

## CORE PROJECT 2023.

# 「時空間特異的なNotchシグナルによるT細胞運命決定メカニズムの解明」

### 【研究概要】

私たちの体を形成している細胞は30兆個を超えられている。これらの細胞はたった一つの受精卵から分裂し、基本的には同じDNAを持っているにもかかわらず、200種類以上の性質の異なる細胞集団として様々な臓器を形成し、恒常性を保っている。幹細胞は外界からのシグナルを受けることで、細胞系列特異的な遺伝子発現が誘導され、特定の機能を持った細胞へと分化する。幹細胞から特定の細胞系列への運命決定メカニズムの解明は、私たちの生命現象を理解する上で極めて重要な課題である。我々は免疫細胞の運命決定を司る転写因子群と外界からのシグナルであるNotchシグナルがどのように相互作用し、どのような分子メカニズムで免疫細胞の系列決定がなされるか解明すること、さらには、Notchシグナルと転写因子の相互作用をコントロールすることで、免疫関連疾患の発症や憎悪を制御する新規治療戦略の確立を目標として研究を進めている。

### 【研究成果】

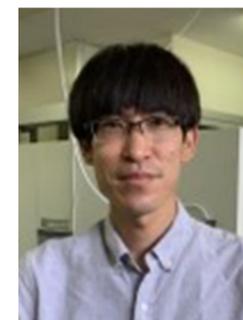
骨髄に存在するリンパ球前駆細胞 (Lymphoid progenitor; LP)が胸腺へ移入しNotchシグナルを受け取ることでT細胞分化プログラムがスタートする。T前駆細胞はいくつかの発生段階を経て、成熟T細胞へと分化する (図1)。T細胞の初期発生において多くの転写因子の発現プロファイルがダイナミックに変化するが、特定のマスター転写因子は存在しないと考えられている (Hosokawa, Nat Rev Immunol 2021)。RUNX転写因子はLPから成熟T細胞に至るまで恒常的に発現し、各発生段階でステージ特異的な役割を果たすことがその遺伝子欠損マウスの解析から示唆されていた。我々は独自に確立したCas9発現LP細胞株などを用いて、T前駆細胞において発生段階特異的、且つacuteにRUNX機能欠損を誘導する方法を独自に確立し、これまで解析が不可能であったT前駆細胞におけるRUNXの機能欠損が発生段階特異的な転写制御ネットワークの破綻を誘導し、T細胞分化が障害される事を明らかにした (Hosokawa, PNAS 2021)。本研究ではCas9発現LP株を用いて、T細胞の初期発生におけるステージ特異的な、①RUNX転写因子欠損細胞のトランスクリプトーム解析、②RUNX転写因子の結合するゲノム領域の網羅的解析 (ChIP-seq解析)、③RUNX転写因子複合体のプロテオミクス解析、④発生段階特異的なRUNX会合分子の機能解析を行った (図1)。

我々は、Cas9発現LP細胞をNotchリガンドを発現するストローマ細胞上で培養する事で、均一な性質を持ったLPから発生段階の異なるT前駆細胞を大量培養する方法を確立した。Notchシグナルを受けたT前駆細胞は3日間ほど多能性を有した前期T前駆細胞にとどまり、同じ培養をさらに7日間続けると全ての細胞がT細胞への運命決定がなされた後期T前駆細胞へ移行する (図1)。この培養系にレトロウイルスによるsgRNAやcDNAの導入を組み合わせることで、LPや前期および後期T前駆細胞においてステージ特異的、且つacute(3日以内)にRUNX欠損や変異型RUNX1の影響を解析する実験系を独自に確立した。我々は本研究において、これら3つの発生段階の細胞を用いてRUNX1のChIP-seq及び、RUNX機能欠損細胞のトランスクリプトーム解析を行い、多くの発生段階特異的なRUNX結合ゲノム領域とRUNXターゲット遺伝子の同定に成功した。また、発生段階特異的なRUNX1複合体のプロテオミクス解析を行い、多くの発生段階特異的なRUNX1会合分子と、いくつかの発生段階特異的なRUNX1の翻訳後修飾を同定した (図2)。現在これらのオミクスデータを統合的に解析し、RUNX1が発生段階特異的な機能を発揮する分子メカニズムの解明に向けて実験を行っている。

