

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670472

研究課題名(和文) ノンコーディングRNAによるB細胞運命制御

研究課題名(英文) Identification of lncRNAs during B cell lineage commitment

研究代表者

伊川 友活 (Tomokatsu, Ikawa)

国立研究開発法人理化学研究所・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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞を含むすべての血液・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B細胞にしかたれない前駆細胞に運命決定される。この運命決定は様々な転写因子やエピジェネティック因子によって制御されているが、詳細は明らかでない。申請者らは最近B細胞への運命決定における分子機構を調べることで出来る新しい分化誘導系を開発した。そこで本研究ではこの培養系を用いてB細胞分化過程において特異的に働く長鎖ノンコーディング(long non-coding: lnc) RNAのスクリーニングを行い、B細胞分化に関与することが示唆されるlncRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：B lymphocytes are generated from pluripotent hematopoietic stem cells (HSCs) through a successive series of lineage restriction processes. Although many transcription factors and epigenetic modifiers were found to regulate the B cell lineage commitment, the exact mechanisms were yet to be determined. We have recently established an ideal system that can be used to examine gene regulatory networks during lymphoid lineage specification from HSCs. In this study, we looked for novel long non coding (lnc) RNAs that could regulate B cell fate determination using this system. We have succeeded in identifying the lncRNAs that may be involved in the specification and commitment of HSCs toward the B cell lineage.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞分化 長鎖ノンコーディングRNA 造血幹細胞 運命決定 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は様々な系列決定過程を経て最終的にB細胞にしかたれない前駆細胞となる。この運命制御には転写因子やエピジェネティック因子が重要な働きをしているが、詳細は明らかでない。解析の大きな障害となっているのが、良い実験モデルがないことにある。

申請者らはカリフォルニア大学サンディエゴ校のC. Murte 教授との共同研究により、転写因子 E2A を欠損したマウスではリンパ系とミエロイド系共通の前駆細胞段階で分化が停止し、このリンフォ・ミエロイド前駆細胞が自己複製することを示した(Ikawa et al. Immunity, 2004)。この知見を応用し、「E2A 欠損 B 前駆細胞の状態を人為的に誘導して制御することにより、リンフォ・ミエロイド前駆細胞を無限に増幅することが可能なのではないか」という仮説を立てた。

E2A の機能を阻害することが知られている Id3 をレトロウイルスベクターを用いて造血幹細胞へ導入し、B 前駆細胞の培養条件下で培養すると、リンフォ・ミエロイド前駆細胞段階で分化が停止し、細胞が断続的に増幅した。驚くべきことにこの細胞を放射線照射したマウスに移植すると数ヶ月以上に渡り、T, B, ミエロイド系細胞を維持することができた。申請者らはこの前駆細胞を iLS (induced Leukocyte Stem) 細胞と名付けた (Ikawa et al. Stem Cell Reports, 2015, 特許申請済) (図1)。iLS 細胞は細胞の分化・増殖を自在に操ることができるため、細胞の運命制御の研究に最適である。申請者らは、Id3 とエストロゲンレセプター (ERT2) を融合した Id3-ERT2 レトロウイルスベクターを作成することにより iLS 細胞をさらに改良することに成功した。この Id3-ERT2 を用いると、タモキシフェンによって分化停止・誘導をより厳密に制御することが可能となる。すなわち、タモキシフェンを加え続ける限りは多能性を維持するが、これを除去すると B 細胞への分化が誘導され、わずか7日間で B 前駆細胞

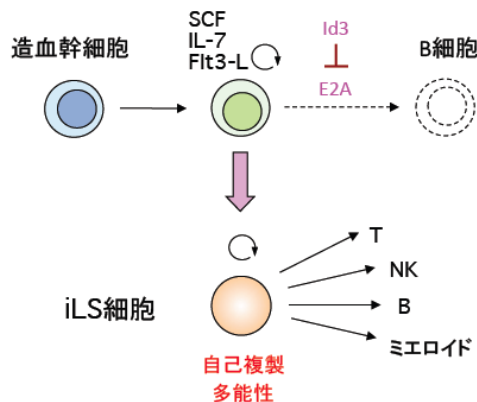


図1 iLS(induced Leukocyte Stem)細胞

への系列決定が完了する。そこで本研究ではこの分化誘導系を用いて多能前駆細胞が B 前駆細胞へ運命決定される過程において特異的に発現する長鎖ノンコーディング (long non-coding: lnc) RNA を同定し、その機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 研究の目的

B 細胞を含むすべての血液・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 B 細胞にしかたれない前駆細胞に運命決定される。この運命決定は様々な転写因子やエピジェネティック因子によって制御されているが、詳細は明らかでない。特に、クロマチン修飾酵素複合体と相互作用することによって細胞の運命決定を制御することが示唆されている lncRNA の役割は不明である。前述のとおり、申請者らは最近 B 細胞への運命決定における分子機構を調べることの出来る新しい分化誘導系を開発した。そこで本研究ではこの培養系を用いて B 細胞分化過程において特異的に働く lncRNA をスクリーニングし、B 細胞分化における役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) iLS 細胞の作成、(2) iLS 細胞を用いた B 細胞への分化誘導および経時的サンプルの採取、RNA-seq, ChIP-seq 解析、(3) 新規 lncRNA のスクリーニング、の順に研究を進めた。

(1) iLS 細胞の作成

Id3-ERT2 をマウス胎仔肝臓の造血幹細胞へ導入しタモキシフェンを作用させながら TSt-4 ストローマ細胞上で培養した。TSt-4 細胞は申請者らの研究室で樹立された細胞株で通常は B 細胞への分化を支持するが Id3 が E タンパクの機能を阻害するため、B 細胞分化が初期の段階で停止し、多能前駆細胞 (iLS 細胞) として増幅した。この細胞を継代、増幅させることによって培養 1ヶ月ほどで均質な iLS 細胞が大量に作成できた。作成された iLS 細胞はフローサイトメーターによる表面抗原の発現および遺伝子発現によって確認した。

(2) iLS 細胞を用いた B 細胞への分化誘導および経時サンプルの採取、RNA-seq, ChIP-seq 解析

次にこの iLS 細胞培養系からタモキシフェンを除去することによって B 細胞への分化を誘導した(図2)。B 細胞へ分化誘導後、0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間後 (計 16 ポイント) に細胞を採取し、RNA を精製した。得られた RNA は RNA-seq 法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。これにバイオインフォマティクス

解析を加えることにより、B 細胞への運命決定におけるノンコーディング RNA を含めた遺伝子発現の推移を解析した。経時サンプル（細胞）は同時に ChIP-seq 解析を行い、H3K4me3 や H3K27me3 などヒストンの修飾状況も同時に解析した。これらのデータを元に B 細胞特異的に発現する lncRNA をスクリーニングしその発現パターンを確認した。

(3) 新規 lncRNA のスクリーニング

(2) で得られた RNA-seq データ、ChIP-seq データを元に 150bp 以上の lncRNA のスクリーニングを行った。この際、B 細胞分化に重要な転写因子やエピジェネティック制御因子の転写制御領域に存在する lncRNA に特に注目した。また、E2A, EBF1, Pax5 などすでに知られている転写因子の発現パターンと照合し、lncRNA が転写ネットワークの形成にどのように関与しているのかを調べた。

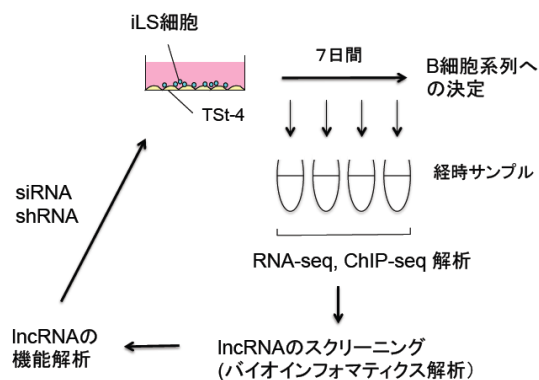


図2 iLS 細胞を用いた新規スクリーニング系

4. 研究成果

(1) RNA-seq解析から遺伝子発現パターンによって8つのクラスターに分けられることが明らかとなった(図3)。Ebf1, Pax5などB細胞特異的転写因子はB細胞へ分化誘導後、48時間後から急激に発現が上昇した(クラスターVII)。逆に、多能性を維持するために必要なMeis1, Gfi1などは徐々に発現が減少した

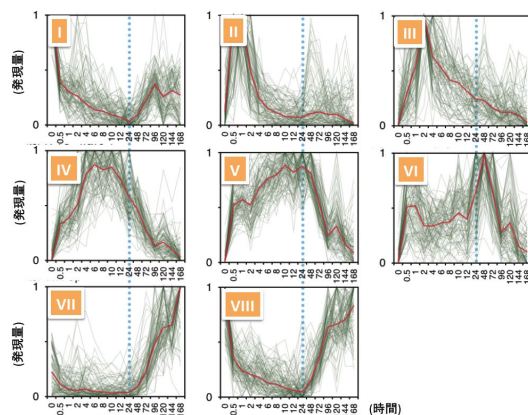
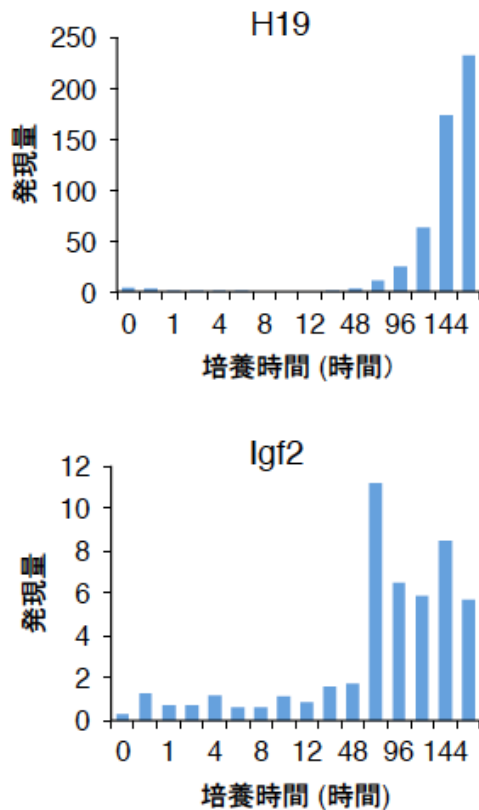


図3 各遺伝子の mRNA 発現パターンを元にしたクラスタリング解析

(クラスターI)。発現のピークはクラスターIIからクラスターVIにかけて徐々に右にシフトした。すなわち発現パターンが波のように連動して動くことが明らかとなった。

次にChIP-seq解析によりヒストンの修飾を調べると、Ebf1, Pax5などのプロモーター領域では分化誘導前には抑制マーカであるH3K27me3が多く見られたが、分化が進むに従って減少した。逆に、活性化マーカであるH3K4me3は発現の上昇に伴い増加した。一方、他の系列に特異的な遺伝子の発現は抑制され、プロモーター領域にH3K27me3が多く認められた。これらの結果からB細胞への運命決定が起こる際にはエピジェネティックにB細胞プログラムが活性化されると同時に、別の系列の分化プログラムが抑制されることが示された。



2) iLS細胞からB細胞への分化誘導時における経時サンプルを用いて網羅的遺伝子発現解

図4 H19およびIgf2のB細胞分化過程における遺伝子発現

析を行ったところ、H19というlncRNAの発現が培養後期に劇的に上昇することが明らかとなった(図4)。H19はInsulin-like growth factor 2 (Igf2) の発現を制御することが報告されている。そこで、iLS細胞の分化誘導系におけるIgf2の発現を調べたところ、Igf2もB細胞分化が進むに連れて発現が上昇していた(図4)。従って、B細胞系列への運命決定においてH19がIgf2の発現を制御することが示唆された。H19は胎生期に強く発現することが報告されているが、生後はその発現が減少し、骨格筋や軟骨でのみ検出されている。従って、本研究によってH19が生後の免疫細胞の発生・分化プロセスに関与することが初めて明らかとなった。

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 9件)

Ikawa T, Masuda K, Huijskens MJAJ, Satoh R, Kakugawa K, Agata Y, Miyai T, Germeraad WTV, Katsura Y, Kawamoto H. Induced developmental arrest of early hematopoietic progenitors leads to the generation of leukocyte stem cells. *Stem Cell Reports*. 査読有、5:716-727, 2015

DOI:10.1016/j.stemcr.2015.09.012

Inoue T, Morita M, Hijikata A, Fukuda-Yuzawa Y, Adachi S, Isono K, Ikawa T, Kawamoto H, Koseki H, Natsume T, Fukao T, Ohara O, Yamamoto T, Kurosaki T*. CNOT3 contributes to early B cell development by controlling Igh rearrangement and p53 mRNA stability. *J Exp Med*. 査読有、212:1465-1479, 2015
12:1171-1180, 2014

DOI: 10.1084/jem.20150384.

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.

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>

〔学会発表〕(計 11件)

伊川友活 Identification of gene regulatory networks during hematopoietic stem cell differentiation by the single-cell analysis. " Single Cell Workshop 2016 2016年2月24日 大阪府吹田市 理化学研究所 QBiC

伊川友活 Gene regulatory networks that orchestrate T and B lymphocyte development. " Liaison Laboratory Seminar 2016年2月10日 熊本県熊本市 熊本大学

伊川友活 Transcriptional networks that control B cell fate determination. BMB2015 2015年12月2日 兵庫県神戸市 神戸ポートピアホテル

伊川友活 Role of IRS-1 in early B cell development. " 第44回日本免疫学会 2015年11月9日 北海道札幌市 札幌コンベンションセンター

伊川友活 Epigenetic maintenance of T cell fate by Polycomb group proteins. Naito Conference 2015年9月15日 北海道札幌市 シャトレーゼ ガトーキ

ングダムサッポロ

伊川友活 Gene regulatory network orchestrating B cell fate specification. RIKEN EPIGENETICS in Kobe 2015年2月13日 兵庫県神戸市 理化学研究所 CDB

伊川友活 ポリコム群タンパクによる T 前駆細胞の運命維持機構 新学術領域「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム 2015年1月27日 東京都千代田区 一橋講堂

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 浜名湖ロイヤルホテル

〔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)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号: 60450392