

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 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390154

研究課題名（和文） ニッチ特異的ノッチシグナルにより細胞系列決定の分子機構 -T 細胞をモデルとして-

研究課題名（英文） Molecular mechanism of T cell development in Notch signal mediated niche

研究代表者

垣生 園子 (HABU SONOKO)

順天堂大学・医学部・客員教授

研究者番号：30051618

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Notch リガンドの下流因子として T 細胞特異的転写因 GATA3 と Runx 1 を想定し、それらが胸腺内での T 細胞の分化過程で Notch 発現の動態と相関して発現することを検証した。同時に胸腺 Notch リガンドの特性を明らかにした。また、両転写因子の過剰発現は分化阻止を誘導することを示し、分化ステージ特異的に Notch シグナルが制御にかかわっていることが示唆された。また、ヒト Notch リガンド発現の遺伝子導入マウスを作製した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we showed that in the T cell developing pathway, GATA3 and Runx1, T cell specific transcription factors, are induced to express correlatively to Notch receptor on immature T cell in the thymus. Notch ligand required for T cells development is also characterized. The over-expression of these transcription factors impaired the early stage developing pathway. Collectively, developing stage specific Notch signaling is suggested regulate the expression of both transcription factors. We also established human Notch L transgenic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
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・免疫学

キーワード：免疫学、胸腺ノッチ、T 細胞分化、ノッチシグナル

1. 研究開始当初の背景

多分化能を有する細胞が特定の細胞系列に分化・コミットする過程では、細胞系列特異的分子の発現制御を伴うが、多細胞生物ではその引き金として組織環境（ニッチ）からのシグナルは重要である。造血細胞系の中で T 細胞のみが胸腺という特殊環境で分化することから、胸腺ニッチには T 細胞特異的の分化

誘導能があると考えられてきたが、その分子レベルの実態は不明であった。1999 年に Notch1 欠如マウスの解析から、胸腺内 T 細胞の分化過程には Notch シグナルが不可欠であることが明らかとなった。我々は、T 細胞分化誘導に関わる in vitro および in vivo の系を駆使して、Notch シグナル誘導に必要な Notch リガンド (NotchL) は胸腺ニッチ構成

の上皮細胞表面に発現しているが、5種類のリガンドのうち、delta like 4 (Dl1-4)のみが特異的にT細胞分化誘導に関わっていることを、誘導型遺伝子欠損マウスの作製によって世界に先駆けて証明した (Nature Immunol. 2004. J. Exp. Med. 2008)。Notchシグナルの有無は、標的遺伝子としてコンセンサスを得ている Hes-1/5 の発現やそのプロモーター活性をもって評価しているが、必ずしも本当のNotchシグナルの総和を代表するものでなく、他の標的を含めた絡みで議論されつつある。NotchシグナルはT細胞以外の分化段階の異なる様々な細胞において、分化決定や増殖制御に関わる事が知られている。また、それら細胞は異なる NotchL を発現したニッチに存在する。従って、リガンド依存的にNotchシグナルの下流で起こる現象を分子レベルで明らかにすることは、多細胞生物個体に於ける臓器特異的な細胞分化の本質を理解する上で、重要な課題である。

2. 研究の目的

上記背景に基づき、本研究では我々が蓄積してきた知見と実験系を基盤として、ニッチに軸足をおいたT細胞分化をモデルにして、異なるNotchL (特にDl1-4とJagged-1)が誘導するNotchシグナルの下流にある標的遺伝子の同定とそのエピジェネティクスを明らかにし、ニッチ特異的リガンドを介した細胞分化を理解する一助とする。具体的には、シグナル下流因子としてGATA3とRunx1に焦点を当てて、マウス胎仔胸腺および胎仔造血幹細胞を用いてNotchシグナルの量的/質的相違による発現状態を検討する。

3. 研究の方法

(1) T細胞特異的転写因子のエピジェネティクスの解析：
Notchシグナルの標的遺伝子としてRunx1とGATA3に焦点を絞って、胸腺リンパ球のT細胞系譜への分化過程における発現状態をNotch受容体との関連で解析する。材料としては胎仔胸腺および成獣の各分化段階サブセットおよびNotchL発現のストローマ細胞(Dl1-1, 4, Jagged-1, 2)と共培養した胎仔肝由来造血幹細胞(HSC, c-kit+Lin-細胞)を使用する。解析には、flow-cytometry, RT-PCR, immunoblot, Chip assayを主たる手法とする。Notchシグナルに関しては、intra cellular Notch(ICN)およびHes-1発現を指標とする。

(2) 異なるNotchLを介したシグナル異同の探索：

①マウス胎仔肝臓由来のHSCを各notchリガンド(Dl1-4, Dl1-1, Jagged-1およびJagged-2)発現のストローマ細胞(OP9-D4, OP9-D1)上で共培養し、アレイ解析に付す。

②各Notchリガンドの細胞外と内を入れ替えたキメラNotchリガンドを作製して、HSCとの共培養系に持ち込み、T細胞分化誘導に必要なリガンド領域を決定する。

(3) 異所的NotchL発現によるT細胞分化誘導とHSC増殖への影響：

Notchリガンド特異的notchシグナルのT細胞分化への影響効果をin vivoの組織特異的ニッチの影響として解析するために、異所的にNotchL発現する遺伝子操作動物を作製する。具体的には、骨髄特異的発現を期待して活性化a1コラーゲン遺伝子近位プロモーター下に組み込んだJagged-1およびDl1-4遺伝子をマウス受精卵に常法により導入する(財団法人実験動物中央研究所との共同研究で進める)。

4. 研究成果

(1)Notchシグナル量は、NotchおよびGATA3の発現を制御する。

①Notch分子とGATA3およびRunx1転写因子発現の相関：

胸腺内に移入した直後のHSC(DN1, CD2)はNotchを高発現している。Notchシグナルの直下にあるpTaが発現開始すると(CD3, 4分化ステージ)、T細胞系譜にコミットすると同時にNotchの発現およびNotchシグナル(ICNおよびHes-1同定)が下がり始める。この分化ステージはNotch発現とNotchシグナルが低下する時機と一致する。GATA3の発現も同様の変化を示した。

②胸腺特異的GATA3およびRunx1のプロモーター領域

GATA3およびRunx1遺伝子は共に2つのプロモーター領域をもち、胸腺内分化過程ではGATA3は1aをRunx1ではproximalを使用することを明らかにした。なお、GATA3の胸腺内発現はDNステージを除いて低かった。

③Runx1過剰発現のT細胞分化過程への影響
胸腺T細胞型distal Runx1の過剰発現トランスジェニックマウスを作製して、胸腺内T細胞の分化への影響を調べたところ、未熟分化過程(DNからDP)が阻止された。しかし、末梢T細胞型proximal Runx1の過剰発現ではそのような分化阻止はみられなかった。また、1bプロモーターによるGATA3トランスジェニックマウスでも胸腺内での分化異常は観察されなかった。

以上、胸腺内分化過程では、Notchシグナルはその下流のGATA3およびRunx1の発現開始には必要であるが、T細胞系譜として分化するためには抑制的に作用することが示唆された。Notch発現を制御する機構解明が今後の課題となった。

(2)T細胞分化誘導NotchシグナルとNotchリガンドの差異：

Notchリガンドのうち、T細胞を分化誘導するDl1-4およびJagged-2と出来ないJagged-1の

キメラ分子を発現するストローマ細胞を作製し、HDCのT細胞系譜での分化誘導能をしらべた。その結果、細胞外ドメインのうち、fringe修飾を受けたNotchと分子相互作用ができる領域を持つリガンドのみ(Dll-4とJagged-2)が、T細胞分化誘導能をもつNotchシグナルをいれることが出来た。

(3) Notchシグナルと造血幹細胞の生存維持に関する研究では、骨髄特異的にヒトNotchリガンド遺伝子を発現するトランスジェニックNOGマウス(hD1-NOGおよびhJ1-NOG Tgマウス)を樹立した。後者では移植ヒト臍帯血幹細胞が効率良く増殖・維持された。ヒト造血腫瘍細胞におけるcancer stem cellの解析やNotchシグナルの腫瘍化へのin vivoモデルとしても有用である。

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16件)
(全て査読あり)

1. Baba Y, Maeda K, Yashiro T, Inage E, Niyonsaba F, Hara M, Suzuki R, Ohtsuka Y, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, and Nishiyama C: Involvement of PU.1 in mast cell/basophil-specific function of the human *IL1RL1/ST2* promoter. *Allergol Int.* in press
2. Wong WF, Kohu K, Nakamura A, Ebina M, Kikuchi T, Tazawa R, Tanaka K, Kon S, Funaki T, Sugahara-Tobinai R, Looi CY, Endo S, Funayama R, Kurokawa M, Habu S, Ishii N, Fukumoto M, Nakata K, Takai T, and Satake M: Runx1 deficiency in CD4+ T cells causes fatal autoimmune inflammatory lung disease due to spontaneous hyperactivation of cells. *J Immunol*, 188:5408-5420, 2012
3. Tamauchi H, Amoh Y, Itoh M, Terashima M, Masuzawa M, Habu S, Katsuoka K and Iwabuchi K: GATA-3 regulates contact hyperresponsiveness in a murine model of allergic dermatitis. *Immunobiology*, 217:446-454, 2012
4. Kanada S, Nishiyama C, Nakano N, Suzuki R, Maeda K, Hara M, Kitamura N, Ogawa H, Okumura K: Critical role of transcription factor PU.1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells. *Blood*, 117:2211-2222, 2011
5. Wong WF, Nakazato M, Watanabe T, Kohu K, Ogata T, Yoshida N, Sotomaru Y, Ito M, Araki K, Telfer J, Fukumoto M, Suzuki D, Sato T, Hozumi K, Habu S, Satake M: Over-expression of Runx1 transcription factor impairs the development of thymocytes from the double-negative to double-positive stages. *Immunology*, 130:243-253, 2010
6. Abe N, Hosumi 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, 2010
7. Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, Maruyama H, Habu S, Kitasato H: IL-10 controls Th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunobiology*, 216:811-820, 2010
8. Matsumura Y, Kanoh M, Habu S, Komotori J, Niiyama S, Tamauchi H, Amoh Y, Terashima M, Katsuoka K: Th2 Immune Response Plays a Critical Role in the Development of Nickel-Induced Allergic Contact Dermatitis. *Allergy Immunol*. 153:303-314, 2010
9. Maeda K, Nishiyama C, Ogawa H, Okumura K: GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells. *J Immunol*, 185:4252-4260, 2010
10. Kametani Y, Suzuki D, Kohu K, Satake M, Suemizu H, Sasaki E,

- Ito T, Tamaoki N, Mizushima T, Ozawa M, Tani K, Kito M, Arai H, Koyanagi A, Yagita H, Habu S: Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset. *Exp Hematol*, 37:1318-1329, 2009
11. Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T: Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, 459:523-527, 2009

[学会発表] (計 14 件)

1. Negishi N, Ito R, Hozumi K, Ando K, Habu S: Increase of transplanted human hematopoietic stem cells in transgenic NOG mice expressing human Jagged-1 in osteoblasts. 3rd international workshop on humanized mice, Pittsburgh, USA, (2011年10月)
2. 馬場洋介、西山千春、前田啓子、鈴木竜洋、奥村康、大塚宜一、清水俊明: IL-33受容体のマスト細胞・好塩基球特異的発現制御機構の解明。第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2011年11月12日)
3. 三朝博仁、亀谷美恵、片野いくみ、伊藤亮治、古川敦子、津田万里、今井浩三、垣生園子、幕内博康、徳田裕: B細胞エピトープに基づく新規HER2ペプチドワクチンの抗腫瘍効果。第13回日本がん免疫学会総会 (2010年7月22日)
4. Sato T, Chiba T, Sugou T, Satake M, Habu S: Evidence for the coupling of DNA replication control and lineage choice into CD4/8 thymocytes (CD4/8胸腺細胞分化とDNA複製制御は共役する)。第39回日本免疫学会総会・学術集会 (2009年)
5. Hozumi K, Hirano K, Nakano Y, Yagita H, Habu S: The physiological significance of D114 for T cell development in the thymus (胸腺内T細胞分化におけるD114の生理的役割)。第39回日本免疫学会総会・学術集会 (2009年12月2日)
6. 前田啓子、西山千春、戸倉智子、奥村康: マスト細胞におけるc-kit分子の発言調節機構について。第59回日本アレルギー学会秋季学術集会 (2009年10月31日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣生 園子 (HABU SONOKO)
順天堂大学・医学部・客員教授
研究者番号: 30051618

(2) 研究分担者

前田 啓子 (MAEDA KEIKO)
大学院・医学研究科・助教
研究者番号: 20053374

佐竹 正延 (SATAKE MASANOBU)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号: 50178688