

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19345

研究課題名（和文）ゲノム上の距離が確率に変換される細胞系譜決定機構の存在を検証する

研究課題名（英文）Evaluation of a cell lineage determination model that converts genomic distances into stochasticity

研究代表者

田村 智彦（Tamura, Tomohiko）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：50285144

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：細胞分化では、鍵となる転写因子群が各系譜に特徴的な遺伝子発現パターンを確立する。確率論的な制御も存在すると考えられているが、これらの接点は未だ不明である。本研究では独自の仮説：「細胞運命決定には、ゲノム上の遺伝子-エンハンサー間の『距離』がクロマチン立体構造決定の『確率』に変換される」を検証した。クロマチンループ構造の形成確率は概ね距離に反比例したが、細胞種特異的に長大なループ構造も確認された。細胞種特異的なループ構造を転写因子遺伝子Irf8をモデルとして解析した結果、最遠位のエンハンサーが単球の分化には必要ない一方で、より少数しか産生されない樹状細胞の分化には必須であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は血液学・免疫学の範疇を超えて、細胞分化の基本原理解について新たな概念を提案するものであり、生命科学から臨床医学に至るまで多くの分野に波及すると予想する。例えば、分化の異常を特徴とする白血病をはじめとする疾患の理解と治療法開発や再生医療などへの貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In cell differentiation, key transcription factors establish the cell lineage-specific gene expression patterns. On the other hand, cell differentiation is also stochastically regulated. It is still unclear how these two mechanisms cooperate. In this study, we evaluated our hypothesis that the 'distance' between genes and enhancers on the genome is converted into the 'probability' of chromatin structure determination to control the cell fate. Our analyses revealed that the rate of gene-enhancer loop formation was indeed generally inversely correlated to the distance. However, there are a few long-range interactions, which were cell type-specific. As a model, we analyzed the Irf8 gene encoding a transcription factor essential for the differentiation of mononuclear phagocytes, composed of monocytes and a far fewer number of dendritic cells. We found that the most distal, previously unrecognized enhancer was essential for the differentiation of dendritic cells but not monocytes.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞分化 確率論的制御 クロマチン高次構造 造血細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

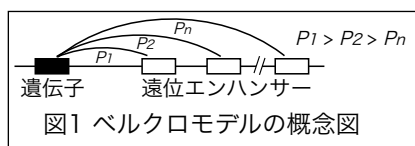
### 1. 研究開始当初の背景

細胞分化においては、系譜特異的な転写因子群がネットワークを構成しながら、各系譜に特徴的な遺伝子発現パターンを確立する。系譜特異的な転写因子は遠位エンハンサーを活性化して、さらにクロマチン立体構造を変化させる。これにより活性化エンハンサーと標的遺伝子とが近接して、転写が誘導される。一方、細胞分化は確率論的にも制御されると考えられている。しかしながら、確率論的な分化制御と転写ネットワークによる分化制御との接点や、確率論的転写制御を担う分子機構は未だ不明である。

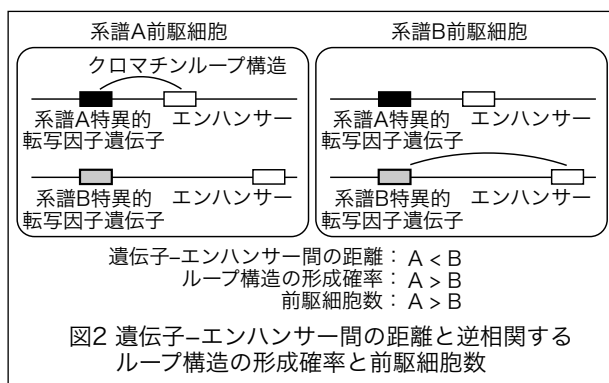
本研究代表者らは単核食細胞系の分化に必須の転写因子 IRF8 を中心に、血球分化について研究を進めてきた。In vitro 単球分化系でのゲノムワイドの転写因子・エピゲノム解析を行い、IRF8 が下流の転写因子遺伝子 *Klf4* と転写因子カスケードを形成することなどを報告している (Kurotaki ら *Blood* 2013)。予備実験の結果、IRF8 が活性化する *Klf4* 遠位エンハンサーと *Klf4* 遺伝子は、単球系の前駆細胞株ではクロマチンループ構造を介して近接する一方、顆粒球系の前駆細胞株では近接していなかった。さらに、単球系の前駆細胞株では、意外にもこのループ構造は IRF8 の発現以前から既に存在していた。

### 2. 研究の目的

これらの結果から、我々は分化能の獲得には鍵となる転写因子の発現以前に標的遺伝子のループ構造が予め整っている必要があり、さらにその形成には確率論的機構が働くと考え、新しい仮説：「細胞運命決定には、ゲノム上の遺伝子発現制御領域間の『距離』がクロマチン立体構造決定の『確率』に変換される原理が用いられている」を着想するに至った。遺伝子発現制御領域がベルクロ (マジックテープ) の様に働き、領域同士の結合確率はゲノム上の距離に逆相関する考えであることから、「ベルクロモデル仮説」と名付ける (図1)。



ベルクロモデルでは、遠位エンハンサーと遺伝子間の距離が異なることで多様な分化能を持つ各血球前駆細胞集団が適切な割合で生じるという仮説である (図2)。本研究は細胞分化の基本原則として、転写因子による分化プログラムと確率論的機構がどのように出会うのかを解明するために、ベルクロモデル仮説の検証を行った。



### 3. 研究の方法

#### (1) 公開データを用いたクロマチンループ構造の解析

NCBI GEO データベースに登録されている複数の細胞種における CTCF の ChIA-PET (Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing) データを取得した (K562 細胞, GSM970216; MCF-7 細胞, GSM970215; GM12878 細胞, GSM1872886)。これらのデータから、コンタクトマトリクスを作成した後に、CTCF ループ間の距離の分布を調べた。

#### (2) マウス細胞のクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) 解析

野生型マウスの骨髄から血球幹・前駆細胞 (LSK) 細胞を、脾臓から古典的樹状細胞 (cDC1) をソートして、遠位エンハンサーの活性化マーカーであるアセチル化ヒストン H3K27 (H3K27ac) に対する抗体を用いて、ChIP-seq 解析を行った。ChIP-seq 法は、既報に倣い実施した (Kurotaki ら *Cell rep* 2018)。他の血球前駆細胞、成熟細胞の ChIP-seq データは既報のものを使用した。

#### (3) IRF8 エンハンサー欠損マウスの樹立

C57BL/6J マウスの受精卵に、Cas9 タンパク質、2 種の gRNA をエレクトロポレーションによって導入した。gRNA は IRF8 遺伝子座の最遠位エンハンサーを含む領域の両端部に設計した。導入後、受精卵は偽妊娠マウスに移植し、仔マウスのゲノム PCR によってエンハンサー欠損を確認した。

#### (4) IRF8 発現量依存的な血球分化能の評価

*Irf8* 欠損マウスの骨髄から造血幹・前駆細胞をソートして、レトロウイルスベクターを用いて外来性 IRF8 を導入した。IRF8 とバイシストロニックに発現する GFP をマーカーにして、IRF8 高発現の細胞と低発現の細胞を分離して、各々放射線照射したマウスに移植した。移植後 7 日目に脾臓から cDC1、単球 (Mo)、好中球 (Neu) を分離することで、分化能を評価した。分化能の評価はフローサイトメトリーによる表面抗原の発現解析により行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) 公開データを用いたクロマチンループ構造の解析

まず我々は、CTCF の ChIA-PET データを用いて、クロマチンループ構造の長さや形成頻度について解析を行った。3 種のヒト細胞株 (K562 細胞、MCF-7 細胞、GM12878 細胞) に共通するクロマチンループ構造を選択して解析を行った結果、クロマチンループ構造の長さや形成頻度は逆相関しており、「バルクロモデル仮説」を支持する結果を得た。次に、K562 細胞に特異的なクロマチンループ構造について解析を行った。細胞種特異的なクロマチンループ構造についても、クロマチンループ構造の長さや形成頻度は概ね逆相関していたが、例外的に長大なものも存在した。これらは形成確率が低くても系譜決定や同一性維持に重要であるため存在する可能性が考えられた。

### (2) マウス *Irf8* 遺伝子座における遠位エンハンサーの解析

この“例外的に長大な”ループ構造を持つエンハンサーの細胞分化における役割を解析するために、単核貪食細胞系の分化に必須の転写因子をコードする

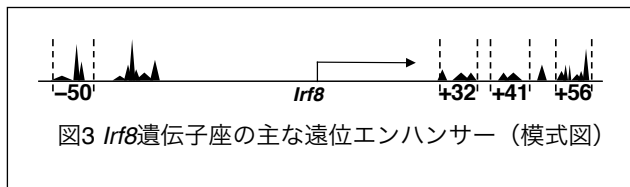


図3 *Irf8* 遺伝子座の主な遠位エンハンサー (模式図)

*Irf8* 遺伝子をモデルとして、*Irf8* 遺伝子座の遠位エンハンサーの細胞分化における役割を検討した。単核貪食細胞は主に単球と樹状細胞から成るが、前者の方が後者よりも細胞数が著しく多い。マウス生体由来の単球-樹状細胞前駆細胞での H3K27ac ChIP-seq データを解析した結果、*Irf8* 遺伝子座には主に 4 個の遠位エンハンサーが認められた (図 3)。このうち、3' 側に存在する最遠位エンハンサー (+56) は新規に同定されたものであった。これらの遠位エンハンサーの血球幹・前駆細胞から樹状細胞 (中でも cDC1) に至る活性化を解析した。その結果、まず最遠位のエンハンサーが前駆細胞段階で活性化し、その後 +32 kb エンハンサー (+32) が活性化することが明らかとなった (図 4)。このように、分化に伴いエンハンサーの活性化が最遠位から近位へと遷移することが認められた。

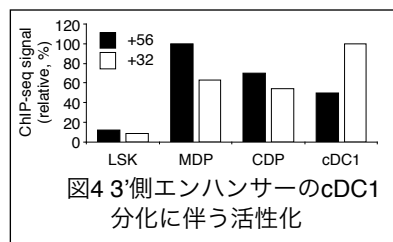


図4 3'側エンハンサーのcDC1 分化に伴う活性化

### (3) +56 kb エンハンサーの欠損マウスの作成とその解析

この+56 kb エンハンサーの生体での血球分化における役割を検討するために、ゲノム編集法を用いて欠損マウスを作成した ( $\Delta$ +56 マウス)。このマウス作成には、北里大学 木村徹先生、関田洋一先生にご協力をいただいた。 $\Delta$ +56 マウスの血球前駆細胞での *Irf8* 発現を検討した結果、*Irf8* 発現は前駆細胞段階から著減した (図 5)。さらに、 $\Delta$ +56 マウスでの *Irf8* の低発現が血球分化にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、 $\Delta$ +56 マウスにおいては、cDC1 産生が阻害される一方で、単球は増加し、好中球は微増していることがわかった。これは cDC1 のみならず単球が消失する一方で好中球が著増する IRF8 の欠損マウスとは対照的である。このことは、IRF8 発現のタイミングや発現量が単球・樹状細胞・好中球を含めた 3 種類のみエロイド系細胞の分化バランス制御に重要であることを示唆するものであった。

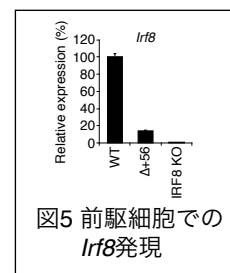


図5 前駆細胞での *Irf8* 発現

### (4) IRF8 発現量の強弱による系譜決定の評価

血球前駆細胞における IRF8 発現量が細胞の分化系譜決定に影響している可能性を検証するために、*Irf8* 欠損マウスの造血幹・前駆細胞にレトロウイルスを用いて外来性 IRF8 の導入を行い、IRF8 高発現細胞と IRF8 低発現細胞を調整した。これら IRF8 発現細胞の放射線照射マウスへの移植を行い、7 日後に脾臓から単球や cDC1、好中球の産生を評価した。その結果、IRF8 高発現細胞は cDC1 へ、IRF8 低発現細胞は単球へ、また IRF8 欠損細胞は好中球への選択的な分化が見られた。すなわち造血前駆細胞における IRF8 の発現量が、みエロイド細胞系内の 3 つの細胞種への分化バランスを決定する要因であることが明らかになった。

単球よりも少数しか産生されない樹状細胞の分化に、最遠位の *Irf8* エンハンサーによる IRF8 高発現が必須であることは、当初のバルクロモデル仮説とも矛盾がない。また、転写因子が発現量依存的に異なる系譜の細胞分化を促す制御機構は他の転写因子や細胞種でも存在する可能性があり、細胞分化運命決定機構の原理解明に資するものと考えられる。本研究の成果は、現在 *Nature Immunology* 誌に投稿中である。

### <引用文献>

1. Kurotaki D. et al. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* 121, 1839-1849, 2013
2. Kurotaki D. et al. Transcription factor IRF8 governs enhancer landscape dynamics in mononuclear phagocyte progenitors. *Cell Rep* 22, 2628-2641, 2018

