

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08291

研究課題名(和文) NKT細胞受容体V 14J 18遺伝子再構成に関わるクロマチンダイナミクス

研究課題名(英文) Chromatin dynamics in the regulation of TCR Valpha14Jalpha18 rearrangement

研究代表者

香城 諭 (Kojo, Satoshi)

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：70360542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：NKT細胞は、均一なV 14J 18受容体を発現し、CD1d分子上に提示された糖脂質抗原を認識する特殊なリンパ球である。今回、この特徴的なT細胞受容体の遺伝子再構成における分子機構を明らかにすべく、V 14プロモーターに結合する転写因子の観点からの解析を加えた。DNA配列解析・プロモーター配列を用いたDNAプルダウン・未熟NKT細胞のRNA-seq解析などにより、23種類の候補遺伝子を選定し、うち18遺伝子のノックアウトマウスの作成によりその機能を確認した。その結果、2系統のマウスにおいて、顕著なNKT細胞の減少が確認され、NKT細胞分化に重要な遺伝子であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：NKT cell expresses invariant T cell receptor (TCR) V 14J 18 gene and recognizes glycolipid antigen presented on MHC class I-like antigen presenting molecule CD1d. In this study, to clarify the mechanisms of specific gene rearrangement of TCR V 14J 18, we tried to find responsible transcription factor(s) by the detection of TCR V 14 promoter binding proteins. After the screening of candidate genes, which can bind to promoter region of TCR V 14, 18 gene knockout mouse lines were generated by the CRISPR/Cas9 system. Severe reduction of NKT cell in the thymus and peripheral lymphoid organs was observed in the two knockout lines, suggesting that these V 14 promoter-binding proteins are important for the regulation of NKT cell development.

研究分野：分子免疫学

キーワード：NKT細胞 T細胞受容体遺伝子再構成 クロマチン 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

NKT 細胞は、均一な抗原受容体  $V\alpha 14J\alpha 18$  鎖によって、抗原提示分子 CD1d 上に提示された糖脂質を認識し、様々な生理活性を發揮する極めてユニークなリンパ球である。NKT 細胞への系列決定には  $V\alpha 14J\alpha 18$  受容体遺伝子再構成が極めて重要である。通常の T 細胞におけるランダム遺伝子再構成とは異なり、NKT 細胞特異的な遺伝子再構成誘導機構の存在が示唆されるが、現在のところその制御機構の詳細は明らかになっていない。クロマチン構造を制御するポリコム群タンパク質 (PcG) の一つ Ring1 遺伝子の欠損によって NKT 細胞が消失することから (図 1)、クロマチン構造の動的な制御が NKT 細胞の分化に必須であることがわかる。

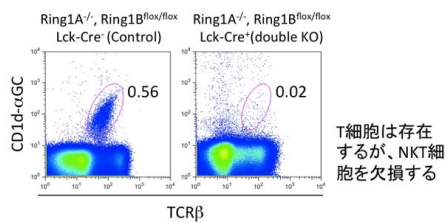


図1. Ring1A/B DKO胸腺におけるNKT細胞の欠如

## 2. 研究の目的

本研究では、以上の背景を基に、NKT 細胞分化中の TCR  $V\alpha 14$  遺伝子領域に着目し、 $V\alpha 14J\alpha 18$  特異的遺伝子再構成に寄与するクロマチンダイナミクス制御機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、induced leukocyte stem (iLS) 技術 (Ikawa T, et al. Stem Cell Rep. 2015) と NKT 細胞クローンマウス (Inoue K, et al. Curr. Biol. 2005) を併用、あるいは NKT 細胞クローンマウス由来 ES 細胞 (Watarai H, et al. Blood 2010) を用いて、NKT 前駆細胞の大量確保を試みた後、以下の検討項目を実施する形で遂行した。

1. NKT 細胞分化に伴う  $V\alpha 14J\alpha 18$  受容体遺伝子領域クロマチン構造の時間的変容確認
2.  $V\alpha 14J\alpha 18$  遺伝子再構成部位に集積する転写因子・クロマチン制御因子を同定し、遺伝子欠損マウスの作製を介して遺伝子再構成への関与を検証

## 4. 研究成果

- (1) NKT クローンマウス由来造血幹細胞を用いた iLS 細胞の樹立の試み

研究代表者は、NKT 細胞核移植によって樹立した NKT 細胞クローンマウスを保有している。これは、体細胞のすべてが遺伝子再構成された NKT 細胞受容体  $V\alpha 14J\alpha 18$  を保有しており、このマウス由来の造血幹細胞は NKT 前駆細胞として利用可能である。研究代表者は、本クローンマウス由来の造血幹細胞に

