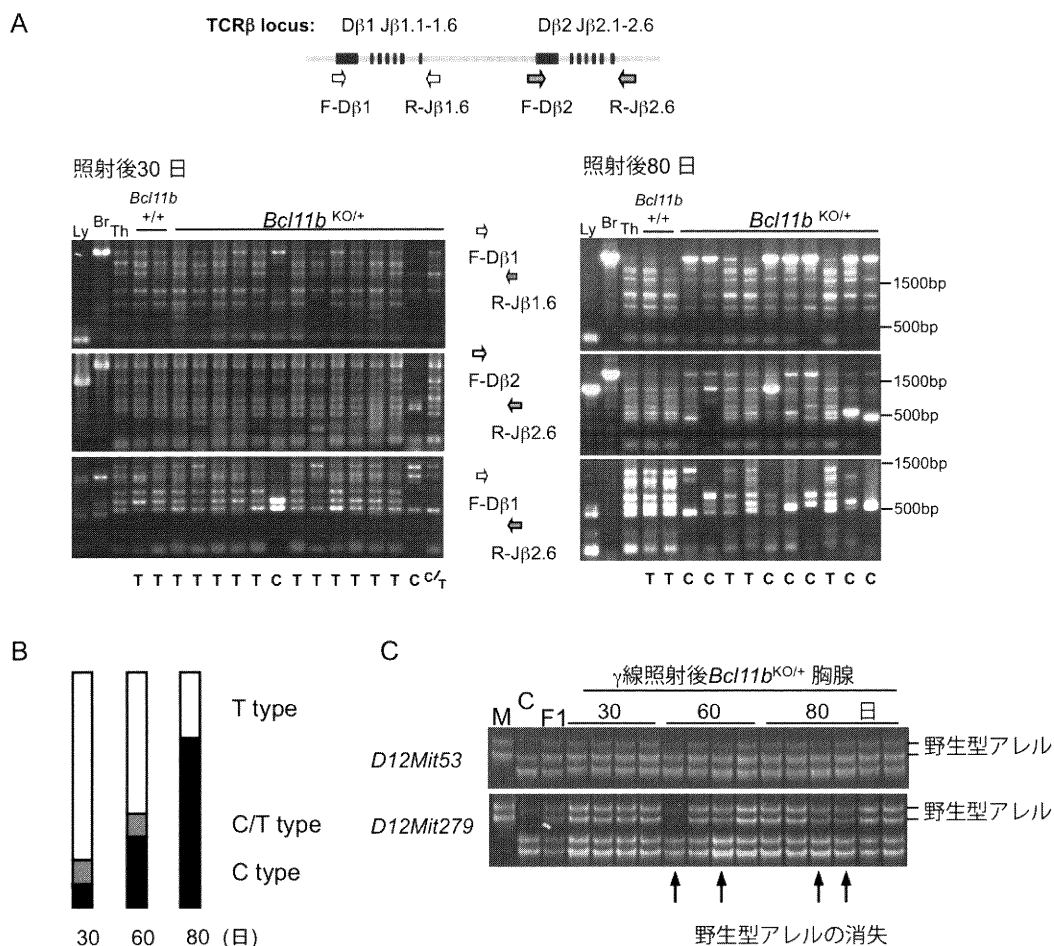


図2 8週齢 $Bcl11b^{KO/+}$ マウスの γ 線照射後の胸腺細胞の D-J 組み換えアッセイと LOH 解析

(A) γ 線照射後 30 および 80 日の D-J 組み換えパターン. 上の図は, TCR β 座の各 PCR プライマーの位置を示す. 下の図は, 各プライマーセットの PCR 産物の電気泳動の結果である. (上) F-D β 1 と R-J β 1.6, (中) F-D β 2 と R-J β 2.6, (下) F-D β 1 と R-J β 2.6. 図の下にそれぞれの D-J 組み換えパターンを示す. T: 正常胸腺の組み換えパターン, C: クローナル増殖の組み換えパターン, C/T: T および C の判別がつかないもの. (B) γ 線照射後に見られる $Bcl11b^{KO/+}$ マウスのクローナル増殖胸腺の発生率の経時的変化. C type は黒, C/T type は灰色, T type は白で示す. 数字は照射後の経過日数. (C) $Bcl11b^{KO/+}$ マウスのクローナル増殖胸腺の LOH 解析. (上) D12Mit53 (下) D12Mit279 の各プライマーの電気泳動の結果を示す. セントロメア側から D12Mit53, $Bcl11b$, D12Mit279; 108.69Mb, 109.15-24Mb, 109.69Mb に位置する. 矢印は, 野生型アレルが消失しているものを示す.

