

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 須藤 洋一

### 学位論文題名

#### 可変性リンパ球レセプターを発現する細胞集団の解析

【背景と目的】免疫系はその進化の過程において常に病原体との激しい競争にさらされてきた。進化を通じて高い選択圧に曝されてきたために、免疫関連遺伝子の進化の速度は極めて早く、その防御戦略も極めて多様である。無顎脊椎動物ヤツメウナギで発見された可変性リンパ球レセプター (variable lymphocyte receptor; VLR) もそうした免疫系の多様性を示す分子の1つで、我々有顎脊椎動物の免疫系へと至る進化の歴史を解明する鍵となる分子である。VLR はこれまでに VLRA 及び VLRB の二種類が同定されていた。リンパ球様細胞において、これら 2 種類の VLR はゲノム再構成を行い、単一の遺伝子座からクローン選択的に多様な抗原レセプターを発現する。VLRA および VLRB は別々のリンパ球様細胞集団で発現し、VLRA は膜結合型、VLRB は分泌型のレセプターとして機能する。VLRA<sup>+</sup>及び VLRB<sup>+</sup>細胞集団の遺伝子発現プロファイルはそれぞれ哺乳類の T 細胞、B 細胞に似ており、脊椎動物の共通祖先の段階でリンパ球はすでに 2 つの細胞に分化していた可能性が示唆されている。Kasamatsu らは公開されているヤツメウナギの遺伝情報データベースを精査し、第 3 の VLR として VLRC を同定した。VLRC は VLRA 及び VLRB 同様にゲノム再構成を行い、それと匹敵するほどの多様性を生み出していた。この結果は VLRC が VLRA 及び VLRB と同様に抗原レセプターであることを示唆しているが、この分子を発現する細胞が他の VLR の陽性細胞から独立した細胞集団を構成するかについては不明であった。本研究では、VLR 特異的モノクローナル抗体を樹立して、1) T 細胞性及び B 細胞性 VLR 陽性細胞の組織分布及び 2) VLRC<sup>+</sup>細胞の分離を行った。

【材料と方法】カワヤツメ *Lethenteron japonicum* は北海道内の河川に遡上してきたものを業者より購入し実験に用いた。各組織から total RNA を抽出し、組織間における VLRA、VLRB 及び VLRC 発現を RT-PCR で比較した。VLRA 及び VLRB の C 末端側定常領域の配列からリコンビナントタンパクを作成し、それを抗原としてマウスを免疫後、モノクローナル抗体を樹立した。樹立した抗体を用いて、VLRA 及び VLRB 転写産物の発現が確認された組織に対する免疫組織化学を行い、各 VLR の組織発現を詳細に検討した。また、VLRC 細胞の分離のために、断尾採血して得た血液から遠心分離により赤血球などを除き、リンパ球様細胞を収集した。樹立した抗 VLRA 及び抗 VLRB モノクローナル抗体を利用し、リンパ球様細胞をセルソーターで VLRA<sup>+</sup>、VLRB<sup>+</sup>及び VLRA<sup>-</sup>VLRB<sup>-</sup>細胞集団に分離した。分離した細胞を 1 細胞ごとにゲノミック PCR で解析し、これらの細胞集団における VLRC 遺伝子座の再構成を調べた。また、VLRA、VLRB 及び VLRC の発現コンストラクトを培養細胞に導入して強制発現細胞を作成し、培養上清への VLR 分泌をウェスタンブロッティングで調べた。

【結果】RT-PCR による解析で、VLRA 及び VLRB と同様に、末梢リンパ球様細胞、エラ、腎臓、腸管における VLRC の遺伝子発現が確認された。樹立した VLRA 及び VLRB モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、これらの組織における VLRA 及び VLRB の分

布を観察すると、VLRB が細胞及び組織間の分泌物中に存在していたのに対して、VLRA は細胞上のみ存在していた。特にエラにおいて、VLRA は上皮中の細胞にも存在しており、他の組織で見られる VLRA<sup>+</sup>細胞とは異なり、その細胞の形態は不定形であった。VLRA 及び VLRB モノクローナル抗体を利用してリンパ球様細胞を VLRA<sup>+</sup>, VLRB<sup>+</sup>, VLRA<sup>-</sup>VLRB<sup>-</sup>に分離し、各集団の VLRC 遺伝子座の再構成を単一細胞からのゲノミック PCR で検討すると、VLRA<sup>+</sup>及び VLRB<sup>+</sup> 細胞からは VLRC の再構成は検出されず、VLRA<sup>-</sup>VLRB<sup>-</sup>細胞でのみ VLRC の再構成が検出された。強制発現細胞の培養上清を分析すると、VLRA 及び VLRC 導入細胞では上清への分泌が認められず、VLRB でのみ細胞外への分泌が検出された。

【考察】T 細胞に近い遺伝子発現プロファイルを持つ VLRA<sup>+</sup>細胞がエラ上皮において観察された事は、この組織と胸腺との進化的な類縁性を示唆する。胸腺は胚発生期に第三鰓弓から分化してくる組織であり、哺乳類胸腺で発生段階に発現する複数の遺伝子のオーソログが、ヤツメウナギのエラでも発現していることがすでに示されている。また、VLRA<sup>-</sup>VLRB<sup>-</sup>細胞集団においてのみ VLRC の遺伝子再構成が検出されたことは、VLRC を発現するリンパ球様細胞が他の VLR 陽性細胞から独立した単独の細胞集団を形成することを示唆する。強制発現細胞の培養上清の解析や、ヤツメウナギ血清の分析及び、過去に行われた分子系統学的な解析は VLRC が VLRA に似た膜結合性の抗原レセプターであることを示唆している。このようなことから、1つの B 細胞及び2つの T 細胞という構成が、脊椎動物の共通祖先の段階ですでに確立していた可能性がある。有顎脊椎動物と無顎脊椎動物の免疫系の進化の過程には、2度の全ゲノム重複が関わったと考えられている。これらの脊椎動物で再構成を行うレセプターが独自に進化した背景には、こうした全ゲノム重複と、有顎脊椎動物の出現期における組み換え酵素 RAG の挿入などの現象が関与していると考えられる。

【結論】今回得られた知見は有顎脊椎動物の出現時に起こった爆発的な免疫系の進化が起きるより以前に、2つの T 細胞と B 細胞が分化していたことを示唆し、このような細胞の出現が急激な進化の前段階としてすでに起きていたことを明らかにした。この結果は、有顎脊椎動物で高度に進化した獲得免疫系の起源を探る研究の今後の進展に貢献することだろう。また、高い特異性を持つ抗体様分子としての VLR の特性は、抗体に変わる試薬の開発という医療応用的な分野においても大きな潜在的価値を秘めている。抗体に変わる試薬の開発は病理学や臨床検査の領域においてニーズが高く、こうした応用的な方面への研究も急がれるべきであろう。