

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16622

研究課題名(和文) 感染防御性免疫が誘導するNK細胞活性化とレトロウイルス感染防御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of NK cell activation and retrovirus infection defense mechanism induced by peptide immunization against murine Friend retrovirus

研究代表者

加藤 茂樹 (KATO, Shigeki)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：90790767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスレトロウイルスと感染防御性マウスモデルを用いて宿主免疫応答、特にNK細胞の活性化機構の解明に取り組んだ。感染細胞排除にはNK細胞が早期に活性化されることが必要であるが、その具体的エフェクター機構は不明であった。本研究は、感染早期の抗原特異的濾胞ヘルパーT細胞によるIL-21発現が、NK細胞上のIL-21Rに作用してNK細胞の成熟・活性化を誘導し、積極的に感染細胞を排除していることを明らかにした。さらに、NK細胞上のCD154は感染早期に樹状細胞およびマクロファージのCD40から刺激を受容することでIL-21Rの発現を調整していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、適切なエピトープ選択による免疫によって早期にTfhが誘導されることは、NK細胞の活性化をもたらすことにつながりウイルス感染細胞を効率的に排除することが可能であるという新規メカニズムを証明したことを意味し、新たなワクチン開発につながることを期待される。

従来、NK細胞は抗原感作が不要と考えられてきたが、CD4陽性T細胞を適切なエピトープで免疫すればNK細胞に間接的に抗原特異性を賦与できること、また、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞のCD40分子が効率的なNK細胞活性化に重要であるという分子基盤を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We worked on elucidating the host immune response, especially the activation mechanism of NK cells, using a mouse retrovirus and an infection-defensive mouse model. Early activation of NK cells is required for elimination of infected cells, but the specific effector mechanism was unknown. We found in this study that IL-21 expression by antigen-specific follicular helper T cells in the early stage of infection acts on IL-21R on NK cells to induce maturation and activation of NK cells, which clearly eliminated the infected cells. Furthermore, it was revealed that CD154 on NK cells regulates IL-21R expression by receiving stimuli from CD40 of dendritic cells and macrophages in the early stage of infection.

研究分野：免疫

キーワード：レトロウイルス ワクチン がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

レトロウイルス感染制御において感染細胞に対する宿主免疫応答の正確な理解は、レトロウイルス感染予防の確立に不可欠である。我々の研究グループはこれまで、マウスに急性病原性を示し、かつ持続感染を誘導するフレンドレトロウイルス (以下、FV) の実験系で、単一の CD4 陽性 T 細胞認識エピトープを含むペプチドワクチンによる唯一回の免疫が、完璧な感染防御を誘導するモデルを世界で初めて確立した (Miyazawa M, et al., *J Immunol*, 1995)。そのエフェクター機構には、NK 細胞と早期抗体産生が必要であり、NK 細胞を枯渇させたマウスでは感染細胞を排除することが出来ないことを明らかにした (Iwanami N, et al., *J Virol*, 2001)。我々は、特定の抗原エピトープを認識する CD4 陽性 T 細胞を検出できる、MHC クラス 分子テトラマーを自製することにより、感染防御性エピトープで免疫された個体では、感染後に高親和性抗原受容体を持つ CD4 陽性 T 細胞がほぼ単クローン性に活性化し、濾胞型ヘルパー T (Tfh) 細胞へと分化することを明らかにした。このとき、Tfh は IL-21 発現が亢進していることをすでに我々は見出しており、IL-21 受容体が発現している NK 細胞の活性化を制御している可能性がある。つまり、CD4 陽性 T 細胞の感染防御性エピトープによる免疫が感染早期 Tfh の分化誘導および IL-21 によって NK 細胞を活性化させ感染細胞排除に決定的な役割を果たしている可能性があるが、その具体的なエフェクター機構は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、FV とその感染防御モデルを用いて、感染防御性エピトープによる CD4 陽性 T 細胞の免疫が Tfh の早期分化と IL-21 の発現誘導による NK 細胞活性化をもたらすことにより効率的に感染細胞を排除されることを分子レベルで解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 感染防御性エピトープ免疫による Tfh 分化と FV 感染細胞排除の関係の解明

