

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24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390121

研究課題名（和文） 組織環境要因としてのNotchLによる細胞系譜決定の分子機構解析

研究課題名（英文） Study for the determination of cell fates by NotchL as environment factor

研究代表者

穂積 勝人（HOZUMI KATSUTO）

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30246079

研究成果の概要（和文）：近年、ES細胞やiPS細胞、あるいは組織幹細胞に関する情報が蓄積し、幹細胞を用いた「再生医療」が現実味を帯びてきている。しかし、幹細胞は単独では機能的成熟細胞に分化せず、必ず何らかの組織環境に応じて分化することが知られている。よって、幹細胞を用いた組織再生の実現には、組織環境を分子的に理解し、それを精緻に制御することが重要である。申請者は、組織環境要因としてのNotchリガンド分子に焦点を当て、リンパ球分化と膵発生をモデルとして、その分化制御の分子機構について追求した。

研究成果の概要（英文）：Advances in the knowledge of the stem cells; ES, iPS or tissue-specific stem cells, have allowed the significant improvement of regenerative medicine. However, these stem cells cannot differentiate into functional mature cells without an appropriate environment. Thus, the manipulation of the environment factors is necessary for the regeneration at various tissues. In this study, we have focused on Notch ligands as an environment factor, and examine their physiological significances for the development of lymphocytes or pancreas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：発生病理

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物を含む多細胞生物の発生は、1個の受精卵に由来する細胞群がそれぞれ固有の分化を遂げ、各組織あるいは個体へと機能的あるいは形態学的に変化していく過程である。これら一連の分化発生過程では、細胞は単独で存在することはなく、未分化細胞間の相互作用および分化の場としての環境要因

の働きかけにより、細胞集団あるいは組織といった細胞社会の中で各細胞の運命が決定されている。こうした過程の分子レベルでの共通原理を探ることは、ヒトを含む多細胞生物個体の本質を理解する上で、きわめて重要な課題と考える。一方、近年、様々な組織から組織幹細胞の存在が報告され、また人工多能性幹細胞（iPS細胞）の効率的樹立法が確

立され、再生医療への期待が高まっている。こうした多能性幹細胞は、本来の生体内環境あるいはそれに類似した条件が整った場合にのみ正常な分化を開始し、組織に特徴的な細胞系譜への方向付けがなされるものと考えられている。しかし、それを制御する分子機構については依然として不明な点が多い。すなわち、幹細胞からの分化を制御する組織要因を分子レベルで理解することは、組織再生を目指した再生医療の発展に不可欠の課題と考える。

2. 研究の目的

Notch は、種を越えて広く保存された遺伝子で、細胞膜上に発現した *Notch* 分子とそのリガンド (*NotchL*、哺乳類では *Dll1*、*4*、*Jag1*、*2*) の結合により誘導されるシグナルによって、種々の細胞の分化系列決定に寄与することが知られている。また、*Notch* 系の様々な変異が個体あるいは器官発生の異常や腫瘍化とも関連し、多細胞生物の分化発生を理解するうえで非常に重要な分子と考えられている。我々はこれまで、分化環境要因としての *NotchL* の生理的役割を解明することを目指して、誘導型 *NotchL* 遺伝子欠損 (*floxed*) マウスの開発を世界に先駆けて行ってきた。本研究では、誘導型 *Dll14*、*Dll11* および *Jag1* 遺伝子欠損マウスを用い、胸腺内 T 細胞分化および腺発生をモデルとして、*NotchL* の特徴的な役割を検証し、またさらに誘導型 *NotchL* 発現トランスジェニック (*Tg*) マウスも用い、相互の *NotchL* の機能的相違についても追求した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス

Dll11-floxed (Hozumi K et al., *Nat Immunol* 5:638, 2004)、*Jag1-floxed* (Brooker R et al., *Development* 133:1277, 2006) および *Dll14-floxed* (Hozumi K et al., *J Exp Med* 205:2507, 2008) マウスをそれぞれ用いた。胸腺上皮細胞にて Cre 分子を発現する *FoxN1-Cre* (Hozumi K et al., *Nat Immunol* 2004) および腺上皮細胞にて発現する *Ptf1a-Cre* マウス (Kawaguchi Y et al., *Nat Genet* 32:128, 2002) は、それぞれスイス・バーゼル大学の Hollander 博士、京都大学・川口博士より供与された。Cre 依存的に *Dll11* あるいは *Dll14* を発現する *Tg* マウス

(*CAG-CAT-D1*、*CAG-CAT-D4*) は、国立遺伝研・相賀博士より供与された。

(2) 免疫染色等

抗マウス CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 、CD3、CD19、sIgM、Thy1.2、CD25、DX5、CD44 mAbs は、すべて eBioscience 社製を用いた。胸腺細胞を各抗体と反応させ、洗浄後、FACSCalibar (BD

Bioscience) を用いてフローサイトメトリ解析を行った。マウス胎仔腺組織は、4%PFA 固定後パラフィン包埋し、2-3 μm の切片とした。抗 Sox9 (Millipore)、Pdx1

(F109-D12、DSHB)、CK19 (TROMA-III、DSHB) および DBA-lectin (Vector) を用いて染色し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000、Keyence) にて観察した。

4. 研究成果

(1) 胸腺分化環境要因としての Delta-like 4 (*Dll14*) の役割

T 細胞は、他の血液細胞が骨髄中にて分化・成熟するのとは異なり、分化環境として胸腺を必要とする。これまで、我々を含む複数の研究グループにより、造血未分化細胞から T 細胞への分化には *Notch* シグナルが重要であることが示されてきた。我々は、哺乳動物での 4 つの *Notch* リガンドのうち、3 つ (*Dll11*、*Dll14*、*Jag1*) について誘導型遺伝子欠損マウスを作製・解析し、胸腺環境の成立には、胸腺上皮細胞に発現する *Dll14* が唯一重要であることを明らかにした。すなわち、胸腺上皮細胞にて *Dll14* 遺伝子を欠失したマウスでは、胸腺内に T 細胞はまったく存在せず、代わりに多数の B 細胞が出現することを見出した (図 1)。

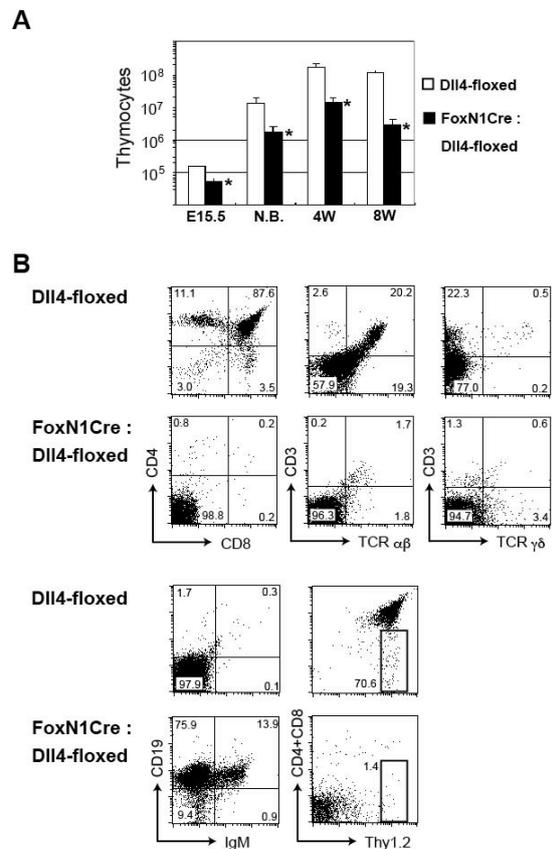


図 1. *Dll14* 消失胸腺における T 細胞分化不全

A、D114-floxed (対照) および FoxN1-Cre・D114-floxed (D114 欠失) マウス胸腺細胞数を胎齢および週齢を追って、調べた。D114 遺伝子欠失により明らかな細胞数の減少が観察された。

B、胸腺細胞のフローサイトメトリー解析、4 週齢マウス胸腺細胞を、表記の細胞表面分子を認識する抗体で蛍光標識し、フローサイトメーターにより解析した。数字は各画分の存在比率を表す。D114 の消失により、正常 T 細胞分化はまったく認められず、代わりに異常な B 細胞の出現を認めた。

