

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19371

研究課題名（和文）二重特異性（dual-TCR）T細胞の意義の解明

研究課題名（英文）Detection and characterization of dual-TCR T cells

研究代表者

新田 剛（Nitta, Takeshi）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・准教授

研究者番号：30373343

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、2種類のTCRを同時に発現するT細胞「dual-TCR T細胞」の検出系の確立と生理的意義の解明を目的とした。TCRa遺伝子の定常領域に2Aペプチドを介してレポーター遺伝子を連結したマウスを作製し、dual-TCR T細胞を検出することに成功した。さらに、TCRa定常領域の細胞外部位にエピトープタグを挿入したマウスを作製し、2種類のTCRaを細胞表面に出す「ホロdual-TCR T細胞」と、片方のTCRaを細胞内にとどめる「ヘミdual-TCR T細胞」を検出する系を確立した。これらのマウスを用いて、dual-TCR T細胞の生体内分布や免疫応答における変化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、二重特異性（bispecific）抗体やキメラ抗原受容体（CAR）を用いるがん免疫治療など、免疫系の抗原特異的作用を治療に応用する試みが注目を集めている。本研究の目標であるDual-TCR細胞の意義の解明は、T細胞の基礎的性状を理解するにとどまらず、2種類の抗原特異性を示すT細胞を医療に応用する可能性につながる。Dual-TCR T細胞は自己免疫疾患や移植片対宿主病（GVHD）に関与することが指摘されている。本研究で確立したモデル動物と、dual-TCR細胞に関する新知見は、それらの疾患に関するよりよい理解と新規の治療戦略に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：A subpopulation of T cells express two T cell receptor (TCR) alpha chains, although the nature and immunological significance of such dual-TCR T cells has been poorly understood. In this study, we generated mice with reporter genes linked via 2A peptides to the constant region of the TCRa gene, to evaluate dual-TCR T cells in vivo. In addition, the mice with epitope tags inserted at the extracellular site of the constant region of TCRa were generated, to distinguish 'holo dual-TCR T cells', which express two TCRa on the cell surface, and 'hemi dual-TCR T cells', which express one TCRa and keep another TCRa inside the cell. Using these mice, we demonstrated the in vivo distribution of dual-TCR T cells in steady state as well as during immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 抗原受容体 TCR マウス ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「1つのリンパ球(T細胞、B細胞)は1種類の抗原受容体を発現する。」この原則は、一細胞一受容体則と呼ばれ、1957年にFrank M. Burnetによって提唱されて以来、現代免疫学における根幹原理のひとつとなっている。これは、抗原受容体の遺伝子が片側アレルだけでV(D)J再編成を受けるしくみ - 対立遺伝子排除(allelic exclusion) - によって成り立っている。しかし、T細胞抗原受容体(TCR)の α 鎖については、対立遺伝子排除が不完全であり、両方のTCR α 遺伝子が再編成を受け、1つのT細胞表面に2種類のTCR α が同時に発現することがある(Padovan et al, Science 1993)。このような2種類のTCRをもつ「dual-TCR T細胞」は、2種類の抗原への免疫応答(交叉反応)を示す可能性があり、免疫学の原則から逸脱する。それらは一人二役の優れ者として、免疫の多様性に貢献する生理的意義を秘めているのか？あるいはアイデンティティを見失った厄介者として免疫応答を混乱させる病的役割をもつのか？生体内のdual-TCR T細胞を検出・単離することはきわめて困難であるため、その研究は進まず、その実態や意義については議論される機会も少ない。しかし、dual-TCR T細胞が外来抗原と自己抗原に同時に反応し、自己免疫を引き起こす例が複数報告されている(Ji et al, Nat Immunol 2010; Bradley et al, Cell Host Microbe 2017)。

近年、ウイルス感染症やがん治療においてT細胞の重要性が注目されている。このような背景のもと、抗原特異的免疫応答の理解と応用の観点からdual-TCR T細胞の生理的・病的意義を包括的に検証すべきであると考え、本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、dual-TCR T細胞を生体内で検出するためのモデルマウスを作製する。それらのマウスを用いて、dual-TCR T細胞の生体内での分布や活性化状態、分化経路などを調べ、定常状態および免疫反応時における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Dual-TCR T細胞を検出・単離するためのレポーターマウスの作製

CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、TCR α 遺伝子の定常領域(Trac)に、2Aペプチドによってレポーター遺伝子(ZsGreenまたはhCD2)を連結したノックイン(KI)マウスを作製した。Cas9タンパク質、sgRNA、ターゲティングベクターの一本鎖DNAをC57BL/6マウス受精卵にマイクロインジェクションし、ICR仮親マウスに移植することでマウスを作出した。これらのマウスでは、遺伝子再編成を受けて機能的なTCR α を発現する細胞だけがレポータータンパク質を発現する。レポーター系統どうしを交配し、Trac^{ZsGreen/hCD2}マウスを作製した。

さらに、2種類のTCR α を細胞表面に発現する細胞を検出するため、TCR α 定常領域の細胞外部位にエピトープタグ配列を挿入したマウスを作製した。挿入されたエピトープタグがTCR α の構造と機能に影響しないように、OT-I-TCRのアミノ酸配列と二次構造予測アルゴリズムを用いて最適なエピトープタグの種類と挿入部位を検討した。計算結果にもとづいてエピトープタグを挿入したOT-I-TCRをT細胞株TG40に発現させ、TCRの発現量と抗原ペプチドに対する反応性を指標としてエピトープタグを選抜した。Trac^{ZsGreen}マウスにALFAタグを、Trac^{hCD2}マウスに

Myc タグを挿入するため、それぞれのマウスの精子と C57BL/6 マウスの卵を用いて受精卵を作製し、Cas9 タンパク質、sgRNA、ターゲティングベクターの一本鎖 DNA をマイクロインジェクションし、ICR 仮親マウスに移植することでエピトープタグ KI マウスを作出した。得られたマウスどうしを交配し、Trac^{ZsGreen-ALFA/hCD2-Myc} マウスを樹立した。

(2) Dual-TCR T 細胞の生成機構と体内分布の解明

上記のレポーターマウスを用いて、生体内の各臓器（胸腺、脾臓、リンパ節、腸管）から血球細胞を調製し、蛍光標識抗体で染色したのちフローサイトメーターを用いて dual-TCR T 細胞を検出した。必要に応じて、磁気ビーズ結合抗体と磁気カラム、または蛍光セルソーターを用いて目的の細胞集団を単離した。また、単離した T 細胞を、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体でコーティングしたマルチウェルプレートで培養し、TCR 刺激による影響を調べた。

4 . 研究成果

(1) Dual-TCR T 細胞を検出・単離するためのレポーターマウスの作製

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、TCR α 遺伝子の定常領域（Trac）に、2A ペプチドによって ZsGreen 遺伝子を連結した KI マウス（Trac^{ZsGreen}）または hCD2 を連結した KI マウス（Trac^{hCD2}）を作製した。これらのマウスでは、遺伝子再編成を受けて機能的な TCR α を翻訳している細胞だけが ZsGreen または hCD2 タンパク質を発現する。それぞれの KI マウスの脾臓細胞をフローサイトメーターで解析したところ、T 細胞のおよそ 60% がレポータータンパク質を発現していた。これらのマウス系統どうしを交配し、Trac^{ZsGreen/hCD2} マウスを作製した。

Trac^{ZsGreen/hCD2} マウスの脾臓 T 細胞のうち、ZsGreen 単陽性が約 40%、hCD2 単陽性が約 40%、ZsGreen/hCD2 両陽性が約 20% であった。セルソーターを用いてそれぞれの T 細胞集団を単離して RNA を抽出し、各レポーター特異的プライマーを用いてそれぞれの TCR α 転写産物を PCR 増幅し、塩基配列を確認した。ZsGreen/hCD2 両陽性 T 細胞では両アレルとも in-frame な遺伝子再編成を受けていたが、ZsGreen または hCD2 単陽性 T 細胞では発現されるレポーターのアレルのみ in-frame であり、もう一方は out-of-frame な遺伝子再編成を受けていた。以上の結果より、本手法によって、両アレルで遺伝子再編成に成功し 2 種類の TCR α を発現する dual-TCR T 細胞と、1 種類の TCR α を発現する single-TCR T 細胞を定量的に識別できることが確認された。

C α の下流にレポーター遺伝子を接続したことによる T 細胞の TCR 刺激応答能への影響を評価するため、Trac^{ZsGreen/hCD2} マウスの脾臓 T 細胞を採取し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激しつつ 3 日間培養した。T 細胞の活性化マーカー CD69、CD25、CD44 の発現強度は、野生型マウスの T 細胞と比較して大きな差を示さなかった。同様に、T 細胞の分化への影響を評価するため、Trac^{ZsGreen/hCD2} マウスの脾臓、胸腺、鼠蹊部リンパ節を採取し、CD4 T 細胞および CD8 T 細胞の割合を算出したところ、野生型マウスと比較してそれらの値に差はみられなかった。従って、Trac^{ZsGreen/hCD2} マウスでは T 細胞の TCR 刺激応答能は正常であり、T 細胞の分化も正常であることが示された。

2 種類の TCR α を細胞表面に発現する細胞を検出するため、Trac^{ZsGreen/hCD2} マウスの TCR α 定常領域の細胞外部位にエピトープタグ配列を挿入したマウスを作製した。Trac^{ZsGreen} マウスに ALFA タグ、Trac^{hCD2} マウスに Myc タグを挿入し、Trac^{ZsGreen-ALFA/hCD2-Myc} マウスを樹立した。これらのマウスでは、ZsGreen を発現するアレルの TCR α は ALFA タグを指標として、hCD2 を発現するアレルの TCR α は Myc タグを用いて検出できることを確認した。脾臓においては、全 T 細胞のうち約 20% が dual-TCR T 細胞であり、そのうちおよそ 20%（全 T 細胞の 4%）は 2 種類の TCR α

を細胞表面に発現する T 細胞であり(ホロ dual-TCR と呼ぶ)、残りのおよそ 80%は一方の TCR α を細胞表面に出しもう一方の TCR α を細胞内にとどめている T 細胞であった(ヘミ dual-TCR と呼ぶ)。

以上のように、生体内における dual-TCR T 細胞の実態を検出することができるモデルマウスの作製に成功した。

(2) Dual-TCR T 細胞の生成機構と体内分布の解明

Dual-TCR T 細胞の生成機構を調べるため、Trac^{ZsGreen/hCD2} マウスの胸腺細胞をフローサイトメーターで解析した。レポーター遺伝子 ZsGreen と hCD2 は CD4⁺CD8⁺胸腺細胞において同時に発現し始め、正の選択を受けたばかりの CD4⁺CD8⁺CD69⁺細胞において ZsGreen/hCD2 両陽性の dual-TCR T 細胞の頻度が最も高くなった(29%)。dual-TCR T 細胞の頻度は CD4⁺CD8⁺細胞または CD4⁺CD8⁺細胞への分化に伴って低下し、脾臓 T 細胞とほぼ同じ値(20%)となった。以上の結果から、TCR α 鎖の遺伝子再編成は CD4⁺CD8⁺胸腺細胞において両アレル同時に起こることがわかった。また、CD4⁺CD8⁺期に生成された dual-TCR T 細胞のおよそ 3 割は、CD4⁺CD8⁺細胞または CD4⁺CD8⁺細胞への分化に伴って負の選択を受けて取り除かれることが示唆された。

Trac^{ZsGreen/hCD2} マウスを用いて、脾臓、鼠蹊部リンパ節、小腸パイエル板、腸間膜リンパ節の T 細胞における dual-TCR T 細胞を調べた。脾臓、鼠蹊部リンパ節、腸管膜リンパ節では CD4 T 細胞、CD8 T 細胞ともに dual-TCR T 細胞の頻度は 20%前後であったが、小腸パイエル板の CD4 T 細胞では 28%と高い値を示した。また、脾臓の Foxp3⁺制御性 T 細胞においても dual-TCR T 細胞の頻度が有意に高かった。

Trac^{ZsGreen-ALFA/hCD2-Myc} マウスを用いて、胸腺、脾臓、鼠蹊部リンパ節の T 細胞におけるホロ dual-TCR T 細胞、ヘミ dual-TCR T 細胞を調べたところ、dual-TCR T 細胞の全体の頻度はどの臓器においても 20%前後であったのに対し、dual-TCR T 細胞に占めるホロ dual-TCR T 細胞の頻度は、胸腺 CD4⁺CD8⁺細胞で 24%、胸腺 CD4⁺CD8⁺細胞で 39%、脾臓 CD4 T 細胞で 19%、脾臓 CD8 T 細胞で 28%、鼠蹊部リンパ節 CD4 T 細胞で 23%、鼠蹊部リンパ節 CD8 T 細胞で 37%と、各 T 細胞集団で異なる値を示した。

現在、Trac^{ZsGreen-ALFA/hCD2-Myc} マウスを用いて、ホロ/ヘミ dual-TCR T 細胞の生成機構と体内動態についても解析を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Muro Ryunosuke, Narita Tomoya, Nitta Takeshi, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Spleen tyrosine kinase mediates the TCR signaling required for T cell commitment and T17 differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1045881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.1045881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nitta Takeshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Mesenchymal stromal cells in the thymus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-022-00219-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yan Minglu, Komatsu Noriko, Muro Ryunosuke, Huynh Nam Cong-Nhat, Tomofuji Yoshihiko, Okada Yukinori, Suzuki Hiroshi I., Takaba Hiroyuki, Kitazawa Riko, Kitazawa Sohei, Pluemsakunthai Warunee, Mitsui Yuichi, Satoh Takashi, Okamura Tadashi, Nitta Takeshi, et al	4. 巻 23
2. 論文標題 ETS1 governs pathological tissue-remodeling programs in disease-associated fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1330 ~ 1341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41590-022-01285-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mino Nanami, Muro Ryunosuke, Ota Ayami, Nitta Sachiko, Lefebvre Veronique, Nitta Takeshi, Fujio Keishi, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 34
2. 論文標題 The transcription factor Sox4 is required for thymic tuft cell development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nitta Takeshi, Ota Ayami, Iguchi Takahiro, Muro Ryunosuke, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 302
2. 論文標題 The fibroblast: An emerging key player in thymic T cell selection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunological Reviews	6. 最初と最後の頁 68 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imr.12985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 井口聖大, 新田剛, 高柳広
2. 発表標題 二つのT細胞受容体を発現するT細胞の体内動態解析
3. 学会等名 第8回ベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Nitta
2. 発表標題 Diversity of thymic stromal cells for T cell repertoire selection
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田 剛
2. 発表標題 T細胞分化における線維芽細胞の役割
3. 学会等名 第50回日本臨床免疫学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田 剛、高柳 広
2. 発表標題 胸腺線維芽細胞による免疫寛容の制御
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新田 剛、高柳 広
2. 発表標題 胸腺線維芽細胞による中枢性免疫寛容の制御
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・日本免疫学会合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科 免疫学 高柳研究室 研究内容 http://osteoimmunology.com/research.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------