

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22507

研究課題名(和文) 乳腺上皮間リンパ球による新規母子免疫機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of mammary intraepithelial lymphocytes

研究代表者

新田 剛(Nitta, Takeshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：30373343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、授乳期のマウスの乳腺上皮細胞の間に特殊なリンパ球が多く存在することを見出し、「乳腺IEL (intraepithelial lymphocyte)」と名づけ、その性状と機能の解明を目的として研究を行った。乳腺IELはCD8 T細胞とgdT細胞からなり、リンパ組織中のT細胞や腸管IELとは異なるエフェクター分子やサイトカイン受容体、ケモカイン受容体の発現パターンを示した。また、多くのNK細胞受容体を高発現しており、新規のNKT細胞集団であることがわかった。乳腺IELに高発現するエフェクター分子GranzymeA/B/Cを欠損するマウスを作製し、表現型解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳腺における免疫機構は、新生児の免疫系の構築や腸内細菌の制御の観点から重要であるが、先行研究が少なく、免疫細胞や遺伝子に関する基盤情報も限られている。本研究では、マウス乳腺に局在する乳腺IELを同定し、その調製・単離法を確立するとともに、高解像度の遺伝子発現データを取得した。乳腺IELは他の免疫細胞とは異なる特徴をもつ、新規のNKT細胞サブセットとわかった。また、乳腺IELによって産生され乳中に放出されるGranzyme分子群の欠損マウスを作製した。本成果は、乳腺の免疫系に関する研究資源を整備した学術的意義だけでなく、乳児の疾患治療と予防のための基盤知識の拡充につながる社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The epithelial layers of the mammary gland contain unique lymphocytes, which we call mammary intraepithelial lymphocytes (mIELs). In this study, we aimed to provide better cellular and molecular characterization of these mIELs. mIELs were comprised of unique types of CD8 T cells and gdT cells, both of which exhibit distinct gene expression profiles of effector molecules, cytokine receptors, and chemokine receptors, compared with other T cell types or intestinal IELs. mIELs also express many NK cell receptors, indicating that they are a novel type of NKT cells. We generated mice lacking Granzyme A/B/C, candidate effector proteins expressed in mIELs, and are conducting phenotyping analysis of these mice.

研究分野：免疫学

キーワード：乳腺 T細胞 IEL Granzyme

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体に常在する細菌の研究は、次世代シーケンス技術の向上に伴うメタゲノム解析と無菌動物への細菌移植実験法の確立によって、この十年ほどで飛躍的に進展した。免疫系や神経系を制御する腸内細菌と原因物質が同定され、それらを制御する腸管免疫の理解が進み、様々な疾患に対して糞便移植治療が現実化しつつある。ヒトの腸内細菌叢は乳幼児期に形成され、一生を通して消化、代謝、免疫などの体質を決定づける。新生児は産道や空気のほか、主に母乳を介して細菌群の伝播を受け、適切な腸内細菌叢が形成される。母乳を分泌する乳腺には、他の体組織とは異なる固有の細菌が定着し、乳児の腸内細菌叢に多大な影響を及ぼすと考えられる。しかし、乳腺や母乳中の細菌叢を制御する免疫機構の詳細は明らかになっていない。

また、乳腺にどのような免疫細胞が存在し、組織の維持や母乳成分にどのような影響を与えるのか、についても十分な理解は得られていない。近年、末梢組織や粘膜で機能するユニークな T 細胞サブセットが相次いで報告されている。例えば、 $\gamma\delta$ T 細胞は皮膚、腸管、肺、生殖器、脂肪組織などに局在し、感染防御、炎症、組織の修復や維持といった多様な生理作用をもつ。我々も、炎症性皮膚疾患に関与する $\gamma\delta$ T 細胞の分化制御機構に関する成果を報告してきた。しかし、乳腺に局在する T 細胞については、先行研究では組織学的な観察が主であり、T 細胞サブセットの同定や機能に関する大型研究は報告されていなかった。

そこで、マウスを用いて乳腺組織のリンパ球を対象とする新たな研究に着手した。妊娠後期および授乳期の乳腺上皮細胞の間隙に、特殊な上皮間リンパ球 (intraepithelial lymphocyte, IEL) 「乳腺 IEL」が存在することを発見し、本研究の構想に至った。

2. 研究の目的

マウスをモデル動物として、乳腺 IEL の検出と単離の手法を確立し、遺伝子やタンパク質の発現を指標としてその機能を明らかにする。特に、乳腺 IEL によって産生され乳中に分泌される液性因子に着目し、それらが乳中の成分や細菌叢を制御する可能性を検証する。乳腺 IEL の機能解明を通して、新規の母子免疫機構を明らかにすることを大きな目的とする。

