

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月2日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08848

研究課題名(和文) T前駆細胞における未分化性維持とT細胞分化決定の分子機構解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for the maintenance of T cell differentiation potential and the determination of T cell fate

研究代表者

穂積 勝人 (HOZUMI, Katsuto)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30246079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、初期T細胞分化の分子機構の理解を目指し、T細胞分化能の異なる2種類のEbf1欠損pro-B細胞を樹立した。両者の発現プロファイリングの比較から、Lmo2を同定し、Lmo2の過剰発現により、T細胞分化能が回復することを見出した。そこで本研究では、Lmo2のT細胞分化能維持機構について調べた。その結果、Bcl11aを標的分子として発現誘導に関わり、その下流分子Bcl2の機能を介して、未分化造血細胞におけるNotch刺激耐性を付与すること、エピジェネティック制御により、Tcf7遺伝子座のNotchシグナル応答性の維持に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞の臨床応用など、近年の再生医療の発展は顕著であるが、応用研究に利用される幹細胞の性状を分子的に理解することは、臨床応用に向けた重要な課題である。しかし、iPS細胞以外の組織幹細胞の性状はいまだに理解が不十分であり、幹細胞がどのように高い未分化性を維持できるのか明らかではない。本研究は、きわめて均一化された造血未分化細胞を用い、リンパ系細胞への分化能維持について追求したものであり、造血幹細胞移植等の発展に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established two Ebf1-deficient pro-B cell lines possessing the different potential for the T cell differentiation. Comparing their expression profiles, Lmo2 transcripts were detected in pro-B(+) cells three-fold greater than in pro-B(-) cells, and its overexpression in pro-B(-) cells was sufficient to provide the differentiation potential. These suggested that Lmo2 has critical role to keep the differentiation potential. We found Bcl11a as a downstream target of Lmo2. Bcl11a was essential for the maintenance of cell survival via the induction of Bcl2. Moreover, Lmo2 also altered the epigenetic status of Tcf7 gene, which is necessary for the full activation of the gene locus with Notch signaling. These results suggested that Lmo2 functions to regulate both Bcl11a and Tcf1 as downstream targets and contributes to the maintenance of the competence to respond to Notch signaling at early T cell progenitor stage.

研究分野：免疫学

キーワード：Lmo2 Bcl11a Tcf1 Notch T細胞分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫応答にて重要な役割を担う T 細胞は、他の血液細胞と異なり、胸腺環境に依存して分化する。その分子機構は長らく不明であったが、申請者を含む複数の研究グループによって、胸腺分化環境を構成する上皮細胞上の Notch リガンド (NotchL) : Dll4 と胸腺に移行した造血前駆細胞 (HPC) 上の Notch1 との相互作用から生じる Notch シグナルにより一義的に制御されることが明らかになった。しかし、Notch シグナルによる T 細胞分化決定の分子機構については十分な理解に至っておらず、さらなる詳細な研究が必要であった。また、Notch シグナルを受容して T 細胞に分化できる T 前駆細胞としての HPC の“未分化性”については、胸腺へ移行する T 前駆細胞の性状が不明瞭なこともあり、ほとんど研究がなされていなかった。

報告者は、Notch シグナル下流事象を網羅的に追跡する実験系の確立を目的として、Ebf1 欠損 pro-B 細胞株を多数、樹立してきたが、培養系のストローマ細胞の性状により、pro-B 細胞株の T 細胞分化能に大きな差があることを認めた (図 1)。さらに、T 細胞分化能を保持する pro-B 細胞株 (pro-B(+)) と保持しない pro-B 細胞株 (pro-B(-)) の発現遺伝子解析から Lmo2 に着目し、Lmo2 の遺伝子導入により pro-B(-) 細胞に T 細胞分化能を付与できることを見出した (図 2)。

