

学 位 論 文 要 約

氏 名 松 原 達 也

題 目 マイクロミニピッグにおける CD4 遺伝子多型に関する研究

CD4 分子は、ヘルパーT 細胞等の表面に発現し、T 細胞受容体の補助的機能を有し、組織適合性抗原複合体 (MHC, ブタでは SLA) クラス II 分子と結合して免疫情報のシグナル伝達等に重要な役割を演じている。極小サイズの新規実験用ミニブタであるマイクロミニピッグの免疫学的特徴を検討する過程において、抗ブタ CD4 抗体を用いたフローサイトメトリー (FCM) によって末梢血単核細胞 (PBMC) から CD4 陽性 (CD4+) 細胞が検出できないブタを認めた。抗ブタ CD4 抗体で CD4+ 細胞を検出できないことが免疫学的にどのような意義があるのかは不明である。そこで、CD4+細胞が検出できない原因を明らかにするとともに、CD4 分子の特徴を明らかにすることを目的として以下の研究を実施した。

第一章では、マイクロミニピッグにおいて抗ブタ CD4 抗体 74-12-4 を用いて PBMC 中の CD4+ 細胞の検出を試み、CD4+細胞を検出できるブタ (CD4.A) と検出できないブタ (CD4.B) を認めた。CD4.B のブタでは、74-12-4 と別クローン由来の抗ブタ CD4 抗体 MIL17 と PT90A によっても CD4+ 細胞を検出できなかった。次に、免疫学的違いを検討するため末梢血リンパ球サブポピュレーションを解析し、CD4.A と CD4.B の両者において、CD3+細胞と CD8+細胞が検出され、総リンパ球数に対する CD3+細胞と CD8+細胞の割合は、CD4.A と CD4.B の間に差はなかった。また、抗体産生能に異常がないかを確認するため血漿 IgM と IgG 濃度を比較したが、CD4 の検出性の違いによる差はなかった。CD4.A と CD4.B のブタは、ともに易感染性などの異常所見を認めないことから、CD4.B のブタは、免疫不全などの重度の免疫異常を生じるような CD4 分子の欠損ではなく、CD4 遺伝子多型の関与が予想された。

第二章では、CD4.A と CD4.B のブタの CD4 遺伝子を解析した。ゲノム DNA について、CD4 の全コーディング領域であるエクソン 2 から 10 を増幅するプライマーを設計し、PCR 産物をシークエンスした。検出された塩基配列を GenBank 登録のブタ CD4 塩基配列 (NM_001001908) と比較した。マイクロミニピッグでは 2 種類の CD4 アリルを確認し、塩基置換数が 15 個のアリルを *CD4.A*、塩基置換数が 22 個のアリルを *CD4.B* とした。*CD4.B* のエクソン 3 から 4 の塩基配列は、やはり CD4 を検出できない NIH ミニブタの *CD4.2* の塩基配列 (X65630) と一致した。CD4 アミノ酸配列 (NP_001001908) との比較では、CD4.A は 7 個、CD4.B は 15 個のアミノ酸置換があった。特に CD4.B では、MHC クラス II との結合に重要とされるドメイン 1 の CDR2 様領域周辺に 10 個のアミノ酸置換が認められた。*CD4.B* と塩基配列が一致するアリルは、デュロック、大ヨークシャー、金華豚の家畜ブタでも確認された。次に、制限酵素 (*Bse*RI) を用いた PCR-RFLP による CD4 遺伝子型 (*CD4.AA*, *CD4.AB* および *CD4.BB*) の簡易判別法を確立した。CD4+細胞を検出できなかったのは *CD4.BB* のみであった。PBMC 由来の RT-PCR 産物の解析では、*CD4.AA* と *CD4.BB* の両方の CD4 mRNA の発現を確認し、さらに *CD4.AB* では *CD4.A* と *CD4.B* の遺伝子が共発現していた。FCM 解析では、*CD4.AB* の CD4+細胞の蛍光強度が *CD4.AA* の 1/2 に減弱しており、*CD4.AB* の個体では CD4.A と CD4.B の分子が CD4+T 細胞で共発現していることを示唆した。*CD4.B* の遺伝子がタンパク質として発現することを確認するため、CD4 の C 末端に FLAG を付加した CD4 分子を発現したところ、CD4.A-FLAG の FLAG と CD4.A を確認できた。CD4.B-FLAG については FLAG は確認できたが、CD4.B は確認できなかった。これらの結果から、CD4.B のアミノ酸置換が抗体により CD4+細胞を検出できない原因であることが示された。

第三章ではマイクロミニピッグにおける CD4 遺伝子多型の生物学的意義を検討した。免疫学的差異を検討するため 60 日齢のブタの血漿 IgM と IgG 濃度および PBMC 中の CD3+細胞の割合および CD8+細胞の割合を比較したが、*CD4.AA* と *CD4.BB* の間に明らかな差はなかった。SLA の影響を除外する目的で、SLA ハプロタイプを一致 (SLA Hp-35.23 ホモと SLA Hp-10.11 ホモ) させて CD4 遺伝子多型による混合リンパ球反応 (CFSE-MLR) の差異を評価した。確認されなかった *CD4.AA* を除く *CD4.AB* と *CD4.BB* の個体間での CFSE-MLR では、*CD4.AB* を Responder とし *CD4.BB* を Stimulator とした場合の Stimulation Index が *CD4.BB* 同士よりも高い傾向にあり、CD4 遺伝子多型によって組織適合性が異なることを示唆した。CD4 分子の機能とは直接関係しないが、CD4 遺伝子型の違いがマイクロミニピッグの系統造成に影響した可能性を考慮し、経済的形質として同腹子数、出生直前の死亡産子数、さらに生時と 50 日齢の体重を検討したが差は認められなかった。

本研究では、マイクロミニピッグの集団には PBMC 中の CD4+細胞を市販の抗ブタ CD4 抗体で検出できない個体があることと、2 種類の CD4 アリルがあることおよび *CD4.BB* の遺伝子型は CD4+細胞を検出できないことを明らかにし、さらに PCR-RFLP による CD4 遺伝子型の簡易判別法を確立した。本研究により、マイクロミニピッグでは、SLA ハプロタイプの違いと CD4 遺伝子型の違いを組み合わせでの免疫機能を評価することが可能となった。現時点では、CD4 遺伝子多型による CD4 分子の機能の差異は明瞭ではないが、多型を示す部分が、MHC クラス II との結合部分であることを考慮すると、CD4 分子の機能に何らかの違いがある可能性が高い。CD4 遺伝子多型の生物学的意義はさらなる検討が必要であるが、本研究は、マイクロミニピッグの CD4 に関する遺伝学的、免疫学的情報を提示し、新規実験動物であるマイクロミニピッグを免疫学的研究に利用する際の重要な免疫学的背景を提示すると考えられる。

学 位 論 文 要 約

氏 名 MATSUBARA, Tatsuya

題 目 Studies on a CD4 Gene Polymorphism in Microminipigs
(マイクロミニピッグにおける CD4 遺伝子多型に関する研究)

The CD4 molecules are expressed on helper T cells, monocytes, and dendritic cells. The CD4 molecule binds to a monomorphic region of a major histocompatibility complex (MHC, represented as swine leukocyte antigen (SLA) in the pig) class II molecule, and plays the critical role of signal transduction in T cell activation for antigen recognition through the function of the co-receptor for T cell receptor. In the process of immunological aspect analysis on Microminipigs, among the extra-small sized novel miniature swine developed for biomedical research, I found some pigs in which CD4 positive (CD4+) cells could not be detected in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by flow cytometry using an anti-pig CD4 antibody (clone 74-12-4). To elucidate the cause of undetection of CD4+ cells, and to characterize the CD4 molecule in Microminipigs, I conducted the following studies.

In Chapter 1, I tried to detect CD4+ cells in PBMC using an anti-pig CD4 antibody (74-12-4), and recognized two types of pigs, those with detectable CD4+ cells (designated as CD4.A) and those with no such detectable cells (CD4.B). In CD4.B pigs, CD4+ cells could not be detected also with alternate anti-pig CD4 antibodies derived from other different clones (MIL17 and PT90A). In peripheral lymphocyte subpopulation analysis, CD3+ cells and CD8+ cells were detected in both CD4.A and CD4.B pigs. Between the CD4.A and CD4.B pigs, there were no significant differences in percentages of CD3+ cells and CD8+ cells in total lymphocytes, as well as plasma IgM and IgG concentrations. Pigs with both CD4 types did not show any clinical abnormalities. Therefore, the loss of reactivity to antibodies in CD4+ cells of CD4.B pigs might be caused by CD4 polymorphism, just as reported in NIH miniature swine herd, but not by lack of CD4 molecules inducing immunological disorder as in immunodeficiency.

