

| | |
|---------|--|
| 氏名 | いし だ だい すけ 石 田 大 輔 |
| 学位の種類 | 博 士 (生命科学) |
| 学位記番号 | 生 博 第 11 号 |
| 学位授与の日付 | 平 成 16 年 3 月 23 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 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻 |
| 学位論文題目 | SPA-1 遺伝子破壊マウスにおける記憶T細胞機能低下と骨髄増殖性疾患 の発症 |

論文調査委員 (主査) 教授 湊 長博 教授 稲葉カヨ 教授 根岸 学

論 文 内 容 の 要 旨

Rasファミリー低分子G蛋白Rap1の機能については、これまでにRas-c-Raf-ERKシグナル伝達経路の抑制、神経などある種の細胞においてのB-Rafを介したERKの活性化、インテグリンの活性化による細胞機能制御などが報告されているが、いずれも培養細胞を用いた*in vitro*における研究の結果であり、*in vivo*での機能の詳細については不明な点が多い。申請者はRap1の生体内における機能の詳細を明らかにする目的で、リンパ造血系組織に特異的に発現するRap1GTPase-activating protein (GAP)であるSPA-1の遺伝子破壊マウスの解析を行った。SPA-1遺伝子破壊 (SPA-1^{-/-}) マウスでは、リンパ球の発生及び分化に明らかな異常は見られなかったが、生後約6ヵ月頃から、加齢に伴い抹消T細胞においてT細胞受容体 (TCR) を介する刺激に対する反応性の低下が進行し、生後1年ではほぼ無反応状態に陥ることが明らかとなった。これは、加齢に伴うCD44高発現T細胞 (記憶T細胞) の増加に相関しており、細胞分離実験によりCD44高発現T細胞の選択的な反応性の低下によることが示された。さらに、T細胞依存性の抗原により免疫した後、*in vitro*における2次免疫反応を調べた結果、1次抗体産生には有意な差は認められないにもかかわらず、2次 (特異的記憶) 免疫反応が増殖、抗体産生ともに顕著に低下していることが確認された。以上の結果は、SPA-1^{-/-}マウスにおいて、記憶T細胞応答の成立に障害のあることを示すものである。反応性の低下したT細胞においてはRap1GTPの過剰の蓄積が見られ、TCRを介した刺激に対し活性化されたRasによるERKの活性化が顕著に抑制されており、過剰のRap1GTPによりRas-c-Raf-ERKシグナルが抑制的干渉をうけることが強く示唆された。他方造血組織 (骨髄) においては、SPA-1^{-/-}マウスは加齢に伴い造血系前駆細胞の有意な増加を示し、生後1年を経過すると、ほぼ全例のマウスで末梢白血球の増加、進行性の貧血、髄外造血による著明な脾腫、急性転化による芽球の出現などを特徴とするヒト慢性骨髄性白血病 (CML) に酷似した病態を発症することが明らかとなった。急性期CMLの病態を呈するSPA-1^{-/-}マウスの骨髄より樹立された白血病細胞株をSCIDマウスへ移入すると致死性の白血病を発症したが、レトロウイルスによる遺伝子導入によってSPA-1の発現を回復させると、同細胞による白血病発症は完全に抑制されることが示された。これらの結果は、SPA-1遺伝子が骨髄球における癌抑制遺伝子であること強く示唆するものがある。経時的にみると、すべてのSPA-1^{-/-}マウスにおいてT細胞性免疫不全の進行が骨髄性白血病の発症に先行して認められることから、白血病の発症における免疫異常の関与も推定され、本マウスは単にヒト骨髄性白血病の発症の発症機構のみならず、免疫系によるがんの監視機構の解析においてもきわめて有用なモデルを提供しうるものと考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Rasファミリー低分子G蛋白Rap1はかつて癌原性Ras遺伝子の拮抗遺伝子として単離されたもので、近年Ras-ERKシグナル伝達経路への干渉、B-Rafを介したRas非依存性のERKの活性化、インテグリンの活性化による細胞機能制御など多様な生物学的機能が報告されてきているが、その生体内における役割はいぜんとして謎が多く、とりわけ初期に推定された

発癌への関与については全くわかっていない。申請者はRap1の生体内における機能を明らかにする目的で、主にリンパ造血系組織に強く発現されるRap1の主たる負の制御因子であるSPA-1の遺伝子破壊マウスを作成しその詳細な形質解析を行った。SPA-1遺伝子破壊 (SPA-1^{-/-}) マウスでは、リンパ球の発生及び分化に明らかな異常は見られなかったが、生後約6ヵ月頃から、加齢に伴い抹消T細胞においてT細胞受容体 (TCR) を介する刺激に対する反応性の低下が進行し、生後1年でほぼ無反応状態に陥ることが明らかとなった。これは、加齢に伴うCD44高発現T細胞 (記憶T細胞) の増加に相関しており、細胞分離実験によりCD44高発現T細胞の選択的な反応性の低下によることが示された。さらに、T細胞依存性の抗原により免疫した後、*in vitro*における2次免疫反応を調べた結果、1次抗体産生には有意な差は認められないにもかかわらず、2次 (特異的記憶) 免疫反応が増殖、抗体産生ともに顕著に低下していることが確認された。以上の結果は、SPA-1^{-/-}マウスにおいて、記憶T細胞応答の成立に障害のあることを示すものである。反応性の低下したT細胞においてはRap1GTPの過剰の蓄積が見られ、TCRを介した刺激に対し活性化されたRasによるERKの活性化が顕著に抑制されており、過剰のRap1GTPによりRas-c-Raf-ERKシグナルが抑制的干渉をうけることが強く示唆された。他方造血組織 (骨髄) においては、SPA-1^{-/-}マウスは加齢に伴い造血系前駆細胞の有意な増加を示し、生後1年を経過すると、ほぼ全例のマウスで末梢血白血球の増加、進行性の貧血、髄外造血による著明な脾腫、急性転化による芽球の出現などを特徴とするヒト慢性骨髄性白血病 (CML) に酷似した病態を発症することが明らかとなった。急性期CMLの病態を呈するSPA-1^{-/-}マウスの骨髄より樹立された白血病細胞株をSCIDマウスへ移入すると致死性の白血病を発症したが、レトロウイルスによる遺伝子導入によってSPA-1の発現を回復させると、同細胞による白血病発症は完全に抑制されることが示された。これらの結果は、SPA-1遺伝子が骨髄球における癌抑制遺伝子であること強く示唆するものである。経時的にみると、すべてのSPA-1^{-/-}マウスにおいてT細胞性免疫不全の進行が骨髄性白血病の発症に先行して認められることから、白血病の発症における免疫異常の関与も推定された。現在ヒトの骨髄性白血病のモデル動物としては、NF-1遺伝子破壊マウス、ICSBP本マウスは遺伝子破壊マウスなどきわめて限られており、さらにSPA-1^{-/-}マウスはこれらのモデルマウスとは明らかに異なる機構で骨髄性白血病の発症に至ると考えられる。従って、SPA-1^{-/-}マウスは単にヒト骨髄性白血病の発症の発症機構のみならず、免疫系によるがんの監視機構の解析においてもきわめて有用なモデルを提供しうるものと考えられた。

以上の結果は、白血病の発症機構および免疫応答の機構の解明とその応用の可能性に大きな貢献をなすものであり、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。また申請者は、平成16年1月27日、論文内容とそれに関連した口頭試問を受け調査委員全員一致で合格と認められたものである。