

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32660

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2019～2021

課題番号：19KK0222

研究課題名（和文）ノンコーディングRNAによるT細胞分化および発がん抑制制御機構の解明

研究課題名（英文）Roles of a non-coding RNA that regulates normal and neoplastic T cell development

研究代表者

伊川 友活（Ikawa, Tomokatsu）

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：60450392

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,200,000円

研究成果の概要（和文）：ノンコーディングRNAは様々な生命現象に関わるが詳細は明らかでない。我々はノンコーディングRNAの1つであるThymoDに着目した。ThymoD欠損マウス骨髄から作製したiLS細胞を用いて、ThymoDが転写因子Bcl11bの発現を制御することによりT細胞分化を促進することが明らかとなった。また、ヒト正常T細胞や白血病細胞株において、ヒトThymoD-BCL11B領域を世界で初めて同定し、ThymoDの転写がBcl11bの発現を制御することを示唆する結果を得た。したがって、マウスだけでなくヒトにおいてもThymoD-BCL11BがT細胞の正常な分化や腫瘍化に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は機能が不明なノンコーディングRNA（ThymoD）に着目し、ThymoDのT細胞分化における役割を解析した。その結果、ThymoDがT細胞の分化や腫瘍化に重要であることが明らかとなった。また、ThymoDはヒト正常T細胞やT細胞性白血病細胞にも発現し機能的であることを世界で初めて発見した。これにより、ThymoDを標的とした白血病の新規治療法の開発に結びつくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Non-coding RNA is involved in various life phenomena, whereas the molecular mechanism is largely unknown. We focused on the role of ThymoD, which is a non-coding RNA exclusively expressed in the thymus. We generated the induced Leukocyte Stem (iLS) cells from bone marrow of ThymoD-deficient mice. The ThymoD-deficient iLS cells fail to differentiate into T cells and express Bcl11b, suggesting that the ThymoD is critical for the expression of Bcl11b and further T cell differentiation. On the other hand, we identified the human ThymoD-BCL11B locus in normal and malignant T cells for the first time in the world. The blockade of the transcription of human ThymoD affected the epigenetic modification of BCL11B loci, suggesting that the ThymoD is essential for both mouse and human T cell development.

研究分野：免疫学、血液学

キーワード：非コードRNA T細胞分化 胸腺 エピジェネティクス 転写因子

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞から T 細胞系列への運命決定には様々な転写因子が重要であることが示されている。しかし、これら転写因子の発現や機能がどのように制御されているのかはあまり知られていない。特に、その制御機構の一つであるノンコーディング RNA の役割は不明である。

ノンコーディング RNA はタンパクに翻訳されない RNA として近年その役割が注目されている。転写、RNA プロセッシング、RNA 分解、翻訳など遺伝子発現の様々な段階に影響を与えることが知られているが、生体におけるその機能が明らかとなっているのはいくつかの microRNA や X 染色体の不活化に関わる Xist などごく僅かである。

我々は以前に、転写因子 Bcl11b が T 細胞系列への運命決定に重要であることを報告した (Ikawa et al. Science, 2010)。また、Bcl11b のエンハンサー領域から転写されるノンコーディング RNA (ThymoD) を発見し、これが T 細胞の初期分化や腫瘍形成を抑制する因子として働くことを示した (Isoda et al. Cell, 2017)。しかし、ThymoD が T 細胞の運命制御や T 細胞性腫瘍抑制にどのように関わっているのかは不明であった。

一方我々は、多能前駆細胞を無限に増幅する方法を開発した (Ikawa et al. Stem Cell Reports, 2015) (図 1)。この方法を用いると、*in vitro* で多能前駆細胞 (induced Leukocyte Stem : iLS 細胞) として増殖し、必要に応じて T 細胞や B 細胞など各種免疫細胞へ分化誘導することができる。そこで、本研究ではこの方法を ThymoD 欠損マウスの解析に応用し、ThymoD 欠損マウスの骨髓細胞から iLS 細胞を作製する。この ThymoD 欠損 iLS 細胞を用いて、ThymoD が Bcl11b の転写、さらには T 細胞系列への運命決定をどのように制御しているのかを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

T 細胞は胸腺で作られる。胸腺細胞は CD4 と CD8 の発現パターンによって CD4⁻CD8⁻ (double negative : DN), CD4⁺CD8⁺ (double positive : DP), CD4⁺CD8⁻ (CD4 single positive : SP), CD4⁻CD8⁺ (CD8SP) の 4 つの分画に分けられ、DN→DP→CD4SP or CD8SP の順に分化が進む。DN 分画は c-kit と CD25 の発現によりさらに c-kit⁺CD25⁻ (DN1), c-kit⁺CD25⁺ (DN2), c-kit⁻CD25⁺ (DN3), c-kit⁻CD25⁻ (DN4) の 4 つの分画に分けられ、この順に分化が進む。DN3 段階で T 細胞受容体 (TCR) β鎖の遺伝子再構成が起これ、T 細胞系列へ完全に運命づけられる。

我々は以前に、この T 細胞系列への運命決定に Bcl11b が必要であることを明らかにした (Ikawa et al. Science, 2010)。Bcl11b を欠損した T 前駆細胞は DN2 段階で分化が完全に停止し、T 細胞としてのアイデンティティを保つことができず、NK 細胞へ分化転換する。また、Bcl11b のエンハンサー領域にノンコーディング RNA である ThymoD を発見し、ThymoD がクロマチンのリモデリングやエンハンサー・プロモーターの相互作用、遺伝子座の核内におけるヘテロクロマチン

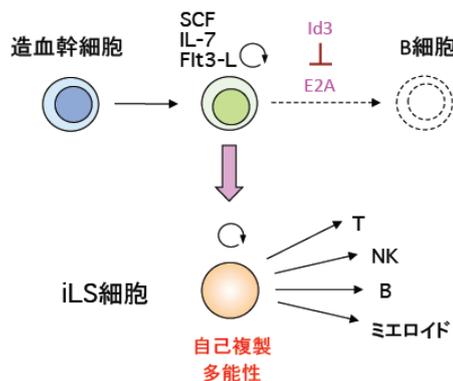


図 1 iLS(induced Leukocyte Stem)細胞

領域からユークロマチン領域への移動を制御することにより、T細胞分化や白血病発症抑制に強く関わっていることを示した (Isoda et al. Cell, 2017)。しかし、ThymoD がどのようにこれらの機能を果たしているのか詳細は不明である。

一方、我々は、E2A の機能を阻害する働きを持つ 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すると多能性前駆細胞として無限に増幅することが明らかとなった。この細胞は白血球 (T細胞、B細胞、ミエロイド系細胞) への分化能を維持していることから人工白血球幹細胞 (induced Leukocyte Stem : iLS 細胞) と名付けた。さらに、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。そこで本研究では、ThymoD 欠損マウスから iLS 細胞を作製し、ThymoD の T細胞分化や白血病抑制を制御するメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ThymoD 欠損 iLS 細胞を用いた網羅的な遺伝子発現およびエピゲノム解析

ThymoD 欠損マウスの胸腺細胞は、細胞数が少なく、そのままでは網羅的遺伝子発現解析やエピゲノム解析を行うのは困難である。そこで、我々が開発した、造血幹・前駆細胞を増幅する方法を用いる。この方法を用いると iLS 細胞として多能前駆細胞を無限に増幅することが出来る。

ThymoD 欠損マウスおよび正常マウスの骨髓から造血幹・前駆細胞を採取し、レトロウイルスを用いて Id3-ERT2 を導入することにより分化誘導可能な iLS 細胞を作成する。この iLS 細胞を *in vitro* で T細胞へ分化誘導し、多能前駆細胞から DN2 へ至る細胞を経時的に採取する。この経時サンプルを用いて RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現を網羅的に調べる。また、クロマチンの修飾状態や高次構造を調べるために、各種エピジェネティクス解析を行う。

(2) ヒト ThymoD の T細胞分化における役割の解析

我々はヒト末梢血 T細胞の解析から、ヒトの T細胞にも ThymoD 様のノンコーディング RNA が存在することを見出した。そこでヒト ThymoD の T細胞分化における機能を解析する。具体的には、ヒト T細胞性および B細胞性白血病細胞株を用いて、RNA-seq, ATAC-seq, ChIP-seq などを行い、Bcl11b 転写における ThymoD の役割を解析する。

4. 研究成果

(1) ThymoD 欠損マウス骨髓から造血幹・前駆細胞を採取し、レトロウイルスを用いて Id3-ERT2 を導入した。Id3-ERT2 を導入した細胞をセルソーターを用いてソーティングし、4-hydroxytanoxifen (OHT) を加えながら B細胞分化誘導条件で培養したところ、1ヶ月ほどで均一な細胞群が得られた。この ThymoD 欠損 iLS 細胞は正常な iLS 細胞と同様に増殖した。次に iLS 細胞を OP9/Delta-like1

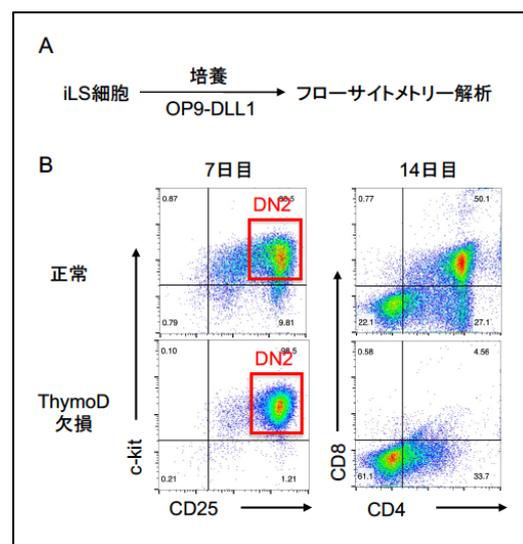


図 2 ThymoD 欠損 iLS 細胞は DN2 で T細胞分化が停止する

(DLL1)フィーダー細胞と共培養し T 細胞へ分化誘導したところ、ThymoD 欠損 iLS 細胞では DN2 での停滞が認められた (図 2)。従って、ThymoD 欠損 iLS 細胞を用いて ThymoD 欠損マウスの T 細胞分化障害を再現できることが示唆された。

次に、ThymoD欠損DN2細胞の性質を明らかにするため、DN2細胞をソーティングし、RNAを採取したあと、RT-qPCR法を用いてmRNA発現解析を行った。ThymoDの発現は完全に消失し、ThymoD標的遺伝子であるBcl11bの発現も激減していた。また、Bcl11b欠損マウスと同様にId2やI12rbの発現が有意に上昇していた。興味深いことに、ThymoD欠損DN2細胞ではがん遺伝子であるc-Mycの発現が上昇していた。ThymoD欠損マウスは約20%がT細胞性のリンパ腫や白血病を発症することから、DN2段階におけるc-Mycの発現上昇が引き金となっていることが示唆された。そこで、ThymoD欠損iLS細胞が腫瘍形成能を持つかどうか明らかにするため、正常およびThymoD欠損iLS細胞を放射線照射したRag2欠損 (T細胞及びB細胞欠損) マウスへ尾静脈注射により移植し、4週間後にマウスを解析した。興味深いことに、正常iLS細胞を移植したマウスの胸腺では、移植したiLS細胞由来の細胞の割合は1%程度であったのに対し、ThymoD欠損iLS細胞を移植したマウスでは、3~7%に増加していた。このことから、正常なT細胞分化過程では、ThymoDはc-Mycの発現を抑制することにより、がん抑制に働くことが示唆された。また以上の結果から、ThymoDはBcl11bの発現を制御することにより、T細胞分化を促進することが確認された。

(2) ヒトThymoDの機能を明らかにするため、ヒトT細胞性急性リンパ性白血病細胞株3種とB細胞性白血病細胞株2種を用いて、ThymoD-BCL11B領域のクロマチンの状態をATAC-seqで、転写産物をRNA-seqで、RNA-ポリメラーゼIIの結合状態およびヒストン修飾をChIP-seqにより解析した。さらに、上記5種類の細胞株および正常T細胞を用いてHi-C解析を行った。その結果、正常T細胞およびすべての白血病細胞株において、ThymoD-BCL11B領域のドメイン構造の構成が異なることが明らかとなった。次に、ThymoDの転写が最も活発な細胞株を用いてThymoDの転写を強制的に停止させ、時系列的にTET2の結合状態やヒストン修飾をChIP-seq法によって、ゲノムの3次元構造をHi-C法を用いて検討した。現在得られたデータを解析中であるが、これまでにThymoD転写抑制によりThymoD-BCL11B領域におけるTET2の結合状態およびヒストン修飾状態が減弱することを確認しており、今後Hi-C解析と併せてさらに解析を進める予定である。以上の結果から、ヒト正常および腫瘍T細胞においてもThymoDが何らかの活性を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ochiai K, Yamaoka M, Swaminathan A, Shima H, Hiura H, Matsumoto M, Kurotaki D, Nakabayashi J, Funeyama R, Nakayama K, Arima T, Ikawa T, Tamura T, Sciammas R, Bouvet P, Kundu TK, Igarashi K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Chromatin protein PC4 orchestrates B cell differentiation by collaborating with IKAROS and IRF4.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 108517-108538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108517.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe A, Miyake K, Nordlund J, Syvanen AC, van der Weyden L, Honda H, Yamasaki N, Nagamachi A, Inaba T, Ikawa T, Urayama KY, Kiyokawa N, Ohara A, Kimura S, Kubota Y, Takita J, Goto H, Sakaguchi K, Minegishi M, Iwamoto S, Shinohara T, Kagami K, Abe M, Akahane K, Goi K, Sugita K, Inukai T.	4. 巻 136
2. 論文標題 Association of aberrant ASNS imprinting with asparaginase sensitivity and chromosomal abnormality in childhood BCP-ALL.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2319-2333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019004090.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ikawa-T	4. 巻 -
2. 論文標題 転写因子とマクロファージ分化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fischer U, Yang JJ, Ikawa T, Hein D, Vicente-Duenas, Borkhardt A and Sanchez-Garcia I.	4. 巻 1
2. 論文標題 Cell fate decisions: The role of transcription factors in early B-cell development and leukemia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discov	6. 最初と最後の頁 224-233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2643-3230.BCD-20-0011.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto K, Kouno T, Ikawa T, Hayatsu N, Miyajima Y, Yabukami H, Terooatea T, Sasaki T, Suzuki T, Valentine M, Pascarella G, Minoda A, Taniuchi I, Arai Y, Hirose N, Carninci P	4. 巻 116
2. 論文標題 Single-cell transcriptomics reveals expansion of cytotoxic CD4 T cells in supercentenarians	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 24242-24251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1907883116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 葉師寺 那由多, 伊川 友活	4. 巻 71
2. 論文標題 B細胞分化を駆動する転写プログラムとクロマチン制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 215-222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ikawa T
2. 発表標題 Transcriptional regulation that determines early lymphocyte development and leukemia
3. 学会等名 The 7th Cancer Epigenetics Symposium (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 免疫細胞の分化・腫瘍化を制御するエピジェネティクス
3. 学会等名 第105回日本栄養・食料学会関東支部大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takano J, Ito S, Nakajima-Takagi Y, Iwama A, Ikawa T and Koseki H
2. 発表標題 Non-canonical PRC1.1 is required for specification of hematopoietic progenitor cells toward B lymphoid lineage
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊川 友活, 高野 淳一郎, 古関 明彦
2. 発表標題 異性型ポリコムタンパクPCGF1はPRC2の機能を安定化させることによりB 細胞系列への運命決定を促進している
3. 学会等名 第29回Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikawa T and Takano J
2. 発表標題 Essential roles of variant PCGF1-PRC1 in regulating hematopoietic cell fates
3. 学会等名 FASEB The Molecular Mechanisms of Immune Cell Development and Function Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 無限に増幅する血液前駆細胞を用いた抗腫瘍薬の開発
3. 学会等名 BioJapan2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takano J, Ito S, Nakajima-Takagi Y, Iwama A, Koseki H, and Ikawa T
2. 発表標題 Variant PCGF1-PRC1 regulates hematopoietic cell fates through nucleosome composition
3. 学会等名 第81回日本血液学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikawa T
2. 発表標題 Epigenetic control in early lymphocyte development
3. 学会等名 The 30th Anniversary International Symposium of Research Institute for Biomedical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikawa T, Takano J, and Koseki H
2. 発表標題 Essential roles of PCGF1 in controlling hematopoietic cell fates
3. 学会等名 第48回日本免疫学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 ポリコームタンパクPCGF1は造血系細胞分化においてDNA複製と運命制御を結びつける働きをしている
3. 学会等名 さきがけ第4回終了領域研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	高野 淳一郎 (TAKANO JUNICHIRO) (00852162)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ リサーチアソシエイト (82401)	
研究 分担者	磯田 健志 (ISODA TAKESHI) (80815225)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------