

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07787

研究課題名(和文) 抗原特異的モノクローナルT細胞レセプターを介する免疫機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of immune function through antigen-specific monoclonal T cell receptor

研究代表者

神沼 修 (KAMINUMA, Osamu)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：80342921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが作出した世界初となる抗原特異的T細胞クローンマウス系統、およびクローンマウス同士および正常マウスとの交配で作出したマウス系統間で比較することにより、T細胞の胸腺分化やサブセット分化にT細胞受容体(TCR)の相違が大きく影響することを明らかにした。一方、T細胞クローンマウスにおけるin vivoの抗原応答性は、同一エピトープに反応するTCR遺伝子導入マウスよりも強く、または鎖のみが抗原特異性を保持した個体でも、正常マウスに比べ強いことを見いだした。免疫機構の解析や免疫疾患モデルを樹立する上でのT細胞クローンマウスの高い有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：By comparing cloned mice derived from antigen-specific T cells generated by applicants for the first time and mouse lines developed by crossbreeding of the cloned mice with inbred mice and the same and other cloned mice, we clarified the importance of T cell receptor (TCR) to thymic T cell development and T cell subset differentiation. Antigen-induced T cell responses in T cell cloned mice were stronger than those of corresponding TCR-transgenic mice. Furthermore, the in vivo antigen responses in mice expressing either alpha- or beta-chain of TCR derived from cloned mice were stronger than those of inbred mice. The usefulness of antigen specific T cell cloned mice for investigating immune systems and developing immune disease models.

研究分野：実験動物学

キーワード：クローン動物 T細胞 核移植 T細胞受容体

1. 研究開始当初の背景

外来抗原に対する特異的生体反応を解析することは、それに起因するアレルギー等の免疫疾患における発症機構を解明し、その予防・治療法を開発する上で重要である。生体に侵入したさまざまな外来抗原が CD4 陽性 T 細胞に認識されることを起点として、生体防御を目的とした種々の生体反応カスケードが稼動する。その抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の機能や役割を明らかにするべく、これまでさまざまな研究が実施されてきた。抗原特異的 TCR 遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) マウスが開発されたことによって、モノクローナルな TCR を有する CD4 陽性 T 細胞の調整や、in vivo/vitro における抗原特異的反応の誘発が容易になったことから、種々の免疫疾患モデルへの応用や、T 細胞の分化およびシグナル伝達機構に関する多くの研究成果が得られるようになり、T 細胞研究は大きく進展した。

しかし、現存する TCR-Tg マウスの CD4 陽性 T 細胞における TCR の発現は、殆ど外来プロモーターによって調節されていることから、その発現レベルやタイミングは内在性の TCR とは異なる。TCR 刺激に伴う T 細胞の反応性や胸腺における分化過程は、抗原/MHC 複合体に対する親和性や結合活性の影響を受けるので、TCR-Tg マウスにおける CD4 陽性 T 細胞の反応が、生体が生理的に獲得した抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の反応を完全に反映するか明らかではない。事実、Balb/c マウスは抗原感作によって Th2 タイプの免疫反応を起こしやすいといわれるが、それをバックグラウンドとした TCR-Tg マウスである DO11.10 マウスを用いて個体レベルで抗原応答性を観察すると、Th17/Th1 優位な反応が誘発されることから、少なくとも本マウスは、Th2 優位なアレルギー疾患研究などへの利用には適さないことが示されていた<sup>①</sup>。

申請者らは最近、アレルギー疾患の主要な誘発アレルゲンであるダニ抗原に反応する TCR を発現する CD4 陽性 T 細胞を使って、世界初の抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞由来クローンマウスを作出することに成功した。CD4 陽性 T 細胞から遺伝子操作を行うことなく作製したクローンマウスの T 細胞には、内在性のものと同程度の TCR 発現がみられることから、既存の TCR-Tg マウスよりも、より生理的な抗原特異的反応が観察できることが期待された。

2. 研究の目的

本研究は、先行研究で作製した、および追加作製を予定している数種類の抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンマウスを用いることによって、T 細胞におけるさまざまな免疫応答および分化機構、ならびに TCR を介するシグナル伝達機構を正確に解明することを目的とした。それにより、外来抗原に対する特異的生体反応に起因する多くの免疫疾患の発症機構を改めて正しく理解し、その画期的な予防・治療法を開発するための新しい研究基盤の構築を目指すこととした。

3. 研究の方法

先行研究で作出した抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞クローンマウスにおける生物学的性状を観察した後、既存の TCR-Tg マウスを利用して解析されてきたさまざまな免疫反応について、クローンマウスを用いた比較検証を行った。また、クローンマウス同士および正常マウスと交配することによって、抗原特異的 TCR $\alpha$  および TCR $\beta$  鎖を独立して片側または両側 allele より発現するマウス、2 倍量の抗原特異的 TCR 鎖を同時に発現するマウスを作出した。さらに、同一抗原エпитープに反応して異なる TCR を有する複数の CD4 陽性 T 細胞クローンマウスも追加作製した。それらのマウスを用いて、抗原応答性や分化・シグナ

表 1. D $\beta$ 1 および D $\beta$ 2 クローンマウス系統の比較

	D $\beta$ 1				D $\beta$ 2			
	wTa/wTB	wTa/rTB(V2)	rTa(V6D-4)/wTB	rTa(V6D-4)/rTB(V2)	wTa/wTB	wTa/rTB(V5)	rTa(V10)/wTB	rTa(V10)/rTB(V5)
Body weight (g)	31.5 $\pm$ 2.4	26.6 $\pm$ 2.0	29.9 $\pm$ 2.1	31.8 $\pm$ 2.0	29.9 $\pm$ 1.7	28.7 $\pm$ 1.6	29.3 $\pm$ 1.9	28.0 $\pm$ 0.8
Spleen weight (mg)	143 $\pm$ 14	146 $\pm$ 22	117 $\pm$ 3	112 $\pm$ 9	108 $\pm$ 3	138 $\pm$ 11	116 $\pm$ 10	108 $\pm$ 7
Thymus weight (mg)	14.2 $\pm$ 3.2	13.8 $\pm$ 2.3	11.6 $\pm$ 1.0	12.2 $\pm$ 1.9	12.4 $\pm$ 1.8	12.1 $\pm$ 2.3	11.9 $\pm$ 1.4	10.4 $\pm$ 1.4
Spleen (%)								
CD3 <sup>+</sup>	20.5 $\pm$ 2.5	25.3 $\pm$ 4.0	20.1 $\pm$ 2.3	28.7 $\pm$ 1.5	26.1 $\pm$ 0.7	24.7 $\pm$ 1.0	21.5 $\pm$ 1.6	34.9 $\pm$ 0.9***
CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>	57.7 $\pm$ 4.4	64.8 $\pm$ 4.4	49.0 $\pm$ 4.0	74.5 $\pm$ 2.5**	69.3 $\pm$ 1.9	75.1 $\pm$ 1.1	63.9 $\pm$ 3.5	29.1 $\pm$ 1.4***
CD8 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>	35.2 $\pm$ 4.6	30.1 $\pm$ 4.1	31.2 $\pm$ 3.1	20.4 $\pm$ 2.5*	26.3 $\pm$ 1.7	21.9 $\pm$ 1.1	23.1 $\pm$ 2.1	1.8 $\pm$ 0.4***
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup>	6.1 $\pm$ 0.7	4.3 $\pm$ 1.0	19.0 $\pm$ 1.5***	4.4 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.2	12.0 $\pm$ 2.0***	69.0 $\pm$ 1.6***
CD19 <sup>+</sup>	58.4 $\pm$ 2.4	48.5 $\pm$ 5.6	59.7 $\pm$ 4.5	56.3 $\pm$ 1.9	59.0 $\pm$ 1.1	55.5 $\pm$ 2.1	60.1 $\pm$ 2.1	50.0 $\pm$ 1.1**
CD3 <sup>+</sup> TCR <sup>+</sup>	0.52 $\pm$ 0.12	0.12 $\pm$ 0.02*	1.03 $\pm$ 0.14**	0.11 $\pm$ 0.02**	0.54 $\pm$ 0.09	0.12 $\pm$ 0.04*	0.90 $\pm$ 0.15*	0.11 $\pm$ 0.03*
TCR $\beta$ <sup>+</sup> a-GaCer/CD1d <sup>+</sup>	0.520 $\pm$ 0.094	0.072 $\pm$ 0.024***	0.218 $\pm$ 0.049**	0.044 $\pm$ 0.009***	0.455 $\pm$ 0.076	0.057 $\pm$ 0.012***	0.317 $\pm$ 0.091	0.065 $\pm$ 0.021***
CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	32.7 $\pm$ 4.7	52.9 $\pm$ 4.0*	37.1 $\pm$ 0.9	52.9 $\pm$ 4.3**	41.9 $\pm$ 5.8	50.1 $\pm$ 6.6	42.1 $\pm$ 3.2	50.4 $\pm$ 4.0
CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	8.4 $\pm$ 2.1	5.6 $\pm$ 0.6	9.7 $\pm$ 1.5	4.7 $\pm$ 0.5	10.1 $\pm$ 1.2	8.2 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 0.8	7.9 $\pm$ 0.6
CD11c <sup>+</sup> SIglec-F <sup>-</sup>	2.50 $\pm$ 0.37	2.51 $\pm$ 0.16	2.46 $\pm$ 0.16	3.01 $\pm$ 0.35	2.69 $\pm$ 0.10	2.83 $\pm$ 0.31	2.76 $\pm$ 0.23	2.61 $\pm$ 0.23
CD11c <sup>+</sup> SIglec-F <sup>+</sup>	0.81 $\pm$ 0.25	1.07 $\pm$ 0.57	0.61 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.08	0.61 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.19	0.84 $\pm$ 0.13	0.63 $\pm$ 0.18
DX5 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup>	4.75 $\pm$ 0.89	4.96 $\pm$ 0.99	4.64 $\pm$ 0.43	4.41 $\pm$ 0.47	4.10 $\pm$ 0.22	5.67 $\pm$ 1.25	4.50 $\pm$ 0.30	4.12 $\pm$ 0.33
DX5 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup>	0.104 $\pm$ 0.020	0.114 $\pm$ 0.024	0.090 $\pm$ 0.011	0.090 $\pm$ 0.016	0.256 $\pm$ 0.129	0.354 $\pm$ 0.252	0.249 $\pm$ 0.115	0.193 $\pm$ 0.067
CD11b <sup>+</sup> Gr-1 <sup>+</sup>	1.98 $\pm$ 0.93	3.20 $\pm$ 1.62	1.50 $\pm$ 0.82	0.76 $\pm$ 0.21	0.76 $\pm$ 0.23	2.00 $\pm$ 1.10	1.02 $\pm$ 0.42	1.15 $\pm$ 0.42
CD11b <sup>+</sup> Gr-1 <sup>-</sup>	3.54 $\pm$ 0.43	3.53 $\pm$ 0.70	3.57 $\pm$ 0.86	3.53 $\pm$ 0.38	3.44 $\pm$ 0.37	4.37 $\pm$ 0.34	3.41 $\pm$ 0.22	3.45 $\pm$ 0.31
Thymus (%)								
CD4 <sup>+</sup>	15.9 $\pm$ 6.0	20.7 $\pm$ 3.4	12.4 $\pm$ 2.7	25.4 $\pm$ 2.8	12.5 $\pm$ 1.6	16.9 $\pm$ 2.7	14.4 $\pm$ 1.2	20.2 $\pm$ 2.8
CD8 <sup>+</sup>	4.1 $\pm$ 1.2	4.3 $\pm$ 0.5	7.1 $\pm$ 1.4	4.1 $\pm$ 0.6	3.7 $\pm$ 0.6	3.2 $\pm$ 0.2	11.9 $\pm$ 2.3*	8.4 $\pm$ 2.8
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	71.5 $\pm$ 7.9	70.4 $\pm$ 3.7	54.1 $\pm$ 6.9	53.1 $\pm$ 5.1	75.1 $\pm$ 2.9	72.7 $\pm$ 2.0	48.8 $\pm$ 3.2**	29.8 $\pm$ 6.7***
Foxp3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	3.06 $\pm$ 0.46	2.22 $\pm$ 0.24	4.91 $\pm$ 0.79*	2.18 $\pm$ 0.24	4.92 $\pm$ 0.50	3.42 $\pm$ 0.97	5.86 $\pm$ 0.93	8.73 $\pm$ 1.78

