

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590573

研究課題名(和文)メモリーT細胞の分化機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of memory CD8 T cell differentiation

## 研究代表者

坂本 明美 (Sakamoto, Akemi)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90359597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫記憶の成立は感染症や腫瘍などに対する生体防御の要であり、ワクチン開発の原動力となる。本課題ではメモリーCD8T細胞の分化過程における転写因子の役割を解析した。

マウスを用いた免疫実験の結果、メモリー前駆細胞でBcl6の発現が高いこと、その分化にBcl6の発現が必要であることを明らかにした。さらにこの過程でCD8T細胞上のIL2受容体の発現とIL2刺激の強度がBcl6で負に制御されていることを明らかにした。Bcl6は細胞活性化後早期にIL2受容体の発現を負に調整することでエフェクター細胞への分化を抑制し、メモリー前駆細胞の分化に関わっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bcl6, a sequence specific transcriptional repressor, is important for generation and maintenance of central memory CD8+ T cells. However, the molecular mechanism involved in the generation is largely unknown. We demonstrated that Bcl6 negatively regulates the in vivo differentiation of both activated CD25+ CD8+ T cells and KLRG1hi effector CD8+ T cells. Since the induction of CD25 expression was more rapid and the amount of phosphorylated STAT5 was higher in the in vitro activated Bcl6-deficient CD8+ T cells than in the activated wild type CD8+ T cells, the IL-2 signaling was negatively regulated in activated CD8+ T cells by Bcl6. We also confirmed the Bcl6 binding to the various regions in the CD25 and IL-2 genes. These results indicate that Bcl6 is responsible for the differentiation of memory precursor CD8+ T cells by regulating the IL-2 signaling in activated CD8+ T cells.

研究分野：免疫学

キーワード：メモリーT細胞 CD8T細胞 Bcl6 転写因子 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

人的交流の急速なグローバル化や地球温暖化に伴い、ウイルス感染症の世界的広がりが危惧されており、その対策は急務である。ワクチンはその対策の重要な柱の一つである。ワクチン接種後には免疫記憶が確立されるが、その主役はメモリーCD8T細胞であり、ウイルス初感染後数週間以内に生体内に誘導され、長期間維持される。実際、エボラ出血熱ウイルス等のマウスへの感染実験において、少量ウイルス初感染で誘導されるメモリーCD8T細胞を抗CD8抗体で除去すると、次の大量ウイルス感染時に免疫していないマウスと同程度に個体が死亡し、ワクチンの効果がなくなることが報告された。このように、メモリーCD8T細胞はウイルス感染二次応答時の感染防御の根幹をなす細胞であることが示され、メモリーCD8T細胞の分化維持に関する研究が急速にすすめられている。これまでの研究結果から、メモリーCD8T細胞の前駆細胞が初期感染もしくはワクチン接種後約1週間の早期に分化してくること、メモリーCD8T細胞は、長期的にはIL-7やL-15の刺激を介して生存維持されていることが明らかにされた。しかし、メモリーCD8T細胞とその前駆細胞の分化、維持の詳細な分子機構は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

免疫記憶は感染応答の要であり、特にCD8T細胞はウイルス感染における生体防御に必須の細胞である。すでに申請者らはメモリーCD8T細胞の分化、機能維持に転写因子Bcl6が機能していることを明らかにしてきた。そこで、本研究ではメモリーCD8T細胞の分化にどのようにBcl6が機能しているのか、詳細な分子機構を明らかにし、ワクチン開発の基盤とする。この結果は、がんワクチンの開発や、免疫不全、自己免疫疾患などの治療応用に展開できる。

## 3. 研究の方法

(1)メモリーCD8T前駆細胞の誘導：マウス生体において抗原特異的CD8T細胞の活性化を誘導し、7日目に脾臓からKLRG1陰性メモリーCD8T前駆細胞とKLRG1陽性エフェクターCD8T細胞とを分取し、Bcl6をはじめとする転写因子の発現量を定量PCRで比較する。

(2)メモリーCD8T前駆細胞の分化におけるBcl6の役割：Bcl6をT細胞で強発現するBcl6トランスジェニックマウス(Bcl6-Tg)やBcl6欠損マウス(Bcl6-KO)を免疫し、分化するメモリーCD8T前駆細胞の割合をFACSで解析する。

(3)メモリーCD8T前駆細胞の分化におけるサイトカインの役割：T細胞の機能分化にIL-2,IL-21などのサイトカインが関与する。メモリーCD8T前駆細胞の分化にどのようなサイトカインが関与し、その機構をBcl6がどのように調整しているかを明らかにする。

## 4. 研究成果

(1)メモリーCD8T前駆細胞における遺伝子発現：マウス免疫後7日目の脾臓からメモリーCD8T前駆細胞とエフェクターCD8T細胞とを分取し、Bcl6をはじめとする転写因子の発現量を定量PCRで比較した。その結果、エフェクターCD8T細胞ではBlimp1の発現が高く、メモリーCD8T前駆細胞ではほとんどその発現は認められなかった。Bcl6はどちらにおいても発現していたが、メモリーCD8T前駆細胞で2-3倍発現が高かった。

(2)メモリーCD8T前駆細胞の分化におけるBcl6の役割：Bcl6遺伝子改変マウスを免疫し、分化するメモリーCD8T前駆細胞の割合をFACSで解析した。その結果、Bcl6-TgマウスでメモリーCD8T前駆細胞の割合が高く、Bcl6-KOマウスで低かった。このことから、Bcl6の発現は、メモリーCD8T前駆細胞の分化を正に制御していることが示唆された。

(3) メモリーCD8T 前駆細胞の分化におけるサイトカインの役割：高濃度 IL-2 存在下で CD8T 細胞を活性化させるとエフェクター細胞に分化する。そこで IL-2 の感受性を検討するために受容体の発現を解析した。その結果、Bcl6-KO CD8T 細胞では、IL-2Ra が活性化早期に、発現上昇し、IL-2 添加時のシグナル伝達物質のリン酸化も高かった。以上の結果から、Bcl6 は IL-2 受容体の発現を負に制御して IL-2 の感受性を下げ、エフェクター細胞への分化を抑制することでメモリーCD8T 細胞の分化を制御している可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Watanabe-Takano H, Takano K, Sakamoto A, Matsumoto K, Tokuhiisa T, Endo T, Hatano M. DA-Raf-dependent inhibition of the Ras-ERK signaling pathway in type 2 alveolar epithelial cells controls alveolar formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. 111:E2291-300. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1321574111.

Ikari J, Inamine A, Yamamoto T, Watanabe-Takano H, Yoshida N, Fujimura L, Taniguchi T, Sakamoto A, Hatano M, Tatsumi K, Tokuhiisa T, Arima M. Plant homeodomain finger protein 11 promotes class switch recombination to IgE in murine activated B cells. *Allergy* 2014 . 69:223-30. 査読有 doi: 10.1111/all.12328.

Tsuruoka N, Arima M, Yoshida N, Okada S, Sakamoto A, Hatano M, Satake H, Arguni E, Wang JY, Yang JH, Nishikura K, Sekiya S, Shozu M, Tokuhiisa T. ADAR1 protein induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6 gene-deficient cells. *J*

*Biol Chem*. 2013. 288:826-36. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M112.365718.

Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano M, Arima M, Miyata S, Nagai N, Tokuhiisa T, Matsuo O. Lack of both  $\alpha 2$ -antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. *Life Sci*. 2013. 93:89-95. 査読有 doi: 10.1016/j.lfs.2013.05.023.

Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, Tokuhiisa T, Oda S, Hatano M. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care*. 2013. 17:R160. 査読有 PMID: 23883625.

Huang J, Li X, Kohno K, Hatano M, Tokuhiisa T, Murray PJ, Brocker T, Tsuji M. Generation of tissue-specific H-2Kd transgenic mice for the study of K(d)-restricted malaria epitope-specific CD8+ T-cell responses in vivo. *J Immunol Methods*. 2013. 387:254-61. 査読有 doi: 10.1016/j.jim.2012.10.019.

Hirata H, Arima M, Fukushima Y, Sugiyama K, Tokuhiisa T, Fukuda T. Leukotriene C4 aggravates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respirology*. 2013. 18:674-81. 査読有 doi: 10.1111/resp.12072.

Ouchida, R., Mori, H., Hase, K., Takatsu, H., Kurosaki, T., Tokuhiisa, T., Ohno, H., and Wang, Ji-Yang. Critical role of the IgM Fc receptor in IgM homeostasis, B cell survival, and humoral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012, 109:2699-2706. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1210706109.

Shigeta A, Tada Y, Wang JY, Ishizaki S, Tsuyusaki J, Yamauchi K., Kasahara Y, Iesato K., Tanabe N, Takiguchi Y, Sakamoto A, Tokuhiisa T, Shibuya K., Hiroshima K., West J, and Tatsumi K. CD40 amplifies Fas-mediated apoptosis: a mechanism contributing to emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012, 303:141-151. 査読有 doi:10.1152/ajplung.00337.2011.

Ohnuki H, Inoue H, Takemori N, Nakayama H, Sakaue T, Fukuda S, Miwa D, Nishiwaki E, Hatano M, Tokuhiisa T, Endo Y, Nose M, Higashiyama S. BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signalling in angiogenesis. *Blood* 2012. 119:2688-2698. 査読有 doi: 10.1182/blood-2011-03-345306.

[学会発表](計23件)

紙谷 聡英、近田裕美、井田絹代、坂本明美、徳久剛史。肝臓における薬物代謝の性差を制御する新規分子の探索 第8回日本性差医学・医療学会学術集会 2015年1月31 - 2月1日 ホテルクレメント徳島(徳島県・徳島市)

Fujimura L, Ohara Y, Arima M, Sakamoto A, Tokuhiisa T, Hatano M. Role of enteric neurons in regulation of intestinal epithelial homeostasis. 第43回日本免疫学会学術集会 2014年12月10 - 12日 国立京都国際会館(京都府・京都市)

上嶋繁、岡田清孝、河尾直之、矢野昌人、田村行識、田中勝喜、坂本明美、幡野雅彦、有馬雅史、宮田清司、永井信夫、徳久剛史、松尾理。a2-antiplasmin/PAI-1両遺伝子欠損マウスにおける免疫系の変化についての検討。第36回日本血栓止血学会 2014年5月30日 大阪国際

交流センター(大阪府・大阪市)

近田裕美、坂本明美、徳久剛史、紙谷聡英。肝臓における薬物代謝の性差を制御する分子メカニズム 第13回日本再生医療学会総会 2014年3月4 - 6日 国立京都国際会館(京都府・京都市)

徳久剛史「免疫記憶細胞の形成と維持」東京免疫フォーラム 2014年2月24日 東京大学医科学研究所(東京都・港区)

Taniguchi, T., Sakamoto, A., Hatano, M., Matsumoto, K., Saito, H., Tokuhiisa, T., Arima, M. Bcl6 regulates production of SLAM-Associated Protein in follicular helper T cells. 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月11 - 13日 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

Fujimura L, Ohara Y, Arima M, Sakamoto A, Tokuhiisa T, Hatano M. Possible role of enteric neurons in regulation of intestinal microbiota. 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月11 - 13日 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

Kawaharta K, Kanazaki T, Akahira R, Michishita K, Dphi M, Tokuhiisa T, Yamamoto L. Intestinal microbiota plays a critical role in the production of antinuclear antibodies in lymphopenia-induced autoimmunity. 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月11 - 13日 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

高野 晴子, 幡野 雅彦, 坂本 明美, 高野和儀, 徳久 剛史, 遠藤 剛. Ras-ERKカスケードのアンタゴニスト DA-Rafは肺胞形成を制御している. 第65回細胞生物学会大会 2013年6月19 - 21日 ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)

徳久剛史、有馬雅史「IgE抗体産生機構と制御法の開発」第25回日本アレルギー

学会 2013年5月12日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Tokuhisa T. 「Development of High Affinity IgE B Cells」 Chiba and Auckland University Immunology Forum Feb 23, 2013 Auckland (New Zealand)

Sakamoto, A., Kohno, M., Pan, J.,

Arima, M., Hatano, M., Tokuhisa, T. Heterogeneity of naïve CD4 T cells. 1<sup>st</sup>

免疫記憶ワクチン国際研究会シンポジウム 2013年1月29日 東京ステーションコンファレンスサビアホール (東京都・千代田区)

Pan, J., Sakamoto, A., Kohno, M., Arima, M., Hatano, M., Tokuhisa, T. A role of Bcl6 in differentiation of memory precursor CD8 T cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Kohno, M., Pas, J., Yamashita, K., Iijima, Y., Arima, M., Hatano, M., Tokuhisa, T., Sakamoto, A. Naïve CD4 T cells are instructed to differentiation into effector or memory CD4 T cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Iijima, Y., Pan, J., Kohno, M., Arima, M., Hatano, M., Tokuhisa, T., Sakamoto, A. Bcl6 is required for ICOSL expression on activated B cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Turuoka N, Yoshida N, Naruke K, Arima M, Sakamoto A, Hatano M, Wang JY, Tokuhisa T. Poles of ADAR1 in somatic hypermutation and class switch recombination in germinal center B cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸国

際会議場 (兵庫県・神戸市)

Yamamoto T, Taniguchi T, Inamine A, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Tokuhisa T, Arima M. Phf11 promotes IgE class switch recombination in activated B cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Fujimura L, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M. Nitric oxide from enteric neurons regulates intestinal barrier function. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Taniguchi T, Sakamoto A, Hatano M, Matsumoto K, Saito H, Tokuhisa T, Arima M. Regulation of

SLAM-associated protein in follicular helper T cells by Bcl6. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

Arima M, Taniguchi T, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Tokuhisa T. Role of IL-33 in a suppressive function of Bcl6 for IL-4 production by memory Th2 cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

⑲ 徳久剛史「免疫記憶細胞の形成と維持」第40回日本臨床免疫学会 2012年9月29日 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

⑳ 徳久剛史「若き臨床研究者たちへ」第51回日本鼻科学会 2012年9月28日 幕張メッセ (千葉県・千葉市)

㉑ 徳久剛史「免疫記憶と慢性アレルギー」第6回日本アミノ酸学会 2012年9月28日 千葉大学園芸学部合同講義室 (千葉県・松戸市)

〔図書〕(計 1 件)

Sakamoto, A., Matsuyama, H., Hayashi, Y., Hasegawa, S., Iijima, Y., Kohno, M., Pan, J., Inage, S., Tokuhisa,

T. Roles of Bcl6 in dendritic cell homeostasis. Recent Res. Devel. Immunology Research Signpost 2012;8: 33-48.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/mucosa/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 明美 (SAKAMOTO AKEMI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：90359597

### (2) 研究分担者

徳久 剛史 (TOKUHISA TAKESHI)  
千葉大学・学長  
研究者番号：20134364