

氏名(本籍)	と こ ろ 野 老 やよい (千 葉 県)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 2960 号
学位授与年月日	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Molecular cloning and characterization of mouse Tspan-3, a novel member of the tetraspanin superfamily, expressed on resting dendritic cells (レストイング樹状細胞に発現している新規 4 回膜貫通型分子, マウス Tspan-3 の単離とその機能解析)
主 査	筑波大学教授 医学博士 住 田 孝 之
副 査	筑波大学助教授 博士(医学) 今 門 純 久
副 査	筑波大学助教授 医学博士 須 磨 崎 亮

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

抗原提示細胞 (APC) は T 細胞を介した免疫応答の中心的役割を担っている。APC と T 細胞の相互作用においてその第一のシグナルは抗原特異的 T 細胞受容体が APC に提示されている MHC と抗原ペプチドとの複合体を認識することにより始まる。また T 細胞の活性化には第二のシグナルも必要で、これは APC と T 細胞のクラスターに存在するいくつもの接着分子、もしくは副刺激分子として知られている分子によってもたらされる。免疫樹状細胞は APC の中でも最も抗原提示能力が高く、そして重要な働きとして抗原未暴露なナイーブ T 細胞を活性化する働きや、メモリー T 細胞を誘導する働きなどが知られている。この樹状細胞も、未熟なものは抗原提示能力を保持してはならず、活性化し、成熟型となって、初めて高い抗原提示能力を示すようになる。樹状細胞の成熟過程には、発現した分子の再編成、たとえばエンドサイトーシスや貧食に関わる分子の発現低下や MHC クラス II 及び T 細胞のプライミング (ナイーブ T 細胞の活性化) に必要な CD40, CD58, CD80, CD86 などの副刺激分子の発現の上昇を伴う。しかしながら樹状細胞の T 細胞をプライミングする分子機構は十分明らかにされていない。そこで、本研究では、T 細胞をプライミングする事の出来る分子を明らかにする事を目的とした。

(対象と方法)

- 1) Representational difference analysis, RDA: C57BL/6 マウスの脾臓細胞よりナイコデンツを用いた比重遠心法により樹状細胞を濃縮した。この濃縮液に含まれる樹状細胞を更にマウス樹状細胞マーカーである CD11cPE 標識抗体によって標識し、フローサイトメーターによって高い純度の分画を行った。分画化してきた樹状細胞は未熟樹状細胞とし、そこから未熟樹状細胞の cDNA を作成した。また、分画化を行った樹状細胞に抗 CD40 抗体を作用させることで成熟樹状細胞を誘導し、この細胞群からは成熟樹状細胞の cDNA の合成をおこなった。抗体による刺激の前後の細胞から調整した cDNA を用いて RDA を試みた。
- 2) 融合タンパク: pMX-FL レトロウイルスベクターでマウス Tspan-3/GFP の融合タンパクの作成を行った。この融合タンパクを一過性に 293 T 細胞発現させ、レーザー顕微鏡下にて観察した。また、ウイルスを用いてマクロファージの細胞株, J774.1 にも発現させ、機能解析を試みた。

- 3) RT-PCR: マウス組織、及び血球系の細胞における発現を RT-PCR にて観察した。各組織、細胞における発現は HPRT もしくは GAPDH の発現強度を目安として定量化した cDNA サンプルを使用して行った。
- 4) 増殖実験: CD8T 細胞を MACS を用いて Balb/c マウスの脾臓より純化し、C57BL/6 マウス脾臓より樹状細胞を分画化したものと共培養を行い、BrdU の取り込みにより CD8T 細胞の増殖を ELISA 法にて検出した。

(結果)

- 1) フローサイトメーターを用いて分画化してきた樹状細胞は細胞増殖実験の結果より、高い抗原提示能を有する樹状細胞であることがわかった。
- 2) 未熟樹状細胞と成熟樹状細胞による RDA の結果、4 回膜貫通型の細胞膜上に発現する新規の分子を同定した。これはヒトの Tspan-3 と 91% の相同性があり相同遺伝子と考えられた。
- 3) RT-PCR の結果より、単離した遺伝子 Tspan-3 は様々な組織で広く発現が観察される分子であった。
- 4) RT-PCR による判定量の結果、Tspan-3 は、活性化免疫樹状細胞上において発現が低下していた。さらに、マクロファージ細胞株の J774.1 に GFP との融合タンパクを遺伝子導入した実験においても、活性化すると発現が低下することが判明した。

(考察)

マウス Tspan-3 が抗原提示細胞上において発現しており、活性化に伴い、その分子の発現の低下が樹状細胞においてもマクロファージにおいても観察されたことから、免疫系が活性化されるステップの初期になんらかの役割を担う分子である可能性があると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、樹状細胞上の T 細胞をプライミングに関わる分子を明らかにする事を目的とした研究である。結果として、新規 4 回膜貫通型分子、Tspan-3 を単離した。この分子は、活性化樹状細胞でその発現が低下していたため、樹状細胞の成熟過程、T 細胞の活性化過程において重要な役割を担っている可能性が示唆された。本研究の成果はすでに国際雑誌に報告され、高い評価を得ている。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。