

令和元年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08572

研究課題名(和文) 転写因子Bach2の発現量に依存したB細胞分化制御の解明

研究課題名(英文) Analysis of Bach2 expression level-dependent regulation of B cell immune response

研究代表者

武藤 哲彦 (Muto, Akihiko)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80343292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答において、抗原刺激を受けたB細胞は、抗体分泌を担う形質細胞へ分化する。転写抑制因子Bach2は、このB細胞の活性化応答を調節するが、機構は不明であった。本研究から転写因子Bach2の直接標的遺伝子群には、細胞増殖を制御する遺伝子群と細胞死を制御する遺伝子群が有意に含まれた。さらに、B細胞内のBach2タンパク質がB細胞運命を規定する内因であることをシングルセル解析で解明し、Bach2タンパク質複合体解析では、細胞内Bach2タンパク質量を調節する因子候補を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、ヒトBACH2変異が要因の免疫不全の症例が初めて報告された。このBACH2変異はアミノ酸置換を伴い、ハプロ不全で症状が現れる。これは、細胞内Bach2タンパク質量が適切に保たれる必要があるという本研究結果と矛盾しない。患者B細胞ではクラススイッチに障害があるという結果も本研究と一致する。したがって、本基礎研究の結果が治療戦略の開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In humoral immune responses, antigen activated B cells differentiate into antibody secreting plasma cells (PCs) to eliminate antigen, or undergo class switch recombination (CSR) of immunoglobulin gene to change the isotype of antibody. Dynamic changes in gene regulatory network (GRN) are the molecular mechanism of these cellular responses. It has been proposed that transcriptional repressor Bach2 is required for controlling the cell fate decisions in activated B cells, the mechanism of this decision making by Bach2 in individual cells remains to be elucidated. This research demonstrated that Bach2 is required to sustain high levels of B cell proliferation in response to BCR signaling. We also revealed that Bach2 expression levels are the intrinsic factor for determining the fate of B cell development. In B cells, we identified that Bach2 expression levels were negatively regulated in response to activation signals.

研究分野：分子生物学

キーワード：B細胞 Bach2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) B細胞分化調節

抗原で活性化された成熟 B 細胞は、胚中心 B 細胞の分化段階を経て、抗体の産生および分泌に特殊化した形質細胞へ最終分化する。その胚中心 B 細胞は、2 種類の抗体遺伝子の改変をおこなう。ひとつはクラススイッチ DNA 組換え (CSR) で、もうひとつは体細胞突然変異 (SHM) である。CSR では、抗体のクラスが IgM から IgG、IgA もしくは IgE など他のアイソタイプに変更される。その結果、B 細胞は、認識する抗原は同じでも液性免疫応答の種類異なる抗体を産生するようになる。一方の SHM では、抗体の抗原を認識するドメインをコードする遺伝子領域に体細胞突然変異が導入される。その後、抗原に対する親和性が高い抗体を産生する B 細胞が選抜される。結果として、親和性の上昇した抗体によって液性免疫応答がおこなわれる。いずれの反応も免疫応答の最適化には重要である一方で、抗体遺伝子以外の遺伝情報にも変異が導入される可能性から腫瘍化などのリスクを有するため、厳密に制御される必要がある。初期に提唱された細胞分化制御モデルでは、B 細胞の性質を維持する転写因子群 (Pax5 と Bcl6) に拮抗して、形質細胞分化を促す転写因子群 (Blimp-1 と Irf4) との間で相互に抑制する関係に基づいた分化の制御が想定されていた。しかし、この二者択一型の分化モデルでは、中間段階としての胚中心 B 細胞への分化と応答を規定できないことが理解されつつあった。

