

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16272

研究課題名(和文)新規の自己反応性T細胞サブセットの同定およびその機能解析

研究課題名(英文)Identifying a novel self-reactive T cell subpopulation and its functional significance

研究代表者

河部 剛史(Kawabe, Takeshi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50834652

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): CD4 T細胞は外来抗原特異的獲得免疫応答における司令塔としての役割を果たすリンパ球であるが、申請者はこの細胞中に、自己抗原認識依存的に産生され病原体感染時には自然免疫機能を発揮しうる新規「MP細胞」を同定した。本研究ではこれに基づき、MP細胞の質的特異性や感染防御機能、さらには自己免疫疾患惹起能を解明することを目的とした。研究の結果、MP細胞は抗原特異的メモリーT細胞とは異なる特有の表現型を有し、定常状態下においてTh1様の「MP1」分画を多く含むことが分かった。MP1の分化機構や機能、炎症惹起能も明らかになりつつある。すなわち、本研究によりMP細胞の特性の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、T細胞は外来抗原特異的獲得免疫応答にのみ寄与するものとされてきたが、本研究により、その一部の細胞集団「MP細胞」が自然免疫の様式にて感染防御に寄与することが明らかになった。本研究成果は、従来の古典的T細胞免疫学の理解に一石を投じるものである。今後、MP細胞の自然免疫機能や炎症惹起能を細胞・分子レベルで解明することにより、新規抗感染症治療戦略の提唱や自己免疫・炎症性疾患に対する根治的治療法の創出にも結び付くものと期待される。

研究成果の概要(英文): CD4 T lymphocytes are essential for useful adaptive immune responses. Among CD4 T cells, we have recently identified a subpopulation with a memory phenotype that arises from naive precursors dependently of self antigen recognition and can exert innate immune function in infectious conditions. Based on this finding, this study aimed to define markers for this subpopulation and unravel its host-protective as well as autoimmune functions. In this study, we identified three markers that specify MP versus foreign antigen-specific memory cells. Moreover, we found that MP cells contain a Th1-like "MP1" subset and this subpopulation can exert innate effector function. Furthermore, we are obtaining evidence arguing that MP cells can induce systemic inflammation in certain circumstances. Together our results suggest MP cells as a unique CD4 T cell subpopulation possessing innate effector function as well as autoimmune potential.

研究分野：免疫学

キーワード：CD4 T細胞 恒常性 感染免疫 自己免疫疾患

### 1. 研究開始当初の背景

CD4<sup>+</sup>T細胞は、外来抗原特異的獲得免疫応答に必須のリンパ球である。すなわち病原体感染時、外来抗原に特異性を有するT細胞受容体(TCR)を持つナイーブ細胞は強く増殖しエフェクター細胞へと分化し、病原体を生体内から排除する。感染終結後、大半のエフェクター細胞は死滅するが、一部の細胞はメモリー細胞として長期に生存し、免疫記憶を形成する。

申請者は最近、CD4<sup>+</sup>T細胞の一分画として、外来抗原ではなく自己抗原特異的に産生され恒常的に準活性化状態を呈する新規細胞集団「Memory-phenotype (MP)細胞」を同定した(Kawabe T, et al. *Sci Immunol* 2(12): eaam9304, 2017)。本細胞は、獲得免疫の中樞を担うはずのT細胞にあって自然免疫機能を有するという極めて特異な性質を保持し、現在注目を集めている(Kawabe T, et al. *Nat Rev Immunol* 18(3): 1, 2018)。

通常の抗原特異的ヘルパーT細胞の場合、活性化細胞はTh1、Th2、Th17などのサブセットに分類され、それぞれ転写因子Tbet、Gata3、RORγtを発現する。申請者は最近、MP細胞もこれと同様に種々の転写因子を発現すること、すなわち同細胞が複数のサブセットからなる可能性を発見した。このことから、これらのMP細胞サブセットがそれぞれ固有の分化・活性化機構、自然免疫的感染防御機能を有する可能性が類推される。一方、MP細胞は自己抗原特異性を有することから、病原体感染時などの炎症性サイトカイン亢進環境下においては同細胞が自己組織に過剰反応し、自己免疫・炎症性疾患を惹起する可能性が類推される。

### 2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究では、MP細胞の質的特異性を明らかにするとともにそこに含まれる各種サブセットを同定し、これらのMPサブセットの産生・維持・分化・活性化機構を明らかにすることを目的とした。そして、MP細胞の自己抗原反応性に基き、同細胞による自己免疫・炎症性疾患発症機構を究明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

MP細胞の質的特異性や分化機構を解明するために、野生型や各種遺伝子欠損マウスを用いたSingle cell RNAseq (scRNAseq)ならびにフローサイトメトリー解析を行った。また、同細胞の感染防御機能を明らかにする目的で、マウスを*Toxoplasma gondii*感染に供し各種解析を施行した。さらに、MP細胞による自己免疫・炎症性疾患発症機構を究明するために、MP細胞を*Rag2*遺伝子欠損(*Rag2*KO)マウスに移入したうえで各種フローサイトメトリー解析や組織学的解析(HEや免疫組織化学染色など)を施行した。

### 4. 研究成果

#### (1) MP細胞の質的特殊性

MP細胞は自己抗原認識依存的に産生され、病原体感染時には自然免疫機能を発揮する。このことから同細胞は、外来抗原特異的に活性化し獲得免疫を担う抗原特異的メモリーT細胞とは質的に異なる存在であるものと考えられる。しかし、両者を鑑別するマーカーはこれまでに同定されておらず、このことがMP細胞研究の進展を著しく阻害していた。

そこで我々はまず、当初の研究計画に則り、scRNAseq解析によりMP細胞とリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)特異的メモリーT細胞の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、両プロファイルが本質的に異なることが判明した(図1A)。さらに、両者を区別するマーカーの候補として、細胞表面蛋白質X、Y、細胞内蛋白質Zをコードする遺伝子が同定された。そこで、両細胞におけるこれらの蛋白発現をフローサイトメトリーによって比較したところ、ほぼ全ての抗原特異的メモリーT細胞がX<sup>+</sup>Y<sup>+</sup>Z<sup>hi</sup>の表現型を有するのに対し、MP細胞はX<sup>-</sup>Y<sup>+</sup>、X<sup>+</sup>Y<sup>+</sup>、X<sup>+</sup>Y<sup>-</sup>、X<sup>-</sup>Y<sup>-</sup>(全てZ<sup>lo</sup>)の4細胞集団に分類されることが分かった(図1B, C)。すなわち、MP細胞の鑑別マーカーとしてX、Y、Zが同定された(研究期間終了時点で投稿中)。

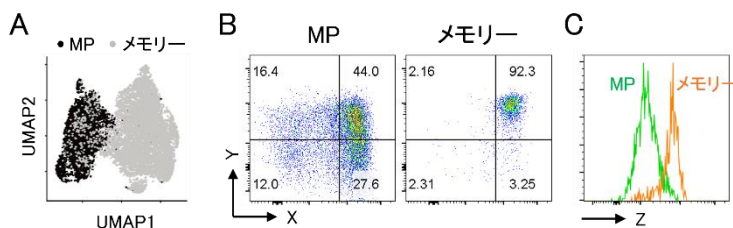


図1. MP細胞と抗原特異的メモリー細胞の差異. (A) MP細胞とLCMV特異的メモリー細胞をscRNAseq解析にて比較した。(B, C) MP・メモリー細胞における(B) X、Y、(C) Zの発現量をフローサイトメトリーにて測定した。

上記の知見をもとに、現在、MP 細胞に含まれる 4 分画の意義の解明、TCR repertoire の解析、ヒト MP 細胞の同定等を施行中である。

## (2) MP 細胞サブセットの産生・分化・活性化機構

我々は、MP 細胞の不均質性 (Heterogeneity) を解析する目的で、T-bet/ROR $\gamma$ t/Foxp3 レポーターマウスを用いて同細胞のフローサイトメトリー解析を行ったところ、定常状態において MP 細胞が T-bet<sup>+</sup> MP1、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> MP17、T-bet<sup>+</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> MP0 等のサブセットから構成されることが明らかになった。特に MP1 細胞は T-bet<sup>hi</sup> CXCR3<sup>+</sup> の極めて高度な分化状態を呈しており、そうした分画が MP 細胞のうち約半数を占めることが分かった。

そこで我々は、MP1 分画の恒常的分化機構を解析した。その結果、定常状態下において MP1 分化は 1 型樹状細胞 (DC1) 由来の IL-12 に依存して起こることが示された。この恒常的 IL-12 は DC1 において TLR-MyD88 および CD40 シグナル依存的に産生され、さらに、正常細菌叢を欠く Germ-free マウスや一切の外来抗原・アゴニストを欠損する Antigen-free マウスにおいても等しく生成されることが証明された。これらの事実より、IL-12 の恒常的産生については MP1 分化は自己認識により惹起・増幅されるものと考えられた。

さらに、MP1 細胞のエフェクター機能を詳細に解析したところ、トキソプラズマ感染時、同細胞は TCR シグナル非存在下においても IL-12/18 に反応して IFN- $\gamma$  を産生することが明らかになった。さらに、免疫不全マウスに MP1 細胞を移入したうえで同マウスを *T. gondii* 感染に供し、さらに抗原認識を抗体投与によりブロックしたうえで生存解析を施行したところ、同細胞移入は生存期間を有意に延長することが分かった。以上より、MP1 サブセットは自然免疫的感染防御機能を有することが証明された。

申請者は、以上の知見を論文発表するに至った (Kawabe T, et al. *Nat Commun* 11(1): 3366, 2020)。現在、MP 細胞に含まれる他のサブセットである MP2 や MP17 についても同様に、その分化・活性化機構を解析中である。

## (3) MP 細胞サブセットによる自己免疫疾患発症機構

Rag2 KO マウスにナイーブ CD4<sup>+</sup> T 細胞を移入すると、激しい腸炎を発症することが古くから知られている。そこで我々は、MP 細胞の炎症原性を評価する目的で、同細胞を Rag2 KO マウスに移入したところ、腸炎は軽症となる一方、数週間の経過を経て全身性の炎症 (胃炎、間質性肺炎、肝炎、腎炎、卵巣炎など) が徐々に惹起されることが明らかになった (図 2)。同炎症は Th1 優位であり、自己抗原や外来抗原などの様々な抗原特異的に起こることも明らかになりつつある。一方、MP 細胞のこのような炎症原性は、制御性 T 細胞によって定常的に抑制されていることも判明しつつある。実際に、上記の MP 細胞移入の際、制御性 T 細胞を共移入することにより全身炎症が抑制されたことからこの仮説は支持される。

現在、MP 細胞依存的炎症における詳細な分子メカニズムを解析中であり、データが得られ次第、論文投稿の予定である。

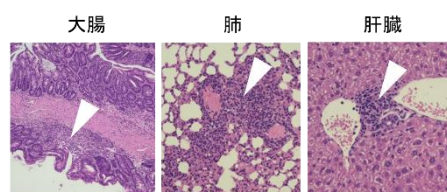


図2. MP細胞による全身性の炎症. MP細胞を Rag2 KO マウスに移入後、4週間後に大腸、肺、肝臓の組織像をH&E染色にて解析した。矢印はドナーリンパ球の集簇を示す。

これまでの一連の研究により、MP 細胞が抗原特異的メモリー細胞とは異なる表現型を有する新たな細胞集団であることが明らかになりつつある。今回同定された MP 細胞マーカーを用いて MP 細胞の特性をさらに詳細に評価することで、新たな「MP 細胞免疫学」の提唱・確立につながるものと期待される (Kawabe T, et al. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 13(9): a037879, 2021; Kawabe T, et al. *Int Immunol* 34(4): 189-196, 2022)。

また今回の研究により、定常状態における MP 細胞、特に MP1 サブセットの分化機構や自然免疫的感染防御機能が証明された。このことから、MP2/17 についても同様にそれぞれ固有の分化機構や感染防御機能の存在が示唆され、現在、MP 細胞の分化機構・エフェクター機能を包括的に解明するプロジェクトが鋭意進行中である。一方、我々は MP 細胞が全身性炎症を惹起する潜在性を有することを示唆する所見を得た。この知見は、MP 細胞が自己免疫疾患の本質的病因であるとの我々の仮説を強く支持している (Yi J, Kawabe T, et al. *Curr Opin Immunol* 63: 14-20, 2020)。今後、MP 細胞による全身性炎症惹起メカニズムを分子レベルで明らかにし、さらに制御性 T 細胞による抑制機構を解析することにより、T 細胞の恒常性維持機構の全容解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawabe T, Sher A.	4. 巻 34
2. 論文標題 Memory-phenotype CD4+ T cells: a naturally arising T lymphocyte population possessing innate immune function.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 189-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab108	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 Kawabe T, Yi J, Sprent J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Homeostasis of naive and memory T lymphocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cold Spring Harb Perspect Biol	6. 最初と最後の頁 a037879
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/cshperspect.a037879	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 Sakurai T, Okuyama Y, Kobayashi S, Phung HT, Asao A, Kawabe T, Ndhlovu LC, Riccardi C, Kudo H, Wada M, Nio M, So T, Ishii N.	4. 巻 34
2. 論文標題 GITR controls intestinal inflammation by suppressing IL-15-dependent NK cell activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 14820-14831
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202001675R	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 Mishima E, Ichijo M, Kawabe T, Kikuchi K, Akiyama Y, Toyohara T, Suzuki T, Suzuki C, Asao A, Ishii N, Fukuda S, Abe T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Germ-Free Conditions Modulate Host Purine Metabolism, Exacerbating Adenine-Induced Kidney Damage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins12090547	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 Kawabe T, Yi J, Kawajiri A, Hilligan K, Fang D, Ishii N, Yamane H, Zhu J, Jankovic D, Kim KS, Trinchieri G, Sher A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Requirements for the differentiation of innate T-bet(high) memory-phenotype CD4+ T lymphocytes under steady state.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 3366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17136-1	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 Grossman Z, Singh NJ, Simonetti FR, Lederman MM, Douek DC, Deeks SG, Contributing authors (Full authorship: Kawabe T, Bocharov G, Meier-Schellersheim M, Alon H, Chomont N, Grossman Z, Sousa AE, Margolis L, Maldarelli F)	4. 巻 41
2. 論文標題 'Rinse and Replace': Boosting T Cell Turnover To Reduce HIV-1 Reservoirs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends Immunol	6. 最初と最後の頁 466-480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.it.2020.04.003	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 Phung HT, Nagashima H, Kobayashi S, Asano N, Machiyama T, Sakurai T, Tayama S, Asao A, Imatani A, Kawabe T, Okuyama Y, Ishii N, So T.	4. 巻 4
2. 論文標題 TRAF5 Deficiency Ameliorates the Severity of Dextran Sulfate Sodium Colitis by Decreasing TRAF2 Expression in Nonhematopoietic Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunohorizons	6. 最初と最後の頁 129-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2000007	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 Tayama S, Okuyama Y, Phung HT, Asao A, Kobayashi S, Musha T, Machiyama T, Sakurai T, Zhang C, Ushio-Fukai M, Kawabe T, So T, Ishii N.	4. 巻 32
2. 論文標題 IQ motif-containing GTPase-activating protein 1 is essential for the optimal maintenance of lung ILC2s.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunol	6. 最初と最後の頁 233-241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz077	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 Yi J, Kawabe T, Sprent J.	4. 巻 63
2. 論文標題 New insights on T-cell self-tolerance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr Opin Immunol	6. 最初と最後の頁 14-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coi.2019.10.002	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9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kawabe T, Yi J, Kawajiri A, Hilligan K, Fang D, Ishii N, Yamane H, Zhu J, Jankovic D, Kim KS, Trinchieri G, Sher A.
2. 発表標題 IL-12 derived from type 1 dendritic cells tonically promotes the differentiation of innate T-bethigh memory-phenotype CD4+ T lymphocytes in steady state.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawajiri A, Ishii M, Li J, Yang Z, Sato K, Tayama S, Okuyama Y, Harigae H, Ishii N, Kawabe T.
2. 発表標題 Inflammatory potential of self-driven memory-phenotype CD4+ T cells.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tayama S, Kawabe T, Kitamura Y, Hiraide K, Li J, Yang Z, Kawajiri A, Sato K, Okuyama Y, Morita M, Akaike T, Ishii N.
2. 発表標題 Reactive sulfide species generated by cysteinyl-tRNA synthetase plays a regulatory role in T cell-induced colitis in a T cell-intrinsic manner.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河部 剛史
2. 発表標題 新規Tリンパ球「MP細胞」の恒常性維持機構の解明ならびにその自己免疫活性の究明.
3. 学会等名 第8回JCRベーシックリサーチカンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河部 剛史
2. 発表標題 新たなCD4 T細胞「MP細胞」の産生・分化機構とその病理学的機能の解明.
3. 学会等名 第49回日本臨床免疫学会総会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Kawabe
2. 発表標題 Differentiation of a novel memory-phenotype CD4+ T lymphocyte population and its immunological significance
3. 学会等名 第49回日本免疫学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Kawabe
2. 発表標題 IL-12 derived from type 1 dendritic cells tonically promotes the differentiation of innate T-bet(high) memory-phenotype CD4+ T lymphocytes in steady state
3. 学会等名 Cytokines 2020(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Kawabe
2. 発表標題 IL-12 derived from CD8a+ dendritic cells drives the differentiation of innate-like T-bet(high) memory-phenotype CD4+ T lymphocytes in steady state
3. 学会等名 Immunology 2020 (cancelled due to COVID-19) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shunichi Tayama
2. 発表標題 IQ motif-containing GTPase-activating protein 1 is essential for the optimal maintenance of lung ILC2s
3. 学会等名 Immunology 2020 (cancelled due to COVID-19) (国際学会)
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