FV 感染による白血病誘発は、骨髄中の赤芽球前駆細胞にウイルスが感染することから始まると考えられる。感染が骨髄から始まるとすれば、感染防御性免疫によって早期に誘導された IL-21 は、主に骨髄内の NK 細胞に作用しエフェクター機構を活性化している可能性がある。そこで感染防御性エピトープで免疫したマウスを FV に感染させ、IL-21 受容体ブロッキング抗体を投与する。感染から 7 日後、抗原特異的 Tfh 細胞数のフローサイトメトリーによる定量と骨髄と脾臓における感染細胞数を定量する。感染細胞は Infectious center assay によって定量する。

#### (2) IL-21 が NK 細胞活性化に与える影響の検証

実験方法 (1) の系で NK 細胞を抗体磁気ビーズと吸着カラムで分離して、CD69 (early effector marker) と KLRG1 (inhibition marker) の発現をフローサイトメトリーで検出するとともに、NKG2D (活性化型受容体) とサイトカイン (IFN- $\gamma$ ) も同時に検出することで、IL-21 が NK 細胞の成熟時期と活性化状態に与える影響を骨髄と脾臓で検証する。

#### (3) 感染早期の NK 細胞上の IL-21 受容体 (IL-21 R) 発現上昇機構の解明

感染早期に分化した Tfh が発現する IL-21 が NK 細胞の活性化を制御している可能性がある一方で、別の NK 細胞活性化経路 (CD40 - CD40L 経路) の存在も考えられる。本研究では、感染防御性マウスの抗原提示細胞に着目し、特に CD40 の発現をフローサイトメトリーで定量する。

### 4. 研究成果

(1) 感染早期の IL-21 R ブロックによる NK 細胞活性化に与える影響。感染から 4 日目において、脾臓の NK 細胞は活性化マーカー CD69 は感染防御性マウスにブロッキング抗体投与の有無に関わらず非免疫群との相違は認められなかったが、感染防御性マウスに IL-21 R をブロックすると骨髄の NK 細胞は NK 細胞の CD69 発現が有意に減少した。また、骨髄 CD3-NK1.1+ 分画において、IL-21 R をブロックした群においては、CD11b<sup>lo</sup>CD27<sup>hi</sup> および CD11b<sup>hi</sup>CD27<sup>hi</sup> の各割合が感染防御性マウスの IL-

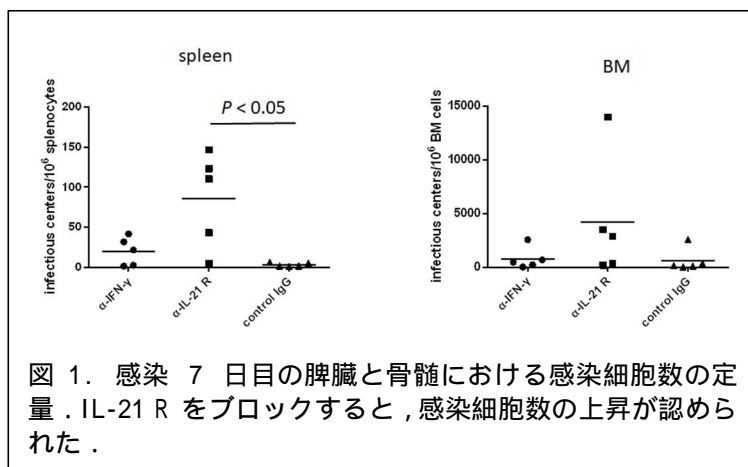


図 1. 感染 7 日目の脾臓と骨髄における感染細胞数の定量。IL-21 R をブロックすると、感染細胞数の上昇が認められた。

図 1. 感染 7 日目の脾臓と骨髄における感染細胞数の定量。IL-21 R をブロックすると、感染細胞数の上昇が認められた。

21 R 非ブロック群に対して有意な上昇が認められた。このとき、IL-21 R をブロックした群のマウスの抗原特異的な Tfh はその割合が有意に減少していることが明らかになった。

一方で、IL-21 R をブロックした際の感染から 7 日目の感染細胞数を Infectious center assay によって定量すると、骨髄においては感染細胞数の上昇が認められたが有意差は検出されなかったものの、脾臓において有意に感染細胞数の増加が認められた (図 1)。

(2) FV 感染において適切なエピトープによって CD4 陽性 T 細胞を感作することで、抗原特異的 Tfh の早期分化を誘導し IL-21 発現が誘導され NK 細胞を活性化していることが明らかになったが、IL-21 の NK 細胞への作用が、直接的に FV 感染細胞排除へ機能していることを示していない。そこで、感染防御性マウスおよび IL-21 R をブロックしたマウスの脾臓から NK 細胞を分離し、Target 細胞 (YAC-1) に対する細胞障害活性を killing assay によって評価した。その結果、IL-21 R をブロックしたマウスから分離した NK 細胞は、ブロックしていないマウスから分離した NK 細胞と比較して、target 細胞に対する障害活性が有意に減少していることが明らかになった (図 2)。

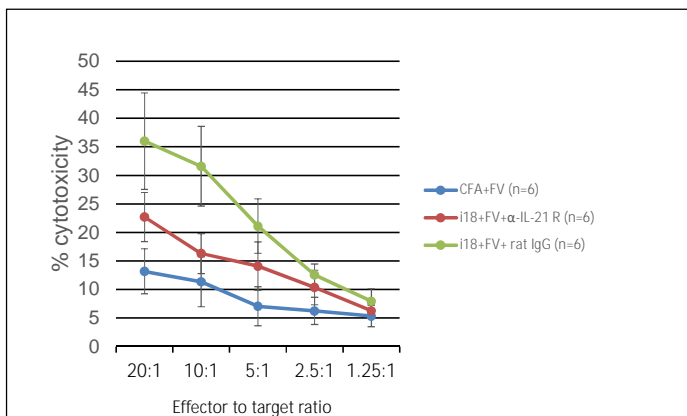


図 2. YAC-1 に対する NK 細胞の killing assay 結果。IL-21 R をブロックした群の NK 細胞 (i18+FV + α-IL-21 R) では killing 活性が減少した。

一方で、IL-21 は Tfh 以外からの分泌も考えられる。FV 感染防御系においては Tfh が分泌する IL-21 が決定的に重要であることを示すために、感染防御性マウスから分離した Tfh を非感作マウスへの移入と感染細胞数の定量を行った。その結果、感染防御マウスから分離した Tfh を移入した FV 感染マウスでは非 Tfh を移入した FV 感染マウスと比較して、骨髄の感染細胞を有意に減少させた。これは、早期 Tfh の分化誘導が重要であることを示している (図 3)。

