

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390118

研究課題名(和文)OX40とIL-7による記憶T細胞恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文)Roles of OX40 and IL-7 in homeostasis of memory T cells

研究代表者

石井 直人 (ISHII, NAOTO)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60291267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：CD4陽性エフェクター記憶T細胞の恒常性維持増殖について解析を行った。その結果、CD4陽性エフェクター記憶T細胞の恒常性維持増殖が、IL-7依存性の遅い増殖とOX40依存性の速い増殖との2つに分類されることが明らかになった。また、OX40シグナル依存性の速い増殖を示す集団において、ヘルパーTh17型細胞の著しい増加が認められたことから、速い恒常性細胞維持増殖がTh17細胞の産生あるいは増殖に重要であることが示唆された。一方、Traf5が、IL-6依存性のTh17細胞分化に抑制的に関与することを証明し、従来、炎症を促進的に制御すると考えられてきたTraf5の新しい機能を発見した。

研究成果の概要(英文)：T-cell homeostasis preserves the numbers, the diversity and functional competence of different T cell subsets that are required for adaptive immunity. It is not clear how memory CD4+ T cell subsets are maintained in the periphery and what factors are responsible for the maintenance. To examine the homeostatic mechanisms, CFSE-labeled CD4+ effector memory T (TEM) cells were transferred into syngeneic C57BL/6 mice, and the systemic cell proliferative responses were assessed by CFSE dye dilution. We found that the fast homeostatic proliferation of TEM cells was strictly regulated by both antigen and OX40 costimulatory signals and that the slow proliferation was dependent on IL-7. The OX40-dependent fast proliferation preferentially expanded IL-17-producing helper T cells (Th17 cells). Together, both OX40 and IL-7 signals are required during homeostasis of TEM cells, and the synergistic signals may be critical for the expansion of Th17 cells.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 T細胞 恒常性維持

1. 研究開始当初の背景

「免疫記憶」は記憶 T 細胞と記憶 B 細胞によって担われるとされる。しかし、獲得免疫の司令塔とも言うべき CD4 陽性 T 細胞の記憶 T 細胞への分化とその維持の仕組みはほとんど明らかではない。免疫記憶はアレルギーや自己免疫疾患での炎症、再発の本態であり、その制御機構が解明できれば、自己免疫疾患・アレルギー疾患の治療やワクチン開発における重要な医学的基盤となる。

我々は、抗原提示細胞に発現する OX40 リガンド (OX40L) を同定し、OX40L 遺伝子欠損マウスや抗 OX40L 単クローン抗体を作成することにより、OX40L が T 細胞の共刺激分子として機能し、T 細胞の活性化とエフェクター T 細胞の生存に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。その研究過程で、OX40 シグナルが、CD4 陽性記憶 T 細胞の恒常性増殖 (homeostatic proliferation) に強く関与することを見いだした。

他方、ナイーブ T 細胞の恒常性維持増殖は末梢における T 細胞数の減少状態の回復を担う重要な機構であるが、一方で炎症性腸疾患や GVHD のような炎症性疾患の病態形成に関与することも知られている。T_N 細胞の恒常性維持増殖には MHC と T 細胞受容体を介したシグナル伝達、および IL-7 等を認識するサイトカイン共通受容体鎖 (c 鎖) を介したシグナルが必須であることが知られている。このようなナイーブ T 細胞に関する多くの知見に対して、記憶 T 細胞の恒常性維持増殖に関してはほとんど研究がなされておらず、また、末梢における記憶 T 細胞数を維持する詳細な分子機構も不明である。

2. 研究の目的

本研究では、CD4 陽性のエフェクター記憶 T (TEM) 細胞の恒常性維持増殖を CD4 陽性ナイーブ T 細胞の恒常性維持増殖と比較することにより、それらを制御する分子の違いや動態の相違を検討する。また、CD4 陽性 TEM 細胞の恒常性維持増殖の免疫学的役割も併せて解明する。これらの解析により、T 細胞免疫記憶の成立と維持の機構を明らかにすることを試みる。

