

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590491

研究課題名(和文) 胚・造血幹細胞からの $\gamma\delta$ Tリンパ球選択的分化誘導培養系の開発研究課題名(英文) Development of a culture system to selectively induce $\gamma\delta$ T-lymphocytes from embryonic and hematopoietic stem cells

研究代表者

岸原 健二 (KISHIHARA KENJI)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：80214774

研究成果の概要(和文)：マウス $\gamma\delta$ Tリンパ球を選択的に分化誘導できる培養系を開発する目的で、まず、 $\gamma\delta$ Tリンパ球のリガンドとなりうるMHCクラスIb分子等のストローマ細胞上での発現を定量的に解析した。その結果から、T10/T22抗原を第一候補として、それぞれを過剰発現するストローマ細胞を樹立した。このストローマ細胞の単層上で、胚幹細胞から $\gamma\delta$ Tリンパ球を誘導したが、T10/T22抗原が $\gamma\delta$ Tリンパ球を優位に分化誘導し、レパートワ形成に影響を及ぼしている事実は今のところ認められていない。現在も解析中である。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a culture system that can selectively induce the murine $\gamma\delta$ T lymphocyte differentiation, first, the gene expression of MHC class Ib and its related molecules as potential ligands of $\gamma\delta$ T lymphocytes in several stromal cell strains were quantitatively analyzed. From the results, stromal cell strains overexpressing T10 and T22 antigens as a first choice were established. On a single layer of the stromal cells, T lymphocytes were induced from embryonic stem cells but it has not observed the fact that T10 and T22 can induce the selective and predominant differentiation of $\gamma\delta$ T lymphocytes and influence their repertoire so far. The culture system is still being further analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：自然免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) $\gamma\delta$ Tリンパ球の分化や認識抗原に関しては、精力的な研究が国内外で展開されているにもかかわらず、まだ不明な点が多い。
 (2) Tリンパ球への抗原提示分子あるいはリガンドである細胞表面分子として、MHC class Ib分子やMHCクラスI様分子が注目

されているが、どの分子が $\gamma\delta$ Tリンパ球のリガンドになりうるかに関しては、詳細なことは分かっていない。
 (3) 再生医学の技術的進展にともない、胚幹細胞(ESC)から種々の細胞や組織への分化誘導が可能な培養系が確立されてきている。造血幹細胞(HSC)やESCからTリンパ球が分

化誘導可能なストローマ（間質）細胞を用いた培養系は、2004年に Zúñiga-Pfúcker らによって初めて開発され、ESC から機能しうる Tリンパ球を誘導することに成功している (*Nat. Immunol.* 5:410-416, 2004)。

(4) この Tリンパ球分化誘導培養系の成功の鍵は、ストローマ細胞株 OP9 に Notch リガンドの一つである Delta1 を遺伝子導入し発現させた点である。しかしながら、この培養系では、 $\gamma\delta$ Tリンパ球は出現するが、 $\alpha\beta$ Tリンパ球が主であり、 $\gamma\delta$ Tリンパ球は選択的かつ優位に発生・分化してはこない。

(5) 試験管内および生体内で、Tリンパ球の分化誘導に Notch シグナルが重要であるが、Notch のリガンドとしては、Delta1 だけでなく Delta4 も同定されている。しかしながら、 $\gamma\delta$ Tリンパ球を誘導する上で Delta1 と Delta4 に機能的差異があるのかは明確にされていない。

2. 研究の目的

(1) $\gamma\delta$ Tリンパ球への分化誘導に関与しうる MHC class Ib 分子および MHC クラス I 様分子を検索する目的で、Tリンパ球分化誘導培養系で使用するストローマ細胞における MHC class Ib 分子および MHC クラス I 様分子の遺伝子発現を網羅的に定量的 PCR 法で解析する。

(2) $\gamma\delta$ Tリンパ球を選択的に分化誘導する培養系を確立する目的で、MHC class Ib 分子または MHC クラス I 様分子を遺伝子導入し過剰発現させたストローマ細胞を複製し、その上で ESC や HSC を長期培養する。

(3) $\gamma\delta$ Tリンパ球を分化誘導する上で Delta1 と Delta4 に機能的差異があるのかを調べる目的で、Delta1 または Delta4 を発現するストローマ細胞を樹立し、その単層上で ESC や HSC を長期培養する。

(4) $\gamma\delta$ Tリンパ球を分化誘導における Notch シグナルの強度の影響を調べる目的で、Notch シグナル阻害剤 DAPT を Tリンパ球分化誘導培養系に添加して、阻害剤の影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) ストローマ細胞における MHC class Ib 分子及および MHC クラス I 様分子の遺伝子発現の解析

① 本研究で用いたストローマ細胞株および対照細胞は以下のとおりである。

- OP9 : *op/op* マウスの胎仔骨髄由来ストローマ細胞株
- TSt-4 : C57BL/6 マウスの胎仔胸腺間葉系細胞由来のストローマ細胞株
- ST2 : BALB/c マウスの胎仔骨髄由来ストローマ細胞株

- MEF : C57BL/6 マウス由来の胎仔線維芽細胞 (embryonic fibroblast) 一次培養細胞
- NIH3T3 : マウス由来の胎仔線維芽細胞株

② 遺伝子発現を解析された MHC class Ib 分子および MHC クラス I 様分子: CD1 (CD1d1, CD1d2)、H-2 T 抗原 (T3 (TL), T10, T22, T23 (Qa-1), T24)、H-2 Q 抗原 (Q1, Q2, Q4 (Qb-1), Q5, Q6, Q7 (Qa-2), Q10)、H-2 M 抗原 (M1, M2, M3, M5)、Rae-1 family (Rae-1 α , β , δ , γ , ϵ)、H60 family (H60a, b, c)

③ 定量的 PCR 解析: 各細胞はそれぞれの細胞に適切な条件で培養し回収した後、RNA を抽出し、cDNA を合成した。定量的 PCR は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて、7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) を使って反応と解析を行なった。上記遺伝子のプライマー・セットの他に、スタンダード用として house keeping gene である β -actin と GAPDH に対するプライマー・セットを使用した。Thermal cycle (95°C, 15 秒→60°C, 45 秒) は、40 回実施した。

(2) Tリンパ球分化誘導培養系の確立と出現する細胞の解析

① 胚性細胞 (ESC) および造血幹細胞の調製: ESC は、ゼラチンコートしたディッシュ上で LIF の存在下において培養し、未分化状態を維持した。C57BL/6 マウスの骨髄細胞および胎仔肝細胞 (14.5 日) を、ビオチン標識された細胞系列特異的抗体 (B220, Mac-1, Gr-1, CD4, CD8, TER119 に対するモノクローナル抗体) で染色した後、ビオチン結合磁気ビーズを用いて Lin⁺細胞を除去した。さらに、Lin⁻細胞を FITC 標識抗 Sca-1 モノクローナル抗体で染色した後、抗 FITC 抗体結合マイクロ磁気ビーズと反応させ、カラムを使って Sca-1⁺細胞を精製した。この Lin⁻ Sca-1⁺細胞を HSC として培養系に供した。

② Tリンパ球分化誘導培養系: ESC あるいは精製された HCS は、ストローマ細胞の単層上において、OP9 培地 (20%FBS 含 RPMI1640 培地) 中で共培養を開始した。共培養 3 日目において、0.25%トリプシンで細胞を分散懸濁し、新しい OP9 培地中のストローマ細胞の単層へ移した。この培養に最終濃度が 5ng/ml になるように Flt-3L を添加した。共培養 8 日目において、培養液中およびストローマ細胞の単層上の細胞を回収し、70 μ m フィルターに通した。回収した細胞は、新しい OP9 培地中のストローマ細胞の単層へ移した。この培養に最終濃度が 5ng/ml になるように Flt-3L を、1ng/ml になるように IL-7 をそれぞれ添加した。共培養 10 日目において、前回と同様に新しいストローマ細胞の単層上へ継代を行い、Flt-3L/IL-7 存在下で培養した。以後、4~8 日ごとに同様の継代と培養を繰り返した。

③ Tリンパ球のフローサイトメトリーおよびRT-PCR法による解析：Tリンパ球のフローサイトメトリーによる解析は、Tリンパ球はCD3, CD4, CD8, TCR β , TCR $\gamma\delta$ を、Bリンパ球はB220を、マクロファージ系細胞はCD11bを指標にFACSCalibur (Becton Dickinson)によって行われた。 $\gamma\delta$ Tリンパ球のレパートワの解析は、磁気的方法で精製した $\gamma\delta$ Tリンパ球由来のcDNAを鋳型として各V γ -C γ 間および各V δ -C δ 間でRT-PCRを行い、V γ /V δ の使用頻度を相対的に比較することにより行なった。

