

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2017

課題番号：15KK0328

研究課題名（和文）転写因子Bach2による造血幹細胞の分化運命制御（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Regulation of lineage fate in hematopoietic stem cells by Bach2(Fostering Joint International Research)

研究代表者

伊藤 亜里 (Ari, Itoh-Nakadai)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：90749772

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,600,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：病原体を排除する抗体を産生する形質細胞が長期間骨髄で生存し、血清中に抗体を産生する現象は、免疫記憶の柱の一つである。我々は、形質細胞の長期生存機構を解明するため、長期生存形質細胞が存在する骨髄と、短期生存形質細胞で構成される脾臓の形質細胞の遺伝子発現を1細胞RNA-sequencing法で比較し、メタロチオネイン（MT）1とMT2を抽出した。骨髄のMT高発現細胞は、低発現細胞に比べて抗ストレス性の遺伝子発現様式であった。さらに、MTの発現は、形質細胞の長寿命に重要なIL-6の刺激で上昇したことから、骨髄のMT高発現形質細胞は、生体内で生存シグナルを受けた細胞であることが予測された。

研究成果の概要（英文）：Long-living plasma cells in bone marrow are key player of the memory of immunity. To elucidate the mechanism of long-living on plasma cells, we performed gene expression analysis using single cell RNA-sequencing (scRNA-seq). scRNA-seq analysis showed that MT1 and MT2 had high expression in bone marrow. These gene showed high correlation as expression level. We found that Hmx1 (HO-1) and Herped1, which are genes of anti-stress factors, highly expressing in MTs expressing cells in bone marrow. IL-6 stimulation increased MT1 and MT2 gene expression in spleen plasma cells. These result suggested that MT expressing cells have received survival factor stimulation in bone marrow.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶 獲得免疫 抗体産生 形質細胞 メタロチオネイン 亜鉛

1. 研究開始当初の背景

生体内での免疫恒常性は、適切な免疫細胞数の供給・存在によって保たれており、造血幹細胞からの血球系列分化制御の機構の解明は、自己免疫疾患やアレルギー疾患の発症の理解に繋がる可能性がある。基課題では、リンパ球前駆細胞で単球・顆粒球などのミエロイド遺伝子を抑制し、リンパ球分化を促進する Bach2 が、細菌感染状態でミエロイド分化促進転写因子である C/EBPβ と拮抗することで血球系列分化を調節していることを明らかにした。

一度感染症にかかれば、二度と同じ感染症に罹患することが無い、終生免疫を司る仕組みとして我々は「免疫記憶」という優れた能力を有している。幹細胞からの免疫細胞の数の調節の異常は自己免疫疾患やアレルギー疾患の一因であると考えられるが、「免疫記憶」機構の柱の一つは、骨髄で長期に維持される形質細胞であるといわれている。しかし、その一方で、アレルギー疾患や自己免疫疾患では無害な花粉や自己組織に対する不都合な免疫が維持され、それを消し去ることは出来ない。免疫記憶を調節できれば様々な難病の治療に繋がるが、免疫記憶維持の仕組みには不明な点が多く、これを自在に調節する方法も開発されていない。そこで、本研究では、免疫記憶機構の理解のため、骨髄の長寿命形質細胞の維持機構を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

骨髄に存在する長寿命形質細胞と短寿命である脾臓の形質細胞の遺伝子発現を比較し、長寿命に必要な因子を特定する。この結果をもとに、骨髄形質細胞で長寿命を獲得した亜集団を特定し、長寿命形質細胞同定マーカーを探索する。

3. 研究の方法

1 細胞 RNA-Sequencing (scRNA-Seq)

骨髄および脾臓から B220⁺CD138⁺形質細胞をフローサイトメーターで、1.2 μl のプライマー液を分注した 96 穴プレートに 1 細胞ずつソートした。その後、CEL-Seq2 法を用いて 1 細胞 RNA-sequencing (scRNA-seq) を行った。具体的には、細胞をソートした後、96 穴プレートでそのまま逆転写を行い、次に 2 重鎖 DNA を作製した。それを鋳型として、*In vitro* transcription を 13 時間行い、RNA を増幅した。増幅した RNA をもう一度 cDNA に逆転写し、PCR 増幅で次世代シーケンサー用のライブラリを作製した。ごく少量の液への 1 細胞分取の方法は、渡航先の Scripps 研究所 Michael McHeyzer-Williams 博士より教授された。

形質細胞のアイソタイプ解析

形質細胞の抗体のアイソタイプを検出するため、フローサイトメトリー法を用いて細

胞膜上の B 細胞受容体を検出した。さらに各マウスアイソタイプ抗体キャプチャー抗体をコートした膜上に形質細胞を撒き、形質細胞が分泌した抗体をキャプチャーして抗体産生細胞の数を検出する Enzyme-linked immunosorbent spot formation (ELISpot)法を用いて抗体産生細胞数の検出を行った。

