

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07347

研究課題名(和文) CD4T細胞より誘導される、新規制御性CD8aaT細胞の免疫反応制御機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of immune regulation by CD8aa T cells differentiated from CD4 T cells.

研究代表者

南部 由希子(Nambu, Yukiko)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：70580380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CD4 T細胞から再分化して生じる新規CD8 T細胞は、遷延化した炎症反応の収束に重要である。しかし、詳細な免疫反応の制御機構は不明な点が多い。本研究では、CD4 T細胞から再分化したCD8 T細胞を標識し、その詳細な解析を目指した。研究代表者が作成したCD4 T細胞のみを標識できるマウスは、解析の結果一部標的以外の細胞集団でも標識されていることが判明した。そのため、他の細胞が標識されることを防げるマウスを作成するためのコンストラクションを作成し、この系が動くことを確認するための実験系も作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者が発見した新規CD8 T細胞は、免疫反応の進行に伴ってCD4 T細胞から再分化して生じる。この細胞を持たないマウスでは自己免疫疾患様の病態を示すことから、CD4+制御性T細胞とは違ったメカニズムで免疫を抑制する、新しい制御性T細胞であることが示唆された。この細胞の分化機構や、免疫反応の制御機構が判明すれば、今までない免疫反応制御の分子のおよび知的基盤を提供することが可能である。本研究では、不完全とは言え、CD4 T細胞から再分化するCD8 T細胞の標識に成功しており、このマウスを解析することによって、さらなる知見を得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：CD8aa T cells differentiated from CD4 T cells play an important role in converging prolonged inflammation. The mechanism of immune regulation by CD8aa T cells still be unknown. In this study, I tried to monitor the appearance of CD4-derived CD8aa T cells during the normal course of immune reaction, but failed. To analyze CD4-derived CD8aa T cells I made mice having fluorescent protein only within CD4 T cells, however other cells were also labeled with fluorescent protein in these mice. As I overcome this trouble, I considered superior strategy and prepared the new construction for generating another mouse. After validating it in vitro, I will make another mouse for suitable for specific labeling of CD4 T cells.

研究分野：分子生物学・免疫学

キーワード：CD8 T細胞 制御性T細胞 再分化

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫応答は抗原特異性を所持した免疫応答である。一度経験した非自己（病原微生物等）に次回効率よく対応するための免疫記憶、自己抗原と認識したものを攻撃しない自己寛容の誘導など、抗原特異的な反応性決定機構は獲得免疫反応が正しく機能するための基盤となる。しかし、自己と非自己の境界は明確ではなく、抗原特異性に依存した免疫反応の開始・抑制の決定だけで様々な局面に対応することは難しい。

免疫抑制機能の一部は転写因子 FoxP3 に依存した制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺T 細胞) によって担われている。制御性 T 細胞による免疫抑制は、免疫反応全体の強さを規定するタイプの免疫抑制であり、抗原特異的な免疫担当細胞に対する特異的抑制作用や、免疫反応の収束に向ける特異的な機能は見出されていない。これらの機能を所持した免疫抑制細胞の存在は想定されているがその実態は未だ不明である。一方で、活性化 T 細胞特異的な免疫抑制機能を持つ、CD8⁺制御性 T 細胞 (CD8α_αもしくは CD8α_βを所持)の存在が明らかになってきた 1)。

研究代表者らは転写因子 Runx3 が欠損したマウスには慢性的な腸炎が認められ、通常飼育下 (SPF ではなく細菌が多い環境下) では腸に腫瘍が形成されることを示した 2)。また、Runx3 欠損マウスを用いた多発性硬化症モデル (EAE) では、発症した EAE から回復できないことを見いだした。この原因を探していく過程で、免疫反応の進行に伴って CD4⁺ T 細胞が CD8α_α T 細胞へ再分化する現象を発見した。Runx3 欠損マウスではこの再分化が起こらないことにより、慢性炎症が遷延化した結果、上述の病態が引き起こされていることが明らかになった 3)。

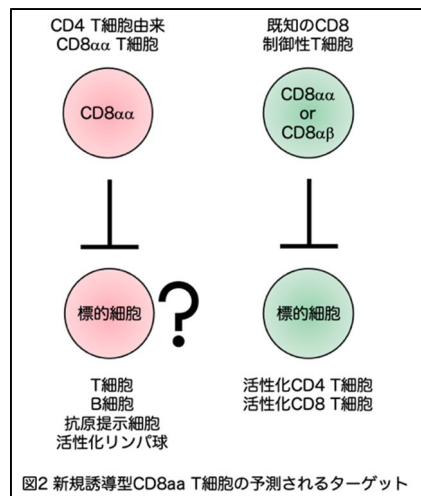
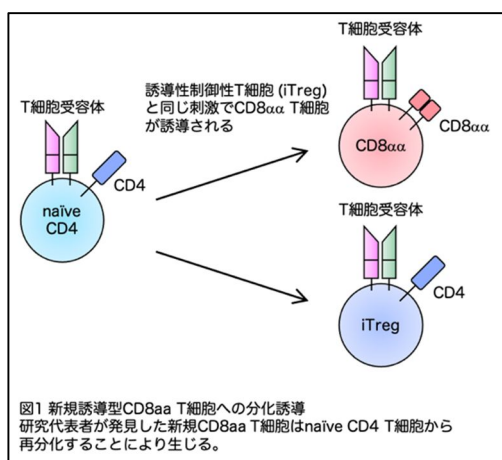
新規 CD8α_α T 細胞が持つ特徴として、他の CD4⁺ T 細胞の補助なしに元の CD4⁺ T 細胞と同じ T 細胞受容体を持つ活性化 CD8 T 細胞が得られるという点が挙げられる。通常、CD8 T 細胞の活性化には CD4⁺ T 細胞の補助が必要であるが、この細胞は CD4⁺ T 細胞から分化するため他の CD4⁺ T 細胞の補助は必要とならない。さらに、免疫反応の時間経過とともに変化する抗原や免疫反応の場の状況変化に対応するため、抗原受容体の異なる CD4⁺ T 細胞が順次活性化され、CD8α_α T 細胞に再分化していることが想定される。研究代表者によるこれらの発見は、抗原特異性に応じた複雑な免疫制御機構に CD4⁺ T 細胞から再分化した CD8α_α T 細胞が関与していることを示唆し、その可能性を検証する研究である。

