

平成 21 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790369
 研究課題名(和文)：細胞傷害性T細胞を欠損する野生由来近交系マウスを用いたT細胞分化決定因子の探索
 研究課題名(英文)：A search for the determination factors for T-cell development using cytotoxic T-cell deficient wild-derived mouse strain
 研究代表者
 北浦 靖之 (KITAURA YASUYUKI)
 独立行政法人理化学研究所・実験動物開発室・研究員
 研究者番号：90442954

研究成果の概要：RIKEN BRCにて収集・保存しているマウス系統の品質・特性検査の一つとしてリンパ球表面抗原の発現をFACSにより解析し、免疫学的特性プロファイルの作製を行っている過程で日本産野生マウス由来の近交系KOR5においてCD8T細胞の分化が特異的に阻害され、欠損状態にあることを発見した。本研究ではKOR5を用いてCD8T細胞への分化決定分子を探索することを目的として、原因遺伝子マッピングを行った。KOR5と標準近交系C57BL/6Jとの交配によりF1マウスを作製し、末梢血に存在する全T細胞中のCD8⁺T細胞の割合を調べたところ、B6では高い値(Ave=32.5%, N=8)を示し、KOR5ではほとんど検出されず(Ave=4.5%, N=8)、F1マウスではほぼ中間の値(Ave=14.2%, N=24)を示した。さらにF1マウス同士を交配し、得られたF2マウスより末梢血におけるCD8⁺T細胞の割合を調べると同時に、マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型を調べ、連鎖地図を作製しMap Manager QTX b20を用いてquantitative trait locus (QTL)解析を行った。CD8⁺T細胞の割合をQTとしてQTL解析を行った結果、有意な値(likelihood ratio statistic (LRS)>16.2, P=0.05)を示す領域が第11染色体のD11Mit99～D11Mit214の領域と第17染色体のD17Mit28～D17Mit9の領域に存在することが示唆された。KOR5は他に例のない極めて独自性の高いマウスモデルであり、その原因遺伝子の同定はT細胞分化制御の研究において大きな発見であることが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	2,000,000	0	2,000,000
平成20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、免疫学

キーワード：T細胞、CD8、野生マウス、QTL

1. 研究開始当初の背景
 哺乳類において外界からの病原微生物の侵入に対し、感染防御機構の主役となるT細胞

は骨髄造血幹細胞に由来し、胸腺内で分化して全身でその機能を発揮する。末梢血中には主に2種類のT細胞、CD4分子を発現するへ

ルパーT (CD4T) 細胞と CD8 分子を発現する細胞傷害性 T (CD8T) 細胞が存在する。最終的には主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex: MHC) クラス I に特異的なクローンは CD8T 細胞に、MHC クラス II に特異的なクローンは CD4T 細胞へと分化するが、分化決定の詳細な分子機構については未だ不明である。近年、CD4T 細胞を全く持たない突然変異マウス (ヘルパー欠損 (HD) マウス) が見つかって話題となったが、2005 年にその原因遺伝子が転写因子 *Th-POK* の点突然変異であることが解明され、CD4T/CD8T 系列への分化決定のマスター遺伝子の一つとして話題となった (Nature 433, 826-833, 2005)。しかしながら CD8T への分化決定に関してこれに匹敵する分子は未だ発見されていない (図 1)。

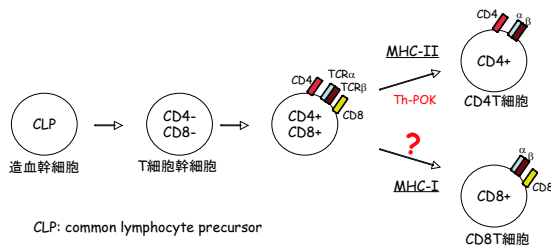


図 1. T細胞の分化

T 細胞幹細胞 (CD4-CD8-) は骨髄に存在する造血幹細胞 (CLP) から由来し、胸腺内で CD4CD8 ダブルポジティブ (CD4+CD8+) と呼ばれる細胞に分化する。この間に T 細胞受容体 (TCR α , β) が発現し、MHC クラス拘束性によって CD4 か CD8 のどちらかの発現を失い、成熟 T 細胞である CD4T 細胞あるいは CD8T 細胞となって胸腺から末梢に出て行く。

2. 研究の目的

RIKEN BRC はマウスリソース中核機関として国内で開発・育成されたマウス系統を中心に収集・保存を行っている。マウス系統の保存にあたっては品質・特性検査を行っているが、その一つとしてリンパ球表面抗原の発現を Flow Cytometry により解析し、免疫欠損マウスなどの免疫学的特性プロファイルの作製を行っている。その過程で日本産野生マウス由来の近交系 KOR5 において CD8T 細胞の分化が特異的に阻害され、欠損状態にあることを発見した ()。細胞傷害性 T 細胞はウイルスや細菌の感染から生体を防御する為の細胞性免疫の主役であり、起源となった野生マウスにこの形質があったとは考えにくく、近交系 KOR5 の育成過程で生じた自然突然変異に由来する可能性が予想される。そこで本研究では日本産野生マウス由来の近交系 KOR5 を用いて CD8T 細胞への分化決定分子を探索することを目的として、原因遺伝子マッピングを行った。KOR5 は他に例のない極めて独自の高いマウスモデルであり、T 細胞分化制

御の研究において大きな発見が期待される。また、KOR5 での CD8T 細胞欠損という発見は、感染実験における CD8T 細胞の役割を解明する場合など、KOR5 を CD8T 細胞の機能解析のための優れたモデルマウスとして確立させ、免疫学の研究に貢献できると期待できる。

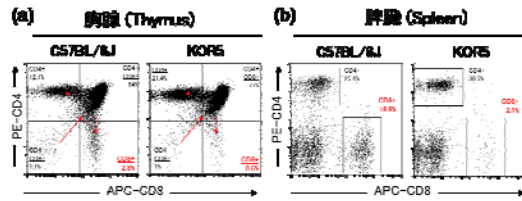


図 2. KOR5 における CD8T 細胞の欠損

胸腺 (a) においてそのほとんどの細胞が CD4CD8 ダブルポジティブ (CD4+CD8+) であり、そこから CD4 もしくは CD8 T 細胞へ分化するが、C57BL/6J と比較して、KOR5 では CD4CD8 ダブルポジティブ (CD4+CD8+) から CD8 T 細胞への分化が著しく阻害されていることが分かる。その結果、KOR5 では末梢の組織である脾臓 (b) において CD8 T 細胞の割合が著しく減少することが考えられる。

3. 研究の方法

CD8T 細胞欠損の原因遺伝子を解明するために、KOR5 と標準近交系 C57BL/6J との交配により F1 マウスを作製し、CD8⁺ T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより調べ、3 系統間で比較した。さらに F1 マウス同士を交配し、F2 マウスを作成した。各個体より血液を採取し、末梢血リンパ球の調製とゲノム DNA の抽出を行い、FACS 解析による CD8 T 細胞の割合を調べると同時に全染色体を網羅するマイクロサテライト (MIT) マーカーのタイピングを行い、連鎖地図を作成し、原因遺伝子の存在する染色体を調べた。さらに、Map Manager QTX b20 を用いて quantitative trait locus (QTL) 解析を行い、原因遺伝子の存在する染色体上の領域を調べた。

4. 研究成果

KOR5 と標準近交系 C57BL/6J との交配により F1 マウスを作製し、CD8⁺ T 細胞の割合を調べたところ、B6 では高い値 (Ave=32.5%, N=8) を示し、KOR5 ではほとんど検出されず (Ave=4.5%, N=8)、F1 マウスではほぼ中間の値 (Ave=14.2%, N=24) を示した (図 3)。さらに F1 マウス同士を交配し、得られた F2 マウスより末梢血における CD8⁺ T 細胞の割合を調べると同時に、マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型を調べ、連鎖地図を作成し Map Manager QTX b20 を用いて quantitative trait locus (QTL) 解析を行った。その結果、有意な値 (likelihood ratio statistic

(LRS)>16.2, P=0.05) を示す領域が第 11 染色体のD11Mit99～D11Mit214の領域と第17染色体のD17Mit28～D17Mit9 の領域に存在することが明らかとなった。その結果、CD8T細胞欠損原因遺伝子が少なくとも2ヶ所の領域に存在することが示唆された(図4)。今後、個体数を増やし、より詳細なQTL解析を行うとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現解析などを行い、その結果との相関を調べ、原因遺伝子の同定を試みる必要がある。

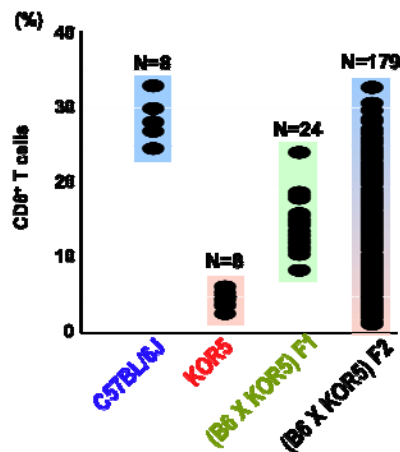


図3. CD8⁺T細胞の割合

CD8T細胞の割合はB6では高い値(Ave=32.5%, N=8)を示し、KOR5ではほとんど検出されず(Ave=4.5%, N=8)、F1マウスではほぼ中間の値(Ave=14.2%, N=24)を示した。

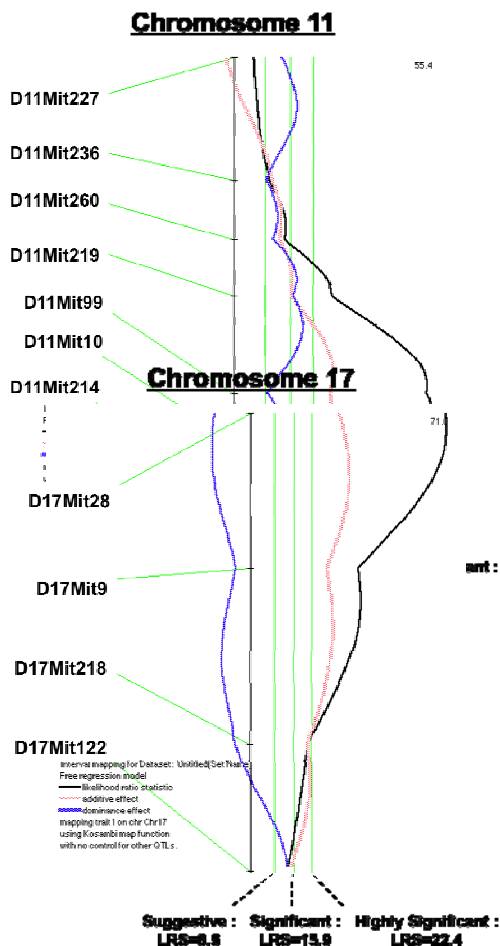


図4. F2マウスにおけるQTL解析

第11番染色体D11Mit9付近(LRS=54.1)、および第17番染色体D17Mit28付近(LRS=70.6)で有意な値をしめし、原因遺伝子が少なくとも2ヶ所の領域に存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Atsushi YOSHIKI, Fumio IKE, Kazuyuki MEKADA, Yasuyuki KITAURA, Hatsumi NAKATA, Noriko HIRAIWA, Keiji MOCHIDA, Maiko IJUIN, Masayo KADOTA, Ayumi MURAKAMI, Atsuo OGURA, Kuniya ABE, Kazuo MORIWAKI and Yuichi OBATA: The Mouse Resources at the RIKEN BioResource Center. *Experimental Animals*, 58(2), 85-90 (2009) 査読あり

② Yasuyuki KITAURA, Yoshibumi MATSUSHIMA, Hatsumi NAKATA, Kazuyuki MEKADA, Masayo KADOTA, Ayumi MURAKAMI and Atsushi YOSHIKI: Cytotoxic T cells-deficient mouse: KOR5 from Japanese wild mice (*Mus musculus molossinus*). *Experimental Animals*, 56(3) Supplement, S89 (2007) 査読あり

[学会発表] (計5件)

① 北浦 靖之、松島芳文、中田初美、目加田和之、門田雅世、村上亜弓、吉木淳：細胞傷害性T細胞を欠損する野生由来近交系マウスKOR5について、第54回日本実験動物学会総会、平成19年5月23日、東京

② 北浦 靖之：郡山産モロシヌス由来近交系マウスにおけるCD8T細胞の欠損、第21回モロシヌス研究会、平成19年6月30日、洲

本（兵庫県）

③ Yasuyuki KITAURA, Kazuyuki MEKADA, Hatsumi NAKATA, Yoshibumi MATSUSHIMA, Mei-Ling JAN, Toshihiko SHIROISHI, Kazuo MORIWAKI, Yuichi OBATA and Atsushi YOSHIKI: : IMMUNOLOGICAL PROFILING OF LABORATORY INBRED AND WILD-DERIVED MOUSE STRAINS DEVELOPED IN JAPAN , 21st International Mammalian Genome Conference, 平成 19 年 10 月 31 日（京都）

④ Yasuyuki KITAURA, Yoshibumi MATSUSHIMA and Atsushi YOSHIKI : Impaired CD8⁺ T cell development in Japanese wild-derived mouse, KOR5、第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 平成 19 年 11 月 22 日, 東京

⑤ 北浦 靖之、Mei-Ling JAN、松島芳文、村上垂弓、小島怜子、吉木淳：日本産野生マウス由来 KOR5 における CD8⁺ T 細胞欠損性の QTL 解析、第 55 回日本実験動物学会総会, 平成 20 年 5 月 16 日, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北浦 靖之 (KITAURA YASUYUKI)

独立行政法人理化学研究所・実験動物開発室・研究員

研究者番号：90442954