

新規 T 細胞分画の同定と生理・病理学的機能の究明

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
河部 剛史

研究背景、目的

CD4⁺ 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活性化・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(1)。

申請者は最近、CD4⁺ 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(2)。MP 細胞は、獲得免疫の中樞を担うはずの T 細胞にあって自然免疫機能を有するという極めて特徴的な性質を保持し、現在免疫学界において大きな注目を集めている(3,4)。

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 (innate lymphoid cell: 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(5)。一方、MP 細胞は ILC とは異なり自己抗原反応性を有することから、その機能亢進時には自己免疫・炎症性疾患を惹起しうると類推される。

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己免疫疾患発症機構を究明することを目的とした。

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 (SPF)環境下で飼育したものをを用いた。MP 細胞の質的特異性や分化・活性化機構、自己免疫活性を解明するために、野生型や各種遺伝子改変マウスを用いた Single cell RNAseq (scRNAseq)ならびにフローサイトメトリー解析を行った。

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。

結果

(i) MP 細胞の質的特異性

上述の様に、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すなわち「古典的」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(1)。しかし、両者を鑑別する分子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CD4⁺T細胞の遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、両者を区別するマーカーの候補として、CD127、Sca1、Bcl2 の遺伝子が同定された。そこで両細胞におけるこれらの蛋白発現を比較したところ、全ての抗原特異的メモリーT細胞が CD127^{hi} Sca1^{hi} Bcl2^{hi} の表現型を有するのに対し、MP 細胞は CD127^{hi} Sca1^{lo}、CD127^{hi} Sca1^{hi}、CD127^{lo} Sca1^{hi}、CD127^{lo} Sca1^{lo} (全て Bcl2^{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 CD127、Sca1、Bcl2 が同定された。

我々はさらに、CD127、Sca1 により定義される MP 細胞 4 集団を詳細に解析した。その結果、CD127^{hi} Sca1^{lo} 分画は新たに産生された未熟 MP 細胞を意味するのに対し、CD127^{hi} Sca1^{hi} 分画は既に細胞増殖を経て分裂静止状態を獲得した成熟 MP 細胞であることが判明した。これらの MP 細胞集団 4 集団は SPF マウスのみならず正常細菌叢を欠く germ-free (GF)マウス、細菌叢や食餌抗原を含む外来抗原を完全欠損する antigen-free (AF) マウスにも等しく存在した。以上より、CD127、Sca1 により定義される MP 細胞 4 集団が、自己特異的 MP 細胞のうちそれぞれ異なる成熟段階を示すサブセットであることが証明された。

(ii) MP 細胞サブセットの分化・活性化機構

次に我々は、MP 細胞の不均質性 (Heterogeneity) を unbiased に解析する目的で、同細胞の scRNAseq 再解析を行ったところ、CD127^{hi} Sca1^{hi} MP 細胞が Th1 型遺伝子を高発現する T-bet⁺ 「MP1 分画」に相当することが明らかになった。さらに、同分画は恒常的に IL-12/18/2 受容体を発現し、TCR 刺激非存在下においてもこれらのサイトカイン反応性に IFN- γ を産生しうることが *in vitro* において証明された。これらの事実は、自己抗原反応性に自発的に産生される CD127^{hi} Sca1^{hi} Bcl2^{lo} 分画が MP 細胞の Th1 型自然免疫機能の主軸をなすことを意味するものであり、我々は以上の知見(i)、(ii)を論文発表するに至った(6)。

(iii) 自己免疫疾患における MP 細胞の機能

MP 細胞は自己抗原反応性を有するため、その過剰活性化により自己免疫・炎症性疾患が惹起される可能性が考えられ、我々は同仮説を総説の形で発表した(7)。本研究では同仮説を証明するために、MP 細胞を Rag2^{-/-} マウスに移入したうえで自然経過を観察したところ、興味深いことに、同細胞は外来抗原刺激非存在下においても IL-12/23 依存的に Th1/17 へと自然分化し腸炎、間接性肺炎、間接性腎炎、胆管炎などの全身炎症を発症した。一方、MP 細胞は消化管において TGF β 依存的に制御性 T 細胞 (Treg) へと分化し、MP 細胞依存的全身炎症を逆説的に抑制していることも明らかになった。

定常状態下、MP 細胞は大きく MP1 ならびに未分化「MP0」サブセットに分類される。我々は、Rag2^{-/-} 体内における MP 細胞の上記の Th1/17/Treg 分化が MP1 と MP0 のどちらの分画から起こるのかを解析したとこ

ろ、MP0 が Th1/17/Treg への多分化能を有する「多能性」MP 分画であることが明らかになった。さらに、MP0 のこうした多分化能は生理的環境下においても一部認められること、Treg 非存在下において劇的に促進されることが判明した。すなわち、未分化 MP 細胞分画は多増殖能および多分化能を有する「幹細胞様」MP 細胞であり、潜在的炎症原性を内包する細胞集団である可能性が示唆された。我々は現在、これらの知見につき論文投稿中である。

考察

上記の一連の研究により、MP 細胞の鑑別マーカーや MP1 分画の分化・活性化メカニズムが証明され(6)、また未分化「MP0」分画の潜在的炎症原性についても明らかになりつつある（責任著者として投稿中）。今後、MP0/1/2/17 分画の免疫学的機能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る新規抗感染症治療戦略「免疫賦活化治療」の創出、同細胞の抑制による自己免疫・炎症性疾患の根治的治療法の提唱にも資するものと期待され、実際に我々は、これらの治療法のコンセプトに関する論文発表を行った(8,9)。また、免疫賦活化治療と同様の治療戦略が抗腫瘍治療においても有効である可能性も考えられる（責任著者として投稿準備中）。今後、MP 細胞の産生・維持・分化機構や免疫学的機能の全容を明らかにすることで、新たな「MP 細胞免疫学」(7)の確立を目指したいと考えている。

謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人・アステラス病態代謝研究会から研究助成金による多大なご支援を賜りました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Kawabe T, Yi J, Sprent J. Homeostasis of naïve and memory T lymphocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **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+ T cells spontaneously generated under steady-state conditions exert innate TH1-like effector function. *Sci Immunol* **2**(12), eaam9304, 2017.
3. Kawabe T, Zhu J, Sher A. Foreign antigen-independent memory-phenotype CD4+ T cells: a new player in innate immunity? *Nat Rev Immunol* **18**(3), 1, 2018.
4. Yi J, Kawabe T, Sprent J. New insights on T-cell self-tolerance. *Curr Opin Immunol* **63**, 14-20, 2020.
5. 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. *Nat Commun* **11**(1), 3366, 2020.
6. Kawabe T, Ciucci T, Kim KS, Tayama S, Kawajiri A, Suzuki T, Tanaka R, Ishii N, Jankovic D, Zhu J, Sprent J, Bosselut R, Sher A. Redefining the foreign antigen and self-driven memory CD4+ T cell compartments via transcriptomic, phenotypic, and functional analyses. *Front Immunol* **13**, 870542, 2022.
7. Kawabe T, Sher A. Memory-phenotype CD4+ T cells: a naturally arising T lymphocyte population possessing innate immune function. *Int Immunol* **34**(4), 189-196, 2022.
8. Kawabe T. Memory-Phenotype CD4+ T Lymphocytes: A Novel Therapeutic Target in Infectious or Autoimmune Diseases? *JMA J* **5**(3), 298-306, 2022.
9. Kawabe T. Homeostasis and immunological function of self-driven memory-phenotype CD4+ T lymphocytes. *Immunol Med* **46**(1), 1-8, 2023.