

機関番号：34419

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24689043

研究課題名(和文)メモリーCD8T細胞の呼吸器感染防御免疫におけるCD69の役割の解明

研究課題名(英文)CD69 regulates the recruitment of memory CD8+ T cells to the lung airways

研究代表者

高村 史記 (TAKAMURA, Shiki)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：90528564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス排除後の肺気道に蓄積するメモリーCD8T細胞は防御免疫に重要な役割を果たしているが、その移行調節機構は不明であった。我々は、メモリーCD8T細胞が肺実質に進入した際、再活性化されて活性化マーカーCD69を発現すること、そしてCD69がスフィンゴシン1リン酸レセプター1(S1P1)を抑制することで実質内定着を補助していること、更に再活性化時に発現されるケモカインレセプターCXCR6が肺気道への移行を調節していることを突き止めた。このことより、肺気道へのメモリーCD8T細胞蓄積を誘導するためには、肺実質における効果的な再活性化を誘導するための経鼻ワクチン開発が必要となる。

研究成果の概要(英文)：Memory CD8+ T cells in the lung airways are maintained by a process of continual recruitment. However, the mechanisms by which Memory CD8+ T cells are recruited to the lung airways during steady-states are poorly understood. Here we show that sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) regulates memory CD8+ T-cell egress from the lung parenchyma, while chemokine receptor CXCR6 promotes continuous migration toward CXCL16 gradient to the lung airways. CD69 upregulated on memory CD8+ T cells upon reactivation in the lung parenchyma inhibited S1P1, thereby preventing egress from this tissue. Furthermore, CXCR6 is also upregulated upon reactivation, which reinforces migration to the lung airways. Such reactivation-associated factors cooperatively enable memory CD8+ T cells to be recruited to the lung airways. These findings highlight a unique continuous developmental process of tissue resident memory (TRM) cells in the lung airways, and a crucial role of CD69 in this process.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染防御学 メモリーCD8T細胞 肺粘膜

## 1. 研究開始当初の背景

現行のインフルエンザワクチンにより誘導される免疫応答は特定株の表面タンパク質に対する全身性抗体反応であり、侵入部位である肺局所での感染防御効果が弱いばかりか、高頻度に出現する変異株にも対応が困難である。従って、複数の株間で高度に保存された領域（ウイルス内部タンパク質等）に対するメモリーT細胞免疫応答を、肺粘膜にて誘導・維持することが将来的なワクチンの理想であり、その開発は急務である。我々はこれまで呼吸器感染モデルを用いたメモリーCD8T細胞の肺粘膜移行調節機構の解明に従事し、メモリーCD8T細胞の肺粘膜（肺気道）移行は、全身感染ではなく呼吸器感染により誘導されたメモリーCD8T細胞特有の現象であることを突き止めた（Takamura et al. *J. Exp. Med.* 2010）。更に、呼吸器感染によりプライミングされたCD8T細胞はメモリー分化後に、従隔リンパ節に残存しているウイルス抗原を認識する特殊能力を持ち、このときに起こる再活性化が後の肺気道移行に重要であることを報告してきた（Takamura et al. *J. Exp. Med.* 2010）。しかしながら、従隔リンパ節にて再活性化されたメモリーCD8T細胞がいかにして肺気道へ移行するのかは未だ不明であった。

## 2. 研究の目的

肺気道のメモリーCD8T細胞はリンパ組織に存在するメモリーCD8T細胞と比較し活性化マーカーCD69やインテグリンCD49a、CD103を高発現しており、これらの因子が肺気道移行に関わっていることが示唆されてきた。このうち、インテグリンは肺実質における接着により組織内への定着を促進していることが考えられたが、CD69がどのようにメモリーCD8T細胞の肺気道移行に影響を及ぼしているのかは不明であった。そこで本研究ではメモリーCD8T細胞の肺気道移行におけるCD69の役割を追求することでメモリーCD8T細胞肺粘膜移行調節機構を解明し、肺粘膜蓄積を目的とする細胞性免疫誘導ワクチン開発への応用の可能性を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) CD69がメモリーCD8T細胞の肺気道移行に関わっているかを調べるため、CD69欠損及び野生型の骨髓細胞を移植した混合骨髓キメラマウスを作製した。末梢CD8T細胞が再構成された後にインフルエンザウイルスを感染させ、ヌクレオプロテイン（NP）特異的CD8T細胞における野生型とCD69欠損の比率を各臓器にて比較した。