は *Bcl11b* 遺伝子の機能低下と関連するものと考えられる。

3. 細胞周期と細胞サイズの解析

BrdU 投与1時間後にマウスの胸腺を取り出し、胸腺細胞の細胞周期の解析を行なった。図3Aはフローサイトメトリー解析の結果を示す。正常な胸腺細胞では、S期にある細胞の割合は約10%である。γ線照射後30日の *Bcl11b*^{KO/+}マウスの胸腺では、平均8.8%となり、正常な胸腺に比べてその割合が減少する。γ線照射後80日では、平均7.4%であった。次に胸腺細胞の大きさを比較すると、正常胸腺でG1期細胞のFSC値はシャープな波形であり、均一な大きさの細胞が集まっていることが分かる。一方、γ線照射した *Bcl11b*^{KO/+}胸腺では、G1期細胞が広がった波形を示し、正常なG1期細胞に比べて大きな細胞が含まれていた。この大型のG1期細胞とS期細胞の割合を比較したものを、図3Bに示す。γ線照射後60, 80日では、*Bcl11b*^{KO/+}胸腺8例で大型のG1期細胞の割合が20%以上であり、すべてC typeであった。また、それらのS期細胞の割合は様々であった。*Bcl11b*^{KO/+}胸腺ではG1期細胞が成長して大型化し、G1からS期への移行する時期で止まってしまっていると考えられ、細胞周期進行の障害が起きていることが示唆された。細胞の大型化は胸腺リンパ腫の特徴の一つであり、ここで示された大型のG1期細胞がリンパ腫前駆細胞であると考えられる。

4. 胸腺細胞分化の解析

Bcl11b^{KO/KO}マウスでは、胸腺細胞の分化が停止する¹³⁾¹⁴⁾。γ線照射後30, 80日の *Bcl11b*^{KO/+}マウスの胸腺22例(30日12例, 80日10例)の分化能についてCD4/8, TCRβでフローサイトメトリー解析を行った(図4A, B)。照射後30日のVDJ組み換えパターンが正常な(T type)胸腺細胞では、*Bcl11b*の遺伝子型に関わらずDP細胞まで分化していた(図4A a-d)。しかし、成熟T細胞であるTCRβ^{high}CD8SP細胞の割合は、T typeの *Bcl11b*^{KO/+}胸腺で減少していた(図4C)。

一方、γ線照射後80日では、VDJ組み換えパターンがC typeである *Bcl11b*^{KO/+}胸腺8例でDP細胞まで分化する細胞の割合は著しく減少し(図4B f, g, h), TCRβ^{high}CD8SP細胞の割合も減少していた。これらのことから、クローナル増殖を示す *Bcl11b*^{KO/+}胸腺では分化能が低下していることが示唆された。*Bcl11b*^{+/+}胸腺は、すべてT typeであり、正常に分化していた。

次にクローナル増殖と細胞分化能の低下との関連を調べるため、10週齢の *Bcl11b*^{KO/+}マウスにγ線3Gy1回照射し、照射後30日で同様に解析を行った(図5A, B)。10週齢マウスでは、照射後クローナル増殖が早期に多く出現するため、今回、実験に用いた。VDJ組み換えパターンは12例中6例がC type, 残り6例がT typeを示した(図5A)。C typeを示す胸腺の分化をみると、DP細胞まで分化しているものが6例中4例で見られた(図5B d, e)。残り2例は分化能が低下していた(図5B b, c)。これは、照射後80日のC type胸腺の結果とは異なる。TCRβ^{high}CD8SP細胞の割合は減少していた。T typeを示す胸腺は8週齢で解析した結果と同様であった。これらのことから、クローナルに増殖する胸腺細胞は、初期には分化能を保持した状態であり、その後、分化停止に至る過程が考えられる。

5. β-catenin の発現解析

以前に行ったCD4, CD8, TCRβのフローサイトメトリー解析を行った結果、非照射の *Bcl11b*^{KO/+}マウスの胸腺では、未分化な胸腺細胞であるTCRβ^{low}CD8SP, すなわちISP細胞が増加することが分かった(data not shown)。いくつかのグループの報告から、胸腺細胞の分化能低下にはWnt/β-cateninシグナルの発現上昇が関与しているとされている²¹⁾⁻²³⁾。そこで非照射 *Bcl11b*^{KO/+}マウスにおけるβ-cateninおよびその下流にあるIL-7Rの発現をフローサイトメトリーで解析した(図6A, B, C)。また今回、対照としてAPC^{min/+}マウスの解析を同様にを行った。APCはβ-cateninと結合して、β-cateninの分解を誘導することにより、その発現を制御している²³⁾。従って、APC

