

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007-2008 年度
 課題番号：19390115
 研究課題名 (和文) Notch/NotchL を基盤とした細胞系譜決定と組織構築の分子機構解析
 研究課題名 (英文) Analysis of the molecular mechanism for the determination of cell fate and the tissue organization with Notch signaling
 研究代表者
 穂積 勝人 (HOZUMI KATSUTO)
 東海大学・医学部・准教授
 研究者番号：30246079

研究成果の概要：

生体防御反応にて中心的な役割を果たす T 細胞は、胸腺にて分化成熟し、末梢リンパ組織に供給される。T 細胞は胸腺に依存して分化するが、その分子基盤については明らかでなかった。本研究では、T 細胞分化に必須の Notch シグナルが、胸腺分化環境を担う胸腺上皮細胞上に発現する Notch リガンド：D114 を介して、胸腺に移動してきた造血未分化細胞に付与され、T 細胞への系列決定が成されることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 7,600,000 | 2,280,000 | 9,880,000 |
| 2008 年度 | 6,900,000 | 2,070,000 | 8,970,000 |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：免疫学、発生生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：Notch、Notch リガンド、細胞系譜、胸腺

1. 研究開始当初の背景

T 細胞分化における胸腺の重要性は、胸腺を欠失するヒト DiGeorge 症候群やヌードマウス (*FoxN1* 遺伝子変異) にて成熟 T 細胞が分化せず、正常な免疫応答が認められないことから明らかであった。しかし、胸腺環境の分子基盤については長らく明確にされず、T 細胞分化の本質を理解することはきわめて難しい課題であった。その間、骨髄にて分化・成熟するもう 1 つのリンパ球である B 細胞の分化が、造血未分化細胞 (HPC) と骨髄ストローマ細胞との共培養により *in vitro* にて再現されたが、胸腺環境の本態と予想された胸腺上皮細胞との共培養では T 細胞は分化せず、胸腺三次元構造が T 細胞分化に必須の分化環境とされた。その後も IL7、SCF といったサイトカインが T 細胞分化に重要との知見が示されたが、いずれも B 細胞分化を支

持する骨髄環境と共有され、T 細胞分化を支持する胸腺環境の特殊性を理解することはできなかった。T 細胞分化の分子機構を理解する上で大きなブレークスルーとなったのは、誘導型 Notch1 遺伝子欠損 (Notch1-floxed) マウスを用いて、Notch1 遺伝子を欠失した HPC は、胸腺にて T 細胞に分化せず、代わりに B 細胞に分化することを示した Rudke 等の報告であった。同時期に、活性化 Notch1 を過剰発現した HPC が骨髄中にて B 細胞に分化せず、CD4/CD8 両陽性 (DP) T 細胞となることが示され、T 細胞分化誘導における Notch1 シグナルの重要性が示唆された。その後、我々を含む 2 つのグループから、過剰 Notch シグナルあるいは Notch リガンド：Delta-like 1 (D111) を介したシグナルにより、骨髄ストローマ細胞を用いた単層培養系にて T 細胞分化誘導が可能なが示

されるに至り、胸腺環境が Notch シグナルを付与する場として理解できる可能性が考えられた。

我々は、T 細胞誘導能を保持することが示された D111 の生理的意義を明らかにするため、D111-floxed マウスを作製し解析したが、D111 を消失させても胸腺での T 細胞分化は正常であること、さらに D11 ファミリー分子の 1 つである D114 が胸腺上皮細胞で発現し、*in vitro* での T 細胞分化誘導能を保持することを明らかにした。こうした解析を通じて、胸腺分化環境を規定する Notch リガンドとして、D114 が機能しているとの仮説を持つに至った。

2. 研究の目的

T 細胞分化に必須の分化環境である胸腺の、T 細胞分化支持基盤を分子レベルで明らかにするため、D114-floxed マウスを作製し、胸腺分化環境から D114 を消失させた場合の T 細胞分化について観察し、D114 の生理的機能を明確にする。さらに、T 細胞分化をモデルとして、Notch システムの機能発現様式について考察し、Notch システムの関与が推測される他の組織発生の理解に寄与することを目指す。

