

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590486

研究課題名 (和文) 記憶 T 細胞の機能発現機構の解明

研究課題名 (英文) Mechanism of memory CD8 T cell generation

研究代表者 坂本明美 (SAKAMOTO AKEMI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90359597

研究成果の概要 (和文)：記憶 CD8T 細胞は感染防御の根幹をなす。私たちは記憶 CD8T 細胞に転写因子 Bcl6 が発現していることを明らかにした。本研究ではその機能を明らかにするために、Bcl6 の標的遺伝子を解析した。その結果、エフェクター細胞に発現する KLRG1 が Bcl6 により発現制御を受けていることを明らかにした。KLRG1 シグナルは細胞増殖を抑制することから、記憶 CD8T 細胞の機能の維持に関連する Bcl6 の役割の一つであると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：Transcription factor Bcl6 expresses in memory CD8 T cells, but its function is not elucidated. In this study, we found that KLRG1 is one of the molecular target of Bcl6. KLRG1 is known as inhibitory signaling for cell proliferation. Regulation of KLRG1 by Bcl6 might be important for keeping the function of memory CD8 T cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学・6913

キーワード：免疫学・記憶 T 細胞・遺伝子・発現制御・サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

免疫担当細胞はウイルス感染時の宿主応答の根幹をなす。申請者らはワクシニアウイルス (vv-OVA) への宿主応答解析モデルを用いて転写因子 Bcl6 の記憶 CD8T 細胞分化への役割を検討した結果、Bcl6 は CD8T 細胞の二次応答能の獲得および維持に重要であることを明らかにした。しかし、その詳細

な分子機構は解明されていない。

## 2. 研究の目的

CD8T 細胞の機能を調節する仕組みを分子のレベルで解明し、その機構を改変することで、再感染の起きやすいウイルス感染に有効なワクチンの開発と慢性ウイルス感染症の根治を目指した治療方法の基盤を確立するこ

とを目的とする。

(1) CD8T 細胞の初期分化および二次応答能の獲得における Bcl6 の機能をその標的遺伝子のレベルで明らかにする。

(2) Bcl6 の標的遺伝子の発現量を直接もしくは Bcl6 を介して間接的に調節することにより、メモリーCD8T 細胞の分化と機能維持の分子機構をコントロールするシステムを開発し、治療応用につなげる。

### 3. 研究の方法

(1) CD8T 細胞の分化過程における遺伝子発現量の解析

lck-Bcl6 Tg, Bcl6-KO および野性型マウスに、OVA 遺伝子を組み込んだワクシニアウイルス (vv-OVA) を感染させることで抗原特異的メモリーCD8T 細胞を誘導し、誘導された細胞での遺伝子発現を抗体や、RP-PCR 法を用いて解析する。また、得られた標的遺伝子における Bcl6 の結合の有無をクロマチン IP (ChIP) 法で解析する。遺伝子のプロモータ領域に Bcl6 の結合が認められる場合は、プロモータ解析を行う。Bcl6 の結合がプロモータ領域とは異なる遺伝子部位に認められる場合は、その遺伝子領域のヒストンのアセチル化、メチル化の程度などを検討することにより、その遺伝子発現におよぼす Bcl6 の影響を明らかにする。

(2) 二次応答のプログラミングにおける Bcl6 の役割の解明

CD8T 細胞の二次応答を決定するプログラム機構の一つとして、ウイルス初感染時の IL-2 刺激の重要性 (Williams, et al., Nature, 2006) や CD4T 細胞の関与 (Janssen, et al., Nature, 2005) が明らかにされている。そこで、これらシグナルに影響するレセプター等の解析を行う。

(3) Bcl6 の機能を有効に発揮させる液性因子や副刺激の解明

Bcl6 遺伝子の CD8T 細胞における転写レベルの調節因子やタンパクレベルの調節因子を明らかにし、ウイルス感染時やメモリーCD8T 細胞の維持期に Bcl6 発現および標的遺伝子の発現抑制を有効に機能させる方法を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) CD8T 細胞の分化過程における遺伝子発現量の解析

マウス生体内において lck-Bcl6 Tg マウス由来の CD8T 細胞で有意に高い二次応答 (細胞増殖など) を観察しており、記憶 CD8T 細胞の機能的分化に Bcl6 が重要であることを確認した。vv-OVA を感染させて誘導した抗原特異的メモリーCD8T 細胞において KLRG1 の発現が Bcl6 強発現 CD8T 細胞では低く、Bcl6 欠損 CD8T 細胞では高いことから、KLRG1 は Bcl6 により負に制御されている分子である可能性が示唆された。KLRG1 遺伝子には Bcl6 想定結合部位が4ヶ所存在するため、Bcl6 の結合の有無をクロマチン IP (ChIP) 法で解析したところ、それぞれで有意な Bcl6 の結合が明らかになった。さらにヒストンのアセチル化の程度を解析した結果、Bcl6 強発現 CD8T 細胞では野性型に比べアセチル化が低く、Bcl6 の KLRG1 への結合はヒストンの状態に影響し、転写を制御していることが明らかになった。KLRG1 はリンパ球の senescence に関与する分子であり、細胞増殖を抑制する。Bcl6 による KLRG1 の発現調節は記憶 CD8T 細胞の機能の維持に重要であると考えられる。

