

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460579

研究課題名(和文) T細胞の疲弊を制御する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanisms to control T-cell exhaustion

研究代表者

山田 武司 (Yamada, Takeshi)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40333554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：HIV等の慢性型感染症では、T細胞の疲弊が病原体の排除を困難にしていることが知られている。そこで本研究では、T細胞疲弊が誘導されるメカニズムを解明するため、マウスモデルを用いた解析を行った。腫瘍抑制因子Meninを欠損させたマウスを解析した結果、細胞内寄生細菌であるリステリアの感染により活性化した抗原特異的CD8 T細胞において、T細胞疲弊が誘導されることを見出した。Meninの欠損により、活性化CD8 T細胞では終末型エフェクターへの分化亢進や抑制性受容体の高発現が観察されることから、Meninはエフェクター分化を制御し、T細胞疲弊の抑制に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been known that T-cell exhaustion reduces function of T cells to eliminate pathogens during chronic infections such as HIV infection. In this study, we thus analyzed the inducible mechanisms of T-cell exhaustion using a mouse model. Our study revealed that T-cell exhaustion was induced in antigen-specific CD8 T cells lacking a tumor suppressor Menin after infection with an intracellular pathogen *Listeria*. We observed that Menin deficiency enhanced terminal-effector differentiation and increased expression of inhibitory receptors in activated CD8 T cells, suggesting that Menin controls differentiation into effectors and inhibits T-cell exhaustion.

研究分野：感染免疫

キーワード：T細胞疲弊 CD8 慢性型感染症

## 1. 研究開始当初の背景

近年、基礎免疫学がめざましい発展を遂げ、その研究成果を基盤とした治療法が開発され、炎症性疾患や癌の治療においては一定の効果をあげることに成功している。感染症分野への基礎免疫学の成果応用に関しても、HIVをはじめとする慢性型ウイルス感染症に対するワクチンの開発や免疫療法の確立などが期待されている。例えば、HIV 感染では、これまで多くの抗 HIV 薬が開発され、効率的な血中ウイルス量の低下を実現しているものの、依然ウイルスを完全に駆逐できない状況にあり、免疫活性化による発症予防や治療法の開発がこの現状を打破する有効な手段であると考えられている。しかしながら、慢性型感染症では、持続的な抗原刺激と炎症性サイトカインによる過剰な T 細胞増殖に伴って誘導される、“T 細胞機能不全 (疲弊; Exhaustion)” が、免疫療法を困難なものにしている。これまでの研究から、HIV 感染長期未発症者では AIDS 発症者に比べ、高い免疫能が維持されていることから AIDS 発症予防には免疫能の維持が重要であることが明らかとなっている。また、AIDS 発症者に見られる免疫能低下に、CD8 T 細胞における抑制性受容体 PD-1 分子の高発現が関与していることも明らかにされており、免疫を基盤とした慢性感染症に対する治療法の開発には、T 細胞疲弊を制御する方法論の確立が必要であり、その達成には、疲弊を抑制する分子メカニズムの解明が必須であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、抑制性受容体の発現誘導を介した T 細胞の疲弊メカニズムをマウスモデルにより解明し、疲弊を抑制した実用的な免疫療法を開発することにある。まず、必要となる実験マウスモデルの開発に関しては、これまでの予備実験から腫瘍抑制因子の 1 つである Menin の欠損マウス由来 T 細胞が、

活性化早期に疲弊を引き起こすことを発見している。この Menin 欠損マウスで見られる T 細胞疲弊が慢性感染症で見られる T 細胞の疲弊現象に類似していることから、Menin 欠損マウスが T 細胞疲弊研究の良いモデルと考え、マウスモデルを用いた T 細胞疲弊メカニズムの解明を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、T 細胞活性化に伴う T 細胞疲弊制御メカニズムの解明を、腫瘍抑制因子 Menin 欠損マウスを用いて行った。実験には T 細胞特異的 Menin 欠損マウス (Menin<sup>flox/flox</sup> CD4-Cre マウス) を使用し、Menin の T 細胞機能維持における役割について個体から細胞レベルにわたって解析した。まず細胞内寄生細菌であるリステリアを Menin 欠損マウスに感染させることにより誘導される抗原特異的 CD8 T 細胞の増殖について個体レベルで解析し、次に、Menin による抑制性受容体の発現解析および細胞死など T 細胞疲弊に関する解析を細胞レベルで行った。さらに、T 細胞疲弊と分化との関係を明らかにするため、CD8 T 細胞における分化を、表面マーカーや機能的アッセイにより詳細に解析した。

## 4. 研究成果

まず、*in vitro* での研究から、腫瘍抑制因子 Menin を欠損させた CD8 T 細胞において、抗原刺激による活性化後、野生型 CD8 T 細胞に比べ早期に抑制性受容体の高発現や増殖の停止など疲弊現象が誘導されることを見出した。そこで Menin 欠損マウスが、T 細胞疲弊研究の良いモデルになると判断し、リステリア感染に対する CD8 T 細胞の感染免疫応答に関して以下の 2 つの解析を行った。

### (1) 感染免疫応答の解析

CD8 T 細胞の感染免疫応答における Menin の役割について明らかにするため、T 細胞特異的 Menin 欠損マウスを用い、リステリア感

染に対する抗原特異的 CD8 T 細胞の免疫応答を経時的に解析した。その結果、野生型では感染後抗原特異的 CD8 T 細胞数が経時的に増加し、感染 7 日目にピークを示した。一方、Menin 欠損型では細胞数が 5 日目に比べて減少し、早期に免疫応答の退縮 (contraction) を示すことが分かった。その結果、Menin 欠損マウスでは効率よくリステリアを排除出来ないことが明らかとなった (図 1)。

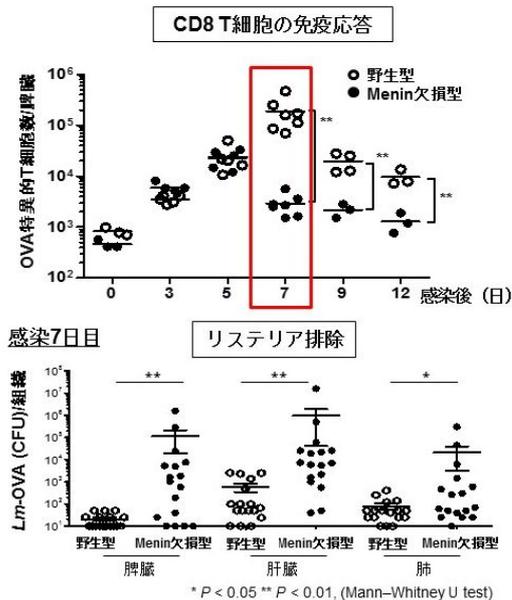


図 1 リステリア感染に対する免疫応答

## (2) 活性化 CD8 T 細胞における分化の解析

Menin 欠損 CD8 T 細胞数が活性化後早期に減少する原因を明らかにするため、T 細胞の疲弊についてリステリア感染 5 日目に解析したところ、予想されたとおり、Menin の欠損により、抑制性受容体の高発現と共に増殖の低下や細胞死の増加といった T 細胞疲弊現象が誘導されることが明らかとなった (図 2)。

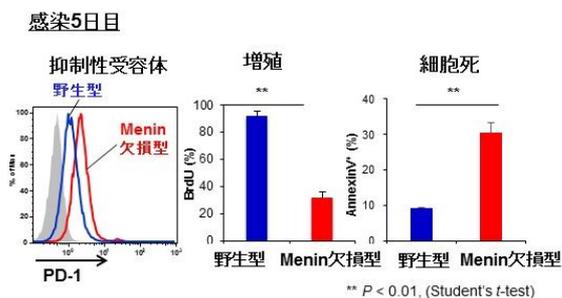


図 2 活性化 CD8 T 細胞に見られる疲弊現象

さらに、リステリア感染 5 日目の抗原特異的 CD8 T 細胞における分化について調べたところ、Menin の欠損により、長期生存型のメモリー前駆細胞を示す CD127 高発現細胞の割合が減少し、終末型エフェクターを示す KLRG1 高発現細胞の割合が上昇していることが明らかとなった (図 3)。

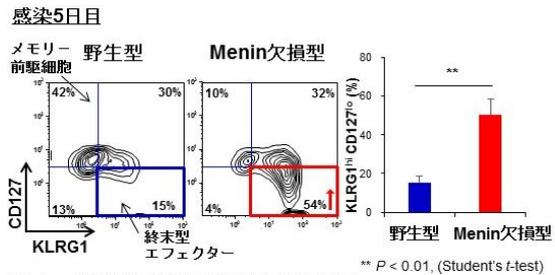


図 3 活性化 CD8 T 細胞の分化異常

以上の結果から、腫瘍抑制因子 Menin は過剰なエフェクター分化を制御し、T 細胞疲弊を抑制している可能性が示唆された。これらの成果を元に、今後はさらに、Menin 欠損マウスを T 細胞疲弊モデルとして解析を進め、Menin あるいはその下流の標的因子を制御することで、疲弊を抑制する手法の開発を行う。将来的には慢性型感染症の克服を目指した免疫療法への応用を目指す予定である。

## 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)

Yamada T, Kanoh M, Nabe S, Yasuoka T, Suzuki J, Matsumoto A, Kuwahara M, Maruyama S, Fujimoto T, Sakisuka R, Yasukawa M, and Yamashita M.