(2) S1P<sub>1</sub>がメモリーCD8T細胞の肺実質か

らの脱出に関わっていることを示すため、ウイルス感染30日後にS1P<sub>1</sub>のアゴニスト（抑制効果を示す）であるFTY720を投与し、メモリーCD8T細胞が肺実質に蓄積するかを検討した。また、肺実質に存在するメモリーCD8T細胞の動態を調べるために、CFSEを経鼻投与し、同様の実験を行った。

(3) CD69によるS1P<sub>1</sub>抑制以外にも、転写レベルでのS1P<sub>1</sub>発現調節に関わっている可能性を調べるために、ウイルス感染30日後の各臓器由来CD8T細胞をCD69発現の有無により識別、分離し、S1P<sub>1</sub>mRNA及びこの発現を上流にて調節するKLF2のmRNA発現をリアルタイムPCRにて調べた。

(4) mRNA減少後もS1P<sub>1</sub>がタンパクレベルで存在しているかを調べるために、ウイルス感染30日後の各組織からリンパ球を分離し、ケモタキシスチャンパーにてNP特異的メモリーCD8T細胞のS1Pに対する走化性を検討した。

(5) S1P<sub>1</sub>による肺実質からの脱出を防ぐのみでは肺気道への移行を直接促進することができないため、肺気道方向にメモリーCD8T細胞移行を促すケモカインの存在が示唆された。そこで、肺実質のNP特異的メモリーCD8T細胞における各種ケモカインレセプターの発現を比較した。また、高発現が見られたケモカインレセプターCXCR3、CXCR6それぞれのリガンドの発現をウイルス感染後の血清及び肺洗浄液にて調べた。また、CXCR6プロモーター下流にGFPを持つレポーターマウスを用いてメモリーCD8T細胞におけるCXCR6発現パターンを詳細に検討した。

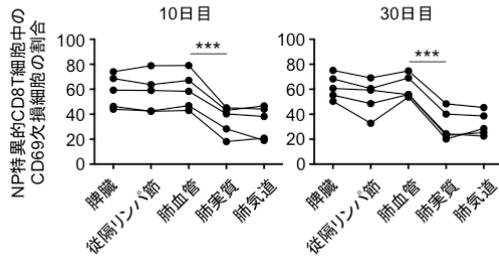
(6) CXCR6の肺気道移行における役割を調べるために、CXCR6欠損及び野生型の骨髓細胞を移植した混合骨髓キメラマウスを作製した。末梢CD8T細胞が再構成された後にインフルエンザウイルスを感染させ、ヌクレオプロテイン（NP）特異的CD8T細胞における野生型とCXCR6欠損の比率を各臓器にて比較した。また、CXCR6による肺気道方面への移行とS1P<sub>1</sub>によるリンパ方面への移行の影響を調べるために、通常のコリチリン16に対するケモタキシスアッセイに加え、S1Pを上段に加えることで拮抗シグナルを与え、影響を受ける細胞群を比較した。

## 4. 研究成果

(1) 肺実質及び肺気道にてCD69欠損メモリーCD8T細胞の割合が極端に低いことより、CD69欠損メモリーCD8T細胞は野生型メモリーCD8T細胞と比較し、肺実質及び肺気道

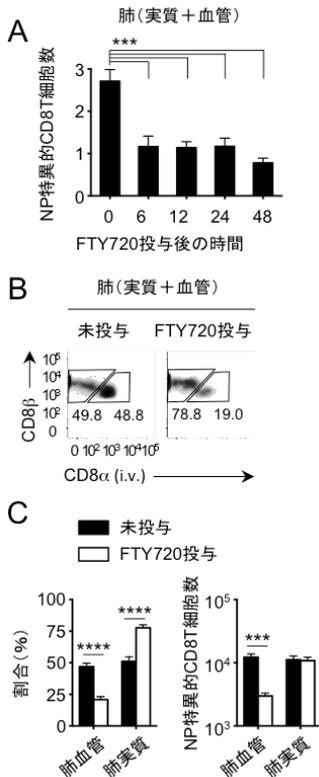
への移行効率が悪いことが明らかとなった (図1)。

図1. 野生型及びCD69欠損マウス骨髓を移入した骨髓キメラマウス



(2) 肺全体 (血管内の細胞を含む) をみると、FTY720の投与によりNP特異的メモリーCD8T細胞数の減少が見られた (図2A)。しかしながら、減少しているのは血液中の来某のみであり、これはFTY720によりT細胞がリンパ節から脱出できないために引き起こされたリンパ球減少症が原因であることが解った (図2B)。ただ、肺実質の細胞のみをみても、FTY720によりメモリーCD8T細胞が蓄積したというデータは得られなかった (図2C)。

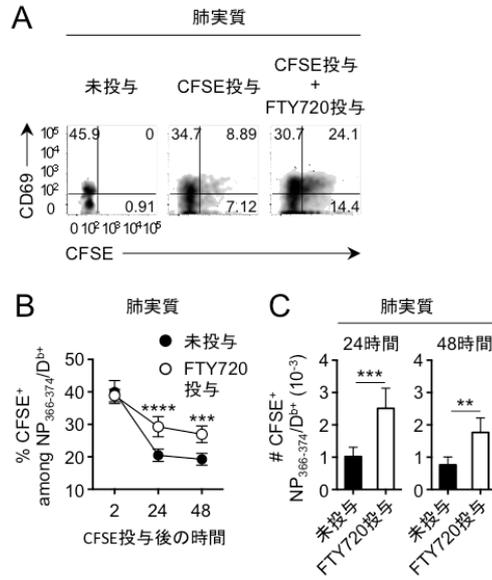
図2. FTY720投与による肺のNP特異的細胞数の変化



CFSEの経鼻投与にて肺実質のメモリーCD8T細胞の一部を染色することができた (図3A)。このCFSE陽性細胞割合及び数は未投与群と比較しFTY720投与群にて優位に増加していた (図3)。これより、メモリー

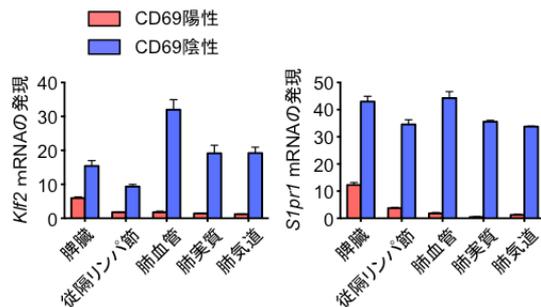
CD8T細胞の肺実質からの脱出にはSIP<sub>1</sub>が関わっていること、そしてその拮抗効果をもつCD69は脱出を妨げる効果を持つことが明らかとなった。

図3. FTY720及びCFSE投与後の肺実質におけるNP特異的細胞数の変化



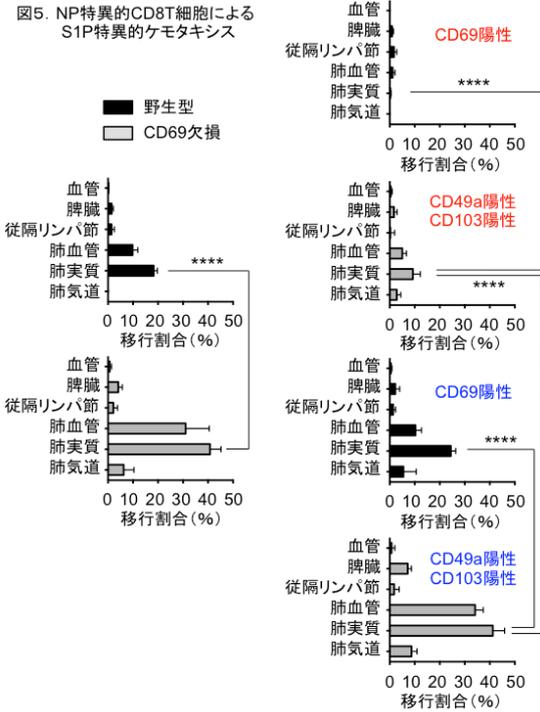
(3) KLF2及びSIP<sub>1</sub>は共に活性化細胞 (CD69陽性) にて発現が抑えられており、組織間において顕著な差は見られなかった (図4)。このことは肺粘膜に移行するだけでCD69が無くてもSIP<sub>1</sub>発現が転写レベルで減少することを示しており、CD69によるSIP<sub>1</sub>抑制がメモリーCD8T細胞の肺実質からの脱出に関わるかどうかは更なる解析が必要となった。

