

マウス胸腺リンパ腫由来細胞における siRNA による Ikaros 発現抑制は薬剤で誘導される アポトーシスに抵抗性を示す

田 覚 健 一

新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器内科学分野 (第三内科)

Repressed Ikaros Expression with siRNA in Mouse Thymic Lymphoma Cells Confers Resistance to Drug-induced Apoptosis

Kenichi TAKAKU

Division of Gastroenterology and Hepatology,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

要 旨

Ikaros はマウス CD3 δ エンハンサーに結合するリンパ球特異的な転写因子として発見され、リンパ球の分化と増殖に関与する遺伝子である。マウスに γ 線照射し誘発された胸腺リンパ腫の LOH 解析から、Ikaros 遺伝子が LOH と点変異を起こすことが分かり、がん抑制遺伝子として機能していることが明らかになった。また、ヒト白血病患者において Ikaros 遺伝子の欠失が起こり、dominant-negative タイプのアイソフォームが過剰発現していることも報告されている。そこで、RNA 干渉法を用いて Ikaros の発がん過程への関与を検索するモデルマウス実験系の確立を目的として、Ikaros siRNA を発現するレンチウイルスを作製しその効果の検証を行った。マウスに Ikaros siRNA 発現ベクターを *in vivo* 投与する前段階として、マウス胸腺リンパ腫由来の BW5147 細胞を用いて Ikaros の発現抑制とアポトーシスとの関連性について検討した。Ikaros siRNA 発現レンチウイルスを感染させた BW5147 細胞にグルココルチコイドホルモンのデキサメタゾンまたは酸化ストレスによる細胞障害を起こす過酸化水素を添加しアポトーシスを誘導させ、Ikaros 発現抑制の影響を調べた。ヨウ化プロピジウム (PI) 染色を用いてアポトーシスの解析を行った結果、どちらの薬剤においても Ikaros の発現抑制群はコントロール群よりもアポトーシスが 30-35%抑制された。また、ウエスタンブロット解析からも、Ikaros の発現が抑制されるとアポトーシス実行タンパク質・caspase 3 の低下が観察された。抗アポトーシスタンパク質・Bcl-2 および Bcl-xL の発現レベルについては、特異的な関連性は認められなかった。これらの結果から、今回作製された Ikaros siRNA を発現するレンチウイルスベクターは、胸腺リンパ腫発症メカニズムを調べるモデル系に利用しうることが分かった。

キーワード：アポトーシス、siRNA 発現レンチウイルスベクター、caspase 3、Ikaros、RNA 干渉法

Reprint requests to: Kenichi TAKAKU
Division of Gastroenterology and Hepatology
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
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
新潟大学医歯学総合研究科消化器内科学分野
田 覚 健 一

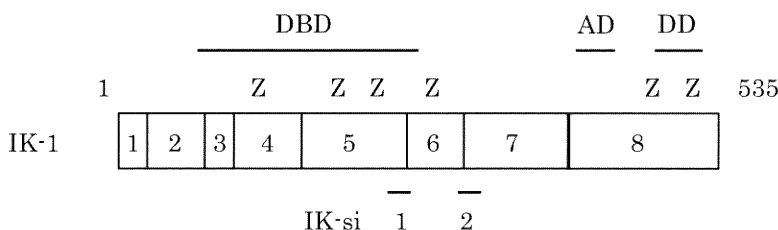


図1 Ikaros の構造模式図と siRNA のターゲット部位

Z, DBD, AD および DD はそれぞれ Zinc finger domain, DNA Binding Domain, Activation Domain および Dimerization Domain を示している. 四角内の 1-8 はエクソンを示し, 用いた IK-si1 と IK-si2 の標的配列の位置を下側に示している.

緒 言

Ikaros タンパク質は主に胸腺や脾臓で発現し, リンパ球の分化と増殖に関与するリンパ球特異的な転写因子であることが知られている¹⁾⁻³⁾. この Ikaros は 8 つのエクソンから構成され, 分子中に 6 つの亜鉛フィンガードメインをもち, N 末端側 4 つのドメインは DNA 結合ドメインであり, C 末端の 2 つは二量体形成ドメインとしての機能をもち, Ikaros ファミリータンパク質間でホモまたはヘテロの二量体を形成する (図 1 参照)¹⁾⁻³⁾.

