



Title	マウス胸腺におけるラミニンの役割に関する研究
Author(s)	岩尾, 睦美
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41972
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 >大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 いわ お じつ み
岩 尾 睦 美

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 1 5 3 6 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平成12年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

薬学研究科応用薬学専攻

学 位 論 文 名 マウス胸腺におけるラミニンの役割に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 山元 弘

(副査)

教 授 田中 慶一 教 授 真弓 忠範 教 授 東 純一

論 文 内 容 の 要 旨

胸腺は、免疫応答の中核を成すTリンパ球の成熟に最も重要な器官である。Tリンパ球への分化能力を持つ幹細胞は、大動脈・生殖隆起・中腎領域、胎児肝臓、胸腺や骨髄などにその存在が知られており、出生後では、造血幹細胞は骨髄から胸腺に移動して分化しT細胞としての機能を発揮できるまでに成熟すると考えられている。造血幹細胞からリンパ球前駆細胞に分化した細胞は胸腺に移行し、CD4CD8ダブルネガティブ細胞から、胸腺細胞のほぼ80%をしめるCD4CD8ダブルポジティブ(DP)細胞に分化した後、適当なT細胞抗原受容体(TCR)を持った細胞だけが選ばれ機能的なT細胞(CD4もしくはCD8シングルポジティブ、SP)となり、末梢へと移行する。胸腺は胸腺リンパ球すなわち胸腺細胞と、それらを支える胸腺ストローマ細胞(上皮細胞など)からなっており、それらの細胞間相互作用なしには胸腺並びにT細胞の正常な発達は考えられない。このことから、接着分子や細胞外マトリックス分子の、T前駆細胞の胸腺への移入や、T細胞分化への影響などが注目されてきた。胸腺の細胞表面に発現し、直接的な細胞間相互作用を担う接着分子については多くの研究者がその役割について研究を進めている。しかし、胸腺そのものの構造に関わる細胞外マトリックス分子については、その細胞間相互作用における役割について未知の面が多く、細胞接着以外の作用の検討は進んでいないのが現状である。特にラミニンはサブタイプも多く、その役割についてはよくわかっていない。そこで筆者は、細胞外マトリックス、特にラミニンファミリーに属するメロシン(ラミニン2/ラミニン4、共にラミニン α 2鎖を構成成分として持つ)の、胸腺細胞分化における役割について研究を行った。

ラミニンは1本の重鎖(約300kDa: α 鎖)と2本の軽鎖(約200kDa: β 鎖と γ 鎖)から構成されており、現在 α 鎖が5種類、 β 鎖が3種類、 γ 鎖が2種類報告されている。マウス胸腺に発現しているラミニンのサブタイプについて検討した結果、すでに報告されているラミニン α 2鎖のみならず、 α 3、 α 4、および α 5鎖も発現していることが明らかになった。また、ラミニン α 2鎖は胸腺上皮細胞で発現し、胸腺細胞では発現が認められなかったことから、メロシンは胸腺上皮細胞から産生され、胸腺細胞に作用すると考えられる。さらに、ラミニン α 2鎖の発現時期について検討した結果、新生児期から発現しており、週齢による大きな差は認められなかった。しかし、胸腺組織染色の結果により、マウスの成長と共にラミニンのファイバーの発達が確認されたことから、ラミニンの重要性が週齢とともに変化する可能性もあると考える。また、胸腺のラミニンファイバーは生後7日目にすでに確認され、その分布は皮膜、皮膜直下や髄質に強く認められ、皮質にも若干認められた。

メロシンの構成成分であるラミニン α 2鎖の欠損マウスは、先天性筋ジストロフィーを起こすことが知られている。骨格筋においてメロシンは筋繊維の維持に働いており、ラミニン α 2鎖の欠損は筋細胞のアポトーシスによる細胞死を引き起こす。胸腺においても筋肉と同様の機構によって異常が起こっている可能性があると考え、ラミニン α 2鎖欠損マウスの胸腺について検討した。その結果、ラミニン α 2鎖欠損ホモのマウスは筋ジストロフィーの発症に伴って、生後3週前後から胸腺皮質の萎縮が観察され、それと同時にDP細胞の減少が認められた。そして、そこに残ったSP細胞は正常なTCR発現パターンを示した。さらに、PI染色およびTUNEL法の結果から、欠損ホモのマウス胸腺におけるDP細胞の減少は、アポトーシスによることが示された。また、メロシンおよびVLA6はどちらも新生児期から発現しており、これらの発現以外のファクターによってメロシンの作用時期が決定すると考えられる。

*in vivo*においてメロシンが胸腺細胞、特にDP細胞の生存に関与していることが示唆された。そこで、*in vitro*で正常胸腺細胞の生存維持に対するメロシンの作用を検討した。その結果、メロシンと抗VLA6抗体が胸腺細胞の細胞死を抑制すること、さらにはラミニン α 2鎖を発現している胸腺上皮細胞によってのみ、ダブルポジティブ胸腺細胞の細胞死を抑制できることが示された。このことから、メロシンの欠損により、特にダブルポジティブ細胞が細胞死を起こすと考えられる。

造血幹細胞の胸腺への移入、分化、並びに胸腺の発達には接着分子やECMが重要な役割を担っている。そこで、ラミニン α 2鎖の骨髓細胞の胸腺移入に対する影響を検討した。その結果、ラミニン α 2鎖欠損マウスにおいて、出生後3週齢前後までは正常な胸腺細胞パターンが示されること、ラミニン α 2鎖欠損マウス胎児胸腺への、成熟マウス骨髓細胞の侵入は十分であったことから、メロシンはリンパ球前駆細胞の胸腺への接着、移入に関与していないと考えられる。

本研究から、筆者は、グルコシルチコイドを含む何らかのアポトーシスシグナルが、胸腺DP細胞や筋肉細胞に、恒常的あるいは時期特異的に伝達されていること、そしてそれは、胸腺ではメロシンとVLA6の相互作用によって、筋肉ではメロシンとインテグリン α 7 β 1の相互作用によって阻止されていると推察する。このことは、細胞外マトリックス分子を介した相互作用により、インテグリンが細胞にシグナルを伝達し、anoikis（細胞表面のインテグリンと細胞外マトリックス分子の接着を阻害することにより引き起こされるアポトーシス）の抑制に働いていることを支持している。細胞外マトリックスタンパク質を介したシグナル伝達経路の解明は、リンパ球や筋肉細胞のアポトーシス阻害の分子メカニズムを明らかにできるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

胸腺の発達や機能維持には、胸腺微小環境を構築する細胞外マトリックスと接着分子を介した、胸腺ストローマ細胞と胸腺リンパ球のコミュニケーションが必要である。胸腺に発現している主要な細胞外マトリックス蛋白であるラミニンは、サブタイプが豊富であり、また胸腺の発達とともに細胞外マトリックスファイバーが成長していくことが知られているが、その役割についてはよく判っていない。

- 1：そこで、各週齢のマウス胸腺におけるラミニンの発現をRT-PCR法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法などで解析したところ、マウス胸腺においてラミニン α 2、3、4及び5の発現が確認できた。
- 2：以前から胸腺での発現が知られているメロシン（ラミニン α 2鎖を構成成分として持つラミニンの一種）は、筋肉においては筋原繊維の生存維持に働いており、その欠損により筋ジストロフィーが引き起こされる。そこでラミニン α 2鎖欠損マウスの胸腺を検討したところ、皮質の萎縮とアポトーシスによるCD4⁺CD8⁺ダブルポジティブTリンパ球の選択的減少・消失が観察された。
- 3：胸腺内でのメロシンの役割を明らかにする目的で、ラミニン α 2鎖欠損マウスから樹立した胸腺ストローマ細胞株を用いた実験を行い、胸腺リンパ球の生存維持に対するメロシンやインテグリンの作用を*in vitro*で検討した。その結果、胸腺ストローマ細胞から産生されるメロシンが、胸腺リンパ球表面のVLA6（インテグリンの一種）を介して胸腺リンパ球の細胞死を抑制することが示された。

以上本研究では、胸腺におけるラミニンの発現、特にラミニン α 2鎖の発現とその役割について、生化学的、組織

化学的、細胞生物学的に解析し、メロシンとインテグリンの相互作用は、胸腺リンパ球の生存維持に働くという新しい知見を示すことができた。したがってこれら成果は、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものとする。