

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670228

研究課題名(和文) ROR γ t陽性自然リンパ球を特異的に欠損するマウスの作成研究課題名(英文) Generation of ROR γ t+ Innate lymphoid cell deficient mouse

研究代表者

澤 新一郎 (Sawa, Shinichiro)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80611756

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)：3型自然リンパ球(ILC3)は転写因子ROR γ t依存的に分化成熟し、粘膜組織バリア機能の維持に重要な役割を果たす。本研究では、T細胞とILC3の分化段階において発現するマーカー遺伝子の時間的差異を利用し、ILC3特異的に欠損可能なマウスの作成を行った。CRISPR/Cas9によるDNA 2重鎖切断後の相同組換えを利用し、ROR γ t遺伝子1st Met以下へloxP配列で挟まれたDTR遺伝子を挿入したマウス個体を得た。本マウスの末梢血CD4陽性T細胞分画にDTR陽性細胞の発現を確認した。今後、Lck-Cre発現マウスとの交配により、ILC3のみにDTRを発現するマウス系統を樹立する。

研究成果の概要(英文)：Group 3 innate lymphoid cell (ILC3) develops ROR γ t dependent manner and plays critical roles on maintaining mucosal barrier function. In this study, with genetic strategy to dissect T cell and ILC3 development pathway, I generated new mouse model in which ILC3 can be depleted. After double strand DNA break with CRISPR/Cas9 system, loxp franked Diptheria toxin (DTR) transgene was knocked-in to the ROR γ t locus. I could observe DTR expression on one of the knock-in founders. I am generating ILC3 specifically deletable mice by crossing this KI founders with T cell specific Cre mouse lines.

研究分野：免疫学

キーワード：自然リンパ球 遺伝子工学 腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

3型自然リンパ球(ILC3)は転写因子 ROR γ t 依存的に分化成熟し、インターロイキン(IL-) 22 の産生をはじめ、粘膜組織バリア機能の維持に重要な役割を果たす^①。一方、ROR γ t 依存的に分化成熟する L-17 産生性ヘルパーT 細胞は腸管の炎症を増悪させる可能性があると考えられている。炎症性腸疾患におけるこれらのリンパ球機能を評価するためには、各々を欠損したマウスが有用であるが、ILC3 は Th17 との分化経路やエフェクター機能が重複しており、ILC3 のみを特異的に欠失するマウスモデルは存在しない^②。そのため、生体における ILC3 特異的な機能は不明な点が多い。

2. 研究の目的

loxP 配列およびサル由来ジフテリア毒素受容体(DTR)配列を持ち、自然リンパ球系列を特異的に生体内から除去可能なトランスジェニックマウスの作出を行う

3. 研究の方法

loxP 配列で挟まれた DTR-EGFP 配列をタイプ 3 自然リンパ球(ILC3)のマスター制御因子 ROR γ t のプロモーター直下に挿入した Bacterial Artificial Chromosome (BAC) トランスジェニックマウスまたはノックインマウスを作成後、T 細胞系列特異的にリコンビナーゼ Cre を発現する Lck-Cre マウスと交配し、T 細胞以外の ROR γ t 陽性細胞、つまり ILC3 をジフテリア毒素依存的に除去が可能となる。

4. 研究成果

平成 25 年度

Loxp-DTREGFP-loxp 配列を pCDNA3.1 発現ベクターに挿入後、ストローマ細胞株に遺伝子導入したところ、良好な EGFP 発現が得られ、リコンビナーゼ Cre の共発現による EGFP 発

現消失が確認できた。このコンストラクトを SK3.1 shuttle ベクターに挿入後、ROR γ t 遺伝子を持つ BAC DNA で組替えを行った。この組替え BAC DNA を C57BL6 マウス受精卵にインジェクションし、ファウンダーを得た。しかし、これらのマウスの胸腺および腸管における EGFP 発現はスクリーニングした 3 系統からは現在得られていない。挿入した Loxp-DTREGFP-loxp 配列のうち、(1) 5' 側の loxp と DTREGFP 配列間の塩基数が十分に取っていない (2) EGFP 配列と 3' 側の loxp の間に polyA 配列を挿入しなかったことが、*in vivo* における挿入遺伝子の十分な発現を認めない原因であったと考えられる。

平成 26 年度

EGFP-loxp-DTR-KusabiraOrange (Ku0)-loxP 配列を再構築し、HEK293T 細胞における発現を再確認後、ROR γ t 遺伝子の 1st Met 以下に EGFP-loxp-DTR-Ku0-loxp を発現するターゲットベクターを作成した。組織発現特異性を担保するため、CRISPR/Cas9 による DNA 2 重鎖切断および相同組換え技術を利用し、EGFP-loxp-DTR-Ku0-loxp 遺伝子の ROR γ t 遺伝子の 1st Met 以下へのノックインを試みた。受精卵へのインジェクションの結果得られた産仔のうち、4 匹に目的領域へのノックインが認められた。さらに、本マウスの末梢血 CD4 陽性 T 細胞分画に DTR 陽性細胞の発現を確認した。現在、これらのマウスの系統化と、Lck-Cre マウスとの交配をすすめ、ILC3 特異的欠損マウスの作成を行っている

<引用文献>

① Shinichiro Sawa, Matthias Lochner, Naoko Satoh-Takayama, Sophie Dulauroy, Marion Bérard, Melanie Kleinschek, Daniel Cua, James P. Di Santo, and Gérard Eberl. ROR γ t⁺ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat Immunol.* 12(4): 320-326, 2011

② Gérard Eberl and Shinichiro Sawa. Opening the crypt: current facts and hypotheses on the function of cryptopatches. *Trends in Immunology*, 31(2): 50-55, 2010

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 9 件)

1. Noriko Komatsu, Kazuo Okamoto, Shinichiro SAWA, Tomoki Nakashima, Masatsugu Oh-Hora, Tatsuhiko Kodama, Sakae Tanaka, J.A. Bluestone and Hiroshi Takayanagi, Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into T_H17 cells in autoimmune arthritis. *Nat. Med.* 20: 62-68, 2014
2. Takako Negishi-Koga, H-J Gober, Eriko Sumiya, Noriko Komatsu, Kazuo Okamoto, Shinichiro Sawa, Ayako Suematsu, Tomomi Suda, Kojiro Sato, Toshiyuki Takai and Hiroshi Takayanagi. Immune complexes regulate bone metabolism through FcR γ signaling. *Nat Commun.*, 6:6637, 2015
3. Lynett Danks, Noriko Komatsu, Matteo M Guerrini, Shinichiro Sawa, Marietta Armaka, George Kollias, Tomoki Nakashima and Hiroshi Takayanagi. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis.*, in press.
4. 澤新一郎. マウスおよびヒト粘膜組織における ROR γ t 陽性自然リンパ球の意義. *日本臨床免疫学会誌*.36(1):11-6, 2013
5. 澤新一郎. 自然リンパ球と腸管免疫. *皮膚アレルギーフロンティア* (メディカルレビュー社) Vol.11 No.2, 50-51, 2013
6. 澤新一郎. 自然リンパ球研究 Up to Date.

実験医学 (羊土社) Vol.32; No.13, 2153-2159, 2014

7. 澤新一郎. 3型自然リンパ球とは? *医学のあゆみ* (医歯薬出版) Vol 251; No.6 504-506, 2014
8. 澤新一郎. 自然リンパ球 (ILC, innate lymphoid cell) の役割. *化学と生物* (日本農芸化学会誌) Vol.53, 78-81, 2015
9. 澤新一郎. 新種の免疫細胞「自然リンパ球」炎症と免疫 (先端医学社) Vol.23; No.4, 2015 (掲載予定)

[学会発表] (計 6 件)

1. Do ROR γ t⁺ innate lymphoid cells play critical role in the intestinal immunity? Kyoto T cell Conference, 国際シンポジウム, 京都 2013
2. Chasing fates of intestinal innate lymphocytes. New Perspectives in Basic and Applied Immunology Symposium, シンポジウム, Heidelberg, Germany, 2013
3. リンパ節形成に必要な微小環境 新学術領域研究合同シンポジウム, 京都 2014
4. Roles of mesenchymal cell derived RANKL on the development of gut immune system. The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014, 国際シンポジウム, 東京 2014
5. Intestinal homeostasis regulated by mesenchymal stroma cells 第43回日本免疫学会学術集会・国際シンポジウム 京都 2014
6. 自然リンパ球とは? 第 39 回日本リンパ学会総会・シンポジウム 東京 2015

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤 新一郎 (Sawa Shinichiro)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80611756