

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20778

研究課題名（和文）胎生マクロファージ分化におけるクロマチン高次構造解析

研究課題名（英文）Analysis of higher order chromatin structure in embryonic macrophage differentiation

研究代表者

菊池 健太（Kikuchi, Kenta）

熊本大学・国際先端医学研究機構・特別研究員（PD）

研究者番号：60907939

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：マクロファージを含む単核貪食細胞は機能的に極めて多様な集団である。しかし、そのような違いが如何なる分子機構により制御されているのが解明されていない。本研究で我々は、単核貪食細胞の分化過程におけるクロマチン高次構造変化について解析した。その結果、単核貪食細胞の分化過程において系譜特異的遺伝子領域に核内コンパートメントやトポジカル関連ドメインを含むクロマチン高次構造が形成されることを見出した。さらにこれらの一部は系譜特異的転写因子により制御されることがわかった。今後は形成されたクロマチン高次構造が遺伝子発現制御にどう関わるのかについて解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージを含む単核貪食細胞は全身に分布し、極めて多様な役割があり、疾患発症にも関与する。単核貪食細胞の性質に発生経路の違いが与える影響については未だ結論がでておらず、この分野における重要な問題点である。本研究では、系譜特異的遺伝子領域におけるクロマチン高次構造の事前形成が単核貪食細胞の機能発現に重要であることを示した。この知見は、細胞のクロマチン高次構造を解析し、構造形成に関与する転写因子やクロマチン制御因子を同定することが、機能を制御する根幹のメカニズム解明につながることを示唆する。単核貪食細胞の形質決定に重要な分子を同定できれば、疾患の新規治療法の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Mononuclear phagocytes, including macrophages, are functionally diverse. However, molecular mechanisms underlying such differences remain unclear. In this study, we analyzed the changes in the higher-order chromatin structures of mononuclear phagocytes during differentiation. We found that higher-order chromatin structures including nuclear compartments and topologically associating domains in the regions of mononuclear phagocyte lineage-specific genes are reorganized during differentiation. Furthermore, some of these structures are regulated by lineage-specific transcription factors. We analyze how the established higher-order chromatin structures are involved in gene regulation.

研究分野：免疫学

キーワード：クロマチン高次構造 マクロファージ 分化 機能

1. 研究開始当初の背景

マクロファージや樹状細胞 (DC) を含む単核貪食細胞は炎症の誘導や組織恒常性の維持等に重要な役割を担っている。そのため、単核貪食細胞の分化や機能発現の分子メカニズムを理解し制御することができれば、炎症性疾患など様々な疾患の治療法開発につながる可能性がある。近年のマウスを用いた系譜追跡実験により、成体に存在する単核貪食細胞は胎生期前駆細胞に由来するものと造血幹細胞に由来するものがあることが分かってきた (Ginhoux et al. *Immunity* 2016)。これらの単核貪食細胞亜集団は、遺伝子発現プロファイルや表面マーカー、さらに機能も異なる。しかし、発生経路の違いにより単核貪食細胞の機能に差異が生じる分子機序は不明である。

細胞の性質はその細胞種に特徴的な遺伝子発現パターンが形成されることにより決定され、転写因子はそれに必須の役割を担っている。我々はこれまでに転写因子による遺伝子発現制御を切り口に、単球、マクロファージ、DC の分化や機能の分子メカニズムについて解析を進めてきた。最近、我々は造血前駆細胞から DC への各分化段階において ChIP-seq、ATAC-seq、さらに網羅的クロマチン高次構造解析 Hi-C を行った。その結果、DC 前駆細胞においてクロマチン高次構造の変化が誘導され、最終的に DC 特異的遺伝子の発現が生じることを発見した (Murakami et al. *Nat Immunol* 2021; Kurotaki et al. *Blood* 2019; Kikuchi et al. *J Immunol* 2018; Ikeda et al. *Sci Immunol* 2018)。このことは、クロマチン高次構造などのエピゲノム変化が前駆細胞の段階で誘導されることで単核貪食細胞への系譜決定が生じることを示す。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて我々は、単核貪食細胞分化において、クロマチン高次構造を含むエピゲノム変化と、遺伝子発現との関係やその制御機構を明らかにすることで、単核貪食細胞の heterogeneity を規定する根幹のメカニズムを明らかにできると考えた。本研究では、まず骨髓由来単核貪食細胞前駆細胞と成熟単核貪食細胞を用いてクロマチン高次構造を含むエピゲノム解析や遺伝子発現解析を網羅的に行い、骨髓造血幹細胞由来単核貪食細胞固有の遺伝子発現制御機構やその制御因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

