

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590343

研究課題名(和文) 転写因子 IRF8 と cAMP 経路に共通するマクロファージ分化基本分子機構の解析

研究課題名(英文) Shared mechanisms of the transcription factor IRF8 and the cAMP pathway in macrophage differentiation

研究代表者

西山 晃 (NISHIYAMA, Akira)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80589664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：細胞分化には、各系譜に特異的な転写因子による適切な遺伝子発現が必須であり、その破綻が免疫不全やがんなどの疾患を引き起こす。転写因子 IRF8 は単球を含む血球細胞分化に必須であり、慢性骨髄性白血病の重要な制御因子と考えられている。本研究では IRF8 の機能解析を通じて血球細胞の分化機構を明らかにし、ひいては白血病の新規治療法の可能性を探ることを目標とした。IRF8 の遺伝子導入等の複数のマクロファージ分化系で遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、共通に発現が誘導される転写因子を同定し、それらの遺伝子導入により IRF8 を介さないマクロファージ分化を達成した。

研究成果の概要(英文)：Cell differentiation requires appropriate changes in gene expression patterns, which are tightly regulated by cell type-specific transcription factors. Dysregulation of these processes can result in disorders including leukemias. IRF8 is a hematopoietic transcription factor that regulates the development of multiple immune cell types, and also it is considered as an important regulatory factor for chronic myelogenous leukemia. In this study, we have investigated the differentiation program of myeloid cells by functional analyses of IRF8 with the aim of the future clinical application for chronic myelogenous leukemia. We performed gene expression profiling of macrophage differentiation induced by multiple procedures including IRF8 ectopic expression. We found the common transcription factors in macrophage differentiation induced by multiple procedures. Indeed, the ectopic expression of these transcription factors induced macrophage differentiation without IRF8 expression.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達 血球分化 転写因子

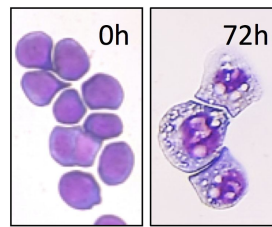
1. 研究開始当初の背景

造血系細胞を含む、多細胞生物の細胞分化においては、各系譜に特異的な転写因子によってしかるべき下流遺伝子の転写の活性化、あるいは抑制が行われていることが必須であり、そしてその制御機構が破綻するとがんなどの疾患を引き起こしうる事が知られている。造血系細胞においては、分化制御の破綻により引き起こされる悪性腫瘍として、白血病がある。特に慢性骨髄性白血病(CML)においては、染色体転座により Bcr/Abl 融合遺伝子が形成され、これによる細胞の不死化、さらには分化能の喪失が起こり、好中球の増加などミエロイド前駆細胞からの細胞分化の異常が知られている。

インターフェロン(IFN)系の転写因子 IFN regulatory factor 8 (IRF8)はミエロイド前駆細胞においてマクロファージへの分化を促進する一方、顆粒球への分化を抑制する (Tamura et al. *Immunity*, 2000, 13:155)。一方、その遺伝子欠損マウスが好中球の増加などのCML様の病態を呈することや、ヒトCML患者において、その発現が消失していること等から、IRF8がCML病態の重要な制御因子である可能性が示唆されている。また、IRF8がCMLの原因遺伝子である Bcr/Abl の癌化能に拮抗し、Mycの転写抑制因子である METS を誘導することによって、マクロファージ分化を生じると同時に細胞増殖停止を生じさせる事が示されている (Tamura et al. *Blood*, 2003, 102:4547)。CMLにおいてはこのIRF8の分化誘導機構および Bcr/Abl への抑制機構の破綻が一因となっていると考えられる。IRF8はマクロファージのみならず、最も強い抗原提示能を持つ樹状細胞の分化や機能においても重要な役割を果たしている (Tamura et al. *J Immunol.*, 2005, 174:2573)。

