

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890030

研究課題名（和文）記憶ヘルパー T 細胞形成における CD69 の役割

研究課題名（英文）Role of CD69 for the generation of memory T helper lymphocytes

研究代表者

篠田 健太（SHINODA KENTA）

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：10612195

研究成果の概要（和文）：

記憶ヘルパー T 細胞は免疫記憶に不可欠な細胞であるが、生体内における記憶ヘルパー T 細胞の分化や多様性、維持のメカニズムは未だ不明な点が多い。記憶ヘルパー T 細胞が活性化マーカーとして知られる CD69 を恒常的に高発現している点に着目したところ、CD69 遺伝子欠損マウスではエフェクターヘルパー T 細胞への分化や増殖が正常であるにもかかわらず、記憶ヘルパー T 細胞を欠損することが明らかとなった。CD69 は記憶ヘルパー T 細胞が定着する骨髄への移行に必須な役割を持っていることと同時に、ヘルパー T 細胞の骨髄への移行は記憶ヘルパー T 細胞の発生に必須であることも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Memory T helper (Th) lymphocytes play an essential role in immunological memory. However, little is known about the molecular mechanisms of the generation and maintenance of memory Th cells. We focused on CD69 and examined to clarify the role of CD69 in memory Th cells. Although CD69 does not appear to be required for the development of effector Th cells, the number of antigen-specific memory Th cells in CD69-deficient mice dramatically decreased compared to wild-type mice. CD69 plays a crucial role in the generation of memory Th cells and that the relocation of effector Th cells to the BM is essential for generation of memory Th cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：アレルギー・喘息、免疫学

1. 研究開始当初の背景

記憶ヘルパー T 細胞は免疫記憶に不可欠な細胞である。それらの細胞の非存在下では、長寿命プラズマ細胞の発生、また記憶キラー T 細胞の維持や二次応答に欠損が見られる。そのような免疫記憶の調節において重要であるにもかかわらず、生体内における記憶ヘルパー T 細胞の分化や多様性、維持、再

活性化についてほとんど知られていない。

抗原刺激を受けたナイーブヘルパー T 細胞は、リンパ節や脾臓などの二次リンパ器官で活性化・増殖しエフェクターヘルパー T 細胞になり、免疫反応終息後そのごく一部が記憶細胞として生体内で長期に生存すると考えられている。これまでどの臓器で記憶細胞が維持されているのかについては全くの不明であった。最近、当研

研究室で記憶ヘルパーT細胞が二次リンパ器官において免疫後3-8週間で骨髄へ移動し、その後何ヶ月も骨髄に定着し続けることを報告した(Tokoyoda et al., *Immunity* 30:721-730, 2009.)。さらに、記憶ヘルパーT細胞は骨髄のIL-7産生ストローマ細胞上で長期に渡り休止状態で、かつ再刺激時には高い反応性をもって維持されていることが分かり、IL-7産生ストローマが記憶ヘルパーT細胞のニッチであることも明らかにしてきた。この記憶ヘルパーT細胞は特異的にLy-6Cや活性化マーカーとして知られるCD69分子を高発現している。また、このLy-6C陽性記憶ヘルパーT細胞は、刺激後に効率よく抗体産生をヘルプすることができる。このことから、エフェクターヘルパーT細胞は骨髄に侵入後ニッチへ移動し、ニッチに接着して記憶ヘルパーT細胞として長期間生存し機能が維持されると考えられるが、この骨髄への侵入からニッチに接着するまでのプロセスやニッチによる記憶ヘルパーT細胞の生存維持や機能維持のメカニズムは全く不明である。そこで、本研究では生体内で抗原刺激を受けて分化したエフェクターヘルパーT細胞が骨髄に侵入しニッチで維持されるまでの細胞のダイナミクスと分子メカニズムの解明、及び記憶ヘルパーT細胞の持つ今までに知られていない機能を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

免疫記憶は高等生物の生体防御における最も重要な生体システムの一つである。私はその中で、免疫記憶の中核として働く記憶ヘルパーT細胞が生体内でどのように形成され維持されているかを解明したいと考えている。今まで、大部分の記憶ヘルパーT細胞が休止状態にも関わらず、CD69分子を特異的に高発現しており、またCD69遺伝子欠損マウスが記憶ヘルパーT細胞を特異的に欠損していることを明らかにしてきた。そこで本研究では、記憶ヘルパーT細胞の形成や維持において、どの段階で、またどのような分子機構でCD69分子が関わるのか、といったCD69分子の役割を解明すると同時に、この記憶ヘルパーT細胞を特異的に欠損したマウスを用いることによって液性免疫を中心とした免疫システムにおける記憶ヘルパーT細胞の役割を解明していく。本研究による免疫システムの解明は、アレルギーや自己免疫疾患などの免疫疾患の治療に大きく貢献すると考えている。

(1) CD69分子の機能と記憶ヘルパーT細胞形成における役割

われわれは既に、CD69遺伝子欠損マウスではエフェクターヘルパーT細胞への分化や増殖が正常であるにもかかわらず(Miki-Hosokawa et al., *J. Immunol.* 183 : 8202 - 8215, 2009)、記

憶ヘルパーT細胞を欠損することを明らかにしている。そこで、CD69遺伝子欠損マウスで記憶ヘルパーT細胞形成に障害が生じる原因としてエフェクターヘルパーT細胞の骨髄への移行、または骨髄での維持においてCD69分子が機能しているのではないかと考えた。そこで、CD69特異的抗体やCD69陽性細胞の局在や動態を解析することでその機能を明らかにすることができると考えている。われわれは、CD69分子の発現を組織学的に検出可能なCD69遺伝子座にGFPをノックインしたマウスを既に作製済みであり、CD69分子の発現とその局在を詳細に解析することが可能である。初めに免疫染色法で抗原特異的なエフェクターヘルパーT細胞の骨髄への移行時でのおおよその局在を明らかにした後、生きているマウス体内で細胞がどのように移動するかを明らかにすることができる生体内イメージング法を用いて、骨髄やリンパ節内のヘルパーT細胞の動態を観察する。さらに、CD69特異的抗体を用いてCD69分子の機能を阻害した時の影響を解析することでCD69分子の機能分子としての役割を明らかにしていくことができると考えている。CD69分子が機能する場所を同定することで、その場での発現が予想されるCD69分子の未知のリガンドについて解析していく。

(2) 記憶ヘルパーT細胞による高親和性抗体産生誘導メカニズム

われわれは、記憶ヘルパーT細胞を特異的に欠損するCD69遺伝子欠損マウスでは高親和性抗体の産生誘導能に著しい障害が生じることを見出している。CD69遺伝子欠損マウスでは脾臓中の胚中心B細胞及びプラズマ細胞は正常に形成されることから、プラズマ細胞の脾臓からの移出、骨髄への侵入、骨髄内での移動のいずれかの段階に障害があると考えられる。そこで、記憶ヘルパーT細胞とプラズマ細胞の動態を観察し、どのように記憶ヘルパーT細胞がプラズマ細胞と相互作用し、調節するかを解析していく。記憶ヘルパーT細胞の有無によりプラズマ細胞の細胞数や生体内における局在の変化を解析し、直接的あるいは間接的に記憶ヘルパーT細胞がプラズマ細胞を調節する機構について解明する。記憶ヘルパーT細胞の未だに知られていない役割を解明することができると考えている。

3. 研究の方法

まず、CD69遺伝子欠損マウスにおける記憶ヘルパーT細胞の欠損とCD69の生体内における役割について解析する。記憶ヘルパーT細胞の形成にCD69分子がどのように関与しているかを明らかにすると同時に、CD69分子の機能分子としての役割を解明したい。次に記憶ヘルパーT細胞の維持におけるCD69分子の役割を解析すると同時に、記憶ヘルパーT細胞のプラズマ細胞に対する作用について詳細に解析する。記憶へ

ルパーT細胞を特異的に欠損するCD69遺伝子欠損マウスを用いることで、記憶ヘルパーT細胞がどのように高親和性抗体の産生誘導を調節しているのかを解明し、液性免疫反応における記憶ヘルパーT細胞の新しい役割を明らかにする。

(1) CD69 分子の機能と記憶ヘルパーT 細胞形成における役割

CD69分子が記憶ヘルパーT細胞形成のどの段階で関与するのかを解明する。まず抗原特異的なCD69遺伝子欠損ヘルパーT細胞の免疫後の生体内での細胞数や局在について詳細に解析する。CD69遺伝子欠損マウスではエフェクターヘルパーT細胞の分化や増殖が正常に起こり、血中に存在するCD69遺伝子欠損エフェクターヘルパーT細胞の数も正常であることから、まずエフェクターヘルパーT細胞の骨髄への移入について着目している。われわれは既にCD69特異的抗体処理により抗原特異的エフェクターヘルパーT細胞の骨髄への移入が阻害されることを明らかにしている。このことからCD69分子がエフェクターヘルパーT細胞の骨髄への移行において機能分子として作用していることが示唆された。CD69遺伝子欠損エフェクターヘルパーT細胞でも同様の現象が認められるのかを解析すると同時に、CD69特異的抗体で処理した細胞の局在や動態を解析していく予定である。CD69分子が骨髄において機能分子として作用することが示唆されたことで、CD69分子の未知のリガンドが骨髄に発現していることが考えられる。CD69特異的抗体で処理した細胞やCD69遺伝子欠損エフェクターヘルパーT細胞の局在と野生型のエフェクターヘルパーT細胞の局在を比較することでCD69分子のリガンドを発現している細胞を同定することができると考えている。

また、われわれは既にCD69-GFPノックインマウスを作製済みで、生体内でのCD69陽性細胞の局在と動態を免疫染色法や生体内イメージング法を用いて解析することができる。われわれは既に多光子レーザー顕微鏡を用いた骨髄やリンパ節における生体内イメージング法を確立しており、従来の凍結切片免疫染色法やフローサイトメトリー法、全身における局在が観察できる超高感度CCDカメラによる生体内イメージングシステムとともに細胞の動態や局在を解析可能である。

さらに、CD69分子が記憶ヘルパーT細胞の維持に関与するのかを解明する。記憶ヘルパーT細胞はCD69分子を恒常的に発現していることから、定常時においてCD69分子が記憶ヘルパーT細胞の維持に関与していることが考えられる。そこで、CD69特異的抗体(Fabフラグメント)をマウスに投与することで記憶ヘルパーT細胞の数やその局在に変化が生じるか解析する。記憶ヘルパーT細胞上にCD69

分子が恒常的に発現していることから、CD69分子のリガンドが骨髄に発現している可能性が高い。血管内皮細胞や骨髄のストローマ細胞はLamininを発現している。われわれは既に、記憶ヘルパーT細胞のほとんどがLaminin陽性細胞と接着していることを明らかにしていることから、Laminin陽性細胞上において、未だ同定されていないCD69リガンドの存在が示唆された。そこで、CD69特異的抗体を処理してCD69分子とリガンドとの結合を阻害した時にLaminin陽性細胞と記憶ヘルパーT細胞の局在がどのように変化するか解析する。またその後、骨髄Laminin陽性細胞を分離し、その溶出タンパク質を標的にしてCD69分子のリガンドを分子生物学的手法を用いて解析する予定である。

(2) 記憶ヘルパーT 細胞による高親和性抗体産生誘導メカニズム

CD69 遺伝子欠損マウスでは高親和性抗体産生誘導能が低下しているにもかかわらず、免疫後14日目の脾臓では野生型同様に抗原特異的プラズマ細胞を誘導する。しかし、免疫後28日目では骨髄中の抗原特異的プラズマ細胞数が顕著に減少することを見出している。このことから、記憶ヘルパーT細胞はプラズマ細胞の脾臓での発生ではなく、骨髄への移行または骨髄での維持に関与していると考えられる。そこで、記憶ヘルパーT細胞が高親和性抗体の産生誘導に働く段階についてさらに詳細に解析していく。記憶ヘルパーT細胞がプラズマ細胞の①脾臓からの移出、②骨髄への移行、③骨髄での維持のどの段階で働くのかを明らかにする。免疫後の時間を振って凍結切片を作製し免疫染色法で観察し、おおよその記憶ヘルパーT細胞の侵入もしくはプラズマ細胞と接着する時間を同定する。その後、生体内イメージング法で動態を解析する。プラズマ細胞の発生する時間を確定するためにも、免疫染色法だけでなくフローサイトメトリー法やELISPOT法も用いる。

記憶ヘルパーT細胞のプラズマ細胞に対する役割をさらに明確にするために、記憶ヘルパーT細胞特異的欠損マウスであるCD69遺伝子欠損マウスを用いて解析する。従来、全ヘルパーT細胞を欠損したマウスは作製できていたが、記憶ヘルパーT細胞のみを欠損したマウスは未だ報告がない。野生型のマウス由来のプラズマ細胞をこの記憶ヘルパーT細胞欠損マウスに移入することで、プラズマ細胞のどの段階で記憶ヘルパーT細胞が作用しているか詳細に解析することができると考えている。つまり、CD69遺伝子欠損マウスの高親和性抗体産生誘導能を解析していくことで、記憶ヘルパーT細胞が間接的あるいは直接的にプラズマ細胞を制御し高親和性抗体産生誘導を行っているのか解析していく。さらにこのマウスを解析していくことによって、従来予想されていた役割以外の新しい記憶ヘルパーT細胞の役割を明らかにするこ

とができると考えている。

4. 研究成果

(1) CD69 分子の機能と記憶ヘルパーT 細胞形成における役割

これまでに私たちは大部分の記憶 CD4 T 細胞が骨髄に定着しており、高い反応性を保持したまま維持されていることを見出してきた。記憶 CD4 T 細胞の多くが CD69 を発現していることから CD69 遺伝子欠損マウスを用いて CD69 分子の機能と記憶ヘルパーT 細胞形成における役割について解析を行った。

まず、CD69 分子が記憶ヘルパーT 細胞形成のどの段階で関与するのかについて解析を行った。CD69 遺伝子欠損マウスではエフェクターヘルパーT 細胞の分化や増殖が正常に起こり、血中に存在する CD69 遺伝子欠損エフェクターヘルパーT 細胞の数も正常であるにもかかわらず、骨髄中に形成される CD69 遺伝子欠損記憶ヘルパーT 細胞の数が顕著に減少した (図1)。

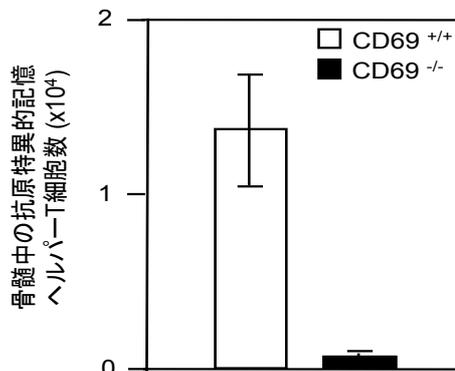


図1. CD69遺伝子の欠損により記憶ヘルパーT細胞は骨髄中に形成されない

次に、CD69 が記憶 CD4 T 細胞の発生にどのように関与しているのかについて解析した。CD69 特異的な抗体で CD69 の機能を阻害したところ、CD69 抗体で処理した CD4 T 細胞は骨髄への移行能に障害が生じる事を見出した。このことから、CD69 は CD4 T 細胞の骨髄への移行に必要な機能分子として働き、記憶 CD4 T 細胞の発生に必須な役割を担っていると考えられる。

CD69 特異的抗体処理により抗原特異的エフェクターヘルパーT 細胞の骨髄への移入が阻害されることを明らかにしていることから、それらの細胞の局在について解析したところ、CD69 特異的抗体で処理した細胞は Laminin 陽性細胞との接着が顕著に阻害される事が明らかとなった。また、われわれは既に CD69-GFP ノックインマウスを作製済みで、生体内での CD69 陽性細胞の局在を免疫染色法を用いて解析した。その結果、骨髄中の CD69 陽性細胞は陰性細胞と比べて顕著に

