

平成 31 年 4 月 2 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 125

氏 名

林 亮

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: Freiburg (国名: ドイツ連邦共和国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

T細胞分化に関わる新たな分子機構の網羅的探索と機能解析

3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 2 日 ~ 平成 31 年 4 月 1 日

4. 受入機関名及び部局名

Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Developmental immunology

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も

可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

【研究背景】

脊椎動物の進化とともに出現した適応免疫系は特定の抗原により効率良く対応できる洗練されたシステムである。脊椎動物が適応免疫系を獲得した進化の過程、どのような淘汰圧に対してなんの利点があったのかを明らかにすることは免疫学、進化学の側面から興味深い題材である。これまで一世紀以上にわたり解剖学的構造やゲノムが様々な生物種において比較された結果、適応免疫系の設計に進化の段階を通して一貫する共通点が指摘された。すなわち、抗原特異的な応答、抗原提示の仕組みにより特異的な非自己抗原が認識され、それが記憶されることである。一方、器官や分子の中には類似した構造や機能を持つが発生や遺伝子の由来が異なる収斂進化の例も報告されており、ヤツメウナギなどの無顎類における適応免疫の獲得はその代表例と考えられる(Annu. Rev. Immunol. 2018. 36:1-24)。

適応免疫系において主要な役割を果たす T 細胞は脊椎動物進化の過程でその生物においても咽頭弓に由来する胸腺で発生・分化する。同じく適応免疫系で主要な役割を果たす B 細胞が生物種によって様々な場所で発生するのに比べると実験的な利点が多い。

胸腺発生の鍵となる転写因子は Foxn1 であり、進化的には脊椎動物の共通祖先となる生物の Foxn4 から gene duplication によって生じた遺伝子である。魚類の胸腺では Foxn1 と Foxn4 がともに発現しているが哺乳類へ至る過程で Foxn1 が機能的により優位になることが観察されている。Foxn1 欠失マウスは体毛を持たず nude mouse として知られ、胸腺が形成されないため T 細胞を欠き重度の免疫不全を示すことが知られている(Nature 1994. 372:103-107)。

現在では CRISPR/Cas9 システムなどの新たな方法を用いて、比較からの推測にとどまっていた現象をより生理的な in vivo の条件において解析できるようになっている。本研究全体の目的は無顎類、軟骨魚類、硬骨魚類、哺乳類に渡る脊椎動物の適応免疫系の共通点と相違点を比較検討し、胸腺に

における T 細胞の発生・分化を制御する遺伝子ネットワークを新たに同定することである。

【計画 1】ゼブラフィッシュで T 細胞発生・分化に関わる因子をスクリーニング

背景

派遣先研究室ではエチルニトロソウレア（ENU: N-ethyl-N-nitrosourea）を用いて独立な 2 通りの順遺伝学的大規模ミスセンス変異体スクリーニングを施行した。その結果、胚発生初期（受精後 5 日まで）の胸腺および T 細胞の発生・分化に有害な劣性変異が同定された。筆者が派遣されるまでに合計 45 系統を得て、ポジショナルクローニングにより系統ごとに責任遺伝子の同定が進められている。胸腺での機能が既知の遺伝子に加え、DNA の修復やメチル化に関わる酵素など、どの組織でも重要と考えられる基本的な細胞機能に関わる遺伝子も発見されており上記のスクリーニングは十分に飽和していると考えられている。ミスセンス変異遺伝子では遺伝子完全欠損よりも選択圧が弱まるため、候補遺伝子を広く集められる利点がありこれが有利に作用した結果と推測される。

計画の進捗状況

上記スクリーニングからのカタログ情報と先に解析が始められた変異体の結果から標的を定め、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子欠失変異体作成を行った。筆者は 13 遺伝子、17 系統の作出と表現型解析を行い、そのうちの 6 遺伝子において胸腺の発生異常とそれに伴う T 細胞の分化異常を同定した。同定の方法はスクリーニングに用いられたのと同様、受精後 5 日までの胸腺の大きさを rag 遺伝子に対する RNA in situ ハイブリダイゼーションによって計測した。

