

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19253

研究課題名（和文）免疫と脳の記憶をつなぐシナプス形成制御の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms linking the immune and brain synapse formation

研究代表者

高田 健介（Takada, Kensuke）

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：40570073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、記憶Tリンパ球による迅速で強力な抗原応答を可能にする分子機構の解明を目的とし、神経シナプスの形成に重要なニューロトリプシンが、記憶Tリンパ球と抗原提示細胞との間で形成される免疫シナプスの制御を介して免疫記憶応答に関与する可能性を検討した。記憶Tリンパ球においてニューロトリプシンの顕著な発現上昇が認められたものの、ニューロトリプシンの欠損がTリンパ球の記憶応答に与える明らかな影響は、これまでのところ確認されていない。今後、実験系を工夫し更なる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスや細菌、腫瘍細胞に対する防御を担うTリンパ球の記憶メカニズムを解明し、細胞性免疫応答を誘導可能なワクチンの開発基盤を形成することは、医学・獣医学領域における重要課題である。神経シナプスの形成に重要なニューロトリプシンが、記憶Tリンパ球において高いレベルで発現されるという本研究の知見は、記憶Tリンパ球による迅速で強力な応答のメカニズムを解明する足がかりとなり得る。現時点で、ニューロトリプシンがTリンパ球の記憶応答に関与することを示す直接的な証拠は得られていないものの、今後の検討によって、免疫記憶の基本原則の解明と新たなワクチン戦略につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to reveal the molecular mechanisms underlying the rapid and strong response of memory T lymphocytes to cognate antigens. We examined the involvement of neurotrypsin, which is important for the formation of neurological synapse, in immune memory responses through the regulation of immunological synapse formed between memory T lymphocytes and antigen-presenting cells. Expression of neurotrypsin was significantly increased in memory T lymphocytes. However, in the experiments performed thus far, clear effects of neurotrypsin deficiency on the memory response of T lymphocytes have not been observed. Further examinations using different experiment systems will be required in the future.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶 T細胞

1. 研究開始当初の背景

過去に感染した病原体が再び体内に侵入すると、より迅速で強力な免疫応答が生じ、病原体は速やかに排除される。この現象は免疫記憶と呼ばれ、ワクチンの基本原理として、人類社会を感染症の脅威から守り、ヒトと自然の共存に多大な貢献を果たしてきた。免疫記憶の本体は、活性化後、長期にわたって体内で維持される記憶リンパ球であるが、その迅速で強力な抗原応答を可能にする分子機構は解明されていない。ウイルスや細菌、腫瘍細胞に対する防御を担う T リンパ球の記憶メカニズムを解明し、次世代ワクチンの開発基盤を形成することは、医学・獣医学領域における重要課題である。そもそも免疫記憶という言葉は近代免疫学の草創期の 1880 年代、免疫系がもつ病原体特異的な再感染防御機能を脳の記憶に例えた造語に過ぎず、脳の記憶と免疫記憶の関連が分子レベルで実証された例はない(Zinkernagel 2012 Cell Mol Life Sci)。本研究代表者らは、神経シナプスの形成を促すことで脳の記憶を担うニューロトリプシンが(M Luz et al., 2006 Cell; Matsumoto-Miyai et al., 2009 Cell; Tidow et al., 2010 Trend Biochem Sci)、記憶 T リンパ球にも高いレベルで発現されることを独自に見出した。ニューロトリプシンはアグリンというプロテオグリカン分子を活性化することで神経シナプス形成を促すが、興味深いことに、アグリンは T リンパ球と抗原提示細胞の間で形成される免疫シナプスと呼ばれる構造にも関わることが報告されている(Matsumoto-Miyai et al., 2009 Cell; Tidow et al., 2010 Trend Biochem Sci)。

2. 研究の目的

以上の背景から、研究代表者らは、ニューロトリプシンの発現が高い記憶 T リンパ球と抗原提示細胞との間では、強力な免疫シナプスの形成によってより安定的な相互作用が生じ、迅速で強力な抗原応答につながるという興味深い仮説に至った。よって本研究では、中枢神経系に高いレベルで発現され、その変異や欠損が精神遅滞や長期記憶の障害といった脳高次機能の異常を引き起こすニューロトリプシン(Molinari et al., 2002 Science; Didelot et al., 2006 Science; Mitsui et al., 2009 Eur J Neurosci)に着目し、当該分子が記憶 T リンパ球の機能に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)モノクローナル T リンパ球を用いた抗原特異的記憶 T リンパ球の作成：抗原特異的な記憶 T リンパ球を作成するため、モデル抗原である卵白アルブミンに特異的な OT-I 抗原受容体トランスジェニックマウスの二次リンパ組織からナイーブ CD8⁺ T リンパ球を磁気ビーズ法とソーティングにより単離した。この細胞をレシピエントマウスに養子移入し、その後、以下の方法で免疫応答を誘導した。ニューロトリプシン発現解析の一部では、卵白アルブミン由来ペプチド(SIINFEKL)でパルスした樹状細胞と CpG の投与により免疫応答を誘導した。その他の実験では、卵白アルブミン発現リステリア菌をレシピエントマウスに感染させた。抗原応答から 50 日以上のドナー T リンパ球を記憶細胞としてレシピエントマウスの二次リンパ組織から単離し、実験に使用した。発現の解析には定量的 PCR 法を用いた。

(2)ニューロトリプシン欠損 T リンパ球を用いた検討：OT-I 抗原受容体トランスジェニックマウスとニューロトリプシン欠損マウスを交配し、ニューロトリプシン欠損 OT-I T リンパ球を得た。レシピエントマウスに移入後、卵白アルブミン発現リステリア菌感染により免疫応答を誘導し、レシピエントマウス脾臓中のドナー細胞の数と表現型を経時的に検討した。さらに、単離した記憶 T リンパ球を別のレシピエントマウスに養子移入し、血液中のドナー細胞を検出することで、二次応答を評価した。また、レシピエントマウスの二次リンパ組織から単離した記憶 T リンパ球と、卵白アルブミンペプチドでパルスした EL4 細胞を混合したのち、一定時間後に、ピペッティングによる再懸濁と PFA 固定を行い、両細胞の接合を FACS 解析で検討した(conjugate assay)。

4. 研究成果

(1)T リンパ球におけるニューロトリプシンの発現解析：T リンパ球は活性化によって急激に増殖しエフェクター細胞となるが、その後 90%以上が死滅し、ごく一部の細胞が長期生存の記憶細胞へと分化する。そこで、OT-I T リンパ球ならびに卵白アルブミン由来ペプチドでコートした樹状細胞をレシピエントマウスに養子移入し、ドナー OT-I T 細胞に対し *in vivo* で抗原刺激を加えた。エフェクター細胞期に相当する抗原刺激後 5~15 日目、ならびに記憶期に相当する抗原刺激後 60 日目にレシピエントマウスの二次リンパ組織からドナー T リンパ球を単離し、ニューロトリプシンの発現を定量的 PCR で解析した。エフェクター T リンパ球の分化に重要とされている T-bet や Blimp-1 の発現は、抗原刺激直後から上昇していた。記憶 T 細胞の分化を担うとされる Eomes や Bcl-6 はナイーブ T リンパ球にも発現され、抗原刺激によって一時減少するが、記憶形成に伴い徐々に回復する傾向が見られた。一方、ニューロトリプシンの発現は、ナイーブ T リンパ球およびエフェクター T リンパ球に比べ、記憶 T リンパ球で顕著に高い傾向が認められた。さらに、KLRG1 と CD62L の発現をもとに単離された 3 つの記憶 T リンパ球亜集団の間で、ニューロトリプシンの発現に大きな違いは認められなかった。同様に、一次応答後に形成される一次記憶 T リンパ球と二次応答後に出現する二次記憶リンパ球の間でもニューロトリプシンの発

現に顕著な違いは見られなかった。

(2) 細菌感染に対するニューロトリプシン欠損 T リンパ球の応答：ニューロトリプシン欠損 OT-I T リンパ球をレシピエントマウスに養子移入した後、卵白アルブミン発現組換えリステリア菌を感染させた。レシピエントマウスから経時的に採血し、CD8 T リンパ球中に占めるドナー細胞の頻度を検討した結果、感染から 7 日後、15 日後のエフェクター期、および 45 日後の記憶期において、ニューロトリプシン欠損 T リンパ球は野生型と同様の増殖と退縮を示した (図 1A)。エフェクター T リンパ球および記憶 T リンパ球は表面抗原の発現パターンによって複数のサブセットに分類される。CD127 と KLRG1 はエフェクター T リンパ球の記憶 T リンパ球の系譜を区別するために使われる一般的なマーカーであるが、感染 7 日後から 45 日後までのレシピエント血液中に存在するニューロトリプシン欠損 T リンパ球と正常 T リンパ球の間に、大きな違いは認められなかった (図 1B)。また、CD62L や CD27、CD43 は、記憶 T リンパ球を機能的に分類する際のマーカーとして一般的に使用されるが、感染 50 日後のレシピエント脾臓中に含まれるドナー T リンパ球を解析したところ、欠損群と対照群の間で、これらのマーカーを発現する細胞の比率に顕著な違いは認められなかった (図 1C)。レシピエント脾臓中の CD8 T リンパ球に占めるドナー細胞の頻度、ならびにドナー T リンパ球の絶対数も両群で同程度であった (図 1D)。

