

2020年度 TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」

調査研究報告書(公開版)

【研究題目】免疫レパトアの正確な定量・モデル化技術の調査研究

【整理番号】TK20-003

【代表機関】産業技術総合研究所

【調査研究代表者(氏名)】熊谷 雄太郎

【TIA 内連携機関：連携機関代表者】東京大学：鈴木 穰

【TIA 外連携機関】

【報告書作成者】産業技術総合研究所 熊谷雄太郎 【報告書作成年月日】2021/3/31

【連携推進(具体的な連携推進活動内容とその活動の効果等)】

本研究におけるレパトア解析の実験系および統計解析の検討のためにリモートでの2回のディスカッションを行った。TCR または BCR シーケンシングに必要な試薬や細胞数、bulk と single cell で得られるデータの違いとコスト、解析スキーム、特にシーケンスからのレパトア同定におけるデータ処理手法は既存のものの中ではどれが適切か等を議論した。また、最近の TCR, BCR シーケンシング解析の動向についての情報を得ることができた。

【調査研究内容(実験等中心に背景・課題と実行された課題解決の内容と結果)】

本調査研究は、免疫レパトアの正確な定量を可能にするための遺伝学的手法の実装、解析を目指したものである。免疫系の多様性を持った受容体分子群(レパトア)の変化は病原体感染、ワクチン効果、自己免疫疾患、がんに対する免疫応答等を理解するための鍵となり、定量化の努力がなされているものの、レパトア生成過程の確率性に起因する個体差が正確な解析を阻んでいる。本研究では実験レベルで個体差の問題を回避しレパトアの厳密な比較を可能にする遺伝学的手法として、1個体においてその免疫細胞レパトアを確率的にラベリング、等分して解析する手法を検討した。

本手法は Cre リコンビナーゼを誘導することで染色体上に tandem に並んだ CFP, RFP-P2A-FLP のどちらかが切り出され、残ったものが発現するというものである。類似の手法として、“Brainbow”マウス(Cai et al, Nat Methods, 2013)やそのバリエーション(Richier and Salecker, WIREs Dev Biol, 2015)だけでなく、遺伝的“モザイク”を作成するマウス(Lao et al, Cell Rep, 2012)がある。また、本手法では RFP-P2A-FLP が残った場合、FLP リコンビナーゼが発現することで、FRT 配列を認識して組換えを引き起こし、染色体上の別の遺伝子座を選択的に欠損できるようになる。

本手法の確認のために、CFP, RFP, FLP をクローニングし、Cre リコンビナーゼに認識される loxP 配列とそのバリエーションを配置した CFP/RFP-P2A-FLP 遺伝子を作製し、lox-stop-lox (LSL) の下流に配置した。この遺伝子をマウス胚性線維芽細胞(MEF)に stable transfection を行い、その細胞に Cre リコンビナーゼ、および FRT-stop-FRT (FSF)-GFP 遺伝子を transfection で導入した。すると、CFP 陽性、RFP 陽性、CFP/RFP 両者とも陰性の細胞がそれぞれ観測された。また、RFP 陽性細胞の中に GFP 陽性細胞が観測され、CFP 陽性細胞や CFP/RFP 陰性細胞の中では観測されなかった。これは、当該手法が機能していることを示唆する。一方、CFP 陽性細胞の割合は常に RFP 陽性細胞のそれよりも多かった。これは CFP は LSL の下流に位置しており、LSL の組換えが起きるだけで、RFP の切り出しが起きずとも発現が誘導されるためであると推定された。実際、これらの細胞をソーティングした後に genome DNA を鋳型とした PCR を行うことで、LSL の組換えのみが起これば下流 CFP/RFP の組換えが起きていないものや、LSL の組換えが起これば CFP/RFP の組換えのみが起きていることが確認された。

次に、Cre と FLP の役割を入れ替えることが可能かどうかを調べるため、CFP, RFP, Cre をクローニングし、FRT 配列を配置しかつ FSF の下流に配置した遺伝子を作製した。これを MEF に stable transfection し、その細胞に FLP および lox-stop-lox-GFP 遺伝子を transfection した。すると、上記と同様に CFP 陽性、RFP 陽性、CFP/RFP 両者とも陰性の細胞がそれぞれ観測されると同時に、RFP 陽性細胞の中に GFP 陽性細胞が観測され、CFP 陽性細胞や CFP/RFP 陰性細胞の中では観測されなかった。この結果は FLP と Cre の役割を入れ替えても当該手法が機能することを示唆すると同時に、上記のように上流の stop のみ、または下流の CFP/RFP のみで組換えが起きてしまう問題は解消されないことを暗示した。

LSL または FSF のみで組換えが生じてしまい遺伝子が発現してしまうこと、または CFP/RFP の組換えのみが生じてしまうこと等の不適切な組換えと遺伝子発現を防ぐため、CFP/RFP 組換えによって排除される部分に転写抑制因子 (TR) を導入した CFP/TR/RFP-P2A-FLP 遺伝子を作製し、この遺伝子を TR によって抑制されるプロモータの下流に配置した。これにより、CFP/RFP の組換えが起こらない場合は TR のために CFP/RFP の発現は起こらず、組換えが起きて CFP または RFP-P2A-FLP が選択されると同時に TR が染色体から排除されたときにのみ発現が起こることが期待される。これを確認するため、上記のように MEF に stable transfection で導入し同様の実験を行ったところ、CFP 陽性、RFP 陽性、CFP/RFP 両者とも陰性の細胞がそれぞれ観測され、RFP 陽性細胞の中に GFP 陽性細胞が観測され、CFP 陽性細胞や CFP/RFP 陰性細胞の中では観測されなかったのみならず、CFP 陽性細胞、RFP 陽性細胞では組換えが起きていること、および CFP/RFP 陰性細胞では組換えは起こっていないことを PCR によって確認できた。

これらの実験から、CFP/TR/RFP-P2A-FLP 遺伝子を TR によって制御されるプロモータ下流に配置したものが当初目的に合致したものであることが確認され、マウスにこの遺伝子を組み込んだものを作製するための POC を取得するに至った。

また、本研究によって開発するモデルの応用のための基盤として、免疫システムの動作原理を数理的に記述できるモデルの研究を行っているが、当該研究の進展を「免疫系の情報処理：細胞の情報伝達と全体最適化」として第 5 回理論免疫学ワークショップ (<https://workshop.theoreticalimmunology.jp/>) で発表した。

【今後の活動予定】

本研究は上記のように完成した遺伝子をマウスに組み込むことを目指し継続する。また、マウスを作製後は次世代シーケンサによる免疫レパトアの測定等を進める予定である。

上記の予備実験結果を基礎として各種予算申請を行っている。また、マウスの作製後はその解析を目標とした資金の獲得を目指す。

以上