

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	ヒトメモリーCD8+T細胞の分化・成熟過程におけるケモカインレセプターの発現とその機能に関する研究
Author(s)	近藤, 孝昭
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11106">http://hdl.handle.net/2298/11106</a>
Right	

学位論文

Doctor's Thesis

ヒトメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟過程における  
ケモカインレセプターの発現とその機能に関する研究

(The functional and phenotypic analyses of chemokine receptor  
expression in human memory CD8<sup>+</sup>T cell differentiation)

近藤孝昭

**Takaaki Kondo**

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻ウイルス制御学

指導教員

滝口雅文 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻ウイルス制御学

2008 年 3 月

# 学位論文

## Doctor's Thesis

論文題名 : ヒトメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟過程における  
ケモカインレセプターの発現とその機能に関する研究  
(The functional and phenotypic analyses of chemokine  
receptor expression in human memory CD8<sup>+</sup>T cell differentiation)

著者名 : 近藤 孝昭

**Takaaki Kondo**

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻ウイルス制御学

滝口 雅文 教授

審査委員名 : 免疫識別学担当教授 西村 泰治

造血発生分野担当教授 小川 峰太郎

細胞病理学分野担当教授 竹屋 元裕

免疫学分野担当教授 阪口 薫雄

2008 年 3 月

## 目次

1. 要旨(和文) .....	3
要旨(英文) .....	5
2. 学位論文の骨格となる参考論文	
2-1 関連論文 .....	7
2-2 その他の論文リスト .....	7
3. 謝辞 .....	8
4. 略語一覧 .....	9
5. 研究背景と目的	
5-1 はじめに.....	11
5-2 メモリー T細胞とは.....	11
5-3 メモリー CD8 <sup>+</sup> T細胞サブセットと機能.....	12
5-4 マウスにおけるエフェクターメモリー およびセントラルメモリー CD8 <sup>+</sup> T細胞の分化経路.....	12
5-5 末梢におけるヒトCD8 <sup>+</sup> T細胞の分化・成熟の概要.....	14
5-6 エフェクター T細胞およびメモリー T細胞とケモカイン.....	15
5-7 本研究の目的.....	17
6. 実験方法	
6-1 血液サンプルと血球分離 .....	19
6-2 抗ヒト単クローン抗体 .....	19
6-3 ペプチド .....	20
6-4 HLA class I ペプチド 4 量体 .....	20
6-5 フローサイトメトリー解析	
6-5-1 健常人末梢血単核球の CD8 <sup>+</sup> T 細胞中における CCR6/CCR4 の発現解析 .....	20
6-5-2 T細胞分化マーカーCD27、CD28、CD45RAを用いたCD8各サブセット中のCCR6/ CCR4 の発現解析.....	21
6-5-3 CD8 <sup>+</sup> T細胞におけるCCR6/ CCR4、CCR7、CCR5の発現解析.....	21

6-5-4	CD27CD28CD45RA 各サブセット における CCR6/ CCR4 および Perforin, GranzymeA, GranzymeB の発現解析	21
6-5-5	ヒト CD8 <sup>+</sup> T 細胞におけるサイトカイン産生細胞の解 析	22
6-6	ヒト CD8 <sup>+</sup> T 細胞の遊走活性の測定	22
<b>7. 実験結果</b>		
7-1	健常人末梢血 CD8 <sup>+</sup> T 細胞中における CCR6 の発現解析	24
7-2	CD8 <sup>+</sup> T 細胞中における CCR6、CCR7、CCR5 の発現解析	26
7-3	CCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T 細胞中におけるエフェクター分子 Perforin / GranzymeA / Granzyme B の発現	27
7-4	CCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T 細胞中におけるサイトカイン産生能の解析	28
7-5	テトラマーを用いたウイルス抗原特異的 CD8 <sup>+</sup> T 細胞中の各サブセット における CCR5、CCR7、CCR6 の発現解析	30
7-6	CCL20(MIP-3 $\alpha$ )に対する CCR6 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T 細胞の遊走能の解析	31
7-7	健常人末梢血 CD8 <sup>+</sup> T 細胞中における CCR4 の発現解析	32
7-8	CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T 細胞中におけるエフェクター分子 Perforin / GranzymeA / Granzyme B の発現	35
7-9	CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T 細胞中におけるサイトカイン産生能の解析	36
7-10	CXCR3 <sup>high</sup> および CXCR3 <sup>low</sup> のメモリー CD8 <sup>+</sup> T 細胞におけるサイト カイン産生能の解析	38
7-11	CXCL9(Mig)に対する CXCR3 <sup>high</sup> および CXCR3 <sup>low</sup> CD8 <sup>+</sup> T 細胞の遊 走能の解析	41
8.	考察	42
9.	結語	49
10.	参考文献	50

## 1. 要旨

**【目的】**CD8<sup>+</sup>T 細胞は抗原刺激を受けて分化および活性化し、サイトカイン産生や細胞傷害活性を示すことによってウイルス感染細胞の除去に重要な役割を担っている。細胞傷害性T細胞(CTL)を効率よく誘導するためにメモリーCD8<sup>+</sup>T 細胞の存在が不可欠であるが、HIV-1 患者はもとより健常人における CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化および活性化に関しては、様々な CD 抗原やケモカインレセプター、エフェクター機能分子によって少しずつ明らかになってきているにも関わらず、分化経路や機能など未だ不明な点が多い。そこで、私はケモカインレセプターCCR6, CCR4, CXCR3 に着目し CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟について詳細な解析を行うと共にそれぞれの分化段階でのメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の機能を明らかにするため本研究をおこなった。

**【方法】**健常人末梢血より末梢血単核球(PBMC)を分離し、末梢 CD8<sup>+</sup>T細胞における CCR6、CCR4 および CXCR3 の発現を解析した。CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化マーカーである CCR7、CCR5、CD27、CD28、CD45RA 抗体を用いてナイーブ、メモリー、エフェクターと呼ばれる機能的集団に分類し、各サブセットにおける CCR6/ CCR4/ CXCR3 の発現をフローサイトメーター(FACS)にて検討した。またエフェクター分子の発現を確認するため Perforin(Per), Granzyme A(GraA), Granzyme B(GraB)およびT細胞分化マーカーに特異的抗体を用いてマルチカラーフローサイトメトリーにて解析を行った。メモリー CD8<sup>+</sup> T細胞におけるサイトカイン産生能の測定は目的の集団をソーティングによって分取し PMA および Ionomycin で刺激後、フローサイトメトリーにて解析した。遊走能の測定では目的の集団をソーティングによって分取し、EZ-TAXIScanにて遊走する細胞を毎分測定した。

**【結果】**健常人末梢血 CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CCR6 の発現は、CCR7<sup>-</sup>CCR5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> の分画において発現が確認され、エフェクター分子の発現は Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup>であった。また、メモリー CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞は IFN- $\gamma$ および TNF- $\alpha$ を共に産生する集団、または IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ を産生する集団が多く含まれていた。CCR4 は CCR7<sup>+/+</sup>CCR5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> の分画において高い発現が認められ、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞のエフェクター分子の発現パターンは Per<sup>-</sup>GraA<sup>-</sup>GraB<sup>-</sup>であった。また、同細胞のサイトカイン産生能は CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞と比べ有意に TNF- $\alpha$ , IL-4 の産生量が高かった。CXCR3 を高発現している細胞(CXCR3<sup>high</sup>)は IFN- $\gamma$ , IL-2を共に産生する集団であり、CXCR3 陽性細胞の遊走能と CXCR3 の発現強度との間には相関関係が認められた。

**【考察】**CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞はエフェクターメモリーサブセットに存在し、CCR6 のリガンドである CCL20 /MIP-3α は腸管に特異的に発現していることから、CCR6 はエフェクターメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞を腸管に遊走し、粘膜免疫において重要な役割を担っている可能性が示唆された。CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞と比べ高いサイトカイン産生能をもち、活性化後に TNF-αや IL-4 を産生し炎症巣において皮膚指向性の 2 型リンパ球を誘導すると考えられた。また、CXCR3<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は IL-2 などのサイトカインにより細胞増殖が誘導され積極的に炎症局所に遊走後 IFN-γなどのサイトカインを産生することによって獲得免疫に寄与していると考えられた。

**【結論】**ケモカインレセプターCCR6, CCR4, CXCR3 の発現分布の解析はヒト末梢 CD8<sup>+</sup>T 細胞の機能的な分類とりわけメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞の分類において有用であると考えられる。これらの知見は依然として不明な点の多いヒト末梢血メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞の分化段階を明らかにする手がかりになると考えられる。

## **1. Summary**

**[Purpose]** CD8<sup>+</sup> T cells play an important role in the eradication of viruses and tumors. Memory CD8<sup>+</sup> T cells are divided roughly into central memory and effector memory subsets, which possess different capacities to home to lymphoid or non-lymphoid tissues, to proliferate in response to antigens or cytokines, and to perform effector functions. The study concerning the differentiation and maturation of human memory CD8<sup>+</sup> T cells is important for vaccine development and analysis of various viral diseases. In the present study, we investigated the expression and function of CCR6, CCR4, and CXCR3 on human CD8<sup>+</sup> T cells and characterized their subsets.

**[Methods]** We analyzed the expression of CCR6, CCR4, or CXCR3 on CD8<sup>+</sup> T cell subsets using mAbs against CD27, CD28, CD45RA, CCR7 or CCR5, and the ability of CD8<sup>+</sup> T cell subsets expressing CCR6, CCR4, or CXCR3 to express effector molecules such as perforin and granzymes A/B. We sorted the CCR6<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup>, or CXCR3<sup>+</sup> subsets and then measured the amount of IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , and IL-4 secreted from these sorted cells after having been stimulated with PMA and ionomycin. We also measured the chemotactic response of CCR6<sup>+</sup>, CCR4<sup>+</sup>, or CXCR3<sup>+</sup> subsets by using a TAXIScan holder.

**[Result]** Multi-color flowcytometric analysis revealed that the CCR6<sup>+</sup> cells were predominantly found in CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> subset and that most CCR6<sup>+</sup> cells in this subset expressed CCR7<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> phenotype and a low level of perforin and granzyme A. CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells produced significantly more IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and less IL-2 than the CCR6<sup>-</sup> subset. CCR4<sup>+</sup> cells were predominantly found in CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> subset and that most CCR4<sup>+</sup> cells in this subset expressed CCR7<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup> phenotype. CCR4<sup>+</sup> memory subset expressed neither perforin, granzyme A nor granzyme B. CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells produced significantly more TNF- $\alpha$  and IL-4 than did the CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells included two functional memory subsets, one possessing the ability to produce IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-4, and the other possessing the ability to produce IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells showed chemotactic activity in response to the ligand of CCR4. We found that human memory CD8<sup>+</sup> T cells included a population expressing a high level of CXCR3 (CXCR3<sup>high</sup>). CXCR3<sup>high</sup> cells were predominantly found in CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> memory phenotype. CXCR3<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T cells had ability to produce both IL-2 and IFN- $\gamma$ . CXCR3<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> T cells had a

greater ability to migrate in response to CXCR3 ligands than did CXCR3<sup>low</sup> ones.

**[Discussion]** These findings indicate that CCR6 is expressed on the effector/memory CD8<sup>+</sup> T cells, and suggesting that CCR6<sup>+</sup> memory CD8<sup>+</sup> T cells migrate to inflammatory sites within the tissues such as colon and then differentiate to effector cells. CCR4 CD8<sup>+</sup> T cells contain more differentiated memory CD8<sup>+</sup> T cells than did CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells, and possess the functional subsets. The present study implied that CCR4<sup>+</sup> memory CD8<sup>+</sup> T cells migrate to inflammatory sites within the tissues such as skin, and play the important role of cutaneous immunity. The high expression of CXCR3 on these memory CD8<sup>+</sup> T cells might play an important role in the migration of these cells to inflammatory sites and in their differentiation.

**[Conclusion]** The expression pattern of CCR6, CCR4, and CXCR3 together with that of other chemokine receptors is useful for functional classification of human memory T cells. The classification of memory CD8<sup>+</sup> T cell subsets using the expression pattern of these chemokine receptors will help to clarify the differentiation and maturation pathway of human memory T cells.

## 2. 学位論文の骨格となる参考論文

### 2-1 関連論文

**Takaaki Kondo**, Hiroshi Takata and Masafumi Takiguchi.

Functional Expression of Chemokine Receptor CCR6 on Human Effector Memory CD8<sup>+</sup> T Cells

*Eur. J. Immunol* 37:54-65, 2007

Naoki Kobayashi\*, **Takaaki Kondo\*** (**\*equally contribution**), Hiroshi Takata, Shumpei Yokota, and Masafumi Takiguchi.

Functional and phenotypic analysis of human memory CD8<sup>+</sup> T cells expressing CXCR3

*J. Leukocyte Biol.* 80: 320-329, 2006

近藤孝昭、滝口雅文

メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞のサブセット

*臨床免疫* 48(2): 215-222, 2007

近藤孝昭、滝口雅文

CD8<sup>+</sup>T細胞の分化段階とケモカイン反応性

*臨床免疫* 47(1): 40-60, 2007

### 2-2 その他の論文リスト

### 3. 謝辞

本研究は熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野にて行われた。本研究にあたり、多大なるご指導・ご支援を賜りましたエイズ学研究センターウイルス制御分野、滝口雅文教授、並びに、阪井恵子特定事業研究員、上野貴将准教授および日本学術振興会特別研究員の高田比呂志氏に感謝いたします。度重なるご助言をくださいました小林直樹特任助教に心から感謝申し上げます。また、ウイルス制御分野修士課程、岡田良、松木郁親、両氏にも感謝申し上げます。

事務的支援を賜りました酒井幸子教務補佐員、浦田桂子技術補佐員、有村由香子技術補佐員に合わせて御礼申し上げます。

最後に、多方面にわたりご協力頂きました熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野教室員の皆様に心から感謝申し上げます。

#### 4. 略語一覽

APC: Allophycocyanin  
Bcl-2: B-cell lymphoma 2  
CCL: CC Chemokine Ligand  
CCR: CC Chemokine Receptor  
CD: Cluster of Differentiation  
CTL: Cytotoxic T Lymphocyte  
CXCL: CXC Chemokine Ligand  
CXCR: CXC Chemokine Receptor  
EBNA: Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen  
EBV: Epstein-Barr Virus  
ELC: Epstein-barr virus-induced molecule 1 Ligand Chemokine  
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter  
FCS: Fetal Bovine Serum  
FITC: Fluorescein Isothiocyanate  
GraA: Granzyme A  
GraB: Granzyme B  
HCMV: Human Cytomegalovirus  
HLA: Human Lymphocyte Antigen  
IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$   
IgG: Immunoglobulin G  
IL-2/-4: Interlokin-2/-4  
IL-7R $\alpha$ : Interlokin-7 receptor  $\alpha$  chain  
IP-10: IFN- $\gamma$  inducible Protein 10  
I-TAC: IFN- $\gamma$  -inducible T cell Chemokine  
LARC: Liver and Activation-Regulated Chemokine  
LCMV: lymphocytic choriomeningitis virus  
mAb: monoclonal Antibody  
MACS: Magnetic Activated-Cell Sorting  
MDC: Macrophage-Derived Chemokine  
MHC: major histocompatibility complex  
Mig: Monokine-induced by IFN- $\gamma$   
Mip-3 $\alpha$ : Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$   
NCS: Newborn Calf Serum  
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

**PBS: Phosphate Buffered Saline**

**PE: Phycoerythrin**

**Per: Perforin**

**SLC: Secondary Lymphoid tissue Chemokine**

**TARC: Thymus and Activation-Regulated Chemokine**

**T<sub>CM</sub>: Central memory CD8<sup>+</sup> T cell**

**T<sub>EM</sub>: Effector memory CD8<sup>+</sup> T cell**

**TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor**

## 5. 研究の背景と目的

### 5-1. はじめに

CD8<sup>+</sup>T細胞は感染細胞除去に非常に重要であり、樹状細胞などの抗原提示細胞上に提示された抗原を認識し活性化し細胞傷害活性を獲得する。細胞傷害性 T 細胞は IFN- $\gamma$ などのサイトカインによってウイルス複製の阻害し、パーフォリンなどのエフェクター分子や Fas リガンドによって標的細胞のアポトーシスを誘導して感染細胞を除去する。初期感染時において細胞傷害性 CD8<sup>+</sup>T細胞は急速に増加し血漿中のウイルス量を減少させる。ウイルス感染には初期感染、二次感染、急性期、慢性期などの様々なステージがあり、それぞれの状態に応じて細胞傷害性 CD8<sup>+</sup>T細胞の分化・成熟段階や機能は変化する[1-3]。ヒトは感染症を発症し治癒した後、同一の感染症にはかかりにくい、もしくはかかっても軽症ですむことが知られている。これは再感染の際に生体内のメモリー T 細胞が速やかに細胞傷害性 CD8<sup>+</sup>T細胞を誘導し強い免疫応答を引き起こすためである。ここ数年のマウスを用いた感染実験によりメモリー CD8<sup>+</sup>T細胞の産生、および維持について多くの発見があった。しかし、ヒトCD8<sup>+</sup>T細胞はマウスと分化・成熟過程が異なると考えられているためメモリー CD8<sup>+</sup>T細胞は依然として不明な点が多い。以上よりヒト末梢 CD8<sup>+</sup>T細胞の分化・成熟過程におけるメモリー CD8<sup>+</sup>T細胞の詳細な解析を行う必要がある。

### 5-2. メモリー T細胞とは

CD8<sup>+</sup>T細胞はウイルス感染細胞や病原体、癌に対する免疫反応において宿主内で非常に重要な役割を果たしている。抗原に感作されていないナイーブ CD8<sup>+</sup>T細胞 (naïve T cell)は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞の主要組織適合抗原クラス I (MHC class I)に提示された外来性の抗原を認識することによって細胞傷害活性や IFN- $\gamma$ や TNF- $\alpha$ などのサイトカインを産生するエフェクター CD8<sup>+</sup>T細胞 (effector T cell)に分化を始める。エフェクター CD8<sup>+</sup>T細胞の寿命は短く、一旦抗原が除去されると増殖した抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T細胞の多くがアポトーシスを起こし死滅する。しかし、これらのエフェクター CD8<sup>+</sup>T細胞の一部がメモリー CD8<sup>+</sup>T細胞として体内に残り、これらの細胞が免疫記憶を担うのである。メモリー CD8<sup>+</sup>T細胞は再度同じ病原体に遭遇した際に、より速やかにかつ効果的に免疫応答が起こる。このメモリー CD8<sup>+</sup>T細胞は抗原が体内から除去された後も体内に恒常的に維持され再感染に備えている。メモリー T細胞の大きな特徴のひとつに「長期生存」があり、ワクチン接種後、長期にわたり免疫反応が誘導されるのはこのためである[4]。

### 5-3. メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞サブセットと機能

広義のメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞は大きく分けて二つの集団に分けられる。リンパ節から体内の炎症局所に遊走するエフェクターメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞(effector memory CD8<sup>+</sup>T cell (以下 T<sub>EM</sub>))とリンパ節や脾臓に再ホーミングするセントラルメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞(central memory CD8<sup>+</sup>T cell (以下 T<sub>CM</sub>))である[5]。T<sub>EM</sub>はナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞に発現が認められるケモカインレセプターであるCCR7の発現が確認されず、CD62リガンド(CD62L)や共刺激分子のひとつであるCD27の発現も低下しており、主に肺や腸管粘膜固有層、肝臓などの非リンパ組織に存在する。一方、T<sub>CM</sub>はCD62L、CCR7、CD27を高発現しており、脾臓やリンパ節などの二次リンパ組織に存在が確認される。T<sub>CM</sub>は*in vitro*で抗原刺激後、すぐには細胞傷害活性などの機能は示さないが、非常に高い増殖能力を有する。これらの機能の違いから、T<sub>EM</sub>は即時に免疫応答する際に重要な役割を担い、T<sub>CM</sub>は再感染が起こり二次免疫応答を誘導する際に重要な役割を担っていると考えられている[6]。

### 5-4. マウスにおけるT<sub>CM</sub>およびT<sub>EM</sub>の分化経路

エフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞およびT<sub>CM</sub>の分化経路およびT<sub>CM</sub>の産生は不明であったが、Wherryらはリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV))の急性感染を引き起こすアームストロング株およびLCMVの糖タンパク由来のGP33-41エピトープを特異的に認識するT細胞レセプターを組み込んだCD8<sup>+</sup>T細胞をもつP14マウスを用いてT<sub>CM</sub>とT<sub>EM</sub>の関係を明らかにした。急性感染後の終息期において、総メモリーCD8<sup>+</sup>T細胞数は維持されたが、時間の経過と共にT<sub>EM</sub>の細胞数が減少し、T<sub>CM</sub>の細胞数が増加した。また彼らはソーティングしたCD62Lの発現が低いT<sub>EM</sub>を野生型のマウスに移入したところ、CD62Lの発現が上昇しT<sub>CM</sub>に分化することも示した[7]。これはマウスにおいて抗原刺激を受けたナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞が細胞傷害活性を持つエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞へと分化し、エフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞からT<sub>EM</sub>そしてT<sub>CM</sub>へと分化するlinear differentiation modelを示唆するものであった(図1)。

KaechらはメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞の時間経過における遺伝子の発現と機能の変化を検討した結果、長期生存するメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞はエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞の一部が徐々に分化し、感染終了後数週間した後にメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞としての特徴的な機能を獲得することを明らかにした[8]。また、KaechらはLCMVおよびP14マウスを用いて、ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞が抗原感作後クローン増殖を行いエフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞に分化した際にIL-7レセプターα鎖(IL-7Rα: CD127)を高発現するエフェクタ

— CD8<sup>+</sup>T細胞がメモリー CD8<sup>+</sup>T細胞の前駆体であることを示している。これらの細胞はメモリー CD8<sup>+</sup>T細胞の生存維持に重要なIL-7刺激を受け取り、抗アポトーシス分子であるBcl-2を高発現することでT<sub>CM</sub>として維持され、IL-7R $\alpha$ の発現が低い細胞は感染後の収縮期において徐々にアポトーシスを起こし消失すると考えられている [9]。

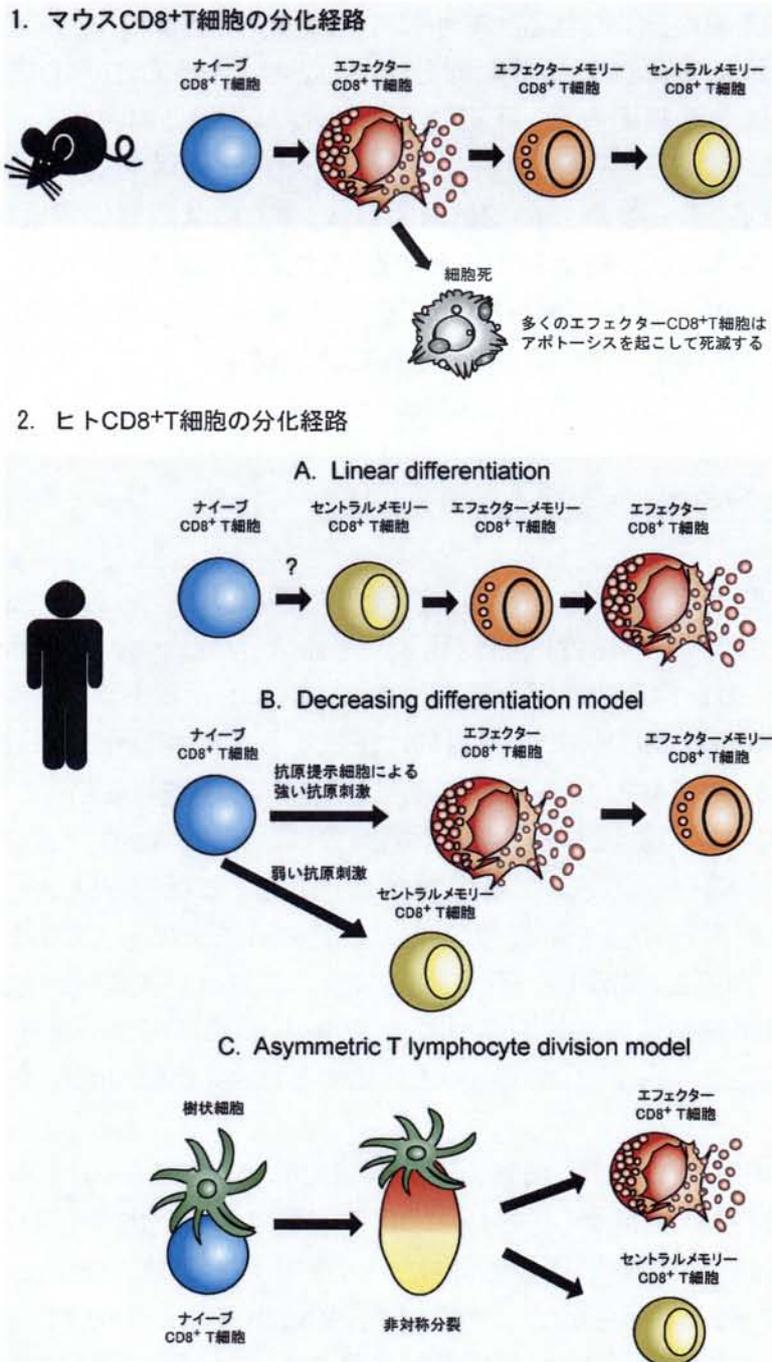


図 1. マウスおよびヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟の概要

## 5-5. 末梢におけるヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟の概要

1997 年に Hamann らがヒト末梢血で細胞表面に発現する分子 CD27、CD28、CD45RA を用いて 3 つの機能的集団に分類した[11]。これらの分画はナイーブ (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>)、メモリー (CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>)、エフェクター (CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) と呼ばれ「メモリー細胞」は非常に高い増殖能を示し、「エフェクター細胞」は *in vivo* で取り出した状態 (*ex vivo*) で標的細胞に強い細胞傷害活性を示す。そして 1999 年に Sallusto らが広義のメモリー細胞を CCR7 の発現によってリンパ節と脾臓に再ホーミングされる T<sub>CM</sub> T細胞 (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) とリンパ節から炎症局所に遊走される T<sub>EM</sub> T細胞 (CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>) に分類した[5]。現在も細胞の表面抗原や、共刺激分子や接着分子などにより新しいヒト T細胞の亜集団を分類する研究が行われている。

近年、様々なヒト末梢 CD8<sup>+</sup>T 細胞分化マーカーやケモカインレセプターが明らかとなり、同時に少しずつ CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟の過程が明らかになってきている。現在、ヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化マーカーとして主に用いられているものに CD45RA、CCR7、CD62L、CD27、CD28 などがあり、これらの分化マーカーによりヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞をナイーブ、T<sub>EM</sub>、T<sub>CM</sub>、エフェクターなどの各集団に分類することが可能になった (表 1)[11]。ヒト T細胞の分化経路には抗原刺激を受けたナイーブ T細胞がメモリー T細胞、エフェクター T細胞へと分化していく linear differentiation model [12] と、強い抗原刺激を受けた細胞がエフェクター T細胞に分化し、弱い抗原刺激を受けた T細胞がメモリー T細胞に分化するという decreasing potential model [13] などが提唱されている (図 1)。また、2007 年の Science に Steaven L. Reiner らが Asymmetric T lymphocyte division model (T 細胞非対称分裂モデル) という、非常に興味深い分化モデルを報告している。彼らは単一の T 細胞が病原体に応答して、初期に非対称細胞分裂を生じ、運命の異なる 2 つの娘細胞 (daughter cell) を生成することを明らかにした。抗原提示細胞 (APC) と免疫シナプスを形成した後、シグナル伝達や非対称細胞分裂の原因となるタンパク質を含む多様なタンパク質が T 細胞内に再構築される。分裂後、APC-T 細胞シナプスに近位の娘細胞はエフェクター細胞となり、これと遠位の姉妹細胞はメモリー細胞へと分化することを示した[14]。また最近、彼らのグループは非対称分裂後エフェクター細胞へ分化する細胞が T細胞の転写因子である T-bet や Blimp-1 を発現し、メモリー T細胞は同じく転写因子である Eomes を発現することを示唆した報告も行っており[15]、ヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化経路を解明する新たな手がかりを示している。

以上のように T細胞の分化経路はいくつかの説が存在するが、マウスを用いた実験系と異なりヒトでは感染実験が出来ないためメモリーやエフェクターの分化経路が明らかにされていない。Appay らはヒト末梢血において共刺激分子と呼ばれる CD27、

CD28、CD45RA やケモカインレセプターの CCR7、Perforin や Granzyme などのエフェクター分子の産生頻度などを詳細に調べた結果、ヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T細胞の分化・成熟経路が inear differentiation model である可能性を示し、ヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T細胞はマウスとは異なった分化経路を取ることを示唆した(図 1)[16]。また、われわれの研究室ではヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T細胞における Perforin (Per)、Granzyme A(GraA)、Granzyme B(GraB)の発現をマルチカラー解析によって解析したところ、CD45RA<sup>-</sup>メモリーサブセット中に Per<sup>-</sup>GraA<sup>-</sup>GraB<sup>-</sup>細胞(T<sub>CM</sub> CD8<sup>+</sup>T細胞)、Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup>細胞(early effector memory CD8<sup>+</sup>T細胞(早期 T<sub>EM</sub>))、Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>+</sup>細胞(late effector memory CD8<sup>+</sup>T細胞(後期 T<sub>EM</sub>))の存在を確認し、これらのエフェクター分子が新たなメモリー CD8<sup>+</sup>T細胞の分化マーカーとなる可能性を示した[17]。

近年のフローサイトメトリーによるマルチカラー解析の発展と高速セルソーティングの実現によって、ナイーブ、T<sub>CM</sub>、T<sub>EM</sub>、エフェクターの各分画に特異的に発現するケモカインレセプターとその発現細胞の役割が明らかになっている。

表1. ヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T細胞の分化・成熟段階において発現する分子

	naïve	central memory	effector memory	effector	機能
CD45RA	+	-	-	+/-	膜透過型脱リン酸化酵素。T細胞レセプターを介したシグナルを制御する。抗原刺激後発現が低下し、代わりにCD45ROが発現する。
CD62L	high	high	low	low	細胞接着分子のセレクトリンファミリー。CD34やGlyCAMと結合し内皮とのローリングを媒介している。
CD27	+	+	+/-	-	TNF受容体ファミリー。CD70をリガンドとし、活性化したリンパ球や樹状細胞との相互作用によって発現する補助刺激分子。CD70との相互作用によって発現が低下する。
CD28	+	+	+/-	-	免疫グロブリンスーパーファミリー分子。抗原提示細胞上のCD80(B7-1)やCD86(B7-2)をリガンドとし、シグナル伝達分子および接着分子として機能する。CD28を介した2次刺激は細胞増殖やIL-2産生に寄与する。
CCR7	+	+	-	-	SLC(CCL19)とELC(CCL21)をリガンドとし、二次リンパ組織への遊走に関与。主にナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、B細胞、成熟胸腺細胞、成熟樹状細胞に発現する。
CCR5	-	-	high	low	MIP-1α(CCL3)、MIP-1β(CCL4)、RANTES(CCL5)などをリガンドとし単球やTh1細胞、活性化CD8 <sup>+</sup> T細胞の遊走や炎症反応に関与する。HIV-1感染の際の共受容体。
CXCR4	high	high	low	low	SDF-1(CXCL12)をリガンドとし造血や血管形成、骨髄への造血幹細胞のホーミングに関与している。また、HIV-1がCD4 <sup>+</sup> T細胞に進入する際に重要な役割を果たす。
Perforin	-	-	low	high	細胞傷害性T細胞やNK細胞により放出される細胞障害性顆粒。標的細胞表面に孔を開けてアポトーシスを誘導するグランザイムの流入を促進する。

## 5-6. エフェクター T細胞およびメモリー T細胞とケモカイン

エフェクター T細胞には CXCR1、CX<sub>3</sub>CR1 が発現し、メモリー T細胞には主に CCR7、CCR5、CXCR3、CXCR4、CCR4、CCR6 が発現している。エフェクター細胞は抗原刺激を受け、T細胞レセプターを介した刺激により活性化され、エフェクター

機能を獲得し、その後アポトーシスを起こし死滅する。一方、メモリー細胞は獲得免疫を象徴する細胞であり、抗原特異的リンパ球の分化・成熟やクローン性増殖に寄与している。メモリー細胞は均一な集団ではなく、CCR7 の発現の有無により大きく2つの集団に分類される。多くの CCR7<sup>+</sup> メモリー細胞は T<sub>CM</sub> と呼ばれ、L-セレクチンを発現しリンパ節に帰属する。一方 CCR7<sup>-</sup> メモリー細胞は T<sub>EM</sub> と呼ばれ L-セレクチンを発現しておらず、脾臓を除き二次リンパ組織に帰属することが出来ない。T<sub>EM</sub> はその名前が示すように抗原の再誘発の際、輸送分子や表面抗原分子の発現が変化し、即時にエフェクター機能を得る。T<sub>CM</sub> は T<sub>EM</sub> に比べ高い自己増殖能力とエフェクター細胞誘導能を持つ。

*in vivo* において抗原投与後メモリー細胞は体内における様々な組織で存在を確認できる。Masopust らは卵白アルブミン発現リステリア菌や水疱性口内炎ウイルス (VSV) 感染マウスにおけるメモリー CD8<sup>+</sup> T細胞を観察したところ、脾臓やリンパ節では細胞傷害活性を示さない T<sub>CM</sub> が認められたが、肺や腸管粘膜固有層などの非リンパ組織には細胞傷害活性を持つ T<sub>EM</sub> が存在していた[18]。これらの組織分布の違いは CCR7 のリガンドである CCL21 の発現が二次リンパ組織で高いことによって説明される。また、病原微生物が再侵入する非リンパ組織に T<sub>EM</sub> が維持されることで速やかに免疫応答が起こると考えられている。

T<sub>CM</sub> と T<sub>EM</sub> の機能的な違いは発現している表面抗原分子の違いにより分類できる。補助刺激分子であり分化マーカーと呼ばれている CD27 と CD28 は主にナイーブ T細胞とメモリー T細胞に発現しており、エフェクター T細胞のような高い細胞傷害活性を持っている細胞では発現されていない。また、様々なケモカインレセプターがヒト CD8<sup>+</sup> T細胞を機能的集団に分類する際に非常に有効であると考えられている。われわれは、炎症性のケモカインである MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTES のレセプターとして知られる CCR5 が、主にメモリー、とりわけ T<sub>EM</sub> で発現が高く、CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> → CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> → CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> の順にメモリーからエフェクターに分化・成熟するに従って発現が低下し、CCR5 が T<sub>EM</sub> の指標になることを明らかにした[11]。さらに好中球遊走、活性化因子として知られている IL-8 のレセプターである CXCR1 が主にエフェクター、T<sub>EM</sub> で発現することも報告している。CXCR1 の発現は、標的細胞の細胞膜を貫通する小孔をあけるエフェクター分子 Perforin と発現の相関性が確認された[19]。一方、CX<sub>3</sub>CR1 は CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+/+</sup> のエフェクター細胞で特異的に発現しており、CX<sub>3</sub>CR1 は膜結合型の CX<sub>3</sub>CL1 と直接、強固な結合を行い、細胞内伝達やインテグリンの活性化をすることなく細胞接着を誘導する機能を持つ[20]。

皮膚や小腸は炎症が無くても組織特異的なケモカインを用いてT細胞を遊走させ免疫系を保っている。皮膚毛細血管の内腔上皮は CCL27 や CCL17 を発現している。皮膚抗原により活性化したエフェクター細胞は CCR4 か CCR10 もしくはその両方を

発現しており、これが皮膚へのホーミングの重要な鍵を握っている[21]。

小腸における組織特異的なケモカインには CCL25 とそのレセプターの CCR9 および CCL20 とそのレセプターの CCR6 がある。ヒト末梢血中における CCR6 の発現は B 細胞や多くのインテグリン  $\alpha 4 \beta 7$  陽性の T<sub>EM</sub>T 細胞や皮膚指向性の cutaneous lymphocyte-associated antigen(CLA)陽性T細胞の一部に発現している[22-23]。

## 5-7. 本研究の目的

私は本研究において、CCR6, CCR4, CXCR3 という3つのケモカインレセプターに着目した。

CCR6 は LARC/MIP-3 $\alpha$ (CCL20)のレセプターであり、CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、未熟樹状細胞、B 細胞で発現が確認されている[24]。その機能としては LARC の発現している腸管や皮膚などの上皮炎症局所に CD4<sup>+</sup>T 細胞や未熟樹状細胞を誘導し、未熟樹状細胞の抗原取り込みに関与していると考えられている[25-26]。また、CD4、CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CCR6 発現細胞は CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD8<sup>+</sup>T 細胞、共に CD45RO<sup>+</sup> の発現が高いことが報告されている。また最近、CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> と CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>の T<sub>CM</sub> の分画で CCR6 の発現が確認されている[22]。しかし、CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR6 発現細胞の詳細な解析は行われていない。

表 2. 本研究に用いたケモカインレセプターおよびその機能

ケモカインレセプター	レセプター発現細胞	リガンド	リガンド産生細胞	機能
CCR4	末梢血Th2メモリー細胞、皮膚指向性T細胞、CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>low</sup> 胸腺細胞	TARC/CCL17	ケラチノサイト、血管内皮細胞、樹状細胞、活性化Th2細胞	細胞遊走シグナルの伝達、ポジティブセレクションを受けた胸腺細胞をネガティブセレクションの行われる胸腺髄質に遊走する
		MDC/CCL22	マクロファージ、樹状細胞、B細胞、胸腺髄質上皮細胞	
CCR5	Th1細胞、T <sub>EM</sub> CD8 <sup>+</sup> T細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞、胸腺細胞など	MIP-1 $\alpha$ /CCL3	CD8 <sup>+</sup> T細胞、マクロファージなど	炎症局所への誘導、単球・Th1細胞の遊走活性および細胞内Ca <sup>2+</sup> の濃度上昇など
		MIP-1 $\beta$ /CCL4	活性化樹状細胞、単球など	
		RANTES/CCL5	T細胞、単球、マクロファージ、好酸球など	
CCR6	T細胞、B細胞、未成熟胸腺細胞	LARC/MIP-3 $\alpha$ /CCL20	腸管組織、表皮ケラチノサイト	LARCの発現している腸管や皮膚などの上皮炎症局所にCD4 <sup>+</sup> T細胞の遊走、および未成熟樹状細胞の抗原取り込みにも関与
CCR7	T細胞、B細胞、成熟胸腺細胞、NK細胞、成熟樹状細胞、中枢神経細胞など	ELC/CCL19	胸腺、リンパ節、脾など	二次リンパ組織への遊走、細胞遊走活性、接着分子LFA-1の活性化、HIVの増殖促進
		SLC/CCL21	胸腺、リンパ節、脾、高内皮性静脈(HEV)など	
CXCR3	単球、T細胞、B細胞	Mig/CXCL9	単球、血管内皮細胞など	炎症局所への誘導、単球・Th1細胞の遊走活性
		IP-10/CXCL10	単球、血管内皮細胞など	
		I-TAC/CXCL11	マクロファージ、血管内皮細胞	

CCR4 は thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17)および

macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22)をリガンドにもつ。IL-4, IL-5 を産生する Th2 タイプのメモリー CD4<sup>+</sup> T 細胞に選択的に発現しており IFN- $\gamma$ を産生する Th1 細胞にはほとんど発現していない[27]。末梢組織での TARC の主な発現細胞は樹状細胞である。また喘息患者の気道上皮細胞やアトピー性皮膚炎の表皮ケラチノサイト、皮膚炎症巣の微小血管内皮細胞などで発現が報告されている。MDC は樹状細胞、マクロファージ、表皮ケラチノサイトなどでの発現が報告されている[28-29]。また、ほとんどの皮膚指向性メモリー CD4<sup>+</sup>T細胞は CCR4 陽性であり、さらにリガンドである TARC は炎症皮膚の微小血管内皮細胞で産生されることから CCR4-CCL17/TARC系は皮膚指向性メモリー CD4<sup>+</sup>T細胞が血流から皮膚組織に移行するために重要な働きをしていると考えられているが、CD8<sup>+</sup>T細胞における CCR4 発現細胞は非常に少ない頻度ということもあり詳細な解析が行われていない[30]。

CXCR3 は CXCL9/monokine induced by IFN- $\gamma$  (Mig)、CXCL10/IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10) および CXCL11/IFN- $\gamma$ -inducible T cell chemokine (I-TAC) のレセプターであり、同レセプターは一部の B 細胞および T 細胞において発現が認められている。発現細胞は各ケモカインに対して遊走反応を示すことが報告されている [31-37]。また、CD4<sup>+</sup> T細胞上および CD8<sup>+</sup> T細胞上の CXCR3 の発現は活性化することで増強されることも報告されている[38]。ヒト CD4<sup>+</sup> T細胞における CXCR3 の発現に関する研究では、0 型ヘルパー T 細胞 (Th0) および 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) において高い発現が、また、一部の 2 型ヘルパー T 細胞(Th2)において低い発現が認められると報告されているが[39]、ヒト CD8<sup>+</sup> T細胞中の CXCR3 を発現している細胞集団に関しては詳細に研究されていない。

そこで、ヒト末梢 CD8<sup>+</sup> T 細胞の分化・成熟段階における CCR6, CCR4, CXCR3 の発現について解析し各細胞集団の表現型および機能的特徴を明らかにすることを試みた。このようにヒト末梢血中のメモリー CD8<sup>+</sup> T細胞の分化・成熟過程を詳細に解析し不均一な集団であるメモリー CD8<sup>+</sup> T細胞集団を一つ一つ明らかにすることで、難治性の感染症における効果的なワクチンの誘導、新たな免疫療法の開発などの臨床医療に貢献できると考えている。

## **6. 実験方法**

### **6-1. 血液サンプルと血球分離 (blood samples)**

本研究で用いた血液サンプルは全て、熊本大学大学院医学薬学研究部等倫理委員会承認の研究計画に基づき、インフォームドコンセントの得られた成人健常人から採取した。採取した末梢血は Ficoll (Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare Bio-Science, Piscataway, USA)を用いた比重遠心法により末梢血単核球(PBMC)に分離した。さらにヒト CD8<sup>+</sup> T 細胞を得るために PBMC を抗 CD8 抗体磁気マイクロビーズ(MACS CD8 Microbeads; Militenyi Biotec, Germany)で標識し、autoMACS (Militenyi Biotec)にてソーティングを行った。分離した CD8<sup>+</sup> T 細胞の純度はいずれも 98%以上であった。

### **6-2. 抗ヒト単クローン抗体(anti-human mAb(monoclonal antibodies))**

anti-CD8 PerCP labeled mAb, anti-CCR6 Alexa Fluor®647, anti-CCR4 Alexa Fluor®647, anti-CCR4 PE labeled mAb, anti-CD28 FITC labeled mAb, anti-CD27 APC-Cy7 labeled mAb, anti-CCR5 FITC labeled mAb, anti-CCR7 PE-Cy7 labeled mAb, anti-integrin  $\beta$ 7 chain PE labeled mAb, anti-mouse-IgG FITC and PE-Cy7 labeled mAb, anti-CD45 AlexaFluor®405 labeled mAb は BD Biosciences(San Diego, CA)から購入した。anti-CD45RA ECD labeled mAb, anti-CD28 ECD labeled mAb は Immunotech (Marseille , France)から購入した。anti-CD3 FITC labeled mAb, anti-CXCR3 PE labeled PE mAb は DakoCytomation (Glostrup, Denmark)から購入した。anti-mouse-IgG PE and APC labeled mAb は eBioscience(San Diego, CA)から購入した。Anti-CD8 Cascade Blue labeled mAb, anti-CD8 Cascade yellow labeled mAb はハイブリドーマ OKT8 接種ヌードマウス腹水から抗体を affinity chromatograophy によって精製し、蛍光色素 Cascade Blue、Cascade yellow (Molecular Probes,Eugene, OR) を標識した。標識抗体はいずれもゲル濾過カラム(Pierce Biotechnology, Inc; IL)によって精製後実験に用いた。

### 6-3. ペプチド(peptide)

HLA class I EBV および HCMV テトラマーを作製するため、HLA-A\*1101 拘束性 EBV CTL epitope peptide (EBNA3B 416-424 : IVTDFSVIK) [40] および HLA-A\*2402 拘束性 EBV CTL epitope peptide (BRLF1 198-206 : TYPVLEEMF) [41]、HLA-A\*0201 拘束性 HCMV CTL epitope peptide (pp65 495-503 : NLVPMVATV) [42]を用いた。

### 6-4. HLA class I ペプチド 4 量体(HLA class I EBV peptide tetramers)

テトラマーは過去に報告のあった方法で作製を行った[43]。組み替え HLA class I タンパク(HLA-A\*0201、HLA-A\*1101、HLA-A\*2402)と $\beta_2$  ミクログロブリンを該当するプラスミドを導入した大腸菌で生産させた。HLA class I の H チェーンはそれぞれ、膜貫通細胞内末端を欠損させ、C 末端に BirA のビオチン化部位を含むシーケンスを付加した。EBV CTL epitope (EBNA3B 416-424 : IVTDFSVIK および BRLF1 198-206 : TYPVLEEMF)または HCMV CTL epitope peptide (pp65 495-503 : NLVPMVATV)と HLA class I 分子を用いてリホールディングを行った。形成された 45kD の HLA class I ペプチド複合体は、Superdex G75 column(Amersham Pharmacia Biotech)にて精製した。精製された HLA class I ペプチド複合体(モノマー)を分子比 4:1 で PE 標識 streptavidin (Molecular Probes)で反応させてテトラマーを作製した。

### 6-5. フローサイトメトリー解析 (Flow cytometric analysis)

#### 6-5-1. 健常人末梢血単核球の CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR6/ CCR4 /CXCR3 の発現解析

健常人末梢血単核球 (PBMC) を PBS (Phosphate buffered saline) に 10%NCS(newborn calf serum)を添加し作製した buffer(10%NCS/PBS)に懸濁した。その後、anti-CCR6/ CCR4 mAb を添加し 30 分常温にて反応させた。反応後、10%NCS/PBS で 1 回洗浄し、再び buffer(10%NCS/PBS)に懸濁した後 anti-CD3、CD8 mAb を加え 30 分 4°Cにて反応させた。反応後 10%NCS/PBS で 2 回洗浄し、フローサイトメーター FACS Calibur™(BD Biosciences)と Flow Jo software (Tree Star, San Carlos,CA)にて CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR6/ CCR4 の発現を解

析した。

#### **6-5-2. T 細胞分化マーカーCD27、CD28、CD45RA を用いた CD8 各 subset 中の CCR6/ CCR4/ CXCR3 の発現解析**

健常人 PBMC を 10%NCS/PBS に懸濁した後、anti- CCR6/ CCR4 /CXCR3 を添加し 30 分常温にて反応させた。反応後、10%NCS/PBS で 1 回洗浄し、再び buffer (10%NCS/PBS) に懸濁した後 anti- CD8、CD27、CD28、CD45RA mAb を加え 30 分 4°Cにて反応させた。反応後 10%NCS/PBS で 2 回洗浄し、フローサイトメーター BD LSR II™(BD Biosciences)と Flow Jo software (Tree Star, San Carlos,CA)にて CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CD27CD28CD45RA subset における CCR6/ CCR4/ CXCR3 の発現を解析した。

#### **6-5-3. CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR6/ CCR4、CCR7、CCR5 の発現解析**

健常人 PBMC を 10%NCS/PBS に懸濁した後、anti-CCR5、CCR7、CCR6mAb を添加し 30 分常温にて反応させた。反応後、10%NCS/PBS で 1 回洗浄し、再び buffer(10%NCS/PBS)に懸濁した後 anti-CD8 mAb を加え 30 分 4°Cにて反応させた。反応後 10%NCS/PBS で 2 回洗浄し、フローサイトメーター FACS Calibur™(BD Biosciences)と Cell Quest software(BD Biosciences)および Paint-A-Gate PRO™(BD Biosciences)にて CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR6/ CCR4 /CXCR3、CCR7、CCR5 の発現パターンの解析を行った。CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CD27CD28CD45RA、各 subset における CCR6/ CCR4、CCR7、CCR5 の発現解析でも同様に健常人 PBMC を anti- CCR5、CCR7、CCR6/ CCR4 mAb 染色後 anti-CD8、CD27、CD28、CD45RA mAb を加えて反応させた。反応後フローサイトメーター BD FACS Aria™(BD Biosciences)と Flow Jo software (Tree Star, San Carlos,CA)にて CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CD27CD28CD45RA subset における CCR6/ CCR4、CCR7、CCR5 の発現パターンの解析を行った。

#### **6-5-4. CD27CD28CD45RA 各 subset における CCR6/ CCR4 /CCR7 および Perforin, GranzymeA, GranzymeB の発現解析**

健常人 PBMC を anti- CD8、CD27、CD28、CD45RA、anti-CCR6、anti-CCR4、anti-CCR7 mAb を用いて染色後、エフェクター分子の発現を解析するため、4%

paraformaldehyde /PBS にて 4°C20 分で固定し 0.1% Saponin /20% NCS /PBS (Permabilizing Buffer) にて細胞膜透過処理を 4°C20 分を行った。その後細胞を anti-Perforin, anti-GranzymeA, anti-GranzymeB mAbs で 4°C30 分染色を行い、染色後 Permabilizing Buffer にて 3 回洗浄した。染色後フローサイトメーター BD FACS Aria™(BD Biosciences)と Flow Jo software (Tree Star, San Carlos,CA)にて解析を行った。

#### 6-5-5. ヒト CD8<sup>+</sup> T 細胞におけるサイトカイン産生細胞の解析

CCR6/ CCR4 /CXCR3 を発現するヒト CD8<sup>+</sup> T 細胞のサイトカイン産生能を検討するため Auto-MACS および BD FACS Aria™(BD Biosciences)にて目的の subset をソーティングした CD8<sup>+</sup> T 細胞を PMA(10ng/mL)および Ionomycin(1μg/mL)を含む 10% FCS/ RPMI-1640 培地(R10 medium)に懸濁後、96well F プレートを用いて 6 時間刺激を加えた。刺激開始から 2 時間後に各 well に最終濃度 10mg/mL となるように Brefeldin A (SIGMA)を添加した。刺激終了後細胞を回収し、固定、細胞膜透過処理を行った後、anti-IFN-γ, anti-IL-2, anti-TNF-α, anti-IL-4 mAbs を用いて染色を行った。染色後フローサイトメーター BD FACS Aria™(BD Biosciences)と Flow Jo software (Tree Star, San Carlos,CA)にて解析を行った。

#### 6-6. ヒト CD8<sup>+</sup> T 細胞の遊走活性の測定

CD8<sup>+</sup> T 細胞の遊走能の測定は EZ-TAXIScan (Effector Cell Insitute; Tokyo, Japan)を用いて測定した[44]。TAXIScan はチャンネル下面のガラス上を水平方向に移動する細胞を顕微鏡により観察する。

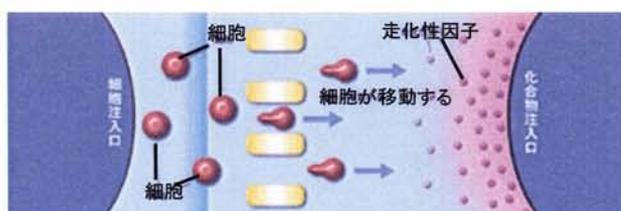


図2. EZ-TAXIScan における遊走能試験の概要

チャンネルの一方に細胞を一系列に整列させ、もう一方に走化性因子を注入することにより、細胞を遊走させる(図 2)。この技術により従来のボイデンチャンバー法の 1/500 ~ 1/1000 程度の細胞で走化性を測定することが可能になり、希少な細胞の測定が容易になった。本研究では 20mM HEPES 0.5% BSA / RPMI medium に 100μg/mL MIP-3β, 50μg/mL TARC, 50μg/mL MDC, 100μg/mL Mig または 100μg/mL SDF-1 (Peprotech House; London, England)をケモアトラクタントとして用いた。測定用の細胞は BD FACS Aria™(BD Biosciences)にて目的の subset をソーティングし R10

に懸濁後、 $1.0 \times 10^4$ /well となるように重層した。37°C 180 分測定後、毎分ごとの遊走細胞の数を TAXIScan Analyzer (Effector Cell Institute; Tokyo, Japan)を用いて解析した。

## 7. 実験結果

### 7-1. 健康人末梢血 CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR6 の発現解析

健康人の樹状細胞や CD4<sup>+</sup>T 細胞における CCR6 の発現は既に報告されているが CD8<sup>+</sup>T 細胞における発現は詳細な解析が行われていない。そこで最初に我々は CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR6 の発現解析を行った(図 3)。

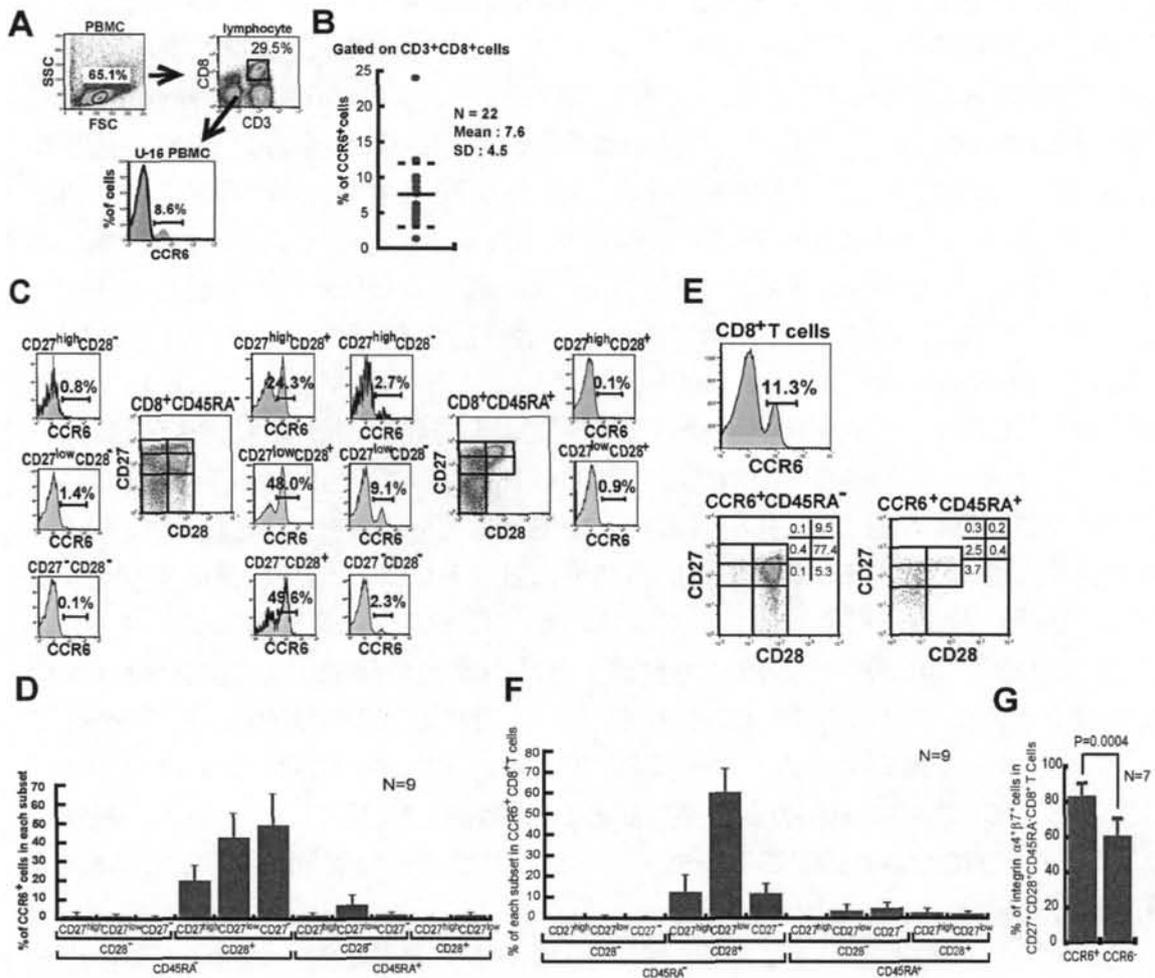


図 3 ヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR6 の発現解析

(A) 健康人 PBMC (U-16)を抗 CCR6, CD8, CD3 抗体で染色し CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CCR6 発現を示した。(B) 22 人の健康人の CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CCR6 発現細胞の割合をグラフに示した。平均および標準偏差は図中に示した。(C) 健康人 PBMC を抗 CD27, CD28, CD45RA, CD8, CCR6 抗体で染色し CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CD27/CD28/CD45RA 各サブセットにおける CCR6 の発現を解析した。(D) 9 人の健康人から得られた CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CD27/CD28/CD45RA 各サブセットにおける CCR6 の発現頻度の平均値および標準偏差を示した。(E) 健康人における CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CD27/CD28/CD45RA 各サブセットの頻度を解析した。(F) 9 人の健康人から得られた CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CD27/CD28/CD45RA 各サブセットの頻度の平均値および標準偏差を示した。(G) 7 人の健康人 PBMC 中の CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> サブセット中におけるインテグリンα4β7 の平均と標準偏差を示した。

健常人 PBMC を抗 CD3、CD8、CCR6 抗体にて染色し、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR6 陽性細胞をフローサイトメーターにて解析した(図 3A)。22 人の健常人 PBMC で同様の解析を行ったところ、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中において平均 7.6% CCR6 陽性細胞が確認された(図 3B)。しかし、SD が 4.5 と CCR6 の発現に個人差が認められ(1.5-24.0%)ごく限られた集団での発現が確認された。これらの結果より CCR6 は健常人 CD8<sup>+</sup>T 細胞において限られた集団に発現しており、特定の CD8<sup>+</sup>T 細胞のサブセットに CCR6 陽性細胞が存在することが示唆された。

最近の研究によりヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟段階は表面抗原 CD27、CD28、CD45RA の発現によってナイーブ(CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>)、メモリー(CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>)、メモリーエフェクター(CD27<sup>low</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>)、エフェクター(CD27<sup>low</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>-/+</sup>)に分類できることが報告されている[11, 45]。そこで我々は CCR6 が CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟過程においてどのようなサブセットに発現しているのか検討するため、CD27、CD28、CD45RA 各サブセットにおける CCR6 陽性細胞の解析を行った(図 3C)。各分画における CCR6 は非常に限局された分画(CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>)で発現しており、CD27<sup>low/-</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> の分画での発現が最も高く(約 50%)、次いで CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> で高い発現(24.3%)が確認された。また、T<sub>EM</sub>(CD27<sup>low</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>)分画でわずかに CCR6 の発現が確認された(9.1%)。そのほかのナイーブ T 細胞(CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>)やエフェクター T 細胞(CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>-/+</sup>)分画において CCR6<sup>+</sup>細胞がほとんど検出されなかった。同様の解析を 9 人の健常人 PBMC にて行い各集団における CCR6 の発現量の平均値をグラフで示した(図 3D)。CCR6 が CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> および CD27<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットで発現する傾向は他の健常人でも確認された。続いて我々は逆に CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞における CD27CD28CD45RA の発現を解析したところ、65%および 20%の CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞が CD27<sup>low</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> および CD27<sup>high/-</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> の発現系であることを確認した(図 3E, F)。以上の結果より CD8<sup>+</sup>T 細胞において CCR6 はメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞に特異的に発現していると考えられた。

インテグリン $\alpha 4\beta 7$  はパイエル板、腸間膜リンパ節の高内皮性小静脈(HEV)、腸管粘膜固有層の細静脈に発現している MAdCAM-1 との相互作用によって、リンパ球のローリングと接着を媒介し腸管特異的なホーミングレセプターとして機能を果たしている。そこで私は CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR6<sup>+</sup> および CCR6<sup>-</sup> サブセット中のインテグリン $\alpha 4\beta 7$  の発現を解析した。7 人の健常人から得られた結果をまとめ(図 3G)に示す。CCR6<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は CCR6<sup>-</sup> サブセットよりもインテグリン $\alpha 4\beta 7$  の発現が有意に高く(平均 $\pm$ 標準偏差; CCR6<sup>+</sup>細胞 83.1 $\pm$ 7.3%, CCR6<sup>-</sup>細胞 60.4 $\pm$ 9.7%, P=0.0004)、メモリー CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞

は腸管組織に特異的に遊走することが示唆された。

## 7-2. CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR6、CCR7、CCR5 の発現解析

CCR7 はリンパ球を二次リンパ組織にホーミングする際に重要な役割を担っているケモカインレセプターである。また、ナイーブ CD8<sup>+</sup>T 細胞、メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞に発現していることが報告されている[5]。また、CCR5 は主に T<sub>EM</sub> やエフェクター CD8<sup>+</sup>T 細胞に発現している[11]。よって、私は CCR6 の発現が CCR7、CCR5 の発現と相関することを予想し、CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR6、CCR7、CCR5 の発現解析を行った。健康人 PBMC を抗 CCR5、CCR7、CCR6、CD8 抗体で染色し CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR6、CCR7、CCR5 の発現パターンの解析を行った。

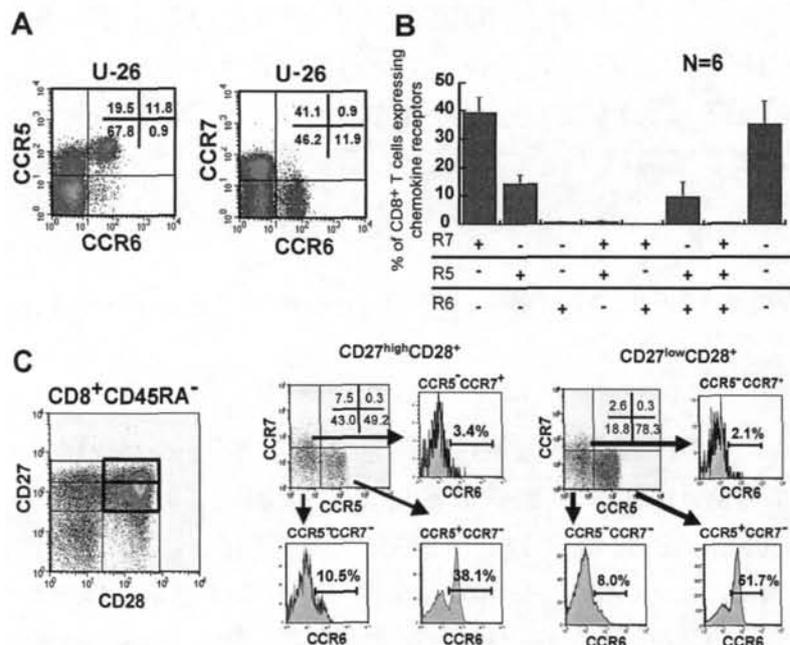


図4. CD8<sup>+</sup>T細胞の各サブセットにおける CCR5、CCR7、CCR6 の発現解析

(A)健康人 U-26 の PBMC を抗 CD8、CCR5、CCR7、CCR6 抗体で染色し、CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR5 または CCR7 と CCR6 の発現を解析した。％は CD8<sup>+</sup>T 細胞中における各サブセットの割合を示している。(B) CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR5 / CCR7 / CCR6 それぞれのサブセットの％をグラフに示した。6 人の健康人から得られた結果の平均値と標準偏差を示した。(C) 健康人 PBMC を抗 CD8、CD27、CD28、CD45RA、CCR5、CCR7、CCR6 抗体で染色し FACS にて解析を行った。CD8<sup>+</sup>T 細胞を CD27、CD28、

CD45RA で各サブセットに分けた後、CCR6 の発現が高い CD27<sup>high</sup> / low CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> の各サブセットを CCR5 / CCR7 で展開し、各 CCR5 / CCR7 サブセットにおける CCR6 の発現をヒストグラムで表した。Dot-plot における数字は CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR7 / CCR5 それぞれのサブセットの割合を示している。また、ヒストグラムにおける数字は各 CCR5 / CCR7 サブセットにおける CCR6 陽性細胞の割合を示している。ネガティブコントロールとして mouse IgG 抗体を用いた。

CCR6<sup>+</sup>T 細胞の 90%が高いレベルで CCR5 を発現しているが、CCR6<sup>+</sup>T 細胞は CCR5 を発現していない細胞群であった(図 4A)。また、CCR7 と CCR6 の発現パターンでは CCR6<sup>+</sup>T 細胞は CCR7 を発現しておらず、CCR6<sup>+</sup>T 細胞にのみ CCR7 が発現していることが確認された(図 4A)。同様の結果が 6 人の健康人で確認されたことから、CCR6<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>T 細胞は T<sub>EM</sub> であり、CCR6<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>T 細胞がナイーブ

CD8<sup>+</sup>T 細胞および T<sub>CM</sub> であることが示唆された(図 4B)。

これまでの結果より CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の分画の中に二次免疫応答に重要な CCR6<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>である T<sub>CM</sub> と分化・成熟の進んだ CCR6<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>である T<sub>EM</sub> が混在していることが示唆された。そこで私は CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の分画をより詳細に解析するため、健康人 PBMC を抗 CCR5、CCR7、CCR6、CD8、CD27、CD28、CD45RA 抗体で染色し CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR5、CCR7、CCR6 の発現パターンを解析した(図 4C)。まず、CCR6 の発現の高い CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> の分画を CD27 の発現により high / low の 2 つの分画に分け、さらにそれぞれを CCR7 と CCR5 で展開した後、それぞれのサブセットにおける CCR6 の発現量を比較した。CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の分画は CCR5、CCR7 によって CCR5<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>、CCR5<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>、CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> の 3 つの分画に分けられた。また CCR6 の発現量は CCR5<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> → CCR5<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> → CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> の順に増加した。同様の結果が 7 人の健康人によって確認された。以上の結果より CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は CCR7<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> の表現系であることが示された。また、T<sub>EM</sub> で発現の高い CCR5 を高頻度に発現し、T<sub>CM</sub> で特異的に発現する CCR7 を発現していないことから CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は T<sub>EM</sub> であることが示唆された。

### 7-3. CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中におけるエフェクター分子 Perforin / Granzyme A / Granzyme B の発現

Perforin および Granzyme A / B は標的細胞に小孔をつくりアポトーシスを誘導する細胞傷害性因子のひとつであり、CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟においてエフェクター機能の指標として用いられている。最近、我々の研究室ではヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T 細胞における Perforin(Per)、Granzyme A(GraA)、Granzyme B(GraB)の発現をマルチカラー解析によって解析したところ、CD45RA<sup>-</sup> メモリーサブセット中に Per<sup>-</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup> 細胞 (T<sub>CM</sub>)、Per<sup>-/low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup> 細胞 (早期 T<sub>EM</sub>)、Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>+</sup> 細胞 (後期 T<sub>EM</sub>) の存在を確認し、これらのエフェクター分子が新たなメモリーサブセットの分化マーカーとなる可能性を示した[17]。

そこで私は CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の CCR6<sup>+</sup> および CCR6<sup>-</sup> サブセットにおける Perforin および Granzyme A / B の発現解析を行った。CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットにおいて、85.1% の CCR6<sup>+</sup> サブセットが Perforin の発現量が低く Granzyme A を発現し Granzyme B を発現しない集団であったのに対して CCR6<sup>-</sup> サブセットでは同様の集団は 30.9% しか確認されなかった(図 5)。CD27<sup>low</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットにおいても同様の結果が得られた。また、

同様の結果が 3 人の健常人において確認された。以上の結果より CCR6<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞は Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup>細胞集団であり早期 T<sub>EM</sub>であることが示唆された。

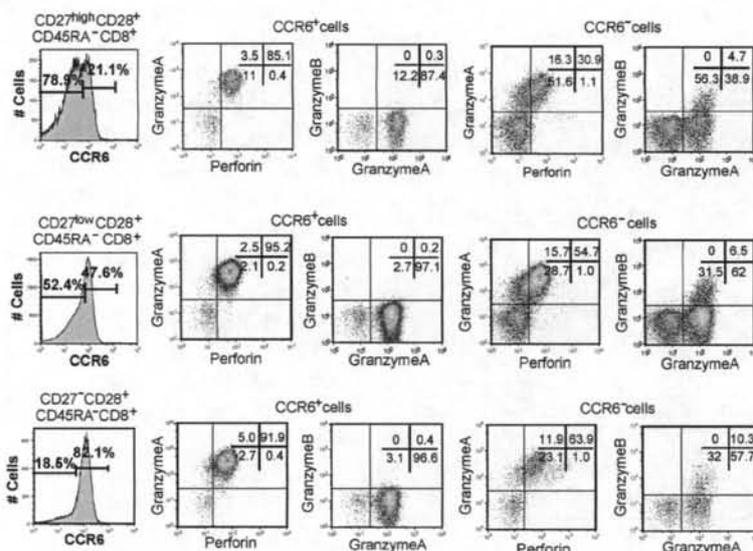


図 5. メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CCR6<sup>+</sup> および CCR6<sup>-</sup> サブセットにおけるエフェクター分子の産生  
健常人 3 名由来の CD8<sup>+</sup> T 細胞を、抗 CCR6, CD27, CD28, CD45RA, CD8, Perforin, Granzyme A, Granzyme B 抗体を用いて染色し CD27<sup>high/low</sup>-CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞の CCR6<sup>+</sup> および CCR6<sup>-</sup> サブセットにおける Perforin および Granzyme A/B の発現解析を行った。プロット内の数字は各サブセットにおける Per/GraA, GraA/GraB の発現によって分けられる細胞集団の割合を示している。

#### 7-4. CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中におけるサイトカイン産生能の解析

CD8<sup>+</sup> T 細胞におけるサイトカイン産生能は分化・成熟段階の異なる細胞集団によって産生されることが報告されている。細胞増殖に必須な IL-2 はナイーブおよびメモリー T 細胞集団で主に産生が確認され、細胞障害性サイトカインである IFN- $\gamma$  は T<sub>EM</sub> およびエフェクター細胞で産生される。

そこで私は CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR6<sup>+</sup> と CCR6<sup>-</sup> サブセットの機能的差異を明らかにするため、CD3<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞より CCR6<sup>+</sup> と CCR6<sup>-</sup> サブセットをソーティング後、PMA および Ionomycin によって刺激し、IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  の産生を測定した(図 6A)。ソートされた細胞の純度は、CCR6<sup>+</sup> サブセットは 96.4%、CCR6<sup>-</sup> サブセットは 99.6%であった。CCR6<sup>+</sup> サブセットの 90%が IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  を産生しているのに対して IL-2 を産生している集団は 30%であった。同様の実験を 3 人の健常人でおこない解析を行ったところ、63.9%の CCR6<sup>+</sup> サブセットは IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  を共に産生する集団であり、20.5%の CCR6<sup>+</sup> サブセットが IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 全てのサイトカインを共に産生する集団であった(図 6B)。

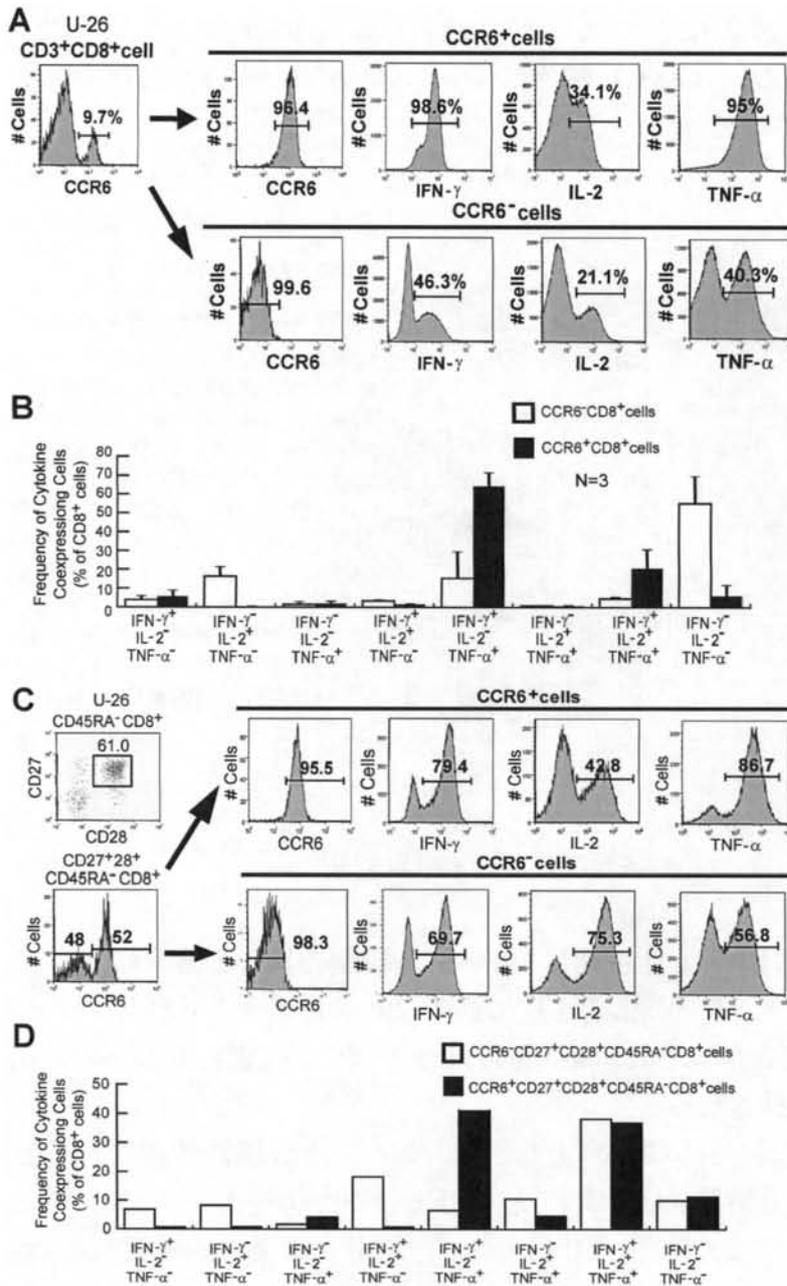


図 6. CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中におけるサイトカイン産生能

おけるサイトカイン産生能

(A) 健常人 U-26 より Auto-MACS により CD8<sup>+</sup>T 細胞を分離しさらに CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> および CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> サブセットをソーティングし分離し PMA および Ionomycin によって刺激し、IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$  の産生を測定した。数字は各サブセットにおけるサイトカイン産生細胞の割合を示す。(B) 同様の実験を 3 人の健常人で行い、各サブセットにおけるサイトカイン産生細胞の頻度の平均値および標準偏差を示した。

(C) 健常人 U-26 より Auto-MACS により CD8<sup>+</sup>T 細胞を分離後、ソーティングし CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CCR6<sup>+</sup> および CCR6<sup>-</sup> サブセット中のサイトカイン産生能を解析した。数字は各サブセットにおけるサイトカイン産生細胞の割合を示す。(D) 各サブセットにおけるサイトカイン産生細胞の頻度の平均値を示した。

続いて私はメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR6<sup>+</sup> および CCR6<sup>-</sup> サブセットの機能的差異を明らかにするため CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CCR6<sup>+</sup> および CCR6<sup>-</sup> サブセットをソーティングしサイトカイン産生能を解析した(図 6C)。CCR6<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞において 41.3% および 36.9% の細胞がそれぞれ IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  を共に産生する集団、および IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 全てのサイトカインを共に産生する集団であった(図 6D)。一方 CCR6<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  を共に産生する集団は 10% 以下であった。同様の結果が異なる健常人で得られた。したがって、CCR6<sup>+</sup> メ

モリー CD8<sup>+</sup> T細胞は IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ を共に産生する集団と IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 全てのサイトカインを共に産生する集団の異なるサブセットをもつことが示唆された。

### 7-5. テトラマーを用いたウイルス抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞中の各サブセットにおける CCR5、CCR7、CCR6 の発現解析

EBV 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞は CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー表現型を持つことが報告されている [45]。また HCMV 抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞には CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+/-</sup> のエフェクターや CD27<sup>low</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+/-</sup> の T<sub>EM</sub>を持つ細胞集団が含まれている [46]。

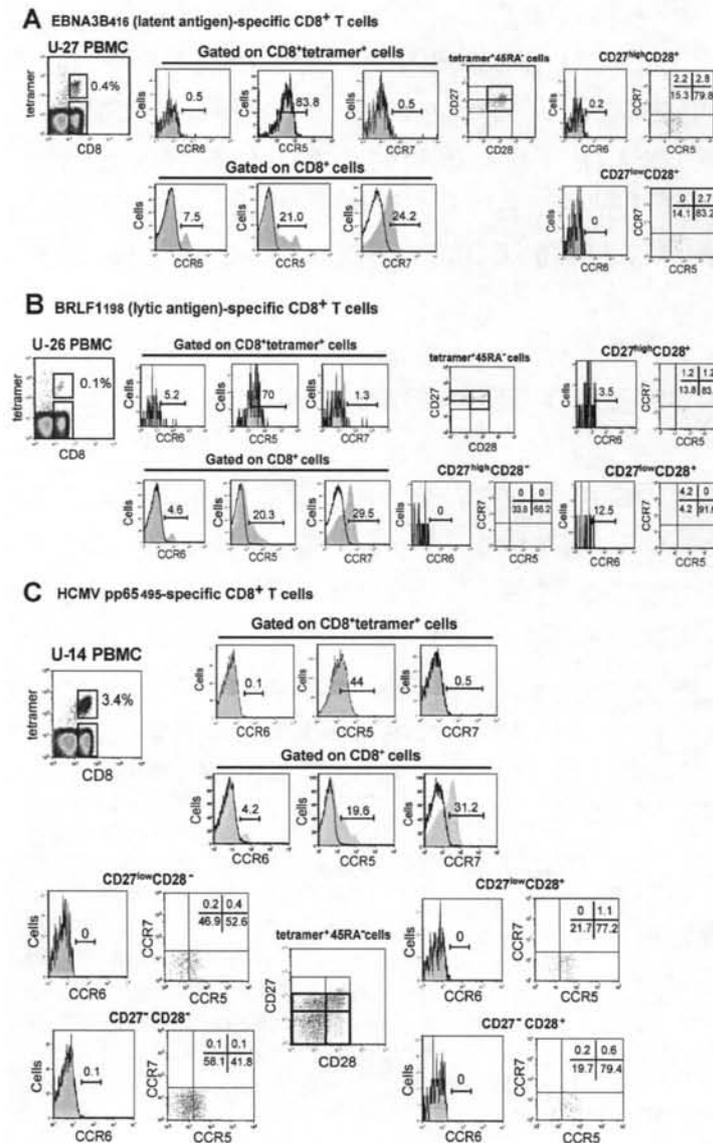


図 7. EBV 抗原特異的および HCMV 抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR6 の発現

(A,B). EBV 抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR6, CCR5, CCR7 の発現を図に示した。HLA-A\*1101 陽性の健常人 U-27 および HLA-A\*2402 陽性の健常人 U-26 より得られた PBMC を、抗 CD8, CD27, CD28, CD45RA 抗体、および抗 CCR6, CCR5, CCR7 抗体、および HLA-A\*1101 拘束性 EBNA3B テトラマー(A)、または HLA-A\*2402 拘束性 BRLF-1 テトラマー(B)を用いて染色した。CD8<sup>+</sup> T 細胞および CD8<sup>+</sup>tetramer<sup>+</sup> T 細胞をゲーティングし、各サブセットにおける CCR6, CCR5, CCR7 の発現を解析してヒストグラムで示した。CD8<sup>+</sup> T 細胞中のテトラマー陽性細胞の割合を図中に表記した。また、CD8<sup>+</sup>tetramer<sup>+</sup> 細胞における CD27、CD28 および CD45RA の発現を解析し各 subset における CCR6, CCR5, CCR7 の発現を解析してヒストグラムで示した。(C). HCMV 抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR6 の発現を図に示した。HLA-A\*0201 陽性の健常人 U-14 より得られた PBMC を、HCMVpp65-HLA-A\*1101 テトラマーをもちいて染色した。CD8<sup>+</sup> 細胞および CD8<sup>+</sup>tetramer<sup>+</sup> T 細胞中の CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> 各サブセットにおける CCR6, CCR5, CCR7 の発現を解析してヒストグラムで示した。

そこで、私は EBV および HCMV 特異的テトラマーを用いてウイルス抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR6 の発現を確認した。HLA-A\*24 陽性、HLA-A\*11 陽性または HLA-A\*0201 陽性の PBMC に HLA-A\*1101 拘束性 EBNA3B 特異的なテトラマー、HLA-A\*2402 拘束性 BRLF1 特異的なテトラマーおよび HLA-A\*0201 拘束性 HCMV pp65 特異的テトラマーを反応させ、その後、抗 CCR5、CCR7、CCR6、CD8、CD27、CD28、CD45RA 抗体で染色し、テトラマー陽性 CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CD27CD28CD45RA 各サブセットにおける CCR6、CCR7、CCR5 の発現パターンの解析を行った。まず、テトラマー陽性細胞中における CCR6、CCR5、CCR7 の発現を調べたところ、テトラマー陽性細胞中に CCR6、及び CCR7 の発現は確認されず、80%以上が CCR5 陽性の細胞群であった。また、EBV 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞における ケモカインレセプターの発現をさらに詳しく解析するために CD27CD28CD45RA によって各分画に分けて CCR6、CCR5、CCR7 の発現を解析した。一部の分画は細胞数が非常に少ないため、主なテトラマー陽性細胞の分画でのみ解析を行った。EBV 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の 90%が CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>メモリーの表現型をもち、CCR6<sup>-</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>の細胞集団であることが示された。また、潜伏感染時に発現している latent antigen(潜伏抗原)および、EBV 感染時の初期に発現する lytic antigen(前早期抗原)に特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR6 の発現に大きな差は確認されなかった(図 7A, B)。また、HCMV 特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞においても CCR6 の発現は確認されなかった(図 7C)。

## 7-6. CCL20(MIP-3 $\alpha$ )に対する CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走能の解析

リンパ球が免疫応答の場へ遊走する際には個々の機能的サブセットを選択的に遊走させることが重要である。このためケモカインレセプターを発現している細胞はそのリガンドに対して特異的な遊走能を示す。そこで私はメモリー CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞がリガンドである MIP-3 $\alpha$ に対する遊走能の解析を行った。

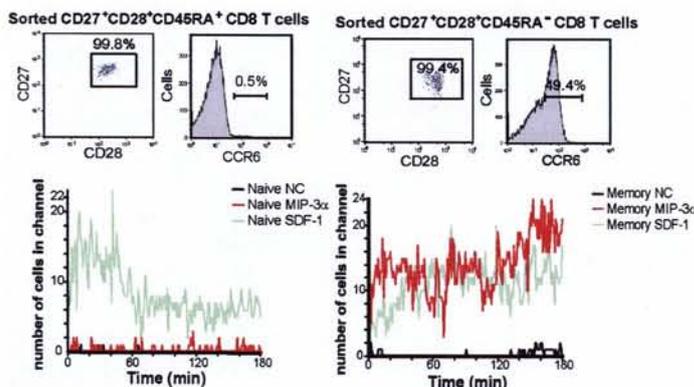


図 8. CCL20(MIP-3 $\alpha$ ) に対する CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走能

CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走能を検討した。健康人 PBMC を抗 CD8、CD27、CD28、CD45RA 抗体で染色し、FACS Aria<sup>TM</sup>にて CCR6 を高発現する CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>サブセット(メモリーサブセット)と対照として CCR6 の発現量が低い CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>サブセット(ナイーブサブセット)にソーティングした。CCL20/MIP-3 $\alpha$ (赤)を細胞走化性因子としそれぞれの細胞集団の遊走能を

EZ-TAXIScan<sup>TM</sup>にて測定した。グラフは毎分ごとの遊走細胞の数を示している。ポジティブコントロール(緑)には SDF-1 を用い、ネガティブコントロールには medium を用いた(黒)。

CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞の 49.4%が CCR6 を発現しており、MIP-3 $\alpha$ に対して非常に高い遊走能が確認された。一方 CCR6 の発現が 0.5%だった CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> ナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞は MIP-3 $\alpha$ に対して遊走能は確認されなかった。同様の結果が異なる健常人でも確認された(図 8)。以上のことからヒト末梢血中の CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>メモリーの表現型をもち、そのリガンドである MIP-3 $\alpha$ に対して遊走能を発揮することが示された。

### 7-7. 健常人末梢血 CD8<sup>+</sup> T 細胞中における CCR4 の発現解析

CCR4 は IL-4, IL-5 を産生する Th2 タイプのメモリー CD4<sup>+</sup> T 細胞に選択的に発現しており IFN- $\gamma$ を産生する Th1 細胞にはほとんど発現していない[21, 30]。しかし、CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR4 発現細胞の詳細な解析は行われていない。そこで、私は健常人 PBMC における細胞表面上の CCR4 の発現を解析するため、健常人 PBMC を抗 CD3、CD8、CCR4 抗体にて染色し、CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR4 陽性細胞の解析をおこなったところ、約 2%の CD8<sup>+</sup> T 細胞集団に CCR4 の発

現を確認された。同様の解析を 15 人の健常人で行ったところ CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR4 陽性細胞の割合は平均 2.3%  $\pm$  1.5%であった(図 9A)。

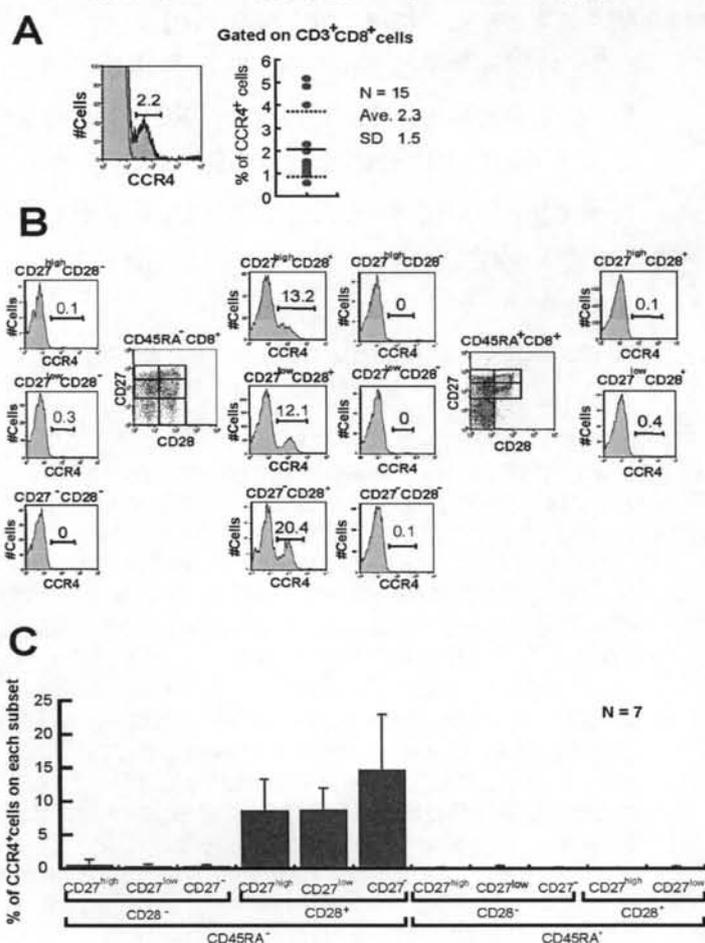


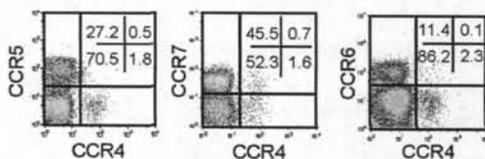
図 9. ヒト CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR4 の発現解析

(A) 健常人 PBMC (U-16)を抗 CCR4, CD8, CD3 抗体で染色し CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CCR4 発現を示した。15 人の健常人の CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CCR4 発現細胞の割合をグラフに示した。平均および標準偏差は図中に示した。(B) 健常人 PBMC を抗 CD27, CD28, CD45RA, CD8, CCR4 抗体で染色し CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CD27/CD28/CD45RA 各サブセットにおける CCR4 の発現を解析した。(C) 7 人の健常人から得られた CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CD27/CD28/CD45RA 各サブセットにおける CCR4 の発現頻度の平均値および標準偏差を示した。

次に、末梢 CD8<sup>+</sup> T 細胞の分化・成熟段階における CCR4 の発現を調べるため、CD27、CD28、CD45RA の細胞表面マーカーを用いて、CD8<sup>+</sup> T 細胞中の各 CD27CD28CD45RA サブセットにおける CCR4 の発現をフローサイトメトリーにて解析したところ、CCR4 は CD27<sup>high/low</sup>-CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>のメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞集団に多く含まれ、CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> ナイーブサブセットや CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> エフェクターサブセットでは発現は確認されなかった(図 9B)。同様の結果が 7 人の健康人から得られたことから CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞はメモリーサブセットに存在するということが示唆された(図 9C)。

CCR6 の結果で述べたように、CCR7 はナイーブおよび T<sub>CM</sub>において発現されており、CCR5 は主に T<sub>EM</sub>において発現されている。また CCR6 は早期 T<sub>EM</sub>に発現すると考えられる。図 9 の結果より CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞はメモリーサブセットに存在することが示唆されたため、CCR4 の発現が CCR7、CCR5 または CCR6 の発現に相関関係があることが推察される。そこで、CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR4 の発現と CCR7、CCR5 および CCR6 の発現との関係を 6 人の健康人で調べたところ(図 10A)、

**A**



CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞中の 35.0%±18.8%が CCR5 を発現し、33.7%±6.9%が CCR7 を発現していた (data not shown)。一方、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞中 CCR6 を発現している細胞は 6.8%±2.8%であった。以上の結果より、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は CCR5、CCR7 を一部発現し CCR6 を発現しない細胞集団であることが示唆された。

**B**

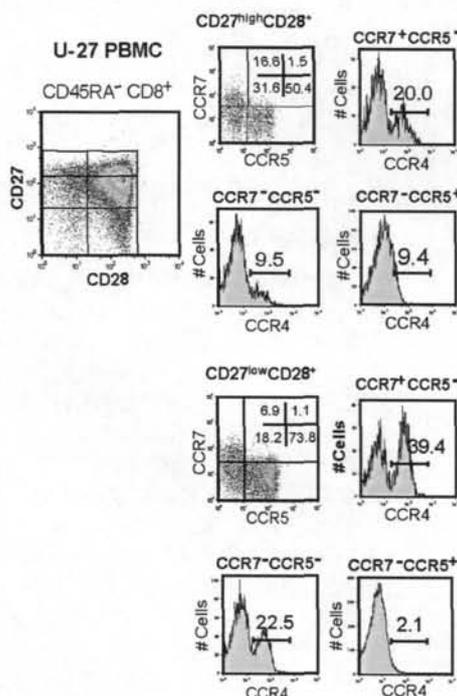


図 10. CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR4、CCR5、CCR6、CCR7 の発現

(A)健康人 U-27 の PBMC を抗 CD8、CCR5、CCR7、CCR4 抗体で染色し、CD8<sup>+</sup> T 細胞中における CCR5 または CCR7 と CCR4 の発現を解析した。%は CD8<sup>+</sup> T 細胞中における各サブセットの割合を示している。(B) 健康人 PBMC を抗 CD8、CD27、CD28、CD45RA、CCR5、CCR7、CCR4 抗体で染色し FACS にて解析を行った。CD27CD28CD45RA を用いて CD8<sup>+</sup> T 細胞を各サブセットに分けた後、CCR4 の発現が高い CD27<sup>high/low</sup> CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>の各サブセットを CCR5 / CCR7 で展開し、各 CCR5 / CCR7 サブセットにおける CCR4 の発現をヒストグラムで表した。%は CD8<sup>+</sup> T 細胞中における CCR7 / CCR5 それぞれのサブセットの割合を示している。また、ヒストグラムにおける数字は各 CCR5 / CCR7 サブセットにおける CCR4 陽性細胞の割合を示している。ネガティブコントロールとして mouse IgG 抗体を用いた。

続いてメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR4、CCR5 および CCR7 の発現を調べるため、健常人の PBMC について抗 CCR5、CCR7、CCR4、CD8、CD27、CD28、CD45RA 抗体で染色し CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>メモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR5、CCR7、CCR4 の発現パターンを解析した。CD27<sup>low</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>のメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞において、CCR7<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup>サブセットの 39.4%、および CCR7<sup>-</sup>CCR5<sup>-</sup>サブセットの 22.5%が CCR4 を発現していたのに対し、CCR7<sup>-</sup>CCR5<sup>+</sup>サブセットはほとんど CCR4 を発現していなかった(図 10B)。CD27<sup>low</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>の細胞集団よりも未分化であるメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞が含まれる CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>メモリーサブセットにおいても同様の傾向を示した。同様の結果が 5 人の健常人で確認されたことから CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は CCR7<sup>+</sup>/CCR5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>サブセットをもちメモリーの表現型を示す可能性が示唆された。

次に私は末梢ヒト CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞が CCR4 のリガンドである TARC(CCL17) および MDC(CCL22)に対して特異的に遊走し、機能的な細胞であるか検討するため遊走能の測定を行った(図 11)。

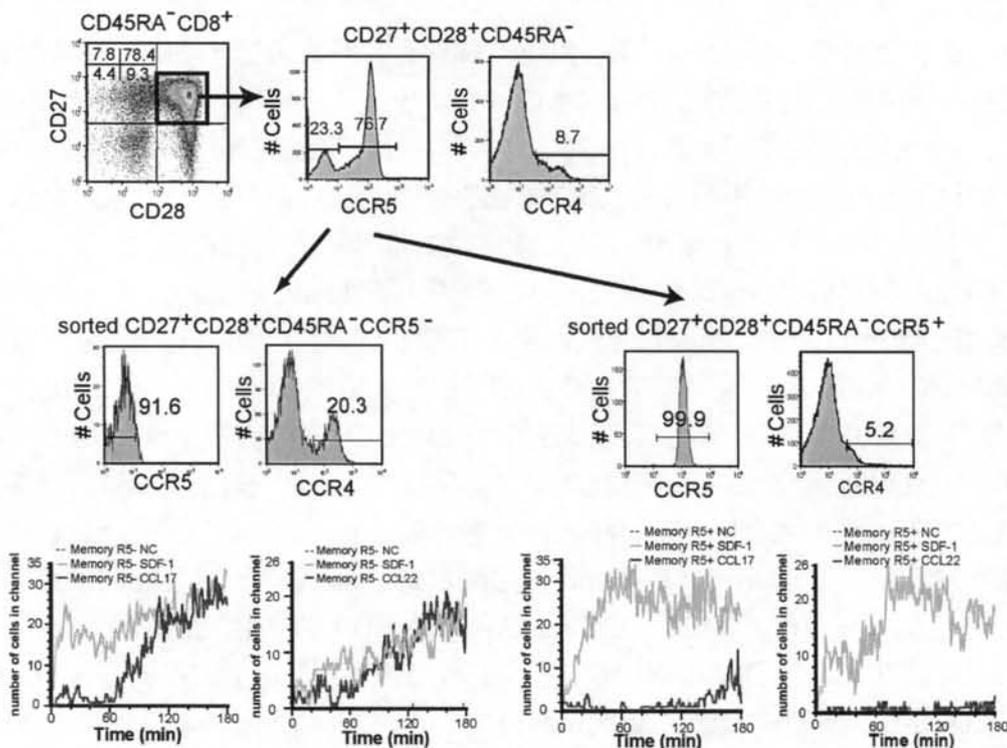


図 11. CCL17(TARC)および CCL22(MDC)に対する CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走能

CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走能を検討した。健常人 PBMC を抗 CD8、CCR5、CD27、CD28、CD45RA 抗体で染色し、FACS Aria<sup>TM</sup>にて CCR4 を高発現する CCR5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>サブセットと対照として CCR4 の発現量が低い CCR5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>サブセットをソーティングした。CCL17/TARC(黒)を細胞走化性因子としそれぞれの細胞集団の遊走能を EZ-TAXIScan<sup>TM</sup>にて測定した。グラフは毎分ごとの遊走細胞の数を示している。ポジティブコントロール(グレー)には SDF-1 を用い、ネガティブコントロールには medium を用いた(点線)。

健常人 PBMC を抗 CD8, CCR5, CD27, CD28, CD45RA 抗体で染色し、FACSAria™にて CCR4 を高発現する CCR5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットと対照として CCR4 の発現量が低い CCR5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットをソーティングした。TARC および MDC を走化性因子とし EZ-TAXIScan™にて遊走能を測定した。CCR4 を 20.3%発現する CCR5<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞は TARC および MDC に対して高い遊走能が確認された。一方 CCR4 の発現が低い CCR5<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞は TARC および MDC に対する遊走能は非常に低かった。同様の結果が異なる健常人でも確認された(図 11)。以上のことからヒト末梢血中の CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞はそのリガンドである TARC および MDC に対して遊走能を発揮することが示され、さらに CD8<sup>+</sup>T 細胞上の CCR4 が機能的であることが示された。

#### 7-8. CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中におけるエフェクター分子 Perforin / Granzyme A / Granzyme B の発現

Perforin および Granzyme A / B はヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞を分類する際に非常に有効な分化マーカーであり、CCR6 の項でも述べたように、CD45RA<sup>-</sup> メモリーサブセットは主に Per<sup>-</sup>GraA<sup>-</sup>GraB<sup>-</sup> 細胞 (T<sub>CM</sub>)、Per<sup>-low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup> 細胞 (早期 T<sub>EM</sub>)、Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>+</sup>細胞 (後期 T<sub>EM</sub>) の 3 つの細胞集団から成り立っている。私はメモリー CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞のより詳細な表現型を解析するため、CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットにおける CCR4 陽性細胞のエフェクター分子の発現を解析し、Per<sup>-</sup>GraA<sup>-</sup>GraB<sup>-</sup> の発現系を示す CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞 (T<sub>CM</sub>) と Per<sup>-low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup> の発現系を示す CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞 (早期 T<sub>EM</sub>) と比較した。

CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞において、CCR4<sup>+</sup> サブセットの 66.1% が Perforin および Granzyme A を発現していない集団であった。また、CCR7<sup>+</sup> サブセットも同様に Perforin および Granzyme A を発現していない集団であった。一方、CCR6<sup>+</sup> サブセットの 83.7% が Perforin の発現が低く Granzyme A を発現している集団であった(図 12)。また、CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞より分化・成熟の進んだ CD27<sup>low</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞でも同様の結果が得られた。CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞において CCR4<sup>+</sup> サブセットは Granzyme B を発現していなかった(data not shown)。同様の結果が 3 人の健常人で確認された(図 12B)。以上の結果より CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞において CCR4<sup>+</sup> サブセットおよび CCR7<sup>+</sup> サブセットは CCR6<sup>+</sup> サブセットよりも未分化なメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞の集団であることが示唆された。

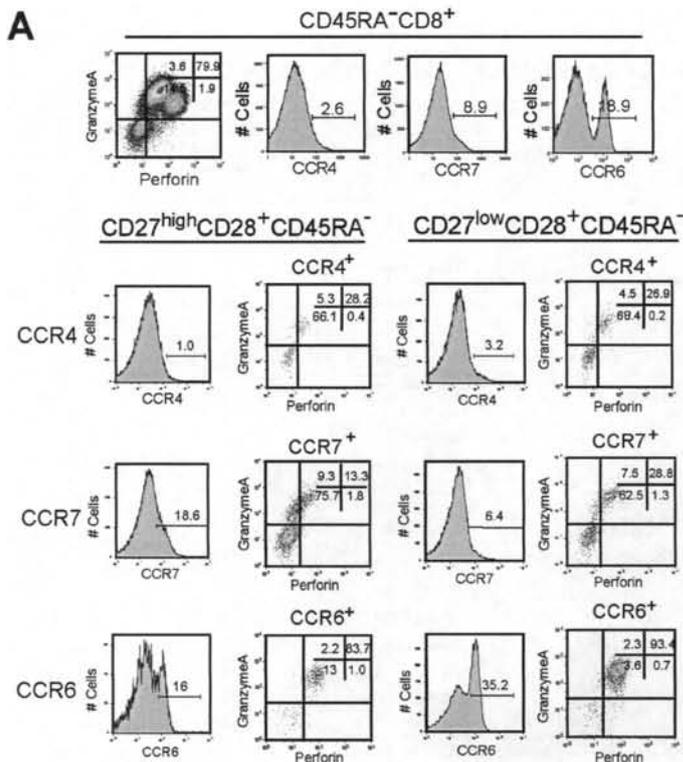
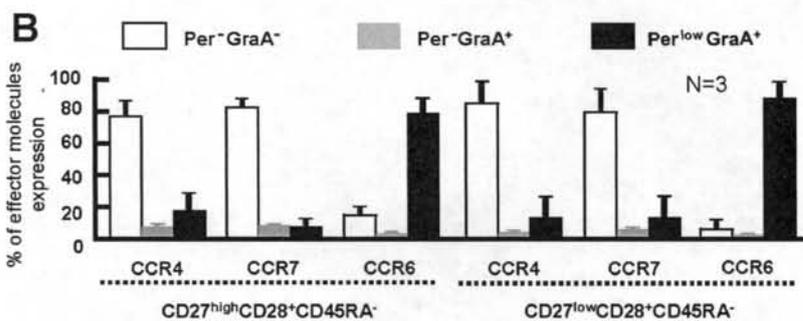


図 12. メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CCR4<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup> および CCR7<sup>+</sup> サブセットにおけるエフェクター分子の産生

(A) 健康人由来の CD8<sup>+</sup> T 細胞を、抗 CCR4, CCR7, CCR6, CD27, CD28, CD45RA, CD8, Perforin, Granzyme A 抗体を用いて染色し CD27<sup>high/low</sup>-CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞の CCR4<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup> および CCR7<sup>+</sup> サブセットにおける Perforin および Granzyme A の発現解析を行った。プロット内の数字は各サブセットにおける Per/Gra の発現によって分けられる細胞集団の割合を示している。

(B) 同様の実験を 3 人の健康人で行い各サブセットにおけるエフェクター分子の発現量の検討を行った。得られた結果の平均と標準偏差をグラフに示した。



### 7-9. CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中におけるサイトカイン産生能の解析

エフェクター分子の発現解析によって CCR4<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> および CCR7<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットにおける Perforin および Granzyme A の発現パターンに違いが確認されなかった。そこで私はこの 2 つのメモリーサブセットの機能的差異をより詳細に検討するためサイトカイン産生能の解析を行った。CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞より CCR4<sup>+</sup> と CCR7<sup>+</sup> サブセットをソーティング後、PMA および Ionomycin によって刺激し、IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 の産生を測定した(図 13A)。

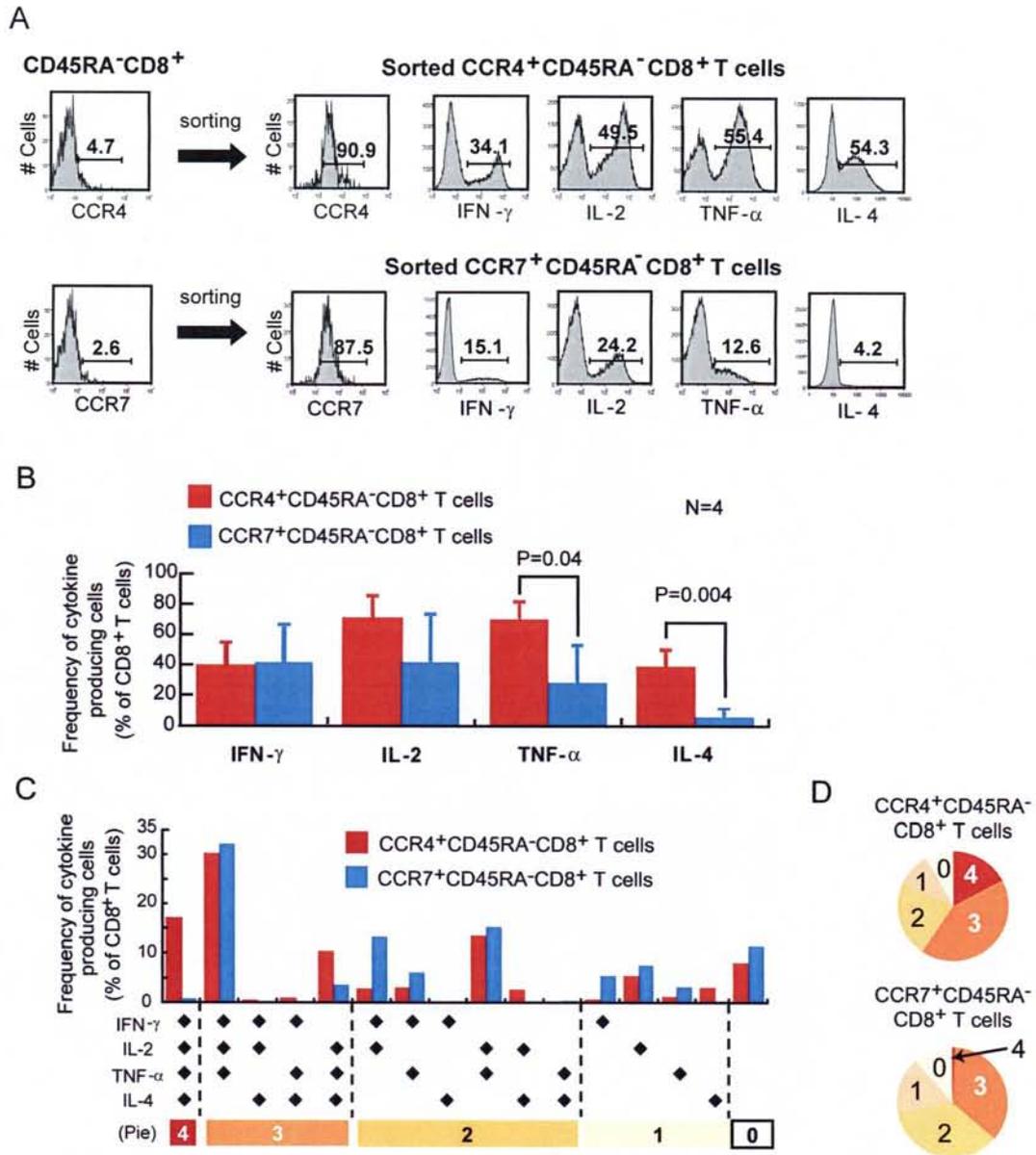


図 13. CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞中におけるサイトカイン産生能

(A) 健康人 U-26 より Auto-MACS により CD8<sup>+</sup> T 細胞を分離し、さらに CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> および CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> サブセットをソーティングし分離した。分取した細胞を PMA および Ionomycin によって刺激し、IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\alpha$ 、IL-4 の産生を測定した。数字は各サブセットにおけるサイトカイン産生細胞の割合を示す。(B) 同様の実験を 4 人の健康人で行い、各サブセットにおけるサイトカイン産生細胞の頻度の平均値および標準偏差を示した。

(C) 健康人 U-26 より Auto-MACS により CD8<sup>+</sup> T 細胞を分離後、ソーティングし CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> および CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞中のサイトカイン産生パターンを解析した。全 CD8<sup>+</sup> T 細胞中に占める各サイトカイン産生サブセットの割合を算出しグラフに示した。(D) CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> および CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞中のサイトカイン産生プロフィールを解析した。Fig.13C のデータに基づき、各細胞が共に産生しているサイトカインのパターンを解析し、円グラフに示した。

ソートされた細胞の純度は、CCR4<sup>+</sup> サブセットは 90.9%、CCR7<sup>+</sup> サブセットは 87.5%であった。CCR4<sup>+</sup> サブセットの 35%が IFN- $\gamma$ および 50%が IL-2、TNF- $\alpha$ 、IL-4

をそれぞれ産生しているのに対して CCR7<sup>+</sup> サブセットは IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 の産生量が少なかった。同様の実験を 4 人の健常人で行ったところ、CCR4<sup>+</sup> サブセットにおいて 70.6% および 39.5% の細胞が TNF- $\alpha$  および IL-4 をそれぞれ産生していたのに対して、CCR7<sup>+</sup> サブセットではわずか 28.8% および 6.6% の細胞が TNF- $\alpha$  および IL-4 を産生しているのが確認された(図 13B)。以上の結果より CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> メモリーサブセットおよび CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> サブセット(T<sub>CM</sub>)間に TNF- $\alpha$  および IL-4 産生能の機能的差異があることが示唆された。

続いて CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞におけるサイトカインの産生パターンを詳細に解析するため、健常人 U-26 由来の PBMC を CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> サブセットおよび CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> サブセットにソーティングし、抗 IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 抗体によって染色し解析を行った。30.31% の CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞が、IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  を共に産生する集団であり、10.4% および 17.3% の細胞が、それぞれ IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 および、IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 全てのサイトカインを産生する細胞集団であることが確認された(図 13C)。また CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> サブセットは CCR7<sup>+</sup> サブセットに比べ、1 つの細胞が同時に多種類のサイトカインを産生するマルチポテンシャルなメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞であることが示された(図 13D)。以上の結果よりメモリー CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞に比べて非常に機能的な集団であり、IL-4 などの 2 型サイトカイン産生能を持つことが示唆された。

#### 7-10. CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low</sup> のメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞におけるサイトカイン産生能の解析

ケモカインレセプター CXCR3 は一部の B 細胞および T 細胞において発現が認められており、活性化することによって CD4<sup>+</sup> T 細胞上および CD8<sup>+</sup> T 細胞上の CXCR3 の発現が増強されることも報告されている[29-33]。ヒト CD4<sup>+</sup> T 細胞における CXCR3 の発現に関する研究では、0 型ヘルパー T 細胞 (Th0) および 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) において高い発現が確認されている[36, 37]。健常人 PBMC における細胞表面上の CXCR3 の発現を解析したところ、CD4<sup>+</sup> T 細胞では約 20%、CD8<sup>+</sup> T 細胞では約 60% の細胞集団において CXCR3 の発現が確認された(図 14A)。また、細胞表面上の CXCR3 の発現量によって、CXCR3 の発現が高い CXCR3<sup>high</sup>、CXCR3 の発現が低い CXCR3<sup>low</sup> および CXCR3 をほとんど発現していない CXCR3<sup>-</sup> の 3 グループに分けられることが判明し、ヒト末梢 CD8<sup>+</sup> T 細胞中に CXCR3<sup>high</sup> は約 10%、CXCR3<sup>low</sup> は約 50% 存在した(図 14A)。

次に、末梢 CD8<sup>+</sup> T 細胞の分化・成熟段階における CXCR3 の発現を調べるため、CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CD27CD28CD45RA 各サブセットにおける CXCR3 の発現をフロ

ーサイトメリーにて解析したところ、エフェクターサブセットには CXCR3<sup>high</sup> の集団はほとんど認められず、CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> のナイーブサブセットよりも CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> および CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+/-</sup> サブセットに多く認められた(図 14B, C)。CXCR3 の発現はメモリー細胞においてもっとも高く、また、その発現はナイーブ細胞からメモリー細胞へ分化する過程で上昇し、メモリー細胞からエフェクター細胞へ分化する過程で低下することが示唆された。

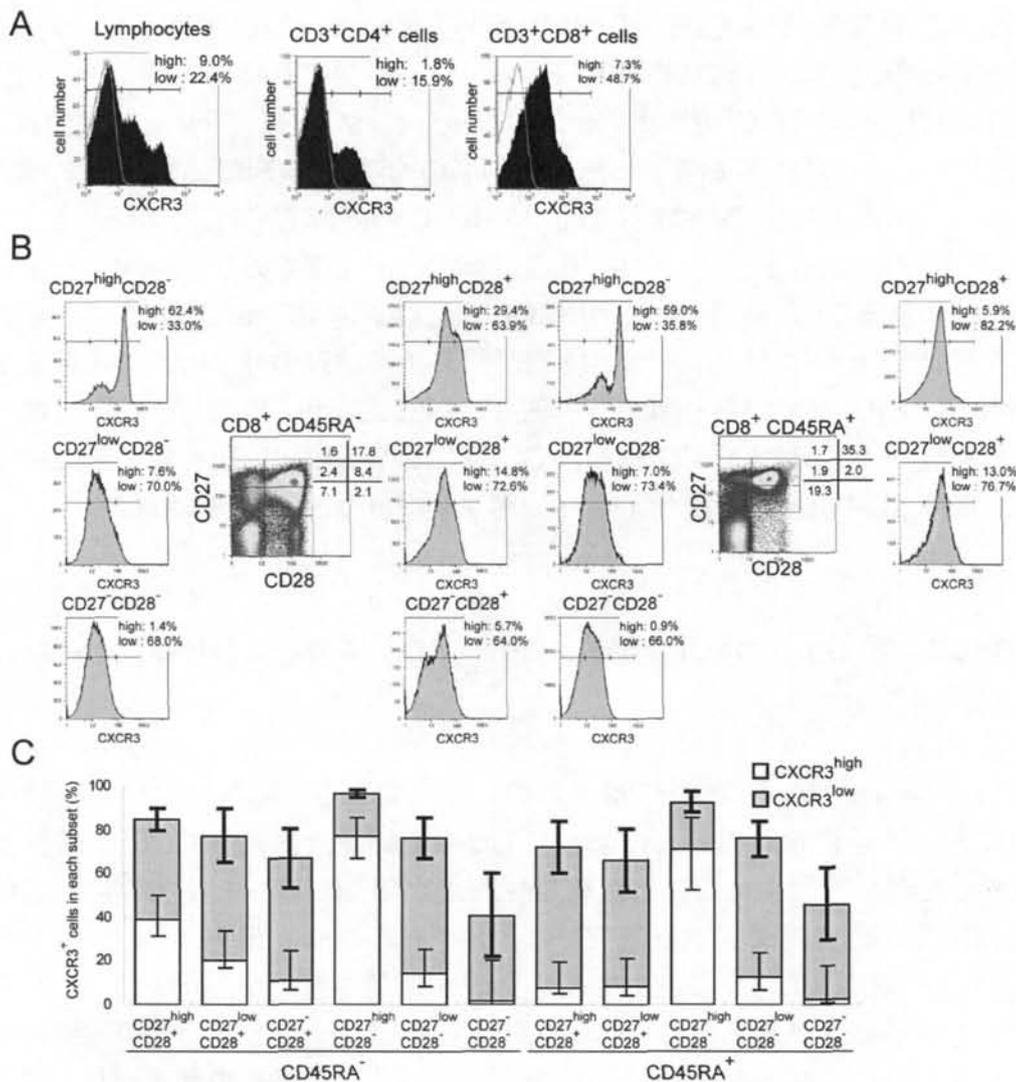
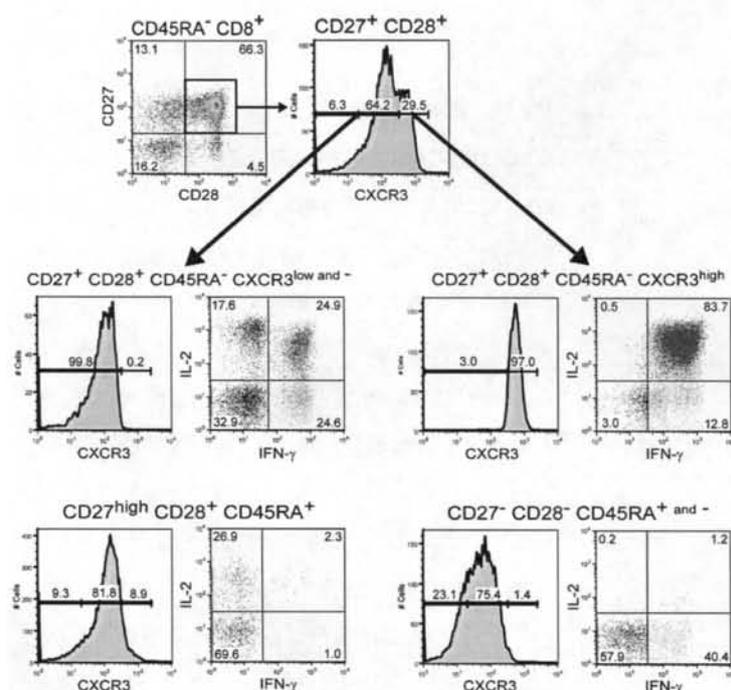


図 14. ヒト CD8<sup>+</sup> T 細胞における CXCR3 の発現解析

(A) 健康人 PBMC を抗 CXCR3, CD4, CD8, CD3 抗体で染色し CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> および CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CXCR3 発現を示した。(B) 健康人 PBMC を抗 CD27, CD28, CD45RA, CD8, CXCR3 抗体で染色し CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CD27/CD28/CD45RA 各サブセットにおける CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low</sup> の発現を解析した。(C) 8 人の健康人から得られた CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CD27/CD28/CD45RA 各サブセットにおける CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low</sup> の発現頻度の平均値および標準偏差を示した。

そこで我々は多様な集団を含むメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞における CXCR3<sup>high</sup> と

CXCR3<sup>low/-</sup>の機能的差異を明らかにするため、CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞より CXCR3<sup>high</sup> と CXCR3<sup>low/-</sup>の細胞集団をソーティング後、PMA および Ionomycin によって刺激し、IL-2 および IFN- $\gamma$ の産生を測定した(図 15)。CXCR3<sup>high</sup>の細胞は IFN- $\gamma$ と IL-2 の両方を産生したことから、CXCR3<sup>high</sup>のメモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞は IFN- $\gamma$ と IL-2 を産生する能力を備えていることが示唆された。一方、CXCR3<sup>low/-</sup>には IFN- $\gamma$ のみ産生する集団、IL-2 のみ産生する集団、IFN- $\gamma$ と IL-2 両方を産生する集団、および、IFN- $\gamma$ と IL-2 をどちらも産生しなかった 4 つの細胞集団が含まれ、CXCR3<sup>low/-</sup>には少なくとも機能的に異なる 4 種の亜集団が存在した。ナイーブ CD8<sup>+</sup> T 細胞には IL-2 のみを産生した集団および IL-2 と IFN- $\gamma$ のどちらも産生しなかった集団の両者が存在したが、エフェクター CD8<sup>+</sup> T 細胞には IFN- $\gamma$ のみを産生した集団および IL-2 と IFN- $\gamma$ のどちらも産生しなかった集団の両者が含まれた。これらの結果から、IL-2 のみを産生した CXCR3<sup>low/-</sup>の細胞は未熟なメモリー 細胞であり、IFN- $\gamma$ のみを産生した CXCR3<sup>low/-</sup>の細胞は T<sub>EM</sub>であることが示唆された。どちらのサイトカインも産生しなかった細胞は未熟なメモリー T 細胞か、あるいは分化・成熟過程が進んだ後期 T<sub>EM</sub>であると考えられた。また、異なる健康人由来の細胞を用いた実験からも同様の結果が得られた。したがって、CXCR3<sup>high</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>の CD8<sup>+</sup> T 細胞は機能的な細胞集団であると考えられた。



CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR3<sup>low/-</sup>、CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> ナイーブおよび CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup> エフェクター CD8<sup>+</sup> T 細胞の純度は、それぞれ 96.0%、98.7%、98.3%および 99.0%であった。

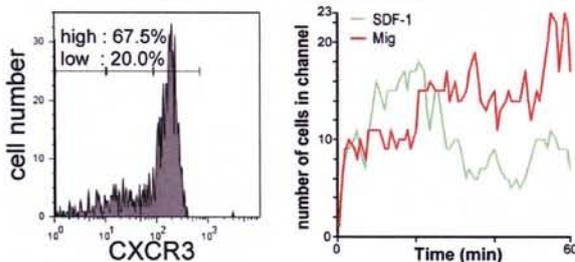
図 15. メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low</sup> サブセットにおけるサイトカイン産生

CD8<sup>+</sup> T 細胞を PMA および Ionomycin で刺激後、メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞中の CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low/-</sup>の細胞における IFN- $\gamma$  および IL-2 の産生を測定した。健康人 (U-13) より得られた CD8<sup>+</sup> T 細胞を抗 CD27、CD28、CD45RA、CXCR3 抗体をもちいて染色後、FACS により CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR3<sup>high</sup>、CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR3<sup>low/-</sup>、CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> および CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞を分離した。分離された CD8<sup>+</sup> T 細胞を 96 well F プレートにて PMA および Ionomycin で 6 時間刺激し、IFN- $\gamma$  および IL-2 産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。ソーティングによる CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CXCR3<sup>high</sup>、

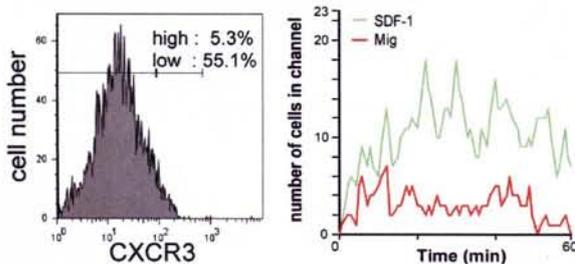
## 7-11. CXCL9(Mig)に対する CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走能の解析

CXCR3 を発現するリンパ球は CXCR3 のリガンドである CXCL9/monokine induced by IFN- $\gamma$  (Mig)、CXCL10/IFN- $\gamma$ -inducible protein 10 (IP-10) および CXCL11/IFN- $\gamma$ -inducible T cell chemokine (I-TAC) の各ケモカインに対して遊走反応を示すことが報告されている[36,37]。そこで我々は CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low</sup> の細胞の間に機能的差異があるのか検討するため、遊走能試験を行った。CXCR3<sup>high</sup> の細胞を多く含む CD27<sup>high</sup>CD28<sup>-</sup> サブセットおよび CXCR3<sup>low</sup> の細胞を多く含む CD27<sup>low</sup>CD28<sup>-</sup> サブセットをそれぞれソーティングし、EZ-TAXIScan にて遊走能の測定を行った。CD27<sup>high</sup>CD28<sup>-</sup> サブセットは 67.5% および 20.0% の CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low</sup> の細胞集団が存在し、CD27<sup>low</sup>CD28<sup>-</sup> サブセットは 5.3% および 55.1% の CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low</sup> の細胞集団が存在することが認められた(図 16)。CXCR3<sup>high</sup> 細胞を多く発現する CD27<sup>high</sup>CD28<sup>-</sup> サブセットは CXCR3<sup>low</sup> の細胞を多く含む CD27<sup>low</sup>CD28<sup>-</sup> サブセットに比べリガンドの Mig に対して高い遊走能が確認された。同様の結果が異なる健常人でも確認されたことから、CXCR3<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は CXCR3<sup>low</sup> の細胞集団に比べ、そのリガンドに対して非常に強い遊走能をもち、機能的細胞集団であることが示された。

### CD27<sup>high</sup>CD28<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T subset (CXCR3<sup>high</sup>)



### CD27<sup>low</sup>CD28<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T subset (CXCR3<sup>low</sup>)



用いた(黒)。

図 16. CXCL9(Mig)に対する CXCR3<sup>high</sup> および CXCR3<sup>low</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走能

CXCR3 の発現強度の差異が CXCL9/Mig に対する遊走能に影響するのか検討をおこなった。健常人 PBMC を anti-CD8, CD27, CD28, CD45RA mAb で染色し、FACS Aria<sup>TM</sup> にて CXCR3 を高発現する CD27<sup>high</sup>CD28<sup>-</sup> サブセット (CXCR3<sup>high</sup> サブセット) と CXCR3 の発現量が低い CD27<sup>low</sup>CD28<sup>-</sup> サブセット (CXCR3<sup>low</sup> サブセット) にソーティングした。CXCL9/Mig (赤)を細胞走化性因子としそれぞれの細胞集団の遊走能を EZ-TAXIScan<sup>TM</sup> にて 60 分間測定した。グラフは毎分ごとの遊走細胞の数を示している。ポジティブコントロール(緑)には SDF-1 を用い、ネガティブコントロールには 10%FCS/RPMI を

## 8. 考察

CCR6 は CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞で発現が確認されており、発現量は CD4<sup>+</sup>T 細胞が CD8<sup>+</sup>T 細胞より 5~6 倍多く発現している[22]。私は CD8<sup>+</sup>T 細胞中における CCR6 の発現解析を行った結果、個人差が認められたことから CD27、CD28、CD45RA を用いた分化・成熟段階における CCR6 の発現解析を行った。CCR6 は非常に限局された分画 (CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) で発現しており、CD27<sup>low/-</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> の分画と CD27<sup>high</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> で高い発現が確認された。この結果は CCR6 が CD45RO<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞に特異的に発現するという報告および CCR7<sup>+/+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (T<sub>CM</sub> および T<sub>EM</sub>) に発現するという報告と一致している。このことから私は CCR6 が CD8<sup>+</sup>T 細胞においてメモリーの表現型に特異的に発現していると考えた。

次に私は CCR5、CCR7、CCR6 の発現の相関性を調査した。CCR7 はナイーブ CD8<sup>+</sup>T 細胞、T<sub>CM</sub> に特異的に発現しており、CCR5 は T<sub>EM</sub> やエフェクター CD8<sup>+</sup>T 細胞に発現しており、分化・成熟が進行するにつれて発現が低下することが報告されている。CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は多くが CCR5 を発現し、CCR7 を発現していない集団であった。私はヒトメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞を調査するため T<sub>EM</sub> に特異的に発現していることが予想される CCR6 および分化マーカーの CCR5、CCR7 を用いて CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>T 細胞 (メモリーの表現型) の分画をより詳細に解析した。CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>T 細胞の分画は CCR5、CCR7 によって 3 つの分画に分けられ、CCR6 の発現パターンから CCR5<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> → CCR5<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> → CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> の順に分化が進んでいると考えられる。よって CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>T 細胞において CCR6<sup>+</sup>CCR5<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> の分画が T<sub>CM</sub> であり、CCR6<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> の集団は分化・成熟の進んだ T<sub>EM</sub> であることが示された。

エフェクター分子である Perforin および Granzyme A/B はヒト末梢 CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟段階を同定する際に非常に有用なマーカーである。過去の報告により Perforin はヒト末梢血 PBMC 中において T<sub>EM</sub> およびエフェクターサブセットに発現することが示されている。最近、我々の研究室ではヒト末梢血 CD8<sup>+</sup>T 細胞における Perforin (Per)、Granzyme A (GraA)、Granzyme B (GraB) の発現をマルチカラー解析によって解析したところ、CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟において Per<sup>-</sup>GraA<sup>-</sup>GraB<sup>-</sup> → Per<sup>-</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup> → Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup> → Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>+</sup> → Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>+</sup> とエフェクター分子の発現が変化することを報告した[15]。また、CD45RA<sup>-</sup>メモリーサブセット中に Per<sup>-</sup>GraA<sup>-</sup>GraB<sup>-</sup>細胞 (T<sub>CM</sub>)、Per<sup>-/low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup>細胞 (早期 T<sub>EM</sub>)、Per<sup>low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>+</sup>細胞 (後期 T<sub>EM</sub>) の存在を確認した[17]。本研究において CCR6<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットは Per<sup>-/low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup> の発現系を示した

ことからメモリー CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞は早期 T<sub>EM</sub>であり、細胞傷害活性を持たない可能性が示唆された(図 17)。

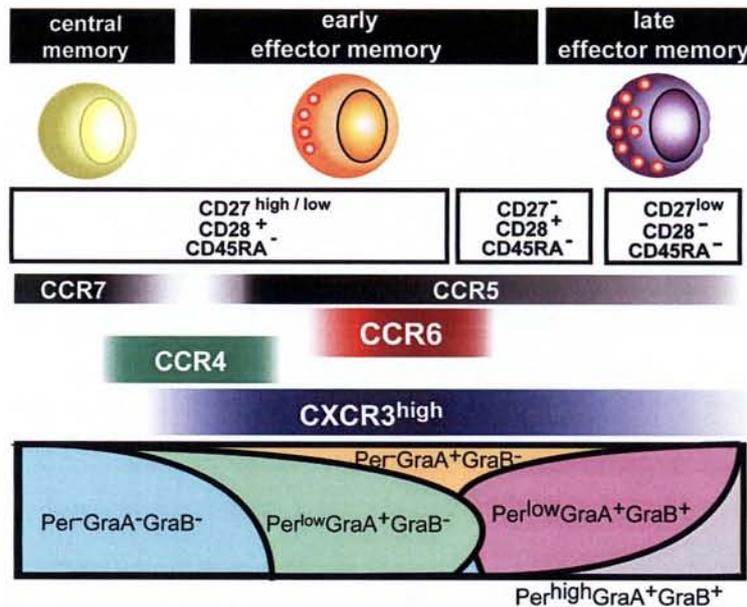


図 17. ヒトメモリー CD8<sup>+</sup> T細胞の分化・成熟過程におけるケモカインレセプターの発現

CD8<sup>+</sup>T細胞の各分化段階におけるサイトカイン産生能の違いはエフェクター分子と同様にヒト CD8<sup>+</sup> T細胞の分化・成熟段階を研究する上で重要であると考えられている。これまでの研究により、CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>あるいはCD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>の CD8<sup>+</sup> T細胞は、IFN- $\gamma$ を産生するが IL-2 は産生しないことが報告されている。これらのことから、IFN- $\gamma$ 産生能はあるが IL-2 産生能はない CD8<sup>+</sup> T細胞はエフェクター T細胞であることが示唆される。また CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> は IFN- $\gamma$ の産生能はあるが IL-2 産生能が低く、CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T<sub>CM</sub>は IFN- $\gamma$ , IL-2 をともに産生する細胞集団であることが報告されている。本研究において CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞は IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ を共に産生する集団と IFN- $\gamma$ と TNF- $\alpha$ を産生する集団によって構成されていることが示された。これらの結果は CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞が T<sub>EM</sub>に存在することを示唆するものである。また、CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞は CCR7 を発現しておらず、Perforin の発現も低いことから、早期 T<sub>EM</sub>であることが示唆された。

最近の研究によって EBV 特異的 CD8<sup>+</sup>T細胞は CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> のメモリー一表現型を持つことが報告されている。私は EBV 特異的 CD8<sup>+</sup>T細胞における CCR6、CCR7、CCR5 の発現を確認した。その結果、EBV 特異的 CD8<sup>+</sup>T細胞において CCR5 のみ発現が確認され、CCR7、CCR6 は検出されなかった。EBV の潜伏感染期に発現している抗原(潜伏抗原; latent antigen)特異的な CD8<sup>+</sup>T細胞は活性

化マーカーである CD69 が発現しておらず、CD45RO 陽性で CD62L が発現しているという報告がある[45]。また、*ex vivo* において細胞傷害活性が無いことから[11]、EBV 潜伏抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞は T<sub>CM</sub> であることが推測されたが、今回の結果では T<sub>CM</sub> 特異的な分化マーカーである CCR7 が検出されず CCR5 のみ発現が高頻度に確認されたことより、健常人における潜伏抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞は T<sub>CM</sub> より分化の進んだ分画に存在することが明らかとなった。また、EBV の再活性化時、早期に発現する抗原(前早期抗原; lytic antigen) 特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞におけるケモカインレセプターの発現は CCR5 陽性細胞が大部分を占め、CCR6 を発現している細胞集団は 5%程度であった。前早期抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞は僅かに細胞傷害活性を示し、CD45RA と CD45RO が共発現している T<sub>EM</sub> であるという報告されている[43]。本実験では潜伏抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞とは異なり CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>の細胞集団が確認され、CCR5 の発現が高かったことなどから、前早期抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞は潜伏抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞より分化・成熟の進んだ分画に存在することが示された。しかし、本実験では前早期抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞の細胞数が非常に少ない(CD8<sup>+</sup>T 細胞中 0.06%)ため、今後、細胞数を増やし更なる検討が必要だと考えられる。また、健常人では EBV が潜伏感染期にあるため分化・成熟段階に大きな変化は確認されなかったが、HIV 患者や伝染性単核症を発症した患者は潜伏抗原、前早期抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞が抗原に対して強力な細胞傷害活性を示し、Perforin や IFN- $\gamma$ などの産生も増大するという報告があることから[45-47]、EBV エピトープペプチドを用いて健常人 PBMC を刺激し EBV-BRLF-1 特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CCR6 の発現を検討したところ、未刺激の状態に比べ CCR6 の発現が上昇していた(data not shown)。これらの結果および知見より、一部の T<sub>EM</sub> は抗原提示細胞上の抗原を認識後、CCR6 を発現し腸管などの末梢組織に遊走され粘膜免疫に寄与していることが考えられた。

本研究によって CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞が早期 T<sub>EM</sub> に特異的に発現していることを示した。CCR6 は末梢血中の CD34<sup>+</sup> 血液前駆細胞を GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)と TNF- $\alpha$ によって分化させて得られた未熟樹状細胞や単球を GM-CSF と IL-4 および分化誘導を休止させる TGF- $\beta$ 1(transforming growth factor)を加えることによって発現する[25, 26, 50]。さらにこの未熟樹状細胞を成熟樹状細胞に分化させると CCR6 の発現は急速に低下しリンパ節へのホーミングレセプターである CCR7 が発現する[51, 52]。以上より CCR6 は免疫応答のイニシエーションレセプターの一部を担っていると考えられている。MIP-3 $\alpha$ は腸管上皮細胞によって産生され、IL-1 $\beta$ や TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインによって産生量が上昇することが知られており[53]、MIP-3 $\alpha$ の発現増加はクローン病や潰瘍性大腸炎で確認されている[54]。さらに健常人の腸管組織を病理染色

した結果、CCR6 を発現する T 細胞の存在が確認されている[53]。また、健常人の皮膚組織において MIP-3 $\alpha$  の発現量は少ないが乾癬やアトピー性皮膚炎などの慢性皮膚疾患患者では表皮ケラチノサイトから MIP-3 $\alpha$  の産生が著しく増加することが報告されている[55]。乾癬患者の末梢血 PBMC において CCR6 の mRNA 量が健常人に比べ有意に増加し、皮膚指向性 T 細胞に CCR6 の高発現が認められている[56]。

以上の知見および本研究で得られた結果から CCR6 のリガンドである LARC / MIP-3 $\alpha$  (CCL20) は皮膚および腸管に非常に多く発現しメモリー-CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞が MIP-3 $\alpha$  特異的な遊走能を示したことや、CCR6<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットにおいて腸管特異的なホーミングレセプターであるインテグリン $\alpha$ 4 $\beta$ 7 の発現が有意に高かったことから末梢 CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> メモリー T 細胞が腸管免疫および皮膚免疫において重要な役割を担っていることが示唆された。

ケモカインレセプター CCR4 は thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17) および macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) をリガンドにもつ。IL-4, IL-5 を産生する Th2 タイプのメモリー-CD4<sup>+</sup> T 細胞に選択的に発現しており IFN- $\gamma$  を産生する Th1 細胞にはほとんど発現していない[27]。本研究では CD8<sup>+</sup> T 細胞において CCR4 を発現している細胞集団について詳細な解析を行った。CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> サブセットに多く認められ、一部 CCR7 を発現し、CCR5, CCR6 の発現は僅かしか認められなかった。よって、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞はメモリー表現型をもつことが示唆された。

続いてメモリーサブセットにおいて CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞の発現系をより詳細に解析するため、エフェクター分子の発現パターンの解析を行い、Per<sup>-</sup>GraA<sup>-</sup>GraB<sup>-</sup> の発現系を示す CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞 (T<sub>CM</sub>) と Per<sup>-low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup> の発現系を示す CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞 (早期 T<sub>EM</sub>) と比較した。CCR4<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は Perforin, Granzyme A/B を発現していない集団の割合が 80% と最も多く、CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞 (T<sub>CM</sub>) の Perforin, Granzyme A/B 発現パターンと同様の結果が得られた。また、CCR6<sup>+</sup> サブセットは Per<sup>-low</sup>GraA<sup>+</sup>GraB<sup>-</sup> の発現パターンを示したことから、メモリー-CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞は早期 T<sub>EM</sub> の表現型をもつ CCR6<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞よりも未分化なメモリーサブセットであることが示唆された (図 17)。しかし、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞と CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞においてエフェクター分子の発現パターンに差異が認められなかったため、私はメモリー-CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞および CCR7<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞 (T<sub>CM</sub>) のサイトカイン産生能の比較検討を行った。CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞において 70% が IL-2 および TNF- $\alpha$  をそれぞれ産生し、40% が IFN- $\gamma$  を産生していた (図 13)。一方、CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞では TNF- $\alpha$  の産生量は CCR4<sup>+</sup> サブセットと比較して有意に低かった。

過去の報告では、ヒト正常表皮細胞株である HaCaT 細胞は IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  で刺激することで CCR4 のリガンドである TARC を産生する[57, 58]。アトピー性皮膚炎患者において末梢血中の IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  が上昇し、皮膚志向性 CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T 細胞が健常人に比べ有意に増加することが知られている。また、ヒトアトピー性皮膚炎のモデルとして知られる NC/Nga マウスを用いて皮膚基底層のケラチノサイトが TARC を産生し、皮膚樹状細胞(dermal DC)によって MDC が産生されることも報告されている[59]。これらの知見はアトピー性皮膚炎の患者体内において CCR4 のリガンドである TARC および MDC によって遊走された CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞が皮膚などの炎症部位で活性化し IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  を産生することで表皮ケラチノサイトや皮膚樹状細胞の TARC および MDC の産生を促し、皮膚指向性リンパ球を誘導する可能性を示唆するものである。また、TNF- $\alpha$  は内皮細胞に作用して E-セレクトインや VCAM-1, ICAM-1 などの接着因子の発現を誘導する。内皮細胞上で発現が上昇した VCAM-1 には CD8<sup>+</sup>T 細胞上の VLA-4 が結合し ICAM-1 には LFA-1 が結合して抗原の存在する局所への CD8<sup>+</sup>T 細胞の遊走を亢進する。また、IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  は相乗的に働いて内皮細胞を変形させることによって血流の増加、血管透過性の亢進、局所への白血球や組織液などの移行を促進する。以上のことから CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は炎症時に皮膚組織に誘導され局所免疫において重要な役割を担っていることが考えられる。

ヒト末梢 CD8<sup>+</sup>T 細胞において CCR4 は 2 型 CD8<sup>+</sup>T 細胞に特異的に発現しているという報告がある。2 型 CD8<sup>+</sup>T 細胞は IL-4 や IL-13 を産生し IFN- $\gamma$  を産生しない細胞集団であることが知られている。免疫応答における 2 型 CD8<sup>+</sup>T 細胞の役割は以前不明な点が多い。しかしその存在は HIV をはじめとする慢性感染症や自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎や乾癬などで確認されている[60, 61]。本研究において PMA/Ionomycin 刺激によって 40% もの CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞が IL-4 を産生することが確認された。また、同時に CCR4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  を共に産生する集団、IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 を共に産生する集団、IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-4 を産生する集団を含む不均一な集団であることを示した。最近マウスにおいて 2 型 CD8<sup>+</sup>T 細胞が Th2 の分化を誘導するとの報告があり、ヒトの末梢においても IL-4 産生 CD8<sup>+</sup>T 細胞はナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞が Th2 細胞に分化・成熟するのを誘導している可能性がある。

CD8<sup>+</sup>T 細胞は CD4<sup>+</sup>T 細胞と同様に CXCR3 を発現していることが報告されている。しかしながら、これらの研究は細胞表面上の CXCR3 の発現強度にまでは言及していない。我々は CD8<sup>+</sup>T 細胞および CD4<sup>+</sup>T 細胞中に CXCR3 を高発現している CXCR3<sup>high</sup> の集団がごく一部存在していることを明らかにした。

CXCR3<sup>high</sup>の細胞は主に CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>および CD27<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD45RA<sup>+/-</sup>の表現型を持つ CD8<sup>+</sup> T 細胞中に認められた。

CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>の表現型を持つ CXCR3<sup>low/-</sup>の CD8<sup>+</sup> T 細胞には、IL-2のみを産生する細胞、IFN- $\gamma$ のみを産生する細胞、その両者を産生する細胞、および、どちらも産生しない細胞の 4 つの集団が存在した。したがって、メモリー表現型を持つ CXCR3<sup>low/-</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞には異なる分化段階の CD8<sup>+</sup> T 細胞が含まれる。一方、CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>の表現型を持つ CXCR3<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞には IL-2 と IFN- $\gamma$ の両方を産生する細胞しか存在しなかった。したがって、メモリー CD8<sup>+</sup> T 細胞における CXCR3 発現の増加は主に IL-2 と IFN- $\gamma$ の両方を産生する能力を持った細胞集団において認められた。CXCR3<sup>high</sup>における CXCR3 の発現強度は CXCR3<sup>low</sup>の約 10 倍高い。本研究によって CXCR3 陽性細胞の遊走能力が CXCR3 の発現強度に依存することが示されたことから、CXCR3<sup>high</sup>のメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞は CXCR3<sup>low</sup>の T 細胞よりも炎症局所へより積極的に遊走すると考えられる。CXCR3 リガンドによって遊走したこれらの CXCR3<sup>high</sup>CD8<sup>+</sup> T 細胞および CD4<sup>+</sup> T 細胞は IL-2 のようなサイトカインによる刺激によって細胞増殖が誘導され、炎症局所においてエフェクター CD8<sup>+</sup> T 細胞や種々の IFN- $\gamma$ などのサイトカインの産生によりウイルスの増殖を抑制すると考えられる。

マウスにおける CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化において、T<sub>EM</sub>はエフェクター → T<sub>CM</sub>の分化段階の間に位置し、*in vivo* から取り出した状態で細胞傷害活性を示す。また、T<sub>EM</sub>は二次リンパ組織に存在する T<sub>CM</sub>とは異なり、肺、腸管粘膜層などの非リンパ組織に多く存在することが報告されている。しかし、ヒトにおける T<sub>EM</sub>は IL-2 を産生し増殖能の高いメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞と細胞傷害活性を持つエフェクター CD8<sup>+</sup>T 細胞の間に位置する分画という定義しかされておらず、依然として不明な点が多い分画である。本研究における、ケモカインレセプター CCR6, CCR4, CXCR3 の発現分布の解析、およびその発現細胞の機能的解析はヒト T<sub>CM</sub> および T<sub>EM</sub> の分類において極めて重要である(図 17)。これらのケモカインは免疫組織の形成や機能維持に必須の役割を担っており、様々な細胞群が局所・全身で複雑に影響しあっていると考えられる(図 18)。ヒトにおけるメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞に発現する表面抗原分子やケモカインレセプターが明らかにし、その機能と維持機構および分化機構を解明することが難治性の感染症におけるワクチン開発、腫瘍免疫における臨床研究の発展に寄与するものと考えられる。

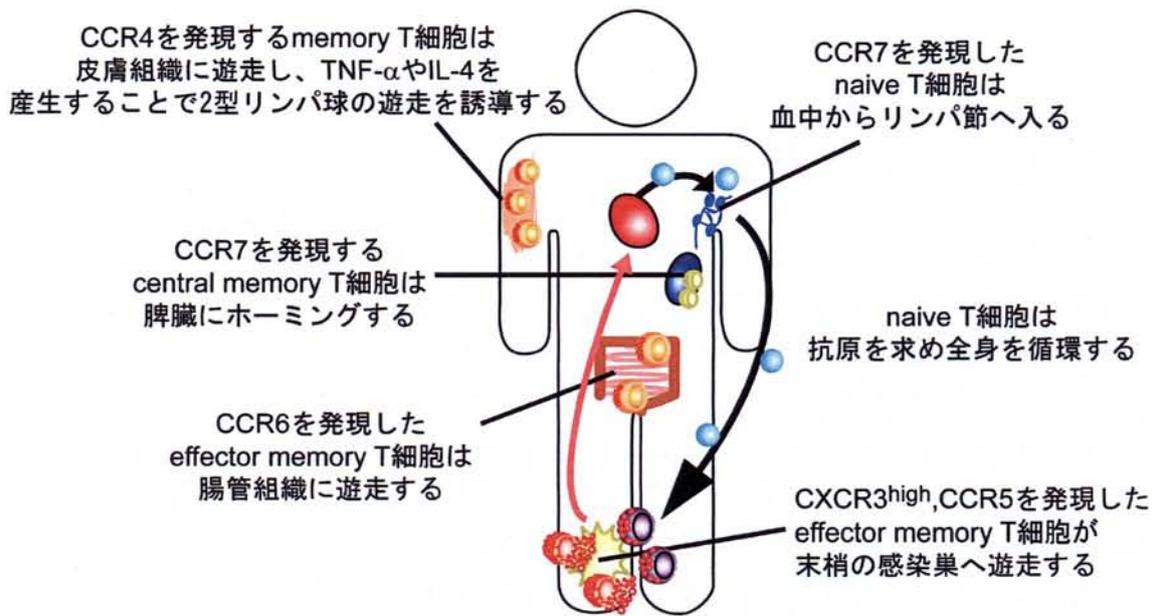


図 18. ヒト CD8<sup>+</sup> T 細胞の分化段階とケモカイン反応性

## 9. 結語

これまでの CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化および活性化の研究の多くはマウスをモデルとして進められてきた。しかし、ヒトとマウスでは CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化および活性化経路は異なり、特にメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の維持においてはヒト独自の維持機構があるのではないかと考えられている。近年、エフェクター分子や、様々な分化マーカーの発現パターンなどから少しずつ CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟の過程が明らかになってきているが、CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化段階およびその機能には不明な点が多い。また、ヒトにおける CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化経路、とりわけメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞、及び T<sub>EM</sub> の分化、特性に関しては十分な検討がなされていない。本研究によって示されたヒト CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR6, CCR4, CXCR3 の発現は T<sub>CM</sub> および T<sub>EM</sub> に限局しており、これらの分化・成熟段階を明らかにするために重要なマーカーの1つだと考えられる。このようにヒト末梢血中のメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞の分化・成熟過程を詳細に解析し不均一な集団であるメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞集団を一つ一つ明らかにすることで、難治性の感染症における効果的なワクチンの誘導、新規治療法の開発に貢献できることを期待している。

## 10. 参考文献

1. Guidotti, L.G. and Chisari, F.V., To kill or to cure: options in host defense against viral infection. *Curr. Opin. Immunol.* 1996. 8: 478–483.
2. Levy, J.A., Mackewicz, C. E. and Barker, E., Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol. Today* 1996. 17: 217–224.
3. Trapani, J.A., Sutton, V.R. and Smyth, M.J., CTL granule: evolution of vesicles essential for combating virus infections. *Immunol. Today* 1999. 20: 351–356.
4. Kaech, S.M., Wherry, E.J., Ahmed, R., Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 2002. 2: 251–262.
5. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A., Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999. 401: 708–712.
6. Sallusto, F., Gejminat, J. and Lanzavacchia, A., Central memory and effector memory T cell subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 2004 22: 745–763.
7. Wherry, E. J., Teichgraber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., von Andrian, U. H. *et. al.*, Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol.* 2003. 4: 225–234.
8. Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell.* 2002. 111: 837–851.
9. Kaech, S.M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D., Ahmed R. Selective expression of interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* 2003; 4:

- 1191–1198.
10. Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R. and van Lier, R.A., Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 1997.186: 1407–1418.
  11. Tomiyama, H., Matsuda, T. and Takiguchi, M., Differentiation of human CD8<sup>+</sup> T cells from a memory to memory/effector phenotype. *J. Immunol.* 2002. 168: 5538–5550.
  12. Hamann, D., Roos, M.T. and van Lier, R.A., Faces and phases of human CD8<sup>+</sup> T cell development. *Immunol. Today* 1999. 20: 177–180.
  13. Lanzavecchia A, and Sallust F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science.* 2000; 290, 92–97.
  14. Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, Banerjee A, Longworth SA. *et. al.*, Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science.* 2007; 315, 1689–1691.
  15. Intlekofer AM, Takemoto N, Kao C, Banerjee A, Schambach F, Northrop JK, Shen H, *et. al.*, Requirement for T-bet in the aberrant differentiation of unhelped memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 2007.204: 2015–2021.
  16. Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M., Papagno, L., Ogg, G. S. *et. al.*, Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* 2002. 8: 379–338.
  17. Takata, H. and Takiguchi, M. Three memory subsets of human CD8<sup>+</sup> T cells differently expressing 3 cytolytic effector molecules. *J Immunol.* 2006. 177: 4330–4340.
  18. Masopust D, Vezys V, Marzo L, and Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in non-lymphoid tissue. *Science.* 2001; 291:

- 2413–2417.
19. Takata, H., Tomiyama, H., Fujiwara, M., Kobayashi, N. and Takiguchi, M., Cutting Edge: Expression of Chemokine Receptor CXCR1 on Human Effector CD8<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* 2004. 173:2231–2235.
  20. Nishimura M, Umehara H, and Nakayama T. Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin<sup>+</sup>/granzyme B<sup>+</sup> cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J. Immunol.* 2002. 168: 6173
  21. Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ. CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood.* 2003. 101:1677-1682.
  22. Liao, F., Rabin, R. L., Smith, C. S., Sharma, G., Nutman, T. B. and Farber, J. M., CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$ . *J. Immunol.* 1999. 162: 186–194.
  23. Carramolino L, Zaballos A, Kremer L, et.al. Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8<sup>+</sup> T cells from secondary lymphoid organs. *Blood.* 2001; 97: 850.
  24. Hieshima, K., Imai, T., Opdenakker, G., Van Damme, J., Kusuda, J., Tei, H., Sakaki, Y. *et. al.*, Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J. Biol. Chem.* 1997. 272: 5846–5853.
  25. Power, C. A., Church, D. J., Meyer, A., Alouani, S., Proudfoot, A. E., Clark-Lewis, I., Sozzani, S. *et. al.*, Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3 $\alpha$  from lung dendritic cells. *J. Exp. Med.* 1997. 186: 825–835.

26. Greaves, D. R., Wang, W., Dairaghi, D. J., Dieu, M. C., Saint-Vis, B., Franz-Bacon, K., Rossi, D. *et. al.*, CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  and is highly expressed in human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 1997. 186: 837–844.
27. Imai, T., M. Nagira, S. Takagi, M. Kakizaki, M. Nishimura, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O. 1999. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int. Immunol.* 11: 81–88.
28. Imai, T., M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, O. Yoshie. 1997 The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J. Biol. Chem.* 272: 15036–15042.
29. Godiska, R., D. Chantry, C. J. Raport, S. Sozzani, P. Allavena, D. Leviten, A. Mantovani, P. W. Gray. 1997. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J. Exp. Med.* 185: 1595–1604.
30. Campbell J. J., G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu, E. C. Butcher. 1999. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature.* 400: 776–780.
31. Qin S, Rottman J B, Myers P, et al: The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest.*, 101: 746–754, 1998.
32. Jones D, Benjamin R J, Shahsafaei A and Dorfman D M: The chemokine receptor CXCR3 is expressed in a subset of B-cell lymphomas and is a marker of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 95: 627–632, 2000.
33. Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E and Moser B:

- Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur. J. Immunol.*, 28: 3696–3705, 1998.
34. Kim C H and Broxmeyer H E: Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukoc. Biol.*, 65: 6–15, 1999.
35. Kim C H, Rott L, Kunkel E J, et al: Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J. Clin. Invest.*, 108: 1331–1339, 2001.
36. Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, et al: Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 184: 963–969, 1996.
37. Cole K E, Strick C A, Paradis T J, et al: Interferon-inducible T Cell alpha chemoattractant (I-TAC): A novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T Cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J. Exp. Med.*, 187: 2009–2021, 1998.
38. Rabin R L, Alston M A, Sircus J C, et al: CXCR3 is induced early on the pathway of CD4<sup>+</sup> T cell differentiation and bridges central and peripheral functions. *J. Immunol.*, 171: 2812–2824, 2003.
39. Sallusto F, Lenig D, Mackay C R and Lanzavecchia A: Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 187: 875–883, 1998.
40. Gavioli, R., Kurilla, M. G., de Campos-Lima, P. O., Wallace, L. E., Dolcetti, R., Murray, R. J., Rickinson, A. B. *et. al.*, Multiple HLA-A11-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes of different immunogenicities in the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 4. *J. Virol.* 1993. 67: 1572–1578.
41. Kuzushima, K., Hayashi, N., Kudoh, A., Akatsuka, Y., Morishima, Y. and Tsurumi, T., Tetramer-assisted identification and characterization of epitopes recognized by HLA A\*2402-restricted Epstein-Barr virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells.

- Blood* 2003. 101: 1460–1468.
42. Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B. and Sissons, J. G., The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T- cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J. Virol.* 1996. 70: 7569–7579.
43. Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. *et al.*, Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996. 274: 94–96.
44. Kanegasaki, S., Nomura, Y., Nitta, N., Akiyama, S., Tamatani, T., Goshoh, Y., Yoshida, T. *et al.*, A novel optical assay system for the quantitative measurement of chemotaxis. *J. Immunol. Methods* 2003. 282: 1–11.
45. Hislop, A. D., Gudgeon, N. H., Callan, M. F., Fazou, C., Hasegawa, H., Salmon, M. and Rickinson, A. B., EBV-specific CD8<sup>+</sup> T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function. *J. Immunol.* 2001. 167: 2019–2029.
46. Tomiyama, H., Takata, H., Matsuda, T. and Takiguchi, M., Phenotypic classification of human CD8<sup>+</sup> T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function. *Eur. J. Immunol.* 2004. 34: 999–1010.
47. Tussey, L., S. Speller, A. Gallimore, and R. Vessey. Functionally distinct CD8<sup>+</sup> memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur. J. Immunol.* 2000. 30: 1823–1829.
48. Catalina, M. D., Sullivan, J. L., Brody, R. M., and Luzuriaga, K. Phenotypic and functional heterogeneity of EBV epitope-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol.* 2002. 168: 4184–4191.
49. Hislop, A. D., Annels, N. E., Gudgeon, N. H., Leese, A. M., Rickinson, A. B.

- Epitope-specific evolution of human CD8<sup>+</sup> T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med.* 2002. 195: 893-905.
50. Yang, D., Howard, O. M., Chen, Q. and Oppenheim, J. J., Cutting edge: Immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF- $\beta$  1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J. Immunol.* 1999. 167: 6644–6653.
51. Dieu-Nosjean, M. C., Vicari, A., Lebecque, S., Caux, C. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol. Review.* 1999. 66:252-262.
52. Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H., Yamaguchi, Y. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol.* 1998. 161: 3096-3102.
53. Izadpanah, A., Dwinell, B., Eckmann, L., Varki, N. M. and Kagnoff, M. F., Regulated MIP-3 $\alpha$  / CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001. 280: G710–G719.
54. Kwon, J. H., Keates, S., Bassani, L., Mayer, L. F. and Keates, A. C., Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  (MIP-3 $\alpha$ ) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut.* 2002. 51: 818–826.
55. Homey, B., Dieu-Nosjean, M. C., Wiesenborn, A., Massacrier, C., Pin, J. J., Oldham, E., Catron, D. *et. al.*, Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3  $\alpha$ /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J. Immunol.* 2000. 164: 6621–6632.
56. Schmuth, M., Neyer, S., Rainer, C., Grassegger, A., Fritsch, P., Romani, N. and Heufler, C., Expression of the C-C chemokine MIP-3  $\alpha$ /CCL20 in

- human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp Dermatol*. 2002. 11: 135–142.
57. Vestergaard, C., Bang, K., Gesser, B., Yoneyama, H., Matsushima, K., and Larsen, C. G. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J. Invest. Dermatol*. 2000. 115: 640–646.
58. Vestergaard, C., Yoneyama, H., Murai, M., Nakamura, K., Tamaki, K., Terashima, Y., Imai, T., Yoshie, O., Irimura, T., Mizutani, H., and Matsushima, K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest*. 1999. 104: 1097–1105.
59. Geginat, J., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. Proliferation and differentiation potential of human CD8<sup>+</sup> memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. 2003. 101: 4260–4266.
60. Austin, L. M., Ozawa, M., Kikuchi, T., Walters, I. B., and Krueger, J. G. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J. Invest. Dermatol*. 1999. 113: 752–759.
61. Iezzi, G., Boni, A., Degl'Innocenti, E., Grioni, M. Bertilaccio, M. T., and Bellone, M. Type 2 cytotoxic T lymphocytes modulate the activity of dendritic cells toward type 2 immune responses. *J. Immunol*. 2006. 177: 2131–2137.