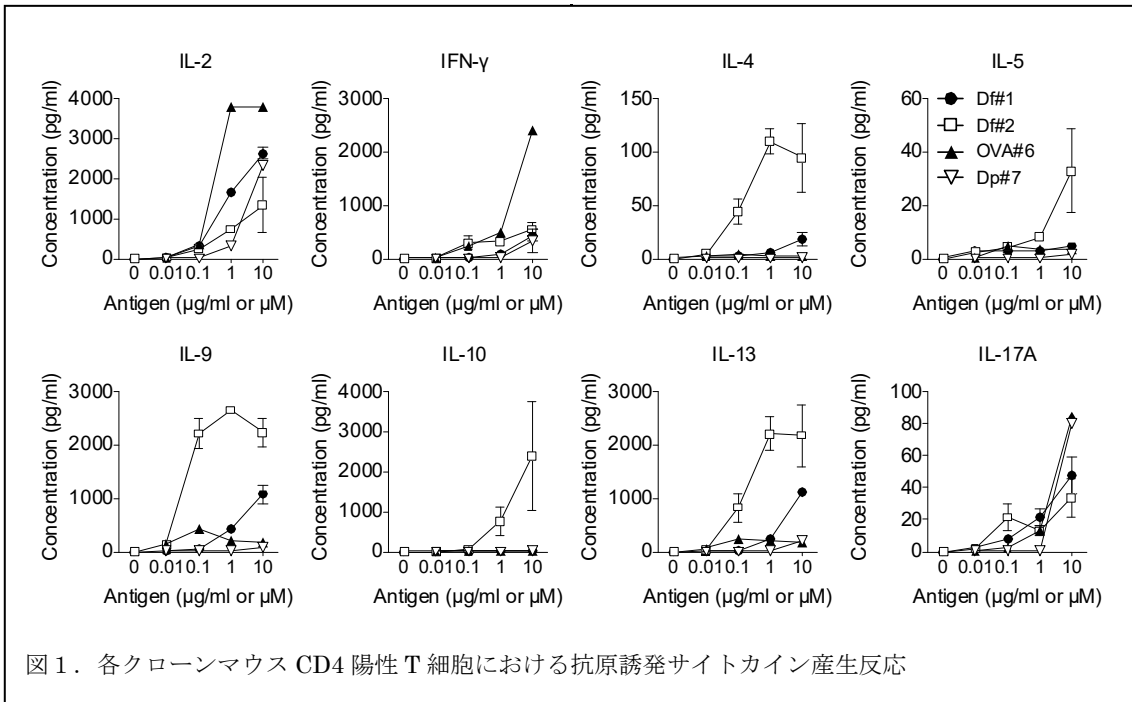


図1. 各クローンマウス CD4 陽性 T 細胞における抗原誘発サイトカイン産生反応

ル伝達イベント等を *in vitro* および *in vivo* で比較解析した。

#### 4. 研究成果

作出したクローンマウスについて、解剖学的、生理学および血液学的な検査を実施した結果、体重やリンパ組織重量等には特に影響はみられなかった (表1)。胸腺および末梢リンパ組織におけるさまざまな免疫・炎症細胞数の変化をフローサイトメトリーで解析したところ、 $\gamma\delta$  細胞および NKT 細胞の劇的な減少が共通して認められたのに対し、末梢および胸腺 CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞数は、クローンマウス間で異なる変動を示すことが明らかとなった。またある種のクローンマウスでは、末梢の Double negative (DN) T 細胞が増加する等、特徴的な表現型がみられた。さらに、クローンマウスと正常マウスを交配し、TCR  $\alpha$  または  $\beta$  のみが抗原特異性を示すマウスを得て検討したところ、 $\gamma\delta$  細胞および NKT 細胞の劇的な減少は、再構成された TCR  $\beta$  鎖の発現に起因することが明らかとなった (表1)。

これまで TCR-Tg マウスを用いて解析されてきた免疫反応について、クローンマウスと TCR-Tg マウス間で比較解析した。各クローンマウスの CD4 陽性 T 細胞を特異抗原で刺激すると、Th1, Th2, Th17 サイトカインをはじめとする種々のサイトカイン産生パターンが、クローンマウス間で大きく異なっていた (図1)。さらに、同じ抗原に反応する異なるクローンマウス系統間で CD4 陽性 T 細胞における抗原応答性を比較してみても、サイトカインの産生パターンが明らかに異なることを見いだした。抗原に対する親和性が、T 細胞の分化傾向に影響を与えることが明らかになった。

各サイトカインをほぼ均等に産生する

Df#1 クローンマウスに Df 抗原を経気道的にチャレンジすると、好酸球浸潤および IL-4, IL-5 および IL-13 産生を伴う Th2 タイプの気道炎症が惹起された。また面白いことに、各クローンマウスの *in vitro* における抗原反応性には、TCR  $\alpha$  および  $\beta$  の両方が必要とされたのに対し、抗原チャレンジによって *in vivo* で観察されるアレルギー性炎症の発症は、片側の TCR 鎖を発現するだけで正常マウスに比し増強されることが判明した (図2)。OVA 特異的 D011.10 マウスに抗原を暴露すると、Th17/Th1 有意な好中球性炎症が誘発され

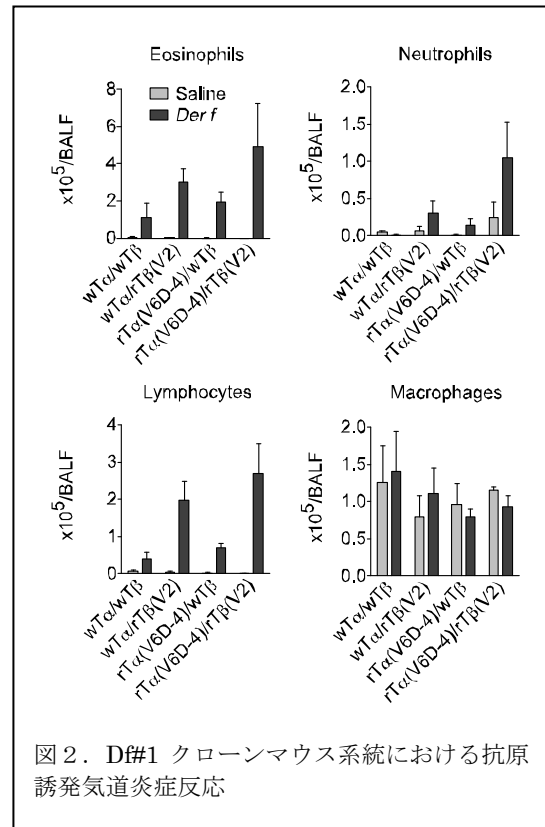


図2. Df#1 クローンマウス系統における抗原誘発気道炎症反応

ることが報告されており<sup>①</sup>、クローンマウスは TCR-Tg マウスと異なる免疫学的性質を示すことが明らかとなった。

さらに、DO11.10 の反応エピトープと同じ抗原に反応する TCR を発現するクローンマウスに対し、OVA323-339 を点鼻投与したところ、鼻粘膜への好酸球、好中球およびリンパ球の浸潤や、非特異的刺激に対するくしゃみ反応の増強、すなわち鼻粘膜過敏性の亢進がみられた。同様の反応は、DO11.10 に抗原チャレンジしてもみられたが、鼻粘膜炎症の程度はクローンマウスの方が有意に強かった (図 3)。

また、クローンマウス同士を交配することによって、通常の 2 倍量の抗原特異的 TCR を発現する T 細胞を持つマウスを作出したところ、多くの個体においてリンパ節腫大等の免疫異常が観察され、その異常個体の CD4 陽性 T 細胞における抗原応答性は失われていた。一方、異常を起こさない個体における抗原応答性は、一对の抗原特異的 TCR を発現するクローンマウスと同程度であった。二倍程度の刺激強度の相違は、抗原応答性に殆ど影響を与えないことが示された。

クローンマウス由来の TCR を発現するマウスにおける TCR レパトアの変化を検討したところ、既に発現している TCR 以外のレパトアが加齢により発現してくることが明らかになり、特にその傾向は TCR  $\alpha$  鎖で強かった。クローンマウス由来の再構成 TCR 以外の TCR が、クローンマウスおよび野生型マウスのどちらのアレルに由来して再構成されるか、その機構も含め今後検討する必要がある。

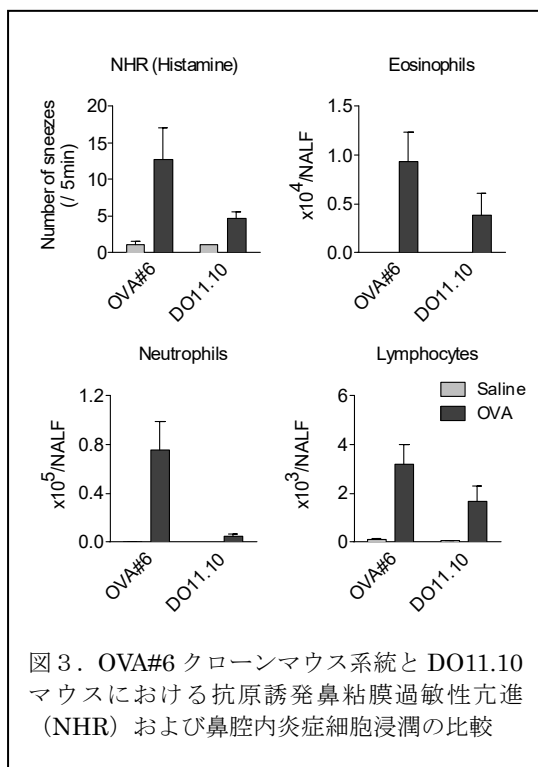


図 3. OVA#6 クローンマウス系統と DO11.10 マウスにおける抗原誘発鼻粘膜過敏性亢進 (NHR) および鼻腔内炎症細胞浸潤の比較

<引用文献>

① Lemaire MM, Dumoutier L, Warnier G, Uyttenhove C, Van Snick J, de Heusch M,

Stevens M, Renauld JC, Dual TCR expression biases lung inflammation in DO11.10 transgenic mice and promotes neutrophilia via microbiota-induced Th17 differentiation, *J Immunol*, 187, 2016, 3530-3537.

## 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 2 件)

- ① Kaminuma O, Katayama K, Inoue K, Saeki M, Nishimura T, Kitamura N, Shimo Y, Tofukuji S, Ishida S, Ogonuki N, Kamimura S, Oikawa M, Katoh S, Mori A, Shichijo M, Hiroi T, Ogura A. Hyper-reactive cloned mice generated by direct nuclear transfer of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *EMBO Rep*, 18:885-893, 2017. (査読有)  
DOI: 10.15252/embr.201643321.
- ② 神沼 修, 井上 貴美子, 佐伯 真弓, 形山 和史, 森 晶夫, 小倉 淳郎. 特集 医薬品評価に活用できる新しいアレルギー疾患モデル: 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の核移植によるアレルギー性炎症急速発症モデルの樹立. *日本薬理学雑誌*. 150:83-87, 2017. (査読無)  
DOI: 10.1254/fpj.150.83.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Kaminuma O, Katayama K, Kitamura N, Shimo Y, Mori A. Establishment of non-transgenic monoclonal T cell receptor-expressing mice. 第 46 回日本免疫学会学術集会 (仙台), 2017. 12. 12-14.
- ② 神沼 修. アレルギー疾患における T 細胞の重要性と核移植クローン技術による新規モデル開発. 第 7 6 回鳥取大学染色体工学研究センターセミナー (鳥取), 2017. 6. 21.
- ③ Ogura A, Inoue K, Saeki M, Matoba S, Nishimura T, Kitamura N, Mori A, Hiroi T, Kaminuma O. Cloned mice derived from antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells for the study of inflammation and aging. RIKEN aging project annual meeting (Wako, Saitama), 2017. 6. 1.
- ④ 神沼 修, 井上 貴美子, 佐伯 真弓, 西村 友枝, 北村 紀子, 森 晶夫, 廣井隆親, 小倉 淳郎. 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞由来クローンマウスのアレルギー性気道炎症. 第 64 回日本実験動物学会総会 (福島), 2017. 5. 25-27.
- ⑤ 井上 貴美子, 神沼 修, 越後貫 成美, 上村 悟氏, 及川 真実, 的場 章悟, 廣井 隆親, 小倉 淳郎. 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞由来の核移植クローンマウス

作製. 第 64 回日本実験動物学会総会 (福島)、2017. 5. 25-27.

- ⑥ Kaminuma O, Inoue K, Saeki M, Nishimura T, Kitamura N, Ogonuki N, Kamimura S, Oikawa M, Katoh S, Mori A, Hiroi T, Ogura A. Hyper-reactive T cell clone mice as a model for aging study. *Frontiers in aging research toward healthy longevity* (Tokyo), 2016. 11. 17.
- ⑦ 形山 和史、神沼 修、井上 貴美子、小倉 淳郎、越後貫 成美、上村 悟氏、及川 真実、的場 章悟、井上 弘貴、下茂 佑輔、七條 通孝. 抗原特異的 T 細胞の核移植によるクローンマウスの作出. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会 (東京)、2016. 6. 17-19.
- ⑧ 神沼 修、佐伯 真弓、北村 紀子、形山 和史、井上 貴美子、小倉 淳郎、加藤 茂樹、森 晶夫、七條 通孝、廣井 隆親. 抗原特異的 T 細胞由来のクローンマウスは気管支喘息様の気道炎症を急速発症する. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会 (東京)、2016. 6. 17-19.
- ⑨ 廣井 隆親、西村 友枝、形山 和史、井上 貴美子、小倉 淳郎、森 晶夫、七條 通孝、神沼 修. 抗原特異的 T 細胞由来のクローンマウスはアレルギー性鼻炎様症状を急速発症する. 第 65 回日本アレルギー学会学術大会 (東京)、2016. 6. 17-19.
- ⑩ 神沼 修. T 細胞クローンマウスを用いた新しいアレルギー疾患モデル. 第 4 回山梨大学医学部基礎医学系研究セミナー (山梨)、2016. 4. 27.
- ⑪ Kaminuma O. Rapid development of house dust mite-induced allergic inflammation. 第 89 回日本薬理学会年会 (横浜)、一般公募シンポジウム 8 “医薬品評価に活用できる新しいアレルギー疾患モデル”、2016. 3. 9.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：非ヒト哺乳動物

発明者：神沼 修、井上 貴美子、形山 和史、小倉 淳郎

権利者：塩野義製薬株式会社、公益財団法人東京都医学総合研究所、国立研究開発法人理化学研究所

種類：特許

公開番号：特開 2016-106631

公開年月日：平成 28 年 6 月 20 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~osamuk/index.html>

<http://ja.brc.riken.jp/lab/kougaku/>

<http://www.igakuken.or.jp/allergy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神沼 修 (KAMINUMA, Osamu)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：80342921

(2) 研究分担者

井上 貴美子 (INOUE, Kimiko)

国立研究開発法人理化学研究所・遺伝工学

基盤技術室・専任研究員

研究者番号：70360500