

Title	A Study on CD45 Isoform Expression During T-Cell Development and Selection Events in the Human Thymus
Author(s)	福原, 謙二郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/44427">http://hdl.handle.net/11094/44427</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	福原謙二郎
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17977 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 2 項該当
学位論文名	A Study on CD45 Isoform Expression During T-Cell Development and Selection Events in the Human Thymus (ヒト胸腺内 T 細胞分化および選択に伴う CD45 アイソフォームの発現の推移に関する検討)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 暉  (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 戸田 達史

#### 論文内容の要旨

##### [目的]

胸腺内 T 細胞分化において、T 細胞抗原受容体のレパトリーの決定のため positive selection および negative selection が行われ、これに伴い CD45 分子の発現量およびそのアイソフォームが変化することが知られている。かかる selection 前後における CD45 アイソフォームの変化については、CD45R0<sup>+</sup> を経由して CD45RA<sup>+</sup> に switch するという仮説と、CD45R0<sup>+</sup> 細胞はアポトーシスに至る細胞であるという対立する二つの仮説があるなど、selection 前後における CD45 アイソフォームの変化は未だ明らかではない。一方、CD45 の細胞外ドメインは messenger RNA での alternative splicing によって異なる種々のアイソフォームとして発現されることが知られており、exon 4、exon 5、exon 6 の組合せにより理論上、RABC、RAB、RAC、RBC、RA、RB、RC、R0 の 8 種類のアイソフォームが存在する。

そこで本研究においては胸腺内 T 細胞分化に伴う CD45 アイソフォームの変化を明らかにすることを目的として、RT-PCR 法により各 CD45 分子において使用される exon 4、exon 5、exon 6 の組合せの決定を行うとともに、Bcl-2 および CD69 という positive selection マーカーの発現の評価を含めたフローサイトメトリー法を用いて、特に selection event 前後の CD45 アイソフォームの発現の変化を決定した。

##### [方法]

心臓外科手術時に切除された正常胸腺の一部より得られたリンパ球および上皮細胞を用いて以下の解析を行った。

1. 胸腺由来リンパ球を CD3、CD4、CD8 の発現によりその分化段階の順に、CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> triple negative、CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> single positive、CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> single positive の 5 つのサブセットに分画化し、RT-PCR とサザンハイブリダイゼーションにて各分化段階において用いられている CD45 アイソフォームを決定した。
2. 上記の各サブセットにおける CD45 分子の発現量と CD45R0、RA、RB、RC の各エピトープの発現を 4 カラーフローサイトメトリーにより評価した。
3. 骨髓由来のもっとも未熟な胸腺内 T 細胞である CD34<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> 細胞の胸腺上皮細胞上での共培養による分化に伴う各エピトープの発現をフローサイトメトリーにより経時的に評価した。

4.  $CD4^+CD8^+$  double positive サブセットにおける T 細胞の selection に伴う CD45 アイソフォームの変化を解析するため、positive selection マーカーである Bcl-2 と CD69 の発現と CD45R0、RA、RB、RC の各エピトープの発現をフローサイトメトリーで評価した。

[成績]

