原 著

順天堂医学 37 (2)
P. 208~217 (1991)

トランスジェニックマウスの胸腺における

ユニークな導入Thy-1.1 遺伝子の発現様式

Expression pattern of Thy-1.1 antigen in transgenic mice

淡 路 正 則*1) 斎 藤 十 一*1) 野 沢 慎 吾*2)

MASANORI AWAJI, M.D. JU-ICHI SAITOH, M.D. SHINGO NOZAWA, M.D.

阿 部 雅 明*2) 西 村 裕 之*2)

MASAAKI ABE, Ph.D. & HIROYUKI NISHIMURA, Ph.D.

マウスの胸腺細胞・T細胞のマーカー抗原である Thy-1 分子は、正常では胸腺細胞と末梢T細胞の全てに発現されている。この Thy-1 抗原を code する遺伝子には Thy-1.1 と Thy-1.2 という 2 つの allotype が存在するが、今回われわれは Thy-1.2 マウスの受精卵に Thy-1.1 遺伝子を transgene し、その発現様式を調べてみた。その結果、内在性 Thy-1 (Thy-1.2) 分子は胸腺細胞と末梢T細胞の両者に発現していたが、導入 Thy-1.1 遺伝子の発現は、胸腺細胞には認められたが末梢T細胞には認められなかった。これは導入した Thy-1.1 遺伝子 DNA が、末梢T細胞での発現を規定する cis-acting な調節配列を含まないため、発現調節因子との相互作用が起こらないためと考えられた。一方、胸腺細胞における導入 Thy-1.1 遺伝子の発現を詳細に検討した結果、胸腺細胞の大半を占める未分化な $CD3^-$ /T cell receptor (TCR) $^-$ 細胞においては、導入した Thy-1.1 遺伝子の発現はほぼ全てにみられたが、分化した $TCR^+ CD4^+$ または $CD8^+$ single positive (SP) 胸腺細胞には、Thy-1.1 を表現するものと表現しないものの 2 つのグループが認められた。このことから、すでに分化していると考えられていた SP 胸腺細胞の中にも、末梢T細胞へと移行する際に胸腺内で導入された Thy-1.1 遺伝子が消失していくという、もう一つの分化過程の存在する可能性が示唆された。一方、double negative (DN) 胸腺細胞においては、全ての $CD3^+ / TCR^+$ 細胞は Thy-1.1 $^-$ であった。これらの結果から、 $CD3^+ DN$ 細胞の成熟過程は、 $CD3^+ SP$ 細胞とは異なっていると考えられた。以上の結果から、今回われわれが生産した Thy-1.1 トランスジェニックマウスは、これまで知られていなかった $CD3^+$ 胸腺細胞の最終成熟過程における細胞内の、諸現象の解析に有用なモデルであると考えられた。

索引用語: Thy-1.1, 胸腺細胞成熟, トランスジェニックマウス

Key words: Thy-1.1, thymocyte maturation, transgenic mouse.

緒 言

Thy-1 は分子量 25kDa, ホスファチジルイノシ

トールを介して細胞膜に結合している膜蛋白質である¹⁾。その一次構造は、免疫グロブリンV領域のドメイン類似の構造をもち、MHC (主要組織適合性遺伝子複合体) の遺伝子産物、T細胞受容体 (TCR) などを含む免疫グロブリン超遺伝子族の一員であり、しかもその中で、特に基本的・原始的な構造を保持した分子と考えられている²⁾。Thy-1 がどのような機能を担っているかは未だ明らかで

*1) 順天堂大学医学部産婦人科学講座

*2) 順天堂大学医学部病理学第二講座

*1) Department of Obstetrics and Gynecology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

*2) Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan.

〔Oct. 22, 1990 原稿受領〕(Nov. 22, 1990 掲載決定)

はない。広い種において脳に多量に発現されており、シナプス形成の際何らかの認識機序に関わるものと推測されている。Thy-1 は最初マウスの胸腺におけるアロ抗原として見いだされたものであり、89番目のアミノ酸残基の Arg と Gln の違いにより Thy-1.1 と Thy-1.2 の2つの表現型を有し²⁾³⁾⁴⁾、マウスにおけるT細胞や胸腺細胞のマーカーとして重要な指標となっている⁵⁾。

T細胞は抗原受容体 (T細胞受容体 TCR) によって抗原を認識するが、成熟したT細胞は MHC の class I 遺伝子産物を介して抗原を認識するもの (CD 8⁺ T細胞)、および class II 遺伝子産物を介して抗原を認識するもの (CD 4⁺ T細胞) の主に2種類に大別される。胸腺細胞は CD 4・CD 8 の発現について、double negative (DN)・double positive (DP)、および CD 4 あるいは CD 8 single positive (SP) の細胞を含み、大部分の胸腺細胞は DN→DP→SP の分化過程をとると考えられている。しかしながら、DN胸腺細胞の一部は機能的に成熟した性質を示すことが知られている。SP胸腺細胞は、従来表現型において成熟したT細胞と同様と考えられてきた。しかし、SP胸腺細胞から末梢T細胞への分化過程があるのか、あるいはSP胸腺細胞は、すでに末梢T細胞と同等の分化過程に達しているのかに関しては未だ明らかになっていない。

Thy-1 はマウスにおいては、未だ胸腺における分化過程にはいる以前の細胞 (pre-T細胞)、DN・DP・SP 胸腺細胞および末梢T細胞に一貫して発現している。Thy-1 の脳における発現は広い種において共通しているが、リンパ系の細胞における発現パターンは種によって異なっている⁶⁾⁷⁾。マウスと異なりヒトでは、大部分の胸腺および末梢T細胞にはThy-1抗原の発現は認められない⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。ラットでは胸腺細胞には発現するが、末梢T細胞には発現しない¹¹⁾¹²⁾。

Thy-1 遺伝子の組織特異的発現調節の機構を探る目的で、Gordon ら¹³⁾は Thy-1.2 の遺伝子についてホモ接合体であるマウス受精卵の前核に、ヒト Thy-1 およびマウス Thy-1.1 遺伝子を導入

したトランスジェニックマウスを生産した。その結果、種による Thy-1 発現の組織特異性の違いは、Thy-1 遺伝子発現調節に係わる調節蛋白質 (trans-acting factor) の相違によるものではなく、Thy-1 遺伝子 DNA 上の近傍に存在する調節配列 (cis-acting element) の違いに基づくものであることが示唆されている。これらの Thy-1.1 トランスジェニックマウスにおいて明らかにされた重要な知見のひとつは、末梢T細胞において内在性 Thy-1.2 遺伝子が発現しているにもかかわらず、導入マウス Thy-1.1 遺伝子産物が発現しなかったことである。

本研究では、Thy-1.2 遺伝子の発現しているマウスに Thy-1.1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを生産し、導入遺伝子の胸腺細胞における発現様式を、他の分化マーカーとの対比において詳細に解析した。その結果、導入した Thy-1.1 遺伝子の発現は、CD 3⁺/TCR α/β ⁺ SP 胸腺細胞のT細胞分化過程において、細胞内の trans-acting なシグナルの変化を反映した指標として有用な分化マーカーとなり得ることが示唆された。

実験材料と実験方法

1. マウス

受精卵採取のための交配用マウスとして、C57BL/6 (♂) および (C57BL/6 X DBA/2) F1 (B6D2F1) (♀)、また偽妊娠代理母および里親用の雌マウス、また偽妊娠マウス作製のための精管結紮雄マウス用として ICR マウスを静岡実験動物センターより購入した。全てのマウスは14:10 (19時消灯 5時点灯) の明暗サイクルで飼育した。受精卵採取用に6~8週齢の雌マウスを用い、過排卵処置として46~48時間の間隔で PMS および HCG (ともに帝国臓器) 5単位を腹腔内に注射した。HCG 投与後すぐ雄マウスと交配し、翌日腔栓の確認されたマウスより採卵した。偽妊娠用の雌マウスも、同日にあらかじめ精管結紮しておいた雄マウスと交配し、翌日腔栓の確認されたマウスを卵管内移植に用いた。

2. Thy-1.1 ゲノム DNA の調整

マイクロインジェクションに用いた Thy-1.1 遺伝子 DNA は、Thy-1.1 遺伝子をもつ AKR/J マウスの胸腺リンパ腫、BW5147 細胞より調整した遺伝子ライブラリーから単離した¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。低融点アガロースゲルで EcoRI による 8.2kb の遺伝子断片を精製したのち、受精卵の雄性前核に注入した¹³⁾。これらの操作は、Leitz 社製のマイクロマニピュレーターおよびノマルスキー微分干渉装置付き倒立顕微鏡を使用した。インジェクション後の受精卵を偽妊娠マウスの卵管内へ移植し、陰栓確認後 20 日目に仔マウスを得た。自然分娩に至らないマウスは分娩予定日当日に帝王切開にて仔マウスを娩出し、里親に哺育させた。6 週齢に達した時点で個体識別後、Thy-1.1 遺伝子が導入されたかどうかを調べるために尾の一部を切断して DNA を抽出し、サザンブロット法にて解析を行い、外来遺伝子の組み込まれたマウスを初代トランスジェニックマウスとした。その後トランスジェニック系を樹立するために、そのマウスを C57BL/6 マウスへ 6 回退交配し、出生した仔マウス (F 6) が 6 週齢になった時点で解析に用いた。

3. フローサイトメトリー

Two-color analysis は FACStar (Becton Dickinson Mountain View CA) を、three-color analysis は FACScan または FACStar-plus (Becton Dickinson) を用いて行った。細胞染色用のモノクローナル抗体としては、Thy-1.1 (NEI-002 NEN Research Products Boston MA), Thy-1.2 (30-H12), CD 3 (2 C11)¹⁷⁾¹⁸⁾, T 細胞分化抗原のひとつである CD 4 (Ly-11 GK1.5) や CD 8 (Ly-2/53-6.7), T 細胞受容体のひとつである TCR α/β (H57-597)¹⁹⁾ や、TCR γ/δ (3 A10)²⁰⁾ に対する抗体を用いた。細胞はまず FITC ラベル、Phycoerythrin (PE) ラベル、およびビオチン化したモノクローナル抗体とともにインキュベーションし、次いで streptavidin-allophycocyanin (APC) (Becton Dickinson) で標識した。死滅した細胞を染色するために、これらの細胞を 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 7 AAD (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) および 10

%FCS を含む培養液に再懸濁した。

4. 胸腺 single positive (SP) 細胞の調製

CD 4⁺ または CD 8⁺ SP 胸腺細胞の調整では、まず最初にウサギ補体の存在下に各々抗 CD 8, または抗 CD 4 モノクローナル抗体による細胞障害処理を行い、次いで抗ラット IgG ヒツジ抗体 (DynaSkoyen Norway) の結合したマグネティックビーズを用いて、モノクローナル抗体の結合した残存細胞を除去した²¹⁾。それぞれの分画に残った double negative (DN) 細胞は、three-color 解析によってゲートアウトした。

5. 胸腺 double negative (DN) 細胞の調製

胸腺 DN 細胞はまず補体、抗 CD 4 および抗 CD 8 モノクローナル抗体を用いた細胞障害処理によって分離し、次いで抗ラット IgG ヒツジ抗体の結合したマグネティックビーズを用いて、残存の CD 4⁺ CD 8⁺ 細胞を除去することにより単離した。細胞の純度は、FITC でラベルした抗ラット IgK マウスモノクローナル抗体 (M-21 ヤマサ醤油) で細胞を染めることにより検定し、常に 98% 以上の純度を得た。

結 果

1. 胸腺細胞における導入 Thy-1.1 遺伝子の発現様式

Thy-1.1 遺伝子の導入された 6 週齢のトランスジェニックマウス (F 6) の胸腺および脾臓を用いて、導入 Thy-1.1 と内在性 Thy-1.2 の発現を two-color 解析によって調べた。Fig.-1a のように、導入 Thy-1.1 遺伝子の発現は脾臓 T 細胞には認められなかった。胸腺細胞においては、内在性の Thy-1.2 は殆ど全ての胸腺細胞に発現していたが、導入された Thy-1.1 の発現は胸腺細胞の約 88% に限られていた (Fig.-1b)。対照として、Thy-1.1 と Thy-1.2 の対立遺伝子についてヘテロ接合体である (AKR X C57BL/6) F1 マウスの胸腺細胞における発現様式を調べたところ、Thy-1.1・Thy-1.2 とともに全ての細胞で同様の発現が見られた (Fig.-1c)。

Fig. -1 Dual-color flow cytometry analysis for Thy-1.1 vs. Thy-1.2 gene expressions of spleen cells (a) and thymocytes (b) between the 6-mo-old Thy-1.1 transgenic mouse and the (AKR X B6) F1 mouse (6-mo-old) heterozygous for Thy-1.1 and Thy-1.2 alleles(c). Note that in contrast to (AKR X B6) F1 mouse cells, all of the spleen T cells and 12% of the thymocytes of transgenic mouse are negative for transgenic Thy-1.1 expression.

Fig. -2 Dual-color flow cytometry analysis for the relation between T cell receptor (CD 3, a and c; TCR α/β , b and d) and Thy-1 expressions (transgenic Thy-1.1, a and b; endogenous Thy-1.2, c and d) on thymocytes from a 6-mo-old Thy-1.1 transgenic mouse. Numbers within the panels are percentages of cells.

Thy-1.1 トランスジェニックマウスの胸腺細胞における Thy-1.1・Thy-1.2 と、CD 3・TCR α/β との発現の相関を two-color 解析によって調べた (Fig.-2). 殆ど全ての CD 3/TCR α/β 胸腺細胞は Thy-1.2 陽性であったが (Fig.-2 c, d), Thy-1.1 の発現についてみると、これらの細胞は陰性群と弱陽性群に分かれた (Fig.-2 a, b).

2. 胸腺 single positive (SP) 細胞における Thy-1.1 の発現

殆ど全ての CD 4⁺ または CD 8⁺ 胸腺SP細胞において、内在性 Thy-1.2 の発現は陽性であったが (Fig.-3 e, f), 導入 Thy-1.1 の発現については、Thy-1.1⁺ と Thy-1.1⁻ の2つのグループに均等に分けられた (Fig.-3 a, b). そこでCD 4, および CD 8⁺ SP胸腺細胞を各々分離したのち、Thy-1.1 と TCR の発現様式の相関を調べてみた. その結果 Fig.-4 a, b のように、CD 4⁺ および CD 8⁺ SP分画双方において、TCR α/β 胸腺細胞は Thy-1.1 陰性と陽性の2つの細胞亜集団からなっていた. なお、Thy-1.1⁺ と Thy-1.1⁻ の2つの集団の中で、TCR α/β の発現量に差は認め

Fig. -3 Three-color flow cytometry analysis for expressions of transgenic Thy-1.1 (a-d) vs. endogenous Thy-1.2 (e-h) in the CD4⁺ SP (a, e), CD8⁺ SP (b, f), DP (c, g) and DN (d, h) thymocytes from the 6-month-old Thy-1.1 transgenic mouse. Numbers within the panels are percentages of cells.

Fig. -4 Three-color flow cytometry analysis for expressions of transgenic Thy-1.1 vs. T cell receptors (TCR α/β , a and b; TCR γ/δ , c and d) in each SP thymocytes (CD4⁺ SP, a and c; CD8⁺ SP, b and d) from the 6-month-old Thy-1.1 transgenic mouse. Each CD4⁺ and CD8⁺ SP thymocytes were isolated from DP thymocytes, as described in Materials and Methods. These SP thymocytes were stained for CD4 or CD8, Thy-1.1 and TCR (TCR α/β or TCR γ/δ) and subjected to the three-color flow cytometry analysis. Analysis were made after gating out the DN thymocytes. Numbers within the panels are percentages of cells. Note that either CD4⁺ or CD8⁺ SP thymocytes are separated into two groups, one Thy-1.1⁺ and one Thy-1.1⁻.

られなかった。

同様の結果が TCR γ/δ と Thy-1.1 との発現の関係の間にもみられたが (Fig. -4 c, d), CD8⁺ SP 胸腺細胞では, Thy-1.1⁺ よりも Thy-1.1⁻ 細胞に TCR γ/δ の発現量が多い傾向があった (Fig.-4 d)。

3. Double positive (DP) および double negative (DN) 胸腺細胞における Thy-1.1 の発現

大部分の CD4⁺ CD8⁺ DP 胸腺細胞は Thy-1.1⁺ であったが, 少ないながらも有意な量の (5.7%) Thy-1.1⁻ 細胞の存在が示された (Fig.-3 c). この際, 内在性 Thy-1.2 は全ての DP 胸腺細胞 (99.97%) に表現されていた (Fig.-3 g)。

DN 胸腺細胞における導入 Thy-1.1 と内在性 Thy-1.2 の発現を two-color 解析によって調べた (Fig.-5). その結果, DN 胸腺細胞は Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺・Thy-1.1⁻

Fig. - 5 Dual-color flow cytometry analysis of transgenic Thy-1.1 vs. endogenous Thy-1.2 expression on DN thymocytes from the 6-mo-old Thy-1.1 transgenic mouse.