Menin plays a critical role in the regulation of the antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell response upon *Listeria* infection. *J. Immunol.* 197(10):4079-4089, 2016. 査読有  
DOI: 10.4049/jimmunol.1502295

Yasuoka T, Kuwahara M, Yamada T, Maruyama S, Suzuki J, Taniguchi M, Yasukawa M, Yamashita M.

The transcriptional repressor Gfi1 plays a critical role in the development of NKT1- and NKT2-type iNKT cells. *Plos One*, June;

11(6):e0157395, 2016. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0157395

Nagy-Szakal D, Mir AV.S, Harris R.A, Dowd S.E, **Yamada T**, Lacorazza H.D, Tatevian N, Smith C.W, Kellermayer R.  
Loss of omega-6 fatty acid induced pediatric obesity protects against murine colitis. *FASEB J.*, 29(8):3151-9, 2015. 査読有  
DOI: 10.1096/fj.14-267690

Lee P-H\*, **Yamada T**\*, Park CS, Shen Y, Puppi M, Lacorazza H.D.  
G0S2 modulates homeostatic proliferation of naïve CD8<sup>+</sup> T cells and inhibits oxidative phosphorylation in mitochondria. *Immunol Cell Biol.*, 93(7):605-15, 2015. \*equally contributed 査読有  
DOI: 10.1038/icb.2015.9

Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, **Yamada T**, Kanoh M, Matsumoto A, Maruyama S, Kometani K, Kurosaki T, Ohara O, Nakayama T, Yamashita M.  
The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4<sup>+</sup> T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nature Communications*, 5:3555, 2014. 査読有  
DOI: 10.1038/ncomms4555

〔学会発表〕(計 8 件)

**Yamada T**, Toriyama K, Nabe S, Kanoh M, Imai Y, Yasukawa M, and Yamashita M.  
Histone H3K27 demethylase negatively controls memory formation of Ag-stimulated CD8<sup>+</sup> T cells. 7<sup>th</sup> International Workshop Kyoto T cell conference, Shirankaikan in Kyoto University, Kyoto city, Kyoto, Japan, March 13-17, 2017 年

藤本拓也、**山田武司**、安川正貴  
CD8 陽性 T 細胞の感染免疫応答における腫瘍抑制因子 Menin の役割, 第 90 回日本感染症学会, 仙台国際センター, 宮城県仙台市, 4 月 15 ~ 16 日, 2016 年

**Yamada T**, Kanoh M, Matsumoto A, Yasuoka T, Suzuki J, Maruyama S, Kuwahara M, and Yasukawa M, Yamashita M.  
Menin plays a critical role in the survival of antigen-specific activated CD8<sup>+</sup> T cells upon infection. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology (JSI), Sapporo Convention Center, Sapporo city, Hokkaido, Japan, November 18-20, 2015 年.

Yasuoka T, Kuwahara M, Maruyama S, Ochi M, Suzuki J, Matsumoto A, Kanoh M, **Yamada T**, and Yamashita M.  
The transcriptional repressor Gfi1 is critical

for NK1.1-positive invariant NKT cell development and effector function. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology (JSI), Sapporo Convention Center, Sapporo city, Hokkaido, Japan, November 18-20, 2015 年.

Suzuki J, Kuwahara M, Maruyama S, **Yamada T**, Yasuoka T, Yasukawa M, and Yamashita M.  
A tumor suppressor Menin controls CD8 T cell senescence by regulating energy metabolism. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology (JSI), Sapporo Convention Center, Sapporo city, Hokkaido, Japan, November 18-20, 2015 年.

鈴木淳平、桑原誠、**山田武司**、安川正貴、山下政克  
腫瘍抑制因子 Menin は代謝調節を介して CD8T 細胞老化を制御する, 第 3 回がん代謝研究会, 石川県立音楽堂交流ホール, 石川県金沢市, 7 月 16 ~ 17 日, 2015 年

Suzuki J, **Yamada T**, Yasuoka T, Ochi M, Kuwahara M, Yasukawa M, and Yamashita M.  
Crutial role of Menin in the epigenetic regulation of Satb1 expression in CD8 T cells. The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology (JSI), Kyoto International Conference Center, Kyoto city, Kyoto, Japan, December 10-12, 2014 年.

**Yamada T**, Kanoh M, Matsumoto A, Yasuoka T, Suzuki J, Kuwahara M, and Yamashita M.  
Menin plays a critical role in the expansion and maintenance of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells upon infection, The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology (JSI), Kyoto International Conference Center, Kyoto city, Kyoto, Japan, December 10-12, 2014 年.

〔図書〕(計 件) 該当なし

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件) 該当なし  
取得状況 (計 件) 該当なし

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://ehime-u-immunology.com/>

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者  
山田 武司 (Yamada , Takeshi )  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 40333554

(2) 研究分担者 該当なし

(3)連携研究者 該当なし