

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689042

研究課題名(和文) DNAメチル化によるT細胞系列への運命制御機構の解明

研究課題名(英文) Maintenance of T cell lineage commitment by DNA methylation

研究代表者

伊川 友活 (Tomokatsu, Ikawa)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60450392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の分化・系列決定過程における系列状態の維持にはクロマチンの修飾やDNAのメチル化などのエピジェネティック制御機構が深く関与している。しかしその詳細は明らかでない。本研究により、DNAのメチル化に重要な働きをするNp95がT細胞分化に必須であることを我々は見いだした。Np95のT細胞分化における機能を調べるために、T細胞特異的Np95欠損マウスを作成し解析したところ、T前駆細胞段階で分化が顕著に阻害されていた。このT前駆細胞では本来発現するはずのない遺伝子の発現が誘導されていた。このことから、DNAメチル化はT細胞分化過程において特にT前駆細胞の運命維持に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic regulations, such as chromatin modification or DNA methylation play key roles in the maintenance of committed cells during differentiation. However, exact mechanisms are yet to be determined. Here we found that the Np95, which is shown to regulate the DNA methylation, is critical for early T cell differentiation. The T cell development in thymus of T-cell specific Np95-deficient mice was severely impaired at the early differentiation stage. Derepression of genes which are not normally expressed in thymic T cell progenitors were found. These results suggest that the Np95 is essential for the maintenance of T cell fate.

研究分野：免疫学

キーワード：T細胞分化 運命決定 Np95 エピジェネティクス DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

T細胞を含む全ての血液・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T細胞にしかたない前駆細胞になる。この分化運命は、いったん決定されると厳格に維持される。この運命の維持にはクロマチン修飾やDNAメチル化などのエピジェネティックな制御機構が重要であると考えられるが、その詳細は明らかでなかった。申請者らはDNAのメチル化に必須であるNp95 (Uhrf1)がT細胞分化に重要であることを見いだした(未発表)。T細胞特異的Np95欠損マウスの胸腺を解析したところ、T細胞が未分化な段階で顕著に阻害されていたのである(図1)。Np95はDNA複製の際、既にメチル化されたDNAアリルに特異的に結合し、DNAを維持するために必要なメチル化酵素Dnmt1をDNA上に呼びこむ因子であるとされている。しかしT細胞分化における機能は不明であった。そこで、本研究ではT細胞特異的Np95欠損マウスやDnmt1欠損マウスを解析することにより、DNAメチル化によるT前駆細胞の運命維持機構を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

造血幹細胞は様々な系列決定過程を経て、最終的にT細胞にしかたない前駆細胞になる。申請者らは最近この最終的な系列決定にBcl11bという転写因子が必要であることを明らかにした(Ikawa et al. Science, 2010)。

一般に、細胞はひとたび系列決定が起こった後は他の系列へ分化することはない。系列決定状態の維持にはクロマチン修飾やDNAのメチル化などのエピジェネティックな機構が作用していると考えられる。しかし、T細胞系列へ決定された後の運命維持のメカニズムは知られていない。そこで、本研究では前駆細胞がT細胞系列へ決定された後の“T系列の細胞”としてのアイデンティティが維持されるメカニズムを解明することを目指す。具体的には、Np95のT細胞分化における標的遺伝子を解析することによって、T細胞系列への運命決定・維持にNp95を含めたDNAメチル化修飾がどのように関わっている

のかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、T細胞特異的Np95欠損マウスや独自に開発したT細胞分化培養系を用いてNp95のT細胞系列への運命決定や運命維持における役割、すなわちNp95の標的遺伝子を含めた分子機構を明らかにする。具体的には、以下の2項目を中心に研究を行う。

(1) Np95の標的遺伝子の解析

Np95欠損胸腺細胞の遺伝子発現プロファイルをコントロールの胸腺細胞と比較することにより、ゲノム網羅的に遺伝子発現を解析する。さらに網羅的なクロマチン免疫沈降法(ChIP-seq法)を用いてヒストンタンパクの修飾状態を調べたり、MeDIP-seq法を用いてDNAメチル化状態を調べることで標的遺伝子を絞り込む。次に、これら標的遺伝子候補の中から転写因子やエピジェネティック制御因子など興味深い遺伝子を抽出し、この機能を解析する。その際にはin vitroにおける培養系(TSt-4/DLL1ストローマ細胞との共培養系)を用いる。

(2) 培養系を用いたDNAメチル化のT細胞分化における研究

我々は、以前にB細胞分化に必須の転写因子であるE2AやEBF1の欠損マウスから多能前駆細胞株を作製した(Ikawa et al. Immunity 2004, Ikawa et al. JEM 2006)。これらの細胞はストローマ細胞と特定のサイトカイン依存的に増殖するだけでなく、B細胞以外の全ての細胞への分化能を維持している。これはいわば多能性血液前駆細胞株であり、このような細胞株は他に例を見ない。また、EBF1欠損造血前駆細胞をT細胞分化を支持するTSt-4/DLL1ストローマ細胞と共培養すると6日間でT細胞系列への決定を誘導できる。そこでこの培養系にDnmt1の特異的阻害剤であるRG108を加えることにより、DNAメチル化のT細胞系列への運命決定における役割を解析する。

4. 研究成果

(1) 胸腺細胞各分画におけるNp95のmRNAの発現パターンを調べたところ、CD4-CD8-(DN) CD4+CD8+(DP) CD4+CD8-(CD4SP)あるいはCD4-CD8+(CD8SP)と分化が進むにつれて発現が減少することが明らかとなった。DNの中でも特にDN3とDN4でNp95の発現が高いことから、T細胞系列への決定およびその運命維持に重要な働きをしていることが示唆された。そこで、Np95のT細胞分化における標的遺伝子を調べるために、LckCre-Np95f1/f1マウスおよびコントロールのNp95f1/f1マウス胸腺からDN3細胞をソーティングし、RNA-seq解析を行った。その結果、Np95欠損マウスのDN3細胞においてGfi1b, Irf7, Irf9などの発現が有意に上昇していた。これらの発現上昇は定量的RT-PCRを用いて確認された(図2)。またクロマチ

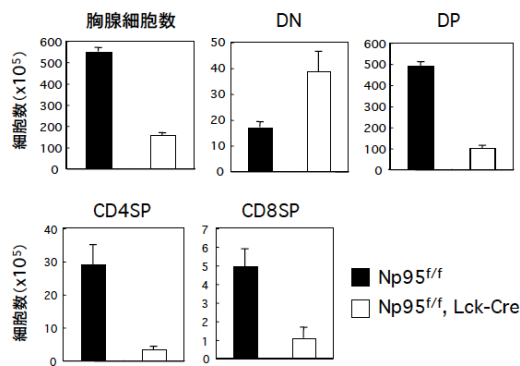


図1 Np95欠損マウスのT細胞分化障害

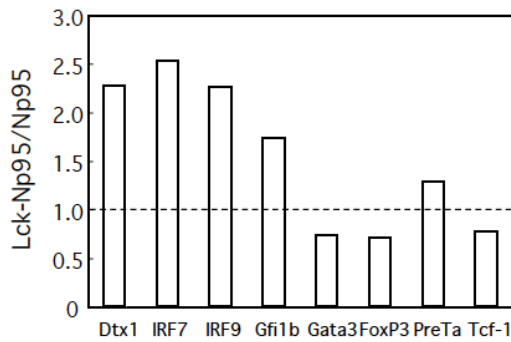


図2 Np95 欠損 DN3 細胞における遺伝子発現

ン免疫沈降を用いて胸腺 T 前駆細胞におけるヒストン H3K27me3 修飾を調べたところ、Np95 欠損マウスではこれらの遺伝子座において有意に減少していた。このことから Np95 は Irf7, Irf9 などの発現を抑制することによって T 細胞分化を促進していることが示唆された。

(2) Lckcre-Tg マウスを用いて T 細胞特異的 Dnmt1 欠損マウスを作成したところ、DN3 から DP 段階への T 細胞分化過程に異常が認められた (図3)。従って、DNA メチル化は DN2 までの運命決定には必須ではないが、それ以降の分化に重要であることが示唆された。次に Dnmt1, Np95 DKO マウスの胸腺を解析すると、細胞数はそれぞれ単独の欠損マウスと比べて更に細胞数が 1/3 程度に減少していた。正常な胸腺細胞と比べると約 1/20 に激減していた。また、T 細胞分化は DN 段階で停滞していた。DN 段階をさらに詳しく調べると主に DN3 段階で分化が停止していた。これらの結果から Dnmt1 と Np95 は互いに協調しながら T 細胞分化を促進していることが明らかとなった (図3)。

(3) EBF1 欠損造血前駆細胞を Tst-4/DLL1 ストローマ細胞と共培養し、T 細胞へ分化誘導を行った。ここへ Dnmt1 の特異的阻害剤である RG108 を添加した。6 日後に細胞を回収し FACS により表面抗原マーカーを調べたところ、コントロールの DMSO を加えた細胞は DN2 への分化が認められた。一方、RG108 を加えた細胞もコントロールと同程度に DN2 細胞が生成された。細胞数にも影響はなかった。このことは少なくとも多能前駆細胞から DN2 への T 系列への決定過程において Dnmt1 は必須でないこと

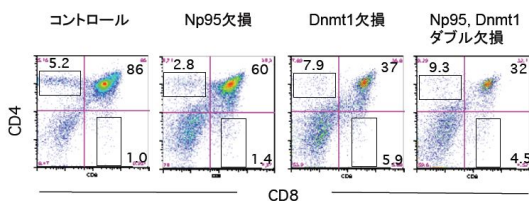


図3 Np95, Dnmt1 ダブル欠損マウスの胸腺細胞

を示唆している。この分化誘導系で MeDIP-chip 解析を行ったところ、どの遺伝子座においても DNA メチル化はそれほど変化していなかった。一方、先述したように T 細胞特異的 Dnmt1 欠損マウスの胸腺細胞では、DN3 から DP 段階への T 細胞分化過程に異常が認められた。従って、DNA メチル化は DN2 までの運命決定には必須ではないが、それ以降の分化に重要であることが示唆された。

## 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 11 件)

Arner E, Ikawa T ら (108 人中 36 番目). Gene regulation. Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. Science. 査読有、347:1010-1014, 2015

DOI: 10.1126/science.1259418.

Itoh-Nakadai A, Hikota R, Muto A, Kometani K, Watanabe-Matsui M, Sato Y, Kobayashi M, Nakamura A, Miura Y, Yano Y, Tashiro S, Sun J, Ikawa T, Ochiai K, Kurosaki T, Igarashi K\*. The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program. Nat Immunol. 査読有、12:1171-1180, 2014

DOI: 10.1038/ni.3024.

Hojyo S, Miyai T, Fujishiro H, Kawamura M, Yasuda T, Hijikata A, Bin BH, Irié T, Tanaka J, Atsumi T, Murakami M, Nakayama M, Ohara O, Himeno S, Yoshida H, Koseki H, Ikawa T, Mishima K, Fukada T\*. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、111:11786-91, 2014

DOI: 10.1073/pnas.1323557111.

Miyai T, Hojyo S, Ikawa T, Kawamura M, Irié T, Ogura H, Hijikata A, Bin BH, Yasuda T, Kitamura H, Nakayama M, Ohara O, Yoshida H, Koseki H, Mishima K, Fukada T\*. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、111(32):11780-5, 2014

DOI: 10.1073/pnas.1323549111

Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi, Tajima S, Matsumoto H, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K\*. The epigenetic regulator Uhrfl facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. Nat Immunol. 査読有、15: 571-579, 2014

DOI: 10.1038/ni.2886.

FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), Forrest AR\*, Ikawa T, ら (260人中102番目). A promoter-level mammalian expression atlas. Nature 査読有、507: 462-470, 2014

DOI: 10.1038/nature13182.

Hoshii T, Kasada A, Hatakeyama T, Ohtani M, Tadokoro Y, Naka K, Ikenoue T, Ikawa T, Kawamoto H, Fehling HJ, Araki K, Yamamura K, Matsuda S, Hirao A\*. Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockade in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 査読有、111: 3805-3810. 2014

DOI: 10.1073/pnas.1320265111.

Ikawa T\*. Genetic and epigenetic control of early lymphocyte development. **Curr Top Microbiol Immunol**. 査読無、381:1-20, 2014

DOI: 10.1007/82\_2014\_370.

**伊川友活**, 宮井智浩. B細胞系列への運命決定を制御する転写因子. 臨床免疫・アレルギー科 査読無、61:704-710, 2014

<http://www.kahyo.com/category/A1-MA>

Okuyama K, Ikawa T, Gentner B, Hozumi K, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A\*. MicroRNA-126-mediated control of cell fate in B-cell myeloid progenitors as a potential alternative to transcription factors. Proc Natl Acad Sci USA. 査読有、110: 13410-13415, 2013

DOI: 10.1073/pnas.1220710110.

Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S, Koseki H, Kawamoto H\*. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells. Cell Stem Cell. 査読有、12: 31-36, 2013

DOI: 10.1016/j.stem.2012.12.006.

〔学会発表〕(計 5件)

伊川友活 Epigenetic maintenance of T cell identity by Polycomb-mediated suppression of Pax5 日本免疫学会、2014年12月11日、京都府京都市 国立京都国際会館

伊川友活 T細胞系列への運命決定とエピジェネティクス、Legend セミナー 2014年12月9日、京都府京都市 ホテルグランピア京都

伊川友活 Maintenance of T cell identity by Polycomb group proteins France-Japan Immunology meeting、2014年10月23日、フランス カシス

伊川友活 細胞分化の研究に魅せられて新学術領域「細胞運命制御」若手の会 2014年4月18日、静岡県浜松市 浜名湖口イタルホテル

伊川友活 Epigenetic regulation in T cell lineage commitment、The 5<sup>th</sup> LJI&RCI Workshop 2013年10月30日 神奈川県横浜 理化学研究所

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.riken.jp/labo/45/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊川 友活 (IKAWA, Tomokatsu)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号: 60450392