

平成30年6月18日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15506

研究課題名(和文) B細胞分化における1細胞転写ネットワーク解析

研究課題名(英文) Single-cell transcriptional networks during B cell differentiation

研究代表者

伊川 友活 (Ikawa, Tomokatsu)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60450392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞は様々な系列決定過程を経て最終的にB細胞にしかたない前駆細胞となる。この運命制御には転写因子が重要な働きをしているが、詳細は明らかでない。特に、1細胞レベルでの遺伝子発現制御機構は不明である。我々は独自に開発したB細胞分化誘導系を用いて個々の細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、1細胞レベルの遺伝子発現パターンは複数の細胞を用いて得られた結果と類似していた。また、骨髄の前駆細胞を用いた1細胞RNA発現解析結果もこれを支持していた。このことから、モデル系を用いて明らかとなった転写ネットワークは通常のB細胞分化においても重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：B cells are generated from hematopoietic stem cells (HSCs) through a successive series of lineage restriction processes. Although many transcription factors were shown to control the B cell fate determination, the exact mechanisms remain largely unknown. We have recently established an ideal system that can be used to examine gene regulatory networks during lymphoid lineage commitment from HSCs. In this study, we focused on the gene expression profiles at the single cell level during B cell differentiation using this system. The single cell RNA-seq analysis using the in vitro culture system demonstrated the step-wise activation of B-lineage associated genes, whereas the genes involved in the multipotency were gradually repressed. The gene expression patterns obtained by the culture system totally fit with the data of the single progenitors isolated from mouse bone marrow. These results will provide a blueprint for studying the normal and neoplastic development of B cells.

研究分野：免疫学、血液学

キーワード：B細胞分化 1細胞発現解析 運命決定 転写因子 造血幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は様々な系列決定過程を経て最終的に B 細胞にしかたれない前駆細胞となる。この運命制御には転写因子が重要な働きをしているが、詳細は明らかでない。特に、1 細胞レベルでの遺伝子発現制御機構は不明である。解析の大きな障害となっているのが、良い実験モデルがないことにある。

我々はカリフォルニア大学サンディエゴ校の C. Murte 教授との共同研究により、転写因子 E2A を欠損したマウスではリンパ系とミエロイド系共通の前駆細胞段階で分化が停止し、このリンフォ・ミエロイド前駆細胞が自己複製することを示した(Ikawa et al. *Immunity*, 2004)。この方法を応用し、E2A の阻害タンパクの 1 つである Id3 を用いることにより、多能前駆細胞を生体外で増幅することに成功した(Ikawa et al. *Stem Cell Reports*, 2015)。この前駆細胞を iLS(induced Leukocyte Stem)細胞と名付けた。iLS 細胞は細胞の分化・増殖を自在に操ることが出来るため、細胞の運命制御の研究に最適である。我々は、Id3 とエストロゲンレセプター (ERT2) を融合した Id3-ERT2 レトロウイルスベクターを作成することにより iLS 細胞をさらに改良することに成功した。この Id3-ERT2 を用いると、タモキシフェンによって分化停止・誘導をより厳密に制御することが可能となる。すなわち、タモキシフェンを加え続ける限りは多能性を維持するが、これを除去すると B 細胞への分化が誘導され、わずか 7 日間で B 前駆細胞への系列決定が完了する。

そこで本研究では、この iLS 分化誘導系を用いて、多能前駆細胞から B 細胞系列への運命決定における個々の細胞の遺伝子発現を網羅的に解析する。また、マウス骨髄中の前駆細胞も同様に解析し、1 細胞レベルでの B 細胞運命決定機構を明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

B 細胞を含むすべての血液・免疫細胞は造血幹細胞から作られる。その過程で多能性の造血幹細胞は徐々に分化能が限定されていき、最終的に B 細胞にしかたれない前駆細胞に運命決定される。E2A、EBF1、PAX5 など様々な転写因子が B 細胞への運命決定に関わっているが、詳細は明らかでない。特に、これら転写因子群のネットワークは不明である。我々は最近、B 細胞への運命決定における分子機構を調べるための新しい分化誘導系を開発した。この培養系を用いると、7 日間で多能前駆細胞から B 細胞系列への運命決定を誘導することが出来る。そこで本研究では、この培養系を用いて経時的に個々の細胞の RNA-seq 解析を行い、多能前駆細胞から B 細胞への運命

決定を制御する転写ネットワークを 1 細胞レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) iLS 細胞の作成および B 細胞への分化誘導、網羅的遺伝子発現解析

iLS 細胞の作成には Id3-ERT2 レトロウイルスを用いる。Id3-ERT2 をマウス胎仔肝臓の造血幹細胞へ導入しタモキシフェンを用いて作用させながら TSt-4 ストロマ細胞上で培養する。TSt-4 細胞は通常は B 細胞への分化を支持するが Id3 が E2A の機能を阻害するため、B 細胞分化が初期の段階で停止し、多能前駆細胞として増幅する。この細胞を継代、増幅させることによって培養 1 ヶ月ほどで均質な iLS 細胞が大量に作成できる。

