

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 5月 27日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2012

課題番号：24890146

研究課題名（和文） NotchシグナルによるCX₃CR1陽性小腸粘膜固有層細胞の分化制御研究課題名（英文） Regulation of differentiation of the small intestinal lamina propria CX₃CR1-positive cells by the Notch signal.

研究代表者

石舟 智恵子 (ISHIFUNE CHIEKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80632645

研究成果の概要（和文）：我々はCD11c陽性細胞に特異的な*Rbpj*の欠損で小腸粘膜固有層のCX₃CR1⁺sLPCが消失し、CD11c^{low}sLPCが出現することを見出してきた。本研究によりCX₃CR1⁺sLPCの分化に重要なNotch-RBP-Jシグナルの責任受容体はNotch1と2であり、腸管上皮細胞からのリガンドは必須ではないことが示唆された。また、CD11c^{low}sLPCは、内在性*Rbpj*の欠損により出現し、CX₃CR1⁺sLPCと同じCX₃CR1⁺単球から分化すること、細胞系列は類似するがCX₃CR1⁺sLPCの前駆細胞ではなく、分化が偏向した細胞であると考えられた。これらの結果から、Notch1,2-RBP-JシグナルはCX₃CR1⁺sLPCの分化制御を通じて、腸管免疫応答の恒常性維持に寄与していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：From our research, we observed the CX₃CR1⁺sLPC were markedly decreased and the CD11c⁺sLPC were increased in small intestinal lamina propria by CD11c-dependent deletion of *Rbpj*. We found that Notch1 and/or 2 are essential receptor of the canonical Notch-RBP-J signal required for the differentiation of CX₃CR1⁺sLPC. The Notch ligands supplied by intestinal epithelial cells were not essential. The CD11c^{low}sLPC differentiated from CX₃CR1⁺ monocytes in *Rbpj* deficient mice is not a precursor but one subtype of CX₃CR1⁺ cell. Our data suggest that the canonical Notch1 and/or Notch2-RBP-J signaling affects the homeostasis of intestinal immune responses via regulating the differentiation of CX₃CR1⁺sLPC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	1,100,000	330,000	1,430,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：抗原提示細胞、粘膜免疫、分化、Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

腸管は、上皮細胞を隔てて常在菌や食物抗原にさらされており、定常状態においては制御性 T リンパ球、抑制性サイトカインの働きにより、免疫寛容を起している。一方で、病原菌が侵入した場合にはそれを排除する免疫システムを備えている。例えば、腸管では微生物由来の毒素の中和を行う IgA が免疫グロブリンの約 90% を占め、抗微生物ペプチドの誘導に関与する Th17 も抹消のリンパ組織等と比較して効率よく誘導されている。このような特殊な免疫応答を担う T・B リンパ球の機能を制御している細胞のひとつは、特殊な機能・表現型を有した抗原提示細胞 (APC) である。小腸の粘膜固有層 (sLP) では、3 つの機能的に異なる APC サブセット ① $CX_3CR1^+ CD103^-$ 粘膜固有層細胞 ($CX_3CR1^+ sLPC$)、② $CD103^+ CD8\alpha^{neg}$ 樹状細胞 (DC)、③ $CD103^+ CD8\alpha^{neg}$ DC が報告されている。近年、DC 固有の前駆細胞から分化を遂げる 2 種の DC のうち、② $CD103^+ CD8\alpha^{neg}$ DC の分化に、転写因子 RBP-J を介さない非古典的 Notch2 シグナルが重要であることが報告された (Lewis KL *et al. Immunity* 2010)。しかしながら、これら APC の分化を制御する詳細な分子基盤は明らかではない。Notch シグナルは、免疫系においてリンパ球前駆細胞から T/B 細胞の分化の細胞系譜決定に重要なシグナル伝達経路として知られている。我々は、sLP の APC サブセットの分化・機能における Notch-RBP-J シグナルの役割を検討する目的で研究を行った。現在までに、canonical Notch シグナル伝達に重要な転写因子 RBP-J を、樹状細胞マーカーとして知られている $CD11c$ 発現細胞において欠損する $CD11c-Cre Rbpj^{Flox/Flox}$ (F/F) マウスを用いて sLP 内 APC サブセットを解析した。これまでに、以下に示す結果を得ている。

