

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19166

研究課題名(和文)新規細胞運命追跡法を用いたメモリーCD8T細胞分化機構の解明

研究課題名(英文)Genetic fate mapping analysis of highly cytotoxic KLRG1+ effector CD8 T cells

研究代表者

石亀 晴道(Ishigame, Harumichi)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：70729227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、メモリーCD8陽性T細胞には局在、遊走能、機能の異なる細胞が多く存在し、きわめて不均一な集団であることが明らかにされたが、その分化の機構についてはいまだ不明な点が多く残されている。本研究では、一部のKLRG1陽性のエフェクターCD8陽性T細胞はKLRG1を一時的に発現したのち消失し、高い細胞障害活性および増殖能をもつさまざまな種類のメモリーCD8陽性T細胞へと分化することを見出した。本研究により、エフェクターCD8陽性T細胞はこれまで考えられていた以上に高い分化の可塑性をもち、この可塑性がメモリーCD8陽性T細胞の多様性や長期的な生体防御応答の形成に貢献することが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Protective immunity against pathogens depends on the efficient generation of functionally diverse effector and memory T lymphocytes. However, whether plasticity during effector-to-memory CD8+ T cell differentiation affects memory lineage specification and functional versatility remains unclear. Using genetic fate mapping analysis of highly cytotoxic KLRG1+ effector CD8+ T cells, we demonstrated that KLRG1+ cells receiving intermediate amounts of activating and inflammatory signals, downregulated KLRG1 during the contraction phase in a Bach2-dependent manner, and differentiated into all memory T cell lineages. 'ExKLRG1' memory cells retained high cytotoxic and proliferative capacity distinct from other populations, which contributed to effective anti-influenza and anti-tumor immunity. Our work demonstrates that developmental plasticity of KLRG1+ effector CD8+ T cells is important in promoting functionally versatile memory cells and long-term protective immunity.

研究分野：免疫学

キーワード：メモリーCD8T細胞 免疫記憶 分化可塑性

1. 研究開始当初の背景

メモリーCD8 陽性 T 細胞は非常に不均一で多様性のある細胞の集団であり、その局在、遊走能、機能により大きく3つに分類されると考えられている。血液循環型であるメモリーCD8 陽性 T 細胞は、T 細胞の活性化のおもな場であるリンパ節への遊走能をもつセントラルメモリーCD8 陽性 T 細胞と、リンパ節への遊走能をもち末梢組織を循環するエフェクターメモリーCD8 陽性 T 細胞とに分けられ、体内の異なる部位を循環することにより異物の侵入をたえず監視する。一方、非循環型のメモリーCD8 陽性 T 細胞は組織常在型メモリーCD8 陽性 T 細胞とよばれ、粘膜組織の上皮や皮膚に局在し、再感染の際に感染部位において迅速な免疫応答をひき起こす。しかし、それぞれのメモリーCD8 陽性 T 細胞の集団もけして均一ではなく、メモリーCD8 陽性 T 細胞の起源や多様性がどのように形成されるかについては明らかにされていなかった。

これまでの研究において、非常に強い抗原の刺激を受けたエフェクターCD8 陽性 T 細胞は、終末分化のマーカースとして知られる KLRG1 を発現し高い細胞障害活性を獲得するが、その大部分はメモリーCD8 陽性 T 細胞へと分化せずに死滅することが報告されていた。また、生き残った KLRG1 陽性のエフェクターCD8 陽性 T 細胞はエフェクターメモリーCD8 陽性 T 細胞にしか分化できず、終末分化に近い状態にあると考えられていた。一方、KLRG1 陰性のエフェクターCD8 陽性 T 細胞はインターロイキン7 受容体を強く発現し、すべての種類のメモリーCD8 陽性 T 細胞へと分化する前駆細胞であると考えられていた。しかし、このモデルは非常に単純化されたものであり、KLRG1 陰性のエフェクターCD8 陽性 T 細胞も不均一な細胞の集団であることから、異なる機能をもつメモリーCD8 陽性 T 細胞が同一の前駆細胞に由来するかどうかはわかっていなかった。

