

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04214

研究課題名(和文)ポリコムタンパクによるリンパ球分化運命制御機構

研究課題名(英文)Role of Polycomb proteins in lymphocyte cell fate decision

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞やB細胞は造血幹細胞から作られる。その過程で多能性の造血幹細胞は各種転写因子やエピジェネティック因子の働きにより徐々に分化能が限定されていき、最終的にT、Bリンパ球系列へ運命決定される。造血幹細胞からリンパ球系列への運命制御は骨髄において行われるが、その詳細は明らかでない。特に運命決定過程におけるエピジェネティック制御機構は不明である。我々は最近、ポリコム群タンパクPCGF1がB細胞初期分化に重要であることを見いだした。PCGF1は造血幹細胞からB細胞系列への運命決定において、ミエロイド系遺伝子や幹細胞系遺伝子の発現を抑制することにより、B細胞への分化を促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体産生を担うB細胞は骨髄中で造血幹細胞から作られるが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。特に、造血幹細胞からどのようにB細胞系列へ運命決定されるのか明らかでない。本研究により、B細胞の生成に重要な分子機構の一端が明らかとなった。この知見は白血病を含む造血器腫瘍の発症機構の解明に寄与すると考えられる。また、分化の分子機構が明らかになれば、免疫細胞療法や再生医療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：T cells and B cells are generated from hematopoietic stem cells (HSCs). HSCs gradually specify their fates to finally commit to the B cell lineage. Transcription factors and epigenetic modification play pivotal roles in the cell fate decision. However, the molecular mechanisms are largely unknown. We have recently found that the Polycomb group protein, PCGF1 was important for the B cell lineage specification from HSCs. B cell development in bone marrow of PCGF1-deficient mice was severely impaired, while T cells were normally generated. The expression of myeloid and stem cell genes was derepressed in PCGF1-deficient hematopoietic progenitors. Knock-down of the upregulated genes partially restored the B cell generation. Thus, these results indicate that PCGF1 is an essential epigenetic regulator for early B cell differentiation.

研究分野：免疫学、血液学

キーワード：エピジェネティクス 造血幹細胞 B細胞分化 運命決定 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写因子やエピジェネティック因子はリンパ球分化に重要な働きをしている。我々はこれまでにB細胞系列への決定には転写因子E2Aが、T細胞系列への最終的な運命決定には転写因子BCL11Bが必要であることを明らかにした (Ikawa et al. Immunity 2004; Ikawa et al. Science 2010)。また、T系列へ決定された前駆細胞の運命維持にポリコム群 (PcG) タンパクであるRING1A/Bが必須であることを示した (Ikawa et al. Genes Dev. 2018)。さらに東京大学の岩間教授らとの共同研究により、PcG タンパク PCGF4 (BMI1) が B 細胞特異的転写因子である EBF1 や PAX5 の発現を制御することにより、造血幹細胞の維持に重要であることを報告した (Oguro et al. Cell Stem Cell 2010)。このように PcG タンパクはリンパ球分化に重要であることが示唆されているが、リンパ球系列への最初のステップである、造血幹細胞からリンパ球系多能前駆細胞 (Lymphoid-primed multipotent progenitors : LMPP) への運命決定に関わっているのかどうかは不明である。

PcG タンパクは幹細胞の発生・分化に重要なエピゲノム制御因子である。PcG タンパクは主に PRC (polycomb repressive complex) 1 と PRC2 という 2 つのタンパク複合体からなる。PRC1 はヒストン H2A の 119 番目リジン (K) のユビキチン化 (H2AK119ub) 酵素である RING1A/B を中心とした複合体であり、含まれる PCGF タンパク (PCGF1-6) により 6 種類 (PRC1. 1-1. 6) に分けられる。これまでに PCGF2 (MEL18)、PCGF4 の形成する従来型 PRC1 が正常造血において重要な役割を果たすことが示唆されてきた。

一方、生化学的解析により、RING1A/B は含まれるものの、従来型の PcG 複合体には含まれない異性型ポリコム複合体の存在が示された (Gao et al. Mol. Cell 2012)。その構成要素である PCGF1, 3, 5, 6 は従来型のポリコム複合体 (PCGF2, 4) とは違う機能が示唆されているが詳細は明らかでない。

我々は最近、PCGF1 が造血幹細胞からリンパ球系列への分化決定に必須であることを見いだした。ERT2Cre-PCGF1^{f1/f1} マウスの骨髓細胞を正常マウスに移植し、タモキシフェンを用いて PCGF1 を造血系細胞特異的に欠損させたマウスでは、T 細胞分化が正常であったのに対し、骨髓における B 細胞がプロ B 細胞段階から消失していた。このマウスの造血幹細胞の維持には異常が認められなかったが、LMPP およびリンパ球系前駆細胞 (Common lymphoid progenitor : CLP) が減少し、ミエロイド・エリスロイド系前駆細胞 (CMP, GMP, MEP) が増大していた。このことから、PCGF1 はリンパ球系・ミエロイド系細胞の運命決定に重要であることが示唆された。

2. 研究の目的

T 細胞や B 細胞は造血幹細胞から作られる。その過程で多能性の造血幹細胞は各種転写因子やエピジェネティック因子の働きにより徐々に分化能が限定されていき、最終的に T, B リンパ球系列へ運命決定される。造血幹細胞からリンパ球系列への運命制御は骨髓において行われるが、その詳細は明らかでない。特に運命決定過程におけるエピジェネティック制御機構は不明である。前述のように、我々は最近、PcG タンパク PCGF1 が B 細胞初期分化に重要であることを見いだした。そこで、本研究では PCGF1 を含むポリコム複合体が造血幹細胞からリンパ球系列への運命決定にどのように寄与しているのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PCGF1 コンディショナル欠損 (cKO) マウス由来人工白血球幹細胞の作製とこれを用いた RNA-seq 解析

骨髓中の造血幹・前駆細胞は数が少ないため、これらの細胞を用いて網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-seq) やクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を行うのは困難である。そこで、最近我々が開発した、造血幹・前駆細胞を増幅する方法 (Ikawa et al. Stem Cell Reports 2015) を用いる。この方法を用いると人工白血球幹 (induced Leukocyte Stem : iLS) 細胞として LMPP 細胞を無限に増幅することができる (図 1)。

iLS 細胞は次のように作成する。まず、骨髓中の造血幹細胞へレトロウイルスを用いて Id3 を導入し、導入した細胞を TSt-4 ストローマ細胞上で培養する。TSt-4 細胞は、通常は B 細胞への分化を支持するが、Id3 が E2A の機能を阻害するため、B 細胞分化が初期の段階で停止し、多能前駆細胞 (iLS 細胞) として増幅する。この細胞を継代、増幅させることによって培養 1 ヶ月ほどで均質な iLS 細胞が大量に作成できる。作成された iLS 細胞はフローサイトメーターによる表面抗原の発現および遺伝子発現によって確認する。なお、この iLS 細胞は一度作成すれば少なくとも半年以

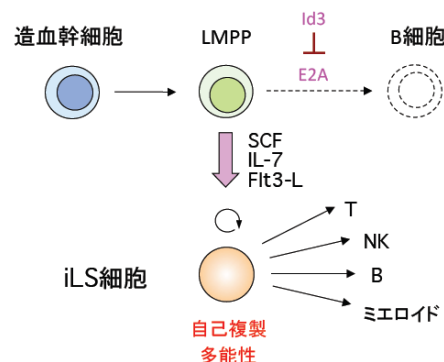


図 1 iLS (induced Leukocyte Stem)細胞

上維持することが出来るため、細胞株として長期に渡り以後の実験に用いることが出来る。この方法を用いて、PCGF1cKO (ERT2-Cre PCGF1^{fl/fl}) マウスから iLS 細胞を作成する。この細胞にタモキシフェン (4-OHT) を加えると PCGF1 欠損 iLS 細胞が得られる (図 2)。正常および PCGF1 欠損 iLS 細胞から RNA を採取し、RNA-seq 解析によって遺伝子発現を網羅的に調べる。こうして得られた RNA 発現データを比較検討することにより、PCGF1 の標的遺伝子を探索する。

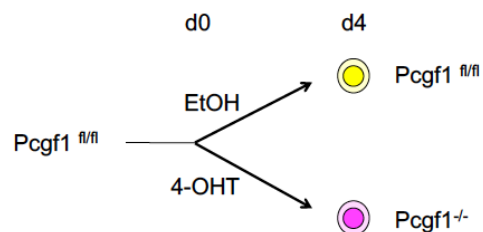


図 2 PCGF1 cKO iLS 細胞を用いた解析法

- (2) PCGF1cKO マウス骨髄の造血前駆細胞における ChIP-seq 解析

網羅的なクロマチン免疫沈降 (ChIP-seq) 法を用いて LMPP 段階における PCGF1 の結合遺伝子座を網羅的に解析する。すなわち、PCGF1cKO マウスより作成した iLS 細胞へ Tag を付けた PCGF1 遺伝子を導入し、PCGF1 の結合部位を探索する。まず、PCGF1-FLAG を発現するレトロウイルスベクターを PCGF1 欠損 iLS 細胞へ導入する。次に Anti-FLAG 抗体を用いて ChIP を行う。続いて次世代シーケンサーを用いたシーケンス (ChIP-seq) 解析を行い、網羅的に PCGF1 の結合遺伝子座を解析する。同様に、抗 RING1B 抗体や抗 Suz12 抗体を用いて他のポリコームタンパクである RING1A/B や SUZ12 (PRC2) の結合領域を解析する。さらに、転写活性化マーカーであるヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) 修飾や転写不活性化の目印であるヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) 修飾なども同様に解析し、ヒストン修飾状態を解析する。これら RNA-seq 解析と ChIP-seq 解析から PCGF1 の標的遺伝子を同定することを目指す。

- (3) PCGF1cKO 造血前駆細胞を用いた標的遺伝子の機能解析

1), 2) によって明らかとなった標的候補遺伝子の機能を、PCGF1cKO マウス骨髄の造血幹細胞を用いて解析する。具体的には、PCGF1 によって発現が抑制されている遺伝子の shRNA レトロウイルスベクターを PCGF1 欠損マウスの骨髄細胞から採取した造血幹・前駆細胞へ導入する。この shRNA を導入した細胞を Tst-4 細胞と共培養することにより、B 細胞分化が回復するかどうか調べる。また、こうした解析から、PCGF1 の造血幹細胞からリンパ球系列への分化制御機構を解明する。

4. 研究成果

ERT2-Cre PCGF1^{fl/fl} マウスの骨髄前駆細胞へ Id3 を導入し、B 細胞分化誘導条件下で培養すると約 1 ヶ月で自己複製能を持つ均一な iLS 細胞 (PCGF1cKO iLS 細胞) が生成された。この iLS 細胞へ 4-OHT を作用させ、4 日後に細胞を回収した。4-OHT を作用させていない iLS 細胞をコントロールとしてそれぞれの細胞から RNA を採取し、RT-qPCR で PCGF1 の発現を比較したところ、4-OHT を作用させた PCGF1 欠損 iLS 細胞では PCGF1 の発現が消失していた。そこで、これらの RNA を用いて RNA-seq 解析を行ったところ、PCGF1 欠損 iLS 細胞ではミエロイド系遺伝子 (*Hmga2*, *I16r*) や幹細胞系遺伝子 (*Tal1*, *Fzd2*) の発現が有意に上昇していた。

次に、PCGF1cKO iLS 細胞へレトロウイルスベクターを用いて PCGF1-FLAG を導入した。この細胞へタモキシフェンを作用させて内在性の PCGF1 を欠失させた。抗 FLAG 抗体、抗 RING1B 抗体、および抗 H3K27me3 抗体を用いて ChIP-seq 解析を行ったところ、PCGF1 は 1500 個あまりの遺伝子座に結合が確認された。そのほとんどはプロモーター領域であった。PCGF1 結合部位の大半は RING1B の結合部位とオーバーラップしていた。そのうちの 37% は H3K27me3 修飾を受けていた。すなわち、PCGF1/RING1B の結合領域は H3K27me3 修飾の有無で 2 つのクラスターに分けられることがわかった。H3K27me3 修飾を受けている遺伝子座を Cluster (C) 1、受けていない遺伝子座を C2 として解析を進めた。興味深いことに、C1 に含まれている遺伝子は PCGF1 欠損により、遺伝子発現が上昇したが、C2 では有意な差が見られなかった。このことから PCGF1 は通常の B 細胞分化において、遺伝子発現を抑制することが示唆された。PCGF1 欠損により脱抑制されていた遺伝子群のうち、*Hmga2* は high-mobility group (HMG) タンパクと呼ばれ、クロマチンの構造を修飾することが報告されてい

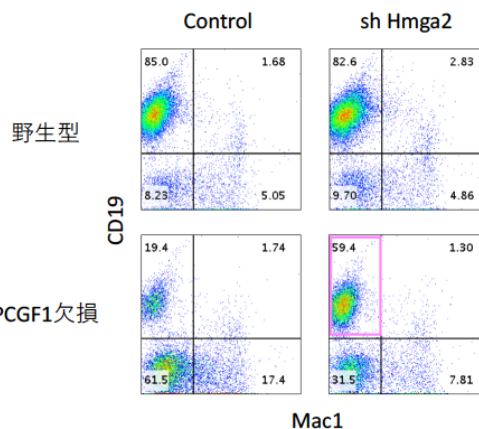


図 3 sh Hmga2 による PCGF1 欠損前駆細胞の B 細胞分化回復

る。また、Hmga2 は PCGF4 の標的遺伝子として骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の抑制に重要であることが示唆されていた。

そこで、PCGF1 と Hmga2 との関係を調べるために、Hmga2 に対する shRNA を作成し、PCGF1 cKO マウスの骨髄前駆細胞へ導入した。この細胞にタモキシフェンを作用させた上で B 細胞へ分化誘導すると、PCGF1 を欠損した骨髄前駆細胞では B 細胞分化が顕著に阻害されていた。一方、Hmga2 に対する shRNA を導入した PCGF1 欠損 iLS 細胞では、B 細胞分化が部分的に回復した (図 3)。この結果から、*Hmga2* は PCGF1 の重要な標的遺伝子の 1 つであることが明らかとなった。

驚いたことに、PCGF1 を欠損しても RING1B や H3K27me3 のレベルは下がらなかった。また、RING1A/B の基質である H2AK119ub1 レベルにも変化がなかった。このことは PCGF1 が RING1A/B や H3K27me3 非依存的に遺伝子発現を抑制することを示唆している。これは、これまで従来型 PRC1 (PCGF2/4) で示されてきた実験結果とは異なる。従って、PCGF1 を含む PRC1.1 複合体は RING1A/B や H3K27me3 非依存的に標的遺伝子の発現を抑制することが示唆された。また、この遺伝子発現の抑制によって、B 細胞分化が促進されることも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masuda J, Takayama E, Ichinose T, Strober W, Mizuno Kamiya M, Ikawa T, Kitani A, Kawaki H, Fuss I, Kawamoto H, Seno A, Vaidyanath A, Umemura N, Mizutani A, Kasai T, Honjo Y, Satoh A, Murakami H, Katsura Y, Kondoh N and Seno M	4. 巻 16
2. 論文標題 Suppression effect on IFN-g of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells isolated from b2-microglobulin-deficient mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Med.	6. 最初と最後の頁 4277-4282
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 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 Li S, Liu J, Min Q, Ikawa T, Yasuda S, Yang Y, Wang YQ, Tsubata T, Zhao Y and Wang JY	4. 巻 30
2. 論文標題 Kelch-like protein 14 promotes B-1a but suppresses B-1b cell development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 311-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxy033.	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 薬師寺 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 -

1. 著者名 宮井 智浩, 伊川 友活	4. 巻 70
2. 論文標題 多能性前駆細胞からB細胞への分化における段階的転写制御	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 503-513
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 Miyai T, Takano J, Endo TA, Kawakami E, Agata Y, Motomura Y, Kubo M, Kashima Y, Suzuki Y, Kawamoto H, Ikawa T	4. 巻 32
2. 論文標題 Three-step transcriptional priming that drives the commitment of multipotent progenitors toward B cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Dev	6. 最初と最後の頁 112-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.309575.117	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 -

1. 著者名 Noguchi S, Ikawa T ら(178人中75番目)	4. 巻 4
2. 論文標題 FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Data	6. 最初と最後の頁 170112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/sdata.2017.112	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 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

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 ポリコムタンパク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

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 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 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 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 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, 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 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 Takano J, Nakajima-Takagi Y, Koseki H, Iwama A and Ikawa T
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47回日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 異性型ポリコムタンパクPCGF1は造血幹細胞からB細胞系列への運命決定に重要である
3. 学会等名 さがけ第3回終了領域研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takano J, Nakajima-Takagi Y, Koseki H, Iwama A and Ikawa T
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80回日本血液学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川 泰策, 伊川 友活, 城口 克之
2. 発表標題 Automated Live Imaging and Single-cell Picking System for RNA-seq
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikawa T
2. 発表標題 Transcriptional programs that guide B cell development
3. 学会等名 The 2nd international innovation dialogue on genome engineering animal models and biomedical research symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takano J, Nakajima-Takagi Y, Koseki H, Iwama A and Ikawa T
2. 発表標題 A critical role of Non-canonical PRC1.1 for lineage determination of hematopoietic progenitor cells
3. 学会等名 第9回日本血液学会国際シンポジウム
4. 発表年 2018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は造血幹細胞からB 細胞系列への運命決定に重要である
3. 学会等名 第28回Kyoto T cell Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikawa T and Miyai T
2. 発表標題 Transcriptional priming that triggers the B cell fate determination
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 Immunosystem development
3. 学会等名 日本免疫学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 Three-step transcriptional priming that drives multipotent progenitors toward B cells
3. 学会等名 日本免疫学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 Epigenetic maintenance of T cell identity by Polycomb-mediated suppression of Pax5
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 A road map that guides the development of B cells
3. 学会等名 The 3rd Tsinghua-RIKEN Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊川 友活
2. 発表標題 Transcriptional networks during B lymphocyte commitment
3. 学会等名 FASEB meeting (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----