

Title	マウス胸腺形成初期段階の細胞学的・組織化学的検討
Author(s)	中村, 晃裕
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43358
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	なかむらあきひろ 中村晃裕
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第16962号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	マウス胸腺形成初期段階の細胞学的・組織化学的検討
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 前田 正知 教授 田中 慶一 教授 岡部 勝

論文内容の要旨

免疫系で中枢的な役割を果たしているT細胞は血球系幹細胞に由来し、胸腺内で分化・増殖することが知られている。マウスでは大動脈・生殖隆起・中腎領域で発生した血球系幹細胞は、胎児肝臓を経て胎児胸腺に移入すると考えられている。この移入過程ではサイトカインやケモカインなどの可溶性因子と共に、様々な接着分子が関与していると考えられている。

これまでに行われてきた胸腺再構築実験では、フローサイトメトリーによる解析が中心であったために、解析には一定数以上の細胞を必要とした。このため、例えば血球系幹細胞の胸腺への移入過程など、ごく少数の細胞のみが関与しているT細胞分化の初期過程を解析するには困難が伴う。また、細胞の分布や動態を解析する実験には骨髓移植法が広く用いられてきた。この場合にも、ドナー由来の細胞とホスト由来の細胞を区別するために、Ly-5やThy-1などのアロタイプマーカー抗原に対する免疫組織化学染色が必要であった。

オワンクラゲより単離されたGreen Fluorescence Protein (GFP) は緑色の蛍光を発する。岡部らによって作製されたGFPトランスジェニックマウス(GFPマウス)は、EGFP(enhanced GFP)をトランスジーンしたマウスである。このマウスは、リンパ球を始めとする多くの細胞がGFP陽性である。本研究ではGFPマウス胎児肝臓または成マウス骨髓由来の血球系幹細胞を用いて、胸腺再構築実験を行った。この実験系では、血球系幹細胞の胸腺への移入過程を、GFPの蛍光を検出することにより視覚的に捕えることが可能である。

本研究室では、これまでにGFPマウスを使用し、胸腺への接着と胸腺内への侵入にかかわる接着分子を解明してきた。その結果、接着分子の抗体による機能阻害による実験で、接着分子がT前駆細胞の胸腺内移入に重要な役割を果たしていることが示された。

すなわち、VLA-4やVLA-6のようなインテグリンは、前駆細胞が胸腺葉に接着する段階に働き、また、CD44分子は、接着後の侵入の過程に働くことが明らかになった。

また、T前駆細胞の由来によって移入に関わるインテグリンの種類が異なることも示された。

これまでに、リンパ球の炎症部位への血管外遊走には接着分子とともにケモカインなどの可溶性因子が重要な働きをしていることが示されている。また、血球系幹細胞の胸腺移入においても接着分子が重要な働きをしていることも示された。

そこで本研究では、T前駆細胞の胸腺内移入に関わっている可溶性因子、ケモカインを検索した。私が注目したケ

モカインは stromal cell derived factor-1 (SDF-1) である。SDF-1は未分化造血幹細胞を遊走させる。TECKにもその機能はある。しかし、胎齢18日の胸腺をストローマ細胞と胸腺細胞に分離し、様々なケモカインの mRNA レベルを検討した結果、TECKは胸腺ストローマ細胞にも胸腺細胞にも mRNA レベルで確認されるが、SDF-1は胸腺ストローマ細胞のみで mRNA が発現されていた。胎児胸腺の初期形成段階では、胸腺細胞が存在しない状態でT前駆細胞が胸腺に遊走すると考えられる。したがって、胸腺ストローマ細胞のみが産生するケモカインが、T前駆細胞の胸腺への遊走に深く関わっていると考えられる。事実、SDF-1 β によって、胎児胸腺へのT前駆細胞の migration が促進され、抗 SDF-1抗体により、その migration が阻害された。SDF-1と CXCR4の相互作用がT前期細胞の胸腺への migration に重要であることが示された。

成熟マウス骨髄由来T前駆細胞と胎児肝臓由来T前駆細胞の移入効率は、胎児肝臓由来の方が約3倍高かった。これは、胎児胸腺に胎児肝臓由来のT前駆細胞が移入することは、生理的に当然の現象であるが、胎児胸腺に成熟マウス骨髄由来のT前駆細胞が移入することは、生理的にあり得ない。これらの理由で骨髄由来のT前駆細胞の移入効率が胎児肝臓由来のT前駆細胞に比べ低いのもかもしれない。また、骨髄由来T前駆細胞と胎児肝臓由来T前駆細胞では、胸腺に接着、侵入する際に異なる接着分子が関与することが原因かもしれない。しかし、再生医学な応用を考えると、胎児肝臓細胞を手に入れることは困難であり、成人骨髄細胞を手に入れることの方が容易である。したがって、成熟マウス骨髄由来のT前駆細胞を用いた場合にも、SDF-1が胸腺への migration に重要な役割を果たしていることは、将来の再生医学的応用に有益な結果である。

生体内で SDF-1の効果により、c-kit⁺細胞が胸腺内へ移入した後、どのように胸腺は成長していくのか。成熟した胸腺は、皮質と髄質に区別される。GFP⁺c-kit⁺細胞が移入した胸腺を、胸腺再構築実験法で培養しても、種々のマーカー抗原の消長を伴って、T細胞分化は正常に起こっているが、皮質と髄質の形成を判断することは困難であった。さらに、胎齢14日の胸腺をそのまま器官培養しても、*in vitro*では、髄質が生体内と同じように形成されることはなかった。このように、詳細は示さないが、*in vitro*で胎児胸腺が皮質と髄質を形成していくプロセスを見出す試みは、全て失敗した。

一方、GFP陽性の骨髄を成熟リンパ球欠損マウスである *scid*に移入した実験では、髄質に GFP 強陽性のリンパ球が観察された。このように、*in vitro*では髄質の形成は観察されないため、生体内における胸腺成長を免疫組織化学的手法により、*in vivo*で評価することを試みた。

その結果、胎齢13日~14日で、胸腺髄質、胸腺皮質が染め分けられるが、MHCクラスI (Qa-2)、MHCクラスII (I-A^b)によって染色される機能的な髄質に分化する時期は、胎齢14日以降であると考えられた。胸腺ストローマ細胞の分化・増殖とともに、T前駆細胞の胸腺内移入・分化・増殖が促進され、成熟胸腺へと成長する。しかし、*scid*マウス、IL-7R欠損マウスの胸腺髄質、胸腺内 CD4/8の割合、胸腺細胞数の観察から、胸腺髄質とリンパ球分化は独立した現象であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

T細胞は血球系幹細胞に由来し胸腺内で分化・増殖する。マウスでは、大動脈・生殖隆起・中腎領域で発生した血球系幹細胞は、胎児肝臓を経て胎児胸腺に移入するが、この移入過程ではサイトカインやケモカインなどの可溶性因子と共に、様々な接着分子が関与していると考えられている。これまで行われてきた胸腺再構築実験では、フローサイトメトリーによる解析が中心であったために、解析には一定数以上の細胞を必要とした。このため、例えば血球系幹細胞の胸腺への移入過程など、ごく少数の細胞のみが関与しているT細胞分化の初期過程を解析するには困難を伴う。本研究では、少数の細胞移動を検出するために GFP transgenic (GFP) マウスを用い、前駆細胞の胸腺への接着と胸腺内への侵入にかかわる分子を解明することを目的とした。また進入後の胸腺形成の過程を種々変異マウスを用いて免疫組織化学的に解析した。

(1)胎児胸腺形成期に働く可能性があるケモカインについて、RT-PCR法で検索した結果、SDF-1 β とTECKを検出した。しかしTECKは胎児胸腺細胞、ストローマ細胞両方が発現するのに対し、SDF-1 β は胸腺ストローマ細胞の

みで発現していた。

(2)SDF-1 β の受容体であるCXCR4の mRNA は、両方に発現が認められた。

(3)胎児胸腺培養で、SDF-1 β はT前駆細胞の移入を促進し抗 SDF-1抗体は阻害した。

(4)胸腺の成熟は髄質形成が指標となるが、マウス胎児胸腺を器官培養しても、*in vitro*では髄質形成は認められなかった。そこで胸腺の成長過程を免疫組織化学的手法により、*in vivo*で評価した。胎齢13日～14日で、胸腺髄質が検出できた。

(5)MHC分子の検出は、髄質形成に少し遅れて、胎齢14日以降で可能になった。

(6)*scid*マウス、IL-7R欠損マウスの胸腺髄質の観察から、髄質形成とリンパ球分化は独立した現象であることが示唆された。

以上本研究は胎児胸腺器官培養法を駆使して、T前駆細胞が胸腺内に進入するときに働くケモカインがSDF-1 β であること、また種々の変異マウスを用いた胸腺形成の免疫組織化学的検索によって、胸腺髄質形成と機能的リンパ球分化とは独立した事象であることを明らかにした。これらの成果は、胸腺形成の分子機構を明らかにしていくうえで貴重な知見であり、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものとする。