

T細胞の自己反応性の持つ免疫学的意義の解明

河部剛史

東北大学大学院医学系研究科・免疫学分野

【研究の背景】

CD4⁺ T細胞は外来抗原に対する獲得免疫応答に必須の役割を果たすリンパ球である。すなわち病原体感染時、外来抗原を特異的に認識したナイーブ細胞は活性化・増殖してエフェクター細胞へと分化し、当該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アポトーシスにより死滅するが、一部の細胞はメモリー細胞として長期に生存し免疫記憶を形成する。これらの細胞分画により構成される 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⁾。

このような「古典的」T細胞活性化経路に加え、我々は、定常状態においてナイーブ CD4⁺ T細胞の一部が外来抗原ではなく自己抗原を認識し、恒常的に準活性化状態を呈することを発見し、このように産生される細胞を「Memory-phenotype (MP)細胞」と定義づけた²⁾。重要なことに MP細胞は、獲得免疫を担うはずの T細胞にあつて自然免疫機能を発揮し得るといった特徴的な性質を有する。具体的には MP細胞は、外来抗原を認識せずにサイトカイン IL-12 に応答して IFN- γ を産生することにより、トキソプラズマや結核に対する感染防御に寄与することが証明されている。こうした特徴から、MP細胞は新規の自然免疫型 Tリンパ球として現在注目を集めている³⁻⁷⁾。

我々は最近、外来抗原特異的ヘルパーT細胞における Th1, Th2, Th17 分類と同様に、MP細胞が MP1, MP2, MP17 分画から構成される可能性を見出すとともに⁸⁾、その分子マーカーを同定した⁹⁾。うち約半数を占める MP1 サブセットは上記の MP細胞の自然免疫機能の主軸を担い、その分化は IL-12 により定常的に促進される。このことから、MP2, MP17 に関してもそれぞれ固有のサイトカイン依存的分化・活性化機構の存在が示唆される。一方、MP細胞は定常状態下において自己抗原特異的に産生されることから、その過剰活性化により自己免疫・炎症性疾患を惹起しうる可能性も類推される。同様に MP細胞が抗腫瘍活性を保有する可能性も考えられる。

【目 的】

上記の研究背景を踏まえ、本研究では MP細胞の分化・活性化機構、自己免疫活性、抗腫瘍免疫活性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)、germ-free (GF)、antigen-free (AF)環境下で飼育したものを用いて、Single cell RNA sequencing (scRNAseq)解析、フローサイトメトリー解析、組織学的解析等を行った。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。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】

(1) MP 細胞の分化・活性化機構

MP 細胞は、ナイーブ CD4⁺ T 細胞が抗原提示細胞 (APC) 上の自己抗原を認識することによって生成される。一方、定常状態における免疫抑制には制御性 T 細胞 (Treg) が重要な役割を担うことが知られているため、Treg が MP 細胞の産生を恒常的に抑制している可能性が考えられる。すなわち、MP - APC - Treg 間相互作用の破綻が MP 細胞の過剰産生・活性化に寄与する可能性が示唆される。

上記の仮説を検証するために、我々は、任意のタイミングで Treg を除去することのできる Foxp3-diphtheria toxin receptor-transgenic (Foxp3-DTR) マウスに MP あるいはナイーブ CD4⁺ T 細胞を移入し、Diphtheria toxin (DT) 投与により Treg を除去したうえでドナー細胞の挙動を解析するという実験系を確立した。その結果、Treg 除去環境下において、MP 細胞はナイーブ細胞に先んじて自発的活性化・増殖を呈することが判明した。さらに、活性化した MP 細胞の分化状態を解析したところ、同細胞は IFN- γ ⁺ T-bet⁺ の Th1 型分化を呈することが明らかになった。一方、Th2, Th17 型分化は殆ど観察されなかった。これらのことから、Treg 欠損下において MP 細胞はナイーブ細胞に先んじて増殖、さらには 1 型活性化を呈することが証明された。

次に我々は、上記の MP 細胞活性化の分子メカニズムの解明に取り組んだ。Treg 除去環境下において APC 上の CD80, CD86 の発現量の上昇が認められたため、CD28 - CD80/86 シグナルが MP 細胞活性化に寄与する可能性が推察された。そこで CTLA4-Ig 投与により同シグナルを遮断したうえで MP 細胞の活性化を観察したところ、MP 細胞増殖は有意に抑制された。1 型分化には影響は見られなかった。すなわち、Treg は定常的に APC 上の CD80/86 の発現量を制御しており、Treg 欠損下では APC 上の CD80/86 発現量が過剰になることにより MP 細胞の過剰増殖が起こることが示唆された。

一方、MP 細胞の一部は定常的に IL-2 を産生していた。定常状態下、CD4⁺ T 細胞由来の IL-2 は周囲の Treg に働きかけて後者細胞の生存を促進する。このことから、Treg 除去環境下では MP 細胞由来の IL-2 が過剰となり、その結果 MP 細胞の過剰活性化が促進される可能性が考えられる。この仮説を実証するために、抗 IL-2 阻害抗体を投与したうえで MP 細胞の過剰活性化を観察したところ、同抗体投与により MP 細胞の増殖は不変であった一方、Th1 型活性化は有意に抑制された。すなわち、Treg は MP 細胞由来の IL-2 を定常的に消費しており、Treg 欠損下では同サイトカインが余剰となるために MP 細胞の 1 型活性化が促進されるものと考えられた。

以上より、MP 細胞はナイーブ細胞の自己認識により定常的に産生されるため、増殖ならびに 1 型活性化を呈する潜在性を有するが、その過剰活性化は Treg により恒常的に抑制されていること、同経路には CD28 - CD80/86 ならびに IL-2 シグナルが重要な役割を担うことが示された¹⁰⁾。

(2) MP 細胞の自己免疫活性

上記のように、MP 細胞は過剰増殖・活性化を呈する潜在性を有することが明らかになったため、次に我々は、こうした反応が実際に自己免疫・炎症性疾患を惹起しうることについて検証した。この目的で、MP CD4⁺ T 細胞を分取し、Treg を含む全 T・B リンパ球を欠損する Rag2KO マウスに同細胞を移入して自然経過を観察したところ、MP 細胞は消化管・肺・腎・肝に集積して腸炎・間質性肺炎・間質性腎炎・胆管炎を惹起し、2-3 か月の経過を経て再発・寛解を繰り返しながら徐々に病態は悪化した。これらの多臓器炎症のうち、腸炎は正常細菌叢依存的、肺炎は非依存的であり、それぞれ正常細菌叢抗原、自己抗原が病態増悪に重要な役割を担うことが示唆された。また、消化管においては MP 細胞は IL-12/23 依存的に Th1、Th17 細胞に分化し、IFN- γ かつ IL-17A 依存的に病態を増悪させることが明らかになった。

次に我々は、炎症惹起における MP 細胞とナイーブ細胞の役割を比較した。上記と同様に、分取した MP またはナイーブ細胞を Rag2KO マウスに移入してその自然経過を比較解析したところ、予想外なことに、MP 細胞により惹起される腸炎はナイーブにより惹起されるそれに比較して有意に軽症であることが明らかになった。そこで MP、ナイーブドナー細胞の分化状態を詳細に解析したところ、MP 細胞は高率に Treg に分化することが明らかになった。同 Treg 分化は TGF β 依存的であることも判明した。

以上のことから、MP 細胞は Th1, Th17, Treg に分化することにより全身炎症の病態を形成することが示された。定常状態下、MP 細胞は T-bet⁺ Ror γ ⁻ MP1, T-bet⁻ Ror γ ^t MP0 の分画より構成される。そこで次に、これらの MP 分画のうちいずれが Rag2 KO マウス体内で Th1, Th17, Treg に分化するのかを解析した。これらの分画をそれぞれ Rag2 KO マウスに移入し

で数週間後にドナー細胞を解析したところ、MP1 はすでに Th1 に終末分化しており Th17, Treg へは変化しなかった一方、MP0 は Th1, Th17, Treg を高率に産生した。こうした MP0 の「多分化能」は *Rag2* KO マウスのみならず前出の Foxp3-DTR マウスにおいても同様に観察された。

最後に、T-bet⁻ Rorγt⁻ MP0 細胞のトランスクリプトームならびに TCR 配列解析を行った。MP0 は MP1 と比較して *Ccr7*, *Cd27*, *Tcf7* などの「ナイーブ・メモリー様」マーカーを高発現していた。また、MP1 分画においては特定の TCR を有するクローンの oligoclonal な増殖が認められたのに対し、MP0 はナイーブ細胞と遜色ない TCR レパートリーの多様性を保持していた。すなわち、MP0 分画が未成熟な「幹細胞様」の性質を有することが示された。

以上より、MP 細胞集団には T-bet⁻ Rorγt⁻「未分化」MP 分画が含まれること、同分画は *Rag2* KO マウスならびに Foxp3-DTR マウスにおいて Th1, Th17, Treg へと分化することにより緩徐かつ持続性の全身炎症を惹起しうるということが明らかになった¹¹⁾。

(3) MP 細胞の抗腫瘍活性

上記の MP 細胞の多分化能から、MP 細胞が Th1, Th17, Treg へと分化することにより抗腫瘍活性を發揮しうる可能性が示唆される。現在、マウス悪性リンパ腫 EL4、悪性黒色腫 B16 を用いて同仮説を検証中である (*Under revision*)。

【考 察】

一連の研究により、MP - APC - Treg 間相互作用の破綻により MP 細胞は過剰活性化を呈し得ること、MP 細胞には未分化分画が含まれ、同分画は Th1, Th17, Treg へと分化することにより自己免疫・炎症性疾患の病態形成に寄与し得ることが証明された。

今回の研究では、MP 細胞が潜在的に「炎症原性」を内含することが明らかになった。すなわち、MP 細胞は APC 上の自己抗原ならびに CD80/86 を認識することにより増殖するが、その過剰な分裂反応は Treg によって抑制されている¹⁰⁾。また、MP 細胞は自発的に IL-2 を産生し自身の Th1 分化を促進するが、健常状態では過剰な 1 型活性化は Treg によって抑制される。これらのことから、MP - APC - Treg 間相互作用が MP 細胞の恒常性維持に必須の役割を果たし、その破綻により MP 細胞の過剰活性化さらには自己免疫疾患が惹起されるものと考えられる。

また、MP 細胞は Treg 欠損下、Th1, Th17 に分化して炎症を惹起するのみならず、自分自身が Treg に分化することにより自身の炎症原性を逆説的に抑制することも明らかになった¹¹⁾。そして、MP 細胞に含まれる「未分化」分画が Th1, Th17, Treg を産生する「多能性」を有する可能性も示唆された。これらの所見は、MP 細胞が炎症促進作用のみならず抑制作用をも内含することを示すものである。

T リンパ球は胸腺における正ならびに負の選択を経て産生されるため、全ての末梢 T 細胞は弱い自己抗原反応性を有する。この弱い自己反応性は、感染防御において機能的な「自然免疫的 MP 細胞システム」の構築を可能にした一方、必然的に MP 細胞に炎症原性をもたらしたものと考えられ、今回の我々の研究結果は同仮説を支持するものである。そしてこのような MP 細胞の負の側面は、MP 細胞外因性の Treg に加え、MP 細胞自身に由来する Treg により二重に抑制されているものと考えられる。我々は、このような MP 抑制機構の破綻が自己免疫疾患の本質的な病態であるものと考え、さらなる研究を行っている。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、外来抗原に対する曝露が限定的であると思われるヒト臍帯血あるいは胎児において、メモリー表現型を有する CD4⁺ T 細胞が存在することが明らかになってきた^{12, 13)}。また、健常人末梢血中に含まれるメモリー細胞様分画の一部は細胞分裂状態を呈し、Treg に類似した遺伝子発現プロファイルを持つことも報告された¹⁴⁾。これらの知見は、マウス MP 細胞と相同の分画がヒトにおいても存在する可能性を示唆するものである。ヒト MP 細胞の存在が証明され、さらにその自然免疫機能や自己免疫活性の全容が明らかになれば、同細胞を標的とした新たな感染症ならびに自己免疫疾患治療戦略の創出⁶⁾にもつながり得るものと期待される。

【参考・引用文献】

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, Sher A. Memory-phenotype CD4⁺ T cells: a naturally arising T lymphocyte population possessing innate immune function. *Int Immunol* **34**(4), 189–196, 2022.
6. Kawabe T. Memory-Phenotype CD4⁺ T Lymphocytes: A Novel Therapeutic Target in Infectious or Autoimmune Diseases? *JMA J* **5**(3), 298–306, 2022.
7. Kawabe T. Homeostasis and immunological function of self-driven memory-phenotype CD4⁺ T lymphocytes. *Immunol Med* **46**, 1–8, 2023.
8. 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.
9. 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.
10. Li J, Yang Z, Kawajiri A, Sato K, Tayama S, Ishii N, Zhu J, Kawabe T. Excess generation and activation of naturally arising memory-phenotype CD4⁺ T lymphocytes are inhibited by regulatory T cells in steady state. *Front Immunol* **15**, 1429954, 2024.
11. Kawajiri A, Li J, Koinuma K, Yang Z, Yoon HJ, Yi J, Nagashima H, Ishii M, Gao F, Sato K, Tayama S, Harigae H, Iwakura Y, Ishii N, Sher A, Ishigaki K, Zhu J, Kim KS, Kawabe T. Naturally arising memory-phenotype CD4⁺ T lymphocytes contain an undifferentiated population that can generate T_{H1}, T_{H17}, and Treg cells. *Sci Adv*, in press.
12. Zhang X, Mozeleski B, Lemoine S, Dériaud E, Lim A, Zhivaki D, Azria E, Le Ray C, Roguet G, Launay O, Vanet A, Leclerc C, Lo-Man R. CD4 T cells with effector memory phenotype and function develop in the sterile environment of the fetus. *Sci Transl Med* **6**(238), 238ra72, 2014.
13. Li N, van Unen V, Abdelaal T, Guo N, Kasatskaya SA, Ladell K, McLaren JE, Egorov ES, Izraelson M, Chuva de Sousa Lopes SM, Höllt T, Britanova OV, Eggermont J, de Miranda NFCC, Chudakov DM, Price DA, Lelieveldt BPF, Koning F. Memory CD4⁺ T cells are generated in the human fetal intestine. *Nat Immunol* **20**(3), 301–312, 2019.
14. Younes SA, Talla A, Pereira Ribeiro S, Saidakova EV, Korolevskaya LB, Shmagel KV, Shive CL, Freeman ML, Panigrahi S, Zweig S, Balderas R, Margolis L, Douek DC, Anthony DD, Pandiyan P, Cameron M, Sieg SF, Calabrese LH, Rodriguez B, Lederman MM. Cycling CD4⁺ T cells in HIV-infected immune nonresponders have mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest* **128**(11), 5083–5094, 2018.