LEC ラットの免疫不全原因遺伝子同定について

小瀬博之^{1,2}・山田宣永³・松本耕三²

¹ 国際基督教大学教養学部生命科学デパートメント

² 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部附属動物実験施設

³ 京都大学大学院農学研究科応用生物科学動物育種学分野

Cloning of a gene responsible for T helper immunodeficiency in the LEC rat

Hiroyuki KOSE^{1,2}, Takahisa YAMADA³, Kozo MATSUMOTO²

¹ Department of Life Science, Division of Natural Sciences, International Christian University

² Division of Animal Research Resources, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School

³ Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

はじめに

我々は日常ごく自然な形で、自分を自分と認識し、他人を他人と認識するが、自己 (self) と非自己 (non-self) をどのように厳密に識別しているのか、またそもそも自己・非自己を峻別するメカニズムが生じたその起源はどこにあるのか？ 古くて新しい哲学的な問いである。

生物学として「認識」を考えると、その最も端的な現象は神経系よりはむしろ免疫系と言えるかもしれない。哺乳動物で高度に発達した獲得免疫は、異物が体内に取り込まれると、たちどころにそれを排除するよう働く。異物として認識される分子は、いわゆる病原体由来の分子だけではなく人工的に合成された化学物質にも及ぶ。理論的には実に 10 の 15 乗の分子構造を識別できる判別機器が我々の体内に備わっていることになる。そして言うまでもないことであるが、移植医療の現場では、我々自身の防御システムによる拒絶反応を回避することが最大の隘路となっている。

この拒絶反応を担っているのが、T 細胞と呼ばれるリンパ球である。T 細胞の細胞表面に発現する T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR) が、異物を認識するわけであるが TCR は異物を単独では認識する (異物に結合すること) はできない。異物は異物を提示する別の細胞 (マクロファージなど) によって処理される必要がある。例えば、それが病原性ウイルスであるとすると、まずそのウイルスがマクロファージによって貪食され、リソソームで分解される。そして、ウイルス蛋白のある断片が主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) と呼ばれる蛋白質に結合し、細胞膜表面に晒されることになる。TCR は MHC と結合した状態の異物分子をいわばセッ

トで認識するのである。もし MHC に結合している異物 (ポリペプチド、糖鎖、脂質など) が、「自己」と認識されれば、T 細胞はそれを容認し何の反応も示さないが、「非自己」と認識されると、その異物の排除を開始するシグナルを伝達する。後述するように、体内を行き巡る T 細胞は必ず胸腺で「教育」を受けている。すなわち、「自己」を「自己」と認識し、「非自己」を「非自己」と正しく認識する細胞群だけが警備員としてのライセンスを与えられ、胸腺を出て行くことが許される。TCR は α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーであるが、ポリペプチドとしての多様性は抗体分子と同様、ランダムな遺伝子断片の組み換えによって生じる。その一つが胸腺内で、あたかも品質管理のようにチェックされるわけである。自己の蛋白と反応する、つまり自己免疫疾患を引き起こすような T 細胞は排除され (ネガティブセレクション)、外来抗原と程良く反応できる T 細胞は更に分化・誘導がかかる (ポジティブセレクション)。

さて、胸腺内に於ける T 細胞の分化過程で、「自己」「非自己」を区別する能力の獲得と並んで重要な特徴がある。T 細胞はヘルパー T 細胞とキラー T 細胞に大別されるが、どちらかのタイプへ分化するかは胸腺内で決定される。しかも、ヘルパー vs. キラーの系譜選択 (lineage choice) はネガティブ・ポジティブセレクションとはほぼ平行して進行する。ヘルパー T 細胞は体

連絡先: 小瀬博之、国際基督教大学教養学部生命科学デパートメント 〒181-8585 東京都三鷹市 3-10-2
(e-mail: kose@icu.ac.jp)

液性免疫に関与する。つまり、抗体分子を産生する B リンパ球を活性化する。一方のキラー T 細胞は細胞性免疫に関与し、ウイルス感染細胞を傷害する。細胞性免疫は抗体分子が関与しない免疫系である。T 細胞が異物に結合する際、その異物は MHC 分子によって提示されることは既に述べたが、MHC 分子も 2 種類に分類され、T 細胞の分類と対応関係が存在している。すなわち、クラス I MHC 分子が提示する異物を認識する T 細胞はキラー T 細胞に、クラス II MHC 分子が提示する異物を認識する T 細胞はヘルパー T 細胞に分化するのである。実際、クラス I MHC 分子のみを欠損したマウスでは、ヘルパー T 細胞は正常に分化するが、キラー T 細胞は欠損している。クラス II MHC 分子の欠損では、逆のことが起こる。

