

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790322

研究課題名(和文) 転写因子による単球分化制御機構の解明と動脈硬化病変形成への関与の検討

研究課題名(英文) Analysis of the role of transcription factors in monocyte development

研究代表者

黒滝 大翼 (Kurotaki, Daisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10568455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：IRF8-KLF4転写因子カスケードが単球分化に必須であることを見出した。IRF8依存性単球分化系においてIRF8は主にプロモーター遠位領域に結合し、エンハンサーを形成・増強することで、単球分化に重要な転写因子であるKLF4を含む単球関連遺伝子の発現を誘導する。IRF8欠損マウスの単核貪食細胞前駆細胞ではKLF4の発現が著減しており、KLF4欠損マウスよりも重度の単球分化不全を示すことがわかった。さらに単核貪食細胞前駆細胞においてIRF8は好中球分化を促進する転写因子であるC/EBP β のクロマチンへの結合を阻害することで、これら前駆細胞における好中球分化能喪失にも寄与することを発見した。

研究成果の概要(英文)：We found that the IRF8-KLF4 transcription factor cascade is essential for monocyte development. During IRF8-dependent monocyte differentiation, the chromatin binding of IRF8 at promoter-distal regions induces the establishment of enhancers marked by histone H3 lysine 4 monomethylation (H3K4me1), thereby promoting the expression of monocyte-related genes including KLF4, which is essential for Ly6C⁺ monocyte development. In IRF8-deficient mice, monocyte development is as defective as that in KLF4-deficient mice. Moreover, mononuclear phagocyte progenitors in IRF8-deficient mice do not express KLF4. We also found that IRF8 suppresses the chromatin binding of C/EBP β , the transcription factor that promotes neutrophil differentiation, to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils.

研究分野：免疫学

キーワード：単球分化 転写因子 IRF8

1. 研究開始当初の背景

単球 (Mo) はマクロファージや樹状細胞の前駆細胞として重要な役割を担っているが、Mo それ自体も生体防御応答や異物・死細胞の除去等に関与する。また Mo の過剰な産生や活性化は炎症時における組織障害やがんなど多くの疾患の悪化に関与することが明らかになっている。

骨髄の造血幹細胞 (HSC) は Mo 産生のためにミエロイド系共通前駆細胞 (CMP), 顆粒球-Mo 前駆細胞 (GMP) へと分化する。さらに GMP は、Mo と樹状細胞の共通の前駆細胞である Mo-樹状細胞前駆細胞 (MDP) へと分化し、この MDP から Mo が作られ、Mo は循環血中へと移動する。ヒトとマウスの Mo には少なくとも 2 種類のサブセットが存在することがわかっており、血管巡視性 Mo と炎症性 Mo に分類される。血管巡視性 Mo はマウスにおいて Ly6C (Gr-1 と呼ぶ) 陰性 CX3CR1 強陽性で、定常状態において血管の状態を監視し、炎症時には血管内壁に留まり炎症局所への好中球の動員に働く。一方、炎症性 Mo は Ly6C 陽性 CCR2 陽性であり、感染等が起こると速やかに組織へと浸潤し、TNF や IL-12 等のサイトカインを大量に産生する。炎症性疾患の病変部にはこの Ly6C 陽性 Mo が多数浸潤しており、炎症増悪化の原因となっている。つまり炎症性 Mo の機能及び分化を特異的に制御することができれば、種々の炎症性疾患の新規治療法開発につながる可能性がある。

転写因子 interferon regulatory factor-8 (IRF8) は免疫細胞に限局して発現し、特に自然免疫細胞の分化や応答に必須の役割があることを本教室の田村らが明らかにしてきた (Tamura et al. Annu. Rev. Immunol. 2008)。しかしながら Mo 及びその前駆細胞の分化や機能における IRF8 の役割は良くわかっていない。本研究者が IRF8 欠損マウスを用いて末梢血、脾臓及び骨髄の Mo をフローサイトメトリーで解析した結果、IRF8 欠損マウスでは Ly6C 陽性 Mo が消失していることを発見した。一方、Ly6C 陰性 Mo は IRF8 欠損マウスにおいて半減しているものの Ly6C 陽性 Mo に比較すれば確かに存在することがわかった。次に腹膜炎モデルの一つであるチオグリコレート培地投与による腹膜炎を誘導した。このモデルでは炎症に伴って Ly6C 陽性 Mo に由来する多数の炎症性マクロファージの腹腔内浸潤を認める。IRF8 欠損マウスでは野生型マウスと比較して、炎症性マクロファージの数が著しく減少していた。以上の結果から、IRF8 は Ly6C 陽性 Mo に由来する炎症性マクロファージの誘導に必須であることがわかった。しかし、IRF8 がどの前駆細胞段階でどのようにして Mo 分化を制御するのか不明である。

IRF8 欠損マウスで失われる Ly6C 陽性 Mo は動脈硬化を悪化させることが知られている。IRF8 欠損マウスにおいては Ly6C 陽性 Mo が著減することから動脈硬化性疾患の発症が抑

制される可能性が高いが、動脈硬化性疾患発症における IRF8 の役割は全くわかっていない。

2. 研究の目的

(1) IRF8 が如何にして前駆細胞から Ly6C 陽性 Mo への分化誘導を行うのかその分子メカニズムを解明する。

(2) 動脈硬化及び Ly6C 陽性 Mo が関与する疾患における IRF8 の役割を解明する。

3. 研究の方法

IRF8 による Mo 分化制御機構を *in vivo* 及び *in vitro* の実験手法を用いて包括的に解析する。まずフローサイトメトリーを用いて、骨髄に存在する Mo 前駆細胞を詳細に解析する。また前駆細胞や Mo における IRF8 の発現を細胞内染色や新たに導入した IRF8-GFP マウスにより詳細に検討する。IRF8 欠損マウスの骨髄細胞を放射線照射した野生型マウスに移植することで IRF8 が cell-intrinsic に Ly6C 陽性 Mo の分化に必要なか解析する。さらに IRF8 欠損マウス MDP を FACS Aria II を用いて sorting を行い、野生型マウスに養子移入する。これによって IRF8 欠損マウスの MDP から Ly6C 陽性 Mo の分化が抑制されているかどうかを調べる。野生型マウスの MDP, Ly6C 陽性 Mo, Ly6C 陰性 Mo, IRF8 欠損マウスの MDP, Ly6C 陰性 Mo を単離し、マイクロアレイ解析を行うことで IRF8 欠損に伴う遺伝子発現変化の詳細を解析する。本研究室が所有する骨髄ミエロイド前駆細胞株 (Tot2 細胞) を用いて、IRF8 が誘導する遺伝子のマイクロアレイ解析と抗 IRF8 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンズ解析 (ChIP-seq) を行い、さらに Mo や MDP のマイクロアレイ解析データと統合的解析を行う。それにより Mo 分化における IRF8 の遺伝子発現制御機構を検討する。

IRF8 欠損マウスと APOE 欠損マウスを交配して二重欠損マウスを作製したうえで、動脈硬化モデルを検討する。

4. 研究成果

(1) IRF8-KLF4 転写因子カスケードによる単球分化制御

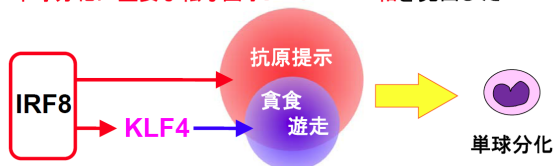
IRF8 依存的に Mo へ分化する骨髄前駆細胞株 (Tot2 細胞) を用いて、前駆細胞段階から Mo への分化初期における IRF8 のクロマチンへの結合を ChIP-seq により解析した。その結果、IRF8 結合はプロモーター近位 (転写開始点から 5 kb 以内) にも遠位 (転写開始点から 5 kb より遠く 300 kb 以内の領域) にも見られたが、いずれの場合も遺伝子発現誘導を伴っていたことから単球分化において IRF8 は転写活性化因子として機能することがわかった。さらにプロモーター遠位における IRF8 の結合はエンハンサーに特徴的なヒストン修飾であるヒストン H3 リジン 4 の単メチル化 (H3K4me1) と Ets ファミリー転写

因子 PU.1 の結合を著しく増強することから、IRF8 はエンハンサーの形成に関与することで遺伝子発現を制御することがわかった。IRF8 により発現が誘導される遺伝子約 2,100 個のうち、IRF8 が直接結合する遺伝子はその約半数であり、残りの遺伝子の発現誘導には IRF8 によって誘導される下流の転写因子が関与する可能性が考えられる。実際 IRF8 は *Klf6*, *Atf7*, *Irf5*, *Klf4* を含む 21 個の転写因子遺伝子の発現を 10 倍以上誘導する。これらの転写因子の中から IRF8 下流で単球分化に重要な役割を有する転写因子を同定するために、IRF8 の“間接的標的遺伝子”の遺伝子発現調節領域（プロモーター及び H3K4me1 陽性エンハンサー領域）において、転写因子の DNA 結合モチーフ解析を行ったところ、KLF4 の結合モチーフが最も高頻度に検出された。IRF8 は *Klf4* 遺伝子の転写開始点から 200 kb 以上離れた場所に H3K4me1 と PU.1 の結合を伴う広大なエンハンサー領域を形成する。さらに新規蛋白質合成なしに *Klf4* 遺伝子の発現を誘導することから、エンハンサーを形成することで *Klf4* 遺伝子を直接的に制御していると考えられた。

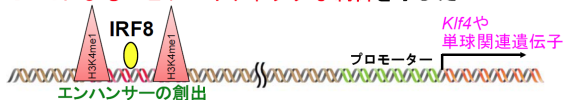
KLF4 欠損骨髓キメラマウスでは炎症を惹起するのに重要な Ly6C 陽性単球亜群が減少することが報告されている。もし IRF8 が体内単球分化において KLF4 の上流に位置する転写因子であるならば、IRF8 欠損マウスでは KLF4 の発現が消失し、その結果として Ly6C 陽性単球が減少するものと考えられる。実際、IRF8 欠損マウスでは単球分化の運命が決定される前駆細胞である MDP における *Klf4* 発現がほぼ完全に消失し、Ly6C 陽性単球が著減していた。

最後に Tot2 細胞に KLF4 を強制発現させると IRF8 誘導性遺伝子の約 3 分の 1 が誘導され、部分的ではあるが Mo 分化を生じた。これら KLF4 誘導遺伝子を用いて Gene ontology 解析を行ったところ、細胞遊走や食食関連の遺伝子が多く含まれることがわかった。しかし KLF4 導入により分化した単球は抗原提示関連遺伝子の発現が誘導できず、さらに CpG 等の刺激によっても IL-12 の産生ができないことがわかった。以上の結果は IRF8-KLF4 軸は Mo 分化に必須であるが、完全に機能的な Mo となるためには IRF8 そのものが必要であるということを示している (Kurotaki et al. Blood 2013)。

単球分化に重要な転写因子 IRF8-KLF4 軸を見出した



IRF8 によるエピジェネティックな制御を示した



(2) IRF8 による Mo 前駆細胞における好中球分化阻害のメカニズムを解明

IRF8 が Mo 系譜においてどの前駆細胞段階で発現するのか詳細に解析を行ったところ、IRF8 タンパク質は MDP の段階から急激に発現が増加し、その発現は cMoP (最近報告された樹状細胞分化能をもたない MDP 下流の Mo 前駆細胞) でも維持されることがわかった。さらに IRF8 欠損マウスでは野生型に比較して MDP や cMoP が著しく増加することがわかった。これらの結果から IRF8 は MDP や cMoP で発現することで Mo 分化を促進すると考えられる。

そこで IRF8 欠損マウスの MDP や cMoP を放射線照射した野生型マウスに移植し、その分化能を解析したところ、予想通り Mo 分化能が著しく減少していた。そして興味深いことにこれらの Mo 前駆細胞は本来は分化しないはずの好中球を大量に産生してしまうことがわかった。

IRF8 欠損マウスの MDP や cMoP において活性化状態にある因子をマイクロアレイデータから予測した結果、C/EBP ファミリーの転写因子がその候補にあがった。実際 IRF8 は MDP や cMoP において好中球分化を引き起こす機能を持つ転写因子である C/EBP α と結合し、C/EBP α の機能を制御することで、それらの Mo 前駆細胞における好中球分化能を抑制していることがわかった。このように IRF8 は MDP や cMoP において KLF4 を誘導し Mo 分化を促進するのみならず、好中球分化能を阻害することで MDP や cMoP の系譜決定に重要な役割があることが示された (Kurotaki et al. Nat Commun 2014)。

研究目的 (2) に関しては研究の準備段階において他の研究グループに先を越されてしまった (Döring et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012)。そのため、本研究課題では特に研究目的 (1) に関して詳細な解析を行い、その結果多くの成果をあげることができた。

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 7 件)

- ① Tamura T, Kurotaki D, Koizumi S. Regulation of myelopoiesis by the transcription factor IRF8. Int J Hematol, 2015, 101, 342-351, 査読有, DOI: 10.1007/s12185-015-1761-9.
- ② Kurotaki D, Uede T, Tamura T. Functions and development of red pulp macrophages. Microbiol Immunol, 2015, 59, 55-62, 査読有, DOI: 10.1111/1348-0421.12228.
- ③ Sasaki H*, Kurotaki D*, Osato N, Sato H, Sasaki I, Koizumi S, Wang H, Kaneda C, Nishiyama A, Kaisho T, Aburatani H, Morse HC 3rd, Ozato K, Tamura T. (*Co-first

authors) Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells. *Blood*, 2015, 125, 358-369, 査読有, DOI: 10.1182/blood-2014-02-557983.

- ④ Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ban T, Ichino M, Sasaki H, Matsunaga S, Yoshinari M, Ryo A, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. IRF8 inhibits C/EBP α activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nat Commun*, 2014, 5, 4978, 査読有, DOI: 10.1038/ncomms5978.
- ⑤ Watanabe T, Hotta C, Koizumi S, Miyashita K, Nakabayashi J, Kurotaki D, Sato GR, Yamamoto M, Nakazawa M, Fujita H, Sakai R, Fujisawa S, Nishiyama A, Ikezawa Z, Aihara M, Ishigatsubo Y, Tamura T. The transcription factor IRF8 counteracts BCR-ABL to rescue dendritic cell development in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res*, 73, 6642-6653, 2013, 査読有, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0802
- ⑥ 黒滝大翼, 田村智彦. Introduce My Article “Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation.” *臨床血液*, 2013, 54, 786, 査読無.
- ⑦ 黒滝大翼, 田村智彦. IRF8-KLF4 転写因子カスケードによる単球分化制御. *実験医学*, 2013, 31, 2971-2975, 査読無.
- ⑧ Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood*, 2013, 121, 1839-1849, 査読有, DOI: 10.1182/blood-2012-06-437863.

〔学会発表〕(計 24 件)

- ① 黒滝大翼, 山本道雄, 西山 晃, 宇野 和宏, 藩 龍馬, 市野素英, 佐々木 悠, 松永智子, 吉成正裕, 梁 明秀, 中澤正年, Keiko Ozato, 田村智彦. 転写因子 IRF8 は単球-樹状細胞前駆細胞において C/EBP α の機能を阻害し、好中球分化能の喪失をもたらす. 第 19 回造血器腫瘍研究会, グランデはがくれ (佐賀県佐賀市), 2015 年 1 月 23 日
- ② Sasaki H, Kurotaki D, Tamura T. Role of the transcription factor IRF8 in the developmental pathways of mast cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 京都国際会館 (京都府京都市), 2014 年 12 月 11 日
- ③ Sasaki H, Kurotaki D, Tamura T. Role of the transcription factor IRF8 in the developmental pathways of mast cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 京都国際会館 (京都府京都市), 2014 年 12 月 11 日

- ④ Sasaki H, Kurotaki D, Osato N, Sato H, Sasaki I, Wang H, Kaneda C, Nishiyama A, Kaisho T, Aburatani H, Morse HC III, Ozato K, Tamura T. The transcription factor IRF8 is essential for basophil development. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市), 2014 年 10 月 31 日
- ⑤ 西山 晃, 黒滝大翼, 田村智彦. 単球分化において転写因子 IRF8 が *Klf4* 遠位エンハンサーとプロモーターの段階的活性化を誘導する. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市), 2014 年 10 月 31 日
- ⑥ 西山 晃, 黒滝大翼, 中林 潤, 田村智彦. 単核貪食細胞群の分化機構に関する研究. 新学術研究ゲノム支援班会議, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市), 2014 年 8 月 21 日
- ⑦ 黒滝大翼, 大里直樹, 西山 晃, 山本道雄, 田村智彦. 単球分化に必須の IRF8-KLF4 転写因子カスケードの発見. 第 10 回麒麟塾, コクヨホール (東京都港区), 2014 年 7 月 12 日
- ⑧ 山本道雄, 黒滝大翼, 西山 晃, 宇野和宏, 市野素英, 佐々木悠, 藩 龍馬, 吉成正裕, 中澤正年, Keiko Ozato, 田村智彦. 転写因子 IRF8 による C/EBP α の機能阻害が単球-樹状細胞前駆細胞における好中球分化能の喪失をもたらす. 冬の若手ワークショップ 2014, 軽井沢東磯部温泉 (群馬県安中市), 2014 年 1 月 30 日
- ⑨ Nishiyama A, Kurotaki D, Tamura T. 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, 幕張メッセ (千葉県千葉市), 2013 年 12 月 11 日
- ⑩ Sasaki H, Kurotaki D, Osato N, Sasaki I, Kaneda C, Nishiyama A, Kaisho T, Morse HC III, Ozato K, Tamura T. The transcription factor IRF8 is required for basophil development. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ (千葉県千葉市), 2013 年 12 月 11 日
- ⑪ Yamamoto M, Kurotaki D, Nishiyama A, Uno K, Ichino M, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. IRF8 Inhibits the Activity of C/EBP α to Restrain Monocyte- Dendritic Cell Progenitors from Differentiating into Neutrophils. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ (千葉県千葉市), 2013 年 12 月 8 日
- ⑫ Kurotaki D, Sasaki H, Osato N, Sasaki I, Kaneda C, Sato H, Nishiyama A, Kaisho T, Aburatani H, Morse HC 3rd, Ozato K, Tamura T. IRF8 restrains monocyte-dendritic cell progenitors from differentiating into neutrophils by inhibiting C/EBP α activity. 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition,

- New Orleans (USA), 2013年12月8日
- ⑬ Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Sasaki H, Ozato K, Tamura T. The transcription factor IRF8 is a key transcription factor for basophil development. 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, New Orleans (USA), 2013年12月7日
- ⑭ 西山 晃, 黒滝大翼, 田村智彦. 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, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市), 2013年12月4日
- ⑮ Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ichino M, Sasaki H, Ban T, Yoshinari M, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. IRF8 inhibits the activity of C/EBP α to restrain the neutrophil differentiation program in monocyte- dendritic cell progenitors. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市), 2013年12月3日
- ⑯ 佐々木悠, 黒滝大翼, 大里直樹, 佐々木泉, 金田智香, 西山 晃, 改正恒康, 油谷浩幸, Herbert C. Morse III, Keiko Ozato, 田村智彦. 好塩基球分化の謎に迫る ~転写因子 IRF8 の役割~. 第15回神奈川血液・免疫フォーラム, 新横浜プリンスホテル(神奈川県横浜市), 2013年11月1日
- ⑰ Kurotaki D, Yamamoto M, Uno K, Nishiyama A, Nakabayashi J, Morse HC 3rd, Ozato K, Tamura T. IRF8 inhibits the activity of C/EBPs to restrain neutrophil development in monocyte-DC progenitors. 第75回日本血液学会学術集会, ロイトン札幌・札幌芸文館・札幌市教育文化会館(北海道札幌市), 2013年10月12日
- ⑱ Sasaki H, Kurotaki D, Sato H, Morse HC III, Ozato K, Tamura T. The transcription factor IRF8 is required for the development of basophils. Cytokines 2013, San Francisco (USA), 2013年10月1日
- ⑲ Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Nakazawa M, Miyake N, Matsumoto N, Ozato K, Tamura T. The IRF8-KLF4 transcription factor cascade is essential for the development of monocytes. 2013 Inaugural Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, San Francisco (USA), 2013年10月1日
- ⑳ Nishiyama A, Kurotaki D, Tamura T. A dynamic and long-range chromatin control of *Klf4* transcription by IRF8 in monocyte differentiation. 12th Human Proteome Organization World Congress, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2013年9月16日
- ㉑ 黒滝大翼. 組織常在性マクロファージ及び単球の機能とその分化機構の解明. 第24回

- 日本生体防御学会学術総会, くまもと森都心プラザ(熊本県熊本市), 2013年7月12日
- ㉒ 黒滝大翼, 山本道雄, 宇野和宏, 西山 晃, 中林 潤, 中澤正年, Herbert C. Morse III, Keiko Ozato, 田村智彦. 転写因子 IRF8 は単球-樹状細胞前駆細胞において C/EBP α の機能を阻害し、好中球分化能の喪失をもたらす. 第24回日本生体防御学会学術総会, くまもと森都心プラザ(熊本県熊本市), 2013年7月11日
- ㉓ Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Nakazawa M, Miyake N, Matsumoto N, Ozato K, Tamura T. The IRF8-KLF4 transcription factor cascade critically regulates the development of inflammatory monocytes. The Joint International Meeting of the Japanese Society for Interferon and Cytokine Research and Macrophage Molecular and Cellular Biology 2013, 都市センターホテル(東京都千代田区), 2013年5月20日
- ㉔ Sasaki H, Kurotaki D, Sato H, Morse HC III, Ozato K, Tamura T. The transcription factor IRF8 is required for the development of basophils. The Joint International Meeting of the Japanese Society for Interferon and Cytokine Research and Macrophage Molecular and Cellular Biology 2013, 都市センターホテル(東京都千代田区), 2013年5月20日

[その他]

プレスリリース (計3件)

http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/res/tamura_201411.html

http://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/res/tamura_201409.html

<http://www.yokohama-cu.ac.jp/univ/pr/press/130117.html>

研究室ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒滝 大翼 (KUROTAKE, Daisuke)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 10568455

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし