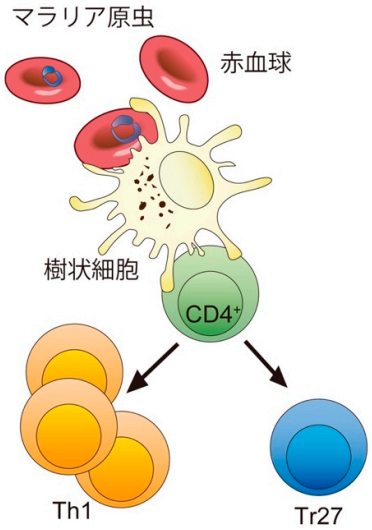
66　IL-27産生CD4⁺T細胞の分化制御機構の解明	由井　克之

【目的】マラリア原虫感染では、制御性サイトカイン IL-27 を産生し免疫応答を制御する T 細胞（Tr27 細胞）が誘導される。この細胞は、マラリア原虫抗原を認識したナイーブ T 細胞が活性化し、一方は Th1 細胞に、もう一方は Tr27 細胞へと分化したものと考えられた。本研究では、マラリア原虫感染マウスから Tr27 細胞と Th1 細胞を分離し、両者の遺伝子発現を網羅的に比較することにより、Tr27 細胞の分化・活性化を特徴付ける遺伝子を抽出することを目的とした。

【方法】マラリア原虫感染マウスから Foxp3^{-}CD11a^{hi}CD49d^{hi}CD4^{+}細胞分画をソーティングにより分離し、シングルセルレベルでサイトカイン遺伝子発現を調べ、IL-27 産生細胞と IFN-γ 産生細胞を分離同定した上で、両細胞の網羅的遺伝子発現を比較することにした。当初シングルセルレベルで IL-27 産生を検出することができなかったため、試験管内で T 細胞を刺激し、その後シングルセル解析を行った。

【結果】TCR 刺激を加えることにより、シングルセルレベルで T 細胞の IL-27 産生を検出することはできた。しかしながら陽性細胞の頻度が十分に高くなかったため、蛍光タンパク発現で IL-27 をモニターできるマウスを用い、解析を行うことにした。今後、このマウスを用いてシングルセル解析に進める予定である。研究を進める中で様々な問題に直面し、予定より時間がかかってしまったが、解決の目処はあり着実に成果につなげていきたい。

マラリア原虫抗原を提示された CD4^{+} T 細胞の Tr27 細胞への分化



66. IL-27 産生 $CD4^+$T 細胞の分化制御機構の解明

由井　克之

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学講座 免疫学分野

Key words：免疫制御，T 細胞，サイトカイン，感染，マラリア

緒　言

1. マラリア感染と免疫抑制

マラリアは、熱帯・亜熱帯地方で毎年 2 億人以上が感染し 50 万人近くが死亡している重要な疾患である。マラリア流行地では、人々は何年にもわたり繰り返し感染を繰り返して自然抵抗性を獲得する。また感染者の免疫応答が抑制され、他の感染症に感染しやすくなることが指摘されている。しかしながら、その機構については十分に理解されていない［1］。私たちは、ネズミマラリア感染実験モデルを用い、マラリア原虫感染に伴う免疫応答の修飾について研究を進めてきた。マウスをマラリア原虫に感染させ、抗 T 細胞受容体（TCR）抗体を用いて T 細胞を刺激すると、非感染マウスに比べて高いインターフェロン-γ（IFN-γ）産生を示す。感染に伴い Th1 タイプ原虫抗原特異的 T 細胞が誘導される結果である。一方インターロイキン-2（IL-2）産生は、マラリア患者で報告されたのと同様［2］、著しく低下していた［3］。IL-2 産生低下の機構を解明する過程で、$Foxp3^-CD11a^{hi}CD49d^{hi}$ $CD4^+$T 細胞分画にマラリア原虫抗原特異的に液性因子を介して IL-2 産生を抑制する細胞の存在が明らかになった。

2. Tr27 細胞の発見

マラリア原虫抗原特異的 $CD4^+$T 細胞は、制御性サイトカイン IL-27 を産生する。このサイトカインは IL-12 ファミリーに属する二量体で、p28 と EBI3 から構成される。遺伝子ノックアウトマウスを用いた実験等から、免疫抑制が IL-27 に依存すること、IL-27 を産生する $CD4^+$T 細胞は IFN-γを産生する Th1 細胞とは異なることが明らかになり、我々はこの細胞を Tr27 細胞（IL-27 を産生する制御性 T 細胞の意）と呼ぶことを提唱した［4］。

IL-27 は、従来から知られているようにマクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞により産生される［5］。しかしながら T 細胞のみ IL-27 産生欠損のマウスを用いた感染実験から、Tr27 細胞が IL-27 依存的にマラリア原虫に対する防御免疫を抑制することを明らかにした。マラリアは、免疫応答が暴走すると宿主（ヒト）を傷害し重篤な疾患に至る。Tr27 細胞は、このような感染に伴う免疫応答の暴走を制御する働きがあると考えられる。

ナイーブ T 細胞がマラリア原虫抗原を認識し活性化する際に、IL-27 を産生する Tr27 細胞と IFN-γを産生する Th1 細胞に分化すると考えた（図 1）。そこで本研究では、マラリア原虫感染マウスから Tr27 細胞と Th1 細胞を分離し、両者の遺伝子発現を比較することにより、Tr27 細胞の分化・活性化を特徴付ける遺伝子を抽出することを目的とした。

方　法

1. マラリア原虫特異的細胞の精製と解析

Tr27 細胞と Th1 細胞は、マラリア原虫感染マウス $CD11a^{hi}CD49d^{hi}$ $CD4^+$T 細胞分画にある。IL-27 と IFN-γの細胞内サイトカイン染色により両者は区別できるが、生きたまま分離することはできない。そこで、シングルセルレベルでサイトカイン遺伝子発現細胞を調べ、IL-27 産生細胞と IFN-γ産生細胞を同定することにした。細胞内サイトカイン染色の結果、IL-27 細胞は $CD4^+$T 細胞の約 2%、IFN-γ産生細胞は約 10%であった。C57BL/6 マウスにマラリア原虫を感染させ、6 日後原虫血症 5～10%の時点でマウス脾細胞を抗体で染色し、磁気ビーズ法により $CD4^+$T 細胞を分離した。さらにセルソーターを用いて $CD11a^{hi}CD49d^{hi}CD4^+$T 細胞をソーティング、シングルセルでプレート上に分離した。必要に応じ、抗 TCR 抗体をコートした培養プレート上で培養し、T 細胞を試験管内で活性化させた。シング

ルセル解析は、早稲田大学の竹山春子教授および細川正人博士との共同研究で行った。

2. IL-27 産生のモニターマウス

研究の過程で、Tr27 細胞の頻度が予想されたより低い可能性が出てきた。この点は、佐賀大学の吉田裕樹教授との共同研究を行った。吉田教授のグループは、IL-27p28 分子の発現を蛍光タンパク EYFP 発現でモニターするマウスを開発しており、このマウスを用い IL-27 発現細胞を高率に集めることにした。

結　果

1. マラリア原虫抗原特異的 $CD4^+$T 細胞の解析

マラリア原虫感染マウスの $CD11a^{hi}CD49d^{hi}$ $CD4^+$T 細胞からシングルセルのライブラリーを作成し、IL-27p28 と IFN-γ の real time PCR を行ったところ、IFN-γ 陽性細胞は確認できたが IL-27 陽性細胞は殆ど検出されなかった。この結果を受け、IL-27 産生の確認には TCR 刺激による T 細胞活性化が必要と考え、マラリア原虫感染マウスから採取した $CD4^+$T 細胞に抗 TCR 抗体やマラリア原虫抗原で刺激を加え、IL-27 産生の条件を検討した。その結果、抗 TCR 抗体で 6 時間程度の刺激が $CD4^+$T 細胞の IL-27p28 mRNA 発現に十分であるとわかった。そこで、マラリア原虫感染マウス $CD4^+$T 細胞をまず抗 TCR 抗体存在下で培養し活性化した後、$CD11a^{hi}CD49d^{hi}CD4^+$T 細胞をソーティングし（図 2）、シングルセルに分離した。この細胞のシングルセルライブラリーを作成し、IL-27p28 と IFN-γ の real time PCR を行った。その結果 IL-27p28 陽性細胞は確認できたが頻度は予想外に低く、遺伝子発現解析に耐える数を確保するためには、IL-27 産生細胞を高効率に集める方法が必要だという結論に至った。