図4. 抗原感作CD8T細胞におけるKlf2及びSip1 mRNAの発現



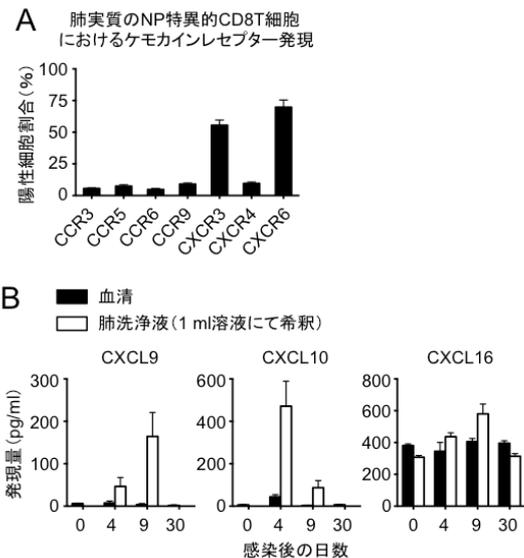
(4) 野生型マウスでは肺実質のメモリーCD8T細胞がSIPに対して非常に強い走化性を示すことが解り、CD69欠損マウスではこれが更に増強されることが明らかとなった (図5左)。また、野生型マウスにおいて走化性を示しているのはCD69陰性群のみであり、活性化したCD69陽性群は全く走化性を示さなかった (図5右黒)。CD69欠損マウス

では同様にS1Pに対する走化性増強が見られ、S1P<sub>1</sub> mRNA の発現低下が見られた活性化群 (CD49a 及び CD103 陽性) においても S1P に対する走化性が示された (図5右灰色)。このことより、mRNA 低下後も S1P<sub>1</sub> タンパクがある程度残存し、S1P に対する走化性を示しうることを、そしてこれを完全に遮断するには CD69 の発現が必要であることが示された。



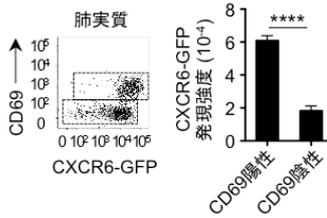
(5) 肺実質のNP特異的メモリーCD8T細胞表面にはケモカインレセプターCXCR3とCXCR6が強く発現していることが明らかとなった (図6A)。

図6. 肺におけるCXCR6及びCXCL16の発現



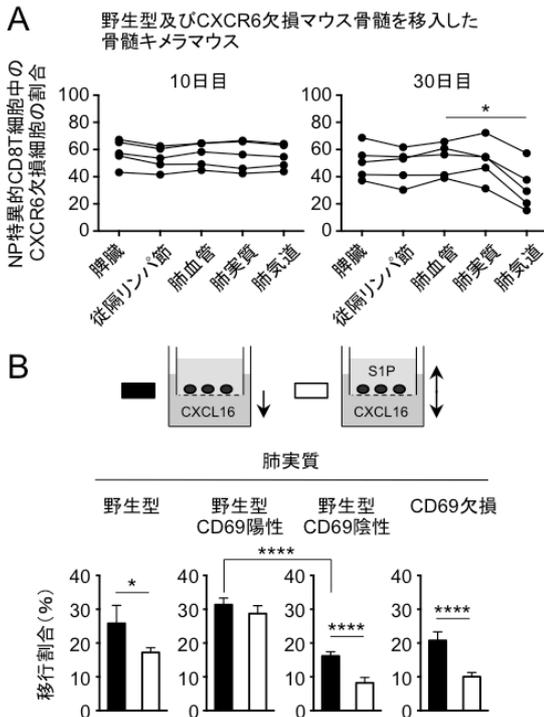
このうち、CXCR3のリガンドであるCXCL9及びCXCL10は、肺にて感染初期に一過性に上昇がみられたが、CXCR6のリガンドであるCXCL16はメモリー期においても恒常的に発現していることが解った (図6B)。このことより、CXCR6は肺気道方面への移行を司っている可能性が示された。更に、CXCR6発現はメモリーCD8T細胞が肺実質にて再活性化された際に更に上昇することも明らかとなった (図7)。

図7. 肺実質における再活性化に伴うCXCR6発現増強



(6) 肺気道にてCXCR6欠損メモリーCD8T細胞の割合が低いことより、CXCR6欠損メモリーCD8T細胞は野生型メモリーCD8T細胞と比較し、肺気道への移行効率が悪いことが明らかとなった (図8A)。また、野生型メモリーCD8T細胞はCXCL16に対して強い走化性を示すが、再活性化したCD69陽性細胞の方がより強力であることが解った (図8B中)。更にS1Pによる拮抗シグナル存在下では、CXCL16に対する走化性が若干減少すること (図8B左)、この減少はS1P<sub>1</sub>を発現し

図8. CXCR6によるメモリーCD8T細胞肺気道移行調節



ている CD69 陰性細胞（もしくは欠損細胞）にて顕著であること、S1P<sub>1</sub> を発現していない CD69 陽性細胞では影響がないことから（図 8B）、活性化により S1P<sub>1</sub> による脱出シグナルが遮断され、更には CXCL16 に対する走化性が増大することでメモリーCD8T 細胞が肺気道へ移行可能となることが示された。

#### 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 3 件）

- ① Tsuji-Kawahara S, Takamura S, Miyazawa M.  
Reply to "CD8<sup>+</sup> T cells are essential for controlling acute Friend virus infection in B6 mice"  
*J. Virol.* 2014, 印刷中.  
査読有り
- ② Takamura S\*, Kajiwar E, Tsuhi-Kawahara S, Masumoto T, Fujisawa M, Kato M, Chikaishi T, Kawasaki Y, Kinoshita S, Itoi M, Sakaguchi N, Masaaki M\*. (\*corresponding authors)  
Infection of adult thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents functional memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation.  
*PLoS Pathog.* 2014, Mar;10(3):e1003937  
査読有り  
doi: 10.1371/journal.ppat.1003937.
- ③ Sato H, Jing C, Isshiki M, Matsuo K, Kidokoro M, Takamura S, Zhang X, Ohashi T, Shida H.  
Immunogenicity and safety of the vaccinia virus LC16m8Δ vector expressing SIV Gag under a strong or moderate promoter in a recombinant BCG prime-recombinant vaccinia virus boost protocol.  
*Vaccine.* 2013, Aug 2;31(35):3549-57.  
査読有り  
doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.071.

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① Takamura S 他  
CD69 enhances the recruitment of memory CD8<sup>+</sup> T cells to the lung airways by inhibiting S1P-mediated lymphocyte egression from the lung parenchyma.  
Keystone Symposia (Tissue-Resident Memory)  
2014 年 1 月 12-16 日 Snowbird, UT, USA
- ② Takamura S 他  
Intravascular staining discloses molecular mechanisms of memory CD8<sup>+</sup> T cell recruitment to the lung airways.

第 42 回日本免疫学会学術集会  
2013 年 12 月 11-13 日 千葉

- ③ Takamura S  
Memory CD8<sup>+</sup> T cells in the lung airways.  
The 1st Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum  
（招待講演）  
2013 年 1 月 29 日 東京
- ④ 高村史記 他  
メモリーCD8T 細胞の肺粘膜移行調節機構の解明  
第 6 回次世代アジュバント研究会  
2013 年 1 月 13 日 大阪
- ⑤ Takamura S 他  
CD69 controls a balance between S1P- and CXCL16-induced chemotaxes during the process of memory CD8<sup>+</sup> T cell recruitment to the lung airways.  
第 41 回日本免疫学会学術集会  
2012 年 12 月 5-7 日 神戸
- ⑥ 高村史記 他  
CD69、S1P<sub>1</sub>、CXCR6 の相互作用によるメモリーCD8T 細胞の肺粘膜移行調節  
第 60 回日本ウイルス学会学術集会  
2012 年 11 月 13-15 日 大阪
- ⑦ Takamura S 他  
CD69 controls a balance between S1P- and CXCL16-induced chemotaxes during the process of memory CD8<sup>+</sup> T cell recruitment to the lung airways.  
The 34<sup>th</sup> Naito Conference  
2012 年 10 月 16-19 日 北海道
- ⑧ Takamura S  
CD69 controls a balance between S1P- and CXCL16-induced chemotaxes during the process of memory CD8<sup>+</sup> T cell recruitment to the lung airways.  
Trudeau Institute, Seminar（招待講演）  
2012 年 8 月 27 日 Saranac Lake, NY, USA
- ⑨ 高村史記 他  
ウイルス特異的メモリーCD8T 細胞の肺気道粘膜移行調節機構の解明  
第 26 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム  
2012 年 5 月 24-26 日 福島

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
高村 史記 (TAKAMURA, Shiki)  
近畿大学・医学部・助教  
研究者番号：90528564