

論文の内容の要旨

論文題目: Mouse epiglycanin / Muc21: a novel transmembrane mucin expressed by thymic epithelial cells

(マウスエピグリカニン/Muc21: 胸腺上皮細胞が発現する新奇膜貫通型ムチン)

氏名: イシイシュラーデ カトリン ベアーテ

背景と目的

ムチンは糖含有率の高い糖タンパク質であり、糖鎖のほとんどは O-結合型である。ムチンは主に上皮細胞の管腔側に発現され、その機能は粘膜上皮を寄生体や物理的刺激からの保護であるとされる。ムチンには分泌型と膜貫通型の2種類が存在する。これまでにムチンのポリペプチド部分として 20 種類の遺伝子が知られており、発見された順に MUC1-20 (マウスでは Muc1-20) と呼ばれる。最近当研究室では、マウス乳癌細胞表面分子として知られていた「エピグリカニン」のポリペプチド部分の遺伝子を見出し、21 番目のムチンであることを明らかにした。エピグリカニンを発現している TA3-Ha 細胞は同系の A/J のマウスだけではなく、異系のマウスやラット、ハムスターの体内でも増殖するが、エピグリカニンを発現していないバリエーションである TA3-St 細胞は A/J のマウス体内でのみ増殖した。その原因としてエピグリカニンが巨大で負に荷電しているため、細胞表面の MHC 分子を隠して T-リンパ球による認識を妨げるためであるとの説や、エピグリカニン自身が T-リンパ球に直接作用して免疫抑制効果を持つとの説があったが、遺伝子が同定できなかったために検証できなかった。エピグリカニンの免疫系における機能を解明する一環として、まず正常組織と細胞におけるこの分子の分布を詳細に明らかにする必要があると考えた。

本研究の目的は、Muc21 についてマウス組織における分布の差異と組織内の細胞種による発現の差異を明らかにすることである。本論文は三つの章よりなる。第一章ではマウス Muc21 のオリゴペプチド部分に特異的なポリクローナル抗体の作成について述べる。第二章ではこれら及び mRNA 解析を用いた Muc21 の組織分布と、胸腺について発現細胞を同定した結果を述べる。第三章では自己免疫疾患マウスの胸腺において Muc21 の mRNA とポリペプチド部分の発現の変化を追求した結果を述べる。

第1章: マウス Muc21 のポリペプチド部分に特異的なポリクローナル抗体の作成

付加された糖に依存しない
で Muc21 を認識する抗体を作製するために、糖が付加しない部分を選んでオリゴペプチドを合成し、HPLC により精製し、MALDI-TOF 質量分析器によって確認し、キャリアタンパク質である KLH と結合させてウサギの皮下に注入した。すべてのペプチドが免疫応答を誘導したが、Muc21 特異的な応答が見られたのは2種のペプチドのみすなわち peptide 4: HTGTPVMEVKPSGSLK[C]と Cyt 4:[C]SWRRPRTFNVVEMTR であった。

抗 peptide 4 抗体の特異性は TA3-St 細胞、TA3-Ha 細胞、CHO-Mock 細胞を用いたフローサイトメトリーにより明確に示された (図 1-1)。即ち、この抗体は TA3-St 細胞及び CHO-Mock 細胞には結合せず、TA3-Ha 細胞及び CHO-Muc21 細胞には結合した。結合は抗体を peptide 4 と混合しておくで見られなくなったが、無関係なペプチドによっては阻害され

