

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07081

研究課題名（和文）骨髄と脾臓に維持される記憶ヘルパーT細胞の役割

研究課題名（英文）Roles of memory T helper cells in bone marrow and spleen

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、各組織の記憶ヘルパーT細胞を血清学的かつ遺伝学的に除去し、各々の動態や機能、役割を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、二次応答時には、骨髄記憶ヘルパーT細胞が4時間以内にCD40Lなどの活性化マーカーかつ機能分子を発現するのに対して、脾臓記憶ヘルパーT細胞は24時間後まで活性化は見られなかった。さらに骨髄から早期に末梢への遊走も見られたと同時に、骨髄でもB細胞との相互作用が見られ、骨髄記憶ヘルパーT細胞が主に強く二次応答に働いていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、骨髄で維持される記憶ヘルパーT細胞が高い機能を持ち、主に二次応答で貢献していることが分かった。ワクチンなどで記憶ヘルパーT細胞の形成を指標にする際は、骨髄を観察する必要があることが分かったとともに、自己免疫疾患やアレルギー疾患などでも主として働く記憶ヘルパーT細胞を除去するためには、骨髄の記憶ヘルパーT細胞を除く必要があることが分かった。この発見は、ワクチン開発や疾患の治療法確立のために、大きく役立つものであり、学術的にも社会的にも大きく意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we serologically and genetically depleted memory helper T cells in the bone marrow and spleen, and aimed to clarify their dynamics, functions, and roles. During the secondary response, bone marrow memory helper T cells expressed activation markers and functional molecules such as CD40L within 4 hours, whereas splenic memory helper T cells did not show activation until 24 hours later. Furthermore, the rapid migration from bone marrow to the periphery and interaction with B cells in the bone marrow were observed at the same time, indicating that bone marrow memory helper T cells are mainly involved in the secondary response.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶 ヘルパーT細胞 骨髄 二次応答

## 1. 研究開始当初の背景

感染や免疫における二次応答において、記憶ヘルパーT細胞は抗原特異的な免疫系の再活性化のために中枢として働くと考えられている。しかし、どのように関与しているのか、その動態や機能、役割については、未だに明らかになっていないことが多い。研究代表者は今まで、全身性の免疫応答では、記憶ヘルパーT細胞が主に骨髄に、また一部は脾臓に維持され、末梢血やリンパ節など他組織には維持されていないことを示してきた (Tokoyoda et al. *Immunity* 2009)。それにもかかわらず、記憶ヘルパーT細胞の特異的マーカーが同定されていないことや、二次応答時に骨髄と脾臓の記憶ヘルパーT細胞を各々追跡できないことなどの理由で研究が進まなかった。研究代表者は、骨髄記憶ヘルパーT細胞はインテグリン 2 やその下流の FAK 依存的に、また脾臓記憶ヘルパーT細胞は IL-7 依存的に維持されていることを明らかにし、各シグナルを単独または同時に阻害することによって、各組織の、またすべての記憶ヘルパーT細胞を特異的に除去可能になり、各記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割を解析できるようになった。そこで本研究では、二次応答時における骨髄ならびに脾臓の記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割を明らかにすると同時に、記憶ヘルパーT細胞そのものの役割についても明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、二次免疫応答において、どのように記憶ヘルパーT細胞が免疫系再活性化のために関与しているのか、その動態や機能、役割について明らかにすることである。研究代表者は、生体内において記憶ヘルパーT細胞が骨髄内の特殊なストローマ細胞により構成されている組織内微小環境(ニッチ)で長期間維持されていることを明らかにしてきた (Tokoyoda et al. *Immunity* 2009; Tokoyoda et al. *Nat Rev Immunol* 2010)。骨髄記憶ヘルパーT細胞は、高いサイトカイン産生能を示し、記憶B細胞から長寿命プラズマ細胞への分化を強く誘導する。それに対し、胚中心B細胞のプラズマ細胞への分化に関わる濾胞ヘルパーT(Tfh)細胞は、記憶細胞として脾臓にとどまることが他グループより報告されている。それらの結果より、骨髄と脾臓の記憶ヘルパーT細胞は機能や役割が異なる可能性が考えられる。また、B細胞の存在やIL-2の阻害は、Tfh細胞への分化を促進するが、骨髄記憶ヘルパーT細胞への分化は阻害するなど、骨髄と脾臓の記憶ヘルパーT細胞は形成過程も異なる (Hojyo et al. *Front Immunol* 2016; Sarkander et al. *Front Immunol* 2020)。さらに、維持においても、骨髄記憶ヘルパーT細胞は2型コラーゲンに接着して維持されており、またその受容体であるインテグリン 2 の発現は骨髄記憶ヘルパーT細胞で非常に高いが、脾臓記憶ヘルパーT細胞ではそのような接着や発現は見られなかった (Hanazawa et al. *Immunol Cell Biol* 2013)。そこで、記憶ヘルパーT細胞の維持におけるインテグリン 2 の役割を解析した結果、骨髄と脾臓で異なるシグナルで維持されていることを明らかにし、二次応答前に片方を消失させることが可能になった。これにより、本研究では骨髄と脾臓、各記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割を解析できるようになった。二次応答時には、記憶ヘルパーT細胞自身が増殖するとともに、記憶B細胞の長寿命プラズマ細胞への分化や胚中心への再移行などが主に脾臓で行われていると考えられてきた。しかし最近 Riedel らにより、記憶B細胞が骨髄にも多く維持されていることが報告され、骨髄でも記憶B細胞と記憶ヘルパーT細胞が会う可能性を無視できなくなった。本研究では、記憶B細胞の二次応答の場として

