

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591154

研究課題名（和文） Notch-1を発現するヒト造血前駆細胞の純化と分化能解析

研究課題名（英文） Differentiation potential of Notch-1 positive human hematopoietic progenitors

研究代表者

岩崎 浩己（IWASAKI HIROMI）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20403925

研究成果の概要（和文）：

健康人の骨髄中に Notch-1 陽性ヒト造血前駆細胞を同定した。純化した Notch-1 陽性前駆細胞は液体培養系において、好中球系への分化能が抑制されており、おもに単球および樹状細胞への分化が認められた。純化した Notch-1 陰性の顆粒球・単球前駆細胞の液体培養中に Notch-1 陽性前駆細胞が分化してくることから、Notch-1 陽性前駆細胞は顆粒球・単球前駆細胞の下流に位置し、単球/樹状細胞系によりコミットした前駆細胞集団と考えられた。その遺伝子発現プロファイル解析においても、SpiB、FLT3、PU.1 など単球/樹状細胞分化に重要な分子の強い発現が認められた。Notch-1 陽性前駆細胞の分化能に及ぼす Notch シグナルの役割を検討したところ、リガンド刺激を受けて分化した樹状細胞では、HLA-DR や CD86 などの活性化マーカーの発現が弱い傾向が認められた。つまり、Notch シグナルは樹状細胞の成熟に抑制的に働く可能性があることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We identified a novel human myeloid progenitor population that expressed Notch-1 at a high level. These Notch-1 positive progenitors preferentially differentiated into the monocyte/dendritic cell lineage in vitro. Notch-1 positive progenitors emerged in the culture of Notch-1 negative granulocyte/macrophage progenitors (GMPs), suggesting that they are more committed to the monocyte/dendritic cell lineage compared to GMPs. Indeed, they highly expressed monocyte/dendritic cell-affiliated genes including SpiB, FLT3, and PU.1. When Notch-1 positive progenitors were cultured in the presence of Notch-ligand (Delta-like 1), their progeny dendritic cells expressed lower levels of CD86 and HLA-DR compared to cells cultured without Delta-like 1, suggesting that Notch signals suppress the activation/maturation of dendritic cell lineage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：血球分化

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液免疫学、Notch シグナル、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の Notch 分子は 4 種類存在し、5 種類のリガンドが対応しているが、この複雑さこそが Notch シグナルの役割を理解する上での障害となってきた。遺伝子改変マウスの解析から、Notch シグナルには組織特異的かつ分化段階特異的な多彩な機能が含まれることが明らかになってきた。近年、Notch-1 を介したシグナルがマウス胎生早期の造血幹細胞発生に不可欠であることが明らかにされた (Immunity 18, 699-711, 2003)。また、同シグナルはマウス T 細胞分化の初期段階、つまり T 細胞 vs. B 細胞の分化方向決定過程で、T 細胞分化誘導のための必須分子であることが明らかにされた (Immunity 10, 547-58, 1999)。さらに、Notch-2 を介したシグナルがマウス marginal zone B cell の分化に必須であることも示された (Immunity 18, 675-85, 2003)。一方、ヒト造血系における Notch シグナルの役割として最もインパクトのある知見は、実に 50% 以上の T-ALL 症例で Notch-1 遺伝子の活性型変異が認められるという事実であった (Science 306, 269-71, 2004)。しかし、正常のヒト造血系における Notch シグナルの役割については、断片的な報告を見るのみで、まとまった知見は得られていないのが現状である。例えば、Notch リガンドとの共培養によるヒト造血幹細胞の自己複製促進効果に関しては、未だ有望な報告は認められない。また、正常 T 細胞分化における役割に関しても、Notch リガンドである Delta-like 1 存在下で CD34 陽性ヒト造血前駆細胞からの T 細胞分化がサポートされるとの報告を散見するのみである。

2. 研究の目的

遺伝子改変マウスモデルをもちいた研究で、Notch シグナルは様々な臓器・組織の発生過程における分化方向決定機構に重要な役割を担っていることが報告されている。しかし、ヒト造血系においても Notch シグナルがマウスと同様の機能を有しているかは不明であり、ヒト造血前駆細胞を用いた研究により検証していくことが重要と考えられる。本研究課題においては、1) Notch-1 を強く発現するヒト造血前駆細胞分画をマルチカラーフローサイトメトリーによりプロスペクティブに純化する技術の確立、2) 純化した Notch-1 陽性ヒト造血前駆細胞の造血能 (分化・増殖能) を明らかにすること、3) リガンド刺激の有無がそれら前駆細胞の造血能に及ぼす影響とその際の分子基盤を明らかにすること、以上の 3 点を目的として研究を進める。

3. 研究の方法

(1) Notch-1 陽性ヒト造血前駆細胞の純化
抗 Notch-1 抗体をもちいて common myeloid progenitor (CMP)、granulocyte/monocyte progenitor (GMP)、megakaryocyte/erythrocyte progenitor (MEP) (Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 11872-7, 2002) との同時 staining を行い、Notch-1 陽性前駆細胞の分布を同定する。

(2) Notch-1 陽性ヒト造血前駆細胞の分化能解析
in vitro コロニー形成法をもちいて、Notch-1 陽性前駆細胞の分化能を検証する。

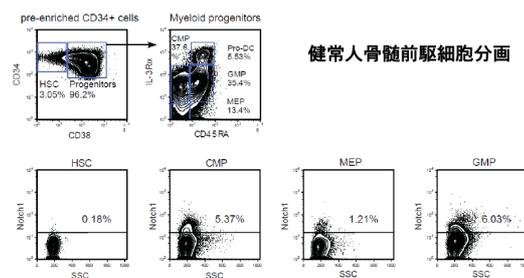
(3) Notch-1 陽性ヒト造血前駆細胞における Notch シグナルの役割
純化した Notch-1 陽性前駆細胞を Notch-1 のリガンドである Delta-like 1 を強制発現させたストローマ細胞株 (TSt4-DLL1) とコントロールの親株 (TSt4) 上で培養し、Notch-1 陽性前駆細胞の分化能に及ぼす Notch シグナルの役割を検討する。

(4) Notch-1 陽性ヒト造血前駆細胞の遺伝子発現プロファイル
純化した Notch-1 陽性前駆細胞について、定量的 PCR あるいはマイクロアレイをもちいた遺伝子発現を他の骨髓系前駆細胞と比較する。

4. 研究成果

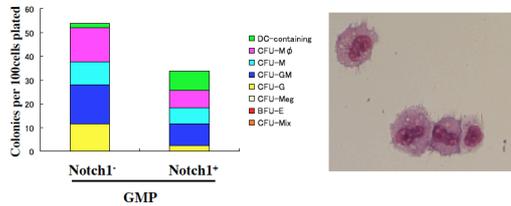
(1) フローサイトメトリー解析の結果、Notch-1 タンパクは健康人末梢血中の単球領域に強く発現しており、リンパ球および好中球、好酸球には発現を認めなかった。健康人骨髓単核球中の CD34 陽性 CD38 陰性分画にはヒト造血幹細胞が濃縮されているが、この分画中に Notch-1 を発現する細胞集団は認められなかった。一方、CD34 陽性 CD38 陽性分画は様々な造血前駆細胞を含んでいるが、そのうち骨髓系共通前駆細胞 (CMP) と顆粒球・マクロファージ前駆細胞 (GMP) のそれぞれ約 5% が Notch-1 を細胞表面に発現していた (図 1)。

図1 Notch1陽性ヒト造血前駆細胞の純化同定



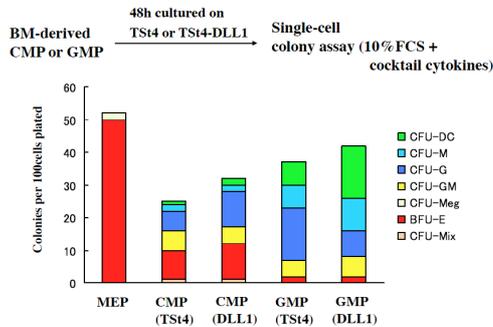
(2) 純化した Notch-1 陽性 GMP のメチルセルロース上でのコロニーアッセイにおいて、樹状細胞(DC)を含むコロニーの割合が増加していた(図2)。

図2 Notch-1陽性GMPは樹状細胞を含むコロニーを高頻度に形成する



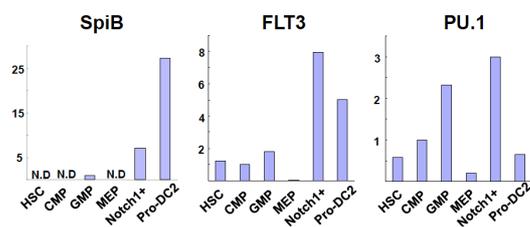
さらに、Notchリガンドである Delta-like 1 を発現するストローマ細胞株 Tst4-DLL1 と 48 時間共培養することによって、GMP の樹状細胞へのコミットメントが促進された(図3)。

図3 NotchシグナルはGMPからの樹状細胞分化を誘導する



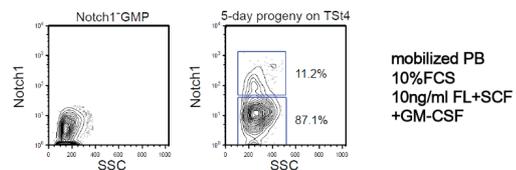
(3) Notch-1 陽性前駆細胞は樹状細胞分化に強い影響を及ぼす遺伝子群 (SpiB、FLT3、PU.1) を、他の前駆細胞群と比較して強発現していた(図4)。

図4 Notch-1陽性前駆細胞の遺伝子発現



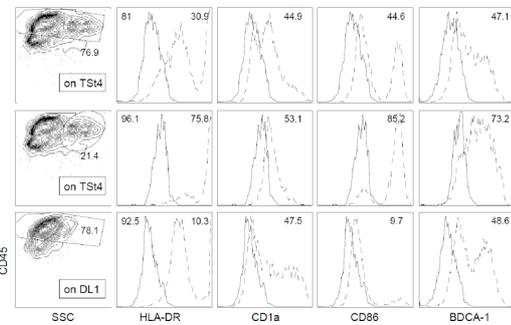
(4) Notch-1 陽性前駆細胞の分化経路を明らかにするために、純化した Notch-1 陰性 GMP を in vitro で短期培養したところ、Notch-1 陽性細胞分画が出現したことより、Notch-1 陽性前駆細胞は GMP の下流に存在し、より単球・樹状細胞系に分化した前駆細胞集団と考えられた(図5)。

図5 Notch-1陰性GMPから Notch1陽性前駆細胞が分化する



(5) Delta-like 1 刺激を受けて分化した樹状細胞は、活性化マーカーである HLA-DR や CD86 の発現が弱い。つまり、Notchシグナルは樹状細胞へのコミットメントを誘導するが、その成熟・活性化を抑制する可能性がある(図6)。

図6 Notchシグナルは樹状細胞の成熟活性化マーカー発現を低下させる



(6) 今後は、Delta-like 1 刺激前後での Notch-1 陽性前駆細胞における遺伝子発現プロファイルについてマイクロアレイをもちいて比較解析することで、樹状細胞分化における Notchシグナルの機能的メカニズムについて詰めていく計画である。

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7件)

Kikushige Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, Iino T, Mori Y, Iwasaki H, Niuro H, Takenaka K, Nagafuji K, Harada M, Ishikawa F, Akashi K. Human flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J Immunol.* 180, 7358-67, 2008.

(査読あり)

Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, Uike N, Niuro H, Takenaka K, Nagafuji K, Miyamoto T, Harada M, Takatsu K, Akashi K.

Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: Revision of

phenotypic definition of the human common myeloid progenitor.

J Exp Med. 206, 183-93, 2009.

(査読あり)

Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K.

Origin of basophils and mast cells.

Allergol Int. 58, 21-8, 2009.

(査読あり)

森康雄、岩崎浩己、赤司浩一

造血幹細胞から好酸球への分化機構

血液・腫瘍科 58(2), 135-40, 2009

(査読なし)

有信洋二郎、岩崎浩己、赤司浩一

好塩基球の発生・分化

アレルギー・免疫 16(3), 12-7, 2009

(査読なし)

岩崎浩己、赤司浩一

白血病幹細胞の細胞生物学

血液・腫瘍科 59(4), 467-75, 2009

(査読なし)

岩崎浩己、赤司浩一

白血病幹細胞の成立機序と標的治療

血液フロンティア 20(3), 149-58, 2010

(査読なし)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

岩崎浩己、赤司浩一

好酸球、好塩基球、肥満細胞の分化経路

実験医学 アレルギー疾患の免疫機構,

56-62, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.idenshi.co.jp/>

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 浩己 (IWASAKI HIROMI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号 : 2 0 4 0 3 9 2 5

(2) 研究分担者

赤司 浩一 (AKASHI KOICHI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号 : 8 0 3 8 0 3 8 5

