

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15191

研究課題名（和文）Notchシグナルによる小腸上皮間リンパ球の成熟・TCRレパトア調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulation mechanisms of maturation and TCR repertoire of small intestinal interepithelial lymphocytes by Notch signaling

研究代表者

石舟 智恵子（ISHIFUNE, Chieko）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：80632645

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELの成熟を制御する分子を明らかにするために、TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELのDNAマイクロアレイ・プロテオーム解析を行い、種々の機能性分子関連の遺伝子発現の変化を認めた。また、TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELのシングルセルRNAシーケンス解析を行った結果、分子Aの発現が高いクラスターがRbpj-8KOで出現した。TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELはThy1.2と分子Aを用いて3つのIELサブセットに細分され、Rbpj-8KOでは活性化・増殖能が高いサブセットが増加した。よって、NotchシグナルはTCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELの多様性や活性化を調節している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELsは腸管の恒常性や、腸炎の抑制に重要な上皮間リンパ球の一種であり、これまで、種々の分子がTCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELsの分化調節に関連している報告はいくつかなされているが、TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELsの成熟や活性化状態を調節する分子機構については、ほとんど明らかではなかった。本研究はNotchシグナルが、TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELsの多様性や活性化状態を制御していることを示唆する知見を見出したことから、今後の解析により腸炎の病態制御に重要な手掛かりとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecules that regulate the maturation of TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELs, we conducted DNA microarray and proteomic analysis of TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELs, revealing expression changes in various functional molecule-related genes. Additionally, single-cell RNA sequencing analysis of TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELs showed the emergence of clusters with high expression of molecule A in Rbpj-8 knockout mice. TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELs were further subdivided into three IEL subsets using Thy1.2 and molecule A markers, and Rbpj-8 knockout resulted in an increased proportion of the subset with enhanced activation and proliferation potential. Therefore, these findings suggest the potential involvement of Notch signaling in the activation of TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> IELs.

研究分野：免疫学

キーワード：Notchシグナル 腸管上皮間リンパ球

## 1. 研究開始当初の背景

マウス小腸の上皮間リンパ球 (IEL) は、数個の上皮細胞に 1 個の割合で分布し、粘膜面の最前線において食物・微生物抗原に対する宿主防御や、腸管組織恒常性に重要な働きを担うと考えられている。IEL には主要な 4 サブセットが報告されているが、CD8 $\alpha$  のホモダイマーを発現する IEL (CD8 $\alpha$ IEL) には TCR $\alpha\beta$  型と TCR $\gamma\delta$  型が存在し、炎症性腸炎マウスモデルにおいて病態を抑制する機能が報告されている ( - )。また、古典的・非古典的 MHC I 分子を認識する多様な TCR を有する特徴や、granzyme B の産生能から、感染が生じた上皮細胞の排除に関与すると考えられている。過去の報告から、CD8 $\alpha$ IEL の分化には IL-15、AhR シグナル、転写因子 T-bet が重要であることは示唆されている ( - )。また、TCR $\alpha\beta$  型 CD8 $\alpha$ IEL に関しては上皮細胞由来の IL-15 により Thy1 陽性から Thy1 陰性に最終分化することが報告されている ( ) が、この成熟を調節する分子機構はほとんど証明されていない。研究代表者はこれまで、Notch シグナル伝達に必須の転写因子 *Rbpj* を CD4-*Cre* 依存的に欠損するマウス (*Rbpj*-4KO) の小腸 IEL を解析し、*Rbpj*-4KO では、対照マウスと比較して小腸 TCR $\alpha\beta$  型 CD8 $\alpha$ IEL の数と Thy1 陰性 granzyme B 陽性の成熟 IEL が減少することを見出した。このうち前者の数の減少には Notch シグナルを介したフリッパーゼをコードする *Atp8a2* の発現制御が重要であった。フリッパーゼは、ホスファチジルセリン (PS) を細胞内に保持する機能があることから、Notch シグナルは “Eat me シグナル” と M $\phi$  による貪食を介して TCR $\alpha\beta$  型 CD8 $\alpha$ IEL 数を制御していることを報告した ( )。しかしながら、CD8 $\alpha$ IEL の成熟に Notch 介在性のどのような分子機構が重要であるかは不明である。さらに、Notch シグナルが CD8 $\alpha$ IEL の TCR レパトアに影響を与え、CD8 $\alpha$ IEL の TCR 多様性を変化させているのかどうかは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、Notch シグナルが CD8 $\alpha$ IEL の機能的成熟と TCR レパトアを制御する分子基盤を明らかにし、CD8 $\alpha$ IEL の分化・多様性獲得と、機能的成熟の調節機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスの交配と CD8 $\alpha$ IEL における細胞表面分子の解析；

CD4-*Cre* よりも TCR $\alpha\beta$  型 CD8 $\alpha$ IEL の分化の後期で *Cre* が発現することに加えて、TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha$ IEL でも *Rbpj* の欠損が可能な CD8 エンハンサー (E8I) -*Cre* 特異的な *Rbpj* 欠損マウス (*Rbpj*-8KO) を作製する。小腸の IEL の細胞内外のタンパク質発現は、IEL を精製後に、細胞表面タンパク質に対する抗体による染色を行い、フローサイトメーターを用いて解析する。

### (2) TCR レパトアに関する解析；

*Rbpj*-8KO と対照マウスから小腸 IEL を精製し、いくつかの TCR $\gamma$ ・ $\delta$  鎖に対する入手可能な抗体を用いて TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>IEL の TCR $\gamma$ ・ $\delta$  鎖の分布をフローサイトメーターで解析する。

### (3) DNA マイクロアレイ・プロテオーム・シングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) 解析；

*Rbpj*-8KO と対照マウスから小腸 IEL を精製し、さらにセルソーターを用いて、TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha$ IEL に分離・精製する。DNA マイクロアレイ解析では、さらに Thy1 陽性と Thy1 陰性分画に細分して分離・精製後に、細胞の RNA を抽出し、マイクロアレイ受託解析に依頼し、対照マウスと比較して *Rbpj*-8KO で発現変化する遺伝子や Thy1 陽性と Thy1 陰性で発現の異なる遺伝子についてのデータを解析する。遺伝子の mRNA 発現は、RNA を cDNA に逆転写し、リアルタイム PCR で確認する。プロテオーム解析については、精製した IEL を用いて共同研究により、Tandem Mass Tag (TMT) システムを利用してプロテオーム解析を行う。対照マウスと比較して *Rbpj*-8KO で発現変化するタンパク質に関しては、タンパク質に対する抗体を用いてフローサイトメーターによって発現を確認する。scRNA-seq 解析については、細胞精製とキットによるライブラリー調整後、シークエンスを受託し、解析ソフトにて解析する。RNA、タンパク質の発現の違いをリアルタイム PCR とフローサイトメーターで確認する。

### (4) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いた腸内細菌の検出と腸内バクテリア特異的 DNA の定量；

FISH 法に関しては、*Rbpj*-8KO と対照マウスから回腸を採取し、カルノア固定し、パラフィン切片を作製する。切片を脱パラフィン、脱水後、リゾチーム処理し、真正細菌の共通のプロープである EUB338-Cy3 でハイブリダイゼーションし、核染色を DAPI で行い、洗浄・封入する。陽性シグナルは共焦点レーザー顕微鏡で観察する。腸内バクテリアを検出するために管腔の内容物を洗浄後、回腸のゲノム DNA を抽出し、いくつかの腸内細菌の 16srRNA 遺伝子に特異的なプ

ライマーで定量的 PCR を行い、発現を確認する。

(5) デキストラン硫酸誘発 (DSS) 大腸炎の誘導 ;

マウスに飲水で 2% DSS を 7 日間投与し、8 日に通常の飲水に交換する。体重減少に関して評価する。

(6) IEL の培養と機能性分子の発現解析 ;

セルソーターで Rbpj-8KO と対照マウス由来の小腸 IEL を分離・精製し、TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha$ IEL のうち、Thy1 と分子 A で分離できる 3 つのサブセットを採取する。IL-2, 3, 4, 7 と抗 CD3 抗体を添加した培地を用いて CO<sub>2</sub> インキュベーターで 3 日間培養し、細胞を顕微鏡下で観察する。また、Rbpj-8KO と対照マウスの小腸 IEL を精製し、TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha$ IEL における機能性分子の細胞内外でのタンパク質発現をフローサイトメーターで観察する。

#### 4. 研究成果

- (1) Rbpj-8KO において TCR $\alpha\beta$  型 CD8 $\alpha$ IEL を解析した結果、Rbpj-4KO 由来の IEL とは異なり、対照マウスと比較して TCR $\alpha\beta$  型 CD8 $\alpha$ IEL の数の減少は認められなかったが、Thy1 陰性の TCR $\alpha\beta$  型 CD8 $\alpha$ IEL が減少するという成熟への影響が認められた。また、Rbpj-8KO では TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha$ IEL においても解析し、対照マウスと比較して IEL 数は減少しないが、Thy1 陰性分画が減少するという

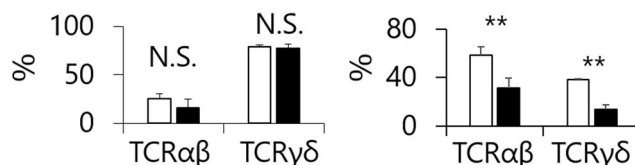


図1, 上皮間リンパ球におけるTCR $\alpha\beta$ ・TCR $\gamma\delta$ 型のCD8 $\alpha$ IELの比率(左図)とTCR $\alpha\beta$ ・TCR $\gamma\delta$ 型のCD8 $\alpha$ IELにおけるThy1陰性IELの比率(右図), N.S.:有意差なし, \*\*:  $p < 0.01$ , 白:対照マウス、黒:Rbpj-8KO

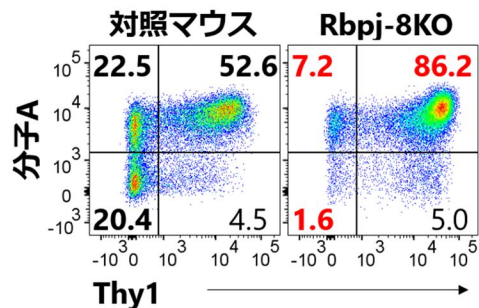
変化が認められ、TCR $\alpha\beta$ 型とTCR $\gamma\delta$ 型のCD8 $\alpha$ IELに共通した表現型を見出した(図1)。以後はTCR $\alpha\beta$ 型よりも細胞数の確保が容易なTCR $\gamma\delta$ 型CD8 $\alpha$ IELに着目して研究を進めた。

- (2) TCR $\gamma\delta$ 型CD8 $\alpha$ IELのTCRレパトアに関して、抗体で検出可能な種々のV $\gamma$ ・V $\delta$ 鎖を調べた。Rbpj-8KOとコントロール由来の小腸TCR $\gamma\delta$ 型CD8 $\alpha$ IELに関して、V $\gamma$ 1, V $\gamma$ 2, V $\gamma$ 3, V $\gamma$ 6, V $\gamma$ 7, V $\delta$ 4の発現を観察したが、コントロールとRbpj-8KOのTCR $\gamma\delta$ 型CD8 $\alpha$ IELにおいてV $\gamma$ ・V $\delta$ 鎖の分布に差は認められなかったことから、さらなる詳細な解析は行わなかった。
- (3) TCR $\gamma\delta$ 型CD8 $\alpha$ IELの成熟を制御する分子を明らかにするために、TCR $\gamma\delta$ 型CD8 $\alpha$ IELのDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、Thy1陽性とThy1陰性のTCR $\gamma\delta$ 型CD8 $\alpha$ IELは、異なる遺伝子発現パターンを有していた。Thy1陰性のTCR $\gamma\delta$ 型CD8 $\alpha$ IELでは抗菌ペプチドに関連する遺伝子の発現が高かった。Thy1陰性が成熟IELでThy1陽性は未成熟IELであるというよりは、それぞれが異なる特徴を有した細胞である可能性が示唆された。さらに、DNAマイクロアレイ解析とプロテオーム解析に関して、Rbpj-8KOのTCR $\gamma\delta$ 型CD8 $\alpha$ IELでは、対照マウスと比較して、Notchシグナルの既知の標的遺伝子の低下に加えて、種々の機能性分子の発現変化が認められた。
- (4) Rbpj-8KOマウスでは抗菌ペプチドを高発現するThy1陰性CD8 $\alpha$ IELが減少する。過去の報告によると、通常は抗菌ペプチドの働きにより、腸内細菌と上皮細胞とは一定の距離が保たれている。しかし、抗菌ペプチドをコードするRegIII $\gamma$ を欠損するマウスでは、腸内細菌が上皮細胞間に接する変化が認められるという報告がなされているため( )、腸内細菌への影響に着目した。しかしながら、コントロールマウスとRbpj-8KOマウスでは上皮細胞と細菌との距離に変化は認められなかった。また、回腸でのバクテロイデス属、乳酸菌・腸球菌、クロストリジウム属、SFBなどの菌の分布に変化は認められなかった。RegIII $\gamma$ などの抗菌ペプチドは、IEL以外にも上皮細胞から多く産生されているため、より局所的な変化を検討する必要があると考えている。
- (5) Rbpj-8KOにおいてCD8 $\alpha$ IELの組成の変化がもたらす病態への影響に関しても解析を進めてきたが、Rbpj-8KOは通常の飼育環境では自然誘発性の大腸炎は起こさないことに加えて、Rbpj-8KOへのデキストラン硫酸誘発大腸炎は対照マウスに比べて変化が認められなかった。この結果に関しては、他の免疫担当細胞によってIELの機能がマスクされている可能性があるため、CD8 $\alpha$ IELの生理的な機能や病態へ関与については、別の方法で解析していく予定である。

- (6) TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha\alpha$ IEL のシングルセル RNA シークエンス解析を行った結果、分子 A の発現が高いクラスターが Rbpj-8 KO で出現した。Thy1 と分子 A の発現を TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha\alpha$ IEL で観察すると、両分子の発現から TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha\alpha$ IEL は 3 つの IEL サブセットに細分されることを見出した(図 2)。3 つのサブセットを抗 CD3 抗体で刺激すると、分子 A 陽性 Thy1 陽性の IEL は高い増殖性を示し、さらに細胞表面マーカーの解析から、他の 2 つのサブセットよりも活性化細胞に発現する分子を高発現していた。

成果のまとめ；

本研究によって、これまで明らかではなかった、TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha\alpha$ IEL のサブセットが明らかになり、その多様性は Notch シグナルによって保たれていることが示唆された。Notch シグナルを欠損すると、IEL はより活性型のサブセットに偏った。また、これまで、CD8 $\alpha\alpha$  の Thy1 の発現に関して、TCR $\alpha\beta$  型では Thy1 陰性が Thy1 陽性よりも成熟 IEL であることが報告されているが、TCR $\gamma\delta$  型に関しては遺伝子発現パターンや細胞表面分子の発現から、Thy1 の発現の有無によって成熟・未成熟を区別できないようなデータを得ており、TCR $\alpha\beta$  型と TCR $\gamma\delta$  型では異なる制御が存在する可能性が考えられた。また、Thy1 陰性 TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha\alpha$  に関して、少なくとも分子 A で 2 つのサブセットに分類できることから、IEL の多様性、あるいはいくつかの分化段階を Notch シグナルが制御している可能性が示唆された。さらに、Rbpj-8KO マウスでは活性化の特徴を示す分子を発現する IEL が増加することから、Notch シグナルは TCR $\gamma\delta$  型 CD8 $\alpha\alpha$ IEL の活性化を抑え、恒常性維持に関与している可能性が示唆された。Notch シグナルは IEL 制御を介して腸管の病態に重要な役割を示す可能性が考えられるが、詳細な分子機構や病態における生理的な役割については今後の研究で進めていく。



**図2, Rbpj-8KO由来TCR $\gamma\delta$ +IEL のフローサイトリー解析； Rbpj-8KOでは分子AとThy1を共発現する細胞集団が増加し (52.6→86.2%)、Thy1陰性の細胞集団は減少する (22.5/20.4→7.2/1.6%)**

< 引用文献 >

- Olivares-Villagómez D *et al.* Trends Immunol, 2018, 39, 264  
 Chen Y *et al.* PNAS, 2002, 99, 14338  
 Inagaki-Ohara K *et al.* J Immunol, 2004, 173, 1390  
 Poussier P *et al.* J Exp Med, 2002, 195, 1491  
 Klose CS *et al.* Immunity, 2014, 41, 230  
 Li Y *et al.* Cell, 2011, 147, 629  
 Reis BS *et al.* Immunity, 2014, 41, 244  
 Ma LJ *et al.* J Immunol, 2009, 183, 1044  
 Ishifune C *et al.* PLoS Biol, 2019, 17, e3000262  
 Vaishnav S *et al.* Science, 2011, 334, 255

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jaroonwitchawan Thiranut, Arimochi Hideki, Sasaki Yuki, Ishifune Chieko, Kondo Hiroyuki, Otsuka Kunihiko, Tsukumo Shin-ichi, Yasutomo Koji	4. 巻 14
2. 論文標題 Stimulation of the farnesoid X receptor promotes M2 macrophage polarization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1065790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukumo Shin-ichi, Subramani Poorani Ganesh, Seija Noe, Tabata Mizuho, Maekawa Yoichi, Mori Yuya, Ishifune Chieko, Itoh Yasushi, Ota Mineto, Fujio Keishi, Di Noia Javier M., Yasutomo Koji	4. 巻 8
2. 論文標題 AIF3, a susceptibility factor for autoimmune diseases, is a molecular facilitator of immunoglobulin class switch recombination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abq0008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishifune Chieko, Tsukumo Shin-ichi, Maekawa Yoichi, Hozumi Katsuto, Chung Doo Hyun, Motozono Chihiro, Yamasaki Sho, Nakano Hiroyasu, Yasutomo Koji	4. 巻 17
2. 論文標題 Regulation of membrane phospholipid asymmetry by Notch-mediated flippase expression controls the number of intraepithelial TCR +CD8 + T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chieko Ishifune, Koji Yasutomo
2. 発表標題 Notch signal controls final differentiation of TCR +CD8 + intraepithelial lymphocytes in the small intestine
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chieko Ishifune, Koji Yasutomo
2. 発表標題 Notch-mediated final differentiation of TCR +CD8 + intraepithelial lymphocytes in the small intestine
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chieko Ishifune, Koji Yasutomo
2. 発表標題 Notch signal controls the number of TCR +CD8 + intraepithelial lymphocytes via phospholipid asymmetry by maintaining flippase ATP8a2
3. 学会等名 Australia-Japan Meeting on Cell Death (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	安友 康二  (YASUTOMO Koji)  (30333511)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授    (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------