／Thy-1.2⁺・Thy-1.1⁻／Thy-1.2⁻の表現型をもつ3つのサブセットに分かれ、その割合は各々14.2％・67.8％・18.0％であった。Thy-1.1⁺／Thy-1.2⁻を示す細胞は見られなかった。

DN胸腺細胞における導入 Thy-1.1 と TCR との発現の関係を three-color 解析によって調べた (Fig.- 6). DN胸腺細胞のうち CD 3⁺ (全DN胸腺細胞中10.3％) のものは全て Thy-1.1⁻であったが、それらの細胞のうちのはほぼ80％ (全DN細胞中の7.9％) は内在性 Thy-1.2⁺であった (Fig.- 6 a, b). このように CD 3⁺ DN 胸腺細胞の大部分は、末梢T細胞の表現型である Thy-1.1⁻／Thy-1.2⁺を示した。なお、TCR α／β⁺ DN 細胞について調べたところ、そのほぼ半分 (3.7％中の1.7％) が、また TCR γ／δ⁺ DN 細胞ではそのほぼ全て (3.2％中の2.9％) が、Thy-1.1⁻／Thy-1.2⁺であった (Fig.- 6 c～f).

Fig. - 6 Flow cytometry analysis for expressions of T cell receptors (CD3, TCR α / β and TCR γ / δ), transgenic Thy-1.1 and endogenous Thy-1.2 on DN thymocytes from the 6-mo-old Thy-1.1 transgenic mouse. Numbers within the panels are percentages of cells. Note that there is no population with the CD 3 / TCR⁺ Thy-1.1⁺ phenotype.

考 察

Thy-1.2 マウスの受精卵に、Thy-1.1 遺伝子 DNA (EcoRI による8.2kb の DNA 断片) を導入したトランスジェニックマウスの1系統を生産し、導入 Thy-1.1 遺伝子の発現様式を調べた。その結果、導入 Thy-1.1 遺伝子の発現は胸腺細胞には認められたが末梢T細胞には認められなかった。Thy-1.1 トランスジェニックマウスに関し同様の結果を他のグループも報告しているが¹³⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾、今回われわれが新しく得た発見の一つは、胸腺細胞中において DP 胸腺細胞の大部分は Thy-1.1⁺

であったが、より分化した $CD4^+$ または $CD8^+$ S P 胸腺細胞中に Thy-1.1⁺, および Thy-1.1⁻ の 2 つの亜集団が存在するという点である。両者間において、細胞表面の CD3/TCR 複合体の発現量に差は見られないので、この Thy-1.1⁺ 胸腺細胞群は末梢T細胞と同様に、Thy-1.1⁻ であるSP胸腺細胞への分化過程にある細胞群と考えられる。従来から胸腺のSP細胞と、末梢T細胞とを識別する良い手段がなかったため、今回のこの発見は、T細胞の最終的な成熟過程を研究するための良いモデルとなる可能性がある。

Thy-1 遺伝子発現の組織特異性における調節機構は、ゲノム DNA 上に複数存在する cis-acting element (組織特異的プロモーター、エンハンサーなど) と、trans-acting factor (遺伝子発現調節にかかわる蛋白質) との相互作用によって決定されていると考えられるが、Gordon ら¹³⁾は、種による発現の組織特異性の相違は、Thy-1 遺伝子上の発現の組織特異性の調節に関わっている cis-acting element の種による違いによるものであることを示唆している。最近 Vidal ら²⁴⁾は、Thy-1 遺伝子上の組織特異的な cis-acting regulatory element の分布を解析し、ゲノム DNA 上に散在する複数の調節因子が独立に特定の組織での発現を規定していることを報告した。今回われわれが生産したトランスジェニックマウスにおいて、導入 Thy-1.1 遺伝子発現がSP胸腺細胞の一部と末梢T細胞で見られなかったのは、導入した Thy-1.1 ゲノム DNA クローンに末梢T細胞における発現を規定する cis-acting element が欠如していたためと考えられる。

胸腺細胞成熟過程は、様々なT細胞系の機能に係わる遺伝子とその発現を調節する複数の trans-acting factor によってプログラム・制御されているものと思われる^{25) 26)}。また胸腺細胞が末梢T細胞へと成熟していく過程で、細胞内のこれらのtrans-acting なシグナルに機能的・質的な変化があるものと思われる²⁷⁾。細胞表面上にすでに機能的 CD3/TCR 複合体を形成しており、その意味では分化しているといえるSP胸腺細胞にも、なお末梢

T細胞としての機能を獲得するためには、さらに成熟過程を経る必要があると推定される。その過程においてある種の trans-acting なシグナルに質的な変化が要求され、その変化が導入 Thy-1.1 遺伝子の発現に反映されているものと考えられる。

DN胸腺細胞は、導入 Thy-1.1 遺伝子および内在性 Thy-1.2 遺伝子の発現に関して、Thy-1.1⁻/Thy-1.2⁻・Thy-1.1⁻/Thy-1.2⁺・Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺ の 3 つのサブセットに分けられた。Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁻ の表現型をもつ集団は認められなかった。DN胸腺細胞は表現型においても機能的にも様々な異なった集団からなっており²⁸⁾、少なくとも CD3⁻ と CD3⁺ の 2 つのグループに分けられる²⁹⁾。前者より DP・SP、またおそらくは CD3⁺ DN 胸腺細胞が分化するものと考えられている。トランスジェニックマウスのDN胸腺細胞の大半は Thy-1.1⁻/Thy-1.2⁺/CD3⁻ である。このことは胸腺細胞発生の初期において、導入 Thy-1.1 は内在性 Thy-1.2 に遅れて発現されることを示唆している。DP胸腺細胞の殆どが Thy-1.1⁺ なので、殆どの胸腺細胞での Thy-1.1 発現のプロセスが CD4・CD8 の発現と同時に起こっているようである。しかし、少数の Thy-1.1 陰性の CD8⁺/CD4⁻/CD3⁻ 胸腺細胞が存在するという点も注目に価する (Fig.-4b)。このような少数の細胞の起源は今のところ不明である。

CD3⁺ DN 胸腺細胞は、CD3⁺ SP 細胞への分化系統とは異なる別個の亜集団である可能性が考えられている^{30) 31)}。それらの細胞は TCR に対する抗体による刺激に対して反応性を有するので、機能的に成熟した細胞であると考えられている³⁰⁾。全ての CD3⁺ DN 胸腺細胞は Thy-1.1⁻/Thy-1.2⁺ で、表現型においては成熟した末梢T細胞型であった。一方、今回の検索で Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺ の CD3⁺ DN 胸腺細胞の存在は見られなかった。この点は、CD3⁺ SP 胸腺細胞に Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺ の亜集団が存在することと明らかに対照的であり、SP T細胞と成熟 DN T細胞との成熟過程が異なることを示すものと考えられる。

今回の研究から、Thy-1.1⁺ SP 胸腺細胞が末梢

T細胞と比較してどのように機能的に異なっているか、また Thy-1.1⁺, Thy-1.1⁻ の2つのSP胸腺細胞間で TCR のレパートリーに差異が認められるかなどの課題が提出されたが、これらの点については現在研究中である。

ま と め

マウスの Thy-1.1 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを生産し、これらのマウスにおける導入 Thy-1.1 の発現様式を調べ、次のことが明らかになった。

1. 導入 Thy-1.1 の発現は胸腺細胞には認められたが、末梢T細胞には認められなかった。胸腺内において内在性 Thy-1.2 は殆ど全ての胸腺細胞に発現するが、導入 Thy-1.1 の発現は胸腺細胞の約88%に限られていた。このような Thy-1.1 のユニークな発現は、導入遺伝子に一定の cis-acting element を欠くためと考えられた。

2. 全ての CD 4⁺ CD 8⁺ DP 胸腺細胞は内在性 Thy-1.2⁺ であり、その殆どは導入 Thy-1.1 についても陽性であった。

3. 殆ど全ての分化した CD 3⁺/TCR α/β ⁺ の SP胸腺細胞には、内在性 Thy-1.2 の発現はあったが、導入 Thy-1.1 の発現に関しては陽性と陰性の2つのグループに分けられた。この両者間において TCR α/β の発現量に差は認められなかった。このことから、胸腺内SP細胞中にも分化段階の異なる細胞の存在することが示唆された。

4. DN胸腺細胞は、Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺・Thy-1.1⁻/Thy-1.2⁺・Thy-1.1⁻/Thy-1.2⁻ の3つの subpopulation に分けられた。CD 3⁺ DN 胸腺細胞の大部分は末梢T細胞のThy-1.1⁻/Thy-1.2⁺ の表現型を示し、SP細胞にみられたThy-1.1⁺/Thy-1.2⁺ の表現型をもつ CD 3⁺ 細胞は認められなかった。このことから、SP胸腺細胞と CD 3⁺ DN 細胞とは成熟過程を異にすると考えられた。

