

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790453

研究課題名（和文） ケモカイン受容体 CXCR3 によるメモリーCTL樹立・維持の
制御機構の解明研究課題名（英文） Role of chemokine receptor CXCR3 on generation and maintenance of
memory CD8 T cells

研究代表者

倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00396722

研究成果の概要（和文）：ケモカイン受容体 CXCR3 が、活性化した CD8 陽性 T 細胞上に急速に発現し、プライミングされる T 細胞領域から抗原や炎症性サイトカインが豊富である脾臓辺縁帯へと抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を選択的に誘導することを明らかにした。ケモカインによる微小環境局在差がエフェクター細胞への分化、さらにはメモリー細胞の形成に影響することを示した。CXCR3 シグナルへの介入はワクチンへの応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It is not known how early lymphocyte distribution after infection has an impact on this process. We demonstrate that the chemokine receptor CXCR3 is involved in promoting CD8⁺ T cell commitment to an effector fate rather than a memory fate by regulating T cell recruitment to an antigen/ inflammation site.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫記憶、CD8 陽性 T 細胞、CXCR3、エフェクター分化、脾臓辺縁帯

1. 研究開始当初の背景

CTL は非自己抗原を発現する細胞を認識して排除することで感染症や腫瘍の最終的な

コントロールに重要な役割を果たしており、エフェクターCTL の一部がメモリーCTL へ移行し生残することで、長期的な個体防御が維

持されている。メモリーCTLの樹立・維持を制御する分子でこれまでに明らかになっているのは維持性サイトカイン(IL-2/IL-7/IL-15等)や抑制性受容体(PD-1等)など少数に限られており、その全容は未だによく分かっていない。副作用を抑制しつつメモリーCTL樹立を最適化した良質のワクチンを開発するには分子・時期特異的な介入(治療)が重要であり、そのためにはメモリーCTLの樹立・維持に関する分子機序の詳細な解明が必要である。

ケモカイン受容体CXCR3は炎症性ケモカインCXCL9(Mig)・CXCL10(IP-10)・CXCL11(I-TAC)に反応して主として白血球遊走を制御する。抗原特異的CTL応答において、ナイーブ状態でのCXCR3発現はわずかであるが、活性化に伴い高発現し、エフェクターCTLを炎症局所へ動員することが知られている。CXCR3発現は全体としてはエフェクター期以降も持続するが、発現率と発現強度は同一水準で経過せず、コントラクション期には低下し、CXCR3発現に限ってもヘテロな状態を呈する。コントラクション期以降にエフェクターCTLからメモリーCTLへの選別と成熟が進行するが、この時期のCXCR3作用はほとんど明らかになっていない。他方、CXCR3はT細胞増殖を微弱ながら促進することや、血管内皮細胞や神経細胞にも発現し細胞内シグナル伝達への関与が示唆されており、遊走制御以外の作用が報告されている。CXCR3がメモリーCTL樹立・維持に果たす役割を明らかにできれば、免疫システムの根幹をなす「免疫記憶」の形成を直接制御するという、ケモカイン・システムの新しい作用機序を解明することができ、さらにワクチン応用に向けた重要な標的をも開拓することが可能となる。

2. 研究の目的

免疫システムの最大の特徴である「免疫記憶」を理解し、ワクチンへの応用を図るためには、メモリーCD8陽性T細胞(CTL)樹立・維持の分子機序を解明する必要がある。ケモカイン受容体CXCR3は、これまで主にエフェクターT細胞の遊走制御について解析されてきたが、CTL上の発現がコントラクション期以降に持続するにも関わらず、メモリーCTLの樹立・維持に果たす作用は未解明であった。CXCR3欠損T細胞受容体トランスジェニック細胞を用いてCTL応答を比較・解析し、メモリーCTL樹立・維持に関してCXCR3が制御するシグナル・遺伝子(群)を同定して、CXCR3によるCTL応答制御(特にメモリー樹立)を解明することを目的として本研究を申請した。

3. 研究の方法

(1) 基本解析モデル

モデル抗原をOVAとし、これに対するCD8

陽性T細胞TCR-TgであるOT-Iをドナー細胞に、OVAを発現する組換えワクシニアウイルス(VV-OVA)等を感染因子に用いる。CXCR3KO×OT-I細胞とWT×OT-I細胞を野生型レシピエントマウスに共養子移入し、LM-OVA/VV-OVAを接種した後にCTL応答を解析する系を樹立した。

(2) CTL感染応答の「量」に関する制御

CTL数・分布解析：主要臓器から単核球を分離しフローサイトメーター(FCM)にてCXCR3KOおよびWT×OT-I細胞数を臓器別に定量的に比較し、CXCR3KO細胞がメモリー細胞に移行しやすいことを確認した。

(3) CTL感染応答の「質」に関する制御

(2)にてFCM解析を行う際に同時にCTL分化・成熟に関する既知の表面マーカー(CD27, CD28, CD43, CD122, CD127, KLRG-1等)を定量的に比較・評価した。また細胞内サイトカイン多重染色にて複数のサイトカイン等(IFN γ , TNF, IL-2, Granzyme B, Perforin等)の産生性を同時に測定し、単細胞レベルでサイトカイン多重産生性(=良質のCTL形成状態)を評価した。CXCR3KO細胞は質的にも良質のメモリー細胞表現型を示すことが明らかとなった。

(4) CXCR3によるCTL感染応答制御の「時期」と「分子機序」を解明

コントラクション期以降にCXCR3KO×OT-Iの生残が有利であることを予備実験で明らかにしており(図2)、その機序について以下の点から解析を進める。

時期の同定：CTL応答の量的・質的变化が顕在化する時期に関して(2)と(3)で示される情報に加えて、細胞増殖(BrdU取込やCFSEラベル後再養子移入)あるいは細胞死(AnnexinV染色)のバランス変化を糸口に、CXCR3欠損によってCTL応答に差異が生じる時期を同定する。

CXCR3標的遺伝子候補の抽出：同定された時期の前後で両OT-Iを分取し、定量PCRやウェスタン法などを用いてTCRやサイトカインなどのシグナル経路・細胞増殖や細胞死関連遺伝子の遺伝子発現/機能解析を行う。結果についてCXCR3KO×OT-IとWT×OT-Iを比較することで、T細胞分化や細胞生残に関連する遺伝子群からCXCR3の調節を受ける可能性がある候補を抽出する。

候補遺伝子の関与を証明：前項でCXCR3による調節を受けることが示唆された候補遺伝子(群)について解析を進める。CXCR3KO×OT-Iで候補遺伝子を操作しメモリーCTL生残有利性への影響を解析することで、CXCR3欠損で観察された現象と標的候補遺伝子との相関を確認する。

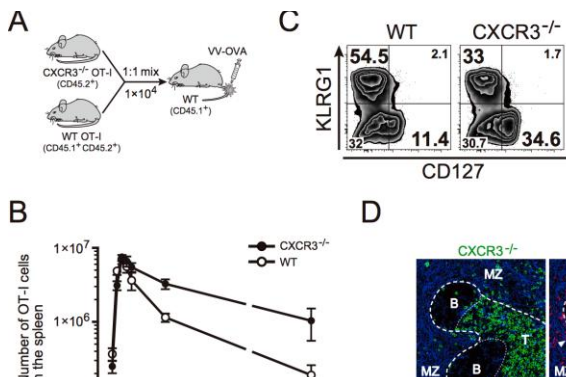
CXCR3 リガンドの同定：CTL 生残に関与する CXCR3 リガンドと作用時期を同定するために、生体内応答時の濃度測定に加えて、応答途中まで *in vitro* で誘導した後に生体内に養子移入しメモリーCTL 樹立を比較評価する実験系を用いて、培養時に添加するケモカインを組合せて解析する。

サイトカイン感受性の確認：

CXCR3KO×OT-I の生残有利性について、維持性サイトカイン(IL-2 / -7 / -15 等) に対する感受性に WT との差が存在するかを、サイトカイン添加培養実験で確認する。

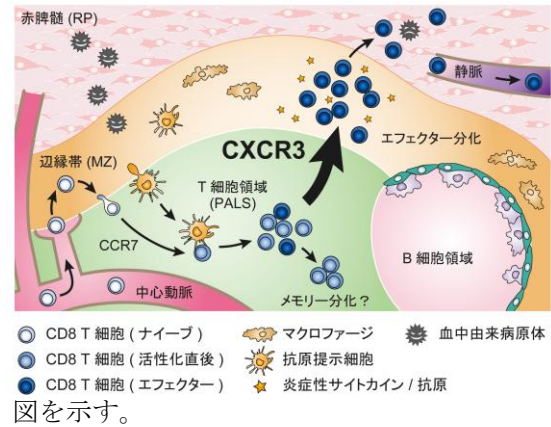
4. 研究成果

CXCR3 欠損および野生型 CD8 陽性 T 細胞を共養子移入する実験系を用いて CXCR3 が CTL 応答に及ぼす影響を解析した (図 A)。大変興味深いことに感染応答 7 日目において CXCR3 欠損 CTL は野生型 CTL に比べて MPEC 表現型を高率に示し、その後のメモリーCTL 形成が増加した (図 B, C)。CXCR3 が G 蛋白共役受容体であることから、CXCR3 が直接 CD8 陽性 T 細胞に内因的な刺激シグナルを伝達している可能性を考慮して研究を進めてきたが、*in vitro* でのリガンド添加培養実験では顕著な影響を認めることができなかった。このため、CXCR3 が制御する生体の局在 (移動) が CD8 陽性 T 細胞の応答の質を制御していると考え、感染後早期の脾臓内局在に焦点を当てて組織学的な解析を実施した。その結果、活性化後早期に CD8 陽性 T 細胞上に発現誘導される CXCR3 が、脾臓内において CD8 陽性 T 細胞を傍リンパ鞘周辺 T 細胞領域から辺縁帯へ遊走させることで、エフェクター型への分化を促進していることが明らかになった (図 D)。



CXCR3 は抗原特異的な活性化を受けた T 細胞のみに発現が誘導されるため、辺縁帯への集積は抗原特異的 T 細胞に限定され、その他の非特異的な集団は T 細胞領域内に残ることになる。これにより辺縁帯のスペースやサイトカインなどのリソースは抗原特異的細胞が大量のエフェクターCTL を産出するために有効に利用され、大多数の非特異的集団は炎症性サイトカインによる bystander 活性化を

避けることができるのではないかと、我々は考えている。CXCR3 がほぼ全ての活性化 CTL 上に発現することから、ワクチン接種量 (抗原や炎症シグナルの総量) を増加させずとも CXCR3 シグナルを制御することでワクチン効果を増強することが可能であると考えられる。本研究の成果は、The Journal of Experimental Medicine にて発表した。概念



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① [Kurachi Makoto](#) 他, Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8⁺ T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration, The Journal of Experimental Medicine, 査読有、208 巻、2011、pp. 1605-1620, 10.1084/jem.20102101

[学会発表] (計 4 件)

- ① [Kurachi Makoto](#), Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8⁺ T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration, 米国免疫学会 (AAI2011)、2011 年 5 月 16 日、アメリカ合衆国サンフランシスコ国際会議場
- ② [Kurachi Makoto](#), Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8⁺ T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration, Keystone Symposium, 2011 年 2 月 8 日、Fairmont Hotel (Banff, Canada)
- ③ [Kurachi Makoto](#), Chemokine receptor CXCR3 regulates the generation of memory CTL, International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 25 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

④倉知 慎、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞 (CTL) 応答においてケモカイン受容体 CXCR3 はエフェクター CTL への分化を促進しメモリー CTL 樹立を制御する、日本炎症再生医学会、2010 年 8 月 5 日、京王プラザホテル (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00396722

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし