

論文審査の結果の要旨

氏名 崔 秉日

本論文は序論、材料と方法、結果、結論、謝辞、及び参考文献より構成され、ケモカインレセプターの1つであるCXCR4のコンディショナルノックアウトマウスの作製と機能解析について述べられている。

ケモカインは炎症組織、傷害部位へ各種白血球が走化性遊走を行う際に中心的な役割を果たす因子であるが、遊走能以外にもリンパ球の分化増殖や、組織形成にも関与することが示唆されている。これらのケモカインは7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体に結合して細胞内にシグナルを入れることが明らかになっている。これまでに、CXCR4及びそのリガンドであるSDF-1の完全欠損変異マウスが作製され、心室中隔欠損、小脳の発生異常、胃腸での血管形成不良、胎児肝及び骨髄での造血異常などが報告されている。しかし、ホモ欠損マウスは出産前後に死亡する為に成体におけるこの分子の機能は今だ不明である。CXCR4遺伝子はTリンパ球で高い発現がみられ、その分化段階においても厳密な発現調節が行われている。また、HIV-1がTリンパ球に感染する際にCXCR4がコレセプターとして利用されることから、Tリンパ球におけるCXCR4遺伝子の機能解析は重要且つ興味深い問題である。ここで論文提出者はノックアウトマウスの致死性を回避するために、Cre/loxPシステムを利用した部位特異的、時期特異的なCXCR4遺伝子のノックアウトを試み、成体での機能を解析した。

CXCR4遺伝子のエクソン2とselective markerであるネオマイシン抵抗性遺伝子をloxP配列で挿んだコンストラクトを作製し、ES細胞に形質転換し、G418存在下で培養し、5つのhomologous recombinantsを得た。Aggregation法を用いてキメラマウスを作製し、野生株マウスとの交配でヘテロノックインマウス(flox/w)を得た。さらに、ヘテロノックインマウスの兄妹交配からホモノックインマウス(flox/flox)を得た。そこで、T細胞特異的にCXCR4遺伝子を欠損させる為に、lckプロモーターの制御下にcreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスとCXCR4ノックインマウスとの掛け合わせを行った。その子孫マウスを調べ

たところ、T細胞特異的に CXCR4 遺伝子がほぼ 100%欠失し、CXCR4 の遺伝子発現がなくなっていることがわかった。これらのマウスにおいて T細胞の分化に異常があるかどうかを調べる為に種々の Tリンパ球の分化マーカーを用いた FACSscan 解析を行った結果、胸線細胞や抹消 Tリンパ球は正常であることがわかった。しかし、胸線、リンパ節の細胞数が野生株マウスの 60%程度に減少していることが分かった。また、脾臓細胞の数は減少していなかったが、T細胞が占める割合は野生株マウスの 60%程度に減少していた。その原因を知るために、Annexin-V と PI を用いて胸線細胞を染色し FACSscan で解析したところ、アポトーシス細胞が増加していることがわかった。また、TUNEL法を用いた胸線組織切片の染色でもアポトーシス細胞の増加が確認できた。次に、抹消 T細胞の減少の原因を調べるために BrdU を含む水をマウスに与えた後、リンパ節 T細胞での BrdU 陽性細胞の割合を調べたところ、野生株マウスよりノックアウトマウスでの割合が 2 倍程高くなっていることが分かった。また、6 日間 BrdU を含む水を与えた後、BrdU を含まない水に換え BrdU 陽性細胞の減少を調べたところ、ノックアウトマウスでの減少が野生株マウスより早くなっていることがわかった。したがって、CXCR4 ノックアウトマウスでみられる抹消 T細胞の減少はリンパ節 T細胞の turnover の亢進によるものであることが明らかになった。

以上、本研究により、CXCR4 からのシグナルが T細胞生存に重要な役割を果たしていることが初めて明らかになった。また、HIV 感染後 Tリンパ球で CXCR4 の発現抑制が見られることから、AIDS における末梢 T細胞の減少のメカニズムについて新しい説明を与えた。この様に本研究は免疫学、ウイルス学分野に大きく貢献するものである。

なお、本論文においてマウス作製は安田二郎・浅野雅秀・須藤カツ子・岩倉洋一郎との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断した。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。