以上のように、今回われわれが生産した Thy-1.1 トランスジェニックマウスは、現在まで不明であった CD 3⁺ 胸腺細胞の最終成熟過程を研究

する上で有用なモデルであると考えられた。

謝辞 稿を終えるにあたり、研究の機会をお与え下さり、ご校閲を賜った順天堂大学産婦人科学教室高田道夫教授に心より感謝いたします。また、直接ご指導とご校閲を賜った順天堂大学病理学第二教室白井俊一教授に深甚なる謝意を表します。併せて、本研究にご助言・ご協力頂いた産婦人科学教室・病理学第二教室の方々に心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) Campbell, D.G., Gagnon, J., Reid, K.B.M., *et al.*: Rat brain Thy-1 glycoprotein: The amino acid sequence, disulphide bonds and unusual hydrophobic region. *Biochem. J.*, **195**: 15~30, 1981
- 2) Williams, A.F., Gagnon, J.: Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: homology with immunoglobulin. *Science*, **216**: 696~703, 1982
- 3) Reif, A.E., Allen, J.M.V.: The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J. Exp. Med.*, **120**: 413~433, 1964
- 4) Marshak-Rothstein, A., Fink, P., Gridley, T., *et al.*: Properties and applications of monoclonal antibodies directed against determinants of the Thy-1 locus. *J. Immunol.*, **122**: 2491~2497, 1979
- 5) Raff, M.C.: Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice. *Transplant Rev.*, **6**: 52~80, 1971
- 6) Reif, A.E., Allen, J.M.W.: Mouse nervous tissue isoantigens. *Nature*, **209**: 523, 1971
- 7) Morris, R.: Thy-1 in developing nervous tissue. *Dev. Neurosci.*, **7**: 133~160, 1985
- 8) Dalchau, R., Fabre, J.W.: Identification and unusual tissue distribution of the canine and human homologues of Thy-1 (θ). *J. Exp. Med.*, **149**: 576~591, 1979
- 9) Seeger, R.C., Danon, Y.L., Rayner, S.A., *et al.*: Definition of a Thy-1 determinant on human neuroblastoma, glioma, sarcoma and teratoma cells with a monoclonal antibody. *J. Im-*

- munol., **128**: 983~989, 1982
- 10) Retting, W. J., Dracopoli, N. C., Chesa, P. G., *et al.*: Role of human chromosome 11 in determining surface antigenic phenotype of normal and malignant cells. Somatic cell genetic analysis of eight antigens, including putative human Thy-1. J. Exp. Med., **162**: 1603~1619, 1985
 - 11) Acton, R. T., Morris, R. J., Williams, A. F.: Estimation of the amount and tissue distribution of rat Thy-1.1 antigen. Eur. J. Immunol., **4**: 598~602, 1974
 - 12) Ritter, M. A., Gordon, L. K., Goldschneider, I.: Distribution and identity of Thy-1-bearing cells during ontogeny in rat hemopoietic and lymphoid tissues. J. Immunol., **121**: 2463~2471, 1978
 - 13) Gordon, J. W., Chesa, P. G., Nishimura, H., *et al.*: Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. Cell, **50**: 445~452, 1987
 - 14) Chang, H. C., Seki, T., Moriuchi, T., *et al.*: Isolation and characterization of mouse Thy-1 genomic clones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 3819~3823, 1985
 - 15) Giguere, V., Isobe, K. I., Grosveld, F.: Structure of the murine Thy-1 gene. EMBO J., **4**: 2017~2024, 1985
 - 16) Ralph, P.: Retention of lymphocyte characteristics by myelomas and θ^+ lymphomas: Sensitivity to cortisol and phyto-hemagglutinin. J. Immunol., **110**: 1470~1480, 1973
 - 17) Leo, O., Foo, M., Sachs, D. H., *et al.*: Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T 3 polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**: 1374~1378, 1987
 - 18) Bluestone, J. A., Pardoll, D., Sharrow, S. O., *et al.*: Characterization of murine thymocytes with CD 3-associated T-cell receptor structures. Nature, **326**: 82~84, 1987
 - 19) Kubo, R. T., Born, W., Kappler, J. W., *et al.*: Characterization of monoclonal antibody which detects all murine $\alpha \beta$ T cell receptors. J. Immunol., **142**: 2736~2742, 1989
 - 20) Itohara, S., Nakanishi, N., Kanagawa, O., *et al.*: Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor $\gamma \delta$: Analysis of $\gamma \delta$ T cell during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 5094~5098, 1989
 - 21) Vartdal, F., Kvalheim, G., Lea, T. E., *et al.*: Depletion of T lymphocytes from human bone marrow. Use of magnetic monosized polymer microspheres coated with T lymphocyte-specific monoclonal antibodies. Transplantation, **43**: 366~371, 1987
 - 22) Isobe, K. I., Kollias, G., Kolsto, A. B., *et al.*: T cell independent Thy-1 alloantibody response with the use of transgenic mice. J. Immunol., **137**: 2089~2092, 1986
 - 23) Kollias, G., Spanopoulou, E., Grosveld, F., *et al.*: Differential regulation of a Thy-1 gene in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**: 1492~1496, 1987
 - 24) Vidal, M., Morris, R., Grosveld, F., *et al.*: Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. EMBO J., **9**: 833~840, 1990
 - 25) Krimpenfort, P., de Jong, R., Uematsu, Y., *et al.*: Transcription of T cell receptor β -chain genes is controlled by a downstream regulatory element. EMBO J., **7**: 745~750, 1988
 - 26) Serfling, E., Barthelmäs, R., Pfeuffer, I., *et al.*: Ubiquitous and lymphocyte specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. EMBO J., **8**: 465~473, 1989
 - 27) Hashimoto, Y.: T cell receptor β gene has two downstream DNase I hypersensitive regions: Possible mechanisms of tissue and stage-specific gene regulation. J. Exp. Med., **169**: 2097~2107, 1989
 - 28) Fowlkes, B. J., Pardoll, D. M.: Molecular and cellular events of T cell development. In: Dixon, F. J., eds. Advances in Immunology., **44**: 207~264, Academic Press, San Diego, 1989
 - 29) Shirai, T., Abe, M., Yagita, H., *et al.*: The expanded populations of CD 4⁻ CD 8⁻ T cell receptor α / β^+ T cells associated with the *lpr*

- and *gld* mutations are CD2⁻. J. Immunol., **144** : 3756~3761, 1990
- 30) Fowlkes, B. J., Kruisbeek, A. M., Ton-That, H., *et al.*: A novel population of T cell receptor α/β -bearing thymocytes which predominantly expresses a single V β gene family. Nature, **329** : 251~254, 1987
- 31) Ceredig, R., Lynch, F., Newman, P.: Phenotypic properties, interleukin 2 production, and developmental origin of a "mature" subpopulation of Lyt-2⁻ L3T4⁻ mouse thymocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **84** : 8578~8582, 1987

Original Paper

Summary

Expression pattern of Thy-1.1 antigen in transgenic mice

We established a line of transgenic mice carrying the exogenous mouse Thy-1.1 gene (8.2 kb EcoRI genomic DNA fragment). In these mice, Thy-1.1 was expressed on thymocytes but not on peripheral T cells, presumably due to the lack of cis-acting elements on the micro-injected genomic DNA. In the thymus, the transgenic Thy-1.1 was expressed on most of the CD3⁺/TCR⁻ thymocytes. However, the CD4⁺ or CD8⁺ single positive (SP) thymocytes consisted of Thy-1.1⁺ and Thy-1.1⁻ subsets, the former considered to be at a premature stage of terminal T cell differentiation. There was no difference in the amount of CD3⁺/TCR complexes expressed on the two SP thymocyte subsets. In the double negative (DN) thymocytes, all the CD3⁺/TCR⁺ cells were Thy-1.1⁻. These results suggest that the maturation process of CD3⁺ DN thymocytes differs from that of SP thymocytes. The distribution of the Thy-1.1⁺ population among the CD3⁺ thymocytes suggests that the transgenic Thy-1.1 gene expression can serve as a useful marker to examine the terminal maturation processes of CD3⁺ thymocytes.

Key words : Thy-1.1, thymocytes maturation, transgenic mouse

MASANORI AWAJI, M.D. * 1) JU-ICHI SAITOH, M.D. * 1)
 SHINGO NOZAWA, M.D., * 2) MASA-AKI ABE, Ph.D. * 2)
 & HIROYUKI NISHIMURA, Ph.D. * 2)

* 1) Department of Obstetrics and Gynecology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

* 2) Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan