

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860352

研究課題名(和文) 生体内における記憶ヘルパーT細胞の維持機構およびその意義

研究課題名(英文) Role of memory T helper cells and their maintenance in vivo

研究代表者

篠田 健太 (SHINODA, Kenta)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10612195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄において維持される記憶ヘルパーT細胞の機能について、記憶ヘルパーT細胞を特異的に欠損するCD69遺伝子欠損マウスを用いて解析したところ、骨髄記憶ヘルパーT細胞が液性免疫において必須な役割をもつことが明らかとなった。一方で、外界異物の侵入を受ける末梢非リンパ組織においても、記憶ヘルパーT細胞が形成、維持されることが知られている。そこで、呼吸器粘膜組織における記憶ヘルパーT細胞の維持機構について着目し解析したところ、記憶ヘルパーT細胞は誘導性気管支関連リンパ組織中で維持されることがわかった。これらの結果は記憶ヘルパーT細胞の生体内における役割やその維持機構の更なる解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the roles of bone marrow (BM) memory T helper (Th) cells, we evaluated humoral immune response of CD69-deficient mice which lacks them. We have clarified that BM memory Th cells are essential for efficient establishment for humoral immunity. On the other hands, it is known that there are memory Th cells that maintained at peripheral non-lymphoid tissues which are the sites of pathogen invasion. We focused on the maintenance of memory Th cells in lung tissue and found that memory Th cells are maintained within inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT). These studies will contribute the understanding of the role of memory Th cells and their maintenance in the body.

研究分野：免疫学

キーワード：アレルギー・喘息 免疫学

1. 研究開始当初の背景

記憶ヘルパーT細胞は免疫記憶に不可欠な細胞である。それらの細胞の非存在下では、長寿命プラズマ細胞の発生、また記憶キラーT細胞の維持や二次応答に欠損が見られる。そのような免疫記憶の調節において著しく重要であるにもかかわらず、生体内における記憶ヘルパーT細胞の分化や多様性、維持、再活性化についてはほとんど知られていない。抗原刺激を受けたナイーブヘルパーT細胞は、リンパ節や脾臓等の二次リンパ器官で活性化・増殖しエフェクターヘルパーT細胞になり、免疫反応終息後そのごく一部が記憶細胞として生体内で長期に生存すると考えられている。近年、記憶ヘルパーT細胞が二次リンパ器官において免疫後3-8週間で骨髄へ移動し、その後何ヶ月も骨髄に定着し続けることが明らかとなった(Tokoyoda et al., *Immunity* 20:721-730, 2009)。骨髄記憶ヘルパーT細胞は骨髄のIL-7産生ストローマ細胞上で長期に渡り休止状態で、かつ再刺激時には高い反応性をもって維持されていることが分かり、IL-7産生ストローマが記憶ヘルパーT細胞のニッチであることも明らかとなった。さらに最近では、骨髄において大部分の記憶ヘルパーT細胞が休止状態にも関わらず、CD69分子を特異的に高発現しており、またCD69遺伝子欠損マウスが骨髄記憶ヘルパーT細胞を特異的に欠損していることを明らかにしてきた(Shinoda et al., *Proc. Natl. Sci. USA* 109:7409-7414, 2012)。これらの報告により今まで不明であった記憶ヘルパーT細胞の形成や維持のメカニズムの理解が大きく進んだ。そこで、CD69遺伝子欠損マウスを用いることで骨髄記憶ヘルパーT細胞が免疫現象の中でどのような役割を持っているかを明らかにすることができると考え、記憶ヘルパーT細胞のプラズマ細胞の調節機構について詳細に解析した。

一方で、抗原暴露を受けた個体では外界異物の侵入部位において記憶ヘルパーT細胞が形成、維持されており、特にアレルギー疾患においてはこの有害な記憶ヘルパーT細胞の集積が病態形成に関与することが強く示唆されている。しかしながら、外界異物の侵入部位である末梢非リンパ組織における記憶ヘルパーT細胞の形成・維持機構については未だ

全く不明である。そこで、骨髄記憶ヘルパーT細胞ニッチで同定された分子をもとに外界異物の侵入の標的となりやすい呼吸器粘膜における記憶ヘルパーT細胞の形成・維持機構について解析を行った。

