

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

肥満を基盤とする 2 型糖尿病発症の主因として、脂肪組織内で惹起される炎症によってインスリン抵抗性が誘導される事が知られている。その為、肥満脂肪組織に於ける炎症の発生機序に関して多くの研究が行われ、現在までにマクロファージの関与が明らかにされてきた。脂肪組織中には元々炎症抑制性の M2 型と呼ばれるマクロファージが存在するが、肥満に伴いその数が減少し、反対に炎症亢進性の M1 型と呼ばれるマクロファージの浸潤が増加する。しかしながらマクロファージ以外の免疫細胞を含めた一連の免疫応答を解明する事が、炎症を制御する上で必須である。

近年、適応免疫応答の中核を担う T 細胞の重要性について複数の研究チームから報告されるようになった。マクロファージと同様に、肥満進行に伴い炎症亢進性 T 細胞の肥満脂肪組織への浸潤増加と炎症抑制性 T 細胞の浸潤減少がいくつかの先行研究により報告されている。ところが、相反する結果も報告されており今後の更なる検証が必要とされる。一方で、大変興味深い事に、炎症亢進性 T 細胞か炎症抑制性 T 細胞かに関わらず、肥満脂肪組織に浸潤する T 細胞の発現する T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) に制限が見られるとの研究結果が複数報告されている。TCR は抗原認識に於いて特異性の決定を担うことから、肥満脂肪組織中で曝露される特定の抗原の存在が示唆された。同時に、それらの抗原を認識した T 細胞により T 細胞依存性の適応免疫応答が引き起こされている可能性、すなわち肥満脂肪組織炎症が自己免疫疾患の側面を持つ可能性が推測された。

そこで本研究では自己免疫疾患の観点から、2 型糖尿病発症へと至る肥満脂肪組織炎症を解析する為、肥満脂肪組織への浸潤増加が見られる T 細胞の発現する特異的な TCR の同定を主な目的とした。また、1 型糖尿病や実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE)、関節リウマチ、自己免疫性胃腸炎等の自己免疫疾患モデルとしてこれまでに様々な TCR-トランスジェニック (TG) マウスが作製されてきた歴史を鑑みると、患部に生じる一連の免疫応答を解明する上で TCR-TG マウスが有用である事は明らかである。さらに TCR-TG マウスを用いた解析は適応免疫応答開始に係わる自己抗原の同定をも可能にすると考えられる。この様な理由から、劇的に 2 型糖尿病の進行を呈する新規のモデルマウスとなる事を期待して、今回同定した TCR-TG マウスを作製した。

まず、近年問題となっている肥満が食生活の欧米化による脂質の過剰摂取によるところが大きいと考えられる為、それを模倣するモデルとして高脂肪食負荷による肥満モデルを用いた。雄の C57BL/6JJcl マウスに高脂肪食 (High Fat Diet: HFD) を給餌し、肥満進行に伴う T 細胞の変化を追う為、経時的に脂肪組織浸潤 T 細胞を採取し解析を行った。その結果、肥満進行に伴う T 細胞の脂肪組織への浸潤増加が確認され、CD4T 細胞は一貫して CD8T 細胞よりも優勢を保っている事が確認された。そしてそれらの T 細胞が発現する TCR レパートリーを比較したところ、HFD 負荷後 9 週目でのみ特定の TCR $\alpha$  鎖 (Va5) を発現する細胞の割合が顕著に増加している事を見出した。この様な特定の TCR への集束

傾向は HFD 負荷後 12 週目になると消失し、再び多様性を取り戻していた。さらに HFD 負荷後 9 週目の脾臓中の T 細胞が発現する TCR レパートリーについても同様に解析を行ったが、脂肪組織で見られた程の著しい Va5 への集束は確認されなかった。次に、HFD 負荷後 9 週目に脂肪組織中へ浸潤増加する Va5T 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明らかにする為、シングルセルレベルでシーケンズ解析を行った。その結果、TCR $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖共に相補性決定領域 (Complementarity-Determining Region: CDR) 3 が完全に一致する細胞の存在が確認された。CDR3 は結合部多様性を示す事が知られており、同一の CDR3 配列を持つ Va5T 細胞の存在は、クローン増殖が生じた結果を意味する。以上の事から、Va5T 細胞が肥満脂肪組織で曝露される特定の抗原を認識し、活性化した事が推定された。同時に、HFD 負荷後 12 週目で再び TCR レパートリーに多様性が現れたのは、HFD 負荷後 9 週目に生じた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を反映するものと考えられた。