① $CD11c-Cre Rbpj^{F/F}$ マウスでは sLP において $CD103^{neg} CD4^+ F4/80^+ CD11c^+ CD11b^{int} MHC\ classII$ (MHCII)⁺ の表現型を有した細胞が欠損し、コントロールマウスでは認められない $CD11c$ の発現が低下した細胞集団 $CD4^+ CD11c^{low} CD103^{neg} F4/80^+ MHCII^+ sLPC$ ($CD11c^{low} sLPC$) が出現する。欠損した細胞集団は、過去の報告から、管腔側からの抗原の取り込みや腸管侵入性の細菌感染の克服に重要で、 CX_3CR1^+ の単球前駆細胞から分化するマクロファージ様細胞に相当することが示唆された。

② $CD11c-Cre Rbpj^{F/F}$ マウスで出現した $CD11c^{low}$ の細胞集団 $CX_3CR1^+ CD11c^{low} sLPC$ は $CX_3CR1^+ sLPC$ と同様に、共刺激分子 (CD40, CD80, MHCII) の発現を有し、マウスの十二指腸から投与した蛍光タンパクを付加した卵白アルブミンを細胞内に取り込む能力が

ある。

③ $CX_3CR1^+ sLPC$ の前駆細胞である骨髄の $CX_3CR1^+ Gr-1^{hi}$ の単球は Notch1-3 を発現している。また他の DC や好酸球と比較して $CX_3CR1^+ sLPC$ では Notch2, Notch3 の発現が特異的に高く Notch シグナルの要求性が高いと考えられる。

④ $CX_3CR1^+ sLPC$ は Notch3 欠損マウスでは正常であり、 $CD11c-Cre Notch1^{F/F}$ マウスと $CD11c-Cre Notch1^{F/F} Notch2^{F/F}$ マウスでは欠損していることより $CX_3CR1^+ sLPC$ の分化には Notch1 と Notch2 両方または Notch1 が必要であることが考えられる。

2. 研究の目的

我々は、これまでの研究から、管腔からの抗原の取り込みに重要な $CX_3CR1^+ sLPC$ の分化に転写因子 RBP-J を介した Notch シグナルの重要性を見出している。本研究では ① $CX_3CR1^+ sLPC$ の分化における Notch-RBP-J シグナルの機能と、② $CX_3CR1^+ sLPC$ の小腸における役割を解明することを目的とした。①では $CX_3CR1^+ sLPC$ が骨髄の単球前駆細胞から、どの Notch の構成因子の制御を受けて分化しているかを明らかにし、 $CD11c-Cre Rbpj^{F/F}$ マウスで出現した $CD11c^{low} sLPC$ がどのような細胞であるかを同定することを通して、 $CX_3CR1^+ sLPC$ の分化における Notch シグナルの役割を明らかにする。②の検討では、 $CD11c-Cre Rbpj^{F/F}$ マウスでは、 $CX_3CR1^+ sLPC$ の欠損に伴い、 $CX_3CR1^+ sLPC$ の機能も欠損していると考えられる。そこで疾患モデルを用いて解析を行い、 $CX_3CR1^+ sLPC$ の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) $CX_3CR1^+ sLPC$ の分化機序を解明する。
A. $CX_3CR1^+ sLPC$ の分化に必要な Notch シグナルのレセプター・リガンドを同定する。
a) レセプターの同定 これまでの結果からレセプター Notch1-4 のうち Notch1 または 2 が $CX_3CR1^+ sLPC$ の分化に重要であることが考えられたが、Notch2 単独の重要性については明らかではない。CD11c の発現に依存的な Notch2 単独欠損マウスである $CD11c-Cre Notch2^{F/F}$ マウスを用いて、 $CD11c-Cre Rbpj^{F/F}$ マウスと同様の表現系が現れるか FACS で検討し、責任受容体を同定する。
b) リガンドの同定 どの細胞が、リガンド (Delta-like (Dll) 1, 3, 4, Jagged (Jag) 1, 2) を供給し、 $CX_3CR1^+ sLPC$ の分化に関与しているか検討する。上皮細胞特異的に Dll1 または Jag1 が欠損する $Villin1-Cre Dll1^{F/F}$ マウス、 $Villin1-Cre Jag1^{F/F}$ マウスを用いて、上皮細胞のリガンド欠損により、 $CX_3CR1^+ sLPC$ に影響があるか FACS で検討する。リガンドの供

給源が上皮細胞ではない場合は、腸管ストローマ細胞やその他の細胞であることを考慮し、ストローマ細胞セルラインとの培養実験での検討を行う。

(2) CD11c^{low} sLPC はどのような形質をもつ細胞であるかを検討する。

A. CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F} マウスで出現する CD11c^{low} sLPC は CD11c の発現が低いため CD11c-Cre が機能して RBP-J が欠損した結果、出現した細胞であることを証明する。CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F} マウスと Cag-loxp-Cat-loxp-EGFP マウスを交配し、CD11c-Cre が働いた細胞を EGFP で可視化できるマウスを作製し、CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F} マウスで出現する CD11c^{low} sLPC が RBP-J の欠損により直接的に生じた細胞であることを EGFP の発現を指標に FACS で解析する。

B. CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F} マウスで出現した CD11c^{low} sLPC は RBP-J の欠損により CX₃CR1⁺ sLPC に分化できなかった前駆細胞である可能性や、異なる系譜の細胞に分化が偏向した可能性がある。まず、CD11c^{low} sLPC が CX₃CR1⁺ sLPC と同様に単球から分化した細胞であることを検討するために、*Cx3cr1* 遺伝子座を GFP で置換したノックインマウスと交配し、CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F}-*Cx3cr1*^{gfp/+} マウスを用いて CD11c^{low} sLPC が CX₃CR1 の発現を有するか検討する。前駆細胞である可能性については *Rbpj*^{F/F}-*Cx3cr1*^{gfp/+} マウスから CD11c^{low} sLPC 分画をソーティングにより精製し、Notch シグナルの刺激を入れるために Notch リガンドのひとつである Dll1 を発現したストローマ細胞 OP9-Dll1 またはコントロールの OP9-GFP と、GM-CSF・M-CSF 存在下で 5 日間共培養し、CD11c^{low} sLPC が CX₃CR1⁺ sLPC に変化するか観察する。

(3) CX₃CR1⁺ sLPC の小腸における機能を解明する。

CX₃CR1⁺ sLPC の機能を明らかにするためには、より生理的な炎症モデルや、小腸での感染モデルが必要であるため、① T リンパ球依存性の大腸炎モデルと② 腸管寄生線虫の感染モデルを CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F} マウスに適應する。①の腸炎モデルでは、CD11c-Cre RBP-J^{F/F} マウスと *Rag2* 遺伝子欠損マウスを交配し、CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F}-*Rag2*^{-/-} マウスに CD4⁺ CD45RB^{hi} T リンパ球を移入する T 細胞依存性の大腸炎モデルを適應し、体重減少を観察する。また、②の感染モデルでは、共同研究により、CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F} マウスに腸管寄生線虫 *Heligmosomoides polygyrus* を感染させて、初感染および二次感染後の血中の細胞の FACS 解析、糞便中の寄生虫卵の数、抗体価を測定する。

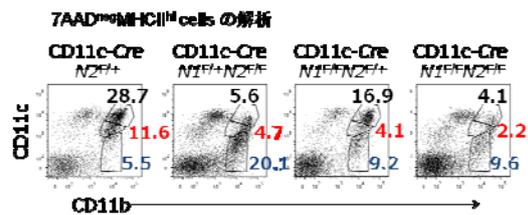
4. 研究成果

(1) レセプター・リガンドの同定

a) レセプターの検討

以前の検討で、CD11c の発現に依存的な *Notch1* 遺伝子の単独及び *Notch1*, 2 遺伝子の両欠損マウスにおいて CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F} マウスで得た結果と同様に CX₃CR1⁺ sLPC に相当する分画 (CD11b⁺ CD11c⁺; 図 1 赤字) が欠損するという結果が得られていた。しかしながら、*Notch2* 遺伝子の重要性については明らかではない。そこで、CD11c-Cre *Notch1* (*NI*)^{F/+} *Notch2* (*N2*)^{F/F} マウスで sLP の APC サブセットをフローサイトメーターで解析した。CD11c-Cre *NI*^{F/F}*N2*^{F/+} CD11c-Cre *NI*^{F/F}*N2*^{F/F} マ