3. 研究の方法

放射線照射によりリンパ球減少状態にしたマウスあるいはリンパ球欠損マウスに CD4 陽性ナイーブ T 細胞および TEM 細胞を移入し、さらに、OX40L、IL-7 受容体を阻害する単クローン抗体をそれぞれ、もしくは同時に投与した。その後、経時的に、脾臓、腸管膜リンパ節、鼠径リンパ節、腸管組織などのドナー T 細胞の分布、表現型、サイトカイン産生能などを測定することにより、CD4 陽性 T 細胞の恒常性維持増殖における OX40 シグナルおよび IL-7 シグナルの役割について検討した。これらの解析により、OX40 と IL-7 の CD4 陽性 T 細胞の機能維持における役割についても解析を行った。

4. 研究成果

1) CD4 陽性ナイーブ T 細胞の恒常性維持増殖について：小腸、腸間膜リンパ節において速い恒常性維持増殖を示す細胞集団の中に、⁴陽性かつ IL-17 陽性の表現型を示す T 細胞、すなわち腸管指向性ヘルパー T 17 型 (以下 Th17) 細胞が出現することが分かった。また、速い増殖は OX40 共刺激因子に依存적であった。宿主マウスの腸間膜リンパ節を切除すると、小腸組織における IL-17 陽性の速い増殖を示す細胞が有意に減少した。さらに、宿主マウスに FTY720 を投与し、二次リンパ節からのリンパ球の遊出を阻害したところ、腸間膜リンパ節においては ⁴陽性かつ IL-17 陽性の速い増殖を示すドナー細胞が蓄積し、一方、小腸組織においてはドナー細胞が著明に減少した。これらの結果は、小腸の Th17 細胞の生成には小腸組織ではなく腸間膜リンパ節が重要であることを示唆した。本研究により、腸間膜リンパ節特異的な速い恒常性維持増殖により腸管指向性 Th17 細胞が産生されることが示された。

2) CD4 陽性 TEM 細胞の恒常性維持増殖について：ナイーブ T 細胞の恒常性維持増殖と同様に、CD4 陽性 TEM 細胞の恒常性維持増殖が速い増殖と遅い増殖の 2 つに分類されることが明らかになった。また、速い増殖が T 細胞共刺激分子である OX40 のシグナルに依存するのに対して、遅い増殖には IL-7 シグナルが必要であることが分かった。さらに、OX40 シグナルと IL-7 シグナルの両方を阻害したところ TEM 細胞の恒常性維持増殖が完全に抑制されたことから、CD4 陽性 TEM 細胞の恒常性維持増殖には OX40 と IL-7 両方のシグナルが必須であることが示された。また、MHC クラス II 欠損マウスをレシピエントに用いて同様の実験を行ったところ、OX40 シグナルの有無とは関係なく速い増殖が全く観察されなくなった。一方、遅い増殖は、減弱を認められたものの、明らかに観察された。しかし、IL-7 シグナル阻害によって残存していた遅い増殖は完全に消失した。したがって、OX40 シグナル依存的な速い増殖と IL-7 依存的な遅い増殖では、抗原刺激への依存性が異なることが示された。また速い増殖を示す集団において、有意にヘルパー Th17 型 (以下 Th17) 細胞の増加を認めることから、速い恒常性細胞維持増殖が Th17 細胞の産生あるいは増殖に重要であることが示唆された。以上より、CD4 陽性 TEM 細胞の恒常性維持増殖に OX40 と IL-7 が相乗的に作用することにより、CD4 陽性 TEM 細胞数の維持とサイトカイン産生機能に重要な役割を有することが明らかになった。

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)

[雑誌論文](計 17 件)

以下全て査読あり。

1. So T, Nagashima H, and Ishii N: TNF receptor-associated factor (TRAF) signaling network in CD4⁺ T-lymphocytes. *Tohoku J. Exp. Med.*, in press, 2015, URL: <http://journal.med.tohoku.ac.jp>
2. Chonan M, Saito R, Shoji T, Shibahara I, Kanamori M, Sonoda Y, Watanabe M, Kikuchi T, Ishii N, and Tominaga T: CD40/CD40L expression correlates with the survival of patients with glioblastomas and an augmentation in CD40 signaling enhances the efficacy of vaccinations and prolongs survival in intracranial glioma- and glioma-initiating cell-isografted tumor models. *Neuro-Oncology*, in press, 2015, URL: <http://neuro-oncology.oxfordjournals.org/>
3. Shibahara I, Saito R, Zahng R, Chonan M, Kanamori M, Sonoda Y, Kumabe T, Kanehira M, Kikuchi T, So T, Watanabe T, Takahashi H, Iwabuchi E, Tanaka Y, Shibahara Y, Sasano H, Ishii N, and Tominaga T: OX40 ligand expressed in glioblastoma modulates adaptive immunity depending on the microenvironment: a clue for successful immunotherapy. *Mol Cancer*, 14: 41-53, 2015, doi: 10.1186/s12943-015-0307-3
4. Ono C, Yu Z, Kasahara Y, Kikuchi Y, Ishii N, and *Tomita H.: Fluorescently activated cell sorting followed by microarray profiling of helper T cell subtypes from human peripheral blood. *PLoS ONE*, 9: (11) e111405, 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0111405
5. Fujita T, Burwitz BJ, Chew GM, Reed JS, Clayton KL, Rini JM, Ishii N, Ostrowski MA, Hansen SG, Sacha JB, and Ndhlovu LC: Expansion of dysfunctional Tim-3 expressing effector memory CD8⁺ T cells during SIV infection in Rhesus Macaques. *J. Immunol.* 193:5576-5583, 2014. doi: 10.4049/jimmunol.1400961
6. Yamaki S, Ine, S, Kawabe T, Okuyama Y, Suzuki N, Soroosh P, Mousavi SF, Nagashima H, Sun S-L, So T, Sasaki T, Harigae H, Sugamura K, Kudo H, Wada M, Nio M, and Ishii N: OX40 and IL-7 play synergistic roles in the homeostatic proliferation of effector memory CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.*, 44: 3015-3025, 2014. doi: 10.1002/eji.201444701
7. Haji Y, Suzuki M, Moriya K, So T, Hozumi K, Mizuma M, Unno M, and Ishii N: Activation of Notch1 promotes development of human CD8⁺ single positive T cells in humanized mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 447: 346-351, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.003
8. Nagashima H, Okuyama Y, Asao A, Kawabe T, Yamaki S, Nakano H, Croft M, Ishii N, and So T: TNF receptor-associated factor 5 limits inflammatory CD4⁺ T cell differentiation by antagonizing IL-6-receptor signaling. *Nat Immunol*, 15: 449-456, 2014. doi: 10.1038/ni.2863
9. Kamachi F, Harada N, Usui Y, Sakanishi T, Ishii N, Okumura K, Miyake S, and Akiba H: OX40 ligand regulates splenic CD8-dendritic cell-induced Th2 responses in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 444: 235-40, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.060
10. Nagata T, Murata K, Murata R, Sun S-L, Saito Y, Yamaga S, Tanaka N, Tamai K, Moriya K, Kasai N, Sugamura K, and Ishii N: Hepatocyte Growth Factor Regulated Tyrosine Kinase Substrate in the peripheral development and function of B-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443:351-356, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.029
11. Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun SL, Sato M, Asao A, Haji Y, Sasahara Y, Candotti F, Tsuchiya S, Kure S, Sugamura K, and Ishii N: Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PLOS ONE*, Aug 21;8(8):e71594, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0071594
12. Sun SL, Horino S, Itoh-Nakadai A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T, Funayama R, Kondo M, Saitsu H, Matumoto N, Nakayama K, and Ishii N: Y-chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice. *J. Immunol*, 190: 6209-6220, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1300303
13. Kawabe T, Sun SL, Fujita T, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, So T, and Ishii N: Homeostatic proliferation of naïve CD4⁺ T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. *J. Immunol.* 190: 5788-5798, 2013. doi: 10.4049/jimmunol.1203111
14. Ichimura, A., Matsumoto, S., Suzuki, S.,

- Dan, T., Yamaki, S., Sato, Y., Kiyomoto, H., Ishii N., Okada, K., Matsuo, O., Hou, F.F., Vaughan, D.E., de Strihou, Cv, and *Miyata, T.: A small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor 1 inhibits macrophage migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33: 935-42, 2013. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301224
15. Shima K, Mizuma, M., Hayashi, H., Nakagawa, K., Okada, T., Sakata, N., Omura N., Kitamura Y., Motoi, F., Rikiyama, T., Katayose, Y., Egawa, S., Ishii N., Horii, A., and Unno, M.: Potential utility of eGFP-expressing NOG mice (NOG-EGFP) as a high purity cancer sampling system. *J. Exp Clin Cancer Res.* 31: 55, 2012. doi: 10.1186/1756-9966-31-55.
 16. Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, and Ishii N.: Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. *PLoS ONE*, 7(6): e37892, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0037892
 17. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebinu M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai A, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N., Fukumoto M, Nakata K, Takai T, and *Satake M.: Runx1-deficiency in CD4+ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. *J. Immunol.* 188: 5408-5420, 2012. doi: 10.4049/jimmunol.1102991
- 〔学会発表〕(計 14 件)
国際学会発表のみ記載
1. 32nd Nonhuman Primate Models for AIDS (Nov 13, 2014, Portland, OR, USA) Fujita T, Ishii N., Ndhlovu LC: Expansion of dysfunctional Tim-3-expressing effector memory CD8+ T cells during simian immunodeficiency virus infection
 2. NIH-Japan-JSPS symposium 2014 (Oct 24, 2014, Bethesda, MD, USA) Fujita T, Ishii N., Ndhlovu LC: Expansion of dysfunctional Tim-3-expressing effector memory CD8+ T cells during simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques.
 3. 2nd symposium of international immunological memory and vaccine forum (Aug 25, 2014, San Diego, USA) Nagashima H, Ishii N., So T.: TNF receptor-associated factor 5 inhibits Th17 differentiation by antagonizing IL-6-receptor signaling.
 4. 2nd symposium of international immunological memory and vaccine forum (Aug 25, 2014, San Diego, USA) So T., Nagashima H, Ishii N.: A novel molecular function of TRAF5 in CD4 T cell lineage commitment.
 5. 4th International Workshop on Humanized Mice (Oct 1, 2013, Seoul, Korea) Moriya K, Suzuki M, Takahashi T, Sasahara Y, Kure S, Ishii N.: Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice.
 6. 15th International Congress of Immunology (Aug 24, 2013, Milano, Italy) Kawabe T, Sun S, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, So T., Ishii N.: Homeostatic proliferation of naïve CD4 T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells.
 7. 15th International Congress of Immunology (Aug 24, 2013, Milano, Italy) Sun SL, Horino S, Ito A, Kawabe T, Asao A, Takahashi T, So T., Kondo M, Ishii N.: Y-Chromosome-linked B- and NK-cell deficiency in mice.
 8. Annual International Symposium of Rheumatology Institute of Seoul National University Hospital (June 28, 2013, Seoul, Korea) Kawabe T, Sun S, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, So T., Ishii N.: Th17 cell generation and mucosal immunity.
 9. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium (May 9, 2013, Gonryo Kaikan, Sendai, Miyagi) Kawabe T, Sun S, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, So T., Ishii N.: Homeostatic proliferation of naïve CD4 T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells.
 10. NIH-Tohoku University-JSPS Symposium (May 9, 2013, Gonryo Kaikan, Sendai, Miyagi) Sun SL, Takahashi T, So T., Ishii N.: Y chromosome-linked B cell deficiency in mice.
 11. 5th Annual Translational Symposium: Looking Closely at HMGB-1 (Feb 25, 2013, Honolulu, HI, USA) Fujita T, Ishii N., Ndhlovu LC: Tim-3 on human NK cells suppresses cell-mediated cytotoxicity.

12. 1st Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum (Jan 29, 2013, Sapia Hall, Chiyoda-ku, Tokyo) Kawabe T, Sun S, Yamaki S, Asao A, Takahashi T, So T, Ishii N: Homeostatic proliferation of naïve CD4 T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells.
13. 54th ASH Annual Meeting and Exposition (Dec 9, 2012, Atlanta, GA, USA) Moriya K, Suzuki M, Takahashi T, Sasahara Y, Kure S, Ishii N: Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice.
14. 30th Annual Symposium for Nonhuman Primate Models for AIDS (Oct 24, 2012, San Antonio, TX, USA) Fujita T, Ishii N, Ndhlovu LC: Expansion of dysfunctional Tim-3 expressing CD8 T cells in lymph nodes during SIV infection

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.immunol.med.tohoku.ac.jp//index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 直人 (ISHII NAOTO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60291267

(2)研究分担者

宗 孝紀 (SO TAKANORI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60294964