発生生物学で、ある未分化細胞が運命を決定する時、さまざまなシグナル伝達系が働くことが知られている。未分化細胞は周囲から何らかの信号を受け取るわけだが、多くの場合 1 種あるいは数種類のリガンドが受容体に結合することであるシグナル伝達系が活性化し、それに応じて多様な細胞が生まれてくる。それに対して、ここで問題にしている胸腺の分化は状況が全く異なることを強調しておきたい。つまり、MHC 分子(と異物の複合体)と TCR の相互作用で運命が決定されるのだが、シグナルの送り手である分子 MHC も受け手である TCR も分子的に見ればその実態は膨大な数の分子群であり、無限とも言えるその組み合わせの結果生じる T 細胞のタイプがたった二つのタイプに峻別されるのは驚くべきことである。その分子機構の詳細は未だ不明な点が多い。今回我々が遺伝解析を行った LEC ラットは興味深い T 細胞分化異常を示す。

LEC ラットについて

LEC (Long-Evans Cinnamon) ラットの由来は北海道大学実験生物センターのクローズドコロニー Long-Evans 系ラットである。1975 年にこのコロニーから近交系系統として確立され (Mori ら 1991)、1984 年、24 世代目に黄疸と急性肝炎が見つかり注目を集めた (Sasaki ら 1985; Yoshida ら 1987)。その後の解析で、LEC ラットに顕著に見られる肝障害は、肝臓内で異常に銅が蓄積していること、血清レベルでは ceruloplasmin と銅含有量が低下しているなどの所見から、ヒト Wilson 病のモデルと考えられるようになった。1994 年には LEC ラットにおける肝炎発症遺伝子は Wilson 病原因遺伝子である *Atp7b* と呼ばれる銅輸送遺伝子のオーソログであることが示され、Wilson 病の疾患モデル動物としての地位

が確立した (Muramatsu ら 1994; Wu ら 1994)。この他にも LEC ラットは、医学研究分野で興味深いいくつかの病態を示す。LEC ラットは高頻度で肝臓癌を発症する (Masuda, R. ら 1988)。また、X 線照射に対する感受性が高い (Hayashi ら 1994; Okui ら 1996)。X 線を照射すると急性骨髄細胞死が起こるが、LEC ラットは対照群の半分程度の X 線量で細胞死が誘発される。また、繊維芽細胞を用いた研究で、DNA 損傷の修復機能が低下していることが報告されている (Choudhury ら 2003; Masuda, K. ら 2006)。さらに、免疫系の異常としてヘルパー T 細胞の分化異常が知られている (Agui ら 1990)。これまでのところ、LEC ラットで肝炎以外の疾患原因遺伝子は同定されていない。今回我々が報告した LEC ラットにおける免疫異常原因遺伝子の同定は、先に述べた免疫発生学的観点と疾患モデル動物としての LEC ラット研究への貢献という二つの点で意義深いと考えられる (Asano ら 2007; Kose ら 2007)。

LEC ラットにおいて免疫系の異常が示唆されたのは、ヒト肝炎発症過程において免疫不全が報告されたことによる (Almeida と Waterson 1969; Dudley ら 1972; Singh ら 1984)。実際、LEC ラットの血清中では IgG 免疫グロブリンレベルが著しく低下している (Matsumoto ら 1989)。抗体分子を産生する B 細胞は T 細胞の刺激を受けて抗体を分泌すること、また LEC ラットの胸腺組織は際だって退縮していることから、T 細胞の分化異常の可能性が考えられた。我々は T 細胞の中でもヘルパー T 細胞が特異的に減少していることを報告した (Agui ら 1990)。ヘルパー T 細胞とキラー T 細胞はそれぞれ CD4、CD8 という膜蛋白質を発現しており、と同時にこれらの蛋白質が T 細胞のアイデンティティを決めている。以降ここでは、CD4 陽性細胞はヘルパー T 細胞、CD8 陽性細胞はキラー T 細胞と同義として取り扱うことにする。

