

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21356

研究課題名（和文）再感染リスクに対応した免疫記憶維持の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of immune memory maintenance corresponding to the risk of reinfection

研究代表者

高田 健介（TAKADA, KENSUKE）

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：40570073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ワクチンの基本原理である免疫記憶の詳細な成立機構は未だ解明されていない。免疫記憶の本体は、抗原特異的な活性化の後、長期にわたり体内で維持される記憶リンパ球である。本研究では、免疫系での役割が解明されていない新規転写因子Dmrt4がCD8+記憶Tリンパ球に高いレベルで発現されるという独自の知見に基づいて、当該分子の記憶Tリンパ球における役割を検討した。記憶Tリンパ球の表現型や機能、遺伝子発現に与える影響について、実験結果の再現性を十分に確認する必要があるものの、今後の発展につながる有望な予備的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去に感染した病原体の再感染に対し、免疫系はより素早く強力に応答する（免疫記憶）。免疫記憶の本体は抗原特異的な応答の後、体内で長期間維持される記憶リンパ球である。とりわけCD8+記憶Tリンパ球は、ウイルスや細菌、腫瘍細胞に対する防御に重要な役割を果たす。本研究から、免疫系での役割が不明な新規転写因子がCD8+記憶Tリンパ球の制御に関与する可能性が示唆された。現時点では予備的知見の域を出ないものの、今後検討を重ねることで、免疫記憶の基本原理の解明とともにワクチンや免疫療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The detailed mechanism of immunological memory, which is the basic principle of vaccines, has not yet been elucidated. The body of immunological memory is the memory lymphocytes that are maintained in the body for a long period of time after antigen-specific activation. Dmrt4 is a novel transcription factor and its involvement in the immune system has not been reported. In this study, based on our own finding that Dmrt4 is highly expressed in CD8 + memory T lymphocytes, we investigated the role of Dmrt4 in memory T lymphocytes. Through this research project, we have obtained potentially interesting preliminary findings that will lead to future development of the research. However, it is still necessary to fully confirm the reproducibility of the experimental results regarding the effects on the phenotype, function and gene expression of memory T lymphocytes.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶 T細胞

1. 研究開始当初の背景

過去に感染した病原体が再び体内に侵入すると、より迅速で強力な免疫応答が生じ、病原体は速やかに排除される(免疫記憶)。免疫記憶の本体は、抗原特異的な活性化の後、長期にわたり体内で維持される記憶リンパ球である。記憶リンパ球の分化と維持のメカニズムを解明することは、ワクチンや免疫療法の開発基盤として、獣医学を含めた生命科学領域に広く資する。

病原体由来の抗原を認識した活性化Tリンパ球は、爆発的に増殖する。その後、多くのTリンパ球は病原体の排除に伴って死滅するが、一部は記憶細胞へと分化し再感染に備える。

研究代表者らは、細菌感染後のTリンパ球における網羅的遺伝子発現解析から、新規転写因子Dmrt4に着目した。Dmrt4の発現は、未感作Tリンパ球や増殖期および退縮期のエフェクターTリンパ球で低く、感染から長期間を経た記憶Tリンパ球で顕著に高かった(図1)。

また、正常マウスおよびDmrt4欠損マウスに卵白アルブミン発現リステリア菌を感染させ、記憶期における卵白アルブミン特異的Tリンパ球をクラスI MHCテトラマーで検出したところ、Dmrt4欠損マウスでは記憶Tリンパ球数が顕著に高かった(図2)。

以上の予備的知見から、Dmrt4が記憶Tリンパ球において何らかの重要な役割を担う可能性が予想され、本研究計画の提案に至った。

図1. 記憶Tリンパ球におけるDmrt4遺伝子の発現。未感作Tリンパ球および抗原応答直後のTリンパ球に比べ、抗原応答後60日の記憶Tリンパ球でDmrt4の発現が顕著。

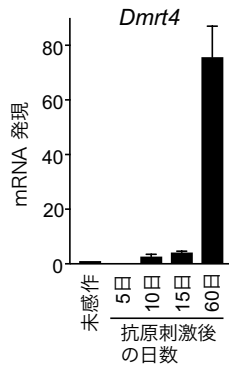
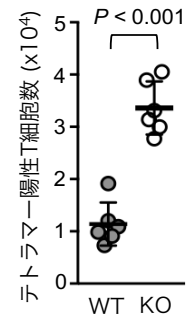


図2. 卵白アルブミン発現組換えリステリア菌をマウスに感染させ、感染70日後にMHCテトラマーを用いて検出される卵白アルブミン特異的記憶Tリンパ球数をDmrt4欠損マウスと野生型マウスと比較した。



2. 研究の目的

Dmrt4は性決定に関わるDmrt遺伝子ファミリーのひとつとして同定されたが、その後、性決定への関与は実験的に否定された。現在、神経細胞分化への関与が示唆されていることを除き、Dmrt4の生体内での役割はほとんどわかっていない。特に、免疫系での機能については、国内外を通じ報告がなく、研究代表者らにより初めて検討が開始された萌芽的段階にある。Dmrt4の標的遺伝子と新たな機能の解明を目的とした本研究は、免疫学の領域にとどまらず、当該因子に関する今後の研究に重要な示唆を与える。

Tリンパ球免疫応答の過程で、Dmrt4が記憶期に特異的に発現されるという知見は、Dmrt4が記憶Tリンパ球において、何らかの重要な役割を果たすことを強く示唆する。よって本研究は、新規転写因子Dmrt4が記憶Tリンパ球の分化や維持、機能制御における役割を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Dmrt4の欠損がTリンパ球免疫応答に与える影響の検討: 本研究の予備検討では、Dmrt4欠損マウスに直接病原体を感染させ、MHCテトラマーを用いて病原体特異的なリンパ球を検出した。しかしこの方法では、病原体に由来する特定の抗原に特異的な記憶Tリンパ球の数が非常に少なく、詳細に解析することは難しい。また、Tリンパ球以外の細胞に発現されるDmrt4が免疫応答に与える影響を厳密には排除できない。そこで、モデル抗原である卵白アルブミンを特異的に認識するOT-I抗原受容体のトランスジェニックマウスとDmrt4欠損マウスを交配し、卵白アルブミンに特異的なDmrt4欠損CD8⁺Tリンパ球を得た。この細胞をレシピエントマウスに養子移入後、卵白アルブミン発現組換えリステリア菌を感染させ、経時的にレシピエント脾臓中のドナーOT-I Tリンパ球の数と表現型をフローサイトメトリーで解析した。Dmrt4欠損マウスはC57BL/6マウスに8世代戻し交配して、レシピエントマウスと遺伝的背景を一致させた後に本研

究に使用した。

(2) Dmrt4 欠損が記憶 T リンパ球の遺伝子発現に及ぼす影響 : Dmrt4 は性決定に関わる Dmrt 転写因子ファミリーのひとつとして同定されたが、先行研究は非常に少なく、標的遺伝子も明らかにされていない。本研究では、記憶 T リンパ球で Dmrt4 の制御を受ける遺伝子を同定するため、Dmrt4 の欠損によって発現が変動する遺伝子を網羅的に探索した。Dmrt4 欠損 OT-I T リンパ球および正常 OT-I T リンパ球をレシピエントマウスに養子移入後、卵白アルブミン発現組換えリステリア菌を感染させた。感染 90 日後にドナー T リンパ球をレシピエントマウスの脾臓からソーティングにより単離し、得られた RNA を RNA-seq 解析に供した。

4. 研究成果

(1) Dmrt4 欠損ナイーブ OT-I T リンパ球を正常マウスに移入した後、卵白アルブミン発現リステリア菌を感染させ、1、6、13 週間後にレシピエント脾臓中のドナー T リンパ球を解析した。応答のピークである感染 1 週間後では、Dmrt4 欠損群と対照群の間に細胞数の違いは見られなかった。しかし、記憶 T リンパ球が分化する感染 6 週間後、および記憶 T リンパ球の維持期である感染 13 週間後において、Dmrt4 欠損群の細胞数が対照群に比べ減少していた。

CD8+ エフェクター T リンパ球は KLRG1 と CD127 をマーカーとして、大きく KLRG1^{hi}CD127^{lo} と KLRG1^{lo}CD127^{hi} の亜集団に分けられ、記憶形成に伴って徐々に KLRG1^{lo}CD127^{hi} 細胞が優位となる。これらのマーカーを用いた表現型解析の結果、感染 1-13 週間後のいずれのタイムポイントにおいても、Dmrt4 欠損群と対照群の間に違いは認められなかった (図 3 および 4)。

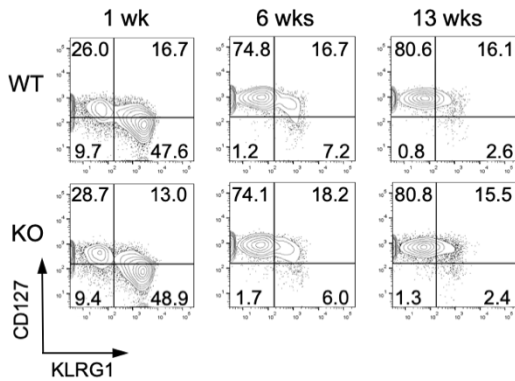


図 3. KLRG1 と CD127 に基づく表現型の経時的変化

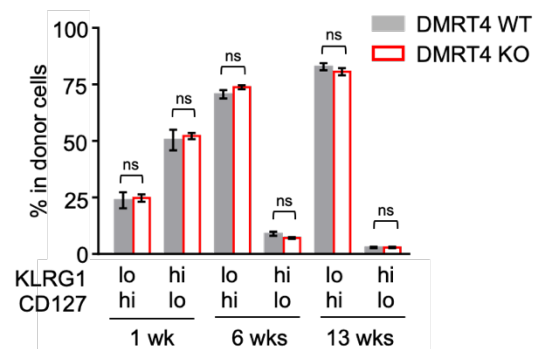


図 4. KLRG1 と CD127 で定義される各亜集団の頻度 ns, not significant

記憶 T リンパ球は様々な表面マーカーの発現によっていくつもの亜集団に分類される。そこで、二次リンパ組織の間を循環するために必要な接着分子である CD62L、遊走や局在に影響を与えるケモカイン受容体 CXCR3 および CX3CR1、さらに細胞傷害活性の指標として使われる KLRG1 の発現を、感染 6 週および 13 週間後の記憶 T リンパ球で検討した。その結果、Dmrt4 欠損群と対照群の間で、これらの分子の発現に基づく亜集団構成に明確な違いは認められなかった (図 5 および 6)。

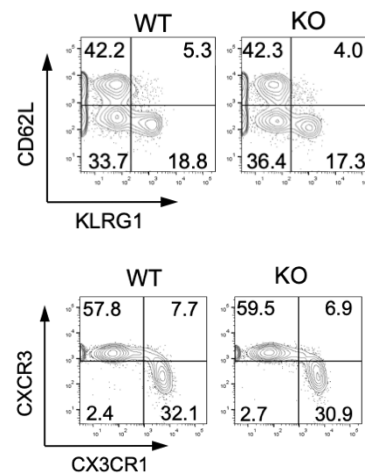


図 5. 記憶 T リンパ球の表現型解析 (感染 6 週間後)

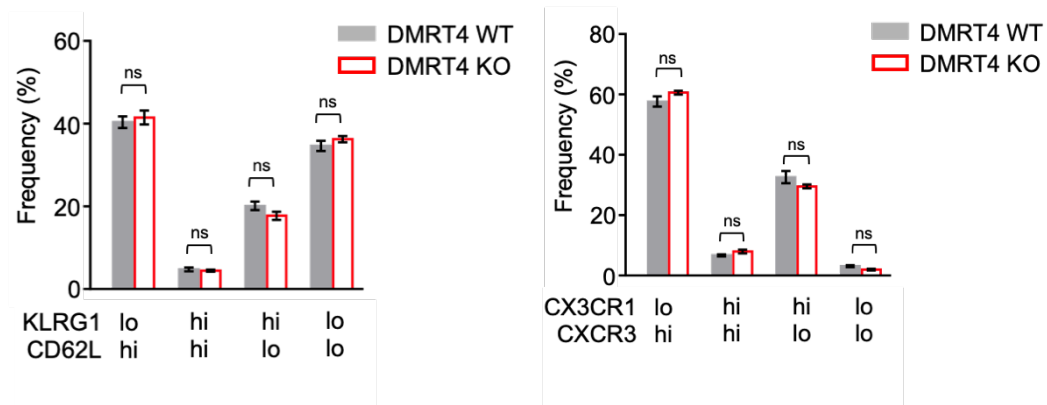


図 6. 記憶リンパ球における各亜集団の頻度（感染 6 週間後） ns, not significant

(2) *Dmrt4* は転写因子であることから、その欠損は記憶 T リンパ球に何らかの遺伝子発現の変化をもたらすと期待される。*Dmrt4* 欠損 OT-I T リンパ球および野生型 OT-I T リンパ球をレシピエントマウスに移入後、卵白アルブミン発現リステリア菌を感染させ、感染 90 日後のドナー T リンパ球を用いて RNA-seq 解析を行なった。両群で FPKM 値が 5 以下の低発現遺伝子を除外した後、群間で 2 倍以上の発現変動が見られた遺伝子を抽出した。その結果、*Dmrt4* 欠損 T リンパ球で発現が上昇した遺伝子として、149 遺伝子、同様に、*Dmrt4* 欠損 T リンパ球で発現が低下した遺伝子として 135 遺伝子が抽出された。

(3) 本研究の結果から、*Dmrt4* が記憶 T リンパ球の数を制御する可能性が示唆された。*Dmrt4* の欠損は、T リンパ球の数を減少させたが、感染 1 週間後のエフェクター細胞の数には影響を及ぼさなかった (図 3)。この結果は、*Dmrt4* の発現が記憶期にほぼ特異的に見られるという定量的 PCR の結果と一致する (図 1)。

一方で、マウス交配スケジュールの遅れから、これらの結果については、1 度の実験検討しかできていない。今後、同様の感染実験を繰り返し、再現性を注意深く確認する必要がある。

同様に、RNA-seq 解析も各群 n=1 の解析を 1 度実施したのみであり、再現性に加え、定量的 PCR による遺伝子発現の確認が不可欠である。さらに、標的遺伝子の同定には、*Dmrt4* との相互作用を ChIP あるいは ChIP-seq 解析で検証することも重要である。ChIP-seq に利用可能な抗 *Dmrt4* 抗体が存在しないため、*in vitro* で活性化させた T リンパ球に対しレトロウイルスベクターを用いてタグ付加 *Dmrt4* を過剰発現させ、抗タグ抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Wang Shangyi, Kozai Mina, Mita Hironobu, Cai Zimeng, Masum Md. Abdul, Ichii Osamu, Takada Kensuke, Inaba Mutsumi	4. 巻 144
2. 論文標題 REV-ERB agonist suppresses IL-17 production in T cells and improves psoriatic dermatitis in a mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 112283 ~ 112283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2021.112283	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 Cai Zimeng, Ishibashi Taishin, Kozai Mina, Mita Hironobu, Wang Shangyi, Takada Kensuke, Inaba Mutsumi	4. 巻 99
2. 論文標題 ROR agonist hampers the proliferation and survival of postactivated CD8+ T cells through the downregulation of cholesterol synthesis related genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunology & Cell Biology	6. 最初と最後の頁 288 ~ 298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imcb.12406	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 Ohigashi Izumi, Frantzeskakis Melina, Jacques Alison, Fujimori Sayumi, Ushio Aya, Yamashita Fusano, Ishimaru Naozumi, Yin Da, Cam Margaret, Kelly Michael C., Awasthi Parirokh, Takada Kensuke, Takahama Yousuke	4. 巻 218
2. 論文標題 The thymoproteasome hardwires the TCR repertoire of CD8+ T cells in the cortex independent of negative selection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20201904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20201904	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0件

〔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
---------	---------