

80	自己抗原特異的TCRを発現する水疱症モデル動物の樹立	氏家 英之
----	----------------------------	-------

【目的】 水疱性類天疱瘡 (BP) は、表皮基底膜部の構成タンパクである 17 型コラーゲン (COL17、BP180) に対する自己抗体により発症する最も頻度の高い自己免疫性水疱症で、厚生労働省の指定難病となっている。過去の研究により、BP の自己抗体産生には自己反応性 T 細胞の働きが重要と考えられているが、COL17 反応性 T 細胞の病原性は未だ明らかになっていない。我々は最近、マウスに COL17 タンパクで免疫し、そのマウスのリンパ球を *in vitro* で刺激することで 5 株の COL17 反応性 T 細胞株の樹立に成功した。T 細胞株の病原性を評価したところ、3 つの株で病原性がみられ、2 つの株で病原性が見られなかった。本研究の目的は、我々が樹立した COL17 反応性 T 細胞株の T 細胞受容体 (TCR) の遺伝子配列を明らかにし、その配列を持つノックインマウスを作製することで新規 BP マウスモデルを樹立することである。

【方法】 病原性 T 細胞と非病原性 T 細胞のそれぞれから Total RNA を抽出し、RNAseq で TCR レパトア解析を行った。この TCR 配列を参考に人工遺伝子合成で TCR をデザインした。このデザインした TCR を、レトロウイルスを用いて、T 細胞セルラインに導入し、TCR の発現確認をフローサイトメトリーで行った。このセルラインを COL17 タンパクで刺激し、活性化の有無に対してフローサイトメトリーとサイミジン取り込み試験を行った。セルラインに導入した TCR の配列の一部をサンガーシーケンスで確認した。TCR ノックインマウスを作製するために人工遺伝子で病原性 T 細胞と非病原性 T 細胞の配列を作製し、ゲノム編集でマウス受精卵に導入した。導入確認は PCR での Genotyping で行った。

【結果】 病原性 T 細胞と非病原性 T 細胞の TCR レパトア解析で TCR の配列を同定した。この TCR 配列を人工遺伝子合成で作製し、レトロウイルスを用いて、T 細胞セルラインに導入しフローサイトメトリーで TCR の発現を確認した。このセルラインを COL17 タンパクで刺激し、活性化の有無に対してフローサイトメトリーとサイミジン取り込み試験で評価したが T 細胞の有意な活性化は確認できなかった。セルラインに導入した TCR の配列の一部をサンガーシーケンスで確認したところ、変異が入っていることが確認された。TCR ノックインマウスを作製するために人工遺伝子合成で病原性 T 細胞と非病原性 T 細胞の配列を作製した。ゲノム編集でマウス受精卵に導入し FO を得た。導入確認は PCR での Genotyping で行い、多数のマウスにおいてゲノム編集で TCR がノックインされていることを確認した。

T 細胞セルラインへの TCR 導入と TCR ノックインマウスの作製

