

令和元年5月29日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08850

研究課題名(和文)肺粘膜滞在型メモリーCD8T細胞維持機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms by which lung-resident memory CD8 T cells are maintained

研究代表者

高村 史記(TAKAMURA, Shiki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90528564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：滞在型メモリーCD8T細胞(CD8TRM)は粘膜面など病原体侵入部位に長期間維持され、防御免疫の第一線を担う。マウス同士を結合するパラビオーシスにて滞在型と循環型メモリーCD8T細胞を区別して解析したところ、肺内にて滞在型と循環型のメモリーCD8T細胞は完全に独立した機構で維持されることが解った。即ち、肺実質CD8TRMは肺組織内にて恒常性増殖により維持され、長期生存が困難な肺気道に継続的にCD8TRMを供給することで最前線の防御免疫を支えている。また、このCD8TRMの肺気道持続的移行は肺実質にて再活性化時に発現するケモカインレセプターCXCR6により調節されている事も解った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行のインフルエンザワクチン(ウイルス表面タンパク質の皮内投与)により誘導される免疫応答は特定の株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は期待できず、頻繁に発生するウイルス表面抗原変異にも対応が困難である。一方、CD8T細胞はウイルス株間で高度に保存された内部タンパク質を標的とすることで交差反応性を示す事は周知である。従って、病原体侵入部位に長期間維持される滞在型メモリーCD8T細胞を効果的に誘導・維持することが将来のワクチン開発に求められる。本研究ではその維持機構の一端を解明した。今後は肺滞在型メモリーCD8T細胞誘導機構の解明が待たれる。

研究成果の概要(英文)：Populations of CD8 lung-resident memory T (TRM) cells persist in the interstitium and airways following recovery from respiratory virus infections. While it is clear that CD8 TRM cells in the airways are dynamically maintained via the continuous recruitment of new cells, there is a vigorous debate whether tissue-circulating effector memory T (TEM) cells are the source of these newly recruited cells. Here we definitively demonstrate that CD8 TRM in the lung airways are not derived from TEM in the circulation, but are seeded continuously by TRM from the lung interstitium. This process is driven by CXCR6 that is expressed on TRM, but not TEM. We further demonstrate that the lung interstitium CD8 TRM population is also maintained independently of TEM via a homeostatic proliferation mechanism. Taken together, these data show that lung memory CD8 TRM cells in the lung interstitium and airways are compartmentally separated from TEM and clarify the mechanisms underlying their maintenance.

研究分野：免疫学

キーワード：メモリーCD8T細胞 組織滞在型 肺 感染防御 インフルエンザウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現行のインフルエンザワクチン(ウイルス表面タンパク質の皮内投与)により誘導される免疫応答は特定の株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はそれほど期待できない。更には2009年度に大流行したA/H1N1の様な大規模な抗原性の変異は勿論、季節性インフルエンザウイルス間で見られる小規模な変異にも対応が困難であるのが現状であり、新規ワクチン開発は急務である。一方、CD8T細胞はウイルス株間で高度に保存された内部タンパク質を標的とすることで交差反応性を示す事は周知である。従って、効果的な感染防御免疫の獲得には肺粘膜において抗原特異的メモリーCD8T細胞を効果的に蓄積させる事が求められる。

近年、病原体進入部位である粘膜面に定着し、通常の循環型メモリーCD8T細胞(二次リンパ組織や血液中に存在)とは完全に独立して維持される粘膜組織滞在型メモリーT細胞(Tissue-resident memory: T_{RM})が同定され、これらが初期感染防御免疫の中心的役割を担っていることが明らかとなった(Gebhardt et al. *Nat. Immunol.* 2009)。申請者は肺CD8 T_{RM} に関する新概念を提唱しており(Takamura et al. *J. Exp. Med.* 2016)、本研究では新たに生じた肺CD8 T_{RM} 維持機構に関する仮説を解析することで、ワクチン開発へ向けた基礎研究を行う。

