

博士論文

肥満脂肪組織中で増加する特異的 T 細胞の同定及び
TCR トランスジェニックマウスの作製

谷口 香織

目次

要旨	1
第1章 序文	2 - 11
1-1 肥満と糖尿病	2
1-2 肥満脂肪組織リモデリング	4
1-3 脂肪組織炎症と T 細胞	6
1-4 自己免疫疾患モデルとしての TCR トランスジェニック (TG) マウス	9
1-5 本研究の目的	10
第2章 材料・方法	12 - 38
第3章 結果	39 - 90
3-1 マウスを使用した高脂肪食 (High Fat Diet: HFD) 給餌による肥満モデル	39
3-2 肥満脂肪組織浸潤 T 細胞サブタイプ並びに TCR レパートリーの変化	42
3-3 肥満脂肪組織浸潤 T 細胞が発現する特異的 TCR の同定	57
3-4 TCR 複合体形成の検証	63
3-5 TCR-TG マウスの作製	66
3-6 TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの胸腺に於ける T 細胞成熟	75
3-7 TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの末梢に於ける成熟 T 細胞	83
3-8 TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウス成熟 T 細胞の応答性	87
第4章 考察	91 - 100
4-1 はじめに	91
4-2 V α 5T 細胞の同定に関して	92
4-3 TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスが持つ V α 5T 細胞の胸腺に於ける分化成熟に関して	93
4-4 V α 5T 細胞が置かれる免疫寛容状態に関して	96
4-5 作製した TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスのモデル動物としての有用性に関して	99
第5章 総括	101
第6章 参考文献	102 - 107
謝辞	108

要旨

肥満によって脂肪組織で惹起される炎症反応はインスリン抵抗性の主因となり、やがて2型糖尿病発症へと至る為、肥満脂肪組織炎症の制御が2型糖尿病を予防する上で重要である。その様な炎症状態に置かれた脂肪組織では特異的なT細胞が存在する事が知られており、T細胞依存性の適応免疫応答が生じていると推測された。そこで本研究では、肥満脂肪組織炎症を自己免疫疾患の側面から検証する為、肥満脂肪組織への特異的な浸潤が見られるT細胞のTCR同定を主な目的とした。さらに今後の肥満脂肪組織炎症研究に於ける有用なモデル動物となる事を期待し、同定したT細胞を持つTCR-TGマウスを作製した。

第 1 章

序文

1-1 肥満と糖尿病

現在、世界中で問題となっているのが肥満人口の増加である。日本に於いても食生活の欧米化や生活環境の変化に伴い肥満人口は増加しており、特に男性に於いてはその割合が 30 年前と比較してほぼ倍増しているとの報告がある（厚生労働省「国民健康・栄養調査結果の概要」／平成 23 年）。さらに肥満は動脈硬化や、脂肪沈着による肝機能障害等の様々な制御困難な疾患群発症のリスクを高める要因である事が知られている。その様な肥満を基盤として発症する代表的な疾患の一つとして糖尿病が挙げられる。

糖尿病は、1 型糖尿病、2 型糖尿病、妊娠糖尿病、そして遺伝子異常や感染症等、他の疾患に誘発される糖尿病に分類される。1 型糖尿病は自己免疫疾患の一つで、インスリンを産生する膵臓の β 細胞が自己の持つ免疫システムにより攻撃を受け消滅していくことが原因で発症する。子供の内に発症する事が多いと言われている。一方、糖尿病患者の 95 % 以上を占めると言われているのが肥満を基盤として発症する 2 型糖尿病である。肥満は脂肪組織を軽度の炎症状態にし、それがインスリン抵抗性獲得の原因となる事が知られている。インスリン抵抗性獲得後、初期は膵臓 β 細胞からの

インスリンの過剰分泌によって対応するため高インスリン血症を呈するが、最終的にβ細胞の疲弊によりインスリン分泌不全となり糖尿病を発症する。肥満から炎症惹起にいたるメカニズムに関しては未だ不明な点が多く、現在世界中の機関で研究が進められている段階である。本研究も、肥満に伴う脂肪組織炎症の発生機序に焦点を当てて行っている。妊娠糖尿病は妊娠を契機に発症するもので、産後寛解した場合でも妊娠糖尿病のない人と比較して将来糖尿病を発症する可能性が高い事が指摘されている。そして上記に示した様な特定の原因によらない糖尿病として、肝臓病や膵臓病、甲状腺病に合併して発症する場合や、ステロイドホルモンなどの薬害として発症する場合、非常に稀な遺伝子変異に起因する場合等が知られている。

糖尿病は一度発症したら治癒する事は無く、進行と共に網膜症や腎症等の様々な合併症を誘発する。さらに糖尿病は全身の動脈硬化を促進し、日本人の死因第2位を占める心筋梗塞や狭心症等の心疾患や、第3位の脳血管疾患の原因ともなり得る（厚生労働省「平成22年人口動態統計」）。現在、日本に於いては急速に高齢化が進行しており、それに伴い2型糖尿病患者数は今後さらに増加する事が懸念されている。その為、肥満から2型糖尿病発症へ至るメカニズムを解明し、病態を制御する方法を早急に確立する事が社会的にも求められている。

1-2 肥満脂肪組織リモデリング

脂肪組織は栄養分の主要な貯蔵庫としての役割以外に、様々なホルモンやサイトカインの積極的な分泌を担う器官として知られている。肥満は過剰に摂取した栄養分が脂肪細胞に蓄積された結果生じ、脂肪細胞の肥大化と同時に、脂肪組織内への血管新生、それに伴う免疫細胞の浸潤増加をもたらし、さらに炎症性のアディポカインの産生を亢進する。肥満による脂肪組織に於けるこれらの変化は組織リモデリングとして知られている [1]。肥満した脂肪組織では上記のような組織リモデリングにより軽度の炎症が惹起され、慢性化する事で全身性の炎症へと発展する。炎症とインスリン抵抗性との関連については 20 年程前の先行研究により、炎症反応を担う主要なサイトカインの一つである **Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)** がインスリン抵抗性獲得に重要な働きをすることが示されている [2, 3]。通常、インスリンがインスリン受容体に結合すると、受容体を構成するサブユニットの一種である β サブユニットの細胞質側に位置するチロシンキナーゼが活性化され、その下流のシグナル伝達物質 **Insulin Receptor Substrate (IRS) -1** のチロシン残基がリン酸化される。それを受けて、更に下流へとシグナルが伝達されるわけだが、TNF- α は IRS-1 のセリン残基をリン酸化し不活性型へと制御する [3]。それによりインスリンシグナル伝達が阻害され、主に骨格筋と脂肪細胞で発現が見られる **Glucose Transporter (Glut) 4** の発現量低下とそれに起因した血中の糖の取り込み障害が生じる [2, 4]。この機構により、炎症状態におかれ

る組織ではインスリン抵抗性が誘導され、慢性化すると最終的には2型糖尿病発症へと至る。その為、肥満脂肪組織に於ける炎症反応惹起及びこれの亢進、抑制のメカニズムに関して多くの先行研究が行われてきた。

現在までに明らかとなっているのは、マクロファージの関与である。脂肪組織中には元々少数の脂肪組織在住マクロファージが存在し、それらはM2型と呼ばれる炎症を抑制する働きを持つマクロファージである。しかしながら肥満に伴いそれらの数は減少し、反対にM1型と呼ばれる炎症亢進性のマクロファージの浸潤が、脂肪細胞から分泌される Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) に誘導され増強される [5, 6]。それらの産生する各種炎症性サイトカインにより炎症反応が亢進され、特に TNF- α は脂肪細胞に対し脂肪分解を誘導し、放出された飽和脂肪酸は Toll Like Receptor-4 (TLR-4) を介してマクロファージを活性化する [7, 8, 9]。TLR-4 はパターン認識受容体の一つで、TLR ファミリーに属する分子は微生物細胞壁成分あるいは病原菌特異的な核酸成分を認識し、炎症性サイトカインと1型インターフェロンの産生を誘導することが知られている。すなわち、遊離した脂肪酸によりマクロファージは炎症性に制御される為、M1型マクロファージを含む炎症亢進性免疫細胞の更なる脂肪組織内への浸潤が促進され、炎症反応が増強されるという悪循環が生じる [1]。

1-3 脂肪組織炎症と T 細胞

近年、マクロファージ以外の免疫細胞の関与についても様々な報告がなされており、その中でも適応免疫システムの中核を担う T 細胞の重要性が多くの研究チームから指摘されるようになった。

既に先行研究により、T 細胞もまた脂肪組織内へ浸潤し、その浸潤は肥満症に相関している事が明らかにされている。最近では、CD8T 細胞が高脂肪食 (High Fat Diet: HFD) 負荷後 2 週目からマクロファージに先んじて脂肪組織へ浸潤し、それらを中和抗体を用いて除去した場合、或いは遺伝的に CD8 を欠損している場合に於いて、HFD 負荷による脂肪組織へのマクロファージの浸潤とそれに続く炎症反応が改善されるという報告がある [10]。またいくつかの研究チームからは IFN- γ を分泌する CD4⁺Th1 細胞の肥満脂肪組織への浸潤が報告されている [11, 12, 13]。ヒトに於いても同様の結果が報告されており、CD4⁺Th1 細胞の関与については確実性が高いものと考えられている [14]。さらに別のグループからは肥満女性に於いて、MHC クラス II による抗原提示に関わる MHC クラス II 関連遺伝子の発現が脂肪細胞で増強されている事に加え、マウスの場合も同様に HFD 負荷後 2 週目の時点で MHC クラス II の発現が脂肪細胞に於いて誘導される事が示されている [15]。この MHC クラス II の発現増加は、IFN- γ を含めた炎症性 Th1 細胞マーカーの増加と抗炎症性 Th2 細胞及び制御性 T 細胞マーカーの減少と並行し HFD 負荷後 2 週間以内に生じ、マクロファージの M1 型へ

の分化増強が生じる HFD 負荷後 12 週に先んずる結果となっている。その上この研究チームは、マクロファージに於ける炎症性サイトカイン分泌への偏向が生じるよりも早期の段階で既にインスリン抵抗性が生じている事も合わせて報告している。以上のように炎症性 T 細胞が肥満脂肪組織に於ける炎症惹起及び促進へもたらす影響は大きい事が窺えるが、未だ不明な点が多く更なる研究が必要とされる。

次に炎症抑制に働く T 細胞については、肥満進行に伴い Th2 細胞及び制御性 T 細胞の脂肪組織浸潤数が減少する事がいくつか報告されている [10, 11, 16]。Winer らのグループによると、HFD 負荷により肥満を誘導した recombination activating gene (RAG) -1^{-/-}マウスに CD4T 細胞を移植した場合、肥満に対して抵抗性を示すと同時にインスリン感受性が改善され、移植した CD4T 細胞の大部分は Foxp3⁺ の Th2 細胞であった事が示されている [16]。また Ilan らのグループからは、レプチン欠損に起因した過食症を呈する肥満モデルとして知られる ob/ob マウスへの、制御性 T 細胞の経口投与により血糖値の低下及び脂肪組織内炎症の緩和が見られたとの報告がある [17]。ところがヒトの脂肪組織に於ける T 細胞マーカーの発現量について検証したグループからは、細胞傷害性 T 細胞や Th1 細胞と同様に Th2 細胞及び制御性 T 細胞のマーカーが肥満患者の内臓脂肪組織で増加している事が報告されている [14]。以上の様に脂肪組織が炎症状態にある時、炎症抑制性の T 細胞数に減少が見られる事は動物実験上は確からしいが、それがヒトの場合も同様に適応される現象であるのか等、未だ

議論の余地があると言える。

一方で興味深い事に、炎症の亢進性または抑制性に係らず脂肪組織中へ浸潤している T 細胞の発現する T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) には、その多様性に制限が見られる事が複数の研究チームにより報告されている [10, 11, 16, 18]。TCR は認識する抗原の特異性決定を担う事から、以上の様な報告は脂肪組織中に特定の抗原が存在し、その抗原を認識した T 細胞が選択的に動員された事を示唆する。その為、特定の TCR を発現した T 細胞が肥満脂肪組織中の抗原を認識した後、適応免疫応答を誘導している可能性は十分にあり、肥満脂肪組織内で惹起される炎症反応と密接に関与する事が推測出来る。それ故、肥満脂肪組織炎症を制御する新規治療法開発を目指して、脂肪組織に存在する抗原の特定が世界中で急がれている中、その様な T 細胞の同定は非常に重要であると言える。

1-4 自己免疫疾患モデルとしての TCR トランスジェニック (TG) マウス

1 型糖尿病は、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞上に発現する抗原を認識する自己反応性の T 細胞や抗体の存在によって発症する自己免疫疾患であるが、最もよく用いられる 1 型糖尿病モデルとして non-obese diabetic (NOD) マウスが知られている。現在までに NOD マウスを用いて膵臓 β 細胞上の抗原に特異的な T 細胞クローン (BDC2.5 として知られる) が同定され、同定された T 細胞クローンを糖尿病発症前の若い NOD マウスに移植した場合に病態の発症と進行が促進される事が明らかとなった [19, 20, 21]。その後 BDC2.5 クローンの発現する TCR について同定され、作製された BDC2.5TCR-TG マウスの T 細胞は自己反応性であるにも係らず、胸腺に於ける負の選択を回避し、正の選択を受けて成熟し末梢へと遊走する事が報告されている [22, 23]。また、内因性の TCR を発現する T 細胞を排除する事で、より劇的に病態が進行する事が知られている。

この様な BDC2.5TCR-TG マウス以外にも 1 型糖尿病モデルマウスは幾つか作製されており、さらにこれに加え、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) や関節リウマチ、自己免疫性胃腸炎等のモデル動物としても TCR-TG マウスが様々作製されてきた [24]。この様な歴史を鑑みると、自己免疫疾患の研究に於ける TCR-TG マウスモデルの有用性は自明であると言える。

1-5 本研究の目的

上述した様に、肥満脂肪組織に生じる炎症はインスリン抵抗性の原因となり、果ては2型糖尿病の発症へと至る為、肥満脂肪組織炎症の制御が2型糖尿病予防に重要である事は明らかである。さらにその様な炎症状態に置かれる肥満した脂肪組織には特定の TCR を発現した T 細胞の浸潤が増加しており、T 細胞依存性の適応免疫応答が働いていると推測できる。そこで我々は2型糖尿病を自己免疫疾患の側面からとらえ、肥満脂肪組織内で適応免疫応答を開始する事が予測される特定の TCR を持つ T 細胞の同定を目的とした。さらに、体内の殆ど全ての T 細胞が同定した TCR を持つ TCR-TG マウスを作製し、新規の肥満脂肪組織炎症モデルの確立を目指した。今後、肥満脂肪組織で生じる一連の免疫応答を解明する際のみならず、肥満脂肪組織で曝露されると予測される特定の抗原を同定する上でも、本研究により得られた知見及び作製した TCR-TG マウスは、有益なものとなる事が期待される。

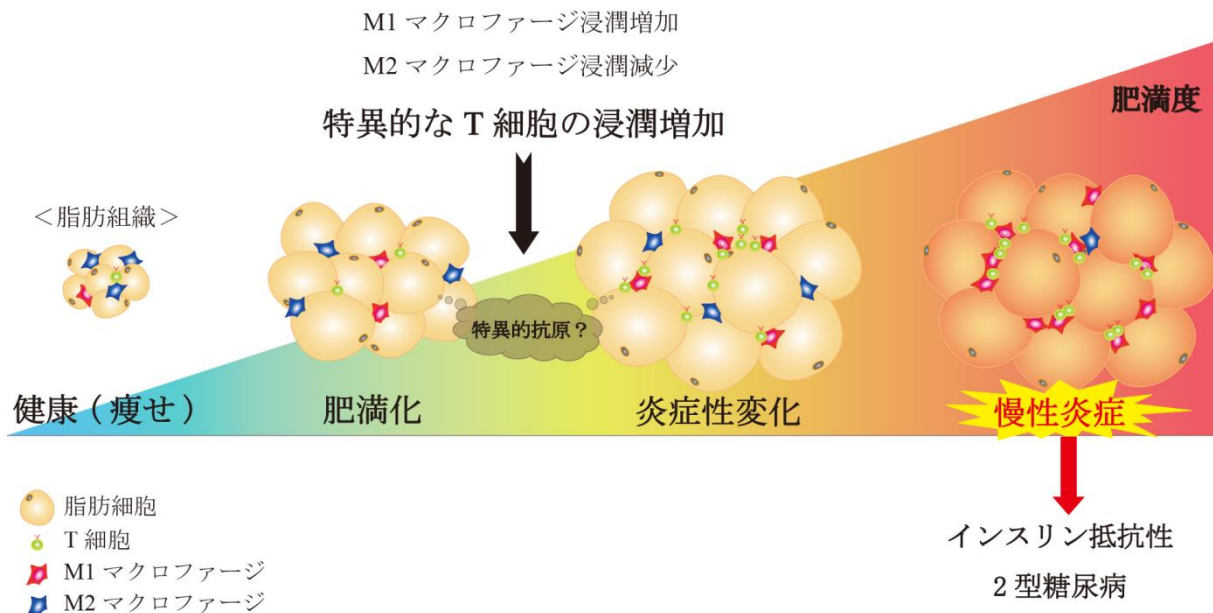


図 1. 肥満からインスリン抵抗性獲得に至るまでの脂肪組織に於ける変化の概略図
 肥満進行に伴い、M1 マクロファージの浸潤増加と M2 マクロファージの浸潤減少に代表される免疫細胞の挙動変化が生じる。その結果、脂肪組織で炎症が惹起され、その様な炎症状態の慢性化がインスリン抵抗性獲得の主因となる。近年、マクロファージと同様に T 細胞もまた肥満脂肪組織炎症に関与する事が分かってきた。T 細胞とマクロファージのどちらが先導しているかは未だ議論的であるが、特異的な T 細胞の浸潤が見られる事から、T 細胞依存性の適応免疫応答が関与している事が示唆されている。その為、肥満脂肪組織炎症の制御法開発を目指して、肥満脂肪組織で曝露されると推定される特定の抗原の同定が重要であると考えられている。

第 2 章

材料・方法

【使用動物】

C57BL/6Jcl マウス（日本クレア）を 12 時間の明暗サイクル下で飼育した。餌は飼育繁殖用食または肥満誘導食として γ 線 30 kGy 照射滅菌した CE-2 または High Fat Diet 32（共に、日本クレア）をそれぞれ与え、餌水は自由に摂取できる様にした。なお High Fat Diet 32 は粗脂肪含量が約 32 % であり、総カロリーに占める脂肪由来カロリーの比率が約 60 % の高脂肪飼料である。

また、作製したトランスジェニックマウスとの交配には、B6.129S2-*Tcra*^{tm1Mom}/J（理化学研究所 CDB）を使用した。このマウスは TCR α 鎖 C 領域の遺伝子を欠如している為、機能的 TCR α 鎖を産生できず、結果として内因性 $\alpha\beta$ T 細胞を欠損したモデルマウスである [25]。これらのマウスも同様の環境下で飼育した。

【血清採取】

0.02 ml/g 体重量の AVERTIN を腹腔内に投与した。麻酔が効いたことを確認後、パスツールピペットを用いて眼窩静脈叢から採血した。採取した血液は BD Microtainer[®]

に移し、Centrifuge 5418 (Eppendorf) を用いて 12000 rpm、室温で 15 分間遠心後、上層に位置する血清をチューブに取り $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【脂肪組織からの T 細胞を含む Stromal Vascular Fraction (SVF) の分離】

精巢上体脂肪を採取し、ヘパリン - Phosphate Buffered Saline (PBS) 溶液 (1 unit/mL) 中で 2 mm 画程に細かく刻んだ。Vortex を用いて十分に攪拌した後 $1000\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 8 分間遠心し、浮遊した脂肪組織を回収した。Collagenase Type II (MERCK MILLIPORE) を 2 mg/mL 含んだ PBS 中に、回収した脂肪組織を入れ 200 rpm、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 40 分間インキュベートした。脂肪組織が完全に分解されたことを確認後 $1000\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 8 分間遠心し、ペレット状に現れたリンパ球を含む分画 SVF を回収した。

【フローサイトメトリーによる解析】

採取した細胞を FACS 用バッファー (5 % Fetal Bovine Serum (FBS) /PBS) 中に懸濁し、himacCF7D2 (日立) を用いて室温で 1400 rpm、4 分間あるいは $400\times g$ 、5 分間遠心し上清を除去した。染色には細胞 $< 10^7$ に対して 100 μl の FACS 用バッファーを使用した。初めに Fc 受容体を介した非特異的な抗体の接着をブロックする為、Purified anti-CD16/32 を 1/100 希釈した FACS 用バッファーで細胞を懸濁し氷中で 30 分置いた後、同様に遠心し上清を除去した。次に下記の抗体を FACS 用バッファーで各適正濃

度に希釈したところへ細胞を懸濁し氷中に 30 分保持した後、FACS 用バッファー 1 ml で細胞を洗った。また細胞内染色をした際は、細胞を 1 ×BD Perm/Wash™ バッファーで洗った後、100 µl の BD Cytofix/Cytoperm™ で懸濁し 10 ~ 20 分間氷中で保持した。1 ×BD Perm/Wash™ バッファーで一度細胞を洗った後、抗体が各適正濃度に希釈された 1 ×BD Perm/Wash™ バッファーで細胞を懸濁し氷中で 30 分間保持した。1 ×BD Perm/Wash™ バッファーで細胞を洗い、最後に再度 FACS 用バッファーで洗いを行った。この時に 70 µm のセルストレイナーを通し細胞塊が残らないようにした。Flow Cytometer は BD 社製 LSR II または Aria™ II セルソーターを使用した。

【RNA 抽出及び逆転写反応による cDNA 合成】

細胞を 500 µl または 1 ml の TRIzol® Reagent (invitrogen) 中でよく懸濁し、室温で 5 分間静置した。クロロホルム (和光純薬工業) を 100 µl または 200 µl 加え懸濁し 3 分間室温に静置した後、12000 ×g、4 °C で 15 分間遠心した。上部の水層を新しいチューブに取り 60 % 量のイソプロパノール (和光純薬工業) を添加し攪拌後、室温で 10 分間静置した。12000 ×g、4 °C で 10 分間遠心し、得られた RNA の沈殿を 500 µl の 75 % エタノールで洗った。再度 12000 ×g、4 °C で 10 分間遠心し上清を除去後、30 分程風乾し DEPC 水 12 µl を加え 750 rpm、58 °C で 15 分間インキュベートし溶解した。得られた RNA 溶液は -80 °C で保存した。

OD 値を測定し、逆転写反応には 2 μg の total RNA を使用した。RQ1 DNase (Promega) 添付書に従って反応液の総量を 15 μl に調整し 30 分間 37 $^{\circ}\text{C}$ で DNase 処理を行い、1.5 μl の RQ1 DNase stop solution を添加後、65 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートし DNase を失活させた。次に ReverTra Ace[®] (TOYOBO) 添付書に従ってランダムプライマー、dNTP、5 \times バッファーの混合液を作製した。作製した混合液を DNase 処理した RNA 溶液へ添加し、19.5 μl ずつ 2 本のチューブへ分注した。一方へは 0.5 μl の ReverTra Ace[®] をもう一方へはネガティブコントロールとして 0.5 μl の DEPC 水を加え、30 $^{\circ}\text{C}$ 10 分、42 $^{\circ}\text{C}$ 60 分、99 $^{\circ}\text{C}$ 5 分と順に熱処理を行った。得られた cDNA を含む逆転写反応産物は 30 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

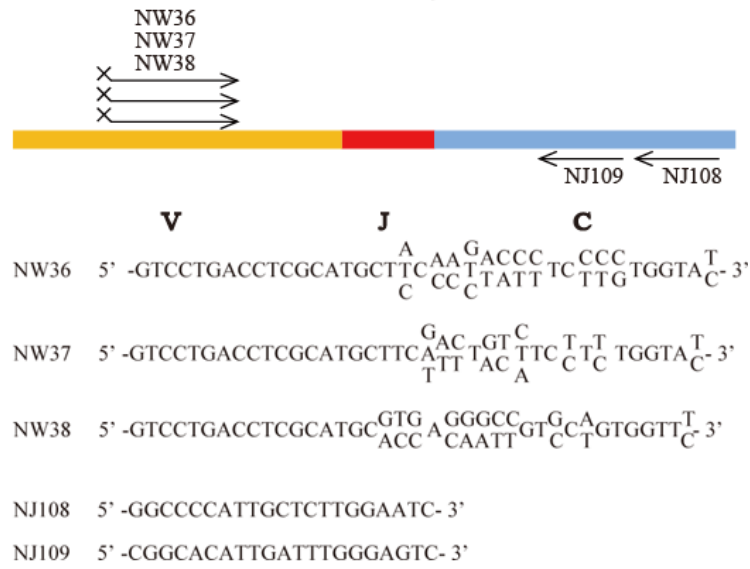
【Degenerate PCR】

TCR の V 領域、J 領域、D 領域 (β 鎖のみ) を増幅する為、 α 鎖 β 鎖それぞれについて 3 種類の縮重 Forward プライマーと Nested PCR を行う為の 2 種類の Reverse プライマーを用いた。これらのプライマーは、先行研究によって NOD マウスの腓島特異的な T 細胞の TCR 同定に用いられたものである [22]。KOD-Plus-Ver. 2 (TOYOBO) の添付書に従い総量 50 μl となるように PCR 反応溶液を調整し、1st PCR では鋳型となる cDNA を 40 ng 使用した。 α 鎖の増幅には NW36、NW37、NW38 と NJ108 プライマーを、 β 鎖の増幅には NK121、NK122、NK123 と MQ284 プライマーを用いた (図 2A)。

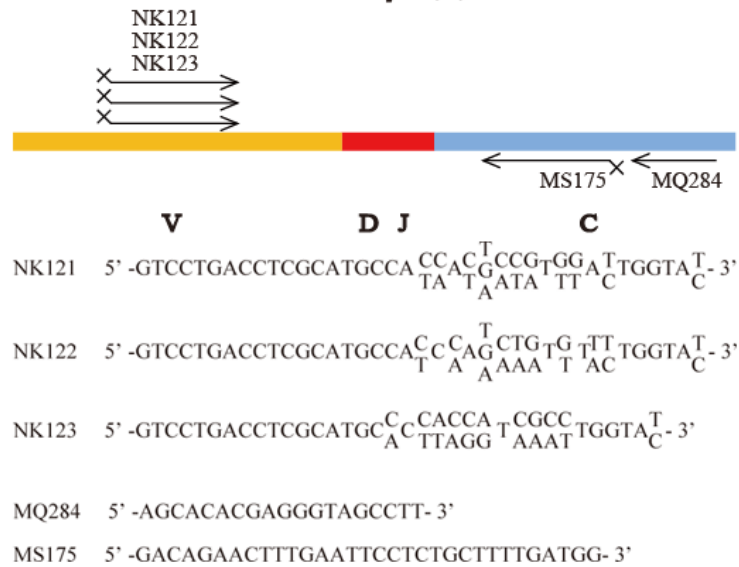
ただし、3種類の Forward プライマーは混合せずに、 α 鎖 β 鎖共に 3 本の個別に用意した PCR 反応溶液で行った。反応プログラムは表に示す通りである (図 2B)。得られた PCR 産物を 1% のアガロースゲルを用いて 100 V で 20 分間電気泳動し、期待されるバンドサイズである 310–603 bp の範囲を切り出した。切り出したゲル断片から GENE CLEAN[®] II Kit (Q-BIOgene) を用いて目的のサイズの PCR 産物を精製し、10 μ l の純水に溶出した。回収した 1st PCR 産物溶液を鋳型として 2 μ l 使用し、 α 鎖には NW36、NW37、NW38 と NJ109 プライマーを、 β 鎖には NK121、NK122、NK123 と MS175 プライマーを用いて同様に Nested PCR を行った。

A)

TCR α 鎖



TCR β 鎖



B)

94°C 2 min.

98°C 10 sec.)
40°C 1 min.) × 5
68°C 4 min.)

98°C 10 sec.)
45°C 1 min.) × 35
68°C 4 min.)

68°C 5 min.

4°C ∞

図 2. Degenerate PCR による TCR α 鎖或いは β 鎖が持つ V 断片の増幅

A) NK121、NK122、NK123 と NW36、NW37、NW38 は、全ての TCR α 鎖或いは β 鎖の V 断片由来の縮重オリゴヌクレオチドであり、5'プライマーとして使用した。1回目の PCR では、 α 鎖の増幅には NJ108、 β 鎖の増幅には MQ284 を 3'プライマーとして用い、得られた PCR 産物を鋳型として行った 2 回目の PCR では、NJ109 と MS175 をそれぞれ用いた。**B)** DNA ポリメラーゼは KOD -Plus- Ver. 2 を用い、上記の反応プログラムで PCR を行った。

【シングルセルソーティング及び RT-PCR】

精巢上体脂肪から上述した方法で SVF を回収し、Flow Cytometer による解析を行う場合と同様に細胞を抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体で染色した。MicroAmp[®] Fast Optical 96-well Reaction Plate (life technologiesTM) の各 well に予め 20 μ l の 1 \times RNA extraction buffer を分注しておき、BD 社製 AriaTM II セルソーターを用いて CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞をそれぞれ 1 細胞ずつ各 well に採取した(図 3) [26]。プレートをシールし Vortex で攪拌後、スピンドウンし室温で 15 分間静置した。上術した逆転写反応方法と同様に ReverTra Ace[®] 添付書に従ってランダムプライマー、dNTP、5 \times バッファーの混合液を作製し、20 μ l ずつ各 well へ分注し総量 40 μ l/well で逆転写反応を行った。

ソーティング及び cDNA 合成がされている事を確認する為、先ず初めにハウスキーピング遺伝子である β アクチンまたは 18S リボソーム RNA の Nested PCR を TaKaRa TaqTM (タカラバイオ) を用いて行った。使用したプライマーは、以下に列挙した (表 1)。目的サイズのバンドが検出されたサンプルで TRAV3-3 (V α 5) の Nested PCR を KOD -Plus- Ver. 2 (TOYOBO) を用いて行った。添付書に従い総量 50 μ l となるように PCR 反応溶液を調整し、鋳型として 1st PCR には純水で 5 倍希釈した逆転写産物を 5 μ l、2nd PCR には 1st PCR 産物を 2 μ l 使用した。シーケンス解析は (株) ファスマックに委託した。TRAV3-3 (V α 5) が検出されたサンプルについて上述した様に TCR β 鎖の

Degenerate PCR を行い、シーケンス解析により TRAV3-3 (V α 5) T 細胞の TCR β 鎖を同定した。

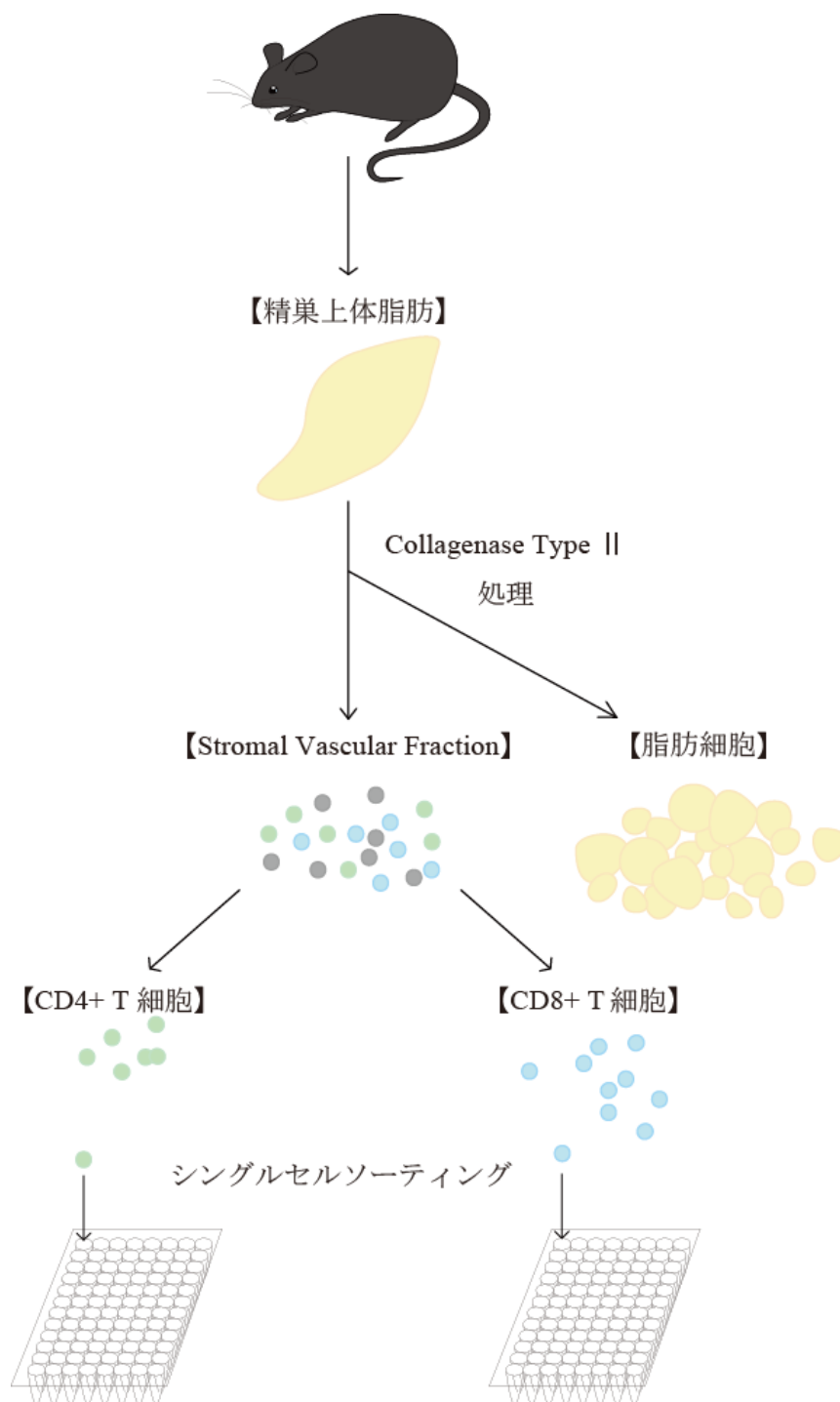


図 3. シングルセルソーティング方法の概略図

β actin 1 ST	SENSE	5' -GTGGCTACAGCTTCACCACCACAG- 3'
	ANTI-SENSE	5' -AGTAATCTCCTTCTGCATCCTGTC- 3'
β actin 2 ND	SENSE	5' -GCTTCACCACCACAGCTGAGAGGGA- 3'
	ANTI-SENSE	5' -GCATCCTGTCAGCAATGCCTGGGT- 3'
18S rRNA 1 ST	SENSE	5' -ACGACCCATTCTGAACGTCTG- 3'
	ANTI-SENSE	5' -TATTCCTAGCTGCAGTATCCAGGC- 3'
18S rRNA 2 ND	SENSE	5' -ATTCGAACGTCTGCCCTATCAAC- 3'
	ANTI-SENSE	5' -CTCGGGCCTGCTTTGAACACTC- 3'
V α 5 1 ST	SENSE	5' -GACAAACGACTCTCTCTGAACCTCAC- 3'
	ANTI-SENSE	5' -GGCATCACAGGGAACGTCTGAACT- 3'
V α 5 2 ND	SENSE	5' -GACAAACGACTCTCTCTGAACCTCAC- 3'
	ANTI-SENSE	5' -GGCCCCATTGCTCTTGAATC- 3'

表 1. シングルセルサンプルを用いた RT-PCR に使用したプライマー一覧

【PCR 産物のクローニング】

得られた Nested PCR 産物を上述した方法と同様に GENE CLEAN[®] II Kit を用いて精製し、8 ~ 10 μ l の純水で溶出した。KOD ポリメラーゼで増幅した場合 PCR 産物の 3' 末端は平滑末端となる為、Ligation には Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen) を使用した。 α 鎖 β 鎖、各 3 種類の PCR 産物溶液を 1 μ l ずつ混合し、添付書の指示に従い総量 6 μ l の反応溶液を作製した。室温で 30 分間静置した後 2 μ l を取り、50 μ l の DH5 α [™]-T1^R 大腸菌株溶液へ添加し静かに混合し 30 分間氷上に置いた。42 °C で 30 秒間のヒートショックを与え、直ちに氷上へ戻し、室温に戻した S.O.C 培地を 250 μ l 加え 300 rpm 37 °C で 1 時間ほど振盪培養した。kanamycin 50 μ g/mL 含んだ LB 寒天プレートへ播種し、37 °C のインキュベーターで一晩培養した。翌日、形成されたコロニーを kanamycin 50 μ g/mL 添加済 LB 液体培地 2 ml へ播種し、15 ml チューブの蓋を緩めた状態でさらに一晩 37 °C のインキュベーターで振盪培養した。

翌日、増殖した大腸菌からアルカリ法によりプラスミドを抽出した。大腸菌培養液 1.5 ml をチューブへ採り、12000 rpm で 30 秒間遠心し上清を除去した。残り的大腸菌培養液は 4°C で保存した。回収した大腸菌ペレットを 100 μ l の氷冷した Solution I 中で Vortex を用いて十分に懸濁し、200 μ l の Solution II を添加しチューブを転倒混和した。溶菌により粘性がでた事を確認し、氷冷した Solution III を 150 μ l 添加しチューブを転倒混和した。3 ~ 5 分間氷上に静置し、12000 \times g、4 °C で 5 分間遠心後、上清を新しい

チューブへ回収した。270 μ l のイソプロパノール（和光純薬工業）を加え Vortex でよく懸濁し、室温で 10 ~ 60 分間静置後、14000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心した。上清をデカンテーションにより除去し、500 μ l の 70 % エタノールで得られたプラスミドのペレットを洗い同様に 14000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心した。上清をデカンテーションにより除去し、しばらく風乾した後 50 μ l の TE バッファーに溶解した。

【Construction】

I. トランスジェニック (TG) マウス作製用

同定した TCR ($V\alpha 5/V\beta 8.2$) を T 細胞に特異的に発現させる為、human CD2 minigene を基盤とした VA hCD2 発現ベクターを使用した (図 4)。今回使用したこのカセットは、筑波大学大学院 人間総合科学研究科 医学系専攻の高橋智教授からのご厚意で供与して頂いたものである。5'末端と 3'末端には human CD2 遺伝子の 5 kb のプロモーターと 5.5 kb の locus control region (LCR) がそれぞれあり、マウスゲノム DNA への導入遺伝子の挿入部位に関係なく導入されたコピー数に依存した発現を誘導する。また従来のカセットから遺伝子の挿入部位を改変することで、発現強度が 10 倍にも高められた事も合わせて報告されている [27]。

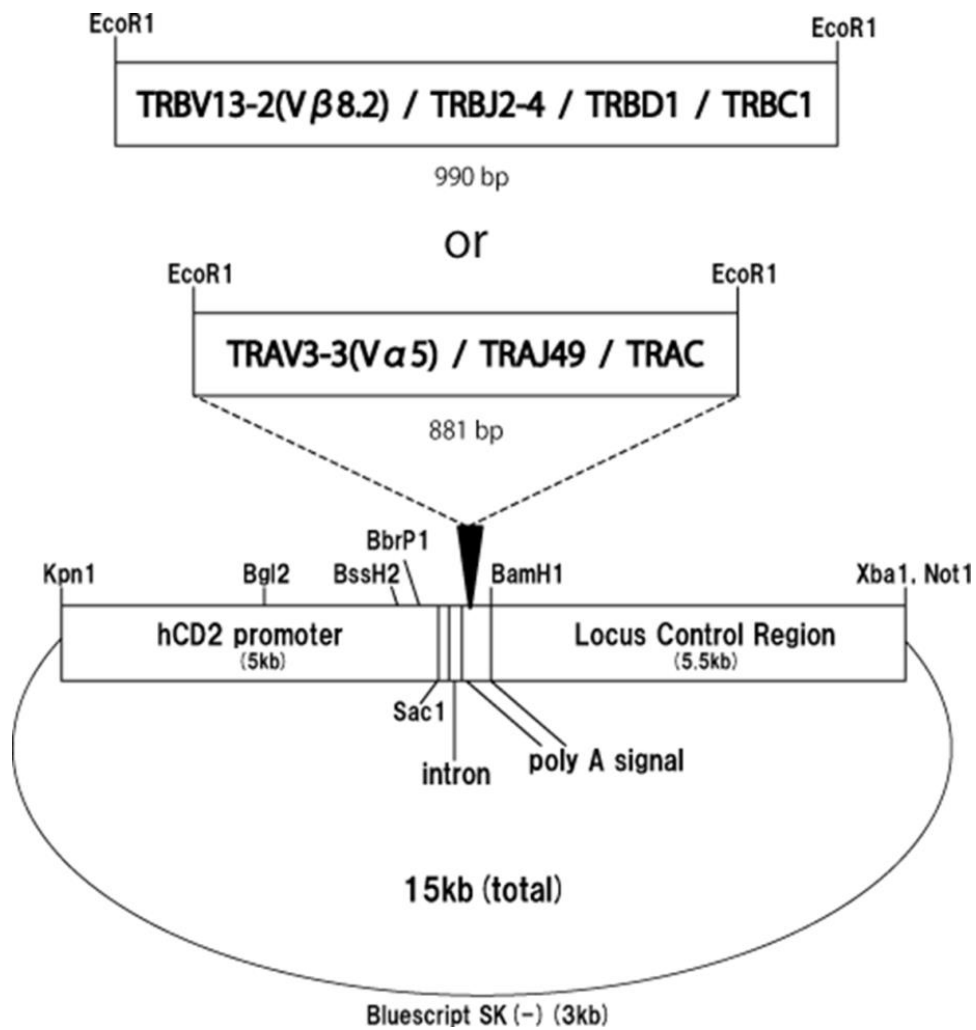


図 4. human CD2 minigene を基盤とする VA hCD2 発現ベクターを用いたコンストラクションマップ

TCR α 鎖 β 鎖の全長を以下の方法で作製し、 α 鎖の両末端には EcoR1 制限酵素サイトを、 β 鎖の両末端には Sma1 制限酵素サイトを付加した。まず V 領域、complementarity-determining region (CDR) 3 そして C 領域を個別に PCR によって増幅した。増幅された断片をそれぞれ GENE CLEAN[®] II Kit を用いて精製し、純水で溶出した。シーケンス確認後、CDR3 と C 領域をオーバーラップ PCR により結合し、最後に V 領域と CDR3 - C 領域を同様にオーバーラップ PCR により結合した。なお、CDR3 クローニングの際にはシングルセルソーティングで得られた V α 5T 細胞の cDNA 溶液を鋳型として使用した。 β 鎖も α 鎖同様に行った。ただし CDR3 に関しては新調せず、シーケンス解析の際に行ったシングルセル由来 cDNA を用いた PCR 産物を鋳型として、CDR3 と C 領域のオーバーラップ PCR に使用した。また最終的に得られた PCR 産物は C 領域中の 66 bp が欠損してしまった為、それらと、C 領域のみ再度 PCR を行い得られた PCR 産物とを共に鋳型として用いてオーバーラップ PCR を行うことで V 領域から C 領域の全長を作製した。DNA ポリメラーゼは KOD -Plus-Ver. 2 (TOYOBO) を使用し、使用したプライマーは以下に列挙した (表 2)。

α	V 領域 1 ST	SENSE	5' -GCATCTTGTCTGGCTGAAG- 3'
		ANTI-SENSE	5' -AGGATGGGCAGCTGTGAG- 3'
α	V 領域 2 ND	SENSE	5' -GAATTCGAAGGTCAGAGTCTGGAG- 3'
		ANTI-SENSE	5' -AGGATGGGCAGCTGTGAG- 3'
α	CDR3	SENSE	5' -GACAAACGACTCTCTCTGAACCTCAC- 3'
		ANTI-SENSE	5' -TGAGACCGAGGATCTTTTAACTGG- 3'
α	C 領域	SENSE	5' -ATCCAGAACCCAGAACCTG- 3'
		ANTI-SENSE	5' -GAATTCACAAATCTGGGAGATCC- 3'
α	CDR3 + C 領域	SENSE	5' -GACAAACGACTCTCTCTGAACCTCAC- 3'
		ANTI-SENSE	5' -GAATTCAGTCAGGCTCTGTTCAGTC- 3'
α	V 領域 + CDR3/C 領域	SENSE	5' -GAATTCGAAGGTCAGAGTCTGGAG- 3'
		ANTI-SENSE	5' -GAATTCAGTCAGGCTCTGTTCAGTC- 3'
β	V 領域	SENSE	5' -CCTTGGTCCCAAGATG- 3'
		ANTI-SENSE	5' -GGTAGCCAACCTCCAGAATG- 3'
β	CDR3 + C 領域	SENSE	5' -TACTGGTATCGGCAGGACAC- 3'
		ANTI-SENSE	5' -CTGAGAATTCTAACACAATGTGTTGTCAGC- 3'
β	V 領域 + CDR3/C 領域	SENSE	5' -AGTCGAATTCTTGGTCCCAAGATG- 3'
		ANTI-SENSE	5' -CTGAGAATTCTAACACAATGTGTTGTCAGC- 3'
β	V 領域/CDR3	SENSE	5' -AGTCCCCGGGTTGGTCCCAAGATGGC- 3'
		ANTI-SENSE	5' -TGGACCTCCTTGCCATTC- 3'
β	C 領域	SENSE	5' -TGACCACGTGGAGCTG- 3'
		ANTI-SENSE	5' -AGCTCTTCAGAAGTTCTGGG- 3'
β	V 領域/CDR3 + C 領域	SENSE	5' -AGTCCCCGGGTTGGTCCCAAGATGGC- 3'
		ANTI-SENSE	5' -CTGACCCGGGACACAATGTGTTGTCAGCTC- 3'

表 2. TCR クローニングの際に使用したプライマー一覧

次に、作製した TCR α 鎖を EcoR1 で、 β 鎖を Sma1 で処理し GENE CLEAN[®] II Kit を用いて精製した。同様に VA hCD2 発現ベクターを EcoR1 または Sma1 で処理後 Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (タカラバイオ) を用いて、制限酵素により切断を受けた部位の 5'末端に露出したリン酸基を除去した。Rapid DNA Ligation Kit (Roche) の添

付書に従い、TCR α 鎖と β 鎖それぞれのライゲーション反応溶液を作製した。15 °Cで 60 分間反応させ、10 倍量のコンピテントセル溶液を用いて先述の通りにトランスフォーメーションを行った。そしてアルカリ法によるミニプレップでプラスミドを回収し、制限酵素により切り出される断片長からインサートの方向を判断した。最後にシーケンスを確認し、Kpn1 と Xba1 で Bluescript SK(-)部分を切除した。

II. T 細胞ハイブリドーマ導入用

VA hCD2 発現ベクターへ組み込んだ TCR α 鎖を EcoR1 で、 β 鎖を Sma1 で処理し GENE CLEAN® II Kit を用いて精製した。pCAGGS 発現ベクターを EcoR1 で切断後 SAP 処理を行い、GENE CLEAN® II Kit で精製した後 TCR α 鎖と共にライゲーションを行った。一方 β 鎖のライゲーションには、SAP 処理前にさらに T4 DNA Polymerase (invitrogen) による粘着末端の平滑化を行ったベクターを使用した。そしてエレクトロポレーション及び Lipofectamine™ 2000 (invitrogen)、FuGENE (Roche)、X-treameGENE9 (Roche) のトランスフェクション試薬を用い、前述の方法で作製した TCR 発現ベクターの T 細胞ハイブリドーマへの導入を試みた。しかしながらどの方法でも芳しい結果が得られなかった為、レンチウイルスを使用する事にした。

ウイルスシステムを利用した TCR 遺伝子の細胞への導入に関して、2006 年に報告されたレトロジェニックマウスの作製法を参考にした [28, 29]。レトロジェニックマウ

スとはレトロウイルスを用いて骨髄細胞へ TCR 遺伝子を導入し、それらの骨髄細胞を X 線照射したレシピエントへ移植する骨髄キメラの一種である。TCR α 鎖と β 鎖を共に 1 つの細胞へ導入する必要がある為、ピコルナウイルス由来の 2A ペプチドで α 鎖と β 鎖をつなぎ、1 つのコンストラクションとした (図 9A)。さらにレポーター遺伝子として Green Fluorescent Protein (GFP) を発現させる為、Internal Ribosome Entry Site (IRES) -GFP 配列も付加した。

既に完成していた VA hCD2 発現ベクターへ組み込んだ TCR α 鎖および β 鎖を鋳型として PCR を行った。使用したプライマーは α 鎖の 5'末端に EcoR1、 β 鎖の 3'末端に Sma1 制限酵素サイトを設け、さらに α 鎖と β 鎖を連結する為、 α 鎖の 3'末端並びに β 鎖の 5'末端に 2A ペプチドを付加した。得られた α 鎖と β 鎖それぞれの PCR 産物を鋳型として用い、オーバーラップ PCR により α 鎖 - 2A - β 鎖を連結した。以下に使用したプライマーを列挙した (表 3)。

TCR α + 2A	SENSE	5' -GAATTCGAAGGTCAGAGTCTGGAG- 3'
	ANTI-SENSE	5' -CTTCCACGTCTCCTGCTTGCTTTAACAGAGAGAAGTTCGTG GCTCCGGAGCCGGACCACAGCCTCAGCGTCATGAG- 3'
2A + TCR β	SENSE	5' -CTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGT CCCATGGGCTCCAGGCTCTTCTTCGTGCTC- 3'
	ANTI-SENSE	5' -CTGACCCGGGACACAATGTGTTGTCAGCTC- 3'
TCR α /2A/ TCR β	SENSE	5' -GAATTCGAAGGTCAGAGTCTGGAG- 3'
	ANTI-SENSE	5' -CTGACCCGGGACACAATGTGTTGTCAGCTC- 3'

表 3. 2A ペプチドを用いた TCR α 鎖 β 鎖結合の際に使用したプライマー一覧

得られた PCR 産物を Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (invitrogen) を使用してクローニングし、BamH1 と Not1 を用いてクローニングベクターから切り出した。さらに pENTR[™]1A Dual Selection Vector (invitrogen) を同様に BamH1 と Not 1 で消化したのち SAP 処理をし、切り出した TCR を挿入した。次に Sma1 と Not1 で消化し、そこへ同じく Sma1 と Not1 で pIRES2-AcGFP1 (Clontech) から切り出した IRES-GFP 配列を挿入した。完成したエントリークローンと pLenti6.3/V5-DEST (invitrogen) を混合し、添付書に従い LR Clonase[™] II による LR 組換えを行った。またプラスミドの増幅には One Shot[®] Stbl3[™] コンピテント *E.coli* (invitrogen) を用いた。

【TCR-TG マウス作製】

VA hCD2 発現ベクターから Kpn1 と Xba1 で Bluescript SK(-)部分を切除した。QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて OD²⁶⁰/₂₈₀ が 1.8 前後に、OD²⁶⁰/₂₃₀ が 1.8-2.2 の範囲に収まるように精製後、TE バッファーで 50 ng/ μ l に調整した。 α 鎖と β 鎖は混合し同時に受精卵雄性前核へ注入した。この受精卵雄性前核へのインジェクションは熊本大学 生命資源研究・支援センター 動物資源開発研究部門 竹田直樹助教授に行って頂いた。

【TCR-TG マウス遺伝子型決定方法】

マウスの尻尾を 5 mm 程採取し、1 μ l の Proteinase K (20 mg/mL) を添加した 200 μ l の DNA 抽出バッファーを加え 55 $^{\circ}$ C でインキュベートした。組織が十分に溶解された後、フェノール/クロロホルムを 200 μ l 加え Vortex で十分に攪拌した。12000 rpm、室温で 3 ~ 4 分間遠心し水層と有機層に分離させ、水層を新しいチューブに回収した。同量のイソプロパノールを加え十分に転倒混和した後、12000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心した。上清を除去し得られたペレットを 500 μ l の 70 % エタノールで洗い、12000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し上清を除去した。風乾した後 TE バッファーに懸濁した。以上の様に精製した DNA を鋳型として (図 8B) に示す部分を PCR により増幅し、導入遺伝子の有無を確認した。また、B6.129S2-*Tcra*^{tm1Mom}/J (*TCR α* ^{-/-}) の遺伝子型決定は The Jackson Laboratory のホームページに記載された方法に従って行った (<http://jaxmice.jax.org/protocolsdb/>)。DNA ポリメラーゼは TaKaRa TaqTM (タカラバイオ) を使用し、使用したプライマーは以下に列挙した (表 4)。

V α 5	SENSE	5' -CGCAGTCAGTGCTGATCCGGGTTA- 3'
	ANTI-SENSE	5' -GGCATCACAGGGAACGTCTGAAC- 3'
V β 8.2	SENSE	5' -GCCAGCGGTGATGCAGGCAGTCAA- 3'
	ANTI-SENSE	5' -TCTGCACTGATGTTCTGTGTGACA- 3'
TCR α 鎖 Wild type	oIMR0733	5' -ACTGTGCTGGACATGAAAGC- 3'
	oIMR0734	5' -CCATAGATTTGAGCCAGGAGG- 3'
TCR α 鎖 Mutant	oIMR6916	5' -CTTGGGTGGAGAGGCTATTC- 3'
	oIMR6917	5' -AGGTGAGATGACAGGAGATC- 3'

表 4. TCR-TG マウス遺伝子型決定に使用したプライマー一覧

【T細胞ハイブリドーマへのTCRトランスフェクション】

CD3、CD4、CD8 及び TCR の細胞表面における発現を欠損しているマウス T 細胞株として知られている $58\alpha\beta$ 細胞を使用した [30]。なお、 $58\alpha\beta$ 細胞は Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université, de la Méditerranée Claude GREGOIRE 教授からのご厚意で供与して頂いたものである。

$58\alpha\beta$ 細胞は 10 % FBS、100 units/mL ペニシリン (life technologies™)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン (life technologies™)、そして 5×10^{-5} M メルカプトエタノール (life technologies™) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), High Glucose, GlutaMAX™, Pyruvate (life technologies™) を使用し、MCO-18AIC (UV) CO₂ インキュベーター (SANYO) を用いて 37 °C で培養した。

使用したレンチウイルスキットは安全性の確保の為、必要最小限のウイルス構造遺伝子ならびに各種酵素、翻訳調節因子を異なる 3 種類の発現ベクターへ分散してある。それゆえ初めに感染能力を有するウイルスを産生する為、それらの遺伝子発現ベクターの混合溶液である ViraPower™ Packaging Mix (invitrogen) と作製した pLenti 発現ベクターを同時に 293FT 細胞 (invitrogen) へ導入した。導入には X-treameGENE9 (Roche) のトランスフェクション試薬を用い、全ての操作は添付書の指示に従って行った。なお 293FT 細胞の培養には、10 % FBS、0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acid (NEAA) (STEMCELL™ TECHNOLOGIES)、100 units/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプト

マイシン、500 µg/mL G418 (invitrogen) を添加した DMEN, GlutaMAX™, Pyruvate を使用した。レンチウイルス発現ベクターを導入した 293FT 細胞を抗生物質非存在下で 4 ~ 5 日間培養した後、培養上清を回収した。ウイルスの感染効率を向上させる為、Lenti-X™ Concentrator (Clontech) を用いてウイルス濃度を 20 ~ 30 倍に濃縮した。そして 1×10^5 の 58αβ 細胞を培地 10 ml 中に懸濁し、そこへ作製したウイルス溶液 1 ml と 10 µg/mL Polybrene (MILLIPORE) を混合した。この時、抗生物質非添加の培地を使用した。37 °C の 5 % CO₂ インキュベーターで一晩培養した後、ウイルスを含んだ培地を除去した。そして 10 µg/mL Blasticidin (life technologies™) を添加した培地で 10 ~ 12 日間培養し、薬剤耐性を獲得した細胞の選別を行った。培地は 3 ~ 4 日ごとに交換した。最終的に得られた薬剤耐性クローンの TCRβ 鎖並びに GFP の発現をフローサイトメトリーにより解析したところ、凡そ 50 % の細胞で TCRβ 鎖と GFP 両方の発現が確認できた (図 9B)。以上の結果から薬剤による選別のみでは、均一な集団を得るには不十分であると判断し、GFP 高発現の分画を Aria™ II セルソーターを用いて選別した。

【in vitro T 細胞活性化実験】

I. T 細胞分裂促進因子、増殖因子による活性化

マウスリンパ節をすり潰し 1 細胞毎に散けた後、96 well プレーートの各 well に 1×10^6 細胞ずつ播種した。Concanavalin A (ConA) (SIGMA-ALDRICH®) を $1 \mu\text{g/mL}$ または $5 \mu\text{g/mL}$ となるよう培養培地に懸濁し、6 時間または 19 時間培養した。なお培養培地は 10 % Heat-inactivated FBS (65 °C で 10 分間熱処理を加えた)、0.1 mM NEAA、2 mM L-glutamine (life technologies™)、100 units/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン、 5×10^{-5} M メルカプトエタノールを添加した DMEN, GlutaMAX™, Pyruvate を使用した。培養後、細胞を回収しフローサイトメトリーにより解析した。

II. TCR 刺激による活性化

抗 CD3 ϵ 抗体溶液または抗 TCR β 鎖抗体 (H57) 溶液を適当な濃度となるように PBS で希釈し、BD Falcon™ 96 well カルチャープレート (平底) へ 100 μl ずつ分注した。4 °C で一晩置きプレート底に抗体を固相化し、PBS で一度洗った。さらに培地で一度洗った後、細胞を懸濁した培地を 200 μl ずつ各 well へ分注した。

培養培地及び細胞は同上の条件で行った。37 °C の CO₂ インキュベーターで一晩培養し、Plate Spin® II (KUBOTA) を用いて 400 $\times\text{g}$ 、室温で 5 分間遠心した。培養上清を回収し、後日 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) に使用する為 -80 °C で保

存した。ELISA は Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go![®] (eBioscience) を用い、添付書に従って行った。

【統計解析】

Fテスト、及び Student T テストは Microsoft Excel 2010 を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

【法令遵守等の対応】

組換え DNA 実験に対しては、東京大学「医学部組換え DNA 実験安全委員会」の承認を得た。また、マウスを用いた動物実験については、東京大学で制定されている動物実験マニュアルに従い、「東京大学医学系研究科動物実験委員会」へ届け出し、許可を得た。

《使用抗体一覧》

◇フローサイトメトリー

Anti-Mouse CD3e PE (eBioscience)
FITC Rat Anti-Mouse CD4 (BD Pharmingen™)
PerCP Rat Anti-Mouse CD4 (BD Pharmingen™)
Allophycocyanin Anti-Mouse CD8a(Ly-2) (eBioscience)
Anti-Mouse CD11c PE (eBioscience)
Anti-Mouse CD16/32 Purified (eBioscience)
Anti-Mouse CD25 Alexa Fluor 488® (eBioscience)
Anti-Mouse CD25 Biotin (eBioscience)
Anti-Mouse CD69 FITC (BD Pharmingen™)
Anti-Mouse CD206 Alexa Fluor 488® (BioLegend)
Anti-Mouse F4/80 APC-eFluor® 780 (eBioscience)
Anti-Mouse F4/80 Biotin (eBioscience)
Anti-Mouse Foxp3 PE (eBioscience)
Anti-Mouse Mac-1 APC (eBioscience)
PE Hamster Anti-Mouse TCR β chain (BD Pharmingen™)
FITC Mouse Anti-Mouse V β 8.1/8.2 TCR (BD Pharmingen™)
Streptavidin APC-eFluor® 780 (eBioscience)
Streptavidin APC-Cy7 (BioLegend)
Streptavidin PE (BD Pharmingen™)

◇in Vitro 活性化実験

Anti-Mouse CD3 ϵ Purified (eBioscience)
Anti-Mouse TCR beta Functional Grade Purified (eBioscience)

《試薬一覧》

AVERTIN

0.5 g 2,2,2-Tribromoethanol

0.31 ml (0.25 g) 2-methyl-2-butanol (tert amyl alcohol)

39.5 ml dH₂O

Collagenase, Type II (stock)

100 mg Collagenase Type II

1 ml PBS

DEPC 水

1 ml DEPC (diethyl pyrocarbonate)

1 L H₂O

一晩室温に置いた後、20 ~ 40 分間 120 °C でオートクレーブにかけた。

DNA Extraction Buffer

150 mM NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM EDTA

1 % SDS

ELISA Wash Buffer

0.05 % Tween-20

PBS

ELISA Stop Slution

1 M H₃PO₄

FACS Buffer

5 % FBS

PBS

1 × PBS (-)

200 mg/L KCl

200 mg/L KH₂PO₄

8000 mg/L NaCl

2160 mg/L Na₂HPO₄·7H₂O

Phenol/Chloroform

10 ml Tris-HCl で平衡化した中性 Phenol

10 ml Chloroform

0.1 % 8-Hydroxyquinoline

RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

0.1 w/v % SDS

1 w/v % TritonX-100

(0.5 w/v % sodium deoxycholate)

1 × RNA extraction buffer

DEPC 水

40 mM Tris-HCl (pH 8.5)

60 mM KCl

3 mM MgCl₂

10 mM DTT

10 % IGEPAL

100 µg/mL Linear acrylamide (Ambion®)

0.81 unit/mL RNase inhibitor

Solution I

50 mM Glucose

25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

121 °Cで20分間オートクレーブにかけた後、50 µg/mL RNaseA 添加した。

Solution II

0.2 N NaOH

1 % SDS

NaOH は使用する直前に添加した。

Solution III

60 ml 5M CH₃COOK

11.5 ml CH₃COOH

28.5 ml H₂O

TE Buffer

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

第3章

結果

3-1 マウスを使用した高脂肪食 (High Fat Diet: HFD) 給餌による肥満モデル

実験動物を用いた肥満モデルを脂肪分や糖分の多い餌の給餌により作製する場合、使用する餌の組成に加えて、動物の系統に依存して体重増加、耐糖能、インスリン抵抗性、トリグリセリド、その他のパラメーターに現れる変化に違いが見られる事が知られている。まず、使用する餌に関しては、近年問題となっている肥満人口増加の主因が、食生活の欧米化による脂質の過剰摂取であると考えられる為、それに相当した実験系モデルとして、HFD 給餌による肥満モデルが最も相応しいと判断した。次に使用する動物であるが、これまでの先行研究により、C57BL/6 マウスや AKR マウスといったいくつかの同系交配の系統は、高脂肪食給餌による肥満の影響を非常に受けやすく、また別の系統では、SWR/J マウスや A/J マウスの様に肥満そのものに対して抵抗性を示す場合等が報告されている [31, 32]。ところが、肥満感受性の高い系統である C57BL/6 マウスと AKR マウスに総カロリーの 58 % が脂質由来となる高脂肪食を与えた場合では、同程度の体重増加が見られる一方で、C57BL/6 マウスはより耐糖能異常を示す事が知られている [33]。

本研究の目的は、インスリン抵抗性獲得の原因となる肥満脂肪組織内炎症のメカ

ニズム解明に迫る事である。それ故、上述した知見と、同様の肥満研究で広く一般的に用いられている前例を鑑みて、高脂肪食負荷により容易に肥満が誘導され、さらに肥満による耐糖能障害が生じやすいとされる C57BL/6 マウスを用いることにした。また C57BL/6 マウスの肥満に対する感受性に性差は無いが、内臓脂肪の内、組織採取が比較的容易に行える精巣上体脂肪を用いる為、肥満誘導実験には雄を用いた。さらに週齢については若齢の方が中年齢と比較して、高脂肪食負荷による体脂肪率と耐糖能に対する影響が大きい事が知られている為、離乳し成獣となった直後の 6 - 11 週齢から HFD 給餌を開始した [34]。

マウスに HFD を負荷し経時的に体重を測定し、肥満の進行を確認した。複数の先行研究で HFD 負荷後 12 週までにインスリン抵抗性が獲得される事が報告されていることから、本研究ではそれ以前の早期の段階に焦点を当てる為、上限を 12 週とした [10, 15]。その結果、HFD 負荷群では、ほぼ一定のペースで体重増加が認められた (図 5)。一方、HFD は粗脂肪含量が約 32 % であるのに対し、約 5 % である通常食を 12 週間与えた群では僅かな体重増加に止まった。また、精巣上体脂肪の重量についても計測を行ったところ、HFD 負荷群では体重増加に伴って顕著な脂肪組織の肥大化が見られたが、通常食で飼育した群では殆ど変化が見られなかった (図 5)。以上の事から、加齢による体重増加は僅かながら見られるが、HFD 給餌により明らかに肥満が誘導されている事が確認できた。

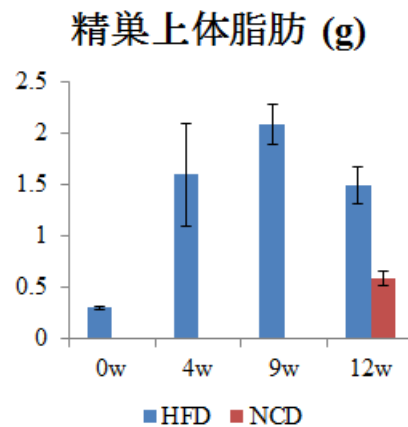
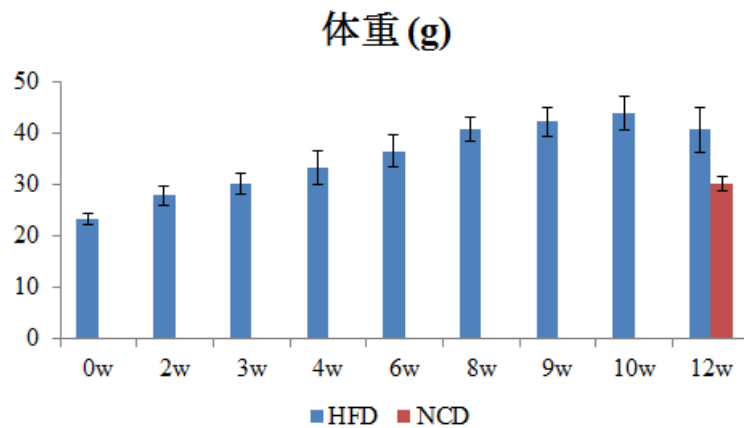


図5. 高脂肪食 (HFD) 給餌による肥満誘導

C57BL/6JJcl マウス (雄) に生後 6 - 11 週齢から、粗脂肪含量が約 32 % である HFD の給餌を開始した。1 - 2 週間おきに体重を測定し、肥満進行の程度を確認したところ、ほぼ一定のペースで体重増加が認められた。一方、粗脂肪含量が約 5 % である通常食 (NCD) を 12 週間与えた群では僅かな体重増加に止まった。同様に精巣上体脂肪の重量変化を経時的に計測したところ、HFD 負荷群では体重増加に伴う内臓脂肪の蓄積が見られたが、NCD 給餌群では殆ど変化が見られなかった。体重: HFD 群; n = 12 ~ 20、NCD 群; n = 3、精巣上体脂肪: HFD0w/12w/NCD12w 群; n = 3、HFD4w 群; n = 6、HFD9w 群; n = 5。 エラーバーは標準偏差を表す。

3-2 肥満脂肪組織浸潤 T 細胞サブタイプ並びに TCR レパートリーの変化

肥満脂肪組織で生じる炎症反応と T 細胞との関与について解明する為、まず初めに肥満に伴う脂肪組織浸潤 T 細胞の動態変化を経時的に追った。脂肪組織は前脂肪細胞と血管内皮細胞の他に、樹状細胞、マスト細胞、T 細胞、B 細胞、NKT 細胞、好酸球、好中球といった様々な免疫細胞を含む事が知られている [10, 11, 35, 36, 37, 38, 39, 40]。その為、脂肪細胞や脂肪組織浸潤免疫細胞の解析には、歴史的に Collagenase type II を用いて組織を分解した後、細胞自体の密度に差があることを利用して脂肪細胞とそれ以外の細胞とに遠心分離する方法が取られている [41]。そこで本研究でも同様に Collagenase Type II (ヒストリチウム菌由来; MERCK MILLIPORE) 処理を行い、内臓脂肪である精巣上体脂肪から T 細胞を含む脂肪細胞以外の細胞分画である Stromal Vascular Fraction (SVF) を分離した。マウスは成獣となった 6 - 11 週齢から、総カロリーの約 60 % が脂肪由来となる高脂肪食 High Fat Diet 32 (日本クレア) を与え肥満を誘導し、肥満進行過程の 4 点 (HFD 負荷後 0、4、9、12 週目) で解析を行った。

分離した SVF をフローサイトメトリーで解析したところ、リンパ球分画に占める CD4⁺T 細胞の割合は常に CD8⁺T 細胞の 2 倍程であり、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞共に肥満進行に伴い SVF に占める割合が増加していた。一方、通常食で飼育していた群では SVF に占める T 細胞の割合にその様な増加は見られず、HFD 負荷 0 週の群と同程度を示した (図 6)。従って、この HFD を負荷した群で観察された脂肪組織への

T細胞浸潤増加は、加齢や飼育環境等の影響ではなく肥満によってもたらされたと言える。さらにその浸潤の程度は、肥満進行に比例して増強される傾向にある事が分かった。

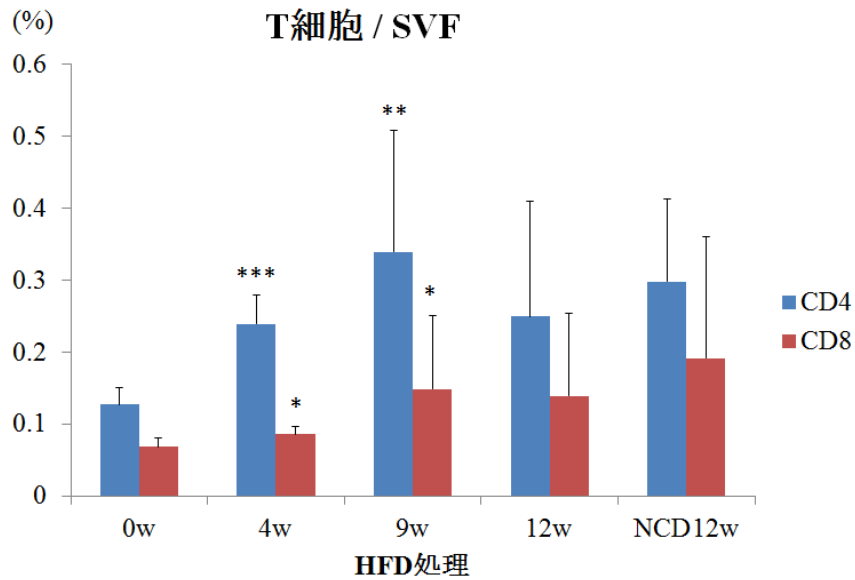


図 6. 脂肪組織浸潤 T 細胞が SVF に占める割合と肥満進行に伴う変化

HFD 負荷により肥満を誘導した C57BL/6JJcl マウスの精巢上体脂肪を、肥満進行の各段階 (HFD 負荷後 0、4、9、12 週後) で採取した。Collagenase type II を用いて、脂肪組織を分解した後、脂肪細胞以外の細胞分画であり T 細胞を含有する Stromal Vascular Fraction (SVF) を分離した。フローサイトメトリーを用いて SVF に占める CD4T 細胞と CD8T 細胞の割合を解析した結果、どちらも肥満進行に伴う増加が確認された。これに対し、NCD を給餌した群では HFD 未負荷 (0w) の群と比較して有意な変化は見られず、T 細胞の脂肪組織浸潤増加が肥満に伴う事が示された。また、肥満の程度に係らず CD4T 細胞は一貫して CD8T 細胞を上回る割合で存在していた。HFD 群; n = 6 ~ 9、NCD 群; n = 3。エラーバーは標準偏差を表す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs HFD0w.

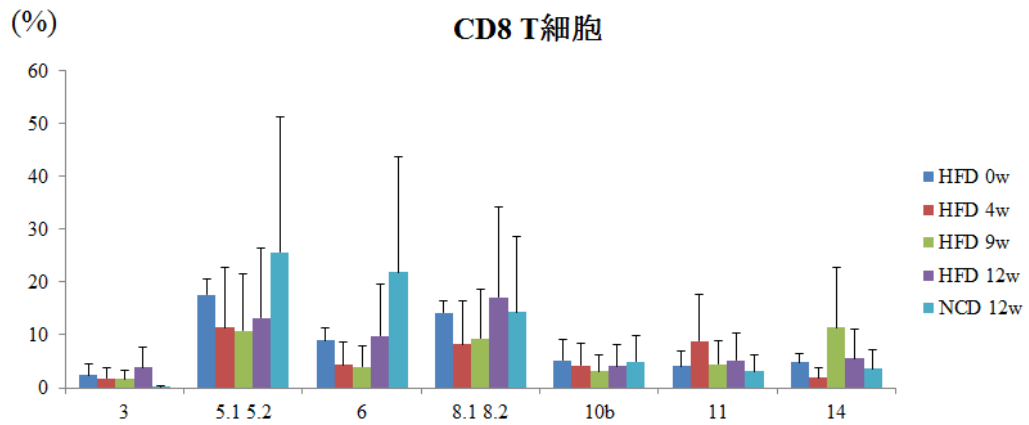
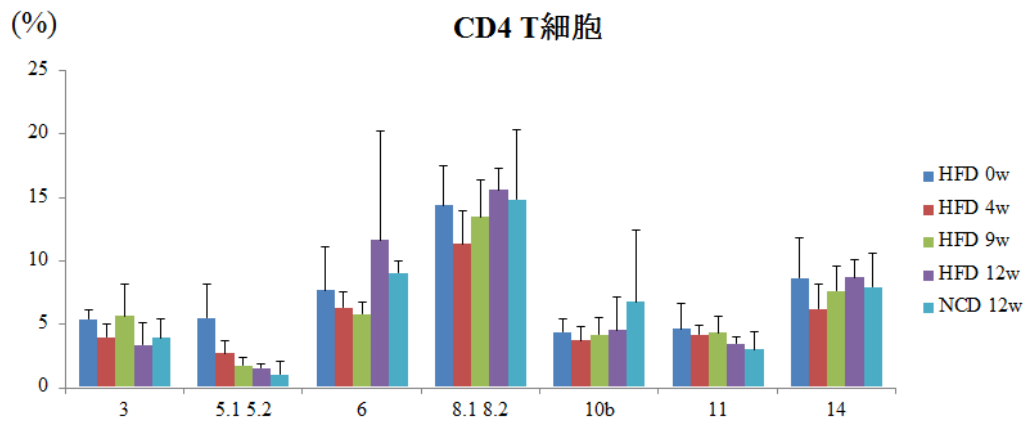
そこで肥満進行に伴う T 細胞の脂肪組織浸潤増加が、特定の抗原認識に起因するものなのか、或いは非特異的な T 細胞増殖なのかを明らかにする為、TCR レパートリーの変化について検証した。TCR は α 鎖と β 鎖、或いは γ 鎖と δ 鎖から成るヘテロ 2 量体であり、発現する TCR によりそれぞれ $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞と呼ばれる。 $\gamma\delta$ T 細胞は、 $\alpha\beta$ T 細胞ほど莫大な TCR のレパートリーを持たず、早急な炎症反応と細胞傷害性を示す傍ら、組織損傷を抑制する制御性細胞としての役割を持つ T 細胞サブタイプであり、血中を循環するリンパ球の 1~5% を占める事が知られている。一方 $\alpha\beta$ T 細胞は適応免疫応答に於いて主に 2 つの機能を果たす。1 つは $CD8^+$ T 細胞による細胞傷害性であり、もう 1 つは $CD4^+$ T 細胞によるサイトカイン分泌を介した他の免疫細胞の誘導及び活性化である。本研究では、複数の先行研究により肥満脂肪組織への選択的な浸潤とその関与が指摘されている $\alpha\beta$ T 細胞に焦点を当てることにした。

TCR を構成する α 鎖と β 鎖は共に、細胞膜近傍の可変性を持たない定常領域 (Constant Region) と、細胞膜から離れたところに位置する多様性に富んだ可変領域 (Variable region) というドメインを持つ。その構造は DNA の可変断片 (Variable segment: V 断片) と定常断片 (Constant segment: C 断片)、そしてその間をつなぐ結合断片 (Joining segment: J 断片)、 β 鎖ではさらにそこに非常に短い多様性断片 (Diversity segment: D 断片) が加わって構成される。それぞれの断片には複数種類が存在し、それらが様々な組み合わせで連結される事で抗原に対する幅広い反応性を生み出して

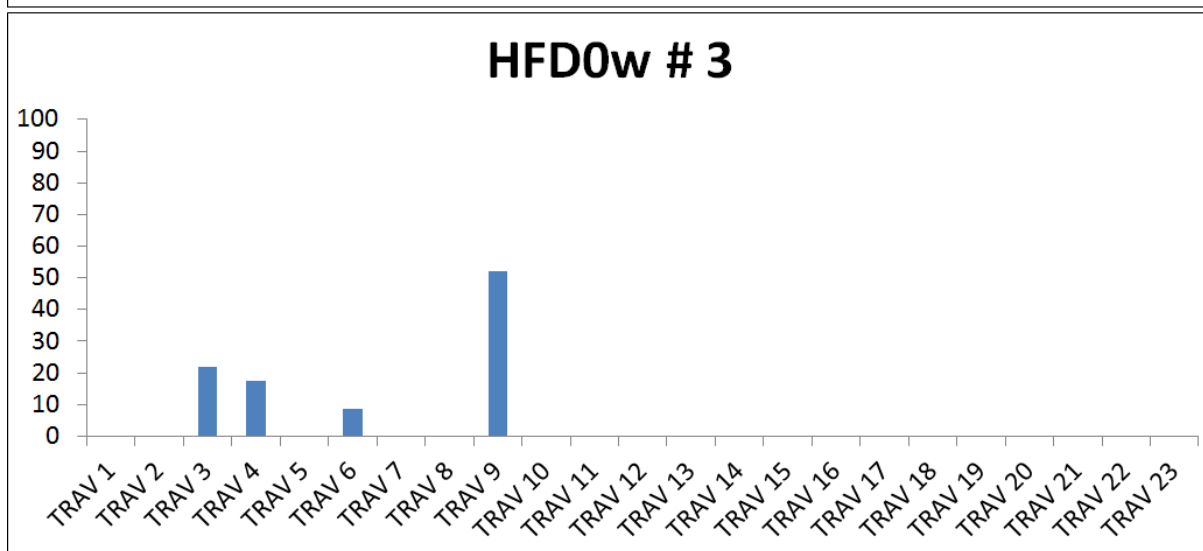
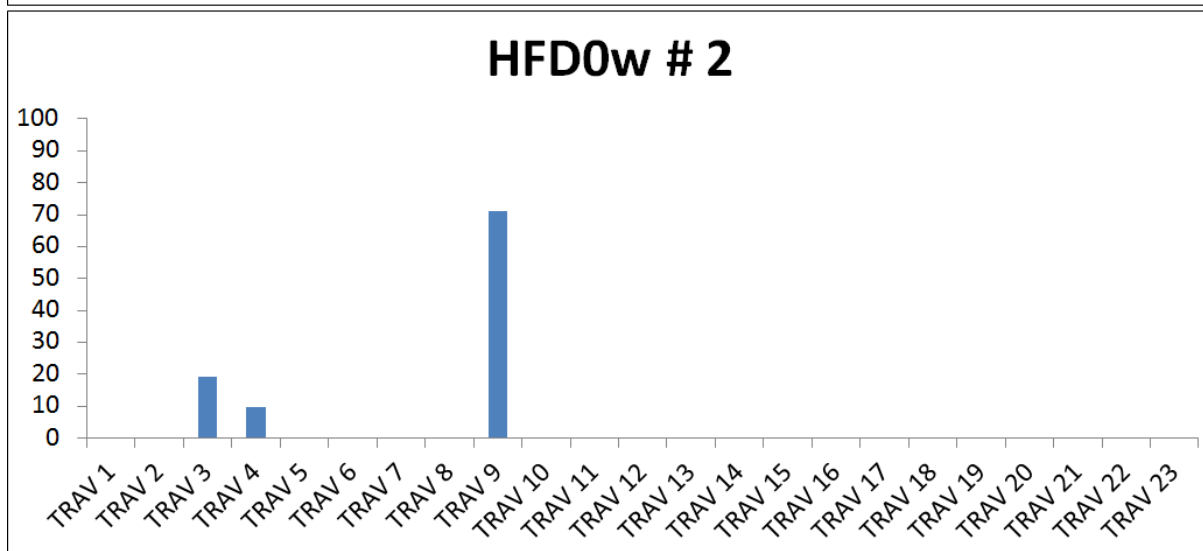
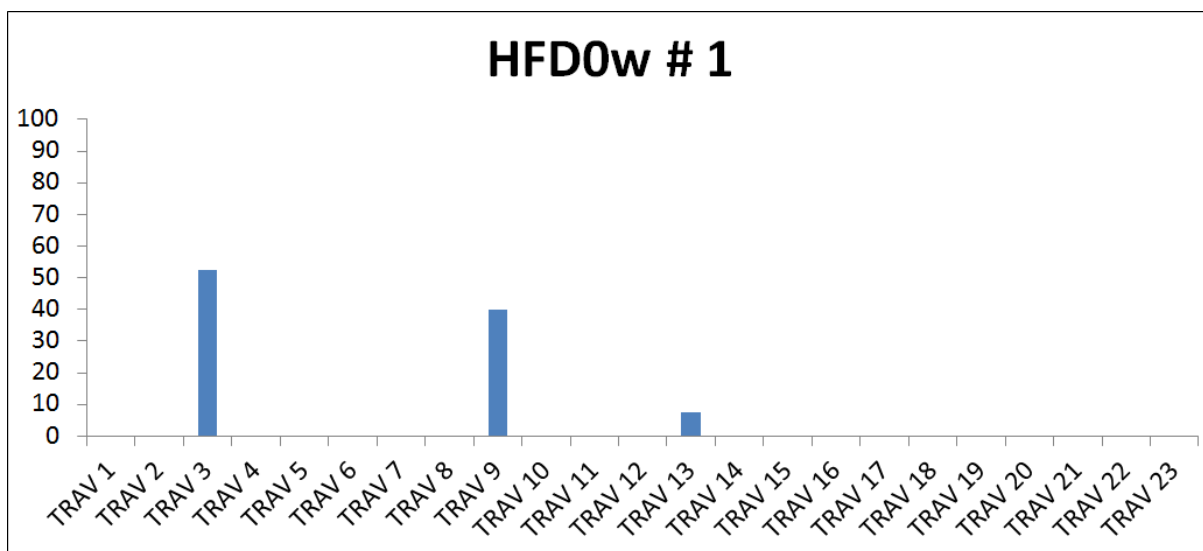
いる。そのような TCR α 鎖と β 鎖には相補性決定領域 (Complementarity-Determining Region: CDR) と呼ばれる部分が 3 箇所ずつ存在し (CDR1、CDR2、CDR3)、それぞれの CDR はループ構造を形成している事が知られている。そして最も重要な点は、この 3 つの CDR は超可変領域と呼ばれる、直接、抗原-MHC 複合体と接触する部分であるという事である。このような抗原特異性決定を担う CDR の内、CDR1 及び CDR2 は共に V 断片の DNA 中にコードされている。それに対して、さらなる多様性を創出する上で非常に重要な機構によって作り出されるのが、CDR3 である。それは結合部多様性 (Junctional Diversity) として知られ、遺伝子再編成によって、 α 鎖の場合 V 断片と J 断片、 β 鎖の場合 V 断片と D 断片そして J 断片がそれぞれ連結される際に、連結部分へランダムにヌクレオチドが挿入或いは除去される事で達成される。それ故、TCR レパートリーの解析には、先ず初めに 2 つの CDR を含む V 断片を特定する事が先決であると考え、先の方法と同様に肥満進行過程の 4 点で SVF を分離し、CD4T 細胞と CD8T 細胞に於ける TCR β 鎖の V 断片についてフローサイトメトリーを用いて解析を行った。その結果、肥満進行のどの段階に於いてもそれぞれの V 断片の出現頻度は同程度を示しており、肥満による影響はないものと思われた (図 7A)。次に TCR α 鎖についても同様に V 断片の出現頻度を解析した。TCR α 鎖は β 鎖の様に抗体が市販されておらず、フローサイトメトリーによる解析は不可能であった為、RT-PCR によりそれぞれの発現について検証する事にした。同様に肥満進行過程の 4 点で SVF を

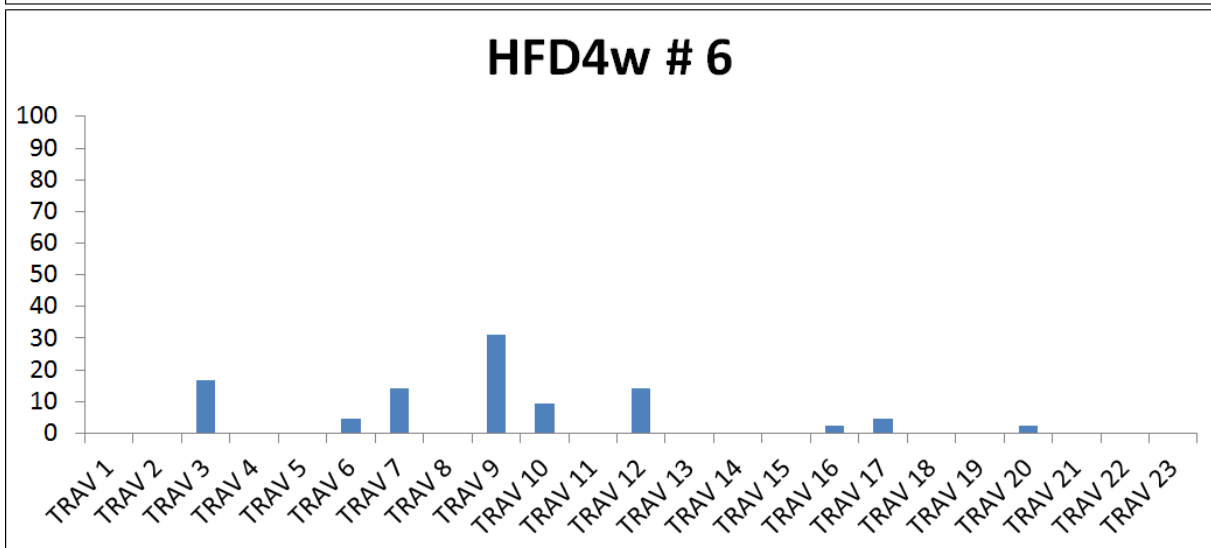
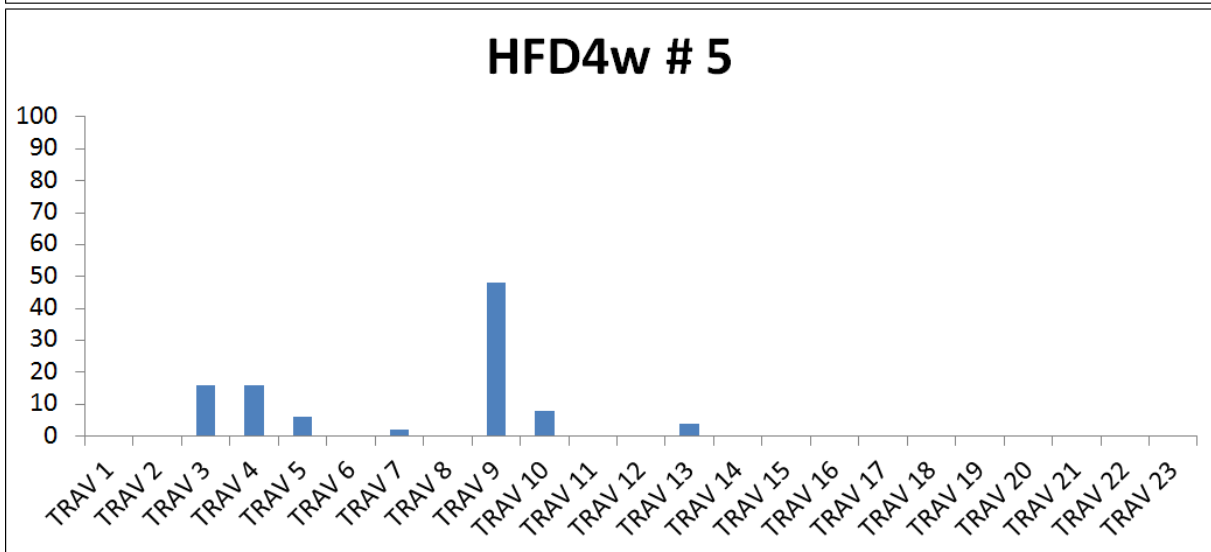
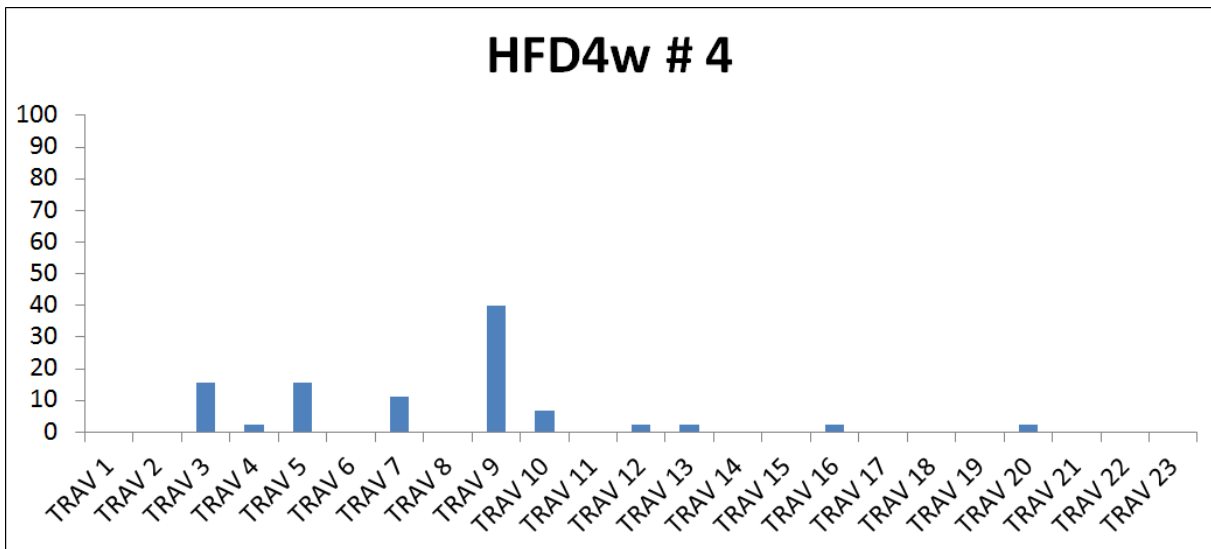
分離し、RNA を抽出後 cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として用いた Degenerate PCR により CDR1 及び CDR2 を含む V 断片から結合部多様性を示す CDR3 を含む C 断片にかけた部分を増幅した。得られた PCR 産物をクローニングし、各サンプルにつきおよそ 50 コロニーずつシーケンス解析を行うことで、各遺伝子の出現頻度を決定した。シーケンス解析には IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® (<http://www.imgt.org>)の IMGT/V-QUEST を利用した。その結果、TCR α 鎖に於いて HFD 負荷後 9 週目の時点でのみ、TRAV3-3 (IMGT®参照。一般的に V α 5 として知られている。)を発現する T 細胞 (以下、V α 5 T 細胞) の割合が著しく増加している事を見出した (図 7B)。一方、 β 鎖についても同様の方法で再度解析を行ったが、その様な肥満進行に伴う特定の TCR への集束傾向は見受けられず、フローサイトメトリーによる解析の結果と一致するものとなった。また HFD 負荷後 9 週目の脾臓に於ける T 細胞 TCR レパートリーも同様に解析したところ、SVF で見られた程の顕著な集束は確認されなかった (図 7C)。

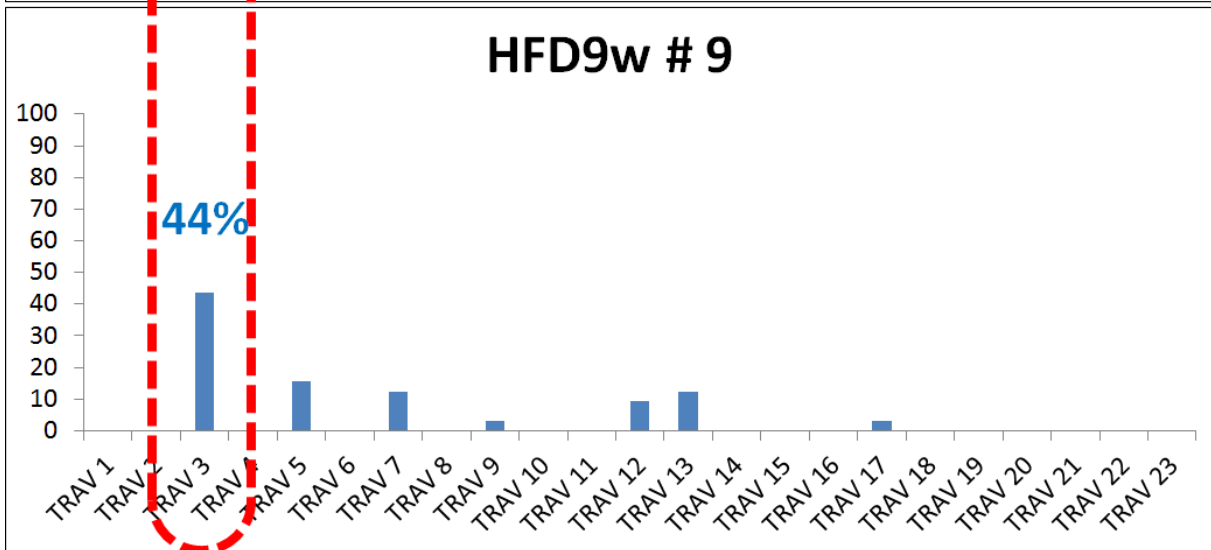
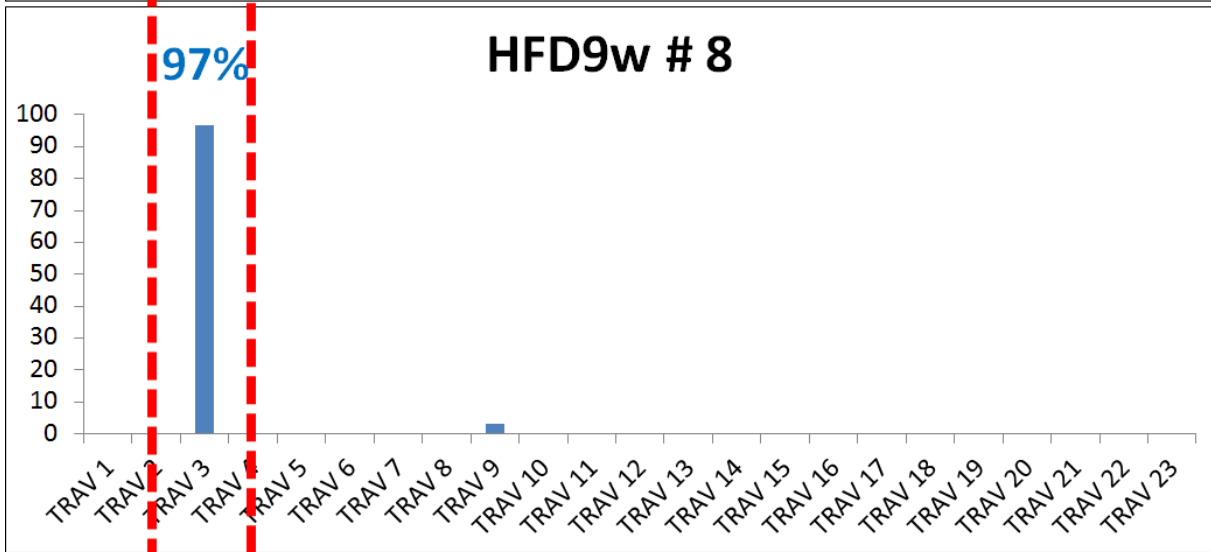
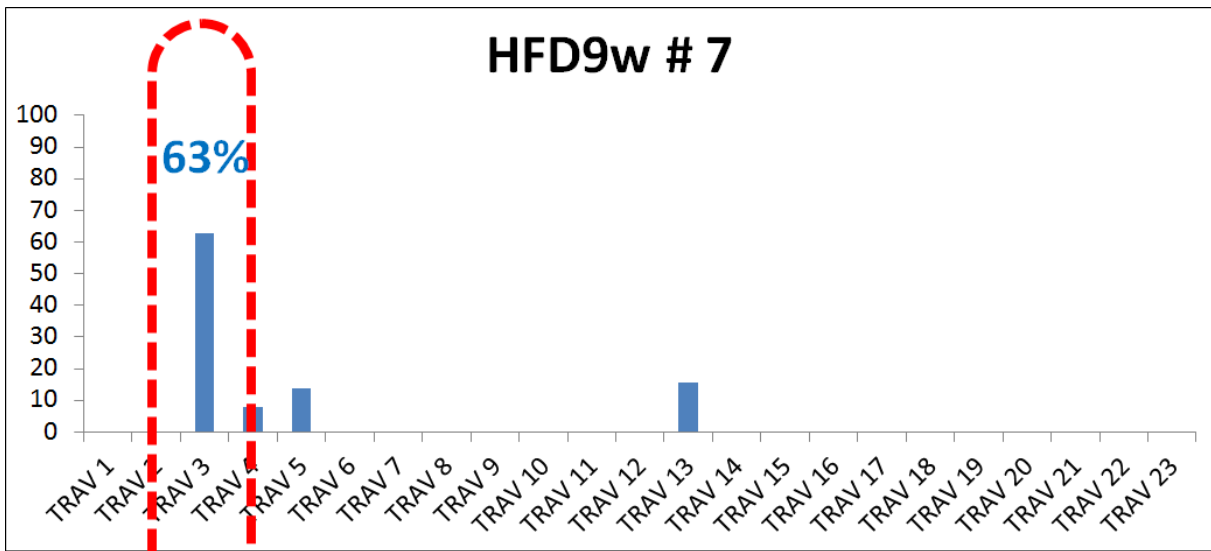
A)

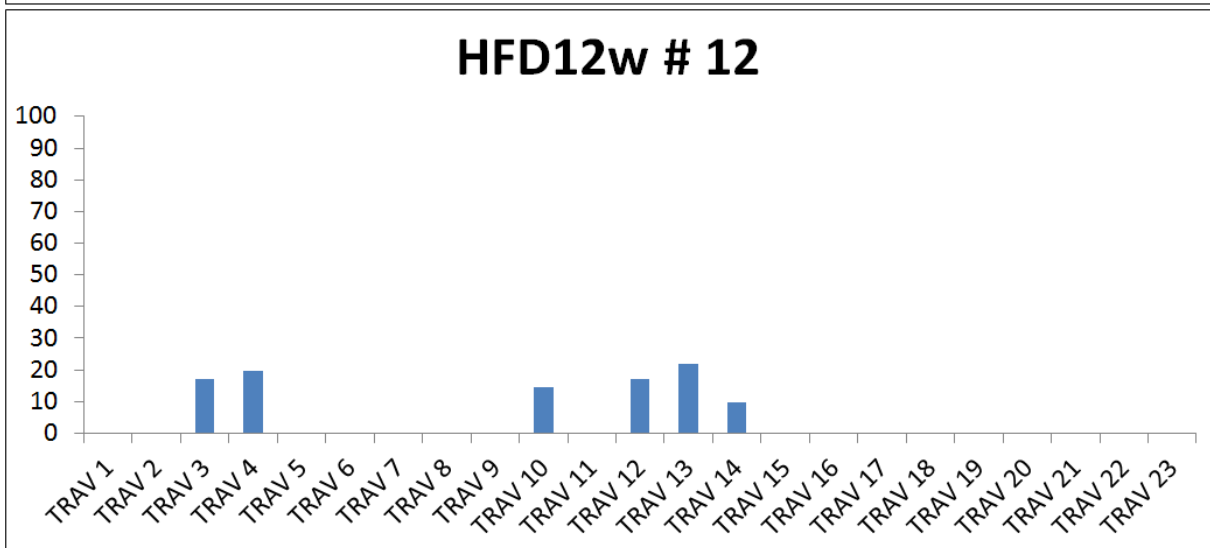
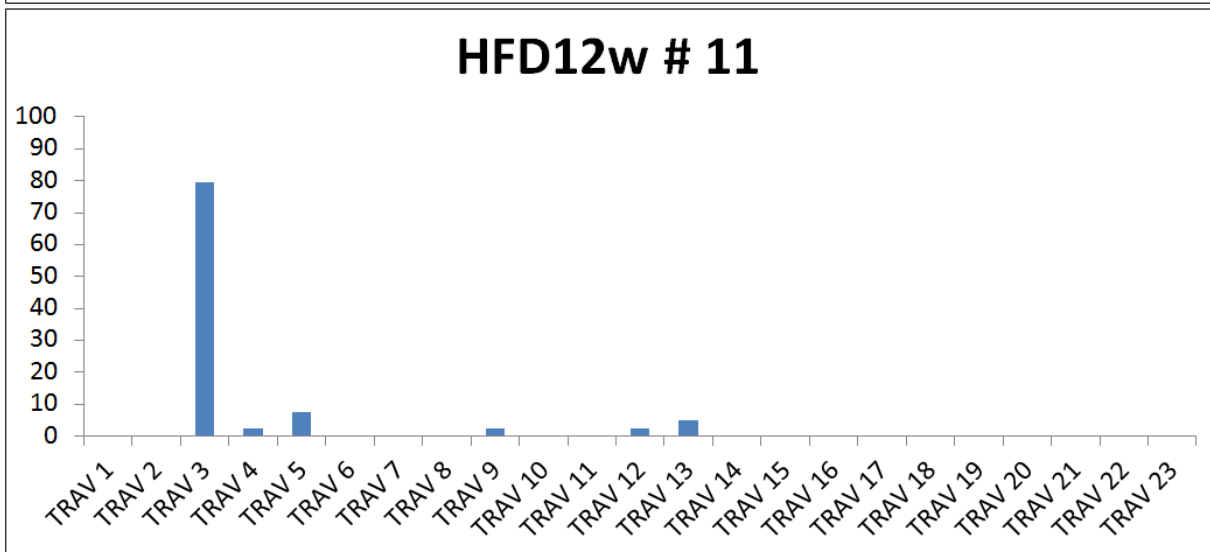
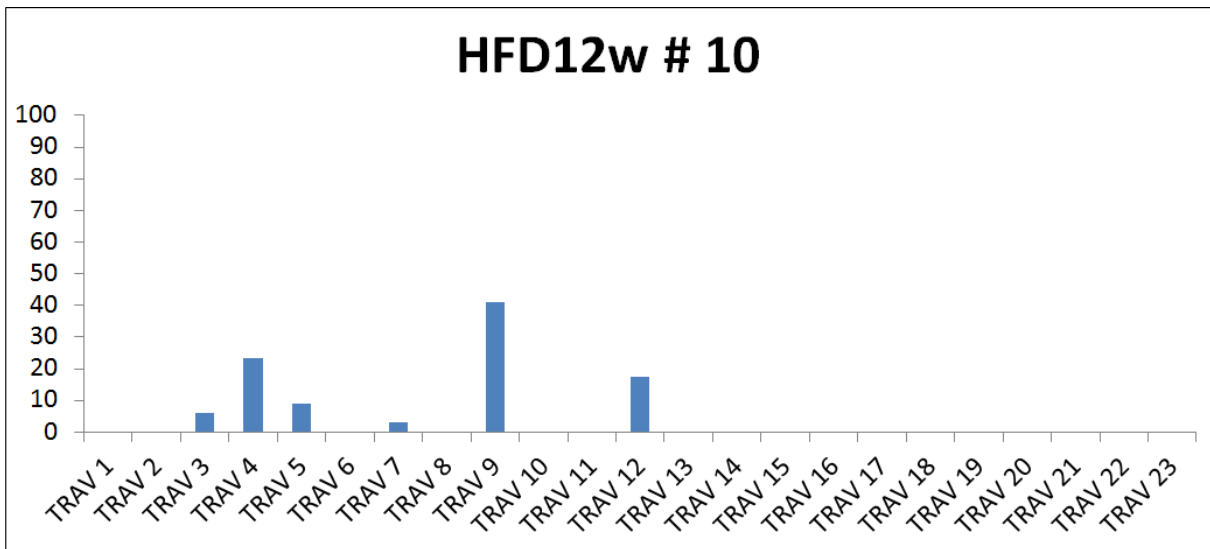


B) TCR α 鎖 - V 断片レパートリー(%)

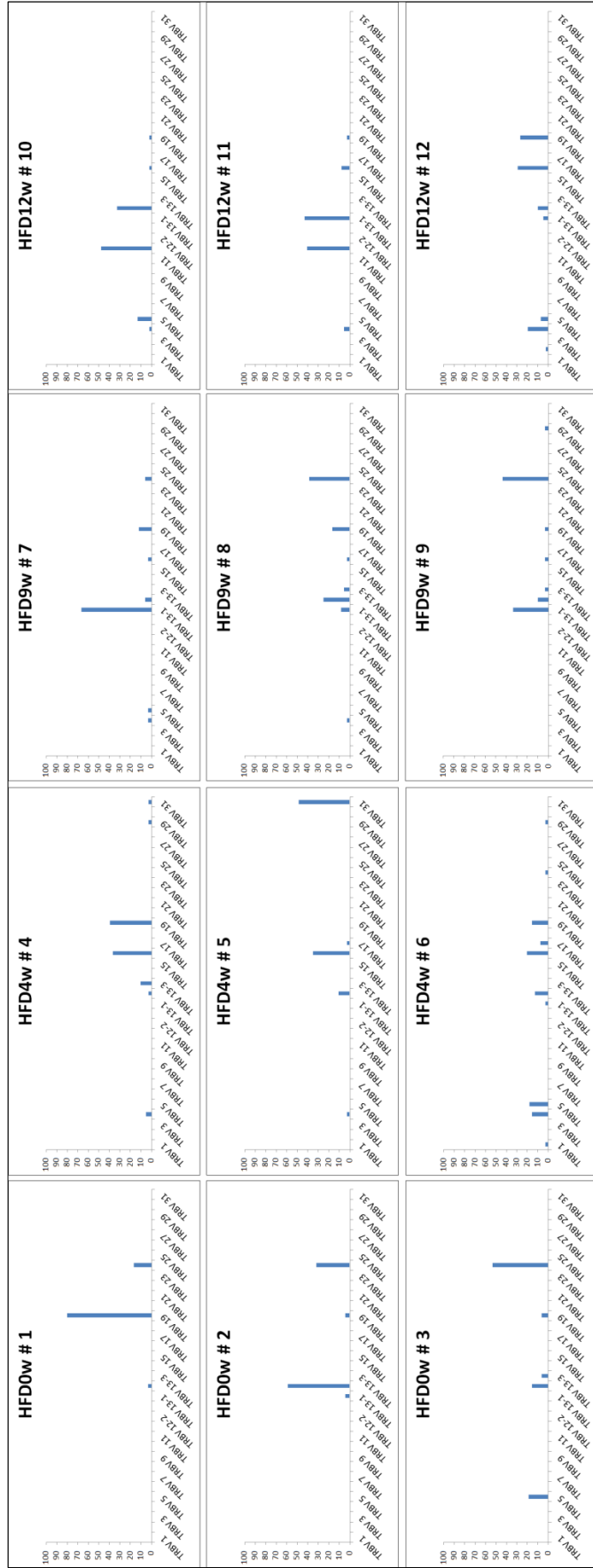








TCRβ 鎖 - V 断片レパートリー(%)



V 断片出現頻度(コロニ一数)

	HFD_0W			HFD_4W			HFD_9W			HFD_12W		
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
TRAV 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAV 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAV 3	21	6	10	7	8	7	32	30	14	2	31	7
TRAV 4	0	3	8	1	8	0	4	0	0	8	1	8
TRAV 5	0	0	0	7	3	0	7	0	5	3	3	0
TRAV 6	0	0	4	0	0	2	0	0	0	0	0	0
TRAV 7	0	0	0	5	1	6	0	0	4	1	0	0
TRAV 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAV 9	16	22	24	18	24	13	0	1	1	14	1	0
TRAV 10	0	0	0	3	4	4	0	0	0	0	0	6
TRAV 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAV 12	0	0	0	1	0	6	0	0	3	6	1	7
TRAV 13	3	0	0	1	2	0	8	0	4	0	2	9
TRAV 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
TRAV 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAV 16	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
TRAV 17	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0
TRAV 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAV 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAV 20	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
TRAV 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAV 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAV 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
total	40	31	46	45	50	42	51	31	32	34	39	41

	HFD_0W			HFD_4W			HFD_9W			HFD_12W		
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
TRBV 1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
TRBV 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
TRBV 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 4	0	0	0	2	1	6	1	1	0	1	2	8
TRBV 5	0	0	6	0	0	7	1	0	0	6	0	3
TRBV 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 12-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	15	0
TRBV 12-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 12-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 13-1	0	1	0	0	0	1	22	3	10	0	16	2
TRBV 13-2	1	13	5	1	4	5	2	9	3	15	0	4
TRBV 13-3	0	0	2	4	0	0	0	2	1	0	0	0
TRBV 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 16	0	0	0	14	13	8	1	1	1	3	12	0
TRBV 17	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0
TRBV 18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 19	24	1	2	15	0	6	4	6	1	1	1	11
TRBV 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 24	5	7	17	0	0	1	2	14	13	0	0	0
TRBV 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 29	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
TRBV 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRBV 31	0	0	0	1	18	0	0	0	0	0	0	0
total	30	22	32	38	37	39	33	36	30	46	37	41

J/D 断片出現頻度(コロニ一数)

	HFD 0W			HFD 4W			HFD 9W			HFD 12W				HFD 0W			HFD 4W			HFD 9W			HFD 12W		
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
TRAJ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TRBJ 1-1	0	0	0	1	2	12	0	1	3	0	0	0
TRAJ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TRBJ 1-2	0	0	0	2	0	3	1	0	0	3	27	0
TRAJ 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TRBJ 1-3	0	0	0	0	22	0	4	0	0	0	0	0
TRAJ 4	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	TRBJ 1-4	0	0	6	1	4	0	0	0	0	1	4	0
TRAJ 5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	TRBJ 1-5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
TRAJ 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TRBJ 1-6	0	0	2	0	0	3	0	2	2	0	0	0
TRAJ 7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	TRBJ 1-7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAJ 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TRBJ 2-1	5	10	17	14	0	4	4	16	15	15	2	8
TRAJ 9	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	TRBJ 2-2	0	11	1	0	0	2	1	1	0	0	1	2
TRAJ 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TRBJ 2-3	0	0	0	6	0	3	20	6	0	19	0	0
TRAJ 11	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	TRBJ 2-4	24	1	2	0	0	1	0	3	8	7	2	5
TRAJ 12	0	0	0	1	0	1	2	0	4	0	0	0	TRBJ 2-5	1	0	4	0	3	2	2	5	1	1	0	14
TRAJ 13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	7	TRBJ 2-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRAJ 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	TRBJ 2-7	0	0	0	14	6	3	1	0	1	1	1	10
TRAJ 15	0	0	0	1	3	1	0	0	1	0	0	0	total	30	22	32	38	37	38	33	34	30	47	37	39
TRAJ 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 17	0	0	0	2	1	2	0	0	3	1	0	3													
TRAJ 18	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 21	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 22	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 24	28	4	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 26	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 27	0	3	8	3	6	1	0	0	0	0	0	6													
TRAJ 28	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 30	0	0	4	1	2	1	4	0	0	0	0	0													
TRAJ 31	8	1	10	0	2	0	13	0	4	3	3	0													
TRAJ 32	0	0	0	8	0	1	0	0	0	8	0	1													
TRAJ 33	3	22	24	0	0	1	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 34	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	7													
TRAJ 35	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 37	0	0	0	0	0	0	30	30	12	2	0	1													
TRAJ 38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0													
TRAJ 39	0	0	0	2	1	1	0	0	1	0	0	0													
TRAJ 40	0	0	0	4	6	3	0	1	0	14	1	0													
TRAJ 41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 43	1	0	0	1	2	1	2	0	0	0	0	0													
TRAJ 44	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 45	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 47	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0													
TRAJ 48	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0													
TRAJ 49	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 50	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0													
TRAJ 51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 52	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	22	9													
TRAJ 53	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1													
TRAJ 54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 56	0	0	0	2	4	2	0	0	2	0	0	1													
TRAJ 57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 58	0	0	0	1	0	6	0	0	2	1	1	0													
TRAJ 59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
TRAJ 61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													
total	40	31	46	39	49	40	51	31	32	29	39	41													

	HFD 0W			HFD 4W			HFD 9W			HFD 12W		
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
TRBD 1	29	22	28	29	32	25	11	21	20	39	30	24
TRBD 2	1	0	4	9	5	11	22	13	10	7	7	16
total	30	22	32	38	37	36	33	34	30	46	37	40

C) HFD9w 脾臓 V 断片レポーター(%)

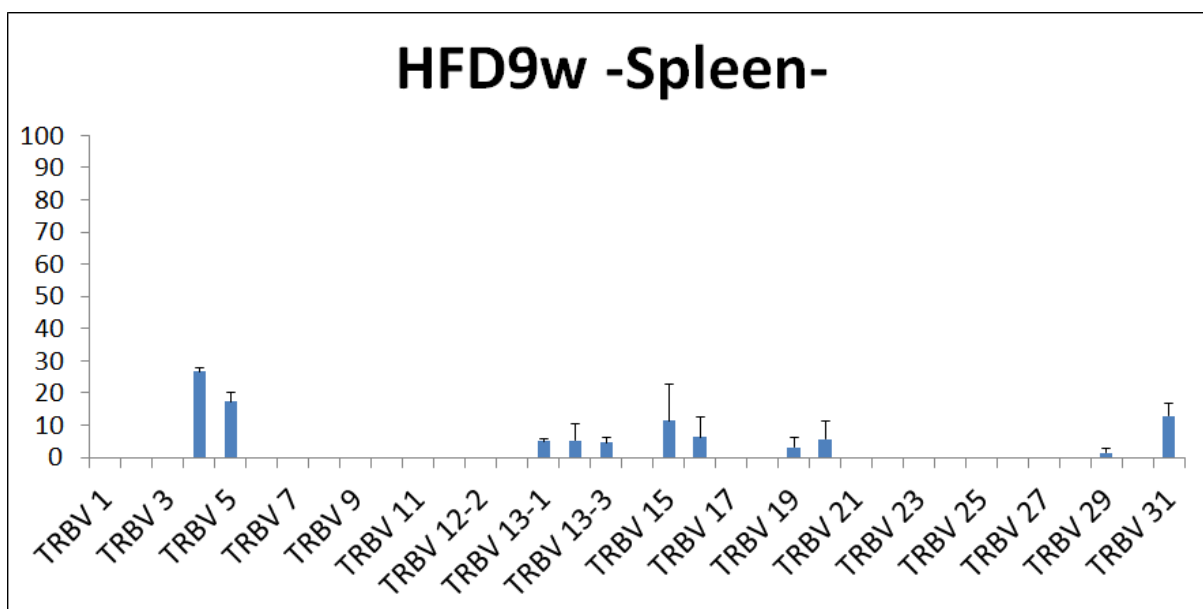
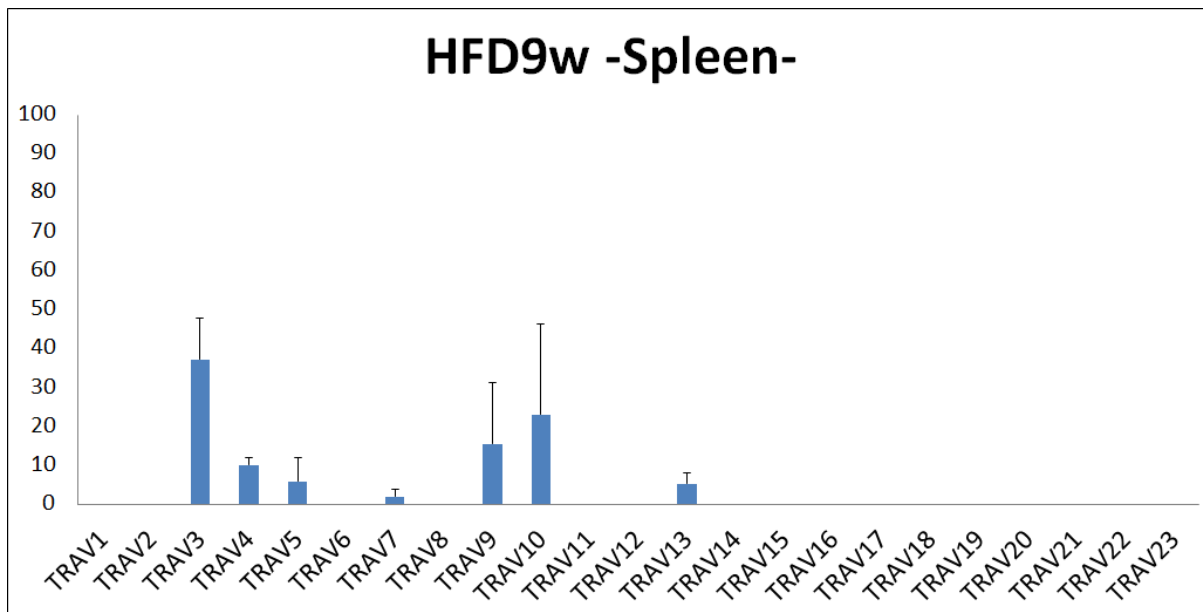


図7. 脂肪組織浸潤 T 細胞の発現する T 細胞受容体 (TCR) レポーター
 肥満脂肪組織への T 細胞の浸潤増加が特定の T 細胞の浸潤増加に起因するの否かを
 解明する為、各 TCR レポーターの割合変化を検証した。A) フローサイトメトリー
 を用いて、SVF に含まれる CD4T 細胞と CD8T 細胞の発現する TCRβ 鎖のレポーター
 をそれぞれ解析した。主要な 7 種類の V 断片の出現頻度(%)を見たが、肥満進行に
 伴う変化は現れなかった。HFD 群; n = 6~9、NCD 群; n = 3. エラーバーは標準偏差を
 表す。B) SVF から抽出した RNA を用いて cDNA を合成した後、それらを鋳型とした
 degenerate PCR を行った。プライマーは、TCRα 鎖或いは β 鎖の V 断片を全種類増幅

可能である事が既に報告されているものを使用した (図 2A) [22]。得られた PCR 産物をクローニングし 50 個以上の大腸菌コロニーについてシーケンス解析を行う事で、各 V 断片の出現頻度を決定した。シーケンス解析には IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® (<http://www.imgt.org>) の IMGT/V-QUEST を利用した。その結果、HFD を 9 週間負荷した群でのみ、TRAV3(V α 5)を持つ TCR α 鎖の割合が顕著に増加していた。# 1 ~ 12 はマウスの個体番号を表す。C) HFD 負荷後 9 週目の脾臓に於ける TCR レパートリーについても同様に、degenerate PCR 産物のシーケンス解析を行った。上段は TCR α 鎖、下段は TCR β 鎖である。n = 2. エラーバーは平均値からの差異を表す。

3-3 肥満脂肪組織浸潤 T 細胞が発現する特異的 TCR の同定

HFD 負荷後 4 週目から T 細胞の浸潤増加が確認され、さらに当研究室の先行研究によると HFD 負荷後 9 週目とはマクロファージが浸潤した直後であることから、V α 5T 細胞の浸潤増加は肥満脂肪組織で生じる炎症反応と関連している可能性が高いと考えた。そこで、それらの V α 5T 細胞が多クローン性の集団であるのか或いは少クローン性、単クローン性の集団であるのかを解明する為、V α 5T 細胞の TCR 配列を同定した。HFD を 9 週間負荷したマウスの脂肪組織から SVF を分離し、CD4T 細胞と CD8T 細胞それぞれのシングルセルソーティングを行った (図 3)。細胞は RNA 抽出バッファー中へ直接回収し、全量を用いて cDNA 合成を行った [26]。得られた cDNA を鋳型として、V α 5 特異的プライマーを用いて増幅された RT-PCR 産物のシーケンス解析を行った。その結果、V α 5T 細胞の 85.7% が CDR3 を含め完全に同一の配列を発現している事が明らかとなった (図 8)。さらにそれらの V α 5T 細胞の半数以上は TRBV13-2 (V β 8.2) を発現し、こちらも CDR3 を含め完全に同一の β 鎖であった。上述した様に TCR 遺伝子は、胸腺で生じる T 細胞の成熟過程において再編成を受けるが、その際に α 鎖では V 断片と J 断片の間で、 β 鎖では V 断片と D 断片、D 断片と J 断片の間で一度切断を受けた後、塩基の除去や terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) による結合部へのランダムなヌクレオチドの挿入により、最も多様性に富んだ CDR3 が形成される。すなわち、同一の CDR3 を持つ T 細胞の存在はクローン増殖が

生じた結果を意味するものである。さらに今回同定された TCR α 鎖は、先に行ったバルクの解析によっても同一の配列が確認されている。

A)

マウス A 細胞 #	TRAV	TRAJ	----- V断片 -----	----- C断片 -----	
CD4	C6	TRAJ33	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	D1	TRAJ21	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	E12	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	F5	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
マウス B 細胞 #	TRAV	TRAJ			
CD4	H4	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	H5	TRAJ49	AVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	H2	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
CD8	A1	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	A2	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	A3	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	A5	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	A6	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	A10	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	B0	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	B4	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	B6	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	B8	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	B11	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	C1	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	C2	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	C3	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	C4	TRAJ49	EGDSAVITCTYTDPNNSYFFWYKQEPGASLQLLMKVFSSTEINEGQGFVLLNKKDK-LSLNITAAHPGDSAAAYFCV--SADPGYQ--NFYFGKGTSLTIPNIQNP	EPAYVQLKDRSQDSTLCLNSR	
	マウス B 細胞 #	TRBV	TRBD	----- V断片 -----	----- C断片 -----
CD4	H5	TRBV13-2	ALILF--YGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASG--GRQGRIFFGHGKLSVLEDLRnVTP-		
			FWYRQDTGHGLRIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASG--GRQGRIFRSE-----PSV-		
	A10	TRBV13-1	TRBD1	TRBJ2-7	LLVSQDTGHGLRIHYSYGAGNLIQIGDVPDGYKATRTIQEDFFLLEIASPSQTSVYFCASSGN---YEQVFGPTRLTVLEDLRmLR--
	B2	TRBV13-2	TRBD1	TRBJ1-4	NTSSLF--YGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASG--GRQGRIFFGHGKLSVLEDLRnVTP-
	B4	TRBV13-2	TRBD1	TRBJ2-5	FWYRQDTGHGLRIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASG--GRQGRIFRSD-----PAT-
CD8	B6	TRBV13-2	TRBD1	TRBJ2-4	LLVSQDTGHGLRIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASGDA-GSQNTLYFGAGTRLSVLEDLRmLTPK
	B8	TRBV13-2	TRBD1	TRBJ2-4	LLVSQDTGHGLRIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASGDA-GSQNTLYFGAGTRLSVLEDLRmLTPK
	B11	TRBV13-2	TRBD1	TRBJ1-3	LLVSQDTGHGLRIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASGDA-GSQNTLYFGAGTRLSVLEDLRmLTPK
	C1	TRBV13-2	TRBD1	TRBJ2-4	LLVAHTGHGRRRIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASGEASGAGNTHFFGE-RRIFVEEEmLlHq
	C2	TRBV13-2	TRBD2	TRBJ2-4	LLVSQDTGHGLRIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASGDA-GSQNTLYFGAGTRLSVLEDLRmLTPK
	C3	TRBV13-2	TRBD1	TRBJ2-4	LLVSQDTGHGLRIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASGDA-GSQNTLYFGAGTRLSVLEDLRmLTPK
	C4	TRBV13-2	TRBD1	TRBJ2-4	LLVSQDTGHGLRIHYSYGAGSTEKGDIPDGYKASRPSQENFSLILELATPSQTSVYFCASGDA-GSQNTLYFGAGTRLSVLEDLRmLTPK

B)

TRAV3-3, P, N, TRAJ49, TRAC

```

M K T V T G P L F L C F W L Q L N C V S
ATG AAG ACA GTG ACT GGA CCT TTG TTC CTG TGC TTC TGG CTG CAG CTG AAC TGT GTG AGC

R G E Q V E Q R P P H L S V R E G D S A
AGA GGC GAG CAG GTG GAG CAG CGC CCT CCT CAC CTG AGT GTC CGG GAG GGA GAC AGT GCC

V I T C T Y T D P N S Y Y F F W Y K Q E
GTT ATC ACC TGC ACC TAC ACA GAC CCT AAC AGT TAT TAC TTC TTC TGG TAC AAG CAA GAG

P G A S L Q L L M K V F S S T E I N E G
CCG GGG GCA AGT CTT CAG TTG CTT ATG AAG GTT TTC TCA AGT ACG GAA ATA AAC GAA GGA

Q G F T V L L N K K D K R L S L N L T A
CAA GGA TTC ACT GTC CTA CTG AAC AAG AAA GAC AAA CGA CTC TCT CTG AAC CTC ACA GCT

A H P G D S A A Y F C A V S A D P G Y Q
GCC CAT CCT GGG GAC TCA GCC GCG TAC TTC TGC GCA GTC AGT GCT GAT CCG GGT TAC CAG
-----
SENSE Primer →
N F Y F G K G T S L T V I P N I Q N P E
AAC TTC TAT TTT GGG AAA GGA ACA AGT TTG ACT GTC ATT CCA AAC ATC CAG AAC CCA GAA

P A V Y Q L K D P R S Q D S T L C L F T
CCT GCT GTG TAC CAG TTA AAA GAT CCT CGG TCT CAG GAC AGC ACC CTC TGC CTG TTC ACC

D F D S Q I N V P K T M E S G T F I T D
GAC TTT GAC TCC CAA ATC AAT GTG CCG AAA ACC ATG GAA TCT GGA ACG TTC ATC ACT GAC

K T V L D M K A M D S K S N G A I A W S
AAA ACT GTG CTG GAC ATG AAA GCT ATG GAT TCC AAG AGC AAT GGG GCC ATT GCC TGG AGC

N Q T S F T C Q D I F K E T N A T Y P S
AAC CAG ACA AGC TTC ACC TGC CAA GAT ATC TTC AAA GAG ACC AAC GCC ACC TAC CCC AGT

S D V P C D A T L T E K S F E T D M N L
TCA GAC GTT CCC TGT GAT GCC ACG TTG ACT GAG AAA AGC TTT GAA ACA GAT ATG AAC CTA
-----
ANTI-SENSE Primer ←
N F Q N L S V M G L R I L L L K V A G F
AAC TTT CAA AAC CTG TCA GTT ATG GGA CTC CGA ATC CTC CTG CTG AAA GTA GCC GGA TTT

N L L M T L R L W S S Stop
AAC CTG CTC ATG ACG CTG AGG CTG TGG TCC AGT TGA

```

TRBV13-2, TRBD1,N, TRBJ2-4, TRBC1

```

M G S R L F F V L S S L L C S K H M E A
ATG GGC TCC AGG CTC TTC TTC GTG CTC TCC AGT CTC CTG TGT TCA AAA CAC ATG GAG GCT

A V T Q S P R N K V A V T G G K V T L S
GCA GTC ACC CAA AGC CCA AGA AAC AAG GTG GCA GTA ACA GGA GGA AAG GTG ACA TTG AGC

-----CDR1-----
C N Q T N N H N N M Y W Y R Q D T G H G
TGT AAT CAG ACT AAT AAC CAC AAC AAC ATG TAC TGG TAT CGG CAG GAC ACG GGG CAT GGG

-----CDR2-----
L R L I H Y S Y G A G S T E K G D I P D
CTG AGG CTG ATC CAT TAT TCA TAT GGT GCT GGC AGC ACT GAG AAA GGA GAT ATC CCT GAT

G Y K A S R P S Q E N F S L I L E L A T
GGA TAC AAG GCC TCC AGA CCA AGC CAA GAG AAC TTC TCC CTC ATT CTG GAG TTG GCT ACC

-----CDR3-----
P S Q T S V Y F C A S G D A G S Q N T L
CCC TCT CAG ACA TCA GTG TAC TTC TGT GCC AGC GGT GAT GCA GGC AGT CAA AAC ACC TTG
-----
Y F G A G T R L S V L E D L R N V T P P
TAC TTT GGT GCG GGC ACC CGA CTA TCG GTG CTA GAG GAT CTG AGA AAT GTG ACT CCA CCC

K V S L F E P S K A E I A N K Q K A T L
AAG GTC TCC TTG TTT GAG CCA TCA AAA GCA GAG ATT GCA AAC AAA CAA AAG GCT ACC CTC

V C L A R G F F P D H V E L S W W V N G
GTG TGC TTG GCC AGG GGC TTC TTC CCT GAC CAC GTG GAG CTG AGC TGG TGG GTG AAT GGC

K E V H S G V S T D P Q A Y K E S N Y S
AAG GAG GTC CAC AGT GGG GTC AGC ACG GAC CCT CAG GCC TAC AAG GAG AGC AAT TAT AGC

Y C L S S R L R V S A T F W H N P R N H
TAC TGC CTG AGC AGC CGC CTG AGG GTC TCT GCT ACC TTC TGG CAC AAT CCT CGC AAC CAC

F R C Q V Q F H G L S E E D K W P E G S
TTC CGC TGC CAA GTG CAG TTC CAT GGG CTT TCA GAG GAG GAC AAG TGG CCA GAG GGC TCA

P K P V T Q N I S A E A W G R A D C G I
CCC AAA CCT GTC ACA CAG AAC ATC AGT GCA GAG GCC TGG GGC CGA GCA GAC TGT GGG ATT
-----
T S A S Y Q Q G V L S A T I L Y E I L L
ACC TCA GCA TCC TAT CAA CAA GGG GTC TTG TCT GCC ACC ATC CTC TAT GAG ATC CTG CTA

G K A T L Y A V L V S T L V V M A M V K
GGG AAA GCC ACC CTG TAT GCT GTG CTT GTC AGT ACA CTG GTG GTG ATG GCT ATG GTC AAA

R K N S Stop
AGA AAG AAT TCA TGA

```

図 8. HFD 負荷後 9 週目に脂肪組織への浸潤増加が見られる V α 5T 細胞が発現する TCR の同定

HFD を 9 週間負荷したマウスから SVF を採取し、そこへ含まれる CD4T 細胞と CD8T 細胞をそれぞれ 1 細胞毎に選別した。細胞は RNA 抽出バッファー中へ直接回収し、全量を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型とした PCR で、始めにハウスキーピング遺伝子の増幅の有無を確認した。増幅が見られたサンプルについて V α 5 特異的プライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をシーケンス解析した。

A) その結果、CD4T 細胞と CD8T 細胞の両方から V α 5 が増幅され、増幅された V α 5 の殆どが同一の相補性決定領域 (Complementarity-Determining Region: CDR) 3 を持つ事が明らかとなった。また、V α 5 が増幅されたサンプルを用いて TCR β 鎖の degenerate PCR を行い、同様に得られた PCR 産物をシーケンス解析したところ、半数以上が CDR3 領域を含め同一の V β 8.2 であった。上段は V α 5 が増幅されたサンプルの TCR α 鎖のアミノ酸配列である。その内、V 断片と J 断片が共に同一の細胞を青で示した。下段は同一の TCR α 鎖を持つ細胞の TCR β 鎖のアミノ酸配列である。V 断片、D 断片そして J 断片が同一の細胞を桃色で示した。

B) V α 5T 細胞が発現する TCR として、最終的に同定された TCR α 鎖及び β 鎖の塩基配列とアミノ酸配列を併せて記した。塩基配列は以下に従って色分けした。橙: V 断片、紫: D 断片、青: J 断片、黒: P 領域、赤: N 領域、緑: C 断片。また、TCR-TG マウスの遺伝子型決定 PCR に使用する、SENSE primer 及び ANTI-SENSE primer を図中に示した。

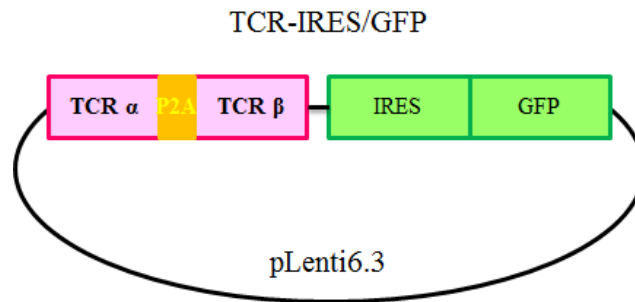
3-4 TCR 複合体形成の検証

シングルセルソーティングにより得た1細胞毎のシーケンス解析の結果見出された TCR α 鎖及び β 鎖が TCR 複合体を形成し得るのかを検証する為、マウス由来の T 細胞株である 58 $\alpha\beta$ へ導入した。この細胞株は TCR の発現を欠損しており、それに起因して細胞表面に於ける CD3 ϵ の発現も欠損している。しかし、TCR α 鎖 β 鎖を同時に導入することで TCR と CD3 の各構成要素による TCR 複合体の形成が可能となる為、TCR と共に CD3 ϵ を細胞表面で検出可能になるものである [30]。細胞への TCR 遺伝子の導入には、エレクトロポレーションや LipofectamineTM2000 (Invitrogen)、X-treameGENE9 (Roche) といった市販のトランスフェクション試薬を用いたがあまり効率が良くなかった為、非分裂時の細胞の染色体へも遺伝子を挿入可能なレンチウイルスを用いて、再度導入を試みた。その際、 α 鎖と β 鎖を効率的に1つの細胞へと導入する為、レトロジェニックマウスの作製法を参考にし、ピコルナウイルス由来の 2A ペプチドで α 鎖と β 鎖をつなぎ1つのコンストラクションとした(図 9A) [28, 29]。2A ペプチドは RNA からタンパク質へと翻訳される際にリボソームスキップと呼ばれる現象が生じ、結果として 2A ペプチドを挟んで上流と下流に繋がれたタンパク質は2つの独立したタンパク質として産出される [42]。このシステムを用いた場合、導入した2つのタンパク質の発現量はほぼ同じとなる事が知られている [28, 42]。さらにレポーター遺伝子として Green Fluorescent Protein (GFP) を発現させる為、Internal

Ribosome Entry Site (IRES) -GFP 配列も付加した。以上の方法によって TCR α 鎖と β 鎖を同時に導入した結果、58 $\alpha\beta$ の細胞表面に CD3 ϵ 及び TCR β 鎖が検出された (図 9B)。

使用可能な抗体の問題で、CD3 ϵ と TCR β 鎖を同時染色する事は出来なかったが、CD3 ϵ または TCR β 鎖の発現が見られた細胞の割合がほぼ同じであったことから TCR 複合体が正常に形成されたものと判断した。

A)



B)

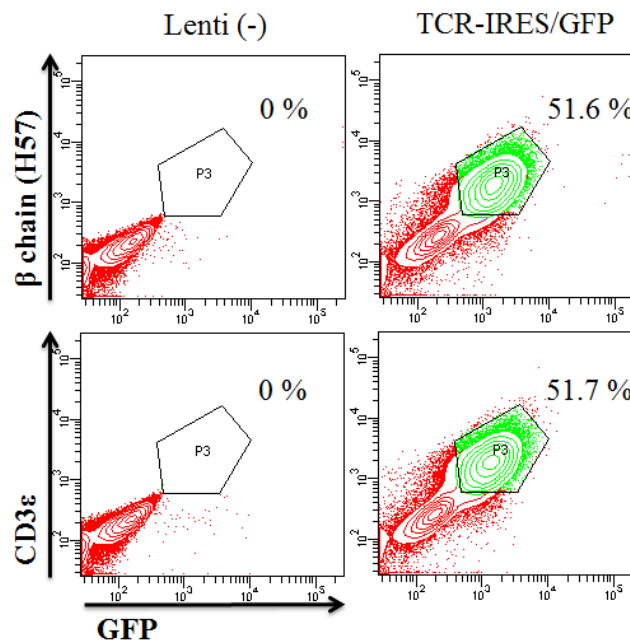


図9. TCR 複合体形成の検証

同定した Vα5 を持つ TCRα 鎖と Vβ8.2 を持つ TCRβ 鎖を、TCR を欠損したマウス T 細胞株である 58αβ へと導入した。A) α 鎖と β 鎖は 2A ペプチドで 1 つに繋ぐ事で、導入効率の向上を図った。この場合、TCRα 鎖の C 末端には 2A ペプチド由来の約 20 アミノ酸が余分に付加されるが、TCR 刺激に対するシグナル伝達に影響はないとの報告がある [28, 29]。stable 細胞株を得る為、導入遺伝子をゲノム DNA 中へ挿入可能なレンチウイルスシステムを利用した。B) 薬剤を用いて遺伝子が導入された細胞を選択し、フローサイトメトリーにより得られた細胞株の TCRβ 鎖と CD3ε の細胞表面に於ける発現と GFP の蛍光を測定した。その結果、TCRβ 鎖⁺GFP⁺の細胞と CD3ε⁺GFP⁺の細胞の割合が同程度である事が確認出来た。この事から TCR 複合体は正常に形成されたものと判断した。

3-5 TCR-TG マウスの作製

本研究で我々が同定した V α 5T 細胞の、肥満脂肪組織炎症における役割を解明する為、TCR-TG マウスを作製した。まず TCR 遺伝子再編成に関しては、機能的 TCR β 鎖が一度産生されると対立遺伝子排除により β 鎖の遺伝子再編成が停止する事が知られている。その為、TCR-TG マウスの作製には、内因性の機能的 TCR β 鎖が産生されるよりも早い段階で導入遺伝子が発現している必要がある。そこで今回、human CD2 minigene based vector を使用した。この発現ベクターは、human CD2 プロモーターとポリ A シグナル配列及び Locus Control Region (LCR) から成るものである (第 2 章、図 4) [27, 43]。CD2 は細胞間接着に関与する糖蛋白質であるが、T 細胞の成熟段階の最も早期から発現が見られる T 細胞マーカーの一つであり、その発現は T 細胞の一生を通じて見られることが知られている [44]。その様な CD2 のプロモーターを用いて TG マウスを作製した場合、導入遺伝子由来の mRNA の発現が胸腺で強く且つ脾臓で僅かに見られ、蛋白質としての発現は T 細胞のみで確認された事が報告されている [45]。またこの発現ベクターが持つ LCR は、T 細胞特異的なエンハンサー及び活性クロマチンドメインを構成する調節因子を含む。それにより導入遺伝子の挿入部位に関係なく、しかし導入されたコピー数に比例して、T 細胞系統特異的に発現を誘導するものである [27, 43, 46]。

TCR 複合体形成の確認の際には 2A ペプチドを用いたが、その場合 2A ペプチドの上流に位置するタンパク質の C 末端に 2A ペプチド由来の約 20 アミノ酸が余分に

付加されてしまう。TCR シグナル伝達に影響しないとの報告はあるが、今回は出来る限りその様な不確実性を除く為 TCR α 鎖と β 鎖を別個のコンストラクションとして作製した。しかし TCR α 鎖、 β 鎖の双方を同様に導入する必要がある為、当初それぞれの TG マウスを作製後、十分な発現が見られる系統を交配する事で導入 TCR α 鎖 β 鎖両方を持つダブル TG マウスを得ようと試みた。その結果 α 鎖、 β 鎖それぞれの TG マウスを数匹ずつ得られた。そこで先ず対立遺伝子排除が厳密に生じる β 鎖の TG マウスから末梢血を採取し、T 細胞表面における TCR β 鎖の発現をフローサイトメトリーにより解析したところ、導入遺伝子を発現している個体を確認する事はできなかった。また、これと同時に、 α 鎖と β 鎖を混合して受精卵雄性前核へ注入した TG マウスも作製していたが、得られた 3 個体の α 鎖 β 鎖が共に導入された TG マウスに於いても同様の結果となった。

以上の様に複数の個体において導入した β 鎖の発現が全く見られなかった原因として 2 つの可能性を考えた。1 つは、我々が導入した遺伝子が機能的 TCR を産生しない可能性である。そしてもう 1 つは、内因性の機能的 TCR 産生よりも早期に十分な導入遺伝子の発現が誘導されていない可能性である。以上の 2 つの可能性を検証する為、T 細胞成熟過程の早期に導入 TCR をより強力に発現させる近位 Lck プロモーターを用いて再度 TCR-TG マウスの作製を試みた。Lck は CD4、CD8 補助受容体に結合している Src ファミリーチロシンキナーゼであり、TCR シグナル伝達に中心的な役割

を担っている。近位 Lck プロモーター制御下で遺伝子を導入した場合、胸腺で選択的にその発現が誘導される一方で、腎臓、肝臓、心臓、肺、骨格筋といった組織では発現が見られず、脾臓とその他の末梢組織において僅かに導入遺伝子の発現が見られることが報告されている [47]。さらに胸腺における発現については、 $CD4^-CD8^-$ のダブルネガティブ (DN) 胸腺細胞として知られる未成熟な段階で強く誘導される [47, 48, 49]。この DN 胸腺細胞の内、 $CD25^+CD44^-$ の DN3 と呼ばれる段階で TCR β 鎖の遺伝子は再編成を受け、 $CD25^-CD44^-$ の DN4 と呼ばれる次段階へと成熟する (T 細胞分化に関しては次項の「3-6 TCR-TG マウスの胸腺に於ける T 細胞成熟」で解説する)。

その為、この時期に強力に導入遺伝子の発現を誘導する近位 Lck プロモーターを用いる事で、対立遺伝子排除により内因性 TCR β 鎖の産生を、より確実に抑制出来るものと考えた。最終的に得られた TG マウスの胸腺をフローサイトメトリーで解析したところ、DN よりも成熟段階にある $CD4^+CD8^+$ のダブルポジティブ (DP) 胸腺細胞、及び $CD4^+CD8^-$ または $CD4^-CD8^+$ の完全に成熟した T 細胞表面に於いて導入 TCR β 鎖の発現を確認できた。同時にこの結果により、今回作製した TCR コンストラクトが機能的 TCR を産生する事が立証された。しかしながら、近位 Lck プロモーターでは末梢へ移動した成熟 T 細胞における発現強度が著しく低下してしまった為、今後の実験への使用は難しいと判断した。そこで再度 human CD2 プロモーターを使用して TG マウスを作製し直した。近位 Lck プロモーターを使用して導入遺伝子の発現が確認でき

た TG マウスは、TCR α 鎖と β 鎖を同時に注入して得られた α 鎖 β 鎖のダブル TG マウスであったことを鑑みて、今度は TCR α 鎖 β 鎖を同時に注入する方法を取った。最終的に産まれた総数 114 匹から尻尾を採取し、そこから精製したゲノム DNA を鋳型として用いた PCR により導入遺伝子の有無を確認した。その結果、TCR α 鎖 β 鎖のダブル TG マウスは 14 匹、 α 鎖のみの TG マウスと β 鎖のみの TG マウスはそれぞれ 3 匹ずつ得られた。TCR α 鎖 β 鎖ダブル TG マウス 14 匹の内、生存していた 13 匹から末梢血を採取し、フローサイトメトリーにより導入 TCR β 鎖の発現を解析した。その結果、2 個体で殆ど全ての細胞で十分な導入 TCR β 鎖の発現が見られ (# 3, 11)、3 個体で導入 TCR β 鎖を発現する細胞と導入 TCR β 鎖の発現が見られない細胞が共に観察され (# 6, 12, 13)、残りの個体は野生型 (WT) の同腹仔と同様の結果を示した (図 10A, B)。そこで殆ど全ての細胞で十分に導入 TCR β 鎖を発現している個体と、導入 TCR β 鎖を発現していない細胞も存在する個体の末梢血を用いて RT-PCR を行い成熟 T 細胞に於ける TCR α 鎖の発現について検証したところ、殆ど全ての細胞で十分な TCR β 鎖の発現が見られた個体でより強い TCR α 鎖の発現が確認できた (図 10C)。この結果を受けて、導入 TCR β 鎖の十分な発現が見られた 2 個体 (# 3, 11) は本研究に使用可能と判断し、これらを選抜し系統を維持する事にした。またこれらの結果から、TCR α 鎖 β 鎖のダブル TG マウスであっても導入遺伝子の発現比率は個体によって大きく異なる上、十分な発現が見られる個体が得られる確率も約 15 % (2 匹/13 匹中)

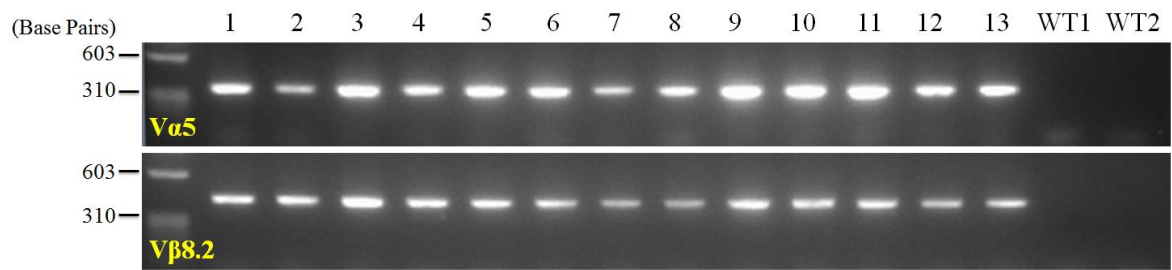
と低い事が分かった。

次に、末梢成熟 T 細胞に於ける TCR α 鎖のタンパク質としての発現について検証した。導入した α 鎖は V α 5 を持つが V α 5 を認識する抗体は市販されていない為、現在使用可能な V α 2、V α 3.2、V α 8.3、V α 11 を認識する抗体を用いて、導入した TCR α 鎖を細胞表面に発現している T 細胞の割合を間接的に解析した。しかし、以上に挙げた 4 種類それぞれの V α の占める割合は TG マウスに於いても WT 同腹仔と同程度見られた。この結果は、TCR β 鎖では厳密に対立遺伝子排除が行われるのに対して、TCR α 鎖ではその様な対立遺伝子排除は起こらず、CD4⁺CD8⁺の DP 胸腺細胞の段階で生じる正の選択によって recombination activating gene (RAG) -1 と RAG-2 の発現が消失するまで遺伝子再編成が続く事に起因すると考えられた。その為、成熟し末梢へ遊走してくる T 細胞が内因性 TCR α 鎖を持たないように、作製した TCR-TG マウスとの交配には、B6.129S2-*Tcra*^{tm1Mom}/J (理化学研究所 CDB) を使用した。このマウスは TCR α 鎖 C 領域の遺伝子を人為的に欠如させてある為、機能的 TCR α 鎖を産生できず、結果として内因性 $\alpha\beta$ T 細胞を欠損したモデルマウスとして知られている [25]。また TCR-TG マウスも B6.129S2-*Tcra*^{tm1Mom}/J も共に遺伝的背景は C57BL/6J であるので、F2 以降に得られた TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスを用いて実験を行った (図 10D)。

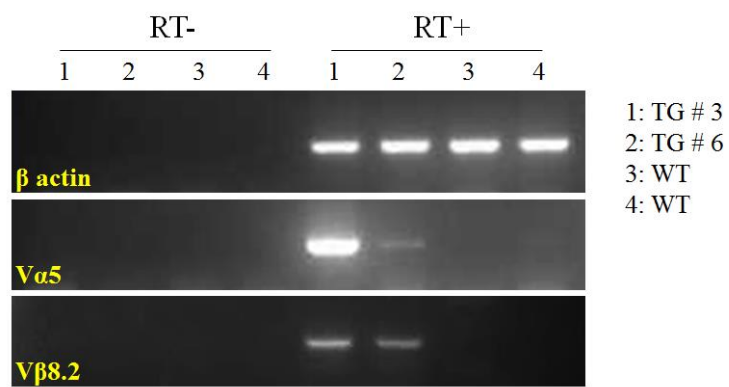
なお、TCR-TG マウスはヘミ接合体として継代しており、産まれる TG マウスは 99 % 以上の確率で導入した TCR α 鎖と β 鎖を共に持つダブル TG マウスであること

から、導入した TCR α 鎖と β 鎖は単一遺伝子座に挿入されたものと考えられる。

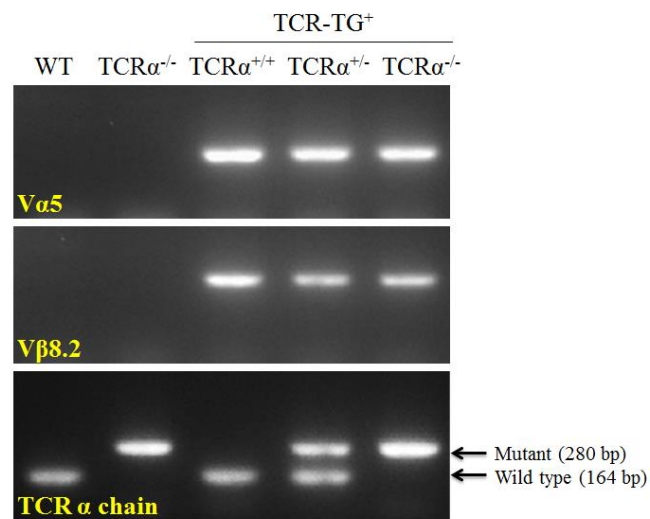
A)



C)



D)



B)

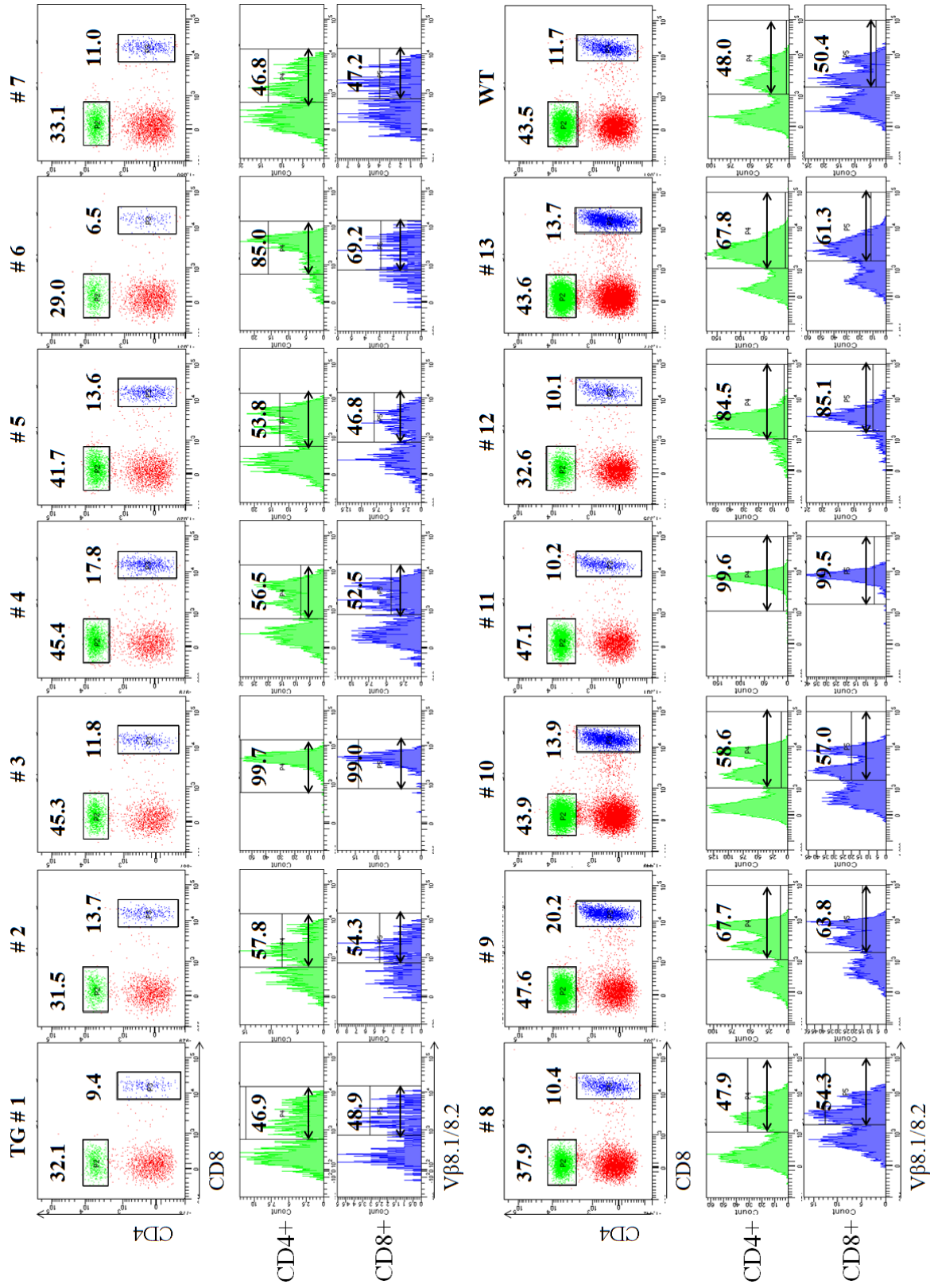


図 10. TCR-TG マウスの作製と成熟 T 細胞に於ける導入 TCR 発現の確認

T 細胞系統特異的に終始発現が見られる CD2 のプロモーター制御下で TCR 遺伝子を導入した TCR-TG マウスを作製した。A) TCR α 鎖と β 鎖を同時に受精卵へ注入し、産まれた 114 匹のマウスの尻尾から精製したゲノム DNA を用いた PCR により導入遺伝子の有無を判断した。その結果、14 匹 (内 1 匹死亡) の TCR α 鎖 β 鎖のダブル TG マウスが得られた。B) TCR α 鎖 β 鎖のダブル TG マウスから末梢血を採取し、フローサイトメトリーにより成熟 T 細胞に於ける導入 TCR β 鎖の発現を検証した。まず、CD4T 細胞と CD8T 細胞の比率に関しては、WT マウスと同様に TCR-TG マウスに於いても CD4T 細胞の割合が CD8T 細胞を上回っており、その比率に変化は見られなかった。一方、V β 8.1/8.2 を発現する細胞の割合は、13 匹中 2 匹 (# 3, 11) がほぼ全ての T 細胞で V β 8.1/8.2 を発現しており、3 匹 (# 6, 12, 13) が 6~9 割程の T 細胞で発現している事が確認できたが、残りの 8 匹は WT マウスと同程度の割合に止まった。C) フローサイトメトリーによる解析の結果、導入 TCR β 鎖を発現する細胞の割合に差が認められた為、ほぼ全ての T 細胞で発現が見られた個体 (TG # 3) と、導入 TCR β 鎖を発現する細胞の割合が 7~9 割程度の個体 (TG # 6) で V α 5 の発現量に違いが見られるのか RT-PCR により検証した。その結果、ほぼ全ての T 細胞で発現が見られた個体 (TG # 3) では、その割合が 7~9 割程度の個体 (TG # 6) と比較して非常に強い V α 5 の発現が確認された。D) 内因性 TCR α 鎖の発現を排除する為、TCR α ^{-/-}マウスと交配し、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスを作製した。図は、尻尾から精製したゲノム DNA を用いた遺伝子型決定 PCR の結果を示す。

3-6 TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスの胸腺に於ける T 細胞成熟

先ず作製した TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスで T 細胞は正常に分化成熟する事を確認する為、胸腺に於ける T 細胞の正の選択及び負の選択について検証した。

T 細胞の胸腺に於ける分化は、多能性造血幹細胞から分化した初期リンパ球前駆細胞が胸腺の髄質と皮質の境界部に侵入するところから始まる。この段階は補助受容体の CD4 も CD8 も発現しておらずダブルネガティブ (DN) 胸腺細胞として知られている。DN 胸腺細胞はさらに、IL-2 受容体 α 鎖である CD25 と、細胞 - 細胞、或いは細胞 - 細胞間基質との接着分子である CD44 の発現パターンにより 4 段階 (DN1 ~ 4) に分類される。胸腺へ移動した直後の最も未熟な DN1 の段階では CD25 は発現しておらず、CD44 を高発現している。しかし CD44 は成熟と共にその発現が減少する。CD44 と CD25 の発現が見られる段階は DN2 とされ、胸腺皮質外部へと向かい移動する。そして CD44 の発現が弱まるが、CD25 の発現が見られる段階は DN3 とされ、この時期に TCR β 鎖の再編成が生じる。一度機能的な β 鎖が産生されると、プレ TCR α 鎖と会合し、プレ TCR を形成する。この段階は CD44 と CD25 の発現が消失し DN4 とされる。そして、プレ TCR からのシグナルにより先ず CD4 と CD8 を共に発現したダブルポジティブ (DP) 胸腺細胞となり活発な増殖を行う。次に再度髄質へ向かって移動し、プレ TCR のシグナルにより遺伝子組み換えを担う RAG-1,2 の標的が TCR β 鎖から α 鎖へと移行する事で、それ以上の β 鎖の再編成を停止する対立遺伝子排除が

行われる。そして、機能的 TCR α 鎖の産生により形成された TCR からのシグナルで正の選択を受けた細胞のみが、CD4 か CD8 いずれか一方の発現を消失し、シングルポジティブ (SP) 胸腺細胞となる。その後自己抗原への高親和性により負の選択を受けなければ、完全に成熟した T 細胞として末梢へと遊走する。

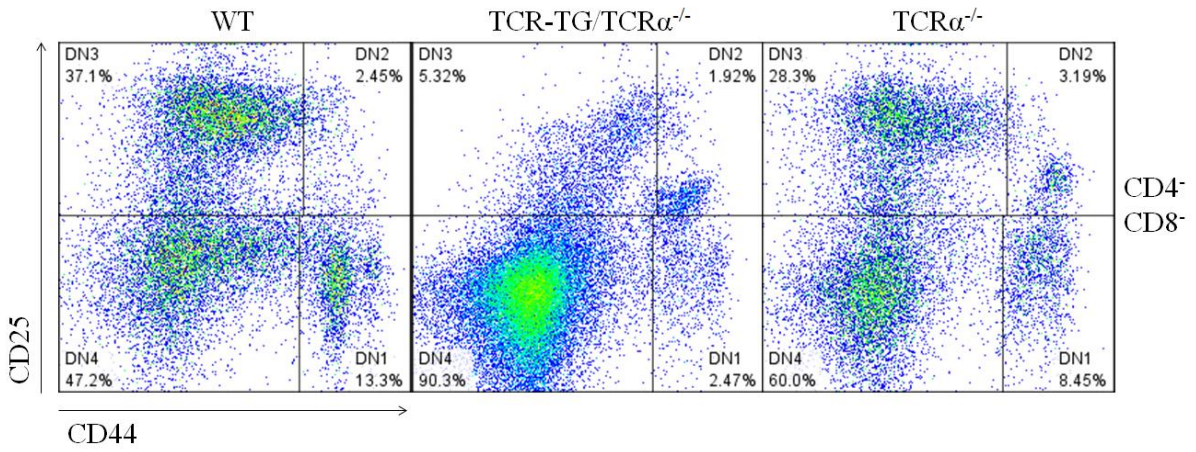
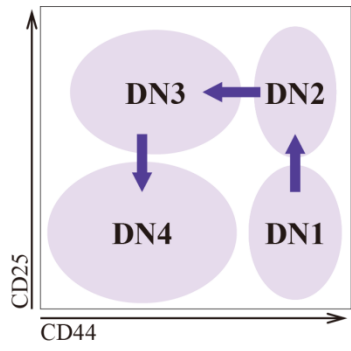
以上の様に、通常 T 細胞の正か負かの選択は細胞成熟の最終段階である DP 胸腺細胞以降になってから行われるが、最も未成熟な DN 胸腺細胞から順に解析を行った。初めに DN 胸腺細胞を CD25 及び CD44 で分画し、成熟パターンの違いを検証した。その結果、先ず TCR α ^{-/-}マウスは機能的 TCR α 鎖を欠損している為に DP 胸腺細胞以降の分化成熟には障害が見られるが、DN 胸腺細胞の段階では WT と同様の結果を示した。一方、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスの DN 胸腺細胞は殆どが DN4 の成熟が進んだ段階である事が分かった (図 11A)。これは TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスでは導入した TCR β 鎖が DN3 以前の段階で発現している事を反映するものであり、TCR トランスジェニックマウスで一般的に見られる現象である [50, 51]。次に胸腺細胞を CD4 及び CD8 の発現パターンで分画した。その際、DN、DP、CD4⁺CD8^{low}、CD4SP、CD8SP の 5 つの成熟段階における胸腺細胞に分画し解析を行った。何故なら、DP 胸腺細胞は CD4 と CD8 の発現強度が高い DP^{bright} 段階に正の選択を受け、抗原提示を受けた後 DP^{dull} へと移行し、一過性の CD4⁺CD8^{low} 段階を経て CD4SP 或いは CD8SP 胸腺細胞へと成熟する事が知られている為である [52]。その結果、TCR α ^{-/-}マウスでは殆ど見られなかつ

た CD4SP 胸腺細胞の割合が、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスでは回復している事が確認された (図 11B)。一方で、CD8SP 胸腺細胞の割合については明らかな変化は見受けられなかった。

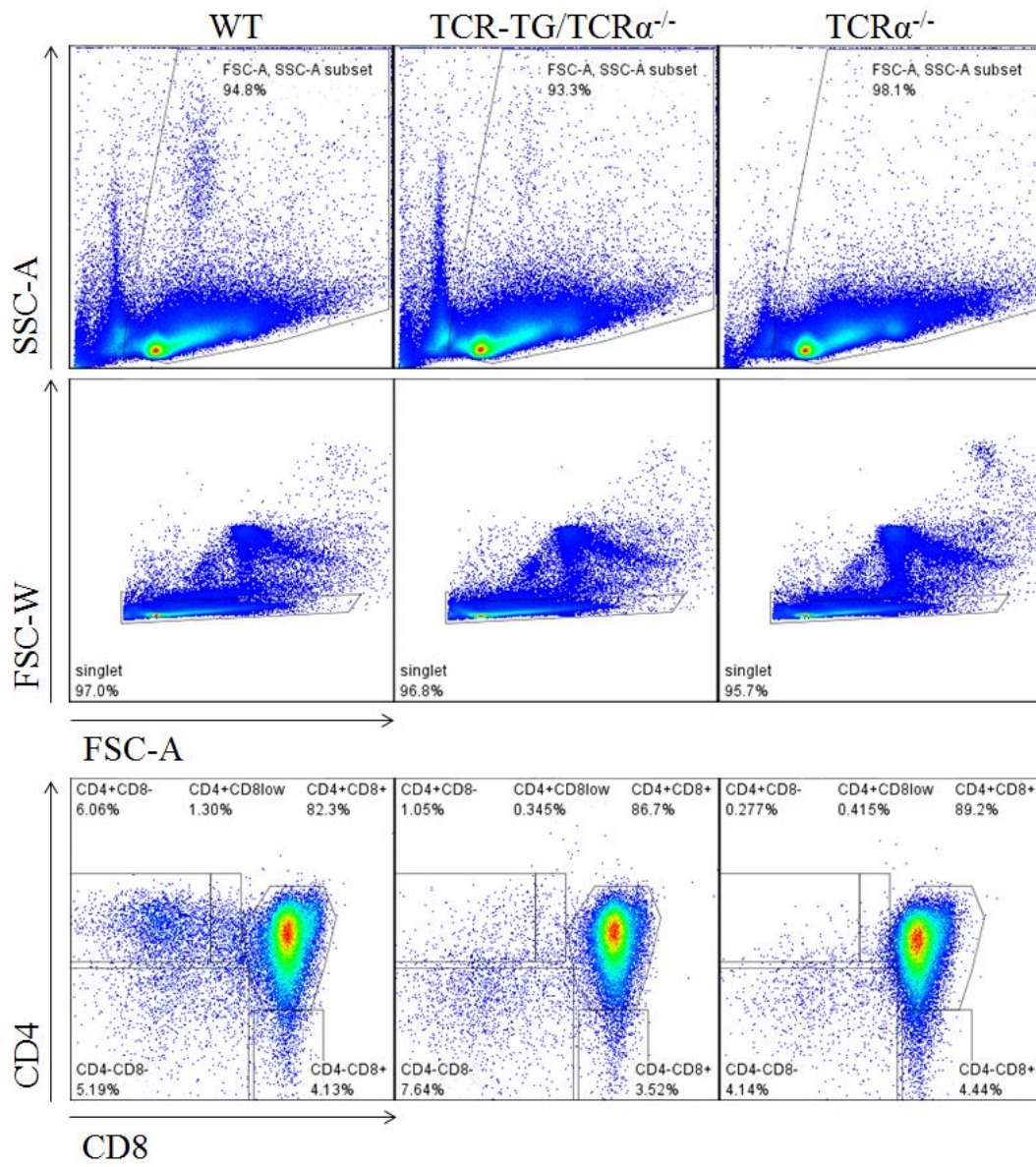
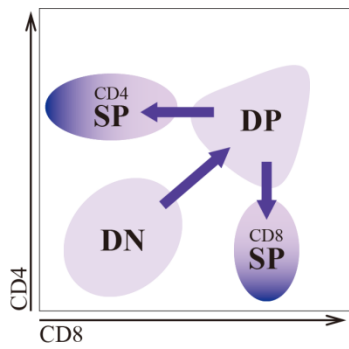
さらに、正の選択が正常に行われているか否かを検証する為、CD4⁺CD8^{low}、CD4SP、CD8SP の各成熟段階に於ける、CD69 と TCR β 鎖の発現量について解析した。CD69 は C 型レクチンであり、T 細胞が TCR を介した刺激等で活性化されると細胞表面に発現が見られることで知られている。先行研究によると、選択を受ける前の DP 胸腺細胞は CD69⁻TCR^{lo} を示し、TCR α 鎖と β 鎖の会合が行われた直後の DP 胸腺細胞は CD69⁺TCR β ^{int} を示す。そして正の選択を受けた直後の SP 胸腺細胞は CD69⁺TCR β ^{hi} を示し、より成熟が進むと CD69⁻TCR β ^{hi} を示す事が知られている [52]。すなわち、CD69⁺TCR β ^{int} と CD69⁺TCR β ^{hi} を示す細胞分画の減少は正の選択に於ける障害を反映しており、CD69⁺TCR β ^{hi} を示す分画と CD69⁻TCR β ^{hi} を示す分画に減少が見られる場合は、正の選択後の生存に何らかの問題がある事を意味する。以上の様に、DP 胸腺細胞は CD69⁻TCR^{lo} → CD69⁺TCR β ^{int} → CD69⁺TCR β ^{hi} → CD69⁻TCR β ^{hi} と成熟が進み SP 胸腺細胞へと移行する。その為、正常に正の選択を受け分化成熟してくる場合、WT マウスで見られるように CD4SP 胸腺細胞の大部分は CD69⁺TCR β ^{hi} または CD69⁻TCR β ^{hi} へと分画される (図 11C)。これに対し、TCR α ^{-/-}マウスの場合は TCR α 鎖の欠損により正の選択が障害されている為、ほぼ全ての CD4⁺CD8^{low} 胸腺細胞が CD69⁻TCR^{lo} の分

画に止まっている。ところが TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは、CD4⁺CD8^{low} 胸腺細胞、CD4SP 胸腺細胞共に、CD69⁺TCR β^{hi} を示す分画と CD69⁻TCR β^{hi} を示す分画の割合が回復している事が確認された (図 11C)。また、その様に正常に正の選択を受けた胸腺細胞は WT マウスと同程度の TCR β 鎖を発現している事が分かった。一方 CD8SP 胸腺細胞に関しても、TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは CD69⁺TCR β^{hi} または CD69⁻TCR β^{hi} へと分画される正の選択を正常に受けた細胞の存在が確認出来た。これらの結果により、導入した V α 5/V β 8.2 の TCR を持つ T 細胞は、MHC クラス I と II の双方によって正の選択を受ける事が出来る非常に稀な細胞である事が示された。

A)



B)



C)

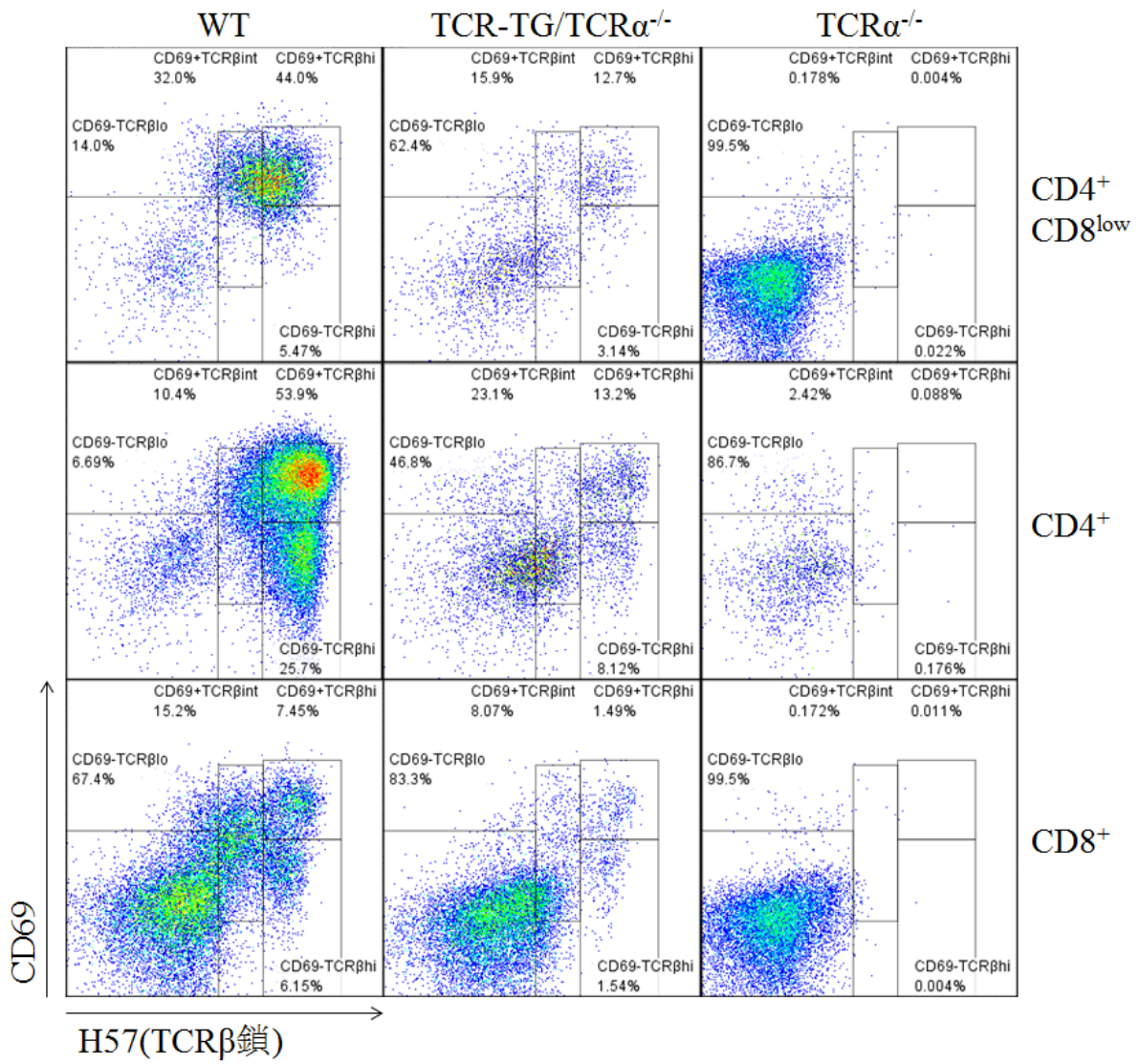
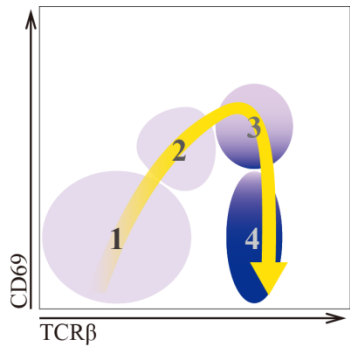


図 11. TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスの胸腺に於ける T 細胞成熟

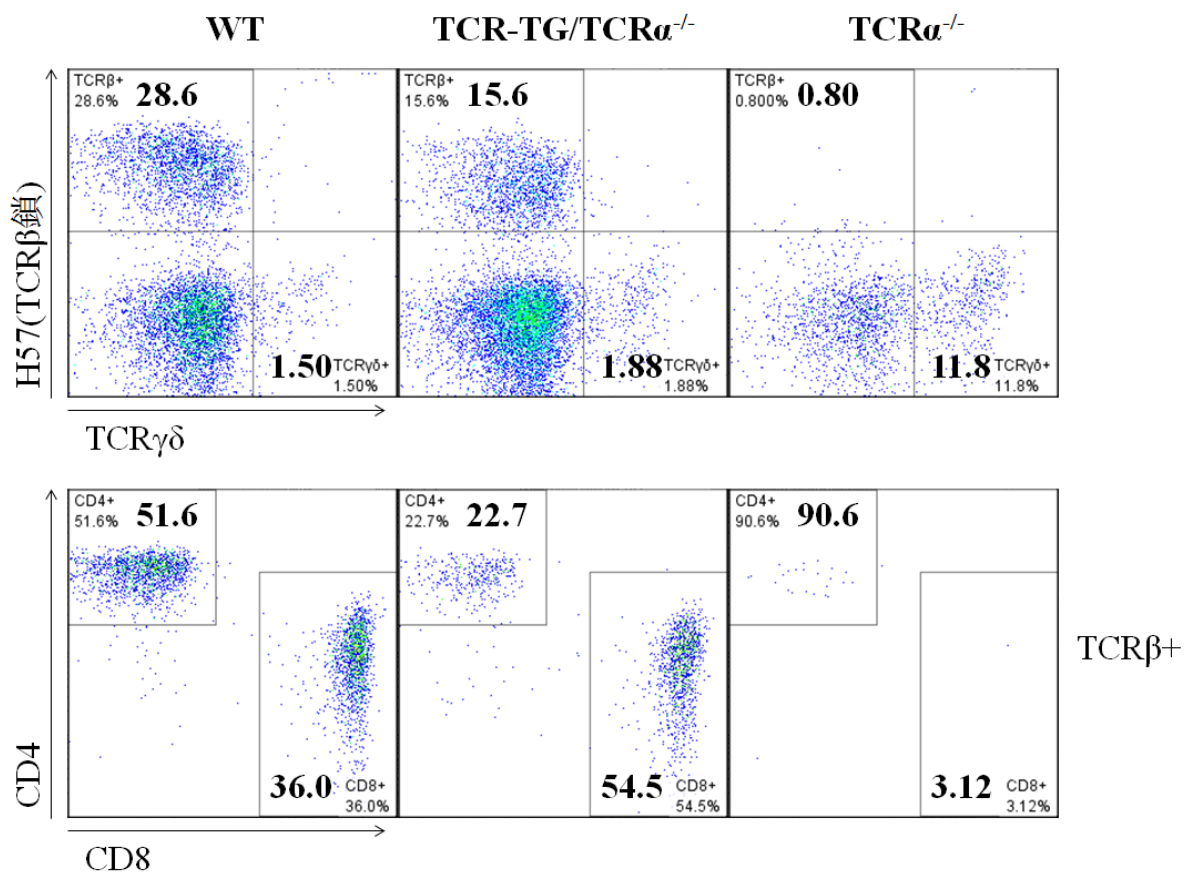
TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスから胸腺を採取し T 細胞の成熟過程をフローサイトメトリーにより解析した。生存胸腺細胞を FSC-A/SSC-A で分画した後、複数の細胞から成る細胞塊を FSC-W により除いた分画を解析した。**A)** 胸腺の皮髄境界部へ入ったばかりの最も未成熟な初期リンパ球前駆細胞である CD4⁺CD8⁺の DN 胸腺細胞を、CD25 及び CD44 の発現パターンで分画した。TCR α ^{-/-}マウスでは DN 胸腺細胞の段階では正常に成熟が進む為、DN1 ~ DN4 全ての成熟段階が WT マウスと同様の割合を示す事が確認された。一方、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスでは殆ど全ての細胞が DN4 の最も成熟の進んだ段階にいる事が分かった。**B)** CD4 と CD8 の発現パターンから、DN、DP、CD4⁺CD8^{low}、CD4SP、CD8SP の 5 つの成熟段階に分画し解析を行った。最も未成熟な DN 胸腺細胞から、機能的 TCR β 鎖が再編成されるとプレ TCR α 鎖と会合しプレ TCR を形成する。プレ TCR からのシグナルにより CD4⁺CD8⁺の DP 胸腺細胞へと成熟し、TCR α 鎖の再編成が生じる。その後、形成された TCR と MHC-ペプチド複合体との親和性により、正の選択と負の選択というチェックポイントを通過した細胞は一過性の CD4⁺CD8^{low} 段階を経て CD4 または CD8SP 胸腺細胞となり、成熟した T 細胞として末梢へと遊走する。TCR α ^{-/-}マウスでは機能的 TCR α 鎖を欠損している為に CD4SP 胸腺細胞が殆ど存在しないが、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスでは CD4SP 胸腺細胞の割合に回復が見られた。**C)** さらに CD69 と TCR β 鎖の発現パターンにより正の選択について解析した。DP 胸腺細胞は正の選択を受けた後、一過性の CD4⁺CD8^{low} 段階を経て CD4SP 或いは CD8SP 胸腺細胞へと成熟する為、CD4⁺CD8^{low}、CD4SP、CD8SP の 3 つの成熟段階の細胞についてそれぞれ検証した。選択を受ける前の DP 胸腺細胞は CD69⁻TCR β ^{low} (分画 1) に位置し、TCR α 鎖と β 鎖が会合し、選択が行われる前の一過性の段階が CD69⁺TCR β ^{int} (分画 2) である。そして正の選択を受けた直後の細胞は CD69⁺TCR β ^{hi} (分画 3) に位置し、さらに成熟が進むと CD69⁻TCR β ^{hi} (分画 4) へと移行する。(以上の様に 1→2→3→4 の順に成熟段階が進んでいく様子をイラストに表した。) TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスでは WT マウスと同様に CD4⁺CD8^{low}、CD4SP、CD8SP 胸腺細胞で、正の選択を受けた CD69⁺TCR β ^{hi} (分画 3) 及び CD69⁻TCR β ^{hi} (分画 4) に位置する細胞の存在が確認された。また、それらの正の選択を正常に受けた TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウス胸腺細胞は WT マウスと匹敵する TCR β 鎖の発現量を示していた。n = 3. 独立した 3 回の実験で同様の結果が得られた。

3-7 TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの末梢に於ける成熟 T 細胞

TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの T 細胞は正常に胸腺に於ける分化成熟を経る事が確認されたので、次に成熟し末梢へ遊走した T 細胞について解析した。末梢血由来の細胞を TCR β 鎖 (H57) と TCR $\gamma\delta$ 鎖の発現パターンで分画したところ、WT マウスでは TCR β 鎖⁺の $\alpha\beta$ T 細胞が $\gamma\delta$ T 細胞を上回る割合で存在する事が確認された一方で、TCR $\alpha^{-/-}$ マウスは殆ど全ての $\alpha\beta$ T 細胞を欠損しており、これに起因した $\gamma\delta$ T 細胞の増加が確認された (図 12A 上段) [25]。しかし TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは WT マウスと比較すると減少傾向にはあるが、今回同定した TCR α 鎖 β 鎖の導入により確かな $\alpha\beta$ T 細胞集団の存在が確認された。また、その様な $\alpha\beta$ T 細胞の出現に伴い TCR $\alpha^{-/-}$ マウスで見られた $\gamma\delta$ T 細胞の増加も抑制されていた (図 12A 上段)。次に $\alpha\beta$ T 細胞の内、CD4T 細胞と CD8T 細胞の割合を検証したところ、まず TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスに於いても CD4T 細胞と CD8T 細胞の両サブタイプが存在する事が確認された (図 12A 下段)。そして、通常は WT マウスで見られるように CD4T 細胞が CD8T 細胞より高い比率で存在するのに対し、TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスではその比率が逆転しており CD8T 細胞の割合が CD4T 細胞を上回る事が明らかとなった。さらに CD4T 細胞と CD8T 細胞に於ける導入 TCR β 鎖の発現を検証したところ、殆ど全ての細胞が導入 TCR β 鎖を発現している事が確認できた。しかし予期せぬことに、当初 TCR-TG/TCR $\alpha^{+/+}$ マウスで確認された WT マウスと同程度の TCR β 鎖の発現量は見られず、CD4T 細胞と CD8T 細胞共に殆

ど全ての細胞で導入 TCR β 鎖の発現量が著しく低下している事が明らかとなった (図 12B)。同時に、依然として WT マウスと同程度の発現量を保っている細胞も僅かながら確認された。

A)



B)

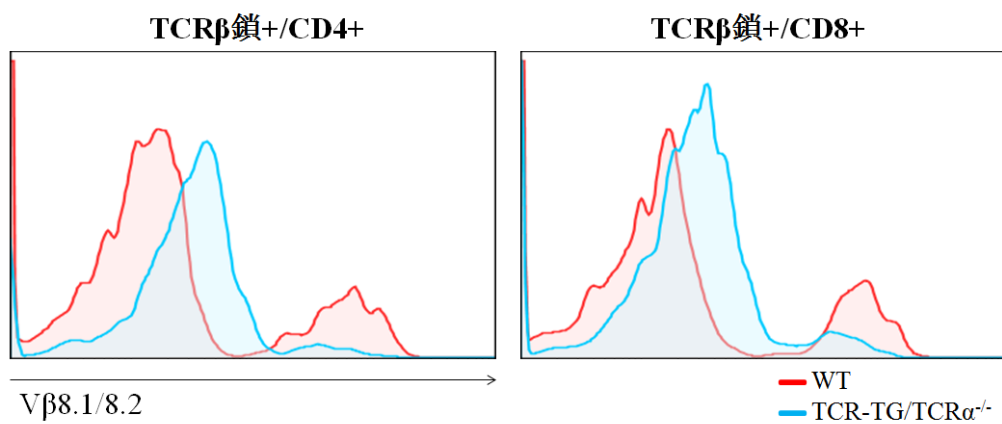


図 12. TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの末梢に於ける成熟 T 細胞

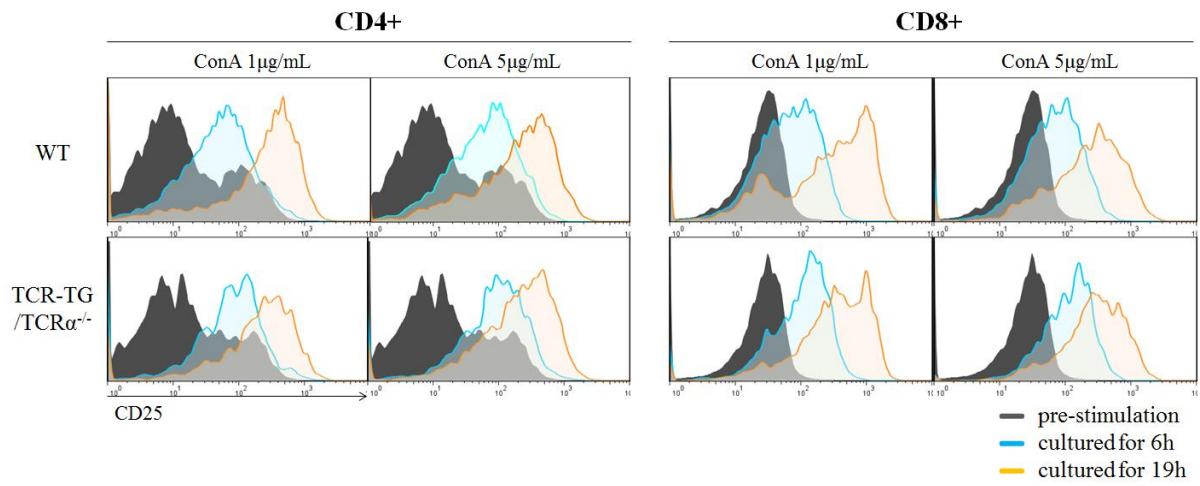
TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウス T 細胞は胸腺に於ける分化成熟を正常に経る事が確認された為、成熟 T 細胞について末梢血を用いてフローサイトメトリーにより解析した。**A)** TCR β 鎖 (H57) と TCR $\gamma\delta$ の発現パターンにより $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞の比率について検証したところ、TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは $\alpha\beta$ T 細胞の欠損に起因して $\gamma\delta$ T 細胞の増加が確認された [25]。これに対し TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは $\alpha\beta$ T 細胞の割合が回復し、それに伴い $\gamma\delta$ T 細胞の増加が抑制された。さらに $\alpha\beta$ T 細胞の内、CD4T 細胞と CD8T 細胞の比率を検証したところ、WT マウスでは CD4T 細胞が CD8T 細胞の 1.5~2 倍近く存在するのに対し、TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスではそれが逆転しており CD8T 細胞が CD4T 細胞を上回る割合で存在する事が確認された。**B)** $\alpha\beta$ T 細胞の内、CD4T 細胞と CD8T 細胞の両サブタイプに於ける導入 TCR β 鎖 (V β 8.2) の発現量を検証した。CD4T 細胞も CD8T 細胞も殆ど全ての細胞が V β 8.1/8.2 を発現している様子が窺えたが、その発現量は非常に低く保たれている事が明らかとなった。また少数ではあるが、WT マウスと同程度の強い発現を示す細胞の存在も確認された。WT; n = 3, TG; n = 5.

3-8 TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウス成熟 T 細胞の応答性

TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウス T 細胞は胸腺に於いて導入 TCR の発現により正常に正の選択を経た後、成熟した CD4T 細胞或いは CD8T 細胞として末梢へと遊走する事が確認された。しかしながら、TCR-TG/TCR α ^{+/+}マウスで見られた導入 TCR β 鎖の発現量が、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスでは著しく低下している事が明らかとなった。そこで発現する TCR レベルの低下により、末梢に存在する成熟 T 細胞が機能不全となっている可能性を検証する為、T 細胞マイトジェンである Concanavalin A (ConA) による汎 T 細胞活性化刺激に対する応答性を解析した。ConA はレクチンであり、T 細胞培養時に加える事で細胞分裂活性、及び細胞生産物の増加を促す事が知られている。この様に抗原非特異的な T 細胞の活性化を強力に促す ConA 存在下で腸間膜リンパ節由来の細胞を一定時間培養後、フローサイトメトリーにより成熟 T 細胞の活性化状態を解析した。その結果、T 細胞活性化マーカーとして知られる IL-2 受容体 α 鎖である CD25 の発現量に変化が見られた (図 13A)。WT マウスも TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスも同様に刺激前の状態では、CD4T 細胞 CD8T 細胞共に大部分の細胞は CD25 を発現していないのに対し、ConA による刺激を与える事で CD25 を発現する細胞の割合増加が確認できた。この CD25 の発現量は刺激持続時間が長い程増強されており、抗原非特異的な強力な汎 T 細胞活性化刺激に対しては TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウス T 細胞も WT マウス T 細胞と同程度に応答する能力がある事が確認された。

況 T 細胞活性化刺激に対する応答性が確認されたので、次に、抗原認識の際に生じる TCR を介した刺激に対しても同様に応答可能であるか否かを検証した。TCR による抗原認識時の状態を模倣する手段としては、抗 CD3 ϵ 抗体を用いた T 細胞の刺激が歴史的に広く用いられている。そこで、腸間膜、腋窩、膝窩リンパ節を採取し、固相化した抗 CD3 ϵ 抗体または抗 TCR β 鎖抗体 (H57) を含有或いは不含有の well 中で一晩培養した。T 細胞は TCR を介した抗原刺激に応答する際に IL-2 を産生する為、回収した培養上清中へ分泌された IL-2 量を ELISA により定量したところ、固相化された抗体濃度すなわち刺激強度に依存して産生された IL-2 量も増加している事が明らかとなった (図 13B)。さらに WT マウスの T 細胞と比較して TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの T 細胞は産生する IL-2 量が非常に多い事から、抗原刺激に対してより強い応答性を示す事が示唆された。以上の結果から、TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの T 細胞は TCR 発現レベルが非常に低く制御されているにも係らず依然として抗原認識に対して応答する能力を保持し、さらにその程度は刺激強度に依存している事が明らかとなった。

A)



B)

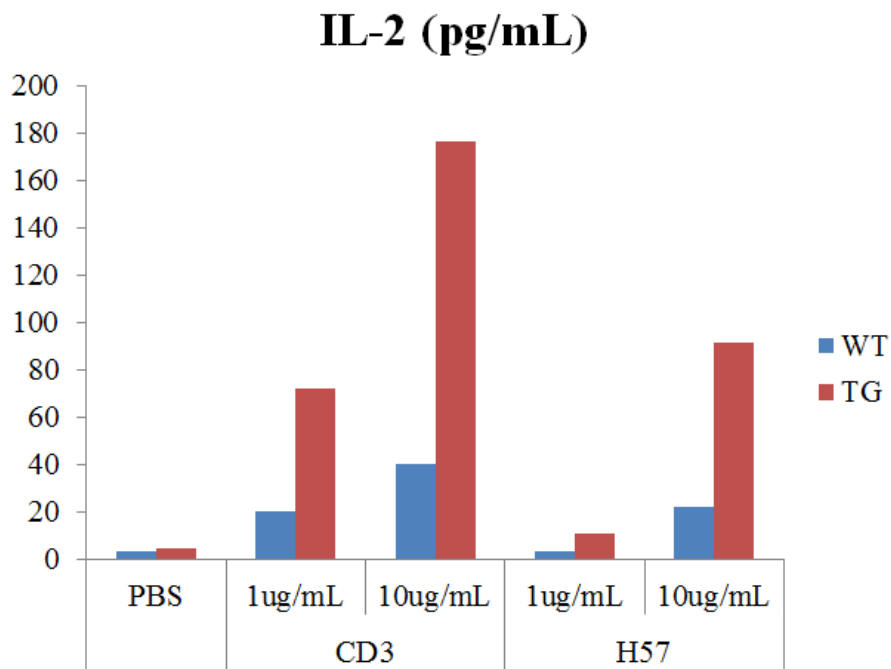


図 13. TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウス T 細胞の *in vitro* 活性化実験

TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスでは、胸腺に於ける成熟を経て末梢へ遊走した成熟 T 細胞は TCR の発現量が非常に低く制御されている事が示された。その様な低い TCR 発現レベルにより T 細胞が機能不全となっている可能性を検証する為、*in vitro* 活性化実験を行った。A) T 細胞分裂促進物質である ConA を用いて汎 T 細胞活性化刺激を腸間膜リンパ節由来の細胞に与え、フローサイトメトリーにより成熟 T 細胞の活性化状況を解析した。T 細胞の活性化マーカーである IL-2 受容体 α 鎖 (CD25) の発現レベルを比較したところ、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウス T 細胞も WT マウス T 細胞も、刺激前は大部分の細胞で CD25 の発現が認められないのに対し、ConA 刺激により CD25 を発現する細胞の割合に増加が見られた。同時に、CD25 の発現量は刺激持続時間が長いほど増加しており、刺激強度に依存して活性化されている事が示された。また CD4T 細胞と CD8T 細胞は共に同程度の活性化応答を示し、さらに TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウス T 細胞と WT マウス T 細胞間に於いてもこれらの汎 T 細胞活性化刺激に対する反応性に差異は認められなかった。B) 汎 T 細胞活性化刺激に対する応答性が確認できたので、次に TCR を介した刺激によっても同様に応答可能であるか否かを検証する為、TCR 刺激を模倣した刺激として抗 CD3 ϵ 抗体と抗 TCR β 鎖抗体 (H57) を用いた。T 細胞は抗原刺激に応答する際に IL-2 を産生する為、成熟 T 細胞を多く含むリンパ節由来の細胞集団を各抗体存在下或いは非存在下で一晩培養した後、培養上清中へ分泌された IL-2 量を ELISA により定量した。その結果、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウス T 細胞も WT マウス T 細胞と同様に TCR を介した刺激に応答することが明らかとなった。さらに IL-2 分泌量は抗体濃度が高いほど多く、A) の汎 T 細胞活性化刺激を用いた場合と一致して、刺激強度に依存した反応性を示す結果となった。従って、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウス T 細胞は TCR 発現レベルが著しく低下しているにも係らず、依然として TCR 刺激に対する反応性を保持している事が明らかとなった。IL-2 ELISA は独立した 3 回の実験により同様の結果を得た。

第 4 章

考察

4-1 はじめに

今回我々は、肥満進行過程の脂肪組織浸潤 T 細胞を継時的に解析する事で肥満脂肪組織炎症との関与が疑われる特定の T 細胞を見出した。さらにそれらの T 細胞についてシングルセルレベルで TCR α 鎖 β 鎖のシーケンス解析を行ったところ、同一の CDR3 を持つ T 細胞の存在が明らかとなった。この結果は、T 細胞がクローン増殖した事を意味するものであり、すなわち特異的な T 細胞の活性化とそれに起因した T 細胞依存性免疫応答の発生を示唆する。HFD 負荷後 4 週目の時点で既に脂肪組織浸潤 T 細胞数に増加は見られるが、TCR のレパートリーは多様性に富んでいることから、この時点では未だ抗原が曝露されていない事が窺える。従って、肥満した脂肪組織或いはマクロファージなどの細胞により分泌された走化性因子により抗原非特異的に誘導されたものと思われる。そして、HFD 負荷後 9 週目という肥満進行の特定の段階に達した時に脂肪組織中で曝露される特定の抗原が存在する為、それらを認識する V α 5T 細胞の活性化及びクローン増殖が生じたものと考えた。HFD 負荷後 12 週目になると再び TCR のレパートリーに多様性が現れたが、これは活性化した V α 5T 細胞が引き起こすと推測される適応免疫応答により 2 次的に様々な TCR を発現した T 細

胞が誘導された結果であると思われた。

4-2 V α 5T 細胞の同定に関して

今回、V α 5T 細胞の TCR を確定する為、シングルセルソーティング後 TCR のシーケンス解析を行ったが、RT-PCR により TCR を増幅できたサンプル数が想定していたよりも少なかった。通常シングルセルソーティングを行う場合、96 well プレートの 1 well に対して 200 μ l のバッファーを分注して行う場合が多いが、今回はその後 RT-PCR を行う事を鑑みて、鑄型濃度を出来る限り濃く保つ為に 1 well につき 20 μ l の RNA 抽出バッファーを分注してソーティングを行った。ソーティング後、先ず細胞の有無と cDNA 合成の確認をハウスキーピング遺伝子の nested-PCR により行ったが、バンドが検出できた数は 1 プレートにつき 20 サンプル前後という結果であった。おそらく多くの細胞がソーティング時にバッファー中へ回収されず、プレート壁に当たってしまった事が原因として考えられる。しかし、シングルセル解析により同定された TCR は、最初に行ったバルク解析によっても HFD を 9 週間与えたマウスでのみ確認出来た。以上の様に HFD を 9 週間負荷したグループでのみ複数の個体から同一の TCR 配列が確認出来た事から、V α 5T 細胞が脂肪組織炎症と関わる T 細胞である信憑性は高いものと思われた。さらに今回の結果を支持するものとして、2009 年に Winer らのグループから肥満に伴う脂肪組織浸潤 T 細胞の発現する TCR レポートリー

の変化に関して、同様に V α 5 の増加が報告されている[16]。これに加えて、同時に報告された V α 3 (TRAV9) の減少も本研究によって再現が取れている (図 7B)。以上の事からも今回得られた結果は信頼できるものと判断し、V α 5T 細胞に焦点を当て以降の実験を進めた次第である。

4-3 TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスが持つ V α 5T 細胞の胸腺に於ける分化成熟に関して

同定した TCR α 鎖 β 鎖を発現する TCR-TG マウスを作製し、内因性の TCR α 鎖の影響を排除する為、TCR α ^{-/-}マウスと交配した。なお β 鎖に関しては厳密に対立遺伝子排除が行われる為、殆ど全ての細胞が導入した β 鎖のみを発現しているものと考えられる。そして、得られた TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスの胸腺に於ける T 細胞の成熟について検証したところ、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスが持つ V α 5T 細胞は CD4T 細胞と CD8T 細胞の双方へと正常に分化成熟する事が確認された。通常、胸腺での選択過程に於いて、MHC クラス I 分子と共にペプチドを認識し正の選択を受けた DP 胸腺細胞は CD8SP 胸腺細胞へと分化し、MHC クラス II 分子と共にペプチドを認識し正の選択を受けた DP 胸腺細胞は CD4SP 胸腺細胞へと分化する。その為、成熟した $\alpha\beta$ T 細胞は認識可能な MHC に対応した片方の補助受容体のみを発現するが、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスの V α 5T 細胞にはこの様な MHC 拘束性が見られない。この点については、3つの可能性が挙げられる。1つは、今回同定した TCR が MHC クラス I、クラス II のどちらに提

示された抗原でも認識可能である場合だ。この場合 CD4SP 胸腺細胞が WT マウスと比較して非常に少ない事を考えると、MHC クラス I - 抗原複合体との結合力がより正の選択に適していると推定される。しかし一方で、CD69⁺TCRβ^{hi} から CD69⁻TCRβ^{hi} を示す分画の割合について WT マウスと比較すると、CD4SP 胸腺細胞と同様に CD8SP 胸腺細胞も少ない。その為、TCR-TG/TCRα^{-/-}マウス T 細胞は胸腺に於ける正の選択で障害を受けている、或いは負の選択を受けている可能性も考える必要があるだろう。何故なら、第一に今回同定した T 細胞は肥満脂肪組織への特異的な浸潤増加を示す事から、自己反応性と考えられる為である。さらに負の選択が生じる段階は一定ではなく、DP 段階の場合や SP 段階の場合等、TCR が認識する抗原が提示される場所（皮質か髄質か）により異なる事が知られている事も理由として挙げられる[53]。2 つ目は、本来ならば CD4T 細胞として成熟すべき胸腺細胞の減少による影響が考えられる。その理由として、CD4T 細胞へと分化する事が知られている TCRαβTG マウスを用いた先行研究により、TCRαβTG マウス由来の骨髄と TCRα^{-/-}マウス由来の骨髄を混合して移植した場合に、その混合比率に応じて T 細胞の分化系統に変化が見られると報告されている事が挙げられる [54]。すなわち正常に分化が進まない胸腺細胞の存在下では TCRαβTG マウス由来 MHC クラス II 拘束性の胸腺細胞が CD8SP として成熟する事が示されており、作製した TCR-TG/TCRα^{-/-}マウスでは CD4T 細胞の分化成熟が障害を受けている為に、同様の現象が生じた可能性がある。その場合、TCR-TG/TCRα^{-/-}

マウスの CD8T 細胞に関しては、本来 WT マウスで見られる細胞傷害性 $\alpha\beta$ T 細胞とは異なる性質を持つ可能性がある。しかしながら *in vitro* T 細胞活性化実験で示された通り CD8T 細胞も CD4T 細胞と同様に活性化され、また TCR 発現レベルに於いても CD4T 細胞と匹敵する低発現を示している。これらの結果を踏まえると、導入した TCR が MHC 拘束性を受けない非常に稀な例である可能性が高いと言えるだろう。そして 3 つ目に、ヘルパー CD4T 細胞と細胞傷害性 CD8T 細胞以外の別の分化系統である、NKT 細胞の一種である可能性についても検討する必要があるだろう。NKT 細胞は CD1d 分子によって提示された抗原を認識する為、CD4 と CD8 それぞれを発現する可能性は否定できない。そしてもう一つ NKT 細胞として考えられる理由は、CD1d に提示される抗原として糖脂質が知られている為である。V α 5T 細胞は肥満脂肪組織への浸潤増加が見られる T 細胞であるから、特異的に認識すると思われる抗原は先述した様に脂肪組織に局在すると推測される。従って、CD1d に提示される性質の抗原である可能性が高いと考えられた。

さて、今回 TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでも WT マウスと匹敵する CD8SP 胸腺細胞の存在が確認されたのは、おそらく $\gamma\delta$ T 細胞の増加に起因するものと思われるが、CD8 の発現レベルがやや低い集団が増加している様子から immature SP (ISP) 胸腺細胞の増加も疑われる。ISP 細胞とは DN 胸腺細胞が DP 胸腺細胞へと移行する際に、CD8 が CD4 よりも先に発現する為に生じる一過性の段階であり、正の選択を受けた後に現れる

CD8SP 胸腺細胞よりも CD8 発現レベルが弱い事が知られている。TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは機能的 TCR α 鎖が産生されない為、DP 胸腺細胞以降の段階への成熟が阻害されるが、ISP から DP の段階への移行に影響が現れるのかは不明である。

4-4 V α 5T 細胞が置かれる免疫寛容状態に関して

内因性の TCR α 鎖の影響を排除する為に TCR $\alpha^{-/-}$ バックグラウンドにしたところ、予期せぬことに、当初 TCR-TG/TCR $\alpha^{+/+}$ マウスで確認された成熟 T 細胞表面に於ける導入 TCR β 鎖の高発現が、著しい低下を示した。おそらく TCR-TG/TCR $\alpha^{+/+}$ マウスで見られた TCR β 鎖の高発現は、内因性 TCR α 鎖と会合していたことに起因するものと思われる。では何故、ほぼ完全に導入した V α 5 を含む α 鎖と V β 8.2 を含む β 鎖のみを持つ T 細胞となることで TCR 発現レベルが減少するのかという問題に対しては、導入した TCR が自己反応性である事が原因として考えられる。

今回確認された TCR 発現レベルの低下と同様の表現型は、これまでも組織特異的抗原を認識する T 細胞を持つ TCR-TG マウスモデルを用いたいくつかの先行研究により示されている[55, 56]。まず、ニワトリ卵リゾチーム (hen egg lysozyme: HEL) を抗原として、甲状腺上皮または膵臓ランゲルハンス島 β 細胞特異的に、或いは全身的に発現させ、それぞれの場合に HEL 特異的な TCR を発現する T 細胞の性質を解析した先行研究によると、HEL の発現パターンに依存して誘導される免疫寛容のレベル

に幅がある事が報告されている [55]。それによると抗原である HEL が局所的に発現される場合と比較して全身的に発現する場合では、負の選択がより厳密に生じ、胸腺に於ける DP 胸腺細胞の顕著な減少が示されている。また負の選択を回避した成熟 CD4T 細胞に於いては、HEL の発現量が多い程 TCR の発現レベルに減少が見られ、さらにそれらの TCR 刺激に対する応答性は TCR の発現レベルに依存している事も示されている。別のグループからも、human complement reactive protein (CRP) を抗原として肝臓で特異的に発現させるモデルを用いた実験で、局所的な抗原の存在により CD8T 細胞に於いて同様に TCR レベルの低下が引き起こされる事が報告されている [56]。これらの知見から、今回我々が作製した TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスの T 細胞で TCR レベルの顕著な低下が見られたのは、免疫寛容が誘導された事に起因すると考えられる。しかしながら今回作製した TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスの場合、in vitro の T 細胞活性化実験の結果に示される様に、依然として TCR 刺激に対する十分な応答性を保持している。これに対し、全身で HEL の発現が誘導されたモデルでは非常に強力に免疫寛容が誘導されている為に、さらに高濃度の抗原が局所的に存在しても免疫寛容は破綻しないが、一方で局所的に HEL を高濃度で発現したモデルでは抗原を発現する標的組織に於ける T 細胞の浸潤と共に B 細胞やマクロファージの活性化の様相が観察されている [55]。従って、TCR-TG/TCR α ^{-/-}マウスの T 細胞は局所的に存在する自己抗原を認識する為に比較的弱い免疫寛容状態に置かれており、それ故依然として免疫応

答を示すと考えられた。それは同時に、当初想定していた肥満脂肪組織由来の特異的な抗原を認識している可能性を支持する結果であると言える。

では、実際に免疫寛容機構によって負の選択及び TCR レベルの低下が引き起こされているのかを検証する方法の一つとして、自己免疫制御因子 (autoimmune regulator: Aire) 欠損による変化をみる事が挙げられる。Aire は転写調節因子であり、胸腺に於ける他の臓器特異的な自己抗原の発現誘導を一部担っているとされる。その性質上、Aire を欠損したマウスでは一部の臓器特異的な自己抗原に対する免疫寛容が障害される結果、いくつもの臓器が侵される広範囲に及ぶ自己免疫疾患を発症する。この様な Aire を、上述した HEL 抗原と HEL 特異的 TCR を共に発現するマウスモデルで欠損した場合、胸腺で成熟する T 細胞数の減少が回復され、さらに TCR 発現レベルにも上昇がみられたとの報告がある [57]。また、末梢に於ける免疫寛容の獲得機構に関しては、抗原提示細胞とは別の胸腺外に存在する Aire 発現細胞が重要な働きをする事が報告されている [58]。それによると Aire 発現細胞は CD4T 細胞に対し補助刺激因子 B-7 の刺激を欠損した状態下で抗原提示を行う事で不活性型へと制御する事が示されており、今回 TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスで観察された末梢へ遊走した T 細胞の TCR 発現量の低下と何らかの関連がある可能性が考えられる。未だ Aire によって免疫寛容が誘導されるメカニズムについては完全には分かっていないが、我々が作製した TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスで Aire を欠損した場合に、同様の成熟 T 細胞数及び TCR 発現

レベルの増加が観察されたならば、免疫寛容機構により負の選択と TCR 発現の抑制が生じていると立証できるだろう。

一方で別の先行研究によると、末梢へ遊走した後に CD4T 細胞が 6 カ月以上の長期に亘って生存する為には、TCR と MHC クラス II 分子との微弱な相互作用が必要とされる事が示されている [59]。TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの場合、CD4T 細胞は末梢へ輸送した後に TCR レベルが低く制御されている事から、MHC クラス II 分子との相互作用から受ける TCR を介した刺激が減少する事が推測される。従って、自己反応性 T 細胞の TCR レベルを抑制し T 細胞の生存を妨げる事で、末梢免疫寛容が確立されている可能性も否定はできない。しかし、この場合 CD8T 細胞のこれに相当する機構の有無等を解明する必要があるだろう。

4-5 作製した TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスのモデル動物としての有用性に関して

今回、本研究では肥満に伴う脂肪組織への浸潤増加を示す T 細胞の 1 種である V α 5T 細胞を同定し、TCR-TG マウスを作製した。肥満脂肪組織に於ける V α 5T 細胞の作用に関しては今後の解析が必須であるが、先行研究で示される様に炎症を亢進する働きを持つとすれば、脂肪組織炎症から 2 型糖尿病発症までの進行が劇的に促進されるものと期待される。一方、炎症惹起の時期は抗原の曝露される時期に依存すると考えられる為、やはりある程度肥満が進行した段階から生じる事が予想される。この

様な肥満脂肪組織内への劇的な T 細胞の浸潤及び活性化を確認した後は、この TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの T 細胞は肥満脂肪組織内に存在する特定の抗原を同定する上で非常に有用なツールとなると考えられる。

また、本来ならば胸腺に於ける中枢性の免疫寛容で除去、或いは制御性 T 細胞へと転換されなかった自己応答性の T 細胞は、末梢に於いて制御性 T 細胞へと転換されるか Anergy として知られる免疫不応答状態におかれる。しかし TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの V α 5T 細胞は自己反応性である事が推測されるにも係らず、胸腺に於ける負の選択を回避し、制御性 T 細胞への転換も生じない (図 11)。その上、依然として TCR を介する刺激に対して応答性を保持しており、WT マウスの T 細胞と比較しても非常に強い応答を示す事が明らかとなった (図 13B)。これらの事から、先述した様に TCR の発現量を低く制御する事で Anergy とは異なる一種の免疫寛容を獲得している可能性が考えられた。従って、末梢へ遊走した後に TCR 発現量が抑制される機構について TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスを用いた解析を進める事で、免疫寛容機構の観点から有益な知見を得られるものと期待する。

第 5 章

総括

今回、自己免疫疾患の側面から 2 型糖尿病をとらえ、2 型糖尿病モデルマウスの作製を試みた。肥満脂肪組織へ浸潤する T 細胞の解析及び、作製した TCR-TG マウスの解析の結果以下の事が分かった。

1. 肥満進行の特定の時期に見られる脂肪組織への V α 5T 細胞の浸潤増加は、クローン増殖の結果を反映するものであった。
2. 作製した TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの V α 5T 細胞は胸腺に於ける正の選択を受け、CD4T 細胞、CD8T 細胞双方へと分化成熟が可能であった。
3. 胸腺での成熟を経て末梢へと遊走した成熟 V α 5T 細胞は、TCR 発現レベルが非常に低く制御されていた。
4. V α 5T 細胞は TCR 発現レベルの著しい低下が見られるにも係らず、依然として TCR を介した刺激に対する応答性を保持しており、WT マウス T 細胞と比較しても非常に強い応答を示した。

以上の結果から、作製した TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスは肥満脂肪組織炎症の全容解明のみならず、免疫寛容機構の研究に於いても有用なモデルとなる事が期待される。

第 6 章

参考文献

1. Suganami T. and Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *Journal of Leukocyte Biology* 88: 33–39. (2010)
2. Hotamisligil G. S, Shargill N. S. and Spiegelman B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87–91. (1993)
3. Hotamisligil G. S, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White M. F. and Spiegelman B. M. IRS-1—mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α —and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271: 665–668. (1996)
4. Thorens B. and Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 298: E141–145. (2010)
5. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K. and Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of Clinical Investigation* 116: 1494–1505. (2006)
6. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R. and Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissue causes macrophage recruitment and insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 26602–26614. (2006)
7. Shi H, Kokoeva M. V, Inouye K, Tzameli I, Yin H. and Flier J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 116: 3015–3025. (2006)
8. Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y. and Ogawa Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27: 84-91. (2007)
9. Nguyen T. M. A, Favellyukis S, Nguyen A, Reichart D, Scott P. A, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass C. K, Neels J. G. and Olefsky J. M. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2

- and 4 and JNK-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 35279–35292. (2007)
10. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T. and Nagai R. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* 15: 914–920. (2009)
 11. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine B. A, Benoist C, Shoelson S. and Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine* 15: 930–939. (2009)
 12. Zúñiga A. L, Shen J. W, Joyce-Shaikh B, Pyatnova A. E, Richards G. A, Thom C, Andrade M. S, Cua J. D, Kraemer B. F. and Butcher C. E. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *The Journal of Immunology* 185: 6947–6959. (2010)
 13. Cheng X, Wang J, Xia N, Yan X. X, Tang T. T, Chen H, Zhang H. J, Liu J, Kong W, Sjöberg S, Folco E, Libby P, Liao Y. H. and Shi G. P. A guanidine-rich regulatory oligodeoxynucleotide improves type-2 diabetes in obese mice by blocking T-cell differentiation. *The EMBO Molecular Medicine* 4: 1112–1125. (2012)
 14. Zeyda M, Huber J, Prager G. and Stulnig M. T. Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity* 19: 743–748. (2011)
 15. Deng T, Lyon C. J, Minze L. J, Lin J, Zou J, Liu Z. J, Ren Y, Yin Z, Hamilton D. J, Reardon P. R, Sherman V, Wang H. Y, Phillips K. J, Webb P, Wong S. C. T, Wang R and Hsueh W. A. Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. *Cell Metabolism* 17: 411–422. (2013)
 16. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker D. J, Engleman E, Winer D. and Dosch H. M. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature Medicine* 15: 921–929. (2009)
 17. Ilan Y, Maron R, Tukpah A. M, Maioli T. U, Murugaiyan G, Yang K, Wu H. Y. and Weiner H. L. Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9765–9770. (2010)
 18. Yang H, Youm Y, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble J. M, Greenway F, Stephens J. M, Mynatt R. L. and Dixit V. D. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: Implication for systemic inflammation and insulin resistance. *The Journal of Immunology* 185: 1836–1845. (2010)

19. Haskins K, Portas M, Bradley B, Wegmann D. and Lafferty K. T-lymphocyte clone specific for pancreatic islet antigen. *Diabetes* 37: 1444–1448. (1988)
20. Haskins K, Portas M, Bergman B, Lafferty K. and Bradley B. Pancreatic islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 8000–8004. (1989)
21. Haskins K. and McDuffie M. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4⁺ islet-specific T cell clone. *Science* 249: 1433–1436. (1990)
22. Candeias S, Katz J, Benoist C, Mathis D. and Haskins K. Islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice express heterogeneous T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 6167–6170. (1991)
23. Katz J. D, Wang B, Haskins K, Benoist C. and Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 74: 1089–1100. (1993)
24. Lafaille J. J. T-cell receptor transgenic mice in the study of autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* 22: 95–106. (2004)
25. Mombaerts P, Clarke A. R, Rudnicki M. A, Iacomini J, Itohara S, Lafaille J. J, Wang L, Ichikawa Y, Jaenisch R, Hooper M. L. and Tonegawa S. Mutations in T-cell antigen receptor genes α and β block thymocyte development at different stages. *Nature* 360: 225–231. (1992)
26. Kurokawa M, Furukawa H, Yabe T, Matsui T, Toda M, Hamada C, Kasukawa R, Yamamoto K, Nishioka K. and Kato T. Frequency of clonally expanded T cells evaluated by PCR from a single cell. *Journal of Immunological Method* 224: 203–208. (1999)
27. Zhumabekov T, Corbella P, Tolaini M. and Kioussis D. Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *Journal of Immunological Method* 185: 133–140. (1995)
28. Holst J, Szymczak-Workman A. L, Vignali K. M, Burton A. R, Workman C. J. and Vignali D. A. A. Generation of T-cell receptor retrogenic mice. *Nature Protocols* 1: 406–417. (2006)
29. Holst J, Vignali K. M, Burton A. R. and Vignali D. A. A. Rapid analysis of T-cell selection *in vivo* using T cell-receptor retrogenic mice. *Nature Methods* 3: 191–197. (2006)
30. Letourneur⁺ F. and Malissen B. Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor α and β chain transcripts reveals a nonfunctional α -mRNA of BW5147 origin*. *European Journal of Immunology* 19: 2269–2274. (1989)
31. Suwit S. R, Feinglos N. M, Rodin J, Sutherland A, Petro E. A, Opara C. E, Kuhn M. C. and Rebuffe-Scrive M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 44: 645–651. (1995)
32. Prpic V, Watson M. P, Frampton C. I, Sabol A. M, Jezek E. G. and Gettys W. T. Adaptive

- changes in adipocyte gene expression differ in AKR/J and SWR/J mice during diet-induced obesity. *The Journal of Nutrition* 132: 3325–3332. (2002)
33. Rossmeisl M, Rim S. J, Koza A. R. and Kozak P. L. Variation in type 2 diabetes-related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes* 52: 1958–1966. (2003)
 34. 上塚浩司、西川知美 マウスを使った高脂肪食給餌による肥満の実験モデル系の開発 日生研たより 55: 5–10. (2009)
 35. Winer D. A, Winer S, Shen L, Wadia P. P, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson M. G, Alonso M. N, Leong H. X, Glassford A, Caimol M, Kenkel J. A, Tedder T. F, McLaughlin T, Miklos D. B, Dosch H-M. and Engleman E. G. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nature Medicine* 17: 610–617. (2011)
 36. Lynch L, Nowak M, Varghese B, Clark J, Hogan A. E, Toxavidis V, Balk S. P, O’Shea D, O’Farrelly C. and Exley M. A. Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37: 574–587. (2012)
 37. Wu L, Parekh V. V, Gabriel C. L, Bracy D. P, Marks-Shulman P. A, Tamboli R. A, Kim S, Mendez-Fernandez Y. V, Besra G. S, Lomenick P. Jefferson, Williams B, Wasserman D. H. and Kaer L. V. Activation of invariant natural killer T cells by lipid excess promotes tissue inflammation, insulin resistance, and hepatic steatosis in obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: E1143–E1152. (2012)
 38. Wu D, Molofsky A. B, Liang H, Ricardo-Gonzalez R. R, Jouihan H. A, Bando J. K, Chawla A. and Locksley R. M. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 8: 243–247. (2011)
 39. Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N. and Levy R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *Journal of Lipid Research* 49: 1894–1903. (2008)
 40. Talukdar S, Oh D. Y, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y, Ofresio J, Lin M, Brenner M. B. and Olefsky J. M. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nature Medicine* 18: 1407–1412. (2012)
 41. Orr J. S, Kennedy A. J, Hasty A. H. Isolation of adipose tissue immune cells. *Journal of Visualized Experiments* 75: e50707, doi: 10. 3791/50707. (2013)
 42. Szymczak A. L. and Vignali D. A. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opinion on Biological Therapy* 5: 627–638. (2005)
 43. Huseby E. S, Sather B, Huseby P. G. and Goverman J. Age-dependent T cell tolerance

- and autoimmunity to myelin basic protein. *Immunity* 14: 471–481. (2001)
44. Kamoun M, Martin P. J, Hansen J. A, Brown M. A, Siadak A. W. and Nowinski R. C. Identification of a human T lymphocyte surface protein associated with the E-rosette receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 153: 207–212. (1981)
 45. Lang G, Wotton D, Owen M. J, Sewell W, Brown M. H, Mason D. Y, Crumpton M. J. and Kioussis D. The structure of the human CD2 gene and its expression in transgenic mice. *The EMBO Journal* 7: 1675–1682. (1988)
 46. Liu G. Y, Fairchild P. J, Smith R. M, Prowle J. R, Kioussis D. and Wraith D. C. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* 3: 407–415. (1995)
 47. Allen J. M, Forbush K. A. and Perlmutter R. M. Functional dissection of *lck* proximal promoter. *Molecular and Cellular Biology* 12: 2758–2768. (1992)
 48. Miyazaki T. Two distinct step during thymocyte maturation from CD4⁻CD8⁻ to CD4⁺CD8⁺ distinguished in the Early Growth Response (Egr)-1 transgenic mice with a recombinase-activating gene – deficient background. *The Journal of Experimental Medicine* 186: 877–885. (1997)
 49. Miyazaki T. and Lemonnier F. A. Modulation of thymic selection by expression of an immediate-early gene, Early Growth Response 1(Egr-1). *The Journal of Experimental Medicine* 188: 715–723. (1998)
 50. Nikolić-Žugić J, Andjelić S, Teh H.-S. and Jain N. The influence of rearranged T cell receptor $\alpha\beta$ transgene on early thymocyte development*. *European Journal of Immunology* 23: 1699–1704. (1993)
 51. Lacorazza H. D, Tuček-Szabo C, Vasović L. V, Remus K. and Nikolich-Žugich J. Premature TCR $\alpha\beta$ expression and signaling in early thymocytes impair thymocyte expansion and partially block their development. *The Journal of Immunology* 166: 3184–3193. (2001)
 52. Hu Q, Nicol S. A, Suen A. Y. W. Baldwin T. A. Examination of thymic positive and negative selection by flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments* 68: e4269, doi: 10.3791/4269. (2012)
 53. Starr T. K, Jameson S. C. and Hogquist K. A. Positive and negative selection of T cells. *Annual Review of Immunology* 21: 139–176. (2003)
 54. Canelles M, Park M. L, Schwartz O. M. and Fowlkes B. J. The influence of the thymic environment on the CD4-versus-CD8 T lineage decision. *Nature Immunology* 4: 756–764. (2003)
 55. Akkaraju S, Ho W. Y, Leong D, Canaan K, Davis M. M. and Goodnow C. C. A range of CD4 T cell tolerance: Partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity* 7: 255–271. (1997)

56. Ferber I, Schönrich G, Schenkel J, Mellor A. L, Hämmerling G. J, Arnold B. Level of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 263: 674–676. (1994)
57. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L. and Goodnow C. C. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature Immunology* 4: 350–354. (2003)
58. Gardner J. M, Metzger T. C, McMahon E. J, Au-Yeung B. B, Krawisz A. K, Lu W, Price J. D, Johannes K. P, Satpathy A. T, Murphy K. M, Tarbell K. V, Weiss A. and Anderson M. S. Extrathymic *Aire*-expressing cells are a distinct bone marrow-derived population that induce functional inactivation of CD4⁺ T cells. *Immunity* 39: 560–572. (2013)
59. Takeda S, Rodewald H, Arakawa H, Bluethmann H. and Shimizu T. MHC class II are not required for survival of newly generated CD4⁺ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5: 217–228. (1996)

謝辞

本研究を行うに当たり、ご多忙な中御指導御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科分子病態医科学部門 宮崎徹教授に心より御礼申し上げます。

また日々の研究生活の中で格別の御助言と御支援を頂きました、新井郷子講師、中島克彦助教授（現国立がん研究センター研究所）、に深謝致します。

本研究に於いて中核となるトランスジェニックマウス作製に於きましては、懇切な御指導と御尽力を賜りました熊本大学生命資源研究・支援センター技術開発分野 竹田直樹助教授にこの場を借りて深く御礼申し上げます。

さらに本研究を博士論文としてまとめるに当たり、様々なご厚情、お力添えを頂きました前原奈都美さんをはじめとする本研究室の皆様に謝意を表します。

そして、不肖な私がこの様に研究生活を送る事が出来たのは、偏に、温かく見守り協力してくれた家族の支えがあつての事と思い、心より感謝致します。

最後に、本研究の為に尊い犠牲となった多くのマウスの冥福を祈ると共に、万謝致します。