

令和元年6月11日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09870

研究課題名(和文) T細胞系列とB細胞系列間の排他的頑健性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of the robustness between T and B cell lineage

研究代表者

増田 喬子 (Masuda, Kyoko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：40565777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血液細胞における系列頑健性についてポリコム遺伝子に注目して解析を行った。T前駆細胞においてポリコム遺伝子を欠失させるとB細胞に分化転換することを示した。さらに、血液細胞全体でポリコム遺伝子を欠失させた上で各系列の前駆細胞をサイトカインカクテル存在下で培養すると、赤血球、巨核球、B細胞、T細胞系列の前駆細胞がミエロイド細胞に分化転換した。これらの結果から、全ての血球細胞は系列決定後もミエロイド細胞への潜在的な分化能を有しており、その分化能はポリコム遺伝子によって抑制されていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の運命決定に転写因子が深く関与することはすでに知られていたが、本研究により、転写因子だけではなくエピジェネティック制御によっても系列決定状態が規定されていることが示された。また全ての血球細胞は、系列が決定されたあとも潜在的にミエロイド細胞への分化能を有していることも示された。これらの結果は、血液細胞が進化の過程において、どのようなプロセスを経て各系列の細胞種を創出してきたか、各系列間での関係性はどのようなものであるかを考える上で非常に重要な知見であり、本研究が血液学をより深く理解するためにもたらした意義は非常に大きいものである。

研究成果の概要(英文)：It has been known that transcription factors play important roles for the determination of cell fate in the process of hematopoiesis. In this study, we tried to figure out how epigenetic mechanism regulate the lineage maintenance and the robustness. The analysis of mice conditionally deleted for polycomb genes in T cell progenitors revealed that T cell development was arrested at DN stage and those cells were converted to B cell lineage. Further, we examined whether non-T lineage cells also were able to be converted to another lineage. When progenitor cells of various lineage from mice conditionally deleted for polycomb gene in hematopoietic cells were cultured in the presence of cytokine cocktail, erythroid, megakaryocyte, B cell and T cell lineage progenitors were converted to myeloid lineage. These results indicate that progenitors of all hematopoietic lineages retain latent myeloid potential beyond the lineage decision and their myeloid program is suppressed by polycomb genes.

研究分野：免疫学

キーワード：系列決定 系列頑健性 ポリコム遺伝子

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

1. 研究開始当初の背景

血液細胞には、赤血球、血小板、リンパ球や顆粒球を総称した白血球など多様な細胞腫が含まれる。各種の細胞は全て造血幹細胞からつくられるが、各系列への分化の途上において、多能前駆細胞を経て単能性の前駆細胞へと分化能が少しずつ限定されていく。この細胞運命が限定されることを系列決定と呼ぶ。

申請者らは、造血幹細胞から T 前駆細胞へ向けてどのような順序で系列決定されていく過程を明らかにしてきた。これまでの研究により、骨髄から胸腺に移行する細胞は多能前駆細胞ではなく T 系列へ分化する方向へバイアスのかかった前駆細胞であることを示した (JI 2005、EMBO J 2005)。また、造血幹細胞から T 前駆細胞ができるまでには、まず B 細胞への分化能が失われ、次にミエロイド系の分化能が失われること (Nature 2008) T 細胞への完全な系列決定は DN2 段階で起こることを報告してきた (JI 2007) (図 1)。さらに、この段階での系列決定には転写因子である Bcl11b が深く関与していることも明らかにしてきた (Science 2010)。

系列決定が起こるメカニズムとして、一般的には特定の運命を決定づける転写因子が活性化または抑制する遺伝子に働きかけ、続いてエピジェネティック制御によってその状態を維持すると考えられている。しかし、血球の系列決定においてエピジェネティック制御が担う役割について詳細な解析はなされていなかった。

2. 研究の目的

本申請研究では、遺伝子の発現状態を負に制御する役割をもつポリコーム遺伝子群に着目し、T 細胞への系列決定過程におけるエピジェネティック制御の役割を解明することを目的とした。予備実験において、T 系列への「決定」後であっても、ポリコーム遺伝子が不活性化されることにより、B 細胞系列への運命転換が起こるというデータが得られていた。また T 系列から B 系列へ運命転換する途上で、T 細胞系列と B 細胞系列という、本来共存しえない表現系が同一細胞上で共存するという極めて貴重な状態が観察された (T/B 系列共存細胞)。生理的条件下においては、特定の系列へと向かう決定が起こった後に、他系列への分化を抑制する排他性や系列決定状態の安定性がみられるが、これらの分子メカニズムはまだ解明されていない。そこで、ポリコーム遺伝子の不活性化によって生じた T/B 系列共存細胞を用い、さらなる人為的な介入を加えることで、系列の頑健性や安定性について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

系列安定細胞と 2 系列共存細胞の比較による系列頑健性に関わる分子の同定

Cdkn2a 欠損かつ、T 細胞系列でポリコーム遺伝子を欠損するマウス (Cdkn2a^{-/-};Lck-cre;Ring1A^{-/-};Ring1B^{fl/fl} マウス) の胸腺を解析したところ、DN3 段階の細胞が T/B 系列共存細胞に転換するという予備実験データが得られていたため、これらの細胞を詳細に解析することで、系列の頑健性に関与する転写因子の発現プロファイルやエピゲノム状態を解析する。特に T/B 系列共存細胞では T 系列と B 系列それぞれに関わる転写因子がどのようなバランスで発現強度が保たれているかを RNA-Sequence によって解析する。また各転写因子が実際に DNA 上でのどの部位に結合しているかなどを ChIP-sequence によって解析する。さらにヒストン修飾 (H3K4me3、H3K27me3)、DNA メチル化状態などのエピゲノム状態も同時に解析する。

in vitro における系列安定性維持の解明

Cdkn2a 欠損かつ、タモキシフェン存在化でポリコーム遺伝子を欠損するマウス (Cdkn2a^{-/-};ER-cre;Ring1A^{-/-};Ring1B^{fl/fl} マウス) を用いる。in vitro においてこれらのマウスの多能前駆細胞から T 前駆細胞を誘導し、適切な段階でタモキシフェンを添加することでポリ

コーム遺伝子を欠損させる。T/B 系列共存細胞が予備実験である *in vivo* と同様に、*in vitro* においても T/B 系列共存細胞が現れるかどうかを、細胞表面に発現する各系列細胞マーカーをフローサイトメトリー解析することによって検証する。

4 . 研究成果

系列安定細胞と 2 系列共存細胞の比較による系列頑健性に関わる分子の同定

Cdkn2a 欠損かつ T 細胞系列でポリコーム遺伝子を欠損するマウス (Cdkn2a^{-/-}; Lck-cre; Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl} マウス) の胸腺において、DN3 段階の細胞が T/B 系列共存細胞に転換することから、この細胞を用いて転写因子の発現プロファイルやエピゲノム状態の変化の解析を行った。DN3 分画細胞を用いたマイクロアレイ解析を行ったところ、B 細胞系列遺伝子の発現が上昇していたことから、B 細胞系列遺伝子の発現抑制解除が確認された。しかし幹細胞もしくは T 細胞系列遺伝子を含むその他の系列に関わる遺伝子の発現に変化は見られなかった。そこで、T 前駆細胞において、ポリコーム遺伝子複合体と B 細胞系列遺伝子の関与を調べるために、正常な胸腺細胞を用いて ChIP-on-chip 解析を行った。その結果、Pax5 や Ebf1 といった B 細胞系列遺伝子のプロモーター領域に対してポリコーム遺伝子複合体が結合していることや H3K27 がトリメチル化されていることが示された。T 細胞系列遺伝子に対して、ポリコーム遺伝子複合体の結合は見られなかったことから、Ebf1 や pax5 といった B 細胞への系列決定には不可欠の遺伝子は、T 前駆細胞内ではポリコーム遺伝子複合体によって直接的に抑制されていることが示された。さらに胸腺細胞の中で DN3 細胞と DP 細胞をそれぞれ単離し、同様の解析を行ったところ、ポリコーム遺伝子複合体の Pax5 や Ebf1 のプロモーター領域への結合は DN3 段階では見られたものの、DP 細胞ではほとんど見られなかった。これらの結果から、ポリコーム遺伝子による B 細胞系列遺伝子の抑制は DN 段階にのみ見られることであり、DP 段階以降はポリコーム遺伝子以外のメカニズムによることも示された。

