

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02954

研究課題名(和文)単核貪食細胞系の生体内分化におけるクロマチン高次構造変化とその意義の解析

研究課題名(英文)Higher-order chromatin structure dynamics during dendritic cell development in vivo

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分化においては転写因子による遺伝子発現パターンの確立が極めて重要である。私たちは一貫して単核貪食細胞(単球や樹状細胞)系をモデルとして細胞分化を研究し、IRF8をはじめとする転写因子が前駆細胞におけるエンハンサーランドスケープを確立、これが将来の遺伝子発現への布石となって分化を制御することなどを見出してきた。この様にIRF8の役割が明らかになる一方で、Irf8そのものの発現制御機構の解明が全く不十分であった。本研究では樹状細胞分化における3個のIrf8エンハンサーについて物理的・機能的な相互作用を解析し、エンハンサーの相互活性化が分化段階によって異なる機序で生じることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは、系譜特異的な転写因子遺伝子のエンハンサーが細胞の分化段階で異なるメカニズムによって活性化することで、遺伝子発現を調節することを見出した。本研究で見出した分化段階で異なる相互作用機序によるエンハンサーの活性化は、前駆細胞が持つ複数の細胞種への分化能の保持や、系譜決定後の細胞種特異的な遺伝子発現に重要と考えられ、樹状細胞だけでなく他の細胞種の分化においても用いられる普遍的な機序であると予想される。さらに、エンハンサー領域の変異は多くの疾病の原因となり得ることが明らかになっており、本研究がこのような疾病の病態理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The establishment of gene expression patterns by lineage-determining transcription factors is essential for cell differentiation. We have focused on studies of cell differentiation using the mononuclear phagocytic cell lineage (monocytes and dendritic cells) as a model and have found that IRF8 and other transcription factors establish an enhancer landscape in progenitor cells, which serves as a groundwork for future gene expression and controls differentiation. While the role of IRF8 has been clarified, the regulatory mechanism of Irf8 itself is not fully understood. In this study, we analyzed the physical and functional interactions among the three Irf8 enhancers during dendritic cell differentiation and found that the mutual activation of the enhancers occurs by different mechanisms depending on the differentiation stage.

研究分野：血液学

キーワード：クロマチン高次構造 細胞分化 転写因子 樹状細胞 単球

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において、ゲノム配列が同じなのに膨大な種類の細胞が存在するのは、分化の際に系譜特異的転写因子が各細胞種特有の遺伝子発現パターンを確立するからである。単核貪食細胞系は単球 (Mo)・マクロファージならびに樹状細胞 (DC) を含み、自然免疫応答に加えて抗原提示により獲得免疫を発動する役割を持ち、様々な疾患への関与 (免疫不全、自己免疫疾患、がん、動脈硬化など) も注目されている。

本研究代表者の一貫した研究テーマは単核貪食細胞の分化・応答における転写因子による遺伝子発現制御機構である (①など)。そして転写因子 IRF8 が単核貪食細胞の分化に必須であることを世界に先駆けて示した (②など)。IRF8 を欠損したマウスやヒトは Mo や DC の分化障害によって免疫不全と好中球 (Neu) の増多を生じる。さらに私たちは IRF8 が他の転写因子とネットワークを形成しながら前駆細胞におけるエンハンサーランドスケープを確立し、それが将来の遺伝子発現への布石となって分化を制御することを見出してきた (③など)。

これらの成果は IRF8 と慢性骨髄性白血病との関わりや、IRF8 の標的遺伝子の一つである IRF5 と自己免疫疾患全身性エリテマトーデスの関わりなど病態解明と新規治療法開発研究にも繋がった。さらに最近では single cellRNA-seq を用いて、DC の早期コミットメントモデルにおける IRF8 の役割を明らかにした (④)。しかしながら、私たちの研究を含めこれまでの解析の多くは「エンハンサーは直近の遺伝子の発現を制御している」という大雑把な前提でなされている。すなわち決定的に欠けているのが、エンハンサー・プロモーター相互作用などクロマチン高次構造変化の理解であった。

