

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790551

研究課題名(和文) 活性化リンパ球特異的細胞接着因子CRTAMの腸管免疫における機能の解明

研究課題名(英文) Regulatory role of CRTAM+CD4+T cells in the mucosal immunity

研究代表者

竹内 新 (TAKEUCHI, Arata)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：00360579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：CRTAMはリンパ球の接着に関与する分子として単離された。通常、T細胞にはCD8陽性の細胞傷害性T細胞とCD4陽性のヘルパーT細胞の2種類が存在しているが、今回我々が発見したCRTAM分子を発現するCD4陽性T細胞は、遺伝子解析の結果から、ヘルパーT細胞と細胞傷害性T細胞の両方の特徴を持ち合わせる非常にユニークな細胞であることが判明した。この細胞は腸の中に多く存在して働いているが、大腸炎を起こした際には、症状の悪化に関与していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We previously identified an adhesion molecule CRTAM that is expressed on activated lymphocytes. Most of the T cells belong to one of two subset, these are CD8+ cytotoxic T cells and CD4+ helper T cells. In this study, we found that a small fraction of activated CD4+T cells express CRTAM. The gene expression profiles revealed that CRTAM+CD4+T cells shear both characteristics of helper and cytotoxic T cells. CRTAM+CD4+T cells are accumulated to intestine, and function during immune response. However, they worsen a symptom when colitis is induced.

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：細胞接着因子 細胞傷害活性 粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

我々はCD8⁺T細胞から、活性化に伴い発現が誘導される分子としてCRTAMを単離した。CRTAMは細胞表面分子で、細胞の刺激から12時間後程度の比較的早い時点をピークに一過性の発現を示す。また、CRTAMのリガンドとして、細胞接着因子の一つであるNec12を同定し、このCRTAM-Nec12ヘテロ結合が細胞間接着に重要な役割を果たしていることを報告してきた。

当初、CD8⁺T細胞にのみ発現すると思われていたCRTAMであるが、2-5%程度の脾臓CD4⁺T細胞にもCRTAM陽性細胞が認められることを見出した。更に腸管の粘膜固有層に存在するCD4⁺T細胞では、その割合が20%に達する程高くなっていることを突き止めた。

腸管内におけるCRTAM陽性CD4⁺T細胞の役割を明らかにすることを目的として、ナイーブCD4⁺T細胞をRag欠損マウスに移入して大腸炎を誘導するモデル実験を行った。野生型、CRTAM欠損マウス、どちらの細胞を移入しても大腸炎の誘導は認められたが、驚いたことに、CRTAM欠損マウスの細胞を移入したものでは、その後徐々に体重の回復が認められ、明らかに野生型を移入したものとは異なる経過を示し、改善が認められた。

2. 研究の目的

CRTAM陽性CD4⁺T細胞が粘膜固有層に多く存在し、CRTAM欠損細胞では大腸炎の誘導が軽微なものになったことから、CRTAMが腸管内の免疫環境においても、細胞の分化、機能に重要な役割を果たしている可能性が示唆されたが、このような細胞群及び、その役割については今までに報告が無い。本研究では、CRTAM陽性CD4⁺T細胞に注目し、細胞接着因子であるCRTAMが、腸管内でどのようにリンパ球の免疫応答に関与しているのかを解明する事を目的とし、その全容の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞へのCRTAMの発現自体が腸管への集積に影響しているのかを大腸炎誘導モデルを使用して解析する。さらに、何故CRTAM陽性CD4⁺T細胞が腸管内に集積するのか、その機構を明らかにする。腸管へのホーミングに関与している既知受容体の発現を確認すると同時に、CRTAMのリガンドであるNec12が腸管内にどの様に発現しているかを免疫染色などで調べる。Nec12欠損マウスなどを用いて、CRTAM-Nec12の相互作用がCRTAM陽性CD4⁺T細胞の粘膜固有層への集積に寄与しているのかを確認する。

(2) CRTAM陽性CD4⁺T細胞は明らかにCRTAM陰性CD4⁺T細胞と異なる特徴を持っていると考えられる。CRTAM陽性CD4⁺T細胞はどの様に誘導され、どのような機能を備えているのか、マイクロアレイによる解析を元に検討する。

(3) CRTAMの細胞内ドメインにはPDZ結合ドメインをはじめとするいくつかのモチーフを有しており、CRTAMを介したシグナルが細胞の分化や機能を誘導している可能性が示唆される。

CRTAMの細胞内ドメインの寄与を明らかにするため、CRTAMの全長及び、細胞外ドメインのみを発現するトランスジェニックマウスの作製を行い、表現型の違いについて検討する。

4. 研究成果

(1) 大腸炎誘導モデルの系において、CRTAM欠損マウス由来の細胞を移入した場合は体重減少が野生型と比べて軽微であることを再度確認した。実際に大腸の組織を確認したところ、野生型の細胞を移入した場合と比べ、炎症に伴う組織の肥厚はかなり軽い症状であった。また、浸潤しているCD4⁺T細胞の数も欠損マウス由来の細胞を移入した場合には明らかな減少が認められた。野生型と欠損マウス由来の細胞を競合させてRag欠損マウスに移入し、大腸炎を誘導した系でも明らかにCRTAM欠損マウス由来の細胞の減少が認められ、CRTAMの発現自体がCD4⁺T細胞の腸管内への集積に重要であることが明らかとなった。

(2) 組織の免疫染色から、CRTAMのリガンドであるNec12が腸管内に広く発現していることを確認した。この結果から、CRTAM-Nec12の相互作用によって、腸管内への細胞の集積が起こると予想していたが、予想に反して、Nec12欠損マウスにおいても、CRTAM陽性CD4⁺T細胞は遜色なく腸管へ集積した。この結果から、CRTAM-Nec12相互作用は腸管への集積とは無関係であることが分かった。一方で、CRTAM陽性CD4⁺T細胞では、CCR9や $\alpha 4\beta 7$ インテグリンなど、腸管へのホーミングに重要な受容体の発現が高くなっており、これによって腸管へ集積していることが示唆された。

(3) マイクロアレイの解析により、CRTAM陽性CD4⁺T細胞とCRTAM陰性CD4⁺T細胞の遺伝子発現パターンを比較した。興味深いことに、CRTAM陽性CD4⁺T細胞は70%以上の遺伝子が通常のCD4⁺T細胞と同様の発現レベルを示す

のと同時に、CD8 α , IFN γ , eomes を始めとする CD8 $^+$ T 細胞に特徴的な遺伝子にも発現の亢進が認められ、70%程度の遺伝子が、CD8 $^+$ T 細胞と同様の発現レベルを示した(図1)。

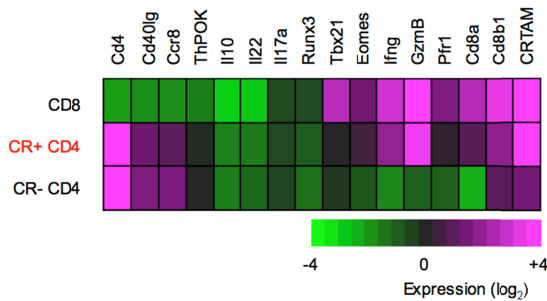


図1 遺伝子の発現パターン

(4) CRTAM 陽性 CD4 $^+$ T 細胞には CD4 $^+$ T 細胞と CD8 $^+$ T 細胞のどちらの特徴が備わっているのかを詳細に解析するため、それぞれの培養条件下で分化誘導をかけ、CRTAM 陰性 CD4 $^+$ T 細胞と比較を行った。CRTAM 陽性 CD4 $^+$ T 細胞は通常の CD4 $^+$ T 細胞と同様に Th1, Th2, Th17, Treg 細胞に分化することが可能であり、ヘルパーT細胞としての役割を十分に果たすことが示された。一方で、分化誘導をかけずに細胞培養を行うと、IFN γ , eomes, グランザイムやパーフォリンなど細胞傷害性 T 細胞に特徴的な遺伝子が誘導され、CD8 $^+$ T 細胞と同程度の細胞傷害活性を持つようになることが示された(図2)。

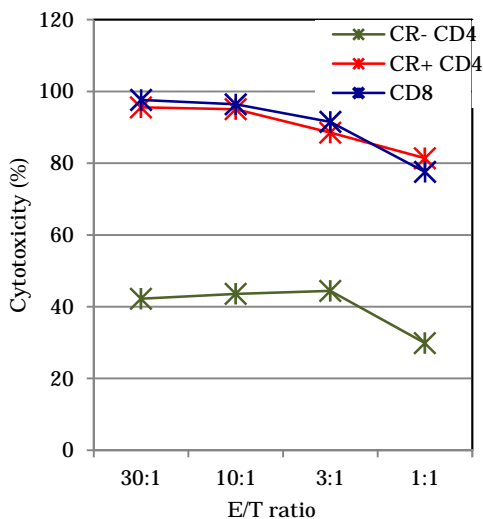


図2 細胞傷害活性の比較

以上の結果から、CRTAM 陽性 CD4 $^+$ T 細胞には CD4 $^+$ T 細胞及び CD8 $^+$ T 細胞の両方の特徴が備わっており、ヘルパー及び、細胞傷害性 T 細胞の両方に分化出来ることが示された。

(5) CRTAM 陽性 CD4 $^+$ T 細胞に高発現を認める転写活性因子の eomes は、細胞障害能を獲得する上で重要な役割を果たしている事が知られている。そこで、eomes によって CRTAM の発現が誘導されているのか、又は CRTAM によって eomes の発現が誘導されているのかを確認した。eomes を T 細胞に強制発現させて CRTAM の発現を確認したが、発現の誘導は認められなかった。また、eomes の欠損マウス由来の細胞でも CRTAM 陽性 CD4 $^+$ T 細胞の割合に変化は認められず、eomes によって CRTAM の発現は誘導されていないことが分かった。CRTAM の発現によって eomes が誘導されるかは、トランスジェニックの系で確認を行った。

(6) CRTAM の発現自体が CRTAM 陽性 CD4 $^+$ T 細胞にどの様に寄与しているのか調べる目的で CRTAM の全長及び、細胞外ドメインのみを発現する 2 種類のトランスジェニックマウスを作製した。CRTAM の全長を発現させた CD4 $^+$ T 細胞では、CD8 $^+$ T 細胞に関係した遺伝子群の発現が亢進し、細胞傷害活性を持つようになることが確認出来た。一方の細胞外ドメインのみを発現する細胞では、このような特徴を獲得することが出来ず、eomes の発現なども誘導されることが無かった。このことから、CRTAM の細胞内ドメインを介したシグナルが転写因子 eomes の発現等を促し、細胞傷害活性に必要な遺伝子を誘導している事が明らかとなった。

同様に CRTAM 欠損マウス由来の CD4 $^+$ T 細胞では、これらの遺伝子の発現が優位に低下しており、細胞傷害活性を十分に獲得出来ない可能性が示唆された。これが原因となり、大腸炎の誘導モデルでは明らかな炎症の減弱が起こっていると考えられる。

以上のことから、CRTAM 陽性 CD4 $^+$ T 細胞は CD4 $^+$ T 細胞、CD8 $^+$ T 細胞の双方の特徴を持ち合わせた大変ユニークな細胞であり、とりわけ腸管内で細胞傷害活性を持つ細胞として免疫応答に寄与していることが明らかとなった。また、CRTAM の細胞内領域を介したシグナル伝達が、細胞傷害活性の誘導に必須であることが示された。

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)

[学会発表](計 3件)

竹内新、CRTAM+CD4+T cells represent a lineage of CD4+ cells with CTL function. 第42回日本免疫学会、2013年12月12日、幕張メッセ

竹内新、CRTAM expression regulates localization and differentiation of CD4+T cells in vivo. 第41回日本免疫学会、2012年12月7日、神戸国際会議場

竹内新、CRTAM 陽性 CD4+T 細胞の生体内における機能、第22回 Kyoto T cell Conference、2012年7月7日、和順会館・京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 新 (TAKEUCHI Arata)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：00360579