

氏名（本（国）籍）	松 原 達 也（富山県）
主 指 導 教 員 氏 名	岐阜大学 教授 北 川 均
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第462号
学位授与年月日	平成28年3月14日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 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
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 浅 井 鉄 夫 副査 帯広畜産大学 教 授 山 岸 則 夫 副査 岩 手 大 学 教 授 佐 藤 れ え 子 副査 東京農工大学 教 授 水 谷 哲 也 副査 岐 阜 大 学 教 授 北 川 均

学位論文の内容の要旨

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）中に CD4 陽性（CD4+）細胞を検出できないブタが認められた。抗ブタ CD4 抗体 CD4+細胞を検出できないことは、マイクロミニピッグを免疫学的研究に供する場合、CD4+細胞が関わる免疫機能を評価する際に不都合が生じる可能性がある。CD4+細胞を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として T 細胞に発現する CD3 や細胞傷害性 T 細胞などに発現する CD8 について解析した。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 exon 2-10 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*の塩基配列と一致した。ブタ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。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。*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。PBMC由来のRT-PCR産物の解析では、*CD4. AA*と*CD4. BB*の両方のCD4mRNA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. A*のC末端にFLAGを付加したCD4分子(*CD4. A*-FLAG)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の際に経済的形質として影響した可能性を考慮し、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。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。

審 査 結 果 の 要 旨

CD4分子は、ヘルパーT細胞等の表面に発現し、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

小サイズの実験用マイクロミニピッグにおいて、フローサイトメトリー (FCM) により末梢血単核細胞 (PBMC) 中に CD4 陽性 (CD4+) 細胞が検出されないブタを発見した。本学位論文では、CD4+細胞が検出できない原因と CD4 分子の特徴を検討した。

抗ブタ CD4 抗体 74-12-4 によって CD4+細胞を検出できるブタを CD4. A, 検出できないブタを CD4. B とした。CD4. B では別クローン由来の抗ブタ CD4 抗体 MIL17 と PT90A でも CD4+細胞を検出できなかった。CD4. A と CD4. B の間では、CD3+細胞と CD8+細胞の割合に差はなく、血漿 IgM と IgG 濃度の差もなかった。CD4. B のブタは易感染性等の異常所見を認めず、免疫不全となる 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。

次に、CD4. A と CD4. B のブタのゲノム DNA について CD4 の全コーディング領域 (exon 2-10) をシーケンスした。検出された塩基配列を既登録ブタ CD4 塩基配列 (NM_001001908) と比較し、2 種類の CD4 アリルを確認した。塩基置換数 15 個のアリルを *CD4. A*, 塩基置換数 22 個のアリルを *CD4. B* とした。アミノ酸配列では、ブタ CD4 (NP_001001908) と比較して CD4. A では 7 個, CD4. B では 15 個の置換を認め、特に CD4. B では MHC クラス II との結合に重要なドメイン 1 の CDR2 様領域周辺に 10 個のアミノ酸置換を認めた。*CD4. B* 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* の塩基配列と一致し、さらに家畜ブタ (デュロック, 大ヨークシャー, 金華豚) でも確認された。制限酵素 *Bse*RI を用いた PCR-RFLP による CD4 遺伝子型の簡易判別法を確立した。FCM によって CD4+細胞を検出できなかったのは *CD4. BB* であった。RT-PCR 解析では、*CD4. AA* と *CD4. BB* の両方の CD4 mRNA の発現と *CD4. AB* における *CD4. A* と *CD4. B* の共発現を確認した。*CD4. B* 遺伝子の C 末端に FLAG を付加した CD4 分子を発現させたところ、FLAG タンパク質を確認でき、CD4. B タンパク質は発現していること、抗体によって CD4+細胞を検出できない原因が CD4. B のアミノ酸置換であることを示した。

さらに、CD4 遺伝子多型の生物学的意義を検討した。*CD4. AA* と *CD4. BB* では、血漿 IgM と IgG 濃度、PBMC 中の CD3+細胞の割合と CD8+細胞の割合、同腹子数、出生直前の死亡産子数、出生時と 50 日齢の体重に差がなかった。SLA ハプロタイプが同じ個体における混合リンパ球反応では、*CD4. AB* と *CD4. BB* の間の Stimulation Index が *CD4. BB* 同士よりも高い傾向にあり、組織適合性が異なることを示唆した。

本論文では、マイクロミニピッグの集団には 2 種類の CD4 アリルがあること、*CD4. BB* の個体では市販の抗体で 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。CD4 遺伝子多型による CD4 分子の機能の差異は現時点では明瞭ではないが、多型部分が MHC クラス II との結合部位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。本研究は、ブタの CD4 に関する遺伝学的、免疫学的情報を提示し、免疫学的研究に利用する際の重要な背景を提示すると考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : Identification of a CD4 variant in Microminipigs not detectable with available anti-CD4 monoclonal antibodies

著 者 名 : Matsubara, T., Nishii, N., Takashima, S., Takasu, M., Imaeda, N., Aiki-Oshimo, K., Yamazoe, K., Kametani, Y., Ando, A. and Kitagawa, H.

学術雑誌名 : Veterinary Immunology and Immunopathology

巻・号・頁・発行年 : 168 (3-4) : 176-183, 2015

既発表学術論文

- 1) 題 目 : ELISA による犬の血漿 N 末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド濃度測定
著 者 名 : 西飯直仁, 高島諭, 松原達也, 小島正章, 星野恵美, 蜂巢達之, 北川均
学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌
巻・号・頁・発行年 : 68 (1) : 68-72, 2015
- 2) 題 目 : Body and major organ sizes of young mature Microminipigs determined by computed tomography
著 者 名 : Takasu, M., Tsuji, E., Imaeda, N., Matsubara, T., Maeda, M., Ito, Y., Shibata, S., Ando, A., Nishii, N., Yamazoe, K. and Kitagawa, H.
学術雑誌名 : Laboratory Animals
巻・号・頁・発行年 : 49 (1) : 65-75, 2015