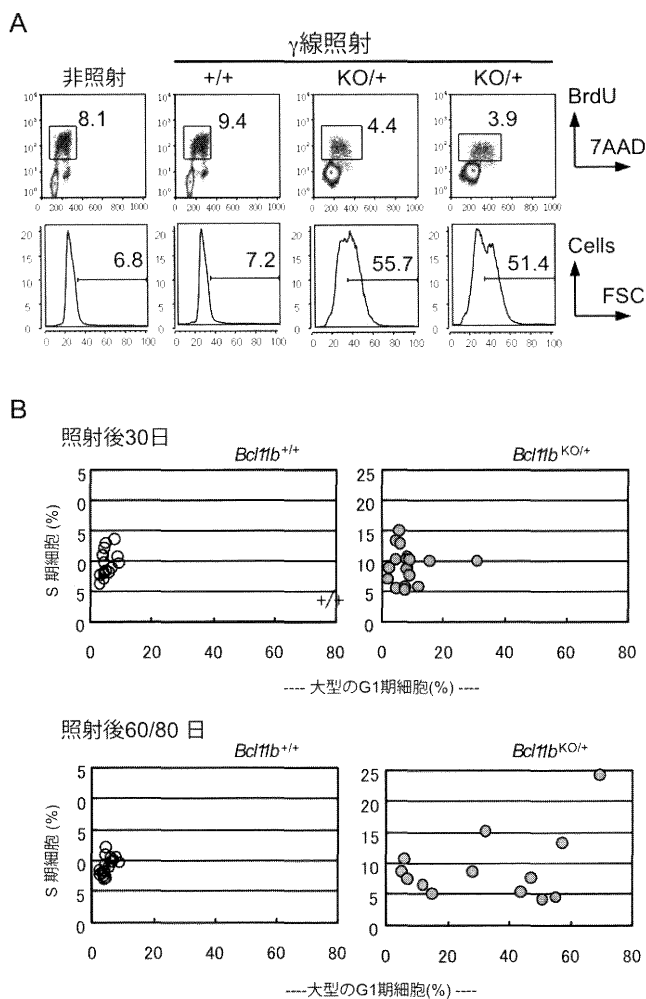


図3 胸腺細胞の増殖とG1期の細胞サイズのフローサイトメトリーによる解析

(A) 上の図は、非照射、 γ 線照射後の *Bcl11b*^{+/+} および *Bcl11b*^{KO/+}マウスの細胞周期を表す。線で囲まれた部分がそれぞれのS期を示す(数字は%)。下の図は、G1期細胞の大きさを見たヒストグラムである。バーは大型の細胞の割合を示す(数字は%)。正常胸腺では、FSC値の大きい方から5%を大型細胞としている。(B) S期細胞と大型のG1期細胞の割合の比較。上のグラフは照射後30日、下のグラフは照射後60/80日の結果を示す。各グラフにおいて、左側が *Bcl11b*^{+/+}マウス、右側が *Bcl11b*^{KO/+}マウスの結果である。

