

45. 粘膜メモリー T 細胞のオートファジー非依存的維持機構

高村 史記

近畿大学 医学部 免疫学教室

Key words : 組織滞在型メモリー CD8T 細胞, 肺粘膜, オートファジー

緒 言

抗原特異的 CD8T 細胞はウイルス感染細胞もしくは腫瘍細胞を直接認識・破壊する細胞集団である。メモリー CD8T 細胞は抗原排除後も長期間生体内に維持され、同一抗原再刺激に際し迅速且つ強力に反応することで病原体の早期排除を可能とする。メモリー CD8T 細胞は場所、性質、機能的に異なる亜集団を構成しており、主に血液及びリンパ組織を循環するセントラルメモリー (T_{CM})、リンパ組織と粘膜組織間を循環するエフェクターメモリー (T_{EM})、そして粘膜等の感染局所に定住し、前述の循環型亜集団とは完全に独立して維持される組織滞在型 (レジデント) メモリー (T_{RM}) に分類される¹⁾。循環型メモリー CD8T 細胞はサイトカイン IL-7 や IL-15 刺激による恒常性増殖により維持される²⁾。一方、T_{RM} は慢性的に外界の刺激に暴露されるため、常に強い活性化型を示し、故にこれらサイトカインレセプター発現も低下している。そのため、T_{RM} は恒常性増殖ではなく個々の細胞の単純な長期生存により維持されていると考えられているが、その機構は未だに解明されていない。また、T_{RM} が存在する上皮や肺気道は無血管組織であるため、低栄養環境であることが予測される。このことより、飢餓刺激に対応し老化した細胞内小器官を分解・再利用することで新陳代謝を高め、細胞の恒常性を保つオートファジー³⁾ が T_{RM} の維持に重要であることが示唆された。そこで、本研究ではマウスインフルエンザウイルス感染モデルを用いて、肺に滞在する CD8T_{RM} の維持におけるオートファジーの役割を解明することを目的とする。

方法、結果および考察

オートファジーはナイーブ T 細胞におけるミトコンドリア機能維持⁴⁾、更には抗原刺激後のエフェクターからメモリー T 細胞への分化に必須であることが知られている⁵⁾。そこで、タモキシフェン投与によりメモリー分化後にオートファジー発動必須因子 *Atg5* の欠損を誘導することが可能な *Atg5-f/f-ERT2-Cre* マウスを作製し、この骨髄及び野生型マウス骨髄を別の野生型マウスに移植した骨髄キメラマウスを用いてインフルエンザウイルス感染実験を行った(図 1A)。メモリー T 細胞分化後(約感染 30 日後)にタモキシフェンを投与して一方のドナー由来 T 細胞のオートファジーを遮断し、6 週後に野生型及びオートファジー欠損型抗原特異的メモリー CD8T 細胞の割合を比較したところ、投与前と比較し両者の割合に変化は見られなかった(図 1B、C)。このことは、ナイーブ T 細胞とは異なり、メモリー CD8T 細胞維持にオートファジーは積極的に関わっていないことを示している。

