

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23838

研究課題名(和文)炎症の遷延化におけるCD69陽性組織常在性T細胞の役割

研究課題名(英文)The role of CD69 expression on memory CD4 T cells for the tissue residency after chronic airway inflammation

研究代表者

岩村 千秋 (Iwamura, Chiaki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：10513062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では白血球の活性化マーカーとして知られているCD69分子が機能分子として働き、組織常在性T細胞(TRM)の特性を規定するものであることを明らかにした。CD69欠損マウスやパラバイオシスを用いた実験から組織常在性Tの形成・維持にCD69が必要であり、それは組織に留まるための接着分子のようなものではないかと推察される。またCD69陽性TRMが組織から移出するためのS1p1シグナルへの感受性の低下も確認された。肺内でのCD69リガンドは現在のところ不明であり、さらなる解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症収束後に組織に滞在し続ける組織常在型T細胞は、局所への抗原侵入に対して第1線の反応部隊である。感染症やワクチン開発などを考えた場合はこの集団を如何に形成するかが感染防御の鍵になる。逆に自己免疫疾患やアレルギー疾患など慢性炎症反応では、病態が継続してしまう病因細胞となる為、如何にこれらの形成を抑制するかが治療において重要になってくる。本研究ではこうしたTRMの形成や維持について明らかにするものであり、現在難治性と考えられる疾患群について新たな病態解明と治療基盤構築のシーズを生み出すものである。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that the CD69 known as an activation marker regulates the generation and maintenance of tissue resident memory T cells (TRM) in the lung. In addition, CD69 positive TRM is inhibited to egress from the lung tissue with S1p1 signaling, because this cell population displays lower expression of S1p1 receptor. Based on the data that CD69+TRM does not move to blood stream, we hypothesized that CD69 might work as a binding molecule to tissue. But the ligand for CD69 in the lung tissue remains unknown. We need more analysis to examine the mechanisms to determine tissue residency of T cells.

研究分野：病理病態学、感染・免疫学およびその関連分野

キーワード：免疫記憶 慢性炎症 組織常在性記憶T細胞 CD69 アレルギー性気道炎症

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は「**なぜ炎症は慢性化し、そして組織が線維化するのか?**」という問いに答えるため、末梢で抗原提示刺激を受け活性化した後も局所に留まり続ける CD4T 細胞の組織常在性免疫記憶 T 細胞 (TRM) に着目した。炎症が起きた場に抗原が無くなった後も滞留し続けるというその特性により、TRM は炎症反応の継続から慢性化に至る過程に関わる鍵となる細胞集団ではないかと推察し着目している。近年研究代表者らは、CD69 分子が T 細胞の炎症局所への浸潤に必要であることを見出した (Hayashizaki et al., 2016, *Science Immunol.*)。本研究はさらに、**炎症反応が沈静化した末梢組織に TRM が滞留する機序と及ぼす影響について、TRM が保持する CD69 発現の意義を解析することから始め、最終目標として、頻発誘導された炎症が収束されず不可逆的に遷延化する機序に、TRM が CD69 を介してどのように寄与しているのかを明らかにすることを掲げる。**

炎症反応の急性期と慢性期では、局所に浸潤してくる細胞が異なっていると考えられている。アレルギー性気道炎症反応においてこれまでの多くの報告がなされてきたが、そのほとんどが急性期の解析であった。しかしながらヒトのアレルギー患者においては、それは長期間アレルギーに曝露されてきた慢性疾患であり、そのメカニズム解明には動物モデルも長期にわたって炎症が起き続けるものでなくてはならない。しかしながら、そうした研究というのはこれまでほとんどなされてこなかった。本研究では炎症が遷延するメカニズムの解明のため、ヒトの喘息患者の代表的なアレルギーである HDM をマウスに頻回投与し、慢性的な炎症を誘導した。また炎症の遷延化に TRM が関与しているのではないかという報告はほとんどなく、研究代表者らのこれまでの精力的な研究で明らかとなった CD69 分子の役割に対する解析はこれまで行われていない。さらに本研究では TRM の存在維持に CD69/My19 の作用が必要であるかを明らかにし、これらの分子に対する抗体投与により慢性炎症が抑制されるのか検討する。抗体投与による選択的な TRM の排除またはその機能阻害は、ステロイドで抑えきれない遷延化した炎症をより少ない副作用で食い止める次世代の抗体療法となりうるであろう。研究代表者らは、CD69 や My19 に対するヒト化抗体も企業との共同研究によりすでに確立しており、その動物モデルにおける効果もすでに実証している (特許第 6286757 号並びに Hayashizaki et al., 2016, *Science Immunol.*)。

2. 研究の目的

研究代表者は、侵襲抗原に晒される末端組織において、炎症反応が周辺支持組織に作用して、TRM のエフェクター機能を増幅させるような免疫活性化機構を有していると予想している。本研究では、そのメカニズムを説明する分子として、細胞外に放出された血小板由来分子である My19 に着目する。そして記憶 CD4T 細胞における CD69 が組織の My19 と結合することで組織常在性を規定し、炎症の遷延化に寄与するのか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. 慢性気道炎症による CD69 陽性 TRM の形成

アレルギー性鼻炎や喘息などの疾患は、ダニ抗原 (House dust mite; HDM) に反応して引き起こされる過敏症である。正常野生型マウスに HDM 溶液を週 2 回 5 週間投与することにより、喘息患者の生理的病態に類似した慢性気道炎症モデルマウスを作成することができる。CD69 欠損マウスに HDM による慢性気道炎症反応を誘導したところ、野生型マウスに比べて、肺の炎症の程度、気道過敏性、並びに慢性気道炎症の指標となる肺線維化の進行はすべて低下していることが分かっている (未発表データ)。この結果は CD69 の発現が慢性気道炎症の増悪に寄与することを示しているが、詳細な抑制メカニズムは明らかとなっていない。そこで、炎症誘導に関連する TRM の機能・役割に CD69 がどのように関与するか調べる。具体的には、①CD69 発現による TRM の機

能の違い、②CD69 による TRM の形成・維持への関与、③CD69 が TRM の組織常在性に関与するの
か検討を行う。

2. 慢性炎症反応における CD69 リガンドの役割

CD69 のリガンドである My19 は、炎症性細胞が肺の実質組織に留まる介助にも関与しているの
ではないかと考えている。そこで HDM 頻回投与により慢性炎症を誘導したマウスの肺において、
免疫染色により My19 の集積様式や量を調べる。そして多重蛍光免疫染色により、My19 と TRM の
相互作用が認められるか高解像度顕微鏡を用いて検討する。

3. CD69 陽性 TRM 細胞集積の場としての iBALT の解析

CD69 欠損マウスでは HDM の繰り返し投与による異所性肺リンパ組織 (iBALT) の形成が減弱し
ていたことから、その成立には CD69 分子の発現が必要であることが考えられる。さらに記憶 T
細胞は特に iBALT に集積していることが観察されており (Shinoda et al., 2012, *PNAS U.S.A.*)、
このことから肺における TRM の維持には iBALT の形成が必要なのではないかと考えている。そ
こで iBALT のリンパ管周囲に存在した T 細胞は TRM なのか、またリンパ管内外での CD69 リガ
ンドである My19 の発現についても解析する。さらに My19 産生細胞を同定し、その細胞の網羅的な
mRNA の発現を調べることで、それらの特徴的な分子を探索する。

4. TRM における CD69 依存的 S1P1 の検討

S1P は胸腺や二次リンパ器官から T 細胞の流出などリンパ球の循環に重要な役割を担って
いることが知られている。CD69 はそのレセプターである S1P1 と結合しており、その機能を阻害す
ることでリンパ球が血流に流出するのを防いでいる。しかしながら、炎症状況下や抹消組織にお
いて、同様のメカニズムで T 細胞が局所にとどまっているかはまだ明らかになっていない。研究
代表者は CD69 陽性と陰性の TRM における S1P1 やその関連分子の遺伝子発現の検討を行い、組
織常在性における S1P1 の必要性について明らかにする。また S1P1 レセプターのコンディショナ
ルノックアウトマウスを作成し、HDM 連続投与による肺での TRM の形成について検討を行う。

4. 研究成果

1. 慢性気道炎症による CD69 陽性 TRM の形成

(1-1) アレルギー性気道炎症反応では病原性の CD69 陽性 TRM が誘導される。

野生型マウスに HDM を経鼻的に 5 週間 (週 1-3
回) 投与すると、組織線維化を伴った慢性気道炎症
反応を誘導する事ができる。そして処置期間と同
じだけ何も処置を行わない期間 (Resting) を設け、
肺組織中に組織常在性 TRM を誘導した。組織に存
在する免疫細胞は経静脈的に抗 CD45 抗体を投与
し、それに染まらなかったものとして確認する事
ができる (iv-集団)。これに対し、血液中に存在す
るものは iv+集団として扱う。肺の iv-集団の中
には CD69 陽性の CD4T 細胞集団がダニ曝露前から
わずかに存在しており、曝露後にはその数が顕著
に増加していた (図 1A)。これに対し、血液中の CD4T
細胞には CD69 陽性細胞は存在していなかった。ま
た CD69 陽性 TRM のサイトカイン産生能を調べる
ために、卵白アルブミン (OVA) 特異的 Th2 細胞を *in vitro* で作成し、それを野生型マウスに移入
した。そして OVA を経鼻投与することで気道炎症反応を誘導し、移入 30 日後に肺から CD69 陽

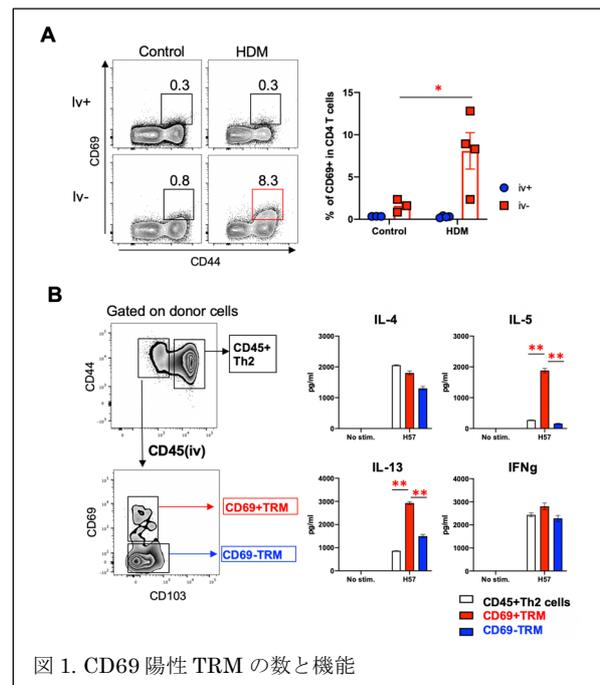
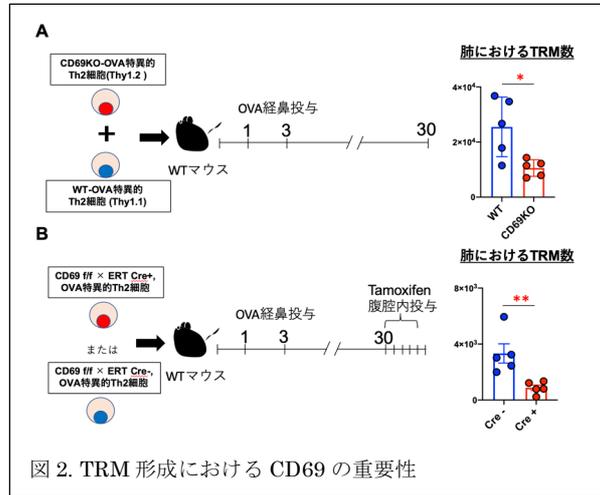


図 1. CD69 陽性 TRM の数と機能

性または陰性の TRM、ならびに血中の Th2 細胞をセルソータにより回収した。そして *in vitro* においてその細胞集団を anti-TCR β antibody (H57) で刺激して、培養上清中のサイトカインを Cytometric beads array 法により測定した(図 1B)。その結果、CD69 陽性の TRM は他の細胞集団よりも好酸球の活性化に重要な IL-5 や気道収縮を誘導する IL-13 の産生が顕著に増加している事がわかった。このことは CD69 陽性 TRM がアレルギー性気道炎症反応の病因細胞となりうることを示唆している。

(1-2) TRM の形成には CD69 の発現が必要である。

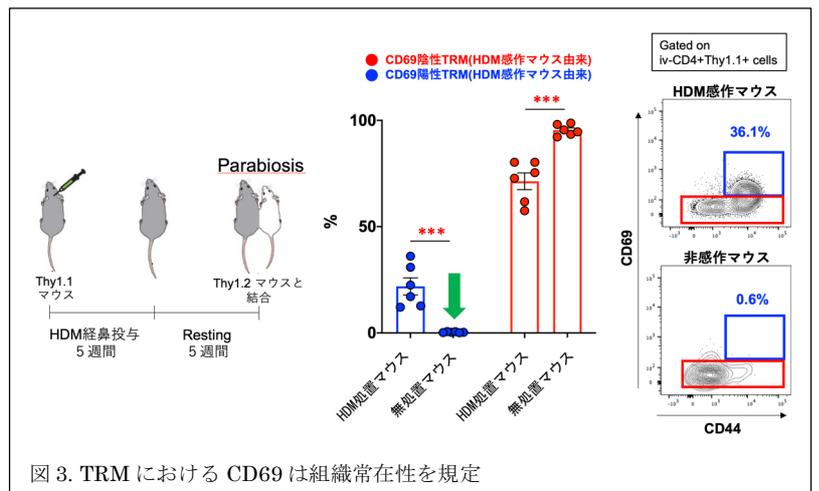
CD69 分子が TRM の形成に必要なかどうかを検証するため、野生型または CD69 ノックアウト (KO) マウスより CD4T 細胞を調整し、*in vitro* で Th2 細胞へと分化させた。そしてそれぞれを同数混ぜ合わせて、野生型マウスに移入し、OVA を経鼻投与することでアレルギー性気道炎症反応を誘導させた。移入から 30 日後にレシピエントマウスの肺を回収し、野生型もしくは CD69KO TRM の数を検討した。その結果、CD69KO TRM は野生型 TRM よりも有意に減少していたことから、CD69 の発現は TRM の形成に重要である事が明らかとなった(図 2A)。



次に CD69 分子は組織に留まるための接着分子として機能しているのではないかと予想し、そのことを検証するために CD69 flox-ERT Cre マウスから *in vitro* で作成した Th2 細胞を野生型マウスに移入した。OVA を経鼻投与したのち移入から 30 日後に CD69 を欠失させるため、タモキシフェンを各マウスに投与した。野生型 Th2 細胞 (CD69-floxed) を移入した群と比較すると、CD69flox-ERT Cre マウス由来の Th2 細胞を移入した群では TRM の有意な減少が確認された(図 2B)。したがって、TRM 形成後も CD69 は組織常在性維持のために必要である可能性が示唆された。

(1-3) TRM の CD69 は組織常在性を規定する。

CD69 陽性 TRM が組織から移動するのかが検討するために、パラバイオシス (平体結合) の実験を行った。これは異なった個体を皮下レベルで手術的に縫合することで、両個体の循環体液を混合させ、免疫細胞の個体間の移動を可能にする。ダニ抗原の反復曝露により肺内に CD69 陽性 TRM を誘導し、5 週間の resting 期間を設けた後に非感作マウスと感作マウスを結合した。その 2 週間後に各個体の肺内にお



ける CD69 陽性または陰性の TRM の局在を調べた。感作マウスで形成された CD69 陰性の TRM は非感作マウスに移動しているのに対し、CD69 陽性細胞は感作マウスの肺からの移出は観察されなかった(図 3)。このことから TRM に発現する CD69 がその組織常在性をもたらすと考えられた。

2. 慢性炎症反応における CD69 リガンドの役割

CD69 陽性の TRM 細胞が炎症組織に留まるために、研究代表者らのグループが CD69 のリガンド

として同定した My19 がそれに関与しているのではないかと考えた。そこで HDM のマウスへの長期曝露により肺に炎症を起こしたときの、炎症局所、特に iBALT での My19 の発現を組織免疫染色法により検討を行った。その結果、My19 は炎症を誘導した肺の血管内皮細胞での発現は強く認められたものの、iBALT など肺の実質においては殆ど観察されなかった。したがって、CD69 陽性の TRM が組織常在性を維持するにあたって、My19 が関与しない可能性が示唆された。元々 My19 は骨髄の細胞溶解液を用いたプルダウンアッセイと Mass-spec 解析により CD69 のリガンドとして同定されている。今後は炎症肺で同様の実験を行い、別の CD69 リガンドを同定する事で、CD69 陽性 TRM が組織に定着するメカニズムについて検証したい。

3. CD69 陽性 TRM 細胞集積の場としての iBALT の解析

CD69 陽性の TRM は組織に常在することを特徴しているが、実際肺においてはそのどの箇所に留まっているかは明らかになっていない。そこでその局在を明らかにするべく、炎症肺での CD69 陽性 T 細胞を組織免疫染色法により検証した(図 4)。その結果、これらの細胞は主に iBALT 内で多く認められており、その他の肺実質には殆ど観察されなかった。このことから、CD69 陽性 T 細胞は iBALT 内にある何らかの分子と結合していると予想している。今後は CD69 陽性細胞が TRM へと分化するにあたって、どのような機能分子が必要であるか明らかにする。

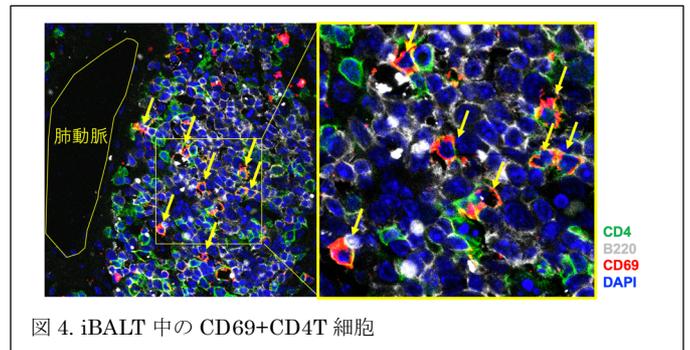


図 4. iBALT 中の CD69+CD4T 細胞

4. TRM における CD69 依存的 S1P1 の検討

野生型マウスにダニ抗原を長期曝露して、CD69 陽性 TRM を作成した。そして TRM の CD69 陰性と陽性の集団をそれぞれセルソーターにより回収し、RNA-sequence 解析によりそれぞれの特徴的な遺伝子発現を調べた。その結果、CD69 陽性 TRM で S1p1r と、その発現調節をする事が知られている Klf3 の顕著な発現低下が認められた(図 5A)。また *in vitro* で作成した Th2 細胞を野生型マウスに移入して OVA の経鼻投与により、肺内で作成した TRM を用いた同様の実験を行った。S1p1r と Klf3 の mRNA の発現を qPCR で確認したところ、同様の結果が得られた(図 5B)。以上の結果から、CD69 陽性 TRM 細胞では S1P1 シグナルを受け取って、血流に乗る作用が著しく抑制される事が推察された。この結果は CD69 陽性 TRM が組織常在性を得る上で、重要なメカニズムであると考えられる。今後は Klf3 または S1p1r の過剰発現が S1P1 シグナルの誘導を CD69 陽性 TRM に促し、TRM が組織外に移出することでの形成を阻害するか検討を行う。

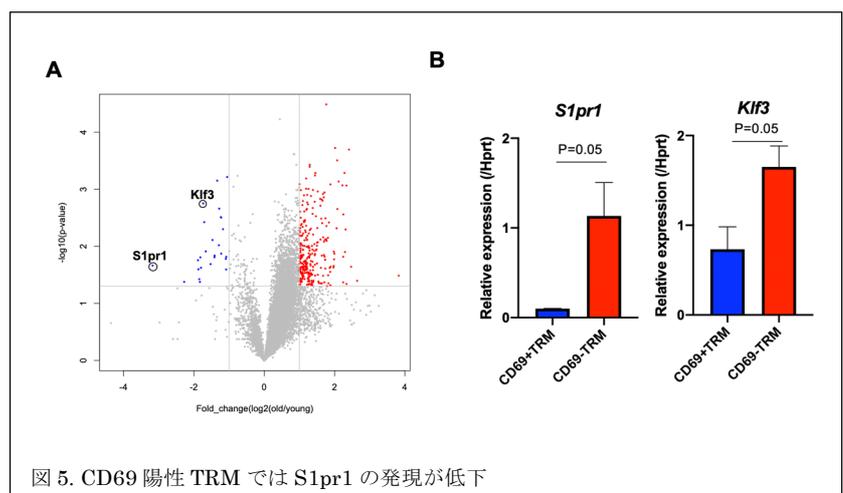


図 5. CD69 陽性 TRM では S1p1r の発現が低下

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Akane S., Yagi Ryoji, Kimura Motoko Y., Iwamura Chiaki, Shinoda Kenta, Onodera Atsushi, Hirahara Kiyoshi, Tumes Damon J., Koyama-Nasu Ryo, Iismaa Siiri E., Graham Robert M., Motohashi Shinichiro, Nakayama Toshinori	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential Role for CD30-Transglutaminase 2 Axis in Memory Th1 and Th17 Cell Generation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.01536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 岩村千秋、中山俊憲	4. 巻 39(2)
2. 論文標題 病原性記憶T細胞による慢性炎症の制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本小児皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学HP https://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/jisseki/index.html

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
---------	---------