



|              |  |
|--------------|--|
| Title        | 胎生期胸腺細胞の表皮への生着における $\gamma\delta$ T細胞受容体に関する研究   |
| Author(s)    | 青野, 豊文   |
| Citation     | 大阪大学, 1999, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41686">https://hdl.handle.net/11094/41686</a>  |
| rights       |  |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 青野 豊文  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)   |
| 学位記番号      | 第 14485 号  |
| 学位授与年月日    | 平成11年3月25日                                       |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科社会系専攻                      |
| 学位論文名      | 胎生期胸腺細胞の表皮への生着における $\gamma\delta$ T細胞受容体に関する研究   |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 吉崎 和幸<br><br>(副査)<br>教授 清野 宏 教授 宮坂 昌之 |

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) はT細胞受容体 (TCR), 免疫グロブリン遺伝子の再構成時に, 断端に template independent に塩基を挿入 (N領域) させる, リンパ球特異的リコンビナーゼの一つである。TdT の発現は胎生期には抑えられており, この時期にN領域を欠き CDR3の多様性が限局された胎生期特有のT細胞, B細胞レパトアが形成される。一方マウスにおいて, 皮膚に存在する $\gamma\delta$ T細胞 (dendritic epidermal T cell, DETC) の90%以上に V $\gamma$ 3-J $\gamma$ 1, V $\delta$ 1-D $\delta$ 2-J $\delta$ 2の, N領域を欠き, V, D, J断端のホモロジーを介して形成されるある特定の塩基配列 (canonical sequence) にコードされる TCR が検出され, またこれと全く同じ塩基配列が胎生期の胸腺細胞にも高頻度に検出されたことにより, DETC は胎生期胸腺由来と考えられている。胎生期胸腺細胞がいかにして表皮へ生着するかの詳細なメカニズムは不明であるが, canonical TCR が生着に関して重要な役目を担っているものと思われる。

今回遺伝子ターゲッティングの手法を用い TdT のプロモーターを lck プロモーターで置換したマウスを作製し, TdT を胎生期より発現させ, それによって胎生期胸腺細胞, および DETC がいかなる影響を及ぼされるか, ならびに, 表皮への生着における canonical TCR の重要性について検討した。

#### 【方法ならびに成績】

1. TdT プロモーター領域を lck プロモーターおよび PGKneo' で置換するためのベクターを作製し, E14ES 細胞に電気穿孔法で導入したのち, G418とガンシクロヴィルで選別を行った。サザン法で相同組み換えの起こったクローンを確認し, C57BL/6 (B6) マウスの胎盤胞に打ち込みキメラマウスを作製, キメラマウスを B6 とかけあわせ, 得られたヘテロ接合体をかけあわせてホモ接合体 (lckTdT+/+) を作製した。

ノザン法により, lckTdT+/+マウスでは TdT 遺伝子の発現が胎生期 (E14.5-E18.5) 胸腺, 成熟胸腺, 脾臓, 骨髄, リンパ節, 肺において認められたが, 腎臓, 脳, 肝臓では認められなかった。これは lck 遺伝子発現パターンと同じであった。

2. E15.5からE18.5において, 胸腺から採取された総細胞数は, lckTdT+/+とコントロール間で差を認めなかつた。しかし E16.5の胎生期胸腺細胞のフローサイトメトリー解析では, lckTdT+/+は lckTdT-/+に比較して,

$\alpha \beta^- \gamma \delta^+$ 細胞が約1/2に減少していた。さらにV $\gamma$ 3<sup>+</sup>HSA<sup>+</sup>, V $\gamma$ 3<sup>+</sup>Thy1.2<sup>+</sup>細胞も同様に減少していた。

3. lckTdT+/-とB6の胎児の胸腺細胞についてゲノムDNA, cDNAを用いてPCRにてV $\gamma$ 3-J $\gamma$ 1ならびにV $\delta$ 1-D $\delta$ -J $\delta$ 2の結合部を增幅し、その塩基配列を決定した。E16.5のB6の胸腺では、V $\gamma$ 3-J $\gamma$ 1結合部においてN領域はゲノムDNA, cDNAともに3%にしか認められず、canonical sequenceがそれぞれ38%, 80%に認められた。一方これと対照的に、lckTdT+/-の胸腺では、N領域がゲノムDNAの74%に認められたが、canonical sequenceはゲノムDNAで14%, cDNAで36%にしか認められなかった。V $\delta$ 1-D $\delta$ -J $\delta$ 2の結合部についてもV $\gamma$ 3-J $\gamma$ 1と同様の傾向が認められたが、lckTdT+/-のcanonical sequenceの頻度はV $\gamma$ 3-J $\gamma$ 1におけるそれよりもさらに低く、ゲノムDNAで9%, cDNAではわずか4%であった。

またV $\delta$ 1-D $\delta$ -J $\delta$ 2の結合部に関しては、ゲノムDNAにおいて、B6では89%がインフレームであったのに対し、lckTdT+/-ではその約半数の45%のみがインフレームであった。したがって、フローサイトメトリー解析で明らかとなったlckTdT+/-の胎生期胸腺における $\gamma \delta^+$ 細胞の減少は、このインフレームの頻度の差によるものと考えられた。

4. 10週齢マウスの表皮細胞のフローサイトメトリー解析の結果、 $\gamma \delta^+$ , V $\gamma$ 3<sup>+</sup>HSA<sup>+</sup>, V $\gamma$ 3<sup>+</sup> $\gamma \delta^+$ 細胞の割合には、lckTdT-/-, lckTdT+/-間に明らかな差を認めなかった。

5. 10週齢lckTdT+/-の表皮細胞について、胸腺細胞における方法と同様にして結合部の塩基配列を解析した。V $\gamma$ 3-J $\gamma$ 1結合部では、cDNAにおいて、N領域はわずか17%，逆にcanonical sequenceは83%であった。V $\delta$ 1-D $\delta$ -J $\delta$ 2結合部についてもほぼ同様の結果で、それぞれ14%および79%であった。したがって、これまでに報告された正常マウス同様、lckTdT+/-においてもDETCの大半がcanonical TCRを持っていると考えられた。

### 【総括】

1. lckTdT+/-の胎生期胸腺においては、 $\gamma \delta$ T細胞が正常の約半数に減少していた。したがって、胎生期胸腺において $\gamma \delta$ T細胞が正常に産生されるには、TdTの発現が胎生期には抑制されている必要があると考えられた。

2. lckTdT+/-では、胎生期胸腺において非常にminorなpopulationであるcanonical TCRを担う $\gamma \delta$ T細胞が、専ら選択的に表皮へ生着していることが確認された。よってcanonical TCRは胎生期胸腺細胞の表皮への生着に重要なはたらきを持つことが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

いまなお解明されていないDETCの表皮への生着機序については、現在も皮膚粘膜免疫研究において非常に興味深いテーマの一つである。本研究は、遺伝子ターゲッティングの手法を用いてTdTプロモーターをlckプロモーターで置換し、胎生期におけるTdTの発現が胎生期胸腺細胞ならびにDETCにいかなる影響をおよぼすかを検討したものである。その結果として本研究は、胎生期胸腺細胞のDETCとしての表皮への生着に、canonical TCRがきわめて重要であることを明らかにした。したがって、本研究はDETCの生着機序解明において、きわめて有意義な成果をあげたと認められる。

さらに本研究におけるミュータントマウスでは、正常では認められない胎生期におけるTdTの発現が十分に確認されたことより、本研究における遺伝子ターゲッティングによるプロモーターの置換という手法は、遺伝子発現を脱制御するにあたり、今後も魅力的な方法として価値のあるものと認められる。

以上、本研究は学位の授与に値するものと評価する。