

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02375

研究課題名（和文）核内受容体REV-ERBによる免疫記憶制御の分子基盤の解明とワクチン療法への応用

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of immunological memory control by a nuclear receptor REV-ERB and its application to vaccines

研究代表者

高田 健介（Takada, Kensuke）

北海道大学・ワクチン研究開発拠点・特任准教授

研究者番号：40570073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：活性化リンパ球の一部は記憶リンパ球へと分化し、再感染防御を担う。記憶T細胞の分化制御機構を解明することは、細胞性免疫記憶を介した免疫療法の開発に不可欠である。本研究では、記憶T細胞に高いレベルで発現される核内受容体REV-ERBに着目し、CD8+ T細胞の記憶形成と当該核内受容体の関連を検討した。REV-ERBの活性化に伴って特定の記憶T細胞亜集団の分化が促進されることを明らかにし、これに関わるT細胞内の責任分子候補を見出した。また、REV-ERB欠損T細胞を用いて、T細胞の感染免疫応答に果たすREV-ERBの関与を直接検討するための技術的基盤を整えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫系は一度感染した病原体を記憶し、再感染に対して素早く強力に応答する（免疫記憶）。免疫記憶の本体は、抗原特異的に活性化した後、抗原排除後も長期にわたって体内で維持される記憶リンパ球であるが、その分化や維持を担う制御機構には未解明の部分が多い。本研究は、細胞内病原体や癌細胞の排除に中心的な役割を果たすCD8+ T細胞の記憶形成を制御する分子を探索し、転写制御因子としての機能をもつ核内受容体が関与する可能性を見出した。今後の研究の発展によって、学術的貢献と臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：A part of activated lymphocytes differentiate into memory lymphocytes and contribute to the body protection against the reinfection with specific pathogen. Elucidating the mechanisms that control memory T cell differentiation is essential for the development of immunotherapy mediated by cellular immune memory. In this study, we focused on a nuclear receptor REV-ERB, which is highly expressed in memory T cells, and investigated its relevance to the immune response and memory formation of CD8+ T cells. We revealed that activation of REV-ERB promotes the differentiation of a specific memory T cell subpopulation, and found several candidate molecules that might be responsible for this lineage bias in post-activated T cells. Furthermore, we have established the technical basis to directly examine the involvement of REV-ERB in T cell immune responses to infection using REV-ERB-deficient T cells.

研究分野：免疫学、動物生命科学

キーワード：免疫 生体防御 免疫記憶 T細胞

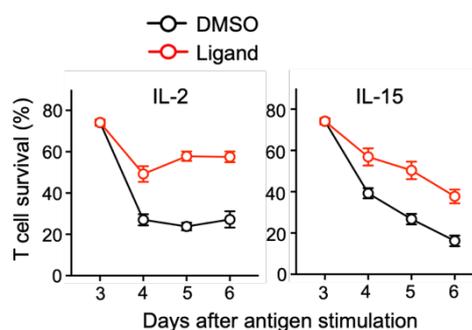
1. 研究開始当初の背景

免疫系は一度感染した病原体を記憶し、再感染に対して素早く強力に応答する（免疫記憶）。免疫記憶による再感染防御機構はワクチンに応用され、人類と自然の共存に多大な貢献を果たしてきたが、その成立メカニズム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、長期にわたって体内で維持される記憶リンパ球と抗体産生細胞である。現行の不活化ワクチンや成分ワクチンは、B細胞を中心とした液性免疫を活性化して抗体産生を誘導する一方、T細胞を主体とする細胞性免疫記憶を誘導できない。ウイルスや細菌、癌細胞に対する生体防御を担うT細胞の記憶メカニズムを解明することは、細胞性免疫を介したワクチン・免疫療法の開発基盤として、ヒトと動物の健康に大きく貢献する。

抗原認識により急激に増殖したT細胞は、サイトカイン産生能や細胞傷害機能をもつエフェクターT細胞へと分化し、病原体の排除に寄与する。エフェクターT細胞の多くは病原体の排除に伴って死滅するが、一部は記憶T細胞として生存し、再感染防御を担う。よって、エフェクターT細胞の生死運命を決定するメカニズムの解明は、記憶形成機構の本質的理解に直結する。

研究代表者らは、抗原応答後のマウスにおけるCD8+T細胞の網羅的遺伝子発現解析から、記憶形成に伴って顕著な発現上昇を示す核内受容体REV-ERBに着目した。本研究では、REV-ERBリガンドの存在下で培養された活性化CD8+T細胞の生存率が顕著に向上するという知見から(図1)、REV-ERBがエフェクターT細胞の生存を促すことで、記憶CD8+T細胞の分化に関与するという仮説に至った。

【図1】REV-ERBリガンドがT細胞の生存に与える影響。
抗原刺激によりCD8+T細胞を *in vitro* で活性化させた。その後、REV-ERBリガンドを添加し、IL-2あるいはIL-15の存在下で継続培養した。いずれのサイトカイン環境下でもリガンド処理によってT細胞の生存率が顕著に上昇した。



2. 研究の目的

REV-ERBは転写因子として、肝臓や筋肉の概日リズムや代謝を制御するが、免疫系での役割はほとんど知られていない。とくに、免疫記憶と当該分子の関連については、国内外を通じ全く報告がない。本研究は、REV-ERBがエフェクターT細胞の生存を促すことで、記憶CD8+T細胞の分化に関与するという仮説に基づき、REV-ERBを介した新たな免疫記憶制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)REV-ERBリガンドがT細胞免疫応答に及ぼす影響

CD8+T細胞の抗原応答にREV-ERBリガンドが及ぼす影響を、*in vitro*で検討した。OT-I T細胞受容体トランスジェニックマウスから得られた脾細胞を卵白アルブミン由来ペプチド(SIINFEKL)およびREV-ERBリガンドの存在下で培養した。CD8+T細胞の芽球化をフローサイトメトリーにより観察した。また、脾細胞をあらかじめCFSEで染色し、抗原刺激後の蛍光強度の減弱を観察することで細胞分裂を検討した。さらに、REV-ERBリガンドの影響を*in vivo*で検討するため、ナイーブOT-I T細胞を養子移入したマウスに卵白アルブミン発現リステリア菌を感染させ、さまざまなタイミングでREV-ERBリガンドを投与した。その後、経時的に、レシピエントマウスの血液中および脾臓中に含まれるドナーT細胞の数や表現型を解析した。

(2)記憶T細胞の細胞傷害機能に及ぼす影響

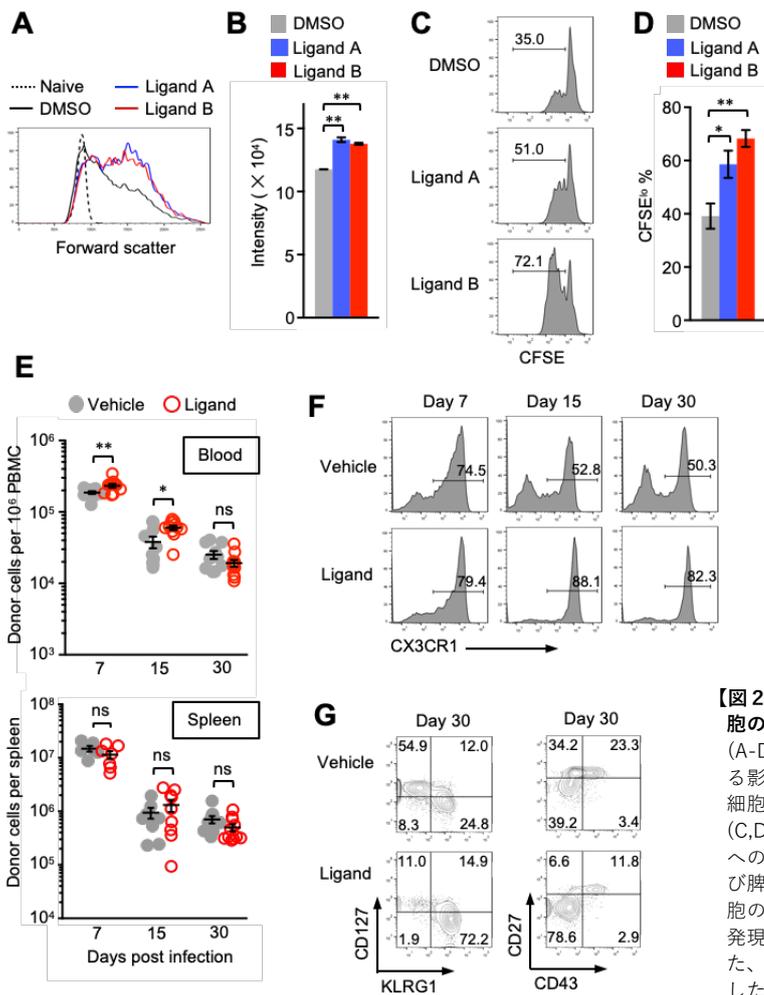
上述のリステリア菌感染モデルにおいて、レシピエントマウスの記憶T細胞がもつ細胞傷害機能を検討した。記憶T細胞分化後のレシピエントマウスから脾細胞を採取した。Granzyme Bを細胞内染色して、ドナーT細胞における発現をフローサイトメトリーで観察した。また、リンパ腫細胞株(EL4)と卵白アルブミン発現リンパ腫細胞株(EL4-OVA)を1:1で混合した後、レシピエントマウスの脾臓から単離した記憶OT-I T細胞を加えて培養し、EL4-OVAに対する特異的な細胞傷害活性を評価した。

(3) 作用メカニズムについての検討

上述のリステリア菌感染モデルにおいて、レシピエントマウスの脾臓からドナーOT-I T細胞を単離し、RNA-seq解析を行った。リガンド投与群における発現が対象群(溶媒投与群)の2倍以上あるいは1/2以下となった遺伝子を抽出した。変動が予測された分子について、定量的PCR解析およびフローサイトメトリーにより、mRNAおよびタンパク質の発現を確認した。

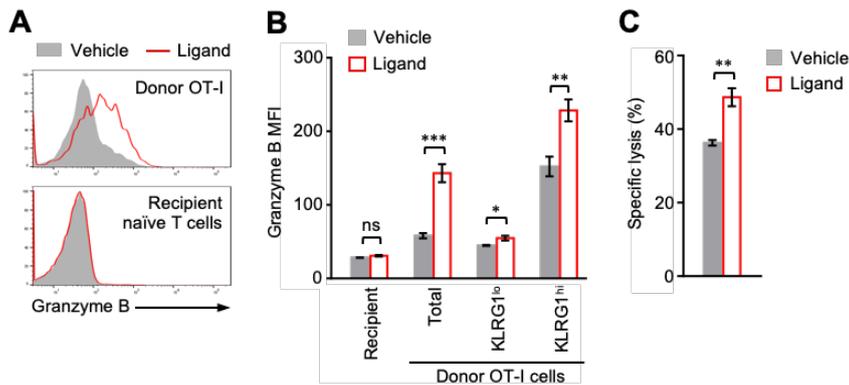
4. 研究成果

(1) CD8+T細胞の抗原応答にREV-ERBリガンドが及ぼす影響を*in vitro*で検討したところ、CD8+T細胞の芽球化(図2A, B)と増殖(図2C, D)が顕著に促進された。さらに、リステリア菌感染モデルを用いて、*in vivo*での応答に対するREV-ERBリガンドの影響を検討した。感染7日後および15日後のエフェクター期において、リガンド投与群では血液中のドナーT細胞が有意に増加していた(図2E)。この影響は、脾臓や感染30日後の血液では認められなかった(図2E)。脾臓中のドナーT細胞の表現型を解析したところ、リガンド投与群では、感染15日および30日後において、炎症部位への遊走に重要なケモカイン受容体CXCR3を発現する細胞の割合が顕著に増加し、また発現レベルの上昇も認められた(図2F)。さらに、感染30日後の脾臓から得られた記憶T細胞について、KLRG1、CXD127、CD43、CD27といった分子の発現パターン解析を行ったところ、エフェクター細胞様の表現型をもつ記憶T細胞亜集団の割合が顕著に増加していた(図2G)。



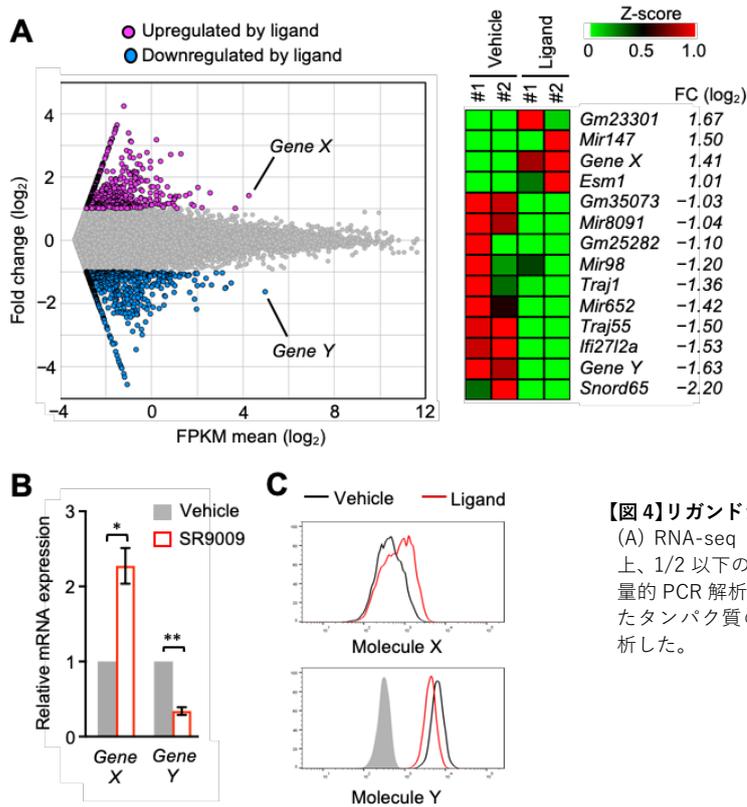
【図2】REV-ERBリガンドがT細胞の免疫応答に及ぼす影響。
(A-D) *in vitro*での抗原応答に与える影響。抗原応答に伴うCD8+T細胞の芽球化(A, B)および増殖(C, D)を検討した。(E-G) 感染応答へのリガンドの影響。血液中および脾臓における抗原特異的T細胞の数(E)とケモカイン受容体の発現(F)を経時的に解析した。また、記憶T細胞の表現型を解析した(G)。

(2) 記憶CD8+T細胞は、機能的に異なるいくつかの亜集団により構成されている。リガンドの投与により増加した細胞の表現型は、長期生存エフェクター細胞(Long-lived effector cells, LLEC)と呼ばれる亜集団の表現型と一致した。LLECは即効性の細胞傷害機能に優れ、感染早期の防御に重要であることが知られている。機能やマーカー分子の発現においてエフェクターT細胞と良く似た特徴を有するが、感染から数週間で消失するエフェクターT細胞とは異なり、LLECは病原体排除後も長期間にわたって体内で維持される。リガンド投与後のマウスから得られた記憶T細胞は、細胞傷害因子であるgranzyme Bを高いレベルで発現し(図3A, B)、特異的抗原を発現する標的細胞に対して高い傷害活性を示した(図3C)。これらの機能的な性質もまた、LLECの特徴に合致した。



【図3】リガンドによる記憶 T 細胞の機能的変化。(A) 細胞内染色による細胞傷害因子の発現解析。(B) *in vitro*での細胞傷害機能試験の結果。

(3) REV-ERB は転写制御因子であるため、リガンドによって T 細胞での発現が変動する遺伝子を RNA-seq 解析により検討した(図 4A)。その結果、溶媒処理群と比較した FPKM 値の差が 2 倍以上および 1/2 以下であった遺伝子として、それぞれ遺伝子 *X* と *Y* が抽出された。これらの遺伝子発現の変化は、定量的 PCR でも確認された(図 4B)。また、フローサイトメトリー解析により、タンパク質レベルでも同様の発現変化が認められた(図 4C)。現在、これらの分子の阻害や過剰発現により、REV-ERB リガンドの LLEC 分化促進作用がどのように影響されるか、検討準備を進めている。



【図4】リガンドが T 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響。(A) RNA-seq 解析の結果。群間の発現比が 2 倍以上、1/2 以下の遺伝子をヒートマップに示す。(B)定量的 PCR 解析の結果。(C)候補遺伝子でコードされたタンパク質の発現をフローサイトメトリーで解析した。

(4) REV-ERB には機能的に重複する α と β のアイソフォームが存在する。T 細胞は両者を発現するため、一方の欠損では、残留するアイソフォームによって機能が補完されてしまう。REV-ERB α および REV-ERB β の二重欠損マウスは胎生致死である。REV-ERB が記憶 T 細胞の分化に及ぼす影響をより直接的に検討するため、本研究では、REV-ERB α 欠損ナイーブ CD8⁺ T 細胞に対して、Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体をエレクトロポレーションで導入し、REV-ERB β を欠損させる方法を試みた。しかし、誘導された変異はいずれも 1 アミノ酸置換であり、機能的なタンパク質を欠損させることができなかった。今後、Cre-loxP システムによる T 細胞特異的コンディショナル欠損マウスを用いた検討を計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shangyi Wang, 香西美奈, Hironobu Mita, Zimeng Cai, Md. Abdul Masum, 市居修, 高田健介, 稲葉睦
2. 発表標題 REV-ERB agonist suppresses IL-17 production in T cells and improves psoriatic dermatitis in a mouse model
3. 学会等名 第165回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kensuke Takada, Zimeng Cai, Hironobu Mita, Mina Kozai, Shangyi Wang, Mutsumi Inaba
2. 発表標題 Nuclear receptor RORalpha regulates bystander activation of memory T cells
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三田泰誠、Cai Zimeng、香西美奈、Wang Shangyi、高田健介、稲葉睦
2. 発表標題 核内受容体RORalphaは記憶T細胞の炎症感受性を制御する
3. 学会等名 第7回 北大部局横断シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zimeng Cai、三田泰誠、香西美奈、Shangyi Wang、高田健介、稲葉睦
2. 発表標題 Nuclear receptor RORalpha regulates bystander activation of memory T cells
3. 学会等名 第164回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	稲葉 睦 (Inaba Mutsumi) (00183179)	北海道大学・獣医学研究院・教授 (10101)	

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