

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860295

研究課題名(和文) 接着分子Notchによる慢性炎症の制御機構

研究課題名(英文) Regulation of chronic inflammatory disorders by Notch as a cell adhesion molecule

研究代表者

村田 暁彦(Murata, Akihiko)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90624221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、炎症組織で発現が上昇するNotchリガンド、及び免疫細胞の発現するNotch受容体の中でどの分子が、接着分子として機能するかを解明することを目的とした。その結果、Notchリガンド(Dll1、Dll4、Jagged1、Jagged2)が、Notch1とNotch2受容体を介して、接着分子として機能することを明らかにした。更に、Notchが種々の免疫細胞に共通の接着分子となり得ること、及び、各Notchリガンドでの接着の反応性を制御する機構の存在を示した。以上の結果から、免疫細胞の浸潤抑制を標的とした種々の炎症性疾患の治療において、Notchが新たな標的として有効な可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Notch ligands are known to be up-regulated in various inflammatory sites. However, the role of Notch in accumulation of immune cells is not clear. Here, we show that the Notch ligands (Delta-like 1 [Dll1], Dll4, Jagged1 and Jagged2) over-expressed in stromal cells markedly promote adhesion of various types of immune cells by functioning as cell adhesion molecules. Both Notch1 and Notch2 on immune cells are counter-receptors responsible for Notch ligands-mediated cell adhesion. These results suggest the possibility that Notch receptors and the ligands function as common adhesion molecules for immune cells. Therefore, cell adhesion mediated by Notch might be a therapeutic target for inhibiting recruitment of immune cells in inflammatory disorders.

研究分野：免疫学

キーワード：Notch 接着分子 炎症性疾患

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎などの慢性炎症性疾患では、組織に恒常的に集積する種々の免疫細胞が病態を形成する。免疫細胞が組織へ集積するためには、組織の血管内皮や間質に発現し、細胞同士の接着を誘導する接着分子と呼ばれる種々の細胞表面タンパク質が必須である。一部の接着分子に関しては、薬剤による阻害が免疫細胞の集積を抑制することで、炎症性疾患の治療に有効であることが示されている。しかし、免疫細胞の集積に関与する既知の接着分子は、細胞や臓器の違いによって種類が異なることから、治療の標的として有効性が限定されている。よって、種々の免疫細胞の集積に広く共通する接着分子を見出すことは、炎症性疾患の治療において重要な課題である。

我々は、炎症組織で発現が上昇する Notch リガンドという細胞表面タンパク質に着目し、アレルギー性炎症の引き金となるマスト細胞を指標に、その役割を研究してきた。その結果、Notch リガンドの一つ、Delta-like 1 (Dll1)は、マスト細胞が発現する Notch2 受容体を介して、マスト細胞の接着を強力に促進することを見出した。Notch はシグナル分子として広く研究されており、マスト細胞の接着の促進は当初、Notch シグナルが何らかの接着分子の発現を上昇させることで生じていると考えられた。しかし、実験の結果は、マスト細胞の接着促進には Notch シグナルは全く関与せず、Notch2/Dll1 の結合自体に依存している事を示唆していた。これらの事から、Notch/Dll1 に接着分子としての新規の機能が存在することを報告してきた。

2. 研究の目的

哺乳類には Notch 受容体が 4 種類 (Notch1-Notch4) 存在し、ほとんど全ての種類の免疫細胞がそのいずれかを発現すると考えられている。一方、Notch リガンドは 5 種類 (Dll1、Dll3、Dll4、Jagged1、Jagged2) 存在し、種々の炎症組織の血管内皮や組織間質において、Dll3 以外全ての Notch リガンドの発現が上昇することが報告されている。これらの事から我々は、Notch 及び Notch リガンドが、種々の免疫細胞に広く共通した接着分子として機能し、炎症組織への細胞集積に関与しているのではないかと考えた。

そこで本研究では、この仮説を検証することを目的とし、どの Notch 受容体とリガンドが接着分子としての機能を有するかを検討した。更に、様々な種類の免疫細胞において、実際に Notch が接着分子として機能するかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 細胞接着に関与する Notch リガンドの解明: 5 種類の Notch リガンドを各々過剰発現させた OP9 間質細胞 (OP9-Dll1、OP9-Dll3、OP9-Dll4、OP9-Jagged1、OP9-Jagged2) を、炎症組織のモデルとして用いた。正常組織のモデルとして、

Notch リガンドを発現させていない OP9 間質細胞 (OP9-control) を用いた。マスト細胞は、マウス骨髄細胞から IL-3 を添加し長期培養することで分化誘導したものをを用いた。

培養皿に敷き詰めた各 OP9 間質細胞の上に、マスト細胞を播種し、37°C で 1 時間培養した後、間質細胞に接着したマスト細胞数を計測した。

(2) マスト細胞の接着促進の機構の解明:

接着の促進が Notch を介したものであるかを確認するために、マスト細胞と各 OP9 細胞の共培養系に、リコンビナント Notch リガンドや、Notch 受容体及び各 Notch リガンドの阻害抗体等を添加し、競合阻害を行うことで、マスト細胞の接着が阻害されるかを検討した。

Notch シグナルの関与は、Notch シグナル阻害剤 (DAPT) の存在下や、氷上で細胞の代謝を抑制した状態でのマスト細胞の接着で評価した。

(3) 種々の免疫細胞の接着への Notch の関与:

マウスの脾臓や骨髄から表面マーカーを指標に磁気ビーズで単離した各種の免疫細胞を用い、マスト細胞と同様に各 OP9 間質細胞への接着を評価した。活性化 CD4⁺、CD8⁺ T 細胞は、採取した脾臓細胞をイオノマイシンとホルボールエステルで 4 日間培養し活性化させた後、磁気ビーズを用い単離した。

4. 研究成果

(1) 細胞接着に関与する Notch リガンドの解明:

1 時間の共培養後、約 40% のマスト細胞が OP9-control に接着した。それに対し、OP9-Dll1、OP9-Dll4、OP9-Jagged1 では約 90% のマスト細胞が、OP9-Jag2 では約 70% のマスト細胞が接着した。一方、OP9-Dll3 ではマスト細胞の接着は全く促進されなかった。よって、Dll1、Dll4、Jagged1 及び Jagged2 が間質細胞上に存在する場合、マスト細胞の接着が顕著に促進されることが分かった。

(2) マスト細胞の接着促進の機構の解明:

リコンビナント Dll4 や各種 Notch リガンドの阻害抗体を添加し、マスト細胞上の Notch 受容体と間質細胞上の各 Notch リガンドが結合できない状態にすることで、Notch リガンドによるマスト細胞の接着促進は、ほぼ抑制された。

マスト細胞が発現する Notch 受容体をフローサイトメトリーで解析したところ、Notch2 が高レベルで、Notch1 が低レベルで発現していた。Notch リガンドによる接着の促進は、Notch2 の阻害抗体の添加で有意に阻害されたが、Notch1 の阻害抗体単独では全く阻害されなかった。しかし、Notch1 と Notch2 の阻害抗体を同時に添加すると、Notch2 阻害抗体単独の場合よりも、顕著にマスト細胞の接着が阻害された。

よって、マスト細胞の接着の促進は、各 OP9 間質細胞が発現する Dll1、Dll4、Jagged1 及び Jagged2 が、マスト細胞上の Notch1 及び Notch2

受容体に結合することで生じることが分かった。

Notch シグナルは接着に關与するのだろうか？マスト細胞の接着促進は、Notch シグナル阻害剤の存在下でも全く阻害されなかった。更に、氷上で細胞の代謝とシグナル伝達を阻害した状態においても、Notch リガンドによる接着の促進が觀察された。よって、Notch シグナルは接着促進の原因ではなく、Notch/Notch リガンドの結合そのものが、マスト細胞の接着に關与することが分かった。

以上の事から、Dll3 以外の全ての Notch リガンドが、Notch1 及び Notch2 受容体を介して、接着分子として機能することが示唆された。

(3) 種々の免疫細胞の接着への Notch の關与: マウスの骨髄から単離した好中球(Gr-1⁺)の接着は、マスト細胞同様に Dll1、Dll4、Jagged1 及び Jagged2 によって顕著に促進された。一方、脾臓から単離したナイーブ CD4⁺、CD8⁺ T 細胞は、OP9-control にはほとんど接着しなかったのに対し、OP9-Dll1 及び OP9-Dll4 へは多くが接着した。興味深いことに、ナイーブ CD4⁺、CD8⁺ T 細胞の接着は Jagged リガンドでは全く促進されなかった。薬剤で活性化した CD4⁺、CD8⁺ T 細胞の接着を検討したところ、Dll リガンドに加え Jagged リガンドでも接着が促進された。Notch リガンドによるこれらの細胞の接着促進は、マスト細胞同様に、Notch シグナル阻害剤で全く抑制されず、Notch/Notch リガンドの結合を競合阻害した時のみ抑制された。

以上の事から、Notch/Notch リガンドが、種々の免疫細胞に広く共通した接着分子となり得ることが示唆された。更に、免疫細胞の種類や、活性化の有無により、接着に關与する Notch リガンドの種類が異なることが示唆された。T 細胞の結果は、Jagged リガンドでの細胞接着の反応性を制御する何らかの機構が存在することを示している。

(4) 総括:

本研究では、炎症組織で発現が上昇する Notch リガンドの中で Dll1、Dll4、Jagged1 及び Jagged2 が、種々の免疫細胞に発現する Notch1 や Notch2 受容体を介して、接着分子として機能することを示した。Notch が、種々の免疫細胞に広く共通した接着分子となり得る可能性を示したことで、今後、様々な炎症性疾患のマウスモデルを用い、実際に Notch を標的とした治療が有効であるかを確認する段階に進むことができる。

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 2 件)

Murata A, Yoshino M, Hikosaka M, Okuyama K, Zhou L, Sakano S, Yagita H, Hayashi SI. An evolutionary-conserved function of mammalian Notch family members as cell adhesion molecules. PLoS

ONE. 9: e108535; 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0108535 (査読有)

Yoshino M, Murata A, Shimoda Y, Hikosaka M, Hayashi SI: Dual system for the transport of self-antigens from the skin. *Current Research in Immunology* 7: 1-12, 2013. (査読有)

(学会発表) (計 7 件)

Murata A, Yoshino M, Shimoda Y, Hikosaka M, Hayashi SI: Local increase of mast cells sustains after resolution of chronic contact dermatitis. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会, 1-J-W18-10-P, 2014 年 12 月 10-12 日, 京都国際会館 (京都)

Hikosaka M, Murata A, Shimoda Y, Yoshino M, Hayashi SI: Putative regulation of IgE production by antigen-specific cell aggregation. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会, 2-G-W29-11-O/P, 2014 年 12 月 10-12 日, 京都国際会館 (京都)

Yoshino M, Imamura R, Murata A, Shimoda Y, Hikosaka M, Suda T, Hayashi SI: Migration of skin antigen-transporting cells in PYNOD-deficient mice. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会, 1-C-W4-2-O/P, 2014 年 12 月 10-12 日, 京都国際会館 (京都)

Okuyama K, Hozumi K, Murata A, Ando K, Kotani A: Functional and comprehensive investigation of microRNA targeting Notch receptors. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会, 2-H-W31-5-O/P, 2014 年 12 月 10-12 日, 京都国際会館 (京都)

Murata A, Yoshino M, Shimoda Y, Hikosaka M, Yagita H, Hayashi SI: Cell adhesion mediated by Notch ligands: An implication for mast cell accumulation in chronic inflammation. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会, 3-J-W56-12-P, 2013 年 12 月 11-13 日, 幕張メッセ (千葉)

Yoshino M, Murata A, Shimoda Y, Hikosaka M, Hayashi SI: Analysis of cells transporting skin self-antigens to regional lymph nodes under CCR7-deficient conditions. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会, 2-I-W39-15-P, 2013 年 12 月 11-13 日, 幕張メッセ (千葉)

Hikosaka M, Murata A, Shimoda Y, Yoshino M, Hayashi SI: Up-regulation of *Aicda* gene expression in IgE producing hybridomas: a model of class switch recombination in plasma cells. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会, 2-H-W38-10-P, 2013 年 12 月 11-13 日, 幕張メッセ (千葉)

(図書) (計 0 件)

(産業財産権)

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/immunol/307/1371.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村田 暁彦(MURATA AKIHIKO)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号:90624221

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし