

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2020

課題番号：18H06232・19K21331

研究課題名（和文）二次免疫応答における骨髄血管内皮細胞による記憶T細胞の活性化機構の解明

研究課題名（英文）Cellular mechanisms that controls memory T cells activation in the bone marrow during secondary immune responses.

研究代表者

伊藤 健 (Takeshi, Ito)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：60825941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：感染症の罹患やワクチン接種の後、骨髄では記憶T細胞は長期間に渡って維持される。このT細胞は、同じ病原体に再び遭遇した時に、強く迅速な免疫応答を起こすために必要である。しかし、骨髄は主に血液細胞を産生する臓器であり、そこでどのように免疫応答が引き起こされているか十分に明らかになっていなかった。本研究では、骨髄に存在する血管内皮細胞が血中の可溶性抗原を効率よく取り込み、抗原提示細胞として記憶CD8+T細胞を活性化する機能がある事を明らかにした。今後、この機能が免疫記憶にどのような意義を持っているのかを明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで十分には知られていなかった骨髄における記憶T細胞の活性化機構を、骨髄血管内皮細胞の抗原提示能の発見により明らかにしたものである。本研究が貢献した骨髄における抗原特異的免疫応答機構の解明は、免疫異常が原因とされる造血器疾患（再生不良性貧血・特発性血小板減少性紫斑病）の病態解明に寄与したり、造血器悪性腫瘍に対する免疫療法（CAR-T細胞療法、免疫チェックポイント阻害薬）の効果の増強に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：Memory T cells are maintained in the bone marrow after infection of pathogenic organisms and vaccination. The memory T cells are crucial for efficient secondary immune responses during re-infection of the same pathogens. The bone marrow is widely known as a major hematopoietic organ, and how memory T cells in the bone marrow are activated is not fully understood. In this study, we found that bone marrow endothelial cells have a capacity to incorporate exogenous soluble antigens and cross-present them to memory CD8+ T cells in the bone marrow. In the future, we will clarify biological significance of the antigen cross-presentation capacity in bone marrow endothelial cells.

研究分野：免疫学

キーワード：骨髄 血管内皮細胞 記憶T細胞 抗原提示

1. 研究開始当初の背景

免疫記憶とは、一度感染した病原体に対して、二度目以降の感染においては、その病原体を効率的に排除し、感染を防御するという適応免疫応答の根幹の1つを成す機能である。ナイーブT細胞は抗原刺激を受けた後、一部が記憶T細胞となり、再感染に備えて全身を循環するとともに、何十年にもわたり骨髄で維持される。骨髄は、骨に囲まれ外界から影響を受けにくい臓器であり、また、IL-7やIL-15を産生するストロマ細胞が存在するため、造血幹細胞と同様に記憶T細胞の長期間の維持には適した臓器であると考えられる。

一次免疫応答(初感染)では、ナイーブT細胞は、脾臓やリンパ節においてプロフェッショナルな抗原提示細胞である樹状細胞から抗原提示を受け活性化する。二次免疫応答においては、骨髄中に長期間維持されていた記憶T細胞は再度活性化し、一次応答の時よりも効率的に病原体を排除する。造血臓器である骨髄にはT細胞領域が存在せず、脾臓やリンパ節とは組織学的構造や構成する細胞が異なるため、独自のT細胞活性化機構が存在する可能性がある。しかし、骨の内部にある骨髄は、他の軟組織よりも観察や解析は容易ではなく、骨髄のマクロファージや樹状細胞の抗原提示能について報告はあるものの、いずれも骨髄におけるT細胞の活性化機構を十分に説明するものではなかった。そのため、骨髄中の記憶T細胞がどのように活性化され、全身の感染症の排除に寄与するかは依然として明らかではない。

骨髄には、動脈や中心静脈も存在するが、大部分は骨髄全体に網目のように広がる類洞血管である。この類洞血管内皮細胞は、血液と骨髄実質との境界であり、骨髄で産生された血球は必ずこの類洞血管内皮細胞を超えて血液中に移動する。研究代表者は予備実験において、骨髄の類洞血管が血中の抗原を効率よく取り込む事、取り込んだ抗原をCD8+記憶T細胞に抗原提示し活性化する事を示唆するデータを得ていた。血液に常に接触する血管内皮細胞は、血行性の抗原に暴露されやすく、また、骨髄から血中への血球の移動の制御に適した位置にあるため、記憶T細胞の迅速な活性化機構の主体を担っているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄血管内皮細胞の抗原提示細胞としての役割を解明することにより、二次免疫応答における記憶T細胞の活性化メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)マウスにAlexa488色素標識を行った卵白アルブミン(OVA)を投与し、骨髄中の各分画における分布をフローサイトメトリーおよび免疫組織染色によって観察する。これにより、骨髄における抗原の分布および偏在を明らかにする。

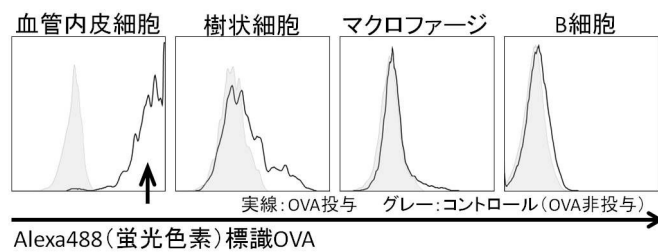
(2)マウス骨髄血管内皮細胞の初代培養系を確立し、マウスの記憶CD8+T細胞と共培養することで、骨髄血管内皮細胞が記憶CD8+T細胞に対して抗原提示能を有する事を明らかにする。同時に、骨髄血管内皮細胞に発現する抗原提示に関わる分子の解析、および交差抗原提示に必要であることが知られている分子のノックアウトマウスおよび阻害薬を用いて樹状細胞における抗原提示機構との相違を明らかにする。

(3)血管内皮細胞にのみMHCクラス1分子を欠損するマウス(Tek-Cre; B2m flox/-マウス)を製作し、in vivoにおける、骨髄血管内皮細胞の抗原提示能の重要性を明らかにする。加えて骨髄血管内皮細胞による記憶CD8+T細胞の活性化が二次免疫応答のどの局面において必要かを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 骨髄血管内皮細胞は、血中の可溶性抗原を効率よく取り込む。

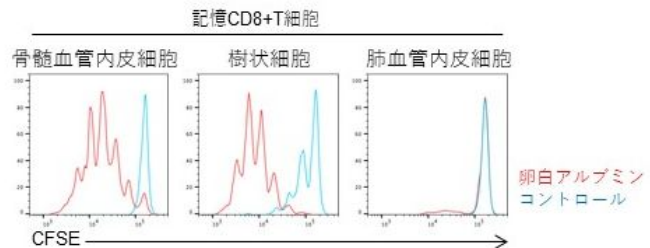
Alexa488 色素標識を行った OVA をマウスに静脈投与し、骨髄中の各分画における Alexa488 のシグナル強度をフローサイトメトリー法において測定した。骨髄血管内皮細胞における Alexa488 のシグナル強度は、既知の抗原提示細胞と比較し著しく高値であった。この事より、骨髄において血管内皮細胞は血中の可溶性抗原を効率よく取り込む機能がある事が明らかになった。



Alexa488(蛍光色素)標識OVA
骨髄中の各細胞のOVAの取り込み能のFACS解析結果 (*in vivo*)。標識OVAのシグナルは血管内皮細胞において最も高い(矢印)

(2) 骨髄血管内皮細胞は、記憶 CD8+T 細胞に対して抗原提示を行う。

マウス骨髄の血管内皮細胞の、初代培養系を確立し、OVA と共培養する。その後、CFSE 染色した OT-I マウス (OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス) 由来記憶 CD8+細胞と 3 日間共培養する。この時、記憶 CD8+T 細胞では、樹状細胞と培養した時と同様に CFSE 色素の希釈を認めるが、肺の血管内皮細胞と培養した場合や、OVA を添加しない場合は、CFSE 色素の希釈は認めない (右図)。この事より、骨髄の血管内皮細胞は、樹状細胞と同様に OVA を取り込み、記憶 CD8+T 細胞に抗原提示を行い、記憶 CD8+T 細胞の増殖を誘導していることが明らかになった。



(3) 骨髄血管内皮細胞は、*in vivo*において、記憶 CD8+T 細胞に対して抗原提示を行う。

Tek-Cre; B2m flox/-をレシピエントして、野生型マウスの骨髄を移植すると、血管内皮細胞のみに MHC クラス 1 分子を欠損するマウスを得る事ができる (B2m EC マウス)。このマウスにおいて、OT-I 由来記憶 CD8+T 細胞を作製し、OVA 投与後に記憶 CD8+T 細胞が活性化するかどうかを評価した。骨髄中の記憶 CD8+T 細胞における活性化マーカーである CD69 の発現は、B2m EC マウスにおいて、コントロールマウスと比較し低下していた。このことから、骨髄血管内皮細胞は *in vivo*でも記憶 CD8+T 細胞に抗原提示を行う事ができる事が明らかになった。

上記(1)(2)(3)の結果により、高い抗原取り込み能を有する骨髄血管内皮細胞は *in vivo* および *in vitro*いずれにおいても交差抗原提示能を有する事が明らかになった。この事は、骨髄血管内皮細胞における交差抗原提示能を初めて明らかにするものであり、骨髄においては、脾臓やリンパ節とは異なる CD8+T 細胞の活性化機構が存在する事を示すものである。今後、この特異な抗原提示機構が二次免疫応答のどの局面で特に重要であるかを明らかにしたい。

(4) 骨髄血管内皮細胞はエリスロポエチン刺激によって免疫複合体の除去能を獲得する

研究代表者は、上記より派生した研究によって、骨髄血管内皮細胞は血中の可溶性抗原だけでなく、免疫複合体も取り込み得る事を明らかにした。研究結果の概要は下記の通りである。

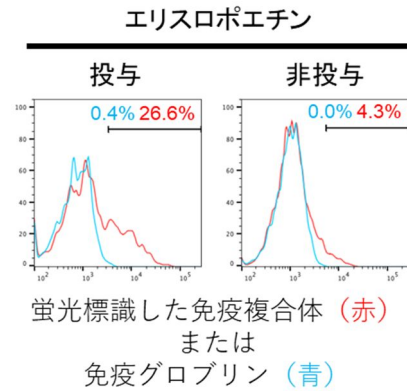
骨髄の血管内皮細胞は Fc 受容体 IIb を発現する。

エリスロポエチン刺激によって骨髄血管内皮細胞における Fc 受容体 IIb の発現が亢進する。

骨髄血管内皮細胞は、エリスロポエチン投与によって免疫複合体を取り込む機能を獲得する（右図）

エリスロポエチンは、血中の免疫複合体の取り込みを促進する。

本研究結果は、造血臓器である骨髄の血管内皮細胞が、エリスロポエチン刺激を受けて、免疫複合体を取り込む機能を獲得することで、免疫複合体の除去を促進する事を示すものである。本研究は、骨髄が血管内皮細胞の働きを介して免疫応答を制御するという新しい機能を示し、過剰な免疫複合体の産生が引き起こす自己免疫疾患の病態解明や、新しい治療法の開発のための新たな基礎的知見を加えるものである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Ito Takeshi, Kometani Kohei, Minato Nagahiro, Hamazaki Yoko	4. 巻 205
2. 論文標題 Bone Marrow Endothelial Cells Take Up Blood-Borne Immune Complexes via Fc Receptor 11b2 in an Erythropoietin-Dependent Manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2008 ~ 2015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1901101	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 Nagatake Takahiro, Zhao Yan-Chun, Ito Takeshi, Itoh Masahiko, Kometani Kohei, Furuse Mikio, Saika Azusa, Node Eri, Kunisawa Jun, Minato Nagahiro, Hamazaki Yoko	4. 巻 33
2. 論文標題 Selective expression of claudin-5 in thymic endothelial cells regulates the blood-thymus barrier and T-cell export	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 171 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa069	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi Ito, Nagahiro Minato, and Yoko Hamazaki
2. 発表標題 Bone marrow endothelial cells induce rapid activation of memory CD8+ T cells by cross-presentation of blood-borne antigens.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Ito, Nagahiro Minato, and Yoko Hamazaki
2. 発表標題 Bone marrow endothelial cells induce rapid activation and persistent proliferation of memory CD8+ T cells by cross-presentation of blood-borne antigens
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference Stromal Cells in Immunity and Disease (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤健、湊長博、濱崎洋子
2. 発表標題 骨髄血管内皮細胞は交差抗原提示により記憶 CD8+ T 細胞を迅速かつ持続的に活性化する
3. 学会等名 第 7 2 回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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