3. 研究の方法

(1) D114-floxed マウスの樹立

D114 遺伝子を Cre/loxP システムを用いて Cre 依存的に欠失させるため、開始コドンを含む第 1 エクソンから第 2、3 エクソンを挟む形で loxP 配列を挿入した変異型 D114 遺伝子を作製し、ES 細胞にて定法に従い、相同遺伝子組換え体を選別した。得られた ES 細胞を元にキメラマウスを作製し、D114-floxed マウスとした。

(2) 免疫組織染色

胸腺組織は、抗ケラチン (Sigma-Aldrich)、ビオチン化抗 D114 (R&D)、抗 K5 (Covance)、抗 K8 (TROMA-I、DSHB、Univ. of Iowa)、抗 CD31 (eBioscience) 抗体を用いた。Notch1 細胞内断片の染色では、分取した細胞を 4%PFA 固定した後、サイトスピン標本とし、105°C、5 分間の抗原活性化処理を行い、抗 ICN1 (Cell Signaling Technology) 抗体を用いて染色した。

(3) レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入

マウス胎仔 (E15.5) 肝臓より系列マーカー陰性 c-kit 陽性細胞を分取し、濃縮レトロウイルス液と混合後遠心感染を行い、洗浄後、胎仔胸腺器官培養あるいは放射線照射マウスに移入した。

4. 研究成果

(1) 胸腺上皮細胞での D114 遺伝子欠失による Notch シグナルの消失

D114 は、D11 ファミリー遺伝子群の哺乳動物では D111、D113 (D113 は細胞内で Notch と結合することによって機能することが示唆され、細胞間にて機能する他の Notch リガンドとは機能的に区別されることが多い) に次いで 3 番目に見出された分子で、血管内皮細胞に特徴的に発現する Notch リガンドと報告されていた。その後、胸腺上皮細胞での発現を示すデータが蓄積し、T 細胞分化誘導を促す胸腺環境の本態である可能性が考えられた。我々も、胸腺上皮細胞での特徴的な発現を、抗 D114 抗体を用いた免疫組織染色により確認し (図 1 A、B)、典型的な上皮組織である腸管や唾液腺では、D114 が血管内皮細胞に限局して発現することを明らかにした (図 1 C)。

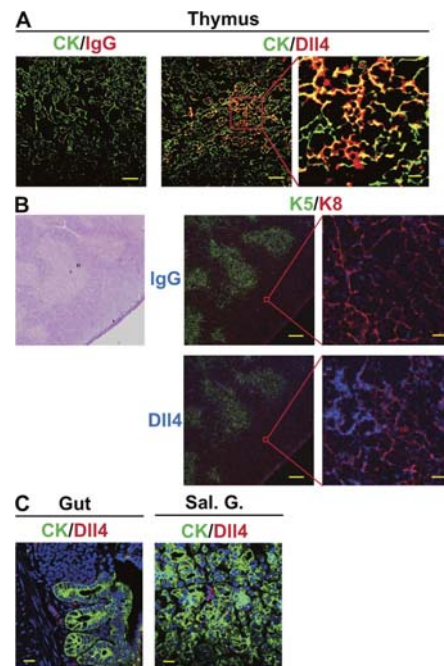


図 1 胸腺上皮細胞における D114 の発現

D114 は、胸腺上皮 (A、B) にて検出されるが、腸管 (C、Gut) や唾液腺 (C、Sal. G.) には検出されない。染色は、抗全ケラチン (CK; A、C、緑色)、抗 K5 (K5; B、緑色)、抗 K8 (K8; B、赤色)、抗 D114 (D114; A、C、赤色; B、青色) またはコントロール抗体 (IgG; A、赤色; B、青色) を使用し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。B、左図は中央図の連続切片の HE 染色図である。A、B では、強拡大図を挿入した (A、B; 右図)。黄色線は、50mm (A、B; 左、中央図)、10mm (A; 右図、B、右図)、200mm (B、中央図)、20mm (C) を表す。

胸腺上皮細胞に発現する D114 の T 細胞分化における役割を解析するため、我々は D114-floxed マウスを作製し (図 2 A)、FoxN1-Cre マウス (胸腺上皮細胞にて Cre が発現、図 2 B) と交配し、胸腺上皮細胞での D114 遺伝子の欠失を誘導した。FoxN1-Cre、D114-floxed マウス胸腺では、ケラチン陽性上皮細胞上に認められる D114 の発現が消失する一方、CD31 陽性血管内皮細胞での発現は残存することが明らかとなった (図 2 C)。同マウス胎仔 (妊娠 15 日目) 胸腺細胞を採取し、Notch1 細胞内断片 (ICN1、図 3 A; Notch リガンドと Notch1 の結合により、Notch1 分子から切断された細胞内領域、Notch シグナル伝達を担う) の存在を調べた結果、対照群では 25-30%の細胞で ICN1 が検出されたのに対し、5%以下の細胞でしか ICN1 の存在を検出できなかった (図 3 B)。このことは、胎仔胸腺内に一定の割合で Notch シグナルが発生していること、胸腺上皮細胞上の D114 の消失によりそうしたシグナルが惹起されなくなることを示唆した。

(2) D114 消失による T 細胞の分化不全と B 細胞の出現

胸腺上皮細胞での D114 の発現が消失したマウスでの T 細胞分化について、胸腺を採取し調べた (図 4 A)。D114 欠失群では、対照群と比較し細胞数は減少していたが、4 週齢にて 107 程度の胸腺細胞が回収でき、*RAG2* 遺伝子欠損マウス等の T 細胞の分化が完全に停止する系統よりも多くの細胞が存在した。胸腺細胞をフローサイトメトリー解析した結果、D114 欠失胸腺では、DP 細胞以降の TCRab 発現 T 細胞や TCRgd 発現 T 細胞がまったく認められず、ほとんどが CD19 陽性の B 細胞であることが示された (図 4 B)。さらに詳細に解析すると、CD4/CD8 両陰性 (DN) 期での最も未分化な細胞を含む DN1 に相当する細胞群 (CD44⁺CD25⁻) のみ認められたが、この集団には c-kit 強陽性 CD24 陰性あるいは弱陽性の T 前駆細胞である DN1a/b 画分が存在せず、B 細胞分化能を比較的強く保持する DN1c 画分 (c-kit 弱陽性 CD24 強陽性) が多く存在した (図 4 C)。また、NK 細胞は、胸腺、脾臓ともに対照群と同等に存在した。以上のことから、胸腺上皮細胞上に発現する D114 は、胸腺に移行してきた HPC に Notch シグナルを付与し、T 細胞系列への分化誘導を行う分子であり、D114 非存在下では、多くの細胞が B 細胞系列に分化することが明らかとなった。

(3) 強制的 Notch1 シグナルによる T 細胞分化の回復

Notch 分子は HPC だけではなく、胸腺上皮細

胞にも発現することから、D114 の消失による上記の T 細胞分化への影響が、胸腺上皮細胞自身への Notch シグナル欠乏による何らかの機能不全を介して間接的に現れた可能性も考えられた。そこで、正常マウス胎仔肝臓由来の HPC に活性化 Notch1 断片 (ICN1) を強制発現させ、D114 を消失した胸腺に導入した場合の T 細胞分化について調べた (図 5)。ICN1 遺伝子をレトロウイルスベクターにて HPC へ導入した後、デオキシグアナシン処理によってリンパ系細胞を除去した FoxN1-Cre、D114-floxed マウス胎仔胸腺 (図 5 A)、あるいは FoxN1-Cre、D114-floxed マウス (図 5 B) へ移入し、対照 (D114-floxed マウス) と比較し、前者では 13 日間の胎仔胸腺器官培養 (FTOC) 後、後者では 3 週後に胸腺を採取し、T 細胞分化について検証した。対照 FTOC では、導入遺伝子に依らず、DP 細胞を含む T 細胞系列の未分化 T 細胞が認められた。一方、空ベクター導入 HPC を移入した D114 消失胸腺を用いた培養では、CD4/8 を発現する細胞はまったく検出されず、DN 細胞のほとんどが CD19 陽性の B 細胞であった。これに対し、ICN1 ベクター導入 HPC を移入した D114 消失胸腺では、D114 消失による T 細胞分化不全が回復し、正常 T 細胞が出現し、B 細胞は認められなかった。同様の結果は、マウス個体に遺伝子導入 HPC を移植したマウス胸腺でも認められた (図 5 B)。以上のことから、ICN1 を介した過剰 Notch シグナルを誘導した HPC は、D114 を消失した胸腺上皮細胞によって分化環境を構成された胸腺でも、十分に T 細胞へと分化可能であり、D114 消失による環境側の機能不全はないものと結論された。よって、胸腺上皮細胞上の D114 は、胸腺に移動してきた HPC 上の Notch1 と結合し、HPC に Notch シグナルを誘導すること、このシグナルが T 細胞分化決定にきわめて重要であり、それが欠失するとほとんどすべての細胞が B 細胞に分化するものと理解できた。すなわち D114 は、T 細胞分化環境としての胸腺を規定する環境要因として機能していることが明らかとなった。

