

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09301

研究課題名(和文) 腸管CD4-CD8<sup>-</sup> double negative T細胞の機能解析研究課題名(英文) Analysis of intestinal CD4-CD8<sup>-</sup> double negative T cells

研究代表者

岡田 英理子 (OKADA, Eriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20376784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腸管は生体最大の免疫組織であり非常に多くの細胞を含むが、特にユニークなのはT細胞やCD4-CD8-TCR<sup>+</sup>T(Double Negative: DNT細胞)細胞である。我々はこれまで機能が不明であったDNT細胞について詳細な解析を行った。DNT細胞は形態学的、免疫学的に多くの点で、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞とは異なり、むしろT細胞に非常に近く、また既報通り免疫抑制能を有する事がわかった。また、養子移入を用いた系によって、各細胞分画間に可塑性はなく、独立した分画であることがわかった。ヒトの腸管においてもこのような分画は存在するものの、マウスに比較して少数であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで機能が不明であったDNT細胞の形態学的、免疫学的特徴が明らかになった。本分画は腸管粘膜免疫における新規制御性T細胞分画として、今後炎症性腸疾患、食物アレルギー、大腸癌などの疾患の病態解明および新規治療法の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：There are huge amount of exogenous antigens, such as gut microbes and food antigens, in the intestine. To keep homeostasis, it has highly developed immune system, and it includes a various types of immune cells. Above all, T cells and CD4-CD8<sup>-</sup>TCR<sup>+</sup>T cells (Double Negative: DNT cells) are very unique. They are abundant in the intestine, while they are rare in the peripheral blood and other organs. We noticed DNT cells, which is still enigmatic fraction, and analyzed their morphological and immunological feature. We found that DNT cells are similar to T cells, while they are different from CD4<sup>+</sup>T cells or CD8<sup>+</sup>T cells in many aspect. DNT suppressed proliferation of Naive CD4<sup>+</sup>T cells in vitro. With the adoptive transfer experiment, we found that DNT, CD4 and CD8<sup>+</sup>T cells in the small intestine are different fraction and there are no plasticity among them. In the human intestine, we found substantial number of DNT cells, but their number is lower than mice.

研究分野：消化器内科学

キーワード：Double Negative T細胞 粘膜免疫 T細胞 腸管上皮間リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの消化管には 100 兆個に及び腸内細菌や食餌抗原など莫大な量の外来抗原が存在する。消化管は外来抗原の混沌の中から栄養素や水分を取り込む一方で、微生物の侵入をブロックしなくてはならず、このような責務に対応するために消化管は高度に発達した独自の免疫機構を有している。本機構により消化管は病原体となる微生物を排除する(炎症)他方で、食事抗原や無害な共生細菌に対しては過剰な免疫応答を抑制(免疫寛容)している。健康な腸管では炎症と免疫寛容のバランスがとれているが、バランスが崩れれば易感染性や発癌、炎症性腸疾患、食物アレルギーにつながる。

実際ヒトの消化管は最大の免疫組織であり多くの免疫細胞を含んでいるが、特にユニークなのが腸管上皮間リンパ球、IEL(intraepithelial lymphocytes)である。ヒト消化管は外界と生体内をたった一層の上皮細胞層で隔てているが、この上皮細胞層にはまり込む様にして IEL は存在する。粘膜固有層と異なり、上皮間には T 細胞しか存在しない。その数は非常に多く、マウス IEL の数は脾臓の全 T 細胞数にも匹敵する。IEL は通常の CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞以外に  $\gamma\delta$  T 細胞や CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> TCR<sup>+</sup> T 細胞(CD4-CD8-Double Negative T 細胞:DNT 細胞)など、末梢血では数%に満たない特殊な細胞を 40-60%と非常に多く含む。前者は出生時には少なく、年齢とともに増加することから induced IEL(iIEL)、後者は出生時に多く、年齢とともに減少することから Natural IEL(nIEL)と定義される。nIEL は unconventional (非通常性) T 細胞とも呼ばれ、自己反応性 TCR を有し、CD8 ホモダイマーや Natural Killer 細胞受容体を発現するなど多くの点で通常の T 細胞と異なる。

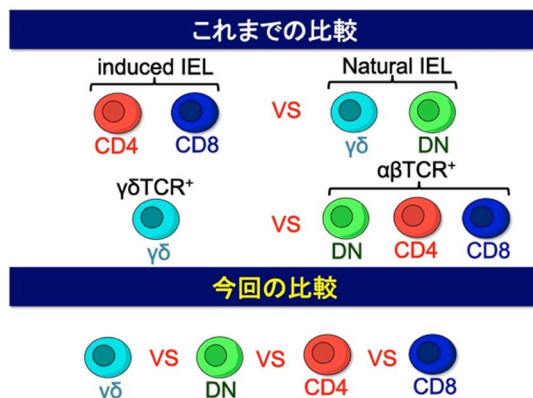
このような最前線において iIEL は通常の T 細胞と同様に細菌抗原等に対してサイトカイン分泌、細胞性免疫を介して炎症を惹起する。他方 nIEL の機能は非常にユニークである。T 細胞の欠損するマウスでは DSS 腸炎が悪化することから T 細胞は腸炎に対して抑制的に機能することが示唆されている(Tsuchiya T et al, J Immunol 2003)。現在では T 細胞はウイルス感染した上皮細胞の排除や、KGF (keratinocyte growth factor)分泌を介した上皮新生の促進など、腸管上皮の品質保持を行っていると考えられている(Cheroutre H et al, Nat Rev Immunol 2011)。一方 DNT 細胞に関してはこれまでにあまり報告がなく、その機能はほとんど分かっていない。2001 年に本細胞分画を CD45RB<sup>high</sup>T 細胞移入腸炎モデルマウスに供移入したところ、腸炎の発症が抑制されたと報告されている(Poussier P et al, JEM 2002)ことから本細胞は腸炎に対して抑制的であることが示唆されるが具体的な抑制機構については不明であり、「これまで無視されてきた存在」と言われている(Mayans S et al, Immunity 2014)(図 2)。

### 2. 研究の目的

腸管に豊富に存在し、免疫寛容に関与するとされているがその機能には未だ謎が多い DNT 細胞の形態学的、免疫学的な機能を明らかにする。特に発現遺伝子や表面マーカーの網羅的な解析を行い、DNT 特異的な新規マーカーの同定を試みるとともに、その免疫抑制能のメカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

これまでに IEL において induced IEL と Natural IEL, T 細胞と T 細胞の比較は数多くなされて来たが DNT 細胞単独に注目した研究はほとんどない。今回は IEL を CD4, CD8, T, DNT に分類し、詳細に解析を行う(下図)。



#### (1). マウス DNT 細胞の形態学的解析

マウス小腸 IEL の CD4, CD8, T, DNT をフローサイトメトリーによって分取し、大きさ、内部顆粒などの差異を検討する。

#### (2). マウス DNT の発現遺伝子の網羅的解析

マウス小腸 IEL, LPL, パイエル板の CD4, CD8, T, DNT をフローサイトメーターによって分取し、マイクロアレイを行い、DNT の発現遺伝子の網羅的解析を行う。

### (3), マウス DNT の表面マーカーの網羅的解析

IEL における DNT 細胞の表面マーカーは CD4<sup>+</sup> T 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞とは大きく異なるが DNT は T 細胞と似た表面マーカーを有しており、DNT 特異的なマーカーは未だ見つかっていない。今回フローサイトメトリーを用いて、各種刺激分子、サイトカイン受容体、Treg マーカー、血球系マーカーなどを網羅的に解析し、DNT 特異的なマーカーを探求する。

### (4), マウス DNT のサイトカイン分泌能の解析

DNT 細胞のサイトカイン分泌能を検討する目的でマウス小腸 IEL, LPL, パイエル板の CD4, CD8, T, DNT をフローサイトメトリーによって分取し、PMA/Ionomycin 刺激後のサイトカイン産生をフローサイトメトリーおよび ELISA によって検討する。

### (5), マウス DNT の移入による分化解析

DNT 細胞の分化の可塑性を調べる目的で、GFP マウス小腸 IEL より DNT 細胞を分取し、免疫不全マウスに移入し2ヶ月後の腸管における IEL の分画をフローサイトメトリーによって検討する。

### (6), マウス DNT の in vitro における抗原特異的な T 細胞分裂の抑制能の検討

WT マウス IEL より CD4, CD8, T, DNT をフローサイトメトリーによって分取し、CFSE ラベルした OTH CD4<sup>+</sup>T 細胞および OVA peptide をパルスした CD11c<sup>+</sup>樹状細胞と供培養し、抗原特異的な細胞分裂を抑制するかを検討する。抑制が見られた場合、IL-10、TGF- $\beta$  などに対する中和抗体を使用しサイトカイン依存性を、トランスウエルを用いた検討により cell-to-cell contact 依存性を検討する。

### (7), IBD マウスモデルにおける DNT の解析

炎症性腸疾患における DNT 細胞の役割を検討する目的で IL-10<sup>-/-</sup>マウス、IL-2<sup>-/-</sup>マウス、CD45RB<sup>high</sup>T 細胞移入大腸炎モデル、DSS 大腸炎モデルにおいて大腸炎発症時の DNT の割合、表面マーカーの変化を検討する。

### (8), DNT の in vivo における腸炎抑制能の検討

Ly5.1 マウス IEL より CD4, CD8, T, DNT をフローサイトメトリーによって分取し、Ly5.2 マウス脾臓由来 CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T 細胞と RAG2<sup>-/-</sup>へ供移入し、8週間後に大腸炎の差異、各臓器における T 細胞の Ly5.1/Ly5.2 比を検討する。

### (9), ヒト小腸粘膜における DNT の検討

ヒト小腸にもマウス同様に CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>T 細胞が存在することは知られているが、その機能に関しては未だ不明な点が多い。そこでヒト小腸内視鏡の生検検体を用いて DNT 細胞の形態、表面マーカー、発現遺伝子を検討する。また、IEL より CD4, CD8, T, DNT をフローサイトメトリーによって分取し、in vitro における抑制能を検討する。

### (10), 炎症性腸疾患患者小腸粘膜における DNT の検討

本機構の炎症性腸疾患における役割を検討する目的でクローン病患者の小腸炎症部粘膜および非炎症部粘膜の手術検体において IEL より CD4, CD8, T, DNT をフローサイトメトリーによって分取し DNT 細胞の形態、表面マーカー、発現遺伝子を検討する。

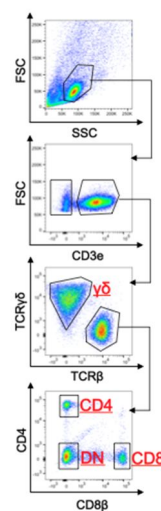
## 4. 研究成果

### (1), マウス DNT 細胞の形態学的解析

我々はまず、小腸 IEL, LPL および各臓器の T 細胞を CD3<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>T 細胞 ( T 細胞 ), CD3<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>T 細胞 ( DNT 細胞 ), CD3<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞 ( CD4<sup>+</sup>T 細胞 ), CD3<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞 ( CD8<sup>+</sup>T 細胞 ) と定義した。

この定義により、従来の T 細胞と T 細胞、あるいは CD8<sup>+</sup>T 細胞と CD8<sup>-</sup>T 細胞の比較ではなく、免疫学的に異なる 4 分画をしっかりと区別して比較することが可能であった(右図)。

まず、フローサイトメーターで分取した各分画の形態学的な解析では、小腸 IEL における IEL, DN, CD4, CD8 に大きな差は見られなかった。そこで、ガラスボトムディッシュへの培養を行い、デルタビジョンシステムによる in vitro live imaging で形態および運動能の評価を行った。結果 T 細胞および DNT 細胞は IEL における CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞あるいは脾臓の TCR $\beta$ <sup>+</sup> T 細胞に比して、高い運動能を有し、アメーバ状の形態を呈することが分かった。この結果により、 T 細胞、DNT 細胞は、CD4, CD8 に比して内因性に高い運動能、形態変化能を有する可能性が示唆された。



### (2), マウス DNT の発現遺伝子の網羅的解析

上記定義により分取した小腸 IEL の各分画を、マイクロアレイを用いて発現遺伝子の網羅的解析を行った。DNT 細胞の発現遺伝子は同じ TCR $\beta$ <sup>+</sup>細胞である CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞よりも T 細胞に非常に近く、NK 受容体やディフェンシン、細胞骨格に関連する遺伝子を高発現することが分かった。詳細なマイクロアレイのデータは論文投稿と同時にデータベースにアップロードする予定である。

### (3), マウス DNT の表面マーカーの網羅的解析

表面マーカーの比較では、DNT 細胞は CD4, CD8 に比して CD103, EpCAM などの上皮との接着、Homing に関与する分子を高く発現していた。また CD4 に比して CD8 ホモダイマーの発現が高かった。その他 B 細胞マーカーである B220 や、樹状細胞マーカーである CD11c の他、NK 細胞のマーカーを多く発現することが分かった。これらの分子の機能的な役割に関しては今後検討する予定である。

### (4), マウス DNT のサイトカイン分泌能の解析

小腸 IEL から分取した細胞の 4 分画におけるサイトカイン産生能の比較では、DN とともに CD4, CD8 に比して IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 の産生能が低く、アナジックな細胞であることが分かった。マイクロアレイによる解析でも IL-2, IL-10, IL-21, IL-22 など、他のサイトカイン遺伝子の発現も低値であった。

### (5), マウス DNT の移入による分化解析

免疫不全マウスへの移入 8 週間後の解析では移入前後に細胞分画の可塑性はないことが分かった。

### (6), マウス DNT の in vitro における抗原特異的な T 細胞分裂の抑制能の検討

OTII マウス、OVA を用いた抗原特異的なナイーブ T 細胞分裂抑制能の検討では、CD4, CD8 では抑制能が見られないのに対して、DN および、特に DNT 細胞において分裂抑制能が確認された。今後より詳細なメカニズムを検討する。

### (7), IBD マウスモデルにおける DNT の解析

野生型マウスに 3%DSS を 5 日間自由飲水させ、急性腸炎を誘導し、9 日後の小腸各分画の細胞数を検討したが、腸炎およびコントロール間において各分画の割合に差は見られなかった。今後、小腸炎モデルにおいても検討を行う。

### (8), ヒト小腸粘膜における DNT の検討

次に我々は DNT 細胞のヒトにおける役割を検討した。マウスに比して少数であるがヒト小腸 IEL、LPL において T 細胞、DNT 細胞は 2-10%存在した。他方、クローン病患者との比較においてはクローン病患者において CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合が低下し、CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合が増加する一方で、DN の割合に大きな変化は見られなかった。今後潰瘍性大腸炎患者の検討、クローン病患者における DNT 細胞の表面マーカーの変化や抑制能の検討を行う。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- 1、Watabe T, Nagaishi T, Tsugawa N, Kojima Y, Jose N, Hosoya A, Onizawa M, Nemoto Y, Oshima S, Nakamura T, Karasuyama H, Adachi T, Watanabe M. B cell activation in the cecal patches during the development of an experimental colitis model. 査読有、*Biochem Biophys Res Commun*. 496(2):367-373.2018, DOI:10.1016/j.bbrc.2018.01.053
- 2、Nibe Y, Oshima S, Kobayashi M, Maeyashiki C, Matsuzawa Y, Otsubo K, Matsuda H, Aonuma E, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Nakada S, Watanabe M. Novel polyubiquitin imaging system, PolyUb-FC, reveals that K33-linked polyubiquitin is recruited by SQSTM1/p62. 査読有、*Autophagy*. 14(2):347-358. 2018, DOI:10.1080/15548627.2017.1407889
- 3、Maeyashiki C, Oshima S, Otsubo K, Kobayashi M, Nibe Y, Matsuzawa Y, Onizawa M, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. HADHA, the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, is involved in long-chain fatty acid-induced autophagy in intestinal epithelial cells. 査読有、*Biochem Biophys Res Commun*.484(3):636-641. 2017, DOI:10.1016/j.bbrc.2017.01.159
- 4、Kobayashi M, Oshima S, Maeyashiki C, Nibe Y, Otsubo K, Matsuzawa Y, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development. 査読有、*Sci Rep*. 6:36780.2016, DOI: 10.1038/srep36780

[学会発表](計 1 件)

- 1、Yasuhiro Nemoto, Colonic regulatory T Cells function during the ulcerative colitis. THE 6th ANNUAL MEETING OF ASIAN ORGANIZATION FOR CROHN'S & COLITIS (AOCC 2018)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：根本 泰宏  
ローマ字氏名：Yasuhiro Nemoto  
所属研究機関名：東京医科歯科大学  
部局名：大学院医歯学総合研究科消化器病態学  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：20456213

研究分担者氏名：渡辺 守  
ローマ字氏名：Mamoru Watanabe  
所属研究機関名：東京医科歯科大学  
部局名：大学院医歯学総合研究科消化器病態学  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：10175127

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。