

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790905

研究課題名(和文) Notch シグナルによる肥満細胞の分化制御機構の解明 ‘マウスからヒトへ’

研究課題名(英文) The role of Notch signaling in differentiation of human mast cells

研究代表者

坂田 麻実子(柳元 麻実子)(SAKATA-YANAGIMOTO MAMIKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：80451805

研究成果の概要(和文)：

ヒト肥満細胞の分化におけるNotchシグナルの役割を明らかにするために研究を行った。臍帯血のうち造血幹細胞・前駆細胞分画を固相化したNotchリガンドで刺激、あるいはレトロウイルスによる遺伝子導入によりNotchシグナルを活性化し、肥満細胞の分化誘導を試みた。Notchリガンド刺激によっては、肥満細胞の分化誘導は確認されなかった。遺伝子導入については、系を樹立することができたものの、分化については引き続き観察が必要である。

研究成果の概要(英文)：

We tried to clarify the role of Notch signaling in the differentiation of human mast cells. Hematopoietic stem cells and progenitors, purified from human cord blood cells, were stimulated by plate-coated Notch ligands, or retroviral transduction of Hes-1. Notch-ligand stimulation did not induce mast cell differentiation. We succeeded in retroviral transduction of Notch signaling molecules, but the effect on differentiation of mast cells were still under the observation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：血液腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：Notch シグナル、臍帯血、Delta1-Fc、Hes-1、レトロウイルス

1. 研究開始当初の背景

肥満細胞は、アレルギー、寄生虫感染における重要なメディエーターとして知られる。さらに、近年では、初期免疫、獲得免疫でも重要な役割を果たすことが報告されつつあり、自己免疫疾患の発症にも重要であることが明らかにされている。喘息、花粉症などの

アレルギー性疾患の罹患者数は増加傾向にあり、肥満細胞の機能亢進はアレルギーの病態形成において重要な役割を果たしているが、肥満細胞の機能を一過性に抑制する薬剤はあるものの、根本的に解決する治療法は開発されていない。これは肥満細胞の分化と機能を制御する機序に関する統合的な研究お

よび理解が不十分なことに起因すると考えられる。

一方で、Notch シグナルは造血系では特にリンパ球の発生や分化において重要な分子として知られる。Notch1 を欠損するマウスは胸腺 T 細胞を欠如し (1)、我々のグループは Notch2 を欠損するマウスはマウス脾臓の辺縁帯 B 細胞を欠損することを報告した (2)。しかしながら、これまで Notch シグナルの肥満細胞における役割はほとんど記載されていない。

【肥満細胞の分化における知見およびそれに関する申請者のこれまでの研究の位置づけ】

肥満細胞の分化については、骨髄中で前駆細胞まで分化した後、末梢の組織へ遊走し、最終的には組織中で成熟肥満細胞へと分化すると考えられているものの (3)、十分には明らかにされていない。肥満細胞の分化を制御する外的因子としては Stem cell factor (SCF)、インターロイキン 3 (IL-3) などのサイトカイン、内的因子としては転写因子である GATA ファミリー、C/EBP α 、PU.1 などの転写因子が知られていた。しかしながら、これらの外的因子と内的因子の相互作用は明らかではなかった。申請者のこれまでの研究から、**Notch シグナルはマウス肥満細胞の分化に重要である**との結果が得られた (4)。すなわち、マウス成体骨髄の骨髄球共通前駆細胞、顆粒球マクロファージ前駆細胞を SCF、IL-3、IL-6、TPO 存在下で Delta1-Fc により刺激したところ、顆粒球、マクロファージへの分化が抑制され、肥満細胞への分化が促進された。Notch2 を欠損した前駆細胞では Delta1-Fc の作用はみられないことから、Notch1-4 分子のうち **Notch2 が責任分子**であると考えられた。さらに、Notch2 により肥満細胞の分化を促進するとの現象は、**転写因子 Hes1 および GATA3 の発現制御を介する**ことを明らかにした (4)。すなわち、Notch シグナルシステムを介して、肥満細胞が外的シグナルを内的因子へ転換することにより、肥満細胞の分化を制御する仕組みが明らかとなった。

