

二重抗原特異性を示すリンパ球の意義

東京大学大学院医学系研究科 免疫学

新田 剛

研究の背景

T細胞（Tリンパ球）は、T細胞抗原受容体（TCR）を発現し、抗原提示細胞によって提示された抗原ペプチド-MHC（pMHC）を認識して活性化する。TCRによる特異的な抗原認識は、キラーT細胞による感染細胞や腫瘍細胞の排除、ヘルパーT細胞によるB細胞の活性化と特異的抗体の産生などの獲得免疫応答の要であり、T細胞は文字通り、私たちの免疫系の中心的司令塔として機能する。

「1つのリンパ球（T細胞、B細胞）は1種類の抗原受容体を発現する。」この原則は、1細胞1受容体則と呼ばれ、Frank M. Burnetによって提唱された「クローン選択説」の基礎であり、リンパ球が細胞単位で抗原特異的な免疫応答を惹起する現象によって実験的に裏付けられ、現代免疫学における根幹原理のひとつとなっている。一細胞一受容体則は、抗原受容体の遺伝子が片側アレルだけでV(D)J再編成を受けるしくみによって成り立つ。これは対立遺伝子排除（allelic exclusion）と呼ばれ、片側のアレルでV(D)J再編成に成功し機能的な抗原受容体を発現すると反対側のアレルにおける再編成を抑制する機構によって制御されている。しかし、TCR α 鎖については、対立遺伝子排除が不完全であり、両方のTCR α 遺伝子が再編成を受け、1つのT細胞に2種類のTCR α が同時に発現することがある（Padovan et al, Science 1993）。2種類のTCR α は1種類のTCR β と会合し、抗原特異性が異なる2種類のTCR α/β 複合体を形成する。このような2種類のTCRをもつ「dual-TCR T細胞」は、2種類の抗原への免疫応答を示す可能性があり、免疫学の原則から逸脱する存在といえる。

Dual-TCR T細胞は、異なるTCR-V α 鎖に対する抗体を用いたフローサイトメトリーによって検出できる。しかしこの方法では、TCR-V α 鎖の多様性のため、ごく一部のdual-TCR T細胞しか検出できず、dual-TCR T細胞の全体像をとらえてその性質や機能を調べることは不可能であった。Dual-TCR T細胞はその発見以来、大型の研究成果は報告されず、その実態や意義について議論される機会も少なくなっている。とはいえ、dual-TCR T細胞が外来抗原と自己抗原に同時に反応し、自己免疫を引き起こす例が複数報告されており（Ji et al, Nat Immunol 2010; Bradley et al, Cell Host Microbe 2017）、dual-TCR T細胞の実態と生理的意義を解明することは免疫学における課題のひとつである。

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

研究の目的・方法

本研究では、dual-TCR T細胞を検出するためのレポーターマウスを作製し、生体内でのdual-TCR T細胞の頻度や分布の実態を明らかにすることを目的とした。さらに、dual-TCR T細胞において2種類のTCRの細胞表面発現が変化する現象に着目し、その生理的・病理的意義を解明することをめざした。

CRISPR/Cas9ゲノム編集を用いて、TCR α 遺伝子の定常領域（C α 、遺伝子名Trac）に、アレルごとに異なるレポーター遺伝子（ZsGreenまたはhCD2）を2Aペプチドによって連結したノックインマウスを作製した。これらのマウスでは、遺伝子再編成を受けて機能的なTCR α を発現する細胞だけがレポータータンパ

ク質を発現する。レポーターマウス系統どうしを交配し、Trac^{ZsG/hCD2}マウスを作製した。さらに、2種類のTCR α を細胞表面に発現する細胞を検出するため、TCR α 定常領域の細胞外部位にエピトープタグ配列を挿入したマウスを作製した。挿入されたエピトープタグがTCR α の構造に影響することを避けるため、OT-I-TCRのアミノ酸配列と二次構造予測アルゴリズムを用いて最適なエピトープタグの種類と挿入部位を検討した。計算結果にもとづいてエピトープタグを挿入したOT-I-TCRをT細胞株TG40に発現させ、TCRの発現量と抗原ペプチドに対する反応性を指標としてエピトープタグを選抜した。Trac^{ZsG}マウスにエピトープタグXを、Trac^{hCD2}マウスにエピトープタグYを挿入し、得られたマウスどうしを交配してTrac^{ZsG-X/hCD2-Y}マウスを樹立した。

研究成果

Trac^{ZsG}マウスおよびTrac^{hCD2}マウスでは、遺伝子再編成を受けて機能的なTCR α を翻訳している細胞だけがZsGreenまたはhCD2タンパク質を発現する。それぞれのマウスの脾臓T細胞のうち、およそ60%がレポータータンパク質を発現していた。これらのマウス系統どうしを交配し、Trac^{ZsG/hCD2}マウスを作製した。

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

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

Trac^{ZsG/hCD2}マウスを用いて、脾臓、鼠蹊部リンパ節、小腸パイエル板、腸間膜リンパ節のT細胞におけるdual-TCR T細胞を調べた。脾臓、鼠蹊部リンパ節、腸管膜リンパ節ではCD4 T細胞、CD8 T細胞ともにdual-TCR T細胞の頻度は20%前後であった。脾臓のFoxp3⁺制御性T細胞においてはdual-TCR T細胞の頻度がわずかに高い傾向がみられた。

2種類のTCR α を細胞表面に発現する細胞を検出するため、Trac^{ZsG-X/hCD2-Y}マウスを作製した。このマウスでは、ZsGreenアレルのTCR α はXタグ抗体を用いて、hCD2アレルのTCR α はYタグ抗体を用いて検出できることを確認した。脾臓においては、全T細胞のうち約20%がdual-TCR T細胞であり、そのうちおよそ25%(全T細胞の5%)は2種類のTCR α を細胞表面に発現するT細胞であり(ホロdual-TCRと呼ぶ)、残りのおよそ75%は一方のTCR α を細胞表面に出し、もう一方のTCR α を細胞内にとどめているT細胞であった(ヘミdual-TCRと呼ぶ)。

Dual-TCR T細胞に発現する細胞内外のTCRが入れ替わる - すなわち、ヘミdual-TCRとホロdual-TCRの間の遷移は起こりうるのだろうか? これを調べるため、Trac^{ZsG-X/hCD2-Y}マウスの脾臓からヘミdual-TCR T

細胞 (X-ヘミまたはY-ヘミ) をソーティングし、培養する実験を行った。無刺激で培養した場合には、ヘミ dual-TCR T細胞のTCR発現は変化しなかった。しかし、抗CD3抗体を用いてTCR刺激を加えて培養すると、それまで細胞内にとどめられていたTCRが細胞表面に発現し、ホロ dual-TCR T細胞となったものが現れた。すなわち、ヘミ dual-TCR T細胞からホロ dual-TCR T細胞への遷移が確認された。

考察

以上のように、独自に作製したモデルマウスを用いて、生体内における dual-TCR T細胞を検出することに成功した。さらに、 dual-TCR T細胞が発現する2種類のTCRは細胞内／外の局在を変化させうることが明らかになった。

TCR α 鎖については、対立遺伝子排除は起こらず、胸腺におけるT細胞の分化段階のうちCD4⁺CD8⁺期において、両アレル同時に遺伝子再編成されることがわかった。片方のアレルで遺伝子再編成に失敗した single-TCR T細胞が、私たちが通常T細胞としてイメージするものであり、T細胞全体の80%ほどにあたる。T細胞のうち約20%は、両方のアレルで遺伝子再編成に成功し、2種類のTCRを発現するポテンシャルをもつ dual-TCR T細胞である。Dual-TCR T細胞の頻度は、マウスの末梢リンパ組織でほぼ変わらず、20%前後であった。さらに、それら dual-TCR T細胞のうち25%程度 (T細胞全体の5%ほど) が、2種類のTCRを実際に細胞表面に発現しているホロ dual-TCR T細胞であり、残りは片方のTCRを細胞表面に出し、もう一方を細胞内にとどめたヘミ dual-TCR T細胞 (dual-TCR T細胞の75%、全T細胞の15%ほど) であることが明らかになった。

今後は、ヘミ dual-TCR T細胞からホロ dual-TCR T細胞への遷移 (あるいはその逆の遷移) が生体内でも生じるか、精査する必要がある。また、ヘミ dual-TCR T細胞における細胞表面と細胞内のTCRに構造や抗原認識の違いがあるかどうか重要な課題である。現在、この課題解決を目標として、Dual-TCR T細胞のシングルセルTCRシーケンス解析を進めている。CDR3領域のアミノ酸配列を精査し、特徴的なTCR候補をクローニングして細胞株やマウス胸腺細胞に発現させ、その機能の検証を進める。ヘミ dual-TCR T細胞の細胞内にとどまっているTCRは、自己pMHCに対する親和性が低いのか／高いのか？ 胸腺で正の選択を受けるか？ 外来抗原やアロ抗原に反応するか？ といった重要課題について実験的に検証し、 dual-TCR T細胞の生理的意義の解明をめざす。

本研究の最大の成果は、 dual-TCR T細胞、およびホロ dual-TCR、ヘミ dual-TCRといったT細胞の実態が明らかになったことである。Dual-TCR T細胞は、例外的なマイナーな細胞集団とはいえない。今後は、「1細胞1受容体」の原則にとらわれることなく、本研究で明らかになったT細胞の真の姿にもとづいて免疫系を捉え直し、基礎研究と応用研究を進めてゆく必要がある。