原因遺伝子のマッピング

胸腺内での T 細胞を抗 CD4 及び抗 CD8 抗体を使って FACS 解析を行うと図 1 のような結果が得られる (Janeway 1992; Germain 2002)。CD4 と CD8 蛋白質の発現量から 4 つの分画に分けられるが、それぞれが胸腺内での発生途中の段階に対応している (後述)。LEC ラットの胸腺内では、CD4 陽性細胞の数が野生型系統 (WKAH 系統) の 5% 程度に減少している (図 1b)。この表現型を、*thid* (T-helper immuno deficiency) と名付け (Yamada ら 1991)、その後の解析で原因遺伝子は劣性かつ単一遺伝子 (あるいは連鎖する複数の遺伝子)

図1. FACS 法による胸腺 T 細胞の解析 縦軸・横軸は CD4、CD8 蛋白質の発現を表す。野生型ラット (a) と比べて、LEC ラット (b) では CD4 陽性細胞が著しく減少している。

であること、また 1 番染色体上腕部の約 30cM の領域にマップされることを示した (Wei ら 1997)。次に LEC 由来の *thid* 領域を WKAH 系統に導入したコンジェニック系統 (WKAH.C-*thid*/Tj) を作成したところ、コンジェニックラットでも LEC ラットと同様の *thid* 表現型が確認された (Sakai ら 1998)。今回我々は新たにスクリーニングして得られた SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) マーカーを用いて、原因遺伝子遺伝子座を *D1Rat328* と *D1Rat6* で挟まれる約 15cM の領域に絞り込んだ (図 2a)。更に詳細にマッピングするため、WKAH.C-*thid*/Tj ラットを WKAH/Slc ラットに交配、第 1 世代を WKAH.C-*thid*/Tj ラットに戻し交配し、1,007 匹の戻し交配群を作成した。これらの個体の表現型解析とハプロタイプ解析の結果、*thid* 原因遺伝子遺伝子座は更に絞り込まれ、*D1Rat148* と AU028456 でマークされる 0.5cM に存在することが明らかとなった (図 2b)。当時公開されていたゲノム情報 (<http://www.ensembl.org/rat>) をバイオインフォマティクス解析したところ、二つの遺伝子、*AH11_RAT* と *Ptprk* (NP_001025073.1) だけが候補遺伝子として残った。続いて行われたゲノム DNA 解析の結果、*ptprk* 遺伝子領域に大きな欠損があることを見いだした (図 2c)。図 2d には PCR 法による *ptprk* 遺伝子のエクソン領域の増幅を示すが、第 4 エクソンから少なくとも第 12 エクソンまでが欠損していることが分かった。*AH11_RAT* を含む近傍の領域には欠損は見いだされなかったもので、我々は *ptprk* を最も有力な *thid* 原因遺伝子と考えた。

また、AU028456 マーカーは *ptprk* 遺伝子第 3 エクソン 5' 端から僅か 4.8kb に位置することが判明した。すなわち *thid* 遺伝子と完全に連鎖したマーカーは *ptprk* 遺伝子内にあることになり、これは *ptprk* が *thid* の原因遺伝子であることを更に強く指示する結果である。

ptprk 遺伝子：配列と発現

次に RACE 法を用いて *ptprk* 遺伝子の完全長とその配列を決定した。ヒト及びマウスホモログとは非常に高い相同性 (98%) が見られた (Jiang ら 1993; Yang ら 1997)。ノーザンブロットによる発現解析の結果を図 3b に示すが、マウス EST database でも報告されている通り、この遺伝子はほぼユビキタスに発現している (図 3)。特に卵巣では非常に高い発現が見られるが、LEC 及び WKAH.C-*thid*/Tj ラットで雌性性異常などは見られない。ゲノム DNA の解析から予想されるように、LEC 及び WKAH.C-*thid*/Tj ラットでは *ptprk* 転写産物は作られていないことを確認した (図 3)。

FTOC (fetal thymus organ culture) による *ptprk* 遺伝子機能アッセイ

PTPRK 蛋白の欠損と *thid* 表現型の因果関係を確立する目的で、次にマウス胎児胸腺組織培養系を用いて RNAi 干渉法によるノックダウンアッセイを行った。まず、short harpin RNA (shRNA) の特異性を検証した (図 4) (Morita ら 2000)。レポーター遺伝子 *DsRed2* の 5' 側に shRNA のターゲット配列 (*ptprk* 遺伝

