

より購入した。何れも6~10週令のマウスを用いた。抗CD69抗体はB-D社より、抗CD25(PC61-5.3)はATCCより購入、抗Ly6.1E(SK70.94)は自家製である。FITCラベル抗ハムスターIg抗体はJackson Research社から、FITCラベル抗マウスIg抗体はDAKO社から購入した。FACS解析用の活性化リンパ球はリンパ節細胞をConA 2 μg/ml, IL-2 50u/mlの存在下で2日間培養したものをを用いた。RT-PCR試薬はペーリンガー社のものを使用した。PCR用プライマーは北海道システムサイエンスに依頼した。

FACS、PCR、塩基配列決定は常法に従って行った。

21) CD69 抗原の自己免疫発症における役割

研究代表者 木村 昭治

研究背景および目的

ウイルス性スーパー抗原に対する *in vivo* での活性化を種々のマウス系統を用いて観察中に A/WySnJ マウスがリンパ球活性化を示すにも拘らず膜表面 CD69 の発現が見られないことを見いだした。CD69 抗原はレクチンファミリーに属する II 型の膜タンパクでありリンパ球活性化に伴って膜に発現される抗原としてよく知られているがその機能はよく分かっていない。本研究計画の目的は A/WySnJ マウスの CD69 発現異常とそれによる免疫反応への影響を検討することによって CD69 の機能を知ること、今回は途中経過としてその前半部分を報告する。

材料および方法

A/WySnJ マウスは友成久平教授 (福井大学免疫学講座) より供与された。A/J マウスは三協ラボラトリー

結果と考察

A/WySnJ マウスがリンパ球活性化に伴い CD69 抗原の膜発現を示さないことを確認するため、*in vitro* で活性化されたリンパ球を用い膜表面での発現を抗 CD69 抗体による FACS 解析で検討した。Fig 1 A に示されるように A/WySnJ に CD69 の発現は全く見られなかった。リンパ球活性化そのものは CD25 と Ly6.1E の発現があることで確認されている (Fig1B)。次に発現欠損のメカニズムを検討するため mRNA 産生を RT-PCR で検討した。A/J マウスにおいては2本のバンドが観察されたが A/WySnJ マウスでは A/J マウスの短いバンドに相当するサイズのバンドのみがみられた (Fig2)。それぞれのバンドの塩基配列を調べると A/J マウスの長い方は既報の CD69 に一致し、短い方はその exon 2 を欠くアイソフォームをコードするものであった。A/WySnJ のバンドは A/J の短い方の塩基配列と同一であった (Fig 省略)。exon 2 は膜貫通

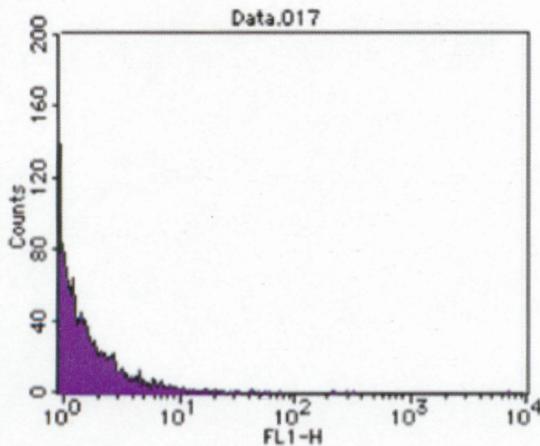


Fig.1A Expression of CD69

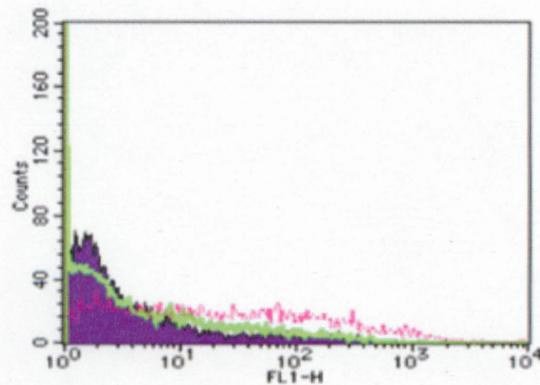


Fig.1B Expression of Ly6.1E and CD25

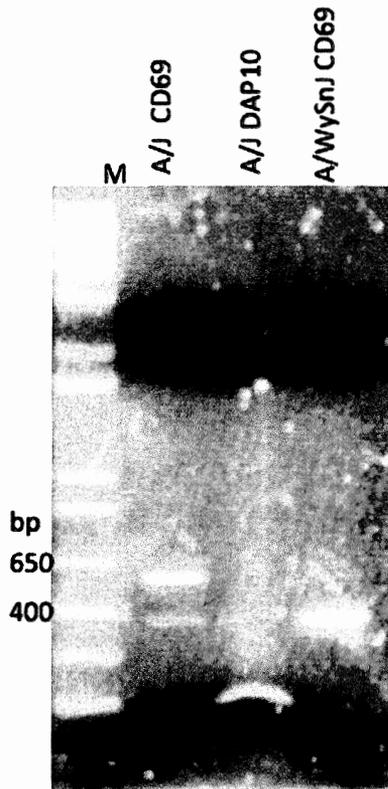


Fig.2 CD69 mRNA expression in A/WySnj mouse

部をコードしており膜局在に必須である。このことから A/WySnj に CD69 の膜発現が見られないのは膜貫通部を欠くためと考えられる。その理由として exon 2 部分の欠失、特定の選択的スプライシング、スプライシング異常などが考えられるため intron/exon 境界領域の塩基配列を調べた。Fig 3 に示されるように intron1-2 と exon2 の境界部分 (intron のアクセプターサイト) の配列が AA (A/J では AG) となっており intron1-2 がスプライスアウト出来なくなり、intron1-2, exon 2, intron2-3 がスプライスアウトされ exon 2 を欠く mRNA が産生されると考えられる。

A/J マウスでは選択的スプライシングによって 2 種類の CD69 mRNA が産生されることが判明したがスプライシングパターンが細胞系列特異的か否かを培養細胞株を用いて検討した (BRRVTC1, CTL, CgCBI, 2B4-11 は T 細胞、M12.C3, 93-4 は B 細胞、R453 は顆粒球、416B は骨髄球系の前駆細胞、P388 はマクロファージ、1029, 8050, 8072 は骨髄球系、0131, 8112, 8057 は巨核球系の細胞株である)。種々の細胞株で 2 種の mRNA が観察され細胞系列によりスプライシングが決まっている訳ではないがそれらの相対的な量には細胞株間で

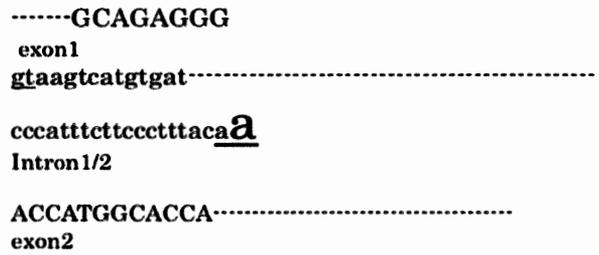


Fig.3 mutation at intron/exon bounday in A/WySnj mouse

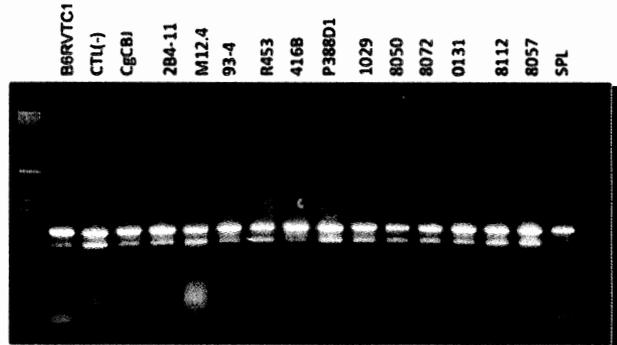


Fig.4 CD69 mRNA expression in a variety of cell lines

多少の差があり細胞のタイプによりスプライシングの調節が行われているようである (Fig 4)。

実際に exon2 を欠く mRNA がタンパクをコードするか、もしそうであればその局在はどうか、を調べるため FLAG 付加の発現コンストラクトを作製し 293T 細胞で一過性の発現をウェスタン法にて検討した。細胞上清および細胞溶解物から産物が免疫沈降され少なくとも遺伝子導入系では分泌されることが示された (Fig 省略)。

A/WySnj マウスでは自己抗体の産生や腎病変など自己免疫疾患の症状を経年とともに表現することが報告されているが我々は CD69 発現欠損と抑制性 T 細胞の量的、質的制御の喪失との関連を考えている。natural Treg 細胞 (CD25+Foxp3+) の A/WySnj と A/J マウスとの FACS による比較ではその頻度には差はみられなかった (Fig 省略)。今後、効果細胞との混合培養でその機能を確認する必要がある。また、TGF-β 1 などによる誘導性 Treg に関しても同様の観察を行うこと、何らかの因子による個体間の差を考慮して蛋白尿や抗 DNA 自己抗体の量との相関を検討することが必要である。