

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18998

研究課題名(和文) 転写因子Bach2による造血幹細胞の分化運命制御

研究課題名(英文) A Bach2-Cebp gene regulatory network for the commitment of multipotent hematopoietic progenitors

研究代表者

伊藤 亜里 (Itoh-Nakadai, Ari)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：90749772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：全ての血球は、骨髄中の造血幹細胞から多能性前駆細胞(MPPs)を経て分化する。MPPsでは、リンパ球、ミエロイド系(マクロファージ、単球)細胞などの成熟血球特異的な遺伝子は十分に発現しておらず、遺伝子の発現を調節する転写因子の働きにより、分化が制御される。本研究では、ミエロイド遺伝子抑制転写因子であるBach2が、定常状態及び炎症状態下のMPPsで、ミエロイド遺伝子誘導転写因子であるC/EBPファミリーと拮抗し、リンパ球の分化を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hematopoietic stem cells and multipotent progenitors (MPPs) commitment can be tuned in response to an infection so that their differentiation is biased toward myeloid cells. Here we find that Bach2, which inhibits myeloid differentiation in common lymphoid progenitors, represses a cohort of myeloid genes and activates those linked to lymphoid function. Bach2 repressed both Cebp and its target Csf1r, encoding C/EBP and macrophage colony-stimulating factor receptor (M-CSFr), respectively, whereas C/EBP repressed Bach2 and activated Csf1r. Bach2 and C/EBP further bound to overlapping regulatory regions at their myeloid target genes. Lipopolysaccharide reduced the expression of Bach2, resulting in enhanced myeloid differentiation. The Bach2-C/EBP GRN pathway thus tunes MPP commitment to myeloid and lymphoid lineages under both normal conditions and after infection.

研究分野：免疫学

キーワード：血球分化 転写因子 遺伝子発現制御 コミットメント

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells: HSCs) では、生体の恒常性を保つため、常に血球系列の分化バランスが取られている。この分化バランスは、主に、細胞外部からのサイトカインなどの刺激による細胞内の遺伝子発現変動によって調節される。

HSCs は、全ての血球に分化する能力を持つが、血球の中で最も強力な分化能を有するのは、細菌や、ウイルス感染初期の生体防御を担当するミエロイド系 (マクロファージ、顆粒球) であるという説が提唱されている。そのため、それ以外の細胞が分化するときにはミエロイド系分化を抑制する必要があると予想される。また、HSCs、MPPs (Multipotent progenitors)、および LMPPs (Lymphoid primed multipotent progenitors) を含む HSPCs (Hematopoietic stem and progenitor cells) は、グラム陰性菌外膜の構成タンパク質であるリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) の受容体である TLR4 (Toll like receptor 4) を発現している。LPS や、LPS 刺激時に生体内で上昇するサイトカイン M-CSF (Macrophage colony stimulation factor) は、HSCs に直接作用し、その分化をミエロイド系に傾けることが報告されている。

私たちは、骨髄の実質的な B 前駆細胞 (Common lymphoid progenitors: CLPs) において、Bach2 が、ミエロイド分化を抑制することで B 細胞分化を促進することを示した。さらに、Bach2 が、TLR4 の受容体構成因子である MD2 (*Ly96*) や、LPS 刺激後に発現が上昇するミエロイド系細胞分化誘導転写因子の *C/EBPβ* (*Cebpb*) などの炎症応答に関わるミエロイド系遺伝子群を直接抑制していることを明らかにした。これらの知見から、Bach2 が定常時および、細菌感染時の HSPCs で血球分化を制御している可能性を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、定常時および、細菌感染時の HSPCs の血球系列分化を Bach2 が制御する可能性について明らかにすることを目的とした。

具体的には、骨髄移植による Bach2 欠損 HSCs の分化能の評価、LPS 刺激の際の Bach2 欠損マウスの骨髄の造血変化を調べる。さらに、Bach2 を HSPCs に発現させ、その表現型を調べることで、Bach2 の多能性血球前駆細胞からの血球系列分化での機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

1) 骨髄競合移植による Bach2 欠損 HSCs の分化バイアスの評価: CD45.1 コンジェニックマウスと CD45.2 Bach2 欠損マウスの骨髄を等数 ( $1 \times 10^6$  個ずつ)、10Gy の放射線を照射した CD45.1 コンジェニックマウスに

移植する。移植 16 週間後、成熟細胞と、前駆細胞の数を数えることで、Bach2 欠損 HSCs の分化能を比較する。

2) HSPCs での Bach2 遺伝子の発現解析: Bach2 が HSPCs で機能する可能性を検討するにあたって、Bach2 の発現を HSPCs、ミエロイド前駆細胞 (Common myeloid progenitors: CMPs)、CLPs で測定する。また、LPS 刺激時の HSPCs での、Bach2 と各細胞系列に重要な転写因子群の発現を定量 PCR で測定する。

3) Bach2 と Bach1 欠損マウスの前駆細胞数の評価: Bach2 と類縁因子の Bach1 は、お互いに機能を補償する形で、CLPs でミエロイド分化を抑制し、B 細胞分化を促進している。そこで、Bach2 欠損、Bach1 欠損、Bach2 および Bach1 二重欠損 (Double deficient: DD) マウスの骨髄中の HSCs と前駆細胞数を野生型マウスと比較し、分化障害の有無を調べる。さらに、細菌感染時の血球分化における Bach2 の役割を明らかにするため、野生型と Bach2 欠損マウスに LPS 刺激を行い、6 日後の骨髄のミエロイドと B 細胞の割合を測定する。

4) Bach2 の前駆細胞での直接標的遺伝子の探索: Bach2 の標的遺伝子を明らかにするため、CLPs 様細胞である *Ebfl* 欠損細胞株で、Bach2 のクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) を行う。さらに、野生型と DD の HSPCs でマイクロアレイを行い発現が変動している遺伝子と ChIP-Seq の結果を照らし合わせることで標的遺伝子を探索する。

## 4. 研究成果

1) B 細胞の系統分化は、骨髄で HSCs、MPPs、LMPPs、CLPs および Pre-pro-B の分化段階を経て、もっとも未熟な B 細胞である pro-B 細胞に分化する。このうち、LMPPs と CLPs は、HSCs と MPPs に比べ、リンパ球分化に偏った前駆細胞である。Pre-pro-B は、B 細胞の細胞表面マーカーである B220 を発現しており、ほとんどの細胞が Pro-B 細胞に分化する。CD45.2 Bach2 欠損マウスと、CD45.1 コンジェニックマウスの骨髄の競合移植の結果、Bach2 欠損マウス由来の細胞では、未熟および成熟骨髄 B 細胞と胸腺 T 細胞の割合が激減することがわかった。さらに、Bach2 欠損マウス由来の血球では、LMPPs と CLPs の数が減少傾向であった。一方で、HSCs と MPPs の数に変化は見られなかった。これにより、Bach2 は CLPs から B 細胞への分化のみならず、多能性前駆細胞からリンパ球前駆細胞への分化にも重要である可能性が示唆された。一方で、ミエロイドと赤血球系の共通前駆細胞である、CMPs の割合は、野生型マウスと Bach2 欠

損マウス由来の細胞で同等であった。

2) 各分化段階の細胞を分取し、*Bach2* 遺伝子の発現を定量 PCR で確認した。*Bach2* は HSCs、MPPs、LMPPs で発現しており、CLPs で発現が上昇することがわかった。次に、*Bach2-RFP* レポーターマウスで、解析を行った。*Bach2* の発現は、HSPCs では CLPs より若干減弱するものの、しっかりと発現しており、CMPs では、著しく低下することがわかった。最後に、野生型の HSPCs を分取し、LPS 刺激を行った。その結果、刺激後 48 時間で、*Bach2* の発現が減少し、*Cebpb* の発現が上昇することがわかった。これらの結果は、*Bach2* 遺伝子の発現が、ミエロイド分化の際に抑制されることを示していた。

