

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590585

研究課題名(和文)メモリーTリンパ球の生存/維持を制御するNotchシグナルの標的同定とその調節

研究課題名(英文)Notch signal controls the survival of memory CD4+ T cells

研究代表者

前川 洋一 (MAEKAWA, Yoichi)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10294670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：CD4T細胞は同一病原体の再感染から体を守るメモリーT細胞へと分化する。メモリーCD4 T細胞が長期維持される機構の解明に取り組んだ。Notchシグナルの伝達に必須の分子であるRbpjが欠損すると、メモリーCD4 T細胞の生存が障害されることを同定した。Rbpjを欠損したメモリーCD4 T細胞はインスリン刺激などに対してAktリン酸化が起こらずグルコース輸送体であるGlut1発現を増加させることができないため、グルコースを十分に細胞内に取り込むことができなかった。本研究から、メモリーCD4 T細胞の生存・維持にグルコース取り込み制御を介するNotchシグナルの重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：CD4+ T cells differentiate into memory T cells that protect the host from subsequent infection. The underlying pathways controlling the maintenance of memory CD4+ T cells remain undefined. Memory CD4+ T cell survival is impaired in the absence of the Notch signaling protein known as recombination signal binding protein for immunoglobulin k J region (Rbpj). Rbpj-deficient CD4+ memory T cells exhibit reduced glucose uptake due to impaired Akt phosphorylation, resulting in low Glut1 expression. Together, these data define a central role for Notch signaling in maintaining memory CD4+ T cells through the regulation of glucose uptake.

研究分野：免疫学、寄生虫学

キーワード：免疫記憶 メモリーCD4陽性T細胞 Notchシグナル グルコース代謝 Akt

## 1. 研究開始当初の背景

感作された抗原特異的 T および B 細胞は活性化シエフェクター細胞として抗体の産生や感染細胞の除去を行い、その後は速やかに消退する。一方、活性化した T 細胞や B 細胞の一部は免疫記憶細胞 (メモリー細胞) として長期間、生体内に残存する。免疫記憶は獲得免疫の特徴であるが、抗原特異的応答に比べ免疫記憶の理解は未だに不十分であった。T 細胞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 T 細胞について主に行われており、知見も多く集積していた。感作された CD8 T 細胞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いくつかの因子が同定されていた。CD4 T 細胞やインターロイキン 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こと、また内在性因子として転写因子 Id2 がメモリー細胞の生存に重要であることなどが報告されていた。しかしメモリー CD4 T 細胞の生存や維持に関してはほとんど明らかになっておらず、特に生存に関連する代謝制御機構についての知見は得られていなかった。

私たちは免疫系の構築および機能発揮、特に T 細胞の活性化と分化の制御機構を明らかにする研究を行ってきた。2000 年以降は細胞分化を制御する Notch シグナルに着目し CD4 T 細胞の機能的分化を制御する機構の解明に取り組んできた。一連の研究のなかで Notch シグナルによるエフェクター/メモリー細胞分化制御の可能性について検討したところ、メモリー CD4 T 細胞の生存・維持に Notch シグナルが必須の役割を果たしていることを見出した。

## 2. 研究の目的

予備的研究から得られた知見に基づき、本研究の目的を以下の 2 点とした。

(1) メモリー CD4 T 細胞の維持/生存を制御している Notch シグナルの標的経路の同定

(2) Notch シグナルの制御による免疫学的記憶機構の人為的操作法

## 3. 研究の方法

(1) メモリー CD4 T 細胞の生存における Notch シグナル関連分子 (受容体、リガンド) の同定: CD4 T 細胞特異的に Notch シグナルのマスター遺伝子である RBP-J (RFF4)、受容体である Notch1(N1FF4)、Notch2(N2FF4)、および CD11c 発現細胞特異的にリガンドである Delta-like 1(D1FF11) の各遺伝子を欠損したマウスを作出し、メモリー CD4 T 細胞への影響を検討した (遺伝子名の後ろの括弧内は遺伝子欠損マウスの本報告書での略名)。

(2) メモリー CD4 T 細胞生存に関連する分子の探索: 以下の項目について検討した。  
①試験管内および生体内で抗原特異的に CD4 T 細胞を刺激し、刺激後経時的に以下の項目について検討した。

②IL-2/7 サイトカイン受容体下流分子である Stat5 のリン酸化を抗リン酸化 Stat5 抗体を用いた細胞内染色により検討した。

③メモリー T 細胞の生存に関与すると考えられている抗アポトーシス分子 Bcl2/Mcl1 の発現を定量的 PCR およびフローサイトメトリーにより検討した。

④Akt-mTOR 経路への影響 1: 抗リン酸化 Akt 抗体による細胞内染色、および mTOR 複合体を構成する遺伝子発現を定量的 PCR 法により検討した。

⑤Akt-mTOR 経路への影響 2: mTOR 阻害剤であるラパマイシンを RFF4 マウスへ投与し影響を検討した。

⑥BrdU 取込みを利用した、生体内での抗原特異的 CD4 T 細胞の細胞増殖の推移を検討した。

⑦活性化 CD4 T 細胞のグルコース取込み能をグルコースアナログ (2-NBDG) を用いて経時的に検討した。

⑧グルコース輸送体 Glut の発現をフローサイトメトリーに手解析した。

## 4. 研究成果

(1) Notch シグナル欠失メモリー CD4 T 細胞の生存障害: 免疫応答の際、CD4 T 細胞は抗原特異的なクローンが選択的に活性化され一過性に増殖する。増殖した CD4 T 細胞クローンの一部分はメモリー CD4 T 細胞

胞として長期間生存すると考えられており、メモリーCD4T細胞は同じ抗原によって再刺激をうけると速やかに増殖する機能を持つ。このようなメモリーCD4T細胞の再増殖が免疫記憶現象の鍵となる。はじめに、CD4 T細胞において Rbpj 遺伝子欠損により Notchシグナルが欠失したマウス(RFF4)での抗原特異的CD4 T細胞の再活性について継時的に解析した。その結果、RFF4マウスでは一次免疫後早期には正常であった抗原特異的 T細胞の再増殖が、免疫後長期間が経過するにしたがって徐々に消失していった。

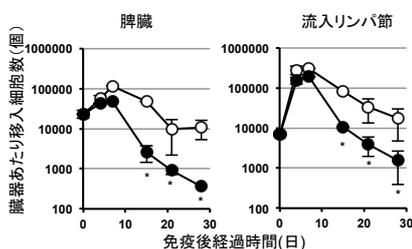


図1、活性化後の抗原特異的CD4T細胞数の生体内推移

次にはCD4 T細胞の Notchシグナルが細胞の生存に関与するかを直接的に解析した。抗原特異的CD4 T細胞の生体内での動態を解析するために、卵白アルブミン(OVA)抗原特異的 T細胞抗原受容体を遺伝子導入されたマウス (OT-II) 由来の CD4 T細胞を用いた。野生型と RFF4背景の OT-II CD4 T細胞をレシピエントマウスに同数移入した後 OVA を免疫した。OVA 免疫後、野生型と RFF4背景の OT-II CD4 T細胞数を継時的に解析してその比率を算出した(図1)。RFF4背景の OT-II CD4 T細胞は免疫後早期には野生型と同様の細胞数であったが、継時的に野生型と比較し顕著な細胞数減少が認められた。また、Ly6C 発現を指標にメモリーCD4 T細胞を解析したところ、RFF4マウス群では野生型マウス群に対して著明に減少していた。これらのことからメモリーCD4 T細胞での Notchシグナルは細胞の長期生存に必須であることが証明された。Notchシグナルを担う Notch受容体には Notch1~4の4種類あるが、メモリーCD4 T細胞の長期生存には Notch1と Notch2の2種類の受容体が必要であることも明らかになった。

(2) 骨髄でのメモリーCD4T細胞生存における Notchリガンド Delta-like 1の要求性：メモリーCD4 T細胞の長期生存を支える Notchシグナル関連微小環境についても解析を行い一部を明らかにした(図2)。メモリーCD4 T細胞の一部は骨髄中で長期間生存することが報告されている。5種類の Notchリガンドのなかで Delta-like 1(Dll1)は骨髄中に存在する CD11c陽性細胞に発現している。CD11c陽性細胞でのみ Dll1遺伝子を欠損させたマウス(D1FF11)では脾臓でのメモリーCD4 T細胞の定着・生存には影響は観察されないが、骨髄中での記憶CD4 T細胞の比率が低下していた。このことから、骨髄中では CD11c陽性細胞が発現する Dll1により刺激される NotchシグナルがメモリーCD4 T細胞の定着・生存を制御していることが明らかとなった。一方、脾臓やリンパ節あるいは諸臓器のメモリーCD4 T細胞はどのような Notchシグナル関連微小環境に支えられているのかについては依然不明である。

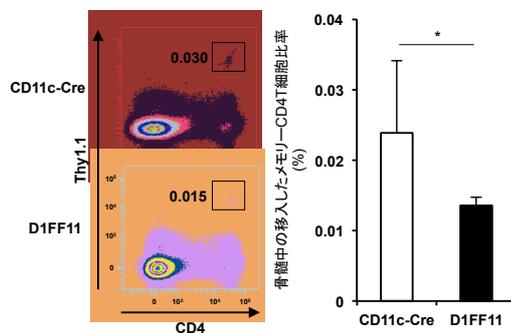


図2、骨髄へのメモリーCD4T細胞の定着

(3) メモリーCD4 T細胞での Notchシグナルによるグルコース代謝制御：Notchシグナルがどのような分子機構によって、メモリーCD4 T細胞の生存・維持を制御しているのかについて検討した。メモリーCD4 T細胞の維持には IL-7などの生存サイトカインが重要であることが報告されているため、はじめに IL-7シグナル経路について解析した。IL-7受容体の発現や受容体下流の Stat5リン酸化を検討したがいずれも RFF4由来CD4 T細胞で差異は認められなかった。さらに RFF4由来メモリーCD4 T細胞の著減が恒常活性型 Stat5導入によって補正す

ることはできなかった。また、Notch シグナル欠損による抗アポトーシス遺伝子の発現への影響は認められなかった。さらに、ラパマイシンの投与によっても RFF4 由来メモリーCD4 T 細胞の著減を回復させることはできなかった。

Notch シグナルは T 細胞発生時期にグルコース取込みに関与しているとの報告がある。そこで筆者らは CD4 T 細胞内へのグルコース取込みについて検討した (図 3)。

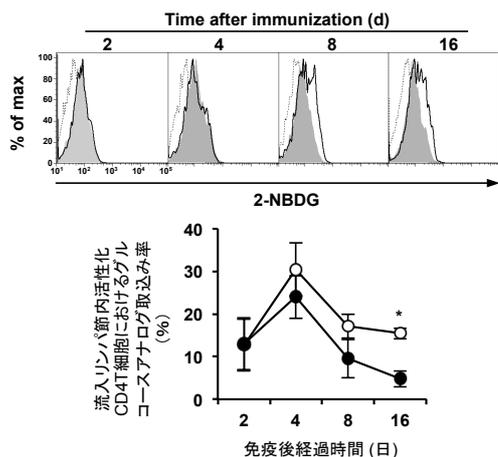


図3. 活性化CD4T細胞のグルコース取込み能の推移

RFF4 由来 CD4 T 細胞は抗原刺激後早期には野生型と同等のグルコース取込み能を示したが、細胞減少が顕著となる免疫 16 日後には有意にグルコース取込みが低下した。グルコース取込み不全が細胞著減の原因か否かを検証するため、グルコース取込み不全を迂回させる目的でグルコース代謝産物であるピルビン酸を作用させることで細胞の減少を補正できるか否かについて検討した。OT-II CD4 T 細胞移入実験において免疫 8 日目から 1 週間ピルビン酸をマウスに投与したところ、RFF4 由来 CD4 T 細胞の減少に回復が認められた。

メモリーCD4 T 細胞について解糖系を中心としたエネルギー代謝を検討した。野生型と RFF4 の両群でメモリーCD4 T 細胞の基礎的な解糖系には有意な差は認められなかった。一方、インスリンによるグルコース取込み促進に伴う解糖系の亢進が RFF4 由来 CD4 T 細胞では全く観察されなかった。このことから、RFF4 由来 CD4 T 細胞では誘導性グルコース取込みに障害があること

が予想された。グルコース取込みに関与するトランスポーターである Glut の発現を検討したところ、野生型ではインスリン刺激に対して Glut1 発現が上昇したが RFF4 では観察されなかった。そこでインスリン受容体下流のシグナル経路を解析したところ、RFF4 由来 CD4 T 細胞では Akt のリン酸化が十分に起きていないことがわかった。また、活性型 Akt を RFF4 由来 CD4 T 細胞に導入すると細胞の減少を抑制した。このことから、RFF4 由来 CD4 T 細胞での細胞著減の原因として不十分な Akt 活性化に伴うグルコース取込み不全によるエネルギー不足が考えられた。

以上の結果から、Notch シグナルはメモリーCD4T 細胞に維持に重要であり、Notch シグナルを人為的に活性化また抑制することでメモリーCD4T 細胞の生存を恣意的に制御できる可能性が示唆された。

#### 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 6 件)

- ① Maekawa Y, Ishifune C, Tsukumo S, Hozumi K, Yagita H, Yasutomo K. Notch controls the persistence of autoimmune memory CD4<sup>+</sup> T cells by maintaining glucose uptake. *Nat. Med.* 2015 21(1):55-61. 査読有 doi: 10.1038/nm.3758.
- ② Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Loilome W, Yongvanit P, Khuntikeo N, Nielsen PS, Paorjukul C, Takahashi Y, Maekawa Y. Milk fat globule epidermal growth factor 8 serves a novel biomarker of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. *Tumour Biol.* 2014 35(3):1985-1995. 査読有 <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13277-013-1264-3>
- ③ Bhuyan ZA, Asanoma M, Iwata A, Ishifune C, Maekawa Y, Shimada M, Yasutomo K. Abrogation of Rbpj attenuates experimental autoimmune uveoretinitis by inhibiting

IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *PloS One* 2014 9(2): e89266. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0089266.

- ④ Nakajima K, Maekawa Y, Kataoka K, Ishifune C, Nishida J, Arimochi H, Kitamura A, Yoshimoto T, Tomita S, Nagahiro S, Yasutomo K. Arnt-Stat3 axis regulates the differentiation of intestinal intraepithelial TCRαβ<sup>+</sup>CD8αα<sup>+</sup> cells. *Nat. Commun.* 2013 4:2112. 査読有 doi: 10.1038/ncomms3112.
- ⑤ Abe T, Hirasaka K, Kagawa S, Kohno S, Ochi A, Utsunomiya K, Sakai A, Ohno A, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Oarada M, Maekawa Y, Terao J, Mills E, Mikawa T. Cbl-b is a critical regulator of macrophage activation associated with obesity-induced insulin resistance in mice. *Diabetes* 2013 62(6):1957-1969. 査読有 doi: 10.2337/db12-0677.
- ⑥ Kuramoto T, Goto H, Mitsuhashi A, Tabata S, Ogawa H, Uehara H, Saijo A, Kakiuchi S, Maekawa Y, Yasutomo K, Hanibuchi M, Akiyama S, Sone S, Nishioka Y. Dll4-Fc, an inhibitor of Dll4-Notch signaling, suppresses liver metastasis of small cell lung cancer cells through the downregulation of the NF-kappa-B activity. *Mol Cancer Ther.* 2012 11(12):2578-2587. 査読有 doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0640.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 前川洋一、安友康二、Protective memory CD4<sup>+</sup> T cells to leishmaniasis are maintained by Notch signaling through the regulation of glucose uptake. 第 8 回 寄生虫感染免疫研究会、2015年2月27、28日、大阪大学微生物病研究所 (大阪府・吹田市)
- ② 石舟千恵子、前川洋一、穂積勝人、安友康二、Notch regulates the differentiation of TCRαβ<sup>+</sup> CD8αα<sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes in the small intestine through Stat5b signaling. 第 4 3 回日本免疫学会学術集会、2014年12

月10~12日、京都国際会議場 (京都府・京都市)

- ③ 石舟千恵子、前川洋一、穂積勝人、安友康二、Notch signaling regulates the differentiation of TCRβ<sup>+</sup>CD8αα<sup>+</sup>Thy1<sup>-</sup> intraepithelial lymphocytes in the small intestine. 第 4 2 回日本免疫学会学術集会、2013年12月11~13日、幕張メッセ (千葉県・幕張市)
- ④ 中島公平、前川洋一、富田修平、善本隆之、安友康二、Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator as a regulator of the differentiation of intestinal intraepithelial CD8αα T cells. 第 4 1 回日本免疫学会学術集会、2012年12月5~7日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑤ 石舟千恵子、前川洋一、安友康二、Notch signaling is essential for the differentiation of XC<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> cells in lamina propria of the small intestine. 第 4 1 回日本免疫学会学術集会、2012年12月5~7日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑥ 前川洋一、安友康二、Notch regulates maintenance of memory CD4<sup>+</sup>T cells by controlling glucose metabolism. 第 4 1 回日本免疫学会学術集会、2012年12月5~7日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑦ Yoichi MAEKAWA, Training Course II: Parasitology. The 11<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 11, 2012, Awaji Yumebutai International Conference Center (兵庫県・淡路市)

[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]

6. 研究組織

(1)研究代表者

前川 洋一 (MAEKAWA, Yoichi)

岐阜大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10294670