また Notch シグナルは、胸腺内での未分化 T 細胞の分化・増殖にも重要とされており、D114 の役割をさらに検討した。D114 非存在下に胸腺未分化 T 細胞 (DN1/2) を胸腺器官培養にて分化誘導を行うと、ほとんど T 細胞は分化できなかった (図 2)。これは、当該ステージにて Notch シグナルの標的分子と考えられてきた TCRβ 鎖および pTa の遺伝子導入では改善しなかった。一方、最近、Notch 下流にて機能することが示唆される c-myc および活性化 Akt の共発現によっても、正常 T 細胞分化は再現できず、異常増殖が観察された。これらのことから、T 細胞分化および正常細胞増殖の担保には、制御された Notch シグナルが必須であることが明らかとなった。今後、過剰 Notch シグナルの関与が明らかとなっているヒト T 型急性リンパ性白血病 (T-ALL) での c-myc、Akt シグナルの寄与について検証し、T 細胞分化およびその異常増殖における Notch シグナルとその下流分子について検証を進める。

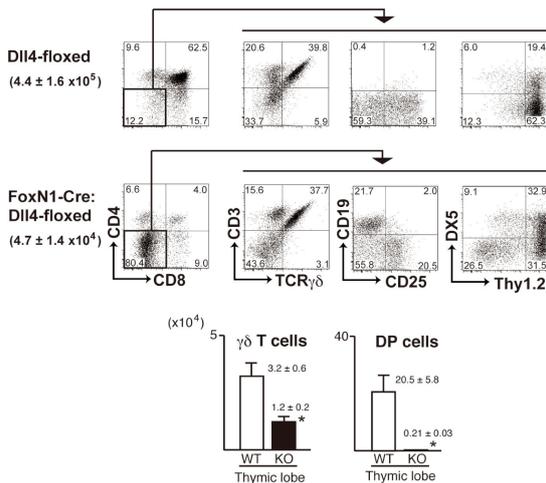


図 2. D114 非存在下における胸腺未分化細胞 (DN1/2) の分化

胸腺上皮細胞にて D114 遺伝子欠失を誘導した胸腺 (FoxN1-Cre: D114-floxed) と対照 (D114-floxed) それぞれに、胸腺細胞の T

系列細胞の最も未分化な画分 (CD44+CD117+; DN1/2) を分離後、導入し、9 日後の T 細胞分化を観察した (上図)。また、TCR $\gamma\delta$ 発現細胞および CD4/CD8 両陽性 (DP) 細胞の絶対数も示した (下図)。D114 の消失により、T 細胞分化は著しく低下した。

(2) T 細胞分化誘導系における Notch リガンドの機能的差異

我々はこれまで、胸腺組織に依存せず、in vitro にて T 細胞分化誘導を行うことができる培養系を世界に先駆けて開発し、T 細胞分化誘導における Notch シグナルの分子的性状について調べてきた。その結果、D111、D114 に加えて、Jag2 によっても T 細胞分化誘導が可能なることを見出した (図 3)。一方、Jag2 ときわめて類似の構造を持つ Jag1 には T 細胞分化誘導能がなく、両者および D11 の誘導する Notch シグナルの機能的差異が、T 細胞誘導の鍵となることが考えられた。そこで、Jag1 分子と同様の活性を保持することをすでに示した J1short 変異体 (Jag1 分子の細胞外領域のうち、先端部に位置する DSL ドメインに加えて、8 個の EGF リピート構造のみを有する; 図 4A) から、Notch 分子との結合に必須である DSL ドメインを、Jag2 あるいは D114 に交換し、その Notch シグナル誘導能および T 細胞誘導能について調べた (図 4)。その結果、D114 由来の DSL ドメインには、J1short の基本構造と協働し、Notch シグナルを誘導する活性がないことが示され、少なくとも DSL ドメインの機能的差異のみがそのリガンド特性を決めるのではないことが明らかになった。他方、Jag2 由来 DSL ドメインを挿入した J2DSL-J1short は、Jag2 と類似の、強い Notch シグナルを誘導することが判明した。しかし、造血細胞全般に発現する Notch 糖鎖修飾酵素: Lfng 存在下では、Jag1、J1short 同様に、その誘導シグナルが著しく減弱し、一定の耐性が観察される Jag2 とは異なったシグナル誘導パターンを示した。この結果と相関して、J2DSL-J1short は、Jag1 同様に T 細胞誘導能を示さなかった (図 4)。以上のことから、Jag2 由来 DSL ドメインは、Lfng による糖鎖修飾のない Notch に対するシグナル誘導の増強に関わることが明らかとなる一方、糖鎖修飾による影響は、Jag 分子の DSL 以外の領域、おそらく EGF リピート構造の先端部に起因する可能性が考えられた。今後、さらに EGF リピートを含む変異体を作製し、上記の可能性を検証する。さらに、こうした機能解析から、糖鎖修飾部位を認識する Notch リガンド側の領域を同定し、機能的側面から Notch/Notch リガンド結合の詳細を明らかにする。こうした取り組みは、Notch/Notch リガンドを特異的に制御し、

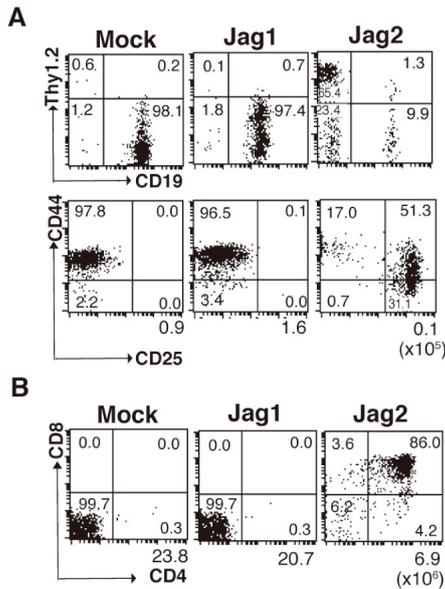


図3. Jagged2 刺激による T 細胞分化誘導

Jagged1 あるいは Jagged2 を強制発現させた NIH-3T3 (A) あるいは PA6 (B) 細胞上にて、IL7 存在下に、胎仔肝臓由来造血未分化 (Lin. -CD117+) 細胞を 12 日間 (A) あるいは 21 日間 (B) 培養した。Jagged2 発現細胞との共培養により、Thy1.2+ あるいは CD25+ 細胞として未分化 T 細胞あるいは CD4/CD8 両陽性細胞の分化が観察された。

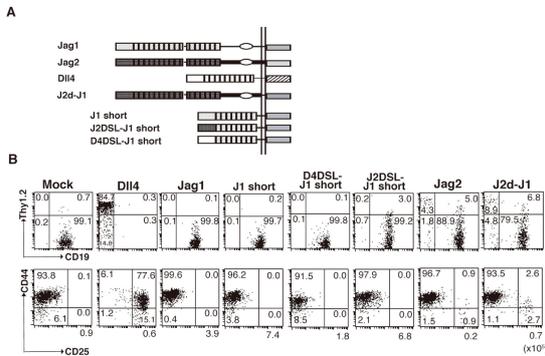


図4. Jagged1/Jagged2 キメラ分子による T 細胞誘導

(A) Jagged1 分子の先端部のみを保持する J1 short 分子およびその DSL ドメインを変換した分子の構造 (B) Jagged1 を基盤として作製した各種 Notch リガンド変異体を過剰発現した NIH-3T3 細胞を用いて、図4に示すような T 細胞分化誘導を行った。Jagged2 の細胞外領域全体を保持する J2d-J1 分子は T 細胞誘導能を有するのに対し、Jagged2 あるいは Dll4 の DSL ドメインに置換した J1 short 変異体には、T 細胞誘導能は認められなかった。

Notch シグナルを機能的に修飾しうる薬剤の開発に重要と考える。

(3) T 細胞分化誘導における Dll4/Dll1 間の in vivo での機能的差異

T 細胞分化決定に重要な Dll4 の機能を詳細に理解するため、胸腺上皮細胞にて *Dll4* 遺伝子が欠失する FoxN1-Cre/*Dll4*-floxed マウスを、Cre 依存的に Dll4 あるいは Dll1 を強制発現する Tg マウス (国立遺伝研・相賀博士より恵与) と交配し、内在性 Dll4 欠失による T 細胞分化障害の回復を試みた。その結果、Dll4 の強制発現により、内在性遺伝子の欠失により消失していた Dll4 が胸腺上皮細胞上に再発現し、T 細胞分化支持能の回復を認めた。一方、Dll1 の強制発現によって T 細胞分化支持能は回復しなかった。しかし、①胸腺内での B 細胞分化を抑制したこと、②内在性 Dll4 存在下に、強制発現された Dll1 が、Dll4 依存的 T 細胞分化を遅延させることから、Dll1 は Dll4 とは異なる Notch シグナルを誘導していることが考えられた。このことは、未分化造血細胞に発現する Notch1 が、Dll4 と選択的に協働することを予想させ、また、Notch2/Dll1 依存性を示す脾臓偏縁域 B 細胞分化との対比から、Notch シグナル発動の分子基盤を探るうえできわめて興味深い知見である。

一方、B 細胞分化支持能を有する骨髄由来分化支持細胞に NotchL を強制発現させ、in vitro にて造血未分化細胞より T 細胞分化を誘導する実験系では、Dll4/Dll1 間では、効率に若干の違いがあるものの、本質的な差異は観察されない。そこで、両者の in vivo での機能比較実験では、発現量を厳密に比較できる、より精緻な実験系の開発が望まれる。そうした系の基盤技術を整備するため、ドイツ・GSF 研究所との共同研究により、ES 細胞にて *Rosa26* 遺伝子領域にリコンビナーゼ標的配列 (attB) を挿入し、それに対応した attP 配列で挟まれた GFP 含有発現ユニットを作製後、PhiC31 リコンビナーゼと同時に ES 細胞へ遺伝子導入することにより、同領域への効率的置換導入系の確立に成功した。今後、Dll1 発現ユニット導入 ES 細胞から遺伝子改変マウスを樹立し、より精密な in vivo 機能比較実験を行う予定である。

(4) 膵発生過程における Dll1、Jagged1 の役割

膵内分泌細胞分化に必須の転写因子：Ngn3 が、Notch 下流にて機能する Hes1 の標的遺伝子であることから、膵細胞分化に Notch シグナルが寄与することは早くから想定されていた。また、Notch シグナル伝達分子：Rbpj の消失が顕著な膵発生異常を呈することからも、Notch シグナルの重要性が推察されて

いた。しかし近年、Rbpj が膵発生に必須の転写因子：Ptf1a と結合しその機能発現に必須の役割を担うこと、膵細胞に主として発現するとされた Notch1/2 の二重遺伝子欠損マウスでは膵発生異常がきわめて微弱なことが示され、膵発生における Notch シグナルの役割には疑問が呈されていた。我々は、膵未分化上皮細胞 (CD49F⁺CD326⁺) にて Notch1、Notch2 および Notch3 が発現することを見出し、Notch 分子群に機能的重複がある可能性を示唆した。また同細胞に Dll1、Jagged1 が発現することを確認した。そこで、Ptf1a-Cre、Dll1⁻、Jagged1-floxed マウスを作製・解析し、①未分化内分泌細胞への分化亢進、②腺房組織の減少、③膵管の異常拡大、④ラ島構造の異常と a/b 細胞比の上昇等の異常形質を伴う、膵臓の発生不全を見出した。これらの結果から、Dll1、Jagged1 に由来する Notch シグナルが膵未分化上皮細胞間で誘導され、膵細胞系譜の決定およびその発達に重要な役割を担うことを明らかにした。

また、膵発生における Dll1/Jag1 の発現部位、時期をより詳細に検証し、膵特異的構造 (腺房、膵管および膵島) の形成が完了する胎生後期 (E18.5) における膵多能性未分化細胞 (Pancreatic multipotent progenitors, MPP) の生成と、その環境因子としての NotchL の意義について調べた。転写因子 Sox9 および Hnf1beta の発現を指標とし、Cre/loxP 系を用いた細胞系列追尾実験 (Cre-mediated lineage tracing) による報告から、胎生後期での MPP として Sox9⁺Hnf1b⁺細胞が想定されてきた。しかし、同細胞がどこに存在し、どのような性状を示すのかについての詳細な検討はなされていない。我々は、E18.5 マウス膵組織の免疫組織化学解析から、Sox9⁺Hnf1b⁺の性状を示す腺房中心 (centroacinar, CA) 細胞を同定した。また、Sox9 および Hnf1beta とほぼ同様の発現様式を示す CD133 および DBA レクチン結合能を新たな指標とすることにより、細胞分散後、フローサイトメーターによる細胞分離を行うことが可能となり、CD133⁺Sox9⁺DBA⁺Hnf1b⁺細胞を純化できることを示した。得られた純化細胞を凝集培養にて 1 週間培養すると、CD133⁺DBA⁺細胞は効率的に細胞塊を形成し、外分泌、内分泌、膵管のいずれの細胞にも分化することを明らかにした。

Dll1 および Jag1 は、E13-15 では膵上皮細胞に広く発現するが、胎生後期に CA 細胞を含む膵管細胞に限局した。また E10.5 以前は膵上皮細胞に Dll1 のみが、出生後は膵管細胞に Jag1 のみが、それぞれ単独で発現することを示した。この結果は、Dll1 および Jag1 の単独遺伝子欠損マウスが、胎齢早期 (E9.5) の内分泌細胞の過剰形成および生後の膵管形成不全を示す研究結果と良く一致した。一

方で、膵形成特に多能性未分化細胞が生成する胎生後期における NotchL の生理的意義については明らかにされていない。そこで我々は、Ptf1a-Cre、Dll1/Jag1-floxed マウスを用いて検討したところ、Dll1 および Jag1 の消失により、Sox9 の発現が大きく低下すること、これに伴い CA 細胞がほとんど生成せず、一部の CA 細胞は増殖不全と細胞死を呈し、腺房中心に存在しないことが明らかになった (投稿中、図 5)。すなわち、Dll1、Jag1 は、MPP の生成およびその維持に寄与する環境因子として機能し、膵臓の恒常性維持に重要な役割を担うことが明らかになった。今後、MPP としての CA 細胞を、単一細胞レベルで分析し、膵幹細胞の性状を、Notch シグナルの観点から精査する。

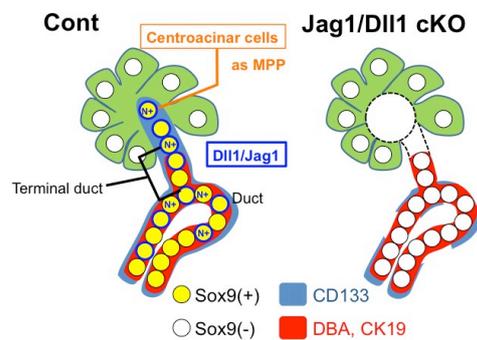


図 5 膵多能性未分化細胞としての腺房中心細胞と NotchL の役割

マウス胎生後期 (E18.5) における腺房中心細胞 (Centroacinar cells) の存在部位と、転写因子 Sox9 の発現 (黄色)、Notch シグナルの発生 (N⁺)、CD133 発現 (淡青)、胆管マーカー (DBA, CK19; 赤) および NotchL: Dll1、Jag1 の発現 (濃青) を図示した。NotchL 欠失環境 (Jag1/Dll1 cKO) においては、腺房中心細胞および末端膵管細胞 (Terminal duct) が消失し、膵管細胞での Sox9、CD133 の発現が減弱する。その結果、生後、未分化細胞からの細胞供給が途絶え、著しい膵形成不全を呈し、生後 2 週程度で死亡する個体が多い。

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)

①Abe N, Hozumi K*, Hirano K, Yagita H and Habu S. Notch ligands transduce different magnitudes of signaling critical for determination of T-cell fate. *Eur. J. Immunol.* 40:2608-2617, 2011.

(*corresponding autor)、査読有

[学会発表] (計10件)

- ① Nakano Y, Hozumi K et al., Roles of Notch ligands: Delta-like 1 and Jagged1 in pancreas development. 第34回日本分子生物学会年会 (2011.12.13、横浜)
- ② Hirano K, Hozumi K et al., Physiological significance of Delta-like 4 for the DN/DP transition in the thymus. 14th International Congress of Immunology (2010.8.25、Kobe、Japan).
- ③ Hozumi K et al., Delta-like 4 has particular significance for T cell development in the thymus. 14th International Congress of Immunology (2010.8.25、Kobe、Japan).
- ④ Nakano Y, Hozumi K et al., The physiological significance of Notch ligands for pancreatic development. 第32回日本分子生物学会年会 (2009.12.10、横浜)
- ⑤ Hozumi K et al., Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. 第32回日本分子生物学会年会 (2009.12.9、横浜)
- ⑥ 穂積勝人他、胸腺内 T 細胞分化における Dll4 の生理的役割、第39回日本免疫学会学術集会 (2009.12.2、大阪)

[図書] (計2件)

- ① 穂積勝人、胸腺内 T 細胞分化における Dll4/Notch シグナルの役割、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、56巻、P.225-231、2011.
- ② 穂積勝人、胸腺分化環境要因としての Delta-like 4 の役割、臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、52巻、P.130-138、2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

穂積 勝人 (HOZUMI KATSUTO)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：30246079

(2) 連携研究者

安藤 潔 (ANDO KIYOSHI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70176014