In Chapter 2, I analyzed the CD4 gene in CD4.A and CD4.B pigs. I designed primers against genomic DNA to amplify exons 2 to 10, corresponding to the CD4 coding sequence. By alignment of nucleotide sequences from PCR products with swine CD4 reference sequence registered in GenBank (NM_001001908), I found two CD4 alleles in the Microminipig herd, and designated one allele with 15 nucleotide substitutions as *CD4.A*, and the other allele with 22 nucleotide substitutions as *CD4.B*. The sequence of exons 3 to 4 of *CD4.B* in Microminipigs was identical to the sequence of *CD4.2* (X65630) reported in NIH miniature swine, whose PBMC also failed to react with an anti-pig CD4 antibody. In comparison with swine CD4 reference amino-acid sequence (NP_001001908), amino-acid substitutions were 7 and 15 in CD4.A and CD4.B pigs, respectively. The location of 10 amino-acid substitutions in CD4.B pigs was around the CDR2-like region of domain 1, binding to MHC class II molecule. Moreover, the same substitutions were also found in domestic pigs, Duroc, Large white, and Jinhua pigs. I established the PCR-RFLP using a restriction enzyme, *BseRI* to identify the CD4 genotypes; *CD4.AA*, *CD4.AB*, and *CD4.BB*, and only pigs with *CD4.BB* lost the reactivity to anti-CD4 antibodies. In analysis of RT-PCR products derived from PBMC, I confirmed the CD4 mRNA

expression in PBMCs of both pigs with *CD4. AA* and *CD4. BB*. Moreover, PBMC in pigs with *CD4. AB* co-expressed *CD4. A* and *CD4. B* genes. In flow cytometric analysis, fluorescence intensity of CD4⁺ cells in PBMC with *CD4. AB* was almost half that of those with *CD4. AA*, and implied the co-expression of CD4.A and CD4.B molecules on CD4⁺ T cells in pigs with *CD4. AB*. In the expression study of CD4 molecule added with a FLAG protein to the C-terminus of CD4 molecule, fluorescences of FLAG and CD4.A could be detected in CD4.A-FLAG molecule. On the other hand, FLAG could be detected, but not CD4.B in CD4.B-FLAG molecule. These results indicate that amino-acid substitutions in CD4.B cause loss of reactivity to anti-CD4 antibodies.

In Chapter 3, I researched the biological significances of CD4 polymorphism in Microminipigs. There were no obvious differences in plasma IgM and IgG concentrations and percentages of CD3⁺ and CD8⁺ cells in PBMC between *CD4. AA* and *CD4. BB* pigs at 60 days old. I assessed histocompatibilities of CD4-genotype different pigs by mixed lymphocyte reaction (CFSE-MLR) in pigs with identical SLA haplotypes (Hp-35.23 homozygous or Hp-10.11 homozygous) to exclude the effect of SLA. CFSE-MLR was conducted between pigs with *CD4. AB* and *CD4. BB* because there were no pigs with *CD4. AA* in the herd of Microminipigs. Stimulation indexes by *CD4. BB* to *CD4. AB* tended to be higher than those in stimulation by *CD4. BB* to *CD4. BB*, suggesting that CD4 polymorphism had some effect on histocompatibility. There were no differences in economic traits, such as the number of normal litters, litter size of perinatal stillborn piglets, and body weights at birth and 50 days old, among the pigs with *CD4. AA*, *CD4. AB* and *CD4. BB*.

To summarize the present study, I demonstrated that Microminipigs involved some individuals in which CD4⁺ cells could not be detected by use of anti-pig CD4 antibodies. There were two kinds of CD4 alleles, *CD4. A* and *CD4. B*, and the polymorphism observed in *CD4. BB* genotype was responsible for the loss of reactivity to anti-CD4 antibodies. Moreover, I established a PCR-RFLP as a simple method to identify the CD4 genotypes. At the current time, differences of CD4 functions associated with CD4 polymorphism are uncertain. However, considering that the CD4 domain with amino-acid substitutions is the site to bind the MHC class II molecule, the polymorphism may associate with some phenotypic alterations. Although further studies on the biological significances of CD4 polymorphism are required, my current research has provided basic genetic and immunological information on Microminipigs, that serves as an important background for use in immunological studies of the Microminipig as a novel laboratory animal.