

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16641

研究課題名(和文)細菌感染症における新規細胞群自然免疫細胞様CD8+ T細胞の生理的役割について

研究課題名(英文)Characterization of a novel innate immune cell-like CD8+ T cell in bacterial infection

研究代表者

大坪 亮太(Otsubo, Ryota)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 感染症制御プロジェクト・プロジェクト研究員

研究者番号：90794222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：感染症からできるだけ早くに回復するためには、非特異的に病原体を除去する自然免疫から特異的に除去する獲得免疫への橋渡しを効率的に行う必要がある。本申請研究において細菌感染マウスモデルを使い、新規自然免疫細胞様CD8+ T細胞の同定に成功した。この細胞群の機能を実験的にブロックすることで、感染症の増悪化及び長期化することが明らかとなった。これらの結果より、この新規細胞群が宿主の免疫システムにおいて橋渡し役として重要な役割を果たし、細菌感染症からの早期回復を促すことを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌感染症において、薬剤耐性菌に対する治療法の確立が急務である。しかし、細菌の感染機構は複雑であり、その治療法の確立は容易な問題ではない。本申請研究で発見した新規自然免疫細胞様CD8+ T細胞は、ヒトに元々備わっている免疫システムの一部である。この細胞群を制御することにより、抗生物質に頼らず、細菌感染症からの早期回復させる可能性があることを示した。

研究成果の概要(英文)：In order to recover from infectious diseases as quickly as possible, it is necessary to efficiently bridge from innate immunity, which removes pathogens non-specifically, to adaptive immunity, which specifically removes pathogens. In the present study, A novel innate immune cell-like CD8 + T cell was successfully identified, using a mouse model of bacterial infection. In addition, it was shown that blocking the function of the novel CD8 + T cells in infection model exacerbates and prolongs the infectious disease. In summary, these novel cells play an important role as the bridge in host immune system, resulting in early recovery from bacterial infectious diseases.

研究分野：細菌感染症

キーワード：細菌感染症 免疫 CD8+ T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

昨今の細菌感染症において、最大の問題の一つに薬剤耐性菌による感染症の拡大がある。薬剤耐性菌感染症に打ち勝つためには、感染症発症機構の解明が重要な要素となる。病原体がどのように生体防御応答である免疫システムから回避するのかを明らかにすることで、治療戦略へと繋がるのが大いに期待される。我々は、以前より赤痢菌感染マウスモデルを用いて、感染機構の解明に注力してきた。申請者は以前、赤痢菌が持つエフェクタータンパクの1つである IpaH4.5 が細胞内に放出されることによりプロテアソームの機能異常が誘導され、外来抗原作出能が低下し、CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化が抑制されることを報告した。その過程で、IpaH4.5 を欠損させた赤痢菌株を使ったマウス感染実験を行ったところ、野生株感染と比べ、症状が軽減し、発症期間も短縮された。さらに、IpaH4.5 欠損株感染において、感染初期、自然免疫系細胞が活性化するタイミングで、感染後期に活躍するはずの獲得免疫系細胞の1つである CD8<sup>+</sup> T 細胞が感染局所に集積することを見出した。これらの結果から赤痢菌感染症の軽減とこの新規自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞の関係を明らかにすることで、細菌感染症の制御機構を明らかにできないかと考えた。

## 2. 研究の目的

赤痢菌感染において、これまで自然免疫系細胞であるマクロファージや好中球の生理的役割について多くの報告がある。しかし、獲得免疫系細胞についての生理的役割についてはまだよくわかっていない。そのため、赤痢菌感染モデルにおいて、IpaH4.5 欠損株感染させた場合、感染 24 時間で局所に集積する新規自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞の特性評価を行う。この研究により、赤痢菌が獲得免疫をどのようにして回避しているかを理解する一端となることが期待される。

