

学 位 論 文 題 名

マウス胸腺特異的にデキサメサゾン依存性に発現する
遺伝子の単離と発現の解析

学位論文内容の要旨

T細胞は骨髓に存在する多分化能を持つ幹細胞から分化する。骨髓を離れると幼若なT細胞前駆細胞は胸腺に移動する。そこで自己応答性のT細胞は胸腺で除去される。この胸腺内でおこる胸腺細胞の選択過程はアポトーシスであり、ネガティブ選択と呼ばれている。胸腺内にてネガティブ選択で除去される主な細胞集団は $CD4^{+}CD8^{+}$ 細胞である。以前からマウス生体を用いたネガティブ選択の実験系として抗CD3抗体、デキサメサゾンの投与あるいは放射線照射が行われてきた。 $CD4^{+}CD8^{+}$ 胸腺細胞のT細胞受容体を抗CD3抗体にて処理するとNur77とc-mycのmRNAおよび蛋白が増加する。p53ノックアウトマウスを用いた実験からマウスを放射線照射した場合、 $CD4^{+}CD8^{+}$ 胸腺細胞がp53分子を介してアポトーシスに陥ることが判明した。しかし、デキサメサゾン依存性の $CD4^{+}CD8^{+}$ 胸腺細胞のアポトーシスはp53ノックアウトマウスでも何ら障害を受けておらず、デキサメサゾン依存性の $CD4^{+}CD8^{+}$ 胸腺細胞のアポトーシスを実際に引き起こす鍵となる遺伝子は判明していない。生体にストレスが加わるとステロイドにより、胸腺が萎縮すること、さらにこれはアポトーシスによることが古くから知られていた。血中のステロイド値は様々な外的要因あるいは内的要因により変化する。さらに胸腺細胞のT細胞受容体依存性のアポトーシスがある一定の濃度のステロイド存在下で抑制されることが示された。したがって、生理的条件下の胸腺でのネガティブ選択を正しく理解するためにはステロイド依存性の胸腺細胞アポトーシス機構の解明が必要と考えた。そのため、私はデキサメサゾン依存性の $CD4^{+}CD8^{+}$ 胸腺細胞のアポトーシスを実際に引き起こす分子を単離することを目的に本研究を行った。

BALB/cマウスにデキサメサゾンを経口投与し、投与後1時間、2時間、3時間、4時間にマウスを安楽死させて胸腺を摘出した。コントロールの無処置マウスを含め、5種類の処置をしたマウスの胸腺を用いてLiangらが開発したDifferential Display法を行い、デキサメサゾン投与後の胸腺で強く誘導されるクローンを2つ単離した。2つのクローンの塩基配列を解析したところ129bpと132bpの同一の遺伝子であった。このため132bpsを含むクローンはDIG1を命名した。さらに、全長のDIG1cDNAを単離するためにBALB/cマウスにデキサメサゾンを経口投与後2時間目の胸腺からcDNAライブラリーを作製し、DIG1遺伝子断片が結合する3つのクローンを得た。これらの遺伝子の塩基配列を解析したところ、132bp断片を5'側にもつ2.1kbの遺伝子であった。また、この遺伝子は最近Choiらによって抗CD3処理したT細胞ハイブリドーマ細胞から単離された、TDAG8と命名されたcDNAと同一で蛋白翻訳領域が163アミノ酸からなるplatelet-activating factor(PAF)受容体と25%の相同性を持つ、7回膜貫通領域をもつG蛋白結合型の受容体であった。

マウス生体でのTDAG8遺伝子発現の解析よりデキサメサゾン投与前には心臓、胸腺にごく微量のTDAG8mRNAが存在した。このことは血中には微量の糖質コルチコイドが存在するのでそれらのステロイドがTDAG8遺伝子を誘導しているのかもしれない。デキサメサゾン投与後には胸腺のみでTDAG8のmRNAが強く誘導されたが、心臓ではほとんど誘導されなかった。リンパ節では非常に弱い発現誘導が認められた。一方、リンパ系以外の組織(腎臓、心臓、骨格筋、肝臓)にはこの遺伝子のmRNAの発現は確認されなかった。また、T細胞ハイブリドーマBD5-8細胞にアポトーシスを誘導するような刺激(デキサメサゾン、抗CD3抗体、放射線照射)にてTDAG8は発現誘導された。しかし、いずれの刺激でもアポトーシスを誘導しなかったCD4⁻CD8⁺の胸腺腫EL-4ではTDAG8は発現誘導されなかった。B細胞株WEHI-231にアポトーシスを誘導するような抗IgM抗体刺激を加えてもTDAG8は発現誘導されなかった。以上のノーザンブロット解析からTDAG8の発現はT細胞系に特異的であることがはっきりと示された。

mRNAの発現パターンから推測されるTDAG8遺伝子の生理的な意義は(i)胸腺細胞特異的なアポトーシスを誘導する分子、あるいは(ii)胸腺細胞特異的なアポトーシスを抑制しようと生体が発現する分子である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

マウス胸腺特異的にデキサメサゾン依存性に発現する 遺伝子の単離と発現の解析

T細胞は骨髓に存在する多分化能を持つ幹細胞から分化する。骨髓を離れると幼若なT細胞前駆細胞は胸腺に移動する。ここで自己反応性のT細胞はT細胞抗原受容体依存性の刺激により除去される。この胸腺細胞の選択過程はアポトーシスであり、ネガティブ選択と呼ばれている。このネガティブ選択で除去される主な細胞群はCD4陽性CD8陽性のダブルポジティブ胸腺細胞である。一方生体にストレスが加わるとステロイドにより、胸腺が萎縮すること、さらにこれはアポトーシスによることが古くから知られていた。血中のステロイド値は様々なストレスで変化し、かつ胸腺細胞のT細胞抗原受容体依存性のアポトーシスが、ある濃度のステロイドで抑制されることも知られている。T細胞抗原受容体依存性のアポトーシスにNur77やc-myc遺伝子産物が関与すること等その分子機序は一定の解明がなされているがステロイド依存性のアポトーシスの分子機序は不明である。したがって生理的条件下の胸腺でのネガティブ選択を理解するためにはステロイド依存性のアポトーシスに関与する遺伝子の単離と分子機序の解明が必須である。

BALB/C マウスにデキサメサゾンを腹腔内投与し、投与前及び後1時間から4時間でマウスを安楽死させて胸腺を摘出した。胸腺から得られたmRNAを用いてLiangらが開発したdifferential display法にて、デキサメサゾン投与後の胸腺に強く発現誘導される2つの遺伝子断片を単離した。2つのクローンの塩基配列を解析したところ129 base pair (bp) と132 bpの同一の遺伝子であった。これをDIG1と命名した。さらに全長のDIG1 cDNAを単離するためにBALB/C マウスにデキサメサゾンを腹腔内投与し、投与後2時間目の胸腺を用いてcDNAライブラリーを作成し、132 bpの遺伝子断片が結合するクローンをえた。132 bpの遺伝子断片を5'側に持つ2 kbの遺伝子であった。この遺伝子は最近Choiらにより抗CD3抗体処理したT細胞ハイブリドーマ細胞より単離されたTDRG8と命名された遺伝子と同一であった。DIG1 cDNAは蛋白翻訳領域が163アミノ酸からなり7回膜貫通G蛋白結合型受容体としての特徴を有していた。

正常状態においてマウス生体内ではDIG1 mRNAは胸腺、ひ臓にごく微量発現するのみであるがデキサメサゾン投与で胸腺で強く発現誘導された。しかしリンパ組織以外で

はデキサメサゾンの投与に関わらず発現は認められなかった。in vitroでアポトーシスを誘導する異なる刺激（デキサメサゾン、抗CD3抗体、放射線照射）を与えたが、ダブルポジティブ胸腺細胞由来BD5-8細胞では、いずれの刺激でもアポトーシスに陥り、DIG1mRNAの発現増強を認めた。CD4陰性CD8陽性胸腺腫由来EL-4細胞ではいずれの刺激でもアポトーシスに陥らずDIG1mRNAの発現増強は見られなかった。一方未熟B細胞株WEHI231細胞は抗IgM抗体刺激でアポトーシスに陥るがDIG1mRNAの発現は見られず、DIG1mRNAの発現はT細胞のアポトーシスに特異的であった。mRNAの発現パターンから推測されるDIG1遺伝子の機能は1) 胸腺細胞に特異的なアポトーシスを誘導する。あるいは2) 胸腺細胞に特異的なアポトーシスを抑制することである。

公開発表にあたって、副査の細川教授よりDIG1遺伝子の機能はなにか、EL-4細胞はもともとDIG1mRNAの発現が見られるが、これをどのように解釈するか、ネガティブ選択とデキサメサゾンの関係はどのようにになっているのか、さらに副査の小野江教授より、デキサメサゾンの血中濃度の変化により、胸腺でのポジティブおよびネガティブ選択が変化するという証拠があるか、マウスに投与するデキサメサゾンの量を変化させるとDIG1mRNAの発現のパターンが変化するか、細胞内領域にあるリン酸化可能部位は良く保存されているのか、主査の上出よりDIG1遺伝子が直接アポトーシスに関与することを証明するためにはどのような実験をする必要があるのか等の質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をなした。

さらに、今後このDIG1遺伝子の機能解析によりステロイド依存性のT細胞アポトーシスの分子機序が解明されることが期待される。

審査委員一同は、マウス胸腺特異的にデキサメサゾン依存性に発現する遺伝子の単離と発現の解析を行った本研究の成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。