

学位論文審査の結果の要旨

氏名	石川 龍也	
学位の種類	博士（理学）	
学位記番号	甲 第1989号	
学位授与の日付	令和6年3月25日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当	
学位論文題目	T-cell receptor repertoire analysis of CD4-positive T cells from blood and an affected organ in an autoimmune mouse model	
主研究指導教員	秋山 泰身	
論文審査委員	(主査) 大野 博司	大学院客員教授
	(副査) 片岡 浩介	准教授
	(副査) 林 郁子	准教授
	(副査) 菅原 亨	准教授

論文内容の要旨

リンパ球の一群である T 細胞は獲得免疫応答に重要である。T 細胞は T 細胞抗原受容体（以下 TCR）を介して抗原を認識するが、様々な外来抗原を認識するために、各細胞で TCR のアミノ酸配列が異なる多様な集団となる（TCR レパートリー）。TCR の多様性はコードする V、D、J 遺伝子の組換え、および組換え反応の接合部位で起きる欠失および付加がランダムに起きることで成立する。TCR による抗原認識は相補性決定領域（CDR）で行われるが、最も多様性の高い領域が CDR3 である。すなわち TCR による多様な抗原認識には、CDR3 領域のアミノ酸配列の多様性が最も大きく寄与する。

疾患の有無や状態を、血液中の分子マーカーで診断あるいは予後予測する試みが多くなされており、一部は実用化されている。T 細胞が抗原を認識すると、抗原を認識した T 細胞だけが増殖する（クローン増殖）。この現象を利用して、血液中 T 細胞の TCR 配列を分子マーカーとして利用する考えが提唱されている。そこで本研究は、自己免疫疾患の症状と TCR レパートリーの相関性の有無を、マウスモデルを用いて検証することを目的とした。

多種類の臓器で症状を呈する自己免疫疾患がある。本研究は、その代表例である自己免疫性多内分泌腺症候群 1 型（APECED）に着目した。APECED は核内因子 AIRE の機

能不全変異で起きる劣性遺伝疾患であり、影響を受ける臓器の種類や症状の程度に個人差がある。一致して、APECED のモデルマウスである AIRE 欠損マウスも、多種類の臓器で自己免疫性の炎症が起きる。

学位申請者は、まず AIRE 欠損マウスで起きる自己免疫が多くの臓器で見られること、それらには個体差があることを自己抗体の検出により確認した。ついで影響を受ける臓器の中から胃を選択し、症状と血液 T 細胞に反映するのかが検証した。まず胃の自己免疫症状の指標として、胃内に浸潤している活性化した T 細胞の数を測定した。その結果、胃内の活性化した T 細胞数は個体により異なり、さらに自己抗体価と相関があることを確認した。一方で血液中の T 細胞の活性化状態を確認したところ、コントロールとほぼ同程度であった。すなわち、胃の自己免疫症状は、血液中の活性化した T 細胞の数だけでは診断することはできないと結論した。

ついで、胃内の活性化した T 細胞と血液中の活性化した T 細胞について、ディープシーケンスにより得られる TCR α 鎖と β 鎖の mRNA 配列から、コードする TCR アミノ酸配列を決定した。TCR 鎖の類似性評価を Jaccard 指数に基づき行なったところ、血中活性化 T 細胞の TCR 配列は α 鎖、 β 鎖両者とも、対応する個体から得られた胃内活性化 T 細胞の TCR 配列と高い類似性を有することが判明した。この結果は、胃内 T 細胞の状況を血液 T 細胞の TCR 配列により推測できることを示唆する。また、重要なことに、同一個体の血液と胃で Jaccard 指数の相関が高いほど、胃内の活性化 T 細胞数が多いことが判明した。この結果は、胃の症状が重篤であるほど、血液と胃の TCR レポートリーで類似性が高いことを示している。以上の結果は、APECED 患者の診断において、血液中 TCR 配列は、自己免疫疾患の症状を反映する分子マーカーになり得ることを示唆している。

最後に、胃の症状と相関して検出される TCR レポートリーのアミノ酸配列を決定することを試みた。候補配列の基準として、コントロールでは存在しないことに加え、2 匹以上の AIRE 欠損マウスについて同一個体の血液と胃の両方で検出される配列とした。選択された CDR3 配列をクラスタリングにより分類し、クラスタリングごとに、胃の症状の指標である胃内活性化 T 細胞数との相関を検証した。その結果、相関係数は低いものの、配列を特定することができた。

これまで、自己免疫疾患に関する TCR レポートリー解析は、疾患が発症の有無だけをモニタリングするために行われてきた。今回の申請者の研究では、疾患発症の有無に加えて、個体間で異なる疾患の重症度もモニタリング可能であるとの結果を得た点が重要となる。今後は、決定された TCR 配列の配列や予測構造から、認識する抗原を同定することが課題の一つとなる。将来的に TCR 配列情報は、様々な免疫疾患の診断や予後予測、さらには癌免疫治療の奏効率予測などに利用される可能性があり、本研究は先駆的な研究の一つになると思われる。

論文審査結果の要旨

本論文の審査は、令和5年12月18日の学位審査会において4名の審査員（主査：大野 博司 副査：片岡 浩介、林 郁子、菅原 亨）により、提出された学位論文、専門的知識、関連分野に関する知識、外国語能力に関して行われた。

学位論文と専門的知識に関する試験は、学位審査会と、その直前に開かれた発表会における質問への回答として行なった。本研究は、自己免疫疾患の抑制に重要なAIREタンパク質を欠損する遺伝子改変マウスが研究対象となっており、AIREに関する専門知識を試験対象とした。また今回の研究で検出しているT細胞抗原受容体（以下、TCR）に関する知識も必須であるため、関連する専門知識も試験対象とした。大野主査は、AIREの機能や欠損、変異の影響に関連して、ヒト自己免疫疾患との関連性、性差による症状の違い、どのような個体差があるかなどを質問とした。申請者は、ヒト自己免疫疾患との関連についてはAIREの変異による疾患が存在すると説明した。また性差による違いが存在すること、そのために今回の実験は全てメスマウスで行なったとの説明があった。個体差がなぜ生じるのかの理由については不明であるとの回答であり、現在までに提唱されている仮説に関する説明はなかった。またTCRのCDR3領域がAIRE欠損マウスの胃内T細胞で短くなる理由について質問したが、明確な回答ではなかった。林副査は、AIRE欠損マウスで症状が違うのはなぜか、AIREタンパク質の機能について、どのような機構で転写を誘導するのか、また標的遺伝子が判明しているのか、との質問を行なった。申請者からは、同じAIRE欠損マウスの症状が違う理由は完全には解明されていないが、多くの免疫応答には確率論で支配される場合が多いとの回答を得た。AIREタンパク質による遺伝子制御の分子機構については、AIREによる転写伸長の抑制が提唱されているが、他にも仮説があり、完全解明には至っていない、との回答であった。また標的遺伝子については、現在のところ今回同定したTCRが認識する抗原が標的遺伝子になっている証拠は有していないとの回答であった。片岡副査は、自己抗体ではなくTCR配列で検査する意義についての質問を行なった。自己免疫疾患はT細胞に依存する疾患であり、B細胞からの抗体産生はそのアプトプットのひとつと見なせること、そのためT細胞のパラメーターを直接検出する方が望ましいと考えているとの回答であった。また片岡副査から実用化への展望について質問があった。それに対し、まだ可能性の段階ではあるが、今後も追求すべきである、との回答であった。菅原副査からは、今回使用したAIRE欠損マウスのゲノム構造についての質問があった。申請者は、AIRE遺伝子がGFP遺伝子に置換されたマウスであると回答した。TCRはV、D、J、の3つの領域が複数存在するため、その数をヒトとマウスの違いも含めて質問したが、正確な回答は得られなかった。また実験の個体数が少ないことを指摘したところ、ヒトで行えばもっと個体数が得られるとの回答であった。しかしながら、これを受けた大野主

査の反論については、明確な回答ができなかった。以上、AIREに関する専門知識は博士号取得に十分であった。一方、TCRに関連した知識については詳細部分に不足があったものの、概ね専門知識を有していると判断した。また本研究の意義づけについても、曖昧な部分はあるものの、概ね説明できており、総合的には博士号取得資格を十分満たす専門知識を有すると結論した。

関連分野に関する知識についての試験は、主に審査会で行われた。大野主査はTCRとB細胞抗原受容体（BCR）の多様性の違いについて、TCR複合体の構成についてなどTCRに関する基礎知識について試験した。申請者はBCRで起きる体細胞突然変異について説明した。一方、TCR複合体のサブユニット数とその構成については回答できなかった。また自己免疫疾患の種類と環境因子の影響について質問したところ、種類については複数挙げて説明できたが、環境因子の影響については明確な回答ではなかった。さらに実験材料の一つであるRAG欠損マウスに関わりRAGについて質問したところ、組換え反応に必要なとの回答を得た。林副査は、解析に使用した統計処理方法についての知識を試験した。その結果、他の統計処理方法と比較しつつ回答することができた。また遺伝子組換えに関わるタンパク質に関する質問がなされ、不十分ながらも回答した。片岡副査は、アポトーシス現象について、一般的な分子機構を質問した。FasL/Fasによるアポトーシス誘導やカスパーゼの活性化について回答することはできたが、アポトーシスを誘導する細胞内シグナルについての回答はできなかった。菅原副査は、申請者が提案した、今回の結果を自己免疫疾患の予防に繋げるとの展望について、具体的にどのように行うのか質問した。予防法はまだ開発されていない、との回答であり、ヒトへの応用に関する展望の不明瞭な説明も含め、社会的応用に関しては、深い思考と知識に基づく回答とは言えなかった。全体として、専門知識から少し外れた一般知識の修得について、幾分不十分な面が見られたものの、学位を取得の適否の観点からは合格と判断した。

英語の語学力については、提出された英文概要と審査会での英語プレゼンテーションから判断した。副査の一人は英文記載の一部に不明瞭な点があると考えたものの、英語力の不足に起因するものではないと判断した。一方、英語による研究内容の説明は流暢であり、英語でのプレゼンテーション能力は極めて高いと結論した。以上、英語力については博士号取得に相応しいと結論した。

全体を通して、審査員の全てが一致して、専門知識については十分であり、英語の語学力も高く、博士号取得に相応しいと判断した。一方で、一般知識については、若干不足している面が否定できないものの、博士号取得の要件は満たすと判断した。