

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790549

研究課題名（和文） MHC クラス II によるメモリーCD8T 細胞恒常性維持機構の解析

研究課題名（英文） How MHC class II molecules promote memory CD8 T cell homeostasis

研究代表者

瀬戸口 留可（SETOGUCHI RUKA）

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：50415204

研究成果の概要（和文）：

メモリーCD8T細胞の存在数を生体内で維持する外因性因子の1つとしてCD4T細胞によるヘルプが報告されていたが、我々は、MHCクラスII欠損マウスにおいてメモリーCD8T細胞が生存を維持できないのは、CD4T細胞が欠損しているためではなく、MHCクラスII分子を欠損している細胞の機能異常であることを明らかにした。本研究ではこのメカニズムを明らかにするために、どの細胞が発現するMHCクラスIIが重要かを検討した。まず非血球系と血球系で発現するMHCクラスII、どちらがメモリーCD8T細胞の恒常性に重要かを、骨髄キメラを用いて検討したところ、非血球系は必須ではないことが明らかになった。さらにB細胞およびMHCクラスII欠損マウスを用いた骨髄キメラによりB細胞が発現するMHCクラスIIも必須ではないことを見出した。以上の結果より樹状細胞またはマクロファージが発現するMHCクラスIIが重要である可能性が高まった。メモリーCD8T細胞の局在を免疫染色により解析した結果、樹状細胞およびマクロファージと共同在している細胞数は正常マウスとMHCクラスII欠損マウスで同程度であった。メモリーCD8T細胞を移入後21日目に、MHCII^{-/-}マウスと正常マウスの血清中のいくつかのサイトカイン量をBio-Plex pro アッセイまたはELISA法を用いて定量したが、現時点までに両群で有意に発現量が異なるサイトカインはない。さらに移入したメモリーCD8T細胞の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、MHCクラスII欠損マウスと正常マウスに移入したメモリーT細胞において2倍以上発現量に差がある遺伝子が77個同定された。今後はこれら候補分子がメモリーCD8T細胞の恒常性維持に関与しているかを解析していく予定である。

研究成果の概要（英文）：

Memory CD8 T cells are long-lived antigen (Ag)-specific CD8 T cells which respond quickly, proliferate robustly, and exert effector functions faster than naïve CD8 T cells upon reencounter with the specific Ags. Memory CD8 T cells are maintained at a stable size over a long period of time, but the mechanisms by which their population size is maintained remain elusive. It has been proposed that the maintenance of memory CD8 T cells depends on “CD4 T cell help”, based on the observation that CD8⁺ T cells which have been primed with Ags in wild-type (WT) mice survive poorly when transferred into MHCII^{-/-} hosts as compared to WT hosts. Our results clearly show that the impaired maintenance of memory CD8 T cells in MHCII^{-/-} mice is not due to the absence of CD4⁺ helper T cells. This was shown by transferring Ag-primed CD8⁺ T cells into WT mice treated with the anti-CD4 GK1.5 mAb, or CD4^{-/-} mice, or ThPOK mutant mice, all of which lack functional CD4⁺ helper T cells. We also found that MHCII molecules expressed by hematopoietic cells, not by non-hematopoietic cells, are required for memory CD8 T cell maintenance. The mRNA expression levels of IL-7 and IL-15, cytokines reported to be important for memory CD8 T cell homeostasis, were comparable in the spleens of MHCII^{-/-} and WT mice. We have not found the different expression levels of cytokines, chemokines, and growth factors in the serum of MHCII^{-/-} and WT mice so far. However, microarray analysis of genes expressed by

transferred CD8 T cells in MHCII^{-/-} and WT mice displayed 77 different expression levels of genes. We are currently attempting to uncover the function of these candidate genes in memory CD8 T cell maintenance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：免疫学的記憶

1. 研究開始当初の背景

通常の免疫反応では、抗原によって感作されたことのないナイーブ CD8T 細胞が外来抗原に反応し増殖した後、大部分が細胞死を起こす一方、少数の CD8T 細胞が生き残り、もう一度同じ抗原に遭遇した際、素早く効率的に免疫反応を起こす。このように外来抗原が生体内から除去された後も長く免疫系に存在し、再刺激により素早くエフェクター機能を発現する CD8T 細胞をメモリーCD8T 細胞と呼ぶ。この細胞群の分化機構、エフェクター機能を記憶するメカニズム、そして生体内でその存在数を維持するメカニズムは明らかではない。

メモリーCD8T 細胞を生体内で維持する外因性因子として、これまでに IL-7、IL-15、CD4T 細胞によるヘルプが報告されている。IL-7 は生存に、IL-15 は恒常性を維持するための増殖(homeostatic proliferation)に必要なものである。一方、“CD4T 細胞ヘルプ”の分子の実体は混沌としている。2003 年に、CD4T 細胞のヘルプがなければメモリーCD8T 細胞は激減する、あるいは機能不全に陥ることが 3 つのグループからいくつかの実験系を用いて報告された。しかしながら他のグループからの報告にも見られるように、CD4T 細胞を欠損する状況下においてメモリーCD8T 細胞が機能不全に陥ることは実験系に依らず一般化できるものの、数自体が減少するか否かは実験系によって異なるという矛盾があった。また、CD4T 細胞ヘルプがメモリーCD8T 細胞の分化においてどの時点で必要であるのか(抗原感作時に必要なのか、免疫記憶形成後に必要なのか)は実験系によって異なる結論が導かれていた。

2. 研究の目的

メモリーCD8T 細胞は外来抗原が生体内から除去された後も免疫系に長期間生存し、高い生体防御能力を維持するが、その恒常性維持メカニズムは不明である。これ

まで、MHC クラス II 欠損マウスを用いた実験からメモリーCD8T 細胞の維持には CD4T 細胞からのヘルプが重要であると考えられてきたが、申請者は、CD4T 細胞ではなく、むしろ MHC クラス II 分子を欠損している細胞自体の機能異常がメモリーCD8T 細胞の恒常性に影響を及ぼすことを見出した。本研究では、MHC クラス II 欠損マウスにおけるメモリーCD8 T 細胞の恒常性異常を引き起こす外因性・内因性因子を同定することでメモリーCD8 T 細胞の恒常性維持メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

MHC クラス II 欠損マウスにおいて何故メモリーCD8T 細胞の数が減少するのかを明らかにするために、外因性および内因性因子を同定し、機能解析を試みた。外因性因子を明らかにするために、まず血清中の様々なサイトカイン、ケモカイン、増殖因子の濃度を網羅的に測定し、MHC クラス II 欠損マウスにおいてどのような液性因子の発現が変動しているかスクリーニングした。また、メモリーCD8T 細胞の生体内での局在を解析しこの細胞群の生存に必要な環境の同定を試みた。内因性因子としては、MHC クラス II 欠損マウスと正常マウスに移入したメモリーCD8T 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、MHC クラス II 欠損環境下で変動する候補遺伝子をスクリーニングし、機能解析を行った。

4. 研究成果

1) 外因性因子の検討

初めにどの細胞が発現する MHC クラス II がメモリーCD8T 細胞の恒常性維持に重要かを検討した。まず非血球系と血球系で発現する MHC クラス II、どちらがメモリーCD8T 細胞の恒常性に重要かを、骨髓キメラ(ホストとして MHCII^{-/-}マウスか野生型マウスを用い、野生型マウスの骨髓細胞により再構成させた)を用いて検討したところ、非血球系は必須ではないことが明

らかになった。さらに B 細胞および MHC クラス II 欠損マウスの骨髄細胞を 1 : 1 に混合し、致死量の放射線を照射した野生型マウスで再構成させた混合骨髄キメラ (B 細胞は MHCII^{-/-}マウスの骨髄からのみ分化する) を抗原特異的 CD8T 細胞のホストとして用い、B 細胞が発現する MHC クラス II も必須ではないことを見出した。以上の結果より樹状細胞またはマクロファージが発現する MHC クラス II が重要である可能性が高まった。メモリー CD8T 細胞の局在を免疫染色により解析した結果、樹状細胞およびマクロファージと共局在している細胞数は正常マウスと MHC クラス II 欠損マウスで同程度であった。したがって共局在できないために生存シグナルを受け取れないということは起きていないと考えられる。メモリー CD8T 細胞を移入後 21 日目に、MHCII^{-/-}マウスと正常マウスの血清中のいくつかのサイトカイン量を Bio-Plex pro アッセイまたは ELISA 法を用いて定量したが、現時点までに両群で有意に発現量が異なるサイトカインはない (図 1 参照)。

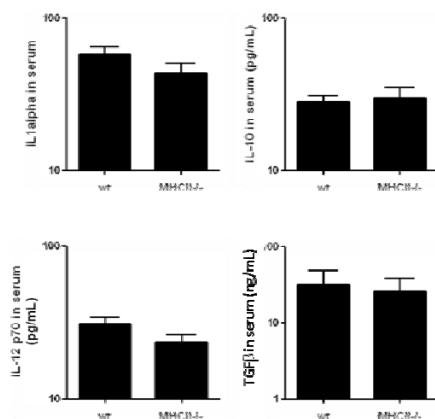


図 1 : 血清中のサイトカイン

2) 内因性因子の検討

MHCII^{-/-}マウスにおけるメモリー CD8T 細胞の減少が、メモリー CD8T 細胞特異的に誘導される現象なのかどうかを検討するために、ナイーブ CD8T 細胞を MHCII^{-/-}マウスに移入し、移入後 60 日目に数を解析した。移入したナイーブ CD8T 細胞の数は MHCII^{-/-}マウスにおいて野生型マウスと同程度の数が維持されていた。このことから、メモリー CD8T 細胞特異的に誘導される現象であることが判明した。さらに移入したナイーブ CD8T 細胞の性状解析を行うと、活性化型フェノタイプ (CD44^{high} CD122^{high}) の割合が野生型に移入した場合と比較し、3 倍の増加が観察され、増殖

している細胞が発現する核内蛋白である Ki67 を発現する細胞の割合は 2 倍に増加していた。この結果から MHCII^{-/-}マウスの生体内の環境は CD8T 細胞が活性化されやすい環境であると考えられた。MHCII^{-/-}マウスに移入したメモリー CD8T 細胞にも過剰な活性化を指し示すフェノタイプがないか検討したところ、CCR7^{low} の割合が野生型に移入した場合と比較し、2 倍以上に増加していた (図 2 参照)。このことから、過剰な活性化または細胞の局在が異なる可能性が示された。さらに移入したメモリー CD8T 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、MHCII^{-/-}マウスと野生型マウスに移入したメモリー T 細胞において 2 倍以上発現量に差がある遺伝子が 77 個同定された。このうち、活発に増殖している細胞が発現する cyclin A2 の発現が MHCII^{-/-}マウスに移入したメモリー CD8T 細胞で野生型に移入した場合に比べ増加していた。定量的 PCR により確認したところ、cyclin A2 の mRNA の発現レベルは MHCII^{-/-}マウスのメモリー CD8T 細胞で野生型マウスに比べ 4 倍の増加であった (図 3 参照)。このことから、MHCII^{-/-}マウスが CD8T 細胞にとって過剰に活性化しやすい環境であると考えられる。

今後はマイクロアレイの結果から得られた候補分子がメモリー CD8T 細胞の恒常性維持に関与しているかを解析していく予定である。

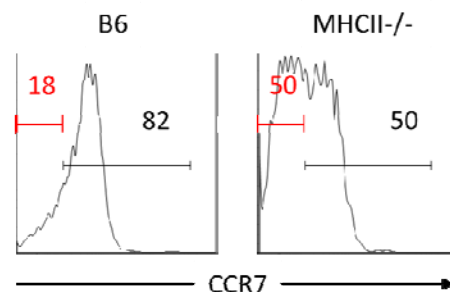


図 2 : メモリー CD8T 細胞上に発現する CCR7 の発現レベル

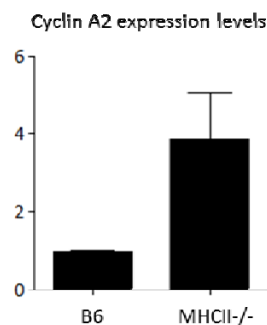


図 3 : cyclin A2 mRNA の発現レベル

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 1 件)

Plasticity of Foxp3+ T cells reflects
promiscuous Foxp3 expression in conventional
T cells but not reprogramming of regulatory T
cells.
Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H,
Fehling HJ, Waldmann H, Huehn J, Hori S.
Immunity. 36, 2012, p262-75.

[学会発表] (計 2 件)

1) 瀬戸口 留可 「クロマチンリモデ
リング因子 Brg1 による CD8T 細胞の増殖
および IFN-gamma 産生の制御」, 千葉幕
張メッセ, 第 40 回日本免疫学会学術集
会, 2011.11.27

2) Ruka Setoguchi, Shohei Hori,
Michael J. Bevan 「How MHC class II
molecules promote memory CD8 T cell
homeostasis」, 京都和順会館, 第 22
回 Kyoto T cell Conference, 2012.07.07

[図書] (計 1 件)

瀬戸口 留可 「メモリーCD8T 細胞の恒
常性維持メカニズム」免疫記憶の制御と疾患
治療 実験医学増刊号 (羊土社) 2011 年

[産業財産権]

○出願状況 (該当なし)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (該当なし)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
http://www.ak.med.kyoto-u.ac.jp/group_research/setoguchiG.html

(1) 研究代表者
瀬戸口 留可 (せとぐち るか)

研究者番号: 50415204

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

6. 研究組織