

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590536

研究課題名（和文） メモリーT細胞の分化と維持における Notch シグナルの役割

研究課題名（英文） The role of Notch signaling in the development and maintenance of memory T cells

研究代表者

前川 洋一（MAEKAWA YOICHI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10294670

研究成果の概要（和文）：免疫学的記憶は生体を防御する免疫システムにとって必須の機構である。本研究は免疫学的記憶におけるメモリーTリンパ球の分化や維持機構を分子レベルで解明することを目的とした。Notch シグナルに障害がある Tリンパ球を持つマウスではリーシュマニア原虫再感染に対する2次免疫応答に不全が認められた。また、同マウスでは抗原特異的 CD4 陽性 Tリンパ球が早期に消退した。以上から Tリンパ球の長期間の生存に Notch シグナルが緊密に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Immunological memory is essential for providing protection against recurrent infection. However, it is still unknown the molecular mechanism underlying the development and maintenance of memory T cells. Here, we found that the mice bearing Notch signaling-deficient T cells did not show the protective immune response against secondary *Leishmania major* infection, indicating that Notch signaling is critical for memory T cell survival after antigen stimulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫記憶、CD4 陽性 Tリンパ球、感染症、リーシュマニア、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

Tリンパ球の免疫記憶に関する研究は細胞傷害性リンパ球(CTL)へと分化する CD8 陽性 Tリンパ球について主に行われており、知見も多く集積していた。その中で、感作された CD8 陽性 Tリンパ球がメモリー細胞となり生体内で長期間生存し再活性化するために必要な因子のいくつかが明らかとなっていた。

CD4 陽性 Tリンパ球、インターロイキン 2 (IL-2) や IL-15 などの Tリンパ球増殖性サイトカインが細胞外環境因子としてメモリー細胞の長期生存に必要である (Shedlock DJ, et al: Science 2003, Sun JC, et al: Science 2003, Williams MA, et al: Nature 2006, Stoklasek TA, et al: J Immunol 2006) ことや、CD8-T の内在性因子として転写因子である Id2 がメモリー細

胞の生存に重要であることが報告されていた。さらに、感作の条件により形成されるメモリー細胞に質的な差異があること明らかであった(Sarkar S, et al: J Exp Med 2008)。このようにメモリー細胞の維持や再活性化は CD8 陽性 T リンパ球内・外のいくつもの因子により制御されているが、感作された CD8 陽性 T リンパ球の中からどのようにメモリー細胞が形成されてくるのか、エフェクターとメモリーの分化がどのように制御されているのかについては未だ明らかではなかった。しかし、メモリー細胞への分化は細胞外因子によって制御されている可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

私たちは Notch シグナルがリンパ球活性化と分化を制御するという現象を解明していく中で、免疫学的記憶現象に Notch シグナルが関与しているのではないかとこの着想を得た。私たちは、免疫応答という生命現象を Notch シグナルという側面から解明していくべく研究を遂行しており、本研究は免疫学的記憶現象に焦点を当てた解析を行い、免疫学的記憶細胞への分化やその維持あるいは再活性化における Notch シグナルの機能を明らかにしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

1) マウス

RBP-J^{flox/flox} マウスを CD4-Cre マウスと交配し TCRαβ T リンパ球特異的 RBP-J 遺伝子を欠損するマウス (RBP-J^{flox/flox}:CD4-Cre, RFF4) を作出した。またこのマウスを BALB/c 背景へと戻し交配した。OVA 抗原特異的 TCR Tg マウス (OT-II) と RFF4 マウスを交配し RFF4-II マウスを作出した。

2) 免疫

抗原特異的免疫応答を観察するためマウス後肢足蹠に卵白アルブミン OVA を完全フロイントアジュバントとともに免疫した。その後、経時的に免疫所属リンパ節細胞を分離し試験管内にて OVA とともに培養した。培養 3 日目に ³H-チミジンの取り込みによる OVA 抗原特異的 T リンパ球増殖を観察した。

3) *Leishmania major* 感染

マウス後肢足蹠に 5x10⁶ の *Leishmania major* (*L. major*) を接種した。その後経時的に接種足蹠の肥厚を観察した。いくつかの実験では *L. major* 接種の前後に抗 IL-4 抗体 (200μg/匹) を腹腔内投与した。再感染実験では、初感染と反対側の足蹠に 1x10⁷ の *L. major* を接種し、経時的に肥厚を観察した。

4. 研究成果

1) RFF4 マウスにおける抗原特異的 T リンパ球応答

マウスを OVA で免疫後 5 日目、10 日目、20 日目に免疫所属リンパ節を分離し試験管内にて OVA により再刺激した (図 1)。免疫後 5 日目では RFF4 マウスは野生型マウスと同程度の反応を示した。しかし 10 日目では RFF4 マウス由来所属リンパ節細胞では増殖の減弱傾向が認められ、免疫後 20 日目では RFF4 マウス所属リンパ節細胞の抗原特異的増殖は顕著に低下した。このことから RFF4 マウスでは免疫後抗原特異的 T リンパ球はいったん活性化されるが、その後抗原特異的 T リンパ球応答が消退することが示唆された。

2) 活性化した抗原特異的 RBP-J 欠損 T リンパ球の早期消失

RFF4 マウスでは抗原免疫後、一度は抗原特異的な T リンパ球応答を示すもののその応答は野生型マウスと比較して早期に消退する。この原因として RFF4 マウスでは(1)抗原特

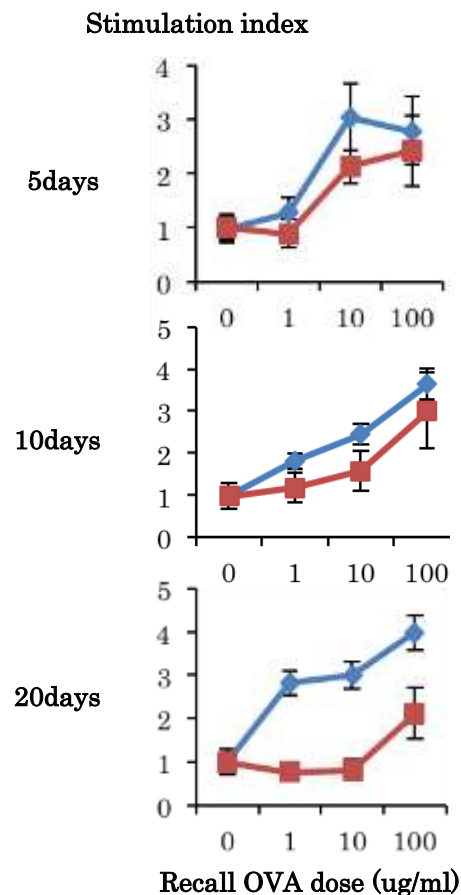


図 1、OVA 抗原免疫マウス所属リンパ節細胞の OVA 再刺激に対する増殖反応：野生型、赤：RFF4

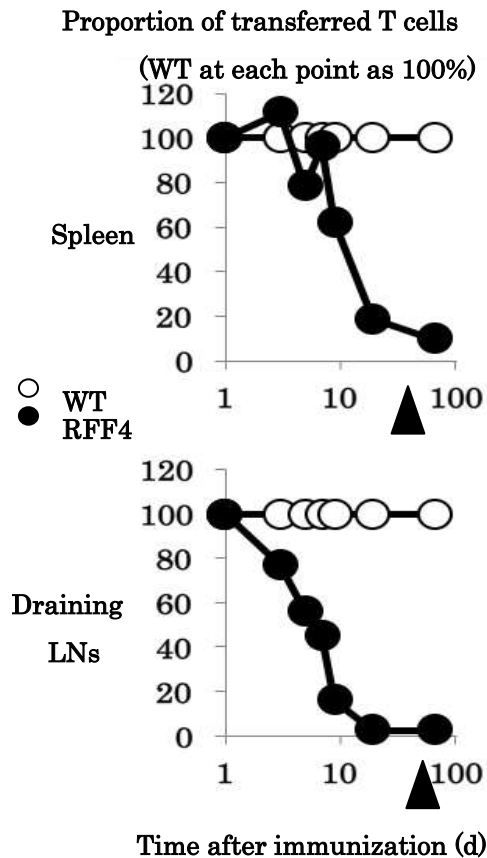


図2、OT-II TCR Tg CD4 陽性 T リンパ球 移入マウスにおける RFF4 由来 T リンパ球 の推移
各々の解析時点で同時に移入した野生型 OT-II TCR Tg CD4 陽性 T リンパ球を 100%としたときの相対的な RFF4 由来 CD4 陽性 T リンパ球数。▲は OVA の再免疫を示している。

異的 T リンパ球が抗原に反応しない麻痺状態となった、(2)抗原特異的 T リンパ球が所属リンパ節に留まらず他の場所に移動した、(3)抗原特異的 T リンパ球が体内から消失した、の3つの可能性が考えられたため、次にこの点について検証した。生体内で抗原特異的 T リンパ球を検出するために OVA 抗原特異的 TCR OT-II を持つ OT-II トランスジェニックマウスと RFF4 を交配し RFF4-II マウスを作出した。このマウス由来の CD4 陽性 T リンパ球(Thy1.2)と対照群由来 OT-II TCR Tg CD4 陽性 T リンパ球(Thy1.1/1.2)を同数 Thy1.1 マウスに移入し OVA 免疫を行った。その後、経時的に所属リンパ節、脾臓および骨髄中での移入 CD4 陽性 T リンパ球をフローサイトメーターにて検出した(図2)。移植した RFF4 由来 CD4 陽性 T リンパ球は免疫後には所属リンパ節に野生型と同程度に存在していた。またデータは示さないがその時点での細胞分裂も野生型と RFF4 由来 CD4 陽性 T リンパ球間で差は認められなかった。しかし、経時

的に観察すると所属リンパ節、脾臓、骨髄(データは示さず)のいずれにおいても RFF4 由来 T リンパ球は野生型と比較し顕著に減少していた。また初回免疫後 96 日後に同一抗原にて再免疫を行っても、所属リンパ節や脾臓には RFF4 由来 T リンパ球は検出できなかった。この結果から RBP-J 欠損 CD4 陽性 T リンパ球では免疫直後の抗原刺激に対する応答は野生型と同程度であるが、その後は野生型と比較して早期に生体内から消失することが明らかとなった。

3) *Leishmania major* 原虫再感染における抵抗性

RFF4 マウスでは抗原特異的 CD4 陽性 T リンパ球は感作後しばらくの間は野生型 T リンパ球と同程度に活性化するがその後抗原特異的メモリー T リンパ球として長期間生存できない可能性が OVA 免疫実験により示唆された。そこで次にメモリー T リンパ球の生存が抵抗性の発揮に必須である感染実験を行った。*Leishmania major* (*L. major*)感染は C57BL/6 マウスは抵抗性系統である一方、BALB/c マウスは感受性系統である。*L. major* 感染に対する抵抗性は *L. major* 特異的 CD4 陽性 T リンパ球が Th1 型となることで発揮される。そのため *L. major* 感染の前後に抗 IL-4 抗体を投与すると感染感受性の BALB/c マウスが抵抗性となる。そこで抗 IL-4 抗体投与により抵抗性となった BALB/c マウスでは *L. major* 再感染に対してどのよ

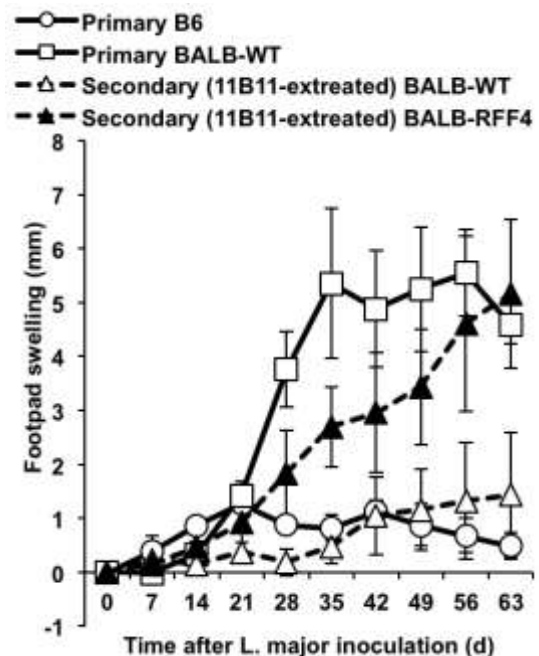


図3、*L. major* 再感染時の感染局所の肥厚の推移

うな反応を示すか検討したところ、このマウスは抵抗性を示した (図3)。他方、BALB/c 背景の RFF4 マウスでも抗 IL-4 抗体投与により *L. major* 初感染に対して抵抗性となったが、初感染後 1 1 週目に *L. major* を再感染させたところ野生型マウスと異なり感染局所は経時的に肥厚していき感染感受性を示した。このことから RFF4 マウスではいったん獲得した *L. major* に対する抵抗性免疫応答、すなわち感染抵抗性メモリー CD4 陽性 T リンパ球が初感染の収束後に生体内から消失したため、再感染に対しては感受性となったと考えられた。

以上のことから T リンパ球での RBP-J 依存的 Notch シグナルはメモリー T リンパ球の分化、あるいは生存に深く関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Iwahashi S, Maekawa Y, Nishida J, Ishifune C, Kitamura A, Arimochi H, Kataoko K, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K. Notch2 regulates the development of marginal zone B cells through Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 418(4):701-707. 査読有、<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.082>
- ② Gaojian L, Arimochi H, Kitamura A, Nishida J, Li S, Kishihara K, Maekawa Y, Yasutomo K. Manipulation of CD98 resolves Type 1 diabetes in NOD mice. *J Immunol* 2012 188(5):2227-2234. 査読有、doi: 10.4049/jimmunol.1102586
- ③ Kitamura A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kawachi I, Nishizawa M, Toyoshima Y, Takahashi H, Standley D, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Obara K, Toyoshima I, Yasutomo K. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J Clin Invest*. 2011 121(10):4150-4160. 査読有、doi: 10.1172/JCI58414
- ④ Shiota A, Taketani Y, Maekawa Y, Yasutomo K, Sata M, Sakai T, Mizuno R, Isshiki M, Yamamoto H, Takeda E. High phosphate diet reduces atherosclerosis formation in ApoE-deficient mice. *J Clin Biochem and Nutri*. 2011 49(2):109-114. 査読有、doi: 10.3164/jcbn.10-150

- ⑤ Kuwahara T, Ogura Y, Oshima K, Kurokawa K, Ooka T, Hirakawa H, Itoh T, Nakayama-Imahiji H, Ichimura M, Itoh K, Ishifune C, Maekawa Y, Yasutomo K, Hattori M, Hayashi T. The Lifestyle of the Segmented Filamentous Bacterium: A Non-Culturable Gut-Associated Immunostimulating Microbe Inferred by Whole-Genome Sequencing. *DNA Res*. 2011 18(4): 291-303. 査読有、doi: 10.1093/dnares/dsr022
- ⑥ Ishifune C, Maekawa Y, Nishida J, Kitamura A, Tanigaki K, Yagita H, Yasutomo K. Notch signaling regulates the development of a novel type of Thyl-expressing dendritic cell in the thymus. *Eur J Immunol*. 2011 41(5):1309-1320. 査読有、doi: 10.1002/eji.201041159
- ⑦ Sugimoto K, Maekawa Y, Kitamura A, Nishida J, Koyanagi A, Yagita H, Kojima H, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K. Notch2 signaling is required for potent antitumor immunity in vivo. *J Immunol*. 2010 184(9):4673-4678. 査読有、doi: 10.4049/jimmunol.0903661
- ⑧ Alam MS, Maekawa Y, Kitamura A, Tanigaki K, Yoshimoto T, Kishihara K, Yasutomo K. Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4+ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 107(13):5943-5948. 査読有、doi:10.1073/pnas.0911755107
- ⑨ Erdenebayar N, Maekawa Y, Moshida J, Kitamura A, Yasutomo K. Protein tyrosine phosphatase-kappa regulates CD4+ T cell development through ERK1/2-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 390(3):489-493. 査読有、<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.117>

[学会発表] (計 3 件)

- ① 前川洋一、Notch signaling regulates the development of intraepithelial CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\alpha\beta$ cells in the small intestine、第 4 0 回日本免疫学会総会・学術集会、2011.11.28、幕張メッセ (千葉市)
- ② MAEKAWA Yoichi、Notch2 signaling is required for potent anti-tumor immunity in vivo、第 1 4 回国際免疫学会、2010.8.23、神戸国際会議場 (神戸市)

- ③ 前川洋一、Notch シグナルは T リンパ球の恒常性を制御する、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009.12.4、大阪国際会議場（大阪市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 洋一 (MAEKAWA YOICHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10294670

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし