

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22764

研究課題名(和文) 記憶ヘルパーT細胞の長寿命の獲得と維持における分子機構の解明

研究課題名(英文) Formation and maintenance of long-lived memory T helper cells

研究代表者

常世田 好司 (TOKOYODA, Koji)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：20362402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：CD4陽性T細胞は抗原の刺激を受けた後、一部は記憶細胞として長寿命を獲得し維持される。しかし、どのように長寿命を獲得し維持されるのか、細胞内外の分子メカニズムは不明であった。本研究では、レトロウイルス導入によるshRNAや阻害抗体投与、遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。その結果、細胞分裂やIL-2R β が重要であること、記憶で発現が高いCXCR6は獲得に関わっていないが維持に関わっている可能性が高くなった。予想外ではあったが、現在更なる研究を進めている。また長寿命維持に関しては、解糖系やインテグリン分子下流シグナルが長寿命の維持に重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫記憶、特にその中枢で働く記憶ヘルパーT細胞の形成や維持の分子メカニズムを知ることは、どのように我々が感染した病原体を記憶しているのかという学術的疑問を解決することにつながる。さらにどのように記憶が形成され維持されているかがわかれば、ワクチンの最大の目的である免疫記憶は、どのように誘導すれば最も効率が良いのかという新しい指標になる。さらにアレルギーや自己免疫疾患の慢性化の原因も免疫記憶であるため、いかに病原性の記憶細胞を除去するのか、その標的分子を明らかにすることにも貢献する。

研究成果の概要(英文)：Some CD4 T cells can be maintained as memory T helper cells for long periods after antigenic stimulation. However, it remains unclear how memory T helper cells are generated and maintained. In this study, we have investigated the molecular mechanisms utilizing retrovirus-induced shRNA, neutralization antibodies and knock-out mice. We here show that enhanced cell division and IL-2R β expression are essential for the generation of memory T helper cells and that CXCR6 expression, glycolysis and Focal adhesion kinase are required for their maintenance. These results contribute to the understanding of cellular and molecular mechanisms on the generation and maintenance of memory T helper cells, totally on immune memory.

研究分野：免疫学

キーワード：ヘルパーT細胞 免疫記憶

1. 研究開始当初の背景

われわれの身体は、細菌やウイルスなどの病原体が侵入した際に、病原体を除去するだけでなく、病原体を記憶し、同種の病原体が再侵入した際には、非常に強く、その病原体を除去することができる能力を持っている。この能力によって、われわれはどのような微生物学的な環境にも適応しながら、感染症に打ち勝ってきた。また一方で、免疫記憶のシステムはわれわれに害を及ぼすことがある。アレルギーや自己免疫疾患などの慢性疾患である。無害な抗原や自己抗原に対して通常の病原体と同様に記憶してしまうことにより、これらの疾患は発症し慢性化する。これらの疾患では、過剰な免疫応答を抑制しても、抗原を記憶しているため、再発してしまうことが大きな問題であり、有害な記憶を除去しなければ、これら疾患の完治はあり得ない。免疫記憶システムを理解し、コントロールすることにより、これら慢性疾患を完治させることができると考えている。そのためには、どのような細胞が、どの組織で、どのような分子を使って維持されているのか、把握することから始まる。この免疫記憶の理解、本研究では特に免疫記憶の中核として働く記憶ヘルパーT細胞がどのように長寿命を獲得し維持しているのかという疑問に対する理解が、生物学においても医学にとっても非常に重要なスタートである。

2. 研究の目的

アレルギー疾患や自己免疫疾患の慢性化を理解する上で、記憶ヘルパーT細胞は極めて重要な働きをする。記憶ヘルパーT細胞は再侵入した抗原だけでなく自己抗原に対しても、迅速な免疫応答を引き起こす。この細胞がなければ、強い再発は起こらない。私たちの大きな目的は、記憶ヘルパーT細胞が長寿命を獲得し維持することに必須な分子メカニズムを明らかにすることであり、結果的に慢性免疫疾患の治療のための標的分子を見つけていくことである。私たちは今まで、記憶ヘルパーT細胞の形成や維持に関わる様々な分子を明らかにし、実際に中和抗体や阻害剤などを用いて、これら細胞の除去に成功してきた。これらの研究で、記憶ヘルパーT細胞の維持を支えている最も根幹となる分子は、サイトカインなどではなく、接着分子であることが明らかになってきた。特に特定の間質系ストローマ細胞との接着が不可欠である。そこで、今までの研究成果を進展させることに加えて、新たに間質系ストローマ細胞の性質をシングルセル遺伝子発現解析により明らかにしており、今までの記憶ヘルパーT細胞の遺伝子発現情報と照らし合わせた。

私は今まで、多くの記憶ヘルパーT細胞が骨髄に維持されていること(Tokoyoda et al. *Immunity* 30:721, 2009)を発見してきた。記憶細胞を維持できる容量がストローマ細胞数によってコントロールされており、免疫記憶能が数的に制限されていることを提示してきた(Tokoyoda et al. *Nat Rev Immunol* 10:193, 2010)。また記憶ヘルパーT細胞は循環し抗原を監視していると考えられてきたが、抗原がなくなれば、それらの細胞は骨髄に定着し、抗原の再侵入を待っているということを見出し、従来の考えを覆してきた。これらの独創的な研究を本申請でも行った。

3. 研究の方法

どのように短寿命なリンパ球が長い寿命を得ることが出来るのか、という生物学的な疑問を分子レベルで解明していく。つまり、細胞にとって長寿命を獲得し維持するとはどのようなことなのか、どのような細胞外環境が不可欠なのか、どのような細胞内シグナル伝達経路が動いているのか、疑問が尽きない。現時点では、記憶ヘルパーT細胞の生存には、ストローマ細胞上の特殊なコラーゲンが必要であり、低酸素、高グルコースという条件も解糖系が優位なエネルギー代謝を保つ上で重要である。本研究では、以下の2つのテーマを中心に研究を行った。

(1) 細胞が長寿命を獲得する分子メカニズム

ナイーブなT細胞が記憶細胞に分化するためには、活性化後、7回以上の細胞分裂を行うことが分かっている (Sarkander et al. Front Immunol 10:3113, 2020)。そのためには、IL-2というサイトカインの刺激が不可欠で、過剰な細胞分裂はIL-2受容体の発現を高めていくためにも行っていることがわかっている。またIL-2の刺激はPI3キナーゼ依存的にCD49bの発現を促進するが、CD49bは骨髄内への入り口である類洞血管を通過するために不可欠なホーミングレセプターであり、CD49b欠損CD4 T細胞は記憶細胞に分化できないことがわかっている (Hanazawa et al. Immunol Cell Biol 91:524, 2013)。本研究では、今まで明らかにしてきた情報を基に、記憶ヘルパーT細胞への分化に必須な分子を、in vivoにおける機能を解析することによって、長寿命を獲得する分子メカニズムの全体像を明らかにする。最近解析した記憶ヘルパーT前駆細胞の網羅的遺伝子発現解析から候補分子を絞り、レトロウイルスによるCRISPRやshRNA、阻害抗体や遺伝子欠損マウスを用いて機能を解析した。

(2) 細胞が長寿命を維持する分子メカニズム

記憶ヘルパーT細胞上のCD49bは骨髄内へ移行するために不可欠であるだけでなく、維持に必要なニッチ上の特殊なコラーゲンに接着するため、かつ長期生存に必要なシグナルを得るためにも不可欠である。また、TCA回路に依存しているナイーブ細胞は、抗原による活性化により解糖系に依存度が変換するが、記憶細胞は解糖系に依存したまま、低酸素条件下の骨髄に移行するため、解糖系依存を維持したまま、長期生存されることを明らかにしている。本研究では、接着分子からのシグナルと解糖系に依存する代謝経路を中心に、記憶ヘルパーT細胞の長期生存に必須な分子メカニズムをニッチ側からもアプローチすることによって、長寿命を維持する生存シグナルの全容が理解できるまで明らかにする。また、組織内の間質系ストローマ細胞が免疫記憶の維持をコントロールしている。現在注目している研究の1つは、この間質系ストローマ細胞群の同定である。そのストローマ細胞集団の細分化と機能の解明は、新たな免疫記憶の概念を生み出すものと考えている。シングルセル遺伝子発現解析により、骨髄間質系ストローマ細胞は、少なくとも14種類に分類できることがわかり、新規の様々なサイトカインや接着分子、細胞外マトリックスなどを明らかにしている。既に多くの情報を持つ、記憶ヘルパーT細胞側の遺伝子発現情報に、間質系ストローマ細胞側の遺伝子発現情報を加え、レセプター・リガンドに対応するデータベースに照らし合わせ、間質系ストローマ細胞が記憶細胞に影響を与える可能性のある分子をピックアップしており、候補を絞っていく。

4 . 研究成果

本研究では、レトロウイルス導入による shRNA や阻害抗体投与、遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。その結果、細胞分裂を止めることが記憶形成を抑制すること、細胞分裂による CCR7 分子の発現抑制と IL-2R の発現促進、IL-2 シグナルを獲得することなどが記憶ヘルパーT 細胞の形成に重要であることが分かった。CXCR6 は当初、発現解析から形成にかかわるものと推測していたが、形成には影響を与えないことが分かったと同時に、実は維持にかかわっていることが明らかになってきた。記憶ヘルパーT 細胞の長寿命維持には、他に解糖系で維持されることが重要であり、脂肪酸経路や電子伝達系、TCA 経路は維持に不可欠ではなかった。またインテグリン $\alpha 2 \beta 1$ が維持に不可欠であることは以前示してきたが、そのインテグリン分子の下流にある接着班キナーゼ (FAK) からのシグナルが維持に不可欠であることも判明した。

今回の研究で、記憶ヘルパーT 細胞の形成や維持にかかわる、多くの分子を同定することができた。現在、それらをつなぎ合わせることに成功しており、非常に複雑だが連鎖しながら、それらの細胞は長寿命を獲得していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Cornelis Rebecca, Hahne Stefanie, Taddeo Adriano, Petkau Georg, Malko Darya, Durek Pawel, Thiem Manja, Heiberger Lukas, Peter Lena, Mohr Elodie, Klaeden Cora, Tokoyoda Koji, Siracusa Francesco, Hoyer Bimba Franziska, Hiepe Falk, Mashreghi Mir-Farzin, Melchers Fritz, Chang Hyun-Dong, Radbruch Andreas	4. 巻 32
2. 論文標題 Stromal Cell-Contact Dependent PI3K and APRIL Induced NF- B Signaling Prevent Mitochondrial- and ER Stress Induced Death of Memory Plasma Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107982 ~ 107982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107982	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 Hojyo Shintaro, Tumes Damon, Murata Akihiko, Tokoyoda Koji	4. 巻 32
2. 論文標題 Multiple developmental pathways lead to the generation of CD4 T-cell memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 589 ~ 595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa051	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 Radbruch Andreas, McGrath Mairi Anne, Siracusa Francesco, Hoffmann Ute, Sercan-Alp ?zen, Hutloff Andreas, Tokoyoda Koji, Chang Hyun-Dong, Dong Jun	4. 巻 1
2. 論文標題 Homeostasis and Durability of T-Cell Memory?The Resting and the Restless T-Cell Memory	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Perspectives in Biology	6. 最初と最後の頁 a038083 ~ a038083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a038083	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 Hiepe Falk, Alexander Tobias, Doerner Thomas, Hauser Anja E., Hoyer Bimba F., Kubagawa Hiromi, Skriner Karl, Tokoyoda Koji	4. 巻 5
2. 論文標題 B-Lymphozyten und Plasmazellen als Treiber rheumatischer Erkrankungen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zeitschrift fuer Rheumatologie	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00393-022-01189-2	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 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Koji Tokoyoda
2. 発表標題 Salmonella escapes from immune memory
3. 学会等名 5th International Immunological Memory and Vaccine Forum Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Murata A, Sasaki H, Tokoyoda K
2. 発表標題 Isotype-specific metabolic requirements for survival of bone marrow plasma cells
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kimura U, Mursell M, Nagano S, Tokoyoda K
2. 発表標題 Bone marrow and splenic memory CD4 T cells are differently maintained in terms of cytokine signals, cell adhesion and cellular metabolism
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuo K, Hojyo S, Yoshino M, Tokoyoda K
2. 発表標題 Antigen priming of conventional dendritic cell 1 preferentially guides the differentiation of resting memory CD4 T cells
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------