

審査の結果の要旨

氏名 河津 正人

本研究は造血に必須な転写因子 **Runx1** の胸腺細胞分化における役割の詳細を明らかにするために、骨髄ストローマ細胞 **OP9-DL1** 上で胎仔肝細胞から胸腺細胞を分化させる系を用いて、マウスの胸腺細胞の初期分化における転写因子 **Runx1** の各ドメインの機能解析を試みたもので、下記の結果を得ている。

1. 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 **CD4/8** ダブルポジティブ (DP) 細胞まで分化した。**CD4/8** ダブルネガティブ (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 floxed/-**, **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られた。

以上のように **OP9-DL1** 細胞を用いた培養により **Runx1 floxed/-**, **Lck-Cre tg** マウスで見られる胸腺細胞の分化障害が試験管内でも再現された。

2. 次に培養中の **Runx1 floxed/-**, **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。

3. 培養中の Runx1 floxed^{-/-}, 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。

以上、本論文は胎仔肝細胞を骨髄ストローマ細胞上で培養し試験管内で胸腺細胞分化を再現する系において、胸腺細胞分化における転写因子 Runx1 の各ドメインの機能解析を行い、Runx1 が胸腺細胞の分化においていくつかの働きをしていること、その作用によって必要とされる機能ドメインが異なることを明らかにした。胸腺細胞分化における Runx1 と転写共役因子との関わり、Runx1 が胸腺細胞の増殖と分化に与える影響など、依然として明らかにすべき点は多く残されているが、これらの問題点を明らかにする手がかりとなり得る結果であり、学位の授与に十分値するものと考えられる。