

平成21年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19599007
 研究課題名（和文） 樹状細胞による記憶CD8 T細胞分化制御の分子メカニズムの解明
 研究課題名（英文） The role of dendritic cells in regulation of memory CD8 T cell differentiation

研究代表者
 岩井 佳子（IWAI YOSHIKO）
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師
 研究者番号：90362467

研究成果の概要：免疫学的記憶とは過去に出会った抗原に対してより早く、より大きな免疫応答が起こる現象でワクチンの基礎となる。記憶 T 細胞の特徴としては naïve な T 細胞よりも早く増殖することが知られているが、そのメカニズムについてはまったく知られていない。本研究では記憶 CD8 T 細胞から分泌される IFN- γ と樹状細胞から分泌される IL-18 が相互に刺激しあってシグナルループを形成し、記憶 T 細胞の増殖を加速する役割を果たしていることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：細胞、免疫学的記憶

1. 研究開始当初の背景

記憶 T 細胞には体内に長期間存在して、再び同じ抗原に出会うと naïve な T 細胞よりも早く大きな免疫反応を誘導して速やかに抗原を除去することができる。樹状細胞 (dendritic cells: DC) は記憶 T 細胞の分化とその運命決定に深く関与しているが、T 細胞の記憶形成における DC の役割についてはほとんど知られていない。また記憶 T 細胞には細胞傷害活性の高い effector memory T 細胞と増殖能の高い central memory T 細胞の 2 つの subset が存在するが、これらの 2 種

類の記憶 T 細胞がどのように形成されるのかまったくわかっていない。

2. 研究の目的

上述のような背景を踏まえて申請者は Rockefeller 大学の Ralph M. Steinman 博士によって開発された in vivo antigen delivery system を応用して世界で初めて central memory T 細胞と effector T 細胞を別々に誘導する実験系を確立した。In vivo antigen delivery system は生体内で DC 特異的に抗原を運ぶことができるきわめて独創的なシ

システムで DC を単離することなく *in vivo* における DC の機能を解析できる利点を有する。この記憶誘導システムと網羅的遺伝子解析手法を組み合わせ、central memory T 細胞と effector T 細胞の形成に関わる遺伝子を同定し、免疫学的記憶形成の分子メカニズムを解明することを目的として研究を進める。2つの記憶 T 細胞の分化制御機構を解明できれば、感染症や癌などのさまざまな疾患において有効なタイプの記憶 T 細胞を選択的に誘導できる効果的なワクチン開発への応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) キメラ抗体の作製

生体内で抗原を直接 DC に運ぶために、DC に特異的に発現する endocytosis receptor, DEC205 に対する抗体に、モデル抗原として OVA タンパク質を融合したキメラ抗体 (DEC:OVA) を作製し、293T 細胞にリン酸カルシウム法で transfection した後、培養上清を回収し、Protein G を用いた affinity chromatography により精製した。

(2) *In vivo* における記憶 T 細胞の誘導

C57BL/6 マウスにキメラ抗体 (DEC:OVA) を投与して記憶 T 細胞を誘導する。キメラ抗体と抗 CD40 抗体 (DC を活性化させる補助刺激) を同時に投与し、2ヶ月後に DEC:OVA を再投与すると effector memory T 細胞が誘導され、初回免疫に補助刺激なしでキメラ抗体のみを投与すると central memory T 細胞が誘導される。このように誘導された effector memory T 細胞と central memory T 細胞から RNA を単離して、さまざまな遺伝子発現を real-time PCR により比較した。

(3) 記憶 T 細胞の機能解析

記憶反応における記憶 T 細胞の増殖能を調べるために、OVA 抗原特異的 CD8T 細胞を MHC-tetramer staining を行い FACS により解析を行った。またサイトカイン産生能については、細胞質染色による FACS 解析または ELISA による測定を行った。細胞傷害活性能に関しては、OVA ペプチドを load した標的細胞を CFSE でラベルして、あらかじめ 60 日前に免疫したマウスに投与して、CFSE 陽性細胞の消失を指標に *in vivo* killing assay を行った。さらに誘導された記憶 T 細胞が実際に感染防御能を有するかどうかを調べるため、OVA を発現する組換えリステリアを 60 日前にあらかじめ免疫したマウスに投与して脾臓の細菌数を測定した。

4. 研究成果

(1) 抗原特異的 T 細胞の誘導

マウスに PBS あるいはキメラ抗体+抗 CD40 抗体を投与し、2ヶ月後に DEC:OVA を再投与した後、脾臓からリンパ球を単離して MHC tetramer 染色を行った。すると初回免疫に PBS で免疫したマウスに比べて DEC:OVA で免疫したマウスでは抗原特異的な (tetramer 陽性) CD8T 細胞が増殖が早く認められた (図 1)。

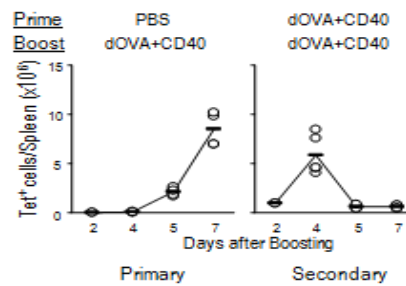


図 1 抗原特異的 CD8T 細胞の増殖

(2) 記憶 T 細胞の組織分布

次に記憶 T 細胞の組織分布を解析した。マウスにキメラ抗体と抗 CD40 抗体 (DC を活性化させる補助刺激) を投与し、2ヶ月後にさまざまな臓器からリンパ球を単離し、MHC tetramer 染色後に FACS 解析を行ったところ、パイエル板、リンパ節、脾臓等のリンパ組織だけでなく、肺、小腸などの粘膜組織にも広く分布することがわかった (図 2)。

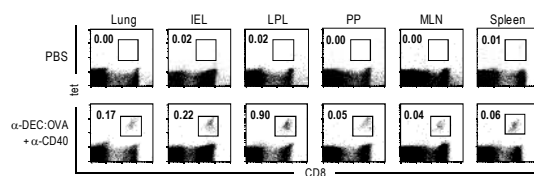


図 2 記憶 T 細胞の組織分布

(3) 記憶 T 細胞の機能解析

① サイトカイン産生能

誘導された記憶 T 細胞のサイトカイン産生能を細胞質染色により調べた。マウスに PBS あるいは DEC:OVA+抗 CD40 抗体を投与し、2ヶ月後に DEC:OVA を再投与した後、脾臓からリンパ球を単離して IFN-g, IL-2, TNF-a の産生を細胞質染色により調べたところ、PBS で免疫したマウスに比べて DEC:OVA で免疫したマウスでは高いサイトカイン産

生がみられた。

② 細胞傷害活性能

誘導された記憶 T 細胞の細胞傷害活性を調べるため、マウスに PBS あるいは DEC:OVA + 抗 CD40 抗体を投与し、2 ヶ月後に OVA peptide を load して CFSE でラベルした splenocyte(標的細胞)をマウスに投与し、18hr 後に脾臓を回収して標的細胞の消失を調べたところ、PBS 免疫マウスでは標的細胞が残ったままであるのに対して、DEC:OVA 免疫マウスではほとんど (96%) の標的細胞が消失した。これらの結果から記憶 T 細胞は高い細胞傷害活性能を有することが示唆された。

③ 感染防御能

誘導された記憶 T 細胞が実際に感染を防御することができるかどうかを調べるために、マウスに PBS あるいは DEC:OVA + 抗 CD40 抗体を投与し、2 ヶ月後に OVA を発現させた組換えリステリア菌を感染させ、4 日後に脾臓における細菌数を測定した。すると、PBS 免疫マウスに比べて DEC:OVA 免疫マウスでは細菌数が 10^6 分の 1 以下に抑えられ、実際に感染を防御できることがわかった (図 3)。

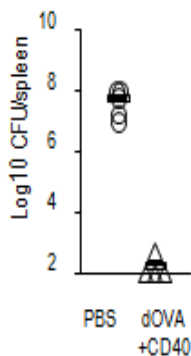


図 3 リステリア感染に対する記憶 T 細胞の防御能

(4) 抗原提示時における IL-18 の局在

上述のように誘導された記憶 T 細胞において IL-18 受容体 (IL-18R) の発現が naïve な T 細胞よりも有意に高いことに注目して、IL-18 がいつ、どのように DC から分泌されるのかを免疫組織染色により解析した。OVA ペプチドを load した DC あるいは load していない DC を、OVA 特異的 CD8T 細胞 (OT-I 細胞) と共培養したところ、ペプチド非存在下では抗原提示は行われず IL-18 は DC の細胞質全体に散在したままであったが、ペプチドの存在下では、DC が T 細胞に抗原提示を行って、T:DC シナプスが形成され、そのシナプス間隙に IL-18 が分泌、蓄積することが

