

平成 29 年度 徳島大学先端酵素学研究所「共同利用・共同研究」成果報告書

研究課題名：胸腺上皮共通前駆細胞の同定

研究者名：澤 新一郎

研究者所属：北海道大学遺伝子病制御研究所 感染症態分野

平成 29 年度は RANK(Tnfrsf11a)プロモーター下流で DNA リコンビナーゼ Cre, および蛍光タンパク質 EGFP を発現する RANK- Cre-IRES(internal ribosomal entry site IRES)-EGFP BAC transgenic (RANK-CIG BAC Tg)マウスの個体作成を行った。

まず、2014 年に特殊免疫研究所（宇都宮市）において作成し、東京大学発生工学センターで C57BL/6J マウスとの人工授精後、簡易ガラス化法により凍結保存した RANK-CIG BAC Tg マウスの凍結胚 80 個からの個体作成を北海道大学遺伝子病制御研究所動物施設内で 2 回に分けて行なった。1 回目は 10 匹の新生仔が出生直後に食殺され、2 回目は 8 匹の新生仔が食殺され、個体作成に至らなかった。

次に、熊本大学生命資源研究・支援センターに凍結胚からの個体作成を依頼した。凍結胚 40 個から 22 匹の成体マウスが得られた（雄 10 匹、メス 12 匹）。これらのマウスを北海道大学遺伝子病制御研究所内に再移送し、マウスコロニーの拡大を試みた。平成 29 年 9 月にこれらのマウスコロニー由来 3 匹の成熟雄マウスから精子凍結保存を行った。これらの凍結精子を徳島大学に搬送するために必要な遺伝子組換え実験および動物実験申請の手続きを進めている。

RANK-CIG BAC Tg マウスは 3 コピーの Cre-IRES-EGFP トランスジーンを有することがサザンブロットで確認されており、蛍光顕微鏡による肉眼観察やフローサイトメーターによる EGFP 陽性細胞の識別、単離が容易である。一方、トランスジーンがゲノム上の複数領域にランダムに integrate される可能性もあり、異所性のトランスジーン発現や戻し交配によるトランスジーン数が減弱する可能性も否定できない。

まず、トランスジーンの適正発現を確認するため、個体作成した RANK-CIG BAC Tg マウスから凍結切片を作成し、全身臓器における EGFP 発現細胞を検討した。その結果、胸腺髄質、リンパ節、骨、脳、腸管などの RANK 発現が報告されている組織における EGFP 発現が確認できた。さらに、免疫多重染色法によりフローサイトメーターおよび共焦点蛍光顕微鏡を用いて、EGFP 発現細胞の詳細な検討を行った。胸腺においては髄質上皮細胞、樹状細胞の一部に EGFP が発現していた。骨組織内では CD45 陽性で核を複数個有する破骨細胞、脳内ではミクログリア、腸管内では上皮細胞に EGFP が発現していることが明らかになった。リンパ節内における EGFP 陽性細胞は Lyve-1 陽性リンパ管内皮細胞、CD207 陽性樹状細胞および 3 型自然リンパ球の一種 L_{Ti} 細胞であった。表面抗原発現パターンにより識別した L_{Ti} 細胞(Lineage⁻ ckit⁺CD127⁺)には EGFP 強陽性のみならず、弱陽性の細胞群も存在する。RANK-CIG BAC Tg マウスにおける EGFP 発

現と内在性 RANK(*Tnfrsf11a*)遺伝子発現の相関性を調べるため、EGFP 強陽性および弱陽性 LTi 細胞をフローサイトメーターによりソーティングし、定量 PCR 法により *Tnfrsf11a* 遺伝子発現を検討していたところ、EGFP 発現と内在性 RANK(*Tnfrsf11a*) 遺伝子の発現に相関が確認できた。一方、胎仔肝臓内および骨髄には血球系前駆細胞が多く存在し、RANK-CIG BAC Tg マウスの血球系前駆細胞は EGFP を強く発現している。RANK-CIG BAC Tg マウスを Rosa26-loxp-stop-loxp-tdTomato (R26-LSL-tdTomato)マウスと交配し、血球系細胞におけるトランスジーン発現履歴を生体内で追跡すると、ほぼ全ての CD45 陽性血球系細胞に tdTomato 発現が確認できた。血球系前駆細胞における RANK 発現および機能的意義はこれまで報告されていない。血球系前駆細胞における RANK 発現やその機能的意義を今後検討する必要がある。

続いて、RANK-CIG BAC Tg マウスと C57BL/6J 野生型マウスの戻し交配を行い、EGFP 発現の減弱が見られるかを確認した。現在、5回まで戻し交配を行なったが、EGFP 発現の減弱は確認できなかった。以上から、3つのトランスジーンはゲノム上の極めて近接した領域に integrate されており、交配を重ねても容易には分離しないと考えられる。