

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15474

研究課題名(和文) Arf経路を介したT細胞生存維持機構の解明

研究課題名(英文) The role of Arf pathway in the maintenance of T cell survival

研究代表者

住吉 麻実 (SUMIYOSHI, Mami)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50779402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Arf1/Arf6二重欠損CD4+T細胞(Arf-KO細胞)の、TCR刺激に伴う細胞死の原因解明に取り組んだ。ナイーブArf-KO T細胞の代謝はコントロールと差がない一方で、活性化Arf-KO T細胞では酸化的リン酸化が亢進していた。ラパマイシンによりArf-KO細胞の細胞死が抑制されたことから、代謝バランスの異常が細胞死の原因であると示唆された。IL-21の存在下ではArf-KO細胞の生存が維持されており、実際Th1型・Th2型それぞれの免疫誘導時のリンパ節におけるTfhの生存は維持されていた。さらに感染実験から、Arf-KOマウスはある程度の生体防御能を有していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Arf1・Arf6が全ての状態のT細胞ではなく、活性化T細胞特異的に生存維持に働くこと、その背景に代謝リプログラミングの異常があることを明らかにした点に高い学術的意義がある。既に、T細胞特異的なArf1・Arf6の二重欠損は、自己免疫疾患をほぼ完全に抑制することを報告している。一方で、Th1やTh2を介した感染応答は、Arf1・Arf6を欠損してもある程度維持されていることを本研究で見出した。以上の知見は、Arf1・Arf6が制御する活性化T細胞の生存維持機構を標的とすることで、生体防御の維持と自己免疫疾患の抑制を両立する新たな治療法開発に繋がる可能性を強く示唆し、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism underlying enhanced cell death in Arf1/Arf6 double-deficient CD4+ T cells (Arf-KO cells) during TCR activation. Naive Arf-KO T cells showed metabolic pattern similar to control cells, whereas activated Arf-KO T cells exhibited enhanced oxidative phosphorylation. Rapamycin protected cell death in Arf-KO cells, strongly suggesting that metabolic imbalance is the main cause of enhanced cell death in Arf-KO cells. Consistent with the finding that survival of Arf-KO cells was maintained in the presence of IL-21, the survival of Tfh in lymph nodes was maintained even under Th1-type or Th2-type immune conditions. Actually, we found that Arf-KO mice are resistant to both Th1-type and Th2-type infections.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 細胞死 Arf 自己免疫疾患 感染応答

1. 研究開始当初の背景

ADP-ribosylation factor (Arf) ファミリーは小胞輸送を制御する低分子量 G タンパク質であり、マウスでは Arf1-Arf6 の 6 つのアイソフォームが存在している。研究代表者は、T 細胞における Arf 経路の機能を解明すべく、T 細胞特異的 Arf1・Arf6 二重欠損 (Arf-KO) マウスを世界で初めて樹立・解析した。その結果、T 細胞における Arf1・Arf6 の欠損は大腸炎や実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) など、Th17 細胞が関与する自己免疫疾患の発症がほぼ完全に抑制することを明らかにした [1]。Arf 欠損によって自己免疫疾患が抑制される機構を明らかにすべく、さらに詳細な解析を行った結果、Arf1・Arf6 の両者を欠損した時のみ、TCR 刺激したナイーブ CD4⁺ T 細胞に高頻度にアポトーシスが誘導されること、ならびにその背景にアポトーシス関連因子、Mcl-1 と Bim の発現バランス異常があることを見出した。IL-7 によりナイーブ T 細胞の状態を維持した場合や、TCR 刺激中に IL-21 で処理した場合には、Arf-KO T 細胞におけるアポトーシスの誘導が抑制されることから、周りのサイトカイン環境や T 細胞の活性化状態が Arf-KO T 細胞の生存維持機構に影響することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、Arf1・Arf6 が制御する活性化 T 細胞の生存維持機構を明らかにすることを目的としている。この目的を達成するため、(1) T 細胞代謝リプログラミングにおける Arf 経路の機能解明 (2) Arf-KO マウスにおける生体防御能の検証、の 2 つの課題を設定した。

(1) T 細胞代謝リプログラミングにおける Arf 経路の機能解明

ナイーブ CD4⁺ T 細胞は、TCR 刺激による活性化過程で代謝リプログラミングが生じ、酸化的リン酸化から解糖系に依存するようになる [2]。定常状態における Arf-KO ナイーブ CD4⁺ T 細胞の生存能はコントロールと差がない一方で、TCR 刺激に伴いアポトーシスが亢進することから、活性化過程における代謝リプログラミングがアポトーシス亢進の引き金なのではないかと考えた。そこで、T 細胞代謝リプログラミングへの Arf・Arf6 の関与の有無を検証する。

(2) Arf-KO マウスにおける生体防御能の検証

各種ヘルパー T 細胞への分化は、周りのサイトカイン環境の違いに依存している。Arf-KO 活性化 T 細胞で誘導されるアポトーシスは IL-21 などのある種のサイトカイン存在下では抑制されることから、Arf1・Arf6 を欠損しても一部の免疫応答は維持されている可能性が考えられた。そこで、Th17 型以外のサイトカイン環境として、Th1 型・Th2 型の免疫応答への Arf 経路の関与と Arf-KO マウスの生体防御能について解析を行う。

3. 研究の方法

(1) T 細胞代謝リプログラミングにおける Arf 経路の機能解明

細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies 社) を用いて、ナイーブ CD4⁺ T 細胞と活性化 CD4⁺ T 細胞における酸素消費速度 (OCR) と細胞外酸化速度 (ECAR) を測定し、Arf1・Arf6 欠損時に代謝リプログラミングが正常に誘導されているかを調べる。Arf-KO 細胞で代謝異常が認められた場合、代謝リプログラミングの異常がアポトーシスの原因であるかを明らかにするため、ラパマイシンやメトホルミンなどの代謝阻害剤で処理した場合の細胞生存能

を比較する。

(2) Arf-KO マウスにおける生体防御応答の検証

Th1 型の免疫応答を評価する方法として、SAS アジュバントと混合した卵白アルブミン(OVA)をマウスの foot pad に皮下注射し、血清中の抗原特異的抗体価・所属リンパ節における T 細胞の割合・サイトカイン産生能を Arf-KO マウスとコントロールマウスで比較する。加えて、生体防御能を調べるために、*Leishmania major* (*L. major*) の感染実験を行い、Arf-KO マウスにおける寄生虫の排除能や所属リンパ節における T 細胞数、サイトカイン産生能などを評価する。

Th2 型の免疫応答として、コントロールマウスと Arf-KO マウスにダニ抗原と類似の作用を示すことが知られる papain を経鼻投与し、Th1 型の解析と同様、血清中の抗原特異的抗体価や所属リンパ節の解析を行う。また、生体防御能を調べるために、腸管寄生虫 *Heligmosomoides polygyrus* (*Hp*) の感染実験を行う。すなわち、コントロールマウスと Arf-KO マウスの糞便における寄生虫卵数を比較すると共に、寄生虫特異的抗体価や所属リンパ節における T 細胞の性状を解析する。

4. 研究成果

(1) 代謝リプログラミングに着目した解析

細胞外フラックスアナライザーによって T 細胞の代謝パターンを解析した結果、ナイーブ T 細胞では Arf-KO とコントロールで代謝状態に違いがない一方で (図 1B)、2 日間 TCR 刺激を行った活性化状態では、Arf-KO T 細胞における basal OCR が上昇し、ECAR に対する OCR の割合がコントロールより高くなっていた (図 1A・C)。さらにミトコンドリアの予備呼吸能 (SRC) も有意に上昇していた (図 1A)。これらの結果から、活性化した Arf-KO CD4⁺ T 細胞の代謝状態は、コントロール細胞と異なり、酸化的リン酸化に依存していることが明らかとなった。

がん細胞を用いた解析から、Arf1 は PI4KIIIβ の局在を制御することにより、ミトコンドリアの分裂に関与することが知られている [3]。Arf-KO 細胞で、酸化的リン酸化が亢進していた理由として、ミトコンドリアに異常

があるのではないかと考え、解析を行った。しかし予想に反して、ミトコンドリア総体積・DNA 量・形態いずれにおいても異常は認められなかった【データ未掲載】。

次に、Arf-KO 細胞で認められた代謝バランスの異常が、アポトーシスを誘導しているのかを調べた。TCR 刺激による解糖系の亢進は mTOR/HIF 経路の活性化によって誘導されるため、TCR

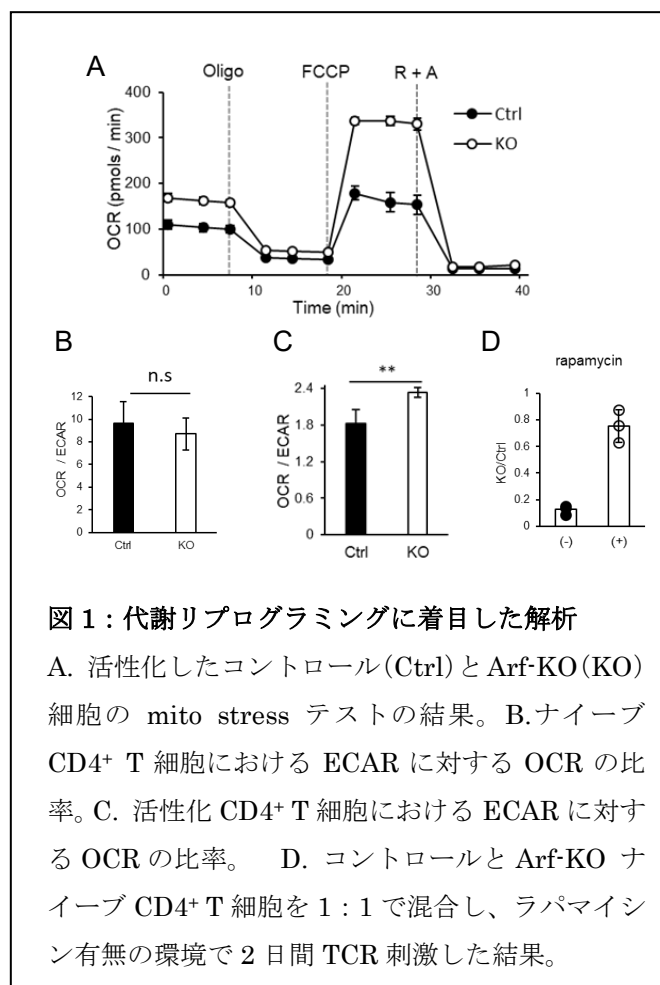


図 1：代謝リプログラミングに着目した解析

A. 活性化したコントロール(Ctrl)と Arf-KO (KO) 細胞の mito stress テストの結果。B. ナイーブ CD4⁺ T 細胞における ECAR に対する OCR の比率。C. 活性化 CD4⁺ T 細胞における ECAR に対する OCR の比率。D. コントロールと Arf-KO ナイーブ CD4⁺ T 細胞を 1 : 1 で混合し、ラパマイシン有無の環境で 2 日間 TCR 刺激した結果。

刺激時にラパマイシンまたはメトホルミンを添加し、活性化による代謝リプログラミングを抑制した場合の細胞の生存を比較した。TCR 刺激のみの場合と比較して、代謝阻害剤で処理した場合には Arf-KO 細胞における生存が維持されることから (図 1D)、代謝の異常がアポトーシスの原因であることが強く示唆された。

(2) Arf-KO マウスにおける生体防御応答の検証

Th1 応答を誘導する SAS アジュバントと混合した OVA を foot pad に免疫し、所属リンパ節を解析した。所属リンパ節に集積する CD4⁺ T 細胞の割合・数ともに Arf-KO マウスで減少しており、リンパ節を OVA で再刺激した時の IFN- γ の産生量も低下していたが、興味深いことに、Arf-KO マウスの所属リンパ節内の Tfh (PD-1^{hi}CXCR5^{hi}) 細胞の割合はコントロールと比較して有意に増加していた (図 2A)。また、papain を用いた Th2 応答誘導モデルにおいても同様の結果が得られた。

L. major の感染排除能は Arf-KO マウスで若干低下していたが、血清中 IgG2c 量はコントロールと同等であり、IgG1 レベルは Arf-KO マウスでむしろ高かった (図 2B)。*Hp* の感染排除能は、コントロールマウスと Arf-KO マウスで全く差がなく、血清抗体価についても有意な差は認められなかった。

以上の結果から、Th17 型の免疫応答と比較すると、Th1 型免疫応答や Th2 型免疫応答は Arf-KO マウスでコントロールマウスと比肩しうるレベルで維持されていることが明らかとなった。免疫時の Arf-KO マウスの所属リンパ節で Tfh 細胞の割合がコントロールマウスと比較して増加していた理由として、Tfh の分化が誘導される環境には IL-21 が存在していることから、Arf1・Arf6 が欠損した状態でも T 細胞の生存が維持されたためと考えられる。

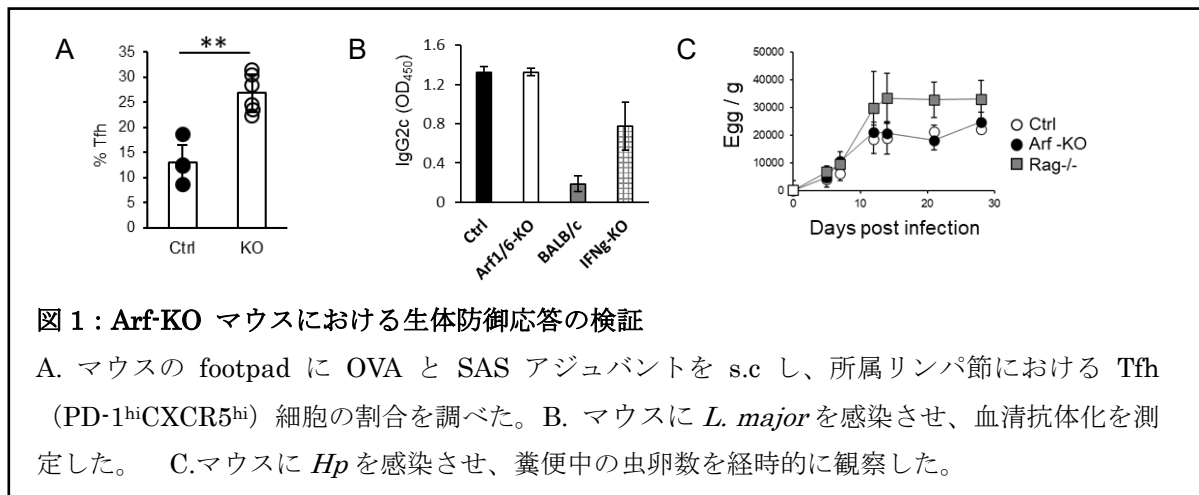


図 1 : Arf-KO マウスにおける生体防御応答の検証

A. マウスの footpad に OVA と SAS アジュバントを s.c し、所属リンパ節における Tfh (PD-1^{hi}CXCR5^{hi}) 細胞の割合を調べた。B. マウスに *L. major* を感染させ、血清抗体価を測定した。C. マウスに *Hp* を感染させ、糞便中の虫卵数を経時的に観察した。

本研究により、Arf1・Arf6 が Th 分化経路依存的に活性化 CD4⁺ T 細胞の生存維持を制御すること、ならびにその背景に代謝リプログラミングの異常があることが明らかとなった。既に T 細胞特異的な Arf1・Arf6 の二重欠損により Th17 細胞依存的な自己免疫疾患がほぼ完全に抑制されることを報告しているが、今回新たに、Arf1・Arf6 を欠損した状態でも Th1 細胞や Th2 細胞に依存した感染応答は相当程度維持されていることを見出した。以上の知見は、Arf1・Arf6 が制御する活性化 T 細胞の生存維持機構を標的とすることで、生体防御の維持と自己免疫疾患の抑制を両立する新たな治療法開発に繋がる可能性を強く示唆する。

- [1] Sumiyoshi, M. *et al.* *J Immunol.* 15;206(2):366-375. (2021)
- [2] Slack, M. *et al.* *Mol Immunol.* 68(200): 507-512. (2015)
- [3] Rasmussen, L. *et al.* *Cell Metab.*; 31(6): 1047-1049. (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 住吉麻実
2. 発表標題 Arfは活性化T細胞の生存維持に重要である
3. 学会等名 KYOTO T CELL CONFERENCE
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住吉麻実
2. 発表標題 Arf欠損T細胞におけるTCR刺激依存的なアポトーシス亢進の分子機構
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住吉麻実
2. 発表標題 T-lineage specific Arf-deficient mice are susceptible to Leishmania major infection.
3. 学会等名 日本免疫学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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