図 1

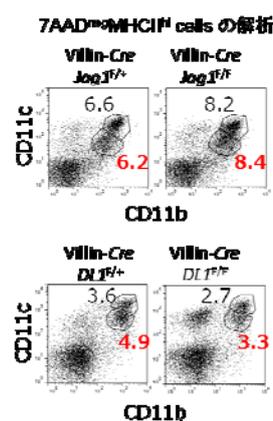


ウスと同様に赤字で示す CX₃CR1⁺ sLPC (図 1) が欠損し、青字で示す CD11c^{low} sLPC が出現した。また、過去の報告と同様に黒字で示す CD103⁺CD8α^{neg}DC 分画 (CD11c^{hi}, CD11b^{hi}) が顕著に減少していた。以上から CX₃CR1⁺ sLPC の分化には *Notch1*, 2 の単独及び両方が重要であり、前駆細胞や CX₃CR1⁺ sLPC の Notch レセプターの発現パターンから分化段階により必要な時期が異なると思われる。

b) リガンドの検討

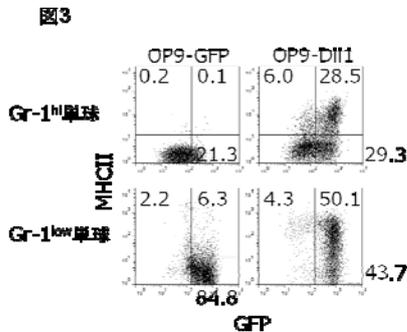
CX₃CR1⁺ sLPC の分化に上皮細胞からのリガンド刺激が重要であるかを検討するために、*Villin1-Cre Dll1*^{F/F} マウス及び *Villin1-Cre*

図 2



Jag1^{F/F} マウスを用いて sLP を解析した。しかし、CX₃CR1⁺ sLPC の分画 (CD11b⁺ CD11c⁺; 図 2 赤字) には変化が認められなかった。よって、上皮細胞からの Dll1, Jag1 のリガンド刺激は CX₃CR1⁺ sLPC の分化には必要ないことが示唆された。

また、CX₃CR1⁺ sLPC の分化への Notch シグナルの重要性について検討するために *Cx3cr1^{gfp/+}* マウスの骨髄から GFP⁺ CD115⁺ CD11b⁺ CD117^{neg} Gr-1^{hi} 単球と GFP⁺ CD115⁺ CD11b⁺ CD117^{neg} Gr-1^{low} 単球を分離し、OP9-Dll1 と M-CSF 存在下でそれぞれマクロファージ系列の細胞へ *in vitro* で分化誘導し

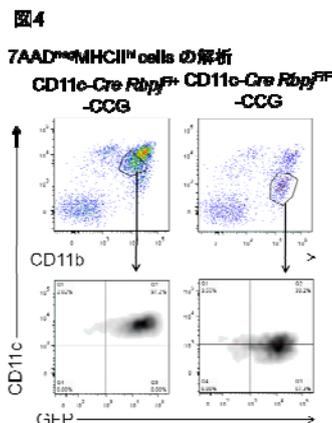


たところ、生体内の CX₃CR1⁺ sLPC と同様の表現型を有する GFP⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ CD11b⁺ の細胞分画が Dll1 刺激存在下では優位に増加した(図3)。

リガンドに関しては *in vitro* の実験系で少なくとも Dll1 刺激により CX₃CR1⁺ sLPC 様細胞が誘導できることが明らかになったが、生理的な条件下では上皮細胞以外のソースが重要であると考えられた。

(2) CD11c^{low} sLPC はどのような形質を持つ細胞であるかの解析について

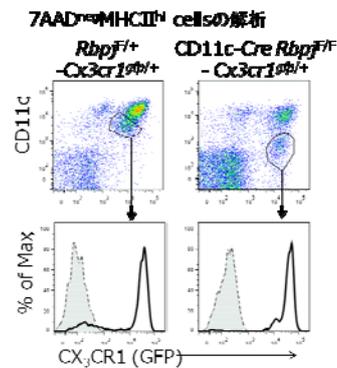
A. CD11c-Cre *Rbpj^{F/F}* マウスで出現する CD4⁺ CD11c^{low} sLPC は CD11c の発現が低いため内在性の *Rbpj* 遺伝子の欠損により生じた細胞であるかを CD11c-Cre *Rbpj^{F/F}* マウスと *Cag-lox-Cat-loxp-EGFP* マウスを交配して作製し、フローサイトメーターで検討した。CD11c-Cre *Rbpj^{F/F}*-CCG マウスで出現する



CD11c^{low} sLPC を用いて解析すると、CD11c-Cre *Rbpj^{F/F}*-CCG マウスの CX₃CR1⁺ sLPC の分画 (CD11b⁺ CD11c⁺) と同様に CD11c-Cre *Rbpj^{F/F}*-CCG で出現する CD11c^{low} CD11b⁺ の細胞集団においても GFP の発現が同様のレベルで認められた (図4)。このこと