3) *Bach2* 欠損、*Bach1* 欠損、DD マウスの HSCs および前駆細胞数を野生型マウスと比較した。その結果、DD マウスでは、HSCs と MPPs の数は野生型と同等であったが、LMPPs と CLPs の数は有意に減少した。単独欠損マウスでは減少傾向はあるものの、有意な差は見られなかった。これらのことから、*Bach2* と *Bach1* は相補的にリンパ球前駆細胞の分化を促進する可能性が示された。また、MPPs に *Bach2* 遺伝子を発現させたところ、B220 陽性 CD19 陰性の Pre-pro-B 様細胞に分化したが、*Bach1* を発現させても分化しなかったことから、*Bach2* が主体となってリンパ球前駆細胞分化を調節している可能性が考えられた。マウスに LPS を投与すると、6 日後には骨髄でミエロイド細胞が増え、リンパ球の割合が減少する。*Bach2* 欠損マウスでは、その程度が激しく、6 日後にはリンパ球の割合は野生型マウスでは 10 % 程度であったのに対し、*Bach2* 欠損マウスでは、5 % 以下であった。また、ミエロイドの割合は野生型 60 % に対し、*Bach2* 欠損マウスでは 80 % と、その割合は有意に増加した。これらの結果は、*Bach2* が、細菌感染の際に過剰なミエロイド系への分化と、B 細胞の減少を抑えている可能性を示唆していた。

4) 生体内での DD HSCs の遺伝子変化を明らかにするため、野生型と DD の HSPCs (HSCs, MPPs, LMPPs) の遺伝子発現をマイクロアレイで比較し、GSEA (Gene set enrichment analysis) 解析を行った。その結果、DD HSPCs で野生型 HSPCs よりも発現が高かった遺伝子には、ミエロイド前駆細胞で上昇する遺伝子が有意に濃縮しており、野生型 HSPCs で DD HSPCs より発現が高かった遺伝子は、CLPs で上昇する遺伝子が、有意に濃縮していた。よって、DD HSPCs は、ミエロイド分化能が上昇している可能性が示唆された。そこで、*Bach2* 欠損の HSPCs の機能を明らかにするため、野生型と *Bach2* 欠損の HSPCs と CLPs を分取し、

B 細胞に分化誘導を行った。CLPs の細胞表面には、B220 も CD19 も発現していないが、その次の分化段階である、Pre-pro-B では B220 が発現する。CD19 は Pro-B になって初めて発現する。*Bach2* 欠損 HSPCs を B 細胞に分化させたところ、Pre-pro-B 細胞である B220<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>細胞の数が野生型に比べて有意に低下した。一方で、CLPs を分化させた時には、Pre-pro-B 細胞の数の両者の間で変化は見られなかった。また、B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> の B 細胞の数は、*Bach2* 欠損 CLPs では、野生型の 6 割程度の減少率であったが、*Bach2* 欠損 HSPCs では、野生型の 1 割程度にまで減少した。これらの結果は、*Bach2* が CLPs から Pro-B 細胞の分化だけでなく、HSPCs から CLPs の分化を促進している可能性を示唆していた。

*Bach2* を *Ebfl* 欠損細胞で過剰発現した際、*Cebpb* などのミエロイド系の遺伝子の発現が減弱しリンパ球系の遺伝子の発現が促進する。同様に、*Bach2* が直接発現を抑制する C/EBPβ を *Ebfl* 欠損細胞に発現させると、*Bach2* 過剰発現の際には抑制された M-CSF 受容体 (*Csf1r*) など複数のミエロイド遺伝子の発現が上昇し、*Gata3* などのリンパ球系の遺伝子の発現が減少した。さらに興味深いことに、C/EBPβ は、*Bach2* の発現を強力に抑制することがわかった。

*Bach2* の直接標的遺伝子を明らかにするため、*Ebfl* 欠損細胞で、*Bach2* の ChIP-Seq を行い、前駆細胞での *Bach2* の結合部位を探索した。さらに、公開されている C/EBPβ の樹状細胞での ChIP-Seq データ及び C/EBPα のマクロファージでの ChIP-Seq データも合わせて解析した。その結果、*Bach2* と C/EBP ファミリーは *PU.1*、*Csf1r*、*Irf8* などのミエロイド系遺伝子の同一遺伝子座位に結合することがわかった。以上の結果から、*Bach2* と C/EBP ファミリーは、お互いに遺伝子発現を抑制し、ミエロイド系の遺伝子の発現を調節することで、HSPCs の分化調節能を制御している可能性が考えられた。

本研究から、細菌感染時に HSPCs では、*Bach2* と C/EBPβ の相互抑制的な関係によって、ミエロイド系とリンパ球の分化バランスが調節されることが考えられた。また、定常状態では *Bach2* と C/EBPα がこのバランスを制御する可能性も示唆された。血球分化の基本型はミエロイド系であるという説が以前より提唱されている。*Bach2* は、リンパ球分化の際に、この inner myeloid を抑制する役割を果たすことが予想され、血球分化の新たな理解につながると考えられる。

##### 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)

Kobayashi, M., Kato, H., Hada, H., Itoh-Nakadai, A., Fujiwara, T., Muto, A., Inoguchi, Y., Ichiyangi, K., Hojo, W., Tomosugi, N., et al. (2017). Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. *Haematologica* (査読あり) 102, 454-465.

Itoh-Nakadai, A., Matsumoto, M., Kato, H., Sasaki, J., Uehara, Y., Sato, Y., Ebina-Shibuya, R., Morooka, M., Funayama, R., Nakayama, K., et al. (2017). A Bach2-Cebp Gene Regulatory Network for the Commitment of Multipotent Hematopoietic Progenitors. (査読あり) *Cell Reports* 18, 2401-2414.

Igarashi, K., and Itoh-Nakadai, A. (2016) Orchestration of B lymphoid cells and their inner myeloid by Bach. *Current Opinion in Immunology* (査読あり) 39, 136-142.

Onodera, K., Fujiwara, T., Onishi, Y., Itoh-Nakadai, A., Okitsu, Y., Fukuhara, N., Ishizawa, K., Shimizu, R., Yamamoto, M., and Harigae, H. (2016) GATA2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood* (査読あり) 128, 508-518.

〔学会発表〕(計 3 件)

Hiroki Kato, Ari Itoh-Nakadai *et al.*, Transcription factor Bach1 and Bach2 operate Erythro-Myeloid competitive differentiation by responding to environmental changes., ASH 2016 Annual meeting Dec 3-6, 2016 San Diego, California, USA

Ari Itoh-Nakadai and Kazuhiko Igarashi, Bach2 represses myeloid programs to promote lymphoid progenitor development under both the steady state and infection., 第 44 回日本免疫学会学術集会 11 月 18-20 日, 2015 札幌

Ari Itoh-Nakadai and Kazuhiko Igarashi, Bach2 represses myeloid programs to promote lymphoid progenitor development under both the steady state and infection, The 3<sup>rd</sup> Symposium of International Immunological memory and vaccine forum, Oct, 30-31, 2015 Berlin, Germany

〔図書〕(計 1 件)

伊藤亜里、五十嵐和彦 リンパ球系とミエロイド系の遺伝子制御ネットワークの拮抗による細胞運命決定機構、臨床免疫・アレルギー科 第 64 巻 第 3 号 244-249 頁 2015 年 9 月 科学評論社

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 亜里 (Itoh-Nakadai, Ari)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号 : 90749772