

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19569

研究課題名(和文)1細胞エピゲノム解析が解き明かす免疫細胞分化の真髄

研究課題名(英文)Dissection of immune cell differentiation by a single cell epigenome analysis

研究代表者

伊川 友活(Ikawa, Tomokatsu)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：60450392

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)：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細胞にしかたない前駆細胞に運命決定される。この運命決定は様々な転写因子やエピジェネティック因子によって制御されているが、詳細は明らかでない。特に、単一細胞レベルの転写制御機構は不明である。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。そこで、この方法を用いて1細胞RNA-seq解析を行い、数理モデルを用いてB細胞系列への運命決定における転写ネットワークを1細胞レベルで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体産生を担うB細胞は骨髄中で造血幹細胞から作られるが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。特に、造血幹細胞からどのようにB細胞系列へ運命決定されるのか明らかでない。本研究により、B細胞の生成に重要な遺伝子制御機構が1細胞レベルで明らかとなった。この知見は正常な免疫細胞分化のメカニズムだけでなく、白血病を含む様々な造血器腫瘍の発症機構の解明に貢献すると考えられる。今後、分化の分子機構がさらに明らかになれば、免疫細胞療法や再生医療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Immune cells including B cells are generated from hematopoietic stem cells (HSCs). HSCs gradually specify their fates to finally commit to the B cell lineage. Transcription factors and epigenetic modification cooperate in the cell fate decision. However, the molecular mechanisms are yet to be determined. We have recently established the multipotent progenitor cell line named iLS (induced Leukocyte Stem) cells. iLS cells maintain the differentiation potential for T, B and myeloid lineage cells with unlimited self-renewal capacity. We have explored the single cell transcriptome profile of B lineage commitment using the iLS cells differentiating into B cells. Synchronous and cascading expression of key transcription factors and epigenetic factors was disclosed based on the single cell RNA-seq analysis. Thus the data provide a blueprint for studying the normal and malignant B cell generation.

研究分野：免疫学、血液学

キーワード：B細胞分化 造血幹細胞 転写因子 エピジェネティクス 運命決定

様式 C-19、F-19-1、Z-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 細胞にしかねない前駆細胞となる。この運命制御には転写因子やエピジェネティック因子が重要な働きをしているが、詳細は明らかでない。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. Murre 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、このリンパ系多能前駆細胞 (Lymphoid-primed multipotent progenitor: LMPP) が自己複製することを示した (Ikawa et al. *Immunity*, 2004)。この知見を応用し、「E2A 欠損 B 前駆細胞の状態を人為的に誘導して制御することにより、LMPP を無限に増幅することが可能なのではないか」という仮説を立てた。

E2A の機能を阻害することが知られている Id3 をレトロウイルスベクターを用いて造血幹細胞へ導入し、B 前駆細胞の培養条件下で培養すると、LMPP 段階で分化が停止し、細胞が断続的に増幅した。驚くべきことにこの細胞を放射線照射したマウスに移植すると、数ヶ月以上に渡り T, B, ミエロイド系細胞を維持することができた。我々はこの前駆細胞を iLS (induced Leukocyte Stem) 細胞と名付けた (Ikawa et al. *Stem Cell Reports*, 2015 ; 特許申請済) (図 1)。iLS 細胞は細胞の分化・増殖を自在に操作することができるため、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 (図 2)。この方法を用いて B 細胞への運命決定プロセスの解明に取り組み、分化に重要な遺伝子発現プロファイルが明らかとなったが、単一細胞レベルの転写制御機構は不明であった。そこで本研究ではこの分化誘導系を用いて、多能前駆細胞が B 前駆細胞へ運命決定される過程において個々の細胞の転写・エピゲノム解析を行い、1 細胞レベルでの運命決定機構を明らかにすることを旨とする。

