

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 **AML1 (Runx1) is essential for development and maturation of T lymphocytes.**

和訳 **AML1 (Runx1) は T リンパ球の分化、成熟に必須である**

指導教官 永井 良三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 8 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 浅井 隆司

AML1 は CBF α 2、PEBP2 α B、Runx1 と呼ばれ、急性骨髄性白血病においてしばしば観察される t(8;21)転座に関与する。ショウジョウバエの *pair-rule* 遺伝子である *runt* とホモロジーを有する Runt 転写ファミリーに属し、 β サブユニット (PEBP2 β /CBF β) とヘテロ二量体を形成し標的となる遺伝子の転写調節をすることが知られている。

血液細胞の発生は、卵黄囊で起こる胎生型造血と、それと独立して大動脈・生殖隆起・中腎 (いわゆる AGM 領域) で起こる成体型造血の 2 系列が波状に起こることが知られているが、AML1 欠損マウスでは胎生型造血を認めるものの、成体型造血が完全に欠失していた。さらに胎生期 12.5 日にて脳室、脊柱管を中心とする出血にて胎生期致死を示した。AML1 が成体型造血のマスターレギュレーターであることは、様々な研究にて明らかにされているが、成体において AML1 がどういふ機能を示しているかについては AML1 欠損マウスが胎生期致死であるため十分に解明されてはいない。

AML1 は胸腺の各分化段階から末梢の T 細胞まで T リンパ球系で強く発現していることが知られている。従来の T リンパ球系 cell line を用いた解析、AML1 に対してドミナントネガティブな作用を有するとされる *runt* ドメインのみを強制発現させた *runt* トランスジェニックマウスによる解析から、AML1 が末梢 T 細胞の CD4,8 各分画への分化誘導に大きな影響を与えることが指摘されていた。しかしながら、AML1 の胸腺内での機能に関しては依然不明と言える状況であった。

Cre-loxP 系では同一方向を向いた *loxP* 配列により挟まれた DNA 断片が Cre リコンビナーゼの作用により環状に切り出されることが知られている。近年ではこの系を用いたコンディショナルノックアウトマウスの作製が可能となり、従来のジーンターゲット法では胎生致死の為に解析不可能であった時間軸、空間軸を限定した遺伝子欠損マウスの解析が可能となっている。今回私は *Cre-loxP* 系を用いた AML1 コンディショナルノックアウトマウスを樹立した。さらに T リンパ球特異的に Cre リコンビナーゼを発現する *lck-Cre* トランスジェニックマウスとの交配により、T 細胞特異的に AML1 を欠損するマウスを作製した。

胸腺細胞は最も幼弱な CD4⁻CD8⁻ ダブルネガティブ (DN) 細胞から CD4⁺CD8⁺ ダブルポジティブ (DP) 細胞を経て、CD4⁺ または CD8⁺ シングルポジティブ細胞に到り、さらに成熟した上で末梢に放出されることが知られている。幼若な DN 細胞はさらに細胞表面の CD25、CD44 の発現により分類され、最も未熟な CD25⁻CD44⁺ (DN1) 細胞から、CD25⁺CD44⁺ (DN2) 細胞、CD25⁺CD44⁻ (DN3) 細胞、CD25⁻CD44⁻ (DN4) 細胞へと分化段階が進むことが知られている。

T 細胞特異的 AML1 欠損マウスは著しい胸腺低形成を示し、胸腺細胞数はコントロール群の 1/7 まで減少していた。CD4、CD8 分画を調べたところ、全分画とも大きく細胞数が減少していた。DN 細胞をさらに CD25、CD44 分画で解析したところ、CD25⁺CD44⁻ (DN3) 分画で細胞が蓄積し、それ以降の分化が著しく抑制されていた。DN3 細胞から DN4 細胞に分化する過程で TCRβ の遺伝子再構成を契機として pre-TCR 複合体 (pTCRα-TCRβ-CD3 複合体) が形成され、その刺激により急激な DP 細胞への分化増殖が見られるが、DN3 分画での分化抑制は pre-TCR 複合体またはその下流シグナルの発現低下を疑わせた。細胞表面 CD3ε、TCRβ の発現を FACS にて調べたところ、特に CD3ε の発現が大きく低下していた他、TCRβ の発現も DP 分画で軽度低下するとともに CD4SP 分画にて大きく低下していた。

さらにこれらのマウスに抗 CD3ε 抗体を直接投与し 40 時間後の胸腺細胞を解析した。pre-TCR

複合体の各構成要素遺伝子の欠損マウスでは抗 CD3 ϵ 抗体により分化抑制が解除され、DN 細胞が大部分 DP 細胞まで分化することが報告されているが、T 細胞特異的 AML1 欠損マウスでは DN3 分画における分化抑制が部分的に解除されたものの、本来誘導されるはずの細胞表面 TCR β の発現はほとんど誘導されなかった。さらに pre-TCR 複合体の各構成要素遺伝子の欠損マウスの分化抑制を解除することが知られている TCR β のトランスジェニック遺伝子を T 細胞特異的 AML1 欠損マウスとコントロールマウスに導入したマウスを作製し、これら胸腺を解析した。同様に DN3 分画における分化抑制は部分的にしか解除されなかった。確かに AML1 欠損胸腺細胞では細胞表面への pre-TCR 複合体の発現は低下しているが、そのみではなく pre-TCR 複合体下流のシグナル遺伝子の発現も抑制されていることが示唆された。

さらに、RAG2 欠損を遺伝的に背景に持った T 細胞特異的 AML1 欠損マウスを作製した。RAG2 欠損マウスでは上述の通り DN3 分画にて胸腺分化が完全に停止するが、大変興味深いことに作製したマウスの胸腺細胞は DP 細胞から CD4SP 細胞まで分化誘導された。同様の胸腺細胞は Src ファミリー PTK (蛋白チロシンリン酸化酵素) リプレッサーである csk 欠損マウスで報告されている。これら TCR 非依存的胸腺細胞を詳細に検討したが、胸腺内での成熟が著明に抑制していることが明らかになった。以上のことから AML1 欠損マウスでは pre-TCR 複合体下流のシグナル遺伝子のリプレッサー活性も低下している可能性が考えられる。

最後に胸腺内の最終分化である細胞表面 CD24/HSA 発現を解析した。HSA は胸腺内で幼弱期には陽性であるものの CD4,8SP 分画にて陰転化し、これ以後成熟した末梢 T リンパ球として機能を果たすことが知られている。T 細胞特異的 AML1 欠損マウスでは CD4SP 細胞での HSA の陰転化が明らかに抑制されていた。この現象は抗 CD3 ϵ 抗体負荷ならびに TCR β のトランスジェニック遺伝子導入によっても変化しなかった。HSA 陰転化の抑制と共にこれら CD4SP 細胞では細胞表面 TCR β の発現低下も観察され、CD4SP 細胞での成熟障害を起こしていることが明らかになった。末梢リンパ臓器ならびに末梢血中でも CD4⁺T リンパ球は CD8⁺ T リンパ球と比較して大きく減少しており、今までに報告された各種遺伝子欠損マウスの結果から、AML1 は CD4⁺T リンパ球への方向付けへの関与している可能性が高いと考えられる。

以上のように私はコンディショナルノックアウトマウスのシステムを用いて、AML1 が T 細胞の胸腺内初期分化と成熟に大きく関与していることを明らかにした。