(2) 転写因子 Bach2

申請者は、転写因子 Bach2 が胚中心 B 細胞への分化に必須であることに加えて、Bach2 が前述の Blimp-1 をコードする遺伝子 (*Prdm1*) の転写抑制を介して形質細胞分化を制することを解明した。これらの研究結果を踏まえて、実際の B 細胞の活性化応答は、Pax5 と Blimp-1 などの拮抗関係に基づいたシンプルな転写ネットワークではないと考えた。そこで、Bach2 による形質細胞分化の制止が、胚中心 B 細胞の分化および胚中心応答の実行を可能にするというモデルを提唱した。さらに、活性化 B 細胞のシングルセル (単一細胞) レベルの解析では、活性化 B 細胞では細胞ごとに Bach2 の発現量に違いを見出し、その Bach2 の発現の揺らぎが B 細胞の運命を決定する主要な内的要因であることを強く示唆した。しかし、Bach2 を中心に据えた B 細胞活性化の制御モデルもいくつかの課題を残した。第一に、実験結果では、すべての Bach2 高発現細胞が CSR を実行することは無く、一方ですべての Bach2 低発現細胞が形質細胞へ分化する訳ではない。したがって、B 細胞の分化制御を理解するためには、まず、CSR する細胞で Bach2 に協力する転写因子や *Prdm1* 遺伝子発現誘導を含め、形質細胞分化を駆動する転写因子と Bach2 とがどの様に連携するのかを明らかにする。第二に、Bach2 は胚中心 B 細胞で機能する遺伝子群を直接制御する可能性が予備的知見から考えられた。そのため Bach2 の直接標的遺伝子を同定する。第三に、Bach2 が *Prdm1* 遺伝子などのヒストン脱アセチル化を促進することを見出したが、このエピジェネティック制御に関わる因子は不明であった。

2. 研究の目的

胚中心 B 細胞から形質細胞への分化過程で Bach2 の制御する転写ネットワークの全容を明らかにし、その制御因子を同定するために、標的遺伝子、タンパク質複合体の解析を組み合わせて取り組み、Bach2 による B 細胞運命決定のメカニズムを明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) クロマチン免疫沈降-シークエンスによる Bach2 の直接標的遺伝子の同定。

(2) Bach2 の標的遺伝子上で他の転写因子モチーフを検索し、Bach2 と連携する候補因子を検索する。

(3) Bach2 複合体の精製と質量分析 (マスペクトロメトリー (MS) 分析) 解析によるエピジェネティック制御因子の同定。

(4) B 細胞と形質細胞に発現する因子のタンパク質レベルでの解析。

(5) 以上で同定した因子の機能の検討として、B 細胞初代培養系でのノックダウン実験。

4. 研究成果

(1) Bach2 直接標的遺伝子の同定

野生型および Bach2 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞を採取し、培養系にて B 細胞受容体 (BCR) 刺激をおこなった。DNA マイクロアレイ解析を実施して、刺激前と 24 時間刺激後の野生型と Bach2 ノックアウト B 細胞における遺伝子発現様式を比較した。得られた遺伝子発現データを用いたクラスター解析において、Bach2 が転写抑制因子であるというこれまでの知見を加味して、細胞刺激前もしくは後で Bach2 ノックアウト B 細胞における発現が上昇する遺伝子群を抽出した。さらに、これらの遺伝子群に対して遺伝子オンロジー解析をおこなった。その結果、Bach2 遺伝子をノックアウトした場合に、発現が上昇する遺伝子群には、細胞増殖を

制御する遺伝子群と細胞死を制御する遺伝子群が有意に含まれることを明らかにした。

次に、クロマチン免疫沈降—シーケンス解析により、B 細胞株において Bach2 が直接結合する遺伝子領域を解明した。そのうえで、Bach2 結合領域の近傍にある遺伝子を同定した。前述の戦略で抽出した、Bach2 ノックアウト B 細胞で発現上昇する細胞増殖を制御する遺伝子群と細胞死を制御する遺伝子群のほとんどが Bach2 の結合活性が遺伝子領域の近傍に見出されたことから、これらの遺伝子群は Bach2 により直接転写調節されることを明らかにした。

すなわち、Bach2 は、直接標的遺伝子である *Cdkn1a* (p21 タンパク質をコードする)、*Cdkn2a* (p19)および、*Cdkn1b* (p27)といったサイクリン依存キナーゼ阻害因子の遺伝子を抑制することによって、B 細胞の増殖を支援する役割を担うと考えられる。

一方、Bach2 の直接標的遺伝子群には、Bcl2 ファミリーの BclxL の遺伝子 (*Bcl2l1*) が含まれており、Bach2 ノックアウト B 細胞で遺伝子発現が低下する。Bach2 ノックアウト B 細胞に BclxL を過剰発現したところ、細胞増殖の障害は救済できたが、限定的であり、野生型と同等までには回復しなかった。これらの結果から Bach2 は、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子の遺伝子発現を抑制し、BclxL の発現を促進することで、活性化 B 細胞の細胞増殖を支援すると考えられた (図)。

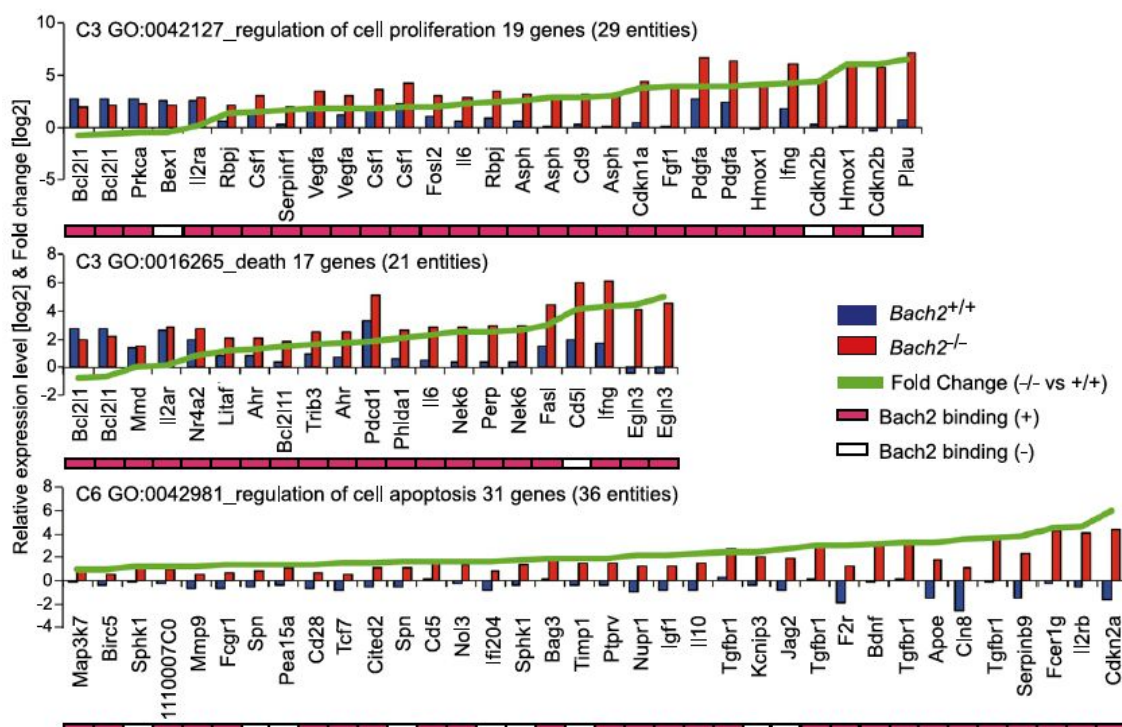


図) DNA マイクロアレイ解析、クラスター解析、遺伝子オントロジー解析およびクロマチン免疫沈降—シーケンス解析結果。青は野生型、赤は Bach2 ノックアウト B 細胞における各遺伝子発現量を表す。緑線は、発現量の相対的な差を示す。マゼンダは、ChIP-seq の結果から、遺伝子近傍に Bach2 結合活性を見出したことを表す。白色は、Bach2 結合活性が無いことを表す。C3、C6 はクラスター解析の結果、付与したクラスター名であり、GO は遺伝子オントロジー解析で有意差のある遺伝子オントロジー名である。(発表論文リスト 2 より)