4. 研究成果

1) 形質細胞アイソタイプ構成の解析

B 細胞は、脾臓などの 2 次リンパ組織で、分化刺激の種類に応じて異なるアイソタイプ抗体を産生する形質細胞に分化する。使用した C57BL/6 マウスの抗体のアイソタイプは、IgM および IgD 型、IgA 型、IgG1 型、IgG2b 型、IgG2c 型、IgE 型である。B 細胞のアイソタイプスイッチは、異なるサイトカイン刺激を受けて実行される。したがって、アイソタイプの違いにより細胞の遺伝子発現が異なる可能性が考えられた。そこで、骨髄と脾臓の形質細胞のアイソタイプの構成の違いをフローサイトメーター (図 1: 左) および ELISpot (図 1: 右) で解析した。その結果、意外なことに、腸や気管などの粘膜免疫で重要な IgA 型の形質細胞が骨髄と脾臓で半数以上を占めていた。アイソタイプスイッチが起きていない IgM (および IgD) 型の形質細胞は、脾臓で割合が高く、IgG 型の形質細胞の割合

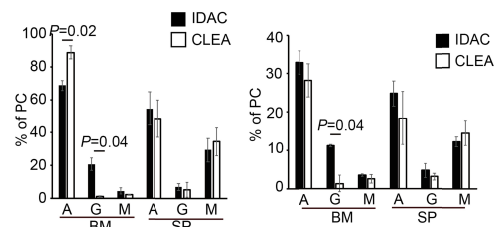
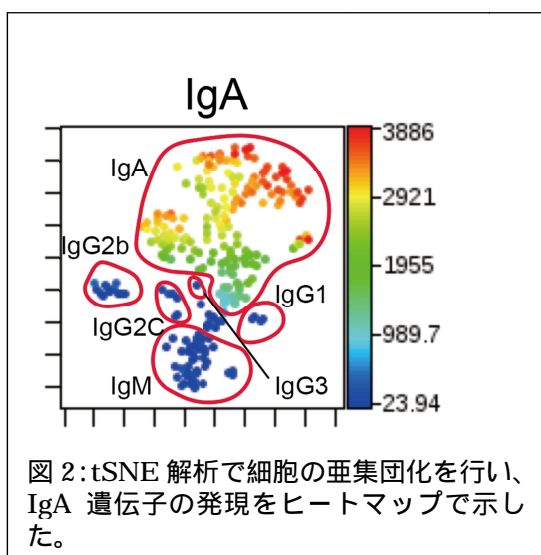


図 1 : 骨髄 (BM) および脾臓 (SP) の形質細胞 (PC) 中の IgA (A), IgG (G), IgM (M) の割合。(左) フローサイトメトリー法。(右) ELISpot 法。IDAC (東北大学加齢医学研究所自飼育)。CLEA (ブリーダー購入マウス)。

は脾臓で最も少なかった。形質細胞の分化は飼育環境に大きく作用される。今回観察された形質細胞のアイソタイプの割合が、他施設で飼育されたマウスでも同じであるかどうかを明らかにするため、ブリーダー (CLEA) から購入したマウスを同様に解析した (図 : 1)。その結果、骨髄および脾臓において IgA 型の形質細胞の割合が最も多いこと、IgM 型は、脾臓で多く骨髄で少ないという傾向は 2 施設のマウスで同じであった。骨髄の IgG の割合は、自飼育のマウスに比べてブリーダーマウスで非常に低かった。これらの結果から、骨髄と脾臓の形質細胞のアイソタイプ構成は異なっていることが明らかとなった。

2) scRNA-seq による骨髄形質細胞で発現が高い因子の探索

形質細胞はその遺伝子発現の 8 割程度が抗体遺伝子であり、それ以外の遺伝子の発現は検出が困難であることが予想された。そこで、McHeyzer-Williams 博士らと相談し、形質細胞の scRNA-seq には、2016 年に Hashimshony らによって報告された CEL-Seq2 法を採用した。この方法では、一般に使われる Smarter を使用した方法よりも 2 倍程度遺伝子同定数が増加していることが報告されていた。骨髄の形質細胞 122 個、脾臓の形質細胞 118 個を解析した結果、467 遺伝子が骨髄で、22 遺伝子が脾臓で有意に発現が高かった。これらの遺伝子について Gene Ontology 解析を行った結果、骨髄ではタンパク質代謝とリボソーム形成に関する遺伝子が有意に濃縮していた。



一方、脾臓では MHC Class I 遺伝子の発現が有意に高かった。形質細胞は、抗体産生の際に大量の unfold protein (UFP) が小胞体に蓄積し、ストレスとなる。Gene Ontology 解析の結果は、骨髄環境では、形質細胞の小胞体ストレス除去能力が増強する可能性を示唆していた。

次に、遺伝子発現様式に基づいて、細胞の亜集団を分類するために、高次元のデータを低次元に圧縮する tSNE 解析を行った。その結果、形質細胞はアイソタイプごとに集団が別れた (図 2)。骨髄と脾臓のアイソタイプの割合は先にフローサイトメトリーや ELISpot で解析した結果とほぼ同等であり、半数以上が IgA 型の形質細胞で、IgM 型の形質細胞は脾臓にしか存在しなかった。

骨髄で発現が高い遺伝子を抽出したところ、そのいくつかはアイソタイプで発現に差があることによって骨髄で高い結果になっていることがわかった。

その中で我々は、亜鉛シャペロンである metallothionein1 (MT1) と MT2 はアイソタイプに関係なく、骨髄で発現が高いことを見出した。さらに、両者の骨髄形質細胞での遺伝子

発現の相関は非常に高かった (図 3)。骨髄の MT 高発現細胞と低発現細胞の遺伝子発現を scRNA-seq データで比較すると、高発現形質細胞では、低発現に比して酸化ストレスを低減する HO-1 や ER ストレスを低減する Herp1、鉄を貯蔵する Ferritin などの遺伝子発現が上昇していた。

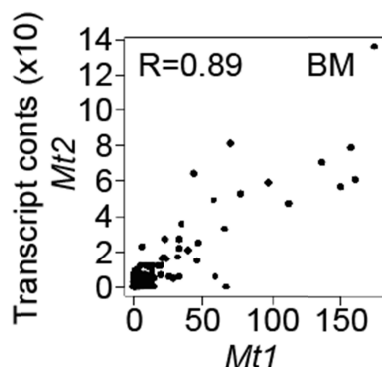


図 3 : MT1 と MT2 遺伝子の骨髄 (BM) での遺伝子発現の相関図。(R)=相関係数

MT 自体も、金属と結合し抗酸化作用をもつタンパク質である。したがって、形質細胞は骨髄環境ストレス耐性型の遺伝子発現に変化し、長寿命を獲得している可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 6 件)

- 1) Miura, Y., Morooka, M., Sax, N., Roychoudhuri, R., Itoh-Nakadai, A., Brydun, A., Funayama, R., Nakayama, K., Satomi, S., Matsumoto, M., et al. (2018). Bach2 Promotes B Cell Receptor-Induced Proliferation of B Lymphocytes and Represses Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J Immunol* 200, 2882-2893. (査読有り)
- 2) Kayaba, A., Itoh-Nakadai, A., Niibe, K., Shirota, M., Funayama, R., Sugahara-Tobinai, A., Wong, Y.L., Inui, M., Nakayama, K., and Takai, T. (2018). Bone Marrow PDGFR⁺Sca-1⁺ Enriched Mesenchymal Stem Cells Support Survival of and Antibody Production by Plasma Cells in vitro through IL-6. *Int Immunol*. (査読有り)

- 3) Sato, Y., Katoh, Y., Matsumoto, M., Sato, M., Ebina, M., Itoh-Nakadai, A., Funayama, R., Nakayama, K., Unno, M., and Igarashi, K. (2017). Regulatory signatures of liver regeneration distilled by integrative analysis of mRNA, histone methylation, and proteomics. *J Biol Chem* 292, 8019-8037. (査読有り)
- 4) Sato, Y., Kato, H., Ebina-Shibuya, R., Itoh-Nakadai, A., Okuyama, R., and Igarashi, K. (2017). Bach2 Controls Homeostasis of Eosinophils by Restricting the Type-2 Helper Function of T Cells. *Tohoku J Exp Med* 241, 175-182. (査読有り)
- 5) Kobayashi, M., Kato, H., Hada, H., Itoh-Nakadai, A., Fujiwara, T., Muto, A., Inoguchi, Y., Ichiyangi, K., Hojo, W., Tomosugi, N., et al. (2017). Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. *Haematologica* 102, 454-465. (査読有り)
- 6) Itoh-Nakadai, A., Matsumoto, M., Kato, H., Sasaki, J., Uehara, Y., Sato, Y., Ebina-Shibuya, R., Morooka, M., Funayama, R., Nakayama, K., et al. (2017). A Bach2-Cebp Gene Regulatory Network for the Commitment of Multipotent Hematopoietic Progenitors. *Cell Rep* 18, 2401-2414. (査読有り)

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) Itoh-Nakadai A, Kayaba A and Takai T, Secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells, 第 46 回日本免疫学会学術集会、仙台、2017 年 12 月 12 日-14 日
- 2) Itoh-Nakadai A, Kayaba A and Takai T, Secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells, 5th Annual meeting of the international cytokine & interferon

society, Kanazawa, Japan, Oct 29- Nov 2, 2017

- 3) Itoh-Nakadai A and Takai T, Secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells, Keystone symposia, Whistler, British Columbia, Canada, April 23-27, 2017
- 4) 伊藤亜里、萱場敦子、高井俊行 長寿命形質細胞の免疫記憶維持の解明、第 3 回日本骨免疫学会、沖縄、2017 年 6 月 27 日-29 日
- 5) Itoh-Nakadai A and Takai T, Secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI) is highly expressed in long-lived plasma cells, The Inaugural Chiba University - UC San Diego Symposium on Mucosal Immunology, Allergy and Vaccines: Impact on Mucosal Diseases and Global Health, San Diego, CA, USA, Feb 21-22, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
 出願年月日：
 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
 伊藤 亜里 (Itoh-Nakadai, Ari)
 東北大学・加齢医学研究所・助教
 研究者番号：90749772

(2)研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

スクリプス研究所

Immunology and Microbiology

Michael McHeyzer-Williams 教授

〔その他の研究協力者〕

()