2. 研究の目的

本研究では *Irf8* 遺伝子をモデルとして、エンハンサー・プロモーター相互作用を高解像度に解析し、その相互作用の細胞分化における役割を明らかにする目的で研究を行った。IRF8 は多能性造血前駆細胞 (LMPP) の一部の分画から発現し始め、単核貪食細胞の前駆細胞でさらに誘導される。DC 中でも IRF8 は cDC1 サブセットの産生に特に重要である。IRF8 の発現量は cDC1 の分化段階特異的に *Irf8* 遺伝子の +56 kb 下流に存在するエンハンサー (+56 kb エンハンサー)、+41 kb および +32 kb エンハンサーによって制御される。本研究では、クロマチン高次構造の高解像度解析、エンハンサー欠損マウスでの前駆細胞や cDC1 の解析、外来 IRF8 の導入による cDC1 分化とトランスクリプトームの救済実験を行うことで、*Irf8* 3' エンハンサーの物理的・機能的な相互作用の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) *Irf8* エンハンサー欠損マウスは私たちが樹立し、⑤で報告した系統を用いた。造血幹前駆細胞ならびに成熟 DC は骨髄または脾臓から分離し、フローサイトメトリーによって解析を行った。エンハンサーの活性化の評価は CUT&Tag 法を用いて H3K27ac を解析することで行った。

(2) *Irf8* 遺伝子座でのクロマチン高次構造の高解像度解析には、Tiled-C 法を用いた。*Irf8* 遺伝子を中心とした 3 Mb 領域に含まれる DpnII 断片領域に設計した RNA プローブを用いて、⑥の手法によって調整した Hi-C ライブラリーを濃縮し、シーケンス解析を行った。

(3) *Irf8* エンハンサー欠損 cDC1 の救済実験は、造血幹前駆細胞へレトロウイルスを用いて外来 *Irf8* 遺伝子を導入することで行った。レトロウイルスを導入した造血前駆細胞は *in vitro* にてヒト Flt3 リガンドの存在下で培養することで cDC1 分化を誘導した。

4. 研究成果

(1) cDC1 分化における *Irf8* エンハンサー活性化

初めに、cDC1 の分化過程において *Irf8* 遺伝子座の 3 個のエンハンサーがどのように活性化するかを評価した。この評価では CUT&Tag 法を用いて H3K27ac の蓄積を解析した。cDC1 直前の前駆細胞 (pre-cDC1) で機能する +41 kb と +32 kb エンハンサーは確かに pre-cDC1 の段階で活性化することに加え、上流の前駆細胞段階で機能する +56 kb エンハンサーもまた cDC1 の段階まで H3K27ac が蓄積し活性化していることが明らかとなった (図 1)。これらの結果から cDC1 の最終分化でも +56 kb エンハンサーが機能する可能性が示唆された。

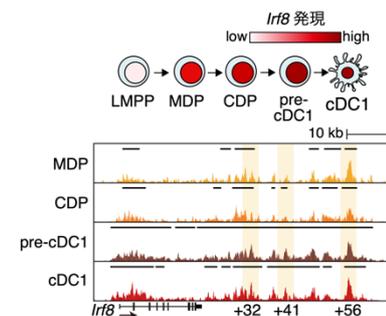


図 1 cDC1 分化における 3 個の *Irf8* エンハンサーの活性化

(2) *Irf8* 遺伝子座のクロマチン高次構造の高解像度解析

次に *Irf8* 遺伝子座でのクロマチン高次構造を解析することで物理的な相互作用を評価した。この評価では上流の前駆細胞である LMPP から cDC1 まで Tiled-C 法によって高解像度解析を行

った。この解析によって *Irf8* 遺伝子を含む大きなクロマチンドメインが LMPP の段階から形成され、cDC1 の分化に伴い *Irf8* 遺伝子と *Irf8* エンハンサー、ならびに *Irf8* エンハンサー同士の相互作用が増強することが明らかとなった (図 2)。これらの結果から cDC1 の分化過程において *Irf8* エンハンサーと *Irf8* 遺伝子、さらには *Irf8* エンハンサー同士が直接的に相互作用し、機能することが示唆された。

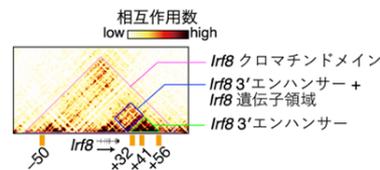


図 2 cDC1 分化において形成される *Irf8* 遺伝子座のクロマチン相互作用

(3) *Irf8* ヘテロ欠損マウスを用いたエンハンサー間の機能的相互作用の解析

さらに、*Irf8* エンハンサー同士が機能的な相互作用を持つかについて解析を試みた。しかし +56 kb と +32 kb エンハンサーもホモ欠損マウスでは解析対象である cDC1 が消失してしまうため、解析が不可能であった。そこで、*Irf8* エンハンサーのヘテロ欠損マウスで産生される cDC1 を利用して、cDC1 における *Irf8* エンハンサーの機能的な相互作用を解析した。解析の結果、前駆細胞における +56 kb エンハンサーの欠損は、+41 および +32 kb エンハンサーの活性化を減弱させ、一方 cDC1 における +32 kb エンハンサーの欠損は +56 および +41 kb エンハンサーの活性を低下させることが明らかとなった。これらの結果から、*Irf8* エンハンサーは物理的な相互作用に加え、機能的な相互作用を持つことが示唆された。

(4) *Irf8* エンハンサー間相互作用における *trans* 効果と *cis* 効果

この機能的な相互作用には、クロマチン高次構造を介した *cis* 効果と、IRF8 や他の転写因子を介した *trans* 効果の二つが考えられる。この検証のために、*Irf8* エンハンサー欠損マウス由来の造血幹前駆細胞に IRF8 を導入することで、cDC1 分化と遺伝子発現を救済し、*Irf8* エンハンサーの活性化を解析した。その結果、+56 kb エンハンサーは主に IRF8 とその他の転写因子を介した *trans* 効果によって、+32 kb エンハンサーは強力な *cis* 効果によって、それぞれ他の *Irf8* エンハンサーへ作用することが明らかとなった (図 3)。

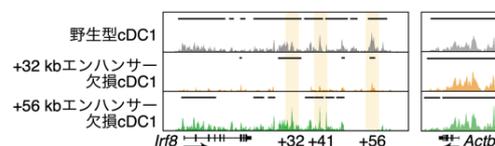


図 3 外来 IRF8 の導入で救済したエンハンサー欠損 cDC1 でのエンハンサー活性化

(5) 生体における *Irf8* エンハンサー間の相互作用の評価

最後に、マウス生体での cDC1 分化における *Irf8* エンハンサー間相互作用を評価した。+56 kb および +32 kb エンハンサーの欠損マウスを掛け合わせ、+56 kb と +32 kb エンハンサーを対立遺伝子の片方ずつで欠損したマウスを解析した。その結果、このマウスは *Irf8* エンハンサーのヘテロ欠損マウスや +32 kb エンハンサーのホモ欠損マウスよりも、重篤な分化不全を生じており、生体での cDC1 分化においても *Irf8* エンハンサー間の相互作用が必須であることが確認された。

(6) 考察

本研究では、*Irf8* 遺伝子の発現を制御する複数のエンハンサー間の相互活性化が、分化段階によって異なるメカニズムで生じることが明らかとなった (図 4)。直接的な *cis* 効果は物理的に結合すれば確実に生じるのに対し、間接的な *trans* 効果は複数の転写因子が形成するネットワークによって生じるため、その作用には柔軟に調節される自由度を持つことができる。もし前駆細胞から機能する +56 kb エンハンサーが *cis* 効果で下流のエンハンサーを自動的に活性化すると、前駆細胞は全て IRF8 の高発現が誘導され cDC1 に分化してしまい、IRF8 の低発現あるいは IRF8 発現が無い場合に産生される Mo や Neu の分化が阻害されると考えられる。すなわち複数の細胞種への分化能を持つ前駆細胞と、運命がすでに決定された細胞とでは、エンハンサー相互作用の機序が異なることは非常に合目的である。このような調節は他の細胞種への分化でも用いられる普遍的な仕組みと予想され、更なる研究で明らかになることが期待される。本研究の成果は、Cell Reports 誌に発表された (7)。

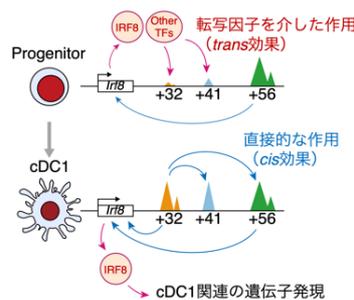


図 4 cDC1 分化における *Irf8* エンハンサー間の相互作用のモデル

<引用文献>

- ① Tamura T et al, Annu Rev Immunol 26:535-84, 2008
- ② Tamura T et al, Immunity 13(2):155-65, 2000
- ③ Kurotaki D et al, Cell Rep 22(10):2628-2641, 2018
- ④ Kurotaki D et al, Blood 133(17):1803-1813, 2019
- ⑤ Murakami K et al, Nat Immunol 22(3):301-311, 2021
- ⑥ Kurotaki D et al, Proc Natl Acad Sci USA 119(34):e2207009119, 2022
- ⑦ Yamasaki T et al, Cell Rep 43(4):114107, 2024

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Harada I, Sasaki H, Murakami K, Nishiyama A, Nakabayashi J, Ichino M, Miyazaki T, Kumagai K, Matsumoto K, Hagihara M, Kawase W, Tachibana T, Tanaka M, Saito T, Kanamori H, Fujita H, Fujisawa S, Nakajima H, Tamura T	4. 巻 11
2. 論文標題 Compromised anti-tumor-immune features of myeloid cell components in chronic myeloid leukemia patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97371-8	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, Kikuchi Kenta, Cui Kairong, Kawase Wataru, Saeki Keita, Fukumoto Junpei, Nishiyama Akira, Nagamune Kisaburo, Zhao Keji, Ozato Keiko, Rocha Pedro P., Tamura Tomohiko	4. 巻 119
2. 論文標題 Chromatin structure undergoes global and local reorganization during murine dendritic cell development and activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2207009119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2207009119	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 Yamasaki Takaya, Nishiyama Akira, Kurogi Nagomi, Nishimura Koutarou, Nishida Shion, Kurotaki Daisuke, Ban Tatsuma, Ramilowski Jordan A., Ozato Keiko, Toyoda Atsushi, Tamura Tomohiko	4. 巻 43
2. 論文標題 Physical and functional interaction among Irf8 enhancers during dendritic cell differentiation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 114107 ~ 114107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2024.114107	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15件（うち招待講演 7件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tomohiko Tamura
2. 発表標題 IRF5 as a target of treatment for systemic lupus erythematosus
3. 学会等名 Cytokines 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiko Tamura
2. 発表標題 Myeloid cells: new developmental mechanisms and functions Overview talk
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiko Tamura
2. 発表標題 The transcription factor IRF8 and chromatin in the regulation of myeloid cell development
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiko Tamura
2. 発表標題 The transcription factor IRF8 and chromatin in myeloid cell development
3. 学会等名 JSPS Core to Core Program Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomohiko Tamura
2. 発表標題 Dynamic changes in higher-order chromatin structures and the role of IRF8 during dendritic cell development and activation
3. 学会等名 JSICR MNCB 2022 Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎貴弥, 西村耕太郎, 西山 晃, 田村智彦
2. 発表標題 樹状細胞分化におけるIrf8遺伝子発現を制御するエンハンサー群の相互作用
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamasaki T, Nishiyama A, Tamura T
2. 発表標題 Novel mechanisms for the regulation of Irf8 gene expression during dendritic cell differentiation
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎貴弥, 西山 晃, 黒木心和, 田村智彦
2. 発表標題 樹状細胞分化においてIrf8遺伝子発現を誘導するエンハンサー群の動的制御機構の解明
3. 学会等名 第27回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiko Tamura
2. 発表標題 Chromatin and the transcription factor IRF8 in the regulation of myeloid cell development
3. 学会等名 NUS-Kanagawa Cancer Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiko Tamura
2. 発表標題 Chromatin and the transcription factor IRF8 in the regulation of dendritic cell differentiation
3. 学会等名 EMDS2023@VIB conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西山 晃, 山崎貴弥, 田村智彦
2. 発表標題 細胞分化におけるIrf8エンハンサークラスターのシス/トランス制御が複合した相互活性化
3. 学会等名 第16回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎貴弥, 西山 晃, 黒木心和, 田村智彦
2. 発表標題 樹状細胞分化におけるIrf8エンハンサーの物理的かつ機能的な協調作用によるIrf8発現の制御
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西山 晃, 山崎貴弥, 田村智彦
2. 発表標題 エンハンサー群の協調機構が樹状細胞分化に必須の転写因子IRF8の発現を最適化する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takaya Yamasaki, Akira Nishiyama, Tomohiko Tamura
2. 発表標題 Physical and functional interaction among Irf8 enhancers during dendritic cell differentiation
3. 学会等名 第53回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西山 晃, 山崎貴弥, 田村智彦
2. 発表標題 単核貪食細胞分化における DNAメチル化に着目したエピゲノム解析
3. 学会等名 第28回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>横浜市立大学 免疫学教室 https://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/ 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的医学共同研究拠点」 https://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~kyoudou/kyoudou_wp/</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	黒滝 大翼 (Kurotaki Daisuke) (10568455)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	ラミロフスキー ジョーダン (Ramilowski Jordan) (10627269)	横浜市立大学・先端医科学研究センター・准教授 (22701)	
研究 分 担 者	西山 晃 (Nishiyama Akira) (80589664)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関