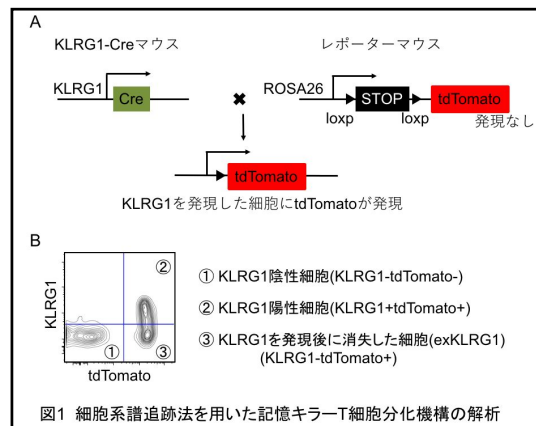
2. 研究の目的

KLRG1 の発現の有無とメモリーCD8 陽性 T 細胞への分化との関係を解析する細胞系譜の追跡法を確立し、エフェクターCD8 陽性 T 細胞の分化の可塑性がメモリーCD8 陽性 T 細胞の多様性の形成や生体防御能におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

KLRG1 の発現の有無とメモリーCD8 陽性 T 細胞への分化との関係を解析する細胞系譜の追跡法を確立するため、*Klrg1* 遺伝子の発現制御のもと Cre 遺伝子を発現する遺伝子改

変マウスを作製した(図 1A)。この KLRG1-Cre マウスと部位特異的な組換え酵素 Cre の活性に依存して赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現するマウスとを交配することにより、KLRG1 をいちどでも発現した細胞を tdTomato により不可逆的に標識することができる。さらに、抗 KLRG1 抗体による染色と組み合わせることにより、KLRG1 をいちどでも発現していない KLRG1 陰性細胞、KLRG1 を発現しつづけている KLRG1 陽性細胞、KLRG1 を発現した経験はあるがその発現を消失した細胞を区別することができる。この手法により同定された、KLRG1 を発現した経験はあるがその発現を消失した細胞を exKLRG1 細胞と名づけ、その特徴や機能を解析した(図 1B)。



4. 研究成果

(1) KLRG1 陽性のエフェクターCD8 陽性 T 細胞は KLRG1 の発現を消失しさまざまなメモリーCD8 陽性 T 細胞へと分化する

KLRG1 を用いた細胞系譜の追跡法により、リステリア菌に感染したのち菌体が排除され炎症応答が終息に向かう時期には、KLRG1 陰性細胞や KLRG1 陽性細胞にくわえ、exKLRG1 細胞も出現することが見い出された。この exKLRG1 細胞は持続期においても確認され、血液循環型のメモリーCD8 陽性 T 細胞に約 20 ~ 30% の割合で存在した。

KLRG1 を発現した経験の有無と血液循環型のメモリーCD8 陽性 T 細胞の分化との関係性についてさらに解析した結果、exKLRG1 細胞はセントラルメモリーCD8 陽性 T 細胞およびエフェクターメモリーCD8 陽性 T 細胞から構成される不均一な細胞の集団であることがわかった。一方、KLRG1 陰性細胞の多くはセントラルメモリーCD8 陽性 T 細胞であり、KLRG1 陽性細胞の大部分はエフェクターメモリーCD8 陽性 T 細胞から構成されていた。さらに、exKLRG1 細胞はケモカイン受容体 CX3CR1 を中程度に発現しており、大部分の末梢メモリーCD8 陽性 T 細胞は exKLRG1 細胞であることも明らか

にされた。

組織常在型メモリーCD8 陽性 T 細胞はすべて KLRG1 陰性であり、このうち、exKLRG1 細胞は約 40～50%という非常に高い割合で存在した。この結果より、KLRG1 陽性のエフェクターCD8 陽性 T 細胞は高い分化の可塑性をもち、KLRG1 の発現を消失してさまざまなメモリーCD8 陽性 T 細胞へと分化することが明らかにされた。

(2) 中程度の抗原の刺激を受けたエフェクターCD8 陽性 T 細胞は exKLRG1 細胞へと分化する

どのようなエフェクターCD8 陽性 T 細胞が exKLRG1 細胞へと分化するのかを明らかにするため、遺伝子の発現を解析した。その結果、KLRG1 陽性細胞においては細胞障害活性に関連する遺伝子が強く発現しており、KLRG1 陰性細胞においてはメモリーCD8 陽性 T 細胞の分化の促進に関連する遺伝子が強く発現していた。一方、exKLRG1 細胞はこれらの遺伝子を中程度に発現していた。とくに、exKLRG1 メモリーT 細胞への分化能はエフェクターCD8 陽性 T 細胞における *Il7r* 遺伝子の発現と正の相関を示した。さらに、exKLRG1 エフェクターT 細胞においては、細胞障害活性に関連する遺伝子の領域およびメモリーCD8 陽性 T 細胞の分化に関連する遺伝子の領域が開いたクロマチン構造をとることが ATAC シークエンスによる解析により明らかにされ、抗原の刺激を中程度にうけたエフェクターCD8 陽性 T 細胞は exKLRG1 細胞へと分化することが示唆された。

(3) 血液循環型の exKLRG1 メモリーT 細胞は KLRG1 陽性のエフェクターT 細胞の特性を維持する

血液循環型の exKLRG1 メモリーT 細胞の機能を解析するため、ex vivo において炎症性サイトカインによる刺激ののちのインターフェロンの産生能について解析した。その結果、KLRG1 陽性のエフェクターメモリーCD8 陽性 T 細胞が炎症性サイトカインによる刺激ののちのインターフェロンの産生能がもっとも高いことがわかった。さらに、exKLRG1 メモリーT 細胞は KLRG1 陰性のメモリーT 細胞と比較して、セントラルメモリーCD8 陽性 T 細胞およびエフェクターメモリーCD8 陽性 T 細胞のどちらの画分においても高いインターフェロンの産生能をもっていた。このことより、血液循環型の exKLRG1 メモリーT 細胞は KLRG1 陽性のエフェクターT 細胞の特性を維持しており、KLRG1 陽性のエフェクターT 細胞の分化の

可塑性が、セントラルメモリーCD8 陽性 T 細胞やエフェクターメモリーCD8 陽性 T 細胞の機能的な不均一性に貢献することが明らかにされた。

(4) 組織潜在型 exKLRG1 メモリーT 細胞は高い細胞障害活性をもつ

セントラルメモリーCD8 陽性 T 細胞やエフェクターメモリーCD8 陽性 T 細胞と同様に、組織潜在型メモリーCD8 陽性 T 細胞においても exKLRG1 細胞は KLRG1 陽性のエフェクターT 細胞の特性を維持しているかどうかについて検討した。その結果、組織潜在型メモリーCD8 陽性 T 細胞において、exKLRG1 細胞は KLRG1 陰性細胞に比べ細胞障害活性の指標となるグランザイム B の発現が亢進していた。このことより、組織潜在型メモリーCD8 陽性 T 細胞においても、KLRG1 陽性のエフェクターT 細胞の分化の可塑性が機能的な不均一性に貢献することが明らかにされた。

(5) exKLRG1 メモリーCD8 陽性 T 細胞は高い抗がん作用および抗ウイルス作用をもつ

生体における exKLRG1 細胞の機能について解析するため、移入実験による肺におけるインフルエンザの感染、および、皮膚がんに対する exKLRG1 メモリーCD8 陽性 T 細胞の生体防御能について検討した。その結果、KLRG1 陽性のメモリーCD8 陽性 T 細胞はインフルエンザの感染のみに、KLRG1 陰性のメモリーCD8 陽性 T 細胞は皮膚がんのみに、効率のよい免疫応答をひき起こしたのに対し、exKLRG1 メモリーCD8 陽性 T 細胞はどちらの実験モデルにおいても高い生体防御能を発揮した。以上の結果から、exKLRG1 メモリーCD8 陽性 T 細胞は多彩な機能を兼ね備えた細胞の集団であることが明らかにされた。

