

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790462

研究課題名（和文）免疫系における *Rit1/Bcl11b* の機能研究課題名（英文）Functional analysis of *Rit1/Bcl11b* in immunological system.

研究代表者

広瀬 哲史 (HIROSE SATOSHI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10415276

研究成果の概要（和文）：*Rit1/Bcl11b* はハプロ不全ながん抑制遺伝子であり、 $\alpha\beta$ T 細胞分化において重要な役割を果たしている。本研究では、*Bcl11b* が T 細胞系列への運命決定において重要な役割を果たしていることが判明した。また、CD8+胸腺 T 細胞や NKT 細胞の運命決定後の生存、表現型を保つ上で *Bcl11b* が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。

研究成果の概要（英文）：*Rit1/Bcl11b* is a haploinsufficient tumor suppressor gene and plays an essential role in $\alpha\beta$ T cell development. *Bcl11b* knockout mice exhibit a developmental block at DN stage and do not generate DP thymocytes. On the other hand, *Bcl11b* heterozygous mice appear to be normal but show retardation of thymocyte development in embryos. This suggests dose-dependency of *Bcl11b* function in differentiation of thymocytes. To analyze this dose-dependency, we generated mice carrying the hypomorphic allele of *Bcl11b* by mutagen treatment conducted in RIKEN large scale ENU Mutagenesis Program. Among six such mutants analyzed, one (1891mut) carries one-base substitution leading to a missense mutation. Here, we show a developmental impairment at the CD69+TCR β high transitional stage of positive selection caused by the presence of 1891mut allele. As a result, development of CD8SP cells, but not of CD4SP, was reduced in 1891mut/+ mice. This reduction was more severe in KO/+ mice. Our data suggest that differentiation of CD8 lineage T cells is controlled by *Bcl11b* and its processing level is affected by or dependent on the *Bcl11b* activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：*Bcl11b*, CD4, CD8, T 細胞, 免疫学, 分子生物学, 胸腺

1. 研究開始当初の背景

Rit1/Bcl11b 遺伝子は、胸腺リンパ腫の発症を抑制するがん抑制遺伝子であり、Zn フィ

ンガーモチーフを持つ転写因子をコードする。

Bcl11b はがん抑制遺伝子としてのみなら

ず、T細胞分化においても重要な役割を果たしていることが明らかになっている。申請者らは、Rit1/Bcl11bの遺伝子欠損マウスを作製し、T細胞の分化が初期で停止することをこれまでに見出している。(Wakabayashi et al., 2003; Inoue et al. 2006) 一方、Rothenbergらは、Bcl11bの発現がT細胞分化に伴って増加し、成熟しても維持されること、さらにNotchシグナルが発現誘導に関与している可能性を示しており、T細胞の分化におけるBcl11bの役割とそのメカニズムが注目されるようになってきている(Tydell et al., 2007)。しかし、これまでの解析ではBcl11bの欠失によるT細胞分化停止の原因は明らかではなかった。

DP細胞からポジティブ選択を経てヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞に分化する過程が詳細に解析され、Runx3やThPokの役割が注目された(Setoguchi et al., 2008; Muroi et al., 2008 他)。Avramらのグループは、Bcl11bの条件欠損マウスを作製し、CD4creトランスジーンによりDP段階でBcl11bを完全に欠失させると、ポジティブ選択が停止し、DP細胞の生存が阻害されることを見出している。したがって、Bcl11bも、これらの因子と相互作用しながらT細胞分化を制御しているものと考えられるが、その後のT細胞分化、成熟や、免疫応答における役割については明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) Bcl11bの発現は、胸腺分化の初期のみならず、DP段階以降の胸腺細胞や末梢T細胞でも認められるにもかかわらず、その役割は明らかになっていなかった。その理由は、既存のマウスモデルではT細胞分化が途中で停止してしまうためであった。Bcl11b欠損マウスではDP以前で、また、条件欠損マウスでもDP段階で停止してしまうことが既に報告されていた。予備的解析では、BALB/c背景のBcl11b^{-/+}マウスの胸腺でCD8SPが著しく減少していることが判明しており、DP段階以降のT細胞においてもBcl11bが重要な役割を果たしていることが示唆されていた。

本研究では、DP以降のT細胞においてBcl11bの新規機能を調べるため、新たなマウスモデルを作製し、CD8SP細胞の分化を制御するメカニズムを調べる。

(2) Bcl11bがT細胞の分化初期に特異的に発現が誘導され、Bcl11bを欠失するとT細胞分化が初期で停止する。このことから、Bcl11bがT細胞分化の初期に特異的な機能を有していることが示唆されるが、その機能は明らかになっていなかったため、本研究で検討した。

3. 研究の方法

(1) Bcl11b変異マウスの樹立と解析

申請者らの研究室では、(i)ノックアウト(KO)マウス、(ii)loxP配列を組込んだ条件欠損マウス(Floxマウス(F); 新潟大学脳研崎村博士らとの共同研究)の他、(iii)化学変異剤ENUにより変異を誘起したマウスを作製(理研BRC権藤博士らとの共同研究)を樹立した。

誘起された変異体の一つ、Bcl11bタンパク質の826番目のセリンをグリシンに置換する変異(S826G)は、機能喪失型ではなく活性低下型変異であり、KO/KOではDPが分化しなかったのに対し、KO/S826GではDP段階まで分化するという結果が得られていた。

Bcl11bの機能をDP段階で完全に欠失させると、それ以降の分化が進行しないことから、(i)-(iii)を交配し、Bcl11bの活性がDP以降も残存しているマウスを作製した。これらのマウスの胸腺T細胞分化、末梢T細胞集団の異常をフローサイトメトリー法により検討した。

(2) 胸腺T細胞の初代培養

Bcl11bを欠損した胸腺T細胞の性状を明らかにするため、胸腺T細胞を初代培養した。

NotchのリガンドであるDL-1を安定発現する胸腺上皮細胞株TSt-4をフィーダーとしてDN胸腺T細胞を培養するとDP段階まで分化する実験系が河本博士らによって確立されている(Miyazaki et al., 2005)。さらに、固層化したDL-1タンパク質だけでもDN2段階までT細胞分化が進行すること、DN2以降の分化プログラムも培養液のIL-7濃度を下げることによって進行することが伊川博士らにより明らかにされていた。

4. 研究成果

(1) T細胞系列へ運命決定する際にBcl11bがマスターレギュレーターとして機能することが判明した。Bcl11bを欠損したT前駆細胞をTSt-4/DL-1上で培養するとDN2段階以降の分化が進まず、NK細胞に分化することが分かった。一方、野生型の初期T前駆細胞を固層化DL-1の存在下で培養してもBcl11bの発現は上昇せず、分化はDN2までが、Bcl11b遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し、強制発現するとDN3段階に進行することが判明した。これらの結果は、Bcl11bがT細胞への運命決定に必須であることを示している。

また、Bcl11b関連遺伝子のデータベース解析の結果は、T細胞が軟骨魚類より高等な脊椎動物に存在するという事実と符合していた。Bcl11b様遺伝子がヤツメウナギにも存在することが既に報告されていたが、Bcl11bのパラログ、Bcl11aであることを確認した。さらに、無脊椎動物や、無顎脊椎動

物に存在している Bcl11b 様遺伝子は、Bcl11a であり、Bcl11b 遺伝子は、軟骨魚類以上の脊椎性動物にのみ存在していることが判明した。この結果は、Bcl11b 遺伝子の進化のみならず、免疫系の進化や獲得免疫系の起源についても新たな知見を加えるものである。

なお本研究は、河本宏博士らと共同研究である。

(2) Bcl11bS826G 変異マウスは、ポジティブ選択後の T 細胞分化を調べるのに適した実験系であることが明らかとなった。

(i) ノックアウト (KO) マウス、(ii) Flox マウス (F)、(iii) 化学変異剤 ENU により誘起した S826G 変異マウスから、Bcl11b の活性を段階的に変化させた一連のマウスを作製した。その結果、T 細胞のポジティブ選択、成熟、NKT 細胞発生の正常な進行に必要な Bcl11b の活性はそれぞれ異なっており、Bcl11b の活性低下の度合いによっては低下がみられるものの、T 細胞分化が完全に停止することはない。

(3) Bcl11b S826G 変異を持つマウスでは、運命決定後の胸腺 CD8+ T 細胞の生存が低下した。胸腺 $\alpha\beta$ T 細胞の成熟を調べると、S826G 変異を有した個体では胸腺 CD8+ (CD4-CD8+) 細胞が顕著に減少していた。Bcl11bS826G/+ でも CD8+ T 細胞が減少したことから、S826G 変異は CD8+ T 細胞の発生を特異的に阻害する優性の変異であることが示唆された。運命決定は正常であり、CD4+ T 細胞が分化しない MHC II 欠損マウスと交配し MHC I で選択された T 細胞の分化を調べたが、Bcl11b が変異していても CD4+ T 細胞には分化していなかった。一方、Bcl11bS826G/+ の成熟胸腺 T 細胞を培養すると CD8+ T 細胞は CD4+ T 細胞より早く減少したことから、CD8+ T 細胞の生存が低下していると考えられた。

(4) Bcl11b 変異により成熟 CD8SP 細胞の表現型が変化した。Bcl11bS826G/F CD4cre マウスの胸腺 CD8+ 細胞では、CD44、CD122 の発現が上昇しており、PMA と Ionomycin で刺激すると IFN γ を高産生し、Innate 様の細胞傷害性 T 細胞に変化したことが示された。これらの結果は、Bcl11b が成熟した T 細胞の表現型の健全性 (Integrity) を保つうえで重要な役割を果たしていることを示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Ikawa T, Hirose S, Masuda K, Kakugawa

K, Satoh R, Shibano-Satoh A, Kominami R, Katsura Y, Kawamoto H. An Essential Developmental Checkpoint for Production of the T Cell Lineage. *Science* 329, 93-96 (2010) (査読有)

② Go R, Hirose S, Morita S, Yamamoto T, Katsuragi Y, Mishima Y, Kominami R. Bcl11b heterozygosity promotes clonal expansion and differentiation arrest of thymocytes in gamma-irradiated mice. *Cancer Sci.* 101, 1347-1353 (2010) (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

① 広瀬 哲史、木南凌 Zinc-finger transcriptional factor Rit1/Bcl11b affects CD8SP thymocyte survival through IL-7R expression 第 14 回日本免疫学会総会・学術集会、千葉、2011 年 11 月 27 日 (口頭、ポスター)

② 広瀬 哲史、木南凌 A S862G substitution allele of Bcl11b/Rit1 generated in ENU Mutagenesis Program reveals a novel role of Bcl11b/Rit1 in cytotoxic T cell development 第 25 回 モロシヌス研究会、新潟県十日町市、2011 年 7 月 8 日 (ポスター)

③ 広瀬 哲史、瀧澤一休、葛城美徳、三嶋行雄、木南凌 転写因子 Rit1/Bcl11b を介した細胞傷害性 T 細胞分化 第 21 回 Kyoto T Cell Conference 京都、2011 年 6 月 10 日 (口頭、ポスター)

④ 伊川友活、広瀬 哲史、木南凌、桂義元、河本宏 転写因子 Bcl11b による T 細胞系列への運命決定 第 114 回小児血液腫瘍懇話会 2010 年 10 月 29 日 東京

⑤ 郷梨江香、広瀬 哲史、葛城美徳、三嶋行雄、木南凌 放射線照射後胸腺細胞のクロール増殖と分化停止における Bcl11b KO/+ 遺伝子型の影響 第 69 回日本癌学会総会、大阪、2010 年 9 月 22 日 (ポスター)

⑥ 広瀬 哲史、瀧澤一休、葛城美徳、三嶋行雄、木南凌 Zinc-finger transcriptional factor Rit1/Bcl11b affects CD8SP thymocyte survival through IL-7R expression 第 14 回国際免疫学会議、神戸、2010 年 8 月 25 日 (ポスター)

⑦ 伊川友活、広瀬 哲史、木南凌、桂義元、河本宏 An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage 第 14 回国際免疫学会議、神戸、

2010年8月24日（口頭、ポスター）

⑧ 広瀬哲史、瀧澤一休、葛城美徳、三嶋行雄、木南凌 転写因子 Rit1/Bcl11b を介した細胞傷害性 T 細胞分化 第 20 回 Kyoto T Cell Conference 京都, 2010 年 6 月 4 日（口頭、ポスター）

⑨ 伊川友活、広瀬哲史、木南凌、桂義元、河本宏 T 細胞系列への決定は転写因子 Bcl11b によって制御されている第 20 回 Kyoto T Cell Conference 京都, 2010 年 6 月 4 日(口頭、ポスター)

⑩ 広瀬哲史、瀧澤一休、木南凌 転写因子 Rit1/Bcl11b の遺伝子量に依存した細胞傷害性 T 細胞分化第 32 回 日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 9 日（ポスター）

⑪ 広瀬哲史、木南凌 転写因子 Rit1/Bcl11b の遺伝子量に依存した細胞傷害性 T 細胞分化第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会 大阪 2009 年 12 月 2 日（口頭/ポスター）

⑫ 郷梨江香、森田慎一、広瀬哲史、木南凌 Bcl11b-ko/+ 遺伝子型は放射線誘発胸腺リンパ腫前駆細胞の出現を加速する第 52 回 日本放射線影響学会大会 広島 2009 年 11 月 11 日（ポスター）

⑬ 広瀬哲史、瀧澤一休、葛城美徳、桜庭喜行、森田慎一、石澤良太、権藤洋一、木南凌 Dose-dependent effect of zinc-finger transcriptional factor Rit1/Bcl11b on differentiation of cytotoxic T cells. The 5th International Workshop of Kyoto T Cell conference, 京都, 2009 年 6 月 2 日（ポスター）

〔図書〕（計 1 件）

「ペコリーノがんの分子生物学」, 日合弘、木南凌監訳, メディカル・サイエンス・インターナショナル(2010), 199-218 第 10 章 感染と炎症

〔その他〕

ホームページ等

新潟大学医学部生化学第一教室ホームページ:

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc1/welcome.html>

新潟大学研究者総覧: 廣瀬 哲史:

<http://researchers.adm.niigata-u.ac.jp/staff/?userId=1117&lang=>

J-GLOBAL 廣瀬哲史:

http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=200901093250119174&t=1&d=1&q=%28205%29%3D1000368181

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広瀬 哲史 (HIROSE SATOSHI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 10415276

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし