The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A novel in vivo inducible dendritic cell ablation model in mice
Author(s)	奥山, めぐみ
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58106
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、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

【44】

氏　　名	奥（おく）　山（やま）　めぐみ
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４３６６　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学　位　論　文　名	A novel *in vivo* inducible dendritic cell ablation model in mice （樹状細胞の除去を個体レベルで誘導する新規マウスモデルの確立）
論文審査委員	（主査） 教　授　竹田　　潔 （副査） 教　授　宮坂　昌之　　教　授　熊ノ郷　淳

論文内容の要旨

（目的）

樹状細胞（DC）はT細胞の活性化や抗原提示を司る。個体レベルのDCの機能はCD11c^{+} 細胞でジフテリアトキシンレセプター（DTR）やジフテリアトキシンAサブユニットを発現するトランスジェニックマウスモデルを用いて解析されている。しかしCD11c^{+} 細胞にはいくつかのサブセットが混在しているため、DCのそれぞれのサブセットのin vivo における機能は不明な点が多い。そこで各サブセットの個体レベルでの機能を解析するためにDCサブセットを選択的に除去できるマウスモデルを作製することを目的とした。

（方法ならびに成績）

１．CD11c-iDTRマウス及びCD11c-iDTRΔマウスの作製

まずCD11c遺伝子座にloxPサイトで挟まれたネオマイシン耐性遺伝子及びストップコドン、そしてその下流にジフテリアトキシン遺伝子Hbegfを挿入したベクターを作製した。このベクターをES細胞に導入し、ネオマイシン耐性クローンから相同組換体を単離した。このESクローンを用いてキメラマウスを作製し、このキメラマウスとC57BL/6マウスを交配することでCD11c-iDTRマウスを得た。ES細胞及びマウスtailのDNAを用いたサザンブロット法により、目的通りターゲティングされていることを確認した。次にCD11c-iDTRマウスのシステムがワークしているか確認するために、全身でCreを強発現することが知られているCAG-Creマウスと交配しCD11c-iDTRΔマウスを作製した。Creによってストップコドンを含んだカセットが除去されているかをサザンブロットで確認した。その結果、CD11c-iDTRΔマウスで目的通りカセットが除去されていた。

CD11c-iDTRΔマウスのCD11c^{+}細胞でDTRの発現を解析した。野生型（WT）、CD11c-iDTR及びCD11c-iDTRΔマウスの脾臓からCD11c^{+} 細胞とCD11c^{-}細胞をFacsソーティングで単離し、mRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRを行った。その結果、CD11c-iDTRΔマウスのCD11c^{+} 細胞だけでDTR遺伝子が発現していることがわかった。

３．In vitroにおけるCD11c^{+} 細胞の除去

CD11c-iDTRΔマウスのCD11c^{+} 細胞はジフテリアトキシン（DT）により細胞死が誘導されるか解析した。WT、CD11c-iDTRΔマウスの骨髄樹状細胞にDTを0、200、2000ng/mlずつ加え、24時間後にCD11c^{+}細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。その結果、WTのCD11c^{+}細胞の割合は変わらなかったが、CD11c-iDTRΔのCD11c^{+}細胞は2000ng/mlのDTの添加によりほとんど消失していた。このことから、CD11c-iDTRΔマウス由来のCD11c^{+} 細胞はDTにより除去されることがわかった。次に時間依存性のDTによるCD11c^{+}細胞の消失を解析した。その結果12時間後には激しく減少し、24時間後には5%以下まで減少した。このようにCD11c-iDTRΔマウス由来のCD11c^{+}細胞はDT添加早期からアポトーシスが誘導され24時間でほぼ全ての細胞が細胞死を起こすことがわかった。

４．In vivoにおけるCD11c^{+} 細胞の除去

in vivoでのDTの効果を解析した。WT、CD11c-iDTRΔマウスにDT40ng/g body weightを腹腔注射で投与し、24時間後に脾臓細胞のCD11c^{+}細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。その結果、WTにDTを投与しても脾臓のCD11c^{+}細胞の割合に変化はなかった。一方、CD11c-iDTRΔマウスではDTを投与することにより脾臓のCD11c^{+}細胞のほとんどが消失した。このようにin vivoでもCD11c-iDTRΔマウス由来のCD11c^{+}細胞はDTにより除去されることがわかった。またCD11c-iDTRΔマウスにDTを投与後、０～７日後の脾臓におけるB細胞、マクロファージ、樹状細胞の数をフローサイトメトリーで解析した。その結果、CD11c-iDTRΔマウスの脾臓におけるB細胞やマクロファージの数に大きな変化はなかった。一方、CD11c^{+}細胞の数は1日目に消失し、3日目までにその状態が続いたが、その後徐々にCD11c^{+}細胞の割合は回復した。このようにCD11c-iDTRΔマウス由来のCD11c^{+}細胞は個体レベルでDTにより選択的に除去され、それは3日目まで続くことがわかった。

（総括）

各DCサブセットの個体レベルでの機能を解析するために、１．CD11c-iDTRマウスを作製した。２．全身でCreを発現するCAG-Cre Tgマウスと交配し、CD11c-iDTRΔマウスを作製した。３．CD11c-iDTRΔマウスではDT投与により、a.in vitroではCD11c陽性の骨髄由来DCが消失した。b.in vivoでは脾臓のCD11c^{+}細胞が消失した。c.脾臓のB細胞やマクロファージの細胞数には影響しなかった。これらの結果から作製したCD11c-iDTRΔマウスはCD11c^{+}細胞のみを除去できることがわかった。このことから、今後CD11c-iDTRマウスと各DCサブセットにCreが発現するマウスを交配することで目的のDCサブセットの細胞のみを除去させるマウスを作製できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

生体内には種々のサブセットの樹状細胞（DC）が存在しているが、各DCサブセットの個体レベルでの機能については不明な点が多い。

本研究では、各DCサブセットの個体レベルでの機能を解析するために、DCサブセットを選択的に除去できるマウスモデルを作製することを目的とした。CD11cプロモーター下にジフテリアトキシンレセプター遺伝子を導入したCD11c-iDTRマウスを作製し、CD11c^{+}細胞にDTRが発現するCD11c-iDTRΔマウスを作製した。このCD11c-iDTRΔマウスではジフテリアトキシンを投与することで、CD11c^{+}細胞を除去できることが明らかになった。

本研究により、CD11c^{+}細胞を選択的に除去できるマウスモデルを作製した。今後、目的のDCサブセットのみを除去するマウスを作製できると考えられ、非常に意義のある研究成果である。よって本研究は学位に値するものと認める。