

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20771

研究課題名（和文）T細胞補助刺激シグナルによる記憶細胞分化機構の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of memory T cell differentiation by co-stimulatory molecules

研究代表者

森 大輝（MORI, Daiki）

大阪大学・感染症総合教育研究拠点・特任助教（常勤）

研究者番号：50907508

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：T細胞に発現する補助刺激分子は、T細胞の分化・生存を司る重要な分子群であり、補助刺激分子によるT細胞活性化機構の解明は、効率よいワクチンの開発などに重要な課題である。本申請研究では、申請者がこれまでに見出した新規補助刺激分子シグナル下流分子の機能探索を行うための実験手法の樹立を目的とした。そこで、1) 標的遺伝子を欠損させたT細胞をin vitroで作製し、2) それを動物に移入することで生体内での機能を解析する実験系の樹立を試みた。遺伝子欠損法に関しては今後の更なる条件検討が必要であったが、T細胞を移入し生体応答を評価する実験法をセットアップすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、今後申請者がT細胞の補助刺激分子シグナル経路の解析を行うために必須の実験系の樹立などを行うことに成功した。T細胞に発現する補助刺激分子はT細胞の分化・生存を司る重要な分子群である。また、近年では補助刺激分子シグナルの違いは、T細胞の記憶細胞への分化や抗体産生を促す濾胞性ヘルパーT細胞の分化に影響を与えることが明らかとなってきた。今後の遂行状況次第では、T細胞の記憶細胞への分化機構などの新規メカニズムの解明などが期待できる。そのため、より効率良く免疫記憶を誘導できるワクチン法の開発などに貢献できる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：Co-stimulatory molecules expressed on T cells are an important group of molecules that regulate T cell differentiation and survival. Investigating the mechanisms of T cell activation by co-stimulatory molecules is one of the important issues for the development of efficient vaccines. Previously we investigated the molecules involving co-stimulatory signals by affinity purification followed by mass-spectrometry, and found novel interacting partners of PI3K. In this research, we attempted to establish an experimental method to disrupt genes of interest on T cells in vitro, and analyze their functions in vivo using adoptive T cell transfer experiments. Although further studies on the gene deletion method were needed, we succeeded in setting up an experimental method to transfer T cells and evaluate their in vivo responses.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 免疫記憶 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫記憶を司る T 細胞の人工的な活性化制御は、がんや感染症に対抗するための創薬標的として注目されている。その中でも T 細胞に発現する補助刺激分子は T 細胞の分化・生存を司る重要な分子群である。その為補助刺激分子による T 細胞活性化機構の解明は、効率よいワクチンの開発などに重要な課題である。申請者は、本研究開始前の留学先での研究において、T 細胞補助刺激分子シグナルに関連する機能未知の分子をいくつか同定していた。標的候補が複数存在したため、遺伝子欠損動物の作成ではなく、*in vitro* で遺伝子欠損を導入できる CRISPR-Cas9 法の使用を想定して実験の提案・計画を行った。

2. 研究の目的

本研究では、この機能未知分子の T 細胞での役割を解明するために、*in vitro* で T 細胞に遺伝子欠損を行う手法の樹立と、遺伝子機能を評価するための動物実験法の樹立を行うことを目的とした。これらを確認し、候補遺伝子を欠損させて T 細胞応答などを確認することで、それぞれの分子と補助刺激シグナルとの関連や免疫学的役割の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

候補遺伝子を *in vitro* で欠損させる手法として、Cas9 を恒常的に発現するマウス (Chiou SH et al, Genes Dev, 2015) と、gRNA を発現するレトロウイルスベクター (Theisen et al, Science, 2018) を検討した。また、生体内での標的遺伝子の機能を評価する実験系として、T 細胞の移入と感染モデルを用いた実験系の樹立を試みた。

4. 研究成果

2022 年度での研究成果

当該年度は、これらの分子の機能を検討する実験系の立ち上げなどに従事した。このためにまず、所属研究所の共通機器であるフローサイトメーターを用いて免疫反応後に増殖する T 細胞のサブセット解析を行う条件検討や抗体パネルの作成を行なった。また、今後使用する動物実験モデルの検討を行い、T 細胞応答を観察するために最適な条件を見出すことに成功した。また、今後の実験に必須であった T 細胞の移植モデルの実験系も樹立し、移植した抗原特異的 T 細胞が免疫応答にともなって活性化し増殖していることも確認できた。これらの結果によって、本研究の目的とする、特定の分子の T 細胞内での機能を検討する実験系を樹立することができた。そこで今後は今回樹立した実験系と、CRISPR-Cas9 を用いた実験系を組み合わせ、申請者がこれまでに見出している T 細胞補助刺激シグナル伝達経路に関連する機能未知の分子の機能解析を行う予定である。

2023 年度での研究成果

当該年度では、1) CRISPR-Cas9 を用いた実験系を樹立すること、2) レトロウイルスベクターを用いた T 細胞への遺伝子導入実験の条件検討を行なった。

1) では、gRNA を供与するシステムとして、Theisen et al で使用されているレトロウイルスベクターを使用した。条件検討を行うために、申請者が以前に使用した CD5 に対する gRNA 配列を使用し、CD5 陰性細胞を FACS で検出した。しかしながら、今回用いた T 細胞での実験系では gRNA の発言量が少なく十分な CD5 陰性細胞が検出できなかった。そこで、今後の方策として別の gRNA を供与するレトロウイルスベクターを addgene より入手し検討を行う予定である。

2) では、今後必要になる gRNA を導入した T 細胞を動物に移入し免疫応答を検討する実験系の検討を行った。検討を行うため、認識抗原既知の TCR をコードするレトロウイルスベクターを複製し実験を行った。活性化 T 細胞にレトロウイルスベクターを感染させ、その後の T 細胞応答を *in vitro* の実験系、及び前年度に樹立した T 細胞移入法を用いた動物実験系を用いて検討を行った。レトロウイルスベクター感染後の T 細胞は *in vitro* での反応、生体内での定着率がレトロウイルスベクター非感染細胞と比較してよくないことが明らかとなった。そこでレトロウイルスベクター感染後の T 細胞の培養条件を検討し、実験を行ったところ、*in vitro* での反応性、生体内での定着率共に上昇する条件を見出すことができた。

以上の研究を通して、本研究では、今後申請者がT細胞の補助刺激分子シグナル経路の解析を行うために必須の実験系の樹立などを行うことに成功した。T細胞に発現する補助刺激分子はT細胞の分化・生存を司る重要な分子群である。また、近年では補助刺激分子シグナルの違いにより、T細胞の記憶細胞への分化や抗体産生を促す濾胞性ヘルパーT細胞の分化に重要であることが明らかとなってきた。今後の遂行状況次第では、T細胞の記憶細胞への分化機構などの新規メカニズムの解明などが期待できる。そのため、より効率良く免疫記憶を誘導できるワクチン法の開発などに貢献できる可能性もある。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Haji Shojiro, Ito Taiki, Guenther Carla, Nakano Miyako, Shimizu Takashi, Mori Daiki, Chiba Yasunori, Tanaka Masato, Mishra Sushil K, Willment Janet A, Brown Gordon D, Nagae Masamichi, Yamasaki Sho | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Human Dectin-1 is O-glycosylated and serves as a ligand for C-type lectin receptor CLEC-2 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 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) 10.7554/eLife.83037 | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Anais Joachim, Rudy Aassel, Lena Gelard, Fanghui Zhang, Daiki Mori, Claude Gregoire, Sergio Villazala Merino, Mauro Gaya, Yinming Liang, Marie Malissen, Bernard Malissen. | 4. 巻 220(11) |
| 2. 論文標題 Defective LAT signalosome pathology in mice mimics human IgG4-related disease at single-cell level | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine | 6. 最初と最後の頁 e20231028 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20231028. | 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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 大輝、伊勢 涉 |
| 2. 発表標題 Analysis of clonal diversity of murine T follicular helper cells during influenza virus infection |
| 3. 学会等名 第53回日本免疫学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 森 大輝 |
| 2. 発表標題 濾胞性Tヘルパー細胞の記憶細胞分化機構の解明 |
| 3. 学会等名 第7回先進医薬研究報告会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Daiki Mori, Bernard Malissen |
| 2. 発表標題 Composition of the UBASH3A signalosome emphasizes its negative regulatory function in TCR signaling |
| 3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術総会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
| | |