

平成 24 年 12 月 26 日

免疫記憶細胞老化の制御機構の開発

代表研究者 千葉大学大学院医学研究院 助教 坂本明美

共同研究者 千葉大学大学院医学研究院 教授 徳久剛史

千葉大学大学院医学研究院 講師 有馬雅史

【まとめ】

ワクチン接種後、リンパ球を中心とするメモリー細胞が形成されるが、しだいに老化、減少し、再感染のときに十分機能できなくなる場合がある。本研究では、生体内で長期機能するメモリーCD8T細胞の分化機構を解析した。その結果、転写抑制因子 *Bcl6* が免疫後早期から活性化CD8T細胞に発現し、IL-2の産生やIL-2レセプターの発現を制御してIL-2シグナルを調整することで、メモリーCD8T前駆細胞の分化を誘導することが明らかになった。

1. 研究の目的

免疫記憶の成立は細菌、ウイルス感染応答の要であり、ワクチン療法の基盤となる。これらの記憶細胞の中心はリンパ球であるが、一度分化した免疫記憶リンパ球はしだいに老化したり減少したりして、再感染のときに十分機能できなくなる場合がある。この機構を明らかにして効率的な感染症の予防ができれば、高齢化社会の生命予後や生活の質の向上に繋がる。すでに申請者らはマウスを用いた感染実験モデルで抗原特異的メモリーCD8T細胞の分化、長期機能維持に転写因子 *Bcl6* が機能していることを明らかにしてきた。さらに近年、メモリーCD8T細胞の初期

分化が明らかにされ、免疫で活性化されたりリンパ球は約1週間後にメモリーCD8T前駆細胞とエフェクター細胞とに分化すること、メモリーCD8T細胞はメモリーCD8T前駆細胞から分化し、エフェクター細胞は感染がおさまった後に、ほとんどが細胞死をおこし減少することが示された。本研究ではメモリーCD8T前駆細胞の分化機構を転写因子の役割を中心に分子のレベルで明らかにする。特に、メモリーCD8T前駆細胞の初期分化に *Bcl6* がどのように機能しているのか、詳細な分子機構を明らかにし、生体防御に より機能的な免疫記憶を確立するための応用法を開発する基盤研究を行うことを目的とする。

2. 研究方法と経過

2-1 メモリーCD8T前駆細胞における転写因子の発現と役割

マウスを免疫して、1週間後に分化する抗原特異的メモリーCD8T前駆細胞を分取し、定量PCR法で *Bcl6* mRNAの量的解析を行った。さらに *Bcl6* 遺伝子改変マウスを免疫し、メモリーCD8T前駆細胞の分化をフローサイトメトリで解析することでメモリーCD8T前駆細胞分化における *Bcl6* の重要性を検討した。

2-2 活性化CD8T細胞のサイトカインシ

グナルにおける Bcl6 の制御機構の解析

サイトカインは活性化CD8T細胞の分化を方向づける刺激のひとつである。そこで、メモリーCD8T前駆細胞の分化過程で誘導されるサイトカインレセプター発現に Bcl6 がどのように関与しているかを解析した。特に、IL-2 レセプターの α 鎖である CD25 は活性化リンパ球に発現するが、その発現が持続する細胞がエフェクター細胞に分化し、メモリーCD8T細胞としては維持されにくいことが示されている。Bcl6 が CD25 の発現を調整しているかをフローサイトメトリや PCR 法で解析し、Bcl6 による制御機構をクロマチン免疫沈降法(ChIP アッセイ)で明らかにした。

3. 研究の成果

3-1 メモリーCD8T 前駆細胞における転写因子の発現

マウスを免疫し1週間後に、エフェクター細胞に発現する細胞表面抗原 KLRG1 を指標に、KLRG1 陰性のメモリーCD8T前駆細胞と KLRG1 陽性のエフェクターCD8T細胞とを脾臓から分取し、転写因子の発現を定量 RT-PCR で解析した。その結果、メモリーCD8T前駆細胞では Bcl6 の発現が高く、エフェクターCD8T細胞では Prdm 1 の発現が高かった。

3-2 メモリーCD8T 前駆細胞の分化における Bcl6 の役割

Bcl6 欠損マウス (Bcl6-KO) を免疫して、メモリーCD8T前駆細胞の分化をフローサイトメトリで比較した結果、Bcl6-KO マウスでは野生型マウスに比べてメモリーCD8T前駆

細胞(KLRG1 陰性)の割合が低く、エフェクターCD8T細胞(KLRG1 陽性)の割合が高かった (図1)。一方、T細胞に Bcl6 を強発現させた Bcl6 トランスジェニック(Bcl6-Tg)マウスではメモリーCD8T前駆細胞がより分化していた。これらの結果から、Bcl6 はメモリーCD8T前駆細胞の分化を正に制御していることが明らかになった。

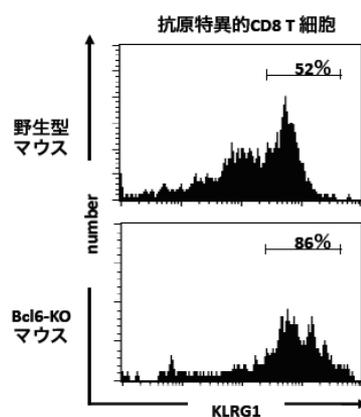


図1 Bcl6-KOマウスにおけるメモリーCD8T前駆細胞の分化：数字はKLRG1陽性のエフェクター細胞の抗原特異的CD8T細胞における%を示す。

3-3 IL-2 レセプターの発現における Bcl6 の役割

強いIL-2シグナルがエフェクターCD8T細胞の分化をより誘導すること、そのレセプターの構成分子のひとつであるIL-2レセプター α 鎖(CD25)が発現している活性化CD8T細胞がエフェクターCD8T細胞により分化しやすいことが示唆されている。

そこでBcl6-KO CD8T細胞を抗CD3および抗CD28抗体で刺激後、CD25の発現をフローサイトメトリおよび定量PCR法で解析した。CD25遺伝子の発現はBcl6-KO細胞で

は刺激後早期に認められ、発現量も高かった (図2)。CD8T 細胞上の CD25 の発現も、Bcl6-KO 細胞で 12 時間以内の早期に誘導された。刺激後 4 日では、野生型では CD25 の発現が低い細胞(CD25^{lo})が検出されたが、Bcl6-KO CD8T 細胞では CD25 の発現の高い細胞(CD25^{hi})が多くを占めていた (図3)。

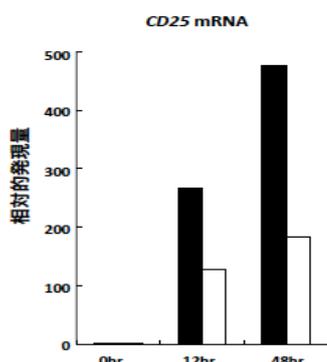


図2 活性化 CD8T 細胞における CD25mRNA の発現：培養系で活性化させた CD8T 細胞における CD25mRNA の発現を定量 PCR 法で解析した。グラフは相対的発現量を示す。■Bcl6-KO CD8T 細胞 □野生型 CD8T 細胞。

さらに Bcl6-KO CD8T 細胞は *t-bet* や *granzyme B* 等エフェクターCD8T 細胞をより特徴付ける遺伝子の発現も上昇していた。また、Bcl6 抑制剤を野生型 CD8T 細胞の培養系に添加した場合も、CD25 およびエフェクターCD8T 細胞関連遺伝子が増加し、細胞表面の CD25 の発現も速やかに誘導された。これらの結果から、Bcl6 は CD25 の発現を遺伝子発現レベルで負に制御しているだけでなく、エフェクターCD8T 細胞の分化そのものを抑制していることが明らかになった。

一方、Bcl6-Tg では活性化後 CD25 の発現

は観察されたものの、速やかに CD25 の発現が下がり、Bcl6 が CD25 の発現調整およびエフェクターCD8T 細胞の分化を負に制御している可能性が示唆された。

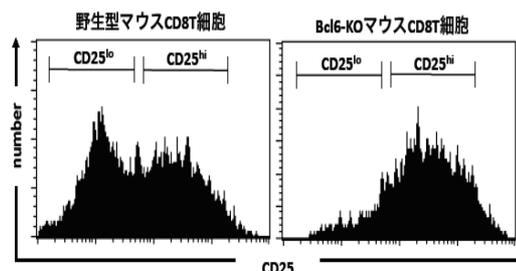


図3 活性化 CD8T 細胞における CD25 の発現：CD8T 細胞を培養系で活性化後 4 日における CD25 の発現をフローサイトメトリで解析した。

3-4 Bcl6 による CD25 遺伝子の発現制御機構の解析

Bcl6 による CD25 遺伝子の発現制御機構を明らかにする目的で CD25 遺伝子上の Bcl6 結合領域を検索した結果、プロモータ領域とイントロンに 4ヶ所の Bcl6 想定結合部位が存在することを明らかにした。そこでこれら領域における Bcl6 の結合を確認するために、活性化前後の CD8T 細胞を用いて ChIP アッセイをおこなった。その結果 4ヶ所すべてで Bcl6 の結合が確認され、Bcl6 が直接 CD25 遺伝子に結合してその発現を制御している可能性が示唆された。

3-5 IL-2 発現における Bcl6 の役割

CD25 の強発現に IL-2 がどのように関わるかを明らかにする目的で IL-2 欠損(IL-2-KO) マウス由来 CD8T 細胞を用いて CD25 の発現を解析した。その結果、IL-2-KO 細胞では

CD25 の中程度の発現は誘導されるが、強発現は誘導できず IL-2 添加で CD25 の強発現が誘導できることが明らかになった。

Bcl6-KO の CD8T 細胞培養上清中の IL-2 を測定したところ、野性型 CD8T 細胞よりも IL-2 を多く分泌していることが明らかになり、CD25 のより高い発現に寄与していることが示唆された。一方、IL-2-KO CD8T 細胞の培養系に Bcl6 抑制剤を添加したところ CD25 の中程度の発現はより早く誘導されたことから、Bcl6 は IL-2 非依存のおよび IL-2 依存の CD25 の発現を負に制御していることが明らかになった。

さらに IL-2 の遺伝子上に Bcl6 の結合部位が存在することを確認したため、活性化前後の CD8T 細胞を用いて ChIP アッセイをおこなった結果、Bcl6 の結合が明らかになり、IL-2 遺伝子の発現を Bcl6 が制御していることが示唆された。

3-6 IL-2 による CD8T 細胞の分化制御

CD8T 細胞の分化における IL-2 の役割を明らかにする目的で IL-2 添加および抗 IL-2 抗体添加による CD8T 細胞の分化への効果を解析した。IL-2 添加において活性化 CD8 における *granzymeB*, *perforin* 等のエフェクター細胞の機能分子の遺伝子発現は亢進したが、*Bcl6* の発現は抑制された。このことから、*Bcl6* は IL-2 および CD25 の発現を負に制御して IL-2 シグナルを調整しているが、IL-2 は *Bcl6* の発現を負に制御することでエフェクター CD8T 細胞への分化を亢進していることが示唆された。

4. 今後の課題

長期生体内で免疫細胞として機能するメモリー CD8T 細胞の初期分化に *Bcl6* の発現が重要であることが示唆された。これらの現象は免疫応答としての普遍性があり、感染症のワクチンのみでなく、がんワクチンの開発や、免疫不全、自己免疫疾患などの治療応用に展開できる。

現在 *Bcl6* の機能を人為的に調整する方法として、*Bcl6* 抑制剤が開発されているが、*Bcl6* の発現もしくは機能を亢進させる方法は明らかにされていない。今後サイトカイン等を用いた、*Bcl6* の発現誘導の方法を開発して、メモリー CD8T 細胞の分化をより誘導し、量的質的に維持する方法を確立する必要がある。

また、メモリー CD8T 細胞の分化には、樹状細胞や CD4T 細胞の活性化の状態も関与する。そこでこれら免疫担当細胞とその相互作用の包括的理解が必要になると考えられる。

5. 研究成果の公表方法

本研究の成果の一部は第 41 回日本免疫学会学術集会で発表した。現在論文投稿準備中である。

免疫担当細胞の包括的理解のために樹状細胞の機能解析もおこなっており、総説を投稿した。

A. Sakamoto et al. Roles of Bcl6 in dendritic cell homeostasis. 2012. Recent Res. Devel. Immunology 8: 33-48.