単核貪食細胞前駆細胞及び成熟単核貪食細胞をマウス生体から磁気ビーズ及びセルソーターにより分離し、複数の手法を用いてエピゲノム解析と遺伝子発現解析を行った。具体的には、Hi-C、ヒストン H3 リジン 27 アセチル化 (H3K27ac) の ChIP-seq、ATAC-seq、RNA-seq 等の次世代シーケンスを行った。続いて、これらのデータを統合解析し、単核貪食細胞系譜特異的遺伝子領域に生じるエピゲノム変化と、エピゲノム変化領域における遺伝子発現の相関を調べた。エピゲノム変化と遺伝子発現変化が見られた領域に着目し、パスウェイ解析やオープンクロマチン領域の DNA モチーフ解析により、単核貪食細胞亜集団の性質決定に關与する転写因子やクロマチン制御因子を予測した。

4. 研究成果

(1) 核内コンパートメントは前駆細胞段階で変化する

核内コンパートメントは転写活性型の A コンパートメントと転写抑制型の B コンパートメントで構成されるクロマチン高次構造の一種である。単核貪食細胞分化におけるクロマチン高次構造変化を調べるために、マウスから複数段階の単核貪食細胞前駆細胞(LMPP, MDP, CDP)と成熟単核貪食細胞(DC、単球)を単離し、Hi-C, H3K27ac ChIP-seq, RNA-seq のデータを取得した。Hi-C のデータを用いて、全ゲノムを 25 kb ごとに区切り、PC1 値を算出することにより、それぞれの領域が A コンパートメントと B コンパートメントのどちらに属するか同定した。k-means クラスタリングにより、分化が進むにつれてコンパートメントが B から A に変化する (B to A) 領域、A から B に変化する (A to B) 領域を発見した。この領域におけるエピゲノム変化と遺伝子発現の時間的相関性を調べるため、H3K27ac と RNA-seq のデータを統合して解析したところ、B to A 領域では MDP の段階でヒストンアセチル化が生じ、CDP の段階でコンパートメントが変化し、単核貪食細胞で遺伝子発現が誘導された。一方、A to B 領域では MDP で遺伝子発現の抑制とコンパートメント変化、単核貪食細胞でヒストン脱アセチル化が生じており、A to B 領域とは逆の順番の変化が見られた (図 1)。これらのデータは、成熟単核貪食細胞における遺伝子発現には前駆細胞段階で核内コンパートメント変化やヒストンアセチル化等のエピゲノム変化が必要なことを示唆する。

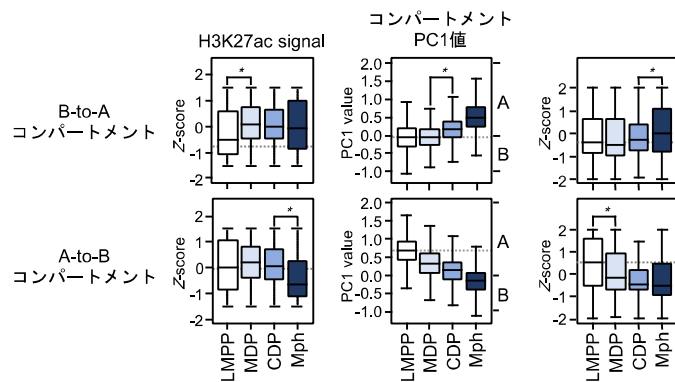


図 1: 分化に伴う核内コンパートメント変化領域の解析
B to A コンパートメント (上段) と **A to B** コンパートメント (下段) における **H3K27ac** 蓄積量 (左)、**PC1** 値 (中央) mRNA 発現量 (右)。前駆細胞は **LMPP, MDP, CDP**、単核貪食細胞は **Mph** と表す。

(2) TAD 内相互作用は遺伝子発現と同時に増強する

次に、単核貪食細胞分化過程における TAD 内相互作用の変化を調べた。Hi-C で同定可能なクロマチン高次構造は、核内コンパートメントとは別に、トポロジカル関連ドメイン (TAD) が知られている。TAD はコヒーシオン複合体と CTCF によるループ押し出しによって形成される構造である。それぞれの細胞種に存在する TAD を統合し、k-means クラスタ解析したところ、TAD は細胞種特異的に確立することが分かった。そこで、成熟単核貪食細胞で TAD が形成される領域に着目し、H3K27ac, RNA-seq のデータを統合解析することで、各イベントの時間的相関を検討した。その結果、MDP でヒストンアセチル化、成熟単核貪食細胞で TAD 内相互作用の増強と遺伝子発現が生じることが分かった (図 2)。この結果は、単核貪食細胞特異的 TAD の形成が遺伝子発現と密接に関わる可能性を示唆する。

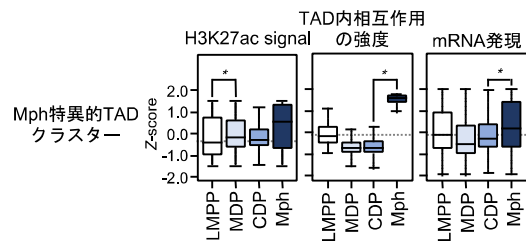


図 2: 成熟単核貪食細胞特異的 TAD の解析
 各分化段階における **TAD** を同定し、**k-means** により成熟単核貪食細胞で形成される **TAD** が存在するクラスターを抽出し、**H3K27ac** 蓄積量 (左)、**TAD** 内相互作用の強度 (中央)、**mRNA** 発現量 (右) を解析し

(3) 転写因子 IRF8 はコンパートメント変化を誘導する

これまでの解析で、前駆細胞における核内コンパートメント変化が系譜特異的遺伝子の発現に必要な可能性を示した。そこで、コンパートメント変化を誘導する要因を探るために、単核貪食細胞前駆細胞において、B to A コンパートメントに存在するオープンクロマチン領域を ATAC-seq により同定し、*de novo* モチーフ解析を行った。PU.1, CTCF, RUNX 結合モチーフは全ての前駆細胞で検出されたが、PU.1-IRF 複合エレメントは MDP と CDP で有意に濃縮されていた。また、IRF ファミリー転写因子の遺伝子発現レベルは、*Irf8* のみ MDP と CDP で高発現していた（図 3）。これらの結果から IRF8 が B to A コンパートメント変化を誘導すると予想し、*Irf8* 遺伝子欠損マウスから MDP を単離して Hi-C および IRF8 ChIP-seq を行った。その結果、野生型 MDP で IRF8 が結合していた 4447 のゲノム領域のうち、942 領域で LMPP から MDP への分化に伴うコンパートメント変化が生じていないことが分かった（図 4）。これらの結果は、IRF8 が単核貪食細胞前駆細胞において B to A コンパートメント変化を促進し、単核貪食細胞系譜特異的遺伝子発現を活性化することを示す。

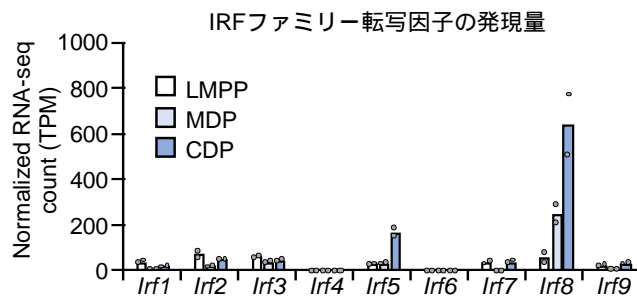


図 3: 単核貪食細胞前駆細胞における IRF ファミリー転写因子の発現
各分化段階の前駆細胞集団における遺伝子発現量を RNA-seq により定量した。

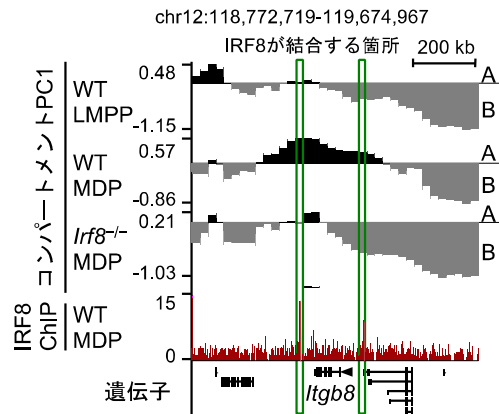


図 4: IRF8 ノックアウト細胞の核内コンパートメント解析
B to A コンパートメント変化が IRF8⁺細胞で生じなかった領域の代表例。図に示す DNA 領域では緑枠で囲った箇所に IRF8 が結合する。野生型 LMPP に見られる B コンパートメントは、MDP に分化すると A コンパートメントに変化する。IRF8^{-/-} MDP ではコンパートメント変化が生じない。

(4) 考察

本研究成果では、骨髄造血幹細胞由来単核貪食細胞前駆細胞において、転写因子がクロマチン高次変化を誘導することで、系譜特異的遺伝子の発現を活性化することを明らかにした。今後も引き続き、この手法を用いて胎生由来単核貪食細胞の分化・機能を制御する転写因子を探索し、由来の異なる単核貪食細胞の形質決定メカニズムの解明を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kenta Kikuchi, Daisuke Kurotaki, Wataru Kawase, Junpei Fukumoto, Kisaburo Nagamune, Keji Zhao, Keiko Ozato, Pedro Rocha, Tomohiko Tamura
2. 発表標題 3D chromatin structure of host defense-related genes is pre-established during DC differentiation
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

感染防御やがん免疫に重要な樹状細胞の分化成熟におけるDNA折り畳み構造を初めて解明 https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20220818
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------