

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03464

研究課題名（和文）胸腺を起点とした生体内恒常性維持制御の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of immune homeostasis originating from the thymus

研究代表者

木村 元子（KIMURA, Motoko）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：00345018

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：制御性T細胞やアゴニスト選択によって分化誘導される自然免疫型T細胞群は、自己免疫疾患制御、生体の恒常性維持、がん免疫、各種炎症反応等に重要な働きをすることが知られているが、その分化機構、各種サブセットの存在、機能の詳細は不明点が多い。本研究では、白血球の活性化マーカーとして知られてきたCD69分子に着目し研究を進めた。CD69は制御性T細胞や自然免疫型T細胞の分化、機能を制御していることを明らかにした。またT細胞上のCD69の発現は組織の恒常性維持機構や抗腫瘍免疫応答に関わることも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制御性T細胞や自然免疫型T細胞（NKT細胞、 $\gamma\delta$ T細胞など）は、感染に対する免疫応答や抗腫瘍免疫応答に働くだけでなく、組織の恒常性維持に寄与することが明らかとなってきた。本研究では、CD69分子が、これらの細胞の分化・維持・機能を制御することを見出した。この事実は、将来的に、ヒトの炎症性疾患や腫瘍に対する新たな治療法開発に貢献できる可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：Regulatory T cells and Innate-like T cells that are differentiated by the thymic agonist selection such as natural killer T cells and  $\gamma\delta$  T cells, are known to play important roles in regulating autoimmune diseases, tissue homeostasis, cancer immunity, and various inflammatory responses. However, the details of their subsets, differentiation mechanisms, and functions remain unclear. In this study, we focused on the CD69 molecule, which has been known as an activation marker of leukocytes, and found that CD69 regulates the differentiation and function of the regulatory T cells and innate-like T cells. CD69 expressed by T cells was found to be involved in tissue homeostasis and anti-tumor immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：制御性T細胞 CD69 T細胞 胸腺 恒常性維持

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

制御性 T (Treg) 細胞の有する免疫抑制能は、自己免疫疾患の発症抑制や生体の恒常性維持に極めて重要である。一方で、Treg 細胞による過剰な免疫抑制は、抗腫瘍免疫応答を減弱させ、がんの成長を促進してしまう。このような生体の様々な免疫応答の局面で働く Treg 細胞には、各種サブセットが存在し、組織特異性があることが明らかとなってきた。しかし、Treg 細胞の組織特異性や、各種 Treg 細胞サブセット分化の分子機構は未だ不明点が多い。

申請者は、CD69 分子に着目した研究を精力的に続けてきた (Hayashizaki, [Kimura et al. \*Sci. Immunol.\* 2018](#), [Kimura et al. \*Immunol. Rev.\* 2018](#), [Kimura et al. \*Semin. Immunopathol.\* 2019](#))。CD69 は、II 型の膜糖タンパク質で、リンパ球の早期の活性化マーカーとして古くから知られてきた分子である。最近では、組織常在性 T 細胞のマーカーとしても広く知られるようになった。CD69 は S1P<sub>1</sub> と直接結合し、その発現を抑制することで、胸腺やリンパ節からのリンパ球の移出を抑制する。また、炎症組織の血管内外に発現する CD69 リガンド、My19/12 (申請者らが同定し世界で初めて報告した, Hayashizaki, [Kimura et al. \*Sci. Immunol.\* 2016](#)) に結合することで、活性化エフェクター細胞を炎症組織内に留める働きをする。つまり CD69 は 'CD69 発現細胞を各組織に留める働きをする' ことがわかってきた。Treg 細胞は恒常的に CD69 を発現していることから、CD69 が Treg 細胞の機能に重要な働きをしている可能性が考えられた。そこで申請者らは、CD69<sup>flox</sup> マウスを新規に作製し、Foxp3YFP-Cre マウスと交配させることにより CD69<sup>TregKO</sup> マウスを樹立した。このマウスは外見上は正常に生育するものの、3-4 ヶ月齢のマウスを解析したところ、肺への激しい細胞浸潤が確認された。同じマウスにおいて皮膚等への炎症はほとんど見られず、組織特異的な自己免疫疾患を発症している可能性が考えられる。一方で申請者らは、CD69 欠損マウスでは、抗腫瘍効果が亢進していることをこれまでに報告した (Mita, [Kimura et al. \*Int. Immunol.\* 2018](#), Outstanding Merit Award 受賞)。その分子機構の一つとして、CD69 を発現する Treg 細胞が、CD69 欠損により腫瘍内に留まれなくなったために、抑制能が解除され、抗腫瘍免疫応答を亢進させている可能性を考えている。

近年の研究結果から、Treg 細胞にはいくつかのサブセットが存在し、それぞれが特定の組織で特異的な免疫応答を担っていることが明らかとなってきた。胸腺内で分化した Treg 細胞は central Treg (cTreg) と呼ばれ、CD44<sup>low</sup>CCR7<sup>hi</sup> の表現系を示す。一方、免疫応答に伴って誘導される effector Treg (eTreg) 細胞は、末梢組織に存在し、組織特異的な免疫抑制能を発揮する。申請者は、免疫応答が生じ得ない '胸腺' にも、eTreg 細胞が存在していることを発見した。実に胸腺内に存在する Treg 細胞の約 20% が、eTreg 細胞であった。しかし、胸腺内 eTreg 細胞がどのように分化し、どのような機能を有しているかは未だよくわかっていない。さらに、アゴニスト選択によって分化した T 細胞群 (*i.e.* NKT, MAIT,  $\gamma\delta$ T 細胞) も、恒常的に CD69 分子を発現しているものが多い。また組織特異性もあることから、CD69 分子の発現による分化・機能制御を受けている可能性が考えられた。事実、申請者は、CD69 に着目して胸腺内 T 細胞分化の研究を行う過程で、NKT2 細胞の胸腺内分化に CD69 が重要な働きをしていることを発見し、NKT 細胞の胸腺内分化に関わる新しい分化機構のモデルを提唱した ([Kimura et al. \*Nat. Commun.\* 2018](#))。また、CD69 欠損マウスでは  $\gamma\delta$ T 細胞の各サブセットの分化に違いが見られることも既に見出している。

### 2. 研究の目的

以上の学術的背景から、'Treg 細胞' 'CD69' '胸腺内アゴニスト選択' という三つのキーワードに基づいて研究を進め、生体の恒常性維持機構と恒常性維持に重要な各種 T 細胞の分化機構と機能についての新規のメカニズム解析を行う。本研究の核心をなす学術的な問いとしては、'Treg 細胞を中心とした生体内恒常性維持機能と胸腺内アゴニスト選択によって分化誘導される各種 T 細胞群の分化機構とその役割とは何か?' を掲げる。

### 3. 研究の方法

(1) Treg 細胞の発現する CD69 分子が胸腺内分化や生体恒常性維持や抗腫瘍免疫応答に果た

## す役割の解明

### Treg 細胞の胸腺内分化における CD69 の役割の解明

CD69 欠損マウスにおける Treg 細胞分化の低下をもたらす分子機構の解析を詳細に進めた。S1P1KO マウスと交配し、S1P1 依存的な制御の関与を検討した。野生型マウスに抗 CD69 抗体を投与することにより、Treg 細胞分化への影響を解析した。胸腺における Treg 細胞分化のどの分化ステージで、CD69 欠損による影響が生じるのかを解析した。

### CD69<sup>TregKO</sup> マウスにおける自己免疫疾患の発症

CD69<sup>flox</sup> マウスを Foxp3YFP-Cre マウスと交配させることにより CD69<sup>TregKO</sup> マウスを樹立した。3-4 ヶ月齢の CD69<sup>TregKO</sup> マウスの各種臓器（肺、肝臓、皮膚など）における炎症の度合いを組織染色を行い解析した。また各組織からリンパ球を採取し、エフェクター T 細胞と Treg 細胞サブセットについて解析した。