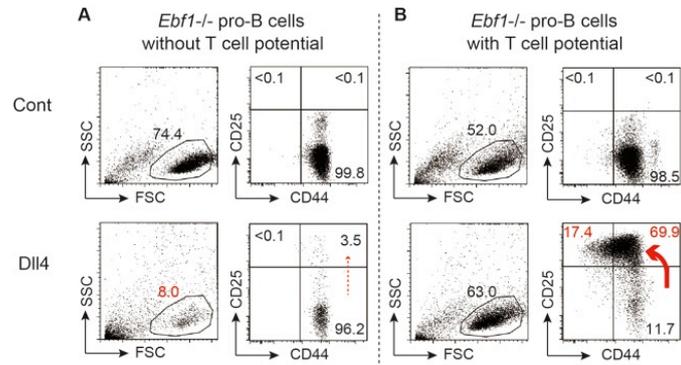


図 1. T 細胞分化能の異なる 2 つの Ebf1 欠損プロ B 細胞株

T 細胞分化能の異なる Ebf1 欠損プロ B 細胞株 (A、B) を、NotchL: Dll4 存在 (下段) あるいは非存在下 (上段) に 5 日間培養し、T 細胞系 (CD25 陽性) への分化を観察した。数字は各画分の存在比を表す。

2. 研究の目的

本研究では、

(1) Lmo2 による T 細胞分化能維持の分子機構を明らかにするため、

① Lmo2 によって発現誘導される遺伝子群の解析

② その T 細胞分化能維持における意義解明

を通じて、T 細胞分化能、あるいは造血未分化細胞に共通の「未分化性維持」機構の解明を目指した。

(2) 新たに樹立した Notch シグナル依存的に T 細胞へ分化する pro-B(+)) 細胞を用い、Notch シグナル下流事象の網羅的解析系の確立を目指した。

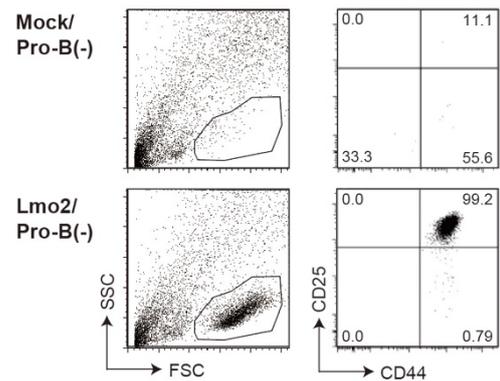


図 2. Lmo2 遺伝子導入による T 細胞分化能の回復

Pro-B(-) 細胞に Mock、Lmo2 遺伝子を導入し、Notch シグナル依存的 T 細胞分化を誘導した。

3. 研究の方法

(1) Lmo2 によって発現制御される遺伝子 (群) の同定

① マイクロアレイ

Pro-B(-) 細胞に Lmo2 を過剰発現させた Lmo2/pro-B(-) 細胞と対象 pro-B(-) 細胞間での発現遺伝子を比較するため、Lmo2 発現レトロウイルスベクター (Lmo2/MIGR1) を導入した pro-B(-) 細胞と空ウイルス導入 pro-B(-) 細胞より mRNA を抽出し、マイクロアレイ (Agilent, Whole mouse genome 4x44K) による発現プロファイリングを行った。

② Real-time RT-PCR

Pro-B(-)/(+) 細胞間でのマイクロアレイデータとの比較と遺伝子発現量の定量を行うため、Pro-B(-)/(+) 細胞、Lmo2 導入 pro-B(-) 細胞に加え、Pro-B(-)/(+) 細胞間で発現に大きな違いのあった幹細胞関連遺伝子: Meis1 の強制発現 pro-B(-) 細胞について、①で候補に挙げられた遺伝子について Real-time RT-PCR を行い、発現量を比較した。

③ T 細胞誘導実験

標的遺伝子導入による pro-B(-) 細胞の Notch シグナル応答性の変化について調べるため、①②で Lmo2 標的分子に推定された遺伝子を pro-B 細胞に導入し、IL-7 (5ng/ml)、Flt3L (5ng/ml) 存在下に Dll4 発現 OP9 細胞と共培養し、Notch シグナル付与による T 細胞分化誘導を行い、T 細胞への分化能の回復を調べた。

④ バイサルファイトシーケンス

T 細胞分化に必須の遺伝子の中で、①②の探索から候補に挙げられた遺伝子で、発現誘導への影響が推測される標的について、DNA メチル化を指標としたエピジェネティック制御の可能性を検証した。Pro-B(-)/(+) 細胞よりゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理 (MethylEasy Xceed、タカラ) した後、これを基質として PCR (Takara Taq HS) を行った。クローニング後、シーケンスし、標的遺伝子領域の DNA メチル化状態を調べた。

