

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 6月 1日現在

機関番号：13601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22790278  
 研究課題名（和文）  $\gamma$ -セクレターゼ制御 Delta シグナルの末梢 CD4 T 細胞分化における役割  
 研究課題名（英文） The contribution of Delta signaling regulated by  $\gamma$ -secretase on the differentiation of peripheral CD4 T cells  
 研究代表者  
 長瀬 尚志（NAGASE HISASHI）  
 信州大学・医学部・助教  
 研究者番号：70303451

## 研究成果の概要（和文）：

様々な培養条件下で末梢の CD4 T 細胞を培養する際に Notch, Delta シグナルを加えることでその分化への影響を検討した。Th1, Th2, Treg 等への分化への顕著な影響はいずれの培養でも見られなかったが、わずかではあるがニュートラルコンディションで Notch シグナルが Th17 分化を促進する傾向が見られた。Th17 コンディションではこの傾向はみられず、Notch シグナルは TGF- $\beta$  や IL-6 で誘導する Th17 とは異なる経路で分化を誘導する可能性が考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

I examined the contribution of Notch or Delta signaling to Th differentiation under various culture conditions. Although there was no effect of Notch/Delta signaling on Th1, Th2 and Treg differentiation, a slight effect of Notch signaling on Th17 differentiation under neutral condition was observed. Since this effect was not detected in the Th17 culture condition, this result suggests that Th17 differentiation by Notch signaling was something different from that in the usual Th17 culture condition.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：Notch, Delta, シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

Notch はショウジョウバエからほ乳類まで進化を通じて非常によく保存された膜一回貫通 1 型タンパク質で、それが伝達するシグナルは個の発生や様々な細胞分化において非常に重要である。また、そのシグナル伝達様式は他のシグナルとは異なり非常にユニ

ークである。すなわち、Notch 分子が隣接する細胞上に発現するリガンド（ほ乳類の場合は Delta/Jagged）と結合すると、種々の過程を経て最終的に Notch 分子の細胞内ドメインが  $\gamma$ -セクレターゼによって膜から切り出されて細胞質へ放出される。その後、Notch 細胞内ドメインは核内へと移行し、種々の転写因

子と結合して複合体を形成し、標的遺伝子の発現をコントロールする。

近年、Notch 以外にも多くの $\gamma$ -セクレターゼ基質タンパクが存在することが報告され、そのいくつかはNotchと同様に細胞内ドメインが切り出され、それらが核内に存在することが示されている。我々は $\gamma$ -セクレターゼの基質タンパクであり、NotchのリガンドでもあるDeltaにおいて、Notch同様のシグナル伝達経路があることを神経幹細胞を用いて示した。すなわち、Deltaが近傍細胞上のNotch分子と結合すると、最終的に $\gamma$ -セクレターゼによりその細胞内ドメインが切り出され、核内に移行し、TGF- $\beta$ シグナル経路最終産物の転写因子Smadと結合し、その転写活性を上昇させる。これはユニークなNotchシグナルと同様のシグナル伝達経路がNotch以外でも存在することを初めて具体的に示した報告で、非常に重要な所見であり、さらにNotch, Delta以外の $\gamma$ -セクレターゼ基質タンパクについても同様のシグナル伝達経路が存在する可能性を示している。

Notchシグナルは免疫系細胞においても非常に重要で、広く研究が行われており、造血幹細胞の樹立や自己複製、T細胞へのcommitment、胸腺細胞から成熟T細胞への分化、末梢ヘルパーT(Th)細胞の活性化や分化、またT細胞以外でも広くその関与が報告されている。しかしながら、これらNotchシグナルの役割について、所見が一致していない報告も多く、中でも末梢CD4 T細胞のTh1/Th2分化のNotchシグナルの役割については、多く研究があるものの、結果が異なるものが多い。すなわち、NotchシグナルはTh1分化に寄与するという報告がある一方でTh2分化に重要だとする結果もあり、さらにはTh1/Th2分化には直接関わらないとするものもある。これらの相違は、実験条件の違いなどに起因すると考えられるが、コンセンサスを得るためには今後更なる解析が必要である。

その一方でNotchシグナルとは逆側のDeltaシグナルについて免疫系での研究は皆無である。我々が神経幹細胞で明らかにしたように、Notch/Deltaは双方向性シグナルをもつために、免疫細胞においてもDeltaシグナルの役割解明は不可欠であり、今後早急にもその解明が望まれている。

## 2. 研究の目的

上記のように、Notchは免疫において非常に広範にわたり、重要な役割を果たしていると考えられるが、その広範さ故か非常に複雑であると考えられ、様々な報告の中には矛盾

するようなものも多数見られる。Th細胞分化におけるNotchシグナルの役割も現在までに多数報告されながらも、一致した見解が得られておらず、またDeltaシグナルについては全く研究がなされていない。このため、本研究は末梢CD4 T細胞の分化においてNotch, Deltaシグナルがどのような影響を及ぼすか、特にNotch/Deltaが双方向性シグナルであるため、それを念頭において検討・解明することを目的とする。特に現在までの報告では $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤を用いた実験が多数行われているが、この阻害剤はNotchシグナルだけでなく、Deltaシグナルも阻害する。そのため、今までの報告等の解釈には慎重を期して研究を進めた。また、DeltaシグナルはTGF- $\beta$ シグナル伝達の最終的な転写因子Smadの活性を修飾するため、TGF- $\beta$ がその分化に関わるTregやTh17について注目した。

## 3. 研究の方法

マウス脾臓からCD4 T細胞をマグネットビーズによるソーティングにより調製した。

COS7細胞などにNotchもしくはDeltaの発現ベクターを導入することでNotch/Delta transfectant (transient)をそれぞれ作製し、これらの細胞を用いて、ナイーブCD4 T細胞をCD3/CD28抗体による刺激を入れ培養する際にNotch, Deltaシグナルを添加した。一定時間(5日程度)培養後、T細胞を回収して再刺激を行ない、細胞内サイトカインを検出することでどのような細胞に分化したかを検討した。また、RT-PCRを用いてそれぞれのTh細胞のマスター遺伝子を測定することで検討をした。

また、Notch, Deltaの刺激を安定的に入れるために、HEK293細胞を親株に、Notch, Deltaの安定発現細胞株を作製し、これも実験に用いた。

CD4 T細胞を培養する条件として、まずはニュートラルコンディション(サイトカイン等を全く添加しない)でCD3/CD28刺激を行ない、さらにはTh1(IL-12), Th2(IL-4), Treg(TGF- $\beta$ ), Th17(TGF- $\beta$ +IL-6)を誘導するサイトカインを加えるコンディションで行い、それぞれの分化にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

## 4. 研究成果

T細胞上のNotch, Deltaの発現については、まずRT-PCRでそれらのファミリー分子のmRNAレベルでの発現について検討をした。NotchについてはNotch1, リガンドであるDelta/JaggedについてはDelta-like

protein (D11) 1 と Jagged2 の発現が強く見られた。

フローサイトメーターでの解析では Notch1 の発現が CD3/CD28 刺激により顕著に細胞表面に発現が見られ、D114 もわずかであるが刺激により発現が見られたが、D111 についてはその発現は検出されなかった。

培養についてはまずニュートラルコンディション下にて COS7 細胞を用いた Transient transfectant を用いて Notch, Delta 刺激を加えて検討したが、いずれの条件においても顕著な差は見られなかった。また RT-PCR により、刺激後回収した細胞でのそれぞれの Th のマスター遺伝子 (Th1: T-bet, Th2: Gata3, Th17: ROR- $\gamma$ t, Treg: Foxp3) の発現量を調べたがこれにも大きな差は見られなかった。

COS7 細胞による Transient transfectant を用いた Notch, Delta シグナルは、実験ごとに Transfection を行なって使用するため、毎回発現効率が異なり安定してそのシグナルを加えることが難しいかもしれないと考え、HEK293 細胞を親株にした、安定発現細胞株を作成することとした。またネオマイシン耐性遺伝子を co-transfection することで薬剤耐性をマーカーとしてセレクションし、Notch, Delta それぞれの安定発現細胞株とネオマイシン耐性コントロール細胞をそれぞれ樹立した。それぞれ Notch1 と Delta 1 (D111) の発現はウエスタンブロットおよびフローサイトメーターで高発現を確認した。

上記安定発現株を用いて、様々な培養のコンディションで CD4 T 細胞を刺激する中で Notch, Delta の刺激を加えた。IFN- $\gamma$  や IL-4 を産生する細胞の分化は Th1 や Th2 コンディションおよび、ニュートラルコンディションにおいても大きな差異はなかった。Treg については Foxp3 を染色することで検出したが、ニュートラルコンディションでは Treg の出現自体がいずれの刺激を加えた場合でもほとんど見られず、Treg コンディションにおいては誘導自体は TGF- $\beta$  の添加により高頻度で誘導ができたが、Notch, Delta シグナルの添加による出現頻度の変化は見られなかった。IL-17A を発現する Th17 細胞については Th17 コンディションにおいては大きな差異は見られなかった。ニュートラルコンディションではもともとほとんど産生細胞が誘導されてこないが、Notch シグナルを加えた際にわずかではあるが、IL-17A 産生細胞の割合が増加した。

今回の一連の実験で Th17 の割合にわずかではあるが、Notch シグナルにより増加したが、特に Th17 を誘導する条件ではその傾向

は見られなかったため、通常考えられている TGF- $\beta$  と IL-6 で誘導される Th17 とは全く違う経路で Notch シグナルにより Th17 が誘導される可能性が考えられた。しかしながら、TGF- $\beta$  と IL-6 での Th17 誘導条件についても細かな条件を変えることで Notch, Delta シグナルの影響が出るかもしれない。

本研究の目的の一つである Notch と逆方向の、Delta シグナルの役割については、今回の Th 分化において顕著な影響が見られなかった。CD3/CD28 刺激後の D111 や D114 の発現があまり高くないことから、Delta シグナルの影響はあっても非常に小さいのかもしれない。ただし、刺激コンディション (添加サイトカイン濃度や CD3/CD28 刺激の強度) によってはこれらの高発現を誘導して、役割を果たす可能性があるかもしれないので、この辺りは検討の余地がまだあると思われる。

## 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 4 件)

- ① Nakayama K, Nagase H, Koh CS, Ohkawara T.  $\gamma$ -Secretase-Regulated Signaling: Notch, APP, and Alzheimer's Disease. *Current Psychopharmacology*. 2012;1(2):155-166. 査読有 DOI: 10.2174/2211556011201020155
- ② Nagase H, Koh CS, Nakayama K.  $\gamma$ -Secretase-Regulated Signaling Pathways, such as Notch Signaling, Mediate the Differentiation of Hematopoietic Stem Cells, Development of the Immune System, and Peripheral Immune Responses. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2011 Jun 2;6(2):131-141. 査読有 DOI: 10.2174/157488811795495459
- ③ Ohkawara T, Nagase H, Koh CS, Nakayama K. The amyloid precursor protein intracellular domain alters gene expression and induces neuron-specific apoptosis. *Gene*. 2011 Apr 1;475(1):1-9. 査読有 DOI: 10.1016/j.gene.2010.11.014 (筆頭著者と同等の貢献度)
- ④ Nakayama K, Nagase H, Koh CS, Ohkawara T.  $\gamma$ -Secretase-Regulated Mechanisms Similar to Notch Signaling May Play a Role in Signaling Events, Including APP Signaling, Which Leads to Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol*. 2011 Apr; 31(6):887-900. 査読有

[図書] (計 3 件)

- ① Nakayama K, Nagase H, Koh CS, Ohkawara T.  $\gamma$ -Secretase-Regulated Signaling and Alzheimer's Disease. *Understanding Alzheimer's Disease*, Croatia: InTech Publishers, Inc.; 2013: pp 61-88.
- ② Nakayama K, Nagase H, Koh CS, Ohkawara T. Amyloid precursor protein: its signaling aspect and Alzheimer's disease. *Amyloids*, Halcheck IP, Vernon NR, editors. NY: Nova Science Publishers, Inc.; 2012: pp 33-59.
- ③ Nakayama K, Nagase H, Koh CS, Ohkawara T.  $\gamma$ -Secretase-regulated signaling mechanisms: Notch and amyloid precursor protein. *Neural Stem Cells & Therapy*, Sun T, editor. Croatia: InTech Publishers, Inc.; 2012: pp161-188.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長瀬 尚志 (NAGASE HISASHI)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号：70303451

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：