

審査の結果の要旨

氏名 成田 知也

本研究は、胸腺における $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御メカニズムを明らかにするために、ゲノム編集法により全 *Skint* ファミリー遺伝子欠損 (SKLD) マウスおよび C57BL/6 遺伝背景 *Skint1* 欠損マウスを作製し、*Skint* ファミリー遺伝子の機能解析を行ったものである。SKLD マウスおよび *Skint1* 欠損マウスの解析から以下の結果を得ている。

1. リアルタイム RT-PCR 法によりマウスの主要な臓器および胸腺上皮細胞における *Skint* ファミリー遺伝子の発現パターンを解析し、すべての *Skint* ファミリー遺伝子が皮膚に高く発現していることを示した。また、*Skint5* および *Skint6* を除く *Skint* ファミリー遺伝子は胸腺髄質上皮細胞にも発現しており、*Skint2*、*Skint3* および *Skint7* など一部の *Skint* ファミリー遺伝子の胸腺髄質上皮細胞における発現は皮膚よりも高いことを示した。
2. CRISPR/Cas9 により全 *Skint* ファミリー遺伝子欠損 (SKLD) マウスおよび C57BL/6 遺伝背景の新たな *Skint1* 欠損マウスを作製した。
3. HE 染色による組織学的解析から、野生型マウスおよび *Skint1* 欠損マウスと同様に SKLD マウスの皮膚には明らかな構造の異常は認められなかった。よって、*Skint* ファミリー遺伝子は皮膚の形成や構造の維持に必要なことを示した。
4. SKLD マウスの皮膚を蛍光免疫染色により解析したところ、SKLD マウスの皮膚では *Skint1* 欠損マウスと同様に樹状構造をした $\gamma\delta$ T 細胞が検出される一方で、 $V\gamma5^+\gamma\delta$ T 細胞が特異的に欠損していた。さらに、SKLD マウスの皮膚をフローサイトメトリー法により解析したところ、SKLD マウスの皮膚では *Skint1* 欠損マウスと同様に $\gamma\delta$ T 細胞の頻度と数が野生型マウスと比較してわずかに減少していた。また、SKLD マウスの皮膚では *Skint1* 欠損マウスと同様に $\gamma\delta$ T 細胞のうち $V\gamma5V\delta1$ $\gamma\delta$ T 細胞の頻度と数が顕著に減少していた。一方で、 $V\gamma1^+$ 、 $V\gamma4^+$ および $V\gamma7^+$ $\gamma\delta$ T 細胞の数と頻度が有意に増加していた。よって、SKLD マウスの皮膚では $\gamma\delta$ T 細胞のレパトアが大きく変化することを示した。
5. SKLD マウスの胎仔胸腺をフローサイトメトリーで解析したところ、SKLD マウスの胎仔胸腺では *Skint1* 欠損マウスと同様に $CD45RB^{hi}$ の成熟した $V\gamma5^+$ $\gamma\delta$ T 細胞の頻度が野生型マウスと比較して顕著に減少していた。よって、SKLD マウスの皮膚における $V\gamma5V\delta1$ $\gamma\delta$ T 細胞の欠損は *Skint1* 欠損マウスと同様に、胎仔胸腺における $V\gamma5V\delta1$ $\gamma\delta$ T 細胞の分化の障害が原因であることを示した。
6. SKLD マウスの皮膚では *Skint1* 欠損マウスと同様に $\alpha\beta$ T 細胞やランゲルハンス細胞、樹状細胞、NK 細胞、 $CD11b^+$ 細胞の数に変化はなかった。

7. SKLD マウスでは *Skint1* 欠損マウスと同様に、胸腺および脾臓における $\gamma\delta$ T 細胞以外の主要な免疫細胞の分化、維持に影響はなかった。
8. 生検トレパンを用いた皮膚の創傷治癒の解析から、SKLD マウスおよび *Skint1* 欠損マウスでは野生型マウスと同様に皮膚の創傷治癒が起こることを示した。

以上、本論文は全*Skint*ファミリー遺伝子を欠損するSKLDマウスと新たに作製したC57BL/6遺伝背景*Skint1*欠損マウスの解析を通じて、マウスの $\gamma\delta$ T細胞の分化制御において、*Skint*ファミリー遺伝子はV γ 5V δ 1 $\gamma\delta$ T細胞の分化に必須であることを明らかにした。本研究の結果は、*Skint*ファミリー遺伝子の生理的意義及びマウスの $\gamma\delta$ T細胞の組織特異的レパトア形成に関する重要な知見を得たのみならず、マウスの $\gamma\delta$ T細胞の分化制御メカニズムの動作原理の解明に大きく貢献したことから、学位の授与に値するものと考えられる。