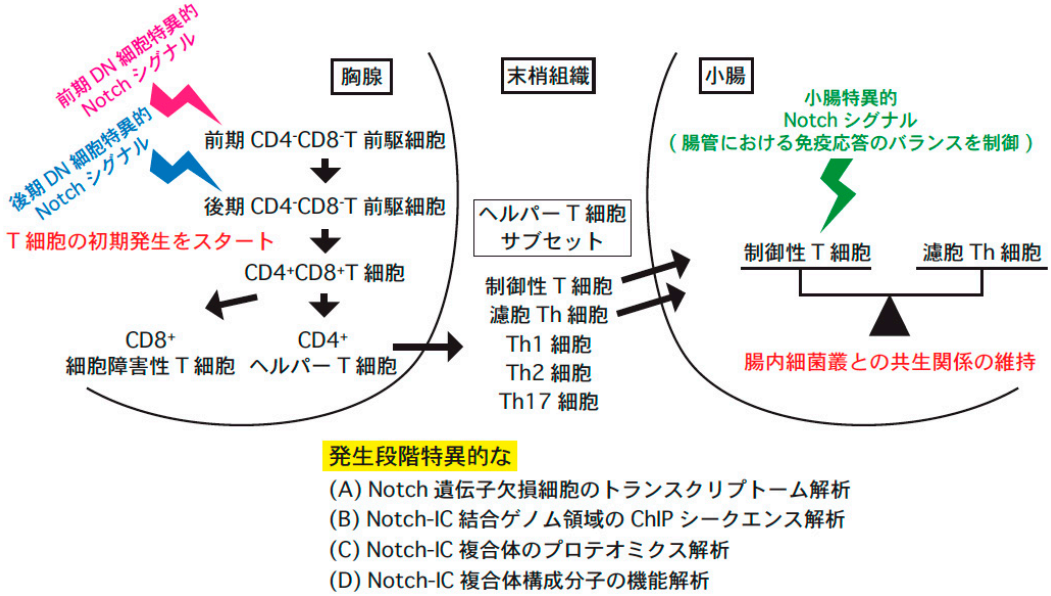
48　T細胞の運命を制御する時空間特異的Notch経路	細川　裕之

【目的】私たちの体を形成する 50 兆を超える細胞はたった 1 つの受精卵に由来し、200 種類以上の細胞から成ると言われている。幹細胞から機能分化した細胞系列を作り出す分子機構の解明は、生命現象を理解するための根幹に位置する極めて重要な研究課題である。ひとつの転写因子またはシグナル経路が同一細胞系列の異なる発生段階で繰り返し重要な役割を担うことや、近縁の細胞系列では異なる役割を果たすことを多くの研究者が想定しているものの、その分子メカニズムについては未だ明らかにされていない。本研究では、免疫細胞の一種である T 細胞をモデルとして、Notch シグナルが時空間特異的に異なる遺伝子群の発現を制御し、様々な細胞の運命を同時にコントロールする分子メカニズムの解明を目指す。

【方法】本研究では、前期および後期 T 前駆細胞を用いて、(A) CRISPR/Cas9 システムによる発生段階特異的な *Notch* 遺伝子欠損、または Notch-IC 過剰発現細胞のトランスクリプトーム解析、(B) ChIP シークエンス解析による発生段階特異的な Notch-IC 結合領域の網羅的同定、(C) Notch-IC が形成する発生段階特異的タンパク質複合体のプロテオミクス解析、(D) 発生段階特異的な Notch-IC 会合分子の機能解析、を組み合わせることで、Notch シグナルが発生段階特異的な機能を発揮する分子メカニズムの統合的な理解を試みた。

【結果】本研究により、Notch シグナルは胸腺内において、T 前駆細胞の前期と後期でそれぞれ発生段階特異的なターゲット遺伝子の発現を制御し、T 細胞の初期発生に必須の役割を果たす事が示された（Romero-wolf et al., *J Cell Biol*, 2020）。一方で、小腸のパイエル板においては、Notch シグナルが制御性 T 細胞と濾胞 Th 細胞のバランスをコントロールすることで、腸内細菌叢との共生関係を維持している事が明らかになった（Yazawa et al., *Int Immunol*, 2021）。

本研究の概要



48. T 細胞の運命を制御する時空間特異的 Notch 経路

細川　裕之

東海大学 医学部 基礎医学系 生体防御学

Key words：Notch シグナル，T 細胞，発生段階特異的，初期発生

緒　言

Notch シグナルは、種を超えて高度に保存されており、様々な器官や臓器の発生、細胞の運命決定を司る。Notch シグナルの興味深い特徴のひとつが、Notch は受容体として働くのと同時に、転写因子として働く点である。Notch は細胞膜に局在し Notch リガンドを認識するレセプターとして働くが、リガンドが結合すると、その細胞内ドメイン（intracellular domain：Notch-IC）が切断され核へ移行し、DNA 結合分子 RBPJ と会合することで転写因子として働く。Notch シグナルの重要性は、*Notch* 遺伝子欠損マウスの解析や、ヒトにおける Notch シグナルの破綻が先天性の発生異常やガンなど様々な疾患を引き起こすことからよく知られている。このことから、Notch シグナルによる細胞運命決定メカニズムの解明やその制御方法の開発は極めて重要な研究課題と言える。Notch シグナルが時空間特異的な機能を発揮し、様々な細胞の系列決定や恒常性の維持に必須の働きをしていることは明らかであるが、その一方で、たった 1 つの Notch シグナルがどのように多様な細胞の発生や機能を適切､且つ特異的にコントロールしているのか、その分子メカニズムについてはほとんどわかっていない。

我々はこれまで、胸腺における T 細胞の初期発生を制御する転写因子群［1～3］や、末梢における Th 細胞サブセットの分化を制御する転写因子［4］について、会合分子のプロテオミクス解析を手がかりに、マルチオミクス解析を行うことでその作用メカニズムを明らかにしてきた。これらの研究成果から、転写因子による遺伝子発現制御メカニズムとして、転写因子は直接 DNA に結合し遺伝子発現を制御するだけでなく、転写因子や co-factor のゲノム上の結合領域を変化させることで直接的な DNA 結合を介さずに遺伝子発現をコントロールする、という新しいコンセプト（co-factor redeployment model）を提示した［5，6］。これまでに行ってきた転写因子による T 細胞の運命決定メカニズムの解析について、さらに研究を発展させるため、外界からのシグナルと転写因子ネットワークの相互作用について明らかにしたいと考え、T 細胞の異なる発生段階においてステージ特異的な役割を果たす可能性が示唆されている Notch シグナルに着目した研究を開始した。本研究では、T 細胞をモデルとして、Notch シグナルが発生段階特異的な機能を発揮し、様々な細胞の運命を同時にコントロールする分子メカニズムの解明を目的とする。

免疫システムは様々な細胞が協調的に働くことで、恒常性が保たれている。その中でも、T 細胞は体内に侵入した病原体（抗原）を認識し、特異的な免疫応答を引き起こす司令塔として働く。T 細胞の発生には胸腺と呼ばれる臓器が必要で、胸腺は T 細胞を作り出すためだけに存在する臓器である。骨髄に存在する前駆細胞が胸腺に移入し、胸腺微小環境から Notch シグナルを受けることで、T 細胞の分化プログラムがスタートする。胸腺に移入した直後の T 前駆細胞は成熟 T 細胞のマーカーである CD4 と CD8 をどちらも発現していないため、ダブルネガティブ（DN）細胞と呼ばれている。その後、CD4 陽性 CD8 陽性のダブルポジティブ（DP）細胞を経て、特異的な抗原を認識する T 細胞抗原受容体を発現した T 前駆細胞は、CD4 陽性のヘルパーT（Th）細胞または CD8 陽性の細胞障害性 T 細胞へと成熟し、末梢へ移行する（図 1）。DN 細胞は細胞表面分子の発現パターンにより DN1 から DN4 に分類することが出来る。胸腺に移入直後の DN1-DN2a 細胞は、その発生や増殖が Notch シグナルに依存しており、また、T 細胞系列以外への分化能（多能性）を有していることから、この発生段階は前期 T 前駆細胞（Phase1：Notch-dependent、pre-commitment）と呼ばれている。その後、DN2b-DN3 細胞はすでに T 細胞への分化が決定づけられているが、さらなる発生には Notch シグナルが必須であることから、後期 T 前駆細胞（Phase2：Notch-dependent、T-lineage committed）と呼ばれてい

る（図 1）。前期 T 前駆細胞において、Notch シグナルは T 細胞の初期発生に重要な転写因子 Tcf7 や GATA3、Bcl11b の発現を誘導する。T 細胞への運命決定がなされ、後期 T 前駆細胞に移行すると、Rag1 や Rag2、Pre-TCRa、CD3 といった T 細胞抗原受容体の遺伝子再構成やシグナル伝達に重要な分子群を Notch シグナル依存的に発現するが、これらの遺伝子は同じように Notch シグナルを受けている前期 T 前駆細胞では活性化されない。しかし、前期 T 前駆細胞で Notch 依存的に活性化されていた Tcf7 や GATA3、Bcl11b は Notch シグナル非依存的に発現が維持されるようになる。このように、Notch シグナルの役割は、T 細胞分化の最も初期段階である Phase1 と Phase2 で異なることが推測されているが、その作用機序は不明である。そこで本研究では、ひとつの Notch シグナルがどのように発生段階特異的な機能を発揮するのか、T 細胞初期発生をモデルとし、その分子メカニズムの解明を目指す。

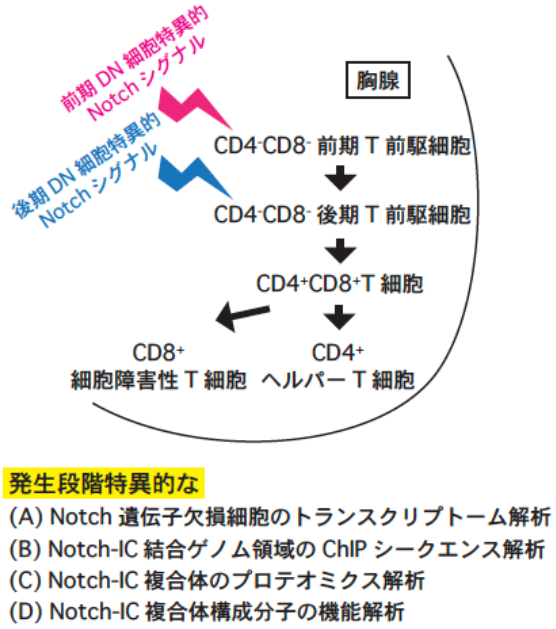


図 1. 本研究の概要

方法および結果

1. T 細胞の初期発生を制御する発生段階特異的な Notch ターゲット遺伝子の網羅的探索

これまで、造血幹細胞から T 細胞への分化における Notch シグナルの役割は、Notch や Notch リガンドの loss-of-function や gain-of-function の遺伝子改変マウスを用いた、個体レベル（steady-state）での解析が主であった。これらの解析から T 細胞初期分化における Notch シグナルの重要性が明らかになったが、ステージ特異的な Notch シグナルの役割については未だ不明な点が多い。我々は、Cas9 を恒常的に発現するマウスの造血幹細胞を骨髄から精製し、Notch リガンドを発現するストローマ細胞上で培養することで T 細胞の初期発生を再現する方法と、レトロウイルスによる sgRNA の導入を組み合わせることで、ステージ特異的（Phase1 および Phase2）且つ acute（3 日以内）に *Notch* 遺伝子欠損の影響を解析する実験系を独自に確立した。実際に、哺乳類に存在する Notch1～4 遺伝子のうち、T 前駆細胞に発現している Notch1 および Notch2 を欠失させると、レトロウイスル導入後わずか 3 日で、重要な Notch ターゲットであり、T 細胞マーカーである CD25 の発現がほぼ完全に消失した（図 2）。この実験系を用いて *Notch* 遺伝子を欠損させた Phase1 および Phase2 細胞のトランスクリプトーム解析を行うと、面白いことに Notch ターゲット遺伝子は発生段階によって劇的に変化していることが明らかになった（図 3）。

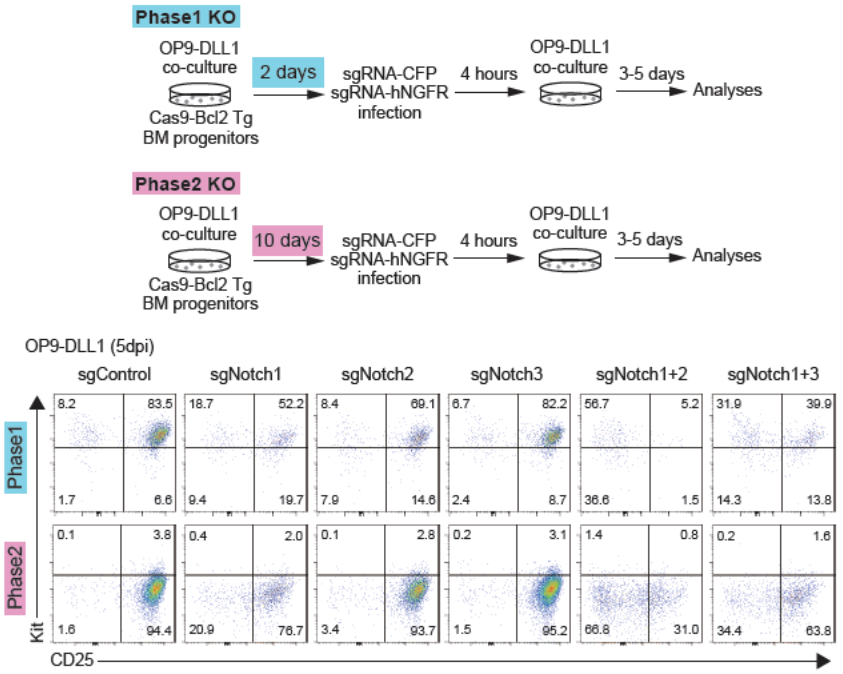


図 2.　T 前駆細胞の発生段階特異的な Notch 受容体欠損システムの確立

Cas9 を全身性に発現するマウスの骨髄から造血幹細胞を精製し、Notch リガンドを発現するストローマ細胞上で培養を行い T 細胞の初期発生を *in vitro* で再現した。Notch シグナルを加えてから 2 日後、まだ T 前駆細胞が前期 T 前駆細胞期（Phase1）にとどまっている間に Notch 受容体に対する sgRNA をレトロウイルスにより導入し、その 3 日後、Notch ターゲット遺伝子であり、T 細胞マーカーである CD25 の発現をフローサイトメーターで調べた（上段）。同様の実験を、造血幹細胞に Notch シグナルを加えてから 10 日後に sgRNA を導入した、後期 T 前駆細胞（Phase2）を用いて行った（下段）。

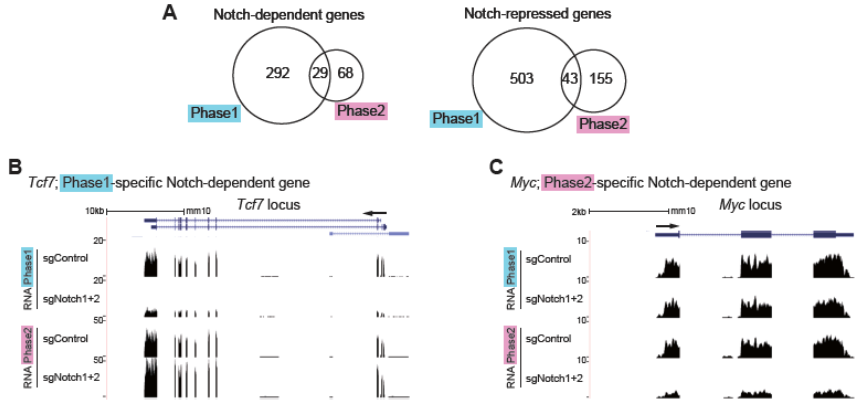


図 3.　発生段階特異的な Notch ターゲット遺伝子

A) Notch 受容体を欠失させた前期（Phase1）、および後期（Phase2）T 前駆細胞を用いて RNA-seq 解析を行った。Notch 受容体の欠損によって優位に発現が低下、または上昇した遺伝子（|Log2FC|＞1、FDR＜0.05、RPKM＞1）の数を示した。