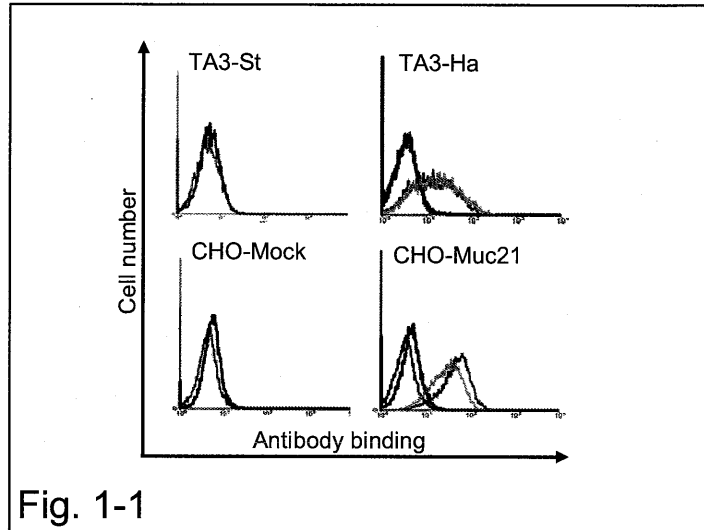


Fig. 1-1

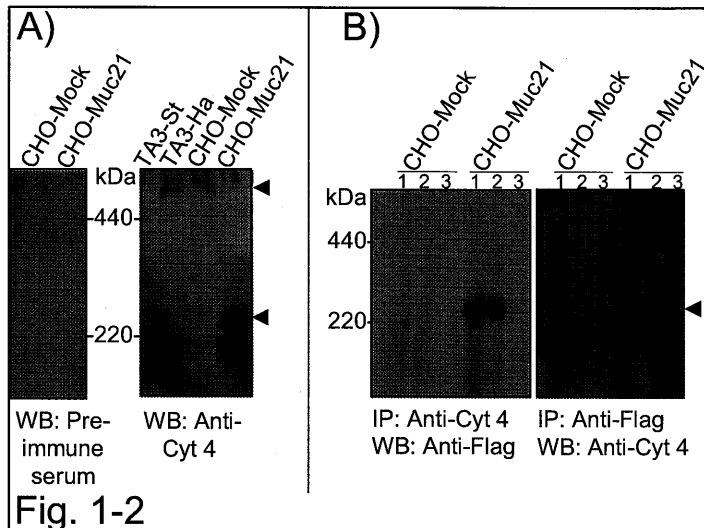


Fig. 1-2

なかった。抗 Cyt 4 抗体の特異性は、これらの細胞を用いたウエスタンブロッティング及び免疫沈降とウエスタンブロッティングの組み合わせによって示された(図 1-2)。抗 Cyt 4 抗血清は TA3-Ha 細胞及び CHO-Muc21 細胞において高分子量のバンドを示したが、CHO-Mock 細胞と TA3-St 細胞では見られなかった。従って、二つの Muc21 に特異的な抗体が産生されたことが示された。

第2章: Muc21 mRNA 及びポリペプチドの正常個体における分布

BALB/c (メス) C57BL/6 (オス) マウスの組織由来の cDNA 及び特異的なプライマーを用いて、mRNA 発現の組織による違いを PCR によって比較した。BALB/c マウスにおいて Muc21 mRNA は胸腺、食道、気管、子宮頸、膈、及び胃にプライマー 1 を用いて検出された (図 2-1A)。C57BL/6 マ

ウスにおいて、Muc21 mRNA は胸腺、食道、気管、胆嚢、大脳、及び精巣にプライマー 1 を用いて検出された。胆嚢以外はプライマー-2を用いても検出された(図 2-1B)。すなわち、胸腺、食道、及び気管では mRNA が再現性よく検出された。Muc21ポリペプチドの分布状態を検証するために BALB/c マウスの組織の凍結切片を抗 peptide 4 抗体で染色した。抗体結合は子宮頸、膈、食道、気管、胸腺、及び胃と食道の移行部の食道側に見られた(図 2-2A)。これらの結果は、mRNA 発現の結果と相関していた。胸腺では抗 peptide 4 抗体によって染色される部位は未成熟胸腺髄質上皮細胞(mTECs)のマーカーである抗 MTS10 モノクローナル抗体の染色部位と局在がほとんど一致した。染色部位は抗 Ep-CAM モノクローナル抗体、*Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1)、及び抗 MHC class II モノクローナル抗体(すべて成熟 mTECs のマーカー)と共局在する部分もあった。抗 ER-TR7 及び抗 CD11c モノクローナル抗体との共局在は見られず、Muc21 は繊維芽細胞または樹状細胞には発現しないことがわかった(図 2-3A)。胸腺の断片を酵素消化して得た細胞から、CD45 陰性(上皮細胞)と CD45 陽性(骨髄系細胞)とをセルソーターによって分画し、それぞれか