次にこの培養系からタモキシフェンを除去することによって B 細胞への分化を誘導する。B 細胞へ分化誘導前 (多能前駆細胞) と誘導 7 日後 (プロ B 細胞) の細胞を採取し、1 細胞 RNA-seq 解析を行う。1 細胞 RNA-seq は東京大学の鈴木穰教授と共同で行い、10xGenomics 社の Chromium という系を用いる。得られたデータにバイオインフォマティクス解析を加えることにより、B 細胞への運命決定における遺伝子発現の推移を 1 細胞レベルで解析する。(図 1)。

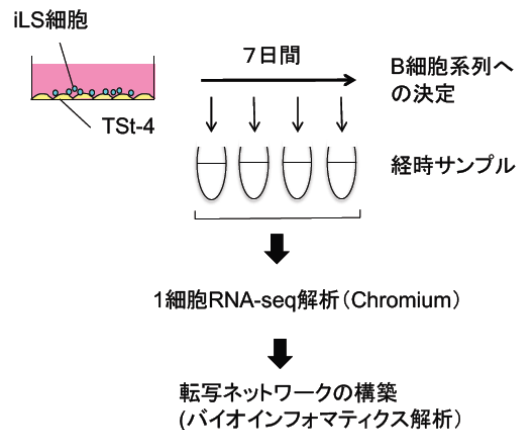


図1 iLS 細胞を用いた 1 細胞 RNA-seq 解析

(2) 骨髄の B 前駆細胞を用いた 1 細胞 RNA-seq 解析

正常な B 細胞分化における遺伝子発現を調べるために、マウス骨髄中の多能前駆細胞 (LMPP)、リンパ系前駆細胞 (CLP)、プロ B 細胞 (pro-B) を用いて (1) と同様に 1 細胞 RNA-seq 解析を行う (図 2)。得られたデータを用いてバイオインフォマティクス解析を行い、遺伝子発現の推移を検討する。また、これまでに得られている複数の iLS 細胞を用いた RNA-seq および、iLS 細胞を用いた 1 細胞 RNA-seq 解析データを照合し、遺伝子発現パターンに相違がないか調べる。

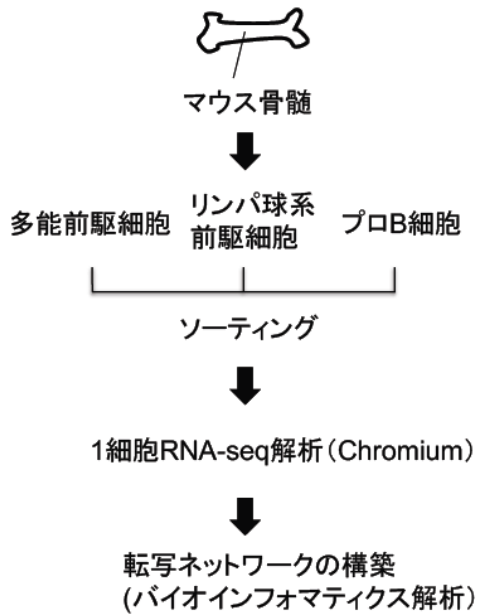


図2 マウス骨髄の前駆細胞を用いた1細胞 RNA-seq 解析

4. 研究成果

(1) iLS 細胞を用いて分化誘導前後で1細胞 RNA-seq 解析を行った結果、いずれのサンプルからも1細胞あたり約1000個の遺伝子発現が検出された。K平均法を用いてクラスタリング解析を行ったところ、分化誘導前の多能前駆細胞では2つのクラスターに分かれたが、分化誘導後のプロB細胞では1つのクラスターであった。また、分化誘導前は多能性を象徴する *Cd34*, *Mycn*, *Sfp1* などが多く発現していたが、分化誘導後はこれらの遺伝子発現は消失し、代わりにB細胞特異的の遺伝子である、*Ebf1* や *Vpreb1*, *Cd79b* などが検出された (図3)。さらに興味深いことに、ほとんどの細胞がこれらの遺伝子を発現していた。このことから、iLS 細胞を用いた分化誘導系では、B細胞分化のプログラムが個々の細胞において同調的に一斉に誘導されることが明らかとなった。

(2) マウス骨髄細胞の LMPP, CLP, pro-B 細胞

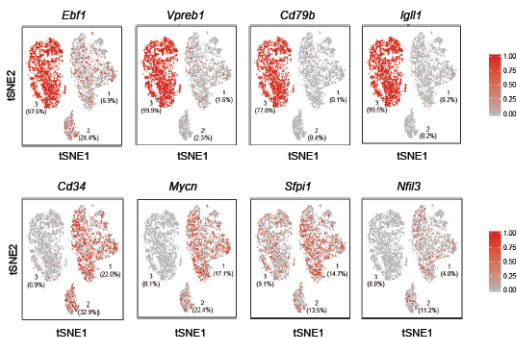


図3 iLS細胞を用いた分化誘導前後の1細胞 RNA 発現解析

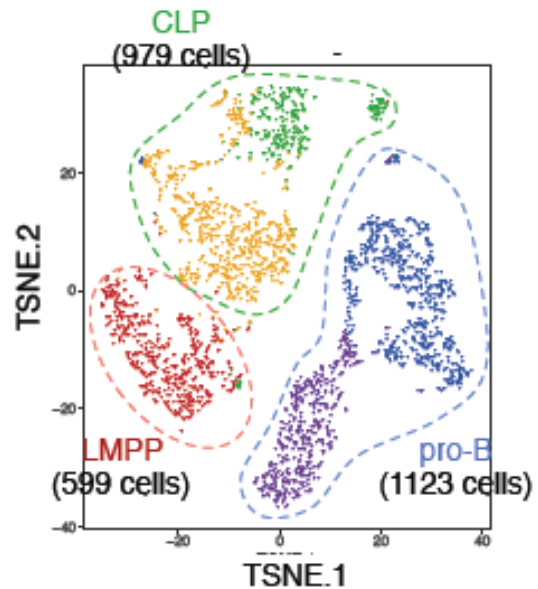


図4 LMPP, CLP, pro-B における1細胞 RNA-seq 解析

を採取し、(1)と同様に1細胞 RNA-seq 解析を行った。それぞれの分画の約500個~1000個の細胞から遺伝子発現が検出された。得られたデータをクラスタリング解析した結果、LMPP, CLP, pro-B はそれぞれ別のクラスターに分類された (図4)。驚いたことに、LMPP は均一のクラスターであったが、CLP および pro-B はそれぞれさらに2つのクラスター (CLP1/CLP2, pro-B1/pro-B2) に分かれた。CLP1/CLP2 では発現している遺伝子にほとんど違いは認められなかったが、多くの遺伝子の発現量が CLP2 において増加していた。また、pro-B1 では pro-B2 に比べて細胞周期に関わる遺伝子 (*Cna2*, *Cdk1*, *Ccnf* など) の発現が有意に高かった。一方、B細胞関連遺伝子 (*Ebf1*, *CD79a*, *Igl11* など) は pro-B2 で発現が上昇していた。このことから、pro-B1 から pro-B2 へ分化が進むことが示唆された。

以上の結果から、通常のB細胞分化における個々の細胞の遺伝子発現パターンは iLS 細胞を用いて得られた遺伝子発現パターンと類似していることが明らかとなった。従って、iLS 細胞分化誘導系を用いて得られた転写ネットワークは生体内のB細胞分化においても正しいことが示された。なお、本研究成果は2018年の *Genes & Development* 誌に報告された。

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 4件)

1. Miyai T, Takano J, Endo TA, Kawakami E, Agata Y, Motomura Y, Kubo M, Kashima

Y, Suzuki Y, Kawamoto H, **Ikawa T**. Three-step transcriptional priming that drives the commitment of multipotent progenitors toward B cells. **Genes Dev.** 32:112-126, (2018) 査読あり

DOI: 10.1101/gad.309575.117.

2. Noguchi S, **Ikawa T** ら(178人中75番目). FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples. **Sci Data.** 4: 170112, (2017) 査読あり

DOI: 10.1101/gad.309575.117.

3. **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 the B-lineage program. **Genes Dev.** 30: 2475-2485, (2016) 査読あり

Epub 2016 Dec 2.

4. 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.** 180: 1559-1573, (2016) 査読あり

Epub 2016 Jul 12.

[学会発表] (計 12件)

1. **伊川友活** Immunosystem development. 日本免疫学会 2017年
2. **伊川友活** Three-step transcriptional priming that drives multipotent progenitors toward B cells. 日本免疫学会 2017年
3. **伊川友活** Epigenetic maintenance of T cell identity by Polycomb-mediated suppression of Pax5. 日本分子生物学会 2017年
4. **伊川友活** A road map that guides the development of B cells. The 3rd Tsinghua-RIKEN Joint Symposium 2017年
5. **伊川友活** Transcriptional networks during B lymphocyte commitment. FASEB meeting 2017年

6. **伊川友活** A challenge as a young chief investigator in IMS. RIKEN Sakura Symposium 2017年
7. **伊川友活** Identification of gene regulatory networks during hematopoietic stem cell differentiation by the single-cell analysis. RIKEN Single cell Workshop 2017年
8. **伊川友活** A critical role of non-canonical PRC1 for specification to lymphoid lineage. KTCC 2017年
9. **伊川友活** Dynamic transcriptional cascades and epigenetic regulation that orchestrate B cell fate determination. 日本免疫学会 2016年
10. **伊川友活** Transcriptional networks that establish B cell identity. 国際免疫学会 2016年
11. **伊川友活** 異性型 Polycomb repressive complex は造血幹細胞からリンパ球系列への運命決定に重要である. KTCC 2016年
12. **伊川友活** Transcriptional regulatory networks that regulate B cell fate determination. CSHL meeting 2016年

[図書] (計 0件)

[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

<http://www.ribs.tus.ac.jp/index.php/institute/labforres/ikawalab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊川 友活 (Ikawa Tomokatsu)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60450392