

東海大学大学院令和三年度博士論文

Notch シグナルによるパイエル板内の濾胞性  
ヘルパーT 細胞・制御性 T 細胞分化の制御

指導 穂積 勝人教授

東海大学大学院医学研究科  
先端医科学専攻

矢沢 正樹

・この学位申請論文は、International Immunology に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

・International Immunology に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

### 【総括】

Notch シグナルは、胸腺における初期 T 細胞分化において必須の役割を担っている。一方で、末梢リンパ組織の成熟 T 細胞における Notch シグナルの意義については十分な理解がなされておらず、また Notch シグナルが誘導される場所やタイミング、Notch リガンドの種類や発現細胞など不明確な部分が多い。本研究では、パイエル板の濾胞樹状細胞(follicular dendritic cell、FDC)、辺縁細網細胞(marginal reticular cell、MRC)および細網線維芽細胞(fibroblastic reticular cell、FRC)での Notch リガンド Delta-like 4 (Dll4)の強い発現とともに、パイエル板の CD4<sup>+</sup>T 細胞に、Notch シグナルを伝達する活性型 Notch 1 断片(Notch1 intracellular domain: N1ICD)の出現を検出した。また、この N1ICD は、Dll4 の欠失によって消失することを確認した。さらに、N1ICD は、転写因子 Foxp3 を発現する制御性 T 細胞 (Treg 細胞) に多く認められ、パイエル板において、Notch シグナルは、Treg 細胞に効率的に誘導されていることが明らかになった。そこで、T 細胞特異的 Notch 1 /Notch2 欠損(Notch1<sup>f/f</sup> Notch2<sup>f/f</sup> CD4-Cre: N1N2 DKO) マウスのパイエル板を解析したところ、N1N2 DKO マウスでは、対照マウスと比較し、Treg 細胞の増加と濾胞性ヘルパーT 細胞 (Tfh 細胞) の減少が確認された。さらに、N1N2 DKO マウス由来の Treg 細胞では Foxp3 の発現が安定的に維持され、対照マウス由来の Treg 細胞で認められる、パイエル板での Treg 細胞から Tfh 細胞への分化転換が誘導されなかった。以上の結果から、パイエル板に特徴的に発現する Dll4 によって誘導される Notch シグナルは、パイエル板での Treg 細胞と Tfh 細胞のバランスを調整し、その結果、腸内細菌叢の多様性の維持および腸管の免疫応答の制御に寄与していることが示唆された。

### 【研究の背景】

細胞の系列決定は環境シグナルと転写因子によって協調的に制御され、細胞系列特異的なクロマチンの状態と遺伝子発現が確立される。Notch ファミリー分子は、細胞表面上のレセプターおよび転写因子として機能する。Notch レセプターと Notch リガンドの結合により、Notch 細胞内ドメイン(Notch intracellular

domain: NICD)が切断され核内へ移行し、DNA 結合タンパク質である Rbpj とともに形成される複合体が、Notch シグナル制御下の遺伝子発現を調節している。Notch システムは多くの生物において高度に保存されている。哺乳類では Notch レセプターは四種の Notch(Notch1, Notch2, Notch3, Notch4)、Notch リガンドは Delta-like (Dll1, Dll4)と Jagged (Jag1, Jag2)が存在している。これまで、胸腺での初期 T 細胞の分化に Notch1 と Dll4 によるシグナルが必須であることが明らかになっている。すなわち、造血前駆細胞で Notch1 を Mx-Cre 依存的 (I 型 IFN 誘導) に欠損(Notch1<sup>flox</sup> Mx-Cre)させる、もしくは胸腺上皮細胞特異的に Dll4 を欠損(Dll4<sup>flox</sup> FoxN1-Cre)させることにより、T 細胞の分化が阻害され、胸腺内で B 細胞の分化が起こることが示されている。胸腺で T 細胞の分化が行われた後、Notch1 および Notch2 の発現は末梢のほぼ全ての T 細胞サブセット、特に活性化期で維持されている。すでにヘルパー T 細胞サブセット (Th1, Th2, Th17, Tfh)の機能分化における Notch シグナルの関与が報告されており、特に Th2 主導型の免疫応答に Notch シグナルが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。NICD は、*IL4* 遺伝子の 3'エンハンサーと、Th2 分化のマスター転写遺伝子である *GATA3* 遺伝子座の上流領域に直接結合して活性化することが報告されている。一方、Th1 や Tfh 細胞の機能分化に対する Notch シグナルの影響はいまだ議論の余地がある。したがって、Notch シグナルは特定の Th サブセットに対し強力な分化を誘導しているとは考えられておらず、各実験モデルの特定の条件下で分化を微調整していると考えられている。これまで、エフェクター T 細胞の機能調節に Notch シグナルが重要であることは一部示されているが、生理条件下でいつ、どこで、どの細胞が、いずれの Notch リガンドから T 細胞に Notch シグナルを誘導するかについては、まったく明らかにされていない。