3. 研究の方法

(1) 乳腺上皮間リンパ球 (IEL) の分化と機能を制御する分子機構の解明

妊娠期や授乳期のマウスから乳腺を採取し、Collagenase/Hyaluronidase 処理によって細胞を解離させた後、Percoll 不連続密度勾配遠心分離によって白血球を分離し、フローサイトメトリーにより細胞表面分子やサイトカイン分子の発現を解析した。また、採取した乳腺を PFA 固定した後にコンパウンドに包埋して凍結し、薄切して免疫染色を行い、乳腺 IEL の局在を解析した。さらに、セルソーターによって乳腺 IEL を単離し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。脾臓の T 細胞および腸管 IEL も同様に単離し、RNA-seq 解析により遺伝子発現を比較した。

(2) 乳腺 IEL が産生する乳成分の同定

哺育中の雌マウスに麻酔下でオキシトシンを投与し、搾乳器を用いて乳汁を採取した。遠心分

離により乳汁中の血球細胞を採取し、フローサイトメトリー解析を行った。また、上清を採取し、ELISA によって Granzyme B 濃度を定量した。

(3) 乳腺 IEL が産生する乳成分が新生児の免疫機能に及ぼす影響の解明

CRISPR/Cas9 法により Granzyme A/B/C 欠損マウスを作製した。乳腺 IEL が分化しない TCR β /TCR δ 欠損マウス、および Granzyme A/B/C 欠損マウスを用いて、乳腺の常在細菌叢への影響を調べる計画であったが、2020 年度の研究環境の変化により中断した。

4. 研究成果

(1) 乳腺上皮間リンパ球 (IEL) の分化と機能を制御する分子機構の解明

マウス乳腺リンパ球のフローサイトメトリー解析と組織解析を並行して行い、乳腺 IEL が CD5- CD8+ T 細胞と CD5- $\gamma\delta$ T 細胞であることを確認した。末梢リンパ組織や腸管の T 細胞と比較したところ、乳腺 IEL は NK1.1 を高発現することがわかった。以後、乳腺に存在する CD5- NK1.1+ CD8+ T 細胞および CD5- NK1.1+ $\gamma\delta$ T 細胞を乳腺 IEL と定義し解析を進めた。このような表面マーカーをもつ T 細胞は、雄マウスや非妊娠状態の雌マウスの乳腺および血液中には検出されなかった。また、乳腺 IEL は妊娠 15 日目に出現して急激に増加し、出産直後にピークを迎え、離乳後に急激に減少することがわかった。

出産直後の乳腺 IEL を単離して RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。また、脾臓と腸管から CD8+ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞を単離して同様に RNA-seq を行い、比較対象として用いた。乳腺 IEL は脾臓の T 細胞群とは異なり、腸管 IEL に近い遺伝子発現パターンを示した。具体的には、Granzyme A/B/C の高発現、ケモカイン CCL3, CCL4, CCL5 の高発現、ケモカイン受容体 CCR7 や S1P 受容体 S1PR1、IL7R の低発現が特徴であった。一方、乳腺 IEL は多くの NK 細胞受容体遺伝子 (Klra1, Klra3, Klra7, Klrb1c, Klrc1 など) を高発現しており、これは腸管 IEL にはみられない特徴であった。従って、乳腺 IEL は NKT 細胞の一種と定義できる。通常の NKT 細胞との比較を行うために、GEO データベースより胸腺 NKT 細胞の RNA-seq データ (GSE74594) を入手し、我々のデータと統合した。結果、乳腺 IEL は通常の NKT 細胞とはケモカイン受容体やサイトカイン受容体の発現が大きく異なっており、新規の NKT 細胞集団と位置づけるべきと考えられた。

乳腺 IEL の由来として、(i) 乳腺組織に局在する前駆細胞が妊娠に伴って分化する可能性と、(ii) 末梢のリンパ球が乳腺に移動して乳腺 IEL へと分化する可能性が考えられる。乳腺 IEL のなかの $\gamma\delta$ T 細胞を詳しく調べたところ、ほとんどが TCR-V γ 4 および TCR-V γ 7 を発現していた。V γ 4 $\gamma\delta$ T 細胞は血液中やリンパ組織中に多く、V γ 7 $\gamma\delta$ T 細胞は腸管に限局して存在する。したがって、乳腺 IEL の $\gamma\delta$ T 細胞はこれらの組織から移動してきた可能性が考えられた。上記 (ii) の可能性を検証するために、野生型マウスの脾臓 T 細胞を TCR β /TCR δ 欠損 雌マウスに移入し、その後妊娠させることで、移入された末梢 T 細胞が乳腺 IEL に変化するかどうかを調べる実験を行った。しかし、2020 年度に研究活動が制限されたことにより、本実験を中断し、成果を得ることはできなかった。