### CD69<sup>T-KO</sup> マウスにおける抗腫瘍免疫応答の解析

CD69<sup>flox</sup> マウスを CD4-Cre マウスと交配させることにより CD69<sup>T-KO</sup> マウスを樹立した。CD69<sup>T-KO</sup> マウスに B16-OVA、MC38 腫瘍を移植し腫瘍増大の測定を行った。

## (2) 胸腺内 Treg 細胞サブセットの由来と CD69 欠損による影響の解析

### 胸腺内に存在する Treg 細胞の約 20% を占める eTreg 細胞の由来の解明

胸腺内 eTreg 細胞の出現時期について、週齢の異なるマウスを解析した。末梢組織で分化した eTreg 細胞は胸腺内に戻ってくること、そのような胸腺内 eTreg 細胞は CD73 を発現していることが報告されたことから、CD73 染色によって、胸腺内 Treg 細胞分画と、CD69 欠損による影響について解析した。

### eTreg 細胞と cTreg 細胞による *in vivo* 免疫応答

T 細胞の胸腺から末梢組織への移出には、S1P<sub>1</sub> 発現が重要である。S1P<sub>1</sub> を Treg 細胞特異的に欠損させ、cTreg 細胞が末梢組織に理論上は存在しない S1P<sub>1</sub><sup>TregKO</sup> マウスを作製し解析した。

## (3) 胸腺のアゴニスト選択によって分化成熟する各種 T 細胞の分化機構と機能

CD69 欠損マウスの胸腺、脾臓、リンパ節、腹腔洗浄液、腸管など複数の組織を用いて、 $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの解析を行った。

## 4. 研究成果

第一のテーマについては、CD69 欠損による Treg 細胞の胸腺内分化機構への影響について更なる解析を進め、CD69 欠損が Treg 細胞分化の早い段階で影響をもたらすことを明らかにした。また CD69 欠損による Treg 細胞の分化障害は、S1P1 依存的な機構と非依存的な機構が存在することが示唆された。CD69 抗体投与は Treg 細胞の分化に影響することが明らかとなった。これらの実験結果は、現在、論文としてまとめている。Treg 細胞特異的な CD69 欠損マウスの複数の組織を解析することで、特定の組織に炎症が起こることを発見した。Treg 細胞特異的な CD69 欠損マウスで炎症の見られた組織から Treg 細胞を回収し、scRNA-seq 解析、並びに scTCR-seq 解析を行い、CD69 欠損 Treg 細胞では、特定のクラスターの形成が减弱していることが判明した。その詳細な解析が現在進行中である。抗腫瘍免疫応答に関する研究では、CD69<sup>T-KO</sup> マウスに B16-OVA、MC38 腫瘍を移植したところ、CD69<sup>T-KO</sup> マウスでは腫瘍の増大が抑制されることが判明した。

第二のテーマについては、S1P<sub>1</sub><sup>TregKO</sup> マウスを作製し、複数の組織を解析することで、特定の組織に炎症が起こることを発見した。この結果は、eTreg 細胞と cTreg 細胞の組織特異的な役割があることを示唆するものである。この点について今後さらに解析を進めていく。