以上の理由から、Va5T 細胞により誘導されるであろう適応免疫応答が肥満脂肪組織炎症反応と関与する事が疑われた為、体内の殆ど全ての  $\alpha\beta$ T 細胞が Va5T 細胞となる TCR-TG マウスを作製した。TCR-TG マウスの作製には T 細胞特異的に導入遺伝子の発現を誘導する事が知られている CD2 プロモーターを使用した。同定した Va5T 細胞の TCR $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖を同時に受精卵へと注入し、最終的に TCR $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖双方を持つダブル TCR-TG マウスが 14 匹得られた。生存していた 13 匹から末梢血を採取し導入 TCR $\beta$  鎖の発現を検証したところ、殆ど全ての細胞で十分な発現レベルが確認された個体と、導入遺伝子を発現する細胞と発現が見られない細胞を共に持つ個体が確認された。次に導入した TCR $\alpha$  鎖の発現量を検証する為、TCR $\beta$  鎖で十分な発現が確認された個体と一部の細胞で発現が見られなかった個体の末梢血を用いて RT-PCR を行った。その結果、殆ど全ての細胞で十分な TCR $\beta$  鎖の発現が見られた個体でより高い TCR $\alpha$  鎖の発現が確認された事を受け、それらの十分な発現が確認された TCR-TG マウスを以降の実験に用いる事にした。さらに、内因性 TCR $\alpha$  鎖の影響を除去する為、TCR $\alpha^{-/-}$ マウスと交配し TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスを得た。

先ず初めに、得られた TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの胸腺に於ける T 細胞の分化成熟を検証した。その結果、TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは機能的 TCR $\alpha$  鎖の欠損に起因した CD4SP 胸腺細胞の消失が確認されたが、TCR $\alpha$  鎖  $\beta$  鎖が導入された TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは CD4SP 胸腺細胞への成熟が回復傾向にある事が確認された。さらに詳細に胸腺細胞の正の選択について検証する為、CD69 と TCR $\beta$  鎖の発現パターンにより分画を行った。CD69 は T 細胞の活性化マーカーであり、TCR を介した刺激により細胞表面への発現量が上昇する事が知られている。その為、正の選択を正常に受けた胸腺細胞は CD69<sup>+</sup>TCR $\beta$  鎖<sup>hi</sup>を示した後、CD69<sup>+</sup>TCR $\beta$  鎖<sup>hi</sup>を示す事が知られているが、TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスではその様な正の選択を経て成熟が進んでいる細胞の存在を確認する事が出来た。また、それらの細胞は WT マウスと匹敵する TCR $\beta$  鎖の発現量を示す事が分かった。そこで、胸腺から末梢へ遊走した成熟 T 細胞についても末梢血を用いたフローサイトメトリーにより解析を行ったところ、TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは  $\alpha\beta$ T 細胞が殆ど存在しないのに対して、TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは  $\alpha\beta$ T 細胞の割合が回復している事が確認出来た。一方で予期せぬことに、TCR-TG/TCR $\alpha^{+/+}$ マウスで当初確認された導入 TCR $\beta$  鎖の強い発現が TCR-TG/TCR $\alpha^{-/-}$ マウスでは著しい低下を示した。

今回同定した Va5T 細胞は、おそらく肥満脂肪組織中に曝露される特定の抗原を認識する自己免疫

性だと考えられる。その為、免疫寛容機構によって TCR 発現量の低下が引き起こされているのではないかと推測した。もし、免疫寛容機構により TCR 発現レベルが低下しているのであれば、機能不全に陥っている可能性が高いと考え、先ず汎 T 細胞活性化刺激による応答性を検証した。T 細胞の分裂促進因子である Concanavalin A (ConA) を用いて TCR 非依存的な強力な刺激を与えた結果、T 細胞活性化マーカーとして知られる CD25 の発現が上昇する事が確認された。この活性化の程度は WT マウスと匹敵する事が明らかとなり、TCR-TG/TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウス T 細胞は機能不全ではない事が示された。では TCR 刺激に対しても同様に応答可能なのかを検証する為、TCR を介した刺激を模倣する手段として、抗 CD3 $\epsilon$  抗体或いは抗 TCR $\beta$  鎖抗体を用いて刺激を与えた。T 細胞は抗原認識に応答する際に IL-2 を産生する事が知られている為、IL-2 分泌量の変化を検証したところ、TCR-TG/TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウス T 細胞は WT マウス T 細胞と同様に刺激強度に依存した応答を示す事が確認された。さらに TCR-TG/TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウス T 細胞は WT マウス T 細胞と比較してより強い反応性を示す傾向にある事が分かった。従って、TCR-TG/TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウス 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関わらず、依然として TCR を介した刺激に対する十分な応答性を保持しており、抗原認識により免疫応答を開始し得る事が示唆された。

以上の結果から、今回作製した TCR-TG/TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウスは今後の肥満脂肪組織炎症に関する研究において有用なツールとなるだけでなく、免疫寛容機構の観点からも有益な知見を与えてくれるものと期待する。