

氏 名	王 書 芳
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 138 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	生 命 学 研 究 科 高 次 生 命 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Development of Notch-dependent T-cell leukemia by deregulated Rap1 signaling (異常なRap1シグナリングによるNotch依存性T細胞白血病の発生)
論文調査委員	(主 査) 教 授 湊 長 博 教 授 松 田 道 行 教 授 清 水 章

### 論 文 内 容 の 要 旨

Rap1 (Ras-proximate 1) is a Ras-family G protein mediating diverse functions highly dependent on the contexts of cell types, such as proliferation, differentiation, cell survival, cell adhesion, polarity and movements. Rap1 is activated to Rap1GTP by specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs) coupled with diverse receptors, while specific GTPase-activating proteins (GAPs) inactivate Rap1GTP to Rap1GDP. SPA-1 (signal-induced proliferation associated gene-1) functions as a suppressor of myeloid leukemia by negatively regulating Rap1 signaling in hematopoietic progenitor cells (HPC). In the present study, it was shown that transplantation of HPC expressing farnesylated C3G (C3G-F), a Rap1 guanine nucleotide exchange factor, resulted in a marked expansion of thymocytes bearing unique phenotypes, CD4/CD8 double positive (DP)  $CD3^- TCR\beta^-$ , in irradiated recipients. SPA-1<sup>-/-</sup> HPC expressing C3G-F caused a more extensive expansion of DP thymocytes, resulting in lethal T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) with massive invasion of clonal T-cell blasts into vital organs. The C3G-F<sup>+</sup> blastic thymocytes exhibited constitutive Rap1 activation and markedly enhanced expression of *Notch1*, 3 as well as the target genes, *Hes1*, *pTa* and *c-Myc*. All the T-ALL cell lines from C3G-F\*SPA-1<sup>-/-</sup>HPC recipients expressed high levels of *Notch1* with characteristic mutations leading to the C-terminal truncation. The proliferation was inhibited completely in the presence of a  $\gamma$ -secretase inhibitor. Transplantation of Rag2<sup>-/-</sup> SPA-1<sup>-/-</sup> HPC expressing C3G-F also resulted in a marked expansion and transformation of DP thymocytes. The results suggested that deregulated constitutive Rap1 activation caused abnormal expansion of DP thymocytes, bypassing pre-T cell receptor (TCR) and eventually leading to *Notch1* mutations and Notch-dependent T-ALL.

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

SPA-1はリンパ・造血系組織においてRasスーパーファミリーに属する低分子量G蛋白, Rap1の特異的なGTPase活性化蛋白 (GAP) として機能している。SPA-1遺伝子破壊 (SPA-1<sup>-/-</sup>) マウスは, 長い潜伏期を経てヒト慢性骨髄性白血病の慢性期に酷似した骨髄性増殖疾患や, 骨髄異形成症候群あるいはB1細胞白血病など多彩な骨髄性疾患を発症することが報告されている。これらの白血病発症にRap1が関与することは明らかになっているが, なぜ発症までに長い期間を要するかということについては不明であった。申請者はこの理由としてSPA-1の欠損によりRap1GTP蓄積が起こる過程に長い期間が必要であるからだという仮説を立て, これを証明するためにRap1活性化因子であるC3Gの常時活性化型分子 (C3G-F) を正常B6およびSPA-1<sup>-/-</sup>マウス由来未分化造血細胞 (HSC) に導入し, それを放射線照射したレシピエントマウスに移入にその影響について解析を行った。その結果, C3G-Fを導入したB6由来HSCを移植したマウスにおいて移植3ヶ月後にCD4/CD8 両陽性 (DP)  $CD3^- TCR^{low}$  という異常な表現系を持つ胸腺細胞の増加が認められた。C3G-Fを導入したSPA-1<sup>-/-</sup>

マウス由来HSCを移植した場合、このDP胸腺細胞の増殖はより顕著であり、移植したマウス全個体が急性Tリンパ芽球性白血病（T-ALL）により死亡した。この結果から、内在性Rap1の活性化状態と病気の程度が関係していることが確認された。C3G-F導入発現により増加が見られたSPA-1<sup>-/-</sup>マウス由来DP胸腺細胞では、NotchおよびNotch細胞内ドメインの発現増強が見られるとともに、その増殖が $\gamma$ -secretase阻害薬により完全に阻害された。さらにRag2<sup>-/-</sup>マウスと掛け合わせたSPA-1<sup>-/-</sup>マウス由来HSCにC3G-Fを導入し移植を行った場合もDP胸腺細胞の増殖およびがん化が観察された。この結果から、Rap1の常時活性化によるDP胸腺細胞の増殖とがん化は、プレT細胞抗原レセプターのシグナルを必要としないことが示された。以上の結果から、Rap1の常時活性化は、Notchの活性化とそれに続くNotch遺伝子変異の誘導によりT-ALLの発症をもたらしうることが強く示唆された。

以上の結果は白血病の発症機構の解明に大きく貢献するものであり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値のあるものと認めた。なお、本申請者は平成20年1月21日に論文内容とそれに関連した口頭試問を受け、合格と認めたものである。