わかった (図 4)。

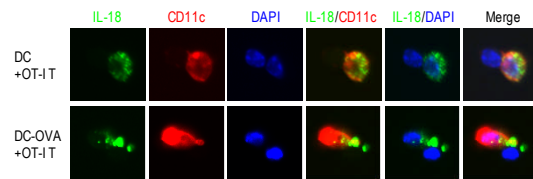


図 4 抗原提示時における IL-18 の局在

(5) 記憶 T 細胞増殖における IL-18 の役割

記憶 T 細胞の重要な特徴の一つとして、naïve な T 細胞よりも抗原に出会うと早く増殖することが知られているが、そのメカニズムについてはまったく知られていない。(4) の結果から IL-18 は抗原提示が行われて DC と T 細胞がシナプスを形成している間のみ DC から T 細胞に直接分泌されること、また記憶 T 細胞では naïve な T 細胞に比べて IL-18R の発現が高いことに注目して、記憶 T 細胞増殖における IL-18 シグナルの役割について調べるため、IL-18 欠損 (IL-18^{-/-}) マウスと野生型 (wt) マウスに PBS あるいは DEC:OVA + 抗 CD40 抗体を投与し、2 ヶ月後に DEC:OVA を再投与して、抗原特異的な CD8T 細胞の増殖を MHC tetramer 染色により解析した。すると IL-18^{-/-} マウスでは記憶細胞の増殖が wt マウスに比べて遅くなることがわかった。

これまで IL-18 は T 細胞からの IFN- γ の分泌を促進することが知られているが、その逆は知られていない。我々は記憶 T 細胞が naïve T 細胞よりも高い IFN- γ 産生能を有することに注目して、記憶 T 細胞からの IFN- γ 分泌が DC からの IL-18 産生を促進する可能性について検討した。すると、IFN- γ 受容体欠損 DC では野生型 DC に比べて IL-18 の産生が著明に低下し、さらに IFN- γ R^{-/-} マウス

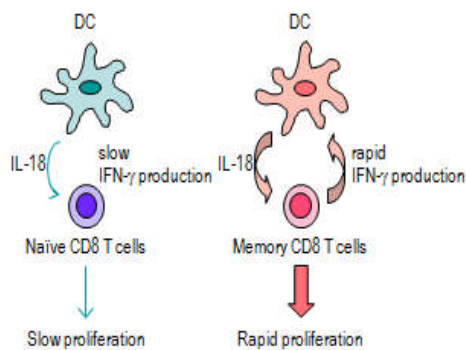


図 5 IL-18-IFN- γ シグナルループによる記憶 T 細胞増殖加速モデル

では、IL-18^{-/-}と同様に二次免疫反応において記憶 T 細胞の増殖が wt マウスに比べて遅くなることがわかった。

以上の結果から、記憶 T 細胞と DC の間には IL-18-IFN- γ によるシグナルループが存在して、記憶 T 細胞の増殖を加速する役割を果たしていることが示唆された (図 5)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yoshiko Iwai, Hiroaki Hemmi, Olga Mizenina, Shoko Kuroda, Koji Suda, and Ralph M. Steinman. An IFN- γ -IL-18 signaling loop accelerates memory CD8⁺ T cell proliferation. PLoS ONE, 3, e2404, 2008. 査読有り
2. Mukhopadhyaya A, Hanafusa T, Jarchum I, Chen YG, Iwai Y, Serreze DV, Steinman RM, Tarbell KV, DiLorenzo TP. Selective delivery of beta cell antigen to dendritic cells in vivo leads to deletion and tolerance of autoreactive CD8⁺ T cells in NOD mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(17):6374-9, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 佳子 (IWAI YOSHIKO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・

特任講師

研究者番号 : 90362467

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) その他

研究協力者 :

Ralph M. Steinman

Rockefeller University

Professor