(2) 乳腺 IEL が産生する乳成分の同定

(1)の RNA-seq 解析により、乳腺 IEL (CD8+ T 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞) は、Granzyme A (GzmA),

GzmB, GzmC をきわめて高いレベルで発現することがわかった。また、フローサイトメトリー解析により、乳腺 IEL は GzmA、GzmB タンパク質を恒常的に発現することが示された。GzmA、GzmB の恒常的な発現は、腸管 IEL にもみられたが、脾臓の T 細胞には検出されなかった。

授乳期マウスの乳腺を対象として免疫組織染色を行い、乳腺 IEL が GzmA と GzmB を発現することを確認した。GzmA と GzmB は、乳腺上皮の間隙に存在する乳腺 IEL によって特異的に産生され、管腔側に放出される像が観察された。マウスの乳を採取して ELISA 解析を行ったところ、GzmB が高濃度（平均 40ng/mL）で含まれることがわかった。これは、抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で 2 日間刺激した脾臓 CD8 T 細胞の培養上清中の GzmB 濃度と同程度であった。授乳期マウスの血清についても ELISA 解析を行ったが、GzmB は全く検出されなかった。また、乳中のリンパ球を回収してフローサイトメトリー解析を行ったところ、それらは乳腺 IEL とは異なり、末梢血中の CD4 T 細胞や CD8 T 細胞と同様の表面マーカー発現を示し、GzmA と GzmB の発現もみられなかった。

したがって、乳腺 IEL は妊娠後期以降に乳腺組織の発達に伴って出現し、乳中に Granzyme 分子群を放出することが明らかになった。Granzyme 分子群はセリンプロテアーゼの一種であり、標的細胞のアポトーシス誘導、細菌の殺傷 (Walch et al, *Cell* 2014)、損傷治癒や炎症に寄与する (Boivin et al, *Lab Invest* 2009; Joeckel & Bird, *Biol Chem* 2014) ことが報告されている。乳腺 IEL が産生する Granzyme 分子群は、乳腺上皮細胞の維持や、乳中の細菌叢の制御に寄与する可能性が考えられた。

(3) 乳腺 IEL が産生する乳成分が新生児の免疫機能に及ぼす影響の解明

乳腺 IEL によって産生される Granzyme 分子群の役割を調べるため、GzmA、GzmB、GzmC を同時に欠損するマウスを作製した。GzmA はマウスの 13 番染色体、GzmB と GzmC は 14 番染色体上に隣り合って存在する。それぞれの遺伝子のコーディング領域中の標的配列を認識する 3 種類の sgRNA を設計し、Cas9 mRNA とともに C57BL/6 マウス受精卵にインジェクションし、偽妊娠 ICR マウスに移植した。生まれたファウンダーマウスからゲノム DNA を採取して PCR スクリーニングを行い、GzmA 遺伝子のフレームシフトおよび GzmB-GzmC 間の欠失をもつ個体を得た。また、末梢血 T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で刺激してフローサイトメトリー解析を行い、GzmA と GzmB のタンパク質発現が失われていることを確認した。この個体を野生型マウスと交配したのち、兄妹交配によって繁殖させ、Granzyme A/B/C 欠損マウスとして系統を樹立した。

Granzyme A/B/C 欠損マウスでは、胸腺や脾臓における T 細胞数は正常であった。乳腺 IEL の分化および乳腺の形成、乳中の細菌叢への影響については、今後の課題である。

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 Muro Ryunosuke, Takayanagi Hiroshi, Nitta Takeshi	4. 巻 2111
2. 論文標題 Retroviral Gene Transduction into T Cell Progenitors for Analysis of T Cell Development in the Thymus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 193 ~ 203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0266-9_16	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 Asano Tatsuo, Okamoto Kazuo, Nakai Yuta, Tsutsumi Masanori, Muro Ryunosuke, Suematsu Ayako, Hashimoto Kyoko, Okamura Tadashi, Ehata Shogo, Nitta Takeshi, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Soluble RANKL is physiologically dispensable but accelerates tumour metastasis to bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 868 ~ 875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42255-019-0104-1	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryunosuke Muro, Takeshi Nitta, Hiroshi Takayanagi
2. 発表標題 Molecular mechanism of Syk-mediated TCR signal in gdT cells
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科 免疫学 高柳研究室 研究内容
<http://osteimmunology.com/research.html>

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
研究協力者	岡村 匡史 (Okamura Tadashi) (00333790)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・実験動物管理室長 (82610)	

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