特に骨髄と脾臓に着目しながら、各記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割について明らかにする。

自己免疫疾患やアレルギー疾患などの慢性免疫疾患では、再発に記憶ヘルパーT細胞と記憶B細胞、長寿命プラズマ細胞が関与すると考えられている。記憶B細胞や長寿命プラズマ細胞は抗CD20抗体やプロテアソーム阻害剤、また研究代表者が明らかにしたサルモネラ因子 SiiE (Männe et al. Proc Natl Acad Sci USA 2019; Takaya et al. Front Immunol 2020)で除去可能であることから、慢性免疫疾患の再発を防ぐためには、残る記憶ヘルパーT細胞の除去だけが課題になっており、本研究の動機の一つにもなっている。研究代表者が見出した、大部分のCD4陽性T細胞には影響を与えずに、骨髄もしくは脾臓、またはすべての記憶ヘルパーT細胞の除去を可能にした予備実験の結果より、あらゆる免疫記憶を消去し慢性免疫疾患を完治させることができる可能性が高くなっている。免疫記憶という観点から慢性免疫疾患を解明しようという点でも、本研究は高い創造性を持っている。また、ワクチンを開発する際、多くの研究は免疫反応で評価してきたが、ワクチンの本来の目的である免疫記憶を評価することが、記憶細胞の局在を同定した現在、可能になってきている(Sarkander et al. Clin Transl Immunol 2016)。本研究で脾臓か骨髄のどちらか、もしくは両組織の記憶ヘルパーT細胞が二次応答に重要であることが分かれば、どの組織の記憶ヘルパーT細胞の形成をワクチンの標的にすべきかが明らかになる。本研究により、慢性免疫疾患やワクチンに関連する免疫記憶が解明されれば、免疫学の基礎研究だけではなく、臨床応用においても大きく貢献できる。

### 3. 研究の方法

記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割を解析するために、以下の3つに分けて研究を実施する。主な実験系は、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 糖タンパク質特異的 TCR Tg マウス (Smarta, Thy1.2)の脾臓ナイーブCD4 T細胞をC57BL/6-Thy1.1マウスに移植し、ニトロフェニル(NP)基で標識されたLCMV糖タンパク質で免疫ならびにブーストをする実験系と、Salmonella Typhimurium SiiE欠損株を用いて感染・再感染させ、蛍光標識MHCクラスIIテトラマーでサルモネラ特異的T細胞を検出する実験系を共に試す。SiiE欠損株はサルモネラによる抗体免疫抑制を除去した株であり、通常の細菌に対する抗体免疫誘導ができる(Männe et al. Proc Natl Acad Sci USA 2019)。

#### (1) 骨髄記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割

免疫や感染から2ヶ月後の記憶期に、抗IL-7抗体を3回腹腔内投与する系と、LCMV-TCR Tg x Rosa26ERT2cre x IL-7R<sup>flox/flox</sup>をC57BL/6-Thy1.1マウスに移植・免疫したマウスに、タモキシフェンを5回腹腔内投与で記憶期に遺伝子欠損を誘導する系で行う。脾臓記憶ヘルパーT細胞が十分に減少した2週間後にブーストし、二次応答時の骨髄記憶ヘルパーT細胞の動態や脾臓記憶ヘルパーT細胞の機能と役割を調べる。骨髄と脾臓、リンパ節、末梢血などにおける抗原特異的ヘルパーT細胞数だけではなく、表現型(CXCR5、PD-1、Ly-6C、T-bet、Bcl-6、CCR7、CD62Lなど)やサイトカイン産生能(IL-21、IFN $\gamma$ 、IL-4など)、マクロファージなどの活性化、脾臓や骨髄の抗原特異的な抗体やBCRを産生するプラズマ細胞数や活性化・胚中心B細胞数、血清中の抗原特異的抗体価も、親和性により分けながら、フローサイトメトリーやELISpot法、ELISA、免疫染色法などで解析する。T細胞の動態はブースト後1、2、4、7、14日目で、B細胞の活性化や分化、血清価は4、7、14日目で解析する。

## (2) 脾臓記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割

免疫や感染から2ヶ月後の記憶期に、抗インテグリン 2抗体もしくはFAK阻害剤を3回腹腔内投与する系と、LCMV-TCR Tg x Rosa26ERT2cre x FAK<sup>flox/flox</sup>を移植・免疫したマウスに、タモキシフェンを5回腹腔内投与で記憶期に欠損を誘導する系で行う。骨髄記憶ヘルパーT細胞が大きく減少した2週間後にブーストし、二次応答時の脾臓記憶ヘルパーT細胞の動態や骨髄記憶ヘルパーT細胞の機能と役割を上記(1)と同様に解析する。

## (3) 記憶ヘルパーT細胞の役割

免疫や感染から2ヶ月後の記憶期に、抗IL-7抗体と抗インテグリン 2抗体もしくはFAK阻害剤を同時に投与する系で行う。両記憶ヘルパーT細胞が大きく減少した2週間後にブーストし、二次応答時の記憶ヘルパーT細胞の役割を調べる。解析方法は上記(1)と同様である。

上記の(1)から(3)までの結果より、骨髄と脾臓各々の記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割を明らかにすると同時に、二次免疫応答時に記憶ヘルパーT細胞自身がどのような役割を持っているのかも解明することができる。また骨髄が二次応答による長寿命プラズマ細胞分化の場であるかを評価する。記憶B細胞も記憶ヘルパーT細胞もともに骨髄に多く維持されているにもかかわらず、もし長寿命プラズマ細胞の分化が起こらなければ、その理由も調べる。

## 4. 研究成果

二次免疫応答において、記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割は不明な点が多い。研究代表者は、全身性の免疫応答では、記憶ヘルパーT細胞が主に骨髄に、また一部は脾臓に維持され、末梢血やリンパ節など他組織には維持されていないことを示してきた。しかし、記憶ヘルパーT細胞の特異的マーカーが同定されていないことや、骨髄と脾臓の記憶ヘルパーT細胞を区別できないことなどで研究が進まずにいた。研究代表者は、骨髄記憶ヘルパーT細胞はインテグリン2やその下流の接着斑キナーゼ(FAK)依存的に、また脾臓記憶ヘルパーT細胞はIL-7依存的に維持されていることを明らかにした。これにより、各シグナルを単独または同時に阻害することによって、各組織の、またすべての記憶ヘルパーT細胞を特異的に除去することが可能になり、各記憶ヘルパーT細胞の動態や機能、役割を解析できるようになった。本研究では、各組織の記憶ヘルパーT細胞を血清学的かつ遺伝学的に除去し、各々の動態や機能、役割を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、二次応答時には、骨髄記憶ヘルパーT細胞が4時間以内にCD40Lなどの活性化マーカーかつ機能分子を発現するのに対して、脾臓記憶ヘルパーT細胞は24時間後まで活性化は見られなかった。さらに骨髄から早期に末梢への遊走も見られたと同時に、骨髄でもB細胞との相互作用が見られ、骨髄記憶ヘルパーT細胞が主に強く二次応答に働いていることが分かった。抗体による除去実験では二次応答前の時点で各細胞の減少が半分程度であったため、二次応答時の細胞数を解析したが有意な差が得られず、現在交配中のコンディショナル欠損マウスで解析中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hiepe F, Alexander T, Duerner T, Hauser AE, Hoyer BF, Kubagawa H, Skriner K, Tokoyoda K	4. 巻 81
2. 論文標題 B lymphocytes and plasma cells as drivers of rheumatic diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Z Rheumatol	6. 最初と最後の頁 660
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

1. 著者名 Radbruch Andreas, McGrath Mairi Anne, Siracusa Francesco, Hoffmann Ute, Sercan-Alp Ozen, Hutloff Andreas, Tokoyoda Koji, Chang Hyun-Dong, Dong Jun	4. 巻 13
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
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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sano Nagano, Uki Kimura, Mei Sakagami, Koji Tokoyoda
2. 発表標題 Regulatory T cell-dependent maintenance of memory T helper cells in vivo
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kana Matsuo, Ohki Kokoro, Koji Tokoyoda
2. 発表標題 cDC1-dependent generation of memory CD4 T cells
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiko Murata, Harumi Sasaki, Koji Tokoyoda
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 Uki Kimura, Mathias Mursell, Sano Nagano, Koji Tokoyoda
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 Kana Matsuo, Shintaro Hojyo, Miya Yoshino, Koji Tokoyoda
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

1. 発表者名 Koji Tokoyoda
2. 発表標題 Targeting Isotype-Specific Plasma Cell Niches
3. 学会等名 30th Annual Henry Kunkel Society Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koji Tokoyoda
2. 発表標題 Maintenance of memory lymphocytes
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koji Tokoyoda
2. 発表標題 免疫記憶とアレルギーの寛解
3. 学会等名 第52回日本アレルギー学会中四国支部会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村宇輝、常世田好司
2. 発表標題 Salmonella evades from humoral immunity and antibiotics
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大木こころ、常世田好司
2. 発表標題 Memory T helper cell differentiation regulated by a type 1 conventional dendritic cell subpopulation
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村田暁彦、常世田好司
2. 発表標題 Macrophages function as survival niches for CD4+ skin-resident memory T cells
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉野三也、常世田好司
2. 発表標題 Transport of skin-specific self-antigen by XCR1-positive dermal dendritic cells
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田航、常世田好司
2. 発表標題 Generation of autoreactive bone marrow plasma cells
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山下政克 / 編 常世田好司 他 / 著	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 288
3. 書名 基礎から学ぶ免疫学	

〔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
---------	---------