

# 免疫記憶T細胞分化の分子機構の解析

研究課題番号 14570276

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))  
研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 徳久剛史

(千葉大学大学院医学研究院教授)

## は し が き

ヒトは、一度抗原に感作されるとその抗原に対して特異的な免疫記憶が成立し、その後の同一抗原による再感作において著しく強い2次免疫応答が誘導される。この免疫記憶の存在がワクチン療法の原動力であり、ヒトの生体防御の根幹をなすといっても過言ではない。すでに、成熟B細胞がメモリーB細胞へ分化する場が脾臓やリンパ節内の胚中心であることが明らかにされてきている。胚中心では、抗原刺激により活性化された成熟B細胞がその抗原レセプター遺伝子において高率に点突然変異をおこして、抗原親和性がより高いB細胞クローンが選択的に増殖してメモリーB細胞へと分化すると考えられている。最近、成熟T細胞も抗原刺激を受けて活性化した後、メモリーT細胞へ分化することが明らかにされてきた。しかし、その分化の分子機構は不明である。

そこで本研究は、成熟T細胞のメモリーT細胞への分化機構を転写因子(BCL6、やBAZF 遺伝子)のレベルで明らかにすることを目的とした。そのため胚工学技術を応用して、これらの遺伝子を欠損させたマウスや高発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、これらのマウスの脾臓やリンパ節におけるメモリーT細胞の分化異常を免疫学的に解析した。その結果、BCL6は、NaiveT細胞からメモリーT細胞への分化において正の機能を担うことを明らかにした。

このような研究成果は、単にメモリーT細胞の長期生存機構の解明ばかりでなくキラーT細胞を応用したがんの免疫療法の改良などの研究につながる点や、その分化機構を改変して免疫記憶の成立をコントロールするシステムを開発することにより、ワクチン療法の新展開やヒトの自己免疫病の治療法への応用へ向けて研究を展開出来る意味からも大変重要である。このような成果をあげることが出来たのも、本研究助成金と本研究に対する文部科学省の多大な援助のおかげであり、ここに感謝の意を表したい。

平成16年3月

研究代表者 徳久 剛史

## 研究組織

研究代表者： 徳久剛史 (千葉大学大学院医学研究院・教授)  
研究分担者： 幡野雅彦 (千葉大学遺伝子実験施設・助教授)  
有馬雅史 (千葉大学大学院医学研究院・助手)  
坂本明美 (千葉大学大学院医学研究院・助手)

## 交付決定額(配分額)

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	2,500	0	2,500
平成15年度	1,500	0	1,500
総計	4,000	0	4,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等 (\*印は本報告書に全文を含む)

1. Seimiya, M., Wada, A., Kawamura, K., Sakamoto, A., Ohkubo, Y., Okada, S., Hatano, M., Tokuhisa, T., Watanabe, T., Saisho, H., Tagawa, M., and O-Wang, J.: Impaired lymphocyte development and function in *Clast5/Stra13/DEC1* transgenic mice. **Eur. J. Immunol.**, In Press, 2004.
2. Kawamura, K., O-Wang, J., Ogawa, R., Bahar, R., Seimiya, M., Chiyo, M., Wada, A., Okada, S., Hatano, M., Tokuhisa, T., Kimura, H., Watanabe, S., Honda, I., Sakiyama, S., and Tagawa, M.: DNA polymerase  $\theta$  is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. **Int. J. Cancer** 109: 9-16, 2004.
3. Honda, K., Arima, M., Cheng, G., Taki, S., Hirata, H., Eda, F., Fukushima, F., Yamaguchi, B., Hatano, M., Tokuhisa, T., and Fukuda, T.: Prostaglandin D2 Reinforces Th2 Type Inflammatory Responses of Airways to Low-dose Antigen through Bronchial Expression of Macrophage-derived Chemokine. **J. Exp. Med.** 198: 533-543, 2003.
4. Okada, S., Obata, S., Hatano, M., and Tokuhisa, T.: Dominant negative effect of the *c-fos* family gene products on inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **Int. Immunol.**, 15: 1275-1282, 2003.
5. Takeda, N., Arima, M., Tsuruoka, N., Okada, S., Hatano, H., Sakamoto, A., Kohno, K., and Tokuhisa, T.: Bcl6 is a transcriptional repressor for the IL-18 gene. **J. Immunol.** 171: 426-431, 2003.
6. Takenaga, M., Hatano, M., Yamashita, Y., Okada, S., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T.: Bcl6-dependent transcriptional repression by BAZF. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 303: 600-608, 2003.
7. Oshitari, T., Okada, S., Tokuhisa, T., Adachi-Usami, E.: Adenovirus-mediated gene transfer of Bcl-xL impedes neurite regeneration *in vitro*. **Neuroreport.** 14: 1159-1162, 2003.
8. Obata, S., Okada, S., Ohkubo, Y., Murasawa, M., Hatano, M., Sekiya, S., and Tokuhisa, T.: Overexpression of the *c-fos* gene perturbs functional maturation of M1 cells into macrophages. **Mol. Immunol.** 39: 585-594, 2003.
9. Sasagawa, K., Matsudo, Y., Kang, M., Fujimura, L., Iitsuka, Y., Okada, S., Ochiai, T., Tokuhisa, T., and Hatano, M.: Identification of Nd1, a novel murine kelch family protein, involved in stabilization of actin filaments. **J. Biol. Chem.** 277: 44140-44146, 2002.

10. Bahar, R., O-Wang, J., Kawamura, K., Seimiya, M., Wang, Y., Hatano, M., Okada, S., Tokuhisa, T., Watanabe, T., and Tagawa, M.: Growth retardation, polyploidy and multinucleation induced by Clast3, a novel cell cycle-regulated protein. **J. Biol. Chem.** 277: 40012-40019, 2002.
11. Yoshida, T., Hanada, T., Tokuhisa, T., Kosai, K., Sata, M., Kohara, M., and Yoshimura, A.: Activation of STAT3 by the Hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. **J. Exp. Med.** 196: 641-653, 2002.
12. Nakagawa, Y., Okada, O., Hatano, M., Ebara, M., Saisho, H., and Tokuhisa, T.: Downregulation of bcl-xL is relevant to UV-induced apoptosis in fibroblasts. **J. Biochem. Mol. Biol.** 35: 452-458, 2002.
13. Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T.: Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. **Immunity** 17: 329-339, 2002.
14. Tada, Y., O-Wang, J., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Kuriyama, T., Okada, S., Tokuhisa, T., Sakiyama, S., and Tagawa, M.: A novel role for Fas ligand in facilitating antigen acquisition by dendritic cells. **J. Immunol.** 169: 2241-2245, 2002.
15. Arima, M., Toyama, H., Ichii, H., Kojima, S., Okada, S., Hatano, M., Cheng, G., Kubo, M., Fukuda, T., and Tokuhisa, T.: A putative silencer element in the *IL-5* gene recognized by Bcl6. **J. Immunol.** 169: 829-836, 2002.
- \*16. Ichii, H., Sakamoto, A., Hatano, M., Okada, S., Toyama, H., Taki, S., Arima, M., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T.: Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8<sup>+</sup> T cells. **Nature Immunol.** 3: 558-563, 2002.
17. Hikita, S., Hatano, M., Inoue, A., Sekita, N., Kobayashi, K., Ohtaki, M., Ogasawara, T., Okada, S., Hirasawa, H., and Tokuhisa, T.: Overexpression of TIAP/m-survivin in thymocytes enhances cell proliferation. **Mol. Immunol.** 39: 289-298, 2002.
18. Oshitari, T., Dezawa, M., Okada, S., Takano, M., Negishi, H., Horie, H., Sawada, H., Tokuhisa, T., and Adachi-Usami, E.: Suppression of c-fos mediates inhibition of cell death and increases neurite regeneration in retinal ganglion cells. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.** 43: 2442-2449, 2002.
19. Sakashita, C., Fukuda, T., Okabe, S., Kobayashi, H., Hirosawa, S., Tokuhisa, T., Miyasaka, N., Miura, O., and Miki, T.: Cloning and characterization of the human BAZF gene, a homologue of the BCL6 oncogene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 291: 567-573, 2002.
20. Kojima, S., Ichikawa, T., Tokuhisa, T., and Ito, H.: Histological analysis of vaginal

opening and spermatogenesis in Bcl6-deficient mice. **Jpn. J. Fertil. Steril.** 47: 39-45, 2002.

21. Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., and Nagai, R.: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. **Nature Med.** 8: 403-409, 2002.
22. Seimiya, M., Bahar, R., Wang, Y., Kawamura, K., Tada, Y., Okada, S., Hatano, M., Tokuhisa, T., Saisho, H., Watanabe, T., Tagawa, M., and O-Wang, J.: Clast5/Stra13 is a negative regulator of B lymphocyte activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 292: 121-127, 2002.
23. Murasawa, M., Okada, S., Obata, S., Hatano, M., Moriya, H., and Tokuhisa, T.: GL7 defines the cycling stage of pre-B cells in murine bone marrow. **Eur. J. Immunol.** 32: 291-298, 2002.

## (2) 口頭発表

1. Takeshi Tokuhisa: 「Role for Bcl6 in the generation and maintenance of memory lymphocytes」第32回日本免疫学会(東京、12月)(2002)
2. 市井啓仁、坂本明美、幡野雅彦、岡田誠治、有馬雅史、黒田嘉和、徳久剛史: 「メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞の生成維持におけるBcl6の機能解析」第32回日本免疫学会(東京、12月)(2002)
3. 大久保雄介、岡田誠治、幡野雅彦、徳久剛史: 「成熟B細胞の増殖、分化におけるc-fos 遺伝子の役割」第32回日本免疫学会(東京、12月)(2002)
4. 大塚雄一郎、有馬雅史、岡田誠治、坂本明美、幡野雅彦、徳久剛史: 「肥満細胞におけるBcl6の機能」第32回日本免疫学会(東京、12月)(2002)
5. 武田伸江、有馬雅史、岡田誠治、幡野雅彦、河野陽一、徳久剛史: 「Bcl6はマクロファージによるIL-18 遺伝子の発現を抑制する」第32回日本免疫学会(東京、12月)(2002)
6. 有馬雅史、大塚雄一郎、市井啓仁、坂本明美、武田伸江、山下公大、岡田誠治、幡野雅彦、徳久剛史: 「Th1細胞におけるTh2型サイトカイン遺伝子発現制御に対するBcl6の機能的役割」第32回日本免疫学会(東京、12月)(2002)
7. Eggi Arguni, Masahiko Hatano, Masafumi Arima and Takeshi Tokuhisa: 「Characterization of the murine Bcl6 gene promoter region」第25回日本分子生物学会(東京、12月)(2002)
8. 井上淳、姜明模、藤村理沙、高森尉之、徳久剛史、幡野雅彦: 「Nd1-Sの発現と機能」

- 第25回日本分子生物学会(東京、12月)(2002)
9. 高森尉之、松戸裕治、藤村理紗、姜 明模、笹川和志、徳久剛史、幡野雅彦:「ドキシロピシンのNd1-L (kelch ファミリー遺伝子)mRNA に及す影響」第25回日本分子生物学会(東京、12月)(2002)
  10. 高森幹雄、竹長真紀、幡野雅彦、栗山喬之、徳久剛史:「転写抑制因子 BAZF の転写抑制は Bcl6 に依存する」第25回日本分子生物学会(東京、12月)(2002)
  11. 鶴岡信栄、岡田誠治、関谷宗英、徳久剛史:「B細胞における体細胞突然変異における Bcl6 の機能解析」第25回日本分子生物学会(東京、12月)(2002)
  12. E Watanabe, H Hirasawa, S Oda, H Shiga, K Nakanishi, T Tokuhisa, M Hatano:「Relation between Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Promoter Polymorphism and Extremely High Interleukin- 6 Blood Level in Japanese Critically Ill Patients」第25回日本分子生物学会(東京、12月)(2002)
  13. L FUJIMURA , Y TAKAMORI , Y MATSUDO , K SASAGAWA , M KANG , T TOKUHISA and M HATANO:「The role for Nd1-L in Doxorubicin-induced cardio toxicity」第25回日本分子生物学会(東京、12月)(2002)
  14. 坂本明美、市井啓仁、有馬雅史、幡野雅彦、徳久剛史:「Role for Bcl6 in the generation and maintenance of antigen specific memory CD8 T cells」第33回日本免疫学会(福岡、12月)(2003)
  15. E Arguni, M Arima, M Hatano, T Tokuhisa:「AP-1 is a major transcription factor for high Bcl-6 expression in germinal center B cells」第33回日本免疫学会(福岡、12月)(2003)
  16. 山下公大、坂本明美、大久保雄介、有馬雅史、幡野雅彦、徳久剛史:「Marginal zone B 細胞分化における c-fos の役割」第33回日本免疫学会(福岡、12月)(2003)
  17. 藤村理紗、王 継揚、前田光輝、大久保雄介、幡野雅彦、渡邊 武、徳久剛史:「CD40L の刺激により発現誘導される新規遺伝子 Clast1 の KO マウスを用いた Bリンパ球における機能解析」第33回日本免疫学会(福岡、12月)(2003)
  18. 王 継揚、清宮美香、和田暁彦、岡田誠治、幡野雅彦、徳久剛史、田川雅敏:「転写因子 Clast5/Stra13 はリンパ球の分化と活性化を抑制する」第33回日本免疫学会(福岡、12月)(2003)
  19. 高森幹雄、幡野雅彦、Tety Hartatik、坂本明美、有馬雅史、徳久剛史:「転写抑制因子 BAZF のナイーブとメモリーT細胞の分化増殖における機能解析」第33回日本免疫学会(福岡、12月)(2003)
  20. 鶴岡信栄、岡田誠治、有馬雅史、坂本明美、幡野雅彦、徳久剛史:「クラススイッチ B細胞の S $\mu$  領域への体細胞突然変異導入における Bcl6 の役割」第33回日本免疫学会

(福岡、12月)(2003)

21. 浅利貞毅、坂本明美、有馬雅史、幡野雅彦、徳久剛史：「トランスジェニックマウスを用いた胚中心形成における Bcl6 の機能の解析」第33回日本免疫学会(福岡、12月)(2003)
22. 佐藤嘉治、北橋正康、徳久剛史、幡野雅彦：「巨大結腸症の原因遺伝子 Ncx の標的遺伝子の解析」第26回日本分子生物学会(神戸、12月)(2003)
23. 西尾妙織、望月俊雄、藤村理紗、長田道夫、小池隆夫、幡野雅彦、徳久剛史：「常染色体優性遺伝性多発性嚢胞腎の原因遺伝子 PKD1 の機能解析」第26回日本分子生物学会(神戸、12月)(2003)

### (3) 出版物

1. 徳久剛史：「記憶リンパ球の分化制御機構」、アレルギー科 13:520-525、(2002)
2. 市井啓仁、坂本明美、徳久剛史：「Bcl6 とメモリーCD8T細胞」、免疫2003 39:116-125、(2002)
3. 徳久剛史：「免疫記憶細胞分化における Bcl6 の機能」、蛋白質核酸酵素 47:2306-2312、(2002)
4. 大久保雄介、徳久剛史：「メモリー B細胞への分化決定要因」、臨床免疫 40: 353-358、(2003)

## 研究成果

成熟ナイーブT細胞が抗原刺激を受けた後に、メモリーT細胞に分化することが、その細胞表面抗原の解析から明らかにされてきた。さらに、メモリーT細胞は、その機能の違いからもナイーブT細胞と区別することができる。すなわちメモリーT細胞はナイーブT細胞と比べて、より弱い抗原刺激でより早く効果細胞へ分化することができ、かつその効果細胞は複数のサイトカインを同時に産生することができる。しかし、メモリーT細胞分化の分子機構は不明である。すでに胚中心由来のヒト Diffuse large cell lymphoma の染色体転座部位 (3q27) から単離されたがん遺伝子である Bcl6 が、胚中心を介した高親和性のメモリーB細胞の分化に必須であることが明らかにされていた。そこで私たちは、Bcl6-KO マウスや Ick-Bcl6 トランスジェニック (Tg) マウスを用いて、メモリーCD8T細胞の分化に関する Bcl6 の機能について免疫学的に解析した。その結果以下のようなことを明らかにした。

### 1) Homeostatic proliferation によるメモリーCD8T細胞の誘導過程における Bcl6 の機能

Bcl6-KO マウスの脾臓中のメモリーCD8T細胞 (CD44+, Ly6C+) の細胞数を経時的に調べたところ、正常コントロールマウスと比べて著しくその数が少ないことを見出した。そこで、Bcl6 遺伝子をT細胞で強発現する Tg (Ick-Bcl6) マウスを作製して、それらのマウスの脾臓におけるメモリーT細胞の割合を解析した。その結果、4週齢までの Ick-Bcl6-Tg マウスの脾臓でのメモリーCD8T細胞の増加パターンは、正常マウスと変わらなかった。しかしそれ以降では、一度増加したメモリーCD8T細胞が減少することなく、そのまま12週齢以降にも高値を持続することが明らかになった。この結果から、Bcl6 は homeostatic proliferation により誘導されるメモリーCD8T細胞の維持機構においても正の機能をしていることが示唆された。

そこで次に Bcl6 の上記に関する機能を確認するために、それぞれのマウス脾臓由来のナイーブ CD8T細胞 (CD44-, Ly6C-) を CFSE ラベルした後放射線照射したマウスに移入して、脾臓における homeostatic proliferation を調べた。その結果、移入1週間後には全ての CD8 T細胞が homeostatic proliferation を起こして、CD44+の CD8T細胞に分化した。Bcl6-KO マウス由来の CD8T細胞もメモリーCD8T細胞に分化したことから、Bcl6 はメモリーCD8T細胞の分化には必須ではないことが明らかになった。しかし、Bcl6-KO マウス由来の CD8T細胞では、移入後2週間で、CD44+の CD8T細胞が著しく減少したのに対して、Ick-Bcl6-Tg マウス由来の CD8T細胞は、移入後5週間をすぎても CD44+の CD8T細胞にとどまっていることが明らかとなった。このことから Bcl6 は、homeostatic proliferation により分化誘導されたメモリーCD8T細胞を長期間にわたり維持し続ける機能があることを明らかにした。

### 2) 抗原刺激による誘導過程における Bcl6 の機能

次に抗原刺激によるメモリーCD8T細胞の誘導における Bcl6 の機能を解析した。骨髄細胞

から誘導した樹状細胞(DC)に OVA ペプチドをパルスした細胞(DC-ova8)や Vaccinia ウィルスに OVA 遺伝子を組み込んだウィルス(VV-ova)を抗原として、Bcl6-KO マウスや Ick-Bcl6-Tg マウスを免疫した。誘導されてくる OVA 特異的メモリーCD8T細胞は、OVA-tetramer と表面抗原型から同定した。抗原刺激後の Bcl6-KO マウスにおいても CD44+で OVA-tetramer+のメモリーCD8T細胞の誘導が見られたことから、Bcl6 は抗原刺激によるメモリーCD8T細胞の誘導には必須でないことが明らかとなった。さらにメモリーCD8T細胞数が、Bcl6 の発現量に比例して増加しており、かつ Ick-Bcl6-Tg マウス由来のメモリーCD8T細胞がもっとも長期間にわたって保たれていた。このことから、Bcl6 が抗原刺激により誘導されるメモリーCD8T細胞の維持機構においても正の機能をしていることが明らかとなった。

上記の研究成果から、Bcl6 がなくてもメモリーCD8T細胞は分化誘導されてくるが、Bcl6 は一度分化したメモリーT細胞をその分化段階で持続させる機能があることが明らかにされた。このように Bcl6 は、リンパ球のメモリー細胞への分化段階のあるステップを維持させるように働いていると考えられた。この様な Bcl6 の機能は、Bcl6 のがん遺伝子としての機能の一部を示しているとも考えられる。そして、Bcl6 の標的遺伝子に関する研究成果は、つぎにメモリーB細胞やメモリーT細胞の分化を改変する研究へと発展する可能性を秘めており、結果としてワクチン療法などの改良が可能となるだろう。また、単にワクチン療法の新展開やヒトのアレルギー疾患の治療法への応用ばかりでなく、自己免疫病の病因の解明やキラーT細胞を応用したがんの免疫療法の改良などへ向けて研究が展開できると考えている。