

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08456

研究課題名(和文) 効率的な抗インフルエンザメモリーCD8 T細胞の誘導法の開発

研究課題名(英文) Development for effective induction of memory CD8 T cell against influenza virus.

研究代表者

吉澤 彰宏 (Yoshizawa, Akihiro)

国際医療福祉大学・医学部・講師

研究者番号：30407093

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)：獲得免疫反応において、CD8 T細胞は、T細胞受容体(TCR)と、ペプチドを結合したMHC class I分子との会合により抗原を認識し活性化される。インフルエンザ感染後マウス肺実質内に残留する2種類のインフルエンザ抗原特異的CD8 T細胞は、それぞれ会合する抗原が異なれば、T細胞内の分子的制御も大きく異なることがすでに明らかとなっている。そこで我々は、インフルエンザ抗原特異的な2種のCD8 T細胞の局在を組織学的に解析、他の種類の免疫細胞との相互反応を与える微小環境を解明、CD8 T細胞の局所残留を可能にする接着分子の探索、をすることで、免疫記憶を成立させる微小環境の解明を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はメモリーCD8 T細胞が形成される“場”のモデルを提唱した。血管と細気管支に近接した粘膜固有層(従来のiBALTとは異なる部位)において、血流を介してCD8 T細胞が集簇する。そこでは、肺マクロファージがTGF- β やIL-15を発現し、一方CD11c陽性樹状細胞がIL-15受容体 を介して、CD8 T細胞にメモリー形質を与える。そして、いくつかは、気道上皮間に移動し、接着分子を介して局在し、次の感染に備えて残留する。こういった、免疫記憶を成立させる微小環境の解明の一端は、今後のウイルスパンデミックに大いに役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：During the cellular adaptive immune response, CD8 T lymphocytes play a central role in mediating protection against myriad infectious pathogens. To investigate the role of TCR-pMHC interaction in regulating lung CD8 tissue-resident T cell (TR) differentiation, polyclonal responses were compared against NP366-374/Db and PA224-233/Db, two immunodominant epitopes that arise during influenza A infection in mice. We investigate 1) the memory niche where influenza-antigen specific memory CD8 T cells are generated, 2) the micro-environment which gives the interaction with other type of cells and 3) the adhesion molecules on the CD8 T cell which foster the persistence within the airway epithelium.

研究分野：免疫学

キーワード：インフルエンザ CD8 T細胞 免疫記憶

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ感染症は、毎年のように流行し、時には2009年のように“新型”と呼ばれるウイルス株がパンデミックを世界的に引き起こす。インフルエンザウイルス感染症対策として、ワクチン接種はある程度有効ではあるが、ウイルス表面タンパクをターゲットとした従来のワクチンでは、効果が限定的である。表面タンパクの構造そのものが、高い頻度で変化してゆくため、一回のワクチンでは終生免疫が得られず、我々はターゲットに合わせたワクチンを毎年受けざるを得ない。

一方、インフルエンザウイルス内部タンパクは、表面タンパクのような構造変化を頻繁には起こさず、構造が保存されている。よって、これをワクチンのターゲットとすれば、毎年の接種は不要となり、社会的にも経済的にも人類にとって大きな利益となり得る。そのような効果をもたらすものは、免疫細胞のうちCD8 T細胞と呼ばれる一群である。

CD8 T細胞は、ウイルス感染細胞をT細胞受容体(TCR)と呼ばれる細胞表面分子で認識し、それを排除する。一度感染が排除されたのちも、次なる感染に備えて、メモリーCD8 T細胞と呼ばれる集団が脾臓やリンパ節内に待機することが知られている。更に近年、Tissue resident memory T細胞(Trm)と呼ばれるCD8細胞群の存在が明らかにされてきた。それらは、感染細胞が排除された後も、血流で再循環せず、皮膚、気道粘膜、消化管粘膜などの外界に接触する最前線に残留し、感染性微生物の侵入監視にあたり、それらの侵入時には即時対応にあたる。

申請者らは以前、マウスのインフルエンザ(H1N1)感染モデルにおいて、その肺実質内に残留する2種類のTrmを比較検討した。1つは核タンパクに由来するNP₃₆₆₋₃₇₄ペプチド(NP₃₆₆)を認識し、感染細胞を攻撃するCD8 T細胞、もう一方はRNAポリメラーゼに由来するPA₂₂₄₋₂₃₃ペプチド(PA₂₂₄)を認識し感染細胞を攻撃するCD8 T細胞である。両ペプチドはインフルエンザウイルス内に存在するペプチドであり、我々がワクチンターゲットと考えるべき存在である。

