

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 イシイ・シュラーデ カトリン ベアーテ

「*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)と題する本論文では、ムチン、即ち多数の O-結合型糖鎖を含むため糖含量の極めて高い上皮由来の糖タンパク質、の一つとして最近クローニングされた Muc21 の発現分布をマウスにおいて詳細に解析した結果が述べられている。特にこれまでムチン発現が知られていなかった胸腺上皮においてその発現を確認し胸腺機能の異常と深く関わる自己免疫疾患発症マウスにおいてその分布と発現に異常があるかどうかを明らかにしている。本論文の序文に述べられているように、Muc21 は、従来マウス乳癌細胞表面分子として知られ、エピグリカニンと呼ばれていたムチンである。エピグリカニンを発現している細胞は同系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ことから、巨大で負に荷電しているムチンであるため、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仮説や、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仮説があった。しかし、遺伝子が同定できなかったためにこれらの仮説を検証できなかった。本研究は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、先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ことを目的として行った結果である。

本論文は三つの章よりなり、第1章ではマウス 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とその特性解析の結果について、第2章ではこれらの抗体及び mRNA 解析を用いて Muc21 の組織分布と、胸腺について発現細胞を同定した結果について、第3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について述べられている。

第1章では先ず Muc21 特異的なポリクローナル抗体の作製法と特異性解析の結果が述べられている。細胞に発現している Muc21 は重量の80%近くが糖と考えられるが、付加された糖に依存しないでマウス 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分子量を、ペプチドシーケンサーによって配列を確認し、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。複数のオリゴペプチド配列を試みたくちで、2種のペプチドのみに特異的な抗体が得られた。結合特異性解析には、Muc21 を低及び高発現するバリエーション細胞である TA3-St 細胞と TA3-Ha 細胞、CHO-Mock トランスフェクタント細胞、CHO-Muc21-N-FLAG-tag トランスフェクタント細胞を用いたフローサイトメトリーとウエスタンブロットング解析が用いられた。その結果、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章では、Muc21 mRNA 及び第1章で作製した抗体に対するエピトープの正常個体における分布が解析された。Muc21 mRNA は胸腺、食道、気管、子宮頸、膈、胃、及び精巣に再現性よく複数のプライマー を用いて検出された。Muc21 ポリペプチドの分布状態を検証するためにマウス組織の凍結切片を抗ペプチドポリクローナル抗体で染色した。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。これらの結果は、mRNA 発現の結果と関連していた。胸腺では染色される部位は未成熟胸腺髄質上皮細胞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、及び抗 MHC class II モノクローナル抗体(すべて成熟胸腺髄質上皮細胞のマーカー)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分かった。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。以上より、Muc21 の mRNA とポリ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 が皮質上皮よりも髄質上皮に検出され、未成熟胸腺髄質上皮細胞の亜集団に発現することが明らかとなった。

第3章では自己免疫疾患発症マウスにおける Muc21 mRNA の発現と分布が解析された結果が述べられている。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 レベル及び抗ペプチドポリクローナル抗体の結合性が検証された。Aire^{-/-}マウスは組織特異的抗原の発現を欠くが正常な胸腺上皮細胞を持つ。NIK^{aly/aly} と TRAF6^{-/-} はいずれも組織特異的抗原を欠くと共に胸腺上皮細胞のオーガニゼーションが乱れており、胸腺上皮細胞の数も少ない。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胸腺髄質上皮細胞に発現していたと考えられた。半定量リアルタイム PCR 及び抗ペプチドポリクローナル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いことが分かった。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強く示している。

以上のように、学位申請者は Muc21 mRNA 及びそれが胸腺上皮細胞などの限られた組織細胞に発現すること、胸腺において Muc21 は Aire 依存的に発現する組織特異的抗原として自己寛容の誘導に寄与するよりも、表面保護潤滑などのムチン固有の分子機能を通して、免疫器官としての胸腺の重要な構成員である胸腺髄質上皮細胞の生存、分布、機能調節などに関わる可能性が高いことを示した。これらの成果は免疫学及び糖鎖生物学に貢献するところが大きく、本研究を行ったイシイ-シュラーデ カトリン ベアーテは博士(薬学)の学位を取得するにふさわしいと判断した。