

おかづかきよし

氏 名	岡 塚 貴世志
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第44号
学位授与の日付	平成17年 3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	p53 prevents maturation of T cell development to the immature CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> stage in <i>Bcl11b</i> <sup>-/-</sup> mice (p53 は <i>Bcl11b</i> ノックアウトマウス胸腺 T 細胞における immature CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> への分化を障害する)

論文審査委員	主査	教授	安 保	徹
	副査	教授	相 澤	義 房
	副査	教授	木 南	凌

## 博士論文の要旨

### 背景と目的

pre-TCR シグナルは $\alpha\beta$ T 細胞の CD4-CD8-分画の DN3(CD44-CD25<sup>+</sup>)から DN4(CD44-CD25<sup>-</sup>)への分化に必須であり、*SCID*、*CD3 $\gamma$* 、*RAG* ノックアウトマウスなど pre-TCR シグナルを伝達できないマウスでは DN3 で分化が停止する。これらに *p53* 欠損を導入すると DP(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)細胞へ分化を誘導しアポトーシスを抑制することから、pre-TCR チェックポイントに *p53* が関与していると考えられている。

放射線誘発胸腺 T 細胞リンパ腫から単離した新規がん抑制遺伝子 *Bcl11b* ノックアウトマウスの胸腺 T 細胞はアポトーシスの亢進と、一部 ISP(CD4-CD8dim)まで分化するものの主に DN3 で分化が停止し分化の障害も見られる。 $\gamma\delta$ T 細胞、B 細胞の分化には影響せず、 $\alpha\beta$ T 細胞の分化に必須の蛋白と考えられる。pre-TCR を欠くマウスと同様に *p53* 欠損を導入し、分化、アポトーシスに与える影響を解析した。

### 材料と方法

*Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスと *p53*<sup>-/-</sup>を交配し *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウスを作製し、更に *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウス同士を交配し *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウスを作製し、解析を行った。このマウスは出生 1 日以内に死亡してしまうため出生 1 日目に胸腺を採取し解析を行った。また SCID マウスへの移植は *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウス同士を 1 晩のみ交配し妊娠 18.5 日の雌マウスから胎仔を摘出し胎仔の肝臓から造血幹細胞を SCID マウスの尾静脈から移植し 8 週後に解析を行った。アポトーシスは TUNEL 法にて解析した。

### 結果

- ① 出生 1 日目の *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>ダブルノックアウトマウスは *Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスと同様に DP 細胞への分化は認めず、DN3、DN4 細胞が占める割合にも変化はなかった。胸腺細胞数もそれぞれ  $8.7 \times 10^5$  個、 $6.9 \times 10^5$  個( $p=0.34$ )と差はなく、*p53* 欠損を導入した効果が得られなかった。
- ② SCID 移植 8 週後の解析。*SCID*、*RAG*<sup>-/-</sup>、*CD3 $\gamma$* <sup>-/-</sup>マウスに *p53* 欠損を導入しても出生直後では DP 細胞は見られないが、8 週以降になると *p53* 欠損の効果が現れ DP 細胞の出現、胸腺細胞数の増加が得られ

たと報告している。*Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウスは出生1日以内に死亡するため、胎仔肝臓の幹細胞を SCID マウスに移植し *p53* 欠損導入の効果が得られるか解析を行った。*Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>では ISP 細胞の増加を認め、*p53* 欠損導入による分化誘導効果が得られた。胸腺細胞数は *Bcl11b*<sup>-/-</sup>では  $9.4 \times 10^5$  個、*Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>では  $30.9 \times 10^5$  個と約 3 倍の細胞数増加を認めた ( $p=0.003$ )。

*Bcl11b*<sup>-/-</sup>ではアポトーシス細胞を  $15.2 \pm 4.0\%$ 、*Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>では  $5.9 \pm 0.6\%$ とアポトーシスの抑制を認めた ( $p=0.006$ )。

#### 考察

- ① *RAG*、*SCID*、*CD3 $\gamma$* ノックアウトマウスに *p53* 欠損を導入すると DP 細胞へ分化するが、*Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスでは *p53* 欠損を導入しても ISP までしか分化しなかった。これは *p53* が DN3 から ISP の分化には関与しているが、ISP から DP への分化には関与していない可能性と、また *bcl11b*<sup>-/-</sup>マウス胸腺 T 細胞は pre-TCR シグナルの欠如だけでなく、ISP から DP への分化に関わる何らかのシグナルが欠如していることが示唆される。
- ② *SCID* へ *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>を移植したマウスの ISP は CD25(IL-2R)の発現低下を認めた。ISP における IL-2 シグナルと分化の関係は明らかではないが、*p53* 欠損により CD25 発現低下、胸腺細胞数の増加、ISP 細胞の増加に関与した可能性を示唆する。

#### 審査結果の要旨

pre-TCR シグナルは  $\alpha\beta$ T 細胞の分化に必須であり、分化に *p53* が関与している。申請者は、*Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスと *p53*<sup>-/-</sup>を交配し *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウスを作製し、更に *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウス同士を交配し *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウスを作製し、解析を行った。

出生1日目の *Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウスは *Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスと同様に DP 細胞への分化は認められず、DN3、DN4 細胞が占める割合にも変化はなかった。胸腺細胞数もそれぞれ  $8.7 \times 10^5$  個、 $6.9 \times 10^5$  個 ( $p=0.34$ )と差はなく、*p53* 欠損を導入した効果が得られなかった。

*Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>マウスは出生1日以内に死亡するため、胎仔肝臓の幹細胞を SCID マウスに移植し *p53* 欠損導入の効果が得られるか解析を行った。*Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>では ISP 細胞の増加を認め、*p53* 欠損導入による分化誘導効果が得られた。胸腺細胞数は *Bcl11b*<sup>-/-</sup>では  $9.4 \times 10^5$  個、*Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>では  $30.9 \times 10^5$  個と約 3 倍の細胞数増加を認めた。*Bcl11b*<sup>-/-</sup>ではアポトーシス細胞を  $15.2 \pm 4.0\%$ 、*Bcl11b*<sup>-/-</sup>*p53*<sup>-/-</sup>では  $5.9 \pm 0.6\%$ とアポトーシスの抑制を認めた。

*p53* 欠損導入による  $\alpha\beta$ T 細胞の分化とその機序について新知見を得た点に学位論文として価値を認める。