

[別紙 1]

論文内容の要旨

論文題目 Notch シグナルによる肥満細胞の分化および機能制御の解析

指導教員 黒川峰夫教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

坂田麻実子 (柳元)

Notch シグナルは細胞の分化運命を決定するシステムとしてハエ、線虫からヒトにいたるまで幅広い生物種で高度に保存されている。血液系では Notch1 欠損マウスでは胸腺の T 細胞が形成されず、Notch2 欠損マウスは脾臓の辺縁帯 B 細胞を欠損することから、Notch シグナルはリンパ球の分化運命決定に重要な役割を担うことが示されてきた。また、近年では Notch シグナルが Th1、Th2 分化など末梢免疫においても重要な役割を担うことが示されつつある。

一方、Notch シグナルのその他の血液系統の分化制御については、赤血球、骨髄球系、樹状細胞などへの分化制御を示唆するデータはあるものの、不明瞭な点も多い。肥満細胞については、Notch1、2、3、Jagged1 が発現するというデータはあるものの、分化あるいは機能制御に関するデータは示されていない。本研究では Notch シグナルが肥満細胞の分化を制御することを下流の機構を含めて明らかにした。また、肥満細胞の機能への関与について、寄生虫感染モデルを用いて明らかにした。以下に詳細を述べる。

[1] 肥満細胞の初期分化への Notch シグナルの関与

マウス骨髄から骨髄球系前駆細胞 (骨髄球共通前駆細胞および顆粒球マクロファージ前駆細胞) を分離し、培養皿にコーティングした Notch リガンドと Fc 蛋白の融合蛋白 (Delta1-Fc) あるいはコントロール Fc で刺激しながら、Stem cell factor (SCF) およびインターロイキン 3、インターロイキン 6、トロンポエチン存在下で 7 日間培養した。コントロール Fc 下では顆粒球、マクロファージが大部分を占めるのに対して、Delta1-Fc で刺激したところ、顆粒球あるいはマクロファージへの分化は抑制され、肥満細胞への分化が促進された。Mx-Cre、Notch2 コンディショナルノックアウトマウス (N2-MxcK0) 由来の骨髄球系前駆細胞では、Delta1-Fc の効果はみられないことから、Notch1-4 のうち Notch2 が責任分子であると考えられた。下流の転写機構を明らかにするため、骨髄球系

前駆細胞を Delta1-Fc あるいはコントロール Fc で刺激し、mRNA を Real-time PCR 法により定量的に解析した。Hes-1 は血液細胞で Notch シグナルの直接の下流でしばしば働いている転写抑制因子であるが、骨髄球系前駆細胞の Delta1-Fc 刺激でもコントロールに比較して発現が上昇していた。一方、GATA ファミリーについては、GATA2 は肥満細胞への分化や Notch シグナルによる骨髄系への分化抑制に重要であることを *in vitro* で示す報告がある。しかし、GATA3 は肥満細胞の分化に関する報告はなかった。今回の研究では、Delta1-Fc 刺激によって、GATA2 の発現には影響がみられなかったが、GATA3 は発現が著明に上昇していた。このことから、Notch シグナルによる骨髄球系前駆細胞から肥満細胞への分化促進において、GATA2 ではなく GATA3 が下流分子として働いていると考えられた。

Hes-1 および GATA3 が実際に肥満細胞の分化促進において下流で働いているか否かについて検証するために、骨髄球系前駆細胞に Hes-1、GATA3 をレトロウイルスを用いて共発現させた。液体培養 8 日後の解析では、肥満細胞の割合は Hes-1、GATA3 共発現分画でコントロールウイルスに比較して著明に増加していた。また、Hes-1 および GATA3 発現分画を分離し、半固形培地にて培養したところ、コントロールウイルスでは顆粒球コロニーあるいは顆粒球マクローファージコロニーができるのに対して、Hes-1 および GATA3 共発現細胞では、肥満細胞コロニーが増加していた。

C/EBP α は骨髄球系細胞の顆粒球への分化において重要な転写因子であり、一方、肥満細胞では C/EBP α の発現が低下していることが知られる。骨髄球系前駆細胞に Hes-1 を導入して mRNA を Real-time PCR 法により定量的に解析したところ、コントロールウイルスを導入した場合に比較して C/EBP α が抑制されていた。

このことから、Notch シグナルは Hes-1 を介した C/EBP α の抑制、および GATA3 の発現上昇によって骨髄系前駆細胞から肥満細胞への分化運命を決定していることが示された。また、この現象には Notch 分子のうち Notch2 が関わっていることが示された。

[2] 粘膜型肥満細胞への分化における Notch シグナルの役割

肥満細胞は、胃、腸管等に分布する粘膜型肥満細胞と、皮膚等に分布する結合織型肥満細胞に大別され、それぞれ特異的なプロテアーゼ (mouse mast cell protease: mMCP) の発現パターンにより区別される。Notch シグナルによる肥満細胞の成熟の制御について調べるために、骨髄由来肥満細胞を Delta1-Fc あるいはコントロール Fc により刺激し、プロテアーゼの発現変化を調べたところ、Delta1-Fc 刺激により粘膜型で発現がみられる mMCP1、mMCP2 の発現は著明に増加し、組織型でみられる mMCP5、mMCP6 の発現には影響はなかった。このこ

とから、Notch シグナルは肥満細胞の粘膜型への成熟を誘導することが示された。また、骨髄由来肥満細胞では TGF- β 1 により mMCP1 の上清中への分泌が誘導されることが知られるが、Notch リガンド刺激により TGF- β 1 存在下で mMCP1 の上清中への分泌が著増していた。これにより、*In vitro* で Notch が TGF β -1 存在下で粘膜型肥満細胞の活性化を亢進させることが示された。N2-MxcK0 の骨髄由来肥満細胞を用いて mMCP1 の発現解析を行ったところ、Notch リガンド刺激により mMCP1 増加は軽度みられるものの、コントロールマウスの骨髄由来肥満細胞に比べてその変化は乏しいことから、Notch1-4 のうち Notch2 が主要な責任分子であることが示された。

[3] 個体における Notch シグナルの肥満細胞における役割

Notch シグナルの個体での機能を実際に調べるため、N2-MxcK0 を用いた。

コントロールマウスでは腸管には肥満細胞はほとんどみられないものの、N2-MxcK0 では、肥満細胞が粘膜固有層に異常集積していた。pI: pC による Mx-プロモーター下での Cre リコンビナーゼの誘導により、一部腸管上皮でも Notch2 が欠損することが知られる。Notch2 分子の欠損が腸管側で必要であるのか、肥満細胞側で必要であるのかを同定するために、Ly5.1 により標識される N2-MxcK0 由来の骨髄を Ly5.2 マウスに移植し、腸管の組織を解析した。N2-MxcK0 と同様に、Notch2 欠損骨髄を移植したマウスでも、肥満細胞は粘膜固有層に異常集積していた。このことから、肥満細胞の腸管での遊走に際して、Notch2 は腸管側ではなく、骨髄由来細胞側に必要なことが示されたが、詳細なメカニズムの解明は、今後の課題である。

また、肥満細胞の成体での分化課程は十分に明らかにはなっていない。近年、骨髄中の肥満細胞前駆細胞を同定したとの報告や、脾臓中の好塩基球-肥満細胞前駆細胞を同定したとの報告がなされた。N2-MxcK0 では、骨髄中の肥満細胞前駆細胞分画はコントロールマウスと差を認めなかった。しかしながら、脾臓中の好塩基球-肥満細胞前駆細胞分画はコントロールマウスに比較してむしろ増加していた。Notch2 は成体での肥満細胞の分化においても、好塩基球-肥満細胞前駆細胞以降の分化段階で重要な役割を担うことが示唆される。

[4] 肥満細胞の寄生虫排除機能における Notch シグナルの役割

Strongyloides venezuelensis はげっ歯類へ感染する寄生虫であり、排虫は T 細胞依存性により誘導される肥満細胞の機能に依存することから、成体での肥満細胞の分化、機能を調べるモデルとして広く使われてきた。*S. venezuelensis* を N2-MxcK0 あるいはコントロールマウスに感染させたところ、N2-MxcK0 では糞便中への虫卵の排泄が遷延していた。感染 8 日目の小腸粘膜面での肥満細胞の

数は N2-MxcK0 では減少していることから、Notch2 は肥満細胞の分化、増殖に重要なことが示された。また、コントロールマウスでは肥満細胞は上皮内に主に存在していたが、N2-MxcK0 では肥満細胞は粘膜固有層にとどまっていた。mMCP1 は *S. venezuelensis* などの寄生虫感染モデルでは血清中の mMCP1 が 1000 倍以上に著増することが知られ、小腸肥満細胞の活性化の指標として用いられている。血清中の mMCP1 の濃度は N2-MxcK0 ではコントロールマウスに比較して低かった。これは *in vitro* での Notch2 による粘膜型肥満細胞への分化誘導および機能活性化の結果に沿うものであった。

このように、Notch2 が肥満細胞の分化および小腸粘膜への遊走を制御し、また mMCP1 の発現を制御することで、排虫に生理的に重要な役割を担うことが示された。

本研究において Notch シグナルが肥満細胞の分化、成熟、遊走、機能に重要な役割をはたしていることが *in vitro*、*in vivo* の双方から明らかとなった。