

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430084

研究課題名(和文) 自然免疫細胞を標的にしたエイズ日和見感染症発症メカニズムの解析

研究課題名(英文) Roles of innate immune cells in opportunistic infections

研究代表者

杉本 智恵 (Sugimoto, Chie)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：60469955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では日和見感染症の発症に関与することが予想されるMAIT細胞の解析を可能にする動物モデルを構築することを目的とした。(1)サルと交差性があるヒト抗体を用い、MAIT細胞を考えられる細胞集団を同定した。サルにはヒトと同程度の割合のMAIT細胞が存在することが明らかになった。(2)MAIT細胞研究用汎用実験動物モデルを構築するため、マウスMAIT細胞由来iPS細胞を樹立した。今後はこのiPS細胞を利用して新規MAITマウスモデルの構築を目指す。

研究成果の概要(英文)：MAIT cells are a novel subset of innate like T cells which could be associated with susceptibility to opportunistic infections in immune compromised patients. Although MAIT cells are very abundant in humans, there is no suitable animal model for studying MAIT cells due to a very low frequency in laboratory mice. The aim of this study was to establish MAIT animal models. (1) Rhesus monkey model for AIDS-related opportunistic infections: We have detected MAIT cells in peripheral blood from healthy rhesus monkeys by using anti-human antibodies. That frequency was similar to humans. (2) Novel MAIT mouse model: We have established iPS cells derived from MAIT cells in C57BL/6 mice and observed that the iPS cells re-differentiated into MAIT cells using the OP9 feeder cell system. The mouse MAIT-iPS cells will be applied to construct novel mouse MAIT models for future studies.

研究分野：感染免疫学

キーワード：MAIT細胞 自然免疫型T細胞 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 は CD4+ T 細胞を主な標的細胞とし、HIV-1 感染者では CD4+T 細胞が減少する。この CD4+ T 細胞の減少が、HIV-1 感染で高頻度に発症する日和見感染症や悪性腫瘍に代表される、免疫不全症候群 (エイズ) を起こすメカニズムとして広く受け入れられている。しかし、我々は HIV-1 感染者での日和見感染発症は CD4+T 細胞に代表される獲得免疫よりも、自然免疫系細胞の機能低下がより重要ではないかと考える。実際、自然免疫系細胞である単球・マクロファージの動的変動が、CD4+ T 細胞の減少よりも強くエイズ発症と相関することを、サルエイズモデルで示した (Hasegawa, Sugimoto *et al.*, *Blood* 2009)。さらに、①自然免疫 T 細胞である MAIT 細胞が HIV-1 感染者で徐々に減少すること、②抗レトロウイルス療法によって血中 HIV 量が低下し CD4+T 細胞数が回復しても、MAIT 細胞数は低下したままであることが報告された。

MAIT 細胞はきわめて特異な性質を持つ自然免疫 T 細胞である。その特徴は、①ヒトで非常に豊富であり、血中 T 細胞の 1-10%、腸管粘膜 T 細胞の 2-10%、肝臓 T 細胞の 20-50% を占める主要な T 細胞サブセットである。一方、マウスにはほとんど存在しない。②一般的な T 細胞と違い、発現している T 細胞レセプターが均一である (インバリアント TCR)。③非特異的な抗菌・原虫活性を持つと考えられている。④従来知られているいかなる T 細胞刺激によっても、増殖させることは困難である。

以上から、我々は 1) MAIT 細胞の減少 (あるいは機能低下) が日和見感染症の発症の原因であり、2) MAIT 細胞数が減少した場合、細胞治療が有効であるという仮説を立てた。

この仮説を検討するため、日和見感染症の動物実験モデルが必要である。SIV 感染アカゲザルモデルはエイズの実験動物モデルとして有用であることは広く認められている。SIV を感染させたアカゲザルは 1~2 年でエイズ類似症状を呈して死に至る。そのような自然な経緯でエイズを発症したサルの死因は大多数が日和見感染によることが病理学的に示されている (Hasegawa, Sugimoto *et al.*, *Blood* 2009)。申請者は、これまでに SIV 感染ザルにおいてエイズ病態に関連する免疫細胞の性質を免疫学的、組織学的に明らかにしてきた (Sugimoto, *et al.* *J. Virol* 2012, Sugimoto, *et al.* *J. Virol* 2003)。しかし、アカゲザルにおいて MAIT 細胞はまだ同定されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は自然免疫系に着目した日和見感染症発現のメカニズムを解析するための基盤として、新規の動物モデルを構築することである。自然免疫系細胞のうち、特に MAIT 細胞の分化と機能の *in vivo* 研究を可能にする実験動物モデルの確立を目指し、研究期間中に以下の 2 つのモデルについて検討した。1) アカゲザルにおける MAIT 細胞の同定、2) 新規マウスモデルの構築。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリー解析によるアカゲザルとヒト MAIT 細胞のフェノタイピング

アカゲザル MAIT 細胞の同定は既存のヒトに対する抗体が交差反応性により判断した。CD3、CD4、CD8 など一般的な T 細胞解析に用いる抗体とともに MAIT 細胞を規定するのに重要な TCR V α 7.2、CD161 を主に、MAIT 細胞の性質と機能を類推できる細胞表面マーカー 80 種類により MAIT 細胞のフェノタイピングをフローサイトメトリー解析によって行った。抗体は Biolegend, BD bioscience, R&D から入手し、MACSQuant (8 カラー 10 パラメーターサイトメトリー) によって染色細胞を取り込み、データ解析は Flowjo ソフトウェアによって行った。

(2) アカゲザル細胞の入手

米国 Tulane National Primate Research Center で行われた動物実験によって採取・凍結保存されていたアカゲザル末梢リンパ球、組織由来リンパ球は国立感染症研究所を経由して入手した。

(3) ヒト末梢血 MAIT 細胞のフェノタイプ解析

アカゲザル MAIT 細胞同定のリファレンスとしてヒト MAIT 細胞の詳細解析をするため健康人 (健康診断受診者)、神経内科疾患患者から採血をし、全血または Ficoll preparation によって分離した末梢血リンパ球をフローサイトメトリー解析した。検体採取は北海道大学病院倫理委員会の審査・承認のもとに行った。

(4) マウス MAIT 細胞の同定

マウス MAIT 細胞を同定できる市販抗体は現在存在しない。そこでこれまでに報告されている細胞表面マーカーと転写因子発現の情報を組み合わせることによって、C57BL/6 マウスの脾臓、肺から得た細胞中の MAIT 細胞をフローサイトメトリー解析によって同定した。

(5) マウス MAIT 細胞の初期化

上述の方法で同定したマウス MAIT 細胞を多く含む細胞集団をセルソーティング (BDJazz, 6 カラー 8 パラメーターセルソーターを使用) によって分離した。分離した細

胞に初期化因子 (Klf4, Oct3/4, Sox2 および cMyc) をセンダイウイルスベクターを用いて導入し、マウス胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) をフィーダー細胞として iPS 細胞を作出した。得られた iPS 細胞クローンは PCR によって再構成済み TCR (V α 19-J α 33) を持つか確認することによって MAIT 細胞由来 iPS 細胞であるかの判断をした。

(6) マウス MAIT-iPS 細胞からのキメラマウス作製

上述(5)で得られた iPS 細胞が多能性を獲得しているか調べるため、3つのクローンを用いてキメラマウスを作成した(新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォームによる研究支援)。

4. 研究成果

(1) ヒト末梢血 MAIT 細胞のフェノタイプ解析

MAIT 細胞は獲得免疫を司る通常型 T 細胞と基本的なフェノタイプは同じであり、CD3、CD4、CD8 のような細胞マーカーだけでは区別がつかない。近年、MAIT 細胞の発現するインバリエント TCR に対する抗体が市販されるようになり、ヒトの MAIT 細胞の同定が簡便にできるようになった。しかし他の動物種ではまだ実用的な試薬は入手が難しい。そこでまずヒト MAIT 細胞のより詳細なフェノタイプを明らかにし、アカゲザルやマウス MAIT 細胞の同定をするためのレファレンスとすることを試みた。

ヒト健康者の MAIT 細胞は CD3+TCRV α 7.2+CD161^{high} の細胞群と規定され、その大多数は CD8+ または CD8^{low} で、残りのわずかが CD4+ であった。他に顕著な細胞表面マーカーは IL18 レセプター α 、CD45RO が陽性であり、Th17 様のメモリー細胞フェノタイプを呈することが示された。

健康診断を受診した女性 64 名 (21-88 歳)、男性 (21-90 歳) の末梢血を用いて MAIT 細胞をフローサイトメトリー解析した結果、血中 T 細胞に対する MAIT 細胞の割合は 0.1-21.5% と個人間でのばらつきが大きかったが性別による差はなかった。しかし、MAIT 細胞は年齢とともに低下する傾向が見られ、それとともに CD161、CD45RO の発現が低下していることが示された。高齢者の易感染性に MAIT 細胞の低下が関連する可能性が示唆された。

また、このヒト MAIT 細胞フェノタイプカタログは疾患との関連を研究することにも利用し、難治性神経疾患である線維筋痛症の確定診断に応用できる可能性があること、多発性硬化症患者ではより活性化した CD8^{low/neg} MAIT 細胞が出現すること、FTY720 長期投与により MAIT 細胞の CD8 発現が回復することなどを明らかにした。

(2) アカゲザル MAIT 細胞のフェノタイプ解析

ヒト MAIT 細胞のフェノタイプをもとに、アカゲザル末梢血単核球中の MAIT 歳暮を同定できるか検討した。アカゲザルとヒトでは多くの細胞表面マーカーに対する市販抗体で交差反応が見られることが明らかである反面、抗体クローン間の反応性に違いがあることもこれまでに明らかになっている。そこで特に MAIT 細胞を規定するのに有用な TCRV α 7.2、CD161 について数種の抗体クローンの反応性を調べた。その結果、TCRV α 7.2 についてはアカゲザル細胞において明らかな陽性細胞集団を検出することができなかったが、CD161 は使用可能な抗体を選択することができた。

CD161 と CD3、CD4、CD8 抗体を組み合わせることにより、CD3+CD8+CD161+ が MAIT 細胞に相当する細胞集団であると考えられた。この細胞集団は末梢血リンパ球においてヒトと同等かやや多い割合で存在し、小腸粘膜リンパ球にも同様の細胞集団が存在することが明らかになった。

(3) マウス MAIT 細胞の同定

霊長類動物モデルであるアカゲザルはヒト疾患、特に感染症研究では有用である。しかし、日本においては実験施設が限られていること、動物の購入・飼育管理が高価であることから一般の研究者が実験を存続することは難しい。一方、汎用動物モデルであるマウスによる MAIT 細胞研究における問題点は MAIT 細胞の数が極めて少ないことである。また、マウス MAIT 細胞が持つインバリエント TCR α 鎖を強制発現するトランスジェニックマウスでは MAIT 細胞の数は増えるが TCR α 鎖発現に用いるプロモーターの種類によって MAIT 細胞の機能が違うことも報告されている。そこで我々のグループで確立した MAIT 細胞 iPS 化の技術を用い、新規マウスモデルを確立するための予備実験を開始した。

6~10 週齢の C57BL/6 から脾臓、肺を摘出し、浮遊細胞液を調製した。一般的な T 細胞マーカーと MAIT 細胞で発現している転写調節因子 ROR γ t と PLZF を抗体で染色し、フローサイトメトリー解析をして MAIT 細胞を検出できるか検討した。その結果、脾臓、肺の

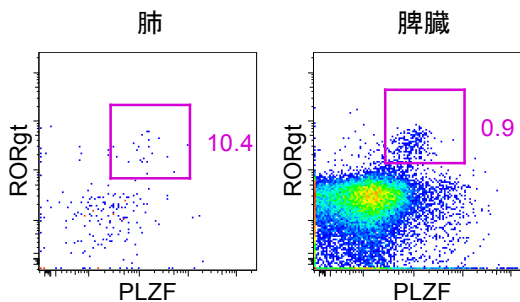


図 1 C57BL/6 マウスにおける MAIT 細胞の割合

T細胞のそれぞれ約1%、10%がMAIT細胞であることが示された(図1)。肺T細胞には高頻度にMAIT細胞が存在することが明らかとなったが、個体あたりの総細胞数では脾臓の方が多くのMAIT細胞を含んでいるので、以降の実験には脾臓細胞を使用した。

(4) マウス MAIT 細胞の iPS 化と次世代 MAIT 細胞動物モデルへの応用

ROR γ t と PLZF はマウス MAIT 細胞を同定するための有用なマーカーであったが、細胞内染色のため細胞を固定する必要があり、生細胞の分離には適さない。希少なマウス MAIT 細胞を iPS 化するため、既存抗体の組み合わせによってできるかぎり MAIT 細胞を多く含む細胞集団を分離することを試みた。そのため抗体磁気ビーズで B 細胞、単球、顆粒球などのいらない細胞をあらかじめ取り除いた後、T 細胞染色をして平均 12% の MAIT 細胞を含む細胞集団を得た。この細胞に初期化因子発現センダイウイルスを感染させ、MEF 上で 2~3 週間ほど培養を続けた結果、50 を超える ES 細胞様コロニーを得た(図2)。

得られたコロニーを 2i 添加 ES 培地を用い

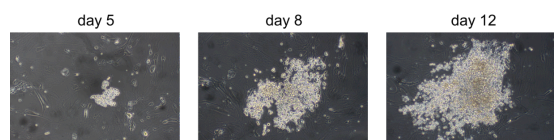


図2 マウス MAIT 細胞由来 iPS 細胞

て MEF 上で増殖させ、細胞 DNA を抽出し、MAIT 細胞由来かどうかを Va19-J α 33 の再構成の有無を PCR 法で判定した。得られた iPS クロンの少なくとも 95% が MAIT 細胞由来であった。

3 つの iPS クローンについてキメラマウスの作製を試みた。各 iPS 細胞クローンをそれぞれ 30 個の受精卵に注入した結果、すべてのクローンから 8 匹のキメラマウスが産出された。MAIT 細胞由来 iPS 細胞は多能性を持つことが確認された。

今後は樹立したマウス MAIT-iPS 細胞と産出されたキメラマウスを用い、新規マウス MAIT 細胞実験モデルの確立と疾患モデルへの応用を目指す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Saito Y, Sugimoto C, Mitsuyama T, Wakao H. Epigenetic silencing of V(D)J recombination is a major determinant for selective differentiation of mucosal-associated invariant T cells from induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 12: e0174699. 2017 (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0174699

- ② Sugimoto C, Hirotsu M, Yoshikiyo K, Koshimizu U, Wakao R, Horinouchi T, Mazaki Y, Higashi T, Fukazawa T, Fujita H, Sasaki H, Wakao H. The dynamics of mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *SpringerPlus* 5: 1259. 2016 (査読有)

DOI: 10.1186/s40064-016-2923-9

- ③ Sugimoto C, Fujita H, Wakao H. Mucosal-associated invariant T cells from induced pluripotent stem cells: A novel approach for modeling human diseases. *World Journal of Stem Cells* 8: 158-169. 2016 (査読有)

DOI: 10.4252/wjsc.v8.i4.158

- ④ Sugimoto C, Konno T, Wakao R, Fujita H, Fujita H, Wakao H. Mucosal-associated invariant T cell is a potential marker to distinguish fibromyalgia syndrome from arthritis. *PLOS ONE* 10: e0121124. 2015 (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0174699

- ⑤ Sugimoto C, Hasegawa A, Saito Y, Fukuyo Y, Chiu KB, Cai Y, Breed MW, Mori K, Roy CJ, Lackner AA, Kim WK, Didier ES, Kuroda MJ. Differentiation kinetics of blood monocytes and dendritic cells in macaques: Insights to understanding human myeloid cell development. *Journal of Immunology* 195: 1774-1781. 2015 (査読有)

DOI: 10.4049/jimmunol.1500522

[学会発表] (計 7 件)

- ① 杉本智恵、佐々木秀直、若尾宏、加齢による粘膜関連インバリエント T 細胞の表現型の変化、第 87 回日本衛生学会学術集会、フェニックスシーガイアリゾート (宮崎県・宮崎市)、2017 年 3 月 28 日
- ② 若尾宏、杉本智恵、満山統泰、齋藤裕、iPS 細胞からの自然免疫型 T 細胞分化誘導の分子機序の統合的解析、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)、2016 年 11 月 30 日
- ③ 杉本智恵、若尾宏、iPS 細胞からのフィーダーフリー自然免疫型 T 細胞分化誘導系の確立、第 86 回日本衛生学会学術集会、旭川市民文化会館 (北海道・旭川市)、2016 年 5 月 13 日

- ④杉本智恵, 若尾宏, iPS 細胞からのヒト自然免疫型 T 細胞大量生産系の確立. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)、2015 年 12 月 2 日
- ⑤若尾宏, 杉本智恵, 藤田博美, エイズ患者での日和見感染発症における自然免疫系細胞の重要性と新規バイオマーカーの検索. 第 85 回日本衛生学会学術集会, 和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国 (和歌山県・和歌山市)、2015 年 3 月 27 日
- ⑥杉本智恵, 藤田博美, Marcelo J. Kuroda, HIV 感染者での日和見感染症発症における自然免疫系細胞の重要性, 第 87 回日本生化学会大会, 京都国際会議場 (京都府・京都市)、2014 年 10 月 18 日
- ⑦杉本智恵, 藤田博美, Marcelo J. Kuroda, エイズ患者での日和見感染症における自然免疫系細胞の重要性と新規バイオマーカーの検索, 第 84 回日本衛生学会学術集会, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)、2014 年 5 月 27 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 智恵 (SUGIMOTO, Chie)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 60469955

(2) 研究分担者

若尾 宏 (WAKAO, Hiroshi)
獨協医科大学・医学部・特任教授
研究者番号: 10280950

藤田 博美 (FUJITA, Hiroyoshi)
獨協医科大学・医学部・特任教授
研究者番号: 60142931

(3) 研究協力者

黒田 マルセロ (KURODA, Marcelo J.)
Tulane University (USA), Professor