

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14879

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュを用いた全個体レベルでの免疫系解析モデルの開発

研究課題名（英文）Development of system-wide zebrafish immune repertoire analysis at the individual level

研究代表者

一戸 辰夫（TATSUO, ICHINOHE）

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：80314219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ゼブラフィッシュの優れたモデル生物としての特性を利用し、単一個体に存在する全てのT細胞クローンを、T細胞受容体CDR3コード領域遺伝子配列の高速並行シーケンシングによって、網羅的かつ半定量的に同定する技術を開発した。また同様の解析系のヒトへの応用可能性を検討し、抗原特異的免疫応答や造血細胞移植後のT細胞再構築をシステムワイドに解析することが可能であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、獲得免疫系を構成する細胞群を個別に同定することは可能であったが、それらの個体全体におけるレパトワを網羅的に取得する方法は存在しなかった。本研究では小型実験動物であるゼブラフィッシュの特性を活用し、システムワイドにゼブラフィッシュの個体に存在するT細胞レパトワを鎖、鎖とも高頻度クローンから微小クローンまで決定する新規技術を確立した。この成果は、免疫系全体の動態を鳥瞰することを可能とし、今後、感染症や悪性腫瘍に対する免疫応答の解明や、免疫学的な機序により発生する病態の診断や治療法の開発に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have developed methods enabling system-wide analysis of T cell receptor (TCR) repertoire at the individual level by taking advantage of a zebrafish model. We extended our analysis into human TCR repertoire and revealed that the immunodominant TCRs are shared by different individuals at least in the setting of anti-virus immune reaction and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation.

研究分野：血液免疫学

キーワード：ゼブラフィッシュ 免疫系 主要組織適合性複合体 造血細胞移植 次世代シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高速シーケンサーによる T 細胞・B 細胞受容体レパトワの網羅的同定技術が開発され、これらの技術を個体全体の免疫系構成細胞の解析に応用することが可能であれば、獲得免疫系の個体発生や恒常性維持など現在未解明の課題の解決に多くの新知見が得られることが予測されている。しかし、ヒトや小型哺乳動物では、全個体に由来する検体を採取することが困難であることから、そのような解析の実現はほぼ不可能である。ゼブラフィッシュは、全個体レベルの生体情報を網羅的に収集することが比較的容易である上に、食細胞・抗原提示細胞・T 細胞・B 細胞など哺乳類とほぼ同様の免疫担当細胞群を有している。また、遺伝子改変が容易、多産で発生までの期間が短い、胚子期から幼生期までは透明性が維持されるため *in vivo* イメージングも可能、など実験生物としてきわめて優れた特性を有している。このような背景から、申請者は、ゼブラフィッシュの一個体すべてに存在する T 細胞・B 細胞を網羅的かつ鳥瞰的に同定できる技術を開発するとともに、造血細胞移植に適したトランスジェニック個体を作成し、ゼブラフィッシュを用いてさまざまな免疫応答の全個体レベルでの解析モデルを確立するための研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュの単一個体すべてに由来する T 細胞受容体(TCR)および B 細胞受容体(BCR)のレパトリーを個々のクローンの単位まで網羅的かつ半定量的に同定可能とする技術を確立することを目標とした。さらに、主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex, MHC) 相同遺伝子の組み替え型個体や免疫不全形質を有する個体を作成し、同種間における

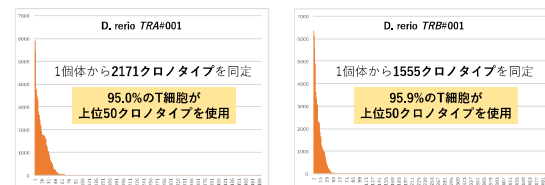
whole kidney marrow(WKM)を用いた造血細胞移植モデルを確立することを目指した。また作成された移植モデルの利用により、個体全体の T 細胞・B 細胞レパトリーの動態を網羅的かつ可視的に解析することが可能であることの検証を目的とした。

