

審査の結果の要旨

氏名 生谷 尚士

本研究は B 細胞初期分化において重要な役割を演じているプレ B 細胞受容体 (PreBCR) シグナルと転写因子ネットワークとの関連を明らかにする目的で行われた。生体内で人工的に PreBCR を架橋刺激し B 細胞の分化を誘導後、mRNA の発現変化が観察された転写因子の機能を解析した。その結果、HeyL が重要な役割を担っていることが下記の結果から示された。

1. ProB 細胞分化段階で B 細胞分化が障害されている Rag2KO マウスと PreBCR のシグナル伝達に必須であるチロシンキナーゼ Btk を欠損する Rag2Btk 重複欠損マウスに細胞表面シグナル伝達分子である Ig β に対する抗体を投与し B 細胞分化を誘導し、遺伝子変化を経時的に観察した。マイクロアレイ解析を行い 7 つの候補転写因子を同定し、過剰発現実験で B 細胞分化への影響を検討した結果 HeyL が B 細胞分化に関与していることが明らかとなった。野生型マウス骨髄 B 細胞各分化段階における HeyL の発現は RT-PCR によって確認された。HeyL は ProB 細胞で発現が誘導され、L-PreB 細胞で一過性に減少後 S-PreB 細胞で発現が増強し、ImmatureB では発現が抑制されるという結果が得られた。
2. 野生型マウス骨髄から FACS により ProB 細胞を精製し HeyL を過剰発現させ次の分化段階である PreB 細胞への分化状況を検討した。その結果 PreB 細胞分化の指標である細胞表面抗原 CD43 の発現減少、CD25、CD2 の発現上昇が観察された。さらに PreBCR の構成分子である VpreB、 λ 5 の発現低下、細胞径の減少とその他の指標でも分化促進が観察され、HeyL が PreB 細胞分化に関わっていることが示された。
3. HeyL の過剰発現により B 細胞初期分化に関与する遺伝子の発現量に変化を及ぼすかを検討した。その結果、ProB 細胞の細胞増殖に関与する遺伝子である IL-7R α 鎖、その転写を直接制御する PU.1、cyclin D2 が増加していた。IL-7 への応答性は HeyL を過剰発現している細胞で有意に増強されていた。また、免疫グロブリン L 鎖の再構成に必須である IRF4、IRF8 の増加も観察された。これらの結果から PreB 細胞分化の促進に加え HeyL は ProB 細胞の細胞増殖に関与することが示された。
4. HeyL の発現を siRNA を用いて抑制し PreB 細胞分化を誘導したところ、CD43 の発現低下、CD25、CD2 の発現上昇が抑制された。すなわち、PreB 細胞分化が障害された。さらに HeyL が抑制されている細胞群ではコントロールベクターに比べ細胞増殖が顕著に障害されていた。これらは HeyL が PreB 細胞分化、細胞増殖にその役割を担っていることを強調する結果である。
5. HeyL に存在する DNA 結合ドメインである bHLH、Orange ドメイン、そしてダイマー形成に関与するとされる C 末端部位を欠損した変異体を ProB 細胞に過剰発現さ

6. HeyLによって誘導される PreB 細胞分化に PreBCR と Btk が必須であるかを野生型マウス、Btk 欠損マウス、PreBCR を欠損する Rag2 欠損マウス、それら両方を欠損する Rag2Btk 重複欠損マウスの ProB 細胞を用いて検討した。CD43 の発現低下ほどの遺伝子型でも観察された。しかしながら CD25 の発現上昇は Btk 欠損、Rag2 欠損 B 細胞で部分的に傷害されており、Rag2Btk 重複欠損 B 細胞ではほぼ完全に障害されていた。CD2 に関しては Rag2 欠損、Rag2Btk 重複欠損 B 細胞で完全に障害されていた。つまり CD43 の制御においては Btk、PreBCR には依存せず、CD25 はその両方、CD2 は PreBCR に依存していることが示唆された。これらの表面抗原は一律な制御を受けているのではなくそれぞれが異なったレベルで制御されていることが判明した。
7. 生体内での HeyL の役割を明らかにするため造血幹細胞を含む未熟な細胞群に HeyL を過剰発現させ、致死量の放射線を照射した野生型マウスに移入した。4 週間後、末梢血液中の B 細胞、T 細胞、ミエロイド系の細胞への影響を観察した。HeyL を強発現している B 細胞はコントロールに比べ有意に増加していた。
8. 本研究より HeyL が B 細胞初期分化において重要な役割を担っていることが考えられるので HeyL 欠損マウスを作製に着手した。相同組換を起こした ES 細胞をマウス胚盤胞にインジェクションし、キメラマウスを得た。このキメラマウスと野生型マウスとの交配で誕生したマウスの尾よりゲノム DNA を抽出し相同組換を起こした遺伝子座を PCR で検出した。その結果、目的の遺伝子座が得られ HeyL 欠損マウスの作製に成功した。

以上、本論文は PreB 細胞分化に関与すると考えられた候補遺伝子を過剰発現、発現抑制実験で検討し、転写因子 HeyL が ProB 細胞分化段階では細胞増殖、その後の PreB 細胞分化段階では PreBCR シグナルにより発現が増強し PreB 細胞分化の完結にその役割を担うことが示された。本研究はこれまで未知に等しかった、PreBCR シグナルと転写因子のネットワークの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。