それら2種類のCD8 T細胞において、局所残留に関わる細胞表面分子の1つであるCD103の発現が、明らかに異なる(図1)ことを見出した。CD8 T細胞はTCRを介して、感染細胞表面のH-2D^b複合体に結合したインフルエンザペプチドを認識することで活性化される。申請者らはペプチドとの“遭遇”が、細胞内の分子的制御に如何に影響を与えるかを、RNAの網羅的解析により、明らかにした。その網羅的解析と過去に蓄積されたデータベースからPA₂₂₄を認識するCD8 T細胞は、NP₃₆₆を認識するCD8 T細胞と比較するとより、メモリーの性質を持つことがわかった。

しかしながら、何故遭遇するインフルエンザ抗原の違いが、それに対応するCD8 T細胞にメモリー形質を与えたり、そうでなかったりするのかは、未だ謎のままである。CD8 T細胞にメモリー形質を与える、条件や微小環境が明らかにできれば、メモリーCD8 Tを肺内に誘導することで、インフルエンザワクチン開発に非常に有用である。

2. 研究の目的

本研究では、肺実質内メモリーCD8 T細胞の形成機構を、メモリー形質を与える微小環境をより詳細に解明し、効率的なメモリーT細胞の誘導方法の確立を目的とする。具体的な研究項目は インフルエンザ抗原特異的な2種のCD8 T細胞の局在を組織学

的に解析 他の種類の免疫細胞との相互反応を与える微小環境を解明 CD8 T 細胞の局所残留を可能にする接着分子の探索、である。

3 . 研究の方法

6 - 10 週令の野生型マウス (C57BL/6) に、初期感染としてインフルエンザウイルス (PR8, H1N1) を感染させたのち、免疫記憶が成立したと一般的に考えられる 30 日後に、2 次感染として血清学的に異なる株のインフルエンザウイルス (X-31, H3N2) を感染させた。初期感染後 14 日、30 日、もしくは 2 次感染後 3 日、7 日など、さまざまな時点で、マウス肺を取り出し、1mL の 20% ショ糖液/O.C.T コンパウンド混合物を肺内に注入し、1 昼夜 20% ショ糖液に浸漬させたのち、O.C.T コンパウンドを用いて、厚さ 3.5 μ m の凍結切片を作成した。凍結切片を 5%FBS (ウシ胎児血清) + PBS-T (リン酸緩衝生理食塩水 + 0.05% Tween) でブロックしたのち、NP₃₆₆ もしくは PA₂₂₄ 特異的テトラマー、抗 CD8 抗体で染色した。共焦点レーザー顕微鏡で、感染後に細気管支と血管周囲に誘導される iBALT (inducible bronchus associated lymphoid tissue) 周辺に集簇するインフルエンザウイルス特異的な CD8 T 細胞の組織学的局在を観察した。なお、iBALT は抗 HEV (high endothelial venule) 抗体で染色することでその構造を確認した。血管と細気管支の間に存在する粘膜固有層に認められるさまざまな細胞を抗 IL-15 抗体、抗 IL-15 受容体 抗体、抗 TGF- β 抗体、抗 TCRV 8.3 抗体、抗 TCRV 7 抗体を用いて染色した。また、PA₂₂₄ 特異的 CD8 T 細胞、NP₃₆₆ 特異的 CD8 T 細胞に発現する表面分子の探索に、フローサイトメトリーも用いた。

4 . 研究成果

インフルエンザウイルス感染前は、肺実質に CD8 T 細胞はほぼ認められないが、感染後 7 日が経過すると、気道上皮にヘマグルチニン陽性が確認された感染細気管支の周囲には、CD8 T 細胞が散見されるようになる。感染 30 日後には、ウイルスの活動性は認められなくなる (ヘマグルチニン陰性) が、気道上皮内と粘膜固有層には残留した CD8 T 細胞が多数認められ、(一般的にも言われているように) 30 日が経過すると免疫記憶が成立したと確認できた。インフルエンザウイルスを再感染させると、同部位へのさらに多数の CD8 T 細胞の集簇が明らかとなった。初期感染後 30 日の肺を、NP₃₆₆ もしくは PA₂₂₄ 特異的テトラマーを用いてそれぞれ染色し、それぞれの特異性をもつ CD8 T 細胞を検出した。すると、iBALT に近接する部位 (iBALT 内部ではない) にそれぞれの特異性をもつ CD8 T 細胞が認められた。双方の染色における切片は 3.5 μ m 間隔であり、特異性の違いによる明らかな存在部位の相違は認められなかった。