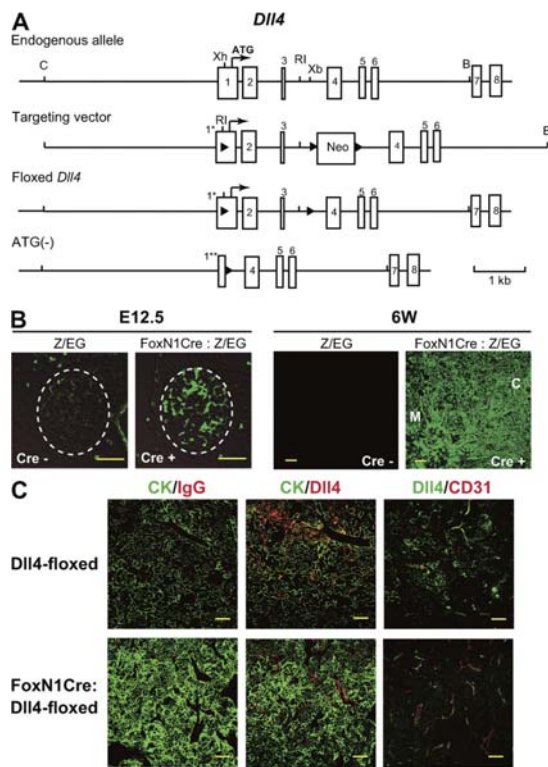


図2 胸腺上皮細胞での Dll4 の消失誘導

(A) Dll4-floxed マウスの作製
 Dll4 遺伝子第1エクソンの一部と第2、第3エクソンを挟む形で loxP 配列を挿入した Dll4 遺伝子改変マウスを作製した。三角、loxP 配列；四角、エクソン；数字、エクソン番号；ATG、開始コドン

(B) FoxN1-Cre マウスによる胸腺上皮特異的遺伝子欠失の誘導
 FoxN1 遺伝子の開始コドンに合わせて Cre 遺伝子を挿入した BAC ベクターを用いて Tg マウスを作製した。これをレポーターマウス (Cre 依存的に GFP を発現) と交配し、胎齢 12.5 日 (E12.5) および 6 週齢 (6W) にて胸腺を採取し、GFP の発現を調べた。胸腺上皮細胞にて GFP の発現を認めた。

(C) Dll4 欠失の誘導
 Dll4-floxed マウスを FoxN1-Cre マウスと交配し、遺伝子欠失を誘導した。Dll4-floxed (上段) あるいは Dll4-floxed, FoxN1-Cre (下段) マウス胸腺を、抗全ケラチン (CK、緑色、左と中央図)、抗 Dll4 (Dll4；赤色、中央図；緑色、右図)、抗 CD31 (CD31、赤色、右図) またはコントロール抗体 (IgG、赤色、左図) で染色した。Dll4-floxed, FoxN1-Cre マウスにて、胸腺上皮細胞での Dll4 の発現が消失した。

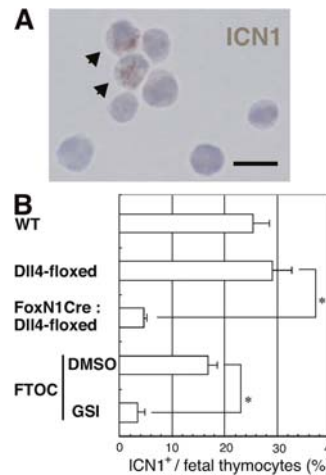


図3 Dll4 欠失胸腺での Notch シグナルの減弱

(A) Notch1 細胞内断片 (ICN1) の検出
 胎齢 15.5 日胸腺細胞にて抗 ICN1 抗体を用いて ICN1 が検出される (矢印)。黒線は、10µm を表す。

(B) Notch シグナルの減弱
 ICN1 を保持する胸腺細胞の比率を、野生型 (WT)、Dll4-floxed、Dll4-floxed:FoxN1-Cre マウス胎仔 (E15.5) 胸腺細胞、あるいは野生型マウス胎仔胸腺 (E15.5) を 4 日間、g-セクレターゼ阻害剤 (GSI) 存在あるいは非存在下にて器官培養した胸腺細胞にて、調べた。Dll4-floxed:FoxN1-Cre マウスにて著しい頻度の低下が認められた。GSI 存在下での器官培養でも、GSI の作用の低下に伴って ICN1 産生が抑制される結果を確認できた。

(4) Notch システム機能発現様式

これまで、Notch・Notch リガンドを介した Notch シグナルは、多細胞生物の分化、発生に大きく寄与することが様々なモデル動物を用いて明らかにされてきた。こうした一連の研究では、Notch と Notch リガンドはそれぞれきわめて均一あるいは類縁の細胞間で相互作用し、Notch 発現細胞に Notch シグナルを付与しつつ Notch リガンドの発現を抑制することで、他方の Notch リガンド発現細胞に同シグナルを誘導せず、両細胞がそれぞれ異なった細胞系譜に分化を促すと理解されてきた (側方抑制 (lateral inhibition) 理論)。しかし、我々の研究にて明らかにされた胸腺上皮細胞上の Notch リガンド: Dll4 は、明確に分化環境要因として働き、そこに移動してきた HPC へ Notch シグナルを付与することが一義的な役割と理解された。これは、類似性を持たない細胞間での Notch シグナル誘導機構が生理的に重要な役割を果たす最初の実証例と考えられた。

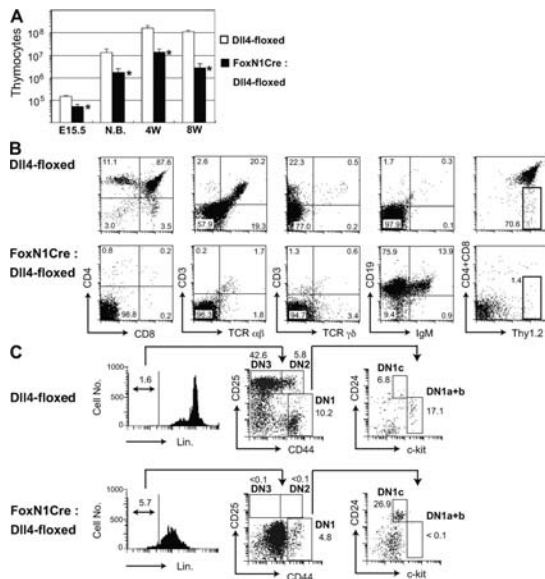


図4 D114 消失胸腺での T 細胞の分化不全

(A) 胸腺細胞数

D114-floxed および D114-floxed : FoxN1-Cre マウス胸腺細胞数を胎齢および週齢を追って調べた。星印は優位の差 (t 検定、 $P < 0.001$) を示す。N. B. : 新生仔

(B) フローサイトメトリー解析

4 週齢両マウス胸腺細胞を、表記の抗体にてフローサイトメトリーにて解析した。数字は各画分の存在比率を表す。

(C) 胸腺未分化ステージの解析

4 週齢両マウス胸腺細胞における DN1a/b から DN3 までの未分化ステージを解析した。各画分を四角で表し、数字は存在比率を表す。

(5) 本成果の意義と今後の課題

近年、iPS 細胞を含む未分化細胞を用い再生医療を目指した研究が盛んに行われ、未分化細胞移植による組織再生に大きな期待が寄せられている。しかし、未分化細胞が成熟細胞へと分化を遂げる際、必ず適当な分化環境を必要とし、未分化細胞のみでは分化しえないことは明らかである。このことは、分化環境要因を分子レベルで理解することが、未分化細胞を用いた再生医療の実現に向けてきわめて重要なことを示している。Notch シグナルは、胸腺 T 細胞分化にとどまらず、多くの細胞系譜の決定に寄与するものと考えられ、分化環境要因としての Notch リガンドの生理的意義を多方面から追求することは急務の課題と考えられる。

