	ふなだ　　りこ
氏　　名	船 田 理 子
学　　位	博 士 （医学）
学 位 記 番 号	新大院博(医)第177号
学位授与の日付	平成19年 3月22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	*Bcl11b* heterozygous mice are susceptible to N－methyl－N－nitrosourea—induced thymic lymphomas (*Bcl11b* heterozygous マウスは、N-メチル-N-ニトロソウレア誘発胸腺リンパ腫に感受性を示す)
論文審査委員	主査　教授　青 柳　豊
	副査　教授　木 南　凌
	副査　教授　内 藤　眞

博士論文の要旨

緒論：マウスリンパ腫は、放射線誘発によるがんの古典的なモデルのひとつである。放射線は染色体欠損や相互転座のような広範囲の DNA 変化をもたらすことが知られている。我々は、以前の研究で、γ線誘発胸腺リンパ腫の解析より Bcl11b/Rit1 遺伝子を単離し、がん抑制遺伝子であることを報告した。一方、N-methyl-N-nitrosourea (MNU)は、アルキル化剤で DNA のグアニン基を修飾し、DNA 複製時グアニンからアデニンへ変化させる。したがって、両者の DNA 変異への貢献の様式は異なる。そこで、Bcl11b Bcl11b+/-の遺伝子型が、MNU 誘発胸腺腫の発症にどのような影響を与えるかを検討した。

方法： BALB/c の遺伝的背景をもつ Bcl11b+/-遺伝子型マウスを用いたが、 Bcl11b 遺伝子座領域は C57BL/6 の染色体をもつ。これはノックアウトマウスが由来した ES 細胞が C57BL/6 起源であることによる。このマウスを BALB/c と交配させ、50 頭の仔に MUN を投与し、250 日間経過観察した。野生株アリルの欠損は、Bcl11b+/-マウスの胸腺腫 27 症例で、 BALB/c と C57BL/6 アレルを区別できる Mit マーカーを用いて PCR 法で行った。リンパ腫における Bcl11b の蛋白発現はウエスタンブロット法で解析した。K-ras 遺伝子の点変異は、SSCP 法およびシークエンス解析によって解析した。

結果： MNU を投与した 50 頭のマウスのうち、36 頭のマウスが腫瘍を発症し、その 34 の腫瘍は胸腺リンパ腫であった。Bcl11b の遺伝子型は 30 頭が Bcl11b+/-で、18 頭が野生型であった。Bcl11b+/-マウスは高率に腫瘍を発症し、潜伏期間が短縮していた(P<0.0001 in Mantel-Cox test)。野生型のアレルの消失があるかどうかを Mit マーカーを用いて検索したが、27 胸腺リンパ腫中 3 例に変化は見られたものの、これらの 3 例にも BALB/c の野生株アリルの消失はなかった。2 箇所の zinc finger ドメイン領域で、DNA 変異を検索したが、塩基配列の変化はみられなかった。一方、Bcl11b 蛋白発現は、19 例のリンパ腫中 5 例でみられた。5 例の蛋白発現のレベルは、正常胸腺より低かった。さらに、K-ras 遺伝子の変異を検索した。変異を MNU 誘発リンパ腫の 8 症例で認め、Bcl11b ヘテロ接合性のリンパ腫で 6 例、Bcl11b 野生株リンパ腫で 2 例であった。ヘテロ接合型に発症したリンパ腫の K-ras 変異頻度は 22%で、以前の我々の報告と同様の結果で、ガンマ線誘発リンパ腫より高頻度であった。

考察：Bcl11b+/-遺伝子型が MNU 誘発胸腺リンパ腫の発症に関与するかどうかを検討した。その結果、Bcl11b 遺伝子の 1 つのアレルの消失だけで、リンパ腫の発症を高めることが分かった。これは、Bcl11b は放射線誘発リンパ腫だけでなく、MNU 誘発胸腺リンパ腫にも、がん抑制遺伝子として機能することを示す。Bcl11b 野性型アリルの欠失は、Bcl11b+/-マウスのγ線誘発胸腺リンパ腫では高頻度に（54%）

でみられたが、 27 の MNU 誘発胸腺リンパ腫では全くみられなかった。また、Bcl11b の zinc finger domain 領域の変異解析でも、Bcl11b の欠損は観察されなかった。一方、K-ras 変異は Bcl11b+/-リンパ腫でみられ、その頻度は Bcl11b 野生株とほぼ同様であった。K-ras と Bcl11b は、リンパ腫発症に寄与する様式は異なる可能性が示唆された。ウエスタンブロット解析から Bcl11b+/-リンパ腫の 74%(14/19)に発現の消失がみられ、Bcl11b の epigenetic な不活化の存在が示唆された。この不活化がリンパ腫での Bcl11b の機能欠損に寄与するものと考えられるが、どのリンパ腫発症段階で不活化するのかは明らかではない。しかし、おそらくリンパ腫の発症の頻度に影響し、Bcl11b+/-マウスの腫瘍発症潜伏期を短縮するのに貢献していると考えられる。

胸腺細胞での Bcl11b の機能欠損は、CD4-CD8-CD44-CD25- (DN4 stage)の成熟段階でのアポトーシスを誘導することが知られている。この段階の胸腺細胞は、増殖能を持つことが知られている。そのため、胸腺から増殖細胞を削除する、Bcl11b 機能欠如はがん抑制遺伝子としての Bcl11b の可能性に矛盾しているように思われる。しかし、前がんもしくは低形成状態の細胞は、アポトーシスに付随して細胞分裂が高頻度に観察される。したがって、そのアポトーシスは細胞増殖の上昇率を反映している可能性を示唆する。

我々の、以前の研究で、野生株アリルの欠損した Bcl11b+/-マウスは、γ線照射後は、前がん状態におけるクローナルな成長を呈する。その結果、胸腺細胞は、細胞増殖が正常に分化し、同時に細胞分裂と、おそらく正常組織周囲で調節されている細胞死の間のバランスをとるメカニズムによって、アポトーシスがおこっていると示唆される。それ故、Bcl11b の後成的な不活化は、 リンパ腫発がん性へ寄与する前リンパ腫段階での胸腺細胞が細胞増殖できることに関与している可能性がある。

（論文審査の要旨）

申請者はがん抑制遺伝子・Bcl11b の遺伝子型が N-methyl-N-nitrosourea (MNU)誘発胸腺リンパ腫の発症にどのような影響を与えるかを検討した。

Bcl11b 遺伝子野生型(+/+)とヘテロ(+/-)型のマウスに MUN を投与し、250 日間経過観察した。Bcl11b 遺伝子型のタイピングは Mit マーカーを用い PCR 法で行った。腫瘍組織での Bcl11b 蛋白発現はウエスタンブロット法で解析した。K-ras 遺伝子の点変異は、SSCP 法および直接シークエンス法で解析した。

結果は以下のとおりであった。MNU 投与した 50 頭のうち、36 頭が腫瘍を発症し、その 34 腫瘍は胸腺リンパ腫であった。Bcl11b の遺伝子型は 30 頭が Bcl11b+/-で、その内 27 頭発症し、野生型マウスと比べ、有意にリンパ腫を発症した。リンパ腫で野性型アレルの消失を検討すると、3/27 例にしか変化は見られず、しかもこれらの 3 例で残存しているアレルは野生型アリルであった。2 箇所の zinc finger ドメイン領域で DNA 変異を検索したが、塩基配列の変化はみられなかった。Bcl11b 蛋白発現は、胸腺リンパ腫中 5/19 例でみられたが、その発現の高さは正常胸腺より低かった。K-ras 遺伝子の変異は、8 症例で認め、Bcl11b ヘテロ型のリンパ腫で 6 例、Bcl11b 野生型リンパ腫で 2 例であった。

これらの結果から、Bcl11b 遺伝子の 1 つのアレルの消失は放射線誘発リンパ腫だけでなく、MNU 誘発胸腺リンパ腫にもがん抑制遺伝子として機能すると、申請者は考察しており，以上の知見を得たところに博士論文としての価値を認める。