

令和 3 年 10 月 10 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960081

氏 名 浅田 礼光

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ハンブルク （国名： ドイツ ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
半月体形成性腎炎における T 細胞移動の機序および役割の解明
3. 派遣期間： 平成 31 年 4 月 10 日 ～ 令和 3 年 10 月 9 日（914 日間）
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名： Hamburg-Eppendorf University
部局名： III Department of Medicine
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意
【記載事項】
 - ・ 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等
 - ・ 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

採用者は 2019 年 4 月から 2 年半の間、ドイツのハンブルク-エッペンドルフ大学病院に海外特別研究員として派遣された。当初は 2 年間の派遣予定であったが、2020 年春からドイツ国内でも新型コロナウイルスが蔓延したため、研究の一時停止及び遅延が生じた。特例措置として派遣期間を半年延長して頂き、研究プロジェクトを継続して推進する事が可能になった。

採用者は当初、半月体形成性腎炎における T 細胞遊走の機序を主な研究テーマとする予定であった。この研究プロジェクトに関わる一方で、採用者は独自のアイデアに基づき新しいプロジェクトを開始することになったため、以下には採用者が筆頭著者として推進している新規プロジェクトの進捗状況について記載する。本研究内容は、2021 年秋に開催されたドイツ腎臓学会 (DGfN) とアメリカ腎臓学会 (ASN) Kidney Week 2021 で、ポスター形式で発表した。プロジェクトは現在も継続中であるが、以下に 2 年半の成果を記載する。

我々の体は、細菌、ウイルス、真菌といった様々な病原体に暴露される。病原体が体内に侵入すると、免疫システムにより病原体が排除されるとともに、**免疫記憶**が形成される。この免疫記憶により、病原体が再度体内に侵入した場合、初回に比べ迅速かつ効率的に病原体を排除する事が可能になる。免疫記憶は主に、メモリー B 細胞およびメモリー T 細胞の誘導により形成される。メモリー T 細胞には大きく分けて CD4 陽性メモリー T 細胞、CD8 陽性メモリー T 細胞が存在する。CD8 陽性メモリー T 細胞が感染細胞を効率的に排除する仕組みについては既に多くの報告がある一方で、**CD4 陽性メモリー T 細胞がどのようにして免疫記憶を形成するかについては不明な点が多い**。重要なことに、CD4 陽性メモリー T 細胞は感染防御だけでなく、自己免疫性疾患の増悪にも関わる事が報告されている。そのため、CD4 陽性メモリー T 細胞による炎症制御機構の解明は、感染症だけでなく自己免疫性疾患の病態解明においても重要である。採用者はこの CD4 陽性メモリー T 細胞が免疫記憶に貢献する仕組みの解明を目指している。

CD4 陽性 T 細胞の重要な機能としてサイトカインの産生がある。サイトカインとは主に免疫細胞から分泌される蛋白質であり、細胞間の情報伝達を担うことで炎症を制御している。通常、T 細胞が新しい病原体に反応するには、1) ナイブ T 細胞がリンパ組織で特定のヘルパー T 細胞へと分化し、2) ヘルパー T 細胞が炎症の生じている臓器へと移動し、3) 各種ヘルパー T 細胞が転写因子に応じたサイトカイン mRNA を発現し、4) サイトカイン mRNA をサイトカインタンパク質へと翻訳し分泌する、という過程をへる。メモリー T 細胞はこれらのうち一部のステップを省略することで、迅速な反応を可能にしていると考えられている。採用者はメモリー T 細胞がどのようにして迅速な反応を可能にしているのか調べるために、ヒト腎臓の CD4 陽性メモリー T 細胞の遺伝子発現プロファイルを用いて single cell RNA sequencing (scRNAseq) で解析した。摘出腎の健常部から得られた CD4 陽性 T 細胞には、Naïve T 細胞、Central memory T (Tcm) 細胞、Effector memory T (Tem) 細胞、そして Tissue resident memory T (Trm) 細胞といった subpopulation が認められた。健常部から採取されたにもかかわらず、一部の T 細胞は *IFNG*, *IL17A*, *CSF2* などの炎症性サイトカイン mRNA を発現していた。subpopulation 間での比較を行うと、これらの**サイトカイン mRNA は主に Trm 細胞が発現**していた (Fig1a, b)。しかし、Trm 細胞によるサイトカインタンパクの産生は、PMA+ionomycin (PMAiono) により刺激された時には認められたものの、resting Trm cell では認められなかった (Fig1c)。Trm が発現しているサイトカイン mRNA がサイトカインタンパクへと翻訳されているかどうかを調べるため、polysome profiling を行った。Polysome profiling では、スクロース濃度勾配を有するバッファーを用い超遠心を行うことで、mRNA を非翻訳分画と翻訳分画に区別することが可能である (Fig1d)。非翻訳部と翻訳部を別々に採取し rtPCR を実施すると、非サイトカイン mRNA は翻訳されているものがあるにも関わらず、**サイトカイン mRNA はほとんどが非翻訳分画に存在**していた (Fig1e)。つまり、Trm 細胞はサイトカイン mRNA を発現しているにも関わらず、ほとんどタンパクへと翻訳していないことが明らかになった。さらに、健常腎および病気腎を用いて microarray 解析を実施したところ、サイトカイン応答性の遺伝子は健常腎では上昇しておらず (Fig1f)、腎臓にはサイトカイン mRNA を発現する Trm 細胞が存在するにも関わらず、腎臓ではサイトカインシグナルが生じていないことが確認できた。

Trm 細胞における特異性を調べるため、腎臓の Trm 細胞と非 Trm 細胞を用い enrichment analysis を実施した。Trm 細胞では mRNA 翻訳に関連した pathway が著しく抑制されていた。一方で、Trm 細胞ではストレス関連 pathway が上昇していることが明らかになった (Fig1g)。さらに、Trm 細胞と非 Trm 細胞において、mRNA 翻訳に関わる ribosomal protein gene (RPG) 発現を調べたところ、Trm 細胞では RPG 発現が非常に低くなっていた (Fig1h)。以上から Trm 細胞では mRNA 翻訳機能が抑制されていると考えられた。

Trm の解析をさらに進めるために、マウスにおける Trm 誘導モデルを使用した。*IL17A* を発現した細胞で蛍光タンパク YFP が発現し続ける *Il17a-Cre/Rosa26-flox-stop-flox-YFP* マウス (fate reporter マウス) にブドウ球菌感染症を誘発し、1 週間の感染期間の後に 2 週間の抗菌薬治療を行い、さらに 4 週間以上経過してから腎臓に存在する Trm 細胞を解析した (Fig2a, b)。Fate reporter マウスの YFP 陽性細胞を FACS で回収し scRNAseq で解析すると、ヒトと同様に、主に Trm 細胞でサイトカイン mRNA 発現を認め (Fig2c, d)、一方で RPG 発現は Trm 細胞で低下していた (Fig2e)。また、翻訳開始に関わるタンパク発現の低下も確認された (Fig2f)。Trm 細胞でのサイトカイン *Il17a* mRNA 高発現は rt-PCR でも確認された (Fig2g)。

次に、Trm 細胞が刺激前後でどのように mRNA 翻訳を変化させているか調べることにした。野生型マウスの CD4 陽性 Trm が発現する mRNA を、polysome profiling で翻訳分画と非翻訳分画を別々に回収した上で bulk RNAseq を行い、total RNA における遺伝子発現と比較することで translatome-transcriptome の比較を行った (Fig2h)。Resting Trm と PMAiono で 1 時間刺激した Trm を比較すると、Resting Trm の polysome mRNA はストレス関連 pathway に関連していた (Fig2i)。この解析により、Trm は刺激に伴い一部の mRNA 翻訳効率を著しく増加させ、サイトカイン mRNA もその mRNA 群に含まれていることが明らかになった (Fig2j)。

次に、Trm が発現している mRNA が、メモリー T 細胞にとって重要な機能である「迅速なサイトカインタンパクの産生」に寄与するのかを調べた。Trm および非 Trm に対し、mRNA の転写を阻害する actinomycin D で処理してから PMAiono で刺激したところ、非 Trm ではサイトカイン産生がほとんど認められなかったが、Trm ではサイトカイン産生が認められた。以上から、非 Trm メモリー T 細胞のサイトカイン産生は mRNA 転写に依存しているが、Trm 細胞は非刺激時からサイトカイン mRNA を発現しているため、サイトカイン mRNA をサイトカインタンパクへと翻訳するだけで炎症を引き起こすことが可能であると考えられた (Fig2k)。

Trm がどのようにしてサイトカイン mRNA を保持したまま翻訳を阻止しているのかは興味

以上から、「非活性 CD4 陽性 Trm 細胞は、サイトカイン mRNA を発現しているが、eIF2 α リン酸化により翻訳機能を抑制しておりサイトカインタンパクを産生していない」ことが明らかになった。現在、eIF2 α の変異体 (S51A, S51D) を用い、Trm 細胞における eIF2 α の重要性の解明をさらに進めている。

a

CD4⁺ T cells - Blood

CD4⁺ T cells - Healthy Kidney

Cytokine mRNA - Blood - Healthy Kidney

IL-17A

CSF2

IFNG

Trm

Tcm

Tem

Naive

KLF2

TCF7

SELL

STPR1

CCR7

NAB1

BATF

IL22

NOTCH1

IL21

IL13

PRDM1

IL7R

HIFI1A

RBPJ

AHR

RUNX3

IFNG

CSF2

RORC

EPA51

CD69

IL17A

EBOM5

ZNF683

TBX21

NAB2

IL17F

TNF

b

c

d

e

f

g

h

Fig. 2

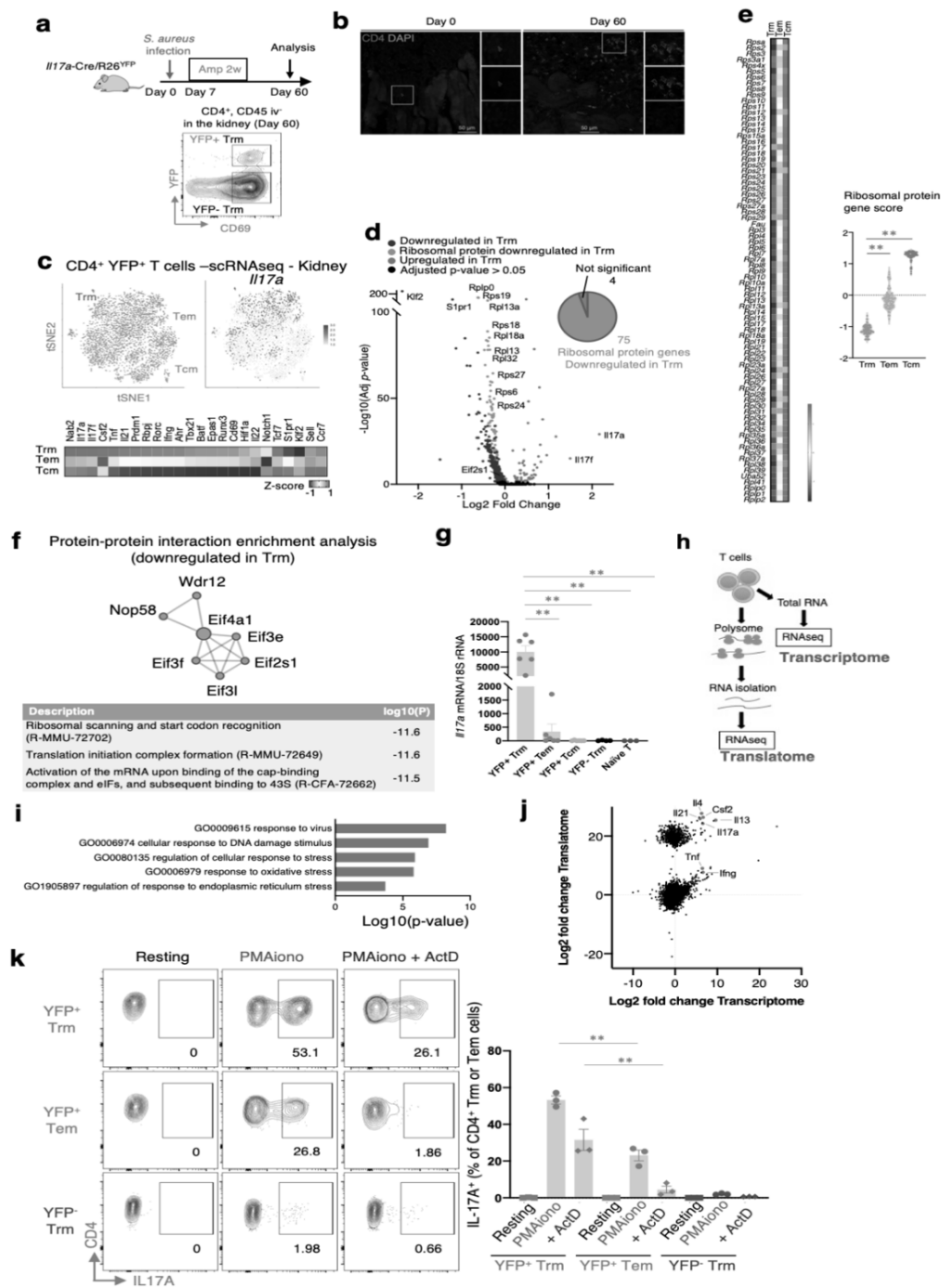


Fig. 3

