

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790538

研究課題名(和文) Tリンパ球におけるNotchシグナル制御性microRNAの検索とその機能解析

研究課題名(英文) Roles of Notch signal regulating microRNA in T cell differentiation

研究代表者

西田 純(Nishida, Jun)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00361981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、Tリンパ球系培養細胞株であるD011.10細胞にNotch細胞内領域を強制発現させ、それに伴い発現が誘導されるmicroRNAとしてmiR449aを見いだした。このmiR449aのTリンパ球分化における機能を解析するため、miR449aノックアウト(KO)マウスを樹立した。野生型とmiR449a KOマウスを比較したところ、胸腺や脾臓、その他二次リンパ組織においてTリンパ球などの分化、成熟において大きな差異は見いだされなかった。また、腸管組織においてもTリンパ球やその他の免疫担当細胞の組成など大きな差異は見いだされなかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed expression of micro RNA in Notch1 intercellular domain over expressed D011.10 cells. We identified one of micro RNA, miR449a, which expression was controlled under the Notch signaling. To clarified role of miR449a, we established miR449a knock out mouse. We compared development and maturation of immune competent cell between wild type and miR449a KO mouse. However, we could not find any difference on differentiation of immune competent cell at thymus, spleen and other secondary lymphoid tissue. We also analyzed immune competent cell in small intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes, we could not find any difference between wild and miR449a KO mouse.

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：miR449a T cell

1. 研究開始当初の背景

Notch は線虫から哺乳類まで広く保存されているシグナル分子である。哺乳類の Notch 分子群には、四種類のレセプターと五種類のリガンドが存在しており、その相互作用は筋形成や神経経路形成、リンパ球分化などに重要な働きをしていることが知られている。Notch レセプターはリガンドと相互作用することにより、細胞内領域が切り出され核内に移行し、RBP-J と結合する。その結合が PCAF や GCN5 などのコファクターとの結合を誘導し、転写因子複合体として標的遺伝子の転写を制御している。Notch 標的遺伝子として Hes1 など多くの分子が報告されているが、Notch シグナルの役割の多様性から、まだ明らかとなっていない標的分子も数多くあると予想される。

従来の研究から、Notch シグナルは T リンパ球分化およびエフェクター機能に重要な役割を担っていることが明らかになっている。例えば、造血系幹細胞の Notch1 シグナルは T リンパ球への分化を促進し、B リンパ球への分化を抑制する。また、胸腺内においては、Notch シグナルは $\gamma\delta$ 型 T リンパ球の分化を抑制し、 $\alpha\beta$ 型 T リンパ球の分化を促進する。また、私達の研究室から発表した論文では、細胞障害性 CD8 陽性 T リンパ球の分化に Notch2 シグナルが重要な働きをしていることを報告した。これら報告のように、Notch シグナルはリンパ球分化の様々な段階に働き、免疫機構の発達や維持に重要な役割を担っている。

microRNA は 17 から 24 塩基からなる機能性 non-coding 一本鎖 RNA であり、線虫の発生において働く small RNA として発見された。microRNA 前駆体は、ゲノム DNA から転写されたり、プレ mRNA からスプライシングにより切り出され、その後 Drosha、Dicer と呼ばれる RNase によって切断を受け成熟型の microRNA となる。成熟型 microRNA は RISC (RNA induced silencing complex) と呼ばれるタンパクと複合体を形成し、これがターゲットとなる遺伝子の mRNA と結合することにより、その遺伝子発現を抑制すると考えられている。哺乳類では数百種類の microRNA が同定されているが、その大部分についてはその機能が明らかとなっていない。これまでに、microRNA は生物の発生過程だけでなく、血球系細胞の分化、成熟や神経経路形成、細胞増殖、細胞死の調節などに働くことが明らかとなってきている。また、microRNA の異常な発現は、様々な疾病に関与していることも知られている。

従来の研究により、microRNA が T リンパ球の分化や機能制御に関わっていることが報告されている。例を挙げると、miR-181a は胸腺における T リンパ球の正負の選択や活性化に重要な役割を果たしていることが解明されている。miR-155 は c-maf を介して Th2 サイトカインの発現を促進し、T リンパ球依存

の抗体産生をコントロールしていると報告されている。また、miR-155 は Foxp3 の標的遺伝子の一つで、miR-155 を欠失すると制御性 T リンパ球の数が減少することが報告されている。その他にも、miR-142s や miR-146、miR-223 など免疫細胞の分化調節に働いているとの報告がある。これらの報告から、多種類の microRNA が T リンパ球の分化、成熟に関わっており、その数は今後も増えていくことが予測される。しかしながら、これら microRNA がどのような刺激によりその発現が制御され、T リンパ球分化および活性化を制御しているかについては明らかになっていない。その上に、Notch シグナルによる microRNA 発現制御についての詳細も不明である。

これまでに私達は CD4⁺ T リンパ球細胞株である D011.10 細胞に活性型 Notch である Notch 細胞内ドメイン (Notch-ICD) を過剰発現させ、それに伴い発現量が変動する microRNA を microRNA マイクロアレイを用いて網羅的に検索した。

その結果、Notch シグナル導入により発現が誘導される microRNA が複数見いだされた。私達は RBP-J が欠損する CD4 陽性 T リンパ球ではコントロールと比較して、その microRNA 発現が低下していることも明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究では T リンパ球分化・活性化を多彩に制御する Notch シグナルが microRNA の発現制御にどのように寄与しているかについて明らかにすることを研究目的とする。本研究の成功により、これまで明らかではなかった T リンパ球制御機構が解明されることが期待されると共に、Notch シグナルの新たな制御系の存在も明らかにできると期待できる。

3. 研究の方法

(1)-a. in vitro 培養系を用いた microRNA の強制発現による T リンパ球分化成熟への影響

これまでの研究により得られた Notch 誘導性 microRNA を人為的に発現誘導し、その T リンパ球分化への影響を調べる。私達は Notch リガンド Delta-1 を発現させた OP9 細胞上で造血系幹細胞を培養し、リンパ球分化を誘導する実験系を確立している。候補 microRNA を強制発現するレトロウイルスベクターを構築し、それらウイルスを感染させた細胞を in vitro リンパ球分化系で培養し、T リンパ球の分化成熟への影響を解析する。この実験から in vitro 培養系において、Notch シグナルにより制御され T リンパ球の分化成熟に関与する microRNA を得る。

(1)-b. マウス骨髄移植実験系を用いた microRNA の T リンパ球分化成熟への影響

in vitro 実験系は手軽に行うことができ、数多くの候補分子を調べる際には便

利ではあるが、実際に in vivo で起こっている現象を再現しているかどうかについては疑問が残る。そこで、in vitro 培養系で絞り込まれた microRNA についてマウス骨髄移植実験系を用い、より in vivo に近い条件での検討を行う。microRNA を強制発現させた造血系幹細胞を放射線照射したマウスに移植し、生着した幹細胞から分化した T リンパ球を解析することにより、in vivo における候補 microRNA の T リンパ球の分化成熟への影響を解析する。また、RBP-J^{fllox/fllox}-CD4-Cre マウスから調製した骨髄細胞を用い同様の実験を行い、Notch シグナルの欠損により障害された T リンパ球分化がレスキューされるかを調べる。ことによりこの microRNA 発現によりレスキューされる分化過程が明らかとなり、Notch シグナルにより制御される分化機構の中のどの部分をその microRNA が担っているかが明らかとなることが期待される。

(2)-a. microRNA ノックアウト (KO) マウスの樹立

上記のマウス骨髄移植実験系では、microRNA が過剰発現した際の影響は解析できるが、欠失させたときの解析は難しい。また、生体内におけるより詳細な解析をする際、microRNA KO マウスを使った解析が必要である。そこで、microRNA KO マウスの樹立を行う。microRNA の欠失はその配列を含む遺伝子やクラスターを形成している他の microRNA に影響を与えないように配慮し、成熟型 microRNA 配列のみを削るように設計する。すでにベクターの構築は終了しており、変異 ES 細胞を樹立し、定法に従いマウスを樹立する。

microRNA は免疫細胞分化だけでなく、生物の発生過程や組織などの形成、分化、成熟に深く関わっている。そのため通常の KO マウスは致死性となり樹立できない可能性がある。KO マウスが致死性となり、KO マウスの樹立が不可能の場合、胎児肝臓由来造血系幹細胞を用いた再構築マウスの樹立や、コンディショナル KO マウスの樹立を計画する。

(2)-b. 遺伝子改変マウスを用いた Notch シグナル制御性 microRNA の機能解析

樹立した microRNA KO マウスと野生型マウスについて、T リンパ球の数や割合、その表現系などを比較することにより in vivo における T 細胞への microRNA の働きを明らかとする。また、RBP-J^{fllox/fllox}-CD4-Cre マウスと microRNA KO マウスとを比較することにより、Notch シグナルによる T リンパ球分化制御のうち microRNA が関与する過程が明らかとなると期待される。

4. 研究成果

(1)-a. in vitro 培養系を用いた microRNA の

強制発現による T リンパ球分化成熟への影響
Notch 誘導性 microRNA である miR449a を発現するウイルスベクターを構築した。そのベクターから作製したウイルスを骨髄由来幹細胞へ感染させ、in vitro 培養系を用い解析を行った。その結果、miR449a ウイルス感染細胞と空ウイルス感染細胞の間で、ダブルポジティブ T リンパ球及び CD4⁺T リンパ球、CD8⁺T リンパ球の分化に差は見られなかった。

(1)-b. マウス骨髄移植実験系を用いた microRNA の T リンパ球分化成熟への影響

miR449a ウイルス及び空ウイルスを感染させた骨髄由来幹細胞を放射線照射したマウスへ移植し、T リンパ球の分化を解析した。その結果、miR449a ウイルス感染脾臓細胞と空ウイルス感染脾臓細胞の間で T リンパ球と B リンパ球の割合や CD4⁺T リンパ球及び CD8⁺T リンパ球の分化に差は見られなかった。

(2)-a. miR449a ノックアウト (KO) マウスの樹立

miR449a を欠失させたターゲティングベクターを構築し、マウス ES 細胞へ導入し、相同組換えにより miR449a 欠失遺伝子を持った変異 ES 細胞を樹立した。その ES 細胞を用い、筑波大学生命科学動物資源センターへ委託しキメラマウスを作製した。それらキメラマウスを C57BL/6 マウスと交配し、miR449a KO マウスを樹立した。

(2)-b. 遺伝子改変マウスを用いた Notch シグナル制御性 microRNA の機能解析

樹立した miR449a KO ヘテロマウスを交配し、miR449a KO マウスを作製した。それらマウスから CD4⁺T リンパ球を調整し、miR449a の発現をリアルタイム PCR で確認した。その結果、KO マウスでは miR449a の発現は認められず、ヘテロマウスではその発現量は野生型と比べ半分程度であった。

野生型と KO マウスの胸腺における T リンパ球について細胞表面マーカーを指標に解析したが、T リンパ球の分化において両者に差は認められなかった。脾臓や各種リンパ節についても胸腺と同様にリンパ球の解析をしたが、T リンパ球、B リンパ球ともに数や表現型に差異は見られなかった。脾臓やリンパ節に存在する樹状細胞やマクロファージ、好中球など非リンパ球系免疫細胞についてもその表現型を解析したが、大きな差は認められなかった。さらに、腸管上皮細胞ならびに粘膜固有層に存在する細胞を調整し、そこに含まれるリンパ球並びに非リンパ球系免疫細胞を解析した。しかしながら、その種類や存在割合などに大きな差異は認められなかった。

野生型と KO マウスの脾細胞を調整し、抗 CD3 抗体並びに各種サイトカイン存在下で培養し、Th1 や Th2 などのエフェクター T リンパ球への分化能を解析した。しかしながら、両者間でエフェクター T リンパ球への分化能に差異は認められなかった。野生型と KO

マウスの血清中の IFN-g、IL-4 及び IL-17 の存在量にも変化は見られなかった。

以上の事から、これまでに miR449a のノックアウトによる免疫担当細胞の量的、機能的変化はとらえられなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

西田 純 (NISHIDA JUN)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：00361981

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：