2. 研究の目的

免疫記憶は脊椎動物の生体防御における最も重要な生体システムの一つである。私はその中で、免疫記憶の中核として働く記憶ヘルパーT細胞が生体内でどのように形成、生存および機能維持されているかを解明したいと考えている。今まで骨髄記憶ヘルパーT細胞の形成・維持メカニズムを明らかにしたわれわれの研究(Shinoda et al., *Proc. Natl. Sci. USA* 109:7409-7414, 2012)を基に、骨髄記憶ヘルパーT細胞を特異的に欠損したCD69遺伝子欠損マウスを用いて、液性免疫を中心とした免疫システムにおける骨髄記憶ヘルパーT細胞の新規機能について解析を行った。また、骨髄記憶ヘルパーT細胞ニッチで同定された機能分子をもとに呼吸器粘膜組織での記憶ヘルパーT細胞の形成・維持機構についても解析を行った。本研究による免疫システムの解明は、アレルギーや自己免疫疾患等の免疫疾患の治療に大きく貢献すると考えている。

(1)記憶ヘルパーT細胞による高親和性抗体産生誘導メカニズム

われわれは、記憶ヘルパーT細胞を特異的に欠損するCD69遺伝子欠損マウスでは高親和性抗体の産生誘導能に著しい障害が生じることを見出している。CD69遺伝子欠損マウスでは脾臓中の胚中心B細胞及びプラズマ細胞は正常に形成されることから、プラズマ細胞の脾臓からの移出、骨髄への侵入、骨髄内での移動のいずれかの段階に障害があると考えられる。そこで、記憶ヘルパーT細胞とプラズマ細胞の動態を観察し、どのように記憶ヘルパーT細胞がプラズマ細胞と相互作用し、調節するかを解析していく。記憶ヘルパーT細胞の有無によりプラズマ細胞の細胞数や生体内における局在の変化を解析し、直接的あるいは間接的に記憶ヘルパーT細胞がプラズマ細胞を調節する機構について解明する。記憶ヘルパーT細胞の未だに知られていない役割を解明することができると考えている。

(2)呼吸器粘膜組織における記憶ヘルパーT細胞形成・維持機構

呼吸器粘膜組織において炎症が誘導されると組織中にリンパ節様の誘導性気管支関連リンパ組織 (induced bronchus-associated lymphoid tissue: iBALT) が異所的に形成されることが知られている。われわれは、抗原特異的エフェクターヘルパーT細胞をマウスに移入し抗原を肺に投与することで、肺組織の微小環境変化により、iBALTを誘導する系を確立している。さらに、肺で維持される記憶ヘルパーT細胞の大部分がiBALT中に局在することを見出している。われわれは骨髄において、IL-7が記憶ヘルパーT細胞ニッチにおける機能分子として働くことを明らかにしており、末梢非リンパ組織における記憶ヘルパーT細胞の維持においてもIL-7が機能しているのではないかと考えた。そこでIL-7陽性細胞の局在と記憶ヘルパーT細胞の動態を解析することで末梢非リンパ組織における記憶ヘルパーT細胞の維持機構を明らかにできると考えている。

3. 研究の方法

記憶ヘルパーT細胞のプラズマ細胞に対する作用について詳細に解析する。記憶ヘルパーT細胞を特異的に欠損するCD69遺伝子欠損マウスを用いることで、記憶ヘルパーT細胞がどのように高親和性抗体の産生誘導を調節しているのかを解明し、液性免疫反応における記憶ヘルパーT細胞の新しい役割を明らかにする。

また、呼吸器粘膜組織における記憶ヘルパーT細胞の発生・維持機構について明らかにする。特に呼吸器粘膜組織においてどういった因子によって記憶ヘルパーT細胞が生存、維持されるのかを解明し、末梢非リンパ組織における記憶ヘルパーT細胞ニッチについて詳細に解析していく予定である。

(1)骨髄記憶ヘルパーT細胞による高親和性抗体産生誘導メカニズム

CD69遺伝子欠損マウスでは高親和性抗体産生誘導能が低下しているにもかかわらず、免疫後14日目の脾臓では野生型同様に抗原特異的プラズマ細胞を誘導する。しかし、免疫後28日目では骨髄中の抗原特異的プラズマ細胞数が顕著に減少することを見出している。こ

のことから、骨髄記憶ヘルパーT細胞はプラズマ細胞の脾臓での発生ではなく、骨髄への移行または骨髄での維持に関与していると考えられる。そこで、骨髄記憶ヘルパーT細胞が高親和性抗体の産生誘導に働く段階についてさらに詳細に解析していく。骨髄記憶ヘルパーT細胞がプラズマ細胞の脾臓からの移出、骨髄への移行、骨髄での維持のどの段階で働くのか明らかにする。免疫後、経時的に凍結切片を作製し免疫染色法で観察し、おおよその記憶ヘルパーT細胞の侵入もしくはプラズマ細胞と接着する時間を同定する。その後、生体内イメージング法で動態を解析する。プラズマ細胞の発生する時間を確定するためにも、免疫染色法だけでなくフローサイトメトリー法やELISPOT法も用いる。

記憶ヘルパーT細胞のプラズマ細胞に対する役割をさらに明確にするために、記憶ヘルパーT細胞特異的欠損マウスであるCD69遺伝子欠損マウスを用いて解析する。従来、全ヘルパーT細胞を欠損したマウスは作製できていたが、記憶ヘルパーT細胞のみを欠損したマウスは未だ報告がない。野生型のマウス由来のプラズマ細胞をこの記憶ヘルパーT細胞欠損マウスに移入することでプラズマ細胞のどの段階で記憶ヘルパーT細胞が作用しているか詳細に解析することができると考えている。つまり、CD69遺伝子欠損マウスの高親和性抗体産生誘導能を解析していくことで、記憶ヘルパーT細胞が間接的あるいは直接的にプラズマ細胞を制御し高親和性抗体産生誘導を行っているのか解析していく。さらにこのマウスを解析していくことによって、従来予想されていた役割以外の新しい記憶ヘルパーT細胞の役割を明らかにすることができると考えている。

(2)呼吸器粘膜組織における記憶ヘルパーT細胞形成・維持機構

記憶ヘルパーT細胞が呼吸器粘膜組織においてどのように維持されているかを解明する。われわれは既にIL-7-GFPノックインマウスを入手しており、iBALT中に多くのIL-7産生細胞が局在していることを見出している。そこで本研究計画では、以下の①～③の三つの点に焦点をしばり解析していく。

記憶ヘルパーT細胞のiBALTでの維持機構
iBALT中での記憶ヘルパーT細胞の維持におけるIL-7の役割を解明する。IL-7がナイーブ

ヘルパーT細胞の生存維持にも必須なサイトカインであることから、IL-7レセプターのコンディショナルノックアウトマウスを用いて解析を行った。このマウス由来の記憶ヘルパーT細胞を誘導した後に薬剤によりIL-7レセプターを欠失させることで、記憶ヘルパーT細胞特異的にIL-7による影響を解析することができる。末梢非リンパ組織におけるIL-7の記憶ヘルパーT細胞の維持における役割について明らかにする。

iBALTの形成機構

抗原特異的エフェクターヘルパーT細胞依存的にiBALTが形成されることから、エフェクターヘルパーT細胞が直接的あるいは間接的にiBALTの誘導に関与していることが示唆される。そこで、エフェクターヘルパーT細胞が産生するサイトカインに焦点を絞り、それらのサイトカインに対する中和抗体を投与することでiBALTの形成が抑制されるか検討する。

IL-7産生細胞の同定および機能分子の探索

われわれは既にIL-7-GFPノックインマウスを入手していることから、肺組織でのIL-7産生細胞の局在と動態を免疫染色法や生体内イメージング法を用いて解析することができる。従来の凍結切片免疫染色法やフローサイトメトリー法、全身における局在が観察できる超高感度CCDカメラによる生体内イメージングシステムとともに細胞の動態や局在を解析可能である。さらに、IL-7産生細胞を単離することで、iBALT中に多く存在するIL-7産生細胞の同定を行い、マイクロアレイを用いてIL-7産生細胞上の機能分子を明らかにすることができると考えている。

4. 研究成果

(1) 骨髄記憶ヘルパーT細胞による高親和性抗体産生誘導メカニズム

記憶ヘルパーT細胞を特異的に欠損するCD69遺伝子欠損マウスの液性免疫反応を評価したところ、免疫早期の抗体価や脾臓におけるプラズマ細胞数には差がないにもかかわらず、高親和性抗体価や骨髄におけるプラズマ細胞数には著しい欠損が見られた。そこで、プラズマ細胞の骨髄への移行に骨髄記憶ヘルパーT細胞が関与しているか解析するため、野生型マウスを免疫し、脾臓に生じたプラズマ細胞をCD69遺伝子欠損マウスに移植する実験を行った。そ

の結果、CD69遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比べてプラズマ細胞の骨髄への移行能が顕著に低いことが明らかとなった。さらに、野生型のマウスにおいてプラズマ細胞の骨髄への移行能はあらかじめ免疫したマウスにおいて顕著に高くなるが、CD69遺伝子欠損マウスではその上昇が顕著に減弱することが明らかとなり、骨髄記憶ヘルパーT細胞はプラズマ細胞の骨髄への移行を補助する役割を持つことが示唆された(図1)。CD69遺伝子欠損マウスでは、濾胞ヘルパーT細胞や胚中心B細胞、胚中心の形成は正常に見られることより、今まで知られていない液性免疫における胚中心反応以降でのヘルパーT細胞の役割が明らかとなった。CD69遺伝子欠損マウスの解析から骨髄記憶ヘルパーT細胞が液性免疫において必須な役割をもつことが明らかとなった。今後、骨髄記憶ヘルパーT細胞の生体内における意義のさらなる解明が期待される。

(2) 呼吸器粘膜組織における記憶ヘルパーT細胞形成・維持機構

呼吸器粘膜組織において炎症が誘導されると組織中にリンパ節様の誘導性気管支関連リンパ組織(induced bronchus-associated lymphoid tissue: iBALT)が異所的に形成されることが知

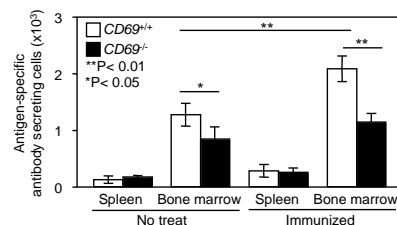


図1 野生型マウスにおいてプラズマ細胞の骨髄への移行能はあらかじめ免疫したマウスにおいて顕著に高くなり、CD69遺伝子欠損マウスではその上昇が顕著に減弱する。

られている。われわれは、抗原特異的エフェクターヘルパーT細胞をマウスに移入し抗原を肺に投与することで、肺組織の微小環境変化により、iBALTを誘導する系を確立した。さらに、iBALT構造を免疫染色法により解析すると、記憶ヘルパーT細胞の大部分がiBALT中に局在していることが明らかとなった(図2)。われわれはこれまでに骨髄において、IL-7が記憶ヘルパーT細胞ニッチにおける機能分子として働くことを明らかにしていることから、末梢非リンパ組織における記憶ヘルパーT細胞の維持においてもIL-7が機能しているのではないかと考えた。IL-7の発現を組織学的に検出可能なIL-7-GFPノックインマウスを用いてiBALTを誘導すると記憶ヘルパーT

細胞の大部分は IL-7 産生細胞と接着して維持されていることが明らかとなった。さらに、IL-7 の記憶ヘルパー T 細胞維持における役割を詳細に解析するため、IL-7 レセプターのコンディショナルノックアウトマウスを用いて、解析した。IL-7 レセプターのコンディショナルノックアウトマウス由来の記憶ヘルパー T 細胞を誘導した後に薬剤により IL-7 レセプターを欠失させると、iBALT において維持される記憶ヘルパー T 細胞が消失することが明らかとなった。これらの結果から、iBALT において記憶ヘルパー T 細胞は IL-7 依存的に生存維持されていることが明らかとなった。

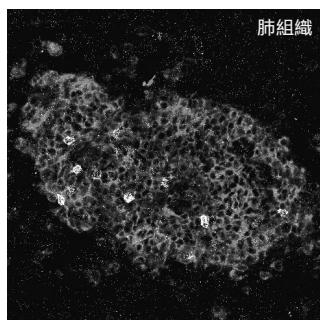


図2 気道炎症を誘導した肺では iBALT(MHC class II 陽性細胞の集積: グレー)が形成され、大部分の記憶ヘルパー T 細胞(白)はその中に局在する。

(3) iBALT 内記憶ヘルパー T 細胞ニッチの同定及び機能分子の探索

iBALT における IL-7 産生細胞の性質を明らかにしていくことで、これらの細胞が記憶ヘルパー T 細胞に与える影響や他の免疫細胞に対する作用について明らかにすることができる。われわれは IL-7-GFP ノックインマウスを用いて、GFP の発現を指標に IL-7 産生細胞をフローサイトメーターにより単離することに成功した。IL-7 はリンパ節においてリンパ管内皮細胞 (Lymphatic endothelial cell; LEC) と細網繊維芽細胞 (fibroblastic reticular cell; FRC) により産生されることが報告されている。われわれが着目する呼吸器粘膜組織における IL-7 産生細胞がこれらの細胞とどのように違うのか、リンパ節の IL-7 産生細胞と肺における IL-7 産生細胞を遺伝子発現レベルで網羅的に比較解析する。最終的には iBALT 内の IL-7 産生細胞を制御し得るような機能分子を同定し、記憶ヘルパー T 細胞の制御によるアレルギー疾患や自己免疫疾患の治療戦略の基盤を構築したい。

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 5 件) 全て査読あり

1. Endo, Y., Hirahara, K., Inuma, T., Shinoda, K., Tumes, D. J., Asou, K. H., Matsugae, N., Obata-Ninomiya, K., Yamamoto, H., Motohashi, Oboki, K., Nakae, S., Saito, H., Okamoto, Y., and Nakayama, T.: The Interleukin-33-p38 kinase axis confers memory T helper 2 cell pathogenicity in airway. *Immunity* 42(2):294-308 (2015)
DOI:10.1016/j.immuni.2015.01.016
2. Watanabe, Y., Onodera, A., Kanai, U., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kiuchi, M., Iwamura, C., Tumes, D. J., Shinoda, K., Yagi, R., Motohashi, S., Hirahara, K., and Nakayama, T.: Trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111(35):12829-12834 (2014).
DOI:10.1073/pnas.1321245111
3. Tumes, D. J., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T.: The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4⁺ T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity* 39(5): 819-832 (2013).
DOI:10.1016/j.immuni.2013.09.012
4. Hosokawa, H., Tanaka, T., Kato, M., Shinoda, K., Tohyama, H., Hanazawa, A., Tamaki, Y., Hirahara, K., Yagi, R., Sakikawa, I., Morita, A., Nagira, M., Poyurovsky, V. M., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T.: Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110(46): 18626-18631 (2013).
DOI:10.1073/pnas.1311100110
5. Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Shinoda, K., Yagita, H., Okumura, K., Löhning, M., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Eckes, B., Radbruch, A., Tokoyoda, K., and Nakayama, T.: CD49b-dependent establishment of T helper cell memory. *Immunol. Cell Biol.* 91:524-531 (2013).
DOI:10.1038/icb.2013.36

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Hosokawa, H., **Shinoda, K.**, Suzuki, A., Ito, T., and Nakayama, T.: Functionally distinct GATA3 complexes regulate Th2 cell differentiation and proliferation. 第 43 回日本免疫学会総会・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)
2. Izumoto, M., Kuwahara, M., Kiyoi, T., **Shinoda, K.**, Nakayama, T., Kurosaki, T., and Yamashita, M.: Bach2-Blimp1 axis plays an important role in the regulation of allergic airway inflammation. 第 43 回日本免疫学会総会・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)
3. Watanabe, Y., Onodera, A., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kiuchi, M., Morimoto, Y., **Shinoda, K.**, Yagi, R., Motohashi, S., Hirahara, K., and Nakayama, T.: The trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. 第 43 回日本免疫学会総会・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)
4. Ito, T., Hirahara, K., Suzuki, A., **Shinoda, K.**, Hayashizaki, K., Wada, T., Yano, I., and Nakayama, T.: Induction of anti-tumor effect of BCG-LM through activation of eosinophils and effector memory Th2 cells. 第 42 回日本免疫学会総会学術集会 2013 年 12 月 11-13 日, 幕張メッセ(千葉県・千葉市)
5. Nakayama, T., Iwamura, C., **Shinoda, K.** and Endo, Y.: Pathogenic memory Th2 cells in the airway and regulation by activated NKT cells in vivo. 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2013 年 11 月 28-30 日, ホテルニューオータニ(東京都・千代田区)
6. **Shinoda, K.** and Nakayama, T.: CD69 regulates the formation of resting T helper memory. シンポジウム 7th International Leukocyte Signal Transduction Conference 9/8-13/2013, Kos Island(Greece)
7. Tumes, D., Onodera, A., Suzuki, A., **Shinoda, K.**, Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: The histone methyltransferase Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4 T helper cells. AAI Annual Meeting, 2013 May 3-7, Honolulu(USA)

〔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

千葉大学大学院医学研究院免疫発生学ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠田 健太 (SHINODA, Kenta)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号 : 10612195