

# 炎症性腸疾患発症において自然リンパ球は予防的に作用するか？ —新規マウスモデル作成の試みと今後の展望—

澤 新一郎

国立成育医療研究センター免疫科 フェロー  
(現 東京大学医学系研究科免疫学 助教)

## 緒 言

我々哺乳類の腸管には多種多様な細菌が生着し、宿主との共生関係を実現している。これら細菌は宿主食物消化、代謝経路の一部を肩代わりするだけでなく、生体防御に必要な宿主免疫系の発達に重要な役割を果たしている。近年、マウス腸管における獲得免疫系が細菌叢依存的に発達する機構が明らかになってきた。炎症性サイトカイン IL-17 を産生するヘルパー T (Th17) 細胞や IgA 産生細胞は腸内細菌依存的に分化し、各々腸内免疫系恒常性維持のために重要な役割を果たしている。

申請者らは Th17 分化に必要な核内受容体、ROR $\gamma$ t を発現する非 T 細胞リンパ球群 (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC) をマウス腸管粘膜固有層内に同定し、その表現型解析を行ってきた。ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC は腸管リンパ組織形成に必要であるのみならず、IL-22 に誘導される上皮からの抗菌ペプチド発現を介し、病原微生物に対する生体防御に重要な役割を果たす事が知られている。ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC は新生児期マウスにおいて獲得免疫系が出現するまでの間、主要な IL-17 産生細胞であり、カンジダ感染防御ならびに腸内細菌の生着に重要な役割を担っていると考えられる。

これまで、筆者および複数の研究グループにおいて生体内における ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC の解析が行われてきた。例えば ROR $\gamma$ t 欠損マウスは ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC および  $\alpha\beta$  +T 細胞、RAG2 欠損マウスは各々および T、B 細胞を欠損することから、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC の機能を解析する上で重要な役割を果たしてきた。しかし、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC 細胞群特異的な分子が同定されていないことから、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC 特異的欠損マウスおよび除去システムはこれまで存在せず、生理的条件下における ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC の機能的役割については未解明であった。

本研究課題においては、T 細胞の分化に影響を与えず ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC を特異的に欠損するトランスジェニックマウス作成を計画した。当初の研究計画においてはジフテ

リア毒素受容体 (DTR) を ROR $\gamma$ t プロモーター下流で発現させる単純なトランスジェニックマウスの作成を試みていた。しかし、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC 特異性がより高い DTR 発現を可能にするため、既存の T 細胞特異的 -Cre 発現マウスと組み合わせた新規モデルの作成を試みた。

## 実験方法

### 1) flox-DTRGFP-floxカセットの作成

Polymerase Chain Reaction (PCR) を用い、DTR-EGFP 融合遺伝子の両端に 26 塩基の回文 loxp 配列をもつ DNA フラグメントを作成し、TA クローニング法により pCR2.1 目的遺伝子をベクターにクローニングする。

### 2) ROR $\gamma$ t-DTRGFP<sup>flox/flox</sup> shuttle vectorの作成

ROR $\gamma$ t 遺伝子の第一エクソン開始コドンの 1kb 上流 (BoxA) および下流 (BoxB) をクローニングし、Bacterial artificial Chromosome (BAC) 遺伝子組換えに必要な SK1.1 Shuttle vector にすでに組み込んだ flox-DTRGFP-flox カセットの 5' 側および 3' 側に BoxA、BoxB をライゲーションすることで ROR $\gamma$ t-DTRGFP<sup>flox/flox</sup> shuttle vector を作成する。

### 3) ROR $\gamma$ t-DTRGFP<sup>flox/flox</sup> BAC Tgマウスの作成

上記方法により作成した ROR $\gamma$ t-DTRGFP<sup>flox/flox</sup> shuttle vector を用い、ROR $\gamma$ 遺伝子を持つ BAC クローン DNA を in vitro において組換える。このように組み換えを完成させた ROR $\gamma$ t-BAC の DNA をラージスケールのプラスミド精製法により濃縮単離し、マウス受精卵前核に移入する。このようにして作成されたキメラマウスから生殖細胞系列にトランスジーンがトランスミットされ、特に high copy のトランスジーンを持つマウスラインを選択する。

#### 4) Lck-Creマウスとの交配

得られた ROR $\gamma$ t-DTRGFP<sup>flx/flx</sup> BAC Tg マウスをジャクソン研究所より購入した Lck-Cre マウスと交配し、abT 細胞以外の ROR $\gamma$ <sup>+</sup> 陽性細胞 (ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC) 特異的に DTREGFP 融合遺伝子を発現するダブルトランスジェニックマウスを作成する。本マウスはジフテリア毒素依存的に ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC を生体内から除去可能である。

#### 結 果

記載した方法に則り、1) -3) の分子生物学的手法を用いて目的とする組み替え BAC 遺伝子のクローニングに成功した。精製した BAC DNA の濃度測定および組換え部位の確認は、本研究助成を購入費用に充当した Biorad 社製のパルスフィールド電気泳動装置を用いて行った。BAC DNA のマウス前核への移入はフェニックスバイオ株式会社 (宇都宮市) に委託し、現在作成キメラマウスのスクリーニングを行っている。

#### 考 察

生体内、特に腸管粘膜組織には数多くの細胞叢集団が存在するが、その分化発生経路は不明な点が多く、特異的発現遺伝子も同定されていない。私がこれまでの研究において注目してきた ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC はそのような特異的遺伝子が明らかになっていないリンパ球叢集団の一つである。ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC を特異的に欠損するマウスモデルはこれまで存在せず、研究進展の大きな障壁となってきた。今回私は、従来のノックインマウスに比較して作成が容易な BAC トランスジェニックマウス技術を基調とし、ROR $\gamma$ t 陽性かつ Lck 陰性細胞においてのみジフテリア毒素受容体を発現する全く新しいトランスジェニックマウスの作成を試みた。立案、ベクターの作成を始め、組み替え BAC ゲノム DNA の精製に至るコア作業をすべて一人で行ったため、計画遂行はやや遅れた。しかし、貴財団より助成を賜った研究費をもとに購入したパルスフィールド電気泳動装置を駆使し、最難関工程である BAC DNA 精製作業を順調に遂行することができ、立案から約 1 年で目的トランスジェニックマウスの作成が実現可能となった。スクリーニング作業により生殖系列に目的遺伝子を発現するマウスは ROR $\gamma$ t 発現細胞において DTR を発現するが、胸腺細胞および末梢 T 細胞 (Lck 発現細胞) においては DNA リコンビナーゼ Cre 依存的な DNA 組換えが生じ DTR がループアウトされるよう

に設計されており、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC 特異的欠損マウスモデルの作出に大きな一歩を歩ことができると考えられる。

本マウスモデル作成におけるボトルネックは (1) Lck-Cre マウスの Cre 組み替え効率、(2) DTRGFP<sup>flx/flx</sup> トランスジーン発現コピー数、の 2 点である。前者の問題に関しては Rosa26-YFP リポーターマウスを用いた検討から Cre 組み替え効率が 90% 以上を超えることを確認しており、大きな問題はない。しかし、2 番目の問題点に関しては導入遺伝子コピー数が制御不能であり、運まかせの要素が否めない。今回マウス作成を委託したフェニックスバイオ社は国内で数多くある BACTG マウス作成施設の中で高コピー数の BAC TG マウス作出を得意としており、目的とするトランスジェニックマウス系統樹立に関して大いに期待している。

#### 要 約

本研究は ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC 得意的欠損マウスモデル作成を試みた。研究遂行期間内において私の異動 (成育医療研究センターから東京大学大学院医学系研究科) も重なり、機器購入を始めとする研究環境整備に予想外に時間を費やした。成体マウス腸管に存在する ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>ILC の機能的解析特に新生児腸内細菌叢構築における役割を解明するうえで本マウスは切り札的なツールとなりうるため、今後も継続して本マウスの樹立並びに解析を行っていきたい。

#### 謝 辞

本研究課題に貴重な研究費を贈呈くださった公益財団法人三島海雲記念財団ならびに選考に携わってくださった諸先生に心より御礼申し上げます。また、BACTG マウス作成に必要な SK1.1 Shuttle ベクターを供与してくださったパスツール研究所 (フランス・パリ) の Gerard Eberl 博士、本研究課題の遂行にご理解くださった成育医療研究センター免疫科の小野寺雅史部長および東京大学免疫学教室の高柳広教授に御礼申し上げます。