計画の問題点とその解決

計画初期に CRISPR/Cas9 によるゼブラフィッシュ変異体解析においては通常の PCR による遺伝子型同定が困難な変異系統が複数見られた。全ゲノムシーケンスの解析から Cas9 に切断された周囲のゲノム構造が大きく変わることが原因と推定された。ほぼ同様に作成された我々のマウスモデルでは、現在までにこの現象は見られていないためゼブラフィッシュにおける CRISPR/Cas9 による変異導入やその後の DNA 修復に特徴的な現象の可能性を想定し新たに設計し直した標的 sgRNA を導入して遺伝子あたりに複数の変異系統を確立し直し、表現型が複数の変異で矛盾なく再現されることを確認した。並行して Morpholino を用いた実験でも胸腺での表現型が再現された。

解析と今後の予定

これらの変異系統に対して次世代シーケンサによる遺伝子発現解析を行い、表現型を示した遺伝子がどのようなパスウェイにおいて胸腺や T 細胞の発生、分化に関与しているのかを同定した。

また、当初の計画にはなかったが偶発的に興味深い知見が得られている。進化の過程で脊椎動物は少なくとも 2 度の大きな全ゲノム重複（whole genome duplication）を経験していることが明らかになっているが、硬骨魚類においてゼブラフィッシュが属する群ではさらに独自にもう一度全ゲノム重複が起きたことが示唆されている。遺伝子の数が倍に増えた場合、元々あった遺伝子と重複した遺伝子の間で機能の役割分担が生じる場合が知られている。研究背景の項で述べた Foxn1 と Foxn4 の関係もこの一例として挙げられる。遺伝子パラログのどちらかを欠失させるかによって表現型の表出が異なる場合が複数見出されており、遺伝子自体の機能のみならず全ゲノム重複による遺伝子機能の分化に焦点を当てた解析に到達し、論文投稿を準備している。

【計画 2】遺伝子変異マウスモデルの作成と適応免疫系における表現系解析

ゼブラフィッシュにおいて同定された候補遺伝子について哺乳類の適応免疫系での機能を比較・解析するため、CRISPR/Cas9 システムを用いてミスセンス変異を持つマウスの作成を試みた。試みられた遺伝子についてゼブラフィッシュの場合には見られなかった胎生致死が観察されており、胸腺や T 細胞の発生段階まで生存できていないため表現系の解析にまだ至っていない。

胸腺の発生と直接の関連は報告されていないもののヒトの疾患において見出された変異など、解析に適した時期までの生存が可能と予想される別の変異を同じ遺伝子上に持つマウスモデルを作成する代替案を進めている。

【計画 3】異なる進化段階の胸腺環境をマウスで再現する

背景

哺乳類における胸腺発生の鍵となる転写因子は Foxn1 であり、進化的には Foxn4 から gene duplication によって生じた遺伝子である。例えば魚類の胸腺では Foxn1 と Foxn4 がともに発現して協調的に機能しているが、脊椎動物が哺乳類へと進化する過程で胸腺における Foxn4 の発現は減少し、Foxn1 が機能的に優位になることが観察されている。Foxn1 欠失マウスは体毛を持たずヌードマウスとして知られ、胸腺が形成されないため T 細胞を欠き重度の免疫不全を示す。このヌードマウスに進化の段階の異なる生物の foxn1 もしくは foxn4 を発現させ、胸腺の発生や T 細胞の分化における表現型を解析することとした。使用する生物種にはヤツメウナギ(*L.planeri*)、ゾウギンザメ(*C.milii*)を選択した。胸腺もしくは咽頭弓に存在するその類似器官が脊椎動物に共通して T 細胞の発生場所であることが可能にした実験系である。

