

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07051

研究課題名(和文)メモリーCD8T細胞の恒常性を維持するMHCクラスII依存の新規制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating a novel MHC class II-dependent mechanism which maintains the homeostasis of memory CD8 T cells

研究代表者

瀬戸口 留可 (Setoguchi, Ruka)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：50415204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、MHCクラスII(MHCII)欠損マウスではCD4 T細胞欠損とは無関係に持続的IFN-gamma刺激によりメモリーCD8 T細胞の恒常性が破綻することを明らかにした。

MHCII欠損によりIFN-gamma産生が亢進するのは大腸のCD8 T細胞であることから、MHCII発現細胞によるCD8 T細胞の抑制機構の存在が示された。また、無菌化したMHCII欠損マウスの解析から、IFN-gammaの産生亢進は腸内細菌依存的に誘導されることが明らかになった。さらに、MHCIIによるIFN-gamma産生制御にはCD8 T細胞上のLAG-3の関与が示唆される結果も得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在メモリーT細胞の研究は、非リンパ系組織常在型メモリーT細胞およびメモリーT細胞の分化に必要な転写因子ネットワークの研究が盛んである。メモリーT細胞の量的維持機構は、免疫学および臨床医学的重要性にも関わらず、IL-7、IL-15およびCD4 T細胞によるヘルプ以外にメカニズムは存在しないかの如く、新たな分子機構の報告はない。このような状況下で、本研究結果は炎症性サイトカインがメモリーCD8 T細胞の恒常性を破綻させるという新規制御機構を提唱できるものである。さらに、CD8 T細胞を標的としたワクチンの有効性向上につながる研究に発展する可能性があり社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)： How memory CD8 T cell numbers are stably maintained remain elusive. The requirement of CD4 help for memory CD8 T-cell homeostasis has been controversial, because their defective persistence is consistently seen in MHC class II (MHCII)-deficient, but not in other CD4 T cell-deficient, host mice. We hypothesized that a previously unidentified factor in MHCII-deficient mice may account for the defective memory CD8 T cell maintenance. We found that IFN response genes were up-regulated in memory CD8 T cells, and IFN-gamma, but not IFN-beta, levels were elevated, in MHCII-deficient mice. IFN-gamma neutralization restored memory CD8 T cell numbers in MHCII-deficient mice, whereas continuous IFN-gamma administrations reduced their numbers in WT mice. Furthermore, IFN-gamma upregulation, not in CD4-deficient but in MHCII-deficient mice, was observed mainly in colon and induced by the microbiota.

研究分野：免疫

キーワード：免疫 感染 ウイルス 免疫記憶 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

抗原によって感作されたことのないナイーブ CD8 T 細胞が外来抗原に反応し増殖した後、大部分が細胞死を起こす一方、少数の CD8 T 細胞が生き残り、メモリーCD8 T 細胞となる。メモリーCD8 T 細胞はもう一度同じ抗原に遭遇した際、素早く効率的に免疫反応を引き起こし、宿主を感染性微生物から防御する。このような宿主防御能力が高いメモリーCD8 T 細胞の生体内における質的量的維持機構には、未だ明らかではない点が多い。

メモリーCD8 T 細胞の恒常性維持に必要な分子として IL-7、IL-15 や CD4 T 細胞によるヘルプがこれまでに報告されている。最近の動向としては、これ以外にメカニズムは存在しないかの如く、新たな分子機構の報告はない。しかしながら申請者のこれまでの実験からメモリーCD8 T 細胞の量的維持機構に関して、新たなメカニズムの存在が示唆されている。従来、メモリーCD8 T 細胞を MHC クラス II (MHCII) 欠損マウスに移入する実験から、メモリーCD8 T 細胞の数の維持には CD4 T 細胞からのヘルプが重要であると考えられてきた(Sun JC, *et al. Nat. Immunol.* 2004)。しかしながら我々の研究では、抗体投与により CD4 T 細胞を除去したマウス、CD4 欠損マウス、ThPOK 欠損マウスなどの MHCII 欠損マウス以外のヘルパーT 細胞欠損マウスモデルにメモリーCD8 T 細胞を移入しても、メモリーCD8 T 細胞の数の減少は観察されなかった。すなわち、メモリーCD8 T 細胞の数の減少は MHCII 欠損マウスでのみ観察されることから、CD4 T 細胞ヘルプではなくむしろ MHCII 分子の欠損により、本来 MHCII を発現する抗原提示細胞の機能異常が引き起こされ、その結果メモリーCD8 T 細胞の恒常性が破綻すると考えられた。

私はさらに、MHCII 欠損マウスにおけるメモリーCD8 T 細胞の恒常性維持破綻の内的メカニズムを検討するために、RNA-Seq 法による遺伝子発現パターンの比較を行った。その結果、野生型マウスに移入した場合と比べて MHCII 欠損マウスに移入したメモリーT 細胞において、S 期から M 期に発現する細胞周期関連分子群および炎症性サイトカイン刺激により誘導される遺伝子群の発現が上昇していた。このことは、MHCII 欠損マウスに移入したメモリーT 細胞は持続的に活性化し、エフェクターへの分化が促進されている可能性を示唆している。実際、MHCII 欠損マウスの血漿では炎症性サイトカインが野生型マウスと比較して上昇していた。以上の結果から、我々は MHCII 欠損環境下ではメモリーT 細胞に、慢性的に炎症性分子による刺激が入り活性化状態が持続するためにメモリーT 細胞の恒常性維持が破綻する、という仮説を立て、本研究課題を推進した。

## 2. 研究の目的

メモリーCD8 T 細胞は、獲得免疫の重要な担い手であり、その数と機能がどのように維持されているのかは十分に理解されていない。これまでに、MHCII 欠損マウスにおいてはメモリーCD8 T 細胞の恒常性が破綻するという実験からメモリーCD8 T 細胞の維持に CD4 T 細胞からのヘルプが必要とされてきたが、私は、メモリーCD8 T 細胞の維持には CD4 T 細胞ではなく MHCII 分子自体が重要であることを見いだした。そして、MHCII 欠損マウスでは炎症性サイトカインの発現が亢進し、かつメモリーT 細胞が活性化状態に移行していたことから、この炎症性環境によりメモリーT 細胞の恒常性が破綻するのではないかと仮説を立てた。本研究では、この仮説を検証することを通して、メモリーCD8 T 細胞の恒常性維持を破綻させる MHCII 欠損マウスの炎症性環境の分子実体を明らかにし、メモリーCD8 T 細胞の新規の恒常性維持機構を明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

本研究では期間内に(1)-(3)の課題を明らかにするために以下の方法を用いて、新規のメモリーCD8 T 細胞の恒常性維持機構の解明を試みた。

### (1) メモリーT 細胞の恒常性維持を阻害する炎症性分子の同定

野生型マウスまたは MHCII 欠損マウスに移入したメモリーT 細胞の網羅的遺伝子発現解析から見出した候補分子 (炎症性サイトカイン2つ) のうち、野生型マウスより MHCII 欠損マウスでこれらの分子の発現が変動しているかを、マウス血漿を用い ELISA 法により検討した。MHCII 欠損により発現変動のあった炎症性サイトカイン IFN-gamma の機能を MHCII 欠損マウスにおいて中和抗体により阻害し、移入したメモリーCD8 T 細胞の細胞数への影響を検討した。また、この炎症性サイトカインをメモリーCD8 T 細胞移入後の野生型マウスに持続的に投与し、メモリーCD8 T 細胞の細胞数への影響を検討した。さらに、このサイトカインシグナルの下流の転写因子 STAT1 の機能獲得型変異を抗原特異的 CD8 T 細胞に過剰発現させ、恒常性維持への影響を検討した。

### (2) 同定した炎症性分子によるメモリーCD8 T 細胞の恒常性維持破綻の誘導機構

MHCII 欠損マウスに移入したメモリーT 細胞は持続的に活性化し、エフェクターへの分化が促進されている可能性を以下の方法で検討した。

- ① 野生型マウスと MHCII 欠損マウスに移入した抗原特異的 CD8 T 細胞を分取し、これらの細胞の代謝がエフェクター様かメモリー様になっているのかを検討するために、細胞外フラ

ックスアナライザーを用いて酸素消費速度を測定した。

- ② 野生型マウスと MHCII 欠損マウスに移入したメモリーCD8 T 細胞における T-bet、Blimp1、Tcf1、Bcl6 などの転写因子の発現を、フローサイトメトリーを用いて比較した。
- ③ 野生型マウスと MHCII 欠損マウスに移入したメモリーCD8 T 細胞における増殖期の細胞の割合を、Ki67 をマーカーとして検討し、さらに生存因子 Bcl-2 の発現に差異があるのかをフローサイトメトリーを用いて検討した。
- ④ 野生型マウスと MHCII 欠損マウスに移入したメモリーCD8 T 細胞における細胞表面マーカー、CXCR3、CD27、CD127 の発現を、フローサイトメトリーを用いて比較し、さらに CD127/KLRG1 の発現で分類されるサブセットの細胞数の変化を評価した。

### (3) MHCII 欠損による炎症性分子の産生亢進のメカニズム

MHCII 欠損マウスの血漿で産生が亢進していた炎症性サイトカインは IFN-gamma であった。そこで、全身かまたは臓器特異的にこのサイトカインが上昇しているかを定量的 PCR により mRNA レベルで、ELISA 法により蛋白レベルで検討した。次に IFN-gamma レポーターマウスを使って野生型マウスと比較して MHCII 欠損によって増加する IFN-gamma 産生細胞の同定を試みた。MHCII 欠損マウスの大腸においてのみ IFN-gamma の産生が増加していたので、腸内細菌の関与を検討するために MHCII 欠損マウスを無菌化して、この IFN-gamma 発現増加への影響を検討した。また、CD11c-Cre マウスと MHCII<sup>flx/flx</sup> マウスを交配し、CD4 欠損背景で樹状細胞特異的に MHCII を欠損させることで、IFN-gamma 発現上昇が MHCII 欠損マウスと同様に観察できるのか検討した。さらに、MHCII 欠損によって増加する IFN-gamma 産生細胞は CD8 T 細胞であり、この細胞群は MHCII を発現しないため、MHCII のリガンドである LAG-3 の関与が考えられた。そこで CRISPR/Cas9 法により CD4 と LAG-3 のダブルノックアウトマウスを作成し、MHCII 欠損マウスと同様のフェノタイプを示すかを検討した。

## 4. 研究成果

本研究課題では、まず網羅的遺伝子発現パターンの比較から明らかになった MHCII 欠損マウスに移入したメモリーCD8 T 細胞における IFN シグナルの亢進が、I 型と II 型、どちらの IFN によって誘導されるかを検討した。その結果 IFN-beta は野生型マウスと MHCII 欠損マウスの血漿において全く検出できなかったのに対し、IFN-gamma は MHCII 欠損マウスにおいて野生型よりも有意に上昇していた (図 1 A)。一方、メモリーCD8 T 細胞の数が維持される CD4 欠損マウスの血漿中の IFN-gamma の濃度は野生型マウスと同程度であった。このことから、IFN-gamma の増加は CD4 T 細胞欠損に依存しない MHCII 欠損によって誘導される現象であることが示された。MHCII 欠損マウスと野生型マウスにメモリーCD8 T 細胞を移入後、抗 IFN-gamma 中和抗体を定期的に投与したところ、この中和抗体投与により MHCII 欠損マウスのメモリーCD8 T 細胞の減少は阻害された (図 1 B)。さらに、メモリーCD8 T 細胞を移入した野生型マウスに週 3 回持続的に IFN-gamma を投与したところ、CD4 T 細胞が存在していても、メモリー T 細胞の数は対照群に比べ顕著に減少した。以上の結果から、MHCII 欠損によって上昇する IFN-gamma シグナルが持続的に働くことで、CD4 T 細胞非依存的にメモリーCD8 T 細胞の恒常性破綻を誘導することが明らかになった。また、IFN-gamma シグナル下流の主要な転写因子 STAT1 の機能獲得型変異である R274W を抗原特異的 CD8 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて導入し、メモリー期における細胞数を解析した結果、R274W を導入した CD8 T 細胞の数は対照群と比べて減少していた。このことから、IFN-gamma シグナルは他の細胞を介さず、直接的にメモリーCD8 T 細胞の恒常性を破綻させることが示された。

RNA-Seq 法による遺伝子発現パターンの解析では、MHCII 欠損マウスのメモリーCD8 T 細胞において、IFN シグナル関連分子の他に S 期から M 期に発現する細胞周期関連分子群の発現が上昇していた。このことから、MHCII 欠損による IFN-gamma シグナルの亢進がメモリーCD8 T 細胞に質的变化を誘導しエフェクター様細胞にしているのではないかと考えた。そこでまず細胞内代謝状態を調べ、MHCII 欠損によりメモリー T 細胞の代謝状態がメモリー様からエフェクター様にシフトしていないかを検討した。酸素消費速度を測定したところ、野生型マウスと MHCII 欠損マウスに移入した抗原特異的 CD8 T 細胞で差異はなかった。次にエフェクター様細胞で発現の高い T-bet と Blimp1、メモリー様細胞で発現の高い Tcf1、Bcl6 などの転写因子の発現を検討したところ、Tcf1 の発現だけが MHCII 欠損マウスに移入したメモリーCD8 T 細胞で野生型に移入した細胞に比べ減少傾向を示した。さらに Bcl-2 と Ki67 の発現は両群のメモリーCD8 T

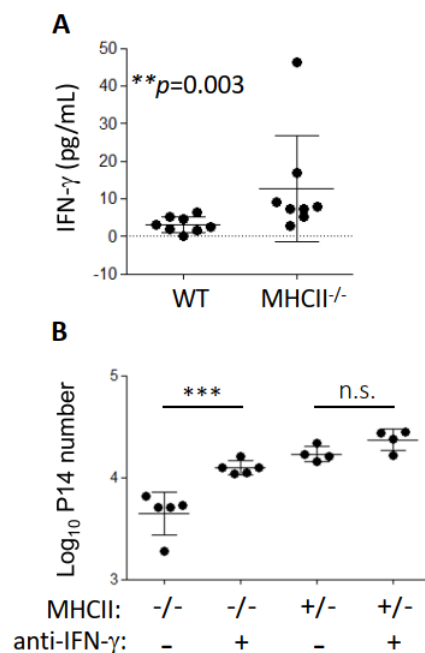


図 1: マウス血漿中の IFN- $\gamma$  の濃度 (A) と抗 IFN- $\gamma$  中和抗体投与による脾臓におけるメモリー T 細胞数への影響 (B) n.s.; not significant, \*\*\*,  $p < 0.001$

細胞で発現に差異はなかった。しかしながら IFN-gamma を持続的に投与した場合、メモリーCD8 T 細胞は対照群と比較し、Ki67 陽性細胞の増加が有意に認められた。これらのことから、MHCII 欠損マウスで増加する IFN-gamma シグナルは、IFN-gamma を持続的に野生型マウスに投与した場合よりも弱いと考えられた。野生型マウスと MHCII 欠損マウスに移入したメモリーCD8 T 細胞における細胞表面マーカー、CXCR3, CD27, CD127 の発現を比較したところ、これらの分子の発現は MHCII 欠損マウスにおいて野生型マウスに移入した場合よりも低下していた。以上の結果から、MHCII 欠損環境下ではメモリー様の特徴を一部失うことが示された。さらに CD127 と KLRG1 の発現で分類されるサブセットの細胞数の変化を評価したところ、KLRG1<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> のメモリーT 細胞は影響を受けず、KLRG1<sup>low</sup>CD127<sup>high</sup> および KLRG1<sup>high</sup>CD127<sup>high</sup> のメモリーT 細胞の数が MHCII 欠損マウスで野生型よりも有意に減少していた。このことから、IFN-gamma シグナルに対する感受性がサブセット間で異なることが示唆された。

一方、MHCII 欠損によって IFN-gamma 産生が亢進するメカニズムを解明するために、まず全身で IFN-gamma が上昇しているのか、臓器特異的に増加しているのかを mRNA レベルと蛋白レベルで検討した。その結果、大腸特異的に IFN-gamma の産生が亢進していた (図2)。次に MHCII 欠損背景の IFN-gamma レポーターマウスを解析し、MHCII 欠損により増加する IFN-gamma 産生細胞の同定を試みたところ、野生型マウスと比較して MHCII 欠損によって IFN-gamma 産生亢進している細胞集団は、大腸の CD8 T 細胞であることが明らかになった。この結果から MHCII 発現細胞による CD8 T 細胞の活性化抑制機構の存在が示唆された。CD4 欠損背景で樹状細胞特異的に MHCII を欠損するマウスを用いた解析により、MHCII 発現細胞による IFN-gamma 産生抑制は、樹状細胞以外の MHCII 発現細胞によっても誘導されることが示された。また無菌化した MHCII 欠損マウスの解析から、IFN-gamma の産生亢進は腸内細菌依存的に誘導されることが明らかになった。さらに CD8 T 細胞上の LAG-3 が MHCII による制御に関与する可能性を考え、LAG3 と CD4 のダブルノックアウトマウスを作成した。このダブルノックアウトマウス大腸の CD8 T 細胞における IFN-gamma mRNA 発現は CD4 ノックアウトマウスや野生型マウスの CD8 T 細胞よりも顕著に増加していることを確認した。現在、MHCII と LAG-3 の相互作用が大腸の CD8 T 細胞の IFN-gamma 発現の制御に必要なかを MHCII との結合が阻害される LAG-3-P111A 変異体 (Maruhashi T, *et al. Immunity* 2022) を用いて検討する予定である。

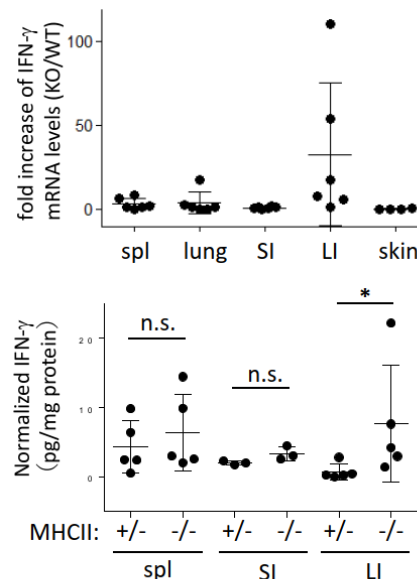


図2: 野生型およびMHCII欠損マウスの各種臓器におけるIFN-γ mRNAレベルと総蛋白量で標準化したIFN-γ蛋白レベル n.s.; not significant, \*; p < 0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀬戸口 留可
2. 発表標題 Single-cell RNA sequencing analysis reveals heterogeneity of memory CD8 T cells and unbiased impact of MHC class II-deficiency on memory CD8 T cell subpopulations
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ruka Setoguchi
2. 発表標題 Single-cell RNA sequencing analysis reveals heterogeneity of memory CD8 T cells and unbiased impact of MHC class II-deficiency on memory CD8 T cell subpopulations
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ruka Setoguchi
2. 発表標題 Chronic interferon- stimulation impairs memory CD8 T cell maintenance
3. 学会等名 学友会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ruka Setoguchi
2. 発表標題 Chronic IFN-gamma signals impair memory CD8 T cell maintenance
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬戸口 留可
2. 発表標題 持続的な IFN-gammaシグナルはメモリーCD8T細胞の恒常性破綻を誘導する
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬戸口 留可
2. 発表標題 Impaired maintenance of memory CD8 T cells in MHC class II-deficient mice is caused by inflammation but not CD4 T cell-deficiency
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀬戸口 留可
2. 発表標題 Chronic IFN-g stimulation impairs memoryCD8 T cell maintenance
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀬戸口 留可
2. 発表標題 持続的な IFN-gammaシグナルはメモリーCD8T細胞の恒常性破綻を誘導する
3. 学会等名 第28回東京免疫フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------