(2) 二次応答のプログラミングにおける Bcl6 の役割の解明

活性化 CD8T 細胞における IL-2 レセプタ

一の発現を解析した結果、IL-2Ra の発現が mRNA レベルでもタンパクレベルでも Bcl6 欠損 CD8T 細胞で高かった。ChIP アッセイでも Bcl6 が結合している結果を得られたことから、IL-2Ra は Bcl6 の標的遺伝子であることが明らかになった。IL-2 の強刺激はエフェクター細胞の分化を促し、記憶細胞の分化を抑制することが既に明らかにされており、記憶 CD8T 細胞の分化過程における IL-2Ra の発現調節は CD8T 細胞の分化のふりわけにも重要であると思われる。

### (3) Bcl6 の機能を有効に発揮させる液性因子や副刺激の解明

活性化 CD8T 細胞における Bcl6 の発現は抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体刺激で誘導される。

さらに、記憶 CD8T 細胞の分化に関与すると考えられる各種サイトカインで CD8T 細胞を刺激した結果、IL-21 刺激時に Bcl6 は早期に誘導され、IL-15 刺激時に 5 日めに誘導された。一方、エフェクターを誘導する IL-2 は Bcl6 の発現を抑制した。さらに IL-21 刺激時は KLRG1 陽性細胞の分化も抑制されており、活性化 CD8T 細胞における Bcl6 の発現誘導は記憶 CD8T 細胞分化に重要な分子機構と考えられる。

以上、本研究の結果、Bcl6 は CD8T 細胞活性化時に T 細胞レセプター刺激や IL-21、IL-15 刺激でその発現を増強し、IL-2Ra の発現を負に制御してエフェクターへの分化刺激が過剰に入らないようにおさえる機能がある。さらに Bcl6 は KLRG1 の発現を制御することでより機能的な記憶 CD8T 細胞を分化、維持させていると考える。

記憶 CD8T 細胞はウイルス感染防御に必須の細胞であり、これらの結果は有効な

ワクチン接種法の開発に繋がる。また記憶 T 細胞の分化、機能調整は腫瘍免疫、自己免疫等にも普遍性があり、広く臨床老いように繋がる研究である。

### 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 8 件)

① Ohtsuka, H., Sakamoto, A., Pan, J., Inage, S., Horigome, S., Ichii, H., Arima, M., Hatano, M., Okada, S., and Tokuhisa, T. Bcl6 is required for the development of mouse CD4+ and CD8 $\alpha$ + dendritic cells. J. Immunol. 186:255-263. 2011、査読有

② Yoshida, N., Kitayama, D., Arima, M., Sakamoto, A., Inamine, A., Takano, H., Hatano, M., Koike, T., and Tokuhisa, T. CXCR4 expression on activated B cells is down-regulated by CD63 and IL-21. J. Immunol. 186: 2800-2808. 2011、査読有

③ Miyauchi, Y., Ninomiya, K., Miyamoto, H., Sakamoto, A., Iwasaki, R., Hoshi, H., Miyamoto, K., Hao, W., Yoshida, S., Morioka, H., Chiba, K., Kato, S., Tokuhisa, T., Saitou, M., Toyama, Y., Suda, T., Miyamoto, T. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. J Exp Med. 207 : 751-762, 2010、査読有

④ Kitayama, D., Sakamoto, A., Arima, M., Hatano, M., Miyazaki, M. and Tokuhisa, T. A role for Bcl6 in sequential class switch recombination to IgE in B cells stimulated with IL-4 and IL-21. Mol.

Immunol., 45:1337-1345.2008、査読有

⑤ Ouchida, R., Yamasaki, S., Hikida, M., Masuda, K., Kawamura, K., Wada, A., Mochizuki, S., Tagawa, M., Sakamoto, A., Hatano, M., Tokuhisa, T., Koseki, H., Saito, T., Kurosaki, T. and Wang, J. A Lysosomal Protein Negatively Regulates Surface T Cell Antigen Receptor Expression by Promoting CD3 $\zeta$  Degradation. Immunity 29: 33-43. 2008、査読有

[学会発表] (計 20 件)

① Sakamoto A. Roles of Bcl6 in memory T cell development. 免疫記憶シンポジウム 2010/12/4 東京

② Sakamoto A., Pan J, Kohno M, Arima M., Hatano M and Tokuhisa T. A Role of Bcl6 in the generation and maintenance of follicular helper T cells. 14<sup>th</sup> International congress of Immunology 2010/8/22-27 神戸

③ Sakamoto A., Pan J, Mochizuki A, Kohno M, Arima M., Hatano M and Tokuhisa T. Role of Bcl6 in the generation and maintenance of follicular helper T cells. 第 39 回日本免疫学会 2009/12/2-4 大阪

④ Sakamoto A., Arima M., Hatano M., Tokuhisa T. Role of Bcl6 in the generation of follicular helper T cells. 第 38 回日本免疫学会 2008/12/1-3 京都

[図書] (計 1 件)

坂本明美、徳久剛史 10-4 血液細胞 改訂：培養細胞実験ハンドブック 黒木登志夫、許

南浩編、実験医学別冊：羊土社 110-115,2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/devgen/>

日本免疫学会主催のアウトリーチ活動『免疫ふしぎ未来』に実行委員として参加し、研究成果を含め免疫学に関する話題を分かりやすく伝えている。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本明美 (SAKAMOTO AKEMI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90359597

### (2) 研究分担者

徳久剛史 (TOKUHISA TAKESI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20134364

幡野雅彦 (HATANO MASAHICO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20208523

有馬雅史 (ARIMA MASAFUMI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：00202763

藤村理紗 (FUJIMURA RIZA)

千葉大学・バイオメディカル研究センター・助教

研究者番号：30376363

### (3) 連携研究者

なし

( )

研究者番号：