図 2. ラット第 1 染色体にマップされた *thid* 遺伝子座

(a) 連鎖解析マップ。

最上段の棒線は WKAH.C-*thid* コンジェニック系統の一番染色体 1p12 領域を表す。灰色部分は LEC 系統由来の領域、その両側の白色部分は組み換えが起こっている領域、黒色部分は WKAH 系統由来の領域をそれぞれ示す。棒線の下は遺伝学的距離 (cM) である。矢印は AU028456 マーカーを示す。

(b) ハプロタイプ解析 (WKAH.C-*thid* x WKAH.C-*thid* 戻し交配 (1,007 匹) のハプロタイプ分布を示し、黒塗り

は LEC アレルのホモ接合体、白はヘテロ接合体である。プラス (+) は正常な T 細胞分化、マイナス (-) は *thid* 表現型個体を表す。*thid* 遺伝子座は、*ptprk* 遺伝子の欠損を LEC アレルとして扱っている。*Ptpk* 遺伝子座及び AU028456 マーカーと、*thid* 表現型の間で組み換えが起こった個体は観察されなかった。各列下の数字は、観察された個体数を表す。

(c) サザンプロット法による *ptprk* 遺伝子領域の解析。

第 3 エクソンの近傍に切断点 (break point) があるのわかる。第 7、10 エクソンは欠損している。

(d) PCR 法による *ptprk* 遺伝子エクソンの解析
サザンプロット法の結果と合わせて、少なくとも第 4 から 12 エクソンまで欠損しているこれは、アミノ酸配列の 159 から 718 に対応する。

図 3. ノーザンプロット法による *ptprk* 遺伝子転写産物の解析

(a) LEC ラット、WKAH.C-*thid* ラットでは *ptprk* 遺伝子は全く発現していない。

(b) 大脳、肺、肝臓、腎臓、大腿筋、脾臓、骨髄、胸腺、脂肪、精巣、卵巣における発現プロフィール。

図 4. shRNA の検証実験

ptprk 遺伝子 cDNA 配列由来の RNAi 干渉ターゲット配列 (42bp)、及び非ターゲット配列をそれぞれ DsRed 遺伝子下流に繋いだレポーター遺伝子ベクターを作成し、レトロウィルスを用いて DO11.10 T 細胞ハイブリドーマ株に移入 (transfection) した。移入細胞を FACS 法で分離し、続いてターゲット配列を認識する hsRNA をエンコードしたベクターを同様にレトロウィルスを用いて移入した。hsRNA ベクターのレポーター遺伝子である GFP シグナルにより FACS 法を用いて移入細胞を分離した。もし配列特異的に RNA 干渉で分解しているなら、RNAi ターゲットを下流に繋いだ DsRed2 遺伝子のシグナルは低下することが期待される。

子由来の約 40bp) を繋いだ場合と非ターゲット配列を繋いだ場合を比較している。shRNA 非存在下では、どちらも DsRed2 シグナルを発するが、shRNA をエンコードしたウイルスで形質転換を導入すると、DsRed 遺伝子の下流にターゲット配列をもつ場合にのみ DsRed 蛍光シグナルの低下が観察された (図 5a)。このことは、shRNA は *ptprk* 由来のターゲット配列配列を認識し、RNA 分子を分解していることを示している。

次にこの shRNA 配列を胎児胸腺細胞で発現させたところ、胸腺内の CD4 陽性細胞発生経路が阻害されることがわかった (図 5b, c) (Ueno ら 2005)。CD4 陽性細胞の減少は LEC ラットと比較して軽度であるが、以上の結果は PTPRK 蛋白の機能が T 細胞分化に必須であること、しかも胸腺ストローマ細胞ではなく、T 細胞側で発現することが重要であることを示唆している (Agui ら 1991; Sakai ら 1995)。

Ptrpk は CD4 陽性細胞の機能的成熟過程にも重要である

次に量的 PCR 法を用いて胸腺内の T 細胞分化過程に於ける *ptprk* 遺伝子発現プロファイルを追跡してみた。

胸腺前駆細胞は骨髄で生まれる。そして胸腺に入り込むのだが、この時は CD4 も CD8 も発現していないので、ダブルネガティブ (DN) と呼ばれる。次に TCR の組み換えが起こり、ネガティブセクションをくぐり抜けた細胞は CD4 と CD8 を発現する。この段階をダブルポジティブ (DP) と言う。そして、続いて起こるポジティブセクションで CD4 陽性細胞へと分化する細胞は徐々に CD8 遺伝子を下方制御し、CD4 遺伝子のみを発現するヘルパー T 細胞になる。キラー T 細胞では逆のことが起こる。

ptprk 遺伝子は胸腺に入ると直ぐに発現が開始する。ところが、DP 細胞では一旦発現が低下し、CD4 陽性

図 5. *Ptpkr* の下方制御は CD4 陽性細胞の発生を阻害する
(a) マウス *ptprk* に対する shRNA の RNA 干渉効率について (実験詳細は図 4 を参照) パネル右上の数字は平均蛍光密度を表す。実践は shRNA ベクター、点線は空ベクターを表す。
(b) 胎児胸腺組織培養で *Ptpkr* を下方制御すると CD4 陽性細胞の正常発生が抑制される。空ベクター (control) と shRNA ベクター (*Ptpkr* knockdown) で比較した。数字は各画分の細胞数をパーセンテージで表した。
(c) *Ptpkr* shRNA による影響の統計解析塗りつぶしとハッチは、対照群と *Ptpkr* ノックダウン群をそれぞれ示す。誤差は SD (n=3)、*p<0.001 である。

図 6. 胸腺内 T 細胞分化過程に於ける *ptprk* 発現プロフィール
(a) 胸腺とリンパ節での *Ptpkr* 発現パターン。BM、骨髄；DN、ダブルネガティブ、DP、ダブルポジティブ；CD4、CD4 陽性細胞；CD8、CD8 陽性細胞。
(b) 末梢 T 細胞での *Th-POK/cKrox* 遺伝子の発現レベルの比較 *Gapdh* 遺伝子に対する相対的な発現レベルで比較している。誤差は SD (n=4)。

細胞でのみ再び活性化するという経過を辿る (図 6a)。そして末梢に出て行った T 細胞では発現は再び抑制される。以上の観察結果からどのようなことが推測できるだろうか？我々は胸腺侵入直後の最初の誘導が系譜選択選択に重要であり、CD4 陽性細胞での再活性は系譜選択後の成熟過程に重要ではないかと考えている (後述)。

ptprk 遺伝子はどのような分子機構で T 細胞分化に働いているのだろうか？Th-POK/cKrox は CD4 陽性細胞の分化に必須な転写因子である (He ら 2005; Sun ら 2005)。LEC ラット胸腺でこの遺伝子の発現を調べたところ、その発現量が低下していたものの、完全に欠失しているわけではなかった。Th-POX/cKrox は CD4 陽性細胞でのみ発現することが知られていることを考えると、Th-POX/cKrox 転写活性の低下というよりは、CD4 細胞数の減少を繁栄していると推測され、Th-POX/cKrox は *Ptpkr* の下流で制御されているわけではないと考えられる。

次に我々は末梢組織の T 細胞を調べた。LEC ラットでは、加齢に伴い末梢での CD4 陽性 T 細胞が徐々に上昇することが知られている。加齢で末梢に蓄積してくる CD4 陽性細胞の由来は明らかではないが、これら

のT細胞は機能不全であることが明らかになっている (Sakai ら 1995; Sakai ら 1998)。mitogen や T 細胞依存性抗原に応答して IL2 や IL4 などのサイトカインを産生できないのである。興味深いことに、これらの LEC ラット末梢 CD4 細胞に於ける Th-POX/cKrox 遺伝子の発現は野生型系統と同等の発現量を示した (図 6b)。Th-POX/cKrox 機能欠損変異体においては、CD4 陽性細胞分化は完全に抑制される (Dave ら 1998)。また、LEC ラットに見られるように末梢に CD4 陽性細胞が蓄積することもない。さらに Th-POX/cKrox 遺伝子を強制発現させると、本来なら CD8 陽性細胞になる細胞を CD4 陽性細胞に誘導することも示されている (Sun ら 2005)。このような結果から、Th-POX/cKrox は CD4 陽性細胞のマスター遺伝子として機能していると考えられているが、LEC ラットの末梢 CD4 陽性細胞ではその発現が正常だったことから、Th-POX/cKrox 遺伝子だけでは系譜選択後の成熟過程不十分であると考えられる。そして、同時にこの結果は Ptpk が系譜選択過

