

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22118004

研究課題名（和文）多能前駆細胞からT細胞系列への運命決定の分子機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of molecular mechanisms regulating lineage commitment taking place on the way from multipotent hematopoietic progenitors to unipotent T cell progenitors

研究代表者

河本 宏（Kawamoto, Hiroshi）

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：00343228

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 196,500,000円

研究成果の概要（和文）：本計画研究は、多能前駆細胞からT前駆細胞への分化決定過程の分子機構を解明する事を目標とした。主に試験管内で分化を停止/再開させる手法を用い、まずT細胞系列のマスター制御因子が転写因子Bcl11bであることを明らかにした（Science, 2010）。さらにT細胞分化経時的サンプルのデータは理研FANTOM5プロジェクトの一部として発表された（Science, 2015）。また、ポリコムをT前駆細胞において欠失させると、T系列からB系列へ分化転換することを見いだした（論文投稿中）。このように、T細胞系列決定過程で起こる転写因子制御と、エピジェネティクス制御の機構解明に切り込むことができた。

研究成果の概要（英文）：This project aimed to clarify molecular mechanisms that regulate lineage determination steps taking place during developmental process from multipotent hematopoietic progenitors to unipotent T cell progenitors. By using in vitro on/off differentiation culture system, we disclosed that transcription factor Bcl11b works as a master regulator of T cell lineage determination (Science, 2010). The data on the time course sample of in vitro T cell differentiation was published as a part of Riken FANTOM5 project (Science, 2015). We further found that by conditionally inactivating polycomb function in T cell lineage, T cell progenitors were converted to B cell lineage (submitted). Thus, we have succeeded in revealing transcriptional and epigenetic mechanisms of T cell lineage determination.

研究分野：免疫学・血液学

キーワード：系列決定 転写因子 エピジェネティクス T細胞系列 B細胞系列

1. 研究開始当初の背景

多能性の造血幹細胞から単能性前駆細胞ができるまでの過程においては、分化能は一定の順序で段階的に限定されていく。この過程は、しかし、骨髄中の 0.1% 程度の頻度の未分化な前駆細胞段階で起こっており、その分子機構を解明することは困難であった。本研究では、全く新規なアプローチを用いて、この課題に取り組むことを考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ミエロイド (M) -T-B 多能前駆細胞から T 前駆細胞への分化能限定過程の分子機構の解明を目指す。研究代表者の河本らは、最近 T 前駆細胞はミエロイド系への分化能を保持していることを明らかにした (Nature, 2008)。本研究では、MTB 多能前駆細胞から T 前駆細胞へ至る過程で起こる「まず B 細胞への分化能を停止し、次にミエロイド系への分化能を停止する」という段階的の分化能喪失過程の分子機構を、転写因子ネットワーク形成と染色体修飾等のエピジェネティックな制御という観点から解析することを目的とした。

3. 研究の方法

河本らは、分化の強制停止により M-T-B および M-T という系列決定状態を維持したまま培養中で前駆細胞を増殖させること、また再度分化を開始させることに成功していた。具体的には、E 蛋白転写因子である E2A の機能阻害法と、ノッチシグナルと IL-7 シグナルの持続的付与により、分化を強制停止させる方法である。この実験システムを用いて、ジェネティック/エピジェネティックな解析を経時的に行ない、これらのステージへの誘導、およびステージの維持に働く分子機構を解明する (図 1)。

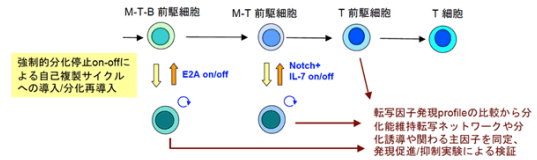


図 1 研究方法の概略

一方、研究分担者の岩間らはエピジェネティックな制御因子であるポリコム遺伝子 Bmi-1 が B 細胞系列関連転写因子を抑制することにより B 細胞系列への決定を制御していることを見いだした (Cell Stem Cell, 2010)。河本らと岩間らとの共同研究により、MTB 段階から MT 段階への推移にエピジェネティックな要因がどう関与するかを解明する。

MT 段階から T 段階への推移に関しては、河本らが転写因子 Bcl11b が必須であることを、研究分担者の谷内らが T 系列への決定と T 細胞レセプター遺伝子の再構成開始に転写因子 Runx 因子が関与していることを見いだしていた (領域開始時未発表)。河本と谷内らの共同研究により Bcl11b と Runx 因子がどのように関連するか、系列決定に伴いどのような転写ネットワークが形成されるかを解明する。

4. 研究成果

まず、上記の方法を用いて、マウスの胸腺前駆細胞をいろいろな条件で培養したところ、フィーダー細胞を用いないでサイトカインとノッチリガンドだけで培養した時に、DN2 とわれる分化段階 (c-kit+CD25+) で分化が停止することを見いだした (図 2) (Ikawa T et al., Science, 329: 93, 2010)。DN2 は MT 前駆細胞から T 前駆細胞への決定が起こる段階である。

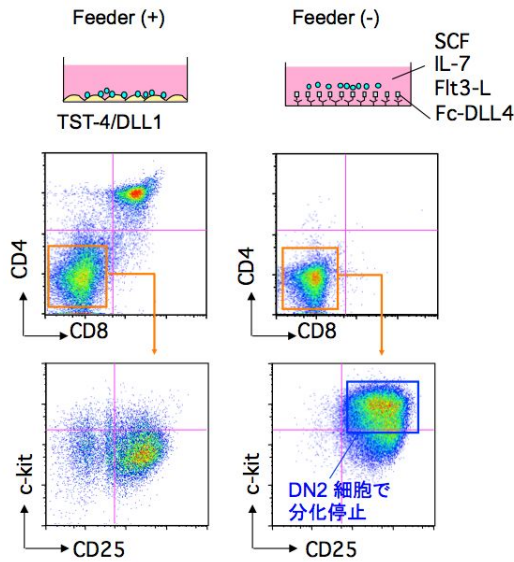


図2 フィーダー無しの培養条件ではDN2段階で分化が停止する。

次に、Bcl11b 欠損マウスを用いて調べたところ、DN2 段階で分化が停止していることを見いだした(図3)。

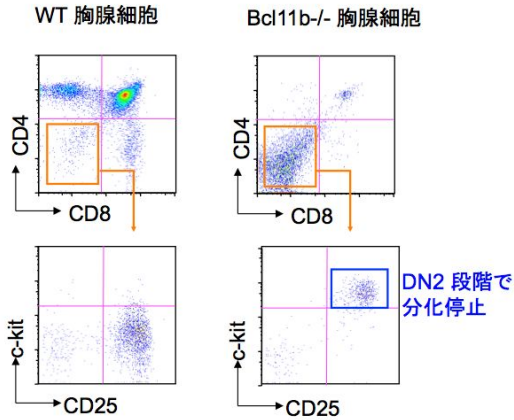


図3 Bcl11b マウスでは胸腺細胞はDN2段階で分化が停止が停止する。

これらの結果から、M-T 前駆細胞が T 前駆細胞になる過程のマスター制御因子が転写因子 Bcl11b であることを明らかにした(図4) (Ikawa T et al., Science, 329: 93, 2010)。

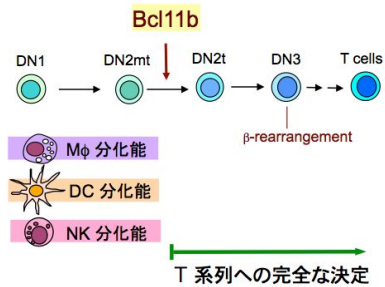


図4 Bcl11bはT細胞系列決定を駆動する主因子である

次に、期間中の研究で、EBF1 欠損多能前駆細胞から T 細胞系列へ誘導する系を用いて、15 のタイムポイントについての分化誘導細胞のサンプルを作製し、理研の FANTOM5 というプロジェクトで解析された。その結果は、他の細胞種を用いた経時サンプルとともに2014 年度に発表された (Arner E et al. Science, 329: 1010, 2015)。

さらに、これらの方法を用いて得られた分化再開細胞のゲノムワイドな遺伝子発現解析データにバイオインフォマティクス解析を加え、M-T-B から M-T 前駆細胞への誘導に働く転写因子の遺伝子発現ネットワーク構造を描出した。これらの結果は申請者が責任者となる論文として現在作製中である。

また、本研究期間中に、T 前駆細胞においてポリコムを欠失させると T 細胞の分化が著明に障害される事と、T 系列から B 系列へ分化転換することを見いだした。さらに PAX5 が

その責任遺伝子であることも見だし、この現象の分子機構に切り込むことができた。これはT細胞初期分化過程におけるエピジェネティックな遺伝子制御の重要性を示す重要な成果で、現在論文投稿中である（図5）。

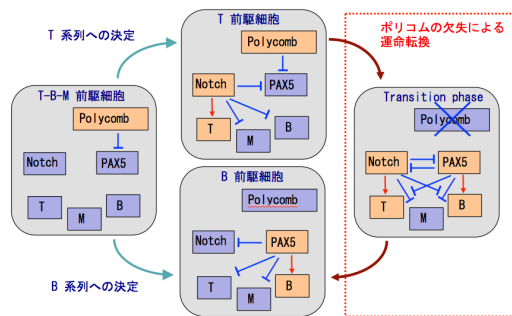


図5 T 前駆細胞においてポリコムを欠失させるとT系列からB系列へ分化転換する

このように、T細胞系列への決定過程で起こる転写因子制御と、エピジェネティクス制御の機構解明に切り込むことができたと考えている。

岩間グループは、ES細胞で明らかとなった幹細胞の多能性を維持するヒストン修飾、すなわち、ポリコム群複合体とトライソラックス群複合体による転写抑制化と活性化の相反するヒストン修飾が共存するbivalent domainが、造血幹細胞においても血球分化に関連する遺伝子プロモーター上に形成され、分化多能性の維持に機能することを、ポリコム群遺伝子欠損マウスの解析から明らかにした。これは、造血幹細胞における分化多能性のエピジェネティック制御機構を初めて明らかにしたものである。

谷内グループは、胸腺細胞のCD4ヘルパー/CD8キラー系列への分化運命決定機構に関して、核内での遺伝子発現制御機構の観点から研究を行った。特にCD4ヘルパー系列への分化に必須のThPOK転写因子をコードするZbtb7b遺伝子の発現制御について、シス制御領域の同定からその作用機序の解明に向けて、制御領域の位置置換を含んだ総括的な遺伝学的解析を実施し、制御領域間のループ構造形成が機能制御に重要である知見を得た。更に新規のヘルパー/キラー運命制御因子として、Bcl11bやSATB1を同定し、これら因子の遺伝子変異マウスを用いた解析により、これら因子の作用機序の一端を明らかにした。

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)
計画研究（河本）

- 1) Arner E et al (Kawamoto H は109人の著者のうち38番目) . □Enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. □Science. 329: 1010-1014, 2015.
- 2) Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S-I, Koseki H, Kawamoto H*. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPS cells derived from mature CD8+ T cells. Cell Stem Cell. 12: 31-36. 2013.
- 3) Ikawa, T, S Hirose, K Masuda, K Kakugawa, R Satoh, A Shibano-Satoh, R Kominami, Y Katsura, H Kawamoto*. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. Science. 329: 93-96, 2010.

分担研究（岩間/指田）

- 1) Nakajima-Takagi Y, Osawa M, Oshima M, Takagi H, Miyagi S, Endoh M, Endo TA, Takayama N, Eto K, Toyoda T, Koseki H, Nakauchi H, and *Iwama A. Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. **Blood** 121, 447-458, 2013.
- 2) Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y,

Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, Koseki H, and *Iwama A. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. **Blood** 120, 1107-1117, 2012.

3) Oguro H, Yuan J, Tanaka S, Miyagi S, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Yamazaki S, Koseki H, Nakauchi H, and *Iwama A. Lethal myelofibrosis induced by *Bmi1*-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes. **J Exp Med** 209, 445-454, 2012.

4) Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, Negishi M, Saraya A, Konuma T, Shinga J, Koseki H, and *Iwama A. Dependency on the polycomb protein Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. **Blood** 118, 6553-6561, 2011.

5) Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T, Yamaguchi N, Kitabayashi I, Koseki H, and *Iwama A. The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. **Blood** 118, 2443-2453, 2011.

6) Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, Ikawa T, Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, and *Iwama A. Poised lineage specification in multipotent hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. **Cell Stem Cell** 6, 279-286, 2010.

分担研究 (谷内)

1) Mucida D, Husain M.M, Muroi S, van Wijk F, Shinnakasu R, Naoe Y, Reis B, Huang Y, Lambalez F, Docherty M, Attinger A, Shui J.W, Kim G, Lena C, Sakaguchi S, Miyamoto C, Wang P, Atarashi K, Park Y, Nakayama T, Honda K, Ellmeier W, Kronenberg M, *Taniuchi I and *Cheroutre H. Transcriptional Reprogramming of Mature CD4 T helper Cells generates distinct MHC class II restricted Cytotoxic T Lymphocytes. **Nat. Immunol.** 14:281-9, 2013.

2) Tanaka H, Naito T, Muroi S, Seo W, Chihara R, Miyamoto C, Kominami R and *Taniuchi I. Epigenetic Thpok silencing limits the time window to choose CD4+ helper-lineage fate in the thymus. **EMBO J.** 32:1183-94, 2013.

〔学会発表〕(計4件)

研究代表者河本 海外招待講演

1) Nikolas Symposia, May 10, 2013, Athens, Greek

"Close relationship between myeloid and lymphoid lineages"

2) Congress of European Hematology association, June 12, 2013, Stockholm, Sweden

"Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology"

3) World Conference of Regenerative Medicine, Oct 23, 2013, Leipzig, Germany

"Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology"

4) Annual Meeting of Chinese Medical Association, June 28, 2014, Taipei, Taiwan

"Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology: a novel strategy for cancer immunotherapy"

〔図書〕(計2件)

1) 河本宏、羊土社、もっとよくわかる！免疫学、2011年2月

2) 河本宏、オーム社、マンガでわかる免疫学、2013年6月

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 1 件)

名称: **造血幹 / 前駆細胞の特性を有する細胞の製造方法**

発明者: 河本宏、伊川友活、桂義元

権利者: 理研

種類: 特許

番号: WO2009113595 A1

出願年月日: 2009年3月11日

取得年月日: 2014年10月29日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河本 宏 (Hiroshi Kawamoto)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：00343228

(2) 研究分担者

谷内 一郎 (Ichiro Taniuchi)
理化学研究所・統合生命医科学研究センター・グループディレクター
研究者番号：20284573

指田 吾郎 (Goro Sashida)
千葉大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70349447

岩間 厚志 (Atsushi Iwama)
千葉大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70244126

(3) 連携研究者

()

研究者番号：