(2) Bach2 結合領域近傍の転写因子モチーフの検索

少なくとも 2 種類の転写因子ファミリーの結合モチーフが有意に見出されている。現在、これらの転写因子ファミリーの B 細胞の活性化応答における役割をノックダウン実験方法で検討中であり、Bach2 をノックダウンした場合と同様の予備的な実験結果を得ていることから、B 細胞活性化・分化において、Bach2 と協働する可能性を考えている。

(3) Bach2 複合体の精製

私たちは、転写因子 Bach2 が標的遺伝子を転写抑制する際に、ヒストン脱アセチル化酵素と複合体を形成して機能することを明らかにしてきた (Tanaka H, Muto A, et al, Epigenetic Regulation of the Blimp-1 Gene (*Prdm1*) in B Cells Involves Bach2 and Histone Deacetylase 3. *J Biol Chem.* (2016), DOI: 10.1074/jbc.M116.713842.). 本研究において、Bach2 の細胞内タンパク質量を調節する役割を担う複合体因子を BAL17 成熟 B 細胞株から同定した。同因子をノックダウンした結果、B 細胞株および、活性化したマウス脾臓 B 細胞において、内在性の Bach2 タンパク質量が増加したことから、生理的には Bach2 のタンパク質量を低く抑える方向で調節

する因子であることを解明できた。

(4)(5) Bach2 と協働する因子のノックダウン実験

野生型マウス由来の B 細胞に比べ、Bach2 ノックアウト B 細胞では、ほとんど CSR が生じない。Bach2 ヘテロ B 細胞では CSR 応答する細胞の頻度が半減することから、細胞ごとの Bach2 の発現量の違いが細胞の運命決定に寄与する可能性が示唆されていた。そこで、マウス脾臓 B 細胞を Bach2 の発現量に基づいて分画し、初代培養系で活性化したところ、Bach2 の発現量の多い B 細胞は、CSR する傾向にあり、一方で Bach2 の発現量の低い B 細胞は、形質細胞へ分化する傾向があった。次に、培養系で活性化したあとで、Bach2 の発現量差で分画し、刺激下で培養を続けたところ、同様の結果を得た。ここでの疑問は、Bach2 の発現量が何によって規定されるかという点である。第一の可能性として、細胞種類の違いである。というのも脾臓の成熟 B 細胞には、辺縁帯 B 細胞と濾胞 B 細胞の二種類が存在する。そこで、主要な細胞分画である濾胞 B 細胞で同様の実験を行ったところ、Bach2 の発現量に依存した細胞分化傾向が観察された。Bach2 の発現量の違いは、細胞種の違いを反映しているだけではないと考えられる。第二の可能性として、B 細胞ごとの抗体分子の抗原特異性が Bach2 の発現量を規定する可能性がある。抗体遺伝子トランスジェニックマウスで同様の実験をおこなったところ、Bach2 の発現量が細胞運命を規定する傾向が観察された。従って、抗原親和性が Bach2 の発現量と関連するだけではないと考えられる。

以上の結果から、B 細胞における Bach2 の発現量は内因因子として機能し、(3)の結果と合わせると、タンパク質の量を減らす方向の調節がされており、細胞間の Bach2 タンパク質量の違いの原因になると考えられた。さらに、外因因子である細胞刺激を受けた時点での Bach2 の発現量は、細胞運命決定における重要な要素である可能性が強く示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1: Kato H, Itoh-Nakadai A, Matsumoto M, Ishii Y, Watanabe-Matsui M, Ikeda M, Ebina-Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Nishizawa H, Suzuki K, Muto A, Fujiwara T, Nannya Y, Malcovati L, Cazzola M, Ogawa S, Harigae H, Igarashi K. Infection perturbs Bach2- and Bach1-dependent erythroid lineage 'choice' to cause anemia. *Nat Immunol*. 査読有 19(10):1059-1070. (2018).
DOI: 10.1038/s41590-018-0202-3.
- 2: Miura Y, Morooka M, Sax N, Roychoudhuri R, Itoh-Nakadai A, Brydun A, Funayama R, Nakayama K, Satomi S, Matsumoto M, Igarashi K, Muto A. Bach2 Promotes B Cell Receptor-Induced Proliferation of B Lymphocytes and Represses Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J Immunol*. 査読有 200(8):2882-2893. (2018). (責任著者)
DOI: 10.4049/jimmunol.1601863.
- 3: Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, Ebina M, Muto A, Sato Y, Kumagai S, Ochiai K, Suzuki T, Igarashi K. S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N(6)-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep*. 査読有 21(12):3354-3363. (2017).
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.092.
- 4: Ebina-Shibuya R, Matsumoto M, Kuwahara M, Jang KJ, Sugai M, Ito Y, Funayama R, Nakayama K, Sato Y, Ishii N, Okamura Y, Kinoshita K, Kometani K, Kurosaki T, Muto A, Ichinose M, Yamashita M, Igarashi K. Inflammatory responses induce an identity crisis of alveolar macrophages, leading to pulmonary alveolar proteinosis. *J Biol Chem*. 査読有 292(44):18098-18112. (2017).
DOI: 10.1074/jbc.M117.808535.
- 5: Itoh-Nakadai A, Matsumoto M, Kato H, Sasaki J, Uehara Y, Sato Y, Ebina-Shibuya R, Morooka M, Funayama R, Nakayama K, Ochiai K, Muto A, Igarashi K. A Bach2-Cebp Gene Regulatory Network for the Commitment of Multipotent Hematopoietic Progenitors. *Cell Rep*. 査読有 18(10):2401-2414. (2017).
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.029.
- 6: Kobayashi M, Kato H, Hada H, Itoh-Nakadai A, Fujiwara T, Muto A, Inoguchi Y, Ichiyangi K, Hojo W, Tomosugi N, Sasaki H, Harigae H, Igarashi K. Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. *Haematologica*. 査読有 102(3):454-465. (2017).
DOI: 10.3324/haematol.2016.151043.

7: Roychoudhuri R, Clever D, Li P, Wakabayashi Y, Quinn KM, Klebanoff CA, Ji Y, Sukumar M, Eil RL, Yu Z, Spolski R, Palmer DC, Pan JH, Patel SJ, Macallan DC, Fabozzi G, Shih HY, Kanno Y, Muto A, Zhu J, Gattinoni L, O'Shea JJ, Okkenhaug K, Igarashi K, Leonard WJ, Restifo NP. BACH2 regulates CD8(+) T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nat Immunol*. 査読有 17(7):851-860. (2017).
DOI: 10.1038/ni.3441.

8: Ebina-Shibuya R, Watanabe-Matsui M, Matsumoto M, Itoh-Nakadai A, Funayama R, Nakayama K, Muto A, Igarashi K. The double knockout of Bach1 and Bach2 in mice reveals shared compensatory mechanisms in regulating alveolar macrophage function and lung surfactant homeostasis. *J Biochem*. 査読有 160(6):333-344. (2016).
DOI: 10.1093/jb/mvw041.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 武藤哲彦、Bach2 expression level is a key driver of B cell fate decision、Interdisciplinary seminar on mucosal immunology at Tohoku University (招待講演) 2019 年 3 月
2. 武藤哲彦、Single-cell Analysis of Bach2 Function in Immune Responses、6th Symposium S.A.R.C in collaboration with open innovation strategy organization Tohoku University (招待講演) 2019 年 2 月
3. 武藤哲彦、Influence of Bach2 expression levels on activated-B cell fate decision、第 4 7 回 日本免疫学会学術集会、2018 年 12 月
4. 武藤哲彦、転写因子 Bach2 量による B 細胞分化制御のシングルセル解析、AMED-CREST エピゲノム領域 H29 年度 領域会議、2018 年 2 月
5. 武藤哲彦、活性化 B 細胞における遺伝子ネットワークのシングルセル解析、第 4 6 回 日本免疫学会学術集会、2017 年 12 月
6. 武藤哲彦、活性化 B 細胞の遺伝子ネットワークのシングルセル解析、第 8 9 回 日本生化学会、2016 年 9 月
7. 武藤哲彦、活性化 B 細胞の多様化と形質細胞分化を調節する Bach2 遺伝子ネットワークの解明、日本生化学会 東北支部 第 8 2 回例会 (招待講演) 2016 年 5 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。