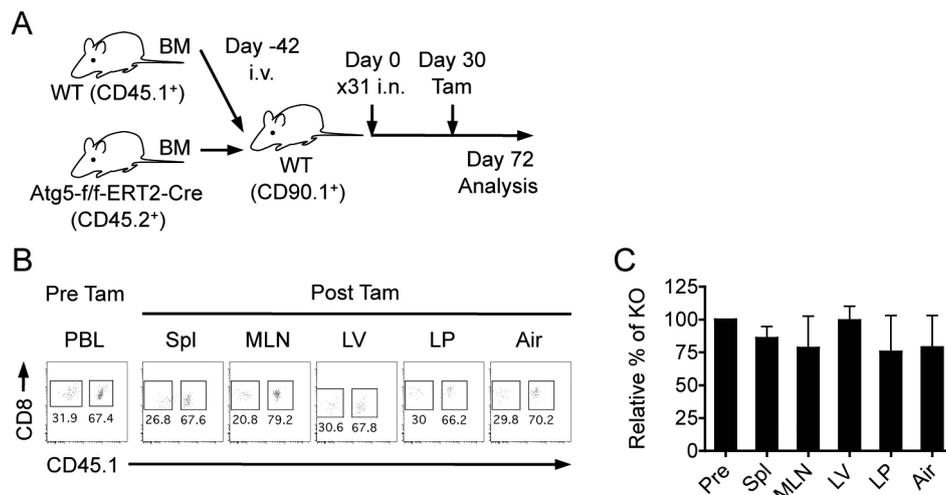


図 1. オートファジー不全がメモリー CD8T 細胞維持に与える影響

(A) 野生型 (WT) マウス及びタモキシフェン誘導 *Atg5* 欠損マウス (*Atg5-f/f-ERT2-Cre*) の骨髄を、ブスルファン処理により骨髄細胞を傷害した野生型マウスに移入し、骨髄キメラマウスを作製した。キメラマウスにインフルエンザウイルス (x31) を経鼻感染し、30 日目にタモキシフェン (Tam) を腹腔接種することで一方のドナー由来 T 細胞の *Atg5* 欠損を誘導した。タモキシフェン投与前 (Pre Tam) の末梢血を、そして投与 6 週間後 (Post Tam) に各組織を採取し、投与前後での抗原特異的メモリー CD8T 細胞中の欠損型と野生型の割合の変化を算出した。(B) タモキシフェン投与前後における各組織の抗原特異的メモリー CD8T 細胞中の野生型 (CD45.1 陽性) とオートファジー不全型 (CD45.1 陰性) の割合。末梢血 (PBL)、脾臓 (Spl)、縦隔リンパ節 (MLN)、肺血管 (LV)、肺実質 (LP)、肺気道 (Air)。(C) 投与前のオートファジー不全型の割合を基準に、投与後のオートファジー不全型の割合の変化を百分率で示した。

更に、同様の実験を、マウスの体重が激減する極度の飢餓状態にて行ったところ (図 2A, B)、脾臓、リンパ節、肺血管など全身を循環しているセントラルメモリー CD8T 細胞にてオートファジー不全型細胞の割合が著しく減少した (図 2C, D)。しかしながら、驚くべきことに肺粘膜 (肺実質及び肺気道) に定着しているオートファジー不全 CD8 T_{RM} の割合は野生型と比較し全く変化しなかった (図 2C, D)。従って、肺粘膜 CD8T_{RM} は飢餓状態においてもオートファジーを必要としないこと、即ち粘膜組織は低栄養の影響を受けにくい環境であることが示唆された。

