

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04040

研究課題名(和文) CD4T細胞から分化誘導される新規制御性T細胞の機能解析

研究課題名(英文) Novel regulatory T cells induced and differentiated from CD4 T cells

研究代表者

清水 章 (Shimizu, Akira)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：00162694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：獲得免疫とは非常に多様性に富んだ受容体を発現しているリンパ球が担っている反応であり、特異的受容体を介して抗原を認識することで免疫反応が開始される。実際の生体防御に必要な免疫反応であっても、過剰な反応は有害であり、これを抑えるために抗原特異的な負の制御機構の存在が想定されているが、その実態は不明である。この点に関して、私たちは新しく同定された細胞「CD4から分化したCD8T細胞」が、少なくともいくつかの実験で制御性T細胞として機能することを見出した。本研究では、「CD4由来のCD8T細胞」を生体内で可視化するシステムの構築と、この細胞を特異的に除く方法の確立を目指し、ある程度の進展が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫反応の正負の制御機構は精力的に解明されてきているが、負の制御機構に関する知見は限られている。最近の知見から特殊なCD8T細胞が抗原特異的免疫抑制反応に関与している事が示唆されているが、そういった機能を持った細胞集団の大部分は未だ同定されていない。本研究では、申請者が見出した新しい制御性T細胞の生体内での機能を明らかにすることを目指しており、この細胞の解析から、免疫反応を制御する新しいメカニズムの発見が期待される。このような研究によってもたらされる免疫抑制機構に関する知見は、様々な過剰な免疫反応によって誘導される自己免疫疾患や過敏症に対する新規治療法の開発にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The acquired immune response is mediated by lymphocytes, which express highly diverse receptors. After lymphocytes specifically recognize the antigen through their specific receptors, immune reactions started. Thus, immune responses of lymphocytes are specific for distinct antigens. This system provides big benefit when invaded by microbes or virus. During the normal course of immune reactions, excessive immune reactions will provide adverse effect. To minimize such kind of adverse effect, existence of antigen-specific immune suppression was proposed, but not clearly demonstrated yet. In this regard, we have found that new CD8T cells derived from CD4 T cells will work as immune regulatory cells at least in some experimental settings. In this project, we intended to develop the monitoring system, which visualize CD4-derived CD8 T cells in vivo, and the depleting method of these cells for evaluating the function of such cells in various immune reactions in vivo.

研究分野：分子生物学 分子免疫学

キーワード：CD8T 免疫寛容 慢性炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗原特異的受容体を持つリンパ球は、自身の発現する抗原受容体によって自己・非自己を識別し、外来抗原に対しては免疫反応・自己抗原に対しては免疫寛容が誘導されることが知られている。さらに実際の免疫反応においては、生体防御に必要な免疫反応であっても過剰な反応は有害であり、これを抑える抗原特異的な負の制御機構の存在も想定されているが、その実態は不明である。最近の発見から、活性化 T 細胞や、特定の抗原特異的な T 細胞を、選択的に抑制する機能を持った CD8T 細胞の存在が明らかになってきた。しかし、このような性質（抗原特異的免疫抑制作用）を持った CD8 T 細胞 (CD8aa もしくは CD8ab) の同定はまだ限定的であり、免疫反応全体におけるそれぞれの細胞の機能や役割に関する知見もほとんど蓄積されていない。これに関連する細胞として、私たちは、免疫反応に伴って『CD4T 細胞から分化誘導される CD8aaT 細胞』を同定し、この細胞が『免疫抑制反応に関与』している事を見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、私たちが見出した新規 CD8T 細胞 (CD4 由来 CD8aaT 細胞) の機能を更に詳細に解析するためのツールとなるマウスの作成を目指す。具体的には CD4 から分化した CD8aaT 細胞を生体内で観察することの出来るマウスを作成する事に加え、この細胞を特異的に除くことの出来るマウスも作成する。これらのマウスを用いることによって、「CD4 由来 CD8aaT 細胞」の生体内における機能を解析する事が可能になる。

3. 研究の方法

まず、「CD4 由来 CD8T 細胞」を生体内で可視化できるマウスの作成を目指す。具体的には、CD4T 細胞特異的な転写因子である ThPOK 遺伝子座に Cre をノックインしたマウスを作成する(マウス 1)。CAG プロモーター下に、二つの LoxP サイトで挟んだ STOP を含む DNA 配列をおき、その後に EGFP の cDNA を持つコンストラクションを使ってトランスジェニックマウスを作成する(マウス 2)。マウス 1 とマウス 2 で可視化がうまくいかなかった場合に備えて、ThPOK 遺伝子座に CreERT2 をノックインしたマウスを作成する(マウス 3)。さらに CD8a 遺伝子座にジフテリア毒素の受容体 (DTR) をノックインしたマウスを作成する(マウス 4)。

次に、「CD4 由来 CD8T 細胞」を生体内で特異的に除くことが出来るマウスの作成を目指す。具体的な詳細は省略する (マウス 5)。

これらのマウスを適切に掛け合わせることによって上記目的にかなったマウスを作成する。

4. 研究成果

この研究において、上記のマウス(マウス 1~マウス 5)の作成が終了したため、目的の用途に使用できるか否かの検証を行った。

「CD4 由来 CD8T 細胞」を生体内で可視化できるマウスの作成：上記マウスの掛け合わせによって、マウス 1 とマウス 2 のヘテロマウス (ThPOK 遺伝子座は +/Cre)(トランスジーンを組み込んだ遺伝子座は +/CAG-LoxP-STOP-LoxP-EGFP)を作成し実験を行った。このマウスで CD4T 細胞が特異的に EGFP+にマーキングされれば、CD4 から分化した CD8T 細胞は CD8+EGFP+となり、もともとの CD8T 細胞 (CD8+EGFP-)とは区別出来るはずである。しかし実験の結果、このマウスでは CD4T 細胞を特異的に EGFP+にマーキングすることは出来なかった。[この実験がうまくいかなかった原因]すべての T 細胞は分化の過程で一時的に CD4 と CD8 を共に発現する時期(CD4+CD8+T 細胞)を経て、最終的に CD4T 細胞と CD8T 細胞に分化することが知られている。ThPOK はもともと CD4T 細胞に特異的な転写因子であると考えられていたが、おそらく未分化な CD4+CD8+T 細胞の時期にも発現があり、その結果全ての T 細胞で Cre の発現が誘導され、EGFP トランスジーン の組換え反応が起こってしまった。[対応]そこで、マウス 3、マウス 2、マウス 4 のヘテロマウス (ThPOK 遺伝子座は +/CreERT2)(+/CAG-LoxP-STOP-LoxP-EGFP)(CD8a 遺伝子座は +/DTR)を作成して実験を行った。今回は LoxP サイトの組換え酵素である Cre を CreERT2 したため、タモキシフェン添加に依存した組換え反応を誘導できるメリットがある。さらに、CD8a 遺伝子座に DTR をノックインしているため、ジフテリアトキシンを添加することによって、CD8a を発現している細胞を特異的に殺すことが出来るトリックを使用している。このマウスにタモキシフェンとジフテリアトキシンを加える事(マーキング操作)によって、未分化な CD4+CD8+T 細胞と成熟した CD8T 細胞は除かれ、成熟した CD4T 細胞が特異的に EGFP+となるはずである。実際の実験においても、CD4T 細胞は特異的に EGFP+になっていた事からこのマーキング操作は機能している事が確かめられた。従ってこのマウスは CD4 由来 CD8T 細胞を可視化できることがわかった。実際の実験は、マーキング終了後のマウスをタモキシフェンとジフテリアトキシンフリーの状態 で維持することによって、通常の CD8T 細胞の回復を待ってから行う予定である。

「CD4 由来 CD8T 細胞」を生体内で特異的に除くことの出来るマウスの作成：マウス 5 を用いて

表題に示す実験を行った。しかしこの実験はうまくいかなかった。現在、機能しなかった原因を調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sugie Tomoharu, Ikeda Takafumi, Kawaguchi Atsushi, Shimizu Akira, Toi Masakazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Sentinel lymph node biopsy using indocyanine green fluorescence in early-stage breast cancer: a meta-analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 11~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-016-1064-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda Takafumi, Sugie Tomoharu, Shimizu Akira, Toi Masakazu	4. 巻 24
2. 論文標題 Patterns of clinical practice for sentinel lymph node biopsy in women with node-negative breast cancer: the results of a national survey in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 341~344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-016-0720-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saito Kazuyuki, Takahashi Katsu, Huang Boyen, Asahara Masakazu, Kiso Honoka, Togo Yumiko, Tsukamoto Hiroko, Mishima Sayaka, Nagata Masaki, Iida Machiko, Tokita Yoshihito, Asai Masato, Shimizu Akira, Komori Toshihisa, Harada Hidemitsu, MacDougall Mary, Sugai Manabu, Bessho Kazuhisa	4. 巻 8
2. 論文標題 Loss of Stemness, EMT, and Supernumerary Tooth Formation in Cebp ^β /?Runx2+/? Murine Incisors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-23515-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kumagai, M., Minakata, K., Masumoto, H., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Ikeda, T., Uehara, K., Yamazaki, K., Ikeda, T., Matsubara, K., Yokode, M., Shimizu, A., Tabata, Y., Sakata, R. and Minatoya, K.	4. 巻 33
2. 論文標題 A therapeutic angiogenesis of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel sheets in a canine chronic myocardial infarction mode.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 2151-2157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-018-1185-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Isobe, Y., Takahashi, K., Kiso, H., Nakao, K., Ikeno, M., Koyama, N., Sugai, M., Shimizu, A., Haga, H. and Bessho, K.	4. 巻 93
2. 論文標題 Direct evidence for the age-dependent demise of GNAS-mutated cells in oral fibrous dysplasia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arch. Oral Biol.	6. 最初と最後の頁 133-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2018.05.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamura, K., Izumi, Y., Banno, H., Uozumi, R., Morita, S., Egawa, N., Ayaki, T., Nagai, M., Nishiyama, K., Watanabe, Y., Hanajima, R., Oki, R., Fujita, K., Takahashi, N., Ikeda, T., Shimizu, A., Morinaga, A., Hirohashi, T., Fujii, Y., Takahashi, R. and Inoue, H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cell-based drug repurposing for amyotrophic lateral sclerosis medicine (iDReAM) study: Protocol for a phase I dose escalation study of bosutinib for amyotrophic lateral sclerosis patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e033131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2019-033131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maeda, M., Tanabe-Shibuya, J., Miyazato, P., Masutani, H., Jun-ichirou Yasunaga, J.-i., Usami, K., Shimizu, A. and Matsuoka, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 IL-2/IL-2 receptor pathway plays a crucial role in the growth and malignant transformation of HTLV-1-infected T cells to develop adult T-cell leukemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	菅井 学 (SUGAI MANABU) (90303891)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	