

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32203
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2017～2020
課題番号：17H03565
研究課題名(和文) MAIT細胞による細菌感染制御機構の解析

研究課題名(英文) MAIT cells in bacterial infection

研究代表者

杉本 智恵 (Sugimoto, Chie)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60469955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫型T細胞である粘膜関連インバリアントT細胞(MAIT細胞)はさまざまな細菌あるいは真菌が持つビタミンB2代謝経路における代謝中間体を認識し、活性化することから細菌感染の制御に関連すると考えられている。MAIT細胞はヒトの血液、粘膜組織などに多く存在するが、マウスの組織にはごくわずかにしか存在せず、MAIT細胞の機能解析のための汎用モデル動物がなかった。本研究ではマウスMAIT細胞からiPS細胞を樹立し、新規MAIT細胞解析マウスモデルを構築し、MAIT細胞の細菌感染制御メカニズムを解析することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MAIT細胞は細菌感染だけでなく、がん・代謝性疾患・自己免疫性疾患など多くのヒト疾患の病態に関与することが世界各地の研究者から報告されている。特にMAIT細胞はヒトのT細胞の数パーセント、組織によっては数10パーセントを締める細胞であるがその機能の全容は明らかにされていない。さらに、基礎免疫学における汎用動物モデルであるマウスにはMAIT細胞がごくわずかにしか存在しない。本研究で構築した新規マウスモデルはMAIT細胞が関与する数々の疾患に対する動物モデルの作製に役立ち、それらの疾患の病態解明と新規治療法の確率に貢献できる技術である。

研究成果の概要(英文)：Mucosal associated invariant T (MAIT) cell is a novel innate like T cell which play a role in bacterial infection. 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. We have established induced pluripotent stem cells derived from mouse MAIT cells in lungs (MAIT-iPSCs) and redifferentiated MAIT cells (m-reMAIT cells). m-reMAIT cells were activated by a vitamin B2 metabolite and bacterial bodies and released various cytokines and chemokines. Further, we have created novel mouse models: m-reMAIT cell adoptive transfer model and MAIT mice established through the intermediary chimeric mice derived from MAIT-iPSCs. V 19 mice, one of strains of MAIT mice, possessed thousands of times more MAIT cells than wild-type mice, and protected early growth of *Mycobacterium bovis* BCG in liver.

研究分野：感染免疫

キーワード：自然免疫型T細胞 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

微生物に対する宿主免疫応答は自然免疫系細胞による微生物由来分子の認識と活性化、それに続く抗原提示から始まり、より特異性の高い獲得免疫誘導へと移行する。このような感染に対する宿主免疫系の中でも自然免疫系は我々が無数に微生物の存在する環境下でも通常は病気を起こさないために重要であると考えられる。さまざまな自然免疫系細胞が存在する中で、MAIT細胞 (Mucosal Associated Invariant T cells: 粘膜関連インバリアント T 細胞) は細菌感染制御活性を持つ自然免疫型 T 細胞として注目されている。MAIT 細胞は以下のような特徴的な性質を持つ。①ヒトの末梢血、腸管、肝臓、肺にきわめて豊富に存在する。②通常型 T 細胞とは異なり、決められた T 細胞受容体 (インバリアント TCR) を持つ。③生体内での MAIT 細胞の発生と分化に腸内細菌が必須である。④MHC class I 類似の MR1 に抗原提示された細菌・真菌が産生するビタミン代謝物を認識する。⑤日和見感染の原因になる微生物 (Mycobacteria, Candida, Salmonella など) の感染に応答する。我々は MAIT 細胞の感染防御、粘膜免疫の恒常性維持における機能を解明し、自然免疫系による感染制御の重要性を総合的に理解することを目指した。また、MAIT 細胞は生体外で増殖させることが困難であること、実験用マウスでは MAIT 細胞は非常にわずかで検出が困難であることから汎用実験動物モデルがないこと、が研究進展を妨げる一因であったことから新規動物モデルの確立が必要であった。

2. 研究の目的

我々がこれまでに報告した MAIT 細胞由来 iPS 細胞とそこから MAIT 細胞を再分化誘導する技術をマウスに応用し、MAIT 細胞の細菌感染制御メカニズムを解明することを目的とした。その目的を達成するため、以下の研究項目を行った。

- (1) マウス MAIT-iPS 細胞を用いて新規 MAIT 細胞研究用マウスモデルの構築
- (2) 細菌由来抗原による MAIT 細胞の活性化機構の解析
- (3) マウス MAIT-iPS 細胞由来マウスを用いた細菌感染モデルの構築

3. 研究の方法

(1) マウス MAIT 細胞の初期化

C57BL/6 マウスおよびそのコンジュニック系統である C57BL/6-Ly5.1 マウスの肺から MAIT 細胞をセルソーティングによって分離し、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で導入した。遺伝子導入された MAIT 細胞をマウス胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) に播種し、iPS 細胞を作出した。得られた iPS 細胞クローンのゲノム DNA を簡易アルカリ法で抽出し、再構成済み TCR (V α 19-J α 33) を検出できるプライマーペアを用いて PCR を行ない、樹立された iPS 細胞が MAIT 細胞由来であるかの判断をした。

(2) マウス MAIT 細胞由来 iPS 細胞 (MAIT-iPSC) からの MAIT 細胞の再分化誘導

ES/iPS 細胞からの T 細胞分化誘導系として確立されている OP9/OP9DL 細胞システムを利用して、MAIT-iPSC から再分化 MAIT 細胞 (m-reMAIT 細胞) を分化誘導した。あらかじめ 10cm ディッシュにコンフルエントになった OP9/DLL1 上に 1.2×10^5 MAIT-iPSC 細胞を播種した。5 日目に細胞をトリプシンで剥がし、新たな OP9/DLL1 上に FLT3-L を添加して播種する。さらに 3 日後 (8 日目) に OP9/DLL1 に付着する細胞を回収し、新たな OP9/DLL1 上に FLT3-L、IL-7 を添加して播種する。以降、細胞増殖を確認しながら FLT3-L/IL-7 加培地で培養する。

(3) m-reMAIT 細胞の細菌由来抗原による活性化

m-reMAIT 細胞を抗原提示細胞 (WT3, WT3m, CH27, CH27m, THP-1) の存在下/非存在化で細菌由来ビタミン B2 代謝中間体の誘導体である 5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylaminouracil (5-OP-RU) とともに 37°C、5% CO₂ で 18 時間培養した。m-reMAIT 細胞における CD69 と CD25 の発現をフローサイトメトリーによって、培養上清中のサイトカイン・ケモカインをマルチプレックスイムノアッセイによって解析した。また細菌での活性化を検討するため、*Escherichia coli* DH5 α 、*Mycobacterium bovis* BCG ワクチン株を用いて同様の解析を行った。

(4) reMAIT 細胞移植モデルの確立

m-reMAIT 細胞をコンジュニックマウスに腹腔内接種した。接種後 7 日目、14 日目に各免疫組織を採取して、移植した m-reMAIT 細胞と内在性 MAIT 細胞をフローサイトメトリーで解析することにより、それぞれの MAIT 細胞の特徴を比較した。

(5) マウス MAIT-iPS 細胞から MAIT マウスの樹立

MAIT-iPS 細胞を BALB/c マウス胚盤胞に注入し、キメラマウスを作製した。得られたキメラマウスと C57BL/6 マウスとを交配し、産仔の毛色から iPS 細胞が生殖系列へ移行したキメラマウスを選別した。このキメラマウスと C57BL/6 を交配することにより、MAIT 細胞由来の遺伝

子再構成済み TCR V α 19-J α 33 を持つマウス (V α 19 マウス)、遺伝子再構成済み TCR V β 8 を持つマウス (V β 8) マウスを樹立した。

(6) MAIT マウスを用いた細菌感染モデルの構築

V α 19 マウスと C57BL/6 に *Mycobacterium bovis* BCG ワクチン株を 1×10^7 cfu 静脈内接種し、感染後 10 日および 20 日の脾臓、肺、肝臓における細菌増殖をコロニー形成能で評価した。

4. 研究成果

(1) マウス MAIT-iPSC の樹立

MAIT 細胞はヒトには血液中にも多く存在するが、実験用マウスでは検出することが困難である。MAIT 細胞を効率よく検出できる MR1 テトラマーが NIH tetramer core から入手できるようになり、それを使って C57BL/6 の脾臓、肺、胸腺から MAIT 細胞を同定し、セルソーティングによって分取した。11 匹の C57BL/6 のそれぞれの臓器から 3000~6000 個、6 匹の C57BL/6-Ly5.1 の肺から 30000 個の MAIT 細胞を得た (図 1A)。この MAIT 細胞にセンダイウイルスベクターで山中因子を導入することにより、C57BL/6 と C57BL/6-Ly5.1 の肺由来 MAIT 細胞から 46、36 個の iPSC クローンを樹立した。PCR によって MAIT 細胞が特異的に持つ遺伝子再構成済み TCR V α 19-J α 33 の有無を調べた結果 (図 1B)、C57BL/6 からのすべて、C57BL/6-Ly5.1 からの 44 クローンが MAIT 細胞由来であると同定した (図 1C)。

(2) MAIT-iPSC から m-reMAIT 細胞への分化誘導

樹立した複数の MAIT-iPSC クローンを OP9/DLL1 をフィーダー細胞として用い、T 細胞へと分化誘導した。試みた全ての MAIT-iPSC は T 細胞へと分化し、MR1 テトラマー染色によってその 90%以上が MAIT 細胞であることがわかった。しかし生体内 MAIT 細胞が CD44^{hi}CD4⁻CD8⁻であるのに対し、m-reMAIT 細胞は CD44^{lo}CD4⁺CD8⁺と未熟なフェノタイプを持つことが明らかになった。MAIT 細胞のマスター転写因子である ROR γ t の発現は生体内 MAIT 細胞と同様に m-reMAIT 細胞においても認められた (図 2A)。

MAIT-iPSC を OP9/DLL1 上に播種して分化を開始した時、18~20 日目で MR1 テトラマー陽性 m-reMAIT 細胞が生成された。m-reMAIT 細胞の倍增時間は 10.5 時間であり、最終的に 1×10^5 個の MAIT-iPSC から 1×10^7 個以上の m-reMAIT 細胞を得ることができた (図 2B、C)。

(3) m-reMAIT 細胞のビタミン B2 代謝中間体による活性化

細菌由来ビタミン B2 代謝中間体から合成される 5-OP-RU は MAIT 細胞のアゴニストであることが知られている。抗原提示細胞として MR1 発現の程度が異なる 4 種の細胞 [WT3 (MR1 発現がほとんどない細胞)、WT3m (WT3 に MR1 を強制発現させた細胞)、CH27 (内因性 MR1 が発現している細胞)、CH27m (CH27 に MR1 を強制発現させた細胞)] と 5-OP-RU を用い、m-reMAIT 細胞の活性化能を調べた。その結果、抗原提示細胞の MR1 発現量と 5-OP-RU の濃度依存的に m-reMAIT 細胞上の T 細胞活性化マーカーである CD69 の発現が亢進することが示された (図 3A)。それはまた抗 MR1 抗体の添加により打ち消された (図 3B)。さらに培養上清には活性化により Th1、Th2、Th17 系の種々のサイトカイン、ケモカインも産生されることも示された (図 3C)。

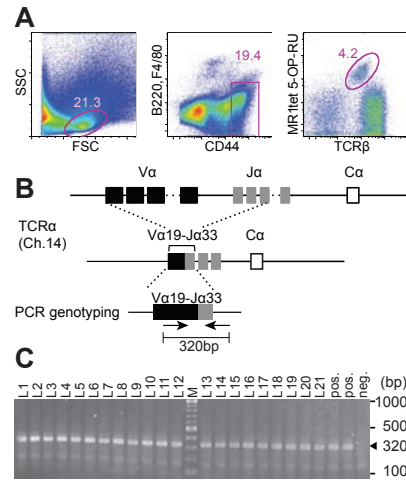


図 1. マウス MAIT-iPSC 細胞の樹立 A: C57BL/6 マウスの肺から分離したリンパ球中の MAIT 細胞。B: MAIT 細胞の TCR α 遺伝子座のゲノム構成と PCR プライマーの設定。C: 樹立された MAIT-iPSC クロノンの遺伝子再構成済み TCRV α 鎖の PCR による検出。

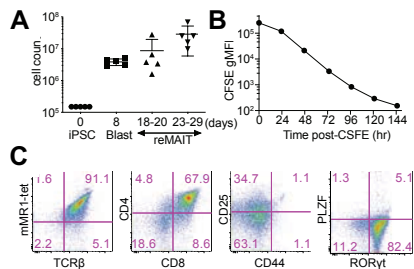


図 2. マウス MAIT-iPSC から m-reMAIT 細胞への分化誘導 A: 1.2×10^5 iPSC から T 細胞分化誘導を開始した時の各ステップにおける細胞数の変遷。B: 分化開始後 20 日目からの m-reMAIT 細胞の増殖曲線。C: m-reMAIT 細胞のフェノタイプ。

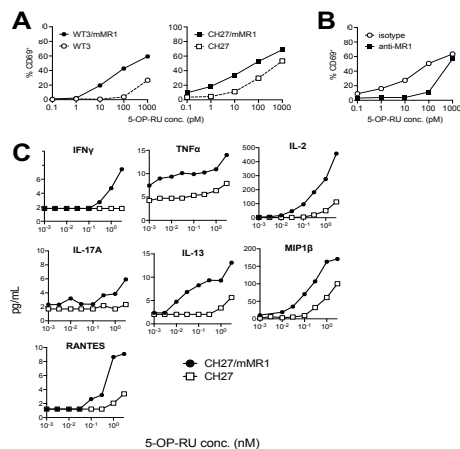


図 3. m-reMAIT 細胞の 5-OP-RU による活性化 A: WT3 および CH27 またはそれらに MR1 を強制発現させた細胞株存在下、表示濃度の 5-OP-RU を添加した時の m-reMAIT 細胞における活性化マーカー CD69 の発現。B: 抗 MR1 抗体添加による活性化のブロック。C: A で示した実験の培養上清中のサイトカインとケモカイン。

(4) m-reMAIT 細胞の細菌による活性化

m-reMAIT 細胞が細菌によって活性化するかを *Escherichia coli* DH5 α 、*Mycobacterium bovis* BCG ワクチン株を用いて検討した。*E. coli* については菌体と培養上清に分けて、m-reMAIT 細胞の活性化能を検討したところ、菌体では菌数依存的な活性化が見られたが、培養上清ではほとんど活性化しなかった (図 4A)。このことから MAIT 細胞を活性化する抗原は菌体から放出はされないことが明らかになった。また BCG も *E. coli* 同様に菌数依存的に m-reMAIT 細胞を活性化することが示された (図 4B)。ただ菌体による MAIT 細胞の活性化が 5-OP-RU とは異なった点は抗原提示細胞の MR1 発現量が低くても MAIT 細胞を活性化できたことである (図 4A, B)。菌体と 5-OP-RU では MR1 をゴルジ体から細胞表面に移行させる能力に差があることが示唆された。

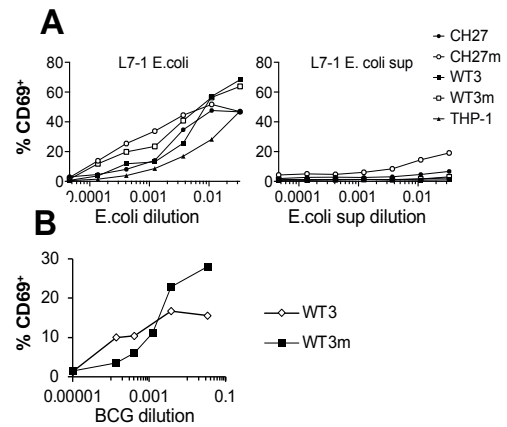


図 4. m-reMAIT 細胞の細菌による活性化 A: さまざまな抗原提示細胞株存在下、表示濃度の *E. coli* 菌体あるいは培養上清を添加した時の m-reMAIT 細胞における活性化マーカー CD69 の発現。B: *M. bovis* BCG 添加による m-reMAIT 細胞における CD69 の発現。

(5) reMAIT 細胞移植モデルの確立

m-reMAIT 細胞を C57BL/6-Ly5.1 マウスに腹腔内接種し、1 および 2 週間後の移入細胞の組織局在と機能成熟をフローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの発現を解析することにより検討した。その結果、移入した m-reMAIT 細胞は脾、肝、肺、腸管、リンパ節などの組織から分離することができた (図 5A)。また移入前の m-reMAIT 細胞はナイーブ T 細胞のフェノタイプを呈したが、マウスへ移入後 1~2 週間で各種細胞表面マーカーの発現が内在性 MAIT 細胞に近づいた (図 5B)。このことから m-reMAIT 細胞はマウス生体内で機能成熟することが示された。

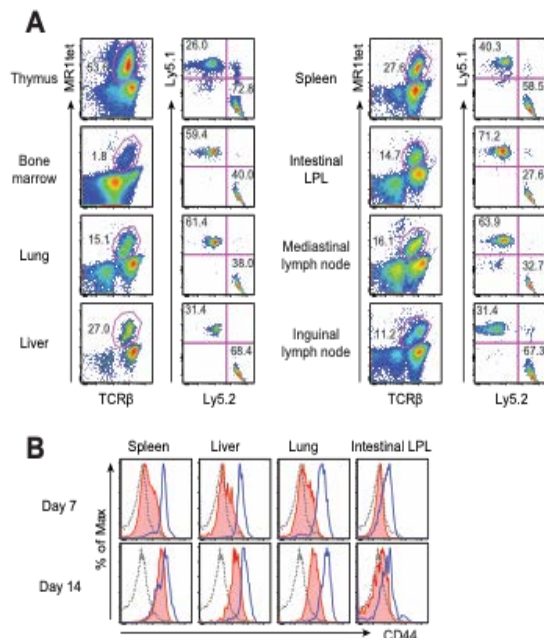


図 5. m-reMAIT 細胞 (Ly5.2) を C57BL/6-Ly5.1 に移入したマウス A: 腹腔内移植後 7 日目の各組織における m-reMAIT 細胞 (Ly5.2+) と内因性 MAIT (Ly5.1+) の割合。B: 移植した m-reMAIT 細胞 (赤) と移植前 m-reMAIT 細胞 (黒点線)、内因性 MAIT 細胞 (青) の T 細胞成熟記憶マーカー CD44 の発現の比較。

(6) マウス MAIT-iPS 細胞からキメラマウスを介した MAIT マウスの樹立

3 種類の MAIT-iPSC クローンを ICR 胚盤胞に移入し、11 匹のキメラマウスを得た。そのうちキメラ率の高い (60~90%) マウス 6 匹と C57BL/6 を交配し、1 匹のキメラマウスが iPSC 細胞の生殖系列移行が確認された。このキメラマウスを経て MAIT-iPSC 由来 TCR α または β 鎖を持つ 2 系統の MAIT マウス、V α 19 マウス、V β 8 マウスを樹立した。野生型 C57BL/6(B6)ではほとんど検出することができない MAIT 細胞が V β 8 マウスでは末梢血 T 細胞中の 0.5%前後、V α 19 マウスでは 25~40% に増加することが示された (図 6)。

これら MAIT マウスにおける MAIT 細胞の組織分布を調べた。MAIT 細胞に特異的な再構成済み T 細胞受容体 α 鎖 (V α 19-J α 33) を持つ V α 19 マウスではいずれの組織においても T 細胞の 40%以上が MAIT 細胞であり、MAIT 細胞由来再構成済み T 細胞受容体 β 鎖 (V β 8-D1-J β 1-2) を持つ V β 8 マウスでは肺、肝臓でそれぞれ T 細胞の約 15%、7%、その他の組織で 0.5~2%であった。

また V α 19, V β 8 マウスの組織から MAIT 細胞を分離し、5-OP-RU で刺激したところ、m-reMAIT 細胞と同等の活性化を示し、MAIT 細胞の特徴的な機能を有することが示された。

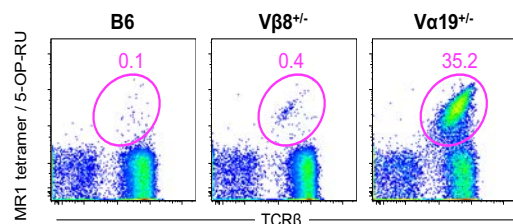


図 6. MAIT マウスの樹立 それぞれのマウスの末梢血中 MAIT 細胞の頻度

(7) MAIT マウスを用いた細菌感染モデルの構築

V α 19 マウスに BCG ワクチン株を静脈内接種し、脾臓、肝臓、肺の細菌数を測定し C57BL/6 と比較した。感染後 10 日目、C57BL/6 では肝臓において著しい感染を認めたが、V α 19 マウスの肝臓ではほぼ感染が抑えられていた。脾臓、肺においてはいずれのマウスでも感染は低かった。感染後 20 日目では、C57BL/6 の肝臓での細菌数は 10 日目より低下したが、V α 19 マウスでは逆に肝臓で著しい細菌増殖が認められ、脾臓においても一部のマウスでは細菌数が高かった。この結果より、MAIT 細胞は BCG の感染増殖ピークを遅らせることが示唆された。しかし V α 19 マウスがその後の感染を制御できなかった理由として、このマウスは遺伝子再構成済み V α 鎖遺伝子を遺伝的に持つことの弊害として獲得免疫に機能する T 細胞レパトアが少ないことが原因として考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Wakao Hiroshi, Sugimoto Chie, Kimura Shinzo, Wakao Rika	4. 巻 8
2. 論文標題 Mucosal-Associated Invariant T Cells in Regenerative Medicine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2017.01711	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 -

1. 著者名 Wakao Hiroshi	4. 巻 2098
2. 論文標題 Reprogramming of MAIT Cells to Pluripotency and Redifferentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 237 ~ 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0207-2_16	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 -

1. 著者名 Wakao Hiroshi, Sugimoto Chie	4. 巻 4
2. 論文標題 iPSC-derived mucosal-associated invariant T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Recent Advances in iPSC-derived cell types	6. 最初と最後の頁 31 ~ 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B978-0-12-822230-0.00012-0	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本智恵、若尾宏
2. 発表標題 MAIT細胞の機能解析のための実験モデル
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マウスMAIT様細胞ならびにMAIT細胞豊富なマウス作製とその利用	発明者 若尾 宏、杉本 智恵	権利者 獨協医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特許願2019-196603	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究 分担者	若尾 宏 (Wakao Hiroshi) (10280950)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

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