

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07556

研究課題名（和文）肺滞在型メモリーCD8T細胞長期維持法の開発

研究課題名（英文）Development of novel cancer immunotherapy by induction of epithelial-tropic CD8 T cells

研究代表者

高村 史記（Takamura, Shiki）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90528564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肺粘膜に定着する滞在型メモリーCD8 T細胞（CD8 TRM）は様々な株のインフルエンザウイルスに対して感染防御効果を示すが、維持期間が他の組織と比較し短い。本研究では肺CD8 TRM維持のを長期化を目指すべく、その分化・維持機構の解明を目的とした。まず、感染初期には肺マクロファージが局所抗原刺激を供給することでTRM分化を促進していることを突き止めた。また、肺CD8 TRMは飢餓時においてもオートファジー非依存的に維持されることを見出した。また、アデノウイルスベクター経鼻接種にて廃墟奥所に長期抗原提示を誘導すると、循環型メモリーが抗原刺激を受け、TRMへと分化し続けることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行のインフルエンザワクチンにより誘導される免疫応答は特定の株に対する全身性抗体反応であり、侵入部位である肺局所での感染防御効果は期待できない。また、パンデミックの要因となる大規模の変異は勿論、季節性インフルエンザウイルス株間にて頻繁に起こる小規模なウイルス表面タンパクの変異にも対応が困難であり、新規ワクチン開発が急務である。感染局所に定着する滞在型メモリーCD8 T細胞（CD8 TRM）は二次感染時に局所にて感染細胞を早期破壊することで防御免疫の最前線を担う。従って、肺粘膜にてCD8 TRMを効果的に分化誘導することが交差反応型ワクチン開発における最重要課題である。

研究成果の概要（英文）：Although tissue-resident memory CD8 T cells (CD8 TRMs) in the lung mucosa confer localized protection against challenges with various strains of influenza viruses, their longevity is shorter than that of other tissues. In this study, we aimed to elucidate the differentiation and maintenance mechanisms of pulmonary CD8 TRMs in order to extend their longevity. First, we found that pulmonary macrophages promote TRM differentiation by providing local antigen stimulation in the early stages of infection. We also found that the lung CD8 TRM is maintained in an autophagy-independent manner even during starvation. We also found that when long-term antigen presentation is induced following intranasal immunization with adenovirus vectors. As a result, circulating memory T cells are continuously activated and differentiate into TRM in the lung. Understanding the mechanisms by which prolonged antigen presentation would help in the development of vaccination strategies to generate long-lived TRM.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶 滞在型メモリー CD8T細胞 ウイルス感染防御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現行のインフルエンザワクチンにより誘導される免疫応答は特定の株に対する全身性抗体反応であり、侵入部位である肺局所での感染防御効果は期待できない。また、パンデミックの要因となる大規模の変異は勿論、季節性インフルエンザウイルス株間にて頻繁に起こる小規模なウイルス表面タンパクの変異にも対応が困難であり、新規ワクチン開発が急務である。一方、抗原特異的 T 細胞はウイルス株間で高度に保存された内部タンパク質を標的とすることで幅広い株に交差反応性を示す。中でも、血流もしくはリンパ組織にて維持される通常の循環型メモリー T 細胞とは異なり、感染局所である粘膜面に定着する滞在型メモリー CD8 T 細胞 (tissue-resident memory CD8 T cell: CD8 T_{RM}) は二次感染時に局所にて感染細胞を早期破壊することで防御免疫の最前線を担う。従って、効果的な肺 CD8 T_{RM} 誘導・維持が新規ワクチン開発の重要な課題である。研究代表者は 2 匹のマウスを外科的に結合するパラビオーシス法 (互いの血管が融合し、循環型メモリー T 細胞が共有される) にて循環型と滞在型 (片方の個体に残る) メモリー CD8 T 細胞を識別することで、肺組織損傷後に形成された修復巣 (二次感染時に最も防御すべき部位) が肺 CD8 T_{RM} 分化・維持の場であることを世界に先駆けて同定し、この部位を Repair-Associated Memory Depot: RAMD と命名した。しかしながら、同部位が早期に消失することで CD8 T_{RM} による防御効果も失われてしまうことも判明した。従って、RAMD にて分化した肺 CD8 T_{RM} をいかに長期維持させるかが今後の研究の焦点となる。

2. 研究の目的

本研究では「肺 CD8 T_{RM} 維持期間の延長」という命題に対し二つのテーマよりアプローチを計る。まず、蓄積部位の主要構成細胞である肺マクロファージ及び樹状細胞の機能及び CD8 T_{RM} 維持に果たす役割を解明することでその代替法もしくは持続・増強法を探る。これに関して、食事療法による粘膜脂質代謝環境変化の影響も検討する。また、研究代表者が新規発見した、既存の T_{RM} 維持における概念を覆す肺 CD8 T_{RM} 増幅現象の誘導機構を解明する。これらを総合して肺 CD8 T_{RM} 長期維持を実現させるための基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者の先行研究にて RAMD 形成期にはマクロファージが、維持期には樹状細胞が主要な修復巣構成細胞であり、それぞれが CD8 T 細胞と共存していることが確認された。従って、これらが CD8 T_{RM} 分化・維持に必要なシグナルを供給し、且つ RAMD 形成・維持にも寄与していると示唆される。本研究では肺マクロファージ及び樹状細胞が RAMD 形成・維持に果たす役割を解明し、その機能を代替もしくは持続・増強することで RAMD を長期維持 (即ち肺 CD8 T_{RM} 長期維持) させるための手法の手がかりを探る。

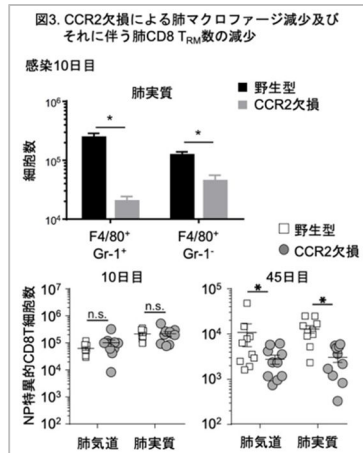
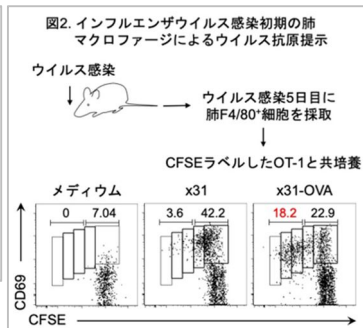
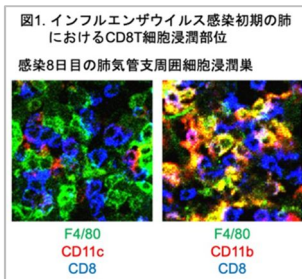
(2) 肺 CD8 T_{RM} が維持される粘膜 (上皮組織) は無血管組織であり、血糖値の変化は肺 CD8 T_{RM} 維持にそれほど影響を及ぼさない。即ち、飢餓状態で循環型メモリーが激減しても RAMD 及び肺 CD8 T_{RM} は維持される。また、肺 CD8 T_{RM} は脂肪酸 (特にパルミチン酸) 取り込み能が強く、しかも、脂肪酸成分は肺気道に豊富に存在するため (サーファクタント等) 脂肪酸が RAMD 及び肺 CD8 T_{RM} の維持に重要な役割を果たしていると予測される。細胞外脂質構成成分は各粘膜面で異なり、その組成 (代謝産物) は供給する餌により変化するため、(1) で得られた成果を基軸とし、肺粘膜脂質環境変化が及ぼす RAMD 構成細胞及び肺 CD8 T_{RM} の生存、維持、機能 (感染防御能) への影響を調べ、肺 CD8 T_{RM} 長期維持に最適な条件を模索する。

(3) 増殖欠損型アデノウイルスベクターの経鼻接種にて感作後数ヶ月経過した肺組織では、通常のインフルエンザウイルス感染マウスと比較し肺 CD8 T_{RM} が劇的に増加していることが確認された。パラビオーシスにてその由来を調べたところ、通常 T_{RM} にはなり得ないパートナー由来の循環型メモリー CD8 T 細胞が宿主肺組織内にて滞在型メモリーに変換され、且つ局所増殖していることが判明した。これは、サイトメガロウイルス持続感染時にみられる、特定のエピトープ反応性メモリー T 細胞が疲弊することなく増殖を続けるメモリーインフレーションという現象と同等の反応が肺局所にて誘導されているものと推測される (CD8 T_{RM} 誘導機構としては未だ報告は無い)。本研究では肺 CD8 T_{RM} インフレーション機構を解明し、維持期間が極めて長い循環型を継続的に滞在型へ変換・増殖させるといった通常起こり得ない機構を利用する逆転の発想で肺 CD8 T_{RM} 長期維持法の確立を目指す。

4. 研究成果

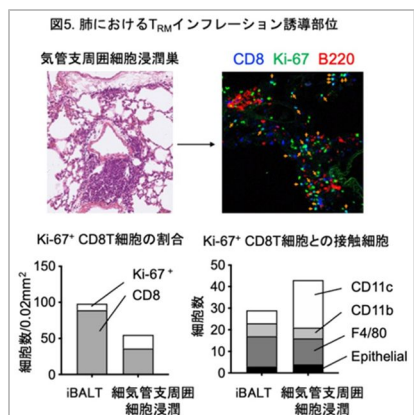
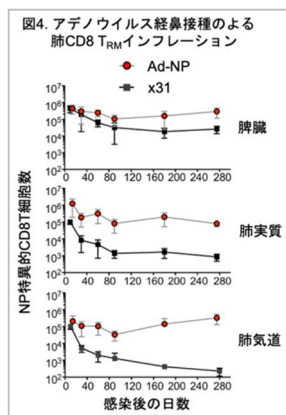
(1) インフルエンザウイルス感染マウスの感染初期の肺の免疫組織化学にて、感染 5 日目ごろから CD8 T 細胞が肺に浸潤し始め、8 日目ごろに RAMD 様構造を形成し始めることがわかった。

この頃の CD8T 細胞の周囲には CD11c 陽性樹状細胞ではなく CD11b, F4/80 陽性の単球由来マクロファージが多数浸潤しており、CD8T 細胞と密接に結合していたことより浸潤 CD8T 細胞の T_{RM} 分化に重要な役割を果たしていることが推測された (図1)。肺 T_{RM} 分化には局所における抗原刺激が重要であるため、ウイルス感染マウス肺より分離したマクロファージの抗原提示能を調べたところ、ウイルス抗原得意的 CD8T 細胞を活性化させる能力を備えていた (図2)。更に、単球が肺に浸潤する際に必須なケモカイン受容体 CCR2 を欠損させると、肺マクロファージ数が劇的に減少し、その結果肺 CD8 T_{RM} 数も激減することがわかった (図3)。このことより、肺マクロファージは感染初期に RAMD にて CD8T 細胞に局所抗原刺激を供給することで T_{RM} 分化を促進していることがわかった (Dunber et al. Mucosal Immunol. 2020)。



(2) 上皮組織は無血管であることより、肺 CD8 T_{RM} の維持におけるグルコース要求性は低いと想定される。その場合、オートファジーが CD8 T_{RM} の維持に寄与している可能性が示唆される。そこで、Atg5 を欠損したオートファジー不全 CD8 T_{RM} の維持を調べたところ、野生型 CD8 T_{RM} と同程度に維持されることがわかり、肺 CD8 T_{RM} の維持にオートファジーは不要であることが判明した。更に、同様の実験を食事制限下で行うと、循環型メモリー CD8T 細胞は激減するものの、Atg5 欠損及び野生型肺 CD8 T_{RM} の数は減少しなかった。このことより、肺 CD8 T_{RM} は飢餓状態においてもオートファジー非依存的に維持されることが判明した。肺 CD8 T_{RM} の維持に脂肪酸の関与が示唆されたため、脂肪酸組成の異なる特殊給餌を与えたところ、必須脂肪酸であるリノール酸を多く含む大豆油餌、α リノレン酸を多く含む亜麻仁油餌の給餌はどちらも肺 CD8 T_{RM} の維持に影響を及ぼさなかった。肺より分離した T_{RM} の脂肪酸取り込み試験ではパルミチン酸の取り込みが顕著であったことより、肺 CD8 T_{RM} のグルコース非依存的維持にはパルミチン酸が大きく関与していることが示唆された。