Laminin 陽性細胞と接着しているものの割合が高いことがわかった (図2)。

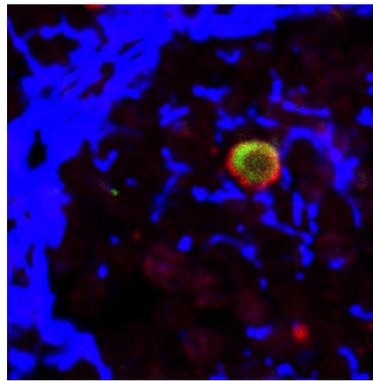


図2. 記憶ヘルパーT細胞(赤)はストローマ細胞(ラミニン、青)上に定着し、CD69(緑)を発現している。

これらのことから、Laminin 陽性細胞上において、未だ同定されていない CD69 リガンドの存在が示唆された。

(2) 記憶ヘルパーT 細胞による高親和性抗体産生誘導メカニズム

記憶 CD4 T 細胞の特徴の一つとして、高親和性抗体の産生を制御する機能がある。そこで、CD69 遺伝子欠損マウスにおける高親和性抗体の産生誘導能を解析したところ、野生型のものに比べて高親和性抗体の産生が低下しており、その現象は、CD4 T 細胞上の CD69 に依存していることも明らかになった (図3)。

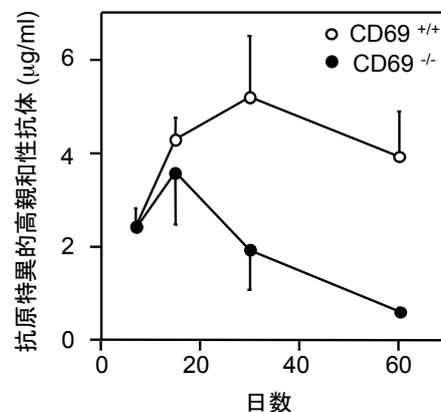


図3. CD69遺伝子欠損ヘルパーT細胞は高親和性抗体産生誘導能が顕著に低い

以上の事から CD69 遺伝子欠損マウスでは機能的な記憶 CD4 T 細胞が形成されない事が証明された。

CD69 遺伝子欠損マウスの表現型を解析したことにより、このマウスが記憶 CD4 T 細胞を特異的に欠損するマウスとして世界で初めて発見されたことになる。今後はこのマウスを用いて、記憶 CD4 T 細胞の従来予想された役割を証明し、さらに予想外の記憶 CD4 T 細胞の新しい役割も明らかにすることができると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件) 全て査読有り

1. Iwamura, C., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Tumes, J. D., Motohashi, S., Kawahara, K., Kinjo, Y., and Nakayama, T.: Regulation of memory CD4 T-cell pool size and function by natural killer T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(42):16992-16997 (2012). DOI: 10.1073/pnas.1203494109
 2. Kuwahara, M., Yamashita, M., Shinoda, K., Tofukuji, S., Onodera, A., Shinnakasu, R., Motohashi, S., Hosokawa, H., Tumes, D., Iwamura, C., Lefebvre, V., and Nakayama, T.: The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- β and suppresses Th2 differentiation. *Nat. Immunol.* 13(8):778-786 (2012). DOI: 10.1038/ni.2362
 3. Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Zehentmeier, S., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, J. D., Radbruch, A., and Nakayama, T.: Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(19):7409-7414 (2012). DOI:10.1073/pnas.1118539109
 4. Yamashita, J., Iwamura, C., Mitsumori, K., Hosokawa, H., Sasaki, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Kaneko, K., Hanazawa, A., Watanabe, Y., Shinoda, K., Tumes, D., Motohashi, S., and Nakayama, T.: *Murine Schnurri-2* controls Natural Killer cell function and lymphoma development. *Leuk. Lymphoma* 53(3):479-86 (2011) DOI: 10.3109/10428194.2011.625099
 5. Hirasaki, Y., Iwamura, C., Yamashita, M., Ito, T., Kitajima, M., Shinoda, K., Namiki, T., Terasawa, K., and Nakayama, T.: Repressor of GATA negatively regulates murine contact hypersensitivity through the inhibition of type-2 allergic responses. *Clin. Immunol.* 139:267-276 (2011). DOI: 10.1016/j.clim.2010.12.022
- [学会発表] (計12件)
1. Kenta Shinoda, Chiaki Iwamura, Koji Tokoyoda, Toshinori Nakayama Generation and Maintenance of memory T-helper lymphocytes The 1st Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum (IIMVF) January 29, 2013
 2. Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Hosokawa, H., Iwamura, C., Koseki, H., Tumes, D., Radbruch, A., and Nakayama, T.: CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. 第41回日本免疫学会学術集会, 2012.12.5-7, 神戸
 3. Shinoda, K., Tokoyoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., and Nakayama, T.: CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. THE 34th NAITO CONFERENCE ON Infection, Immunity, and their control for Health. 2012.10.16-19, Sapporo.
 4. Nakayama, T., Endo, Y., Kuwahara, M., Yamashita, M., Iwamura, C., Shinoda, K., and Tokoyoda, K.: Generation and maintenance of memory CD4 T cells. (招待講演) THE 34th NAITO CONFERENCE ON Infection, Immunity, and their control for Health. 2012.10.16-19, Sapporo.
 5. 篠田健太、常世田好司、花澤麻美、林崎浩史、中山俊憲: CD69 は記憶ヘルパーT細胞の形成を制御する 第22回 Kyoto T Cell Conference 和順会館 2012年7月6日~7日
 6. Shinoda K., Nakayama T. CD69 regulates the formation of resting T helper memory. 14th International Conference on Lymphocyte Activation and Immune Regulation, 2012.2.3-5, Newport Beach, USA.
 7. 岩村千秋、篠田健太、高橋克己、中山俊憲 活性化NKT細胞によるメモリーTh2細胞の増加と機能変化/ Selective expansion and functional modulation of memory Th2 cells by activated NKT cells in vivo. 第40回日本免疫学会学術集会, 2011.11.27-29, 幕張.
 8. Tokoyoda, K., Shinoda, K., Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Radbruch, A., and Nakayama, T.: 骨髄における T ヘルパー記憶の成立/ Establishment of T helper memory in bone marrow. 第40回日本免疫学会学術集会, 2011.11.27-29, 幕張.
 9. Hirasaki, Y., Iwamura, C., Yamashita, M., Ito, T., Shinoda, K., and Nakayama, T.: ROG はTh2による肥満細胞の脱顆粒を制御する事で接触性皮膚炎を抑制する/ Repressor of GATA negatively regulates the induction of contact hypersensitivity via Th2-induced mast cell degranulation. 第40回日本免疫学会学術集会, 2011.11.27-29, 幕張.
 10. Kuwahara, M., Iwamura, C., Shinoda, K., Tofukuji, S., Suzuki, J., Nakayama, T., and Yamashita, M.: Sox4はTGF β により誘導され、Th2型免疫反応を抑制する/ Sox4 acts as a downstream target of TGF β and suppresses Th2 type immune responses. 第40回日本免疫学会学術集会, 2011.11.27-29, 幕張
 11. 岩村千秋、篠田健太、花澤麻美、中山俊憲 Selective expansion and functional modulation of memory Th2 cells by activated NKT cells in vivo 第21回 Kyoto T Cell Conference, 2011.6.10-11, 京都.

12. 桑原誠、岩村千秋、篠田健太、東福寺聡一、鈴木淳平、中山俊憲、山下政克 HMG box 型転写因子 Sox4 は TGF- β 刺激で誘導され、Th2細胞分化を抑制する 第21回 Kyoto T Cell Conference, 2011.6.10-11, 京都

〔図書〕 (計 1 件)

1. 篠田健太、中山俊憲 記憶ヘルパーT細胞形成における CD69 の役割 医学のあゆみ 243(3):246-247 (2012・10)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 健太 (SHINODA KENTA)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：10612195