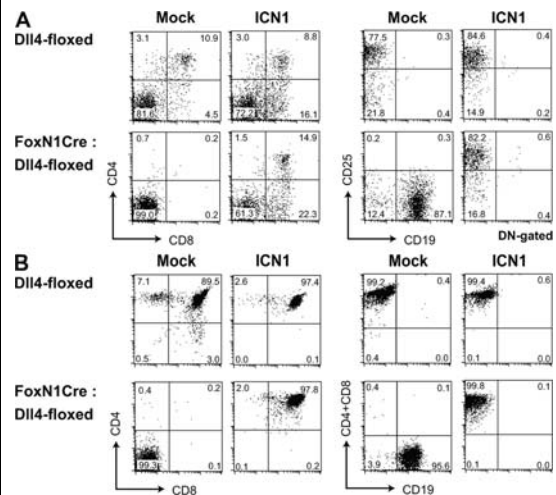


図5 活性化 Notch1 の強制発現による D114 非依存的 T 細胞分化の誘導

マウス胎仔 (E15.5) 肝臓由来造血未分化細胞 (系列マーカー陰性 c-kit 陽性) にレトロウイルスベクターを用いて *ICN1* 遺伝子を強制発現させ、コントロール (空ベクター) 群と比較しつつ、D114-floxed マウス由来 dGuo 処理胎仔胸腺に移入し、13 日間器官培養を行った後、生存細胞をフローサイトメトリー解析した (A)。同様に、遺伝子導入細胞を放射線照射 D114-floxed マウスに静注し、3 週後の胸腺細胞を回収し解析した (B)。

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 4 件)

1. Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K., Yahata, T., Ando, K., Zuklys, S., Holländer, G. A., Shima, D. T. and Habu, S. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J. Exp. Med.* 査読有り 205: 2507-2513, 2008.

2. Hozumi, K., Negishi, N., Tsuchiya, I., Abe, N., Hirano, K., Suzuki, D., Yamamoto, M., Engel, J. D. and Habu, S. Notch signaling is necessary for GATA3 function in the initiation of T cell development. *Eur. J. Immunol.* 査読有り 38: 977-985, 2008.

3. Sheng, Y., Yahata, T., Negishi, N., Nakano, Y., Habu, S., Hozumi, K. and Ando, K. Expression of Delta-like 1 in the splenic non-hematopoietic cells is

essential for marginal zone B cell development. *Immunol. Lett.* 査読有り 121: 33-37, 2008.

4. Oyama, T., Harigaya, K., Muradil, A., Hozumi, K., Habu, S., Iwama, A., Oguro, H., Matsuno, K., Sakamoto, R., Sato, M., Yoshida, N. and Kitagawa, M. Mastermind-1 is required for Notch signal-dependent steps in lymphocyte development in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 査読有り 104: 9764-9769, 2007.

〔学会発表〕(計 5件)

1. 穂積勝人、胸腺分化環境要因としてのNotchリガンド: Dll4 の役割、第31回日本分子生物学会年会、2008.12.11、神戸

2. 阿部奈津美、Notch ligand の機能的差異における転写因子 LRF の役割の検証、第31回日本分子生物学会年会、2008.12.11、神戸

3. 穂積勝人、胸腺分化環境要因としてのDll4 の役割、第38回日本免疫学会学術集会、2008.12.2、京都

4. 平野健一、DN/DP 胸腺細胞分化におけるDll4 の役割、第38回日本免疫学会学術集会、2008.12.2、京都

4. 穂積勝人、Dll4 expressed on thymic epithelial cells is required for T cell development in the thymus.、シンポジウム、第37回日本免疫学会学術集会、2007.11.21、東京

5. 阿部奈津美、Jagged1 が Dll4 と同等のシグナルを伝達する時、造血前駆細胞に T 細胞分化は誘導されるか、第37回日本免疫学会学術集会、2007.11.21、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

穂積 勝人 (HOZUMI KATSUTO)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30246079

(2) 研究分担者

安藤 潔 (ANDO KIYOSHI) (2007 年度)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70176014

今井 賢治 (IMAI KENJI) (2007 年 12 月、東海大学退職に伴い、研究組織より離脱)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70193646

(3) 連携研究者

安藤 潔 (ANDO KIYOSHI) (2008 年度)