

## 学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第 <b>34</b> 号	氏 名	久澄 倫之介
<p>[論文題名] Detection and quantification of bovine signal joint T-cell receptor excision circles. (Veterinary Immunology and Immunopathology, 167: 86-90, 2015) ウシ signal joint T-cell receptor excision circles の定量方法の確立と臨床応用への基盤研究</p> <p>[要 旨] [はじめに]胸腺はT細胞の分化・成熟が行われる一次リンパ器官である。胸腺の大きさは若齢期に最大となり、加齢とともに退縮し脂肪組織となる。胸腺で分化・成熟したT細胞は、末梢へ移動し免疫応答に関わる。胸腺機能が高い個体は、胸腺から末梢へ移動するT細胞の数が多いと考えられている。そこで胸腺機能の評価方法として、末梢T細胞の表現型解析や胸腺の大きさを測定するという間接的手法が用いられてきた。しかし近年、末梢血中の signal joint T-cell receptor excision circles (sjTREC)の定量による直接的な胸腺機能の評価が行われてきている。T細胞レセプターには、<math>\alpha\beta</math>鎖及び<math>\gamma\delta</math>鎖の2類あり、sjTRECはT細胞が胸腺で<math>\alpha\beta</math>細胞へと分化・成熟する際に生じる環状DNAである。同一染色体上で<math>\alpha</math>鎖をコードする遺伝子と<math>\delta</math>鎖をコードする遺伝子がクラスターを作っており、<math>\alpha</math>鎖が再編成される際に<math>\delta</math>鎖をコードする遺伝子群が染色体から切り離され環状を形成し、sjTRECとなる。sjTRECの特徴として、胸腺で分化・成熟した<math>\alpha\beta</math>T細胞にのみ含まれること、細胞分裂の際に複製されないこと、そして細胞内で長期間安定しているということがあげられる。そのため、sjTREC数は胸腺から産出された<math>\alpha\beta</math>T細胞の数を示し、末梢血におけるsjTRECの測定は、胸腺機能評価の手段として利用されている。sjTRECに関する研究は、ヒト、サル、ヒツジ、ブタ等様々な動物種において報告されているにもかかわらず、これまでにウシのsjTRECに関する研究は行われていなかった。</p> <p>本研究では、ウシ sjTREC の定量が細胞性免疫能を評価する指標の一つとして有用であるか検討する為に以下の研究を行った。研究1：ウシ sjTREC 領域を特定し、定量方法を確立した、研究2：ウシの胸腺機能の動態（加齢、性差及び季節変動に伴う変動）を明らかにした、研究3：下痢や肺炎などの慢性疾患に罹患したウシと健康なウシの胸腺機能を比較し、胸腺機能と慢性疾患との関係を調査した。</p> <p>研究1：ウシ sjTREC 領域の染色体上における位置を特定するために、既知のプライマーを基にウシ sjTREC プライマーを設計し、そのPCR産物の塩基配列を決定した。BLAST検索の結果、塩基配列の前半部分と後半部分が同一染色体の約18.5kb離れた領域と一致した。ここはウシ第10染色体上のTCR <math>\alpha</math> chain C-like領域であり、かつT細胞受容体<math>\delta</math>遺伝子を含んでいた。以上の結果から、ウシ sjTREC 領域が第10染色体上の</p>			

TCR  $\alpha$  chain C-like 領域に存在することが明らかになった。

次に、ウシ sjTREC 定量 PCR を確立するために、signal joint 領域の多型を確認したところ、いくつかの多型部位及び  $\delta$ rec- $\psi$ J $\alpha$  の結合部位に塩基のランダムな挿入が認められた。これらの塩基配列を基にウシ sjTREC プライマー及び TaqManProbe を作成し、特異性の高い定量 PCR 法を確立した。この定量 PCR の増幅効率 は 98% 以上で、10~1000 万コピーのウシ sjTREC の測定が可能であった。

研究 2：確立したウシ sjTREC 定量 PCR 法を用いて、約 400 頭のウシ末梢血単核球中に含まれる sjTREC 数を測定し、sjTREC 数と末梢 T 細胞数、日齢、性差及び季節変動との関係を調査した。その結果、sjTREC は新生子期に最も多く、加齢とともに減少したことから、加齢に伴い胸腺機能は減少することが示唆された。また、sjTREC 数は生後 50 日までの間は、オスの方がメスよりも有意に多く、胸腺機能に性差があることが示唆された。更に、sjTREC と季節変動及び末梢 T 細胞数と季節変動との関係を調査した結果、sjTREC 及び末梢 T 細胞数は、夏期に最も多くなり、夏期と冬期間に有意差が認められた。これは、冬期に細胞性免疫が低下することを示唆し、その結果、冬期に肺炎などの感染症に対する罹患率が増加することが考えられた。

研究 3：同じ飼養環境で同じ月齢の子牛のうち、肺炎に罹患した子牛と健康な子牛の sjTREC 数を比較した。その結果、肺炎に罹患した子牛は健康な子牛と比べ sjTREC 数が少なく、肺炎に罹患した子牛は健康な子牛と比較し胸腺機能が低いことが示唆された。また、重度の真菌症子牛の治療前、中及び後における sjTREC 数及び末梢の T 細胞数についても調査した。その結果、治療開始 2 週間で sjTREC 数が増加し、胸腺機能が活性化されたことが示唆された。治癒後には、sjTREC 数は治療前の値に戻ったが、末梢 T 細胞数が増加傾向にあり、末梢の免疫系が活性化されたことが示唆された。

[結語]本研究において、ウシ sjTREC 領域を特定し、定量方法を確立した。その結果、胸腺機能は加齢に伴い減少し、季節変動に伴い増減することが明らかになった。さらに、免疫状態が低下し易感染状態の子牛では、末梢血中の sjTREC 数が低下し、治療や健康状態の改善に伴って増加するなど、胸腺機能は動的変動することが示唆された。

以上の結果から、ウシの末梢血中 sjTREC の定量によって胸腺機能を評価することができ、ウシの健康状態を評価する指標の一つとして利用できると考えられた。さらに、本法によって下痢や肺炎が慢性化する個体を見つけることが可能であり、易感染性個体の早期摘発方法としても使えること、治療中の個体の sjTREC 数を経時的に測定することで治療の効果を評価する方法としても使えることが示唆された。

備考 論文要旨は、和文にあつては 2, 000 字程度、英文にあつては 1, 200 語程度とする。