

## 中山人間科学振興財団 2021 年度研究助成 活動報告書

研究テーマ

「リンパ球の自然免疫機能に基く新たな感染症治療戦略の創出」

氏名

河部 剛史

所属

東北大学大学院医学系研究科 病理病態学講座 免疫学分野・准教授

### 【本文】

#### (I) 背景および目的

CD4<sup>+</sup> T 細胞は、外来抗原特異的獲得免疫応答に必須のリンパ球である。すなわち病原体感染時、外来抗原に特異的な T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を有するナイーブ細胞は爆発的に増殖しエフェクター細胞へと分化し、病原体を生体内から排除する。感染終結後、大半のエフェクター細胞は死滅するが、一部の細胞はメモリー細胞として長期に生存し、生涯免疫記憶を形成する。これらの細胞集団からなる T 細胞免疫系は、精密な制御機構により、その恒常性が生涯にわたり維持される<sup>(1)</sup>。

申請者は最近、CD4<sup>+</sup> T 細胞中の一分画として、外来抗原ではなく自己抗原特異的に産生され恒常的に準活性化状態を呈する新規細胞集団「Memory-phenotype (MP)細胞」を同定した<sup>(2)</sup>。MP 細胞は、獲得免疫の中樞を担うはずの T 細胞にあつて自然免疫機能を有するという極めて特異な性質を保持し、現在免疫学界において大きな注目を集めている<sup>(3,4,5)</sup>。

MP 細胞は、抗原認識非依存性かつサイトカイン反応性にエフェクターサイトカインを産生しうることから、本来は自然リンパ球 (ILC) と類似の機序で自然免疫的感染防御に寄与するものと考えられる。実際に我々は、自然リンパ球における ILC1/2/3 分類と同様に、MP 細胞が MP1/2/17 サブセットに分類され得るとの知見を得ている<sup>(6)</sup>。このことから、MP1/2/17 サブセットがそれぞれ固有の分化

機構や感染防御機能を有する可能性が示唆される。

そこで本研究では、MP 細胞の質的特異性や分化・活性化機構を解明し、さらには同細胞による自然免疫的感染防御機能を究明することを目的とした。

## **(II) 方法**

マウスは、C57BL/6 野生型および各種遺伝子改変マウスを specific pathogen-free 環境下で飼育したものを用いた。MP 細胞の質的特異性や分化機構を解明するために、野生型や各種遺伝子欠損マウスを用いた Single cell RNAseq (scRNAseq) ならびにフローサイトメトリー解析を行った。また、同細胞の感染防御機能を明らかにする目的で、マウスを *Toxoplasma gondii* 感染に供し生存解析等を施行した。

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」を厳正に遵守し、「東北大学における動物実験に関する指針」に則り科学的かつ人道的に適切な方法で行った。実験計画は、東北大学環境安全委員会動物実験専門委員会の承認のもとに行った。また、遺伝子組換え実験（第二種使用等）は「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守し、「東北大学遺伝子組換え実験安全管理規定」に則り科学的かつ倫理的に適切な方法で行った。実験計画は、東北大学環境安全委員会遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認のもとに行った。

## **(III) 結果**

### **(i) MP 細胞の特性**

MP 細胞は自己抗原認識依存的に産生され、病原体感染時には自然免疫機能を発揮する。このことから同細胞は、外来抗原特異的に活性化し獲得免疫を担う抗原特異的メモリーT 細胞とは質的に異なる存在であるものと考えられる<sup>(1,3,5)</sup>。しかし、両者を鑑別するマーカーはこれまで同定されていなかった。

そこで我々はまず、scRNAseq 解析により、MP 細胞とリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 特異的メモリーT 細胞の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、両者を区別するマーカーの候補として、細胞表面蛋白質 X、Y、細胞内蛋白質 Z の遺伝子が同定された。両細胞におけるこれらの蛋白発現を比較したところ、ほぼ全ての抗原特異的メモリーT 細胞が  $X^+ Y^+ Z^{hi}$  の表現型を有するの

に対し、MP 細胞は  $X^- Y^+$ 、 $X^+ Y^+$ 、 $X^+ Y^-$ 、 $X^- Y^-$  (全て  $Z^{lo}$ ) の 4 細胞集団に分類されることが分かった。すなわち、MP 細胞の鑑別マーカーとして X, Y, Z が同定された (投稿中)。

上記の知見をもとに、現在、MP 細胞に含まれる 4 分画の意義の解明、TCR repertoire の解析、ヒト MP 細胞の同定等を施行中である。

### (ii) MP 細胞の分化機構

我々は、MP 細胞の不均質性 (Heterogeneity) を解析する目的で、T-bet/ROR $\gamma$ t/Foxp3 レポーターマウス由来の MP 細胞の scRNAseq ならびにフローサイトメトリー解析を行ったところ、定常状態下において MP 細胞が T-bet<sup>+</sup> MP1、ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> MP17、T-bet<sup>-</sup> ROR $\gamma$ t<sup>-</sup> MP0 等のサブセットから構成されることが明らかになった。特に MP1 細胞は T-bet<sup>hi</sup> CXCR3<sup>+</sup> の極めて高度な分化状態を呈しており、そうした分画が MP 細胞のうち約半数を占めることが分かった。

そこで我々は、MP1 分画の恒常的分化機構を解析した。その結果、定常状態下において MP1 分化は 1 型樹状細胞 (DC1) 由来の IL-12 に依存して起こることが示された。この恒常的 IL-12 は DC1 において TLR-MyD88 シグナル依存的に産生され、正常細菌叢を欠く Germ-free マウスや一切の外来抗原・アゴニストを欠損する Antigen-free マウスにおいても等しく生成されることが証明された。また、DC1 による IL-12 産生は CD40 シグナルによってさらに増幅され、同シグナルは MP 細胞自身により供給されることも明らかになった。これらの事実より、IL-12 の恒常的産生ひいては MP1 分化は自己抗原・アゴニストの認識により惹起・増幅されるものと考えられた。

さらに我々は、MP 細胞の恒常性維持機構を解析した。T-bet<sup>-</sup>、T-bet<sup>lo</sup> および T-bet<sup>hi</sup> MP 細胞をそれぞれ分取し、コンジェニックマウスに移入したうえで経時的にドナー細胞を解析したところ、T-bet<sup>lo</sup> および T-bet<sup>hi</sup> MP 細胞は時間経過とともにその T-bet 発現量を減少させることが明らかになった。一方、T-bet<sup>-</sup> および T-bet<sup>lo</sup> 細胞は T-bet<sup>hi</sup> 細胞を産生しなかったことから、T-bet<sup>hi</sup> MP1 細胞はナイーブ細胞より直接的に産生・分化することが示唆された。

### (iii) MP 細胞の活性化機構と感染防御機能

MP1 細胞の自然免疫的エフェクター機能を詳細に解析するために、我々は

CD4-CreERT2 x TCR $\alpha^{flx}$  マウスに T-bet / IFN- $\gamma$  ダブルレポーターマウスを交配し、タモキシフェン投与により MP 細胞上から TCR を消失させることに成功した。これら TCR $^{-}$  MP 細胞上の T-bet / IFN- $\gamma$  レポーター発現を解析することにより、TCR シグナル非存在下における MP1 細胞の IFN- $\gamma$  産生量を定量的に測定することが可能である。このマウスに *T. gondii* を感染させ、TCR $^{-}$  MP1 細胞による IFN- $\gamma$  産生を経時的に計測したところ、MP 細胞は TCR シグナル非存在下においても IL-12/18 に反応して IFN- $\gamma$  を産生することが明らかになった。また、免疫不全マウスに MP1 細胞を移入したうえで同マウスを *T. gondii* 感染に供し、さらに抗原認識を抗体投与によりブロックしたうえで生存解析を施行したところ、MP1 細胞は抗原認識非依存的に生存期間を有意に延長することが分かった。さらに、IL-12 を人為的に投与したうえで同様の実験を行ったところ、MP1 による延命効果が劇的に改善することも明らかになった。以上より、MP1 サブセットが MP 細胞による自然免疫機能の主軸を担うこと、同反応には IL-12 が必須の役割を果たすことが証明された。

現在、MP2/17 サブセットに関しても同様に、その活性化機構や感染防御機能を検討中である。

#### (IV) 考察

上記の一連の研究により、定常状態における MP1 細胞の分化機構や自然免疫的感染防御機能が証明された。このことから、MP2/17 サブセットに関しても同様にそれぞれ固有の分化機構や感染防御機能の存在が示唆され、現在、MP 細胞の分化機構・エフェクター機能を包括的に解明するプロジェクトが鋭意進行中である。今後、MP 細胞の分化機構の全容が明らかになれば、同細胞を人為的に活性化することにより、病原体の特異性によらず幅広い感染症に対応する新規「免疫賦活化治療」の創出にも資するものと期待される<sup>(7)</sup>。

一方で我々は、本研究において、MP 細胞が全身性の炎症を惹起しうることを示唆する所見を得た（投稿準備中）。この知見は、MP 細胞が自己免疫疾患の本質的病因であるとの我々の従来からの仮説<sup>(4,7)</sup>を強く支持している。今後、MP 細胞による全身性炎症惹起メカニズムを分子レベルで明らかにすることにより、「免疫賦活化治療」に伴いうる炎症副作用の軽減にも資するものと期待される。

## (V) 文献

1. Kawabe T, Yi J, Sprent J. Homeostasis of naïve and memory T lymphocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **13**(9), a037879, 2021.
2. Kawabe T, Jankovic D, Kawabe S, Huang Y, Lee PH, Yamane H, Zhu J, Sher A, Germain RN, Paul WE. Memory-phenotype CD4<sup>+</sup> T cells spontaneously generated under steady-state conditions exert innate TH1-like effector function. *Science Immunology* **2**(12), eaam9304, 2017.
3. Kawabe T, Zhu J, Sher A. Foreign antigen-independent memory-phenotype CD4<sup>+</sup> T cells: a new player in innate immunity? *Nature Reviews Immunology* **18**(3), 1, 2018.
4. Yi J, Kawabe T, Sprent J. New insights on T-cell self-tolerance. *Current Opinions in Immunology* **63**, 14-20, 2020.
5. Kawabe T, Sher A. Memory-phenotype CD4<sup>+</sup> T cells: a naturally arising T lymphocyte population possessing innate immune function. *International Immunology*, In press.
6. Kawabe T, Yi J, Kawajiri A, Hilligan K, Fang D, Ishii N, Yamane H, Zhu J, Jankovic D, Kim KS, Trinchieri G, Sher A. Requirements for the differentiation of innate T-bet(high) memory-phenotype CD4(+) T lymphocytes under steady state. *Nature Communications* **11**(1), 3366, 2020.
7. Kawabe T. Memory-phenotype CD4<sup>+</sup> T lymphocytes: a novel therapeutic target in infectious or autoimmune diseases? *JMA Journal*, Accepted.