

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19H03692

研究課題名(和文)造血幹細胞からTリンパ球への分化における発生段階特異的なNotchシグナルの解明

研究課題名(英文) Stage-specific roles of Notch signaling on induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells

研究代表者

細川 裕之 (HOSOKAWA, HIROYUKI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：60431756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺におけるT細胞の初期発生はNotchシグナルによって誘導される。本研究では、Cas9を恒常的に発現するマウスの造血幹細胞を*in vitro*で培養しT細胞の初期発生を再現する方法と、レトロウイルスによるsgRNAの導入を組み合わせることで、ステージ特異的、且つacute(3日以内)にNotch遺伝子欠損の影響を解析する実験系を確立した。その結果、Notchシグナルはステージ特異的にターゲット遺伝子をダイナミックに変化させ、T細胞関連遺伝子をタイミング良く活性化するだけでなく、他の細胞系列に関連する遺伝子の発現を抑制し、T細胞への運命決定を制御している事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、同じT前駆細胞でも発生段階によってNotchシグナルが制御する遺伝子群がダイナミックに変化することが明らかになった。Notchシグナル経路は、ショウジョウバエから哺乳類まで高度に保存されており、様々な器官の発生や細胞の運命決定を司る。一方で、Notch関連遺伝子の変異が様々なガン細胞で同定されており、その割合は全ガン細胞の5-10%と言われている。本研究をさらに発展させることで、Notchシグナル経路の異常がどのように細胞の腫瘍化を引き起こすのか、その分子メカニズムの解明に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：One of the most important roles of the thymus is providing Notch ligands to the T progenitor cells. Stage-specific activities of Notch signaling in early T cell development are suggested by analysis of expression kinetics of individual Notch targets. To clarify stage-specific roles of Notch signaling, we employed the CRISPR/Cas9-mediated acute and stage-specific gene deletion system in pre- and post-commitment pro-T cells. Notch-regulated target genes before and after T-lineage commitment change dynamically, and we show that this partially reflects shifts in genome-wide DNA binding by Notch-IC/RBPJ complex.

研究分野：免疫学

キーワード：Notchシグナル T前駆細胞 造血幹細胞 転写制御ネットワーク 発生段階特異的

1. 研究開始当初の背景

私たちの体は30兆個以上の細胞からなると言われている。これらの細胞はたった一つの受精卵から分裂し、基本的には同じゲノムDNAを持っているにもかかわらず、200種類以上の性質の異なる細胞集団として様々な臓器を形成し、恒常性を保っている。幹細胞は外界からのシグナルを受けることで、細胞系列特異的な遺伝子発現が誘導され、特定の機能を持った細胞へと分化する。幹細胞から特定の細胞系列への運命決定メカニズムの解明は、生命現象を理解する上で極めて重要である。すべての免疫細胞は骨髄に存在する造血幹細胞から分化し、免疫細胞の発生段階は細胞表面分子の発現パターンを単一細胞レベルで調べることで、容易に検出することができる。さらに、免疫細胞の系列決定を制御できれば、感染症や癌、アレルギー、自己免疫疾患といった免疫関連疾患の新規治療法の開発にもつながる可能性を秘めている。このことから、免疫細胞は、細胞の運命決定メカニズム機構を解析する上で非常に良いモデルであると考えている。

Notchシグナル経路は、ショウジョウバエから哺乳類において高度に保存されており、様々な器官の発生や細胞の運命決定を司る一方で、Notch1 遺伝子の変異が様々なガン細胞で同定されており、その割合は全ガン細胞の5-10%と言われている。このことから、Notchシグナルによる細胞運命決定メカニズムの解明やその制御方法の開発は極めて重要な研究課題と言える。造血系細胞の発生において、Notchシグナルがリンパ球前駆細胞からT細胞への運命決定に必須の役割を担っていることが知られている。T前駆細胞はT細胞への分化能のみならず、B細胞やNK細胞を含む自然リンパ球、ミエロイド系列への分化能を有していることから、前駆細胞からT細胞への運命決定はT細胞特異的な遺伝子発現の誘導と、多能性や他の細胞系譜への分化能を排除することによって成立する事を申請者らは報告してきた。胸腺はリンパ球前駆細胞から成熟T細胞を作るために存在する臓器で、胸腺にたどり着いたリンパ球前駆細胞はその微小環境が発現するNotchリガンドからの刺激を受けることで、T細胞分化プログラムをスタートさせる。Notch受容体やNotchリガンドのloss-of-functionやgain-of-functionの遺伝子改変マウスを用いた個体レベル(steady-state)での解析により、T細胞初期分化におけるNotchシグナルの重要性が明らかにされているが、実際にNotchシグナルがどのような分子機構でT細胞の初期発生を誘導するかについてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