(3) 新しい遺伝子導入ストローマ細胞の樹立と出現してくる細胞の解析

① マウス Delta4 遺伝子導入ストローマ細胞の樹立：マウス Delta1 遺伝子が導入されたストローマ細胞株 (OP9/G-DLL1 および TSt-4/G-DLL1) は理研セルバンクより入手した。マウス Delta4 遺伝子は、発現ベクター (pCMV6-Kan/Neo) に組み込まれた状態で、OriGene より購入した。この発現ベクターは、一旦、大腸菌 DH5 α に形質転換した後、エンドトキシン・フリーの状態で大規模精製し、ストローマ細胞 (OP9 および TSt-4) に FuGene を用いて遺伝子導入した。G418 (0.5mg/ml) 存在下で選択を行い、生存した細胞を希釈限界法で株化した (OP9-DLL4 および TSt-4-DLL4 とそれぞれ命名した)。

② T10 および T22 遺伝子のクローニングと発現ベクターの構築：T10 および T22 遺伝子は OriGene より購入した (それぞれ、pCMV6-H2-T10 および pCMV6-H2-T22)。対象となるストローマ細胞株 (OP9/G-DLL1-D1 および TSt-4/G-DLL1) は、すでに導入されたベクター由来のネオマイシン耐性遺伝子が存在するため、G418 での選択ができないことから、T10 および T22 遺伝子は最終的に pIRES-hygro に組み換えられた。一旦、大腸菌 DH5 α に形質転換した後、エンドトキシン・フリーの状態で大規模精製し、ストローマ細胞 (OP9/G-DLL1-D1 および TSt-4/G-DLL1) に FuGene を用いて遺伝子導入した。hygromycin (5~10 μ g/ml) 存在下で選択を行い、生存した細胞を希釈限界法で株化したそれぞれの細胞株を OP9/G-D1-T10, OP9/G-D1-T22, TSt-4/G-D1-T10, TSt-4/G-D1-T22 と命名した。

③ $\gamma\delta$ Tリンパ球の分化誘導への導入遺伝子の影響の解析：(2)②に準拠して、ESCを上記で(3)②で樹立したストローマ細胞株の単層上で培養した。出現してきたTリンパ球は、(2)③と同様な解析を行った。

(4) Notch シグナル阻害剤 DAPT の Tリンパ球分化誘導培養系への影響の解析

$\alpha\beta$ Tリンパ球 vs. $\gamma\delta$ Tリンパ球の系譜決定において、TCR からのシグナルの強さと Notch からのシグナルの強さの違いが影響す

ることが提唱されている。そこで、この仮説にアプローチするために、Tリンパ球分化誘導培養系へ Notch シグナル阻害剤 DAPT を培養中に異なる濃度 (0, 0.1, 0.5, 1.0, 10 μ M) で共培養開始時または共培養開始後 8 日目から添加した。ESC とストローマ細胞 (OP9/G-DLL1) との共培養は、(2)②に従って実施し、出現してきた細胞は(2)③と同様に解析された。

4. 研究成果

(1) ストローマ細胞における MHC クラス Ib 分子および MHC クラス I 様分子の遺伝子発現の解析

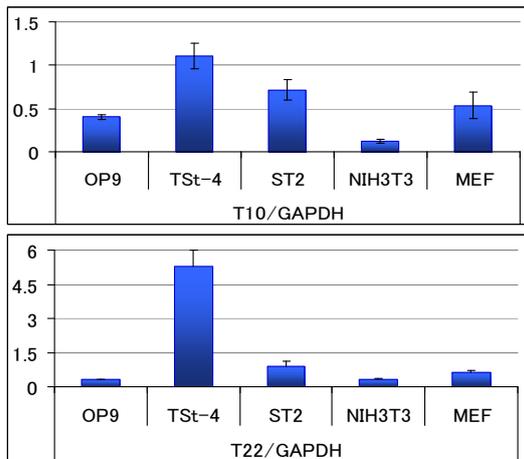
ストローマ細胞株 (OP-9, Tst-4, ST2) および比較対象細胞としてのマウス線維芽細胞株 NIH3T3 とマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) に関して、MHC クラス I b 分子および MHC クラス I 様分子の発現を網羅的に定量的 PCR 法を用いて解析した。その結果は、表 1 にまとめた。発現レベルの評価は、相対的なものであり、+++ > ++ > + > \pm > - の順で低くなる。