2. IL-27 産生のモニターマウスを用いた解析へ

佐賀大学の吉田裕樹教授のグループは、IL-27p28 発現を蛍光タンパク発現でモニターするマウス（p28-Venus マウス）を開発した。そこで吉田教授との共同研究により、このマウスを用い IL-27 産生細胞を高率よく分離することにした。p28-Venus マウスにマラリア原虫感染を行い、$CD11a^{hi}CD49d^{hi}CD4^+$T 細胞分画を刺激すると、蛍光タンパク発現細胞を見いだすことができた。このストラテジーにより、Tr27 細胞と Th1 細胞をシングルセルで分離することにした。今後、このマウスを用いてシングルセル遺伝子発現解析を行う予定である。

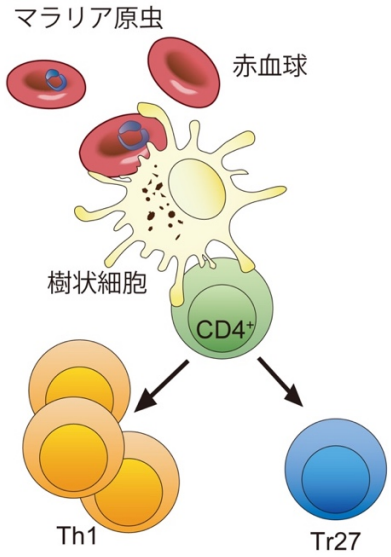


図 1. マラリア原虫抗原を提示された $CD4^+$T 細胞の Tr27 細胞への分化
マラリア原虫抗原特異的$CD4^+$T細胞は、活性化後IFN-γを産生するTh1細胞、IL-27を分泌するTr27細胞に分化する。

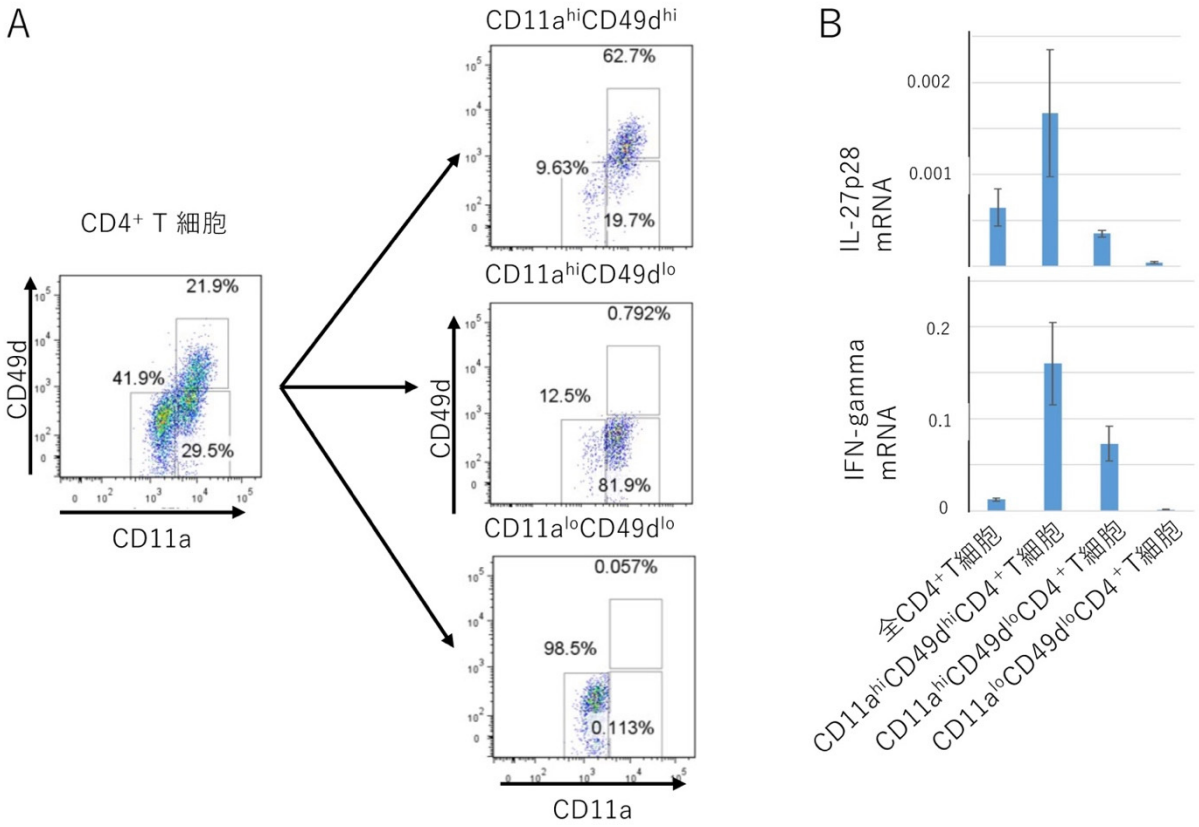


図2. マラリア原虫特異的CD4$^+$T細胞の精製

A. マラリア原虫感染マウス CD4$^+$T 細胞を抗 TCR 抗体で刺激後、CD11a と CD49d を高発現する細胞をソーティングにより分離した。B. ソーティングした細胞の mRNA 発現をアクチン B2 レベルとの比較で解析した。平均値±標準偏差を示す。IL-27p28 mRNA と IFN-γ mRNA 共に CD11a^{hi}CD49d^{hi}CD4$^+$T 細胞に他の分画と比較して有意に高い発現（two-way ANOVA, Bonferroni）が見られた。

考　察

当初の計画は、Tr27 細胞と Th1 細胞の遺伝子発現をシングルセルで比較する予定であったが、様々な問題が生じ時間を要してしまい、現段階でまだ網羅的遺伝子発言解析に至っていない。しかしながら、問題解決の方策はあり、当初の目的に沿って今後とも研究を進める計画である。

共同研究者・謝辞

本研究は、当免疫学分野講師の木村大輔博士（2018 年 4 月より神戸女子大学教授）が中心になって実験等実施した。本研究でシングルセル解析の共同研究者は、早稲田大学大学院先端生命医学センターの竹山春子教授とナノ・ライフ創新研究機構の細川正人博士である。IL-27 とそのモニターマウスに関する共同研究者は、佐賀大学医学部分子生命科学講座生体機能制御学分野の吉田裕樹教授である。この場をお借りして深く感謝の意を表したい。

文　献

1) Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. Nat Immunol. 2008 Jul;9(7):725-32. doi: 10.1038/ni.f.205. Review.PMID:18563083

2) Ho M, Webster HK, Green B, Looareesuwan S, Kongchareon S, White NJ.Defective production of and response to IL-2 in acute human falciparum malaria. J Immunol. 1988 Oct 15;141(8):2755-9.PMID:2971729

3) Doe HT, Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Akbari M, Yui K.Expression of PD-1/LAG-3 and cytokine production by $CD4^+$ T cells during infection with *Plasmodium* parasites. Microbiol Immunol. 2016 Feb;60(2):121-31. doi: 10.1111/1348-0421.12354.PMID:26696540

4) Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Honma K, Hara H, Yoshida H, Yui K.Interleukin-27-producing $CD4^+$ T cells regulate protective immunity during malaria parasite infection, Immunity. 2016 Mar 15;44(3):672-682. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.011. Epub 2016 Mar 8.PMID:26968425

5) Y Yoshida H, Hunter CA.The immunobiology of interleukin-27. Annu Rev Immunol. 2015;33:417-43. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112134. Review.PMID:25861977