## 3. 研究の方法

野生型ゼブラフィッシュの WKM から total RNA を抽出し、adaptor ligation PCR 法を用いて半定量的に TCR $\alpha$ および TCR $\beta$ 遺伝子の cDNA を増幅した後、イルミナ社 Mi-Seq を用いて CDR3 領域の遺伝子配列を網羅的に同定した。また、PCR-SBT 法によってゼブラフィッシュの MHC タイピングを行い、WKM を移植片に用いて、以下の手順で MHC の異なる個体間における同種造血細胞移植を実施した。全ての体細胞が GFP を発現する Histone H2A:GFP トランスジェニック個体あるいは赤血球のみで RFP を発現する Gata 1:RFP トランスジェニックをドナー、透明個体(Casper 株)をレシピエントとして、レシピエントに様々な線量の全身放射線照射(total-body irradiation, TBI)を実施後、ドナーの WKM 由来造血細胞  $1 \times 10^6$  を心腔内に移植し、ライブイメージング法およびフローサイトメトリー法でドナー細胞の動態を経時的に観察した。

## 4. 研究成果

複数の野生型ゼブラフィッシュの WKM に存在する全ての $\alpha\beta$ T 細胞クローンに由来する TCR 鎖、TCR 鎖の CDR3 領域の配列を 1 個体ずつ網羅的に同定し、個体間における比較を行ったところ(下図)、MHC の相違にも寄らず、個体間において共有されているクロナタイプが存在することが明らかとなった。



また、同様の手法で、ヒト末梢血に存在する CD8+T 細胞の、TCR 鎖クロナタイプを同定したところ、HLA の異なる個人間において高頻度に共有されているものが存在しており、それらは stem cell memory 分画に濃縮されていた。

WKM の移植により、致死線量の TBI 実施後も一部の個体において、移植を行わなかった群と比較して、生存期間の延長が得られることが確認され、移植細胞がレシピエントの腎臓に集積するとともに、造血機能の回復に伴い全身血管に循環することを確認した。さらに、一部の個体の MHC タイピングにおいて、従来報告されていないクラス I 遺伝子ハプロタイプが存在することが判明した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

- 1) Ichinohe T, Miyama T, Kawase T, Honjo Y, Kitaura K, Sato H, Shin-I T, Suzuki R. Next-generation immune repertoire sequencing as a clue to elucidate the landscape of immune modulation by host-gut microbiome interactions. **Front Immunol.** **2018** ,**9**:668. [doi: 10.3389/fimmu.2018.00668.](査読有)
- 2) Miyama T, Kawase T, Kitaura Chishakki R, Shibata M, Oshima K, Hamana H, Kishi H, Muraguchi A, Kuzushima K, Saji H, Shin-I T, Suzuki R, Ichinohe T. Highly functional T-cell receptor repertoires are abundant in stem memory T cells and highly shared among individuals. **Sci Rep** **2017**; **7**(1):3663. [doi:10.1038/s41598-017-03855-x.](査読有)
- 3) 本庶仁子, 一戸辰夫. 新しい養子免疫療法を目指したTALEN法によるT細胞受容体ゲノム編集技術の開発. 無菌生物. 2017; 47(1): 68-69. (査読有)

[学会発表](計12件)

- 1) 美山貴彦, 川瀬孝和, 枝廣太郎, 鈴木源晟, 土石川佳世, 森岡健彦, 名越久朗, 今川潤, 三原圭一郎, 福島伯泰, 本庶仁子, 北浦一孝, 新井理, 鈴木隆二, 一戸辰夫. 次世代シーケンサーを用いた同種造血幹細胞移植後に残存する微小レシピエントT細胞クローンの解析. 第40回日本造血細胞移植学会総会. 北海道札幌市, 2018年2月2日.
- 2) 美山貴彦, 川瀬孝和, 本庶仁子, 北浦一孝, 新井理, 鈴木隆二, 一戸辰夫. 骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血幹細胞移植後に残存するレシピエント由来微小T細胞クローンの解析. 第26回日本組織適合性学会大会, 広島県広島市, 2017年10月27日.
- 3) Takahiko Miyama, Takakazu Kawase, Yasuko Honjo, Kazutaka Kitaura, Tadasu Shin-I, Ryuji Suzuki, Tatsuo Ichinohe. Landscape of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic cell transplantation is superdominated by distinct T cell populations bearing T-cell receptor clonotypes shared among different individuals. 59th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, U.S.A, December 11, 2017.
- 4) Tatsuo Ichinohe. Next-generation sequencing-based immunobioinformatics: toward a comprehensive understanding of the human immune system. The Joint Congress of The 19th International Symposium on Gnotobiology, The 50th Congress of Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology and the 39th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease, Tokyo, June 9, 2017.
- 5) Yasuko Honjo, Takahiko Miyama, Takakazu Kawase, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Tatsuo Ichinohe. T-cell receptor gene editing by transcription activator-like effector nuclease (TALEN) as a novel tool for adoptive T-cell immunotherapy. The Joint Congress of the 19th International Symposium on Gnotobiology, the 50th Congress of Japanese Association of Germfree Life and Gnotobiology and the 39th Congress of the Society for Microbial

Ecology and Disease, Tokyo, June 9, 2017.

- 6) 川瀬孝和, 坂本葵, 樗木錬, 美山貴彦, 柴田真志, 田中清人, 北浦一孝, 大島久美, 浜名洋, 岸裕幸, 葛島清隆, 田中秀則, 鈴木隆二, 一戸辰夫. 次世代シーケンサーと single cell sorting を用いた同種抗原反応性 T 細胞の網羅的解析と高頻度クローンの同定. 第 39 回日本造血細胞移植学会総会, 島根県松江市, 2017 年 3 月 3 日.
- 7) 美山貴彦, 川瀬孝和, 田中清人, 柴田真志, 樗木錬, 坂本葵, 土石川佳世, 森岡健彦, 大島久美, 本庶仁子, 田中秀則, 北浦一孝, 鈴木隆二, 一戸辰夫. 同種造血幹細胞移植後の末梢血免疫再構築における shared TCR の優位性. 第 39 回日本造血細胞移植学会総会, 島根県松江市, 2017 年 3 月 3 日.
- 8) 本庶仁子, 一戸辰夫. ゼブラフィッシュ初期胚の放射線に対する影響の解析. 日本放射線影響学会第 59 回大会, 広島県広島市, 2016 年 10 月 26 日.
- 9) 美山貴彦, 田中清人, 柴田真志, 川瀬孝和, 樗木錬, 坂本葵, 北浦一孝, 大島久美, 浜名洋, 岸裕幸, 葛島清隆, 田中秀則, 鈴木隆二, 一戸辰夫. サイトメガロウイルス反応性 T 細胞レパトワ形成に与える HLA-A\*02 の影響の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析. 第 25 回日本組織適合性学会大会, 北海道札幌市, 2016 年 10 月 23 日.
- 10) 川瀬孝和, 美山貴彦, 一戸辰夫. 次世代シーケンサーと single cell sorting を用いた T 細胞受容体 (TCR) の網羅的解析. 第 25 回日本組織適合性学会大会, 北海道札幌市, 2016 年 10 月 23 日.
- 11) Takahiko Miyama, Takakazu Kawase, Kazutaka Kitaura, Ren Chishaki, Masashi Shibata, Kumi Oshima, Hiroshi Hamana, Hiroyuki Kishi, Kiyotaka Kuzushima, Hiroh Saji, Ryuji Suzuki, Tatsuo Ichinohe. Stem cell memory T-cells are a reservoir of functional T-cells highly shared among individuals. 第 78 回日本血液学会学術集会, 神奈川県横浜市, 2016 年 10 月 14 日.
- 12) 川瀬孝和, 坂本葵, 樗木錬, 美山貴彦, 柴田真志, 田中清人, 北浦一孝, 大島久美, 浜名洋, 岸裕幸, 葛島清隆, 佐治博夫, 鈴木

隆二, 一戸辰夫. 次世代シーケンサーと single cell sorting を用いた同種抗原反応性 T 細胞の網羅的解析. 第 20 回日本がん免疫学会総会, 大阪府大阪市, 2016 年 7 月 28 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: Platinum TALEN を用いた T 細胞受容体の完全置換技術

発明者: 一戸辰夫, 山本卓, 佐久間哲司,

本庶仁子, 川瀬孝和, 美山貴彦, 鈴木隆二

権利者: 広島大学, Repertoire Genesis 株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2017-197010

出願年月日: 2017 年 10 月 10 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

2017 年 6 月 19 日プレスリリース

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/40252>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一戸 辰夫 (Tatsuo, Ichinohe)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号: 80314219

(2) 研究分担者

本庶 仁子 (Yasuko, Honjo)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号: 80614106

(3) 連携研究者

鈴木 隆二 (Ryuji, Suzuki)

国立病院機構相模原病院臨床研究センター

・診断・治療室・室長

研究者番号: 70373470

(4) 研究協力者

川瀬 孝和 (Takakazu, Kawase)

美山 貴彦 (Takahiko, Miyama)

佐藤 寛之 (Hiroyuki, Sato)