

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15488

研究課題名（和文）ビタミンCより発現誘導されるガレクチン3のメモリーT細胞の分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of memory T cell differentiation by vitamin C through upregulation of Galectin3

研究代表者

近藤 健太（Kondo, Kenta）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60779974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ビタミンCのDNA脱メチル化促進作用がCD8+ T細胞に及ぼす影響を評価した。その結果、ビタミンC処理 CD8+ T細胞は、病原体や腫瘍細胞に対する免疫応答が亢進することを見出した。ビタミンCがCD8+ T細胞の免疫応答を亢進させる機構を調べるため、ビタミンCにより発現増加するガレクチン3をノックダウンしたが、ビタミンCの効果を抑制できなかった。そのため、原因遺伝子をスクリーニングした結果、Batf3を同定した。Batf3をノックダウンするとビタミンCの効果が抑制され、Batf3をCD8+ T細胞に過剰発現させるとビタミンC処理を行なった場合と同様に免疫応答が亢進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ビタミンCはBatf3の発現増加を介してCD8+ T細胞の免疫応答を亢進させるという新たな生理学的役割を明らかにすることが出来た。本研究成果は、CD8+ T細胞の免疫応答やビタミンCの生理学的役割の理解と同時に、ビタミンCを利用した免疫療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the effect of vitamin C on CD8+ T cells. We found that vitamin C treatment enhances the immune responses of CD8+ T cells against pathogens and cancer. To investigate the mechanism by which vitamin C enhances the immune responses of CD8+ T cells, we knocked down the Galectin3 expression in vitamin C-treated CD8+ T cells. However, the knockdown of Galectin3 could not attenuate the effect of vitamin C on CD8+ T cells. Therefore, we screened for genes whose expression is altered by vitamin C. Eventually, we identified the transcription factor Batf3. The knockdown of Batf3 attenuated the effect of vitamin C on CD8+ T cells. In addition, transduction of Batf3 enhanced the immune responses of CD8+ T cells as well as vitamin C treatment.

研究分野：免疫学

キーワード：CD8+ T細胞 ビタミンC エピゲノム DNA脱メチル化

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) メモリーT細胞分化とDNA脱メチル化

病原体に感染するとCD8+ T細胞は活性化して病原体を排除する(1次免疫応答)。その後、一部の細胞は長期生存できるメモリーT細胞に分化し、同じ病原体に再感染すると迅速で強力に応答して速やかに病原体を排除する(2次免疫応答)。さらにメモリーT細胞は、高い抗腫瘍能も持ち合わせており、メモリーT細胞を増加させることで癌免疫療法の治療効果を改善できることが知られている<sup>1,2</sup>。メモリーT細胞の分化・機能に関連する遺伝子(メモリーT細胞関連遺伝子)のゲノム領域はエフェクターT細胞では高度にメチル化されているが、メモリーT細胞へ分化する時にDNA脱メチル化により発現量が増加することで、その分化が促進されることが報告されている<sup>3,4</sup>。しかしながら、どのような機構によりメモリーT細胞関連遺伝子のDNA脱メチル化が調整されているのかは不明である。

#### (2) ビタミンCによるDNA脱メチル化促進作用

ビタミンCは還元作用をもつ生体に必須の栄養素であり、DNA脱メチル化酵素(TET)を活性化することでDNA脱メチル化を促進する。我々は、予備的実験により、ビタミンC存在下で培養したCD8+ T細胞は、メモリーT細胞の特徴の1つである高い生存能をもつことを見出してきた。さらに、ビタミンC処理CD8+ T細胞は、ガレクチン3の発現量が増加していた。ガレクチン3は糖鎖に結合するβガラクトシド結合レクチンであり、T細胞受容体(TCR)関連分子の糖鎖に結合することでTCRシグナルを抑制する機能<sup>5</sup>やBcl-2ホモロジドドメイン1(BH1)によりアポトーシスを抑制する機能が知られている<sup>6,7</sup>。しかし、これらの機能がメモリーT細胞分化に関与しているのかは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、ビタミンCはCD8+ T細胞の生存能を亢進させることでメモリーT細胞への分化を促進させるという知見に基づき、ビタミンCがCD8+ T細胞の病原体や腫瘍細胞に対する免疫応答を亢進させるのかを検討することを目的とする。さらに、ビタミンCにより発現増加するガレクチン3がCD8+ T細胞の免疫応答の亢進に寄与しているのかも検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ビタミンC処理CD8+細胞の病原体に対する免疫応答の評価

卵白アルブミン(OVA)を認識するT細胞受容体(TCR)を発現するOT-I TCRトランスジェニックマウスからセルソーターを用いてナイーブOT-I T細胞(CD4<sup>-</sup>CD8a<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>+</sup>)を単離し、IL-2存在下で抗CD3抗体と抗CD28抗体を用いて抗原刺激を4日間行った。さらに抗原刺激により活性化したOT-I T細胞をビタミンC存在下で4日間培養した。このビタミンC処理OT-I T細胞をレシピエントマウスに移植し、約3週間後にOVA発現リステリア菌を感染させた。感染後、血液を採取し、移植したOT-I T細胞の免疫動態をフローサイトメトリーで解析した。

#### (2) ビタミンC処理CD8+ T細胞の腫瘍細胞に対する免疫応答の評価

ビタミンCで処理したCD8+ T細胞の腫瘍細胞に対する免疫応答を評価するため、OVAを発現する胸腺腫細胞(EG7)をレシピエントマウスの皮下に移植した。腫瘍細胞を移植後5日目に、(1)と同様の方法で用意したビタミンC処理OT-I T細胞を担癌マウスに移植した。その後、腫瘍の大きさとマウスの生存期間をモニタリングすることで、移植したOT-I T細胞の抗腫瘍活性を評価した。

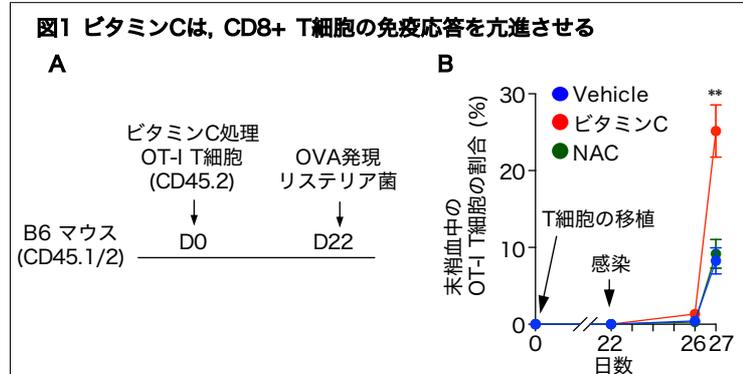
#### (3) 目的遺伝子のノックダウンもしくは過剰発現によるCD8+ T細胞の評価

ビタミンCにより発現変動する遺伝子もしくは当該遺伝子に対するmiRNAをコードしたレトロウイルスをOT-I T細胞に感染させて、目的遺伝子を過剰発現もしくはノックダウンさせた。このOT-I T細胞をレシピエントマウスに移植し、(1)と同様にOVA発現リステリア菌を感染させ、移植したOT-I T細胞の免疫応答を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) ビタミンC処理CD8+ T細胞は、リステリア菌に対する免疫応答が亢進する

先行研究により、ビタミンC存在下で培養したCD8+ T細胞は、生存能が亢進することが明らかになっていたが、病原体に対する免疫応答に及ぼす影響は不明であった。そこで、ビタミンCがCD8+ T細胞の病原体に対する免疫応答に及ぼす影響を評価するため、ビタミンC処理OT-I T細胞をレシピエントマウスに移植後、OVA発現リステリア菌を感染させた。その結果、OVA発現リステリア菌感染後、移植したOT-I T細胞は急激に増殖するが、対照群のVehicle処理CD8+ T細胞と比較して、ビタミンC処理OT-I T細胞は血液中の割合が高かった(図1A, B)。また、ビタミンCと同様に抗酸化作用をもつNアセチルシステイン(NAC)存在下で培養したOT-I T細胞は病原体に対する免疫応答は亢進していなかった。したがって、ビタミンCは抗酸化作用ではなく、DNA脱メチル化促進作用により、CD8+ T細胞の免疫応答を亢進させていることが考えられた。



(2) ガレクチン3は、ビタミンC処理CD8+ T細胞の免疫応答の亢進に寄与しない

ビタミンC処理は、CD8+ T細胞におけるガレクチン3の発現量を増加させるため、ビタミンC処理CD8+ T細胞の免疫応答の亢進は、ガレクチン3が関わっていることが予想された。そこで、レトロウイルスを用いてmiRNAを導入し、ガレクチン3をノックダウンすることで、ビタミンCの効果を抑制できるのかを検討した。予想に反して、ガレクチン3のノックダウンはビタミンC処理によるCD8+ T細胞の免疫応答亢進作用を抑制できなかった。さらに、レトロウイルスを用いてガレクチン3をCD8+ T細胞に過剰発現させても、免疫応答は亢進しなかった。したがって、ガレクチン3は、ビタミンCの免疫応答亢進作用には関与しないと考えられた。

(3) 転写因子Batf3は、ビタミンC処理CD8+ T細胞の免疫応答の亢進に寄与する

上記の通り、ビタミンC処理CD8+ T細胞で顕著に発現増加するガレクチン3は、免疫応答の亢進に関与しなかった。そのため、ビタミンC処理CD8+ T細胞で発現変動している遺伝子の中に、ビタミンCの免疫応答亢進作用に関わる遺伝子が存在すると考えて、スクリーニングを行なった。その結果、ビタミンCにより発現増加する転写因子Batf3を同定した。Batf3をノックダウンするとビタミンCの効果が減弱し、Batf3の過剰発現はビタミンCで処理した時と同様にCD8+ T細胞の免疫応答を亢進させることから、Batf3はビタミンC処理CD8+ T細胞の免疫応答亢進に関わるということが考えられた。

(4) ビタミンC処理CD8+ T細胞は、腫瘍細胞に対する免疫応答が亢進する

最後に、ビタミンC処理により、病原体だけでなく腫瘍細胞に対する免疫応答も亢進しているのかを検討するため、OVA発現腫瘍細胞を移植したレシピエントマウスにビタミンC処理OT-I細胞を移植することで腫瘍細胞に対する免疫応答を評価した。その結果、対照群のVehicle処理OT-I T細胞を移植した場合は、腫瘍の増殖を抑制できなかった。一方、ビタミンC処理OT-I T細胞を移植すると腫瘍の増殖が抑制され、担癌マウスの生存期間が延長した。したがって、ビタミンC処理CD8+ T細胞は、腫瘍細胞に対する免疫応答も亢進していることが示唆された。

以上の結果から、ビタミンCはBatf3の発現量を増加させることでCD8+ T細胞の免疫応答を亢進させることが示唆された。今後は、ビタミンC処理によりBatf3遺伝子座でメチル基が減少するゲノム領域を同定し、ビタミンCがBatf3の遺伝子発現を制御する機構を明らかにする予定である。

## 引用文献

1. Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., et al. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* *17*, 1290-1297. 10.1038/nm.2446.
2. Gattinoni, L., Zhong, X.S., Palmer, D.C., Ji, Y., Hinrichs, C.S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L.M., et al. (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8<sup>+</sup> memory stem cells. *Nat Med* *15*, 808-813. 10.1038/nm.1982.
3. Youngblood, B., Hale, J.S., Kissick, H.T., Ahn, E., Xu, X., Wieland, A., Araki, K., West, E.E., Ghoneim, H.E., Fan, Y., et al. (2017). Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature* *552*, 404-409. 10.1038/nature25144.
4. Ghoneim, H.E., Fan, Y., Moustaki, A., Abdelsamed, H.A., Dash, P., Dogra, P., Carter, R., Awad, W., Neale, G., Thomas, P.G., and Youngblood, B. (2017). De Novo Epigenetic Programs Inhibit PD-1 Blockade-Mediated T Cell Rejuvenation. *Cell* *170*, 142-157.e119. 10.1016/j.cell.2017.06.007.
5. Chen, H.Y., Fermin, A., Vardhana, S., Weng, I.C., Lo, K.F., Chang, E.Y., Maverakis, E., Yang, R.Y., Hsu, D.K., Dustin, M.L., and Liu, F.T. (2009). Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4<sup>+</sup> T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 14496-14501. 10.1073/pnas.0903497106.
6. Akahani, S., Nangia-Makker, P., Inohara, H., Kim, H.R., and Raz, A. (1997). Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res* *57*, 5272-5276.
7. Amani, M.F., Rolig, A.S., and Redmond, W.L. (2020). Intracellular Galectin-3 Is Essential for OX40-Mediated Memory CD8<sup>+</sup> T cell Development. *J Immunol* *205*, 1857-1866. 10.4049/jimmunol.1901052.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenta Kondo, Tatsuya Hasegawa, Koji Terada, Yasutoshi Agata
2. 発表標題 Vitamin C treatment promotes the persistence and immune responses of CD8 + 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 近藤健太、長谷川達矢、寺田晃土、口分田美奈、新田信人、前田菜摘、奥崎大介、縣保年
2. 発表標題 ビタミンCはCD8 T細胞の生存能を亢進させる
3. 学会等名 第31回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田信人、近藤健太、寺田晃土、永野誠治、河本宏、縣保年
2. 発表標題 iPS細胞から再生したT細胞の抗腫瘍活性に対するサイトカインの影響
3. 学会等名 第32回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 口分田美奈、近藤健太、寺田晃土、縣保年
2. 発表標題 Batfファミリー転写因子の過剰発現によるCD8+ T細胞の機能強化
3. 学会等名 第32回 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤健太, 長谷川達矢, 寺田晃士, 口分田美奈, 新田信人, 縣保年
2. 発表標題 ビタミン C による DNA 脱メチル化促進作用がCD8 T 細胞(キラー T 細胞)に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 日本ビタミン学会 第75 回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 口分田 美奈、近藤 健太、寺田 晃士、縣 保年
2. 発表標題 Batf ファミリー転写因子の過剰発現によるCD8+ T細胞の機能強化
3. 学会等名 第36回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新田 信人、近藤 健太、寺田 晃士、永野 誠治、三宅 亨、谷 眞至、河本 宏、縣 保年
2. 発表標題 iPS 細胞から再生した T 細胞の抗腫瘍活性に対するサイトカインの影響
3. 学会等名 第36回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kenta Kondo, Koji Terada, Yasutoshi Agata
2. 発表標題 Vitamin C treatment enhances the immune responses of CD8+ T cells by upregulation of Batf3
3. 学会等名 第52回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024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
---------	---------