

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16331

研究課題名（和文）オミクス手法を用いたT細胞の初期発生を誘導するNotchシグナルの解明

研究課題名（英文）Role of Notch signaling in early T cell development

研究代表者

平野 健一（Hirano, Ken-ichi）

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：70535228

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々が独自に確立したNotch1およびNotch2を欠失したリンパ球前駆細胞株を用いた解析から、Notch2シグナルは、Tcf7などの最初期のT細胞分化における重要なNotch標的遺伝子を十分に活性化できないため、Notch1に比べT細胞分化能が非常に弱いことが明らかになった。また、Notch1欠失細胞にTcf7を導入し、さらにNotch2からのシグナルを誘導させると、T細胞分化は部分的に回復することが分かった。これらの結果から、NotchシグナルはTcf7依存のおよび非依存的な経路によって初期T細胞分化を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで困難であったT細胞の初期発生を誘導するNotchシグナルの標的遺伝子の網羅的な解析を行った。NotchシグナルはT細胞の発生だけでなくT細胞急性リンパ性白血病の発症にも深く関与しており、本研究による成果は、Notchシグナルによる分子制御機構を理解する上で重要な知見であると考えている。

研究成果の概要（英文）：We established lymphoid progenitor cell lines lacking Notch1 and/or Notch2 derived from Cas9-expressing Ebf1-deficient mice. We found that Tcf7, one of the earliest and functional Notch targets, is not fully activated by Notch2. Moreover, T cell differentiation was partially restored by the overexpression of Tcf7 with Notch2 signaling in Notch1-deficient cells. These results suggest that Notch signaling induces early T cell differentiation via Tcf7-dependent and Tcf7-independent pathways.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 Notchシグナル 初期T細胞分化 造血前駆細胞

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獲得免疫応答において中心的役割を担う T 細胞は、リンパ球前駆細胞が胸腺へ移行し、自身が発現する Notch1 と胸腺上皮細胞が発現する Notch リガンドである Dll4 を介した Notch シグナルによって T 細胞系列へ分化を開始する。Notch は Notch リガンドと結合すると、細胞内領域 (Notch-IC) が切断され、活性化型 Notch として核内へ移行し、RBPJ や MAML と複合体を形成することで標的遺伝子の転写制御を行う。Notch1 欠失マウスの胸腺では T 細胞が分化せず、代わりに B 細胞が出現することから、Notch1 に依存したシグナルが T 細胞の発生に必須である事が証明されている。一方で、胸腺に移入するリンパ球前駆細胞において、Notch1 と共に Notch2 が高発現しており、Notch1 と同様に Notch シグナルを誘導することが示唆されているが、最初期の T 細胞分化における Notch2 の役割はほとんど解析されていない。また、T 細胞の初期発生を誘導する Notch シグナルの研究は、主に造血幹細胞と Notch リガンドを発現するストロマ細胞を共培養する in vitro の培養系を用いて行われている。しかし、生体内から精製できる造血幹細胞の不均一さと希少性の問題のため、T 細胞の発生を誘導する最も初期の Notch シグナルの機能を詳細に解析することは、現在でもほとんど不可能となっている。

2. 研究の目的

申請者は、造血幹細胞と同等の T 細胞分化能を長期に保持し、容易に増殖可能な細胞として Cas9 ノックイン EBF1 欠損マウスの造血幹細胞からリンパ球前駆細胞株を樹立した (Hiirano, eLife 2021, Koizumi, J Biol Chem 2022)。また、この細胞に sgRNA を導入することで、Notch1 および Notch2 を欠失したリンパ球前駆細胞株を独自に確立した。これらの細胞を用いた先行研究から、申請者は T 細胞分化を誘導する Notch シグナルの大部分が Notch1 に依存するが、Notch2 も部分的に関与することを明らかにしている。本研究では、申請者が独自に確立した Notch1 および Notch2 を欠失したリンパ球前駆細胞株を用いて、Notch1 と Notch2 の機能的な差異について検証し、Notch シグナルによる細胞の運命決定メカニズムの解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) Notch1 および Notch2 依存的に発現変化する遺伝子のトランスクリプトーム解析

Notch1 および Notch2 欠失リンパ球前駆細胞を Dll4 発現 OP9 と共培養することで Notch シグナルを誘導する。2 日後、生細胞を回収しトランスクリプトーム解析を行う。Notch1 および Notch2 単独のシグナルによって発現変化する遺伝子を比較することで、初期 T 細胞分化における Notch1 と Notch2 の機能的な差異を生み出す原因となる標的遺伝子を網羅的に同定する。

(2) Notch2 シグナル及び Tcf7 による T 細胞分化への寄与の解析

Notch1 欠失リンパ球前駆細胞に Tcf7 を導入後、Dll4 発現 OP9 との共培養によって T 細胞分化を誘導する。11 日後、T 前駆細胞のマーカーである CD25 および細胞内 TCR 発現細胞を評価する。

(3) Notch シグナル依存的かつ Tcf7 非依存的に誘導される Notch 標的遺伝子の探索

Notch1 欠失リンパ球前駆細胞、Tcf7 欠失リンパ球前駆細胞に Notch シグナルを誘導、または Tcf7 を導入したリンパ球前駆細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行う。これらの 3 つの条件の解析によって得られた結果を比較することで、Notch シグナル依存的かつ Tcf7 非依存的に発現上昇する遺伝子を同定する。

4. 研究成果

(1) Notch1 および Notch2 依存的に発現変化する遺伝子のトランスクリプトーム解析

Notch1 および Notch2 欠失リンパ球前駆細胞を用いて、Notch1 および Notch2 依存的に発現変化する遺伝子のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、Notch2 シグナルは一部の遺伝子の発現は Notch1 と同様に誘導できるが、Notch の標的遺伝子の一部を十分に活性化できないことがわかった。この結果を詳細に解析すると、Notch2 は、Tcf7 など初期 T 細胞分化における重要な Notch の標的遺伝子を十分に活性化できないことが明らかになった。

(2) Notch2 シグナル及び Tcf7 による T 細胞分化への寄与の解析

我々は、(1) の解析によって得られた結果から、最初期の T 細胞分化に重要な Tcf7 に着目した。そこで、我々は、Notch1 欠失リンパ球前駆細胞に Tcf7 を発現させることで T 細胞分化が回復するのかどうかを検証した。Notch シグナルを誘導後 11 日目に、CD25 および細胞内 TCR 両陽性の T 系列に決定した細胞の割合を調べると、Notch2 シグナルのみではコントロールに比べ顕著に減少していた。一方で、Notch2 シグナルの誘導と Tcf7 を発現させた細胞では、部分的に

T細胞分化が回復することが明らかになった。また、*Tcf7*の発現のみの細胞では、Notchシグナルが誘導されない条件下でも、CD25陽性細胞が出現したが、TCR陽性細胞は認められなかった。これらの結果から、Notchシグナルは*Tcf7*だけでなくそれ以外の分子の発現を誘導することで初期T細胞分化を制御していることが示唆された。

(3) Notchシグナル依存性かつ*Tcf7*非依存性に誘導されるNotch標的遺伝子の探索

Notchシグナル依存性かつ*Tcf7*非依存性に発現が誘導される遺伝子の同定をするために、*Notch1*欠失リンパ球前駆細胞に*Tcf7*の導入およびNotchシグナルを誘導し、トランスクリプトーム解析を行った。これらの結果と(1)の結果を合わせることで、Notch2依存性に活性化する遺伝子、*Tcf7*の導入によって発現が変化しない遺伝子、*Tcf7*欠失細胞にNotchシグナルを誘導することで活性化される遺伝子をそれぞれ網羅的に明らかにし、全ての条件を満たす転写制御に関連する遺伝子を複数同定した。現在CRISPRスクリーニングにより、これらの候補遺伝子を欠失させたリンパ球前駆細胞株を用いて、T細胞分化への寄与について解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koizumi Maria, Kama Yuichi, Hirano Ken-ichi, Endo Yusuke, Tanaka Tomoaki, Hozumi Katsuto, Hosokawa Hiroyuki	4. 巻 298
2. 論文標題 Transcription factor Zbtb1 interacts with bridging factor Lmo2 and maintains the T-lineage differentiation capacity of lymphoid progenitor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102506 ~ 102506
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平野 健一
2. 発表標題 T細胞の発生を誘導するNotchシグナルの全容の解明
3. 学会等名 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野 健一
2. 発表標題 Etv6 is a Tcf7- and Hes1-independent Notch target gene in the initiation of the T-lineage program
3. 学会等名 FASEB（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野 健一
2. 発表標題 Etv6 is a Tcf7- and Hes1-independent Notch target gene in the initiation of the T-lineage program
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平野健一
2. 発表標題 オミクス手法を用いたT細胞の初期発生を誘導するNotchシグナルの解明
3. 学会等名 Kyoto T Cell Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平野健一
2. 発表標題 Notch signaling triggers T-lineage program via Tcf7-dependnent and -independent mechanisms
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関