

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860325

研究課題名(和文)メモリーCD8T細胞恒常性維持機構の新規メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidating the molecular basis of memory CD8+ T cell maintenance

研究代表者

瀬戸口 留可 (Setoguchi, Ruka)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50415204

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)：メモリーCD8T細胞は外来抗原が生体内から除去された後も免疫系に長期間生存し、高い生体防御能力を維持する。MHCクラスII(MHCII)欠損マウスにおけるメモリーCD8T細胞の恒常性維持破綻は、CD4T細胞の欠損が原因ではなく、MHCII分子を欠損した環境において常在菌非依存的にメモリーCD8T細胞の遺伝子発現パターンを変化させ、エフェクター細胞の特徴を付与していることが本研究により明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Memory CD8 T cells are long-lived antigen (Ag)-specific T cells which respond quickly and exert effector functions faster than naive T cells upon reencounter with the Ags. Memory CD8 T cells are maintained at a stable size over long periods, but the mechanisms by which their size is maintained remain elusive. It has been proposed that the maintenance of memory CD8 T cells depends on CD4 T cells, based on the observation that CD8 T cells which have been primed with Ags in wild-type (WT) mice survive poorly when transferred into MHCII<sup>-/-</sup> as compared to WT hosts. Our study revealed that the impaired maintenance of memory CD8 T cells in MHCII<sup>-/-</sup> mice is not due to the absence of CD4 T cells. Our RNA-Seq analysis showed the upregulation of effector-like gene expressions in memory CD8 T cells in MHCII<sup>-/-</sup> compared with in WT mice. Antibiotics treatment or Myd88 deficiency did not alter the defect, indicating that commensal bacteria or Myd88-dependent signal was not involved with the defect.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶 恒常性維持 MHCクラスII

## 1. 研究開始当初の背景

獲得免疫系は感染性微生物や腫瘍細胞から生体を防御する必要不可欠なシステムである。その重要な性質として免疫学的記憶が挙げられる。免疫学的記憶とは、一度感染症を患いその後回復したヒトは同一の感染症にかからない、またはすぐに治癒する現象をいう。この現象はその後ワクチンとして応用され、人類の感染症との闘いに大きく貢献している。免疫学的記憶は病原微生物の構成要素（抗原）に特異的に反応できるメモリーT細胞とメモリーB細胞が主要な担い手である。メモリーB細胞が不活化している場合や、存在しない場合、細胞障害活性の強いメモリーCD8T細胞のみでも個体を感染から防御することが可能である（Graham MB, *et al.* *J. Exp. Med.* 1997）。現在、免疫学的記憶に関する研究は、その重要性は明白であるにも関わらず、日本では立ち遅れている研究分野である。

通常免疫反応では、抗原によって感作されたことのないナイーブCD8T細胞が外来抗原に反応し増殖した後、大部分が細胞死を起こす一方、少数のCD8T細胞が生き残り、もう一度同じ抗原に遭遇した際、素早く効率的に免疫反応を起こす。このように外来抗原が生体内から除去された後も長く免疫系に存在し、再刺激により素早くエフェクター機能を発現するCD8T細胞をメモリーCD8T細胞と呼ぶ。メモリーCD8T細胞の恒常性維持に必要な分子としてこれまでにIL-7、IL-15、CD4T細胞によるヘルプが報告されている。最近の動向としては、これ以外にメカニズムは存在しないかの如く、新たな分子機構の報告はない。

これまで、MHCクラスII（MHCII）欠損マウスを用いた実験から、メモリーCD8T細胞の数の維持にはCD4T細胞からのヘルプが重要であると考えられてきた（Sun JC, *et al.* *Nat Immunol.* 2004）。しかしながら申請者は、CD4T細胞ではなく、むしろMHCII分子自体またはMHCII分子を欠損している細胞自体の機能異常がメモリーCD8T細胞の数の維持に影響を及ぼすことを、他のCD4T細胞欠損マウスモデルを用いて見出した。また、ナイーブT細胞をMHCII欠損マウスに移入しても数は減少しないことから、数の減少はメモリーCD8T細胞特異的に誘導されていることも見出した。メモリーCD8T細胞の恒常性維持に重要であるIL-7およびIL-15の発現量はmRNAおよび蛋白レベルでも、MHCII欠損マウスと野生型マウスにおいて差異はなかった。つまりMHCII欠損マウスにおけるメモリーCD8T細胞の数の減少は既存のメカニズムでは説明できない。

MHCII欠損マウスにおけるメモリーCD8T細胞の恒常性破綻のメカニズムを解明することで、メモリーT細胞の恒常性維持の新たなメカニズムが明らかになることが期待される。また、CD8T細胞を標的としたワクチン効

果を高める新たな戦略の確立に道が開かれると期待される。

## 2. 研究の目的

メモリーCD8T細胞は外来抗原が生体内から除去された後も免疫系に長期間生存し、高い生体防御能力を維持する。これまで、MHCII欠損マウスを用いた実験からメモリーCD8T細胞の維持にCD4T細胞が重要であると考えられてきたが、我々は、CD4T細胞ではなく、MHCII分子の欠損自体がメモリーCD8T細胞の恒常性に影響を及ぼすことを見出した。さらに、MHCII欠損マウスに移入したメモリーT細胞は活性化したT細胞の特徴（CCR7の発現減少、ccna2 mRNAの発現上昇）を示すことを見出し、MHCII欠損環境下ではT細胞が活性化しやすいため恒常性破綻をきたすという仮説をたてた。本研究では、この仮説を基にメモリーCD8T細胞の新規の恒常性維持機構を解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

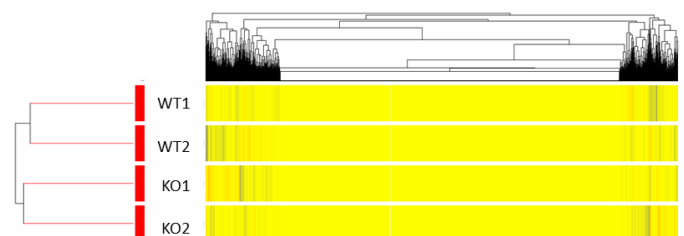
野生型マウスにおいて抗原特異的CD8T細胞を病原体により活性化させ、メモリー期に入った後（4-8週後）に、これらのマウスからCD8T細胞を分取し、MHCII欠損マウスおよび野生型マウスに移入し、移入後2-4週間後または3か月後に解析を行った。

MHCII欠損マウスにおけるメモリーCD8T細胞の恒常性維持破綻の内因的原因の検討として、これまでの研究により明らかになったCCR7の発現減少とccna2 mRNAの発現上昇以外の活性化の指標となる分子の発現変動を検討した。特にRNA-Seq法による遺伝子発現パターンの解析を行った。MHCII欠損マウスにおけるメモリーCD8T細胞の恒常性維持破綻の外因的原因として、共生細菌およびMyd88を介したシグナルが関与しているかを、前者は抗生物質投与により、後者はMHCIIとMyd88のダブルノックアウトマウスをホストとして使用することで検討した。

## 4. 研究成果

野生型マウスにおいてメモリーとなった抗原得的CD8T細胞を、MHCII欠損マウスまたは野生型マウスに移入し、2週後（移入したメモリーT細胞が減少し始めている時点）にこのメモリーCD8T細胞をそれぞれのマウスより分取し、RNAを調整した。これを用い、

図1: 野生型およびMHCII<sup>-/-</sup>マウスに移入したメモリーCD8T細胞の遺伝子発現プロファイル



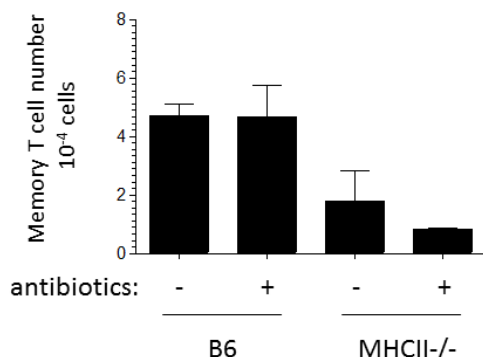
メモリーT細胞の遺伝子発現パターンを、RNA-Seqの手法を用いて比較したところ(図1) ccna2のみならず、S期からM期に発現する細胞周期関連分子群の発現がMHCII欠損マウスに移入したメモリーT細胞で上昇していた。さらにサイトカイン刺激により発現が上昇する遺伝子群が検出され、MHCII欠損マウスに移入したメモリーT細胞はエフェクターへの分化が誘導されているのではないかと考えられた。

Short lived effector cells は  $KLRG1^{high}IL-7R\alpha^{low}$  で定義される細胞群に多く存在することが報告されている(Sarkar, et al. *J Exp Med.* 2008, Joshi, et al. *Immunity* 2007)。そこで、野生型およびMHCII欠損マウスに移入したメモリーT細胞でこの細胞群の数を検討したところ、大きな差異はなかった。また、T-bet/Eomes/STAT3の発現を蛋白レベルで検討したところ、野生型およびMHCII欠損マウスに移入したメモリーT細胞ではこれらの分子の発現に大きな差異は観察されなかった。今後RNA-seq法から得られたデータから、野生型およびMHCII欠損マウスに移入したメモリーT細胞で発現が大きく異なる分子を明らかにする必要がある。

次にメモリーCD8T細胞の恒常性維持を阻害する環境因子の探索の一環として下記の実験を行った。

SPF環境下で飼育したマウスのT細胞が活性化する原因として、マウス個体内に共生している細菌が1つの候補として挙げられる。そこで、MHCII欠損マウスに抗生物質(Ampicillin, Neomycin, Vancomycin, Metronidazole)を飲料水から摂取させる群と、抗生物質なしの飲料水を摂取させる群とを用意し、移入したメモリーT細胞の数の影響を及ぼすかどうかを検討した。移入後、5週後に脾臓における抗原特異的メモリーCD8T細胞の数を解析したところ、野生型マウスにおいて抗生物質を摂取した群と摂取しない群を比較した場合、メモリーT細胞の数は同等に存在し、MHCII欠損マウスにおいて抗生物質を摂取した群と摂取しない群を比較した場合でも、野生型マウスよりどちらの

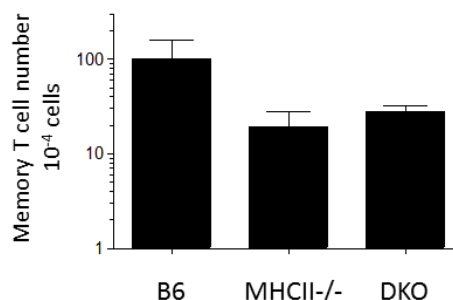
図2: 抗生物質投与による脾臓におけるメモリーCD8T細胞の数への影響



場合も数が減少しており、この2つの実験群の間でメモリーT細胞の数は同等であった。結果としてメモリーCD8T細胞の恒常性維持に、共生細菌の減少は影響を及ぼさなかった(図2)。

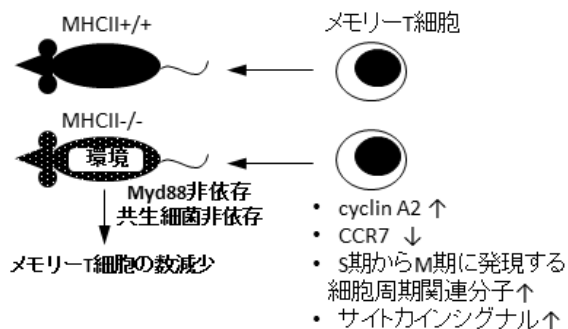
抗生物質処理では、共生細菌の数を減少させられるが、無菌にできるわけではない。そこで、共生細菌が免疫系を活性化させる場合、Myd88を介したToll like receptor (TLR)シグナルの経路を必要とすると考え、MHCII欠損マウスとMyd88欠損マウスを掛け合せ、double knockout(DKO)を作成し、MHCII欠損マウスを対照群とし、移入したメモリーT細胞の数の影響を及ぼすかどうかを検討した。

図3: Myd88-/-MHCII-/- (DKO) マウスの脾臓におけるメモリーCD8T細胞の数



抗原特異的CD8T細胞移入後約3か月後に、脾臓におけるその数を解析したところ、DKOマウスにおいてもMHCII欠損マウスと同等のメモリーT細胞の数の減少が観察された(図3)。この結果から、MHCII欠損マウスにおけるメモリーCD8T細胞の減少は、ホスト側においてTLRシグナル非依存的に誘導されていることが考えられる。

図4: 結果の要約



以上の結果から、MHCII欠損マウスにおいてメモリーT細胞は、投与した抗生物質に感受性のある常在細菌およびMyd88非依存的に活性化され、エフェクターT細胞の一部の性質を獲得し(S期からM期に発現する細胞周期関連分子の発現上昇、CCR7の発現減少、およびサイトカインシグナルの亢進)、恒常性維持が破綻すると考えられた(図4)。

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2件)

1, IL-15 boosts the function and migration of human terminally differentiated CD8+ T cells by inducing a unique gene signature. Setoguchi R  
Int Immunol. 2016 Feb 8 (Epub ahead of print)  
DOI: 10.1093/intimm/dxw004

2, mTOR signaling promotes a robust and continuous production of IFN- by human memory CD8+ T cells and their proliferation.  
Setoguchi R, Matsui Y, Mouri K  
Eur J Immunol. 2015 vol.45, p893-902  
DOI: 10.1002/eji.201445086

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
[http://www.ak.med.kyoto-u.ac.jp/group\\_research/setoguchiG.html](http://www.ak.med.kyoto-u.ac.jp/group_research/setoguchiG.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者：瀬戸口 留可  
(SETOGUCHI, Ruka)

京都大学医学研究科 AK プロジェクト  
特定准教授

研究者番号：50415204

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：