

令和 5 年 4 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09371

研究課題名(和文) unconventional T細胞による腸管抗原の取り込み/提示経路の証明

研究課題名(英文) Analysis of unconventional T cells as novel antigen presenting cells

研究代表者

根本 泰宏 (Nemoto, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20456213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々はマウスCD4-CD8⁻-TCR⁺T(Double Negative:DNT)細胞がMHC class-IIを高発現し、in vitroにおいて高い抗原取り込み能と抗原提示能を有することを発見した。また、2光子顕微鏡を用いた小腸粘膜T細胞のin vivo live-imaging法を新たに開発し、DNT細胞が最も高率に上皮間に存在し、管腔抗原と接触することが分かった。

T細胞特異的なMHC class-II欠損マウスを作成したところ、インドメタシン小腸潰瘍およびDSS腸炎の著明な悪化がみられ、本経路は腸管粘膜における免疫寛容に重要な働きを有する事が分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討ではこれまであまり機能の分かっていなかったDNT細胞のユニークな特徴を明らかにした。DNT細胞は遺伝子的にはT細胞に非常に似ており、形態的にはアメーバ様で高い運動能を有し、MHC-IIを発現し、高い抗原取り込み能、抗原提示能を有する。腸管粘膜免疫機構がいかにして抗原に対して炎症と免疫寛容を振り分けるのかという粘膜免疫機構における最重要命題の一端が明らかになるのみならず、炎症性腸疾患、食物アレルギー、大腸癌などの病態生理と新規治療法、有効な粘膜免疫ワクチンの開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Here, we show that murine DNTs in the small intestine (SI) reach across the epithelial barrier to capture luminal antigens. A sizeable fraction of DNTs in Peyer's patches (PPs), Mesenteric lymph nodes (MLNs) and among LPLs, but not among IELs, express MHC-II, but little or no classical co-stimulatory molecules, suggesting that DNT-mediated antigen presentation to naive CD4⁺ T cells may trigger tolerogenic rather than effector responses. Indeed, DNTs acquire, process and present antigenic proteins and anergize antigen-specific CD4⁺ T cells. Surprisingly, ex vivo antigen presentation experiment showed that DNTs were the most effective intestinal antigen uptake/process/presentation pathway in PP. Conditional genetic ablation of MHC-II in T cells disabled this suppressive function and rendered mutant mice hypersusceptible to DSS colitis.

研究分野：腸管免疫

キーワード：腸管免疫 腸管上皮間細胞 double negative T細胞 抗原提示細胞 クローン病

1. 研究開始当初の背景

「内なる外」である腸管には食事抗原や腸内細菌抗原など莫大な量の外来抗原が存在する。腸内細菌の数は **100** 兆個とも言われておりヒトの全細胞数を上回る。腸管は外来抗原の混沌の中から栄養素や水分を取り込む一方で、微生物の侵入をブロックしなくてはならない。このようなアンビバレントな責務をこなす恒常性を維持するために、腸管は高度に発達した腸管粘膜免疫機構を有している。本機構により腸管は病原性のある微生物や悪性新生物を排除する(炎症)一方で、食事抗原や無害な共生細菌に対しては過剰な免疫応答を抑制している(免疫寛容)。健全な腸管では炎症と免疫寛容のバランスがとれているが、バランスが崩れれば易感染性や発癌、炎症性腸疾患、食物アレルギーにつながる。

ある抗原に対して起こす免疫反応が炎症か免疫寛容かを決定するためにはその抗原を認識する必要がある。そこで腸管は管腔抗原を取り込むための特殊な機構を有する。腸管において外界と体内を隔てるのはたった一層の上皮細胞層である。この単層の腸管上皮細胞層は管腔抗原を取り込むための幾つかの門戸を有する。古典的な経路として、パイエル板管腔側に点在にする **M** 細胞は管腔抗原を取り込み、パイエル板内の樹状細胞がそれを捕捉する。更に、**2001** 年に **CX₃CR1**+マクロファージが腸管上皮細胞層のタイトジャンクションに樹状突起を挿入し、直接管腔抗原を捕捉するという驚くべき経路が発見された(**Rescigno M et al, Nat Immunol 2001**)。 **2012** 年には上皮細胞層に点在し、粘液を産生する杯細胞が低分子抗原を取り込み、粘膜内の **CD103**+樹状細胞に引き渡すという経路が発見された(**McDole JR et al, Nature 2013**)。

このように消化管における抗原の取り込みは非常にユニークであるが、さらに重要なのは、取り込み経路によって誘導される免疫反応のアウトプットが異なる点である。すなわち、**M** 細胞の経路からは **IgA** 産生形質細胞が、**CX₃CR1**+マクロファージの経路では微生物に対する防御免疫反応が、杯細胞からの取り込み経路からは制御性 **T** 細胞が誘導される。

このように、腸管からの抗原取り込み経路は炎症と免疫寛容を振り分ける鍵となるシステムであるが、その一方で本機構には未だ不明な点が多く残されている。これらの門戸以外にも腸管上皮細胞層には非常に特徴的な機構が存在する。腸管上皮間リンパ球、**IEL (intraepithelial lymphocytes)** である。**IEL** は上皮細胞間隙に存在する **T** 細胞である。その数は非常に多く、脾臓の全 **T** 細胞数にも匹敵する。**IEL** は通常の **CD4**+**T** 細胞、**CD8** +**T** 細胞以外に **T** 細胞や **CD4****CD8** -**TCR** +**T (Double Negative: DNT)** 細胞など、末梢血では数%に満たない特殊な細胞を **40-60%**と、非常に多く含む。前者は出生時には少なく、年齢とともに増加することから **induced IEL**、後者は出生時に多く、年齢とともに減少することから **Natural IEL** と定義される。**Natural IEL** は **unconventional (非通常性)** **T** 細胞とも呼ばれ、オリゴクローナルな自己反応性 **TCR** を有し、**Natural Killer** 細胞受容体を発現するなど多くの点で **induced IEL** と異なる。その発生過程や表面マーカーから、**Natural IEL** は原始的な細胞群であることが推測されるが、実際 **T** 細胞は獲得免疫のみでなく、自然免疫的な機能を有している。

このように、**IEL** は粘膜免疫の最前線に存在し、その多くは原始的な **unconventional T** 細胞であり、その機能には不明な点が多いことから、私は **Natural IEL** の一部が腸管上皮間隙から直接管腔抗原を拿捕し、粘膜固有層、更に二次リンパ装置に **migration** し、ナイーブ **CD4**+**T** 細胞に対する抗原提示細胞として機能するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究期間内において①**Natural IEL** が **MHC クラス II** を発現するか、②**Natural IEL** が腸管腔抗原を取り込むか、③**Natural IEL** が **CD4**+**T** 細胞に対する抗原提示能を有するか、④本機構の腸管免疫恒常性における役割、⑤本機構のヒト炎症性腸疾患病態生理における役割を明らかにする。

本経路が明らかになれば、腸管粘膜免疫機構がいかんして抗原に対して炎症と免疫寛容を振り分けるのかという粘膜免疫機構における最重要命題の一端が明らかになるのみならず、炎症性腸疾患、食物アレルギー、大腸癌などの病態生理と新規治療法、有効な粘膜免疫ワクチンの開発に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法と成果

1. DNT 細胞は MHC II を発現する

樹状細胞やマクロファージ、B 細胞などプロフェッショナルな抗原提示細胞は **MHC-II** を恒常的に発現する。他方好塩基球など一部の細胞は一時的に **MHC-II** を発現することが知られている。実際ヒト **T** 細胞は活性化すると **MHC-II** を発現することが知られているがマウスの **T** 細胞は **MHC-II** を発現しないと考えられて来た。他方でマイクロアレイ等の結果からマウス脾臓の **T** 細胞は **MHC-II** を低発現するとの報告もある。腸管は **T** 細胞の宝庫であるが **IEL** の **MHC-II** 発現に関しては報告がない。そこで我々はマウスの小腸 **IEL**, **LPL**, **パイエル板**, **腸間膜リンパ節**, **脾臓**における **T** 細胞各分画における **MHC-II** の発現を検討した。驚くべきことに **T** 細胞よりも **DNT** 細胞が特に **LPL**, **PP**, **MLN** において **MHC-II** を高発現することが分かった。**IEL** では

CD3⁺を含め、MHC-II の発現が低下していたのに対して PP では全体的に上昇傾向であった。

2. DNT 細胞の MHC-II は週令、腸内細菌に依存する

ではなぜこれまでマウスの T 細胞は MHC-II を発現しないと考えられて来たのか。我々は多くのマウスを解析した結果、6 週令の幼弱なマウスでは小腸 IEL, LPL, PP における MHC-II の発現が弱く、他方 10 週令のマウスでは高発現していることを発見した。小腸および GALT の T 細胞における MHC-II の発現は腸管粘膜免疫機構の成熟度と比例しているのかもしれない。幼弱なマウスでは T 細胞や DNT 細胞など natural IEL が多いが、成長するにつれて CD4⁺ T 細胞や CD8⁺ T 細胞が増加することが知られている。実際小腸 LPL において CD8⁺ T 細胞数と DNT 細胞における MHC-II の発現には相関が見られた。

3. DNT 細胞は in vitro において強い抗原貪食能を有する

以上の結果から我々は DNT 細胞に着目した。DNT 細胞は CD8⁺ T 細胞などとも呼称され、T 細胞同様 natural IEL に分類される。自己反応性の TCR を有すること、腸炎に対しては抑制的に働くことが知られているがその機能に関しては不明な点が多く、“忘れ去られた分画”である。

我々は小腸 IEL, LPL における各分画のマイクロアレイを行ったところ、DNT 細胞ではこれまでに知られている NK 細胞マーカーを発現するのみでなく、エンドサイトーシスや抗原提示に関与する遺伝子を発現することが分かった。

そこで in vitro における抗原貪食能を検討する目的で、フローサイトメーターにより分取した各分画と DQ-OVA を供培養し、5 時間後の細胞の蛍光発現を検討した。結果、驚くべきことに DNT 細胞は腸間膜リンパ節の CD11c⁺細胞よりも強い抗原の取り込み能を有していた。T 細胞も DNT の半分程度の取り込み能を有していたが、CD4⁺, CD8⁺ T 細胞ではほとんど取り込みは見られなかった。

抗原提示細胞がナイーブな CD4⁺T 細胞を活性化するには CD80 などの供刺激分子のシグナルが必須である。そこで我々は DNT 細胞における CD80, CD86, CD40 の発現を検討した。結果、MHC-II と異なり、DNT 細胞では供刺激分子の発現はほとんど見られなかった。

4. DNT 細胞は in vivo において強い抗原貪食能を有する

続いて我々は in vivo における DNT 細胞の抗原取り込み能を検討した。麻酔下のマウスを開腹し、小腸を取り出し、5cm の区間を結紮し、腹腔内に 31G の針でデキストラン-Alexa Flour488 を腹腔内投与し、リークが無いことを確認してから閉腹し、5 時間後の各臓器における取り込みを確認した。

結果、小腸 IEL, LPL, PP において DNT 細胞による AF488 の強い取り込みが確認された。他方、この時点では腸間膜リンパ節や脾臓において AF488⁺細胞はほとんど見られなかった。

5. DNT 細胞および T 細胞は in vitro において抗原提示能を有する

次に我々は DNT 細胞の抗原提示能を検討した。フローサイトメーターにて分取した IEL あるいは LPL を CFSE でラベルした OT-II x TCR^{α/β} 由来 CD4⁺ T 細胞と供培養し、Full-length の OVA 蛋白を添加し、4 日後の CFSE 蛍光をフローサイトメーターで測定した。結果、IEL においても LPL においても DNT 細胞は OT-II 細胞を増殖させることは出来なかった。そこで我々は MHC-II の発現が高い PP の DNT 細胞を用いることにした。パイエル板における各分画について同様の検討を行ったところ T 細胞、DNT 細胞は抗原提示能を有することが分かった。その一方で、DNT 細胞に抗原提示された OT-II CD4⁺ T 細胞数は CD11c⁺に抗原提示された細胞に比して少なく、またサイトカイン分泌能も著しく低かった。このことから DNT 細胞は供刺激分子不在の抗原提示によってアナジーを誘導したと考えられた。

6. DNT 細胞は in vivo imaging において管腔抗原と補足する

実際に DNT 細胞が生体内において管腔抗原を拿捕するのかが検討する目的にマウス小腸の in vivo live imaging を行った。全ての T 細胞に GFP が発現する DPE-GFP マウス、T 細胞に GFP が発現する Tcrd-GFP マウス、マクロファージに GFP が発現する CX₃CR1^{GFP} マウスの Imaging を行った。DPE-GFP マウスは pDC など T 細胞以外にも GFP が発現するという報告もあり DPE-GFP x RAG2^{-/-} マウスでも検討を行った。結果、DPE-GFP, Tcrd-GFP マウスでは GFP 陽性細胞が上皮間に多数存在し、LP をダイナミックに運動しているのに対して DPE x RAG^{-/-}および CX₃CR1^{GFP} マウスでは細胞の運動能は低く、上皮間への突出もほとんど見られなかった。

さらに DPE-GFP マウスでは上皮間のみならず管腔側へ突出する細胞を非常に多く認めた。さらに管腔内へデキストランを投与し 3 時間後の Imaging を行ったところ管腔抗原を拿捕する T

細胞が確認できた。

本検討ではこれまであまり機能の分かっていなかった DNT 細胞のユニークな特徴を明らかにした。DNT 細胞は遺伝子的には T 細胞に非常に似ており、形態的にはアメーバ様で高い運動能を有し、MHC-II を発現し、高い抗原取り込み能、抗原提示能を有する。このような機能が皮膚や肺など他臓器の DNT 細胞にもみられるのか、また DNT 細胞が腸管疾患に果たす役割について現在検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takei Yuria, Nemoto Yasuhiro, Morikawa Ryo, Tanaka Shohei, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Watanabe Mamoru	4. 巻 523
2. 論文標題 CD8 + T cells show amoeboid shape and frequent morphological change in?vitro, and localize to small intestinal intraepithelial region in?vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 328 ~ 335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.12.021	査読の有無 無
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 Tanaka Shohei, Nemoto Yasuhiro, Takei Yuria, Morikawa Ryo, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Okamoto Ryuichi, Tsuchiya Kiichiro, Nakamura Tetsuya, Stutte Susanne, Watanabe Mamoru	4. 巻 522
2. 論文標題 High-fat diet-derived free fatty acids impair the intestinal immune system and increase sensitivity to intestinal epithelial damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 971 ~ 977
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.11.158	査読の有無 無
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	渡辺 守 (Watanabe Mamoru) (10175127)	東京医科歯科大学・高等研究院・特別荣誉教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------