

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03928

研究課題名(和文)核内受容体を介した免疫記憶形成機構の解明とワクチン療法への応用

研究課題名(英文) Immunological memory formation through nuclear receptors and its application for vaccine therapy

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) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：ワクチンの基本原理である免疫記憶の詳細な成立機構は未だ解明されていない。本研究では記憶CD8+ Tリンパ球分化の過程で顕著な発現上昇を示すRORファミリー核内受容体に着目し、記憶Tリンパ球の分化および機能の制御における当該分子の関与を検討した。その結果、RORalphaがコレステロール代謝関連遺伝子の発現制御を介して活性化CD8+ Tリンパ球の生存と初期応答に影響を与えることが明らかとなった。さらに、RORalphaが記憶CD8+ Tリンパ球の感染免疫応答に関与する可能性について、今後の発展につながる予備的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去に感染した病原体の再感染に対し、免疫系はより素早く強力に応答する(免疫記憶)。免疫記憶の本体は抗原特異的な応答の後、体内で長期間維持される記憶リンパ球である。ウイルスや細菌、腫瘍細胞に対する防御を担うTリンパ球の記憶メカニズムを解明することは、ワクチン・免疫療法の開発基盤として医学・獣医学に資する。本研究から、リガンド依存的な転写制御因子である核内受容体RORalphaがCD8+ Tリンパ球の免疫応答と機能分化に関与することが明らかとなった。RORalphaの活性は合成リガンドを使って制御が可能であることから、本研究の知見は、当該因子を標的とした新たな免疫療法の開発につながり得る。

研究成果の概要(英文)：The detailed mechanism of immunological memory, the basic principle of vaccines, has not yet been elucidated. In this study, we focused on the ROR family nuclear receptor, which shows a marked increase in expression during memory CD8+ T lymphocyte differentiation, and investigated the involvement of this molecule in the regulation of memory T lymphocyte differentiation and function. It was clarified that RORalpha affects the survival of activated T lymphocytes and effector differentiation by regulating of the expression of cholesterol metabolism-related genes. Furthermore, we obtained the preliminary finding that RORalpha may be involved with the immune response of memory CD8+ T lymphocytes to infection, which prompts us for further examinations in the future.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 核内受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫系は一度感染した病原体を記憶し、再感染に対して素早く強力に応答することで高度な生体防御機能を発揮する(免疫記憶)。記憶は高等生物の免疫系を特徴づける重要な生命現象であり、ワクチンの基本原理として、ヒトと自然の共存に多大な貢献を果たしてきた。免疫記憶の本体は、活性化の後、長期にわたり体内で維持される記憶リンパ球である。特に、細胞内のウイルスや細菌、腫瘍細胞に対する防御を担う CD8+ T リンパ球の記憶メカニズムを解明することは、細胞性免疫記憶を誘導可能なワクチンやがん免疫療法の開発基盤となる。我々は、病原体感染後の CD8+ T リンパ球における網羅的遺伝子発現プロファイルから、核内受容体 ROR α の発現が抗原応答に伴って急激に増加することに着目した。ROR α はリガンドと結合することで転写制御機能を発揮し、時計遺伝子として概日リズムを制御することが広く知られている。ROR α の活性はリガンドの投与によって人為的に制御可能であり、ヒトや動物への投与が可能な合成リガンドの開発が活発に進められている。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では記憶 CD8+ T リンパ球の分化と機能の制御における ROR α の関与を検証し、当該核内受容体を介した新たな免疫記憶形成機構の解明と、特異的リガンドを用いた免疫療法の基盤形成を目的とした。

3. 研究の方法

(1) CD8+ T リンパ球における ROR α の発現解析：生体内での T リンパ球免疫応答に伴う ROR α (遺伝子名 *Rora*) の発現の変化を検討するため単一の抗原受容体を発現する抗原受容体トランスジェニック T リンパ球を実験に使用した。モデル抗原である卵白アルブミンを特異的に認識する OT-I 抗原受容体発現 T リンパ球を OT-I トランスジェニックマウス (OT-I tg マウス) の二次リンパ組織から単離し、レシピエントマウスに養子移入した。さらに、卵白アルブミン由来ペプチド (SIINFEKL) でパルスした樹状細胞を追加移入することで、ドナー T リンパ球に対し抗原刺激を加えた。その後、レシピエントマウスの二次リンパ組織から経時的にドナー T リンパ球を単離し、ROR α の mRNA 発現を定量的 PCR で解析した。

(2) T リンパ球免疫応答と記憶形成への ROR α の関与：ROR α のリガンド結合ドメインに変異をもつ *Rora*^{sg/sg} マウスを用いて、ROR α が T リンパ球の活性化と増殖、記憶形成に及ぼす影響を検討した。OT-I tg マウスと *Rora*^{sg/sg} マウスを交配し、単一の抗原受容体を発現する ROR α 変異マウスを作成した (*Rora*^{sg/sg} OT-I tg マウス)。ROR α のホモ変異個体は、末梢の T リンパ球プールが完全に形成される前に若齢で死亡する。そこで、Busulfan で骨髄破壊処理された正常マウスに *Rora*^{sg/sg} OT-I tg マウスの骨髄細胞を移入することで、血球系細胞のみが機能的 ROR α を欠損する骨髄キメラマウスを作成した。このキメラマウスから単離した未感作 CD8+ T リンパ球を正常レシピエントマウスに養子移入した後、卵白アルブミン発現リステリア菌 (LM-OVA) を感染させてドナー T リンパ球を生体内で活性化させた。感染 7 日後および 50~60 日後に、レシピエントマウスの脾臓におけるドナー OT-I T リンパ球の数と表現型をフローサイトメトリーにより解析した。

(3) ROR α リガンドが T リンパ球の生存とコレステロール代謝に及ぼす影響：OT-I tg マウスの脾細胞を卵白アルブミン由来ペプチドと IL-2 の存在下で 3 日間培養し、*in vitro* で活性化させた。その後、ROR リガンドである SR1078 とサイトカイン (IL-2 あるいは IL-15) の存在下で培養した。トリパンブルー染色および PI 染色により生存 T リンパ球の数と頻度を計測し、ROR を介したシグナルが活性化 T リンパ球の生存に与える影響を検討した。さらに、リガンド処理後の活性化 T リンパ球をもとにマイクロアレイ解析を行い、変動遺伝子を抽出した。ROR リガンド T リンパ球の生存にもたらす影響がコレステロール代謝関連遺伝子の変動によるかを検討するため、上記の培養系に可溶性コレステロールを添加し、T リンパ球の生存率を解析した。また、Filipin III で染色した細胞を蛍光顕微鏡で観察し、ROR リガンドがコレステロール量に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 生体内での T リンパ球応答に伴う ROR ファミリー核内受容体の発現動態を検討した。その結果、ROR α 遺伝子の発現は活性化後に急激に上昇し、その後、記憶形成に伴って徐々に減少しつつも記憶期まで維持された (図 1)。一方、同じ ROR ファミリーに属する ROR γ t (遺伝子名 *Rorc*) では、免疫応答に伴う顕著な遺伝子発現の変化は認められなかった。

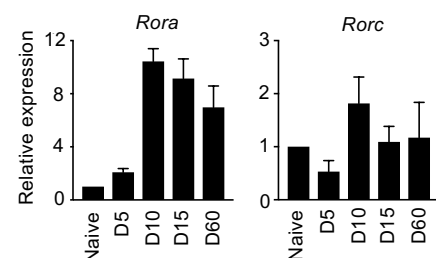


図 1. 抗原免疫 5 日から 60 日後における ROR 遺伝子の発現

(2) Tリンパ球の免疫応答と記憶形成へのROR α の関与：ROR α 変異型ナイーブ OT-I Tリンパ球を正常マウスに移入し、LM-OVAの感染後、エフェクター期および記憶期においてレシピエントマウス脾臓中のドナーTリンパ球を解析した。感染7日後、ROR α 変異型Tリンパ球の数は野生型に比べ有意に多かった。特に、ROR α 変異群ではKLRG1^{hi}CD127^{lo}の表現型を持つ亜集団が増加する傾向が見られた(図2)。一方、メモリーTリンパ球が分化する感染50~60日後では、両群間でドナーTリンパ球の数に差異は認められなかった。また、KLRG1、CD62L、CD27、CD43の発現に基づく亜集団構成にも、ROR α 変異の影響は認められなかった。さらに、予備的知ではあるが、感染50~60週後のROR α 変異記憶Tリンパ球では、免疫応答機能が顕著に低下するという知見が得られ、現在詳細な検討を進めている。以上の結果から、ROR α は感染の初期応答において、CD8⁺Tリンパ球の増殖を抑制し、亜集団構成に影響することが示された。

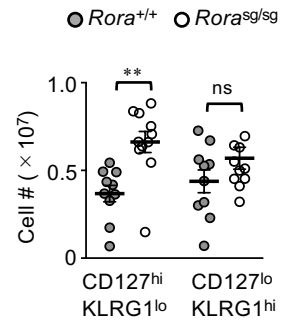


図2. ROR α の変異がエフェクターTリンパ球の表現型に及ぼす影響(感染7日後)
** $P < 0.01$; ns, not significant

(3) OT-I Tリンパ球に *in vitro* で抗原刺激を加え活性化させた後、RORリガンドとサイトカインの存在下で培養することにより、活性Tリンパ球の生存に与える影響を検討した。その結果、RORリガンド処置によってTリンパ球の生存が顕著に低下した(図3)。この傾向はIL-2およびIL-15どちらの環境下でも認められた。さらにROR α の過剰発現でもTリンパ球の生存への影響が認められた。マイクロアレイ解析および定量的PCR解析から、コレステロール代謝関連遺伝子の発現がRORリガンド処置により低下することが示唆された(図4)。また、Filipin III染色によって、リガンド処置後の細胞ではコレステロール量が低下していることが確認された。さらに、コレステロールの添加によって、Tリンパ球の生存は正常レベルにまで回復した(図5)。よってROR α は細胞内のコレステロール産生を抑制することによって活性化Tリンパ球の生存を自由に制御することが示唆された。

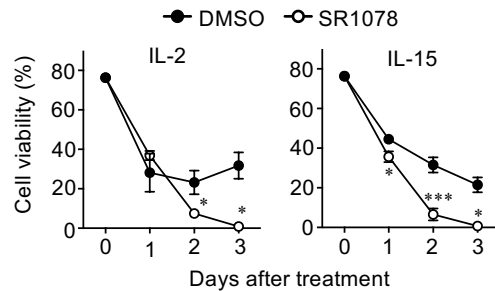


図3. RORリガンドが *in vitro* で活性化Tリンパ球の生存に及ぼす影響
* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; ns, not significant

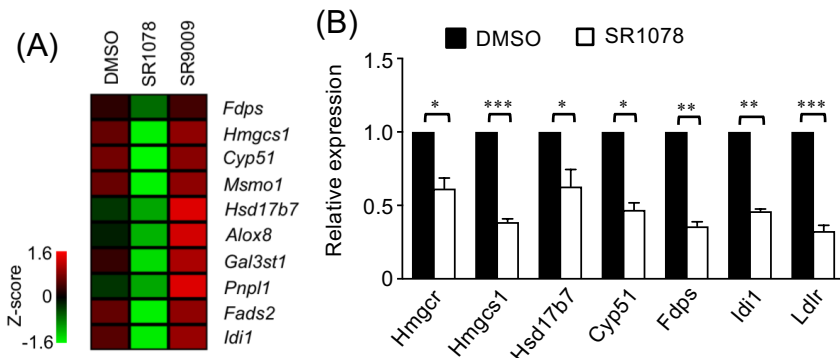


図4. RORリガンド処理によるコレステロール代謝関連遺伝子の発現低下
(A, マイクロアレイ解析; B, 定量的PCR解析)
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant

(4) 考察：RORリガンドの作用により活性化CD8⁺Tリンパ球の生存が低下するという本研究の知見は、移植片対宿主病など、CD8⁺Tリンパ球が病態形成に主要な役割を果たすの免疫介在性疾患に応用できる可能性がある。今後の発展が期待される。

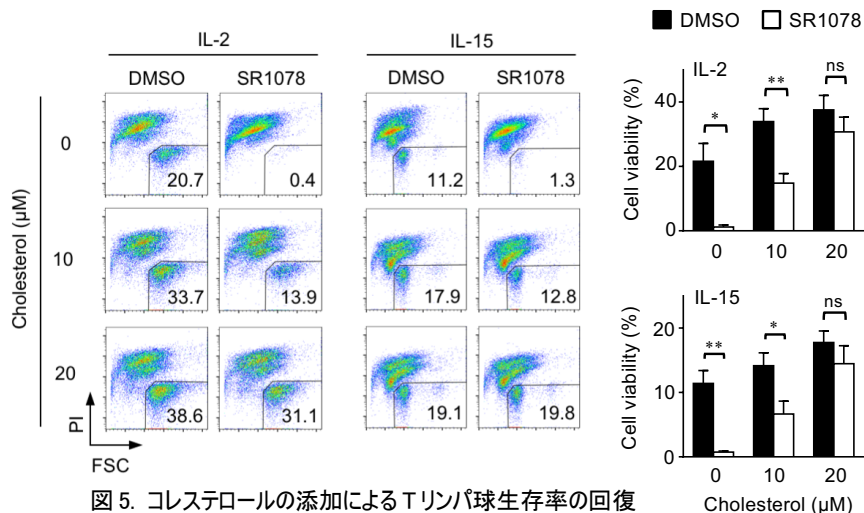


図5. コレステロールの添加によるTリンパ球生存率の回復
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, not significant

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Khanom Umme Shahina, Ohigashi Izumi, Fujimori Sayumi, Kondo Kenta, Takada Kensuke, Takahama Yousuke	4. 巻 203
2. 論文標題 TCR Affinity for In Vivo Peptide-Induced Thymic Positive Selection Fine-Tunes TCR Responsiveness of Peripheral CD8+ T Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 881 ~ 887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900097	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石橋 太心、Zimeng Cai、香西 美奈、高田 健介、稲葉 睦
2. 発表標題 核内受容体間の競合がCD8+T細胞の活性化と記憶形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田健介
2. 発表標題 CD8+T細胞の記憶形成における核内受容体の役割
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takada K, Kondo K, Takahama Y.
2. 発表標題 Functional education of CD8 T cells in the thymus.
3. 学会等名 The 20th Seoul National University - Hokkaido University Joint Symposium. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高田健介
2. 発表標題 胸腺における正の選択を介したT細胞の機能的教育
3. 学会等名 第54回日本生化学会北海道支部会（招待講演）
4. 発表年 2017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
研究 分担者	稲葉 睦 (Mutsumi Inaba) (00183179)	北海道大学・獣医学研究院・教授 (10101)	
研究 分担者	山崎 淳平 (Junpei Yamazaki) (20732902)	北海道大学・獣医学研究院・特任准教授 (10101)	

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