

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Prominently expressing in mature B cells, Notch2 is indispensable for marginal zone B cell development

和訳 Notch2 は成熟 B 細胞に特異的に高発現し、Marginal Zone B 細胞の分化に必須である

指導教官 平井 久丸 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 齋藤 俊樹

Notch 遺伝子ファミリーは進化的に保存された膜貫通型の受容体をコードしており、細胞の運命選択と分化において鍵となる役割を担っている。Notch は切断された細胞内領域が核に移行し RBP-J と Deltex を介して遺伝子の発現制御を行う。前者は HES-1, HES-5, NF- κ B2 を活性化し、後者は JNK 経路を抑制する。Notch はリンパ球分化においても複数の段階で細胞運命の決定を制御していると考えられている。Notch1 と RBP-J の組織特異的ノックアウトマウス(cKO マウス)の解析により、T 細胞分化は初期段階で阻害され、B 細胞分化が胸腺にて促進されることが分かっている。T 細胞分化に比べ、B 細胞分化における Notch シグナルの役割は良く解っていないが何らかの関わりを持つことが発現パターンや in vitro の実験より示唆されている。骨髄にて成熟した後の脾臓などリンパ組織における B 細胞の後期分化については谷垣らが最近、RBP-J

欠損 B 細胞にて Marginal zone B(MZB)細胞数が減少することを報告したのが初めてである。4つの哺乳類での Notch ホモログが同定されており(Notch1-4)、構造的にも機能的にも似ており、Notch 受容体としての特性を全て備えている。特に Notch1 と Notch2 は非常に似ているが、その異同については十分に解析されていない。

リンパ球系の細胞における Notch 遺伝子の発現に関して多くのレポートがなされているが、細かい分画について T 細胞と B 細胞を同時に見ている報告は無かった。そこで RNA レベルでの発現を各分化段階でソートした分画の逆転写産物をリアルタイムPCR法で詳細に調べてみた。まず、今まで言われていたような Late Pre-B 細胞(Hardy 分類 D 分画)特異的な Notch2 の発現分布はマウスにおいて存在せず、Notch2 は B 細胞では分化と共に発現が高くなり、成熟 B 細胞で最も発現が高く、T 細胞では一様に発現が低かった。一方、Notch1 は B 細胞では Notch2 と逆相関し、成熟に伴い発現量を徐々に下がっており、一方 CD4-CD8-T(DN)細胞で発現は際だって高かった。以上より、Notch2 は胸腺での働きは弱く、成熟 B 細胞にて強く機能を発揮していることが推測された。

Notch2 ノックアウトマウスは胎生致死であるため、リンパ球分化における Notch の役割をさらに調べるために Cre-loxP による部位特異的な組み換えの手法をつかった Notch2 cKO マウスを作成した。loxP 配列を ES 細胞の Notch2 の膜貫通領域エクソンの両側に相同組み換えにて挿入した。

Notch1 と RBP-J の cKO マウスでは胸腺で T 細胞の成熟停止と異常な B 細胞出現が認められる。Notch1 と Notch2 は共に胸腺に発現しており、RBP-J は Notch シグナルにおいて主な核内のターゲット分子であることより、我々は Notch2 cKO マウスの胸腺内の T 細胞分化を調べた。胸腺内の T 細胞分画は Notch2^{f/-},Mx-Cre マウスと野生型のマウスで同等の比率であった。胸腺における B 細胞系の細胞の蓄積は認められなかった。これらのより Notch2 欠損 T 細胞により胸腺分画は正常に構成されていることが示され、Notch2 は Notch1 の様に T/B 系列の振り分けを制御しないことが示唆された。

Notch1 の cKO マウスでは B 細胞分化に対する影響は報告されていないが、RBP-J cKO マウスでは MZB 細胞の欠損が認められている。Notch1 と Notch2 は共に B 細胞系列に発現していることより、我々は Notch2 cKO マウスの B 細胞分化を調べた。骨髄内の B 細胞分画は Notch2f⁻, Mx-Cre マウスと野生型のマウスで同等の比率であった。ところが Notch2f⁻, Mx-Cre マウスより由来の脾細胞では MZB 細胞が非常に減少していることが分かった。Notch2f⁻, Mx-Cre マウスにおける MZB 細胞の減少は B 細胞に内因性の Notch2 欠損で起きたのか、MZ に存在する T 細胞、マクロファージ、ストローマ細胞、他の非リンパ球系細胞など他の構成細胞の Notch2 欠損で起きたのか分からない。よって B 細胞系列に特異的に Notch2 を欠損させるため CD19-Cre マウスと交配した。表現形は同じく MZB 細胞は殆ど消失していた。さらに組織学的な検討により、FACS の結果と同様に MZB 細胞に特徴的な IgM⁺, IgD⁻ の濾胞辺縁は Notch2^{-/-} 脾臓では完全に消失していた。Notch2 は MZB 細胞分化に必須であり、またこの欠損は B 細胞の自律的な欠陥によるものであることが分かった。

これまでに B 細胞レセプター(BCR)を介するシグナルが強まることにより、ネガティブフィードバックの1つとして CD21 の発現が下がること、また MZB 分化が阻害されることが幾つか報告されている。一方 CD21 は RBP-J を介する Notch シグナルにより制御されていることが示唆されている。脾臓の follicular B 細胞(FOB)と末梢血 B 細胞は両方とも Notch2^{-/-}において CD21 は低いレベルに全体がシフトしていた。これにより Notch2 欠損により成熟 B 細胞にて CD21 の発現が低下することが示された。

Notch 遺伝子は一般的に発現量の変化によって細胞の運命選択に強い影響がある。我々の Notch2^{+/-}の脾臓においても MZB 細胞の相対的な数は Notch^{+/+}に比べて 1/4-1/6 に減っていた。この表現型は浜田らが作成したアンキリンリピートを含む 3'端を β ガラクトシダーゼで置き換えた変異により Notch2 機能を削除したマウスのヘテロマウス (Notch2^{+m})により再確認された。しかしながら Notch1 ヘテロマウスにおいては MZB 細胞の数は変化していなかった。正常アリアル由来の転写産物にのみを認識するプライマーを用いて B 細胞由来の逆転写産物をリアルタイム PCR 法をにより分析した。Notch2^{+/-}細胞において Notch の正常アリアル由来の転写産物は Notch2^{+/+}細胞のほぼ

半量であり、片アリアルよりの転写量は有意に増加も減少もしていないことが示唆された。これらより Notch2 のヘテロ不全は転写産物の減少により MZB 細胞の減少を引き起こすが、Notch1 のヘテロ不全は MZB 細胞の成熟に影響を与えないことが示された。

前述以外の B 細胞分画、脾臓の未熟 T1 B 細胞と形質細胞、腹腔内 B1 細胞は全て正常に分布していた。他の Notch 受容体が補完的に発現を上昇させた可能性を検証するため、脾臓 B 細胞の逆転写産物を用いて、Notch1, 3, 4 の発現量を測定したところ RNA 発現量は有意な変化を認めなかった。以上より正常に分化した B 細胞においては他の Notch ファミリー遺伝子の重複作用により分化したのではなく、強い Notch シグナルそのものが MZB 細胞以外の B 細胞の成熟には必要ないことが示唆された

さらに、成熟 B 細胞における Notch2 シグナルの欠損が与える下流の遺伝子発現への影響を見るために Notch 関連遺伝子の発現を解析したところ、RBP-J, Hes1, Hes5, Deltex のうち Deltex の発現は Notch2 の発現量に極めて正確に平行しており Notch2^{+/-}B 細胞ではほぼ半減し、Notch2^{-/-} B 細胞では殆ど発現が認められなかった。また MZB 細胞で飛び抜けて発現が高くなっており、T2 B 細胞がそれに続いていることを見いだした。

我々は Notch2 遺伝子が MZB 細胞の分化に必須であることを示した。また生理的な範囲内においても Notch 遺伝子の量的なものが大切であることがハプロ不全が起きることにより確認された。また他の成熟 B 細胞においては他の Notch ファミリー遺伝子の重複作用により成熟したのではなく、強い Notch シグナルが不要であったことが示唆された。また MZB 細胞の成熟には Deltex が関連していることもその発現パターンと Notch2 による厳格な制御より推測された。

(3561 文字)