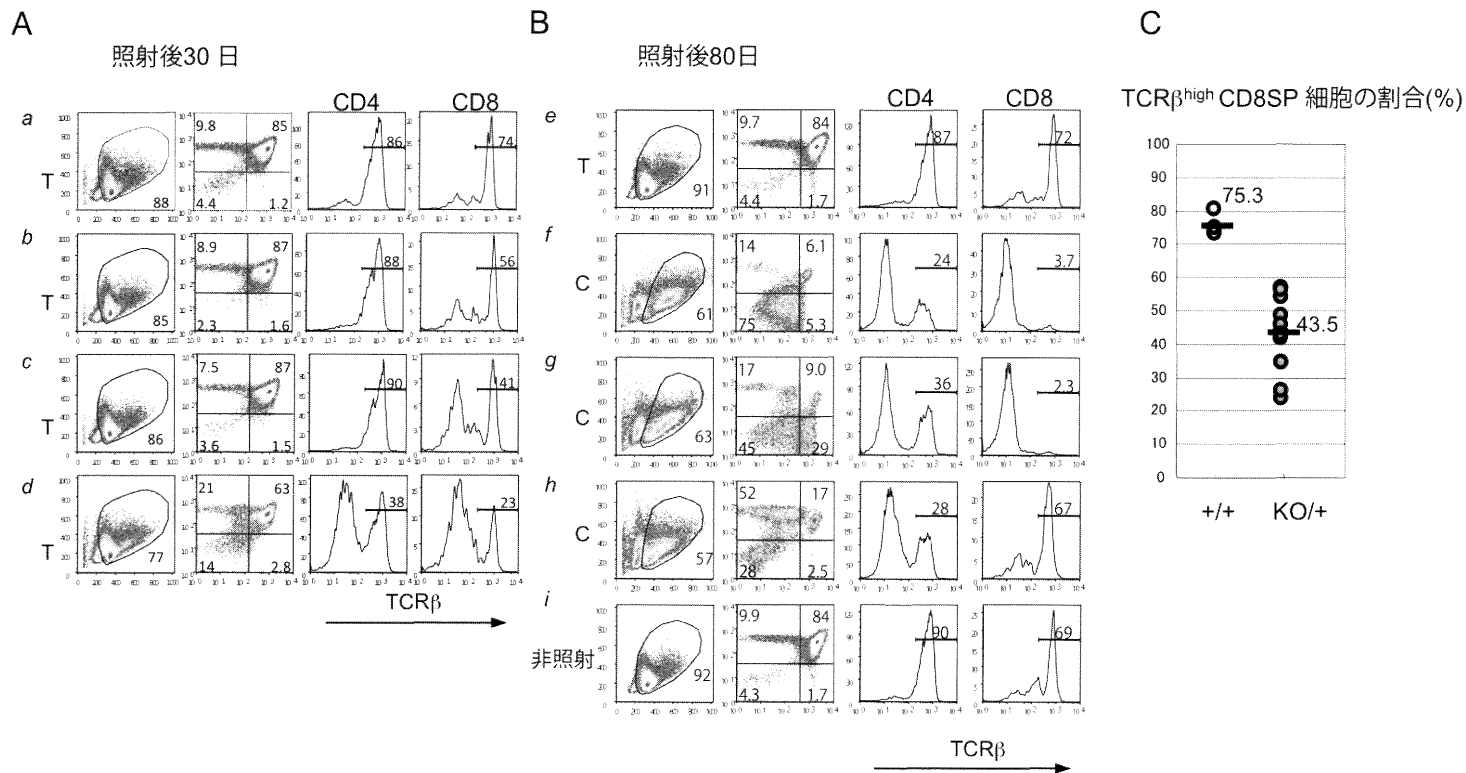


図4 CD4, CD8 および TCR β のフローサイトメトリ解析

(A) aは *Bcl11b*^{+/+} マウス, b-dは *Bcl11b*^{KO/+} マウスの γ 線照射後30日の結果を示す. 左の図は, 縦軸がSSC値, 横軸がFSC値であり, 線で囲まれた部分が胸腺細胞である. 中左の図は, CD4とCD8で展開し, 胸腺細胞の分化を示す. 中右の図は, CD4SP分画におけるTCR β の発現を示す. 数値は, TCR β^{high} の割合(%)である. 右図は, CD8SP分画におけるTCR β の発現を示す. 左端にそれぞれのD-J組み換えパターンを示す. (B) e-hは, *Bcl11b*^{KO/+}マウスの照射後80日の結果を示す. iは, 非照射のマウス胸腺である. (C) TCR β^{high} CD8SP胸腺細胞の割合を示す. グラフ内の数値は, 平均値(%)。

