

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2013～2014  
課題番号：25670227  
研究課題名(和文) ナイーブCD4T細胞における運命決定機構

研究課題名(英文) Heterogeneity of naive CD4 T cells

## 研究代表者

徳久 剛史 (Tokuhiisa, Takeshi)

千葉大学・学長

研究者番号：20134364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではナイーブT細胞の分化機構の解析を目的とした。マウスのナイーブCD4T細胞にLy6ChighとLy6Clowとの2種の細胞が存在すること、これらは活性化後の機能が異なり、Ly6Clow細胞の分化に転写因子Bcl6が必要であることを見出した。胸腺CD4T細胞は、IFNa, IFNg刺激でLy6Cの発現誘導が引き起こされるが、Bcl6欠損CD4T細胞ではより低濃度でLy6Cの発現が誘導された。

本研究からナイーブCD4T細胞は複数の細胞が存在し、Bcl6はIFNa, IFNgの感受性を調整することで、ナイーブCD4T細胞の分化に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found Ly6C high (Ly6Chi) and low (Ly6Clo) naive CD4 T cells in the spleen of a mouse strain. Ly6Chi but not Ly6Clo naive CD4 T cells produced IFN-g, TNF-a and IL-2 after activation with anti-CD3 and anti-CD28 Abs. Within 2 d after leaving thymus, 50% of CD4+CD8- thymocytes which express low levels of Ly6C stably up-regulate Ly6C without cell division in the spleen. Moreover, majority of naive CD4 T cells in the spleen of Bcl6-deficient mice belonged to Ly6Chi naive CD4 T cells. When CD4+CD8- thymocytes were stimulated with IFN-a or IFN-g but not with IL-2 in vitro, Ly6Chi naive CD4 T cells were developed within 2 d and CD4+CD8- thymocytes from Bcl6-KO mice were more sensitive to IFN-a or IFN-g stimulation. These data indicate that Bcl6 regulates heterogeneity of naive CD4 T cells in the periphery by controlling the signals initiated by IFN-a or IFN-g stimulation.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 発生・分化 遺伝子 濾胞ヘルパーT細胞 胸腺

### 1. 研究開始当初の背景

感染応答の要である高親和性抗体産生メモリーB細胞は、二次リンパ臓器内の胚中心において濾胞性ヘルパーT(Tfh)細胞のヘルプのもとに分化する。このTfh細胞の分化にBcl6が必須であるが、ナイーブCD4T細胞からBcl6の発現誘導を介してTfh細胞に分化誘導する分子メカニズムは不明である。また、抗原が再度生体内に入ると二次応答が起きるが、長期間生体内で維持されるメモリーT細胞とメモリーB細胞とがこの応答に必要である。申請者らは、メモリーCD4T細胞の分化にもBcl6が重要であることを報告したが、どの時点でBcl6が機能を発揮しているのか、詳細な機構は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本課題では、ナイーブCD4T細胞の多様性を明らかにし、胸腺CD4T細胞からナイーブCD4T細胞への分化機序を解析する。さらに、培養系や生体内で多様な細胞がどのように機能するか、Tfh細胞や、メモリー細胞の分化を含んだ生理的な意義の全容を明らかにする。これらの研究成果は、新規ワクチン開発の基盤となるばかりか、免疫不全、自己免疫疾患などの治療応用への展開が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) ナイーブCD4T細胞の不均一性の検証：

ナイーブCD4T細胞におけるBcl6の発現に不均一性があるかを検証する目的でCD62L+CD44-ナイーブCD4T細胞でのBcl6の発現を細胞内染色およびフローサイトメトリ(FACS)で解析し、Bcl6欠損マウス由来のCD4T細胞と比較する。

ナイーブCD4T細胞における不均一性を評価できる細胞表面抗原を検索する。ナイーブCD4T細胞を様々な抗体で染色して発現量をFACSで解析し、Bcl6遺伝子改変マウスと比較する。

これらの不均一性を胸腺、二次リンパ臓器、肺など末梢臓器で解析し、表現型を

異にするナイーブCD4T細胞の局在を明らかにする。

#### (2) 胸腺CD4T細胞からLy6C陽性ナイーブCD4T細胞への分化機序の解析：

胸腺CD4T細胞からそれぞれのナイーブCD4T細胞へ分化する過程を明らかにする。正常マウスやBcl6欠損マウス胸腺よりCD4+CD8-T細胞を分取し、CFSEで染色後、野性型コンジェニックマウスに移入してLy6Cの発現量を解析する。

胸腺CD4T細胞やLy6C陰性ナイーブCD4T細胞にLy6Cの発現を誘導する刺激系を検索し、それらの遺伝子欠損マウスや、阻害抗体を用いて生理的意義を検証する。

#### (3) Ly6C陰性およびLy6C陽性ナイーブCD4T細胞の分化と機能解析：

Ly6C陰性およびLy6C陽性のナイーブCD4T細胞の性質の違いを明らかにする目的で、それぞれの細胞を抗CD3/CD28抗体で刺激した後、活性化能やサイトサインの分泌を解析することで二つのCD4T細胞の機能的な違いを明らかにする。

野性型マウスよりLy6C陰性およびLy6C陽性のナイーブCD4T細胞を分取し、CD28欠損マウスにそれぞれの細胞を移入後NP-CGGで免疫してTfh細胞への分化および機能を免疫学的に解析する。CD28欠損マウスは正常な組織構造をした二次リンパ臓器を持つが、自身のCD4T細胞はTfh細胞に分化しないため、移入したCD4T細胞のTfh細胞への分化機能を評価できる。さらに、Ly5.1の系を用いてLy6C陰性とLy6C陽性ナイーブCD4T細胞の免疫後の脾臓におけるCXCR5+PD-1+のTfh細胞への分化をFACSにより検証する。免疫マウスに再度抗原を移入してメモリー細胞への分化と機能を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) ナイーブCD4T細胞の不均一性の検証：

ナイーブCD4T細胞におけるBcl6の発現を

細胞内染色およびFACSで解析した結果、Bcl6タンパクの発現の少ない細胞や多い細胞が検出された。この発現レベルは胚中心B細胞やTfhほどには高くなかった。ナイーブCD4T細胞における表面抗原の解析の結果、Ly6Cの発現の高いLy6C陽性細胞と、低いLy6C陰性細胞が存在した。それぞれにおける転写因子の発現を遺伝子レベルで解析した結果、Bcl6の発現がLy6C陰性の細胞でより高値を示した。Bcl6欠損マウスではほとんどのナイーブCD4T細胞がLy6C陽性細胞であった。二次リンパ臓器、肺など末梢臓器でも同じ結果だったことから、臓器への局在による細胞表現型の差ではなく、分化の違いと考えた。この結果から、Ly6C<sup>low</sup>の細胞の分化にBcl6が必要であることが示唆された。

(2) 胸腺CD4T細胞からLy6C陽性ナイーブCD4T細胞への分化機序の解析：

胸腺CD4T細胞は野生型、Bcl6欠損マウスともにLy6C陰性であった。そこで、末梢に輸出した後の細胞の分化を調べるために野生型マウスやBcl6欠損マウス胸腺より分取したCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>T細胞を細胞分裂が解析できるようにCFSEで染色後、野性型コンジェニックマウスに移入してLy6Cの発現量を解析した。その結果、野生型胸腺細胞は移入後2日で約50%がLy6C陽性に分化したが、Bcl6欠損マウスでは80%以上がLy6C陽性になった。細胞分裂はいずれの細胞でも起こっていなかった。このことから、CD4T細胞内のBcl6の発現が、ナイーブT細胞の分化を調整していることが示唆された。

胸腺CD4T細胞にLy6Cの発現を誘導する刺激を検索した結果、IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$ は野生型胸腺にもLy6Cの発現を誘導し、Bcl6欠損胸腺細胞では、より低濃度でLy6Cの発現を誘導することを明らかにした。野生型胸

腺移入時にIFN $\alpha$ の阻害抗体を投与するとLy6C陽性細胞の分化が抑制された。一方IFMg欠損マウスのナイーブCD4T細胞を解析すると、Ly6Cの発現は野生型と同程度であった。これらの結果から、ナイーブ細胞のLy6C発現は生理的にはIFN $\alpha$ が作用しており、Bcl6はIFN $\alpha$ やIFN $\gamma$ への感受性を調することで分化を制御していることが示唆された。感受性調整の分子機構は現在解析中である。

(3) Ly6C陰性およびLy6C陽性ナイーブCD4T細胞の分化と機能解析：

Ly6C陰性およびLy6C陽性のナイーブCD4T細胞の性質の違いを明らかにする目的で、各細胞を抗CD3/CD28抗体で刺激した後、活性化能やサイトカインの分泌を解析した。CD44陽性のメモリー表現型CD4T細胞と比較して、サイトカインの産生開始は遅く、ナイーブCD4T細胞としての機能を持つ細胞であることが明らかになった。しかしLy6C陽性細胞はよりTh1型のサイトカインの分泌を示し、活性化後のCD25の発現も高かった。一方、Ly6C陰性細胞はあまり多くのサイトカインを産生せず、IL21のみを多く産生した。これらの結果から、Ly6C陽性と陰性の細胞とでは活性化後の機能が異なることが明らかになった。

野性型マウスよりLy6C陰性およびLy6C陽性のナイーブCD4T細胞を分取し、CD28欠損マウスやコンジェニックマウスに移入後NP-CGGで免疫してTfh細胞への分化および機能を免疫学的に解析した。その結果どちらの細胞からもTfhは分化したが、Ly6C陰性の細胞でその割合が多かった。抗体価はLy6C陰性細胞を移入したマウスでより高く、抗原親和性も高かった。移入後6カ月での抗原再刺激5日後の細胞を解析すると、Ly6C陰性細胞でTfh様のメモリーCD4T細胞が顕著に多かった。こ

れらより、Ly6C陰性細胞は、ややTfhに分化しやすい傾向があり、メモリー細胞としてはよりTfhとして機能する細胞であることが示唆された。

以上の結果、CD4T細胞は特異的な抗原刺激を受ける前にIFN $\alpha$ 等の刺激により機能分化して不均一性をきたしていること、この機能分化にBcl6が関与していることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計7件)

Watanabe-Takano H, Takano K, Sakamoto A, Matsumoto K, Tokuhisa T, Endo T, Hatano M. DA-Raf-dependent inhibition of the Ras-ERK signaling pathway in type 2 alveolar epithelial cells controls alveolar formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014. 111:E2291-300. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1321574111.

Ikari J, Inamine A, Yamamoto T, Watanabe-Takano H, Yoshida N, Fujimura L, Taniguchi T, Sakamoto A, Hatano M, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M. Plant homeodomain finger protein 11 promotes class switch recombination to IgE in murine activated B cells. Allergy 2014 . 69:223-30. 査読有 doi : 10.1111/all.12328.

Tsuruoka N, Arima M, Yoshida N, Okada S, Sakamoto A, Hatano M, Satake H, Arguni E, Wang JY, Yang JH, Nishikura K, Sekiya S, Shozu M, Tokuhisa T. ADAR1 protein induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6 gene-deficient cells. J Biol Chem. 2013. 288:826-36. 査読有 doi : 10.1074/jbc.M112.365718.

Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano

M, Arima M, Miyata S, Nagai N, Tokuhisa T, Matsuo O. Lack of both  $\alpha$ 2-antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. Life Sci. 2013. 93:89-95. 査読有 doi : 10.1016/j.lfs.2013.05.023.

Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, Tokuhisa T, Oda S, Hatano M. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. Crit Care. 2013. 17:R160. 査読有 PMID: 23883625.

Huang J, Li X, Kohno K, Hatano M, Tokuhisa T, Murray PJ, Brocker T, Tsuji M. Generation of tissue-specific H-2Kd transgenic mice for the study of K(d)-restricted malaria epitope-specific CD8+ T-cell responses in vivo. J Immunol Methods. 2013. 387:254-61. 査読有 doi : 10.1016/j.jim.2012.10.019.

Hirata H, Arima M, Fukushima Y, Sugiyama K, Tokuhisa T, Fukuda T. Leukotriene C4 aggravates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Respirology. 2013. 18:674-81. 査読有 doi : 10.1111/resp.12072.

### [学会発表](計10件)

紙谷 聡英、近田裕美、井田絹代、坂本明美、徳久剛史. 肝臓における薬物代謝の性差を制御する新規分子の探索 第8回日本性差医学・医療学会学術集会 2015年1月31 - 2月1日 ホテルクレメント徳島(徳島県・徳島市)

Fujimura L, Ohara Y, Arima M, Sakamoto A, Tokuhisa T, Hatano M. Role of enteric neurons in regulation of intestinal epithelial homeostasis. 第43回日本免疫学会学術集会 2014年12月10 - 12日 国立京都国際会館(京都)

府・京都市)  
上嶋繁、岡田清孝、河尾直之、矢野昌人、  
田村行識、田中勝喜、坂本明美、幡野雅  
彦、有馬雅史、宮田清司、永井信夫、徳  
久剛史、松尾理. a2-antiplasmin/PAI-1  
両遺伝子欠損マウスにおける免疫系の  
変化についての検討. 第 36 回日本血栓  
止血学会 2014 年 5 月 30 日 大阪国際  
交流センター (大阪府・大阪市)

近田裕美、坂本明美、徳久剛史、紙谷聡  
英. 肝臓における薬物代謝の性差を制  
御する分子メカニズム 第 13 回日本再生  
医療学会総会 2014 年 3 月 4 - 6 日 国  
立京都国際会館 (京都府・京都市)

徳久剛史「免疫記憶細胞の形成と維持」  
東京免疫フォーラム 2014 年 2 月 24 日  
東京大学医科学研究所 (東京都・港区)

Taniguchi, T., Sakamoto, A., Hatano,  
M., Matsumoto, K., Saito, H.,

Tokuhisa, T., Arima, M. Bcl6 regulates  
production of SLAM-Associated  
Protein in follicular helper T cells. 第  
42 回日本免疫学会学術集会 2013 年 12  
月 11 - 13 日 幕張メッセ (千葉県・千  
葉市)

Fujimura L, Ohara Y, Arima M,  
Sakamoto A, Tokuhisa T, Hatano M.  
Possible role of enteric neurons in  
regulation of intestinal microbiota. 第  
42 回日本免疫学会学術集会 2013 年 12  
月 11 - 13 日 幕張メッセ (千葉県・千  
葉市)

Kawaharta K, Kanazaki T, Akahira R,  
Michishita K, Dphi M, Tokuhisa T,  
Yamamoto L. Intestinal microbiota  
plays a critical role in the production  
of antinuclear antibodies in  
lymphopenia-induced autoimmunity.  
第 42 回日本免疫学会学術集会 2013 年  
12 月 11 - 13 日 幕張メッセ (千葉県・  
千葉市)

高野 晴子, 幡野 雅彦, 坂本 明美, 高野  
和儀, 徳久 剛史, 遠藤 剛. Ras-ERK カ  
スケードのアンタゴニスト DA-Raf は肺  
胞形成を制御している. 第 65 回細胞生  
物学会大会 2013 年 6 月 19 - 21 日 ウ  
ィンクあいち (愛知県・名古屋市)

徳久剛史、有馬雅史「IgE 抗体産生機構  
と制御法の開発」第 25 回日本アレルギー  
学会 2013 年 5 月 12 日 パシフィコ横  
浜 (神奈川県・横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳久 剛史 (TOKUHISA TAKESHI)  
千葉大学・学長  
研究者番号: 20134364

### (2) 研究分担者

坂本 明美 (SAKAMOTO AKEMI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号: 90359597