

	かねふじ つとむ
氏名	兼藤 努
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第173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	Expression of TCR $\alpha$ $\beta$ Partly Rescues Developmental Arrest and Apoptosis of $\alpha$ $\beta$ T cells in <i>Bcl11b</i> <sup>-/-</sup> Mice ( <i>Bcl11b</i> ノックアウトマウスにおいて TCR $\alpha$ $\beta$ の発現は $\alpha$ $\beta$ T 細胞の分化の促進とアポトーシスの回避に部分的に関与する)
論文審査委員	主査 教授 青柳 豊 副査 教授 木南 凌 副査 教授 安保 徹

#### 博士論文の要旨

T 細胞はその分化過程において胸腺内で CD4-CD8-の double negative(DN)-T 細胞から CD8+ の immature single positive(ISP)-T 細胞を経て、CD4+CD8+の double positive(DP)-T 細胞となり、最終的に CD4 または CD8 のいずれかを発現する single positive(SP)-T 細胞となることで成熟 T 細胞となる。一方、新規遺伝子 *Bcl11b* は癌抑制遺伝子として単離され、*Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスの未成熟 T 細胞は DN-T 細胞、中でも CD44-CD25+DN3、もしくは ISP の段階で  $\alpha$   $\beta$  T 細胞の分化が止まる。*Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスと同様に DN ステージで分化が停止する *scid* マウスや *RAG*<sup>-/-</sup>マウスでは TCR 遺伝子の再構成が出来ないことにより pre-TCR シグナルが発現しないことが原因とされている。これらのマウスでは遺伝子再構成がなされない T 細胞はアポトーシスに陥るが、再構成された *TCR $\beta$*  が導入されたり、*p53* が欠損しアポトーシスを回避することで DP に分化することが出来る。我々は以前、全胸腺細胞を用いた解析で *Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスでは細胞表面への preTCR 複合体の発現が低下することを報告した。T 細胞の分化の停止は TCR シグナルの欠損が原因の一つと考えられたが、*p53* が欠損してもアポトーシスが回避できず、ほかのメカニズムも関与している可能性が示唆された。この機構を解明するため、我々は *Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスの胸腺細胞を DN3 ステージ、CD44-CD25- DN(DN4)ステージでフローサイロメトリー法を用いて分集し、解析した。

TCR  $\beta$  鎖の発現について解析すると DN3-T 細胞の細胞表面には発現は認められず、DN4 でも著しく減少していたが、細胞質内での発現は両者で確認された。このことにより TCR  $\beta$  鎖が細胞質内から細胞表面に至る過程に問題があり、TCR  $\beta$  鎖が発現しないことで、pre-TCR シグナルが欠損し、このことが分化停止の要因であると考えられた。しかし、*TCR $\beta$* 、もしくは *TCR $\alpha$   $\beta$*  のトランスジェニックマウスを用いた解析においても DN3 から DP ステージまでの分化が見られなかった。以上の解析から pre-TCR シグナルの欠損のみで *Bcl11b*<sup>-/-</sup>T 細胞の分化停止を説明することが出来なかった。次に、*TCR $\beta$*  遺伝子の再構成過程について半定量 PCR 法を用いて解析した。*Bcl11b*<sup>-/-</sup>DN3-T 細胞では *D $\beta$*  と *J $\beta$*  間の再構成は正常通りなされるが、*V $\beta$*  と *DJ $\beta$*  間の再構成はなされなかった。*VDJ* 遺伝子の再構成の際にヒストン H3 のアセチル化が起こり、クロマチンの

開存に関与するとの報告があり、クロマチン免疫沈降試験を用いて *Bcl11b*<sup>-/-</sup>DN3-T 細胞のヒストン H3 のアセチル化を調べた。しかし *Vβ* と *Dβ* において野生株との間でアセチル化に変化は見られなかった。次に、各々のステージでの細胞数に着目すると、DN3-T 細胞は野生株と同等だが、DN4-T 細胞は低下していた。そこで、TUNEL アッセイ、ウエスタンブロット法を用いて *Bcl11b*<sup>-/-</sup>DN-T 細胞のアポトーシスについて解析した。その結果、DN3-T 細胞ではコントロールと比し、TUNEL 陽性細胞に変化はなく、抗アポトーシス蛋白の Bcl-xl と Bcl-2 の発現増加が見られ、DN4-T 細胞では、TUNEL 陽性細胞が増加しており、Bcl-xl と Bcl-2 の発現低下が確認された。この結果から DN4 ステージでのアポトーシスが増加していることがわかった。その一方で *TCRαβ* のトランスジェニックマウスでの DN4-T 細胞の解析では、細胞数は変わらないもののアポトーシスの低下が見られ、Bcl-xl や Bcl-2 の発現上昇が見られた。

これらの解析から *Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスでは、preTCR シグナルが欠損し、T 細胞の分化が停止するが、TCR シグナルを導入することによって、全てを代償することが出来ず、TCRαβ の導入によってのみ DN4 への分化の促進と、DN4-T 細胞のアポトーシス回避をきたすことが明らかとなり、その一方で *Bcl11b* は DP ステージに進むために TCR シグナルの下流や、ほかのシグナルを介して T 細胞の分化誘導に関与していることが想定された。

(論文審査の要旨)

*Bcl11b* 遺伝子を欠損した *Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスに存在する胸腺 T 細胞の多くは CD4-CD8- の double negative (DN) 段階で分化が止まり、アポトーシスに陥る。同様に分化が停止する SCID マウスや *RAG*<sup>-/-</sup>マウスでは pre TCR シグナルが欠落することにより、DN の T 細胞がアポトーシスに陥ることが分化停止の原因と考えられている。興味深いことに、この停止は再構成された TCRβ を導入したり、*P53* を欠落させることで解除され、double positive (DP) 段階にまで分化が進行する。申請者は *Bcl11b* が T 細胞の分化にどのように関与するかを *Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスの胸腺 T 細胞を用いて解析している。

*Bcl11b*<sup>-/-</sup>マウスでは TCRβ の再構成は不完全ながら起こっているが、細胞表面への発現は低下していた。すでに再構成された TCRβ 遺伝子をもつトランスジェニックを用い、TCRβ シグナルを導入しても DP へは進行しなかった。しかし、DN3 段階から DN4 段階へ進行し、DN4 段階の T 細胞はアポトーシスを回避していた。これらの結果から *Bcl11b* は TCRβ の再構成だけでなく、その下流のシグナルなど他の経路を介して T 細胞の分化に関与することが示唆された。以上、*Bcl11b* 遺伝子が TCRβ シグナルと独立した分化シグナルに影響を与えることを明らかにした点に博士論文としての価値を認める。