

平成24年2月

# 奥山一生 学位論文審査要旨

主 査 竹 内 隆  
副主査 佐 藤 建 三  
同 林 眞 一

## 主論文

A checkpoint in B-lymphopoiesis related to Notch resistance

(B細胞分化過程において観察されるNotch抵抗性)

(著者：奥山一生、村田暁彦、須藤哲央、吉野三也、林眞一)

平成24年 Biochemical and Biophysical Research Communications 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

## A checkpoint in B-lymphopoiesis related to Notch resistance

(B細胞分化過程において観察されるNotch抵抗性)

Bリンパ球とTリンパ球の分化を制御する分化誘導因子や増殖因子の多くは重複する。しかしBリンパ球造血は骨髄で起こり、Tリンパ球は胸腺で分化する。本研究は「なぜBリンパ球分化は胸腺で起こらないのか」について検証した。

Notch関連分子は様々な細胞系譜の発生を制御する。Tリンパ球分化にはNotchリガンド、delta-like ligand (Dl1) (Dl11あるいはDl14) が必須であり、胸腺ではDl1の強い発現が認められる。Dl1はさらにBリンパ球分化を抑制する機能も有する。そこで、Dl1 (Dl11) がBリンパ球造血に及ぼす影響について解析が行われた。

## 方 法

Bリンパ球分化を効率的に支持する骨髄間質細胞株、OP9 (OP9-ctrl) を骨髄環境、OP9にDl11を過剰発現させたOP9-DL1を胸腺環境の試験管内モデルとした。骨髄細胞、胸腺細胞を3~10週齢のC57BL/6Jマウスから回収し、OP9-ctrlあるいはOP9-DL1上で分化誘導培養を行った。培養14日後に細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて分化した細胞を解析した。B、Tリンパ球はそれぞれB220、Thy1.2の発現で評価した。

## 結 果

骨髄細胞をOP9-ctrl (骨髄環境モデル) 上で培養すると、Bリンパ球が効率良く分化誘導され、胸腺細胞をOP9-DL1 (胸腺環境モデル) 上で培養するとTリンパ球が分化した。OP9-DL1上で骨髄細胞を培養するとTリンパ球が分化すると同時に、少数のBリンパ球が分化することが分かった。この結果から、Dl11存在下でもBリンパ球に分化可能な、つまりNotch抵抗性のBリンパ球前駆細胞 (以下、Dl11<sup>R</sup>-Bp) が骨髄内に存在することが示唆された。

Dl11<sup>R</sup>-Bpを同定するために、磁気細胞分離法、蛍光細胞分離法を用いて膜表面分子の探索を行った。その結果、Dl11<sup>R</sup>-BpはFlt3<sup>+</sup> I17r<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> Cd19<sup>+</sup> 細胞であることが明らかとなった。Dl11<sup>R</sup>-BpはB細胞受容体を低発現する、あるいはほとんど発現しないことから、B細胞受容体の遺伝子再構成段階に位置すると考えられた。

以上の結果から、胸腺でBリンパ球分化が起こらないのは、Dl11<sup>R</sup>-Bpが胸腺には存在しな

いからである、と予測された。そこで胸腺の詳細な解析を行ったところD111<sup>R</sup>-Bpを含むと考えられるF1t3<sup>+</sup> Cd19<sup>+</sup> 細胞集団は骨髄に3.4%存在する一方で、胸腺には0.00095%しか存在しないことが分かった。さらに胸腺のF1t3<sup>+</sup> Cd19<sup>+</sup> 細胞を単離しOP9-DL1上で培養したところBリンパ球に分化しないことが明らかとなった。このことから、胸腺にはやはりD111<sup>R</sup>-Bpはほとんど存在しないであろうと示唆された。

## 考 察

D111は多能性前駆細胞のTリンパ球系譜への分化促進し、Bリンパ球前駆細胞細胞内においてBリンパ球分化に重要な転写因子Stat5、E2Aの分解を促進することでBリンパ球分化を抑制する。D111<sup>R</sup>-Bpは、D111によるいずれの抑制に対しても抵抗性であると予想される。どのような機構を以って、D111による抑制を回避しているのかは今後の課題であるが、予備実験にて、D111<sup>R</sup>-BpがOP9-DL1上で増殖し、Bリンパ球に分化するためには、受容体型チロシンキナーゼであるKitからのシグナルが必須では可能性が示唆されている。今後は、Kit以外のサイトカインについても詳細な解析を行う必要がある。

胸腺内にD111<sup>R</sup>-Bpは検出されなかった。胸腺内に存在するTリンパ球前駆細胞は骨髄に由来する。骨髄内で発生したTリンパ球前駆細胞は骨髄から放出され、血流を介して胸腺に移入する。末梢血中の単核細胞を解析したところ、D111<sup>R</sup>-Bpは検出されなかった。このことから胸腺にD111<sup>R</sup>-Bpが存在しないのは、骨髄で発生したD111<sup>R</sup>-Bpは骨髄外に移出せず、その結果、胸腺に移入しないからであると予想される。

## 結 論

D111による分化抑制機能に抵抗性を持つBリンパ球前駆細胞、D111<sup>R</sup>-Bpは骨髄にその存在が認められる。D111<sup>R</sup>-Bpは胸腺内でもBリンパ球に分化する可能性を有すると考えられるが、胸腺内にD111<sup>R</sup>-Bpは観察されなかった。従って、胸腺内でBリンパ球分化が起こらない理由は、胸腺に発現するD11がBリンパ球分化を抑制するだけでなく、D111<sup>R</sup>-Bpが胸腺には存在しないからであると考えられる。