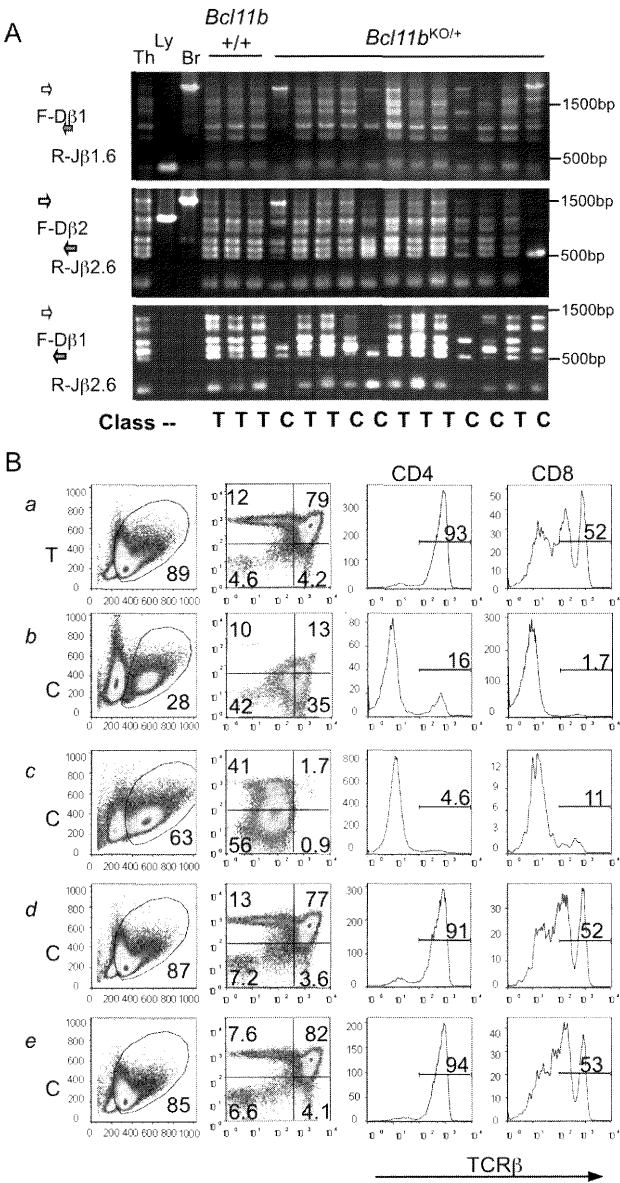


図5 10週齢 $Bcl11b^{KO/+}$ マウスにおける γ 線照射後の胸腺細胞の解析

(A) γ 線照射後 30 日の D-J 組み換えパターン. 図2を参照. (B) CD4, CD8 および TCR β のフローサイトメトリー解析. 図4を参照.

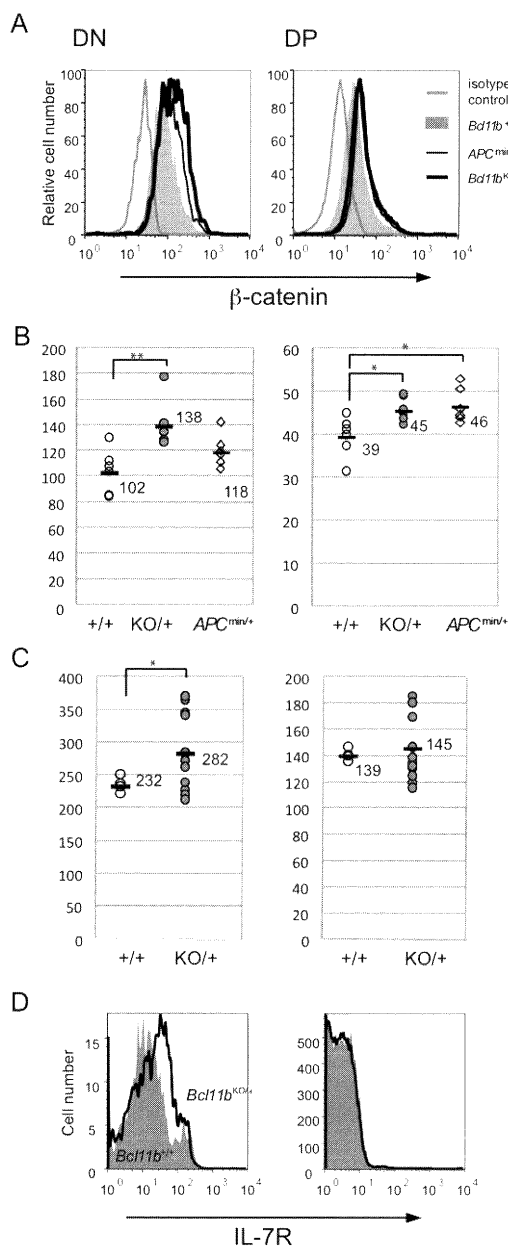


図6 β -catenin および IL-7R のフローサイトメトリ解析

(A) DN および DP 細胞における各遺伝子型の β -catenin の発現量を示す。灰色の領域は $Bcl11b^{+/+}$ マウス、太線 (黒) は $Bcl11b^{KO/+}$ マウス、細線 (黒) は $APC^{min/+}$ マウスである。(B) β -catenin の mean fluorescence intensity (MFI) を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。(C) γ 線照射後 30 日の β -catenin の mean fluorescence intensity (MFI) を示す。*: $p < 0.05$ 。(D) DN および DP 細胞における IL-7R の発現量を示す。灰色の領域は $Bcl11b^{+/+}$ マウス、黒線は $Bcl11b^{KO/+}$ マウスである。

遺伝子の min 変異により β -catenin の蓄積が起これと予想される。図 6A は、フローサイトメトリ解析の一例を示す。DP 細胞より DN 細胞で β -catenin の発現が高いが、これは以前の報告²⁷⁾²⁸⁾と一致している。*Bcl11b*^{+/+}と比べて、*Bcl11b*^{KO/+}および *APC*^{min/+}で β -catenin の発現が上昇していることが分かる。図 6B のグラフから、DN および DP 細胞において、*Bcl11b*^{KO/+}の β -catenin の発現が、*Bcl11b*^{+/+}に比べて有意に上昇していた (図 6B : $P = 0.0034$, $P = 0.019$)。 γ 線照射後 30 日の胸腺についても同様の結果が得られた (図 6C)。IL-7R は、DN 細胞において *Bcl11b*^{+/+}に比べて *Bcl11b*^{KO/+}で発現が上昇し、予想された結果と一致した (図 6D)。これらのことから、*Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型は β -catenin の発現を上昇させ、胸腺細胞の分化や増殖に影響を与えていることが示唆された。

考 察

野生型マウスを用いた γ 線分割照射実験から、照射後初期に胸腺が萎縮した状態を経て、胸腺リンパ腫が発症することが分かってきた。この萎縮胸腺がリンパ腫の前駆状態にあると考え、その特徴についてこれまで解析を行ってきた²⁵⁾。この論文では、発がんの初期過程において *Bcl11b*^{KO/+}遺伝子型が胸腺細胞に与える影響について報告している。3Gy1 回照射後 60, 80 日の *Bcl11b*^{KO/+}マウスの胸腺では、リンパ腫の特徴である細胞のクローナル増殖が高い頻度で確認された。野生型マウスでは、3Gy1 回照射でこのような変化は観察されない。*Bcl11b* 遺伝子欠損が及ぼす影響についていくつかの報告があるが¹³⁻¹⁸⁾、その中で *Bcl11b* 欠損により preTCR シグナルが低下することが示されている¹⁴⁾¹⁹⁾。preTCR シグナルは、胸腺細胞の分化を制御しており²⁹⁻³²⁾、preTCR シグナルが失われることによって胸腺細胞の分化の停止やリンパ腫発症が引き起こされる。また、preTCR シグナルが Erk を介して β -catenin を安定化することも報告されている²⁶⁾²⁷⁾。これらのことから *Bcl11b*^{KO/+}マウスでは preTCR シグナ

ルが減少することで、 β -catenin 発現が減少すると推測された。しかし、本論文では、*Bcl11b* 遺伝子低下によって β -catenin の発現が上昇することが示された。この β -catenin の発現上昇は、preTCR シグナルとは別の過程で起きていると考えられる。 β -catenin は、axin, APC, GSK3, CKI などによって制御されている²³⁾³³⁾。メカニズムは不明だが、*Bcl11b* がそれらのタンパク質の発現の制御に関わっているのかもしれない。*Bcl11b*^{KO/+}マウスのリンパ腫の発症に β -catenin の上昇が重要な役割を果たしていると考えている。 β -catenin はがん遺伝子として知られており³⁴⁾、Tcf1 や Lef1 と複合体を形成して、その下流にある遺伝子 c-myc や cyclinD1 を活性化し、細胞周期の進行を促進する²³⁾³³⁾。

Bcl11b^{KO/+}マウスでは、クローナル増殖を示す胸腺細胞の分化が停止していた。野生型マウスにおける γ 線分割照射後の萎縮胸腺では細胞分化は正常であった²⁵⁾。ことから、萎縮胸腺における細胞分化能の低下は *Bcl11b* 遺伝子の機能低下によるものと推察される。分化能の低下により、*Bcl11b*^{KO/+}マウスの胸腺では DN 細胞、ISP 細胞が増加するが、正常な状態の ISP 細胞は高い増殖能をもち³⁵⁾、細胞周期においても S 期の割合が高い (約 45 %, data not shown)。今回、 γ 線照射した *Bcl11b*^{KO/+}マウスでは、S 期の割合が低く (約 5 %)、本来もつ高い増殖能は見られなかった。

γ 線照射後 80 日の *Bcl11b*^{KO/+}マウスでは胸腺が萎縮し、クローナル増殖を示す胸腺で細胞数が著しく減少していた。また、細胞周期 G1 期で正常な G1 期細胞に比べて大きな細胞の割合が増加していた。この大型の細胞がリンパ腫前駆状態の細胞であると考えられる。一方、 γ 線照射後早い時期 (30 日) の *Bcl11b*^{KO/+}マウスでは、クローナル増殖でありながら、分化能を保持している胸腺が見られた。

今回示された、分化能を保持しクローナル増殖する胸腺細胞は、自己複製能と分化能をもったがん幹細胞との関連が考えられる。*Bcl11b* 遺伝子が、どのような機構で関わっているかまだ不明であるが、胸腺リンパ腫におけるがん幹細胞の形成

に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、これらの胸腺細胞は増殖能が低下しており、悪性化していない。それゆえ、この後何らかの変化が加わることで細胞の異常増殖が起こり悪性転化すると考えられる。

謝 辞

最後に、本研究においてご指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科遺伝子制御講座分子生物学分野の本南凌教授、廣瀬哲史助教に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Hanahan D and Weinberg RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57 - 70, 2000.
- 2) Hahn WC and Weinberg RA: Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 331 - 341, 2002.
- 3) Calabretta B and Perrotti D: The biology of CML blast crisis. *Blood* 103: 4010 - 4022, 2004.
- 4) Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA and Downing JR: Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446: 758 - 764, 2007.
- 5) Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui CH, Relling MV, Shurtleff SA and Downing JR: BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of *Ikaros*. *Nature* 453: 110 - 114, 2008.
- 6) Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL and Wahl GM: Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66: 9339 - 9344, 2006.
- 7) Wakabayashi Y, Inoue J, Takahashi Y, Matsuki A, Kosugi-Okano H, Shinbo T, Mishima Y, Niwa O and Kominami R: Homozygous deletions and point mutations of the *Rit1/Bcl11b* gene in γ -ray induced mouse thymic lymphomas. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 598 - 603, 2003.
- 8) Kominami R and Niwa O: Radiation carcinogenesis in mouse thymic lymphomas. *Cancer Sci* 97: 575 - 581, 2006.
- 9) Kamimura K, Ohi H, Kubota T, Okazuka K, Yoshikai Y, Wakabayashi Y, Aoyagi Y, Mishima Y and Kominami R: Haploinsufficiency of *Bcl11b* for suppression of lymphomagenesis and thymocyte development. *Biochem. Biophys Res Commun* 355: 538 - 542, 2007.
- 10) Nagel S, Kaufmann M, Drexler HG and MacLeod RA: The cardiac homeobox gene *NKX2-5* is deregulated by juxtaposition with *Bcl11b* in pediatric T-ALL cell lines via a novel t (5; 14) (q35.1; q32.2). *Cancer Res* 63: 5329 - 5334, 2003.
- 11) MacLeod RA, Nagel S, Kaufmann M, Janssen JW, Drexler HG: Activation of *HOX11L2* by juxtaposition with 3'-*Bcl11b* in an acute lymphoblastic leukemia cell line (HPB-ALL) with t (5; 14) (q35; q32.2). *Genes Chromosomes Cancer* 37: 84 - 91, 2003.
- 12) Przybylski GK, Dik WA, Wanzeck J, Grabarczyk P, Majunke S, Martin-Subero JI, Siebert R, Döken G, Ludwig WD, Verhaaf B, van Dongen JJ, Schmidt CA and Langerak AW: Disruption of the *Bcl11b* gene through inv (14) (q11.2q32.31) results in the expression of *Bcl11b*-TRDC fusion transcripts and is associated with the absence of wild-type *Bcl11b* transcripts in T-ALL. *Leukemia* 19: 201 - 208, 2005.
- 13) Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J, Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O, Aizawa S and Kominami R: *Bcl11b* is required for differentiation and survival of T lymphocytes. *Nat Immunol* 4: 533 - 539, 2003.
- 14) Inoue J, Kanefuji T, Okazuka K, Watanabe H, Mishima Y and Kominami R: Expression of *TCR β* partly rescues developmental arrest and apoptosis of T cells in *Bcl11b*^{-/-} mice. *J Immunology* 176: 5871 - 5879, 2006.
- 15) Arlotta P, Molyneaux BJ, Chen J, Inoue J, Kominami R and Macklis JD: Neuronal subtype -

- specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45: 207 - 221, 2005.
- 16) Golonzhka O, Liang X, Messaddeq N, Bornert JM, Campbell AL, Metzger D, Chambon P, Ganguli - Indra G, Leid M and Indra AK: Dual role of COUP - TF - interacting protein 2 in epidermal homeostasis and permeability barrier formation. *J Invest Dermatol* 129: 1459 - 1470, 2008.
- 17) Golonzhka O, Metzger D, Bornert JM, Bay BK, Gross MK, Kioussi C and Leid M: *Ctip2/Bcl11b* controls ameloblast formation during mammalian odontogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 4278 - 4283, 2009.
- 18) Aalbu DI, Feng D, Bhattacharya D, Jenkins NA, Copeland NG, Liu P and Avram D: *Bcl11b* is required for positive selection and survival of double - positive thymocytes. *J Exp Med* 204: 3003 - 3015, 2007.
- 19) Okazuka K, Wakabayashi Y, Kashihara M, Inoue J, Sato T, Yokoyama M, Aizawa S, Aizawa Y, Mishima Y and Kominami R: p53 prevents maturation of T cell development to the immature CD4 - CD8 + stage in *Bcl11b*^{-/-} mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 328: 545 - 549, 2005.
- 20) Fischer A and Malissen B: Natural and engineered disorders of lymphocyte development. *Science* 280: 237 - 243, 1998.
- 21) Gounari F, Aifantis I, Khazaie K, Hoeflinger S, Harada N, Taketo MM and von Boehmer H: Somatic activation of beta - catenin bypasses pre - TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat Immunol* 2: 863 - 869, 2001.
- 22) Xu Y, Banerjee D, Huelsken J, Birchmeier W and Sen JM: Deletion of beta - catenin impairs T cell development. *Nat Immunol* 4: 1177 - 1182, 2003.
- 23) Staal FJ and Clevers HC: Wnt signaling in the thymus. *Curr Opin Immunol* 15: 204 - 208, 2003.
- 24) Ohi H, Mishima Y, Kamimura K, Maruyama M, Sasai K and Kominami R: Multi - step lymphomagenesis deduced from DNA changes in thymic lymphomas and atrophic thymuses at various times after γ - irradiation. *Oncogene* 26: 5280 - 5289, 2007.
- 25) Yamamoto T, Morita S, Go R, Obata M, Katsuragi Y, Fujita Y, Maeda Y, Yokoyama M, Aoyagi Y, Ichikawa H, Mishima Y and Kominami R: Clonally expanding thymocytes having lineage capability in γ - ray induced mouse strophic thymus. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 77: 235 - 243, 2010.
- 26) Xu M, Sharma A, Wiest DL and Sen JM: Pre - TCR - induced β - catenin facilitates transversal through β - selection. *J Immunol* 182: 751 - 758, 2009.
- 27) Xu M, Sharma A, Hossain MZ, Wiest DL and Sen JM: Sustained expression of pre - TCR induced beta - catenin in post - beta - selection thymocytes blocks T cell development. *J Immunol* 182: 759 - 765, 2009.
- 28) Weerkamp F, Baert MR, Naber BA, Koster EE, de Haas EF, Atkuri KR, van Dongen JJ, Herzenberg LA and Staal FJ: Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3322 - 3326, 2006.
- 29) Carleton M, Haks MC, Smeele SA, Jones A, Belkowski SM, Berger MA, Linsley P, Kruisbeek AM and Wiest DL: Early growth response transcription factors are required for development of CD4⁻ CD8⁻ thymocytes to the CD4⁺ CD8⁺ stage. *J Immunol* 168: 1649 - 1658, 2002.
- 30) Xi H and Kersh GJ: Early growth response gene 3 regulates thymocyte proliferation during the transition from CD4⁻ CD8⁻ to CD4⁺ CD8⁺. *J Immunol* 172: 964 - 971, 2004.
- 31) Aifantis I, Gounari F, Scorrano L, Borowski C and von Boehmer H: Constitutive pre - TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF - kappaB and NFAT. *Nat Immunol* 2: 403 - 409, 2001.
- 32) Engel I and Murre C: E2A proteins enforce a proliferation checkpoint in developing thymocytes. *EMBO J* 23: 202 - 211, 2004.
- 33) Gregorieff A and Clevers H: Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 19: 877 - 890, 2005.

- 34) Guo Z, Dose M, Kovalovsky D, Chang R, O'Neil J, Look AT, von Boehmer H, Khazaie K, Gounari F: Beta - catenin stabilization stalls the transition from double - positive to single - positive stage and predisposes thymocytes to malignant transformation. *Blood* 109: 5463 - 5472, 2007.
- 35) Ioannidis V, Beermann F, Clevers H and Held W: The β - catenin - TCF - 1 pathway ensures CD4⁺ CD8⁺ thymocyte survival. *Nat Immunol* 2: 691 - 697, 2001.

(平成22年1月25日受付)
