

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20790369  
 研究課題名 (和文) 反復感染応答におけるメモリーCD8陽性T細胞集団の老化と維持機構に関する研究  
 研究課題名 (英文) Senescence and maintenance mechanism of antigen-specific CD8+ T cells upon repetitive antigenic challenges.  
 研究代表者  
 倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)  
 東京大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：00396722

## 研究成果の概要 (和文)：

様々なサブセットから構成される抗原特異的 CTL を、感染応答の回数によって分類する新しい視点から、細胞性免疫記憶の老化現象を解析し、抗原特異的 CTL 応答の維持機構を解明することを目的とした。樹立した memory CTL 老化モデルを用いて naïve CD8、一次、二次 memory CTL を分取し、包括的遺伝子発現解析を行った。反復感染応答による memory CTL の老化現象は、慢性感染症時に見られる exhaustion とは異なる状態であると推察された。

## 研究成果の概要 (英文)：

Although it is suggested that the nature of memory CTL changes over repeated antigenic challenges, molecular characteristics of distinct memory CTL with different number of antigen experience are largely unknown. In this study, we analyzed genome wide transcriptome of primary and secondary memory CTL using a next-generation DNA sequencer. Memory CTL changes molecular signature as they experience the responses and memory CTL senescence differs from exhaustion.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫記憶、老化、CD8 陽性 T 細胞、二次リンパ組織

## 1. 研究開始当初の背景

CTL は、非自己抗原を認識して感染症や腫瘍のコントロールに重要な役割を果たす。抗

原特異的 CTL 応答は、急性感染症において、時間に主軸をおくと大きく分けて naïve → priming & expansion → effector →

contraction → memory というステージを経過する。生体に侵入した病原体を排除した effector CTL は contraction によりピーク時の 10% 以下の細胞数へ減少し、memory CTL となる。memory CTL は二次リンパ組織を中心に存在し、個体の再感染時には再度 priming されてメモリー応答が生じるが、このメモリー応答は naïve CD8 陽性 T 細胞が活性化されて形成するプライマリー応答と比べて、より早期に強力に分裂を開始することで最終的に個体防御を達成する(免疫記憶の本質)。同一病原体の二次感染において抗原特異的 CTL 応答は、その大半が二次感染時に既に存在する memory CTL(メモリー応答)で構成されるものの、少量ではあるが新規に naïve CD8 陽性 T 細胞が活性化されたプライマリー応答が含まれる。(両者が同時期に同一個体内で共存している)

研究代表者は、このプライマリー応答に着目し、個体レベルにおいて繰り返し同一抗原による免疫応答が生じると、次々と動員されるプライマリー応答由来の細胞によって、抗原特異的 CTL 集団が細胞数のみならず TCR レパトア多様性についても維持されていることを明らかにした。(Int. Imm. 2007.19:105) ある特定の抗原に対する抗原特異的 CTL 集団に限定しても、抗原特異的 CTL が priming の時期からして異なる様々な集団で構成されていることを示すことができ、memory CTL の分類及び維持に「抗原応答経験回数」という新しい概念を導入することができた。

しかし、反復感染刺激下における細胞性免疫記憶の老化現象については、一度樹立された memory CTL がどのように「老化」していくのか、いつ・どのようにして「より若い」memory CTL に交代していくのか、その詳細な機序は不明である。ある特定の抗原に应答する抗原特異的 CTL 集団は、両者の総和として捉えることができるが、その CTL 集団の応答能は個体レベルでどのように担保されているのか、即ち「免疫記憶の維持」という根源的な問題が残されている。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究提案では、この細胞性免疫記憶の老化と交代現象を、老化する memory CTL の内因的な変化を細胞生物学的・分子生物学的に解析する方法と、さらに個体レベルにおいて若い memory CTL との競合・補完・交代という現象を細胞免疫学的・組織学的に解析する方法を用い、この二つのアプローチから、個体システムとして抗原特異的 CTL 集団の維持機構を明らかにすることを目的とした。

