

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 20 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：26460576

研究課題名(和文) 正の選択を介して決定されるT細胞の生体防御機能

研究課題名(英文) Positive selection dictates T cell-mediated body defense

研究代表者

高田 健介 (Takada, Kensuke)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：40570073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：正の選択は、胸腺細胞が発現する抗原受容体と胸腺皮質上皮細胞上の自己ペプチド-MHC複合体との親和性に基づいて、生体に有用な幼若T細胞を選別し、T細胞レパトアを決定する機構として知られてきた。しかし最近、胸腺皮質上皮細胞における自己ペプチドの産生を担い、正の選択に中心的な役割を果たす胸腺プロテアソームが発見されたことで、正の選択の意義を再考する機会が生じた。本研究は、胸腺プロテアソーム欠損マウスの胸腺で分化したモノクローナルT細胞の機能解析を通じ、正の選択がT細胞のレパトアのみならず、抗原応答性や記憶形成に影響を及ぼすことを見出した。これによりT細胞分化における正の選択の新たな役割が解明された。

研究成果の概要(英文)：Positive selection is recognized as a process to determine the T cell repertoire, since it selects potentially useful immature T cells based on the affinity between antigen receptors expressed on thymocytes and self-peptide-MHC complexes on cortical thymic epithelial cells. However, the recent finding of the thymoproteasome, which produces self-peptides in cortical thymic epithelial cells and plays a central role in positive selection, provided us an opportunity to revisit the physiological role of positive selection. In the present study, we analyzed the function of monoclonal T cells that have developed in the thymus of thymoproteasome-deficient mice and found that positive selection affects not only T cell repertoire but also antigen responsiveness and memory formation. Our finding unveiled a novel role of positive selection in T cell development.

研究分野：免疫 生体防御

キーワード：獲得免疫 胸腺 T細胞 正の選択

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫系が病原体を始めとした非自己成分に特異的に反応する能力は、その主役であるリンパ球が、分化過程において自己成分と相互作用することにより形成される。胸腺において、幼若 T 細胞は自身が発現する抗原受容体 (TCR) と、抗原提示細胞上の自己ペプチド-MHC 複合体との相互作用を通じ、分化成熟する。正の選択は、胸腺皮質上皮細胞上の自己ペプチド-MHC 複合体に対して弱い親和性をもつ幼若 T 細胞が生存に必要な TCR シグナルを供与される過程であり、抗原認識特異性レパトアを決定すると理解されている。一方、正の選択を誘導する TCR シグナルが T 細胞の機能に及ぼす影響は明らかにされていない。

プロテアソームは MHC クラス I に提示されるペプチドの産生を担うプロテアーゼ複合体である。最近、胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現される胸腺プロテアソームが新たに発見された (Murata ら、2007 Science)。胸腺プロテアソームは正の選択を司る胸腺皮質上皮細胞に特異的に発現され、従来型のプロテアソームとは異なる基質特異性を示す。胸腺プロテアソーム欠損マウスでは、正の選択の異常により CD8⁺ T 細胞数の減少と、TCR レパトアの変容が認められる (Murata ら、2007 Science; Nitta ら、2010 Immunity; Xing ら、2013 PNAS)。これらの知見から、胸腺プロテアソーム依存的に産生される、胸腺皮質上皮細胞特有の自己ペプチドが、正の選択を介した T 細胞のレパトア形成に重要と考えられている。

2. 研究の目的

胸腺プロテアソームの欠損によって T 細胞のレパトアが変容することは既に報告されており、正の選択が抗原認識特異性を決定するという従来のモデルに合致する。本研究は、胸腺プロテアソームの発見による当該領域の進展を背景として、正の選択を誘導する微弱な TCR シグナルが個々の T 細胞の機能に及ぼす影響を検討し、正の選択を介した新たな T 細胞機能制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

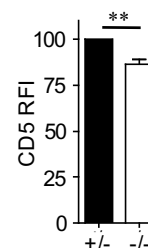
正の選択が TCR レパトアに与える影響を排除して、機能への影響を検討するため、胸腺プロテアソーム欠損下で分化したモノクローナル CD8⁺ T 細胞の機能的解析を行った。Rag1 欠損 OT-I トランスジェニック (Tg) マウスの骨髄細胞を放射線照射した正常マウスおよび胸腺プロテアソーム欠損マウスに移入することで骨髄キメラを作成し、胸腺プロテアソーム存在下および非存在下で OT-I T 細胞を分化させた。胸腺中の各分化ステージにおける CD5 の発現レベルをもとに、胸腺プロテアソーム存在下および非存在下における正の選択シグナルの強度を比較した。また、

二次リンパ組織から得られたナイーブ OT-I T 細胞に対し、*in vitro* で TCR 刺激を与え、活性化マーカーの発現上昇と TCR シグナル分子の活性化をもとに抗原応答性を検討した。さらに、正の選択シグナルの強度が成熟 T 細胞の抗原応答性に影響するかを直接的に検討するため、内因性ペプチドを提示できない遺伝子変異を有する OT-I Tg マウスの胎仔胸腺を、OT-I TCR に対して異なる親和性を持つ複数のペプチドの存在下で組織培養し、得られた成熟胸腺細胞の応答性を検討した。また、正の選択が T 細胞の生体内応答および生体防御に与える影響を検討するため、キメラマウス由来のナイーブ OT-I T 細胞をレシピエントマウスに養子移入し、*in vivo* で活性化させたのち、ドナー OT-I T 細胞の数と表現型、二次刺激に対する増殖応答を検討した。

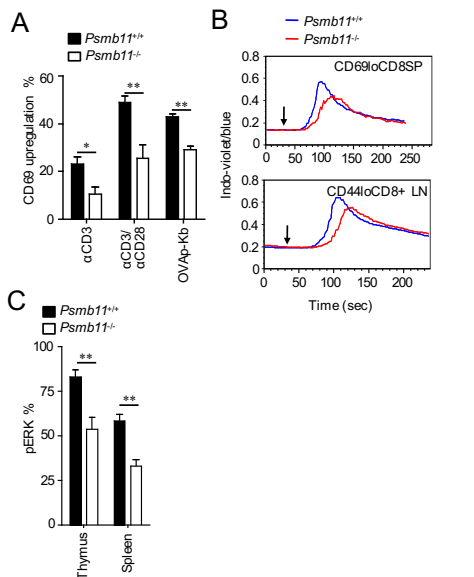
4. 研究成果

未熟胸腺細胞が正の選択を受けると、CD69 の発現がまず上昇し、次いでケモカイン受容体 CCR7 が発現されることで、胸腺皮質から髄質への移動が開始される。すなわち、CD69⁺CCR7⁺ 胸腺細胞は胸腺皮質において正の選択を受けた直後の細胞に相当する。OT-I TCR を発現する CD69⁺CCR7⁺ 胸腺細胞では、数的に異常は見られないものの、TCR シグナル強度の指標となる CD5 の発現が有意に低下していた (図 1)。このことから、胸腺プロテアソーム欠損下では、より低レベルの TCR シグナルによって正の選択が誘導されていることが示唆された。

【図 1】正の選択を受けた直後の CD69⁺CCR7⁺ 胸腺細胞における CD5 の発現を胸腺プロテアソーム存在下および非存在下の OT-I 胸腺細胞で比較した。**P<0.01

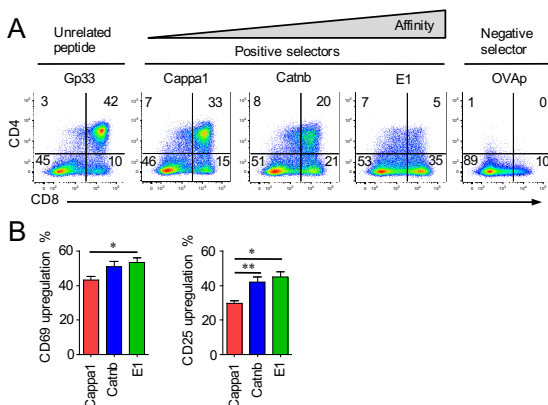


ナイーブ OT-I T 細胞をキメラマウスの二次リンパ組織から分離し、*in vitro* で TCR 刺激を加えたところ、胸腺プロテアソーム欠損下で分化した OT-I T 細胞では、活性化の指標である CD69 や CD25 の発現上昇に障害が認められた (図 2 A)。同様の応答異常は P14 TCR (リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス特異 TCR) や F5 TCR (インフルエンザウイルス特異的 TCR) など、他の TCR を発現する CD8⁺ T 細胞でも認められた。さらに、TCR 刺激後のカルシウム流入や ERK のリン酸化にも障害が認められた (図 2 B, C)。これらの結果から、胸腺プロテアソーム依存的な正の選択は成熟 CD8⁺ T 細胞の抗原応答性を至適化することが示された。



【図2】胸腺プロテアソーム存在下(*Psmb11*^{+/+})および非存在下(*Psmb11*^{-/-})で分化したナイーブ OT-I T 細胞に対して *in vitro* で TCR 刺激を加えた。(A)活性化マーカー-CD69 の発現上昇。(B)Ca₂ⁱ の流入。(C)ERK のリン酸化。**P*<0.05; ***P*<0.01

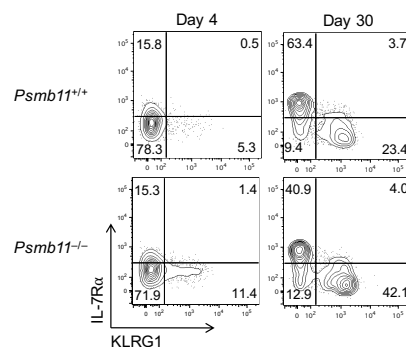
正の選択を引き起こすリガンドと TCR の親和性が T 細胞の機能に影響するかについて、胸腺プロテアソームの有無とは別に、より直接的な方法で検討を行った。OT-I TCR 発現胸腺細胞に正の選択を誘導するペプチドについてはこれまで数多くの報告があり、それらのペプチドと OT-I TCR との親和性も明らかにされている。そこで、内因性ペプチドを提示できない *Tap1* 欠損 OT-I TCR トランスジェニックマウスの胎仔胸腺を、OT-I TCR との親和性が異なるペプチドの存在下で培養し、そこから分化した成熟 T 細胞の TCR 刺激に対する応答を解析した。その結果、正の選択を誘導するペプチドの TCR 親和性と、CD8⁺ T 細胞の抗原応答性が相関することが確認された(図3)。



【図3】*Tap1*^{-/-} OT-I Tg マウスの胎仔胸腺を、OT-I TCR に対して異なる親和性を持ったペプチドの存在下で培養した。(A)親和性の異なるペプチドによる正の選択の誘導。(B)親和性の異なるペプチドで正の選択を誘導後、TCR 刺激を加え、活性化マーカーの発現を検討した。**P*<0.05; ***P*<0.01