ID3 遺伝子を強制発現し、Tst-4 細胞上にて未分化造血幹細胞の大量増殖を試みた (iLS 細胞: Ikawa T, et al. Stem Cell Rep. 2015)。T 細胞受容体遺伝子再構成が認められない野生型マウス由来の造血幹細胞では iLS 細胞の誘導に成功したものの、 $V\beta 8$  あるいは  $V\alpha 14J\alpha 18/V\beta 8$  の再構成遺伝子を保有するクローンマウス由来の造血幹細胞においては、ID3 による未分化性維持が極めて難しく、NKT 前駆細胞を大量確保できなかった。

そこで、NKT 細胞の核移植によって作製した NKT-ES 細胞 (Watarai H, et al. Blood 2010) を使用し、設定した検討項目の解析を実施した。

- (2) NKT 細胞分化に伴う  $V\alpha 14J\alpha 18$  受容体遺伝子領域クロマチン構造の時間的変容確認

NKT-ES 細胞を OP9/DL1 上で培養し、未分化な ES 細胞から NKT 細胞への分化を誘導した。その分化過程において、経時的に  $V\alpha 14$  領域のクロマチン構造変化を、ヒストン修飾を指標として検出した。その結果、初期状態ではヘテロクロマチン状態にある  $V\alpha 14$  遺伝子領域が、NKT 細胞への分化に伴いユークロマチン状態へ変化することを確認した。また、遺伝子欠損マウスの解析によって、NKT 細胞の分化に必須と考えられた PcG の一つ Ring1 の集積も確認された。このことは、NKT 細胞受容体遺伝子におけるクロマチン構造の動的制御を介して NKT 細胞の分化が誘導される可能性を示唆している。

- (3)  $V\alpha 14J\alpha 18$  遺伝子再構成部位に集積する転写因子・クロマチン制御因子を同定し、遺伝子欠損マウスの作製を介して遺伝子再構成への関与を検証

$V\alpha 14J\alpha 18$  遺伝子に集積する転写因子・クロマチン制御因子の候補を選択するために、次の点からの解析を実施した。

- 1)  $V\alpha$  プロモーターを対象とした転写因子結合配列検索を実施し、 $V\alpha 14$  遺伝子に特異的な転写因子結合配列を同定。
- 2)  $V\alpha 14$  遺伝子モーター領域を bait とした DNA プルダウンアッセイを実施し、結合タンパク質を質量分析にて同定。
- 3)  $V\alpha 14$  Venus レポーターを保有する NKT-ES 細胞を用い、T 細胞受容体未発現のレポーター陽性細胞 (NKT 前駆細胞) の RNA-seq 解析/Single cell RT-PCR 解析にて前駆細胞に特異的に発現している遺伝子の確認。

これらの解析の結果、 $V\alpha 14$  遺伝子の制御に寄与する可能性が示唆された 23 遺伝子について、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子欠損マウスの作製を試みた。

遺伝子欠損マウスの作製を試みた結果、23

遺伝子中 18 遺伝子について欠損マウスの樹立に成功した。

NKT 細胞、およびその他のリンパ球について、分化状況や機能等を網羅的に解析した結果、2 系統において NKT 細胞の著減が確認された。

遺伝子再構成時の V $\alpha$ 14 遺伝子の選択にこれらの候補遺伝子が関与する可能性を考え、Digital Genomic-PCR にて V $\alpha$ 14 レパトアの偏りの確認を試みたが、現在までのところ、V $\alpha$ 14 遺伝子選択の偏りを確認できてはいない。

一方、NKT1、NKT2、NKT17 の NKT サブセットを解析した結果、1 系統のマウスにおいて著しい偏りが確認された。このことは、特定のサブセットの分化において重要な遺伝子である可能性を強く示唆する。

#### <引用論文>

1. Inoue, K., Wakao, H., Ogonuki, N., Miki, H., Seino, K., Nambu-Wakao, R., Noda, S., Miyoshi, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ogura, A. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. *Curr Biol.* 15: 1114-1118, 2005
2. 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.* 5: 716-727, 2015
3. Watarai, H., Rybouchkin, A., Hongo, N., Nagata, Y., Sakata, S., Sekine, E., Dashtsoodol, N., Tashiro, T., Fujii, S., Shimizu, K., Mori, K., Masuda, K., Kawamoto, H., Koseki, H., Taniguchi, M. Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 TCR $\alpha$  gene. *Blood.* 115: 230-237, 2010

#### 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. Tenno, M.\*, Kojo, S.\*, Lawir, DF., Hess, I., Shiroguchi, K., Endo, TA., Muroi, S., Sato, R., Kawamoto, H., Boehm, T., Taniuchi, I. Cbfb2 controls differentiation of and confers homing capacity to pre-thymic progenitors. *J. Exp. Med.*, 215: 595-610, 2018 \*Equal contribution. 査読あり
2. Kojo, S., Tanaka, H., Endo, TA., Muroi, S., Liu, Y., Seo, W., Tenno, M., Kakugawa, K., Naoe, Y., Nair, K., Moro, K., Katsuragi, Y., Kanai, A., Inaba, T., Egawa, T., Venkatesh, B., Minoda, A., Kominami, R., Taniuchi, I. Priming of

lineage-specifying genes by Bcl11b is required for lineage choice in post-selection thymocytes. *Nat Commun.* 8:702. 2017 査読あり

3. Kakugawa, K., Kojo, S., Tanaka, H., Seo, W., Endo, TA., Kitagawa, Y., Muroi, S., Tenno, M., Yasmin, N., Kohwi, Y., Sakaguchi, S., Kowhi-Shigematsu, T., Taniuchi, I. Essential roles of SATB1 in specifying T lymphocyte subsets. *Cell Reports.* 19: 1176-1188, 2017 査読あり
4. Dashtsoodol, N., Shigeura, T., Aihara, M., Ozawa, R., Kojo, S., Harada, M., Endo, TA., Watanabe, T., Ohara, O., Taniguchi, M. Alternative pathway of V $\alpha$ 14<sup>+</sup> NKT cell development directly from CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes bypassing the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> stage. *Nat. Immunol.* 18: 274-282, 2017 査読あり
5. Kanda, M., Yamanaka, H., Kojo, S.\*, Usui, Y., Honda, H., Sotomaru, Y., Harada, M., Taniguchi, M., Suzuki, N., Atsumi, T., Wada, H., Baghdadi, M., Seino, K. Transcriptional regulator Bhlhe40 works as a cofactor of T-bet in the regulation of IFN- $\gamma$  production in iNKT cell. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 113: E3394-402, 2016. \*Corresponding author 査読あり
6. Dashtsoodol, N., Shigeura, T., Ozawa, R., Harada, M., Kojo, S., Watanabe, T., Koseki, H., Nakayama, M., Ohara, O., Taniguchi, M. Generation of novel Traj18-deficient mice lacking V $\alpha$ 14 natural killer T cells with an undisturbed T cell receptor  $\alpha$ -chain repertoire. *PLoS One.* 11: e0153347, 2016 査読あり
7. Hayashi, E., Hachiya, K., Kojo, S., Baghdadi, M., Takeuchi, S., Yamanaka, H., Abe, H., Wada, H., and Seino, K.  $\alpha$ -MSH stimulation contributes to TGF- $\beta$ 1 production via MC1R-MITF signaling pathway in melanoma cell. *Inflamm.Regen.* 35:244-254, 2015 査読あり

#### [学会発表](計6件)

1. Kojo, S., Tenno, M., Muroi, S., Taniuchi, I. Helper-lineage dominant activity of maturation enhancer in the Cd4 gene is controlled by a silencer-independent and Runx-dependent mechanism. 第46回日本免疫学会総会・学術集会. 宮城県仙台市. 2017年12月.
2. Kojo, S., Yasmin, N., Tenno, M., Muroi, S., Taniuchi, I. Helper-lineage dominant activity of maturation enhancer in the Cd4 gene is controlled by a silencer-independent and Runx-dependent mechanism. 7<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T cell Conference. Kyoto, Japan, Mar. 2017.
3. Kojo, S., Tenno, M., Muroi, S., Taniuchi, I. Helper-lineage dominant activity of maturation enhancer in the Cd4 gene is controlled by a silencer-independent and

Runx-dependent mechanism. 第45回日本免疫学会総会・学術集会・沖縄県宜野湾市・2016年12月.

4. Kojo, S., Seo, W., Muroi, S., Taniuchi, I. Specific requirement of C-terminal Zn finger motifs in Bcl11b transcription factor for lineage dissection upon receiving positive selection signals in the thymus. 16<sup>th</sup> International Congress of Immunology. Melbourne, Australia, Aug. 2016.
5. 香城 諭, Seo Wooseok, 室井佐和子, 谷内一郎. 転写因子 Bcl11b C 末端配列による T 細胞系列決定制御機構. 第26回 Kyoto T Cell Conference. 滋賀県大津市・2016年5月.
6. Kojo, S., Seo, W., Muroi, S., and Taniuchi, I. Roles of Bcl11b transcription factor in the control of CD4/CD8 lineage choice. 第44回日本免疫学会総会・学術集会・北海道札幌市・2015年11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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

香城 諭 (KOJO, Satoshi)  
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：70360542

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

谷口 克 (TANIGUCHI, Masaru)  
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・特別顧問/グループ  
ディレクター  
研究者番号：80110310

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：60450391

### (4) 研究協力者

小澤 里津子 (OZAWA, Ritsuko)  
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・テクニカルスタッフ