### 【今後の展望】

すべての免疫細胞は骨髄に存在する造血幹細胞から分化し、免疫細胞の発生段階は細胞表面分子の発現パターンを単一細胞レベルで調べることが容易に検出することができる。さらに、免疫細胞の系列決定を制御できれば、感染症や癌、アレルギー、自己免疫疾患といった免疫関連疾患の新規治療法の開発にもつながる可能性を秘めている。このことから、免疫細胞は、細胞の運命決定メカニズム機構を解析する上で非常に良いモデルであると考えている。今後、T細胞の発生及び機能を制御する転写因子群とNotchシグナルの生理的な機能を明らかにすることで、様々な免疫関連疾患 (感染症、癌、アレルギー性疾患、自己免疫疾患など)のコントロールに結びつける研究へと発展させていきたい。

## 血液腫瘍学研究部門



鎌 裕一  
Kama Yuichi  
生体防御学 特任助教



プロジェクトリーダー:細川裕之  
Hosokawa Hiroyuki  
医学部医学科基礎医学系生体防御学 准教授

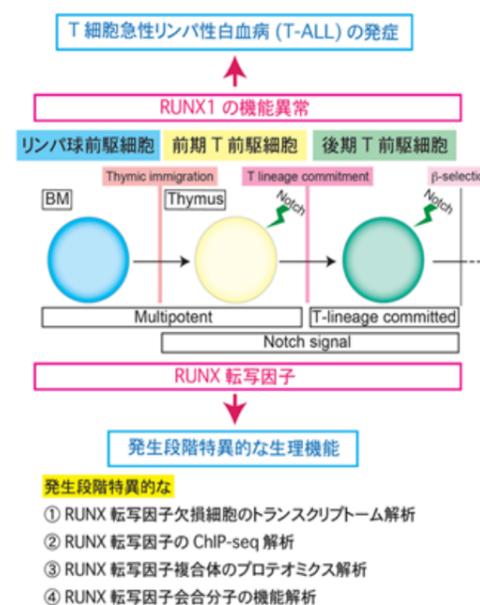


図1、本研究の概要

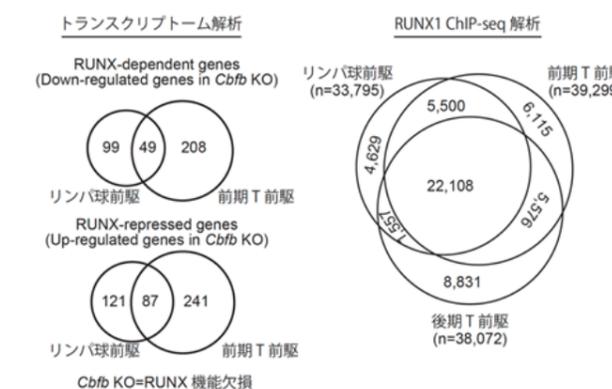


図2、発生段階特異的なRUNX転写因子の機能とゲノム上の結合領域

### Selected Papers,

- 1)Ibrahim AA, Fujimura T, Uno T, Terada T, Hirano K, Hosokawa H, Ohta A, Miyata T, Ando K and Yahata T.: Plasminogen activator inhibitor-1 promotes immune ecasion in tumors by facilitating the expression of programmed cell death-ligand 1. Front Immunol. in press インパクトファクター;8.79
- 2)Koizumi M, Kama Y, Hirano K, Endo Y, Tanaka T, Hozumi K and Hosokawa H.: Transcription factor Zbtb1 interacts with bridging factor Lmo2 and maintains the T-lineage differentiation capacity of lymphoid progenitor cells. J Biol Chem.298(11): 102506 (2022) インパクトファクター;5.49
- 3)Fujimoto M, Yokoyama M, Kiuchi M, Hosokawa H, Nakayama A, Hashimoto N, Sakuma H, Nagano H, Yamagata K, Kudo F, Manabe I, Lee E, Hatano R, Onodera A, Hirahara K, Yokote K, Miki T, Nakayama Y and Tanaka T.: Liver group 2 innate lymphoid cells regulate blood glucose levels through IL-13 signaling and suppression of gluconeogenesis. Nat Commun. 13(1): 5408 (2022) インパクトファクター;17.69
- 4)Suzuki S, Venkatesh D, Kanda H, Nakayama A, Hosokawa H, Lee E, Miki T, Stockwell BR, Yokote K, Tanaka T and Prives C.: GLS2 is a tumor suppressor and a regulator of ferroptosis in hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 82(18): 3209-3222 (2022) インパクトファクター;13.31
- 5)Hirano K, Hosokawa H, Yahata T, Ando K, Tanaka M, Imai J, Yazawa M, Ohtsuka M, Negishi N, Habu S, Sato T and Hozumi K.: Dll1 can function as a ligand of Notch1 and Notch2 in the thymic epithelium. Front Immunol. 13: 852427 (2022) インパクトファクター;8.79