

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04743

研究課題名(和文) T細胞系列への特化過程を駆動する転写因子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Clarification of transcriptional network that drives T cell lineage specification

研究代表者

河本 宏 (kawamoto, hirosi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：00343228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「M-T-B前駆細胞からM-T前駆細胞になる過程」の解明を目指した。27年度には理研のFANTOM5でこの分化段階の経時データを報告し(Science, 329:1014, 2015)、さらに多能前駆細胞の分化誘導オン/オフ系を作製した(Stem Cell Reports, 2015)。28年度にはポリコム欠失によるTからB系列への運命転換を報告した(Gene Dev, 2016)。計画通りでなかった点もあるが、計画に沿った成果(Stem Cell Reports)、関連成果(Gene Dev)が得られており、総体としては、順調に成果があがったと考えている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the molecular mechanisms of the step by which myeloid-T-B progenitors are committed to myeloid-T progenitors. In 2015, we reported the time course data of this process as a part of FANTOM5 project conducted by RIEKN (Science, 329:1014, 2015), and also succeeded in developing an on-off induction culture system of multipotent hematopoietic progenitors (Stem Cell Reports, 2015). In 2016, we reported that T cell progenitors are converted into B lineage cells upon inactivation of polycomb complex (Gene Dev, 2016). In one of planned subjects, in which we knocked out *snai1* and *snai2*, which had been listed up from FANTOM5 project as candidate genes that play role in early T cell differentiation, we produced T cell specific conditional double knockout mice, but unfortunately they did not show phenotypes. However, we have achieved publications as mentioned above along with the aim of this study, and so, as a total, we think that the results were satisfactory.

研究分野：免疫学 血液学

キーワード：多能前駆細胞 系列決定 転写因子 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、2001年に「ミエロイド基本型モデル」という独自の造血モデルを提唱した。古典的モデルが最初の分岐でミエロイド-エリスロイド系前駆細胞(M-E前駆細胞)とリンパ系前駆細胞(T-B前駆細胞)がつくられると提唱しているのに対し、申請者らのモデルではまずM-E前駆細胞とミエロイド-リンパ系前駆細胞(M-T-B)前駆細胞がつくれ、M-T-B前駆細胞からM-T前駆細胞とM-B前駆細胞を経てT前駆細胞とB前駆細胞が生成すると提唱している。それぞれの前駆細胞を特定の分画中に濃縮することにより、実証を進めてきた。特に幹細胞からT前駆細胞に至る経路においてはM-T-B前駆細胞(J Immunol, 2002)とM-T前駆細胞(Nature, 2008)の存在を示した。さらにM-T前駆細胞がT前駆細胞へと決定される過程も明らかにした(Science, 2010)。

一方、M-T-B前駆細胞からM-T前駆細胞に至る過程は、まだよく分かっていない。胸腺に移住して胸腺上皮細胞が発現するNotch ligandに出会ってNotchシグナルが入り、それによりすみやかにM-T前駆細胞になると考えられている。

この過程はいわゆるDN1という段階で起こるが、DN1細胞が少ないため、研究が困難であった。そこで、申請者らは培養中で増幅可能な多能前駆細胞をT系列に向けて分化誘導して、経時的に解析するというアイデアを考案した。E2A, EBF1, PAX5などの転写因子を欠損した前駆細胞はB細胞分化誘導環境で培養すると、M-T-B前駆細胞の段階で自己複製することが知られている(Ikawa et al, Immunity, 2004)。例えばEBF1前駆細胞をT細胞分化誘導環境に移してT系列に向けて分化誘導すると、同調して一斉に分化し、培養3日目には半数が、4日目にはほぼ全てがいわゆるDN2という分化段階に入る。すなわち、培養の最初の2日間が、DN1段階に相当する。

## 2. 研究の目的

この研究では多能幹細胞からT前駆細胞が作られる過程において「B細胞の分化能を喪失する過程」のメカニズムを明らかにすることを目的とした。上記の培養から経時的に回収したサンプルを、理研がすすめていたFANTOM5というプロジェクトでCAGE解析した。そのプロジェクトからsnai1とsnai2という転写因子が候補に上がったので、これら2因子のT細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製することも目的とした。さらに、転写因子だけでなく、「B細胞の分化能を喪失する過程」へのエピジェネティックなメカニズムの関与も調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

まずすでに得られているデータについて解説する。分化誘導培養開始後1週間の内に15のタイムポイントをとって細胞を回収し、解析した。転写因子に着目し、得られた増減パターンから、9つのクラスターに分類することができた。

本申請研究では、その中でT細胞系列への特化過程に関係のありそうなクラスター2とクラスター9について主に検証を進める計画であった。パイオインフォマティクス解析を加えることにより、クラスター2とクラスター9についてはネットワークを描出することに成功している。

本申請研究では、これらのネットワークを参考にしつつ、転写因子の中でキーとなる因子を絞り込む作業を行う。実験法としては、候補となる転写因子を誘導的に欠失させた多能前駆細胞を用いて、B細胞系やミエロイド系への分化能を解析する。

さらに、エピジェネティックな制御機構の関与も明らかにする。分化能が消失する時にはエピジェネティックな制御がかかっている

と思われる。実験法としては、ポリコムを介する制御や DNA メチレーションを介する制御の関与を明らかにするために、ポリコムあるいは dnmt1 を誘導的に欠失させた多能前駆細胞を用いて T 細胞系列への分化誘導を行う。より詳細な方法については研究計画の項目に詳しく記す

以下、具体的な実験法を記載する。多能前駆細胞を Notch リガンド発現ストローマ細胞に移して B 細胞分化能の変遷をみる。多能前駆細胞としては、B 細胞への分化能の検定を可能にために、ER-Id3 により E2A をタモキシフェンの存在下だけ抑制する誘導的システムを用いて作製した多能前駆細胞を材料にする。エピジェネティクス制御状態の改変を行い、その影響を見る。すなわちこの前駆細胞においてポリコムや DNA メチレーションを欠失させた上で、さらに転写因子に改変を加え、B 細胞や T 細胞への分化能に変化が起こるかどうかを、ストローマ細胞との共培養系を用いて測定する。

#### 4 . 研究成果

27 年度には理研の FANTOM5 プロジェクトに参加し、EBF1 欠損多能前駆細胞を分化同期培養したサンプルを CAGE 法で解析したデータを著者のひとりとして報告した (Arner et al, Science, 329:1014, 2015)。さらに ER-Id3 導入によって多能前駆細胞からの分化をスイッチオン/スイッチオフできる系を完成させた (Ikawa et al, Stem Cell Reports, 5:716-727, 2015)。

28 年度は同様の目的で進めていた Ick-Cre と Ring1A-/-Ring1Bf/f をかけ合わせる研究が大きく進展し、重要な知見を得て、論文発表にいたった (Ikawa et al, Genes & Development, 30: 2475, 2016)。T 前駆細胞においてポリコムを欠失させると B 系列の細胞に運命転換するという内容であった。

最終年度である 29 年度には、計画していた

snai1 と snai2 のコンディショナルダブルノックアウトマウスが作製できた。しかし、結果は残念ながら T 細胞分化に関しては表現型がみられなかった。一方、29 年度には T 前駆細胞でポリコムを欠失させると最終的にはミエロイド系細胞に運命転換するという、次につながる成果も得られた。

期間全体として、上記の snai1snai2KO マウスのように期待通りの結果が得られなかった課題もあるが、計画通りの成果 (Stem Cell Reports, 2015 ; Gene Dev, 2016) も上がっており、さらに最終年度には次につながる知見も得られたことから、研究の総体としては、順調に成果があがったと考えている。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

Tomokatsu I, Masuda K, Huijskens MJ, Satoh R, Kakugawa K, Agata Y, Miyai T, Germeraad WT, Katsura Y, Kawamoto H. Induced Developmental Arrest of Early Hematopoietic Progenitors Leads to the Generation of Leukocyte Stem Cells. Stem Cell Reports. 査読有、5 巻、2015、716-27

Maeda T, Nagano S, Ichise H, Kataoka K, Yamada D, Ogawa S, Koseki H, Kitawaki T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Masuda K, Kawamoto H. Regeneration of CD8<sup>+</sup> T cells from T cell-derived iPSC imparts potent tumor antigen-specific cytotoxicity. Cancer Research. 査読有、76(23):6839-6850. 2016.

Ikawa T, Masuda K, Endo TA, Endo M, Isono K, Koseki Y, Nakagawa R, Kometani K, Takano J, Agata Y, Katsura Y, Kurosaki T, Vidal M, Koseki H, Kawamoto H. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of B lineage program. Genes & Development. 査読有、30(22):2475-2485. 2016.

Sato Y, Mii A, Hamazaki Y, Fujita H, Nakata H, Masuda K, Nishiyama S, Shibuya S, Haga H, Ogawa O, Shimizu A, Narumiya S, Kaisho T, Arita M, Yanagisawa M, Miyasaka M, Sharma K, Minato N, Kawamoto H, Yanagita M. Heterogeneous fibroblasts underlie age-dependent tertiary lymphoid tissues

in the kidney. 査読有、JCI insight. 1(11): e87680. 2016.

Masuda J, Kawamoto H, Strober W, Takayama E, Mizutani A, Murakami H, Ikawa T, Kitani A, Maeno N, Shigehiro T, Satoh A, Seno A, Arun V, Kasai T, Fuss IJ, Katsura Y, Seno M. Transient Tcf3 Gene Repression by TALE-Transcription Factor Targeting. Appl Biochem Biotechnol. 査読有、pp1-15. 2016.

Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, Maeda T, Nagata Y, Kitanaka A, Mizuno S, Tanaka H, Chiba K, Ito S, Watatani Y, Kakiuchi N, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Sanada M, Itonaga H, Imaizumi Y, Totoki Y, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Masuda K, Minato N, Kashiwase K, Izutsu K, Takaori-Kondo A, Miyazaki Y, Takahashi S, Shibata T, Kawamoto H, Akatsuka Y, Shimoda K, Takeuchi K, Seya T, Miyano S, Ogawa S. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. Nature. 査読有、534:402-406. 2016.

Satoh R, Kakugawa K, Yasuda T, Yoshida H, Sibilia M, Katsura Y, Levi B, Abramson J, Koseki Y, Koseki H, van Ewijk W, Hollander GA, Kawamoto H. Requirement of Stat3 Signaling in the Postnatal Development of Thymic Medullary Epithelial Cells. PLoS Genet. 査読有、20;12(1):e1005776. 2016.

Ichise H, Nagano S, Maeda T, Miyazaki M, Miyazaki Y, Kojima H, Yawata N, Yawata M, Tanaka H, Saji H, Masuda K, and Kawamoto H. NK cell alloreactivity against KIR ligand-mismatched HLA-haploidentical tissue derived from HLA haplotype-homozygous iPS cells. Stem Cell Reports. 査読有、9:853-867.2017

Seki M, Kimura S, Isobe T, Yoshida K, Ueno H, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Lin L, Kon A, Suzuki H, Shiozawa Y, Kataoka K, Fujii Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Shimamura T, Masuda K, Kawamoto H, Ohki K, Kato M, Arakawa Y, Koh K, Hanada R, Moritake H, Akiyama M, Kobayashi R, Deguchi T, Hashii Y, Imamura T, Sato A, Kiyokawa N, Oka A, Hayashi Y, Takagi M, Manabe A, Ohara A, Horibe K, Sanada M, Iwama A, Mano H, Miyano S, Ogawa S, Takita J. 査読有、Nat Genet.49:1274-1281.2017.

Noguchi S, (Kawamoto H); 78th of 178

authors) FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples. Sci Data. 査読有、4:170112.2017.

Miyazaki M, Miyazaki K, Chen K, Jin Y, Turner J, Moore AJ, Saito R, Yoshida K, Ogawa S, Rodewald HR, Lin YC, Kawamoto H, Murre C. The E-Id Protein Axis Specifies Adaptive Lymphoid Cell Identity and Suppresses Thymic Innate Lymphoid Cell Development. 査読有、Immunity.46:818-834.2017.

Tenno M, Kojo S, Lawir DF, Hess I, Shioguchi K, Ebihara T, Endo TA, Muroi S, Satoh R, Kawamoto H, Boehm T, Taniuchi I. Cbf 2 controls differentiation of and confers homing capacity to prethymic progenitors. J Exp Med. 査読有、215:595-610. 2018.

[学会発表](計7件)

河本宏、T細胞の発生と再生、Advanced Seminar Series on Microbiology and Immunology(招待講演)微生物病研究所、大阪大学、2015

河本宏、新しい血液細胞分化モデルに基づいた混合型白血病の起源に関する考察と再生T細胞による白血病の免疫療法の開発研究、小児白血病研究会、大阪大学、2015

河本宏、T細胞の発生と再生、第104回近畿血液学地方会(招待講演)京都、2015

河本宏、T細胞の発生と再生-T細胞分化過程の解明と再生T細胞を用いた免疫細胞療法の開発、第1回紀州血液/腫瘍/免疫研究会(招待講演)和歌山、2016

河本宏、Epigenetic maintenance of T cell identity by Polycomb-mediated suppression of B cell lineage program、Swiss-Kyoto Joint Symposium(招待講演)(国際学会)京都、2016

河本宏、Generation and Regeneration of T cells、The Molecular Developmental Biology of Lymphocytes, Symposium in honor of Ellen Rothenberg(招待講演)(国際学会)CALTEC、2017

河本宏、造血前駆細胞からT前駆細胞に至る系列決定過程とT前駆細胞の維持機構、ConBio2017 (Consortium of Biological Sciences 2017) 2017年度生命科学系学会合同年次大会(招待講演)神戸、2017

河本宏、T細胞の発生と再生-T細胞分化過程の解明と再生T細胞を用いた免疫細胞療法の開発、第三回日本骨免疫学会ウインターセミナー、軽井沢、2018

〔図書〕(計1件)

熊ノ郷淳編集、河本宏(免疫学の歴史の  
項目を担当)羊土社、免疫ペディア、2017、  
317

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河本 宏 (KAWAMOTO, Hiroshi)  
京都大学ウイルス・再生医科学研究所  
再生免疫学分野 教授  
研究者番号：00343228

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者