ヤツメウナギは脊椎動物の中でも顎を持たない無顎類に分類され、その適応免疫系は収斂進化の結果、顎を有する他の脊椎動物とは全く異なる分子によって構成されている(Annu. Rev. Immunol. 2012. 30:203-20)。異なる分子を用いた適応免疫系システムを持つマウスにおいてヤツメウナギ由来の転写因子 Foxn1/Foxn4 によって免疫系が再構成を検討することはこのシステムにおいてどの構成要素が進化的により保存されているか考察するために重要な情報となる。

ゾウギンザメは軟骨魚類に分類され、2014 年にゲノムが解読されており(Nature 2014. 505:174-179)、その解析結果から進化の速度が他の生物種に比べて極めて遅いことが判明した。このことから、進化的により古い(脊椎動物の共通祖先となる生物の特徴を残した) Foxn1/Foxn4 遺伝子が保存されていることが期待されている。

手法

異なる進化段階の胸腺環境を模したトランスジェニックマウスモデルの作成を行なった。

マウス Foxn1 遺伝子のプロモーターを含むプラスミドにヤツメウナギ(*L.planeri*)、ゾウギンザメ(*C.milii*)の foxn1 もしくは foxn4 をクローニングした。なお、これら外来遺伝子はマウス Foxn1 プロモーター下流にクローニングされているため、胸腺上皮細胞及び毛包上皮細胞など本来マウスの Foxn1 が発現しているにおいてのみ機能を発現していると考えられる。

このプラスミドを受精卵前核に顕微注入し、偽妊娠メスマウスに移植することでファウンダーを得た。このファウンダーと Foxn1 を欠失したマウスを交配した。マウス由来の Foxn1 を欠失したバックグラウンドで上記の遺伝子を発現させることにより、胸腺と T 細胞の発生と分化がどれほど回復されているかを検討した。

計画の進捗状況

下記の解析を行い、現在投稿準備中である。

胸腺の発生を欠き、その結果 T 細胞も欠失しているヌードマウスに上記の遺伝子を発現させると通常よりは小さく、胸腺上皮細胞数も少ないものの、胸腺の構造と機能が部分的に回復した。進化

的により古い形質を保持すると考えられる外来遺伝子の導入によって哺乳類であるマウスの T 細胞の発生・分化も不完全ながら回復することが確認された。

胸腺組織の解析では Foxn1 の発現により胸腺髄質上皮細胞が分化し、組織学的にも明らかな二層構造をとることが判明した。Foxn4 で再現された胸腺環境では皮質の上皮細胞のみが観察された。

自己免疫疾患表現系の解析ではほとんどの場合顕著な病態や組織学的な変化は観察されなかった。野生型に比べると不完全とはいえ、再構築された胸腺微小環境で一定の選択がなされた結果、少なくとも自己に反応する細胞が除かれた T 細胞レパトリーが形成されていると推察された。

胸腺上皮細胞の網羅的トランスクリプトーム解析では進化的に保存されていると予想されるサイトカイン、ケモカインの発現比に注目して比較を行った。リンパ球のホーミングには IL-7 の発現が重要であること、Foxn1 が胸腺機能に特化して行くに従い Notch リガンドである Dll4 の発現が相対的に上昇して行くことが明らかとなった。

【計画 4】ヤツメウナギ免疫系の解析

上記トランスジェニックマウスの実験結果からヤツメウナギの遺伝子がマウスの環境下でも胸腺の発生をサポートできることが明らかになった。そのため異なる抗原受容体分子システムを用い始めるよりも過去の時点（脊椎動物の共通祖先）の免疫系においてもリンパ球の発生過程の微小環境では有顎類の免疫系と共通の因子が使われていることが想定された。

この疑問に答えるため、一連のトランスクリプトーム解析から候補を選択し、ヤツメウナギの *in vivo* 環境において分子の働きを直接阻害する計画を追加で開始した。

現在、ヤツメウナギ飼育環境などの基礎技術を他国の研究所との共同研究で最適化しており、生態に不明な部分も多い動物種を扱うことから長期にわたる実験になると考えている。