

氏名	よしかい よしひろ
学位記番号	吉開 義弘
学位授与の日付	博 士 (歯学)
学位授与の要件	新大院博 (歯) 第 15 号
博士論文名	平成 17 年 3 月 23 日
	学位規則第 3 条第 3 項該当

Rit1/Bcl11b tumor suppressor gene is haploinsufficient in the suppression of thymic lymphomagenesis and thymocyte differentiation.

論文審査委員	主査	教授	高木	律男
	副査	教授	齋藤	力
		教授	織田	公光

博士論文の要旨

当研究室の以前の研究で放射線誘発胸腺リンパ腫を対象にしたゲノム解析により、マウス 12 番染色体上に、がん抑制遺伝子 Rit1/Bcl11b (以下 Rit1) を単離した。Rit1 は、マウス放射線誘発胸腺リンパ腫において biallelic な変化が高頻度に観察される。Rit1^{+/-}p53^{+/-}マウスの自然発症胸腺リンパ腫の解析では、Rit1 はがん抑制に対してハプロ不全、すなわち片方のアレルを失った状況において、がんの発生・進展に選択的に有利に働くということが示唆された。そこで Rit1^{+/-}p53^{+/-}マウスに γ 線を照射し誘発した腫瘍を用いてこの点に関し研究した。

方法は、まず Rit1/Bcl11b^{+/-}マウスと p53^{+/-}マウスを交配させ作製した 59 頭の F1 マウスに γ 線を照射し、300 日間の経過観察を行った。その結果 47 頭でがんを発症し、そのほとんど (29 頭) が胸腺リンパ腫であった。Rit1 のタイピングは、36 頭が Rit1^{+/-}p53^{+/-}で 23 頭が Rit1^{+/+}p53^{+/-}であった。Rit1^{+/-}p53^{+/-}マウスは Rit1^{+/+}p53^{+/-}に比べ、高いがん発生率と短い生存期間を示した (P=0.0037)。照射を行った 36 頭の Rit1^{+/-}p53^{+/-}マウスのうち、24 頭 (67%) は胸腺リンパ腫を、9 頭はその他の (skin tumor(5)、lung cancer(2)、systemic leukemia(1)、liver tumor(1)) 腫瘍を発症し、残りの 3 頭は非発症であった。一方、Rit1^{+/+}p53^{+/-}のマウス 23 頭中、わずか 5 頭 (22%) が胸腺リンパ腫を、7 頭が skin tumor、2 頭が liver tumor を発症し、残りの 9 頭は非発症であった (P=0.0013)。

次に、胸腺リンパ腫を発症した Rit1^{+/-}p53^{+/-}マウスの Rit1 と p53 の野生型アレルが欠失しているかどうかを調べた。p53 では 24 頭中 4 頭 (17%) で野生型アレルの欠失を認めたのに対し、Rit1 ではまったく認められなかった。また、Rit1^{+/+}p53^{+/-}マウスで発生した 5 つの胸腺リンパ腫では、そのうち 3 頭で (60%) 野生型アレルの欠失を認めたが、これは我々の以前の結果と一致している。

さらに、これらリンパ腫の Rit1 たんぱくの発現を anti-Rit1 抗体を用いて western blot 法で調べたところ、20 のうち 14 のリンパ腫で Rit1 発現を保っていたが、残りのサンプルでは、Rit1 の発現を示すリンパ腫または胸腺細胞と比較し、発現を認めないか非常に低かった。

異なる embryonic ステージにおける胸腺細胞の分化における $Rit1^{+/-}$ 遺伝子型の効果について、細胞表面マーカー CD4、CD8 の抗体を用いて、胎生 16.5 日目と 18.5 日目におけるマウス胸腺細胞の flowcytometry 解析を行った。胎生 16.5 日目の $Rit1^{+/+}$ マウスの胸腺細胞のおよそ 40% が DP 分画中に存在したが、 $Rit1^{+/-}$ マウスの胸腺細胞ではおよそ 20% であった。一方、ISP 胸腺細胞の割合は、 $Rit1^{+/-}$ と $Rit1^{+/+}$ マウスの間で著しく異なっていた。このような違いは、胎生 18.5 日目のマウスの細胞においては明白ではなかったが、細胞数の違いが観察された。 $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ マウスで誘発されたリンパ腫において 11、16、19 番染色体上にある *Ikaros*、*Tlsr7*、*Pten* の 3 つの loci の LOH を調べた。*Ikaros*、*Tlsr7*、*Pten* はそれぞれ 32%、24%、24% の LOH 頻度を示した。これは *Ikaros* の LOH 頻度のみ低いように思われたが、 $p53^{+/-}$ マウスにおける放射線照射胸腺リンパ腫による結果とおおむね類似していた。

本研究では $p53^{+/-}$ バックグラウンドのマウスにおける γ 線照射誘発がんおよび胸腺リンパ腫の $Rit1^{+/-}$ 遺伝子型の効果を調べた。 $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ よりも $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ において明らかに高頻度にがんの発生が観察されたが、これは *Rit1* のヘテロ型ががん、特に胸腺リンパ腫に対する感受性を与えていると考えられる。*Rit1* の野生型アレルは、 $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ マウスの 24 すべての胸腺リンパ腫において存在し、*Rit1* たんぱくの発現は胸腺リンパ腫の 70% において保たれていた。また、 $Rit1^{+/-}$ マウスの胸腺細胞は $Rit1^{+/+}$ マウスの胸腺細胞よりも分化と生存状態が悪いことが明らかとなった。以上により *Rit1* 遺伝子は、野生型アレルの不活性化なしに lymphomagenesis に貢献することが出来る、つまり haploinsufficient に作用していることが強く示唆された。

審査結果の要旨

当研究室の以前の研究で放射線誘発胸腺リンパ腫を対象にしたゲノム解析により、マウス 12 番染色体上に、がん抑制遺伝子 *Rit1/Bcl11b* (以下 *Rit1*) を単離した。*Rit1* は、マウス放射線誘発胸腺リンパ腫において biallelic な変化が高頻度に観察される。 $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ マウスの自然発症胸腺リンパ腫の解析では、*Rit1* はがん抑制に対してハプロ不全、すなわち片方のアレルを失った状況において、がんの発生・進展に選択的に有利に働くということが示唆された。そこで $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ マウスに γ 線を照射し誘発した腫瘍を用いてこの点に関し研究した。

方法は、まず $Rit1/Bcl11b^{+/-}$ マウスと $p53^{+/-}$ マウスを交配させ作製した 59 頭の F1 マウスに γ 線を照射し、300 日間の経過観察を行った。その結果 47 頭でがんを発症し、そのほとんど (29 頭) が胸腺リンパ腫であった。*Rit1* のタイピングは、36 頭が $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ で 23 頭が $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ であった。 $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ マウスは $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ に比べ、高いがん発生率と短い生存期間を示した ($P=0.0037$)。照射を行った 36 頭の $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ マウスのうち、24 頭 (67%) は胸腺リンパ腫を、9 頭はその他の (skin tumor (5)、lung cancer (2)、systemic leukemia (1)、liver tumor (1)) 腫瘍を発症し、残りの 3 頭は非発症であった。一方、 $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ のマウス 23 頭中、わずか 5 頭 (22%) が胸腺リンパ腫を、7 頭が skin tumor、2 頭が liver tumor を発症し、残りの 9 頭は非発症であった ($P=0.0013$)。

次に、胸腺リンパ腫を発症した $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ マウスの *Rit1* と *p53* の野生型アレルが欠失しているかどうかを調べた。*p53* では 24 頭中 4 頭 (17%) で野生型アレルの欠失を認めたのに対し、*Rit1* ではまったく認められなかった。また、 $Rit1^{+/-}p53^{+/-}$ マウスで発生した 5 つの胸腺リンパ腫では、そのうち 3 頭で (60%) 野生型アレルの欠失を認めたが、これは我々の以前の結果と一致している。

さらに、これらリンパ腫の Rit1 たんぱくの発現を anti-Rit1 抗体を用いて western blot 法で調べたところ、20 のうち 14 のリンパ腫で Rit1 発現を保っていたが、残りのサンプルでは、Rit1 の発現を示すリンパ腫または胸腺細胞と比較し、発現を認めないか非常に低かった。

異なる embryonic ステージにおける胸腺細胞の分化における Rit1^{+/+} 遺伝子型の効果について、細胞表面マーカー CD4、CD8 の抗体を用いて、胎生 16.5 日目と 18.5 日目におけるマウス胸腺細胞の flowcytometry 解析を行った。胎生 16.5 日目の Rit1^{+/+} マウスの胸腺細胞のおよそ 40% が DP 分画中に存在したが、Rit1^{+/+} マウスの胸腺細胞ではおよそ 20% であった。一方、ISP 胸腺細胞の割合は、Rit1^{+/+} と Rit1^{+/+} マウスの間で著しく異なっていた。このような違いは、胎生 18.5 日目のマウスの細胞においては明白ではなかったが、細胞数の違いが観察された。Rit1^{+/+} p53^{+/+} マウスで誘発されたリンパ腫において 11、16、19 番染色体上にある Ikaros、Tlsr7、Pten の 3 つの loci の LOH を調べた。Ikaros、Tlsr7、Pten はそれぞれ 32%、24%、24% の LOH 頻度を示した。これは Ikaros の LOH 頻度のみ低いように思われたが、p53^{+/+} マウスにおける放射線照射胸腺リンパ腫による結果とおおむね類似していた。

本研究では p53^{+/+} バックグラウンドのマウスにおける γ 線照射誘発がんおよび胸腺リンパ腫の Rit1^{+/+} 遺伝子型の効果を調べた。Rit1^{+/+} p53^{+/+} よりも Rit1^{+/+} p53^{+/+} において明らかに高頻度にごんの発生が観察されたが、これは Rit1 のヘテロ型ががん、特に胸腺リンパ腫に対する感受性を与えていると考えられる。Rit1 の野生型アレルは、Rit1^{+/+} p53^{+/+} マウスの 24 すべての胸腺リンパ腫において存在し、Rit1 たんぱくの発現は胸腺リンパ腫の 70% において保たれていた。また、Rit1^{+/+} マウスの胸腺細胞は Rit1^{+/+} マウスの胸腺細胞よりも分化と生存状態が悪いことが明らかとなった。以上により Rit1 遺伝子は、野生型アレルの不活性化なしに lymphomagenesis に貢献することが出来る、つまり haploinsufficient に作用していることを強く示唆するものであり、学位論文としての価値を認める。