

東海大学大学院平成30年度博士論文

胸腺 T 細胞分化における Notch シグナルの
役割の解明

平野 健一

・この学位申請論文は European Journal of Immunology に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

・European Journal of Immunology に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

【総括】

胸腺に移行した造血前駆細胞は胸腺上皮細胞が発現する D114 を介した Notch シグナルによって T 細胞系列へと分化するが、Notch シグナルが胸腺移行後の胸腺内での T 細胞分化にどのように寄与するのかについては不明な点が多い。特に、多分化能を保持している初期胸腺細胞である DN1/2 期や DN3 期の細胞については、細胞期特異的に機能する Cre マウスが存在しないことから、時期特異的な Notch シグナルの意義を解析することはきわめて困難であった。そこで、本研究では、純化した各分化段階の胸腺細胞をハンギングドロップ法により D114 欠損マウス胎仔胸腺へ移入する器官培養法(胎仔胸腺器官培養、FTOC)を用いることで時期特異的に Notch シグナルを消失させ、胸腺内 T 細胞分化における Notch シグナルの時期特異的な役割について解明を試みた。

その結果、DN1/2 細胞から DP 細胞への分化とそれに伴う細胞増殖は、D114 欠損環境において、著しく低下した。よって、初期 T 細胞分化においても Notch シグナルは重要な役割を担うことが明らかになった。また、レトロウイルスベクターを用いて DN1/2 細胞へ Notch シグナル下流分子である Hes1 や pre-TCR 構成分子を発現させたが、いずれも分化を回復させなかった。よって、Notch シグナル下流については、Hes1 あるいは pre-TCR シグナルとは別の新たなシステムの関与が示唆された。

一方で、DN3 細胞にて同様の解析を行うと、D114 欠損環境でも効率良く DP 細胞へ分化したが、顕著な細胞増殖の低下を認めた。また、内在性 Notch シグナルを事前に消失させた DN3 細胞は、D114 欠損環境では、DP 細胞へまったく分化しなかった。しかし、DN3 細胞に c-Myc を過剰発現させると、D114 欠損環境においても増殖を伴う DP 細胞への分化が再現された。これらの結果から、単層培養系を用いたこれまでの報告と異なり、三次元胸腺環境においては、Notch シグナル下流として c-Myc が DN3 から DP 細胞期への分化に中心的な役割を果たすことが示された。

以上、三次元構造を有する胸腺内での初期 T 細胞分化において、継続的な Notch シグナルの重要性が示された。

【研究の背景】

免疫応答において中心的な役割を担う T 細胞は、造血前駆細胞が胸腺へと移行することで分化、成熟する。胸腺へと移行した造血前駆細胞は、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 細胞系列への分化を開始する。胸腺細胞は細胞表面マーカーから CD4 Single Positive (CD4SP) 細胞、CD8 Single Positive (CD8SP) 細胞、CD4/CD8 Double Positive (DP) 細胞および CD4/CD8 Double Negative (DN) 細胞の 4 つに大きく分類される。胸腺細胞は DN、DP、CD4SP または CD8SP 細胞の順に分化していき、DN 細胞は CD44 と CD25 の発現により DN1 から DN4 に細分化される。DN1 細胞はかなり不均一な集団であり発現している表面抗原から DN1a (CD44⁺ CD25⁻ c-Kit^{hi} CD24⁻)、DN1b (CD44⁺ CD25⁻ c-Kit^{hi} CD24⁺)、DN1c (CD44⁺ CD25⁻ c-Kit^{int} CD24⁺)、DN1d (CD44⁺ CD25⁻ c-Kit⁻ CD24⁺)、DN1e (CD44⁺ CD25⁻ c-Kit⁻ CD24⁻) の 5 つのサブセットに分けられ、DN1a および b は T 細胞への分化能を高く有している。これらの細胞の分化や生存には TCF1、GATA3、Nfatc1 などの転写因子が必須となり、IL-7 などのサイトカインによって増殖し DN2 細胞へと分化していく。DN2 細胞は、DN2mt (または DN2a、CD44⁺ CD25⁺ c-Kit^{hi}) および DN2t (または DN2b、CD44⁺ CD25⁺ c-Kit^{lo}) に分類される。DN2mt 細胞は T 細胞系列であると同時にまだ骨髓系細胞や NK 細胞への分化能を保持しているが、この細胞期に発現する Bcl11b によって多分化能が抑制されることで DN2t 細胞へ分化し、T 細胞系列への分化決定がなされる。T 細胞系列へと分化決定をした DN2t 細胞は、DN3 細胞へと分化し TCR β または TCR γ 遺伝子座の再構成が起これり α β 系列または γ δ 系列へと分化していく。この遺伝子再構成は RAG1 および RAG2 の両者によって誘導されるため、どちらかを欠損すると DN3 細胞で分化が停滞する。この DN3 細胞は遺伝子再構成前を DN3a (CD44⁺ CD25⁺ CD27^{lo})、再構成後を DN3b (CD44⁺ CD25⁺ CD27^{hi}) として分類される。TCR β 遺伝子の再構成に成功した DN3 細胞では、代替 α 鎖 (pre-TCR α : pT α) や CD3 との複合体であるプレ TCR が細胞膜表面に形成され、プレ TCR シグナルとしてリガンド非依存的にシグナルを誘導する。このプレ TCR シグナルは、TCR β 遺伝子座の対立遺伝子排除を誘導し、CD4 や CD8 の発現誘導や TCR α の遺伝子再構成を促す。pre-TCR シグナルを受けた DN3 細胞は、CD25 の発現を低下させて DN4 細胞 (CD44⁻ CD25⁻) を経て活発に増殖し DP 細胞へと分化する。DP 細胞は再構成された TCR α 鎖と TCR β 鎖が会合し成熟 T 細胞型の TCR を発現する。この DP 細胞は自身が発現している TCR と胸腺上皮細胞に提示される自己ペプチド-MHC 複合体を介したシグナルにより生死が決定され、自己ペプチドに低親和性の細胞は正の選択により生存、分化し、高親和性の細胞は負の選択によって細胞死が誘導される。この機構は自己反応性を示す有害な細胞を排除するために重要である。正の選択によ

り生存した細胞は CD4SP または CD8SP へと分化した後、末梢のリンパ組織へ移動し種々の免疫応答に寄与する。

前述のように、胸腺における T 細胞の初期分化には Notch シグナルが寄与する。Notch は膜貫通型の受容体であり、哺乳類では Notch1-4 の 4 種類、そのリガンドとして Jagged1、Jagged2、D111、D114 の 4 種類が知られ、種を超えて広く保存されている。Notch は Notch リガンドと結合すると、 γ -secretase によって細胞膜領域と細胞内領域に切断され、Notch 細胞内領域

(Intracellular domain of Notch:ICN) が活性化型 Notch として機能する。ICN は細胞質にて、DNA 結合分子である Rbpj と結合して核内へ移行し、転写活性化因子 Mastermind-like (MAML) 等との複合体を形成し、標的遺伝子の転写制御を行う。近年の多くの解析により、Notch シグナルは、種々の細胞の分化系列決定や器官発生、腫瘍化など多くの生命現象に関連していることが示されている。

T 細胞の初期分化においては、Cre-loxP システムを用いた誘導型 Notch1 欠損マウス (Mx1-Cre:Notch1 floxed) の造血前駆細胞は、胸腺内で T 細胞に分化せず、代わりに B 細胞に分化することが知られている。また、Rbpj の誘導型欠損マウスでも同様に胸腺内に多くの B 細胞が出現する。さらに、ICN を強制発現させた造血前駆細胞をマウスに移植すると、骨髄にて B 細胞には分化せず、代わりに T 細胞へと分化する。一方で、造血前駆細胞は D111 または D114 を強制発現させた骨髄由来支持細胞株 OP9 との共培養、あるいは、ICN を強制発現させることで *in vitro* においても T 細胞へと分化する。これらのことから、T 細胞と B 細胞の分化の振り分けは Notch シグナルによって決定することが示されている。

一方で、胸腺上皮細胞特異的に D114 を欠損させたマウスでは、胸腺内の T 細胞がほぼ消失し、代わりに多数の B 細胞が出現する。これは、Notch1 欠損マウスにおける結果と一致しており、胸腺環境においては、胸腺上皮細胞に発現する D114 と造血前駆細胞に発現する Notch1 を介して誘導される Notch シグナルが T 細胞分化に必須であることを示している。また、Notch シグナルの標的遺伝子である Hes1 の欠損は T 細胞分化に障害が認められ、T 細胞分化に必須である TCF1 も Notch シグナルの標的遺伝子として機能することが報告されている。

Notch1 の発現が認められる DN 期の胸腺細胞における Notch シグナルの寄与については、Notch1-floxed マウスと時期特異的 Cre マウス (Lck-Cre、CD4-Cre) を交配し解析されているが、十分な理解に至っていない。DN 細胞期は、細胞の分子的性状から、(1) T 細胞への分化能に加えて、B 細胞やミエロイド細胞、樹状細胞、NK 細胞への分化能を有する DN1a/b、DN2mt 期、(2) T 細胞に系列決定し、増殖しつつ TCR β 遺伝子再構成が始まる DN2t 期、(3) TCR β 遺伝子再構成を完成させ、徐々に増殖が低下する DN3a 期、(4) TCR β 鎖を pT α とともに細胞膜上に保持し、pre-TCR シグナルを受け、再度、増殖を開始する DN3b 期、(5) 顕著な増殖を示し、CD4、CD8 の遺伝子発現を開始する DN4 期、に細分化される。上記 Cre マウスの 2 系統、Lck-Cre、CD4-Cre

は、それぞれ（２）あるいは（４）の分化ステージから Cre の発現が期待される。しかし、実際は同ステージの一部の細胞に遺伝子欠失が生じるのみであり、概ねその次のステージ以降での遺伝子欠失の影響を観察していることになる。遺伝子欠失効率が常に 100%でないことは、結果の評価に不確定な要素が存在することを意味し、その結論は、より厳密な形でさらに検証する必要がある。

Lck-Cre 依存的に Notch1 遺伝子を欠失させると TCR β 鎖の遺伝子再構成効率が低下し、その結果、T 細胞分化が部分的に停滞し、DP 期の細胞数が減少する。同様に、Lck-Cre によりドミナントネガティブ型の MAML1 を発現するマウスでも T 細胞分化の停滞が見られる。しかし、DN 細胞に再構成した TCR β 鎖を発現させても分化停滞は回復しないことから、Notch シグナルは TCR β 鎖の存在とは別のシステムに依存することが示されている。また、Notch シグナルの標的遺伝子として *Ptcra* (pT α をコードする) が報告されており、*Ptcra* 遺伝子欠損マウスでは T 細胞分化に停滞が認められることから、DP 細胞への分化に pT α 発現誘導を介した Notch シグナルの寄与も想定される。一方で、CD4-Cre 依存的に Notch1 遺伝子を欠失させたマウスでは、胸腺の T 細胞分化は完全に正常であり、DN3b や DN4 細胞期からの DP 細胞への分化には Notch シグナルは必要ないことが報告されている。

こうした in vivo での解析に対し、Notch リガンド：D111 を過剰発現させた骨髄由来ストローマ細胞 (D111/OP9) を用いた in vitro での単層培養系では、DN3 から DP 期への分化は Notch シグナル依存的に進展することが数多く報告され、さらにシグナル下流分子が検索されている。しかし、本実験系は、DN3/DP 細胞分化が、Notch シグナルを与えることで再現できることを示しているに過ぎず、胸腺内にて同じ事象が起こっているのかはまた別問題である。いずれにしても、DN3/DP 分化の Notch 依存性は、先の in vivo での解析結果と矛盾しており、その相違点について詳細に調べる必要がある。

こうした背景を踏まえ、本研究では、胸腺細胞と D114 欠損胎仔胸腺による器官培養法 (Fetal Thymic Organ Culture、FTOC) を用いることで Notch シグナルを消失させ、Notch1 欠損胸腺細胞と同等の条件で解析する方法を確立している。これにより、各 DN 段階の純化した胸腺細胞を用いることで、Lck-Cre や CD4-Cre のように欠失時期が限定されない実験系が可能となる。そこで、本研究では、胎仔マウス胸腺から DN1a/b および DN2mt 細胞、RAG2 欠損胎仔マウス胸腺から DN3 細胞を純化し、D114 欠損胎仔胸腺との FTOC を行い、それぞれの分化段階における Notch シグナルの役割について検証した。その結果、前者では、DP 期への分化がほぼ完全に停滞するが、同細胞の多分化能に由来する分化転換は認められなかった。また Notch シグナル欠損は pre-TCR の過剰構築では回復しなかった。一方、後者では、pre-TCR シグナルに先んずる Notch シグナルの存在が、pre-TCR 依存的な DP 期への分化に必須であること、さらに DN3/DP 分化に伴う細胞増殖は継続的な Notch シグナルに依存すること、Notch シグナル下流にて c-Myc が機能することが

明らかになった。本研究は、純化した DN 細胞を生理的な条件下で分化誘導することで、これまでの報告にはなかった精密な実験系が可能となり、胸腺細胞の分化における Notch シグナルの寄与を理解するために重要であると考ええる。

【考察】

これまでの報告から、胸腺初期 T 細胞の分化に Notch1 を介したシグナルが必須であることが示されている。Fig. 1 に示されているように、活性化型 Notch シグナルである N1ICD は、胸腺細胞の各分化段階において、DN1a/b 細胞、DN2mt 細胞および DN3 細胞で高頻度に検出され、分化が進むとともにその頻度は低下していく。また、細胞膜上における Notch1 の発現量も N1ICD と同様に低下していき、この相関性は各分化段階、特に DN 期と DP 期における Notch シグナルの必要性の違いを示唆している。胸腺細胞の N1ICD は、Fbxw7 によるユビキチン化によって不安定化することが知られているが、それにもかかわらず、N1ICD が DN3 細胞まで高頻度に検出されたことは、 β セレクション前のほとんどの細胞が Notch1 を介してかなり強い Notch シグナルを受けていることを示唆している。このような Notch 分子やその下流分子の不安定性を促す機構は他にも報告されており、これらの機構が破綻したマウスは急性 T 細胞性白血病 (T-ALL) を発症する。実際に、T-ALL 患者のうち 50% 以上で Notch1 分子に活性化型の変異が見つかった。これらの知見からも、Fig. 1、2 で見られるような分化後期における細胞表面の Notch1 の発現および N1ICD の減少は適切な増殖を担保するために重要であり厳密に制御されていると予想される。また、N1ICD が新生仔 CD8SP 細胞に検出され、成獣 CD8SP 細胞で検出されなかったことは、CD8SP 細胞の分化に Notch シグナルが重要であるという最近の知見と関連しているかもしれない。これらのことから、胸腺細胞の DN 細胞期では Notch シグナルへの依存性が高く DP 細胞期では低いことが示唆された。

DN1a/b および DN2mt 細胞と D114 欠損胸腺との FTOC を行った結果から、初期胸腺細胞において DP 細胞分化への Notch シグナルの寄与が明確に示された。この系において、DP 細胞への分化はほとんど認められず細胞増殖も阻害されていたが、胸腺内に残っていた細胞の多くは Thy1.2 陽性であったことから、T 細胞系列のまま分化が停滞していると思われる。これは、Notch シグナルの消失による標的分子の発現低下が原因と考えられる。胸腺細胞における Notch シグナルの標的遺伝子としては、主に Hes1 や pT α が報告されている。Hes1 は、初期胸腺細胞を効率的に増殖させ、pT α は TCR β 鎖とともに pre-TCR を形成し、pre-TCR シグナルを誘導するために必須である。さらに、DN2t 細胞において Notch1 を欠失 (Lck-Cre:Notch1-floxed) させると、TCR β 遺伝子の再構成およびそのタンパク質合成が阻害されることが示されており、Notch シグナルが

$\alpha\beta$ 系列 T 細胞の分化に重要であることが示唆されている。これらの知見から、我々は、DN1a/b および DN2mt 細胞に Hes1、pT α または pT α +TCR β を強制発現させ、D114 欠損胸腺を用いた FTOC を行ったが、いずれの場合においても ICN1 で見られたような DP 細胞への分化や活発な増殖は認められなかった。このことから、DN2 細胞以降に寄与する Notch シグナルの標的遺伝子は他に存在することが示唆された。初期胸腺 T 細胞分化における重要な分子として TCF1、GATA3、Bcl11b などが知られており、これらの遺伝子は Notch シグナルの標的遺伝子としても報告されているため、Notch シグナルの欠失がこれらの分子の発現維持に影響を与えた可能性もある。また、これらの分子あるいは Notch シグナルを加えた分子群が協調して機能することも考えられるので、胸腺細胞の分化や増殖を回復させるためには、複数の分子を同時に発現させる必要もあるかもしれない。

一方で、 $\gamma\delta$ T 細胞の分化は認められたが細胞増殖は抑制されていた。これまでの $\gamma\delta$ T 細胞系列の研究では、DN2t 細胞において Notch1 (Lck-Cre:Notch1) または Rbpj (Lck-Cre:Rbpj-floxed) を欠損させると、Notch1 欠損では $\gamma\delta$ T 細胞に変化はなかったが Rbpj では増加することが報告されている。また、D114 欠損胸腺を用いた系で、Notch シグナルは T 細胞系列の分化そのものには重要であるが、 $\alpha\beta$ T 細胞系列と $\gamma\delta$ T 細胞系列との運命決定には寄与しないことを示唆する報告もある。我々が示した D114 欠損下における FTOC 後の $\gamma\delta$ T 細胞数の減少は、この報告と一致すると思われる。DN1a/b および DN2mt 細胞は T 細胞系列ではあるが、NK 細胞や骨髄球系への分化能を保持していることが知られている。Notch シグナルの消失によりこれらの細胞系列への分化転換が予想されたが、D114 欠損下の胸腺では少なくとも NK 細胞への分化転換は見られなかった。このことから、NK 細胞の分化にも Notch シグナルが寄与する可能性が考えられる。D114 欠損胸腺において、DN3 細胞から DP 細胞へは効率よく分化したが細胞増殖は顕著に低下していた。この増殖を伴わない分化は、DN2t 細胞より c-Myc を欠失させたマウス (Lck-Cre:c-Myc floxed) の胸腺細胞の表現型と類似している。DN3 細胞から DP 細胞への移行において、Notch シグナルの標的遺伝子または代替分子として c-Myc と Akt シグナルに関する報告が複数されており、これまでの報告を Table. 2 にまとめた。これらの研究は、すべて単層培養系を用いた実験系であり、本研究のような胸腺環境を用いた解析はされていない。我々が行った GSI 処理 FTOC により Notch シグナルを消失させた DN3 細胞では、c-Myc の発現量は顕著に低下したが Akt のリン酸化については Ser473 部位と Thr308 部位の両者とも変化がなかった。対照的に、単層培養系では c-Myc だけでなく Akt のリン酸化量も低下し、この結果はこれまでの報告と一致している。Notch シグナル非存在下の単層培養系において、pre-TCR シグナルを伴う c-Myc の過剰発現は、DN3 細胞から DP 細胞への分化を誘導するためには十分ではないことが示されている報告がある一方で、c-Myc の発現で十分に DP 細胞へ分化するという報告もある。両者の結果の違いとしては、前者の実験系では正常な DN3 細胞を、後者では Bcl2 過剰発現マウス由来の DN3 細胞を

用いていることであり、後者の系の DN3 細胞では強い細胞生存維持能が付与され、本来の DP 細胞への分化に影響を及ぼしている可能性がある。我々の結果から、D114 欠損胸腺において、DN3 細胞への c-Myc の導入により DP 細胞の増殖が回復したことから、胸腺における Notch シグナルの標的遺伝子は c-Myc であり、その発現維持が DP 細胞への移行時の増殖に寄与することが示された。単層培養系と胸腺を用いた三次元培養系の両者の差異は、胸腺が生理的な環境であることの重要性を示している。さらに、D114 欠損胸腺とのハンギングドロップ法により、残存していた Notch シグナルを消失させ、抗 CD3 抗体により pre-TCR シグナルを誘導させると、DN3 細胞から DP 細胞への移行が阻害されることがわかった。このことから、pre-TCR シグナルに先んじて Notch シグナルが導入されることが DP 細胞への移行に必須であることが示された。このとき、c-Myc を導入することにより増殖を伴いながら分化したことと、上述の結果から、正常な DP 細胞への移行と増殖をするためには、継続した Notch シグナルの活性化による c-Myc の発現量の維持が必須であることが示された。

一方で、GSI 処理 FTOC では、pre-TCR シグナルが誘導される前の DN3 細胞における Akt のリン酸化状態の維持は Notch シグナルに依存しないことが明らかになった。また、活性化型 Akt の過剰発現は DP 細胞への分化を促進させたが細胞増殖は顕著に低下していた。対照的に、単層培養系において、活性化型 Akt を導入した DN3 細胞は Notch シグナルに依存して活発な増殖を伴いながら DP 細胞へ分化し、この 2 つの系で見られた明確な差異は非常に興味深い結果となった。この異なる結果となった要因の一つとして、Akt シグナルはグルコースの取り込みを増加させ、解糖系の代謝を亢進させることがよく知られていることから、単層培養系における DN3 細胞は、胸腺を用いた三次元培養系に比べてグルコースに富む培地によりさらされている状態となり、結果的にグルコースを取り込みやすくなり、細胞増殖に有利になった可能性がある。Akt 欠損マウスや Akt のリン酸化が活性化または減弱するマウスの解析から、胸腺細胞の分化における Akt シグナルの寄与は重要であることが示されている。また、胸腺細胞や末梢血 T 細胞は CD3 刺激により Akt のリン酸化が上昇することや、Fig. 17 の抗 CD3 抗体処理なし (D114/HIlgG) や以前の報告のように、単層培養系において DP 細胞への分化が認められることから、Akt シグナルが TCR シグナルの下流にあることが示唆される。これらのことから、三次元培養系において、活性化型 Akt の導入により生細胞数が減少したことは、DP 細胞への移行後に、強い TCR シグナルを受けた場合と同様な反応が誘導され、負の選択によるアポトーシス様の現象が誘導された結果であるかもしれない。単層培養系では、このような胸腺で本来起こるべき現象が起こらないために活性化型 Akt による細胞増殖が見られたのではないかと考えられる。

【結論】

本研究から、D114 欠損胸腺を用いた三次元培養系において、最も未熟な胸腺細胞である DN1a/b および DN2mt 細胞から Notch シグナルを消失させると DP 細胞への分化と増殖は顕著に阻害された。また、DN3 細胞では細胞増殖は抑制されたものの DP 細胞に完全に分化することがわかった。さらに、Notch シグナルを完全に消失させてから pre-TCR シグナルにより DP 細胞へと分化誘導をさせると、DP 細胞への分化が阻害されることも示された。このことから、DN 細胞の各分化段階から DP 細胞への分化には D114 を介した継続的な Notch シグナルが必須であることが明らかになった。さらに、Notch シグナルの代替分子または標的遺伝子として Akt シグナルと c-Myc についてこれまでの報告にあったが、我々の研究結果から、胸腺環境においては Akt ではなく c-Myc が DN3 細胞から DP 細胞への増殖を伴う移行に重要な役割を果たすことが示された。