

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05205

研究課題名(和文) T細胞の活性化におけるE-Id転写因子による転写調節と細胞内メタボリズムの制御

研究課題名(英文) The transcriptional regulation by E-Id protein axis upon T cell activation and its cellular metabolism

研究代表者

宮崎 正輝 (Miyazaki, Masaki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：80403632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：E-Id転写因子群による転写制御バランスが、T細胞の分化・活性化をどのように制御するかについて研究を進めた。この3年間で、E蛋白質であるE2A/HEBが協調的に働きT細胞系列への運命決定に必須であることを突き止めた。さらに、遺伝子改変マウスの解析から、E2A/HEBがT細胞系列への分化を誘導するだけでなく、自然免疫型のリンパ球(自然リンパ球)の胸腺内での異所性の分化を抑制していることを見出した。この結果から、E2A/HEBとId2因子による転写活性のバランスがT細胞への系列と自然リンパ球への系列の分化の分岐点を制御し、獲得免疫リンパ球のプログラムを発動していることを提唱し、論文として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題から、細胞分化の分岐点において、転写因子群は非常に洗練された調節システムを持っており、そのバランスによって、様々な機能を持った細胞群へと分岐し、その機能を発揮する。このような細胞分化の多様性により、生物個体としての全体の機能を発揮することができる。今回は、獲得免疫と自然免疫を担当する、T細胞と自然リンパ球の分化の分岐点を解明し、生物の緻密な分化の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have worked on the study how the balance of E-protein and Id-protein regulates T cell development and activation for this three years. During this process, we discovered that E2A and HEB, members of E-protein, is essential for the T cell lineage commitment in the thymus. Simultaneously, E2A and HEB suppresses the Innate lymphoid cell (ILC) lineage in the thymus, such as ILC2 and LTi-like cells. Given that the similarity of T cell and ILCs was demonstrated, This mechanisms of how developmental bifurcation of T cell and ILCs are regulated is very important findings for the understanding of cell differentiation in biology.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞 分化・活性化 転写因子 E2A, Id2, Id3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の分化・活性化において、細胞の運命決定に必要なプログラムの発動は、転写因子ネットワークによって制御されている。bHLH 型転写因子 E2A とその拮抗因子である Id 因子 (Id1-4) は、リンパ球の分化・活性化制御に必須であり、エンハンサーの機能調節を行う。Id2/Id3 因子の欠損により、T 細胞の活性化プログラムが発動し、自然免疫型濾胞性ヘルパーT (innate T<sub>FH</sub>) 細胞へと自然に分化してしまう。この活性化には、E2A の転写活性がオーバーになることで、AKT-mTOR-FoxO1 経路が活性化してしまうことを、2015 年に報告した (Miyazaki et al, Genes and Development, 2015)。そこで、E2A-Id 因子による転写制御のバランスが T 細胞の分化・活性化をどのように調節しているのかを解明し、T 細胞の分化・活性化のプログラムの本態に迫ること考えた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、”E-Id 因子による転写制御が、どのように T 細胞の分化・活性化プログラムを調節しているのかを?”を明らかにし、『細胞分化プログラムとは何か?』という基礎的な疑問に迫ることを目的としたものであった。

2011 年の申請者の報告において、T 前駆細胞を用いて E2A の ChIP-seq 解析を行い、全ゲノムにおける E2A の結合部位を同定した。驚いたことに、CD3e, Rag1/2, TCRb のエンハンサー (E)、などに E2A の結合が見えたことから、E2A による T 細胞分化プログラムの調節が T 細胞系決定に重要であると考えられた。しかしながら、E2AKO マウスでも T 細胞の分化は明確な欠損を認めないことから、何らかの代替機構が働いていると推測された。そこで、E2A による T 細胞分化プログラムの制御機構を明らかにするため、この分子機構の解明に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### 1) 他の E-protein の関与

bHLH 型転写因子である E-protein は、E2A (E12 と E47)、HEB, E2-2 から成る。E2-2 は、plasmacytoid DC (pDC) に必須の転写因子であり、HEB は、E2A と異なり B 細胞では発現は低いが、T 細胞の初期分化段階で発現が高く、また NKT 細胞分化に必要であることが報告されている。このことから、E2A と HEB による協調作用の可能性を考え、E2A/HEB ダブルノックアウトマウス (dKO マウス) を作成した。HEB ゲノムノックアウトマウスは、胎生致死を示すことから、flox を用いたコンディショナルノックアウト (E2A<sup>f/f</sup>/HEB<sup>f/f</sup>) を作成した。

### 2) E2A によるエンハンサー調節機構の解明

2011 年の申請者の報告より、E2A はエンハンサー部位に結合すること明確になったことから、そのエンハンサー制御機能を解明する目的で、ATAC-seq (Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing) を行う。これにより、プロモーター領域、エンハンサー領域でのクロマチンのアクセシビリティをゲノムワイドに評価することが可能となる。

## 4. 研究成果

### 1) E2A/HEB dKO マウスの解析

E2A/HEB 欠損による T 細胞分化を評価するため、E2A<sup>f/f</sup>/HEB<sup>f/f</sup>/ER-Cre マウスを作成し、Tamoxifen 投与を行なった。驚いたことに、E2A/HEB の欠損により、胸腺の消失を

認めた。どの分化段階の影響かを明確にするため、competitive Bone Marrow Transplantation を行い、competitor 細胞 (CD45.1+) との競合による分化段階の評価を行った。結果、E2A 欠損による B 細胞分化障害に加え、E2A/HEB 欠損により T 細胞の分化が顕著に障害された。興味深いことに、最も初期の T 前駆細胞 (ETPs) は保持される一方、T 細胞系列へと分化した細胞 (DN2) 細胞では、E2A/HEB 欠損細胞が消失していた。このことは、E2A/HEB の協調作用が B 細胞だけでなく T 細胞においても必須の役割を担うことを意味する (図 1)。

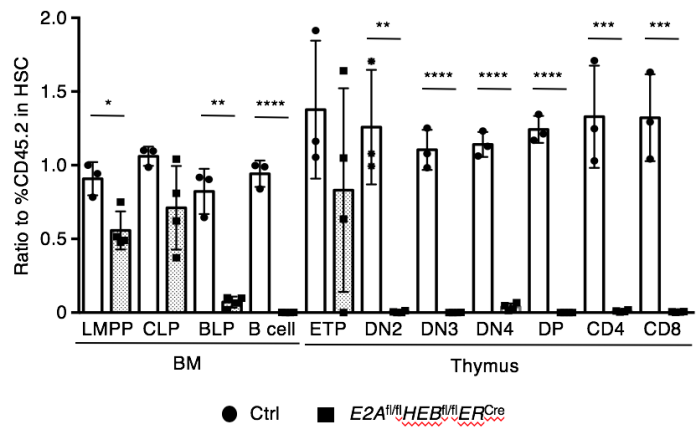


図 1 competitive BMTによるT細胞分化の評価

次にこの結果を確認するため、E2A<sup>fl/fl</sup>/HEB<sup>fl/fl</sup>/IL7R<sup>Cre</sup> マウスを作成し、リンパ球前駆細胞の段階から E2A/HEB を欠損させることを試みた。BMT の結果と一致して、E2A<sup>fl/fl</sup>/HEB<sup>fl/fl</sup>/IL7R<sup>Cre</sup> マウスにおいても、DP 細胞の欠失と、DN1-2 細胞の移行段階での分化障害を確認し、T 細胞の初期分化段階での著しい分化障害を認めた (図 2)。加えて、abT 細胞だけでなく、g dT 細胞においても顕著な障害を認めたことから、T 細胞系列全体への初期分化の障害が確認され、系列決定段階での E2A/HEB の協調作用の必要性が改めて示された。

次に E2A/HEB 欠損により T 細胞系列の欠失を認めたが、果たして何の細胞になったのかを検証するため、他のリンパ球系の細胞、そしてミエロイド系の細胞などへの系列転換などを、fate mapping system を用いて検証した。結果、驚いたことに E2A/HEB の欠失により、自然リンパ球 (ILC) が胸腺内で異所性に分化していることを突き止めた。このこ

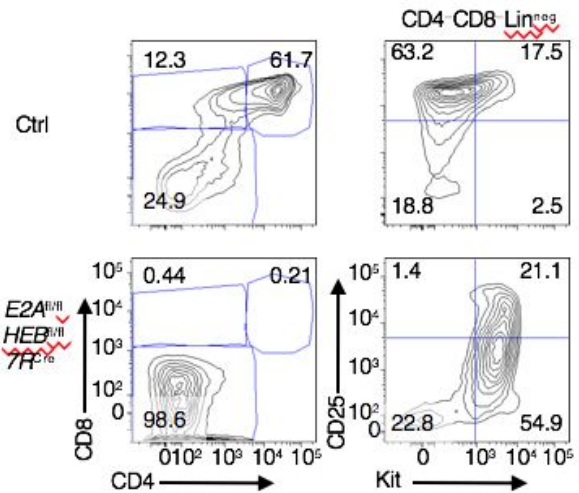


図 2 胎児胸腺におけるT細胞分化障害

とは、E2A/HEB は T 細胞の系列決定に必須の機能を果たすだけでなく、同時に自然リンパ球への異所性の分化を抑制していることを意味する、重大な発見であった。

次にその分子機構の解明のため、E2A/HEB 欠損 T 前駆細胞を用いて ATAC-seq 解析を行った。エンハンサーパターンの比較解析のため、血液幹細胞・前駆細胞を含めた全血球系の細胞の ATAC-seq の結果と統合して、どのような細胞と類似のエンハンサーパターンを示すのかを検証した。結果、プロモーター領域のみを解析した結果は、E2A/HEB 欠損 T 前駆細胞 (ETP) は共通リンパ球前駆細胞 (CLP) に類似しており、野生型 T 前駆細胞 (ETP) と同じであった。一方、エンハンサー領域のみで比較すると、野生型 ETP はやはり CLP と類似であったが、E2A/HEB 欠損 ETP は、未熟な 2 型自然リンパ球 (ILC2 precursor) に最も類似しており、これまでの解析と一致した結果を示した (図 3)。

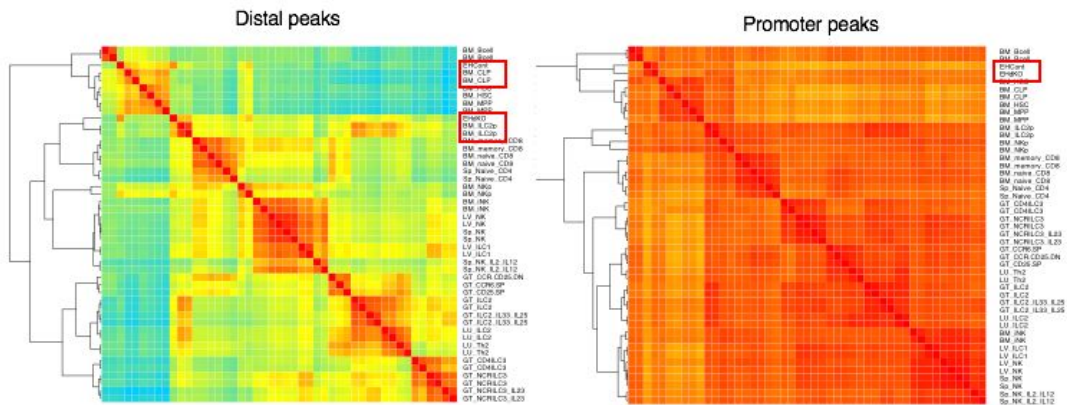


図3 ATAC-seq解析によるプロモーター／エンハンサー領域の解析

これまでの報告から、Id2 は自然リンパ球分化に必須であることが報告されてきたが、Id2 が一体どういった分子を制御しているのかは、全く不明であった。今回の結果から、E2A/HEB の欠損が自然リンパ球の分化を異常に促進したことから、Id2 と E2A/HEB の関係性を検証するため、Id2/E2A/HEB トリプルノックアウトマウスを作成した (Id2<sup>fl/fl</sup>E2A<sup>fl/fl</sup>HEB<sup>fl/fl</sup>IL7R<sup>Cre</sup>)。結果、Id2 欠損を起こしても、この異所性の自然リンパ球の分化には全く影響がなかった。このことは、Id2 は E-protein の転写活性を抑制することで自然リンパ球の分化を誘導しているのであって、E-protein の活性の低下が自然リンパ球分化の本態であることを示している。

本研究の結果をまとめると、獲得免疫リンパ球である T, B 細胞の分化は、E2A によるエンハンサー活性機能を必要とし (T 細胞の場合は、HEB の協調作用も必要) 一方、自然リンパ球系列への分化は、E-protein の活性化の低下 (Id2 はその活性抑制を維持しているに過ぎない) により誘導されることが明らかとなり、獲得免疫リンパ球と自然免疫リンパ球の分化の分岐点の転写制御機構を、世界で初めて提唱することができた (図 4)。以上のことは、Immunity 誌に 2017 年に報告するに至った。

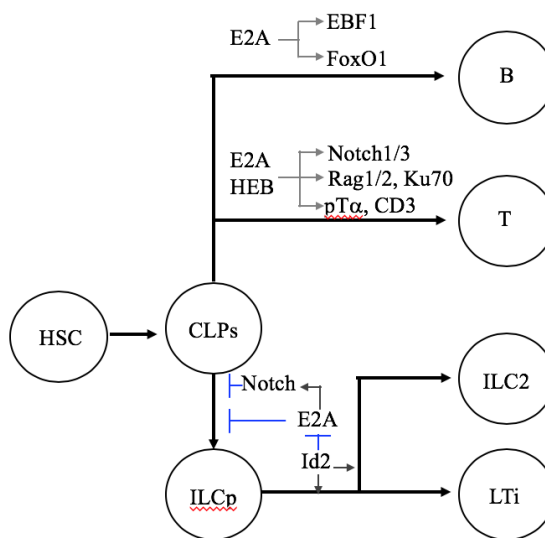


図4 E2Aによる T,B細胞と自然リンパ球の分化分岐点のモデル

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Chen S, Miyazaki M, Chandra V, Fisch KM, Chang AN, Murre C. Mol Cell Biol. 2016, 36(20): 2543-52

Hiroshi Ichise, Seiji Nagano, Takuya Maeda, Masaki Miyazaki, Yuki Miyazaki, Hiroto Kojima, Nobuyo Yawata, Makoto Yawata, Hidenori Tanaka, Hiroh Saji, Kyoko Masuda, Hiroshi Kawamoto. NK cell alloreactivity against KIR ligand-mismatched

HLA-haploidentical tissue derived from HLA haplotype-homozygous iPS cells. Stem Cell Reports, Sep 12;9(3):853-867, 2017. Doi: 0.1016/j.stemcr.2017.07.020. Epub 2017 Aug 31. Masaki Miyazaki\*, Kazuko Miyazaki, Kenian Chen, Yi Jin, Jacob Turner, Amanda J. Moore, Rintaro Saito, Kenichi Yoshida, Seishi Ogawa, Hans-Reimer Rodewald, Yin C Lin, Hiroshi Kawamoto and Cornelis Murre\*. The E-Id Protein Axis Specifies the Innate and AdaptLymphoid Branches of the Immune System. Immunity, 46: 818-834, May 16, 2017. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.022. (\*corresponding author)

〔学会発表〕(計7件)  
(シンポジウム・招待講演)

Masaki Miyazaki, Baylor 免疫リサーチ研究所(ダラス、テキサス州、アメリカ)、Transcriptional regulation by the E-Id protein axis control T cell development and activation. 2016/4/25

Masaki Miyazaki, The E-Id Protein Axis Orchestrate Adaptive and Innate Lymphoid Cell fate. 第46回日本免疫学会学術集会シンポジウム, 2017

Masaki Miyazaki, エール大学(ニューヘブン、コネティカット州、アメリカ)、The E-Id protein axis specifies the adaptive versus innate lymphoid cell fate. 2018/8/24

(学会発表)

Masaki Miyazaki, Kazuko Miyazaki, Yin C Lin, Hans-Reimer Rodewald, Hiroshi Kawamoto, Cornelis Murre, The E-Id protein axis orchestrates the specifies innate versus adaptive lymphoid cell fate. 第45回日本免疫学会学術集会、2016

Masaki Miyazaki, Kazuko Miyazaki, Hiroshi Kawamoto, Cornelis Murre. The E-Id protein axis orchestrates the specifies Innate versus Adaptive lymphoid cell fate. FASEB Conference, Molecular Mechanisms of Immune Cell Development and Function, 2017

Masaki Miyazaki, Kazuko Miyazaki, Hiroshi Kawamoto, Cornelis Murre. E-protein activity determine the lineage choice of adaptive versus innate lymphoid cell fate. 7th International Symposium of Kyoto T Cell Conference, 2017

Masaki Miyazaki, Kazuko Miyazaki, Hiroshi Kawamoto. The Indispensable Synergic Role of E2A and Notch signaling upon the T cell lineage commitment. 第47回日本免疫学会学術集会シンポジウム, 2018

〔図書〕(計1件)

医学のあゆみ 特集号 坂口志文、堀昌平編 Vol.268 No.13, 2019

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮崎和子

ローマ字氏名：Kazuko Miyazaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。