程のみならず、その後の成熟過程の両方において働いていることを示唆している。

結語

現在の作業仮説を図 7 に示す。ptprk 遺伝子欠損の結果、Th-Pox/cKrox 遺伝子の発現量に変化がないことから、ptprk 遺伝子は系譜選択過程において、Th-Pox/cKrox の下流で働くか (図 7 点線)、あるいは平行してシグナルを伝達すると考えられる。CD4 と CD8 の系譜選択には、TCR シグナルの活性強度あるいは活性持続時間によって決定すると考えられている (Matechak ら 1996; Sharp ら 1997; Yasutomo ら 2000)。中程度あるいは持続した TCR シグナルを受けた T 細胞は CD4 陽性細胞へ分化し、弱いあるいは一時的なシグナルを受けた細胞は CD8 陽性細胞へと分化する (Yasutomo ら 2000)。よって PTPRK は例えば TCR 下流の基質を脱リン酸化することで、シグナルを強めているのかも知れない。また、別の可能性として、Ptpk は系譜選択そのものではなく、CD4 陽性細胞の生存に寄与している可能性も否定できない。今後、ptprk 遺伝子のノックアウトマウスを用いた解析がこれらの問いに答えを与えるものと期待される。

References

- Agui T, Oka M, Yamada T, Sakai T, Izumi K, Ishida Y, Himeno K, Matsumoto K. 1990. Maturation arrest from CD4+8+ to CD4+8- thymocytes in a mutant strain (LEC) of rat. *Journal of Experimental Medicine*, 172: 1615–1624.
- Agui T, Sakai T, Himeno K, Matsumoto K. 1991. Bone marrow-derived progenitor T cells convey the origin of maturational arrest from CD4+CD8+ to CD4-CD8+ thymocytes in LEC mutant rats. *European Journal of Immunology*, 21: 2277–2280.
- Almeida JD, Waterson AP. 1969. Immune complexes in hepatitis. *Lancet*, 2: 983–986.
- Asano A, Tsubomatsu K, Jung CG, Sasaki N, Agui T. 2007. A deletion mutation of the protein tyrosine phosphatase kappa (Ptpk) gene is responsible for T-helper immunodeficiency (thid) in the LEC rat. *Mammalian Genome*, 18: 779–786.
- Choudhury S, Zhang R, Frenkel K, Kawamori T, Chung FL, Roy R. 2003. Evidence of alterations in base excision repair of oxidative DNA damage during spontaneous hepatocarcinogenesis in Long Evans Cinnamon rats.

図 7. 胸腺内 T 細胞系譜選択における Ptpk の分子機構モデル 本文参照

- Cancer Research, 63: 7704–7707.
- Dave VP, Allman D, Keefe R, Hardy RR, Kappes DJ. 1998. HD mice: a novel mouse mutant with a specific defect in the generation of CD4(+) T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 95: 8187–8192.
- Dudley FJ, Fox RA, Sherlock S. 1972. Cellular immunity and hepatitis-associated, Australia antigen liver disease. *Lancet*, 1: 723–726.
- Germain RN. 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature Reviews Immunology*, 2: 309–322.
- Hayashi M, Okui T, Endoh D, Sato F, Kasai N, Namioka S. 1994. Radiation hypersensitivity of LEC strain rats controlled by a single autosomal recessive gene. *Mutation Research*, 314: 135–142.
- He X, He X, Dave VP, Zhang Y, Hua X, Nicolas E, Xu W, Roe BA, Kappes DJ. 2005. The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature*, 433: 826–833.
- Janeway Jr CA. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annual Review of Immunology*, 10: 645–674.
- Jiang YP, Wang H, D'Eustachio P, Musacchio JM, Schlessinger J, Sap J. 1993. Cloning and characterization of R-PTP-kappa, a new member of the receptor protein tyrosine phosphatase family with a proteolytically cleaved cellular adhesion molecule-like extracellular region. *Molecular and Cellular Biology*, 13: 2942–2951.
- Kose H, Sakai T, Tsukumo S, Wei K, Yamada T, Yasutomo K, Matsumoto K. 2007. Maturation arrest of thymocyte development is caused by a deletion in the receptor-like protein tyrosine phosphatase kappa gene in LEC rats. *Genomics*, 89: 673–677.
- Masuda K, Miyamoto T, Cho AR, Agui T. 2006. Analysis of the cell cycle of fibroblasts derived from the LEC rat after X-irradiation. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 53: 141–148.
- Masuda R, Yoshida MC, Sasaki M, Dempo K, Mori M. 1988. High susceptibility to hepatocellular carcinoma development in LEC rats with hereditary hepatitis. *Japanese Journal of Cancer Research*, 79: 828–835.
- Matechak EO, Killeen N, Hedrick SM, Fowlkes BJ. 1996. MHC class II-specific T cells can develop in the CD8 lineage when CD4 is absent. *Immunity*, 4: 337–347.
- Matsumoto K, Takeichi N, Izumi K, Otsuka H. 1989. Quantitative variation in immunoglobulin G (Igsr-1) in LEC rats associated with spontaneous hepatitis and hepatoma. *Transplantation Proceedings*, 21: 3259.
- Mori M, Yoshida M, Takeichi N, Taniguchi N. 1991. *The LEC Rat A New Model for Hepatitis and Liver Cancer*. Tokyo, Springer-Verlag.
- Morita S, Kojima T, Kitamura T. 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Therapy*, 7: 1063–1066.
- Muramatsu Y, Yamada T, Miura M, Sakai T, Suzuki Y, Serikawa T, Tanzi RE, Matsumoto K. 1994. Wilson's disease gene is homologous to hts causing abnormal copper transport in Long-Evans cinnamon rats. *Gastroenterology*, 107: 1189–1192.
- Okui T, Endoh D, Arai S, Isogai E, Hayashi M. 1996. Cross-sensitivity of X-ray-hypersensitive cells derived from LEC strain rats to DNA-damaging agents. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58: 1067–1071.
- Sakai T, Agui T, Matsumoto K. 1995. Abnormal CD45RC expression and elevated CD45 protein tyrosine phosphatase activity in LEC rat peripheral CD4+ T cells. *European Journal of Immunology*, 25: 1399–1404.
- Sakai T, Agui T, Wei K, Oka M, Hisaeda H, Nagasawa H, Himeno K, Matsumoto K. 1998. Unresponsiveness of CD4-8+/- thymocytes to lectin stimulation in LEC mutant rats. *Immunology*, 95: 219–225.
- Sasaki M, Yoshida M, Kagami K, Takeichi N, Kobayashi H, Dempo K, Mori M. 1985. Spontaneous hepatitis in an inbred strain of Long-Evans rats. *Rat News Letter*, 14: 4–6.
- Sharp LL, Schwarz DA, Bott CM, Marshall CJ, Hedrick SM. 1997. The influence of the MAPK pathway on T cell lineage commitment. *Immunity*, 7: 609–618.
- Singh NK, Goyal AK, Srivastava PK, Gupta RM, Tripathi KK. 1984. Immunological status in acute viral hepatitis and fulminant hepatic failure. *Journal of the Indian Medical Association*, 82: 281–283.
- Sun G, Liu X, Mercado P, Jenkinson SR, Kypriotou M, Feigenbaum L, Galera P, Bosselut R. 2005. The zinc finger protein cKrox directs CD4 lineage differentiation during intrathymic T cell positive selection. *Nature*

- Immunology, 6: 373–381.
- Ueno T, Liu C, Nitta T, Takahama Y. 2005. Development of T-lymphocytes in mouse fetal thymus organ culture. *Methods in Molecular Biology*, 290: 117–133.
- Wei K, Muramatsu Y, Sakai T, Yamada T, Matsumoto K. 1997. Chromosomal mapping of the T-helper immunodeficiency (thid) locus in LEC rats. *Immunogenetics*, 47: 99–102.
- Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW. 1994. The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nature Genetics*, 7: 541–545.
- Yamada T, Natori T, Izumi K, Sakai T, Agui T, Matsumoto K. 1991. Inheritance of T helper immunodeficiency (thid) in LEC mutant rats. *Immunogenetics*, 33: 216–219.
- Yang Y, Gil MC, Choi EY, Park SH, Pyun KH, Ha H. 1997. Molecular cloning and chromosomal localization of a human gene homologous to the murine R-PTP-kappa, a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Gene*, 186: 77–82.
- Yasutomo K, Doyle C, Miele L, Fuchs C, Germain RN. 2000. The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature*, 404: 506–510.
- Yoshida MC, Masuda R, Sasaki M, Takeichi N, Kobayashi H, Dempo K, Mori M. 1987. New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat. *The Journal of Heredity*, 78: 361–365.