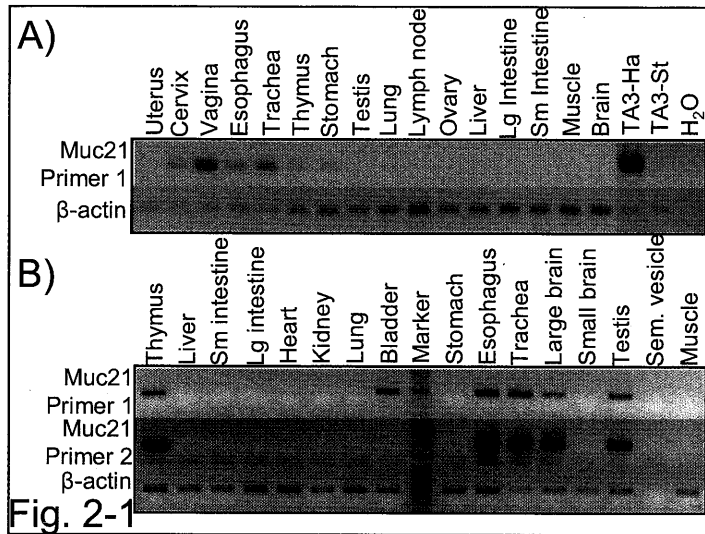


Fig. 2-1

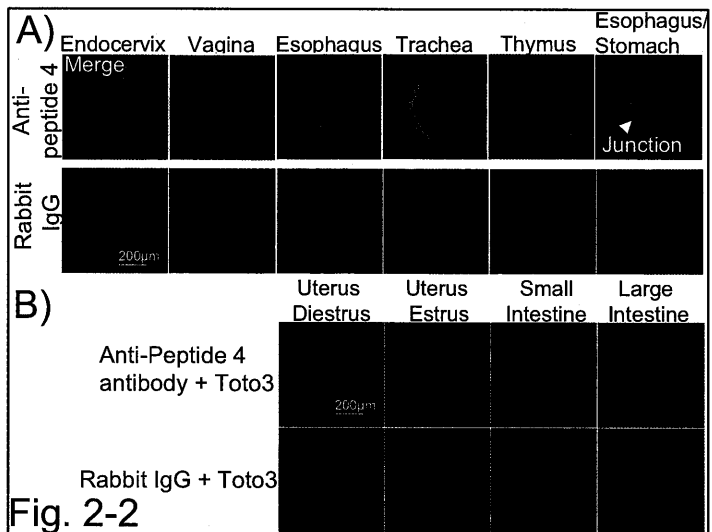


Fig. 2-2

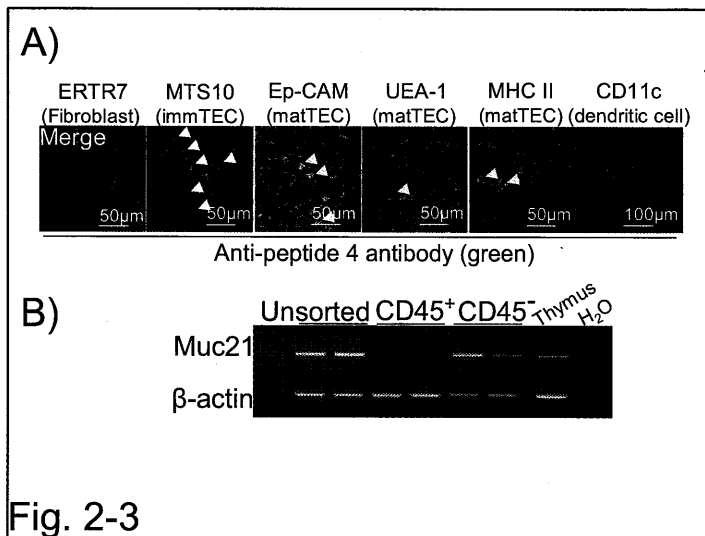


Fig. 2-3

ら得た mRNA を RT-PCR によって解析したところ Muc21 は上皮細胞のみに検出された(図 2-3B)。以上より、Muc21 の mRNA とオリゴペプチドは胸腺上皮を含む限られた種類の組織に発現することが明らかとなった。胸腺においては Muc21 は皮質上皮よりも髄質上皮に検出され、未成熟 mTECs の亜集団に発現することが明らかとなった。

第3章: 自己免疫疾患発症マウスにおける Muc21 mRNA

胸腺上皮に発現する Muc21 が機能を持つかどうか究明する一環として、自己免疫疾患を発症した *Aire*^{-/-}、*NIK*^{aly/aly}、及び *TRAF6*^{-/-} さらにそれらの正常対照マウスの胸腺における Muc21 mRNA 及び抗 peptide 4 抗体の結合性を検証した。*Aire*^{-/-} マウスは組織特異的抗原 (tissue-specific antigen: TSA) の発現を欠くが正常な TECs を持つ。*NIK*^{aly/aly} と

TRAF6^{-/-} はいずれも TSA を欠くと共に TECs のオーガニゼーションが乱れており、TECs の数も少ない。もし、Muc21 の発現レベルが *Aire*^{-/-} マウスの胸腺において劇的に減少しているとする、この分子は胸腺機能を制御すると言うよりは、T-リンパ球に提示されて自己寛容を誘導するために mTECs に発現していたと考えられる。半定量リアルタイム PCR 及び抗 peptide 4 抗体染色の結果から、