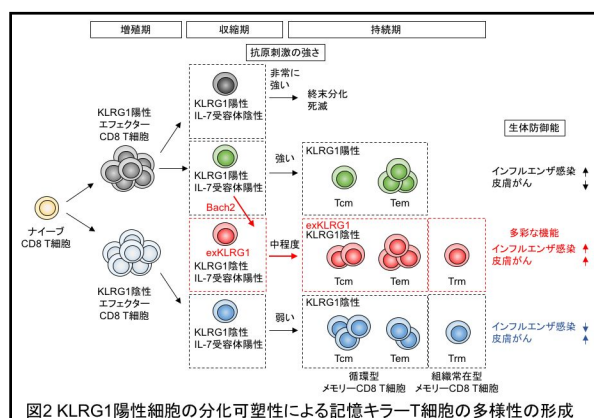
(6) 転写因子 Bach2 は exKLRG1 エフェクターCD8 陽性 T 細胞の分化を促進する

exKLRG1 エフェクターCD8 陽性 T 細胞の分化の機構について検討した。Bach2 はメモリーT 細胞やメモリーB 細胞の分化に必須の役割をはたす抑制性の転写因子である。Bach2 の発現が KLRG1 陽性のエフェクターCD8 陽性 T 細胞に比べ、exKLRG1 エフェクターCD8 陽性 T 細胞において高く発現していることに注目し、KLRG1-Cre マウスを用いて KLRG1 陽性のエフェクターCD8 陽性 T 細胞において Bach2 遺伝子を持異的に欠損させたところ、血液循環型の exKLRG1 メモリーCD8 陽性 T 細胞への分化が障害された。

一方、KLRG1-Cre マウスを用いて Bach2 遺伝子の発現が誘導される実験系を構築したところ、Bach2 は血液循環型の exKLRG1 メモリーCD8 陽性 T 細胞への分化を促進することがわかった。この結果より、Bach2 の発現の強度が exKLRG1 エフェクターCD8 陽性T細胞の分化の制御に重要であることが明らかにされた。

(7) 結論

この研究により、メモリーCD8 陽性 T 細胞の多様性の形成には抗原の刺激の強度が重要な役割をはたすことが明らかにされた(図 2)。とくに、中程度の抗原の刺激を受けたエフェクターCD8 陽性 T 細胞は高い分化の可塑性をもち、KLRG1 を一時的に発現し、高い細胞障害活性および増殖能をもつさまざまなメモリーCD8 陽性 T 細胞へと分化することにより、メモリーCD8 陽性 T 細胞の多様性の形成や生体防御に貢献することがわかった。今後、exKLRG1 細胞の特異的なマーカーや分化の機構を詳細に解析することにより、感染症やがんに対するメモリーCD8 陽性 T 細胞の生体防御能を反映する新たなバイオマーカーの探索に貢献することが期待される。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3件)

1. KLRG1+ Effector CD8+ T Cells Lose KLRG1, Differentiate into All Memory T Cell Lineages, and Convey Enhanced Protective Immunity. Herndler-Brandstetter D*, Ishigame H*#, Shinnakasu R, Plajer V, Stecher C, Zhao J, Lietzenmayer M, Kroehling L, Takumi A, Kometani K, Inoue T, Kluger Y, Kaech SM, Kurosaki T, Okada T#, Flavell RA#. *Immunity*.

2018 48:716-729. *Co-first author, # Correspondence. (査読有)

2. Intestinal type 1 regulatory T cells migrate to periphery to suppress diabetogenic T cells and prevent diabetes development. Yu H, Gagliani N, Ishigame H, Huber S, Zhu S, Esplugues E, Herold KC, Wen L, Flavell RA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 114:10443-10448. (査読有)
3. In vivo multiphoton imaging of immune cell dynamics. Okada T, Takahashi S, Ishida A, Ishigame H. *Pflugers Arch*. 2016 468:1793-1801. (査読有)

[学会発表](計 1件)

1. Ishigame H, Herndler-Brandstetter D, Shinnakasu R, Kometani K, Inoue T, Kurosaki T, Okada T, Flavell RA. Developmental plasticity of KLRG1+ effector CD8+ T cells promotes protective immunity. The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Dec 12-14, 2017. Sendai International Center, Sendai.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石亀 晴道 (ISHIGAME HARUMICHI)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医

科学研究センター・研究員

研究者番号: 70729227

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし