

令和 4 年 5 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07621

研究課題名(和文)ERMタンパク質による制御性T細胞の恒常性調節機構

研究課題名(英文)Control mechanisms of regulatory T cell homeostasis by ERM proteins

研究代表者

平田 多佳子(Hirata, Takako)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00346199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫恒常性を維持する機序として、制御性T細胞(Treg)による免疫抑制があり、一般的に知られるCD4陽性のTreg以外にCD8陽性の細胞系譜(CD8 Treg)が存在することが知られている。本研究では、CD44、CD122を発現するマウスCD8 T細胞の中に、自己抗原ペプチドを提示したQa-1に結合する分画が存在し、この分画が免疫抑制活性を示すことを見出した。また、この分画は、一度も抗原刺激を受けていないにもかかわらずメモリー型の表現型を呈するバーチャルメモリーT細胞と類似する遺伝子発現を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫疾患や臓器移植などにおいて免疫寛容を誘導する、あるいは逆に、免疫監視を阻害することで抗腫瘍免疫を強化しようとするためにTregを標的とした応用研究が行われている。Tregを標的とする治療においては、生体内での数・機能の制御が重要である。本研究結果は、Tregの特定のサブセットの表現型と機能の一端を明らかにするものであり、Tregの生体内運命を人為的に制御することによる効率的で副作用の少ない免疫療法につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：One of the mechanisms for maintaining immune homeostasis is immunosuppression by regulatory T cells (Tregs). In addition to the well-known CD4-positive Tregs, there exist CD8-positive cell lineages (CD8 Tregs) that have immunosuppressive activity. In this research project, we found that among mouse CD8 T cells expressing CD44 and CD122, there was a fraction that binds to Qa-1 presenting self-antigen peptides, and this fraction exhibited immunosuppressive activity. We further found that this fraction showed gene expression profiles similar to those of virtual memory T cells, a subtype of T cells that have acquired memory-type phenotype without prior exposure to foreign antigens.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 制御性T細胞 ERMタンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫系は病原体を認識し排除するが、自己を構成する分子や環境物質に対しては応答しない。このような免疫応答と免疫寛容のバランスが破綻すると、自己免疫疾患やアレルギー疾患が発症する。また、病原体に対する応答においても過剰な反応は組織破壊につながる。免疫恒常性を維持する機序として、制御性 T 細胞 (Treg) による免疫抑制があり、CD4 陽性 (CD4 Treg) と CD8 陽性 (CD8 Treg) の細胞系譜が存在することが知られている。転写因子 Foxp3 を発現する CD4 Treg についてはこれまでに多くの解析がなされ、その生成、維持、機能の詳細が明らかになりつつある。一方、CD8 Treg については、異なる表現型と特徴をもつ複数のサブセットが報告され、サブセット間の関係や個々の機能などの理解はまだ十分に進んでいない。本研究で着目するマウス CD8 Treg は、CD44、CD122、Ly49 の細胞表面発現により同定されるサブセットで、胚中心 (GC) 内で抗体産生に重要な役割をもつヘルパー T 細胞である濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) の増殖や機能を制御することにより免疫抑制機能を発揮する。マウス CD8 Treg は Tfh 表面に発現する非古典的 MHC クラス I 分子の Qa-1 を認識するが、ヒトでは HLA-E 拘束性 CD8 T 細胞がマウス CD8 Treg と同様に自己寛容の維持に働く。

研究代表者らは、細胞膜タンパク質を細胞皮層に連結する ezrin-radixin-moesin (ERM) ファミリー分子の moesin を欠損するマウスが加齢とともに全身性エリテマトーデス (SLE) 様の自己免疫疾患を発症することを本研究開始までに見出していた (J Immunol. 2017;199;3418)。本マウスでは上記の CD44⁺CD122⁺Ly49⁺ CD8 Treg が有意に減少していることから、CD8 Treg の生体内維持の破綻が SLE 様の自己免疫疾患の発症につながることを示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、moesin 欠損マウスの病態解析を通して CD8 Treg の生体内維持機構を解明することを目的とした。最終的には、Treg の恒常性の破綻により自己免疫疾患が発症する機序の一端を理解するとともに、Treg を標的とした自己免疫疾患の治療につながる基盤の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試薬：フローサイトメトリーに用いた各種モノクローナル抗体 (mAb) やコントロール抗体は、BD Biosciences、eBioscience、BioLegend のいずれかから購入した。各種テトラマーは NIH Tetramer Core Facility より入手した。4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl-keyhole limpet hemocyanin (NP-KLH) は Biosource Technologies より購入した。

(2) マウス：C57BL/6 (B6) マウスは日本 SLC から購入した。moesin 欠損マウスは C57BL/6 遺伝的背景に 10 世代以上戻し交配し、オスの moesin 欠損 (Msn^{-Y}) マウスと同腹仔野生型 ($Msn^{+/Y}$) マウスを実験に使用した。Rag2 欠損マウスは京都大学より分与を受けた。マウスはすべて滋賀医科大学動物生命科学研究センターにて飼育した。すべての研究や手順は滋賀医科大学動物実験委員会の承認を受けた。

moesin flox マウスの作製のためには、マウス受精卵に CRISPR/Cas9 法を用いて moesin 遺伝子コード領域のエキソン 4 を挟み込む形で LoxP 配列を挿入することとした。具体的には、*S. pyogenes* 由来の Cas9 endonuclease と人工合成した guide RNA によって形成される Cas9 複合体を、事前に調整した LoxP 配列で挟まれた moesin 遺伝子エキソン 4 の 1 本鎖オリゴヌクレオチドとともに、マウス受精卵にエレクトロポレーションにより導入した。得られた遺伝子改変受精卵を仮親マウスに移植した。

(3) フローサイトメトリー：マウス脾臓から調整した細胞懸濁液を抗 CD16/CD32 抗体と 10 分インキュベートした後、モノクローナル抗体と氷上で 30 分インキュベートした。テトラマーによる染色では、室温で 30 分インキュベートした。洗浄後、FACSCantoII (BD Biosciences) または LSRFortessa (BD Biosciences) でデータを取得し、FlowJo (Tree Sar) を用いて解析した。各サブセットは FACS Aria (BD Biosciences) でソートした。

(4) 定量 PCR と RNA-seq: total RNA は TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出し、High-capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて cDNA を合成した。PCR は KOD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて LightCycler 480 (Roche) で行った。RNA-seq には total RNA から SMART-Seq v4 (TAKARA) により cDNA を調整し、解析を行った。

(5) 養子移入実験：野生型マウスの脾臓から B 細胞と CD25⁻ CD4 T 細胞をソートした。また、 Msn^{-Y} マウスと $Msn^{+/Y}$ マウスの脾臓から CD8 Treg をソートした。Rag2 欠損マウスに B 細胞と CD25⁻ CD4 T 細胞を、野生型または moesin 欠損 CD8 Treg とともに移入し、NP-KLH と complete Freund's adjuvant で免疫し、10 日目に NP-KLH と incomplete Freund's adjuvant で免疫した。15 日目に採血し、NP 特異的抗体量を ELISA により測定した。

4. 研究成果

(1) CD8 Treg の表現型の解析：本研究で着目しているマウス CD8 Treg は、CD3、CD8、CD44、

CD122 を細胞表面に発現するサブセットで、非古典的 MHC クラス I 分子の Qa-1 とそこに提示される自己ペプチドを認識する。Qa-1 上には通常 Qa-1-determinant modifier (Qdm) ペプチドが提示されており、T 細胞受容体 (TCR) を介さずに CD8 Treg に結合することでその機能を抑制している。CD8 Treg はこの Qdm ペプチドが Hsp60_{p216} などの自己ペプチドに置き換わると細胞傷害活性を発揮できると考えられている。そこで、マウス脾臓中の CD3⁺CD8⁺CD44⁺CD122⁺ T 細胞を Qa-1-Qdm テトラマー (Qdm-tet) と Qa-1-Hsp60_{p216} テトラマー (Hsp-tet) を使用して染色すると、Qdm-tet 陰性かつ Hsp-tet 陽性の細胞分画が同定された。この分画は、Tfh を介した GC 反応を阻害したことから、免疫抑制活性をもつサブセットであると考えられた。そこで、この分画の RNA-seq 解析を行ったところ、CD122 以外に CD49、CD5 の発現が高く、Nrp1 の発現が低かった。生体内には、一度も抗原刺激を受けていないにもかかわらずメモリー型の表現型を呈する CD8 T 細胞が存在し、バーチャルメモリー (VM) T 細胞とよばれている。上記の CD8 Treg 分画の遺伝子発現パターンは、VM T 細胞に類似していた。したがって、CD8 Treg は VM T 細胞に属するサブセットまたは近縁のサブセットであることが示唆された。

(2) CD8 Treg の機能の解析：moesin が CD8 Treg の数だけでなく機能にも影響を与えるか明らかにするため、*in vivo* で抑制活性を調べた。そのため、T 細胞、B 細胞、NKT 細胞を欠損する Rag2 欠損マウスに、野生型 B 細胞および CD25⁺ 画分除去 CD4 T 細胞を、野生型または moesin 欠損マウスから単離した CD8 Treg とともに移入し、移入後 NP-KLH で免疫して NP 特異的抗体価を測定した。その結果、moesin 欠損 CD8 Treg を移入したマウスでは、野生型 CD8 Treg を移入した場合に比較して、抗 NP 抗体が高く、moesin 欠損 CD8 Treg の抑制活性が低下していると考えられた。

(3) CD8 T 細胞特異的 moesin 欠損マウスの作製：これまで解析してきたマウスは、moesin を全身性に欠損するマウスであったため、CD8 Treg での moesin 欠損により自己免疫疾患が現れるか調べるために、moesin flox マウスと CD8a-Cre マウスを交配し、CD8 T 細胞特異的に moesin 遺伝子を不活化したマウスを作製することを計画した。マウス受精卵を CRISPR/Cas9 法より遺伝子改変した後、仮親マウスに移植したが、loxP 配列が適切に挿入された F0 マウスは得られなかった。モザイクの可能性もあるため、さらに C57BL/6 マウスと交配して得られた F1 マウスを解析したが、moesin flox マウスは得られなかった。

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 5件）

1. 著者名 Terada Koji, Kondo Kenta, Ishigaki Hirohito, Nagashima Ayaka, Satooka Hiroki, Nagano Seiji, Masuda Kyoko, Kawamura Teruhisa, Hirata Takako, Ogasawara Kazumasa, Itoh Yasushi, Kawamoto Hiroshi, Agata Yasutoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating and circulating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 77 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2021.12.003	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 Satooka Hiroki, Matsui Makoto, Ichioka Satoko, Nakamura Yuzuki, Hirata Takako	4. 巻 371
2. 論文標題 The ERM protein moesin regulates natural killer cell homeostasis in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 104456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2021.104456	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 Matsui Makoto, Nagakubo Daisuke, Satooka Hiroki, Hirata Takako	4. 巻 526
2. 論文標題 A novel Siglec-F+ neutrophil subset in the mouse nasal mucosa exhibits an activated phenotype and is increased in an allergic rhinitis model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 599 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.122	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 Sato Tomomi, Satooka Hiroki, Ichioka Satoko, Maruo Yoshihiro, Hirata Takako	4. 巻 32
2. 論文標題 Citrullinated fibrinogen is a target of auto-antibodies in interstitial lung disease in mice with collagen-induced arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 533 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa021	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 Satooka Hiroki, Ishigaki Hirohito, Todo Kagefumi, Terada Koji, Agata Yasutoshi, Itoh Yasushi, Ogasawara Kazumasa, Hirata Takako	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of tumour-infiltrating lymphocytes in a tumour rejection cynomolgus macaque model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65488-x	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 Kitazawa Jun, Kimura Fuminori, Nakamura Akiko, Morimune Aina, Hanada Tetsuro, Amano Tsukuru, Tsuji Shunichiro, Kasahara Kyoko, Satooka Hiroki, Hirata Takako, Kushima Ryoji, Murakami Takashi	4. 巻 85
2. 論文標題 Alteration in endometrial helper T cell subgroups in chronic endometritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 e13372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aji.13372	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 Thumkeo D., Katsura Y., Nishimura Y., Kanchanawong P., Tohyama K., Ishizaki T., Kitajima S., Takahashi C., Hirata T., Watanabe N., Krummel M. F., Narumiya S.	4. 巻 6
2. 論文標題 mDia1/3-dependent actin polymerization spatiotemporally controls LAT phosphorylation by Zap70 at the immune synapse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaay2432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aay2432	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

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Terada Koji, Kondo Kenta, Ishigaki Hirohito, Nagashima Ayaka, Satooka Hiroki, Nagano Seiji, Masuda Kyoko, Kawamura Teruhisa, Hirata Takako, Ogasawara Kazumasa, Itoh Yasushi, Kawamoto Hiroshi, Agata Yasutoshi
2. 発表標題 Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satooka Hiroki、Nakamura Yuzuki、Todo Kagefumi、Hirata Takako
2. 発表標題 Redox-mediated SOCS3 expression in regulatory T cells is involved in the development of autoimmunity
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato Tomomi、Satooka Hiroki、Ichioka Satoko、Hirata Takako
2. 発表標題 Citrullinated fibrinogen is a target of auto-antibodies in interstitial lung disease in mice with collagen-induced arthritis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Todo Kagefumi、Satooka Hiroki、Hirata Takako
2. 発表標題 Production of secreted form of IgD during immune responses
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakamura Yuzuki、Satooka Hiroki、Hirata Takako
2. 発表標題 Deficiency of moesin causes spontaneous lung inflammation in mice
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Asano Kyoko, Todo Kagefumi, Hirata Takako
2. 発表標題 Phagocytic cells are induced by activation of resting splenic B cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satooka Hiroki, Sato Tomomi, Nakamura Yuzuki, Todo Kagefumi, Hirata Takako
2. 発表標題 Redox-mediated signaling in regulatory T cells is involved in the development of autoimmunity
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Todo Kagefumi, Asano Kyoko, Satooka Hiroki, Hirata Takako
2. 発表標題 Involvement of IgD-expressing cells in type I hypersensitivity
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura Yuzuki, Satooka Hiroki, Hirata Takako
2. 発表標題 Moesin regulates macrophage homeostasis in the lung and its deficiency leads to pulmonary inflammation
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容 Research | 滋賀医科大学 生命科学講座 生物学
<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbio/research.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------