2. 研究の目的

肺粘膜は肺実質と肺気道に分けられる。ウイルス排除後はこの両組織に長期間抗原特異的メモリーCD8T細胞が維持されるが、このうち肺気道メモリーCD8T細胞が防御免疫の最前線を担う。一旦肺気道に到達したメモリーCD8T細胞は再び循環系に戻ることが無いため、広義にCD8 T_{RM} と見なされている。しかし、直接外界に接し恒常性維持サイトカインも不足する肺気道環境はCD8 T_{RM} の長期生存に適さないため、全身循環から細胞が移行し続ける(従って循環系からの独立は不完全)ことで肺気道CD8 T_{RM} 数が維持されていると考えられていた(Zammit et al. *Immunity* 2006)。肺実質には他の粘膜組織と同様CD8 T_{RM} が存在するものの、これら細胞集団も循環しているメモリーCD8T細胞の持続的移行により維持されていると報告された(Slutter et al. *Sci. Immunol.* 2017)。

申請者は感染マウス同士の血流を結合させるパラビオーシスを用いた解析にて、肺気道、肺実質のメモリーCD8T細胞のうち循環由来のメモリーCD8T細胞はほんの一部(約20%)であり、大半(約80%)が全身循環とは全く独立して維持される純粋なCD8 T_{RM} であることが解った。本研究では、このパラビオーシス実験系を用いて、肺CD8 T_{RM} が上述の「循環からの持続的移行のより維持されている」という説を検証した。

3. 研究の方法

(1)異なるコンジェニックマーカーを持つマウスにインフルエンザウイルスを感染させ、約一ヶ月後(メモリーCD8T細胞が分化後)にパラビオーシスにてマウス同士を結合し、経時的に肺実質及び肺気道メモリーCD8T細胞分画におけるホストとパートナーの割合を調べた。また、メモリーCD8T細胞は肺気道環境に長期間留まるとCD11a発現が消失する。従って、肺気道メモリーCD8T細胞におけるCD11a発現は、その細胞が肺気道に移行後間もない細胞であることを示す。そこで、ホスト、パートナーにおける肺気道メモリーCD8T細胞のCD11a発現も経時的に調べた。

(2)もし肺気道CD8 T_{RM} が肺実質CD8 T_{RM} に由来するのであれば、両者のT細胞レセプター(TCR)レパトアの大部分は一致するはずである。そこで、両組織及び脾臓より採取した抗原特異的メモリーCD8T細胞のTCRクロータイプを比較検討した。

(3)一般的に組織に存在するCD8 T_{RM} は拒絶反応に対する抵抗性を有することが多い。そこで、オスのTCRトランスジェニックマウスよりCD8T細胞を分離し(OT-1細胞)、これをオスもしくはメスに移入後にOVA発現インフルエンザウイルスを感染させた。

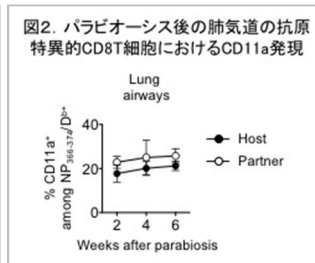
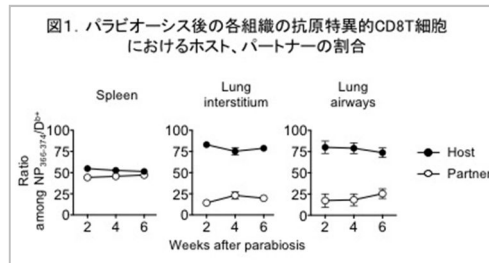
(4)肺実質CD8 T_{RM} が持続的に移行することで肺気道CD8 T_{RM} が維持されているとすれば、肺実質CD8 T_{RM} が恒常性増殖を起こしていると考えられる。そこで、パラビオーシス後のマウスに細胞増殖の指標となるBrdUを飲水投与し、肺気道CD8 T_{RM} がBrdUを取り込むか(増殖するか)を調べた。

(5)また、休止期の細胞と増殖サイクルに入った細胞を2種類の蛍光タンパク発現パターンにて識別可能なFucciトランスジェニックマウス(Sakaue-Sawano S et al. *Cell* 2008)を用い、肺気道CD8 T_{RM} の増殖の有無と再活性化との関係を調べた。

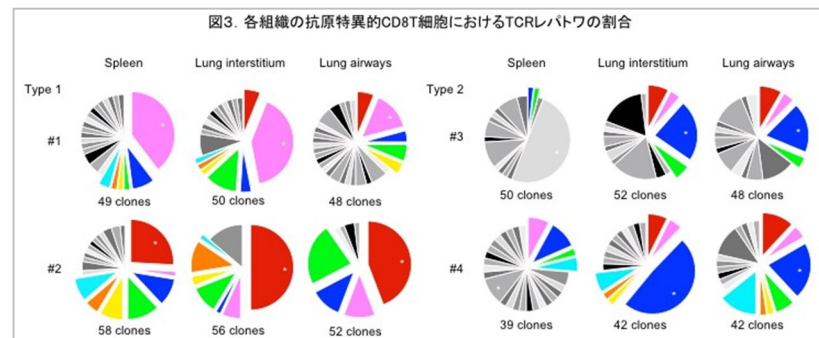
(6)もし肺実質から肺気道への移行があるのであれば、ケモカインが関与している可能性が高い。そこで、パラビオーシスを用い、ホスト(滞在型)とパートナー(循環型)メモリーCD8T細胞におけるケモカインレセプター発現と、肺組織におけるリガンド発現を調べた。また、発現の確認されたケモカインレセプターに関して、ブロッキングによる影響を調べた。

4. 研究成果

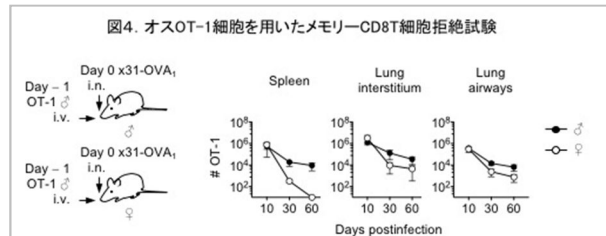
(1) パラビオーシス後2週目、4週目、6週目にて各ペアマウスの脾臓、肺実質、肺気道における抗原特異的メモリーCD8T細胞のホスト、パートナーの割合を調べたところ、パラビオーシス2週後に、脾臓(循環)ではホストとパートナーの割合が平衡化していたのに対し、肺実質及び肺気道では大部分をホストが占めたことより、これらが滞在型であることが解った(図1)。更に、その割合は4週後、6週後でもほとんど変化を示さなかった(図1)。このことより、過去の肺気道及び肺実質のCD8T_{RM}が循環からの持続的移行により維持されているという説が間違いであることが証明された。しかしながら、肺気道CD8T_{RM}におけるCD11a発現は継続的に見られたことより、循環以外の部位からメモリーCD8T細胞が肺気道に持続的に移行していることが示された(図2)。



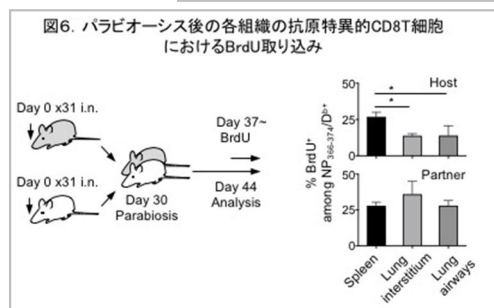
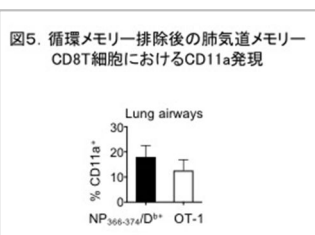
(2) 肺気道CD8T_{RM}が肺実質CD8T_{RM}に由来する事を証明するため、インフルエンザウイルス感染30日後、脾臓、肺実質、肺気道より抗原特異的メモリーCD8T細胞をセルソーターにて分離し、TCR鎖のシーケンスを調べた。すると、脾臓、肺実質、肺気道全ての組織において類似したレパトワを持つマウスと、肺実質と肺気道の間のみ高い割合で共通のレパトワを持つマウスとに分けられた(図3)。前者は循環型と滞在型メモリーCD8T細胞は同じ前駆細胞から分化し得るという過去の報告と一致する。また後者が存在するということは、肺気道CD8T_{RM}が肺実質CD8T_{RM}に由来する事を示唆した(図3)。



(3) また、オス由来OT-1細胞(OVA特異的TCRを保有)をメスもしくはオスのマウスに移入し、OVA抗原発現インフルエンザウイルスを感染させたところ、オス、メスどちらの個体においてもOT-1細胞が抗原特異的に増殖したが、メスのレシピエントでは脾臓(循環)においてOT-1細胞の排除が進み、60日目にて完全に消失した(図4)。しかしながら、そのような循環系にメモリーCD8T細胞が存在しない状況であっても、肺実質及び肺気道CD8T_{RM}が維持されていた。このことは、これら組織のCD8T_{RM}維持が循環と完全に独立していることを示している。更に、このような状況下であっても肺気道CD8T_{RM}にて移行して間もない細胞のマーカであるCD11a発現が確認されたことより、これらの細胞は唯一メモリーCD8T細胞が残存していた組織、つまり肺実質が由来であることが正式に証明された(図5)。

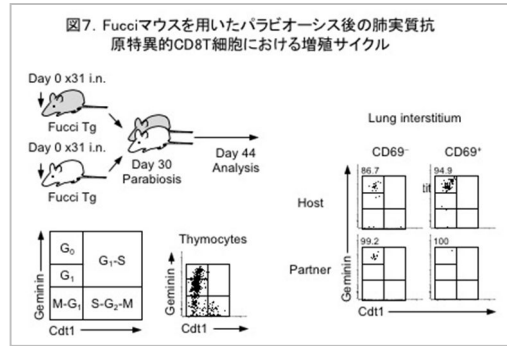


(4) 肺実質CD8T_{RM}が恒常性増殖を起こしているかどうかを調べるため、パラビオーシス後に、増殖細胞に選択的に取り込まれるBrdUを飲水にて1週間投与し続けた。その後、各組織より採取したメモリーCD8T細胞集団におけるBrdU陽性率を調べたところ、肺実質CD8T_{RM}もBrdUを取り込んでいることが解った(図6)。このことは、肺実質CD8T_{RM}が恒常性増殖を起こしていることを示している。しかしながら、その割合は脾臓のものと比較して低い事より、肺実質CD8T_{RM}の恒常性増殖の効率は、リンパ組織(脾臓)での効率と比較し低い事が解った。これは肺組織内における恒常性サイトカイン濃度が低いことが原因であることが示唆される。



(4) 肺実質CD8T_{RM}が恒常性増殖を起こしているかどうかを調べるため、パラビオーシス後に、増殖細胞に選択的に取り込まれるBrdUを飲水にて1週間投与し続けた。その後、各組織より採取したメモリーCD8T細胞集団におけるBrdU陽性率を調べたところ、肺実質CD8T_{RM}もBrdUを取り込んでいることが解った(図6)。このことは、肺実質CD8T_{RM}が恒常性増殖を起こしていることを示している。しかしながら、その割合は脾臓のものと比較して低い事より、肺実質CD8T_{RM}の恒常性増殖の効率は、リンパ組織(脾臓)での効率と比較し低い事が解った。これは肺組織内における恒常性サイトカイン濃度が低いことが原因であることが示唆される。

(5) 上述の4で見られた肺実質 CD8T_{RM} 増殖が肺局所における再活性化と関連があるかどうかを調べるため、細胞増殖サイクルをリアルタイムで可視化できる Fucci マウスのパラビオーシスを用いて、肺実質 CD8T_{RM} のうち活性化マーカーCD69 を発現している細胞にて増殖サイクルが回っているかを調べたところ、大部分の細胞が休止期であることが解った(図7)。このことより、肺実質 CD8T_{RM} の再活性化は恒常性増殖とは関係がないことが示された。