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Bachu Mahesh, Tamura Tomohiko, Chen Chao, Narain Ankur, Nehru Vishal, Sarai Naoyuki, Ghosh Sukhendu B., Ghosh Anu, Kavarthapu Raghuvveer, Dufau Maria L., Ozato Keiko	4. 巻 294
2. 論文標題 A versatile mouse model of epitope-tagged histone H3.3 to study epigenome dynamics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 1904 ~ 1914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005550	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Izawa Naohiro, Kurotaki Daisuke, Nomura Seitaro, Fujita Takanori, Omata Yasunori, Yasui Tetsuro, Hirose Jun, Matsumoto Takumi, Saito Taku, Kadono Yuho, Okada Hiroyuki, Miyamoto Takeshi, Tamura Tomohiko, Aburatani Hiroyuki, Tanaka Sakae	4. 巻 34
2. 論文標題 Cooperation of PU.1 With IRF8 and NFATc1 Defines Chromatin Landscapes During RANKL Induced Osteoclastogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1143 ~ 1154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.3689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kurotaki Daisuke, Kawase Wataru, Sasaki Haruka, Nakabayashi Jun, Nishiyama Akira, Morse Herbert C., Ozato Keiko, Suzuki Yutaka, Tamura Tomohiko	4. 巻 133
2. 論文標題 Epigenetic control of early dendritic cell lineage specification by the transcription factor IRF8 in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1803 ~ 1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2018-06-857789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 田村 智彦、黒滝 大翼	4. 巻 60
2. 論文標題 造血におけるシングルセル解析の進歩	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1075 ~ 1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.60.1075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Guilliams Martin、 Tamura Tomohiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Decrypting DC development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 1090 ~ 1092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-019-0457-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kamada Rui、 Yang Wenjing、 Zhang Yubo、 Patel Mira C.、 Yang Yanqin、 Ouda Ryota、 Dey Anup、 Wakabayashi Yoshiyuki、 Sakaguchi Kazuyasu、 Fujita Takashi、 Tamura Tomohiko、 Zhu Jun、 Ozato Keiko	4. 巻 115
2. 論文標題 Interferon stimulation creates chromatin marks and establishes transcriptional memory	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E9162 ~ E9171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1720930115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 佐々木 悠、 西山晃、 黒滝大翼、 関田洋一、 木村透、 田村智彦
2. 発表標題 単核貪食細胞系におけるIrf8の発現に重要な新規エンハンサー領域の同定
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木悠、 西山晃、 川瀬航、 西村晃成、 黒滝大翼、 関田洋一、 木村透、 田村智彦
2. 発表標題 新規3'エンハンサーによるIrf8発現と単核貪食細胞系分化の制御
3. 学会等名 第23回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamura T
2. 発表標題 Epigenetic control of myeloid cell development by the transcription factor IRF8
3. 学会等名 48th Annual Scientific Meeting - International Society for Experimental Hematology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木悠、西山晃、村上紘一、黒滝大翼、関田洋一、木村透、田村智彦
2. 発表標題 新規3' 遠位エンハンサーによる Irf8遺伝子発現と単核貪食細胞系分化のin vivoにおける制御
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村智彦
2. 発表標題 転写因子IRF8によるミエロイド細胞の分化制御とその機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上紘一、佐々木悠、西山晃、黒滝大翼、川瀬航、関田洋一、中島秀明、木村透、田村智彦
2. 発表標題 新規3' 遠位エンハンサーによる Irf8遺伝子発現及び単核貪食細胞分化の制御
3. 学会等名 第24回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村智彦
2. 発表標題 ゲノム規模解析で紐解く転写因子によるミエロイド細胞の分化系譜決定機構
3. 学会等名 横浜市立大学先端医科学研究センター共同利用・共同研究拠点「マルチオミックスによる遺伝子発現制御の先端医学共同尾研究拠点」シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>横浜市立大学大学院医学研究科 免疫学教室  <a href="http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/">http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西山 晃 (Nishiyama Akira) (80589664)	横浜市立大学・医学部・准教授  (22701)	
研究分担者	中林 潤 (Nakabayashi Jun) (80322733)	横浜市立大学・先端医科学研究センター・准教授  (22701)	
研究協力者	木村 透 (Kimura Tohru)	北里大学・理学部・教授  (32607)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	関田 洋一  (Sekita Yoichi)	北里大学・理学部・准教授  (32607)	