【肥満細胞の機能における知見およびそれに関する申請者のこれまでの研究の位置づけ】

一方、肥満細胞は周囲の組織環境に応じて成熟し、異なるプロテアーゼなどの発現プロファイルを示すことが知られる (3)。申請者のこれまでの研究から、Notch2 シグナルは粘膜型肥満細胞に特異的なプロテアーゼの発現を制御していた。また、Notch2 コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析から、Notch2 シグナルはマウス成体肥満細胞の小腸粘膜上皮への遊走に必須であった。これらを介して、Notch2 シグナルは寄生虫の排虫に重要な役割を果たしていた (研究業績 2)。

参考文献 (1) Nat Immunol 2004; 5: 247, (2) Immunity 2003; 18: 675, (3) Nat Immunol 2005; 6: 135, (4) Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 7839

2. 研究の目的

申請者の研究全般の最終的なゴールは、ヒトの病態における肥満細胞の役割の解明とそれを利用した病態制御にある。肥満細胞の分化、機能についてはマウス等をモデルとして使用することが多いが、サイトカインへの依存性など様々な点で、マウスとヒトの肥満細胞は異なった性質をもつことが報告されている。したがって、本研究では、これまでの申請者の Notch シグナルのマウス肥満細胞の分化・機能制御に与える影響に関する研究成果が、ヒトの肥満細胞にも応用可能かについて調べることを目的とした。細胞の材料としては、臍帯血を用いて最初に試みることにした。

3. 研究の方法

(1) Notch リガンドによる刺激

ヒト臍帯血のうち造血幹細胞・前駆細胞を含む分画を単離する。臍帯血を単核球分離する。抗 CD133 抗体あるいは抗 CD34 抗体で染色後、CD133 陽性、あるいは CD34 陽性分画を MACS^R (Miltenyi) により分離する。

分離された臍帯血造血幹細胞・前駆細胞分画を Delta1-Fc あるいはコントロール Fc を固相化したプレート上で、サイトカイン stem cell factor (SCF)、interleukin-3 (IL-3)、fms-like tyrosine kinase 3 (Flt3)、thrombopoietin (TPO)、IL-6 存在下で 14 日間培養する。サイトピン後ライト染色により、形態的な観察、およびフローサイトメトリーにより細胞表面マーカーの解析を行う。

(2) ヒト臍帯血由来造血幹細胞、前駆細胞に対する遺伝子導入システムの構築

ヒト臍帯血由来細胞に感染するレトロウイルスの系として、ウイルスベクターとしては pGCDNsam、パッケージング細胞としては 293gpG細胞を用いて、臍帯血において Notch シグナルの下流転写因子 Hes-1 を発現させる系を確立する。

(3) 臍帯血に対する遺伝子導入による肥満細胞の分化誘導

Hes-1 を発現するレトロウイルスを含む 293gpG 細胞の上清と臍帯血造血幹細胞・前駆細胞分画を共培養後、GFP 陽性細胞をセルソーターにより分取し、サイトカイン存在下でメチルセルロースにより培養する。

4. 研究成果

CD133 陽性細胞を Delta1-Fc 刺激下に培養

した細胞では、肥満細胞への分化誘導はみられなかった。

また、臍帯血にレトロウイルスにより Hes-1 を導入するシステムは確立した。

これによる臍帯血の肥満細胞への分化誘導の有無については、観察中である。今後もサイトカインの組み合わせなどの検討を引き続き行う必要があると考えられる。

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 8 件)

1. 坂田 (柳元) 麻実子, 千葉滋 「慢性骨髄性白血病と Hes-1」, 血液フロンティア, 査読無, 4 月号, 2011, pp. 62-66
2. Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito TI, Maruyama H, Morishita Y, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita H, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K, and Chiba S, 'Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine.' *Blood*. 査読有, 2011; 117(1): 128-134
3. Nakahara F, Sakata-Yanagimoto M, Komeno Y, Kato N, Uchida T, Haraguchi K, Kumano K, Harada Y, Harada H, Kitaura J, Ogawa S, Kurokawa M, Kitamura T, Chiba S, 'Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia.' *Blood*. 査読有, 2010; 115 (14): 2872-81
4. Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koefler HP, Ogawa S, 'Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms.' *Nature*. 査読有, 2009; 460 (7257): 904-908
5. Lee SY, Kumano K, Nakazaki K, Sanada M, Matsumoto A, Yamamoto G, Nannya Y, Suzuki R, Ota S, Ota Y, Izutsu K, Sakata-Yanagimoto M, Hangaishi A, Yagita H, Fukayama M, Seto M, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S, 'Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma.' *Cancer Sci*. 査読有, 2009; 100 (5): 920-926
6. Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi

T, Kamijo A, Takahashi K, Takanashi M, Okuyama Y, Yasutomo K, Sakano S, Yagita H, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S, 'Notch activation induces the generation of functional NK cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of IL-15.' *J Immunol*. 査読有, 2009; 182 (10): 6168-78

7. Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Higashi K, Takato T, Kurokawa M, Ogawa S, Chiba S, 'Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells.' *Blood*. 査読有, 2009; 113 (26): 6584-6592

8. 坂田麻実子, 千葉滋, 「Notch 変異と分子標的療法」, 血液・腫瘍科, 査読無, 2009; 58(1): 57-62

[学会発表] (計 12 件)

1. 坂田-柳元麻実子, 「Notch signaling as a mediator of myeloid differentiation and leukemic transformation」, 第33回分子生物学学会年会, 2010年12月9日, 神戸
2. 坂田-柳元麻実子, 「Notch signaling as a mediator of myeloid differentiation and leukemic transformation」, 第5回Notch研究会, 2010年11月8日, 野田
3. 坂田-柳元麻実子, 「Notchシグナルによる骨髄球の分化と白血病化」, 第16回血液科学セミナー, 2010年10月24日, 新宿
4. 三宅康行, 「レトロウイルスを用いたHes-1過剰発現により不死化した骨髄前駆細胞のマイクロアレイ解析」, 第72回日本血液学会学術集会総会, 2010年9月24日, 横浜
5. Yasuyuki Miyake, 'Microarray analysis of myeloid progenitors transformed via retroviral transduction of Hes-1', 第1回JSH国際シンポジウム, 2010年7月16日-17日, 秋田
6. Yasuyuki Miyake, 'Microarray analysis of myeloid progenitors immortalized via retroviral transduction of Hes-1, 第8回幹細胞シンポジウム, 2010年5月13日-15日, 淡路島
7. Masashi Sanada, 'Unique Gain-of-function of mutated c-CBL tumor suppressor in myeloid neoplasms', The American Society of Hematology 51st Annual Meeting, 2009年12月6日, 米国 New Orleans
8. Yasuhisa Yokoyama, 'Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells', 第71回日本血液学会学術集会総会, 2009年10月23日, 京都
9. Fumio Nakahara, 'Hes1 confers self-renewal capability on committed progenitors and induces CML BC-like disease', 第71回日本血液学会学術集会総会, 2009年10月24日, 京都

10. Masashi Sanada, 'Gain-of-function mutations of c-Cbl tumor suppressor in MDS and MDS/MPD associated with 11qUPD', 第71回日本血液学会学術集会総会, 2009年10月24日, 京都

11. Masashi Sanada, 'Gain-of-function mutations of c-Cbl tumor suppressor associated with 11qUPD in myeloid neoplasms', 第68回日本癌学会学術集会総会, 2009年10月2日, 横浜

12. Fumio Nakahara, 'Hes1 confers self-renewal capability on committed progenitors and induces CML BC-like disease', 第68回日本癌学会学術集会総会, 2009年10月1日, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 (柳元) 麻実子

(SAKATA-YANAGIMOTO MAMIKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号: 80451805