### 1) 細胞生物学的・分子生物学的手法による老

化 memory と若い memory の質的な差に関する検討

老化 memory CTL 内因的に生じている変化を、遺伝子レベル・細胞レベルで明らかにするため、既知の一般的な細胞死(アポトーシス)・細胞老化関連マーカーの確認および遺伝子発現プロファイル作成による新規マーカーの探索、Flow-FISH 法によるテロメア長の比較などを行う。有意な差が認められたものについて詳細に検討し、診断への応用や既存 memory CTL の寿命を延長することが可能かどうか検討する。CTL 機能の変化についても解析する。

### 2) 老化 memory と若い memory の体内存在部位、反復応答時における priming 差に関する検討

組織(臓器)間あるいは組織内における局在差や他の免疫担当細胞との細胞クラスター形成能にも原因がある可能性があるため、組織レベル・個体レベルでも詳細に検討する。「どのような時に」「どのようにして」交代が生じるのか、交代現象の詳細な動態を細胞免疫学的・組織学的手法により解析する。

### 3. 研究の方法

本研究では均質な memory CTL を、抗原(感染応答)経験回数を明確に区別しつつ安定的かつ効率的に一定数得る必要があり、T 細胞受容体トランスジェニック(TCR Tg)細胞を養子移入して感染刺激を加える実験系を用いた。連続養子移入および感染刺激により、若い memory CTL に取って代わられるような「老化」した memory CTL を作出した。両者の質的な差に関して細胞死・細胞老化関連マーカーを中心に解析し、さらに老化 memory CTL の新規マーカーを探索するために naïve CD8 陽性 T 細胞を含めて遺伝子発現解析を行った。別のアプローチとして、老化 memory CTL と若い memory CTL の体内存在部位や反復応答時における priming 差に関して検討し、memory CTL 交代現象の詳細な細胞動態を細胞免疫学的・組織学的手法により解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 基本モデルの樹立

本研究では、同一病原体(抗原)の反復感染において抗原特異的 CTL が感染(抗原)刺激を受けた回数を明確に区別するために、コンジュニクマーカーで区別できる T 細胞受容体トランスジェニック(TCR Tg)細胞を養子移入して、レシピエントマウスに抗原を発現する遺伝子組換え感染因子を接種して免疫応答の解析を行った。具体的には、卵白アルブミン(OVA)特異的 TCR Tg である OT-I マウスから脾細胞を分離調整し野生型マウスに養子移入した。養子移入した翌日に OVA 発現組換

エリステリア菌 (LM-OVA) を尾静注して免疫後 40-50 日以上経過してメモリー期にいたったところで、マウス脾細胞からコンジェニックマーカー (Ly5.1) を用いて memory CTL のみ分離した。分離した memory CTL は一部を次のレシピエントマウスに養子移入し、翌日に LM-OVA を感染させた。この養子移入と感染刺激を連続して繰り返すことにより、1 回感染応答を経験した一次 memory CTL、2 回経験した二次 memory CTL、3 回経験した三次 memory CTL を樹立した。老化した memory CTL を養子移入する際に、若い memory CTL を少量混合し、次の感染刺激を加えた際に若い memory CTL が老化した memory CTL を凌駕する状態を作出した。これにより分裂応答能が减弱した老化 memory CTL を安定的に作出し、種々の解析が可能なモデルを作成した。

### (2) 遺伝子発現解析による memory CTL 老化現象の解析

樹立した memory CTL 老化モデル用いて naïve CD8 一次、二次 memory CTL を分取し、次世代 DNA シークエンサーと研究代表者が所属する東京大学分子予防医学研究室にて開発された SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法 (Nature Biotechnology, 2004) を用いて、包括的遺伝子発現解析を行った。各ライブラリーから 300 万タグ以上の遺伝子発現断片を解析し比較したところ、合計で 12090 種の遺伝子が検出された。このうち一次 memory と二次 memory を比較すると、二次 memory で二倍以上発現が増加したのは 1303 個、二倍以上低下したのは 976 個であった。慢性感染症時などに発現が亢進する PD-1 や CTLA-4 などの抑制性受容体は二次 memory では増加を認めなかったが、p21 や KLRG-1 などの老化関連遺伝子の発現が増加していた。このため、反復感染応答による memory CTL の老化現象は、慢性感染症時に見られる exhaustion とは異なる状態であると推察された。

