

## 学 位 論 文 要 旨

研究題目

(ヒト B 細胞における BAP1 の機能解析)

兵庫医科大学大学院医学研究科

医科学 専攻 生体応答制御 系

呼吸器病態学 (指導教授 木島 貴志 )

氏 名 多田 陽郎

脱ユビキチン化酵素をコードする BAP1 はヒストン H2AK119 や細胞増殖制御因子 HCFC1 等を脱ユビキチン化し転写を制御する。また、DNA 修復、アポトーシス制御等の機能を有することが報告されており、腫瘍抑制遺伝子として知られる。DNA 二本鎖切断が生じた際に BAP1 が切断部位に集積し、RAD51 や BRCA1 フォーカス形成を促進することから、相同組換え修復に寄与すると報告されている。我々は二本鎖切断を随意に生じることが可能であり、更にトリフルオロチミジンに対する耐性から DNA 二本鎖切断の修復を簡便に検出できるヒトリンパ芽球細胞 TSCE5 を用いて BAP1 の DNA 修復機構を詳細に解析した。CRISPR-Cas9 システムを用いて、*BAP1* ノックアウト細胞を複製したところ両アレルノックアウト細胞のみ得られた。変異箇所がそれぞれ異なる 4 種を用いて、*in vitro* 機能解析を行ったところ、細胞増殖能は過去の報告同様に *BAP1* ノックアウトにより抑制されていた。しかし驚いたことに、トリフルオロチミジン添加試験で DNA 修復能を評価した結果、二本鎖切断、非切断群のいずれにおいても *BAP1* ノックアウトによる変異細胞数に有意な差はなかった。X 線照射時の  $\gamma$ H2AX フォーカス形成量にて DNA 修復能を評価した結果でも有意な差を生じなかった。また、BAP1 はアポトーシス誘導能に影響すると報告されているが、 $H_2O_2$  添加時のアポトーシス誘導能では *BAP1* ノックアウトによる有意な差を示さなかった。過去の *BAP1* ノックアウト実験結果との違いから、BAP1 は B 細胞由来である本細胞では B 細胞種特異的な転写制御機能が働いていることが推定された。

そこで野生型 TSCE5 と *BAP1* ノックアウト細胞を RNA-seq により網羅的に遺伝子発現解析をしたところ、初期免疫に関わるケモカイン・サイトカインが *BAP1* ノックアウトにより大きく変動していた。特に初期免疫応答に重要な働きをする腫瘍壊死因子 TNF $\alpha$  の産生がタンパクレベルでも著しく抑制されていることを見出した。ノックアウトマウスの解析から、Bap1 は T 細胞・B 細胞の分化・成熟に関わることが報告されているが、ヒト B 細胞の機能制御は報告がない。本研究結果では、TNF $\alpha$  のみならず、B 細胞の走化性に関わるケモカイン *CCL19*・その受容体である *CCR7* の産生量も *BAP1* ノックアウトにより著しく変化しており、これらのサイトカイン・ケモカイン産生制御を介して、B 細胞の分化・成熟に BAP1 が寄与すると考えられる。