

## 研究区分:若手研究

## Foxn1 により調節される胸腺上皮細胞の分化及び機能に重要な分子の解析

千葉 章太

基礎医学講座 免疫微生物学ユニット

## 【背景と目的】

1 次リンパ器官である胸腺は、T 細胞分化の場であり、生体防御系において中心的な役割を果たす器官である。胸腺微小環境を構築するストローマ細胞の主な構成成分は上皮細胞である。胸腺上皮細胞は、T 細胞分化に必要な機能分子を発現し、胸腺細胞に分化シグナルを提供している。Foxn1 は、胸腺上皮細胞に発現し、胸腺上皮細胞の分化に必須の役割を果たす転写因子である。本研究では、これまでに胸腺上皮細胞の初期分化段階における機能分子発現と増殖に Foxn1 が重要であることを示した。加えて、生後胸腺においても機能分子発現に関わることを見いだした。しかし、胸腺上皮細胞の分化、増殖や機能分子の発現調節における Foxn1 の役割は、一部しか解っていない。また、胸腺上皮細胞での Foxn1 の標的遺伝子や、Foxn1 による発現調節メカニズムは、まったく解っていない。そこで本研究では、まず、Foxn1 の標的遺伝子を明らかにすることを目指す。

## 【方法と結果】

これまでに、胎生 12 日目の正常マウスおよびヌードマウスの胸腺原基から抽出した total RNA をもとに合成した cDNA をサンプルとして、DNA マイクロアレイによる解析を行った。その解析結果から Foxn1 により直接調節を受ける候補遺伝子を選抜し解析を行ってきた。

*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、geneE は、胎生 14 日目の正常型マウスにおいて、アンチセンスプローブを用いたサンプルに濃い染色が見られ、胸腺において発現しているようにみられた(図 1, 矢印)。

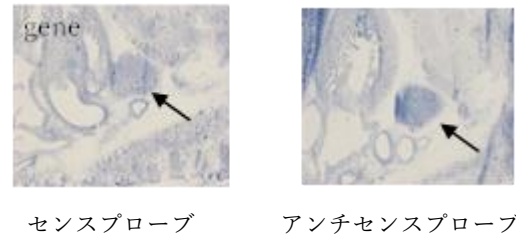


図 1 *in situ* ハイブリダイゼーションの結果  
矢印は胸腺を示す。

## 免疫組織染色法による geneE タンパク質の時間的発現

GeneE に対するタンパク質分子を認識する特異的抗体を用いて、免疫組織染色を行い、正常マウスにおける胸腺原基および胸腺内での発現の有無を確認した。

サンプルは、正常マウスから Ed12 及び Ed14 の胎仔マウスを摘出し、未固定のまま OCT コンパウンド中に投入し、直ちに液体窒素中で凍結させて包埋した。胎仔は 5µm の厚さで凍結切片に加工した。サンプルは、アセトンにより固定した。各候補遺伝子のコードするタンパク質分子を認識する特異的抗体を一次抗体に用いた。二次抗体には、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular probes)を用いた。結果は、蛍光顕微鏡下で観察した。

その結果、geneE から翻訳されるタンパク質分子は、正常マウスにおいて、Ed12 の胸腺原基および、Ed14 の胸腺において発現していることが確認された(図 2)。

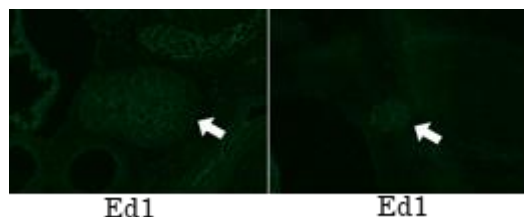


図 2 免疫組織染色の結果

正常マウスの胎生 14 日目の胸腺および胎生 12 日目の胸腺原基において, geneE がコードするタンパク質の発現が確認された (矢印).

### geneE タンパク質はヌードマウス胸腺原基で正常マウスと異なる発現パターンを示す可能性が高い

次に, geneE のコードするタンパク質分子を認識する特異的抗体を一次抗体に用いて, ヌードマウス胸腺原基での発現を免疫組織染色により調べた. その結果, geneE タンパク質は, Ed12 の正常マウス胎仔では胸腺原基を構成する細胞の細胞質と思われる場所にも発現が見られたのに対して, Ed12 のヌードマウス胎仔では胸腺原基を構成する細胞の細胞質と思われる場所にはその発現は見られなかった. (図 3).

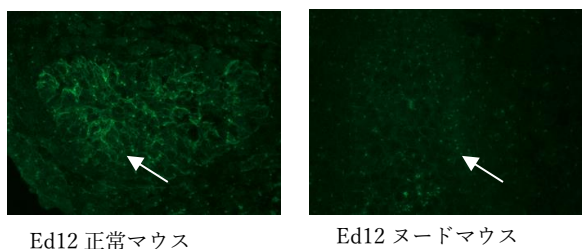


図 3 免疫組織染色の結果

Ed12 のヌードマウス胎仔では胸腺原基を構成する細胞の細胞質と思われる場所にはその発現は見られなかった. (矢印).

加えて, 胸腺上皮細胞のマーカーであるケラチンを用いて多重染色を行ったところ, geneE タンパク質は, 胸腺上皮細胞で発現していることが確認できた (図 4)

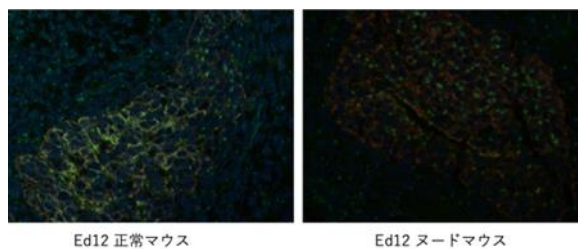


図 4 免疫組織染色の結果

Ed12 の正常マウス胎仔ではケラチンと geneE タンパク質の発現パターンが一致している細胞が確認でき geneE は胸腺上皮細胞で発現していることが確認できた. またヌードマウスでは, 胸腺上皮細胞での発現はみられなかった.

### 【考察】

DNA マイクロアレイのデータから選抜した Foxn1 標的候補遺伝子のうち, 胎生 12 日目のヌードマウス胸腺原基で発現量が減少していた遺伝子についてそれらをコードしているタンパク質に対する特異的抗体を用いて免疫組織染色による解析を行なった結果, geneE がコードしているタンパク質分子は, 正常マウスにおいて胎生 12 日目の胸腺原基および, 胎生 14 日目の胸腺において発現していることを確認した. また, geneE がコードしているタンパク質分子は, 胎生 12 日目のヌードマウス胸腺原基で正常マウスとは異なる発現パターンを示ることが示唆された. 今後は, geneE 遺伝子周辺の Foxn1 結合配列を探索し, geneE の発現調節が行われている領域の同定を試みたい.

### 【論文及び学会発表】

なし