から、CD11c^{low} sLPC は間接的な影響ではなく、内在性遺伝子の欠損により出現した細胞であることが考えられる。

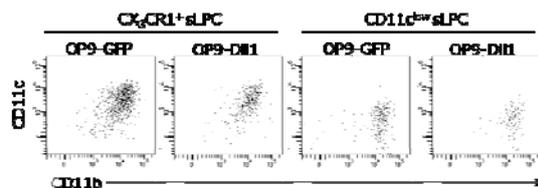
図5



B. CX₃CR1⁺ sLPC と同じ単球細胞から分化した細胞であるかを証明するために CD11c-Cre *Rbpj^{F/F}*-*Cx3cr1^{gfp/+}* マウスの CD11c^{low} sLPC における CX₃CR1 の発現を、GFP を指標に観察した。その結果 CD11c^{low} sLPC が CX₃CR1 陽性であることが示唆された (図5)。よって CD11c^{low} sLPC は CD103⁺ の DC とは系列の異なる細胞であり、CX₃CR1⁺ sLPC と同じ細胞系列であることが示唆された。

さらに、CD11c^{low} sLPC は CX₃CR1⁺ sLPC に分化する前段階の細胞であり、CD11c-Cre *Rbpj^{F/F}* マウスでは Notch シグナルの欠損により分化が途中で止まった CD11c^{low} sLPC が出現するという可能性について検討した。

図6



CD11c^{low} sLPC *Rbpj^{F/F}*-*Cx3cr1^{gfp/+}* マウス由来の CD11c^{low} sLPC を GM-CSF・M-CSF を添加する条件にて OP9-GFP または OP9-Dll1 と共培養した。しかしながら、この実験系においては CD11c^{low} sLPC の CD11c の発現は上昇せず、CX₃CR1⁺ sLPC と同じ CD11c/CD11b の発現パターンに変化しなかった。よって、CD11c^{low} sLPC が CX₃CR1⁺ sLPC の分化段階の途中の細胞であるという結果は得られず、前駆細胞である事の証明には至っていない (図6)。

現在のところ、CD11c^{low} sLPC は CX₃CR1⁺ sLPC と細胞系列が同じであるが Notch シグナルの欠損により分化が偏向した性質の異なる細胞ではないかと考えられる。

(3) CX₃CR1⁺ sLPC の機能的な役割について

の検討

① T リンパ球依存性の大腸炎モデルを CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F}-*Rag2*^{-/-} および *Rbpj*^{F/F}-*Rag2*^{-/-} マウスに適応したが、顕著な変化は得られなかった。また②腸管寄生線虫 *Heligmosomoides polygyrus* 感染モデルを CD11c-Cre *Rbpj*^{F/F} マウスに適応したが顕著な変化は認められなかった。今後の研究において、条件検討や新たな病態モデルの適応を行い CX₃CR1⁺ sLPC の機能的な役割を証明したい。

以上の成果から RBP-J を介した canonical Notch1, 2-RBP-J シグナルは管空側からの抗原の取り込みに重要な CX₃CR1⁺ sLPC の分化に必須であり、Notch シグナルは CX₃CR1⁺ sLPC の分化制御を通じて腸管免疫応答の恒常性維持に寄与していると考えられる。

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 1 件)

① Iwahashi S, Maekawa Y, Nishida J, Ishifune C (他 6 名、4 番目) Notch2 regulates the development of marginal zone B cells through Fos. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、2012、418(4):701-707、DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.082.

[学会発表] (計 2 件)

① 石舟智恵子、前川洋一、安友康二、Notch シグナルは CX₃CR1 陽性小腸粘膜固有層細胞の分化に必須である、日本免疫学会総会学術集会、2012.12.5、神戸国際会議場 (神戸市)

② 石舟智恵子、前川洋一、安友康二、Notch signaling is essential for the differentiation of CX₃CR1-positive cell in lamina propria of the small intestine. 国際樹状細胞学会、2012.10.7、EXCO (Daegu Exhibition & Convention Center) (韓国、テグ)

[図書] (計 2 件)

① 石舟智恵子、安友康二、科学評論社、臨床免疫・アレルギー科、Vol.58、No.4、2012、pp.382-386

② 石舟智恵子、安友康二、秀潤社、細胞工学、Vol31、No.7、2012、pp.751-757

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石舟 智恵子 (ISHIFUNE CHIEKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80632645

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：