⑤ ChIP アッセイ

④と同様に、標的遺伝子のエピジェネティック状態を調べるため、pro-B(+)) 細胞を固定処理後、溶解し、超音波処理した後、抗 H3K4Me3、H3K27Me3 抗体を用いて免疫沈降を行う。沈降物より DNA を精製し、PCR により標的遺伝子の存在を検出する。これにより、標的遺伝子領域のヒスト

ン H3 のメチル化状態を調べた。

(2) Notch シグナル下流事象の探索

① Notch シグナル誘導系の確立と選択

T 細胞誘導における Notch シグナルの閾値を確定するため、D114 および D111 を Tet-off システムにて発現誘導し、OP9 上にて機能させる実験系を確立した。一方で、シグナル誘導の不均一性を完全に排除するため、活性化 Notch1 断片へ ER 断片を付加したタモキシフェン安定化型の活性についても検討した。

② Notch 活性化断片・複合体の免疫沈降

抗 Notch1 活性化断片抗体 (D3B8, Cell Signaling)、抗 Rbpj 抗体 (EPR13479, Abcam ; D10A4, Cell Signaling) を用いて、D114 由来 Notch シグナルを誘導した pro-B(+) 細胞から、免疫沈降により、Notch 活性化断片複合体の結合領域を、ChIP アッセイにて同定を試みた。

4. 研究成果

(1) Lmo2 による T 細胞分化能維持の分子機構

① Lmo2 遺伝子導入により発現が変動する遺伝子の網羅的探索

Pro-B(-) 細胞へ D114 から Notch シグナルを誘導すると、速やかに細胞死に陥る。Pro-B(-)/(+) 間で発現が大きく異なり、幹細胞の維持に関与することが推測される遺伝子として *Meis1*、*Hmga2* を見出し、それらを pro-B(-) 細胞で強発現させた。その結果、特に前者で細胞増殖能の亢進を認めたと、Notch シグナル依存的な T 細胞分化能は回復せず、多くの細胞が死滅した。一方、Lmo2 の強制発現により T 細胞分化能が回復する (図 2)。そこで、Lmo2/pro-B(-)、pro-B(-) 細胞間で発現が変動する遺伝子の中で、pro-B(+) 細胞で強く発現し、*Meis1*/pro-B(-) 細胞では発現増強を認めない遺伝子として、*Bcl11a* と *Bcl2a1* が同定され、さらに Real-time RT-PCR にてそれを確認した (図 3)。*Bcl2a1* の発現誘導では、Pro-B(-) 細胞の Notch シグナル応答性は変化しなかった。*Bcl11a* は、*Bcl2* の発現誘導を介して、未分化 B 細胞ステージの生存維持に寄与していることが示されている。*Bcl11a* の過剰発現は、細胞毒性を示すことから、下流分子として *Bcl2* を pro-B(-) 細胞に導入すると、Notch シグナルによって誘導される細胞死が回避された。しかし、T 細胞系列への分化は誘導されなかった。以上の結果から、Lmo2 は、*Bcl11a* の発現誘導を介して *Bcl2* の安定発現に寄与し、細胞生存の維持に関与する可能性が示唆された。現在、複数の抗 Lmo2 抗体 (Abcam, R&D, Novusbio) を用いた ChIP 実験を遂行中であるが、予備実験データから、Lmo2 タンパク質複合体の *Bcl11a* 遺伝子座への結合を認めている。未分化造血細胞において、Lmo2-*Bcl11a* 系による細胞生存維持の機構が存在するものと考えられる。

② Pro-B 細胞における *Tcf1* (*Tcf7* 遺伝子産物) 発現能の検討

①の変動遺伝子の中に、低発現であるものの、*Tcf7* が存在した。*Bcl2* 発現により pro-B(-) 細胞が Notch シグナル受容時に死滅しないことを利用し、*Bcl2* 発現 pro-B(+) 細胞を樹立し、Notch シグナル発動後の両細胞における *Tcf7* 遺伝子転写とその翻訳タンパク質である *Tcf1* 分子の出現について調べた (図 4、図 5)。その結果、pro-B(+) 細胞では 2 日後より *Tcf7* 転写産物を検出し、7 日後には高い発現と細胞内にて *Tcf1* が検出されるのに対し、pro-B(-) 細胞ではいずれもほとんど検出できず、*Tcf7* 遺伝子が不活化されている可能性が示された。

③ Lmo2 による *Tcf7* 遺伝子領域のエピジェネティック制御

Pro-B(-)/(+) 細胞、Lmo2 導入 pro-B(-) 細胞について、バイサルファイトシークエンスにより、*Tcf7* 遺伝子領域の DNA メチル化状態を調べた (図 6)。その結果、pro-B(+) 細胞では DNA メチル化が低頻度であるのに対し、pro-B(-) 細胞では高頻度にメチル化され、*Tcf7* 遺伝子座が不活化されていた。また、Lmo2 の強制発現により、同領域の脱メチル化が進行し、*Tcf7* 遺伝子座が再活性化されることが明らかになった。このデータから、Lmo2 は、未分化造血細胞期において、T

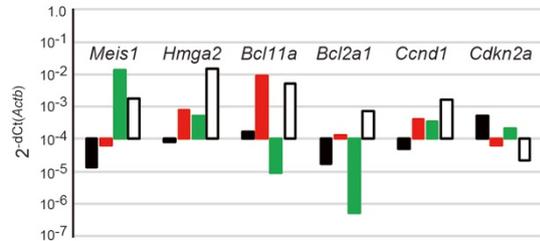


図 3. Lmo2 発現 pro-B(-) 細胞における発現プロファイルの変化
Pro-B(+) 細胞 (白)、pro-B(-) 細胞 (黒)、Lmo2 発現 pro-B(-) 細胞 (赤)、*Meis1* 発現 pro-B(-) 細胞 (緑) における各遺伝子発現を比較した。

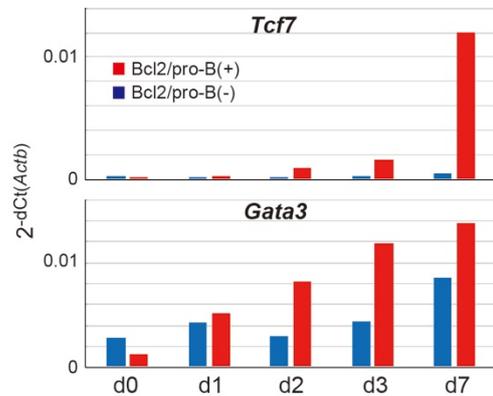


図 4. Notch シグナルによる T 細胞関連転写因子の発現誘導
Bcl2 導入 pro-B(-) および pro-B(+) 細胞を D114 発現 OP9 細胞上にて培養し、Notch シグナルによる *Tcf7*、*Gata3* 遺伝子発現について、経時的に調べた。

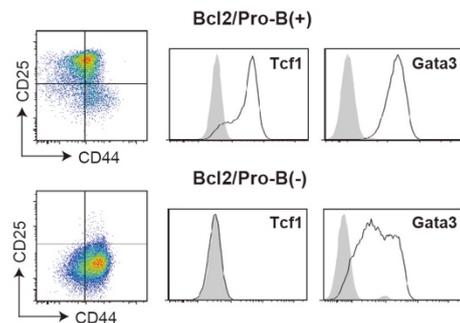


図 5. Notch シグナルによる T 細胞関連転写因子の検出
Notch シグナルによって誘導される *Tcf1*、*Gata3* 分子の存在を細胞内染色にて検出した。

細胞系列の分化に必須の *Tcf7* 遺伝子座の DNA メチル化を抑制することで、T 細胞分化能の維持に寄与していることが示された。

また、抗トリメチル化ヒストン H3K4、同 H3K27 抗体を用いた ChIP により、*Tcf7* 遺伝子領域のヒストンメチル化について検討したところ、pro-B(+)細胞にて、いずれのヒストンメチル化も高頻度に検出された。これは、未分化造血細胞期において、ヒストンの活性化型修飾、不活性化型修飾のいずれもが存在することを意味し、*Tcf7* 遺伝子座が平衡クロマチン (poised chromatin) 状態にあることを示唆した。このような観察は、未分化細胞にて高頻度に認められることが知られており⁽¹⁾、Lmo2 が造血未分化細胞の「未分化性」維持に深く関与する可能性を示唆した。

以上の結果から、Lmo2 は、未分化造血細胞期において、Bcl11a-Bcl2 系を介して生存維持に、*Tcf7* 遺伝子座のエピジェネティック制御を介して T 細胞分化能の維持に、それぞれ寄与していることが明らかになった。現在、抗 Lmo2 抗体を用いた ChIP-Seq 解析を進めており、今後、Lmo2 の直接的な標的遺伝子群の詳細を明らかにできるものと考えている。

(2) Notch シグナル下流事象の探索

① Notch シグナル誘導系の確立

Tet-on、Tet-off の両システムを用い、OP9 細胞での D111、D114 発現系を構築した。特に後者においては、きわめて連続的に増大する Notch シグナルの誘導を可能とし、T 細胞分化に必須の Notch シグナル量を正確に確定できた (Koga S et al., *J Exp Med* 215:1609, 2018)。また、D111、D114 間で、T 細胞誘導能に 3~6 倍の程度の差異があることを明らかにした。

② Notch 活性化断片・複合体の免疫沈降

抗 Notch1 活性化断片抗体、抗 Rbpj 抗体を用いて、D114 によって Notch シグナルを誘導した造血未分化細胞を用い、ChIP-Seq 解析を試みたが、いずれも BG シグナルが高く、対照抗体を用いた結果と有意な差異を示すに至らなかった。そこで、Notch 活性化分子に ER 断片を付加したタモキシフェン誘導型分子に、さらに Myc、Flag 二重タグを付与し、タモキシフェン依存的に Notch シグナル誘導を行う実験系を構築した。未分化胸腺細胞株を用いた予備実験では、Notch シグナル応答を均一に細胞に付与することができ、また Notch 活性化断片を含むタンパク質複合体の免疫沈降に成功している。これを早々に pro-B(+)細胞に導入し、Notch シグナル下流事象の解析につなげたいと考えている。

<引用文献>

① Lesch BJ, Page DC. *Development* 141:3619, 2014.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Koga S, Hozumi K, Hirano K, Yazawa M, Teroatea T, Minoda A, Nagasawa T, Koyasu S, Moro K. Peripheral PDGFRa+gp38+ mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver-derived ILC2. *J Exp Med*. 215:1609-1626, 2018. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

① Hozumi K, Hirano K. The epigenetic regulation of gene loci encoding transcription factor critical for the determination of T/B-cell lineages by Lmo2. 日本免疫学会・学術集会、2018.

② Hozumi K, Ochiai S, Hirano K. Molecular machinery for the maintenance of differentiation potential toward T/B cell lineages in hematopoietic stem/progenitor cells by Lmo2. 日本免疫学会・学術集会、2017.

③ Hozumi K, Hirano K. Essential role of Lmo2 for the maintenance of T-cell differentiation potential in Ebf1-deficient pro-B cells. 日本免疫学会・学術集会、2016.

[図書] (計 1 件)

① Hozumi K. Notch ligands for lymphocyte development. *Notch Signaling* (Ed. Yasutomo K). DOI 10.1007/978-981-10-4971-2, Springer, 2017.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

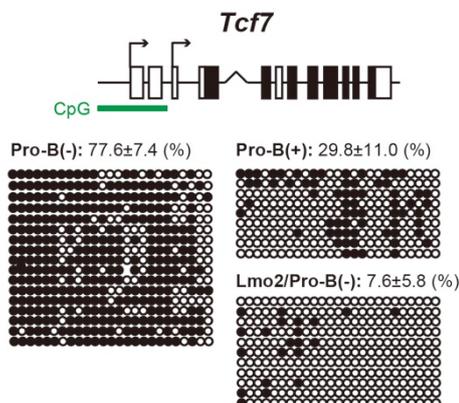


図6. Pro-B 細胞における *Tcf7* 遺伝子領域の DNA メチル化
各 pro-B 細胞よりゲノム DNA を抽出し、*Tcf7* 遺伝子領域について、パイサルファイブシークエンスを行い、メチル化状態を調べた。

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://hozumi.med.u-tokai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。