

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07938

研究課題名(和文) CD4-CD8⁻ TCR⁺ T細胞のアナジー誘導性抗原提示能の解析研究課題名(英文) Analysis of CD4-CD8^α TCR^α T cells as anergic antigen presenting cells

研究代表者

根本 泰宏 (Nemoto, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：20456213

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)：我々はこれまで腸管粘膜に豊富に存在する一方で、その機能が不明であった CD4-CD8-TCR⁺ + Double Negative T(DNT)細胞が、抗原提示細胞として管腔抗原を取り込み、抗原提示を行うこと、本経路は腸炎抑制的でありクローン病の病態に関与することを発見した。今回我々はDNT細胞における抗原提示能獲得メカニズムの解析とその制御因子の検索およびDNT細胞による免疫抑制機構の詳細な解析を行った。T細胞特異的なMHC-IIの欠損によって、急性大腸炎のみならず、小腸炎、慢性大腸炎の悪化が見られた。DNT細胞におけるMHC-IIの発現にはパイエル板の細胞が重要な役割を有することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管粘膜における抗原取り込み経路における研究としてはCX3CR1+マクロファージが腸管上皮細胞層のタイトジャンクションに樹状突起を挿入し、直接管腔抗原を捕捉するという驚くべき経路 (Rescigno M et al, Nat Immunol 2001)、上皮細胞層に点在し、粘液を産生する杯細胞が低分子抗原を取り込み、粘膜内のCD103+樹状細胞に引き渡すという経路 (McDole JR et al, Nature 2013)があるが、本経路はそれに勝るユニークな発見である。

研究成果の概要(英文)：Previously, we found that CD4-CD8-TCR⁺ + double negative T (DNT) cells function as tolerogenic antigen-presenting cells and are involved in the pathogenesis of Crohn's disease. In the present study, we analyzed the mechanism by which DNT cells acquire antigen-presenting capacity, searched for its regulators and analyzed in detail the immunosuppressive mechanism of DNT cells. We found that loss of T-cell-specific MHC-II not only exacerbates acute colitis, but also small intestinal ulcers and chronic colitis, and that Peyer's patches play an important role in the expression of MHC-II on DNT cells.

研究分野：腸管免疫

キーワード：炎症性腸疾患 腸管粘膜免疫 DNT細胞 抗原提示 腸管上皮間リンパ球

1. 研究開始当初の背景

腸管は病原性のある微生物や悪性新生物を排除する(炎症)一方で、食事抗原や無害な共生細菌に対しては過剰な免疫応答を抑制している(免疫寛容)。健全な腸管では炎症と免疫寛容のバランスがとれているが、バランスが崩れれば感染性や発癌、炎症性腸疾患、食物アレルギーにつながる。そこで腸管は管腔抗原を取り込むための特殊な機構を有する。単層の腸管上皮細胞層は管腔抗原を取り込むための幾つかの門戸を有する。古典的な経路としてはパイエル板管腔側に点在にする M 細胞による管腔抗原を取り込みが有名である。更に、2001 年に CX₃CR1+マクロファージが腸管上皮細胞層のタイトジャンクションに樹状突起を挿入し、直接管腔抗原を捕捉するという驚くべき経路が発見された(Rescigno M et al, Nat Immunol 2001)。2012 年には上皮細胞層に点在し、粘液を産生する杯細胞が低分子抗原を取り込み、粘膜内の CD103+樹状細胞に引き渡すという経路が発見された(McDole JR et al, Nature 2013)。このように消化管における抗原の取り込みは非常にユニークであるが、さらに重要なのは、取り込み経路によって誘導される免疫反応のアウトプットが異なる点である。すなわち、M 細胞の経路からは IgA 産生形質細胞が、CX₃CR1+マクロファージの経路では微生物に対する防御免疫反応が誘導され、杯細胞経路は制御性 T 細胞分化誘導に関与する。

これらの門戸以外にも腸管上皮細胞層には非常に特徴的な機構が存在する。腸管上皮間リンパ球、IEL (intraepithelial lymphocytes) である。IEL は上皮細胞間隙に存在する T 細胞である。その数は非常に多く、脾臓の全 T 細胞数にも匹敵する。IEL は通常の CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞以外に $\gamma\delta$ T 細胞や CD4-CD8 $\alpha\beta$ -TCR $\alpha\beta$ + T 細胞(Double Negative: DNT 細胞)など、末梢血では数%に満たない特殊な細胞を 40-60%と非常に多く含む。これらの細胞は多くの点で CD4, CD8+ T 細胞と異なり、特に DNT 細胞に関しては長年その機能が不明であった。我々は腸管粘膜および腸管関連リンパ組織において DNT 細胞が、腸管における第 4 の抗原取り込み / 提示経路であり、腸管における免疫寛容の誘導および炎症性腸疾患の病態において重要な役割を有することを発見した(未発表データ、現在論文投稿中)。

2. 研究の目的

このように DNT 細胞は新たな腸管の抗原取り込み経路として、更には免疫寛容を誘導する抗原提示細胞として非常に興味深い分画であるが、抗原提示能を有する MHC-II+DNT 細胞の割合は、臓器間、マウス間で異なり、抗原提示能獲得メカニズムは不明である。また、DNT 細胞による腸管免疫寛容誘導機構にも未だ不明な点が残されている。そこで今回我々は本研究を更に発展させ、DNT 細胞における抗原提示能獲得メカニズムの解析とその制御因子の検索および DNT 細胞による免疫抑制機構の詳細な解析を行った。

3. 研究の方法

A. DNT 細胞における抗原提示能獲得メカニズムの解析とその制御因子の検索

IEL における DNT 細胞は MHC-II の発現が低く、抗原提示能を有さない一方で、パイエル板(PP)、腸間膜リンパ節(MLN)など 2 次リンパ装置における DNT 細胞は MHC-II を発現し、抗原提示能を有する。我々は腸管局所で管腔抗原を拿捕した DNT 細胞が、

樹状細胞のように2次リンパ装置に migration し、そこで MHC-II を高発現すると仮定しており、その証明のために下記実験を行った。

DNT 細胞の養子移入モデルを用いた *in vivo* における MHC-II 発現誘導

Ly5.1⁺マウス由来の IEL における MHC-II-DNT 細胞をフローサイトメーターによって分取し、Ly5.2⁺マウスへ移入、生着させ、6週間後に各臓器、特に PP、MLN など2次リンパ装置における DNT 細胞の MHC-II の発現を検討した。

パイエル板細胞との供培養系を用いた MHC-II 発現誘導

パイエル板においては DNT 細胞を含む、全ての T 細胞分画で MHC-II の発現が他の臓器よりも高い。パイエル板における他の免疫細胞、間葉系の細胞あるいは液性因子が MHC-II の発現を上昇させている可能性がある。Ly5.2⁺マウスよりパイエル板細胞を採取し、ガラスボトムのディッシュに feeder 細胞として培養し、Ly5.1⁺マウス由来 MHC-II-DNT 細胞を供培養し、day4-7 の MHC-II の発現を検討した。

抗原提示能誘導因子の検索

MHC-II-DNT 細胞にサイトカインやレチノイン酸など、液性因子の添加を行い、day4-7 の MHC-II の発現を検討した。

B. DNT 細胞による免疫抑制機構の解析

DSS 腸炎は上皮障害主体の急性大腸炎モデルであり、小腸炎モデルおよび T 細胞免疫が深く関与する大腸炎モデルにおける DNT の免疫抑制能およびその MHC-II 依存性を検証した。

小腸炎モデルマウスにおける抑制能の解析

T 細胞特異的に MHC-II を欠損する CD4-Cre⁺ x H2-Ab1^{fl/fl} マウスにインドメタシンを皮下注射し、コントロールマウスと小腸炎の重症度を比較した。

T 細胞移入大腸炎モデルマウスにおける MHC-II 依存的な腸炎抑制能の解析

MHC-II^{-/-}マウスおよびコントロール WT マウスより IEL-DNT 細胞を分取、RAG-2^{-/-}マウスへ養子移入し、1週間後に CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞を移入し、腸炎抑制能を検討した。

4. 研究の結果

A. DNT 細胞における抗原提示能獲得メカニズムの解析とその制御因子の検索

DNT 細胞の養子移入モデルを用いた *in vivo* における MHC-II 発現誘導

DNT 細胞は WT や RAG2^{-/-}には生着しなかったために NSG マウスをレシピエントとして使用した。結果、移入の6週間後に細胞の生着が確認できた。一方で高度免疫不全マウスであるため腸間膜リンパ節やパイエル板の誘導は見られず、小腸 IEL, LPL, 脾臓の細胞のみ回収可能であった。これらの臓器において MHC-II^{-/-}DNT 細胞は MHC-II のまま維持されており、移入による MHC-II の誘導は確認できなかった。

パイエル板細胞との供培養系を用いた MHC-II 発現誘導

パイエル板細胞との共培養によって MHC-II-DNT 細胞は MHC-II を発現した。一方でコントロールとして使用した脾臓、腸管膜リンパ節、小腸 IEL との共培養および単独培養群では低レベルの MHC-II 上昇しか見られなかった。

抗原提示能誘導因子の検索

上記結果を踏まえ、パイエル板に豊富な液性因子としてレチノイン酸やサイトカインなどを DNT 細胞単独培養群に添加し、MHC-II の発現を確認したがいずれにおいても MHC-II の誘導は見られなかった。

B. DNT 細胞による免疫抑制機構の解析

小腸炎モデルマウスにおける抑制能の解析

CD4Cre⁺ x H2-Ab1^{fl/fl} マウスにおいてはコントロールに比して、小腸潰瘍面積の増大が見られた。

T 細胞移入大腸炎モデルマウスにおける MHC-II 依存的な腸炎抑制能の解析

WT マウス小腸 IEL 由来 DNT 細胞の移入によって T 細胞移入型大腸炎マウスの腸炎は、コントロールに比して体重減少率、クリニカルスコア、病理スコア全てにおいて抑制された。一方で MHC-II^{-/-} マウス小腸 IEL 由来 DNT 細胞の移入では抑制能はキャンセルされていた。

解析時に大腸粘膜、腸間膜リンパ節、脾臓において DNT 細胞の生着が確認され、さらに WT-DNT 移入群では腸間膜リンパ節、大腸粘膜において MHC-II の発現誘導が確認された。

5. 考察

以上により、DNT 細胞の MHC-II の誘導にはパイエル板に存在する免疫細胞が重要な役割を有すること、慢性大腸炎発症時には DNT 細胞における MHC-II の発現誘導が見られること、DNT 細胞は DSS 投与による急性腸炎のみならず、小腸炎および慢性大腸炎においても腸炎抑制能を有することがわかった。

前回までの研究と、今回の研究結果をまとめて、現在海外誌に投稿中である。論文における新規性確保のために、本報告書においては具体的な数値の記載や Figure の掲載は見送らせていただいた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Yonemoto Yuki, Nemoto Yasuhiro, Morikawa Ryo, Shibayama Nana, Oshima Shigeru, Nagaishi Takashi, Mizutani Tomohiro, Ito Go, Fujii Satoru, Okamoto Ryuichi | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Single cell analysis revealed that two distinct, unique CD4+ T cell subsets were increased in the small intestinal intraepithelial lymphocytes of aged mice | 5. 発行年 2024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.2024.1340048 | 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 - |

〔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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 岡本 隆一 (Okamoto Ryuichi) (50451935) | 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602) | |

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 |
|---------|---------|