

## 論文の内容の要旨

論文題目      **Functional Domains of Runx1 in Thymocytes Development**

胸腺細胞分化における Runx1 の各機能ドメインの役割

指導教官      宮園 浩平 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成13年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 河津 正人

### はじめに

Runx1 (Aml1, Pebpa2 あるいは Cbfa2 と呼ばれる)は runt ドメイン転写因子であり、その遺伝子は急性骨髄性白血病でみられる t(8;21)転座からクローニングされた。Runx1 欠損マウスは胎生致死であるが、その解析から Runx1 は2次造血に必須であることが明らかにされている。さらに Runx1 は2次造血だけでなく、T細胞の分化においても重要な役割をしていることが示唆されている。例えばT細胞受容体  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の各遺伝子のエンハンサーに結合して転写活性を上げることが示されていて、胸腺の発生の過程で Runx1 の発現することがノーザンブロットイングおよび *in situ* ハイブリダイゼーションで示されている。主に胸腺の皮質で発現がみられ、real-time PCR によると CD4/8 ダブルネガティブ細胞での発現が強い。強制発現させると CD8 細胞への分化が誘導され、Th2 細胞への分化が抑制される。われわれの研究室では胸腺細胞特異的に Runx1 遺伝子が knock-out されるマウスを作成し、Runx1 の欠損により CD4/8 ダブルネガティブ (以下 DN) 細胞から CD4/8 ダブルポジティブ (以下 DP) 細胞への分化が傷害されることを見出した。別のグ

ループからは Runx1 が DN 細胞で CD4 の発現を抑制していることが示された。

Runx1 がどのように胸腺細胞の分化に関わっているのかより詳細に検討するために、Runx1 の各機能ドメインの胸腺細胞分化における働きについて解析した。

## 材料および方法

### 細胞およびマウス

Runx1 floxed/wt (以下 f/+), Lck-Cre tg のオスマウスを Runx1 wt/null (以下 +/-) メスマウスと交配し、性交後 14.5 日の胎仔肝細胞を実験に用いた。Runx1 f/-, Lck-Cre tg を試験、Runx1 +/+, Lck-Cre tg を対照とした。C57/BL6 へ少なくとも 9 世代 Backcross したマウスを用いた。

得られた胎仔肝細胞を OP9-DL1 細胞上で IL-7 存在下で 5 日間培養し、5 日目に Runx1 cDNA あるいは Runx1 変異体の cDNA を組み込んだレトロウイルスを感染させ、その 5 日後（培養 10 日目）および 10 日後（培養 15 日目）に細胞を回収しフローサイトメトリーにより解析を行った。

### レトロウイルスベクターとその感染方法

Runx1 cDNA および Runx1 変異体の cDNA は pGCDNsam レトロウイルスベクターに挿入した。これらのレトロウイルスベクターを  $\psi$ MP34 パッケージング細胞に transfection し、これらのレトロウイルスベクターを持つウイルスを産生する細胞株を樹立した。ウイルス産生細胞株の培養上清を polybrene とともに加えることにより感染すなわち遺伝子導入をおこなった。

## 結果

### Runx1 f/-, Lck-Cre tg 胎仔肝細胞の培養結果

野生型マウスあるいは Runx1 +/+, Lck-Cre tg マウスの胎仔肝細胞を OP9-DL1 細胞の上で 15 日間培養すると DP 細胞まで分化した。DN 細胞もみられ、CD44, CD25 の発現により解析すると DN1 (CD44+, CD25-), DN2 (CD44+, CD25+), DN3 (CD44-, CD25+), DN4 (CD44-, CD25-) の各分化段階の細胞がみられた。10 日間の培養では DP 細胞はみられず DN 細胞は DN2 細胞 (CD44+, CD25+) まで分化していた。Runx1 f/-, Lck-Cre tg 胎仔肝細胞を培養した場合、15 日目でも DN2 で分化が止まっていた。10 日目では DN 細胞のほかに CD4 を中等度に発現した細胞が見られた。これは、本来 Runx1 によって発現の抑制されている DN 細胞の CD4 発現が、異常に発現しているものと考え

えられた。

以上のように OP9-D11 細胞を用いた培養により Runx1 *f*<sup>-</sup>, Lck-Cre tg マウスでみられる胸腺細胞の分化障害が試験管内でも再現された。

### Runx1 遺伝子の導入による胸腺細胞分化の回復

次に培養中の Runx1 *f*<sup>-</sup>, Lck-Cre tg 胎仔肝細胞にレトロウイルスをもちいて Runx1 遺伝子を導入したところ、DN3、DN4、DP にまで分化が進み、分化の障害が Runx1 の欠損によることが確かめられた。次に胸腺の分化に必要な Runx1 の機能ドメインを同定するために C 端側を欠損させた Runx1 の変異体をレトロウイルスにより導入し、同様の実験を行った。VWRPY モチーフあるいは inhibitory domain を欠損した変異体を導入した場合には分化の回復が見られたが、activation domain を欠損した変異体では分化は回復せず、activation domain が必須であることが示唆された。

### Runx1 遺伝子の導入による CD4 発現の抑制

培養中の Runx1 *f*<sup>-</sup>, Lck-Cre tg 胎仔肝細胞にレトロウイルスをもちいて Runx1 遺伝子を導入したところ、培養 10 日目でみられていた異常な CD4 の発現がみられなくなり、CD4 の発現が Runx1 の欠損によることが確認された。次に CD4 の抑制に必要な Runx1 の機能ドメインを同定するために C 端側を欠損させた Runx1 の変異体をレトロウイルスにより導入し、同様の実験を行った。VWRPY モチーフあるいは inhibitory domain を欠損した変異体を導入した場合には CD4 の発現が部分的に抑制され、activation domain を欠損した変異体では CD4 の発現は全く抑制されなかった。したがって CD4 の発現抑制には activation domain が必須であり、VWRPY モチーフおよび inhibitory domain も何らかの関与をしているものと考えられた。

## 考察

conditional knock-out マウスの生体内でみられた胸腺細胞分化の異常を試験管内で再現することができた。特に DN 細胞を豊富に回収することが出来、DN 細胞の解析に有用と思われる。さらに比較的容易に遺伝子を導入しそれによる影響を調べることが可能であった。今後は Runx1 の欠損の分子メカニズムをより詳細に解析する必要があるが、DN 細胞が豊富に得られるので、その解析に用いることが可能と考えられる。またなんらかの関連する分子が挙げられた場合には、その遺伝

子を導入して解析するという方法も可能である。

Runx1 が DN 細胞から DP 細胞への分化および CD4 の発現抑制に必要であることが確かめられた。またそのいずれの機能にも P300 などの co-activator との結合に必要な activation domain が必須であることが示せた。一方 WVRPY モチーフは co-repressor である TLE との結合に必要であることが知られているが、DN 細胞から DP 細胞への分化には必要なく、CD4 の発現抑制には何らかの関与をしていることが示された。Runx1 には、胸腺細胞の分化において TLE 依存性の働きと、TLE 非依存性の働きがあることが示唆される。