in vitro における系列安定性維持の解明

で得られた結果から、ポリコーム遺伝子による系列頑健性維持は T 細胞に特異的に見られる現象なのか、血液細胞の他の系列でも見られる減少なのかを明らかにするために、血液細胞でポリコーム遺伝子を欠損するマウスを作製するマウスを作製し、解析した。Cdkn2a^{-/-}; ERT2-cre; Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl} マウスの骨髓細胞を Rag2 KO マウスに移植し、8 週間後に生着を確認した上でタモキシフェンを投与することで血液細胞でポリコームを欠失させたうえで、骨髓、胸腺、脾臓などを解析した。また骨髓細胞から赤血球、巨核球、B 細胞、T 細胞系列の前駆細胞などの各系列の前駆細胞をミエロイド系列への分化を支持するサイトカインカクテル存在下で培養すると、赤血球、巨核球、B 細胞、T 細胞系列の前駆細胞がミエロイド細胞に分化転換した。これらの結果から、全ての血球細胞は系列決定後もミエロイド細胞への潜在的な分化能を有しており、その分化能はポリコーム遺伝子によって抑制されていることが示された。

5 . 主な発表論文等

Kawamoto H, Masuda K, Nagano S, Maeda T.

Cloning and expansion of antigen-specific T cells using iPS cell technology: development of "off-the-shelf" T cells for the use in allogeneic transfusion settings.

Int J Hematol, 107(3):271, 2018

査読有

© Ichise H, Nagano S, Maeda T, Miyazaki M, Miyazaki Y, Kojima H, Yawata N, Yawata M,

Tanaka H, Saji H, Masuda K, Kawamoto H

NK Cell Alloreactivity against KIR-Ligand-Mismatched HLA-Haploidentical Tissue Derived from HLA Haplotype-Homozygous iPSCs.

Stem Cell Reports, 9(3): 853, 2017

査読有

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.

Recurrent SPI1 (PU.1) fusions in high-risk pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia.

Nat Genetics, 49(8): 1274, 2017

査読有

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 534(7607),: 402 , 2016

査読有

Maeda T, Masuda K, Kawamoto H.

Regeneration of tumor antigen-specific CTLs utilizing iPS technology.

Rinsho Ketsueki, 57(8): 1066, 2016

査読有

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.

JCI Insight, 1(11): e87680, 2016

査読有

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 $\alpha\beta$ T Cells from T-cell-Derived iPSC Imparts Potent Tumor Antigen-Specific Cytotoxicity.

Cancer Res, 76(23): 6839, 2016

査読有

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

Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression

of the B-lineage program.

Gen Dev, 30(22): 2475, 2016

査読有

Chojnowski JL, Trau HA, Masuda K, Manley NR

Temporal and spatial requirements for Hoxa3 in mouse embryonic development

Dv Biol. 415(1): 33, 2016

査読有

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

増田喬子 Q46, Q66, Q68, 実験医学別冊 ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A 正しいデータを出すための 100 箇条

2017、313, 155-156,211-213,216-217

〔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:

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:

国内外の別:

〔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:

ローマ字氏名:

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。