### (3) 一次 memory と二次 memory の細胞免疫学的解析

一次メモリーでは CD62L<sup>hi</sup>CCR7<sup>hi</sup> のいわゆるセントラルメモリー (TCM) 様であり、二次および三次メモリーでは CD62L<sup>lo</sup>CCR7<sup>lo</sup> のエフェクターメモリー (TEM) 様であった。またその他の CTL 表面マーカーである CD127 や KLRG-1、IFN $\gamma$  と TNF と IL-2 を指標にしたサイトカイン産生能などと組み合わせて判断しても、一次メモリーは TCM、二次メモリー以降は TEM 指向が強かった。同一個体内で異なる抗原経験回数の memory CTL の次感染応答 (分裂能) を競合的環境下で解析すると、一次メモリーは naïve と同等の分裂能を示すが、二次・三次と進むに従って分裂予備能が低下し、より

若い memory CTL によって置換されることが確認された。

### 今後の展望

従来の CTL 研究は、とりわけ我が国では、主に naïve CD8 陽性 T 細胞が活性化されて effector CTL に移行する一次応答に焦点が当てられてきたが、免疫記憶の本質は一度曝露されて記憶している抗原に対してどのように反復応答が担保されて最終的に個体防御を達成するかであり、この現象を応用した予防ワクチンは史上最も人類福祉に貢献している科学技術知見の一つといえよう。従って、個体レベルで免疫記憶 (反復応答) がいかにして維持されているかということにもっと比重をおいた研究アプローチが必要である。本研究は、生涯レベルの長期時間軸に複数回の感染を経験する環境下で、個体レベルで抗原特異的 CTL の興亡の調節維持機構 (ダイナミズム) を明らかにしようとする独創性に富むものであり、感染症疾患モデルマウス解析による細胞・個体レベルでの炎症・免疫学を展開できる高い成長可能性をもつ。

反復感染応答における抗原特異的 CTL 応答の老化現象と維持機構を解明することは、通常のワクチン接種で用いられている primer-boost 法を最適化させて、より効率的な予防ワクチンの開発・設計に結実することができる。これに加えて、将来的には、既に発症した感染症・腫瘍のコントロールを目的とした治療 CTL ワクチンの開発など、難治疾患の制御につながる重要な研究であり、新興感染症を含めた感染免疫学・腫瘍免疫学の新しい展開に大きなインパクトをもたらすことができる。我が国は急速に高齢化社会に突入しており、今後ますます増加が確実視される国民医療費を可能な限り抑制する社会的要請があり、予防医学への重点対応が望まれている。高齢者では一般に免疫力が低下することが知られているが、本研究の成果は生涯に複数回の感染刺激を受けているであろう高齢者の免疫記憶の維持や回復にも応用が期待される。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Shono Y, Kurachi M, et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche following MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. 査読有、Blood. 2010. In press (掲載確定)

[学会発表] (計 2 件)

① 倉知 慎、他、メモリーCTL の老化に伴う  
遺伝子発現解析、第 39 回日本免疫学会総  
会・学術総会、平成 21 年 12 月 3 日、大阪  
(グランキューブ大阪)

② 倉知 慎、他、Primary memory CTL  
preferentially accumulate in secondary  
lymphoid organs、第 38 回日本免疫学会総  
会・学術総会、平成 20 年 12 月 2 日、京都  
(国立京都国際会館)

[その他]

ホームページ等

<http://www.prevent.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00396722

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし