

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 坂田麻実子 (柳元)

本研究は造血細胞のうちリンパ球の分化および機能に重要な役割を果たすことが知られている Notch シグナルが肥満細胞の分化および機能をも制御する仕組みを明らかにするために行われた。*in vitro* では骨髄球系前駆細胞から肥満細胞への分化および骨髄由来肥満細胞の成熟に対する Notch シグナルの影響を調べるとともに、Notch2 を血液細胞特異的に欠損するマウスの解析を行い、下記の結果を得ている。

1. マウス骨髄球系前駆細胞（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 Notch リガンドと Fc 蛋白の融合蛋白(Delta1-Fc)下で培養したところ、コントロール下では顆粒球、マクロファージが大部分を占めるのに対して、Delta1-Fc 下では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-MxcKO) 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。
2. 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。Delta1-Fc 刺激後早期の観察では Hes-1 mRNA の上昇が見られ、刺激後後期には GATA3 が上昇していた。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。液体培養および半固形培地での培養の双方で、コントロールウイルスでは顆粒球あるいはマクロファージへ分化するのに対して、Hes-1 および GATA3 共発現細胞では、肥満細胞への分化が誘導された。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 の発現が抑制されていた。
3. 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、肥満細胞プロテアーゼの発現変化を調べたところ、Delta1-Fc 刺激により粘膜型肥満細胞で発現がみられる mMCP1、mMCP2 の発現は著明に増加し、結合織型肥満細胞でみられる mMCP5、mMCP6 の発現には影響はなかった。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TGFβ-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-MxcKO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。

4. Notchシグナルの個体での機能を実際に調べるため、N2-MxcKOを解析した。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-MxcKOでは、肥満細胞が粘膜固有層に異常集積していた。

5. 寄生虫 *Strongyloides venezuelensis* を N2-MxcKO あるいはコントロールマウスに感染させたところ、N2-MxcKO ではコントロールマウスに比較して糞便中への虫卵の排泄が亢進していた。感染 8 日目の小腸粘膜面での肥満細胞の数は N2-MxcKO では減少していた。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-MxcKO では肥満細胞の大部分は粘膜固有層にとどまっていた。mMCP1 は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-MxcKO ではコントロールマウスに比較して低かった。

以上、本論文は Notch シグナルが肥満細胞の分化および小腸粘膜での遊走を制御し、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した。また、肥満細胞の分化促進において Notch シグナルの下流で働く転写因子の発現制御の機構を明らかにした。本研究はこれまで全く知られていなかった Notch シグナルの肥満細胞における重要な役割を *in vitro* と *in vivo* の双方で明らかにすることにより、肥満細胞の分化および機能の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。