

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

氏 名： 千葉 章太【免疫・微生物】

共同研究者： 糸井マナミ【免疫・微生物】

【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 の標的分子や、発現調節のメカニズムは、まったく解っていない。そこで本研究では、Foxn1 の標的因子を明らかにすることを目指す。

【方法と結果】

1) DNA マイクロアレイによる胎生 12 日目の正常マウス胸腺原基とヌードマウス胸腺原基での遺伝子発現量の比較

Foxn1 mRNA は胎生 11.25 日目から胸腺上皮細胞で発現を開始する。また、ヌードマウスにおいて胸腺の形態的な異常は胎生 12 日目頃から観察される。そこで、胎生 12 日目の正常マウスとヌードマウスの胸腺原基から total RNA を抽出し、その発現量を比較することにより、Foxn1 の標的遺伝子を同定できるのではないかと考えた。

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 から合成した cDNA をサンプルとして、マイクロアレイ解析を行った。

DNA マイクロアレイには、Agilent 社の SurePrint G3 Mouse GE 8x60K microarray を用いた。胎生 12 日目の正常マウスとヌードマウスの胸腺原基における遺伝子の発現量を比較した。その結果、アレイ中の全 59,305 遺伝子のうち 9,513 遺伝子がヌードマウスにおいてその発現量が 1/2 以下に減少していた。しかし、この中から Foxn1 の標的遺伝子を見つけ出すには数が多

すぎる。そこで、①効率よく胸腺上皮細胞で発現する遺伝子を選抜するために、胎生 12 日目の正常マウス胸腺原基から回収した胸腺細胞に発現する遺伝子を DNA マイクロアレイにより比較し、胎生 12 日目の正常マウス胸腺原基での発現量に対して胸腺細胞での発現量が 1/2 以下に減少している遺伝子を選抜した。②解析を行う遺伝子を転写因子に絞り込むため、遺伝子情報から、核酸結合能または DNA 結合能が示唆されている遺伝子を選抜した。③アレイ内で再現性のないデータを除外した。④胎生 12 日目のマウス胎仔胸腺内で発現しないと報告されている遺伝子を除外した。選抜の結果、34 の遺伝子が Foxn1 標的因子の候補遺伝子として選抜された（図 1）。

2) 定量的 PCR による選抜した候補遺伝子の検証

次に、選抜した候補遺伝子について、ヌードマウスにおいて発現量が減少していた結果に再現性があるかを調べるため、定量的 PCR による確認を行った。胎生 12 日目の正常マウスおよびヌードマウス胸腺原基から RNA を抽出し、9 つの候補遺伝子について、発現量を比較した。その結果、6 つの候補遺伝子において、マイクロアレイの結果と同様にヌードマウス胸腺原基において発現量の減少が認められた（図 2）。

よって、候補遺伝子の中には、ヌードマウス胸腺原基で発現が減少している転写因子が確実に含まれていることがわかった。

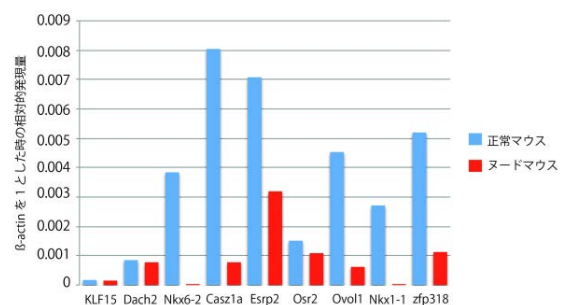


図 2 定量的 PCR による候補遺伝子の発現量の比較

【考察】

今回の解析の結果、DNA マイクロアレイのデータから選抜した Foxn1 標的遺伝子の候補遺伝子の中に、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る転写因子を選抜できた。今後は、これらの候補遺伝子の中から、胸腺上皮細胞に発現している遺伝子を選び、それらの遺伝子の発現時期と発現場所を解析する。同時にそれらの遺伝子が Foxn1 の標的遺伝子であるか、それらの遺伝子の胸腺上皮細胞での役割についても解析を行う。

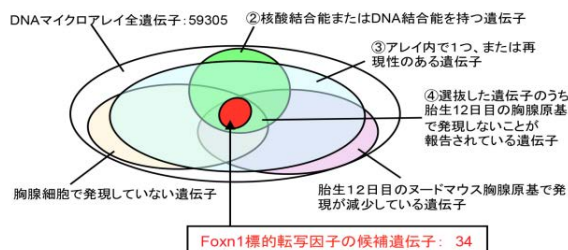


図 1 DNA マイクロアレイの解析結果からの Foxn1 標的候補遺伝子の選抜