CD4 陽性制御性 T 細胞 (Treg 細胞) は、Th サブセットの一つで、自己免疫寛容と恒常性の維持に関与する重要な細胞である。Treg 細胞は自己抗原や腸内細菌および食物抗原に対する過剰な免疫応答を制御している。Treg 細胞には胸腺で分化する tTreg と末梢組織で分化する pTreg 細胞の 2 種類が存在する。転写因子 Foxp3 陽性 Treg 細胞の多くは tTreg 細胞であり、非常に安定した形質を有し、免疫応答を負に制御している。CD4 陽性 T 細胞の一部は腸管などの末梢で pTreg 細胞へ分化する。pTreg 細胞も Treg 特異的なクロマチン構造を持ち、安定的に Foxp3 を発現する。Treg 細胞による免疫応答の制御は生体の恒常性維持に不可欠であるが、これまでに自己免疫性関節炎モデルや実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルなどの炎症環境下で、Treg 細胞が Foxp3 の発現を失い、病原性を示す他のエフェクター Th サブセットへ分化転換することが報告されている。パ

パイエル板では定常状態において、Treg 細胞の Foxp3 が失われ、Tfh 細胞へと分化することが知られ、腸内細菌叢の多様性の維持に寄与することが報告されている。しかし、Treg 細胞における Foxp3 発現維持や発現消失の分子機構についてはいまだ不明確な部分が多い。

小腸のパイエル板は、腸管に存在する多くの腸内細菌に対する免疫応答を制御する重要な場所である。パイエル板内の濾胞性 B 細胞が産生する免疫グロブリン A (IgA) は、腸管に存在する常在菌叢の調整に重要な役割を担っている。さらに、盲腸のリンパ節にはパイエル板と同様に IgA を産生する B 細胞が存在し、産生された IgA は優先的に大腸に移行することが知られている。Tfh 細胞は胚中心(greinal center: GC) B 細胞の活性化に必要であり、パイエル板や虫垂のリンパ節では B 細胞の IgM から IgA へのクラススイッチを誘導する。腸内細菌との共生関係を形成することには、IgA の産生に加えて、Treg 細胞の重要性が知られている。pTreg 細胞は、食物性抗原や腸内細菌によって腸管で誘導され、無害な食物抗原や腸内細菌に対する炎症性の免疫応答を抑制している。さらに、パイエル板の Treg 細胞は GC 依存および GC 非依存の両方の方法で、最適な IgA 産生の調節を介して、多様性のあるバランスの取れた腸内細菌叢の維持に貢献している。したがって、パイエル板における Tfh 細胞と Treg 細胞のバランスは、腸内細菌叢の多様性や恒常性を維持するための重要な要素である。腸管での T 細胞サブセットのバランス異常は、腸内細菌叢の乱れを引き起こし、炎症性腸疾患、アレルギー、メタボリックシンドロームなどの炎症性疾患が引き起こされることが知られている。腸内細菌叢における T 細胞サブセットに関する興味深い事実として、パイエル板にて Foxp3 陽性 Treg 細胞が Tfh 細胞に分化転換することが知られている。パイエル板において Foxp3 陽性 Treg 細胞が Foxp3 の発現を失い、その後 Tfh 細胞へと分化することで、GC B 細胞の IgA 産生を誘導することが示されている。しかし、パイエル板での Treg 細胞が Tfh 細胞へと分化する分子機構については明らかとなっていない。

本研究では、パイエル板の FDC、MRC、FRC と呼ばれる間葉系の細胞が定常状態で Notch リガンド Dll4 を発現していることを明らかにした。また、パイエル板の CD4 陽性 T 細胞の中では、Treg 細胞において、Notch1 シグナルが誘導されたことを表す N1ICD が検出され、さらにこの N1ICD は、Dll4 欠損マウスでは消失した。一方、T 細胞特異的 Notch1 Notch2 欠損マウス(Notch1<sup>flox</sup> Notch2<sup>flox</sup> CD4-Cre: N1N2 DKO)では、パイエル板において対照群と比較し、Treg 細胞が有意に増加し、Tfh 細胞は著しく減少していた。この形質は、腸内細菌などのマウス個体間の環境要因の違いに起因する可能性が考えられたため、

骨髓キメラマウスを作成し、同一個体にて N1N2 DKO マウス由来の細胞と対照マウス由来の細胞で比較を行った。これらの結果から、パイエル板において、Foxp3 陽性 Treg 細胞と Bcl6 陽性 Tfh 細胞の分化における Notch シグナルの重要性が示された。また、腸間膜リンパ節から分離した Treg 細胞の養子移植を行ったところ、N1N2 DKO マウス由来の Treg 細胞はパイエル板にて CD25 と Foxp3 の発現を安定的に維持したが、対照マウス由来の Treg 細胞は CD25 および Foxp3 の発現が失われ、Bcl6 を発現する Tfh 細胞へと分化していた。以上のことからパイエル板に Notch リガンド Dll4 依存的に発生する Notch シグナルは、定常状態で CD4 陽性 T 細胞を Tfh 細胞へ優先的に分化させること、また Treg 細胞の Foxp3 発現の不安定化を誘導し、Tfh 細胞への分化転換を誘導することが示唆された。

### 【考察と展望】

本研究では、パイエル板において、濾胞内の FDC や MRC、T 細胞領域の FRC に発現する Notch リガンド：Dll4 が、T 細胞へ Notch1 シグナルを誘導することを明らかにした。この Notch シグナルは、Treg 細胞への機能分化が優位な環境において Tfh 細胞分化を支持し、その結果 GC B 細胞の出現を誘導することで、IgA 産生を介した腸管の恒常性維持に寄与していると考えられる。

以前の報告では、T 細胞特異的な Notch1/Notch2 欠損マウスを用いた NP-CGG での免疫モデルや寄生虫感染モデルにおいて、Tfh 細胞の分化が阻害され、GC B 細胞の誘導と抗体産生が低下していたが、定常状態のパイエル板で GC B 細胞は低下していなかった。この報告は本研究の結果と一致しないが、この原因はマウスの腸内細菌叢の違いが T 細胞分化に影響を与えていると推察する。また、リンパ節で誘導される Tfh 細胞の機能分化にも FDC および FRC に発現する Dll4 が重要であり、GC B 細胞の効率的誘導に必須と報告されている。しかし、インフルエンザウイルスに対する高親和性の中和抗体は、T 細胞上の Notch1・Notch2 が欠失した状態でも産生されることが示されている。したがって、Tfh 細胞の分化における Notch シグナルの必要性は、抗原の種類や炎症の状態によって異なる可能性がある。これまで得られた知見を整理すると、非炎症性応答が想定される寄生虫や腸内細菌叢の抗原に特異的な Tfh 細胞の分化と抗体の産生は、Notch シグナルに依存しているものと考えられる。

腸管の恒常性を維持するためには、食物や腸内細菌の抗原に対して免疫寛容が誘導され、免疫応答が抑制される必要がある。Treg 細胞は食物や腸内細菌などの抗原に対して T 細胞が過剰な免疫応答を引き起こすことを抑制し、恒常性維

持に重要な役割を果たしている。したがって、腸管の環境には、pTreg 細胞を誘導するための TGF- $\beta$ 1 や IL-10、腸内細菌叢由来の代謝産物またはレチノイン酸が豊富に存在し、pTreg 細胞の分化に優位な環境となっている。一方で、腸管内腔には多くの IgA が分泌されており、この IgA の中和活性が腸内細菌と腸管の接触を遠ざけ、腸内細菌に対する過剰な免疫応答を引き起こすことを防いでいる。IgA の産生は、パイエル板内で Tfh 細胞の支持を受けた GC B 細胞により効率的に行われるが、Treg 細胞の分化が優位な腸管環境下で、どのように Tfh 細胞が機能分化するのかは明らかにされていない。本研究では、パイエル板における Notch シグナルが、食物抗原や腸内細菌を認識する CD4<sup>+</sup>T 細胞または、Treg 細胞から Tfh 細胞への分化に重要な役割を果たしていることを示した。これらのことから、Notch シグナルはパイエル板における Tfh 細胞と Treg 細胞のバランス制御に重要な役割を果たしていると考えられた。

パイエル板での Treg 細胞と Tfh 細胞の関係については、パイエル板環境が Treg 細胞から Tfh 細胞への分化転換を誘導していると報告されているが、同環境の分子的本態については明確にされていない。この報告を我々独自の実験結果から、我々は Notch シグナルがパイエル板での Treg 細胞から Tfh 細胞への分化転換に寄与している可能性を想定した。先の報告では、Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞の Tfh 細胞への分化転換には、まず Foxp3 の発現が消失することが重要であり、これは B 細胞の存在に依存しないことが示されている。その後、B 細胞に依存して Tfh 細胞形質の獲得が進展する。したがって、Treg 細胞から Tfh 細胞への分化転換は、Foxp3 の発現の消失と Tfh 細胞の形質獲得の 2 つの段階に分けられる。Notch シグナルはこの 2 つの段階の両方に寄与していると考えられる。本研究では、N1N2 DKO マウスおよび N1N2 DKO マウス由来骨髓細胞を用いた骨髓キメラマウスの解析から、TCF1 陰性の Foxp3<sup>+</sup> Treg 細胞が有意に増加していることを示した。TCF1 は、胸腺での T 細胞分化に必須である Notch シグナルの直接的な標的遺伝子の一つである。近年の報告では、Foxp3<sup>+</sup> Treg 細胞の TCF1 陰性集団は、機能的に成熟したエフェクター Treg 細胞であることが報告されている。N1N2 DKO にて増加した Foxp3<sup>+</sup> Treg 細胞の TCF1 陰性集団がエフェクター Treg 細胞と同一の性状を有するのかは不明だが、パイエル板の Treg 細胞が TCF1 の発現を維持するためには Notch シグナルが必要と考えられる。TCF1 は Treg 細胞の機能発現に重要な転写因子：Blimp-1 の発現を抑制することが知られており、このことから Notch シグナルが TCF1 発現誘導を介して Blimp-1 の発現を抑制し、Treg 細胞の機能的分化を妨げている可能性が考えられる。また、Notch シグナルは、Rbpj 依存的に Foxp3 の標的遺伝子座への結合を阻害し、pAkt/Foxo1 経路を介して Foxp3 遺伝子のエピジェネティックな安

定性を低下させることで、機能的な Treg 細胞の出現を妨げることも明らかになっている。本研究の結果と合わせ、パイエル板において Notch シグナルは、Treg 細胞の Foxp3 の発現の低下を介して、Treg 細胞の安定性または分化を抑制していることを示唆する。一方、Notch シグナルは腸管上皮幹細胞において Ascl2 の発現を誘導することが報告されている。また Ascl2 は Tfh 細胞の機能獲得に重要な転写因子である。さらに TCF1 は Tfh 細胞の分化に必須な転写因子である。これらの知見から、パイエル板における Notch シグナルが、TCF1 と Ascl2 の遺伝子発現を介して、Tfh 細胞の分化を誘導している可能性が示唆された。

Treg 細胞は炎症環境下では可塑性があり、細胞として不安定であることが報告されている。Foxp3 発現の不安定化がどのような環境下で引き起こされるか詳しいことは明らかにされていないが、Foxp3 の発現が消失した ex-Foxp3 細胞が、さまざまな自己免疫疾患マウスモデルの発症に影響していることが報告されている。したがって、自己反応性 T 細胞は Foxp3 の発現を失った後、環境に応じたエフェクターの表現型を獲得するものと考えられる。本研究で明らかになった Dll4 を介した Notch シグナルもまた、ex-Foxp3 細胞の出現に寄与している可能性が考えられる。近年の立体構造を考慮した Notch と Notch リガンドの結合部位の特定および機能解析の報告から、Dll4 は Notch1 に対して Dll1 とは異なる役割を果たすことが示されている。現在 Notch シグナルの阻害剤として  $\gamma$  セクレターゼ阻害剤(GSI)が用いられるが、GSI は腸管に副作用が生じ治療薬として使用することが難しい。しかし、機能する Notch と Notch リガンドの組み合わせの詳細が明らかになれば、Notch・Notch リガンドの組み合わせに特異的な阻害薬の開発により、副作用の少ない治療薬として開発される可能性が考えられる。将来、本研究で示した Dll4-Notch1 シグナルを介した Treg 細胞の不安定化を標的として、Dll4-Notch1 シグナル阻害剤が、ex-Foxp3 が関与する自己免疫疾患の新たな治療薬になる可能性が想定される。

## 【結論】

本研究から、パイエル板では、他の二次リンパ組織と比較し、間葉系細胞である FDC, MRC, FRC が Notch リガンド：Dll4 を高発現していることが確認された。さらにこの Dll4 は、Treg 細胞を含む CD4<sup>+</sup>T 細胞に Notch1 を介した Notch シグナルを誘導していることが、N1ICD の検出により、初めて直接的に証明された。N1N2 DKO マウスのパイエル板では、Treg 細胞の頻度と細胞数が増加するのに対し、Tfh 細胞は顕著に減少していた。さらに、N1N2 DKO マウス由来の Treg 細胞は、パイエル板における Tfh 細胞への分化転換が起こらず、対照マ

ウス由来の Treg 細胞に比べ、安定した Foxp3 の発現を維持していた。これらのことから、Dll4 によって誘導される Notch シグナルは、Treg 細胞の不安定化に寄与していることが示された。

以上の結果から、本来 Treg 細胞への分化が優位な環境であるパイエル板において、Notch シグナルが Treg 細胞の Foxp3 の発現を不安定化し、同時に Tfh を分化誘導することにより、Treg 細胞と Tfh 細胞の存在比を制御しているものと推察された。すなわち、パイエル板内の Dll4 は、パイエル板の環境要因として、パイエル板特有の T 細胞機能分化に貢献しているものと考えられた。