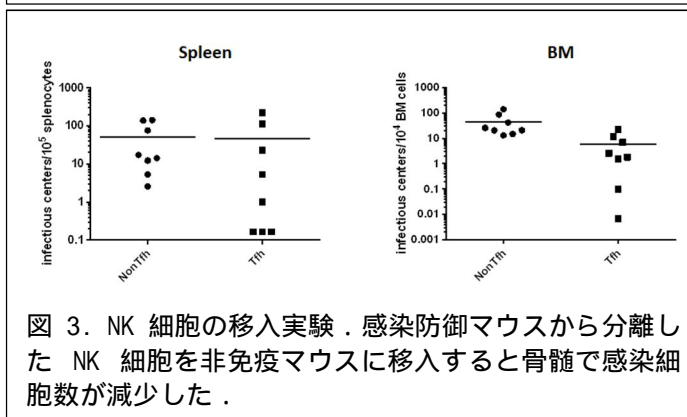


図 3. NK 細胞の移入実験。感染防御マウスから分離した NK 細胞を非免疫マウスに移入すると骨髄で感染細胞数が減少した。

(3) FV 感染早期の Tfh 分化誘導および IL-21 発現亢進が NK 細胞の活性化を制御していることが明らかになったが、一方で感染防御性マウスでは、IL-21 R の発現自体も亢進していることが明らかになった。これまで、B 細胞における IL-21 R の発現は抗原提示細胞からの CD40 からの刺激を CD154 (CD40L) を介して制御されていることが明らかにされているが、NK 細胞における IL-21 R 発現を制御する機序については明らかではなかった。そこで、感染防御性マウスの FV 感染早期に樹状細胞およびマクロファージの CD40 の発現量をフローサイトメトリーで解析した。その結果、脾臓・骨髄において非感作マウスより CD40 発現の亢進が認められた。このことから、FV 感染防御系においては、感染防御性エピトープによる CD4 陽性 T 細胞によって免疫すると樹状細胞およびマクロファージの CD40 を介して NK 細胞の CD154 (CD40L) に作用し、IL-21 R の発現亢進が誘導されていることが明らかになった (図 4)。

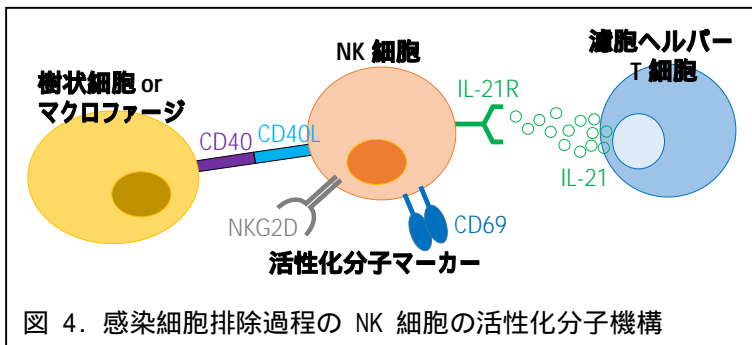


図 4. 感染細胞排除過程の NK 細胞の活性化分子機構

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kato Shigeki, Shirai Yuko, Sakamoto Maya, Mori Shiro, Kodama Tetsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Use of a Lymphatic Drug Delivery System and Sonoporation to Target Malignant Metastatic Breast Cancer Cells Proliferating in the Marginal Sinuses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49386-5	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 Takamura Shiki, Kato Shigeki, Motozono Chihiro, Shimaoka Takeshi, Ueha Satoshi, Matsuo Kazuhiko, Miyuchi Kosuke, Masumoto Tomoko, Katsushima Asami, Nakayama Takashi, Tomura Michio, Matsushima Kouji, Kubo Masato, Miyazawa Masaaki	4. 巻 216
2. 論文標題 Interstitial-resident memory CD8+ T cells sustain frontline epithelial memory in the lung	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 2736-2747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20190557	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 Kato Shigeki, Shirai Yuko, Motozono Chihiro, Kanzaki Hiroyuki, Mori Shiro, Kodama Tetsuya	4. 巻 4
2. 論文標題 In vivo delivery of an exogenous molecule into murine T lymphocytes using a lymphatic drug delivery system combined with sonoporation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1025-1031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.174	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 Kato Shigeki, Takeda Kazu, Sukhbaatar Ariunbuyan, Sakamoto Maya, Mori Shiro, Shiga Kiyoto, Kodama Tetsuya	4. 巻 111
2. 論文標題 Intranodal pressure of a metastatic lymph node reflects the response to lymphatic drug delivery system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4232-4241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14640	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 Kato Shigeki, Yoshiba Shota, Mori Shiro, Kodama Tetsuya	4. 巻 597
2. 論文標題 Optimization of the delivery of molecules into lymph nodes using a lymphatic drug delivery system with ultrasound	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 120324-120324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpharm.2021.120324	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Chihiro Motozono, Shigeki Kato, Sachiyo Kawahara, Shiki Takamura, Masaaki Miyazawa
2. 発表標題 Fate determination with a selected epitope facilitates follicular helper cell differentiation and protection against acute retroviral infection
3. 学会等名 21st Kumamoto AIDS Seminar (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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