第三のテーマについては、CD69 欠損マウスでは、特定の T 細胞サブセットの分化に障害が見られることが判明した。この分化障害は、特定の組織ではなく、全身性に影響があることが判明した。scRNA-seq 解析を行い、CD69 欠損によって影響を受けるサブセットを同定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sarkar Murshed H., Yagi Ryoji, Endo Yukihiro, Koyama-Nasu Ryo, Wang Yangsong, Hasegawa Ichita, Ito Toshihiro, Junttila Ilkka S., Zhu Jinfang, Kimura Motoko Y., Nakayama Toshinori	4. 巻 16
2. 論文標題 IFN suppresses the expression of GF11 and thereby inhibits Th2 cell proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0260204-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0260204	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 該当する
1. 著者名 Nakayama Toshinori, Hirahara Kiyoshi, Kimura Motoko Y, Iwamura Chiaki, Kiuchi Masahiro, Kokubo Kota, Onodera Atsushi, Hashimoto Kahoko, Motohashi Shinichiro	4. 巻 33
2. 論文標題 CD4+ T cells in inflammatory diseases: pathogenic T-helper cells and the CD69/My19 system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 699 ~ 704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab053	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 Yokoyama Masaya, Kimura Motoko Y., Ito Toshihiro, Hayashizaki Koji, Endo Yukihiro, Wang Yangsong, Yagi Ryoji, Nakagawa Tomoo, Kato Naoya, Matsubara Hisahiro, Nakayama Toshinori	4. 巻 11
2. 論文標題 Myosin Light Chain 9/12 Regulates the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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） 10.3389/fimmu.2020.594297	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 該当する
1. 著者名 Suzuki Akane S., Yagi Ryoji, Kimura Motoko Y., Iwamura Chiaki, Shinoda Kenta, Onodera Atsushi, Hirahara Kiyoshi, Tumes Damon J., Koyama-Nasu Ryo, Iismaa Siiri E., Graham Robert M., Motohashi Shinichiro, Nakayama Toshinori	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential Role for CD30-Transglutaminase 2 Axis in Memory Th1 and Th17 Cell Generation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.01536	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 該当する

1. 著者名 Aoki Takahiro, Takami Mariko, Takatani Tomozumi, Motoyoshi Kiwamu, Ishii Ayana, Hara Ayaka, Toyoda Takahide, Okada Reona, Hino Moeko, Koyama Nasu Ryo, Kiuchi Masahiro, Hirahara Kiyoshi, Kimura Motoko Y., Nakayama Toshinori, Shimojo Naoki, Motohashi Shinichiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Activated invariant natural killer T cells directly recognize leukemia cells in a CD1d independent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2223 ~ 2233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14428	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 Angelou Constance C., Wells Alexandria C., Vijayaraghavan Jyothi, Dougan Carey E., Lawlor Rebecca, Iverson Elizabeth, Lazarevic Vanja, Kimura Motoko Y., Peyton Shelly R., Minter Lisa M., Osborne Barbara A., Pobezinskaya Elena L., Pobezinsky Leonid A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Differentiation of Pathogenic Th17 Cells Is Negatively Regulated by Let-7 MicroRNAs in a Mouse Model of Multiple Sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 3125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.03125	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 該当する

1. 著者名 木村元子	4. 巻 82(1)
2. 論文標題 胸腺内 iNKT細胞分化機構とCD69の役割	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 血液内科	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) なし	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 中山俊憲、木村元子、八木良二	4. 巻 -
2. 論文標題 T細胞性免疫のエフェクター - 機能のメカニズム 生体防御におけるT細胞の機能	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 基礎免疫学 原著第6版 - 免疫系の機能とその異常	6. 最初と最後の頁 111-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kimura M., Nasu R., Mita Y., Wang Y., Endo Y., Hasegawa I., Motohashi S., Nakayama T.
2. 発表標題 CD69 regulates anti-tumor immunity
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村元子, 横山将也, 小林弘信, 林崎浩史, 遠藤将大, Wang Yangsong, 長谷川一太, 那須亮, 中山俊憲
2. 発表標題 CD69-MyI9システムと炎症制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村元子
2. 発表標題 多彩な働きをするT細胞の分化・機能と疾患制御
3. 学会等名 第6回 千葉大学 膜タンパク質研究センター × 量子科学技術研究開発機構 量子生命科学研究所 合同勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kimura M.Y., Koyama-Nasu, R., Mita Y., Hayashizaki, K. and Nakayama T.
2. 発表標題 CD69 Biology and Pathology
3. 学会等名 11th International Symposium of IFReC, Immunology at the Forefront (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院 実験免疫学HP  
<https://www.m.chiba-u.jp/dept/experimental-immunology/>

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