B) 前期 T 前駆細胞特異的に Notch によって活性化される遺伝子の代表例として Tcf7 遺伝子座における RNA-seq の解析結果を示した。

C) 後期 T 前駆細胞特異的に Notch によって活性化される遺伝子の代表例として Myc 遺伝子座における RNA-seq の解析結果を示した。

2. 発生段階特異的な Notch-IC/RBPJ 結合ゲノム領域の網羅的同定

Notch はリガンドを認識した後、細胞内ドメイン（intracellular domain : IC）が切断され核へ移行し、DNA 結合タンパクである RBPJ と会合することで、直接ターゲット遺伝子座に結合しその遺伝子発現を制御する。Notch-IC や RBPJ に対するクロマチン免疫沈降（ChIP）解析は抗体の quality が原因で困難であったが、我々は細胞のクロスリンクの条件検討と、複数のモノクローナル抗体を混合して使用する事で、Phase1 および Phase2 細胞における RBPJ の ChIP シークエンス解析を行うことに成功した（図 4）。*Notch* 遺伝子欠損により発現の変化する遺伝子（differentially expressed genes : DEGs）の周辺には、RBPJ の結合シグナルが高頻度に認められた（図 4）。さらに、Notch シグナルが Phase1 特異的なターゲット遺伝子を制御するメカニズムの一部は、Notch シグナルが Phase1 特異的な転写因子である PU.1 の機能に拮抗しているためである事を明らかにした［7］。

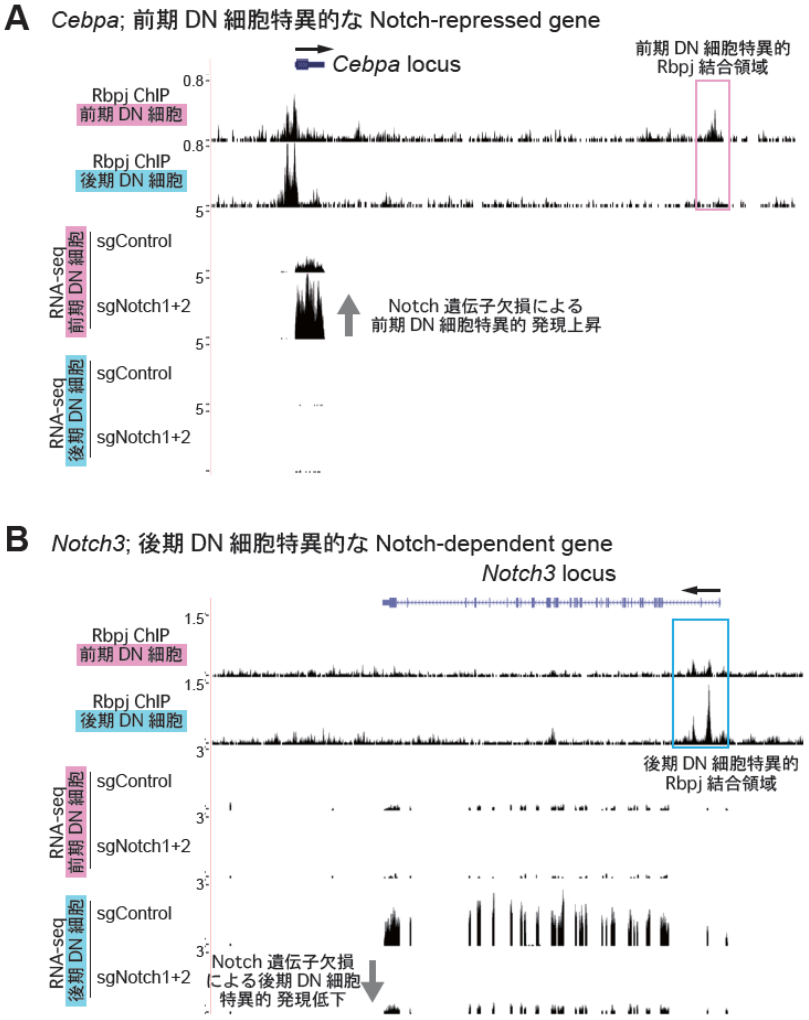


図 4. 発生段階特異的な Notch-IC/RBPJ 結合ゲノム領域の網羅的同定

A) 前期 T 前駆細胞特異的に Notch シグナルによって抑制される遺伝子 Cebpa の下流には、前期 T 前駆細胞特異的な RBPJ の結合シグナルが検出された。

B) 後期 T 前駆細胞特異的に Notch シグナルによって活性化される遺伝子 Notch3 の転写開始点付近には、後期 T 前駆細胞特異的な RBPJ の結合シグナルが検出された。

考　察

Notch シグナルの破綻がガンを含む様々な疾患の原因となることから、Notch がそれらの疾患の治療標的となっている。しかし、Notch 阻害剤は重篤な副反応を引き起こすことから臨床応用は難しいとされている。本研究のさらなる発展により、Notch シグナルが細胞系列や発生段階特異的な機能を発揮するメ分子メカニズムが明らかになり、今後、標的細胞の種類や発生段階に選択的な副反応の少ない Notch シグナル制御法に関する新しいコンセプトの創出が期待される。

文　献

1) Hosokawa H, Ungerbäck J, Wang X, Matsumoto M, Nakayama KI, Cohen SM, Tanaka T, Rothenberg EV. Transcription Factor PU.1 Represses and Activates Gene Expression in Early T Cells by Redirecting Partner Transcription Factor Binding. Immunity. 2018 Jun 19;48(6):1119-1134.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.024. PMID: 29924977

2) Hosokawa H, Romero-Wolf M, Yui MA, Ungerbäck J, Quiloan MLG, Matsumoto M, Nakayama KI, Tanaka T, Rothenberg EV. Bcl11b sets pro-T cell fate by site-specific cofactor recruitment and by repressing Id2 and Zbtb16. Nat Immunol. 2018 Dec;19(12):1427-1440. doi: 10.1038/s41590-018-0238-4. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30374131

3) Shin B, Hosokawa H, Romero-Wolf M, Zhou W, Masuhara K, Tobin VR, Levanon D, Groner Y, Rothenberg EV. Runx1 and Runx3 drive progenitor to T-lineage transcriptome conversion in mouse T cell commitment via dynamic genomic site switching. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Jan 26;118(4):e2019655118. doi: 10.1073/pnas.2019655118. PMID: 33479171

4) Nakayama T, Hirahara K, Onodera A, Endo Y, Hosokawa H, Shinoda K, Tumes DJ, Okamoto Y. Th2 Cells in Health and Disease. Annu Rev Immunol. 2017 Apr 26;35:53-84. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052350. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27912316

5) Hosokawa H, Rothenberg EV. How transcription factors drive choice of the T cell fate. Nat Rev Immunol. 2021 Mar;21(3):162-176. doi: 10.1038/s41577-020-00426-6. Epub 2020 Sep 11. PMID: 32918063

6) Hosokawa H, Masuhara K, Koizumi M. Transcription factors regulate early T cell development via redeployment of other factors: Functional dynamics of constitutively required factors in cell fate decisions. Bioessays. 2021 May;43(5):e2000345. doi: 10.1002/bies.202000345. Epub 2021 Feb 24. PMID: 33624856

7) Romero-Wolf M, Shin B, Zhou W, Koizumi M, Rothenberg EV, Hosokawa H. Notch2 complements Notch1 to mediate inductive signaling that initiates early T cell development. J Cell Biol. 2020 Oct 5;219(10):e202005093. doi: 10.1083/jcb.202005093. PMID: 32756905