

Title	ジーントラップ法を用いたCD43分子関連遺伝子の探索
Author(s)	中平, 陽
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44006">https://hdl.handle.net/11094/44006</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</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	中 平 陽
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 17733 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	ジーントラップ法を用いた CD43 分子関連遺伝子の探索
論文審査委員	(主査) 教授 村上 伸也 (副査) 教授 森崎市治郎 助教授 西村 理行 講師 豊澤 悟

### 論文内容の要旨

#### 【研究目的】

慢性炎症性疾患である歯周病の病巣局所には、免疫担当細胞の浸潤が多数認められ、これら細胞による免疫応答・炎症反応が本疾患の発症及び進行に深く関与している。炎症巣へ遊走してきたリンパ球は、歯肉結合組織を構成する歯肉線維芽細胞(HGF)と細胞接着することにより、同組織内への定着・集積を果たし、この異種細胞間接着を通じて相互に活性化しあうことで炎症反応の慢性化、遷延化を引き起こすものと考えられている。これまでに我々は、リンパ球と HGF との細胞接着は、細胞表面上に発現している接着分子と呼ばれる分子群の作用によって制御を受けていること、リンパ球上の CD43 からの細胞内へのシグナル伝達の結果、リンパ球の HGF に対する接着が阻害されることを明らかにした。また CD43 は細胞接着のみならず、リンパ球の活性化、アポトーシスなどさまざまな機能発現に関与しているという報告も認められる。しかしながら、CD43 を介してシグナルが細胞内へ伝達された結果、如何なる遺伝子の発現調節により細胞レベルでの機能を誘導しているかは未だ十分に解明されていない。そこで本研究では、CD43 を介した刺激により発現調節を受ける遺伝子群を解析することを目的とし、ジーントラップ法を用いて、CD43 に関連する遺伝子の単離・同定を行った。

#### 【材料と方法】

1) ジーントラップベクターの作製：自身の発現プロモーターを欠き、ゲノム内に挿入された際には近傍の内在性のプロモーターにより発現マーカー (*lacZ*+ネオマイシン耐性遺伝子) の発現調整を受けるようなジーントラップベクター pGT1.8-IRES-TAG を作製した。2) CD43 反応性ジーントラップクロンの樹立：HGF との細胞接着のモデルとした K562 (erythroleukemia line) のゲノム上に電気穿孔法によりジーントラップベクターをランダムに挿入した。ネオマイシン存在下 (300  $\mu$ g/ml) の選択培養により G418 耐性細胞クロンを得た。これらベクター導入株を当研究室で樹立した抗ヒト CD43 モノクローナル抗体 (3S-B2) にて刺激し、その際の遺伝子発現の変化について、 $\beta$ -gal 活性を指標としたフローサイトメトリーを応用したスクリーニングを行った。3S-B2 による刺激の際に  $\beta$ -gal 活性が変動する細胞クロンを CD43 反応性ジーントラップクロンとして樹立した。3) トラップ遺伝子の単離と同定：各ジーントラップクロンより mRNA を抽出し、5'RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を用いてトラップされた遺伝子断片の単離を行い、BLAST 検索により遺伝子同定を試みた。4) CD43 刺激による遺伝子発現の検討：野生型 K562 において 3S-B2 刺激の際のトラップ遺伝子の発現量の変動を、半定量性 RT-PCR 法により検討し

た。さらに、末梢血 T リンパ球についても、同様の実験により検討した。5) トラップ遺伝子の全長 cDNA クローニング: GenBank にて検索を行い、トラップされた遺伝子断片を含む EST (expressed sequence tag) クローンを取得し、全長 cDNA をクローニングした。6) 細胞接着の定量: トラップ遺伝子のタンパク質をコードするセンス DNA 及びアンチセンス DNA を発現ベクターに組み込み、K562 に遺伝子導入を行い、トラップ遺伝子の強発現株及び発現抑制株を作製した。さらに同上細胞を用いて細胞接着実験を行った。単層に増殖させた HGF 上に  $^{51}\text{Cr}$  にて標識した各種遺伝子導入株を培養した。30 分後、非接着細胞を洗浄、除去し、HGF に接着した細胞からの放射活性をガンマカウンターにて測定し、接着した細胞数の定量化を行った。

#### 【結果】

1) 遺伝子導入を行った K562 中より、ジーントラップベクターの挿入された 341 個の G418 耐性細胞クローンを得た。これら細胞クローンの中から 3S-B2 刺激により  $\beta$ -gal 活性が変化した 4 個の CD43 反応性ジーントラップ細胞クローン 1D6、1C5、4D6、4B5 を樹立した。各種ジーントラップクローンについて 5'RACE 法を用いてトラップされた遺伝子断片の単離に成功し、DNA シークエンスにより塩基配列を決定した。2) 4 種のトラップ遺伝子の中で、1D6 は新規配列であり、野生型 K562 において CD43 刺激によりその転写活性が抑制された。全長 cDNA 解析の結果、1D6 はその全長 cDNA の 3' 側が TALE homeobox protein 転写活性制御因子をコードする *Meis2* 遺伝子とエクソンを共有していることから、*Meis2* の新規アイソフォーム (*Meis2-Sialophorin Responsive isoform*、以下 *Meis2-SR* と略す) であることが明らかとなった。3) RT-PCR 解析より *Meis2-SR* は 3 種のスプライシングタイプ (*Meis2-SR1*、*SR2* 及び *SR3*) を持つ遺伝子であることが示された。4) *Meis2-SR* アンチセンス遺伝子導入 K562 において、3S-B2 により CD43 を介した細胞接着の抑制がさらに亢進した。5) 末梢血 T リンパ球において、*Meis2-SR2*、*SR3* は、3S-B2 抗体の刺激により、発現の抑制が認められた。

#### 【結論及び考察】

1) 本研究にて考案したジーントラップ法により 4 種の CD43 反応性遺伝子の単離に成功し、未知遺伝子を単離・同定する上で、ジーントラップ法の有用性が実証された。2) 4 種のトラップ遺伝子の中で、*Meis2* 転写制御因子の新規アイソフォームである 1D6 は、野生型 K562 において、CD43 刺激によりその遺伝子発現が減少したことより、1D6 すなわち *Meis2-SR* は、CD43 を介した細胞機能発現に抑制的に働いていることが示唆された。3) *Meis2-SR* アンチセンス遺伝子導入 K562 においては、抗 CD44mAb である OS/37 により誘導される K562-HGF 間の細胞接着において、3S-B2 による CD43 を介した細胞接着抑制がさらに増強され、*Meis2-SR* が T リンパ球-HGF 間の CD43 を介した細胞接着制御機構に関与している可能性が示唆された。4) ヒト末梢血 T リンパ球において、CD43 刺激により *Meis2-SR2*、*SR3* の遺伝子発現が抑制されたことから、リンパ球においても CD43 を介して成立する細胞機能に深く関与していることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、ジーントラップ法を用いて、リンパ球上の CD43 を介した刺激によって発現調節を受ける遺伝子の探索を試みたものである。その結果単離された *Meis2* ホモオボックス遺伝子の新規アイソフォームである *Meis2-SR* は、CD43 刺激によりその遺伝子発現が抑制されることが明らかとなり、更にリンパ球と歯肉線維芽細胞との細胞間接着を制御していることが示唆された。これらの知見は、CD43 を介した接着性細胞間相互作用制御の分子機構の一端を明らかにしたものであり、本研究は博士 (歯学) の学位請求に値するものと認める。