## 3. 研究の方法

### 1) 自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞の発現表面マーカーの同定

赤痢菌野生株や IpaH4.5 欠損株をマウス感染させ、感染 16、24 時間における肺、脾臓の CD8<sup>+</sup> T 細胞において細胞表面マーカー T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM3), Killer cell Lectin-like Receptor G1 (KLRG1), B and T lymphocyte attenuator (BTLA), Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4), CD62L, Programmed cell death 1 (PD1), CX3CR1, Natural killer group 2, member D (NKG2D), Granzyme B, IL7Ra, CCR7 と共に細胞内の IFN $\gamma$  と共に染色し、発現量を Flow Cytometer を使って評価した。

### 2) 自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞の機能解析: 増殖能、細胞障害能、および遊走能

IpaH4.5 欠損株もしくは野生株を感染させたマウスより自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞と Effector memory CD8<sup>+</sup> T 細胞の2種の細胞群を単離した。増殖能解析は、赤痢菌に感染させたマウス線維芽細胞を準備し、そこにこれら2種の Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) でラベル化した CD8<sup>+</sup> T 細胞をそれぞれ加え、4日間培養し、Flow Cytometer により CD8<sup>+</sup> T 細胞内の CFSE を測定した。次に、細胞障害能解析については、赤痢菌に感染させたマウス線維芽細胞とともに、これら2種類の CD8<sup>+</sup> T 細胞をそれぞれ共培養し、生存した感染マウス線維芽細胞の数を測定した。最後に、遊走能解析については、2層チャンバーを使い、下層には、リコンビナントケモカイン、もしくは赤痢菌に感染させたマウス線維芽細胞を準備し、上層に自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞、もしくは Effector memory CD8<sup>+</sup> T 細胞を入れインキュベーション

した。下層に移動した CD8<sup>+</sup> T 細胞の数を測定することで評価した。

### 3) 赤痢菌感染における自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞の分布と経時変化

赤痢菌野生株もしくは IpaH4.5 欠損株をマウスに感染させ、感染 8、16、24 時間と感染 4、7 日後の肺内の自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞を含めた CD8<sup>+</sup> T 細胞の分布の経時変化を Flow Cytometer にて評価した。

### 4) 発現表面マーカーに対する抗体処理マウスへの赤痢菌感染実験

1) で決定した自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞の細胞表面マーカーで高発現していた CD8 含め 3 つの細胞表面マーカーについて、これらの抗体を静脈投与し、機能的に欠失させ、赤痢菌野生株に感染させ、生存率を評価した。

### 5) 自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞投与による赤痢菌感染実験

赤痢菌感染 24 時間のマウスにおいて肺、脾臓から CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup> PD1<sup>hi</sup> T 細胞を単離した。それら細胞群を含む PBS もしくは PBS のみを静脈注射により注入し、赤痢菌感染を行った。

## 4. 研究成果

1) の研究により、新規自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞のサブセットを特定することができた。この細胞群の特性としては、感染後期の Effector memory CD8<sup>+</sup> T 細胞に比べて、増殖能は低く、細胞障害能は高く、遊走能は差が認められなかった。さらに、赤痢菌感染マウスにおいて、この細胞群の感染局所での経時的細胞数変化を追ったところ、感染 1 日までにピークを迎え、感染 4 日、7 日と減少していく、短命な細胞群であることがわかった(図 1)。さらに、この新規細胞群で高発現していた 3 種の細胞表面マーカー抗体投与により機能的にブロックした状態で赤痢菌感染実験を行ったところ、生理食塩水投与群と比較して生存率が大きく低下した(図 2)。

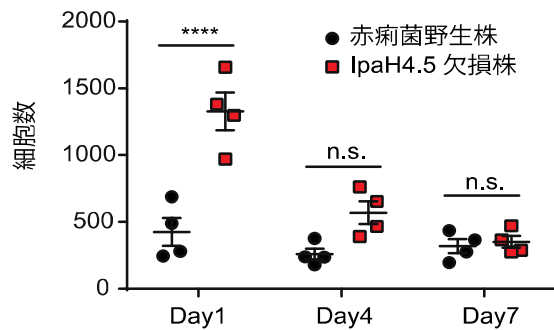


図 1 新規自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞数の経時的変化

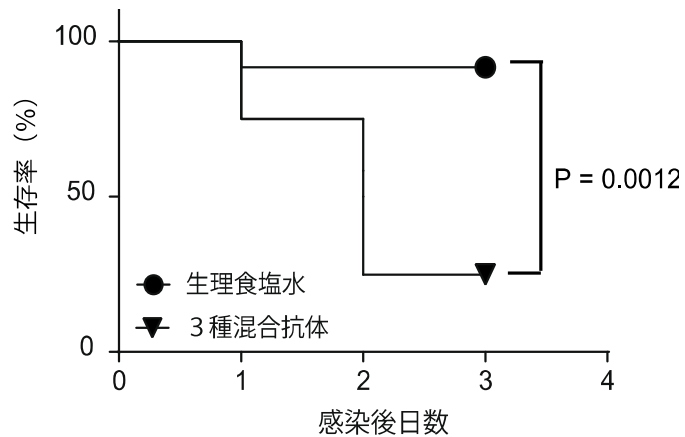


図 2 抗体処理による赤痢菌感染マウスの生存率

一方で、この細胞群を静脈投与した状態で赤痢菌感染実験を行った結果、PBS 投与群に比べて生存率が回復傾向にあった。これらの結果から、新規自然免疫細胞様 CD8<sup>+</sup> T 細胞は、感染初期段階で感染局所に集積し、細胞障害性能により感染細胞を除去し、赤痢菌感染症の増悪化を阻止することができることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kinoshita-Daitoku Ryo, Kiga Kotaro, Miyakoshi Masatoshi, Otsubo Ryota et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 A bacterial small RNA regulates the adaptation of Helicobacter pylori to the host environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22317-7	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 Minamitani Takeharu, Kiyose Karin, Otsubo Ryota, Ito Toshihiro, Akiba Hiroki, Furuta Rika A., Inoue Tsuyoshi, Tsumoto Kouhei, Satake Masahiro, Yasui Teruhito	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel neutralizing human monoclonal antibodies against tetanus neurotoxin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91597-2	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 Ito Toshihiro, Minamitani Takeharu, Hayakawa Masaki, Otsubo Ryota, Akiba Hiroki, Tsumoto Kouhei, Matsumoto Masanori, Yasui Teruhito	4. 巻 11
2. 論文標題 Optimization of anti-ADAMTS13 antibodies for the treatment of ADAMTS13-related bleeding disorder in patients receiving circulatory assist device support	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01696-3	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大坪 亮太
2. 発表標題 How dose Helicobacter pylori evade the humoral immunity?
3. 学会等名 第13回アジュバント研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 大坪 亮太
2. 発表標題 Shigella effector IpaH4.5 targets RPN13 to evade antigen-specific immune response
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大坪亮太、伊藤寿宏、今留謙一、安居輝人
2. 発表標題 包括的血漿プロテオミクス解析によるEBウイルス誘導性B細胞増殖性疾患バイオマーカー探索
3. 学会等名 第34回ヘルペス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Otsubo Ryota, Ito Toshihiro, Yasui Teruhito
2. 発表標題 Comprehensive proteomics analysis for EBV-induced lymphoproliferative diseases
3. 学会等名 EBV2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坪亮太、伊藤寿宏、今留謙一、安居輝人
2. 発表標題 包括的血漿プロテオミクス解析によるEBウイルス誘導性B細胞増殖性疾患バイオマーカー探索
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Otsubo Ryota, Ito Toshihiro, Imadome Ken-Ichi, Yasui Teruhito
2. 発表標題 Comprehensive proteomics analysis of murine and human plasma for EBV-induced lymphoproliferative diseases
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坪亮太、伊藤寿宏、安居輝人
2. 発表標題 ヒト抗破傷風毒素中和抗体とその作用機序
3. 学会等名 第95回 日本細菌学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大坪亮太、安居輝人	4. 発行年 2022年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 炎症と免疫	

〔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
---------	---------