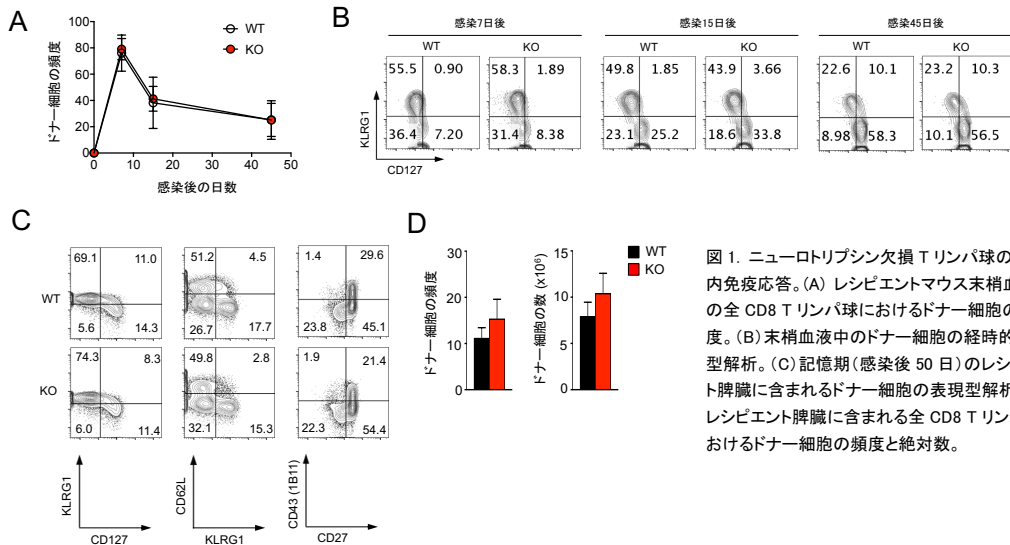


図 1. ニューロトリプシン欠損 T リンパ球の生体内免疫応答。(A) レシピエントマウス末梢血液中の全 CD8 T リンパ球におけるドナー細胞の頻度。(B) 末梢血液中のドナー細胞の経時的表現型解析。(C) 記憶期 (感染後 50 日) のレシピエント脾臓に含まれるドナー細胞の表現型解析。(D) レシピエント脾臓に含まれる全 CD8 T リンパ球におけるドナー細胞の頻度と絶対数。

(3) ニューロトリプシンの欠損が記憶 T リンパ球の機能に及ぼす影響：二次応答 (記憶応答) におけるニューロトリプシンの役割を検討する目的で、ニューロトリプシン欠損および野生型記憶 OT-I T リンパ球を別のレシピエントマウスに養子移入後、卵白アルブミン発現組換えリステリア菌感染させた。その結果、二次感染から 5 日目までの増殖応答に両群で有意な違いは認められなかった (図 2A)。さらに、記憶 T リンパ球と抗原提示細胞の相互作用およびシナプス形成へのニューロトリプシンの関与を検討するため、ニューロトリプシン欠損および野生型の記憶 OT-I T リンパ球を抗原保持細胞と混合し、接合細胞の割合を経時的に検討したところ、両群で同程度であった (図 2B)。

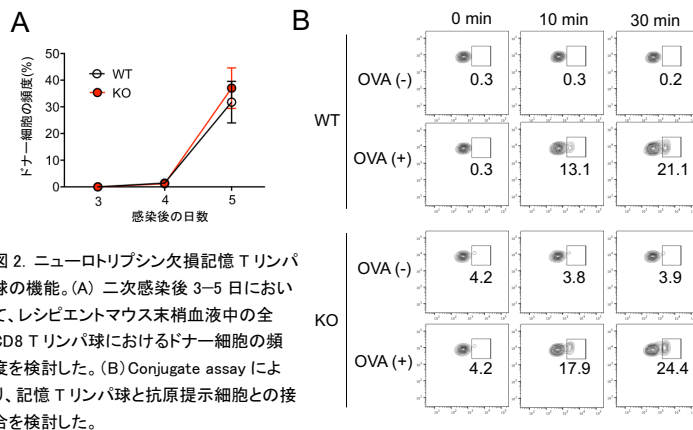


図 2. ニューロトリプシン欠損記憶 T リンパ球の機能。(A) 二次感染後 3-5 日において、レシピエントマウス末梢血液中の全 CD8 T リンパ球におけるドナー細胞の頻度を検討した。(B) Conjugate assay により、記憶 T リンパ球と抗原提示細胞との接合を検討した。

(4) 考察：本研究のこれまでの検討では、ニューロトリプシンが記憶 T リンパ球の分化や機能に影響を与えることを示唆する明らかなデータは得られなかった。本研究で用いた OT-I T リンパ球は、特異的な抗原である卵白アルブミン由来ペプチドとの親和性が非常に高いことが知られており、ニューロトリプシンによる細胞間相互作用の増強効果が観察されにくかった可能性は否定できない。今後、卵白アルブミン由来ペプチドのアミノ配列を改変することで抗原との親和性を低下させ応答を観察することが有効かもしれない (参考文献 Khanom US st al., 2019 J Immunol)。あるいは、特異的な抗原に対してより親和性の低い他のモノクローナル抗原受容体発現 T リンパ球を用いる方法も考えられる。今後検討を重ね、ニューロトリプシンが記憶 T リンパ球の機能に関与するかについて、明確な結論を得る必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石橋 太心、Zimeng Cai、香西 美奈、高田 健介、稲葉 睦
2. 発表標題 核内受容体間の競合がCD8+ T細胞の活性化と記憶形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔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
連携研究者	稲葉 睦 (Inaba Mutsumi) (00183179)	北海道大学・大学院獣医学研究院・教授 (10101)	
連携研究者	山崎 淳平 (Yamasaki Jumpei) (20732902)	北海道大学・大学院獣医学研究院・特任准教授 (10101)	