さらに、正の選択を介した T 細胞の機能的教育がどのように生体防御に寄与するかを

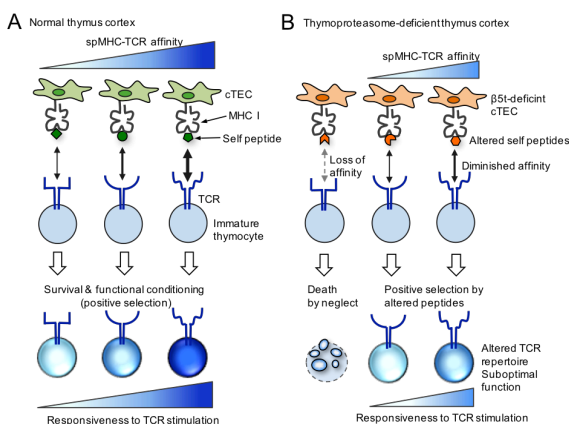
明らかにする目的で、*in vivo* での実験を行った。正常ナイーブ OT-I 細胞および胸腺プロテアソーム欠損下で正の選択を受けたナイーブ OT-I 細胞を Ly5.1 マウスに移入し、その後、レシピエントマウスに対し、OVAp でパルスした骨髄由来樹状細胞および CpG アジュバントを投与することにより、ドナー OT-I 細胞を *in vivo* で活性化させた。レシピエントマウスの脾臓中に含まれるドナー細胞の数を経時的に解析したところ、どちらの群でも免疫後 5 日目にかけての急激な細胞数の増加と、その後の細胞数の減少が同程度に認められ、いずれのタイムポイントにおいても統計的に有意な違いは見られなかった。T 細胞は活性化によって急激に増殖しエフェクター細胞となるが、その後 90%以上が死滅し、ごく一部の細胞が長期生存の記憶細胞へと分化する。エフェクター T 細胞には、将来的に死にゆく運命にある短命エフェクター細胞 (short-lived effector cells, SLEC) および記憶細胞への分化ポテンシャルを持つ記憶前駆細胞 (memory precursor effector cells, MPEC) が含まれ、それらは KLRG1 と IL-7R α の発現により、それぞれ KLRG1⁺IL-7R α ⁻ および KLRG1⁻IL-7R α ⁺ の表現型に分けられる。レシピエントマウス免疫後の各タイムポイントにおける T 細胞の表現型を解析したところ、免疫後 4 日目および 30 日目において、胸腺プロテアソーム非依存的に分化した OT-I 細胞では対照群に比べ、SLEC の頻度が高い傾向が見られた(図4)。また、胸腺プロテアソーム欠損下で分化した OT-I 細胞では、二次刺激に対する増殖応答が顕著に障害されているという予備的データが得られており、正の選択による T 細胞の機能的教育は、記憶形成を含めた T 細胞の生体内応答を規定する可能性が考えられた。



【図4】胸腺プロテアソーム存在下および非存在下で分化したナイーブ OT-I T 細胞をレシピエントマウスに養子移入し、*in vivo* で抗原刺激を加えた。抗原刺激後 4 日目および 30 日目におけるドナー OT-I 細胞の IL-7R α と KLRG1 の発現。

本研究から、胸腺プロテアソーム依存的な正の選択が、TCR と自己ペプチドの親和性に従って、個々の CD8⁺ T 細胞の抗原応答性を分化段階で規定する機構が明らかにされた(図5)(Takada ら、*Nature Immunol* 2015; Takada ら、*J Immunol* 2017)。一方で、正の選択を介した T 細胞の機能的教育が、生体内免疫応

答にどのように寄与するかについては未だ検討中である。現時点で、エフェクター細胞の分化および記憶機能への影響を強く示唆する予備的知見が得られており、今後、生体防御への寄与について集中的に検討を重ねる必要がある。



【図5】本研究から明らかとなった正の選択による T 細胞の機能的教育。正常胸腺(A)と胸腺プロテアソーム欠損胸腺(B)では、胸腺皮質上皮細胞(cTEC)により提示される自己ペプチドレパトアが異なるため、正の選択を誘導する TCR シグナルの強度に違いが生じる。その結果、選択される T 細胞のレパトアのみならず、抗原応答性が影響を受ける。抗原応答性は正の選択シグナルの強度に相関する。

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 10 件)

- 1) Takada K, Kondo K, Takahama Y. Generation of peptides that promote positive selection in the thymus. *Journal of Immunology* 198: 2215-2222 (2017) 査読有 DOI:10.4049/jimmunol.1601862.
- 2) 高田健介、高浜洋介「胸腺プロテアソーム依存的な正の選択は CD8+T 細胞の抗原応答性を至適化する」*実験医学* 34: 446-449 (2016) 査読無 ISBN: 978-4-7581-0148-6
- 3) 高田健介、高浜洋介「胸腺プロテアソームを介した CD8+ T 細胞の正の選択」*臨床免疫・アレルギー科* 65: 506-512 (2016) 査読無 ISSN:1881-1930
- 4) Takada K, Van Laethem F, Xing Y, Akane K, Suzuki H, Murata S, Tanaka K, Jameson SC, Singer A, Takahama Y. TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8+ T cells. *Nature Immunology* 16: 1069-1076 (2015) 査読有 DOI: 10.1038/ni.3237.
- 5) Sasaki K, Takada K, Ohte Y, Kondo H, Sorimachi H, Tanaka K, Takahama Y, Murata S. Thymoproteasomes produce unique peptide motifs for positive selection of CD8+ T cells. *Nature Communications* 6: 7484 (2015) 査読有 10.1038/ncomms8484.
- 6) 高田健介、高浜洋介「T 細胞のレパトア形

成における胸腺皮質上皮の役割」*臨床免疫・アレルギー科* 63: 507-513 (2015) 査読無 ISSN:1881-1930

7) 高田健介、高浜洋介「T 細胞分化のチェックポイント」*炎症と免疫* 12: 3-9 (2015) 査読無 ISBN:978-4-86550-047-9

8) Takada K, Takahama Y. Positive-selection-inducing

self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells. *Advances in Immunology* 125: 87-110 (2015) 査読有 DOI: 10.1016/bs.ai.2014.09.003.

9) Togoo K, Takahama Y, Takada K. Alpha-smooth muscle actin expression identifies subpopulations of lymph node non-hematopoietic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 449: 241-247 (2014) DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.05.023.

10) Takada K, Ohigashi I, Kasai M, Nakase H, Takahama Y. Development and function of cortical thymic epithelial cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 373: 1-17 (2014) DOI: 10.1007/82_2013_322.

〔学会発表〕(計 9 件)

1) 高田健介、高浜洋介「次世代シーケンサを用いた胸腺プロテアソーム欠損マウス CD8T 細胞のレパトア解析」第 26 回 Kyoto T Cell Conference 2016. 5. 20 比叡山延暦寺会館 (滋賀県大津市)

2) Takada K, Takahama Y. Thymoproteasome-dependent positive selection of CD8 T cells. *Immunology 2016 American Association of Immunologists Annual Meeting* 2016. 5. 16 Seattle (USA)

3) Takada K, Takahama Y. TCR sffinity f or thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8 T cells. 第44回 日本免疫学会学術集会 2015. 11. 19札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

4) 高田健介、高浜洋介「胸腺皮質上皮細胞を介した正の選択はT細胞の抗原応答性を規定する」第25回 Kyoto T Cell Conference 2015. 5. 16 京都大学 (京都府京都市)

5) Takada K, Takahama Y. Thymoproteasome-dependent positive selection conditions antigen responsiveness of CD8 T cells. 第43回 日本免疫学会学術集会 2014. 12. 11 国立京都国際会館 (京都府京都市)

6) Takada K, Takahama Y. Thymoproteasome-dependent MHC class I-associated peptide motifs contribute to positive selection of CD8 T cells. The 24th Hot spring Harbor International Symposium 2014. 11. 7 九州大学 (福岡県福岡市)

7) 高田健介、高浜洋介「正の選択を介して決定される CD8T 細胞の抗原応答性」第 157 回 日本獣医学会学術集会 2014. 9. 10 北海

道大学（北海道札幌市）

8) 高田健介、Le Ngoc Nhi、佐々木克博、村田茂穂、高浜洋介「胸腺プロテアソーム依存的に産生される自己ペプチドの正の選択における特性」第24回 Kyoto T Cell Conference 2014. 5. 16 京都平安ホテル(京都府京都市)

9) Takada K, Takahama Y. Positive selection conditions antigen responsiveness of CD8 T cells. The 7th ThymOZ International Conference 2014. 4. 4 Gladstone (Australia)

()

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 健介 (Kensuke Takada)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：40570073

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

高浜 洋介 (Yousuke Takahama)
徳島大学・先端酵素学研究所・教授
研究者番号：20183858

(4) 研究協力者