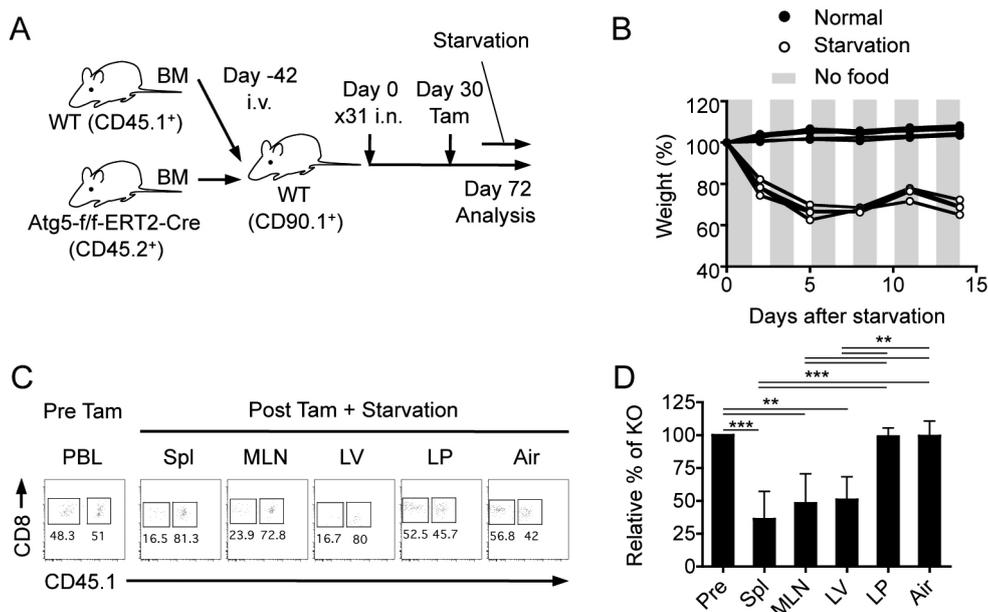


図 2. 飢餓刺激がオートファジー不全メモリー CD8T 細胞維持に与える影響
 (A) 図 1 と同様の実験過程にて、タモキシフェン投与期間の後半 2 週間に断続的な断食 (Starvation) を行った。(B) 飢餓刺激後の経時的体重変化を百分率で示した。(C) タモキシフェン投与前後における各組織の抗原特異的メモリー CD8T 細胞中の野生型 (CD45.1⁺) とオートファジー不全型 (CD45.1⁻) の割合。(D) 投与前のオートファジー不全型の割合を基準に、投与後のオートファジー不全型の割合の変化を百分率で示した。* p < 0.01, *** p < 0.001 (One-Way ANOVA with Tukeys multiple comparisons test) .

元々グルコース濃度が低い粘膜組織 (肺気道は血液の 1/10 以下) ではグルコース非依存的なエネルギー供給が行われている可能性が示唆されたため、メモリー CD8T 細胞各サブクラス (T_{CM}: 脾臓、リンパ節、肺血管、及び T_{RM}: 肺実質、肺気道) において、主なエネルギー源となるグルコースもしくは脂肪酸の取り込み能を、蛍光標識同位体を用いて評価した。すると、ナイーブ CD8T 細胞 (CD44^{lo}, CD62L^{hi}) はグルコース取り込み能が高く、逆に脂肪酸 (パルミチン酸) 取り込み能が低いのにに対し、メモリー CD8T 細胞はグルコース取り込み能が激減し、代わりにパルミチン酸取り込み能が増加することが明らかとなった (図 3A, B)。このパルミチン酸の取り込みに関して、メモリー CD8T 細胞サブクラス間の差は見られなかった (図 3B)。この実験にてみられた蛍光強度の上昇は、細胞表面への蛍光標識同位体の非特異的結合ではなく、細胞内への取り込みに起因することも確認された (図 3C)。また、メモリー CD8T 細胞における様々な長さの脂肪酸取り込み能を評価したところ、長鎖脂肪酸であるパルミチン酸 (C₁₆) の取り込みが非常に強いが、ラウリン酸 (C₁₂)、吉草酸 (C₅) 更には低密度リポタンパク質 (LDL) の取り込みはほとんど見られなかった (図 3D)。このことより、T 細胞は抗原感作を受けることで、エネルギー源の取り込みがグルコースから脂肪酸、特に脂肪酸酸化に直接使用可能なパルミチン酸にシフトすることが解った。ただ、肺粘膜 CD8T_{RM} が飢餓環境にて生存可能な理由は別に存在することが示唆された。

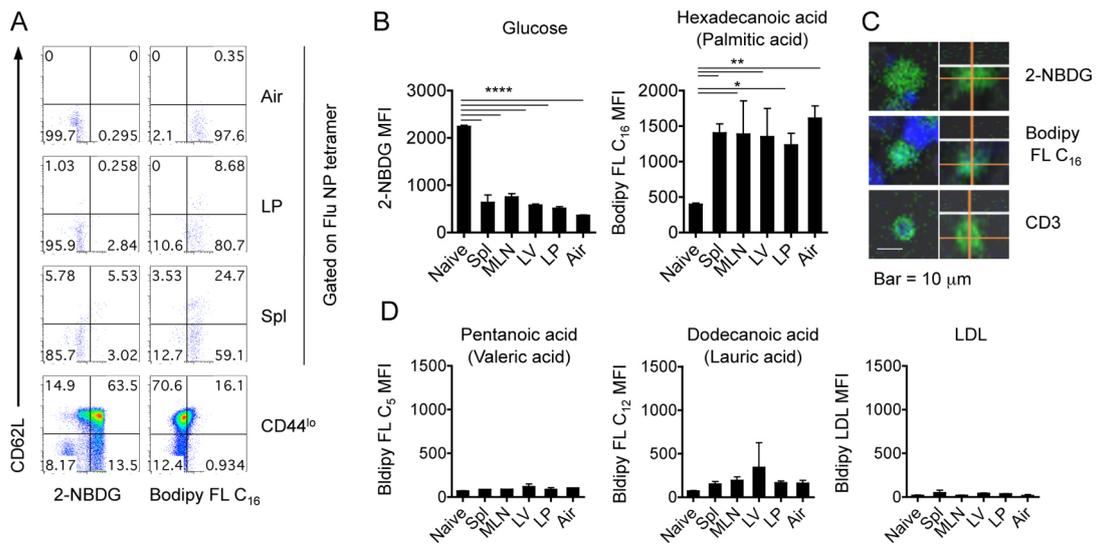


図 3. メモリー CD8T 細胞におけるグルコースもしくは脂肪酸の取り込み

(A) インフルエンザウイルス経鼻感染 30 日後の脾臓、肺実質及び肺気道から採取した抗原特異的メモリー CD8T 細胞の *in vitro* における蛍光標識グルコース同位体 (2-NBDG) もしくは蛍光標識脂肪酸 (Bodipy FL C₁₆: パルミチン酸) の取り込みをフローサイトメーターにて解析。CD44^{lo} は脾臓 CD8T 細胞の CD44^{lo} 分画を示す。(B) 各組織の抗原特異的メモリー CD8T 細胞もしくは CD44^{lo} CD8T 細胞 (Naïve) における蛍光標識グルコース同位体もしくは脂肪酸取り込み後の蛍光強度。(C) 肺実質の抗原特異的メモリー CD8T 細胞における蛍光標識グルコース同位体もしくは脂肪酸取り込みを共焦点顕微鏡にて評価。下段は同細胞を細胞表面抗原 CD3 抗体にて染色。(D) 各組織の抗原特異的メモリー CD8T 細胞もしくは CD44^{lo} CD8T 細胞における蛍光標識脂肪酸 (吉草酸もしくはラウリン酸) もしくは低密度リポタンパク質 (LDL) 取り込み後の蛍光強度。* p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001 (One-Way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test) .

そこで、解糖系、脂肪酸酸化、もしくは脂肪酸再合成に関与する酵素の発現を調べるため、脾臓、肺より各メモリー CD8T 細胞サブクラスを採取し、リアルタイム PCR にて酵素のメッセンジャー RNA 発現を定量した。その結果、解糖系に関与する *Pgam1* 及び *Pkm2*、脂肪酸再合成に関与する *Acc1* の発現に明確な差は見られなかったが、肺粘膜 CD8TRM は他のメモリー集団と比較し脂肪酸酸化を担う *Cpt1a* を高発現していることが確認された (図 4)。従って、肺粘膜 CD8TRM は循環型の CD8TCM と比較し脂肪酸代謝機構が亢進していることが示唆された。これらを総合すると、末梢組織に分布する可能性があるメモリー CD8T 細胞 (全般) は、分化の課程にて組織中の脂肪酸を取り込むことで低グルコース環境に適応する性質を獲得しており、粘膜に到達し T_{RM} へと分化後は脂肪酸代謝が亢進することで外界の脂肪酸を利用した効率の良いエネルギー変換を行うことが可能となると考えられる。肺胞の表面張力を低下させることで虚脱を防いでいる肺サーファクタントの約 80% がリン脂質で構成されていること等も考慮すると、肺組織は比較的脂肪酸が豊富に存在すると考えられる⁶⁾。このことが、脂肪酸優位な代謝機構を有する肺粘膜 CD8TRM の飢餓刺激環境下でのオートファジー非依存的維持を可能としていることが示唆された。

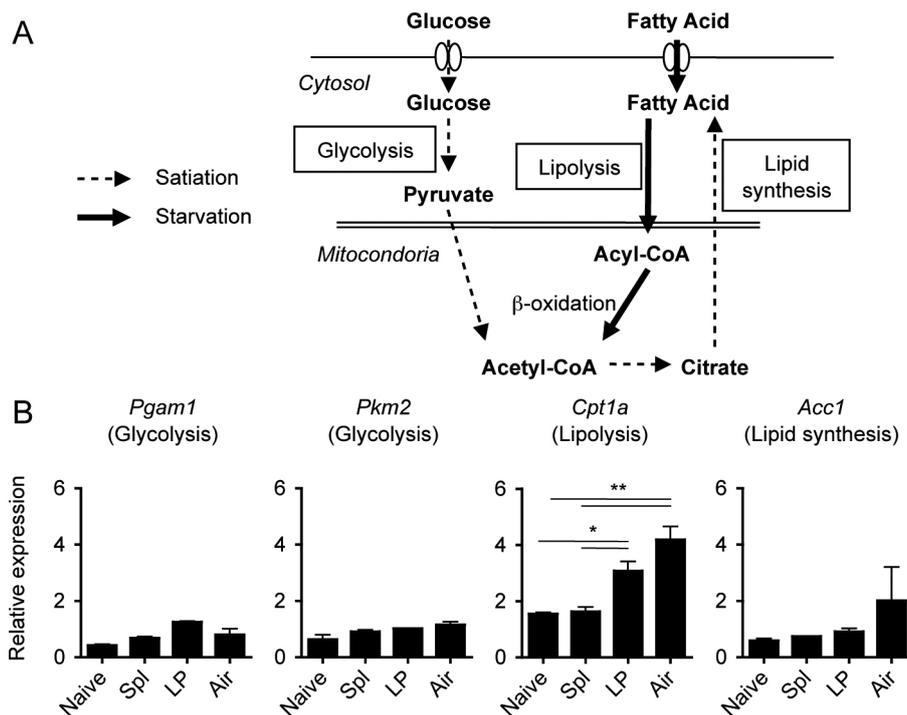


図 4. メモリー CD8T 細胞における解糖系、脂肪酸酸化、脂肪酸再合成

(A) 解糖系、脂肪酸酸化、脂肪酸再合成の模式図。(2) 各組織のナイーブもしくはメモリー CD8T 細胞より RNA を抽出し、Real-time PCR にて解糖系、脂肪酸酸化、脂肪酸再合成に関わる酵素の mRNA を定量した。グラフは胸腺細胞における各酵素 mRNA 発現量を基準にしたときの相対値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (One-Way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test)。

この成果は、途上国への普及を目的としたニードルフリーの粘膜投与型ワクチン開発の重要性を再認識させるものであり、現在、飢餓刺激及びオートファジー遮断による各メモリー CD8T 細胞サブクラス機能もしくは T 細胞老化への影響等を検討している。

本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Mueller SN, Mackay LK. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2016 Feb;16(2):79-89. doi: 10.1038/nri.2015.3. PMID: 26688350
- 2) Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol.* 2003 Apr;3(4):269-79. doi: 10.1038/nri1052 PMID: 12669018
- 3) Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):728-41. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026. PMID: 22078875
- 4) Pua HH, Guo J, Komatsu M, He YW. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J Immunol.* 2009 Apr 1;182(7):4046-55. doi: 10.4049/jimmunol.0801143. PMID: 19299702
- 5) Xu X, Araki K, Li S, Han JH, Ye L, Tan WG, Konieczny BT, Bruinsma MW, Martinez J, Pearce EL, Green DR, Jones DP, Virgin HW, Ahmed R. Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation. *Nat Immunol.* 2014 Dec;15(12):1152-61. doi: 10.1038/ni.3025. PMID: 25362489
- 6) Ding J, Takamoto DY, von Nahmen A, Lipp MM, Lee KY, Waring AJ, Zasadzinski JA. Effects of lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, and palmitic acid on monolayer stability. *Biophys J.* 2001 May;80(5):2262-72. PMID: 11325728