次に、免疫記憶細胞が産生され局在する微小環境における、T 細胞以外の血球細胞について解析した。感染した肺局所の T 細胞数がプラトーになる (免疫記憶が成立する) のは感染後 30 日とみられているので、その 2 週間前 (感染 14 日後) を目途に特に iBALT 付近を観察した。IL-15 と TGF- β のサイトカインがメモリー CD8 T 細胞誘導に重要であると過去の報告があるため、それらサイトカインの産生細胞を突き止めるべく、抗 IL-15 抗体、抗 IL-15 受容体 抗体、抗 TGF- β 抗体を用いて染色を行った。感染後の IL-15 の産生細胞の大部分は粘膜固有層に局在する CD11b 陽性の肺マクロファージであった。それらは、iBALT 近傍に存在し、iBALT 内部に存在はしていない。また気道上皮細胞も軽度の IL-15 の産生が認められた。IL-15 は IL-15 受容体 と結合し

複合体を形成することで、CD8 T細胞上の IL-15/IL-2 受容体 鎖に結合し、IL-15 のシグナルを CD8 T細胞に与えることが分かっている。そこで IL-15 受容体 の発現細胞を抗 IL-15 受容体 抗体で染色したところ、それらの大部分は CD11c 陽性の肺樹状細胞であり、粘膜固有層の血管周囲に認められた（これも iBALT 内部には認められなかった）。IL-15 と同様に、TGF- β も感染によって気道上皮細胞や間質細胞、肺マクロファージに発現が認められた。気道上皮近傍には、CD11c 陽性 IL-15 受容体陽性樹状細胞は認められないが、一方 CD103 陽性樹状細胞は多く認められた。

NP₃₆₆ または PA₂₂₄ 特異的 CD8 T細胞の気管支上皮での局在の分布も検討した。テトラマー染色では、気管支上皮間に密接する CD8 細胞を検出することが困難であったため、（おそらく上皮-T細胞間の強い結合がテトラマーの侵入を阻害するため）それぞれの特異性を抗 V_{8.3} 抗体、抗 V₇ 抗体で染色した。すると、NP₃₆₆ 特異的 V_{8.3} 陽性 CD8 T細胞は、PA₂₂₄ 特異的 V₇ 陽性 CD8 T細胞と比較して、気管支上皮間への密接がより多く認められた。E-カドヘリンのレセプターである CD103 分子は、PA₂₂₄ 特異的 CD8 T細胞により強く発現し、NP₃₆₆ 特異的 CD8 T細胞にはごく軽度にしかなら発現していないことを考えると、それは予想外のことであった。

フローサイトメトリーを用いた方法で、メモリーCD8 T細胞が気管支上皮間に密接しうる分子を検索した。まず E-カドヘリンが双方の特異的 CD8 T細胞に発現が認められた。さらに E-カドヘリンと結合する KLRG1 分子が NP₃₆₆ 特異的 CD8 T細胞により強く認められた。よって、既知の CD103 と E-カドヘリンを介した結合だけでなく、E-カドヘリン同士による結合、E-カドヘリンと KLRG1 による結合を介して、NP₃₆₆ 特異的 CD8 T細胞、PA₂₂₄ 特異的 CD8 T細胞とも気管支上皮間に強く結合し、残留しうるということが考えられた。

以上から我々はメモリーCD8 T細胞が形成される“場”のモデルを提唱した。まず、血管と細気管支に近接した粘膜固有層（従来の iBALT とは異なる部位）において、血流を介して CD8 T細胞が集簇する。ここでは、肺マクロファージが TGF- β や IL-15 を発現し、一方 CD11c 陽性樹状細胞が IL-15 受容体 を介して、CD8 T細胞にメモリー形質を与える。そして、いくつかは、気道上皮間に移動し、接着分子を介して局在し、次の感染に備えて残留する。ここでは、CD11c 陽性、IL-15 受容体 陽性樹状細胞はからの刺激は受けられないが、気道上皮そのものが、TGF- β や IL-15 を発現し、近傍の CD103 陽性樹状細胞から生存シグナルを受け取っている可能性がある。

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 1件）

1. 著者名 Nakamura R, Yoshizawa A, Moriyasu T, DeLoer S, Senba M, Kikuchi M, Koyasu S, Moro K, Hamano S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Group 2 Innate Lymphoid Cells Exacerbate Amebic Liver Abscess in Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101544	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------