1. 胸腺内 T 細胞では、RABC、RAB、RBC、RB、R0 の 5 種類のアイソフォームが認められた。
2. RT-PCR および 4 カラーフローサイトメトリーから得られた結果により、胸腺内 T 細胞における CD45 アイソフォームの発現は、 $CD3^-CD4^-CD8^-$  triple negative サブセットで  $RABC^+RAB^+RBC^+RB^+R0^+$ 、 $CD3^-CD4^+CD8^-$  single positive および  $CD3^-CD4^+CD8^+$  double positive サブセットで  $RABC^-RAB^-RBC^-RB^+R0^+$ 、 $CD3^+CD4^+CD8^+$  double positive サブセットで  $RABC^+RAB^+RBC^+RB^{++}R0^{++}$ 、 $CD3^+CD4^+CD8^-$  single positive サブセットでは  $RABC^+RAB^+RBC^+RB^{++}R0^+$  と決定された。
3.  $CD34^+CD3^-CD4^-CD8^-$  細胞は培養により  $CD3^-CD4^+CD8^+$  double positive サブセットまで分化誘導された。フローサイトメトリーによる CD45 エピトープの発現の評価では、 $CD3^-CD4^-CD8^-$  細胞から  $CD3^-CD4^+CD8^+$  double positive 細胞にかけて、RA と RC の発現は著明に低下、RB の発現は軽度低下、R0 の発現は上昇しており、RT-PCR から得られた結果と一致していた。
4.  $CD3^-CD4^+CD8^+CD45R0^+$  サブセットから  $CD3^+CD4^+CD8^+CD45R0^+$  サブセットにかけて Bcl-2 の発現が上昇した。
5. positive selection 前の  $CD4^+CD8^+CD69^-$  サブセットから positive selection 後の  $CD4^+CD8^+CD69^+$  サブセットにかけて、CD45RB、RC、R0 エピトープの発現は増強したが、CD45RA は低発現のままであった。

[総括]

1. 胸腺内 T 細胞では、CD45 分子は RABC、RAB、RBC、RB、R0 の 5 種類のアイソフォームを発現しており、T 細胞の分化に伴って  $RABC^+RAB^+RBC^+RB^+R0^+$  から  $RABC^-RAB^-RBC^-RB^+R0^+$ 、 $RABC^+RAB^+RBC^+RB^{++}R0^{++}$  を経て  $RABC^+RAB^+RBC^+RB^{++}R0^+$  へと変化することが示された。
2. positive selection は  $CD4^+CD8^+CD45R0^+$  サブセットにおいて行われ、positive selection によって CD45 アイソフォームは  $RABC^-RAB^-RBC^-RB^+R0^+$  から  $RABC^+RAB^+RBC^+RB^{++}R0^{++}$  に変化することが示された。
3. 以上より、ヒト胸腺内 T 細胞分化および T 細胞の selection に伴い、CD45 アイソフォームの発現は厳密に制御されていることが明らかになった。すなわち、CD45 アイソフォームの発現制御が T 細胞分化に深く関与することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

胸腺内 T 細胞分化および選択に伴い、CD45 分子の発現量およびそのアイソフォームが変化することが知られているが、これまでは主としてモノクローナル抗体による解析がなされていたこともあり、その詳細は未だ明らかではない。

そこで本研究では、RT-PCR 法により各 CD45 分子における exon usage の決定を行うとともに、Bcl-2 および CD69 という positive selection マーカーの発現の評価を含めたフローサイトメトリー法を用いて、特に selection event 前後の CD45 アイソフォームの発現の変化を評価し、以下の知見を得た。

胸腺内 T 細胞では、CD45 分子は RABC、RAB、RBC、RB、R0 の 5 種類のアイソフォームを発現しており、T 細胞の分化に伴って  $RABC^+RAB^+RBC^+RB^+R0^+$  から、 $RABC^-RAB^-RBC^-RB^+R0^+$ 、 $RABC^+RAB^+RBC^+RB^{++}R0^{++}$  を経て  $RABC^+RAB^+RBC^+RB^{++}R0^+$  へと変化することが示された。また、positive selection は  $CD4^+CD8^+CD45R0^+$  サブセットにおいて行われ、positive selection によって CD45 アイソフォームは  $RABC^-RAB^-RBC^-RB^+R0^+$  から  $RABC^+RAB^+RBC^+RB^{++}R0^{++}$  に変化することが示された。これらより、ヒト胸腺内 T 細胞分化および選択に伴い、CD45 アイソフォームの発現は厳密に制御されていることが明らかになり、CD45 アイソフォームの発現制御が T 細胞分化に深く関与することが示唆された。

本研究は細胞免疫学における新知見を含んでおり、学位の授与に値すると考えられる。