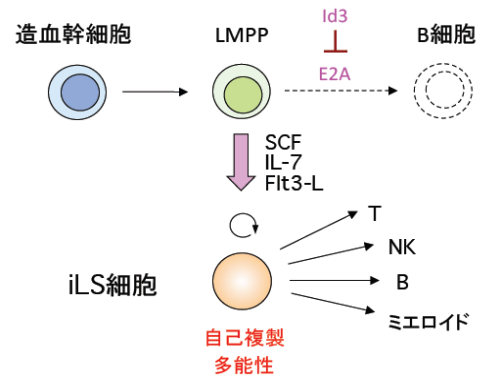


図 1 iLS (induced Leukocyte Stem)細胞

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 細胞にしかねない前駆細胞に運命決定される。この運命決定は様々な転写因子やエピジェネティック因子によって制御されているが、詳細は明らかでない。特に、単一細胞レベルの転写制御機構は不明である。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 (Ikawa et al. *Stem Cell Reports*, 2015)。この方法を用いて経時的に RNA-seq 解析を行い、B 細胞系列への運命決定における転写ネットワークを明らかにした (Miyai et al. *Genes Dev.* 2018)。そこで本研究ではこの培養系を用いて、1 細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析、エピゲノム解析に挑戦し、多能前駆細胞から B 細胞への運命決定におけるダイナミックな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、経時サンプルの採取

分化誘導モデル系として独自に開発した、人工白血球幹 (induced Leukocyte Stem: iLS) 細胞を用いる (図 1)。

iLS 細胞は次のように作成する。まず、骨髄中の造血幹細胞へレトロウイルスを用いて Id3 を導入し、導入した細胞を TSt-4 ストロー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 (iLS 細胞) として増幅する。この細胞を継代、増幅

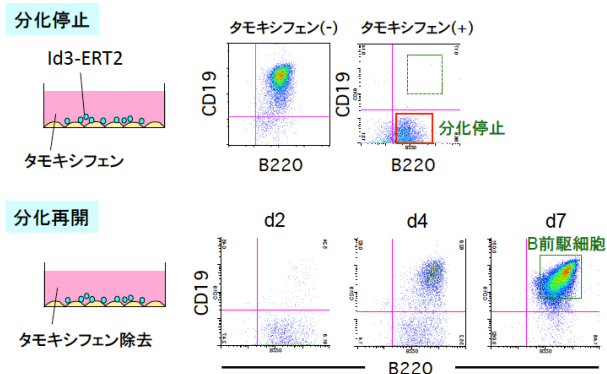


図 2 B 細胞系列への運命決定を誘導する培養系

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。作成された iLS 細胞はフローサイトメーターによる表面抗原の発現および遺伝子発現によって確認する。また、この細胞を分化誘導することにより、in vivo および in vitro において多能性を示すことを確認する。なお、iLS 細胞は一度作成すれば少なくとも半年以上維持することができる上に、凍結保存も可能であるため、細胞株として長期に渡り以後の実験に用いることが可能である。

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。培養中の細胞を経時的に採取し、フローサイトメーターを用いて CD19 陽性細胞の割合をモニターする。B 細胞分化が確認されれば、B 細胞へ分化誘導前後に細胞を採取し 1 細胞 RNA-seq 用にサンプルを調整する。

(2) iLS 細胞分化誘導系を用いた 1 細胞 RNA-seq 解析

実験 1) で得られたサンプルを 10x Genomics 社の Chromium システムを用いて解析する。本実験は、共同研究者である東京大学の鈴木穰教授らとともに進めていく。こうして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、1 細胞レベルでの遺伝子発現変動を解析する。

(3) 骨髄前駆細胞を用いた生体内の B 細胞系列への運命決定における 1 細胞 RNA-seq 解析

正常マウス骨髄の造血前駆細胞を用いて生体内における 1 細胞レベルの遺伝子発現解析を行う。具体的には、骨髄細胞から LMPP, 共通リンパ系前駆細胞 (Common lymphoid progenitor : CLP) および pro-B 細胞をセルソーターを用いてソートし、実験 2) と同様に 1 細胞 RNA-seq を行う。実験 2) および 3) により得られたデータを統合し、正常な B 細胞分化における転写制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

iLS 細胞から B 細胞への分化誘導前後の細胞を用いた 1 細胞 RNA-seq の結果を Cell Ranger という解析ソフトを用いて解析した。培養前後の細胞からいずれも 1 細胞あたり約 1000 個の遺伝子の発現が確認された。K-means クラスタリング法を用いてクラスター解析を行ったところ、培養前後の細胞は別々のクラスターに分類された。興味深いことに、培養後のクラスターは 1 つであったが、培養前の細胞は小さなクラスターと大きなクラスターの 2 つに分かれた。遺伝子発現が有意に変動した遺伝子のうち、トップ 239 個の遺伝子のヒートマップを図 3 に示す。B 細胞特異的遺伝子 (*Cd79a*, *Cd79b*, *Ebf1* など) は B 細胞分化誘導後のみ検出された。一方、幹細胞系遺伝子 (*Cd34*, *Bmi1*, *Hoxa9* など) やミエロイド系遺伝子 (*Cebpb*, *Cbfb* など) は培養前の細胞では高いレベルで発現していたが、培養後には消失していた。この発現パターンは、複数の細胞を用いた RNA-seq の結果とほぼ一致していた。従って、B 細胞分化において変動する遺伝子の発現は 1 細胞レベルにおいても厳密に制御されていることが明らかとなった。

次に、正常マウス骨髄中の LMPP, CLP, pro-B 細胞について同様に 1 細胞 RNA-seq 解析を行った。それぞれの分画の細胞 500-1200 個からデータが得られ、1 細胞あたり約 2000 個の遺伝子が検出された。K-means クラスタ法による解析の結果、LMPP は 1 つのクラスターであったが、CLP および pro-B 細胞はそれぞれ 2 つずつのクラスターに分類された。このことは、CLP, pro-B 細胞は遺伝子発現パターンの不均一であることを示唆している。変動遺伝子をヒートマップで表すと図 4 のようになる。LMPP で発現の高い *Cd34*, *Gata2* など

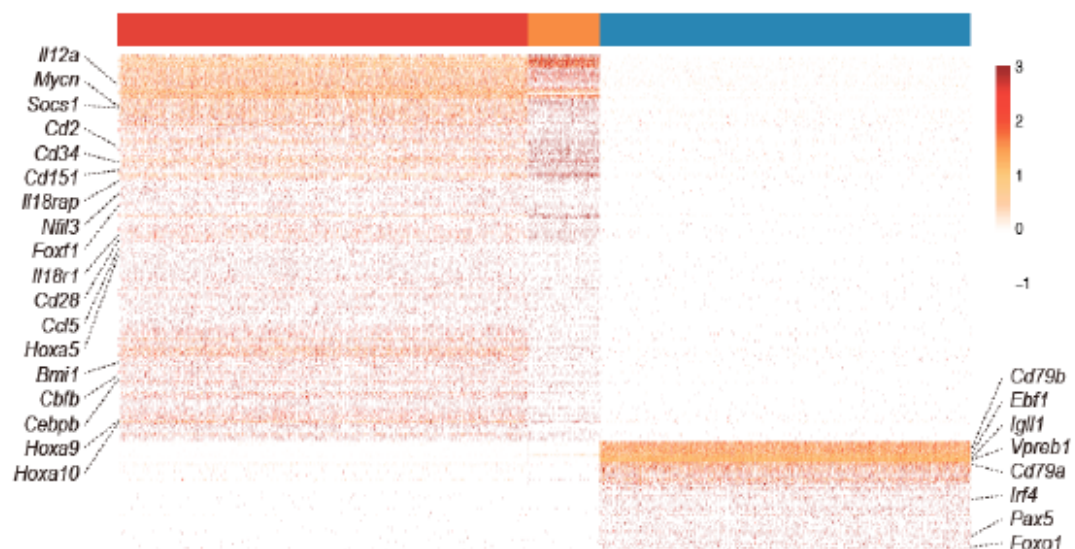


図 3 iLS 細胞分化誘導系を用いた 1 細胞 RNA-seq 解析

化が進むにつれて減少した。一方、*Ebf1*, *Cd79a/b* などの B 細胞特異的遺伝子は大部分の pro-B 細胞において高い発現が確認されたが、LMPP や CLP ではほとんど発現が検出されなかった。転写因子に注目すると、多能前駆細胞の生成や B 細胞初期分化に重要な *Sfpi1* や *Ikzf1* は LMPP および CLP で発現が高かったが、*Tcf3*, *Ebf1*, *Pax5* などの B 細胞系列への運命決定に重要な遺伝子の発現は、LMPP, CLP では低く、pro-B で上昇していた。従って、転写因子の発現パターンには一定のヒエラルキーがあることが示された。興味深いことに、CLP を CLP1 および CLP2 に分類すると、*Sfpi1* や *Ikzf1* の発現は CLP1 で高く、CLP2 では低下した。また、*Tcf3*, *Ebf1*, *Pax5* は、pro-B1, pro-B2 いずれの分画においても発現が確認されたが、pro-B2 段階の方が発現レベルが高かった。さらに、pro-B1 では *Cdk1*, *Cdc20*, *E2f2* などの細胞周期に関連する遺伝子の発現が高かった。細胞周期の状態により、pro-B 細胞は 2 つの段階に分けられることが示唆される。これらの結果は複数の細胞を用いた遺伝子発現プロファイルとほぼ一致していた。従って、これまで複数の iLS 細胞を用いて明らかとなっていた多能前駆細胞から B 細胞系列への運命決定における転写ネットワークは個々の細胞レベルにおいても正しいことが示唆された。

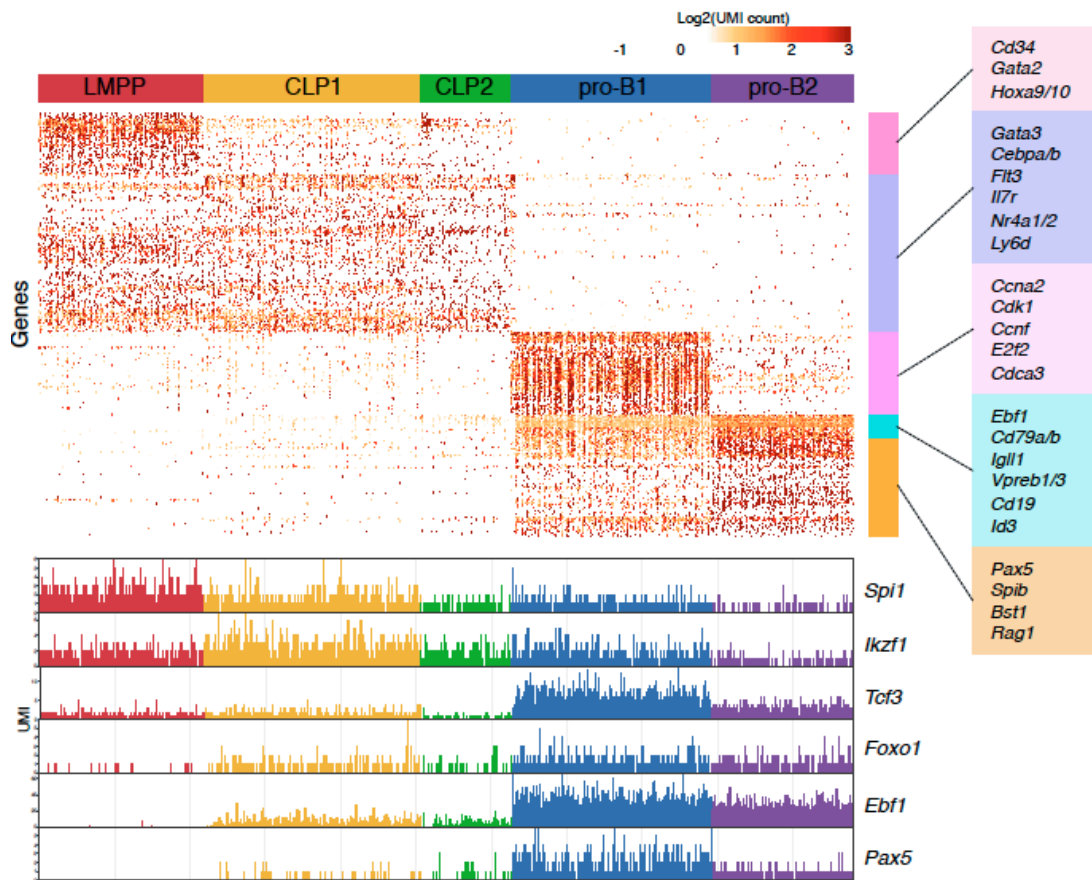


図 4 骨髓前駆細胞を用いた 1 細胞 RNA-seq 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto K, Kouno T, Ikawa T, Hayatsu N, Miyajima Y, Yabukami H, Terooatea T, Sasaki T, Suzuki T, Valentine M, Pascarella G, Minoda A, Taniuchi I, Arai Y, Hirose N, Carninci P	4. 巻 116
2. 論文標題 Single-cell transcriptomics reveals expansion of cytotoxic CD4 T cells in supercentenarians	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 24242-24251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1907883116	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 該当する
1. 著者名 Miyai T, Takano J, Endo TA, Kawakami E, Agata Y, Motomura Y, Kubo M, Kashima Y, Suzuki Y, Kawamoto H, Ikawa T	4. 巻 32
2. 論文標題 Three-step transcriptional priming that drives the commitment of multipotent progenitors toward B cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Dev	6. 最初と最後の頁 112-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.309575.117	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 該当する
1. 著者名 Masuda J, Takayama E, Ichinose T, Strober W, Mizuno Kamiya M, Ikawa T, Kitani A, Kawaki H, Fuss I, Kawamoto H, Seno A, Vaidyanath A, Umemura N, Mizutani A, Kasai T, Honjo Y, Satoh A, Murakami H, Katsura Y, Kondoh N and Seno M	4. 巻 16
2. 論文標題 Suppression effect on IFN-g of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells isolated from b2-microglobulin-deficient mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Med	6. 最初と最後の頁 4277-4282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する
1. 著者名 Li S, Liu J, Min Q, Ikawa T, Yasuda S, Yang Y, Wang YQ, Tsubata T, Zhao Y and Wang JY	4. 巻 30
2. 論文標題 Kelch-like protein 14 promotes B-1a but suppresses B-1b cell development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 311-318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy033.	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 該当する

1. 著者名 薬師寺 那由他, 伊川 友活	4. 巻 71
2. 論文標題 B細胞分化を駆動する転写プログラムとクロマチン制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 215-222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 宮井 智浩, 伊川 友活	4. 巻 70
2. 論文標題 多能性前駆細胞からB細胞への分化における段階的転写制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 503-513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 ポリコムタンパクPCGF1は造血系細胞分化においてDNA複製と運命制御を結びつける働きをしている
3. 学会等名 さきがけ第4回終了領域研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikawa T, Takano J, and Koseki H
2. 発表標題 Essential roles of PCGF1 in controlling hematopoietic cell fates
3. 学会等名 第48回日本免疫学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikawa T
2. 発表標題 Epigenetic control in early lymphocyte development
3. 学会等名 The 30th Anniversary International Symposium of Research Institute for Biomedical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takano J, Ito S, Nakajima-Takagi Y, Iwama A, Koseki H, and Ikawa T
2. 発表標題 Variant PCGF1-PRC1 regulates hematopoietic cell fates through nucleosome composition
3. 学会等名 第81回日本血液学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 無限に増幅する血液前駆細胞を用いた抗腫瘍薬の開発
3. 学会等名 BioJapan2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikawa T and Takano J
2. 発表標題 Essential roles of variant PCGF1-PRC1 in regulating hematopoietic cell fates
3. 学会等名 FASEB The Molecular Mechanisms of Immune Cell Development and Function Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊川 友活, 高野 淳一郎, 古関 明彦
2. 発表標題 異性型ポリコムタンパクPCGF1はPRC2の機能を安定化させることによりB 細胞系列への運命決定を促進している
3. 学会等名 第29回Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takano J, Ito S, Nakajima-Takagi Y, Iwama A, Ikawa T and Koseki H
2. 発表標題 Non-canonical PRC1.1 is required for specification of hematopoietic progenitor cells toward B lymphoid lineage
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takano J, Nakajima-Takagi Y, Koseki H, Iwama A and Ikawa T
2. 発表標題 Non-canonical PRC1.1 is required for Specification of hematopoietic progenitor cells toward B lymphoid lineage
3. 学会等名 第47回日本免疫学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 異性型ポリコムタンパクPCGF1は造血幹細胞からB細胞系列への運命決定に重要である
3. 学会等名 さきがけ第3回終了領域研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takano J, Nakajima-Takagi Y, Koseki H, Iwama A and Ikawa T
2. 発表標題 Non-canonical PRC1.1 is required for Specification of hematopoietic progenitor cells toward B lymphoid lineage
3. 学会等名 第80回日本血液学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川 泰策, 伊川 友活, 城口 克之
2. 発表標題 Automated Live Imaging and Single-cell Picking System for RNA-seq
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikawa T
2. 発表標題 Transcriptional programs that guide B cell development
3. 学会等名 The 2nd international innovation dialogue on genome engineering animal models and biomedical research symposium（招待講演） （国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takano J, Nakajima-Takagi Y, Koseki H, Iwama A and Ikawa T
2. 発表標題 A critical role of Non-canonical PRC1.1 for lineage determination of hematopoietic progenitor cells
3. 学会等名 第9回日本血液学会国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊川 友活, 高野 淳一郎, 古関 明彦
2. 発表標題 異性型ポリコムタンパクPCGF1は造血幹細胞からB 細胞系列への運命決定に重要である
3. 学会等名 第28回Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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