表 1. ストローマ細胞における MHC クラス Ib 分子および MHC クラス I 様分子の遺伝子発現

抗原名 (別名)	OP9	TSt-4	ST2	MEF	NIH 3T3
CD1d1	+++	\pm	+	+	+
CD1d2	++	\pm	+	+	++
T3	\pm	+	++	-	+
T10	\pm	+	+	+	\pm
T22	\pm	++	+	+	\pm
T23 (Qa-1)	+	+	++	++	-
T24	\pm	+	+	-	\pm
Q1	-	\pm	-	+	\pm
Q2	+	+	+	\pm	+
Q4 (Qb-1)	\pm	+++	+	\pm	-
Q5	\pm	+	\pm	-	\pm
Q6	++	+	+	\pm	\pm
Q7 (Qa-2)	+	++	+	\pm	\pm
Q10	\pm	+	++	-	+
M1	-	\pm	+	-	\pm
M2	\pm	++	+	\pm	\pm
M3	\pm	++	+	\pm	\pm
M5	\pm	+	+	-	\pm
Rae-1 α	\pm	+	\pm	\pm	+
Rae-1 β	\pm	+	\pm	\pm	+
Rae-1 γ	-	+	\pm	-	\pm
Rae-1 δ	+	-	-	\pm	-
Rae-1 ϵ	\pm	+	\pm	\pm	\pm
H60a	-	+	\pm	-	\pm
H60b	-	+	-	-	-
H60c	+	\pm	+	+++	+

まず、CD1dの発現は、とくにOP9で著明に高く、TSt-4ではわずかに発現が認められる程度であった。次に、H-2T抗原に関しては、T22の発現がTSt-4で、T3とT23の発現がST2でそれぞれ選択的に高く、OP9では総じてT抗原の発現は低かった。図1には、後述するT10とT22の遺伝子発現の結果を示す。次に、H-2Q抗原の発現に関しては、Q6の発現がOP9で、Q4とQ7の発現がTSt-4で、Q10の発現がST2で、とくに高かった。さらに、H-2M抗原に関しては、M2とM3の発現がとくにTSt-4で高かった。

図1. ストロマ細胞におけるT10/T22の遺伝子発現



最近、 $\gamma\delta$ Tリンパ球に発現が認められているNKレセプターであるNKG2DのリガンドであるRae-1とH60に関しては、Rae-1 α , β , γ とH50a, bの発現が明らかにTSt-4で高いことが認められた。

以上のような、特定のストローマ細胞において選択的に高い発現がある分子は、 $\gamma\delta$ Tリンパ球の分化に影響する可能性がある。すでに、一部の $\gamma\delta$ Tリンパ球サブセットのリガンドとして認められているT10/T22は、その候補として、種々のストローマ細胞に遺伝子導入し、試験管内での $\gamma\delta$ Tリンパ球の誘導に対する影響を調べることにした。

(2) 骨髄および胎仔肝由来の造血肝細胞(HSC)からのTリンパ球分化誘導と $\gamma\delta$ Tリンパ球の発生・分化

骨髄および胎仔肝のHSCからの $\gamma\delta$ Tリンパ球の発生・分化をストローマ細胞(OP9/G-DLL1およびOP9-DLL4)を用いて解析した結果、骨髄由来のHSCからは、出生以降の胸腺に出現する $\gamma\delta$ Tリンパ球のレパートワ(V γ 1, V γ 2, V γ 3, V γ 4)の遺伝子発現が、共培養開始後8日目以降に検出されたが、胎仔肝由来のHSCからは胎仔胸腺で認められる皮膚や肺に局在する $\gamma\delta$ Tリンパ球のレパートワ(V γ 5, V γ 6/V δ 1)の遺伝子発現が上記の $\gamma\delta$ Tリンパ球群

に先行して検出された。したがって、HSCの細胞の由来が、 $\gamma\delta$ Tリンパ球のレパートワ形成に重要であることが明確となった。また、いずれの場合も、 $\gamma\delta$ Tリンパ球の出現に引き続き、 $\alpha\beta$ Tリンパ球が出現した。また、ストローマ細胞上に発現するNotchリガンド(Delta1またはDelta4)によって、 $\gamma\delta$ Tリンパ球のレパートワが明確に変化することは認められなかった。

(3) ES培養細胞からのTリンパ球分化誘導と $\gamma\delta$ Tリンパ球の発生・分化

① OP9/G-DLL1とTSt-4/G-DLL1の違い：T細胞誘導培養系において、ストローマ細胞としてOP9/G-DLL1またはTSt-4/G-DLL1を用いた場合、結果的には、 $\gamma\delta$ Tリンパ球の分化誘導とレパートワ形成に明確な差異は認められなかった。 $\gamma\delta$ Tリンパ球は、mRNAレベルでは共培養開始後11日目頃から認められた。フローサイトメトリーでは14日目には検出された。出現してきた $\gamma\delta$ Tリンパ球のレパートワに関しては、安定したデータが出ておらず、TSt-4/G-DLL1を用いた場合には胎仔胸腺由来の $\gamma\delta$ Tリンパ球サブセット(V γ 5, V γ 6/V δ 1)が検出されることがあるが、OP9/G-DLL1を用いた場合には検出されない。実験毎に出現してくる $\gamma\delta$ Tリンパ球の細胞数や時期がかなり変動があり、安定した結果を得ることが難しい。原因は明らかではないが、血清のロット差やストローマ細胞の状態(Notchリガンドの発現頻度と発現量)など今後、検討する必要がある。

② T10/T22の影響：T細胞誘導培養系において、ストローマ細胞としてOP9/G-D1-T10、OP9/G-D1-T22、TSt-4/G-D1-T10、TSt-4/G-D1-T22を用いた場合、現時点では、 $\gamma\delta$ Tリンパ球の分化誘導とレパートワ形成に明確な差異は認められていない。現在も解析中であり、明確なことは言えないが、 $\gamma\delta$ Tリンパ球は正常に分化誘導され、 $\alpha\beta$ Tリンパ球にも影響はないように思われる。前述のように、実験ごとの結果のばらつきが大きく、T細胞誘導培養系の改善も併せて試みている。

③ Notchシグナル阻害剤DAPTの影響：ストローマ細胞としてOP9/G-DLL1を用いて、ES細胞からのT細胞誘導へのDAPTの影響を調べた結果、濃度依存的にTリンパ球の発生・分化の抑制も認められ、 $\gamma\delta$ Tリンパ球の選択的分化の誘導は認められなかった。さらに、阻害剤濃度および添加スケジュールなどを変更してみたが、DAPTの添加によって、 $\gamma\delta$ Tリンパ球が優位になることはなかった。

(3) 本研究に関連した研究成果

① NotchシグナルのサイトカインIL-22産生調節機構への関与：アリルハイドロカーボン受容体(AhR)を刺激することにより誘導されるCD4⁺細胞からのIL-22の産生に、Notchシ

グナルが重要であることを明らかにした。この研究により、炎症応答の調節に、Notch-AhRを軸とした IL-22 産生調節機構が関与していることが示唆された。

②IL-17 産生 γ δ T細胞の感染防御における重要な役割： γ δ T細胞が産生する IL-17A 結核菌に対する感染防御において、 γ δ T細胞が産生する IL-17A が、成熟した肉芽腫形成を誘導を通して、非常に重要な役割を果たしていることをマウスの実験系を利用して明らかにした。

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)

① Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G, Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung, Journal of Immunology, 査読有、184 巻、2010、4414-4422.

② Alam MS, Maekawa Y, Kitamura A, Tanigaki K, Yoshimoto T, Kishihara K, Yasutomo K, Proceedings of national academy of sciences U.S.A., 査読有、107 巻、2010、5943-5948.

[学会発表] (計0件)

[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]

ホームページ等

[http://www1.niu.ac.jp/about/teacher/detail.html?data\[id\]=173](http://www1.niu.ac.jp/about/teacher/detail.html?data[id]=173)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸原 健二 (KISHIHARA KENJI)
長崎国際大学・薬学部・教授
研究者番号：80214774

(2) 研究分担者

藤木 司 (FUJUKI TSUKASA)
長崎国際大学・薬学部・助教
研究者番号：00420612

(3) 連携研究者

なし