胸腺に移入した直後のT前駆細胞は成熟T細胞のマーカであるCD4とCD8をどちらも発現していないダブルネガティブ(DN)と呼ばれるフェノタイプを示す。DN細胞はさらに細胞表面のCD25とc-Kitの発現パターンによりDN1からDN4に分類することが出来る。胸腺に移入直後のDN1-DN2a細胞はその発生や増殖がNotch1に依存しており、また、T以外の細胞系列への分化能を有していることから、この発生段階はPhase1(Notch-dependent, pre-commitment)と呼ばれている。その後、DN2b-DN3細胞はすでにT細胞への分化が決定づけられているが、さらなる発生にはNotchシグナルが必須であることから、Phase2(Notch-dependent, T-committed)と呼ばれている。胸腺移入直後のDN1細胞において、Notchシグナルは転写因子Tcf7やGATA3の発現を誘導することで、B細胞への分化能を排除すると同時に、ミエロイド系列への分化能の維持をサポートするPU.1の機能を減弱させるとともに、その発現を抑制する。DN2a後期になると、NotchシグナルはGATA3, Tcf7, Runx1と協調的に働き、Bcl11bの発現を誘導する。Bcl11bはzinc finger型転写因子で、自然リンパ球やミエロイド系列への

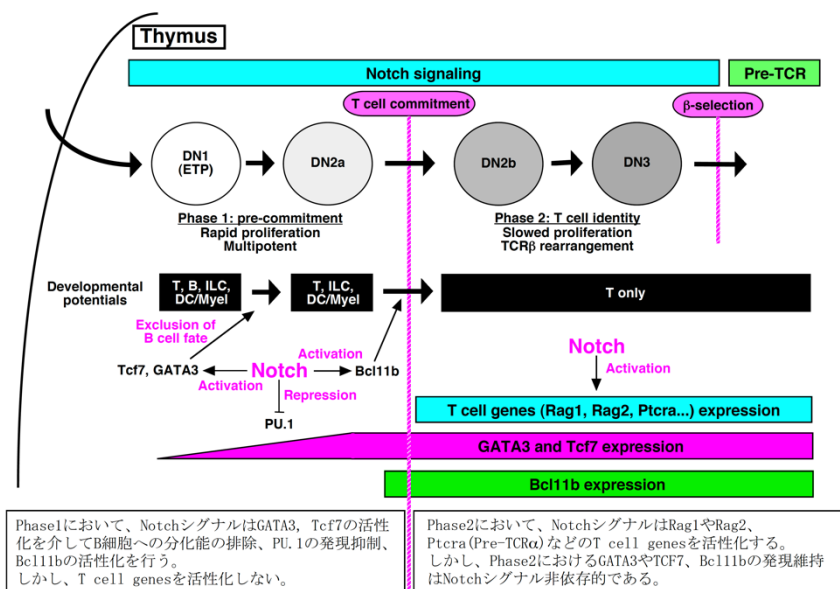


図1, 初期T細胞分化と発生段階特異的なNotchシグナルの役割

胸腺移入直後の DN1 細胞において、Notchシグナルは転写因子Tcf7やGATA3の発現を誘導することで、B細胞への分化能を排除すると同時に、ミエロイド系列への分化能の維持をサポートするPU.1の機能を減弱させるとともに、その発現を抑制する。DN2a後期になると、NotchシグナルはGATA3, Tcf7, Runx1と協調的に働き、Bcl11bの発現を誘導する。Bcl11bはzinc finger型転写因子で、自然リンパ球やミエロイド系列への

分化能をシャットオフすることで T 細胞への運命を決定づける。T 細胞への運命決定がなされ、Phase 2 に移行した DN2b-3 細胞は、Rag1 や Rag2 といった T 細胞受容体の遺伝子再構成に関わる遺伝子群や、Pre-TCR $\alpha$  や CD3 などの pre-T 細胞受容体からのシグナル伝達に重要な分子群を Notch シグナル依存的に発現する。しかし、Phase1 で Notch 依存的にコントロールされていた Tcf7 や GATA3、Bcl11b は Notch シグナル非依存的に発現が維持される (図 1)。

このように、Notch シグナルは T 細胞分化の最も初期段階である Phase1 と Phase2 で異なるターゲット遺伝子を制御する事が示唆されていた。そこで本研究では、Notch シグナルがどのように発生段階特異的な機能を発揮するのか、T 細胞初期分化をモデルとしその分子メカニズムを明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

Cas9 を恒常的に発現するマウスの骨髄から造血幹細胞精製し、Notch リガンドを発現するストローマ細胞上で培養する方法と、レトロウイルスによる sgRNA の導入を組み合わせて、最も初期の T 前駆細胞 (Phase1 および Phase2) においてステージ特異的に Notch を欠失させる方法を独自に確立した。哺乳類に存在する Notch1-4 遺伝子のうち、リンパ球前駆細胞に発現する Notch1 および Notch2 を欠失させると、レトロウイルス導入後わずか 3 日で、重要な Notch ターゲットであり、T 細胞マーカーである CD25 の発現がほぼ完全に消失した (図 2)。この培養系を用いる

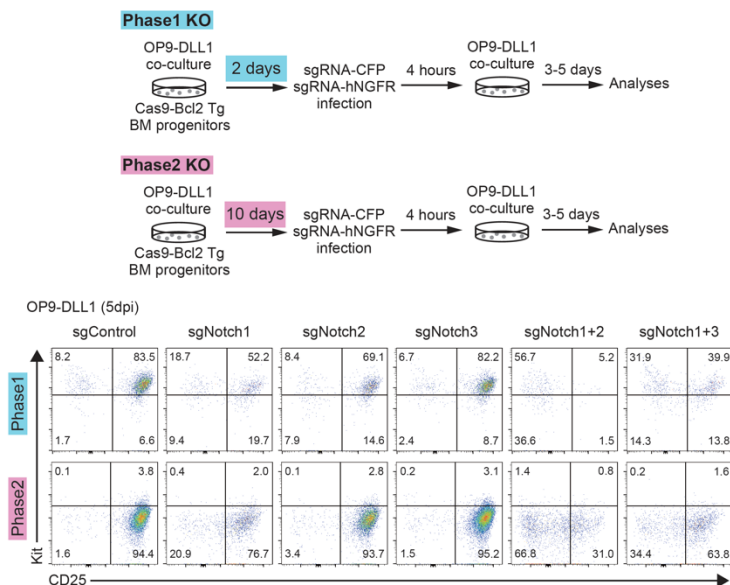


図 2、T 前駆細胞の発生段階特異的な Notch 欠損システムの確立

ことで、Phase1 と Phase2 においてそれぞれ Notch 受容体を欠損させ、その効果をトランスクリプトーム解析により明らかにした。さらに、Notch 複合体の DNA 結合サブユニットである RBPJ の結合ゲノム領域を ChIP-seq 解析により網羅的に同定し、ステージ特異的な Notch ターゲット遺伝子との関連を解析した。

### 4. 研究成果

我々は、Cas9 を恒常的に発現するマウスの造血幹細胞を骨髄から精製し、Notch リガンドを発現するストローマ細胞上で培養することで T 細胞の初期発生を再現する方法と、レトロウイルスによる sgRNA の導入を組み合わせて、ステージ特異的 (Phase1 および Phase2) かつ acute (3 日以内) に Notch 遺伝子欠損の影響を解析する実験系を独自に確立した。この実験系を用いて Notch 遺伝子を欠損させた Phase1 および Phase2 細胞のトランスクリプトーム解析を行うと、面白いことに Notch ターゲット遺伝子は発生段階によって劇的に変化して

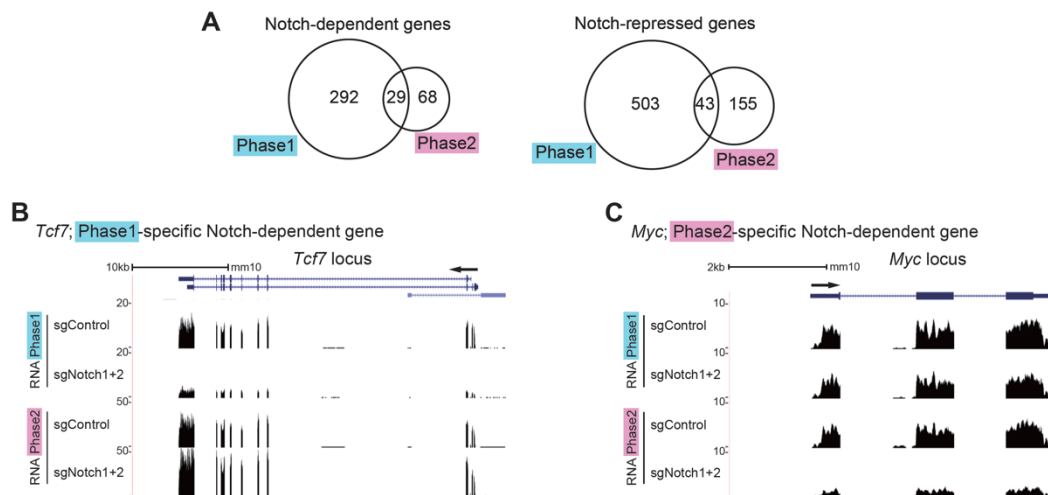


図 3、発生段階特異的な Notch ターゲット遺伝子のダイナミックな変化

いることが明らかになった (図 3)。

Notch はリガンドを認識した後、細胞内ドメイン (intracellular domain; IC) が切断され核へ移行し、DNA 結合タンパクである RBPJ と会合することで、直接ターゲット遺伝子座に結合しその遺伝子発現を制御する。Notch-IC や RBPJ に対するクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析は抗体の quality が原因で困難であったが、我々は細胞のクロスリンクの条件検討と、複数のモノクローナル抗体を混合して使用する事で、Phase1 および Phase2 細胞における RBPJ の ChIP シークエンス解析を行うことに成功した。Notch 遺伝子欠損により発現の変化する遺伝子 (differentially expressed genes; DEGs) の周辺には、RBPJ の結合シグナルが高頻度に認められた (図 4)。さらに、トランスクリプトームと ChIP-seq 解析の結果を統合的に解析し、Notch シグナルが Phase1 特異的なターゲット遺伝子を制御するメカニズムの一部は、Notch シグナルが Phase1 特異的な転写因子である PU.1 の機能に拮抗しているためである事を明らかにした<sup>①</sup>。

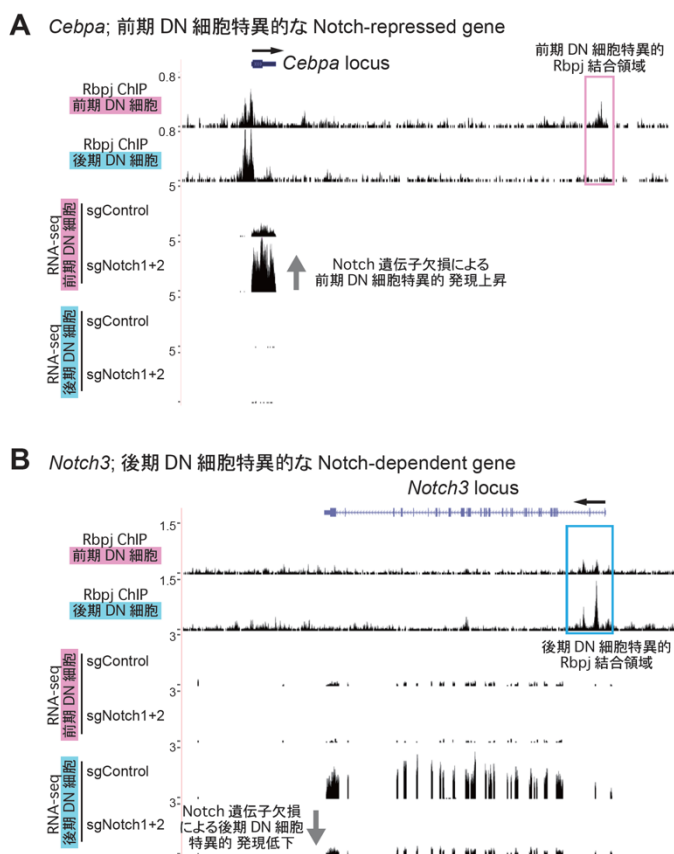


図 4. 発生段階特異的な Notch-RBPJ 結合ゲノム領域の網羅的同定

Notch シグナルが Phase1 特異的な転写因子である PU.1 の機能に拮抗しているためである事を明らかにした<sup>①</sup>。

<引用文献>

- ① Romero-Wolf M, Shin B, Zhou W, Koizumi M, Rothenberg EV, Hosokawa H. Notch2 complements Notch1 to mediate inductive signaling that initiates early T cell development. *J Cell Biol.* 2020 Oct 5;219(10):e202005093. doi: 10.1083/jcb.202005093. PMID: 32756905

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Koizumi Maria, Kama Yuichi, Hirano Ken-ichi, Endo Yusuke, Tanaka Tomoaki, Hozumi Katsuto, Hosokawa Hiroyuki	4. 巻 298
2. 論文標題 Transcription factor Zbtb1 interacts with bridging factor Lmo2 and maintains the T-lineage differentiation capacity of lymphoid progenitor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102506 ~ 102506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102506	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 Fujimoto Masanori, Yokoyama Masataka, Kiuchi Masahiro, Hosokawa Hiroyuki, Nakayama Akitoshi, Hashimoto Naoko, Sakuma Ikki, Nagano Hidekazu, Yamagata Kazuyuki, Kudo Fujimi, Manabe Ichiro, Lee Eunyoung, Hatano Ryo, Onodera Atsushi, Hirahara Kiyoshi, Yokote Koutaro, Miki Takashi, Nakayama Toshinori, Tanaka Tomoaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Liver group 2 innate lymphoid cells regulate blood glucose levels through IL-13 signaling and suppression of gluconeogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-33171-6	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 Suzuki Sawako, Venkatesh Divya, Kanda Hiroaki, Nakayama Akitoshi, Hosokawa Hiroyuki, Lee Eunyoung, Miki Takashi, Stockwell Brent R., Yokote Koutaro, Tanaka Tomoaki, Prives Carol	4. 巻 82
2. 論文標題 GLS2 Is a Tumor Suppressor and a Regulator of Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 3209 ~ 3222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-3914	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 該当する
1. 著者名 Hosokawa Hiroyuki, Masuhara Kaori, Koizumi Maria	4. 巻 43
2. 論文標題 Transcription factors regulate early T cell development via redeployment of other factors: Functional dynamics of constitutively required factors in cell fate decisions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 2000345 ~ 2000345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.202000345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yazawa Masaki, Hosokawa Hiroyuki, Koizumi Maria, Hirano Ken-ichi, Imai Jin, Hozumi Katsuto	4. 巻 33
2. 論文標題 Notch signaling supports the appearance of follicular helper T cells in the Peyer's patches concomitantly with the reduction of regulatory T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 469 ~ 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosokawa Hiroyuki, Koizumi Maria, Masuhara Kaori, Romero-Wolf Maile, Tanaka Tomoaki, Nakayama Toshinori, Rothenberg Ellen V.	4. 巻 218
2. 論文標題 Stage-specific action of Runx1 and GATA3 controls silencing of PU.1 expression in mouse pro-T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20202648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20202648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirano Ken-ichi, Hosokawa Hiroyuki, Koizumi Maria, Endo Yusuke, Yahata Takashi, Ando Kiyoshi, Hozumi Katsuto	4. 巻 10
2. 論文標題 LMO2 is essential to maintain the ability of progenitors to differentiate into T-cell lineage in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e68227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.68227	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 Hirano Ken-ichi, Hosokawa Hiroyuki, Yahata Takashi, Ando Kiyoshi, Tanaka Masayuki, Imai Jin, Yazawa Masaki, Ohtsuka Masato, Negishi Naoko, Habu Sonoko, Sato Takehito, Hozumi Katsuto	4. 巻 13
2. 論文標題 Dll1 Can Function as a Ligand of Notch1 and Notch2 in the Thymic Epithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 852427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.852427	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 Hosokawa Hiroyuki, Masuhara Kaori, Koizumi Maria	4. 巻 43
2. 論文標題 Transcription factors regulate early T?cell development via redeployment of other factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 e2000345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.202000345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shin Boyoung, Hosokawa Hiroyuki, Romero-Wolf Maile, Zhou Wen, Masuhara Kaori, Tobin Victoria R., Levanon Ditsa, Groner Yoram, Rothenberg Ellen V.	4. 巻 118
2. 論文標題 Runx1 and Runx3 drive progenitor to T-lineage transcriptome conversion in mouse T cell commitment via dynamic genomic site switching	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2019655118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2019655118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hosokawa Hiroyuki, Rothenberg Ellen V.	4. 巻 21
2. 論文標題 How transcription factors drive choice of the T cell fate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Reviews Immunology	6. 最初と最後の頁 162 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41577-020-00426-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Masuhara Kaori, Akatsuka Hisako, Tokusanai Mizuki, Li Chenyang, Iida Yumi, Okada Yoshinori, Suzuki Takahiro, Ohtsuka Masato, Inoue Ituro, Kimura Minoru, Hosokawa Hiroyuki, Hozumi Katsuto, Sato Takehito	4. 巻 33
2. 論文標題 AMBRA1 controls antigen-driven activation and proliferation of naive T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 107 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Romero-Wolf Maile, Shin Boyoung, Zhou Wen, Koizumi Maria, Rothenberg Ellen V., Hosokawa Hiroyuki	4. 巻 219
2. 論文標題 Notch2 complements Notch1 to mediate inductive signaling that initiates early T cell development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202005093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202005093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiroyuki Hosokawa, Maile Romero-Wolf, Qi Yang, Yasutaka Motomura, Ditsa Levanon, Yoram Groner, Kazuyo Moro, Tomoaki Tanaka, and Ellen V. Rothenberg	4. 巻 217
2. 論文標題 Cell type specific actions of Bcl11b in early T-lineage and group 2 innate lymphoid cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20190972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20190972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hiroyuki Hosokawa
2. 発表標題 Notch signaling triggers T-lineage program via Tcf7-dependnent and -independent mechanisms
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuichi Kama, Hiroyuki Hosokawa
2. 発表標題 Notch-dependent functional conversion of Runx1 at the initiation of T-lineage program
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 Ken-ichi Hirano, Hiroyuki Hosokawa
2. 発表標題 Notch signaling triggers T-lineage program via Tcf7-dependnent and -independent mechanisms
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 細川裕之
2. 発表標題 初期T 細胞分化におけるPU.1 発現抑制メカニズムの解析
3. 学会等名 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Hosokawa, Ellen Rothenberg
2. 発表標題 GATA3 and Runx1 repress PU.1 expression in early T cell development
3. 学会等名 FASEB 'The Molecular Mechanisms of Immune Cell Development and Function Coference' (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川裕之
2. 発表標題 T細胞の初期発生において転写因子PU.1はコファクターを再配置することにより遺伝子発現を制御する
3. 学会等名 日本分子生物学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Hosokawa, Katsuto Hozumi, Ellen Rothenberg
2. 発表標題 GATA3 and Runx1 repress PU.1 expression in early T cell development
3. 学会等名 日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野健一、細川裕之
2. 発表標題 T細胞の発生を誘導するNotchシグナルの全容の解明
3. 学会等名 京都T cell conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kenichi Hirano, Hiroyuki Hosokawa
2. 発表標題 Etv6 is a Tcf7- and Hes1-independent Notch target gene in the initiation of the T-lineage program
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kenichi Hirano, Hiroyuki Hosokawa
2. 発表標題 Etv6 is a Tcf7- and Hes1-independent Notch target gene in the initiation of the T-lineage program
3. 学会等名 FASEB（国際学会）
4. 発表年 2023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 分担 者	遠藤 裕介  (Endo Yusuke)  (80612192)	公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・室長    (82508)	

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		
米国	カリフォルニア工科大学		