様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　６ 月　９ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１９２６８

研究課題名（和文）メモリーT細胞を直接標的とした新規アジュバントの創出

研究課題名（英文）Study on a new ajuvant that induce memory T cells efficiently

研究代表者

服部　雅一（Hattori, Masakazu）

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：４０２１１４７９

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）：免疫記憶反応に重要な役割を果たしているメモリーT細胞の分化・誘導機構については不明な点が多い。本研究課題ではこのメモリーT細胞分化に関与するCD153分子の新しい機能について明らかにした。CD153を強制発現するマウスT細胞株ではTCRシグナルが強力に阻害されていた。このTCRシグナルの抑制は，CD153がCD3複合体に会合することにより，TCRαβから解離するためであることが明らかになった。この結果はCD153が新しい免疫チェックポイント分子として機能することにより，記憶T細胞分化に関与している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義
新興・再興感染症の制圧に重要な役割を担うワクチンは免疫記憶反応を誘導することにより機能するが，その効果はワクチン接種により誘導されるメモリーT細胞およびメモリーB細胞の量と質により決定される。これまで多くの研究がなされてきたが，まだそれらのメモリー反応を担う細胞群の分化・誘導機構については完全に理解されていない。今回の研究ではメモリーT細胞分化の制御に関与すると示唆されてきたCD153の新しい免疫チェックポイント分子としての機能を明らかにすることができた。この知見はワクチン開発のみならず癌や自己免疫疾患に対する治療薬の創出に直接的に結びつく成果といえる。

研究成果の概要（英文）：Mechanisms on the differentiation of memory T cells have been poorly understood. In the present study, we investigated the new function of a TNF superfamily molecule, CD153 in memory T cell differentiation. We found that a forced expression of CD153 strongly inhibited T cell antigen receptor (TCR) signaling in mouse T cell lines, EL-4 and 3A9 cells. The inhibition of TCR signaling was caused by the association of CD153 with the CD3 complex, which resulted in the dissociation of TCR alpha beta with CD3 complex. These results are consistent with the fact that CD153 functions as a new immune checkpoint molecule, suggesting the involvement in memory T cell differentiation through the checkpoint function.

研究分野：免疫学

キーワード：CD153　メモリーT細胞　CD3複合体　免疫チェックポイント分子

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

## １．研究開始当初の背景

新興・再興感染症の流行に対する有効性の高いワクチンの開発ためには免疫原性の高い病原体抗原の選択が重要である。さらにそのワクチンが成功するためには質の高い免疫記憶の誘導が必要となる。しかし多くの研究がなされてきたのにもかかわらず免疫記憶反応を担うメモリーT 細胞およびメモリーB 細胞の分化・誘導機構については不明な点が多く残されていた。

TNF スーパーファミリー分子である CD153 およびそのレセプターである CD30 の遺伝子破壊マウスではメモリーT 細胞の分化が阻害されていたことから，これらの分子がメモリーT 細胞の分化・誘導に関与することが示唆されていたが，その分子機構の詳細は全く不明であった。

## ２．研究の目的

本研究課題ではメモリーT 細胞の分化・維持に必要な CD153-CD30 相互作用の実体を明らかにし，メモリーT 細胞の人為的制御方法を開発する。

## ３．研究の方法

(1) CD153 遺伝子破壊マウスにおけるメモリー反応の解析

CD153 遺伝子破壊（CD153KO）マウスは九州大学生体防御研の吉開教授より分与された。8 週齢の CD153KO マウスおよび正常 B6 マウスに，アラムに混濁した 100μg NP-OVA を皮下注により免疫した。初回免疫 40 日後に 100μg NP-OVA 単独で腹腔内投与した。採血は初回抗原投与後 10，20，40 日および 54 日後に行った。NP 抗体価は NP-BSA を抗原とした ELISA 法にて抗 NP 抗体価を測定した。

(2) CD153 あるいは Clover-CD153 発現 EL-4 および 3A9 細胞の樹立

CD153 あるいは CD153 の N 末端側に Clover 蛋白（GFP 変異体）を付加した分子（Clov153）を発現するプラスミドをマウス T 細胞株，EL-4 および 3A9 細胞に electroporation 法にて導入，陽性細胞をソーティングにより単離した。

(3) CD153 会合分子の同定

Clov153-EL4 細胞の細胞膜を EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin（Thermo, #21335）にてビオチン化した後，CHAPS を用いて可溶化する。その可溶化液に GFP Trap ビーズ（Chromotek 社）を添加し 4℃1 時間反応させた。ビーズを可溶化バッファーで洗浄した後 SDS-PAGE 電気泳動し，予備実験で強いシグナルの見られた 20 kDa および 10 kDa 付近のバンドを切り出し回収。京都大学医学研究支援センター質量分析室にて解析を行った。

## ４．研究成果

I.  CD153KO マウスではメモリー反応が見られない。

これまで CD153 ならびにそのレセプターである CD30 をコードする遺伝子を欠損するマウスにおいてメモリーT 細胞分化が阻害されているという報告があったことから、まずその事実について確認を行った。図１A に示すように CD153 遺伝子破壊（CD153KO）マウスの T 細胞について解析を行ったところ、通常加齢に伴い増加してくる $PD\text{-}1^{+}CD4^{+}CD44^{high}CD62L^{low}$ のメモリー表現型（MP）を示す T 細胞集団が有意に減少していることが明らかとなった。次に外来抗原として OVA を免疫しこれに対する抗体産生反応を調べたところ、CD153KO マウスでは正常マウスで見られるメモリー反応がほとんど観察できないことが確認できた (図１B)。これらの結果はメモリーT 細胞の分化・成熟あるいはその維持に CD153 と CD30 の相互作用が必要であることを示している。

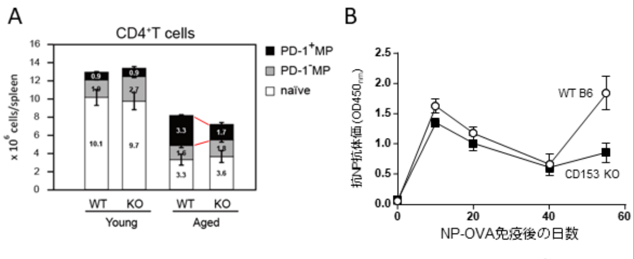


図1　CD153KOマウスではメモリーT細胞分化に異常があり，メモリー反応が起こらない

II. CD153 および CD30 は T 細胞の活性化により一時的に発現される。

すでに報告しているように CD153 は加齢に伴いリンパ組織において増加する老化関連 T 細胞でのみ検出されるが，その他の T 細胞ではほとんど検出されない。しかし上記の結果はメモリーT 細胞分化過程において必ずどこかで発現されることを示している。そこで次に CD153 や CD30 がいつ T 細胞に発現するかをフローサイトメトリー法により解析した。脾臓細胞から CD4T 細胞を精製し，抗 CD3 および抗 CD28 抗体で刺激後，経時的にそれらの分子の発現について解析を行ったところ，図 2 に示すように CD153 は刺激後 1 日目に発現し 3 日目には完全に消失した。これに対し CD30 は CD153 の発現に遅れ刺激後 2 日目に発現し，その発現は観察した 5 日目まで継続することが明らかとなった。この結果から T 細胞は CD153 を発現している約 1 日の間に B 細胞等の CD30 発現細胞との相互作用を介し，メモリーT 細胞分化に必要なシグナルの交換をしているものと考えられる。

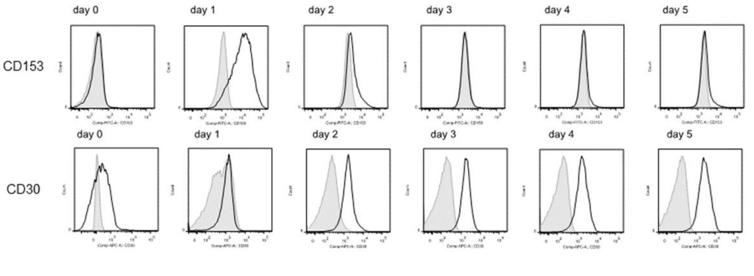

図2　CD4+T細胞においてCD153, CD30はTCR刺激後一過性に発現する。

III. CD153 は CD3 複合体と会合することにより TCR シグナルに対するブレーキとして機能する。

CD153KO マウスはメモリーT 細胞分化が阻害されている他，Th17 への分化異常やそれによる一部細菌に対する抵抗性に異常が生じていることが報告されているが，その分子機構についてはほとんど明らかになっていない。そこで CD153 分子の T 細胞における役割りを明らかにするため，マウス T 細胞株である EL-4 細胞を用いて CD153 を強制発現させ，その影響についての解析を行った。その結果，図 3A に示すように CD153 の強制発現により TCR 刺激後の IL-2 あるいは IL-4 産生が有意に抑制されることが明らかとなった。この CD153 発現による TCR 刺激後のサントカイン産生抑制は，抗原特異的 TCR を発現する 3A9 細胞を用いても確認できた。次にこの時の TCR 下流のシグナル分子動態をウェスタンブロットにより解析したところ，通常 TCR 刺激直後に観察できる Zap70 や Erk のチロシンリン酸化が抑制されていた（図 3B）。

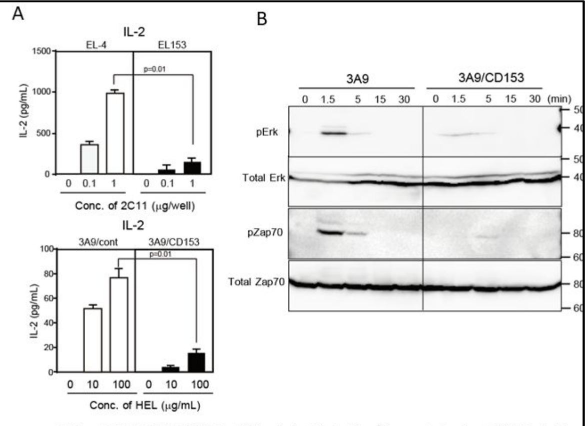

図3　CD153はTCRシグナルに対するブレーキとして機能する。

CD153 は細胞質領域が非常に短く，シグナル伝達に関与すると考えられるドメインを有していないことから， CD153 が TCR シグナル阻害効果を示すためには何らかの会合分子を介している可能性が考えられた。そこでこの可能性を検討するため CD153 強制発現 T 細胞株を用いて会合分子の解析を行った。CD153 の免疫沈降に使用できる抗体が存在しないため，CD153 の N 末端側に Clover 蛋白（GFP 変異体）を付加した分子をマウス T 細胞株である EL-4 細胞に発現させ（Clov153-EL4 細胞），GFP トラップを用いて免疫沈降し共沈物を TOFF-MASS にて解析した。その結果，CD153 に会合する分子としては Cofilin-1、PAICS (ADE2)および CD3 複合体（δ, ε, ζ）が同定された。図 4A に示すようにウェスタンブロット法での解析により CD153 は CD3 複合体（δ, ε, ζ 鎖）に加え CD3γ 鎖とも会合していること，293T 細胞を用いた強発現実験により CD153 は各 CD3 分子と単独で結合することが示された。一方，TCRαβ 鎖との直接会合は確認できていない。

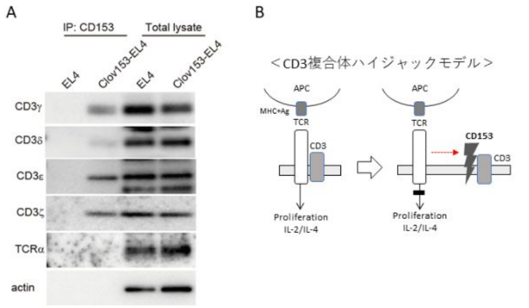

図4　CD153はCD3複合体と会合することによりTCRシグナルを抑制する

　このCD153発現によるTCRシグナル抑制に関わる分子機構としては，この会合実験結果と合わせて考えると，CD153がTCR複合体からCD3複合体を奪い取るためTCRシグナル抑制が引き起こされるという可能性が示唆される（CD3複合体ハイジャックモデル：図4B)。現在，この可能性については全反射顕微鏡（TIRFM）と抗原提示平面脂質二重膜とを融合した実験系により解析を行っている。

IV. CD153あるいはCD30-Igキメラ分子発現プラスミド投与はメモリーT細胞分化を誘導しない。

　現在のところ，CD153発現によるTCRシグナル抑制がメモリーT細胞分化においてどのような役割りを担っているか全く不明である。T細胞は過剰なTCRシグナルが入るとActivation-induced cell death (AICD)と呼ばれる現象が起こってT細胞が減少することが知られているが，抗原刺激による過剰なTCRシグナルが入ることを抑制することにより適当なT細胞クローンのプールを維持するように働いている可能性が高い。このCD153によるTCRシグナル阻害効果をコントロールできれば，メモリーT細胞分化を増強することが可能なることが考えられた。CD153あるいはCD30-Igキメラ分子発現プラスミドをマウスに投与し生体内でこれらの分子を産生させることによって両者の相互作用を変化できるかどうか検討を行ったが，ほとんど影響が認められなかった（結果に示さず)。CD153がCD3複合体と会合することによってTCRシグナルのブレーキ（免疫チェックポイント分子）として機能していることが判明した今，このブレーキ効果を制御するには両者の会合を変化させることができるシグナル系を明らかにする必要があると考え，現在，検討を進めている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Minato N, Hattori M, Hamazaki Y. | ４．巻<br>32 |
| ２．論文標題<br>Physiology and pathology of T-cell aging. | ５．発行年<br>2020年 |
| ３．雑誌名<br>International Immunology | ６．最初と最後の頁<br>223-231 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/intimm/dxaa006 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Fukushima Y, Minato N, Hattori M | ４．巻<br>38 |
| ２．論文標題<br>The impact of senescence-associated T cells on immunosenescence and age-related disorders. | ５．発行年<br>2018年 |
| ３．雑誌名<br>Inflammation and Regeneration | ６．最初と最後の頁<br>24-30 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s41232-018-0082-9.eCollection 2018. | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

〔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<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|
| 研究分担者 | 福島　祐二<br><br>(Fukushima Yuji)<br><br>(90583146) | 京都大学・医学研究科・特定助教<br><br>(14301) | |