(6) 肺実質から肺気道への CD8T_{RM} の移行を調節している機構を調べるため、パラビオーシスを用いて肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) 及び循環型 CD8T 細胞 (パートナー) のケモカインレセプター発現を調べたところ、

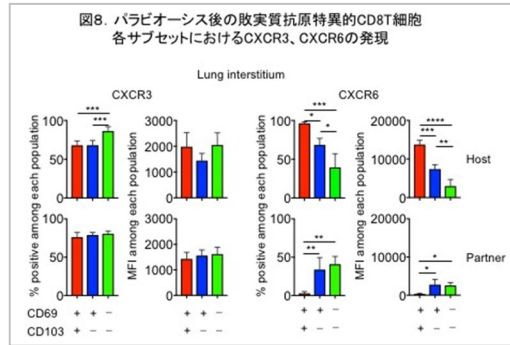
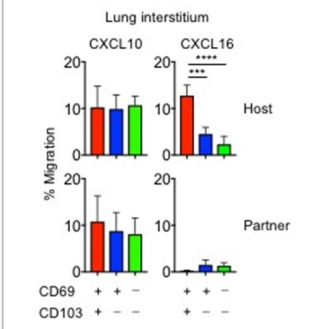


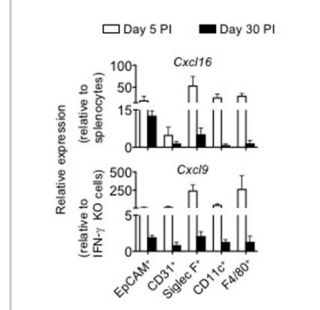
図9. パラビオーシス後の肺実質抗原特異的CD8T細胞各分画における走化性(ケモタキシス)



CXCR3 は肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) 及び循環型 CD8T 細胞 (パートナー) の両方に高発現していたのに対し、CXCR6 は肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) とくに活性化した CD69 陽性細胞にて高発現しており、循環型 CD8T 細胞 (パートナー) はほとんど発現していないことが解った(図8)。このとき、CXCR3 及び CXCR6 それぞれのリガンドに対する走化性(ケモタキシス)を調べたところ、肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) 及び循環型 CD8T 細胞 (パートナー) の両方が CXCR3 のリガンドである CXCL10 に走化性を示したのに対し、肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) のみが CXCR6 のリガンド CXCL16 に対して走化性を示した(図9)。このパターンはケモカインレセプターの発現と全く同様であった。

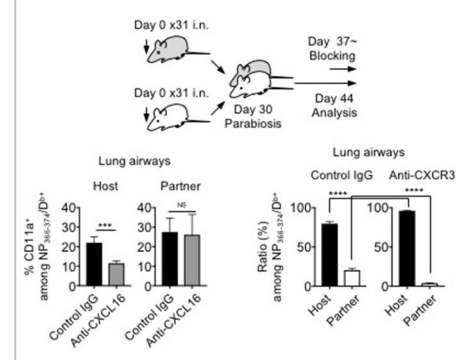
そこで、インフルエンザウイルス感染マウスを用いて、これらリガンドの肺における発現細胞を調べたところ(リアルタイムPCRによる mRNA 発現定量) ウイルスが完全に排除され、炎症もおさまった感染 30 日後においても CXCL16 の発現が上皮細胞及び肺胞マクロファージで確認された(図10)。このことは、このケモカインがこれらの細胞にて恒常性に発現されている、つまり肺気道は CXCL16 が高濃度に保たれているということである。また、CXCL9 (CXCR3 のリガンド) も微量ながら上皮などにて常に発現されている事が解った(図10)。CXCL9 は炎症性ケモカインであるが、おそらく外部環境に常に曝されている影響で微量な発現が続いている物と示唆された。

図10. インフルエンザウイルス感染後の各肺細胞分画におけるケモカインの発現(qPCR)



これまでの結果より CXCR3 及び CXCR6 のリガンドが肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) 及び循環型 CD8T 細胞 (パートナー) の肺気道移行を別々に調節している可能性が示唆されたため、パラビオーシスを用いて、結合後のマウスにケモカイン(もしくは受容体)のブロッキング抗体を投与し、その後の肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) 及び循環型 CD8T 細胞 (パートナー) の肺気道移行を調べた。CXCL16 中和抗体投与では、肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) の肺気道移行が優位に抑制されたが、循環型 CD8T 細胞 (パートナー) の肺気道移行に変化は見られなかった(図11)。一方、CXCR3 中和抗体の投与では循環型 CD8T 細胞 (パートナー) の肺気道移行が著しく減少した(図11)。これらを総合し、肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) は活性化により発現が上昇した CXCR6 を用いて肺気道移行を可能にしているのに対し、循環型 CD8T 細胞 (パートナー) は CXCR3 依存的に肺気道へ移行していることが示された。つまり、肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) 及び循環型 CD8T 細胞 (パートナー) の肺気道移行は別々のケモカインによって調節されている事が解った。

図11. パラビオーシス後のケモカインブロッキングによる抗原特異的CD8T細胞肺気道移行効率の変化



肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) は活性化により発現が上昇した CXCR6 を用いて肺気道移行を可能にしているのに対し、循環型 CD8T 細胞 (パートナー) は CXCR3 依存的に肺気道へ移行していることが示された。つまり、肺実質 CD8T_{RM} (ホスト) 及び循環型 CD8T 細胞 (パートナー) の肺気道移行は別々のケモカインによって調節されている事が解った。

[雑誌論文] (計 8 件)

1. **Takamura S**, Kohlmeier JK.
Establishment and maintenance of conventional and circulation-driven lung-resident memory CD8⁺ T cells following respiratory virus infections.
Front. Immunol. 2019. IF:5.551、査読有
2. Matsuo K, Kitahata K, Kawabata F, Kamei M, **Takamura S**, Oiso, N, Kawada A, Yoshie O, Nakayama T.
A highly active form of XCL1/lymphotaxin functions as an effective adjuvant to recruit cross-presenting dendritic cells for induction of effector and memory CD8⁺ T cells.
Front. Immunol. 2018 Nov 27;9:2775. IF:6.429、査読有
doi: 10.3389/fimmu.2018.02775. PMID: 30542351
3. **Takamura S***. (*Corresponding author)
Niches for long-term maintenance of tissue-resident memory T cells.
Front. Immunol. 2018 May 31;9:1214. IF:6.429、査読有
doi: 10.3389/fimmu.2018.01214. PMID: 29904388
4. Yonesaka K, Haratani K, **Takamura S**, Sakai H, Kato R, Takegawa N, Takahama T, Tanaka K, Hayashi H, Takeda M, Kato S, Maenishi O, Sakai K, Chiba Y, Okabe T, Kudo K, Hasegawa Y, Kaneda H, Yamato M, Hirotsu K, Miyazawa M, Nishio K, Nakagawa K.
B7-H3 negatively modulates CTL-mediated cancer immunity.
Clin. Cancer Res. 2018 Jun 1;24(11):2653-2664. IF:9.619、査読有
doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2852. PMID: 29530936
5. Kimura MY, Hayashizaki K, Tokoyoda K, **Takamura S**, Motohashi S, Nakayama T.
Crucial role for CD69 in allergic inflammatory response: CD69-MyD88 system in the pathogenesis of airway inflammation.
Immunol. Rev. 2017 Jul;278(1):87-100. IF:9.542、査読有
doi: 10.1111/imr.12559. PMID: 28658550
6. **Takamura S***. (*Corresponding author)
Regional immune responses in the lung after respiratory virus infections.
Viral Immunol. 2017 Jul/Aug; 30(6):397. IF:1.513、査読有
doi: 10.1089/vim.2017.29020.sjt. PMID:28609255
7. **Takamura S***. (*Corresponding author)
Persistence in temporary lung niches: a survival strategy of lung-resident memory CD8⁺ T cells.
Viral Immunol. 2017 Jul/Aug; 30(6):438-450. IF:1.513、査読有
doi: 10.1089/vim.2017.0016. PMID: 28418771
8. **Takamura S***, Yagi H, Hakata Y, Motozono C, McMaster SR, Masumoto T, Fujisawa M, Chikaishi T, Komeda J, Itoh J, Umemura M, Kyusai A, Tomura M, Nakayama T, Woodland DL, Kohlmeier JE, Miyazawa M. (*Corresponding author)
Specific niches for lung-resident memory CD8⁺ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance.
J. Exp. Med. 2016 Dec 12;213(13):3057-73. IF:11.24、査読有
doi: 10.1084/jem.20160938. PMID: 27815325