2. 研究の目的

IRF8 遺伝子欠損マウスより樹立したミエロイド前駆細胞株 Tot2 細胞は IRF8 の導入により速やかに増殖を停止し、機能的・形態的に成熟マクロファージに分化する (Tamura et al. *Immunity*, 2000, 13:155)。しかしながら、IRF8 の下流の分子機構を何らかの方法により活性化できれば、IRF8 を導入せずにマクロファージの分化を誘導できるのではと考え、また、IRF8 の発現が著減している CML における新たな治療法への応用を期待し、マクロファージ分化を誘導する薬剤の探索を行ってきた。その結果、興味深いことに、コレラトキシンや cAMP 派生物の db-cAMP が、IRF8 の導入無しにマクロファージ分化を誘導することを見いだした (第 1 図)。コレラトキシンは、三量体 GTPase に結合し、これによりアデニル酸サイクラーゼが活性化し、細胞内 cAMP 濃度が上昇する。この結果は、cAMP 経路が、IRF8 を導入せずにマクロファージの分化を促進させ、IRF8 の転写活性を相補できることを示唆している。



第 1 図 コレラトキシンによる Tot2 細胞の分化誘導

本研究においては、IRF8 導入によるマクロファージ分化と、コレラトキシンや cAMP 派生物によるマクロファージ分化との共通性を探ることにより、マクロファージ分化の基本的な分子機構を明らかにすることを目的とする。また、IRF8 を介さないマクロファージ分化機構の解析により、IRF8 の発現が著減している CML の病態における、血球細胞の分化促進の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子導入などによる *in vitro* でのマクロファージ分化の誘導

Irf8 欠損マウスより樹立したミエロイド前駆細胞株 Tot2 は転写因子 IRF8 の導入によりマクロファージへの分化が誘導される。Tot2 細胞のマクロファージ分化誘導には、組換えレトロウイルスによる遺伝子導入に加え、アデニル酸サイクラーゼを活性化するコレラトキシン処理を行った。

(2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

Tot2 細胞より精製した RNA から、オリゴ dT プライマーを使用し mRNA を鋳型とした Cy3 ラベル化 cRNA を合成した。これを Agilent 社製 Mouse Genome オリゴ DNA マイクロアレイにハイブリダイズし、Agilent 社製マイクロアレイスキャナーシステムにより蛍光強度を測定した。遺伝子発現解析には NIA array analysis software (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>) を用いた。

4. 研究成果

(1) コレラトキシンによる Tot2 細胞の分化誘導

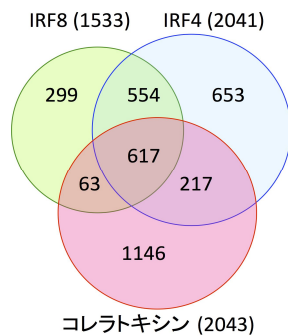
IRF8 の遺伝子導入をせずに、Tot2 細胞のマクロファージへの分化を誘導する薬剤の探索を行った結果、コレラトキシンや cAMP 派生物の db-cAMP がマクロファージ分化を誘導することを見いだした。コレラトキシンによる分化誘導については、Tot2 細胞への処理後、約 5 時間より形態変化が観察され、16 時間後にはマクロファージ様の形態を示した。これは、レトロウイルスによる IRF8 導入と比較し、非常に短時間で形態変化であり、コレラトキシンによる細胞内 cAMP 濃度の増加が引き起こすシグナル伝達系の活性化によるものと考えられる。

(2) コレラトキシンが誘導するマクロファージ分化のマイクロアレイ解析

このコレラトキシンによるマクロファージ分化の分子機構について検討するために、コレラトキシンを処理した Tot2 細胞のマイクロアレイ解析を行った。IRF8 導入によるマ

クロファージ分化との共通性を探るために、IRF8を導入したTot2細胞も用いた。さらに、cAMP経路の活性化はM2マクロファージを誘導することが知られており、またIRF8と同じインターフェロン系の転写因子であるIRF4も、M2マクロファージの誘導に重要である事が報告されている(Satoh et al. Nat. Immunol., 2010, 11:936)。IRF4導入もTot2細胞をマクロファージへと分化させることから(Yamamoto et al., PLoS One, 2011, 6:e25812) IRF4導入Tot2細胞も使い、3者の比較を行った。

これらの分化誘導により、それぞれ約1500~2000個の遺伝子の発現増加が認められた(第2図)。

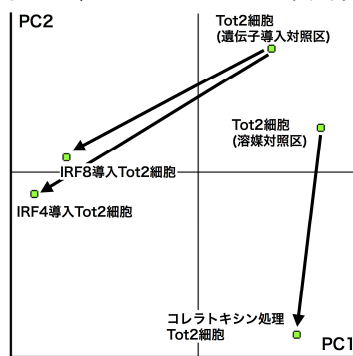


第2図 Tot2細胞の分化に伴い、発現が誘導される遺伝子数

IRF8ならびにIRF4により発現が誘導される遺伝子は半数以上がお互いに共通であった。一方、コレラトキシンとの共通遺伝子については、同じM2マクロファージを誘導するIRF4との共通遺伝子が若干多いが、3者の共通遺伝子が

特徴的に多い結果となった。

遺伝子発現全般から、3者の分化の共通性、ならびに特異性を理解するために、主成分分析を行った(第3図)。その結果、第一主成分には、IRFファミリー転写因子の導入による



第3図 マイクロアレイデータの主成分分析

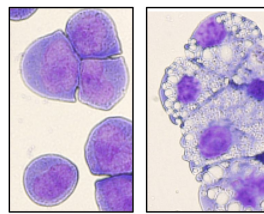
(遺伝子導入用いたレトロウイルスベクターの影響により、対照区間の乖離が生じたと考えられる。)

(3) IRF8の下流の転写因子によるマクロファージ分化

上記の発現誘導を示す遺伝子群の比較と主成分分析は同様の傾向を示した。このため初期の目標であるIRF8の下流の分子機構の解析のためには、3者に共通して発現誘導される遺伝子を解析する事が最も近道であると考えた。第2図に表される3者共通の617個の遺伝子には数多くの転写因子が含まれ

ており、IRF8のChIP-seqデータを参考に複数の候補を選択した(Kurotaki et al. Blood, 2013, 121:1839)。

IRF8と同様に候補転写因子をTot2細胞へ



対照区 候補転写因子導入細胞

第4図 候補転写因子の一つによるTot2細胞の分化誘導

と個々に導入し、マクロファージへの分化誘導を検討した。その結果、候補の内の複数の転写因子により、Tot2細胞のマクロファージ分化が確認された(第3図)。

今後はこれらの下流の転写因子を中心に、IRF8による血球細胞分化の分子機構の解析を進め、ひいてはCMLでの血球細胞の分化促進の可能性を探る。

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10件)

Watanabe T, Hotta C(2番目), Nishiyama A(13番目), Tamura T(17番目, 他13人): The transcription factor IRF8 counteracts BCR-ABL to rescue dendritic cell development in chronic myeloid leukemia. Cancer Res, 査読有, 73:6642-6653, 2013. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0802.

Sarai N, Tamura T(3番目, 他6人): WHSC1 links transcription elongation to HIRA-mediated histone H3.3 deposition. EMBO J. 査読有, 32:2392-2406, 2013. doi: 10.1038/emboj.2013.176.

Patel MC, Tamura T(8番目, 他7人): BRD4 coordinates recruitment of pause-release factor P-TEFb and the pausing complex NELF/DSIF to regulate transcription elongation of interferon stimulated genes. Mol Cell Biol, 査読有, 33:2497-2507, 2013. doi: 10.1128/MCB.01180-12.

Iwasaki Y, Tamura T(7番目, 他8人): Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1 mediated IL-10 production in IL-27 stimulated CD4(+) T cells. Eur J Immunol, 査読有, 43:1-11, 2013. doi: 10.1002/eji.201242942.

Kurotaki D, Nishiyama A(3番目), Tamura T(13番目, 他10人): Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. Blood, 査読有, 121:1839-1849, 2013. doi:

10.1182/blood-2012-06-437863.
Nishiyama A(1 番目, 他 28 人):
Systematic repression of
transcription factors reveals
limited patterns of gene expression
changes in ES cells. *Scientific Rep.*,
査読有, 3:1390, 2013. doi:
10.1038/srep01390.
Nishiyama A(1 番目), Tamura T(3 番目,
他 3 人): Activation of JNK triggers
release of Brd4 from mitotic
chromosomes and mediates protection
from drug-induced mitotic stress.
PLoS One, 査読有, 7:e34719, 2012.
doi: 10.1371/journal.pone.0034719.
Correa-Cerro LS, Nishiyama A(4 番目,
他 17 人): Generation of mouse ES cell
lines engineered for the forced
induction of transcription factors.
Scientific Rep. 査読有, 1:167, 2011.
doi: 10.1038/srep00167.
Yamamoto M, Hotta C(3 番目),
Nishiyama A(4 番目), Ichino M(8 番目),
Tamura T(14 番目, 他 9 人): Shared and
distinct functions of the
transcription factors IRF4 and IRF8
in myeloid cell development. *PLoS ONE*,
査読有, 6:e25812, 2011. doi:
10.1371/journal.pone.0025812.
Sharov AA, Nishiyama A(2 番目, 他 6
人): Responsiveness of genes to
manipulation of transcription
factors in ES cells is associated with
histone modifications and tissue
specificity. *BMC Genomics*, 査読有,
12:102, 2011. doi:
10.1186/1471-2164-12-102.

[学会発表](計 1 1 件)

Nishiyama A, Ichino M, Tamura T et al.: IRF8 Inhibits the Activity of C/EBP to Restrain Monocyte-Dendritic Cell Progenitors from Differentiating into Neutrophils. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 13 日, 幕張メッセ(千葉県)
Nishiyama A, Tamura T et al.: A dynamic and long-range chromatin control of *Klf4* transcription by IRF8 in monocyte differentiation. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 11 日, 幕張メッセ(千葉県)
西山 晃, 田村智彦ら: 単球分化において転写因子 IRF8 が *Klf4* プロモーターと遠位エンハンサーの長距離間の相互活性化を誘導する. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日, 神戸国際会議場(兵庫県)
Nishiyama A, Tamura T et al.: A

dynamic and long-range chromatin control of *Klf4* transcription by IRF8 in monocyte differentiation. 12th Human Proteome Organization World Congress, 2013 年 9 月 16 日, パシフィコ横浜(神奈川県)
西山 晃, 田村智彦ら: M 期での転写メモリーとストレス応答における BRD4 の役割. 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 13 日, パシフィコ横浜(神奈川県)
黒滝大翼, 西山 晃, 田村智彦ら: ゲノム規模解析による単球分化に重要な IRF8-KLF4 転写因子カスケードの発見. 第 35 回分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日, 福岡国際会議場(福岡県)
Kurotaki D, Nishiyama A, Tamura T et al.: Genome-wide analyses revealed the IRF8-KLF4 transcription factor cascade during monocyte differentiation. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 2012 年 12 月 5 日, 神戸国際会議場(兵庫県)
Nishiyama A, Tamura T et al.: Activation of JNK mediates protection from drug-induced mitotic stress by triggering release of Brd4 from mitotic chromosome. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日, パシフィコ横浜(神奈川県)
Kurotaki D, Ichino M, Nishiyama A, Tamura T et al.: Regulation of the development of monocyte subsets by interferon regulatory factor 8. 第 40 回日本免疫学会学術総会, 2011 年 11 月 28 日, 幕張メッセ(千葉県)
Kurotaki D, Ichino M, Nishiyama A, Tamura T et al.: Selective regulation of monocyte subsets by the transcription factor Interferon Regulatory Factor 8. 9th Joint Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research and the International Cytokine Society, 2011 年 10 月 11 日, Firenze Fiera Congress and Exhibition Center (フィレンツェ, イタリア)
市野素英, 堀田千絵, 田村智彦: マラリアにおける樹状細胞分化の異常と転写因子 IRF ファミリー. 第 80 回日本寄生虫学会, 2011 年 7 月 18 日, 東京慈恵会医科大学(東京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

西山 晃 (NISHIYAMA, Akira)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80589664

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
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

市野 素英 (ICHINO, Motohide)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：60271368

堀田 千絵 (HOTTA, Chie)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：80363810
(平成23年度より平成24年度まで)