- 1) Kumar V. et al. Trends in Immunology, 29:337-342, 2008
- 2) Sugai M. et al. Journal of Immunology, 186:6515-6520, 2011
- 3) Nambu Y. et al. Scientific reports, 2:642-652, 2012

2. 研究の目的

研究代表者は免疫反応に伴い CD4⁺ T 細胞が CD8α_α T 細胞に再分化することを見いだした。この CD8α_α T 細胞は遷延化した炎症反応や免疫応答の収束に重要である。再分化は誘導性制御性 T 細胞 (iTreg) と同じ刺激で誘導されることから、この CD8α_α T 細胞は iTreg とは別のメカニズムで免疫を抑制する新しい制御性 T 細胞である可能性を示唆する。

本研究課題では CD4⁺ T 細胞から再分化する CD8α_α T 細胞の解析を通じて、CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺制御性 T 細胞以外の免疫抑制細胞の存在と、その生理的・病理的役割を明らかにし、免疫反応全体を適切に制御するメカニズムの解明を目指すことを目的とする。



3. 研究の方法

CD4 T細胞から再分化する新規誘導型 CD8 $\alpha\alpha$ Tの分化機構を明らかにするために下記の実験を行った。

(1) CD4 T細胞から再分化した CD8 $\alpha\alpha$ T細胞を可視化できる様にする。

この新規 CD8 $\alpha\alpha$ T細胞の分化機構や過程を詳細に解析するためには、CD4 T細胞由来の CD8 $\alpha\alpha$ T細胞を可視化できることが重要となる。この CD8 $\alpha\alpha$ Tのみを標識できるようなマウスを作成し、標識された細胞を単離して遺伝子発現を調べる。

(2) CD4 T細胞から再分化する過程を経時的に観察し、新規 CD8 $\alpha\alpha$ T細胞の分化機構を解析する。

(1) で作成したマウスにタンパク質抗原を免疫し、その免疫反応を経時的に観察することにより、CD4 T細胞から再分化した CD8 $\alpha\alpha$ T細胞の出現時期や細胞数を調べる。

4. 研究成果

(1) CD4 T細胞から再分化した CD8 $\alpha\alpha$ T細胞を可視化するためのマウスを作成したが、標識にリークがあり、標的細胞以外にも可視化される細胞集団があることが明らかになった。とりあえずこのマウスを用いて、タンパク質抗原に対する免疫応答誘導時に見られる、CD8 $\alpha\alpha$ T細胞の出現時期や細胞数を調べようとしたが、明確な結果を得ることができなかった。この時、標的細胞以外で可視化された細胞も増殖していることが確認されたため、今後の解析には標識のリークがさらに少ないマウスを作成する必要があることが明らかになった。

(2) 上述のように、CD4 T細胞由来の CD8 $\alpha\alpha$ Tを可視化することができる遺伝子改変マウス作成に必要なコンストラクションを作成し、このコンストラクションを元にマウスを作出した。このマウスを用いて CD4 T細胞から再分化した CD8 $\alpha\alpha$ T細胞が標識されているのか確認をしたところ、標的以外の細胞集団でも標識されている細胞が存在することが判明した。(1)で述べたように、このマウスを用いて計画した全ての実験を遂行することは難しいため、標的細胞のみを標識するための新たな戦略を立て、この戦略に基づき新たなマウスを作成するためのコンストラクションを作成した。この系が *in vitro* で正しく機能することを確認するために必要な基質となるコンストラクションも作成し、*in vitro* での確認作業を進めている。実験系が動くことが確認でき次第、遺伝子改変マウスを作出し、昨年度作出した遺伝子改変マウスと交配して再度解析を行い、データを取得していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murashima-Suginami A., Kiso H., Tokita Y., Mihara E., Nambu Y., Uozumi R., Tabata Y., Bessho K., Takagi J., Sugai M., Takahashi K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Anti-USAG-1 therapy for tooth regeneration through enhanced BMP signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabf1798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abf1798	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 菅井 学、南部 由希子	4. 巻 70
2. 論文標題 免疫とミトコンドリア機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 114 ~ 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.2425200965	査読の有無 無
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 Mishima Sayaka, Takahashi Katsu, Kiso Honoka, Murashima-Suginami Akiko, Tokita Yoshihito, Jo Jun-ichiro, Uozumi Ryuji, Nambu Yukiko, Huang Boyen, Harada Hidemitsu, Komori Toshihisa, Sugai Manabu, Tabata Yasuhiko, Bessho Kazuhisa	4. 巻 11
2. 論文標題 Local application of Usag-1 siRNA can promote tooth regeneration in Runx2-deficient mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-93256-y	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
---------	---------