(3) アデノウイルスベクターを経鼻免疫マウスでは、肺組織限局的に CD8T 細胞が爆発的に増殖し続け、結果、肺 CD8 T_{RM} が長期間維持される (図4)。このことより、アデノウイルスベクターを経鼻免疫マウス肺ではウイルス抗原提示が持続している可能性が示唆された。そこで GFP 発現アデノウイルスベクターを用いてウイルス抗原発現細胞の局在を調べたところ、肺胞に存在する CD11c 陽性細胞 (肺胞マクロファージ) や細気管支上皮細胞及び肺胞上皮細胞にて GFP の発現が認められた。これらの細胞が抗原を長期間提示することで、循環型メモリー T 細胞を活性化し、T_{RM} へと分化誘導していることが示唆された。肺における CD8 T_{RM} インフレーション誘導部位を特定するため、アデノウイルスベクター経鼻免疫マウスの肺を組織学的に調べたところ、免疫後 42 日目においても広範囲にわたり細気管支周囲に細胞浸潤がみられ、異所性リンパ節様構造 (iBALT) の形成も確認された。両部位にて増殖マーカーである Ki-67 発現 CD8T 細胞が確認されたが、その頻度は細気管支周囲細胞浸潤巣にて高かったことより、細気管支周囲細胞浸潤巣が主要な肺 CD8 T_{RM} インフレーション誘導部位であると示唆された。また、この部位に存在する Ki-67 発現 CD8T 細胞の多くが CD11c 陽性樹状細胞、もしくは F4/80 陽性肺間質マクロファージと近接していたことより、これらの細胞集団が局所抗原刺激を供給し、メモリー CD8T 細胞の増殖 (インフレーション) を誘導しているものと示唆された (図5) (Uddback et al. Mucosal Immunol. 2021)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada K, Saito M, Ando M, Abe T, Mukoyama T, Agawa K, Watanabe A, Takamura S, Fujita M, Urakawa N, Hasegawa H, Kanaji S, Matsuda T, Oshikiri T, Kakeji Y, Yamashita K.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Reduced Number and Immune Dysfunction of CD4+ T Cells in Obesity Accelerate Colorectal Cancer Progression.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells.	6. 最初と最後の頁 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac039.	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 Kawasaki T, Ikegawa M, Yunoki K, Otani H, Ori D, Ishii KJ, Kuroda E, Takamura S, Kitabatake M, Ito T, Isotani A, Kawai T.	4. 巻 41(11)
2. 論文標題 Alveolar macrophages instruct CD8+ T cell expansion by antigen cross-presentation in the lung.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 111828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111828.	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 Yoshikawa T, Minaga K, Hara A, Sekai I, Kurimoto M, Masuta Y, Otsuka Y, Takada R, Kamata K, Park AM, Takamura S, Kudo M, Watanabe T.	4. 巻 34(12)
2. 論文標題 Disruption of the intestinal barrier exacerbates experimental autoimmune pancreatitis by promoting the translocation of Staphylococcus sciuri into the pancreas.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 621-634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxac039.	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 Goplen NP, Takamura S Nakayama T, Sun J.	4. 巻 12
2. 論文標題 Editorial: Resident memory T cells Guardians of the balance between local immunity and pathology.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 745256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.745256	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 該当する

1. 著者名 Watanabe A, Yamashita K, Fujita M, Arimoto A, Nishi M, Takamura S, Saito M, Yamada K, Agawa K, Mukoyama T, Ando M, Kanaji S, Matsuda T, Oshikiri T, Kakeji Y.	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Vaccine based on dendritic cells electroporated with an exogenous ovalbumin protein and pulsed with invariant natural killer T cell ligands effectively induces antigen-specific antitumor immunity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14010171	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 Takamura S	4. 巻 12(19)
2. 論文標題 Divergence of tissue-memory T cells: Distribution and function-based classification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cold Spring Harb. Perspect. Biol.	6. 最初と最後の頁 a037762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a037762	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 Uddback I, Cartwright EK, Scholler AS, Wein AN, Hayward SL, Lobby J, Takamura S, Thomsen AR, Kohlmeier JK, Christensen JP	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Long-term maintenance of lung resident memory T cells is mediated by persistent antigen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mucosal Immunol.	6. 最初と最後の頁 92-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-020-0309-3	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 該当する

1. 著者名 Takamura S	4. 巻 32(9)
2. 論文標題 Impact of multiple hits with cognate antigen on memory CD8+ T cell fate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. Immunol.	6. 最初と最後の頁 571-581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa039	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 Hayward SL, Scharer CD, Cartwright EK, Takamura S, Tiger Ii ZR, Boss JM, Kohlmeier JK	4. 巻 21(3)
2. 論文標題 Environmental cues regulate epigenetic reprogramming of airway-resident memory CD8 T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat. Immunol.	6. 最初と最後の頁 309-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-019-0584-x	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 該当する

1. 著者名 Dunbar PR, Cartwright EK, Wein AN, Tsukamoto T, Tiger Ii ZR, Kumar N, Uddback IE, Hayward SL, Ueha S, Takamura S, Kohlmeier JK	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Pulmonary monocytes interact with effector cells in the lung tissue to drive TRM differentiation following viral infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mucosal Immunol.	6. 最初と最後の頁 161-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-019-0224-7	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takamura S
2. 発表標題 Maintenance of tissue-resident memory CD8+ T cells in the lung
3. 学会等名 The 5th Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum "Educating the immune system: Good and bad memory" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takamura S
2. 発表標題 Generation and maintenance of epithelial-tropic CD8+ T cells in the peripheral tissues and tumor
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会総会・学術集会 国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学医学部免疫学教室
<https://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

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	ジェイコブ コーマイヤー (Jacob Kohlmeier)	Professor	
研究協力者	アラン トムセン (Allan Thomsen)	Professor	
研究協力者	國澤 純 (Kunisawa Jun)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・ワクチン・アジュバント研究センター・センター長 (84420)	
研究協力者	長竹 貴広 (Nagatake Takahiro)	明治大学・農学部生命科学科・専任准教授 (32682)	

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			
米国	Mayo Clinic			
米国	エモリー大学			
デンマーク	コペンハーゲン大学			