マウスに γ 線照射し誘発された胸腺リンパ腫の loss of heterozygosity (LOH) 解析から, 11 番染色体上に存在するがん抑制遺伝子として *Ikaros* が同定された⁴⁾. さらに, リンパ腫を発症した *Ikaros* 遺伝子の塩基配列決定から, N 末端側 (アミノ酸残基 147-194) に存在する亜鉛フィンガードメインに 6 箇所と C 末端側に位置する activation domain (アミノ酸残基 329-352) に 5 箇所のアミノ酸置換があり, *Ikaros* タンパク質にフレームシフトやナンセンス変異が生じることが明らかになり, *Ikaros* がマウスリンパ腫発症に直接的に関与することが強く示唆された⁴⁾. リンパ腫発症には *Ikaros*⁴⁾⁵⁾ のほか, *Bcl11b/Rit1*, *Pten* といったがん抑制遺伝子⁶⁾⁻⁸⁾ や *Myc*, *Notch1* といったがん遺伝子の関与が知られている⁹⁾¹⁰⁾. これら遺伝子の変異は胸腺リンパ腫で高頻度 (23-

89%) に起きることが認められている⁵⁾. 野生型マウスに放射線照射した 30 日後の萎縮胸腺と比較したところ, *Bcl11b* や *Pten* の LOH, *Myc* トリソミーがみられるが, *Ikaros* の LOH や *Notch1* の内部欠失は照射後 100 日以降の萎縮胸腺で高頻度に検出された. また, *Bcl11b*^{+/-}型マウスに放射線照射した 30 日後の萎縮胸腺では, *Ikaros* の LOH が検出されるようになるが, 他の遺伝子変異は野生型マウスの場合と変わらず顕著な差はなかった. このことから, リンパ腫発症の過程で, *Bcl11b* や *Myc* の遺伝子変異は初期に起こり *Ikaros*, *Pten* および *Notch1* の変異は後期に起きることが推測されている⁵⁾¹¹⁾.

ヒト白血病患者においても, *Ikaros* 遺伝子領域に欠失が生じ, とくに *Ikaros* のアイソホームである IK-6 (エクソン 3 から 7 の欠落したもので DNA 結合ドメインを欠くもの) の過剰発現が dominant-negative となり白血病的発症と関連することが報告されている¹²⁾⁻¹⁴⁾. 近年, CML (Chronic Myelogenous Leukaemia) から ALL (Acute Lymphoblastic Leukaemia) に転換する時 (lymphoid blast crisis), この *Ikaros* 遺伝子の欠失が高頻度 (83.7%) に認められることも報告されている¹⁵⁾.

このように, リンパ腫発症過程の時期特異的に *Bcl11b/Rit1* や *Ikaros* の変異が観察されている. リンパ腫発症における分子的基盤の解明には, こ

れら変異の時期特異性と遺伝子間の相互作用を解析する必要があり、そのためのマウス実験系が必要となる。そこで、RNA 干渉法を用いて *Ikaros* の発がん過程への関与を検索するモデルマウス実験系の確立を目的として、マウス胸腺リンパ腫由来の BW5147 細胞を用いて *Ikaros* siRNA 発現レンチウイルスベクターによる *Ikaros* の発現抑制とその抑制の薬剤で誘導されるアポトーシスへの効果の検証を行った。

方 法

BW5147 細胞培養

マウス胸腺リンパ腫由来の BW5147 細胞は 10 % FCS, 1 % ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた RPMI1640 培地を用いて 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で培養を行った。

Ikaros shRNA 発現レンチウイルスの作製

レンチウイルスベクター pLKO.1 に組み込まれた *Ikaros* に対する 2 種類の siRNA 発現プラスミド (MISSIONshRNA) を Sigma-Aldrich から購入した。プラスミド DNA を Lentiviral Packaging Mix を用いて *in vitro* でパッケージングした後、HEK293T 細胞に Fugene 6 を用いてトランスフェクトし、レンチウイルス粒子を作成した。トランスフェクトして 72 時間後、培養細胞を 3000 回転/分、10 分間の遠心で集め、上清を回収した。0.45 μm のフィルターを過した後、Amicon Ultra 100K NMWL device を用いて遠心濃縮し、使用するまで -80 °C で保存した。ウイルス力価は QuickTiter Lentivirus Quantitation Kit (Cell Biolabs 社) を用いて測定した。

細胞へのレンチウイルスベクター感染

12 ウエルマイクロプレートで培養した BW5147 細胞 (5 × 10⁵ 細胞/ml) に shRNA 発現レンチウイルス (m.o.i 10) を Polybrene (6 μg/ml) 用いて感染させ、37 °C, 5 % CO₂ 存在下で培養を行った。

デキサメタゾンまたは過酸化水素によるアポトーシスの誘導

Ikaros siRNA を発現するウイルスを BW5147 細胞に感染させてから 48 時間後に、BW5147 細胞培養液にデキサメタゾン (250nM)¹³⁾¹⁴⁾ または過酸化水素 (250 μM)¹⁶⁾ を添加した。デキサメタゾン処理は 48 時間後に、過酸化水素処理は 6 時間後にそれぞれ細胞を回収した。

アポトーシスの測定

細胞をヨウ化プロピジウム (PI) (0.1 % BSA, 10 μg/mL RnaseA, 0.06 μg/mL PI in 1xPBS) 染色し、FACS 分析を行った。データの解析は、Flow-Jo Software (Tree-Star 社) を用いた。

ウェスタンブロット

各条件下で培養した BW5147 細胞を集め、PBS で遠心洗浄した後、SDS-PAGE のサンプル buffer で 10⁶ 細胞当たり 100ml に溶解した。10 % SDS-PAGE ゲルで電気泳動後、PVDF 膜にタンパク質を電気泳動的に転移させた。膜を 1 次抗体と 4 °C で一昼夜インキュベートした後、HRP で標識した 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。その後 Amersham の ECL ウェスタンブロット検出試薬キットを用いて化学発光させ、オートラジオグラフィでタンパク質の検出を行った。

抗体

用いた 1 次抗体は、*Ikaros* (Santa Cruz sc-13039), Actin (Santa Cruz sc-1615), Caspase 3 (Cell Signaling #9662), Bcl2 (Santa Cruz sc-492), Bcl XL (Cell Signaling #2762), Bax (Cell Signaling #2772) である。用いた 2 次抗体は HRP 結合抗 goat IgG (Santa Cruz sc-2020) と HRP 結合抗 rabbit IgG (Amersham NA934V) である。

結 果

1. *Ikaros* siRNA 発現レンチウイルスによる *Ikaros* の発現抑制

図 1 に示した位置に標的部位がある 2 種類の

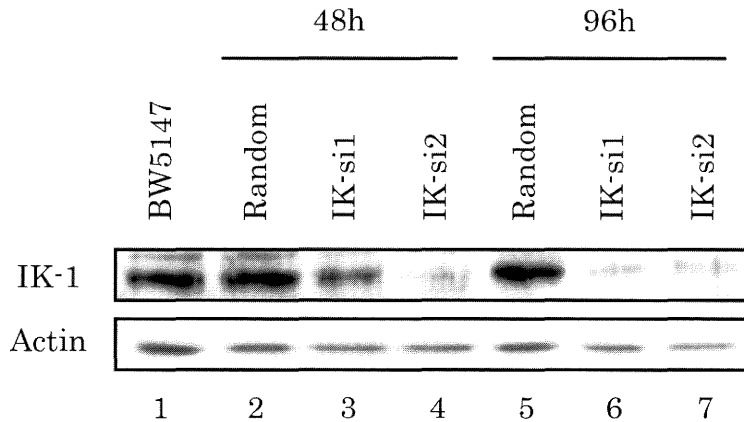


図2 BW5147細胞にIkaros siRNA発現レンチウイルスを感染させたときのIkaros発現抑制の時間経過

マウスゲノム中に存在しない配列(Random)(レーン2と5), Ikarosの標的配列をもつIK-si1(レーン3と6)およびIK-si2(レーン4と7)のsiRNA発現レンチウイルスをBW5147細胞に感染(moi = 10)させ, 48時間後と96時間後に細胞を回収し, 細胞抽出液を調製後, ウェスタンブロット法でIkarosの発現を調べた. レーン1のBW5147は無処理の細胞からの細胞中抽出液の発現量を示し, サンプルアプライ量の対照としてActinを示している.

Ikaros siRNA発現レンチウイルス(IK-si1とIK-si2)を作製し, これらがIkarosの発現抑制を行うかどうかを調べた. マウス胸腺リンパ腫由来のBW5147細胞にIK-si1, IK-si2レンチウイルスと対照としてランダム配列をもつrandom siRNA発現レンチウイルス(Random)をm.o.i.10で感染させ, 48時間後と96時間後に細胞を回収し, ウェスタンブロット法によりIkarosタンパク質の発現レベルを調べた. その結果は図2に示したように, 感染48時間後(レーン2-4)では, IK-si1での発現抑制効果がやや弱いものの(レーン3)IK-si2では>95%の抑制が認められ(レーン4), 感染後96時間(レーン5-7)ではIK-si1(レーン6)とIK-si2(レーン7)の両者とも>95%の発現抑制が認められた. 一方, Randomレンチウイルスは48時間後(レーン2)でも96時間後(レーン5)においても無処理のBW5147細胞(レーン1)と同じレベルのIkarosの発現がみられた. これらの結果から, 用いた2種類のレン

チウイルスベクター(IK-si1とIK-si2)は特異的にIkarosの発現抑制を行うことが確認できた.

2. デキサメタゾンおよび過酸化水素で誘導されたアポトーシスのIkaros siRNAによるIkaros発現抑制がアポトーシスに与える影響のPI-FACS解析

グルココルチコイドホルモンであるデキサメタゾン¹³⁾¹⁴⁾や過酸化水素¹⁶⁾はアポトーシスを誘導することが知られている. BW5147細胞にIK-si1, IK-si2およびRandomレンチウイルスを感染させ, 48時間後にデキサメタゾンまたは過酸化水素をそれぞれ250nMと250 μ Mの濃度で添加し, デキサメタゾン処理したものは48時間後に過酸化水素処理したものは6時間後に細胞を回収し, ヨウ化プロピジウム(PI)染色したのちFACS解析でアポトーシスの程度を測定した.

図3はデキサメタゾンで誘導されるアポトーシスに対するIK-si1およびIK-si2レンチウイルス

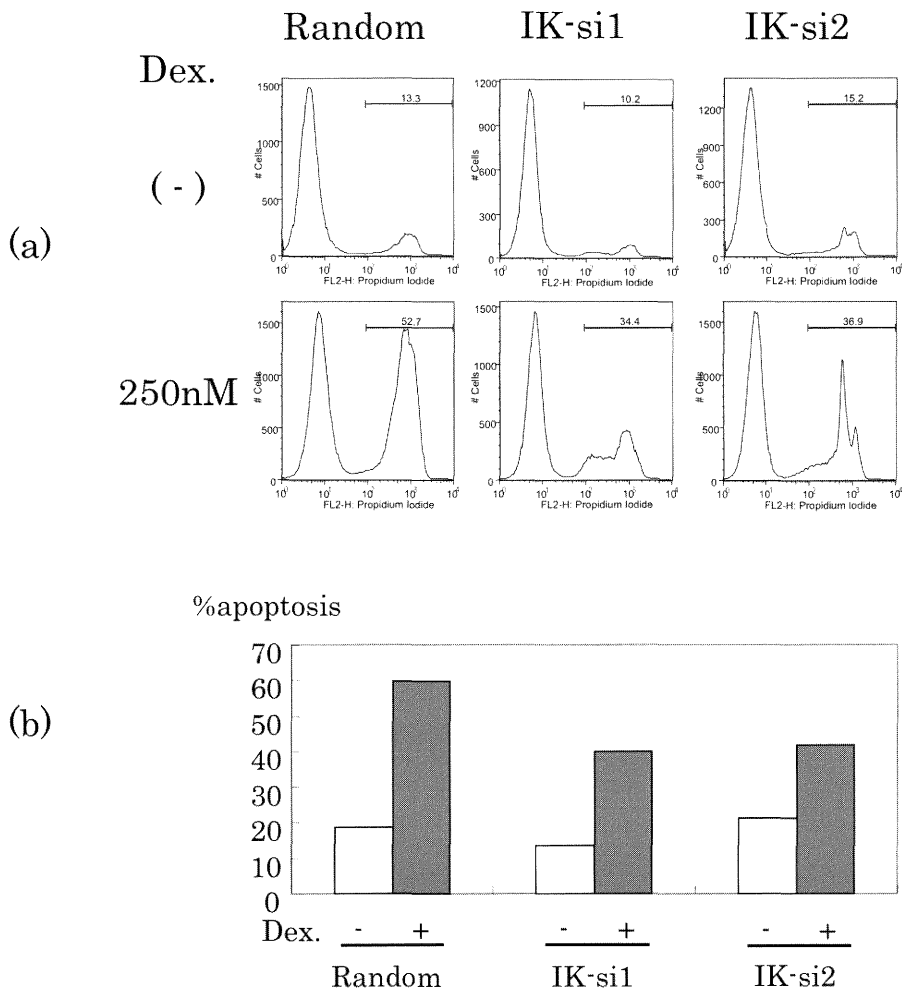


図3 デキサメタゾンで誘導したアポトーシスに対する Ikaros 発現抑制の影響
 (a) Ikaros siRNA を発現するレンチウイルス (IK-si1 と IK-si2) と対照ウイルス (Random) を BW5147 細胞に感染させてから 48 時間後に, BW5147 細胞培養液にデキサメタゾン (250nM) を添加したものと無添加の対照群の 2 つに分け, 48 時間後に細胞を回収し, PI 染色を行い, FACS 解析した結果を示している. 右側のピークがアポトーシスにより断片化された DNA を示している.
 (b) 2 回のアポトーシス測定結果の平均したものをグラフに表したもの.

スペクターによる Ikaros 発現抑制の影響を調べた結果を示している. 図 3-(a) は FACS 解析結果の一例を示しており, アポトーシスの程度は PI 染色陽性の分画 (バーでその領域を指定) で表さ

れている. Random レンチウイルス感染細胞では, デキサメタゾンの存在しない時は 10.2 %, 処理後は 52.7 % と上昇している. 一方, IK-si1 または IK-si2 感染細胞では処理前はそれぞれ 8.86 %,

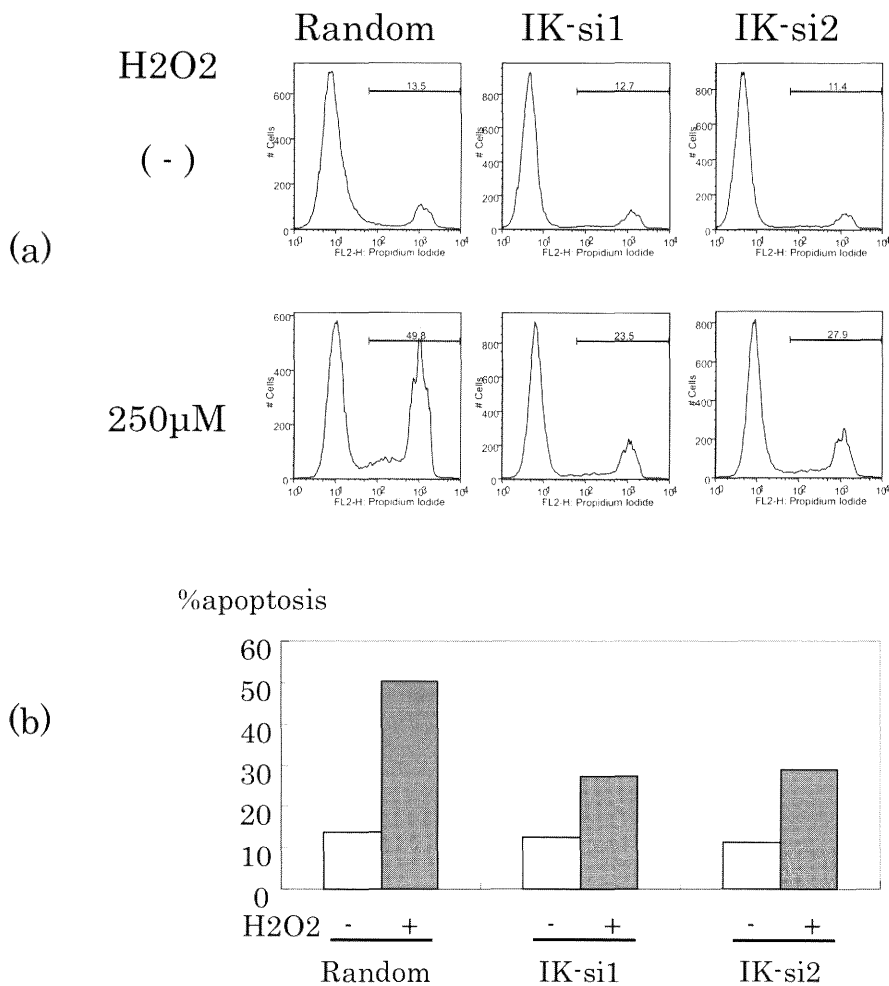


図4 過酸化水素で誘導したアポトーシスに対する Ikaros 発現抑制の影響

- a) Ikaros siRNA を発現するレンチウイルス (IK-si1 と IK-si2) と対照ウイルス (Random) を BW5147 細胞に感染させてから 48 時間後に, BW5147 細胞培養液に過酸化水素 (250 μ M) を添加したものと無添加の対照群の 2 つに分け, 6 時間後に細胞を回収し, PI 染色を行い, FACS 解析した結果を示している.
- b) 2 回のアポトーシス測定結果の平均したものをグラフに表したもの.

16.6%であるのに対して, 処理後は 34.4%, 36.9%と, その上昇は抑えられていた. 図 3-(b) はそれぞれのレンチウイルスベクターでのアポトーシスの割合を 2 回の実験結果の平均で示している. このように, Ikaros の発現抑制によりデキサメタゾンで誘導されるアポトーシスの抑制がみら

れた.

図 4 には過酸化水素で誘導されるアポトーシスに対する Ikaros siRNA 発現レンチウイルスの影響の結果を示している. 図 4-(a) は FACS 解析結果の一例を示しており, アポトーシスの程度を現わしているピークの割合は過酸化水素の存在し

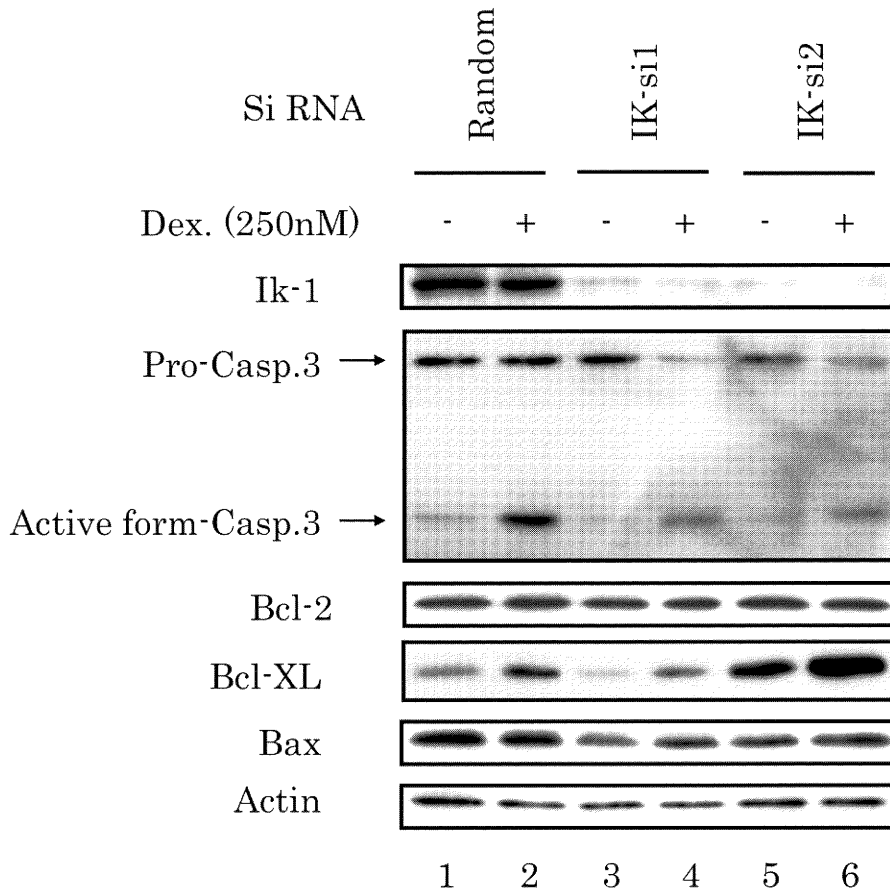


図5 デキサメタゾンで誘導したアポトーシスに対する Ikaros 発現抑制のアポトーシス関連タンパク質への影響

図3と同様な処理をした細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法でアポトーシス関連タンパク質の解析を行った。サンプルアプライ量の対照としてアクチンを示している。

ない時には Random, IK-si1, IK-si2 それぞれ 13.5%, 12.7%, 11.4% であるのに対して、過酸化水素処理でアポトーシスを誘導した時にはそれぞれ 49.8%, 23.5%, 27.9% となった。図4-(b) はそれぞれのレンチウイルスベクターでのアポトーシス割合の2回の実験結果の平均を示している。Ikaros の発現抑制により過酸化水素で誘導されるアポトーシスの抑制がみられ、図3のデキサメタゾンと同様な結果が得られた。図3と図4の結果が示す Ikaros のアポトーシス抑制能は、

Ikaros ががん抑制遺伝子として機能する仮説と矛盾がなく、Ikaros の発現とアポトーシスの実行は逆相関することが確認された。

3. デキサメタゾンで誘導されたアポトーシスに対する Ikaros siRNA による Ikaros 発現抑制がアポトーシスに与える影響のウエスタン法による解析

図3と図4の結果は、Ikaros の発現とアポトーシスの実行が逆相関することを物語っている。そ

ここで、**図3**に示したのと同様なデキサメタゾン処理を行った後、アポトーシス関連因子発現への影響をウエスタン法により調べた。

図5に示すように、Random 配列 siRNA の発現では Ikaros の発現抑制効果はなく (レーン 1 と 2)、デキサメタゾン処理でプロカスペース-3 が活性化され活性型カスペース-3 に変換して (レーン 1 とレーン 2 の比較) アポトーシスが起きているのが確認された。一方、IK-siRNA1 と IK-siRNA2 の発現で、Ikaros の発現は抑制され (レーン 3-4, レーン 5-6)、活性型カスペース-3 レベルの低下がみられ (レーン 4 とレーン 6)、対照 (Random, レーン 2) に比べてアポトーシスの実行が低下していることが確認された。

次に、Bcl-2 ファミリータンパク質である Bcl-2 と Bcl-xL (アポトーシス抑制に働く) および Bax (アポトーシス促進に働く) のタンパク質発現について調べた。その結果、Bcl-2 発現レベルはいずれの場合も顕著な変化がみられなかったが、Bcl-xL 発現レベルが Random (レーン 1 と 2 の比較) や IK-si1 (レーン 3 と 4 の比較) で上昇がみられ、特に IK-si2 で顕著であった (レーン 5 と 6 の比較)。また、Bax 発現レベルは Random (レーン 1 と 2) に比べて、IK-si1 (レーン 3 と 4) と IK-si2 (レーン 5 と 6) でやや低下していたが、アポトーシス誘導の有無では変化が見られなかった。

以上の結果から、Ikaros の発現抑制によってデキサメタゾンで誘導されるアポトーシスが抑制される現象は、Bcl-xL 発現レベルの上昇と関連することが示唆された。

考 察

マウスリンパ腫¹⁷⁾、ヒト急性リンパ性白血病 (ALL; acute lymphoblastic leukemia)¹²⁾ や CML (Chronic myelogenous leukemia から ALL に変換する lymphoid blast crisis のとき¹⁵⁾ にみられる Ikaros の遺伝子欠失は、DNA 結合ドメイン (**図1**のエキソン 3 から 7 の領域) を欠くものでアイソフォーム IK-4, Ik-6 や IK-8 の過剰発現による

dominant-negative タイプのものが高頻度にあることが報告されている²⁾³⁾。この欠失には Rag による組換えの関与が示唆されている¹⁵⁾。これらの報告やこれまでの Ikaros 変異の報告は DNA 結合ドメインのエキソン 3 から 7 を欠き、dominant-negative として働くものである。従って、Ikaros はがん抑制遺伝子と想定されるが、その役割、抑制機構は不明である。

放射線照射で誘発されるマウスリンパ腫はヒトの一つのリンパ腫・白血病のモデルである。発症に関与する遺伝子としてがん抑制遺伝子としての Ikaros⁴⁾⁵⁾のほか、Bcl11b, Pten といったがん抑制遺伝子^{6)~8)} や Myc, Notch1 といったがん遺伝子の関与が知られている⁹⁾¹⁰⁾。リンパ腫および放射線照射 30 日後、100 日後および 150-250 日後の萎縮胸腺でのこれら遺伝子変異の解析を野生型マウスや Bcl11b^{+/-}マウスで行った結果から、リンパ腫発症の過程で、Bcl11b や Myc の遺伝子変異は初期に起こり Ikaros, Pten および Notch1 の変異は後期に起きることが推測されている⁵⁾¹¹⁾。このように、リンパ腫発症過程の時期特異的に Bcl11b や Ikaros の変異が観察されたことから、リンパ腫発症における分子的基盤の解明には、これら遺伝子変異の時期特異性と遺伝子間の相互作用を解析する必要があり、そのためのマウス実験系が必要と考えられる。

時期特異的な発現阻害を行うマウス実験系として conditional knockout マウスを用いることも選択肢としてあるが、既に Bcl11b^{+/-}マウス⁶⁾⁷⁾ が利用できることから Ikaros の発現抑制を RNA 干渉法により時期特異的に行うモデル系の確立を目指すこととした。その前段階として、マウス胸腺リンパ腫由来の BW5147 細胞を用いて Ikaros siRNA 発現レンチウイルスベクターによる効率のよい Ikaros の発現抑制効果が認められるか、またその抑制がデキサメタゾンまたは過酸化水素で誘導されるアポトーシスに及ぼす影響を調べた。従来の Ikaros の機能阻害の研究はエキソン 3 から 7 を欠く (**図1**) タイプ・IK-6 の発現ベクターをリンパ球系細胞にトランスフェクトすることで行われており¹³⁾¹⁴⁾、siRNA による Ikaros 発現抑制

を用いた報告はみられていない。

図 2 および図 5 に示したように、Ikaros siRNA 発現レンチウイルスを感染させた BW5147 細胞の Ikaros 発現は、感染後 48 時間でほぼ 95 % 以上抑制された。マウスゲノム中に存在しない Random 配列を発現するレンチウイルスでは何ら阻害効果は見られなかったことから、ウイルスを感染させたことによる阻害効果ではなく Ikaros 特異的抑制効果であることが確認された。siRNA による Ikaros 発現の抑制が、デキサメタゾンまたは過酸化水素で誘導されるアポトーシスに対してどのような影響を与えるのかを検討した結果がそれぞれ図 3 と図 4 に示した。Ikaros はがん抑制遺伝子としての機能をもつことから、Ikaros の発現抑制をうけた細胞はアポトーシス抵抗性を示すことが予測され、実際、予想通りの結果が得られた。このアポトーシス抵抗性を示すことは、dominant-negative タイプの Ikaros で報告されていると同様の結果であった¹⁴⁾¹⁵⁾。このアポトーシス抵抗性がアポトーシスに関与するどのようなタンパク質の変化と関連しているのかを検討したのが図 5 に示すウエスタンブロット解析の結果である。Ikaros の発現抑制によりアポトーシスの実行タンパク質である活性型 caspase3 の減少がみられたが、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-xL および Bcl-2 レベルには相関が見られなかった。この結果は、dominant-negative タイプの IK-6 を用いたときに報告されている結果とはかならずしも一致しなかった。IK-6 の過剰発現により Bcl-xL レベルが上昇するが Bcl-2 には変化がないとするもの¹⁴⁾ と Bcl-2 レベルが上昇するが Bcl-xL には変化がないとするもの¹⁵⁾ が報告されている。

迅速で効果的な遺伝子解析の手段や遺伝子治療の新しいアプローチとして、レンチウイルスベクターに組み込まれた siRNA が細胞からマウス個体に応用されることが既に報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。このことから、リンパ腫発症過程における遺伝子変異の時期特異性と遺伝子間の相互作用を個体レベルで解析するモデルマウス実験系に、IK-siRNA レンチウイルス発現ベクターの利用が有用

であると考えられる。

結 論

Ikaros はアポトーシス促進作用をもつがん抑制遺伝子である。この Ikaros 発現を抑制する Ikaros siRNA 発現レンチウイルスを作製した。マウス胸腺リンパ腫由来の BW5147 細胞にこのウイルスを感染させると、アポトーシス誘導物質投与により誘発されるアポトーシスから抵抗性となることがわかった。この Ikaros siRNA 発現ベクターはリンパ腫発症メカニズムの解析を行うマウス *in vivo* モデル実験系に利用しうることが分った。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました三嶋行雄准教授、木南凌教授、青柳豊教授（分子細胞医学専攻遺伝子制御講座）に深謝いたします。

文 献

- 1) Georgopoulos K, Moore DD and Derfler B: Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 258: 808 - 812 1992.
- 2) Georgopoulos K, Winandy S and Avitahl N: The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annual Review of Immunology* 15: 155 - 176, 1997.
- 3) Chrousos G and Kino T: Ikaros transcription factors: flying between stress and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 844 - 848 2005.
- 4) Okano H, Saito Y, Miyazawa T, Shinbo T, Chou D, Kosugi S, Takahashi Y, Odano S, Niwa O and Kominami R: Homozygous deletions and point mutations of the Ikaros gene in g-ray-induced mouse thymic lymphomas. *Oncogene* 18: 6677 - 6683, 1999.
- 5) 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.
- 6) 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 Comm* 301: 598 - 603, 2003.
 - 7) Wakabayashi Y, Watanabe H, Inoue J, Takeda N, Sakata J, Mishima Y, Hitomi J, Yamamoto T, Utsuyama M, Niwa O and Kominami R: *Bcl11b* is required for differentiation and survival of alphabetaT lymphocytes. *Nature Immunology* 4: 533 - 539, 2003.
 - 8) Mao HJ, Wu D and Perez - Losasa J: Genetic interactions between *Pten* and *p53* in radiation - induced lymphoma development. *Oncogene* 2: 8379 - 8385, 2003.
 - 9) Eischen CH, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ and Cvleveland JL: Disruption of the *ARF - Mdm2 - p53* tumor suppressor pathway in *Myc* - induced lymphomagenesis. *Genes and Development* 13: 2658 - 2669, 1999.
 - 10) Lin YW, Nicholas RA, Letterio JJ and Aplan PD: *Notch1* mutations are important for leukemic transformation in murine models of precursor - T leukemia/lymphoma. *Blood* 107: 2540 - 2543, 2006.
 - 11) Kominami R, Ohi H, Kamimura K, Maruyama M, Yamamoto T, Takaku K, Morita S, Go R and Mishima Y: γ -ray - induced mouse thymic lymphomas: *Bcl11b* inactivation and prelymphoma cells. *Radiation Health Risk Sciences* (Eds, Nakashima et al.) Springer Library of Congress Control Number: 2008937558, pp 231 - 239, 2009.
 - 12) Sun L, Heerema N, Crotty L, Wu X, Navara C, Vassilev A, Sensel M, Reaman GH and Uckun FM: Expression of dominant - negative and mutant isoforms of antileukemic transcription factor *Ikaros* in infant acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 680 - 685, 1999.
 - 13) Yagi T, Hibi S, Takanashi m, Kano G, Tabata Y, Imamura T, Inaba T, Morimoto A, Toda S and Iashuku S: High frequency of *Ikaros* isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implication for up - regulation of the antiapoptotic protein *Bcl - XL* in leukemogenesis. *Blood* 99: 1350 - 1355, 2002.
 - 14) Sezaki N, Ishiuramaru F, Takata M, Tabayashi T, Nakase K, Kozuka T, Fujii K, Nakayama H, Teshima T, Harada M and Tanimoto M: Over - expression of the dominant - negative isoform of *Ikaros* confers resistance to dexamethasone - induced and anti - IgM - induced apoptosis. *British Journal of Haematology* 121: 165 - 169, 2003.
 - 15) Mullighan CG, Miller CB, RadykE I, Phillips LA, Dalton J, Ma L, White D, Hughes TP, LeBeau MM, Pui C - H, Relling MV, Shurtleff SA and Downing JR: *BCR - ABL1* lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of *Ikaros*. *Nature* 453: 110 - 114, 2008.
 - 16) Aung W, Hasegawa S, Furukawa T and Saga T: Potential role of ferritin heavy chain in oxidative stress and apoptosis in human mesothelial and mesothelioma cells: implications for asbestos - induced oncogenesis. *Carcinogenesis* 28: 2047 - 2052, 2007.
 - 17) Kakinuma S, Kodama Y, Amasaki Y, Yi S, Tokairin Y, Arai M, Nishimura M, Monobe M, Kojima S and Shimada Y: *Ikaros* is a mutational target for lymphomagenesis in *Mlh1* - deficient mice. *Oncogene* 26: 2945 - 2949, 2007.
 - 18) Rubinson DA, Dillon C.P, Kwaikowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja L, Zhang M, McMaus MT, Gertler FB, Scott ML and Parijs LV: A lentivirus - based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature Genetics* 33: 401 - 406, 2003.
 - 19) Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y and Verma IM: Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2140 - 2145, 2002.

(平成21年6月26日受付)