

## 可変性リンパ球レセプターを発現する細胞集団の解析

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】免疫系はその進化の過程において常に病原体との激しい競争にさらされてきた。進化を通じて高い選択圧に曝されてきたために、免疫関連遺伝子の進化の速度は極めて早く、その防御戦略も極めて多様である。無顎脊椎動物ヤツメウナギで発見された可変性リンパ球レセプター (variable lymphocyte receptor; VLR) もそうした免疫系の多様性を示す分子の1つで、我々有顎脊椎動物の免疫系へと至る進化の歴史を解明する鍵となる分子である。VLR はこれまでに VLRA 及び VLRB の二種類が同定されていた。リンパ球様細胞において、これら 2 種類の VLR はゲノム再構成を行い、単一の遺伝子座からクローン選択的に多様な抗原レセプターを発現する。VLRA および VLRB は別々のリンパ球様細胞集団で発現し、VLRA は膜結合型、VLRB は分泌型のレセプターとして機能する。VLRA<sup>+</sup>及び VLRB<sup>+</sup>細胞集団の遺伝子発現プロファイルはそれぞれ哺乳類の T 細胞、B 細胞に似ており、脊椎動物の共通祖先の段階でリンパ球はすでに 2 つの細胞に分化していた可能性が示唆されている。Kasamatsu らは公開されているヤツメウナギの遺伝情報データベースを精査し、第 3 の VLR として VLRC を同定した。VLRC は VLRA 及び VLRB 同様にゲノム再構成を行い、それと匹敵するほどの多様性を生み出していた。この結果は VLRC が VLRA 及び VLRB と同様に抗原レセプターであることを示唆しているが、この分子を発現する細胞が他の VLR の陽性細胞から独立した細胞集団を構成するかについては不明であった。本研究では、VLR 特異的モノクローナル抗体を樹立して、1) T 細胞性及び B 細胞性 VLR 陽性細胞の組織分布及び 2) VLRC<sup>+</sup>細胞の分離を行った。

【材料と方法】カワヤツメ *Lethenteron japonicum* は北海道内の河川に遡上してきたものを業者より購入し実験に用いた。各組織から total RNA を抽出し、組織間における VLRA、VLRB 及び VLRC 発現を RT-PCR で比較した。VLRA 及び VLRB の C 末端側定常領域の配列からリコンビナントタンパクを作成し、それを抗原としてマウスを免疫後、モノクローナル抗体を樹立した。樹立した抗体を用いて、VLRA 及び VLRB 転写産物の発現が確認された組織に対する免疫組織化学を行い、各 VLR の組織発現を詳細に検討した。また、VLRC 細胞の分離のために、断尾採血して得た血液から遠心分離により赤血球などを除き、リンパ球様細胞を収集した。樹立した抗 VLRA 及び抗 VLRB モノクローナル抗体を利用し、リンパ球様細胞をセルソーターで VLRA<sup>+</sup>、VLRB<sup>+</sup>及び VLRA<sup>-</sup>VLRB<sup>-</sup>細胞集団に分離した。分離した細胞を 1 細胞ごとにゲノミック PCR で解析し、これらの細胞集団における VLRC 遺伝子座の再構成を調べた。また、VLRA、VLRB 及び VLRC の発現コンストラクトを培養細胞に導入して強制発現細胞を作成し、培養上清への VLR 分泌をウェスタンブロッティングで調べた。

【結果】RT-PCR による解析で、VLRA 及び VLRB と同様に、末梢リンパ球様細胞、エラ、腎臓、腸管における VLRC の遺伝子発現が確認された。樹立した VLRA 及び VLRB モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、これらの組織における VLRA 及び VLRB の分

布を観察すると、VLRB が細胞及び組織間の分泌物中に存在していたのに対して、VLRA は細胞上のみ存在していた。特にエラにおいて、VLRA は上皮中の細胞にも存在しており、他の組織で見られる VLRA<sup>+</sup>細胞とは異なり、その細胞の形態は不定形であった。VLRA 及び VLRB モノクローナル抗体を利用してリンパ球様細胞を VLRA<sup>+</sup>, VLRB<sup>+</sup>, VLRA<sup>-</sup>VLRB<sup>-</sup>に分離し、各集団の VLRC 遺伝子座の再構成を単一細胞からのゲノミック PCR で検討すると、VLRA<sup>+</sup>及び VLRB<sup>+</sup> 細胞からは VLRC の再構成は検出されず、VLRA<sup>-</sup>VLRB<sup>-</sup>細胞でのみ VLRC の再構成が検出された。強制発現細胞の培養上清を分析すると、VLRA 及び VLRC 導入細胞では上清への分泌が認められず、VLRB でのみ細胞外への分泌が検出された。

【考察】T 細胞に近い遺伝子発現プロファイルを持つ VLRA<sup>+</sup>細胞がエラ上皮において観察された事は、この組織と胸腺との進化的な類縁性を示唆する。胸腺は胚発生期に第三鰓弓から分化してくる組織であり、哺乳類胸腺で発生段階に発現する複数の遺伝子のオーソログが、ヤツメウナギのエラでも発現していることがすでに示されている。また、VLRA<sup>-</sup>VLRB<sup>-</sup>細胞集団においてのみ VLRC の遺伝子再構成が検出されたことは、VLRC を発現するリンパ球様細胞が他の VLR 陽性細胞から独立した単独の細胞集団を形成することを示唆する。強制発現細胞の培養上清の解析や、ヤツメウナギ血清の分析及び、過去に行われた分子系統学的な解析は VLRC が VLRA に似た膜結合性の抗原レセプターであることを示唆している。このようなことから、1つの B 細胞及び2つの T 細胞という構成が、脊椎動物の共通祖先の段階ですでに確立していた可能性がある。有顎脊椎動物と無顎脊椎動物の免疫系の進化の過程には、2 度の全ゲノム重複関わったと考えられている。これらの脊椎動物で再構成を行うレセプターが独自に進化した背景には、こうした全ゲノム重複と、有顎脊椎動物の出現期における組み換え酵素 RAG の挿入などの現象が関与していると考えられる。

【結論】今回得られた知見は有顎脊椎動物の出現時に起こった爆発的な免疫系の進化が起きるより以前に、2つの T 細胞と B 細胞が分化していたことを示唆し、このような細胞の出現が急激な進化の前段階としてすでに起きていたことを明らかにした。この結果は、有顎脊椎動物で高度に進化した獲得免疫系の起源を探る研究の今後の進展に貢献することだろう。また、高い特異性を持つ抗体様分子としての VLR の特性は、抗体に変わる試薬の開発という医療応用的な分野においても大きな潜在的価値を秘めている。抗体に変わる試薬の開発は病理学や臨床検査の領域においてニーズが高く、こうした応用的な方面への研究も急がれるべきであろう。

# 学位論文審査の要旨

主査	准教授	松本美佐子
副査	教授	笠原正典
副査	教授	畠山鎮次
副査	教授	瀬谷司
副査	教授	西村孝司

## 学位論文題名

### 可変性リンパ球レセプターを発現する細胞集団の解析

可変性リンパ球レセプターVariable lymphocyte receptor (VLR)はヤツメウナギをはじめとする円口類の抗原レセプターであり、従来 VLRA、VLRB の二つのレセプターの存在が知られていた。本研究において発表者は、新たに発見された第3のVLR (VLRC)を発現するリンパ球様細胞の同定を、既知のVLRA及びVLRBに対する特異抗体を樹立することによって試みた。

発表者の樹立した抗VLRAモノクローナル抗体及び抗VLRBモノクローナル抗体は、各VLRを発現した培養細胞に対するフローサイトメトリー及びウェスタンブロット解析において、優れた特異性を示した。樹立した抗体を用いて行われた免疫組織化学法によるヤツメウナギ組織の解析では、特に鰓部において、T細胞性の性質を持つとされるVLRA陽性細胞が上皮組織中に特徴的な分布を示すことが提示された。発表者はまた、樹立した抗体によりヤツメウナギリンパ球様細胞をVLRA陽性、VLRB陽性、共陰性の3群に分離し、各群におけるVLRC遺伝子座の遺伝子再構成を単一細胞からのゲノミックPCRによって調べた。結果、原則的にVLRA及びVLRB遺伝子座の遺伝子再構成が行われていない細胞においてのみ、VLRC遺伝子座における遺伝子再構成が認められることを明らかにした。これらの結果から発表者はVLRCを発現するリンパ球様細胞は、VLRAまたはVLRBを発現するリンパ球様細胞とは異なる新たな細胞集団を構成していると結論し、VLRCとVLRAのアミノ酸配列の相似性や共組み替えが観察された点、共にレセプターの細胞外分泌が確認されなかった結果を考慮すると、VLRC陽性細胞はVLRA陽性細胞と同様にT細胞様の性質を持つ細胞であろうと考察した。発表者は、研究の今後の展開のため、より親和性の高い抗VLRC抗体が必要と指摘した。また、VLRの医療分野への応用、特に抗体代替試薬としての可能性について言及し、既存抗体との比較を通じて、その有効性や信頼性を検討する必要があると述べた。

発表終了後、副査の畠山教授から、樹立した特異抗体によるリンパ球様細胞の刺激実験が可能であるかを問われ、発表者はその返答として、ヤツメウナギでは細胞培養を行う最適な条件が判明しておらず、培養下での実験が総じて難しいこと、過去に一度試みたことはあったが明確な結果は得られていないことを述べた。瀬谷教授から、医療分野への応用のために、抗体医薬のように分子のヒト化や小型化により体内への投与が可能になるかとの

質問を受け、発表者は、VLR は人体に存在しない物質であり、人体から異物として認識される可能性が高い上、これ以上の小型化は難しく投与用の薬品としての開発は難しい旨を返答した。西村教授からは、哺乳類培養細胞を使った VLR シグナル伝達系の再構成実験の可能性を提示され、発表者は、今後、VLR のシグナルを細胞内に伝達する因子などが明らかになってくれば、そうした実験も可能になると返答した。笠原教授は同じ T 細胞様の細胞であると発表者が考察した VLRA 及び VLRC 陽性細胞の、ヤツメウナギ免疫系内での機能分担について質問した。発表者は、哺乳類でも T 細胞には  $\alpha\beta$  型及び  $\gamma\delta$  型の 2 種類が存在するため、同様の機能分担がある可能性を指摘した上、レセプターの構造上の違いから、認識する抗原の種類に違いがあるかもしれないと述べた。主査の松本准教授からは自然免疫系と獲得免疫系の中間的な性質を示すヤツメウナギ免疫系の免疫記憶は、哺乳類の自然免疫系で一般に言われるように、次世代の個体に遺伝的に伝わりうるのかとの質問を受け、発表者は、VLR 遺伝子座の組み換えはリンパ球様細胞に限定して発生し、生殖系列では起きないため、免疫記憶が次世代に伝わる事はないと返答した。

この論文は、原始的な脊椎動物であるヤツメウナギにおいて新たなリンパ球様細胞のサブセットの存在を証明し、免疫系の進化を理解する上で重要な新知見を提供した点が高く評価されるとともに、VLR の今後の医療応用への可能性に道筋を示した点についても評価された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院博士課程における研鑽や取得単位も併せ、申請者が博士（医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと判定した。