[学会発表] (計 1 1 件)

1. **Takamura S**
Maintenance of lung-resident memory CD8⁺ T cells following respiratory virus infection.
The 3rd Chiba University - UC San Diego Symposium on Mucosal Immunology, Allergy and Vaccines.
2019 年 2 月 14 日
2. **Takamura S**, Dunbar PR, Cartwright EK, Wein AN, Tsukamoto T, Li ZR, Kumar N, Uddback I, Hawyard SL, Ueha S, and Kohlmeier JE
Antigen presentation by pulmonary macrophages drives the establishment of lung-resident CD8 T cell memory
第 47 回日本免疫学会学術集会 2018 年 12 月 10-12 日
3. **高村 史記**
肺滞在型メモリーCD8T 細胞の分化・維持機構
第 27 回日本サイトメトリー学会学術集会 2017 年 12 月 11-12 日
4. **Takamura S**
Generation and maintenance of lung-resident memory CD8⁺ T cells.
KAI International Meeting 2017. 2017 年 11 月 9-10 日
5. **Takamura S**
Maintenance of lung-resident memory CD8⁺ T cells.

- Symposium, Korea University. 2017 年 11 月 8 日
6. **Takamura S**
Maintenance of lung-resident memory CD8⁺ T cells.
Yonsei Immunology Mini-Symposium, Yonsei University. 2017 年 11 月 7 日
 7. Yonesaka K, Kudoh K, **Takamura S**, Sakai H, Kato R, Haratani H, Takahama T, Tanaka K, Hayashi H, Kaneda H, Takeda M, Maenishi O, Yamato M, Miyazawa M, Nishio K, Nakagawa K
A Checkpoint Molecule B7-H3 as a Novel Immune Therapy Target for Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)
18th World Conference on Lung Cancer 2017 年 9 月 23–26 日
 8. Hayward SL, **Takamura S** and Kohlmeier JE
Unrelated respiratory infections promote the loss of pre-existing tissue resident influenza-specific memory CD8 T cells in the lung
The American Association of Immunologists Meeting 2017 年 5 月 12–16 日
 9. **高村 史記**
肺滞在型メモリーCD8T 細胞は傷害組織修復部位に形成されたニッチ (RAMD) にて維持される
第 10 回次世代アジュバント研究会 2017 年 1 月 23–24 日
 10. **Takamura S**, Yagi H, Motozono C, Tomura M, Nakayama T, and Miyazawa M
Specific niches for lung-resident memory CD8⁺ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance
第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5–7 日
 11. Motozono C, Tsuji-Kawahara S, **Takamura S** and Miyazawa M
Vaccine-elicited preferential induction of polyfunctional Th cells is associated with protection against acute retroviral infection
International Congress of Immunology 2016 年 8 月 21–26 日

〔図書〕(計 1 件)

高村 史記 他、羊土社 実験医学別冊 フローサイトメトリーQ&A 編集戸村道夫、2017、312

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：本園 千尋

ローマ字氏名：(MOTOZONO, Chihiro)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：微生物病研究所

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：10642910

(2)研究協力者

研究協力者氏名：戸村 道夫

ローマ字氏名：(TOMURA, Michio)

研究協力者氏名：福山 聡

ローマ字氏名：(FUKUYAMA, Satoshi)

研究協力者氏名：宮澤 正顯

ローマ字氏名：(MIYAZAWA, Masaaki)