Aire^{-/-} マウスにおける Muc21 の発現は、若干減少したにすぎなかった(図 3-1)。

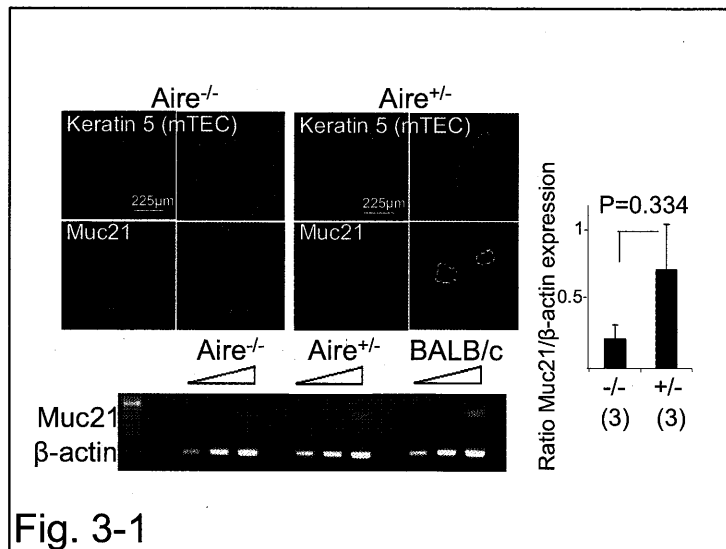


Fig. 3-1

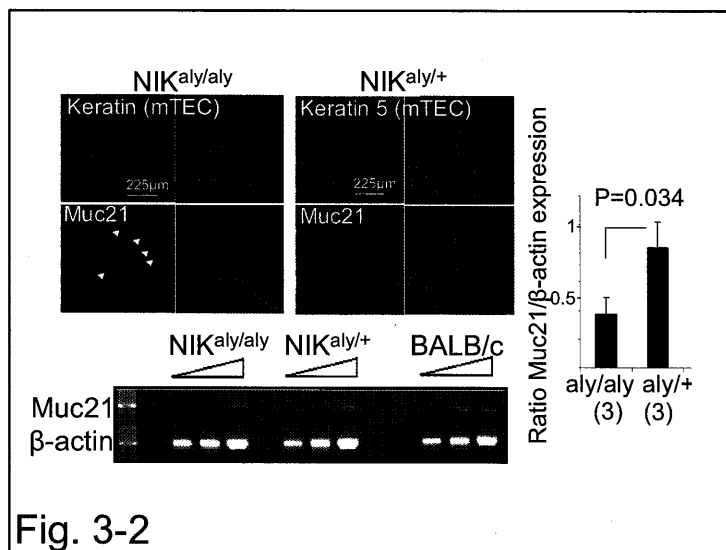


Fig. 3-2

これに対し、NIKaly/aly
 及びTRAF6^{-/-}マウスでは、Muc21
 抗体染色度は大幅に減少した
 (図3-2及び3-3)。これらの結果は、
 Muc21発現の非常に限られた部分
 がAire遺伝子の制御下にあることを
 示唆している。また、TECsに異常を
 来している自己免疫マウスでMuc21
 発現が見られないことは、Aire非依
 存的なMuc21発現は胸腺の機能に
 重要である可能性を示している。

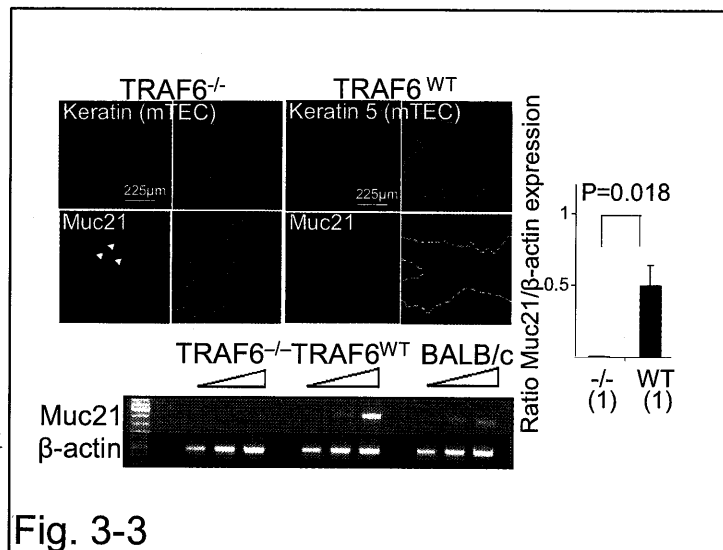


Fig. 3-3

結語

Muc21は新奇な膜貫通型ムチンであり、胸腺上皮細胞などの限られた組織細胞に発現する。胸腺においてはMuc21はTSAとして自己寛容の誘導に寄与するだけでなく、表面を保護するという機能を持つ可能性がある。胸腺内において、成長因子やサイトカインを局所的に機能させるために必要なコンパートメントを形成し維持すると言う想像もできる。これらの結果をふまえて、従来ムチンが機能していると考えられている組織以外におけるムチンの機能を研究することに大きな意義があると提言する。