

〔課程・2〕

審査の結果の要旨

氏名 川 俣 豊 隆

本研究は、慢性骨髄性白血病の原因遺伝子である BCR・ABL 融合遺伝子の遺伝子産物に対する分子標的薬として開発されたメシル酸イマチニブ(IM)が、活性化 B 細胞において抗体産生に多様性をもたらす体細胞突然変異(SHM)やクラススイッチ組換え(CSR)などの遺伝子再構成において重要な役割を果たしている一方で、その過剰発現により腫瘍形成への関与が指摘されている Activation-induced cytidine deaminase(AID)の発現抑制作用を有する可能性について、マウス脾臓 B 細胞などを用いて解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス脾臓細胞を LPS と IL-4 による共刺激下にて *in vitro* で 72 時間培養すると IgG1 へのクラススイッチ組換えが起こるが、その際に IM を投与すると濃度依存性にクラススイッチ組換えが抑制されることが示された。IgG1 へのクラススイッチ組換えには AID と IgG1 germline transcript の発現が最低限必要とされるが、IM 投与時には AID mRNA の発現は濃度依存性に低下を認めたのに対し、IgG1 germline transcript の発現はむしろ上昇を認め、IM による IgG1 クラススイッチ組換え抑制作用は AID の発現抑制作用によるものであることが示された。
2. マウスに羊赤血球の腹腔内投与による免疫刺激を加えるとクラススイッチ組換えが促進されるが、羊赤血球による免疫刺激と IM の腹腔内投与を併せて行ない、*in vivo* における検討も行なった。羊赤血球による免疫刺激のみ行なったマウスでは、脾臓の胚中心は大きく明瞭となり、AID 免疫染色において胚中心の活性化 B 細胞に一致して AID の発現を認めたのに対し、IM を併せて投与したマウスの脾臓の胚中心は小さく不明瞭であり、AID 免疫染色においても AID の発現はわずかに認められるのみであった。IM を併せて投与したマウスでは、脾臓細胞の表面 IgG1 発現量も低下を認め、AID mRNA 発現量も低下しており、これらの結果から、*in vivo* においても AID 発現抑制作用を有することが示された。
3. *In vitro* の実験系において、レトロウイルスを用いて AID を強制発現させると、IM により抑制されていた IgG1 へのクラススイッチ組換えは IM を投与しなかった場合と同等もしくはそれ以上への回復を認めており、この結果からも IM によるクラススイッチ組換え抑制作用は AID の抑制を介したものであることが示された。

4. AID の発現を調節しているプロモーター領域のうち、Region2 が B 細胞特異的結合部位を持ち、特に重要な役割を果たしている。この Region2 領域に結合部位を持つ B 細胞特異的な発現増強因子である Pax5 や E2A、発現抑制因子である E2f7、E2f8 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により検討した。また、Pax5 や E2A の抑制因子である ID2、B 細胞の活性化マーカーである RAG1、RAG2、CD40 の mRNA 発現量の解析も行なった。Pax5、E2A、E2f7、E2f8 はいずれも IM 濃度依存性に低下を認めたが、特に E2A に関しては、10  $\mu$  M IM 投与時は IM 投与なしの場合と比較して 500 分の 1 と著明な低下を認め、特に重要な役割を果たしている可能性が示された。RAG1、RAG2、CD40、ID2 に関しては、IM 濃度依存性の有意な変動は認められず、B 細胞の活性化低下による間接的な作用によるものではないことが示された。

5. E2A 遺伝子は E47 と E12 の 2 つの転写因子をコードしており、E 蛋白の結合部位である E ボックスへ高親和性で実験系の確立している E47 蛋白についての検討を行なった。ウェスタンブロット法による E47 蛋白発現量の解析では、IM の投与により E47 蛋白の著明な発現低下を認めた。また E ボックス配列を持った野生型プローブと、E ボックスに変異を入れ E47 蛋白が結合できないようにした変異型プローブを用いた DNA 親和性沈降解析を行なった。IM 投与時は、変異型プローブを用いた際と同程度まで著明な低下を認めた。これらの結果より、mRNA レベルだけでなく、蛋白レベルにおいても IM 投与により E47 は著明な低下を認め、IM の AID の発現抑制作用に重要な役割を果たしている可能性が示された。

6. AID と E2A は、IM の標的分子である ABL、ARG、BCR-ABL、KIT、PDGFR、DDR1、NQO2 との間には既知の経路はなく、より詳細な作用経路解明のため、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行なった。この結果からは IM による抑制経路として特異的な遺伝子群は認められず、作用経路の特定は出来なかった。

以上、本論文は慢性骨髄性白血病に対する分子標的薬として開発された IM が、マウス脾臓細胞を用いた *in vitro*、*in vivo* の解析から Activation-induced cytidine deaminase(AID)の抑制作用を有することを示した。本研究は、AID の過剰発現が関与している可能性のある悪性腫瘍やアレルギー性疾患、自己免疫疾患への IM の臨床応用の可能性や、AID 阻害剤の開発につながる重要な役割を果たすと考えられ、学位に値するものと考えられる。