

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2020

課題番号：17KK0171

研究課題名（和文）単球と樹状細胞の分化における網羅的クロマチン高次構造解析

研究課題名（英文）3D chromatin structure analysis during mononuclear phagocyte differentiation

研究代表者

黒滝 大翼（KUROTAKI, Daisuke）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：10568455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：単球や樹状細胞を含む単核貪食細胞は自然免疫および獲得免疫応答さらに組織恒常性の維持などにおいて極めて重要な役割を有している。本研究者はこれまでに単球や樹状細胞の分化機構について転写因子によるエピゲノム制御の観点から研究を行ってきた。近年、細胞種特異的な遺伝子発現パターンの確立にクロマチン高次構造形成が関与することが示唆されている。本国際共同研究では単球や樹状細胞の分化過程におけるクロマチン高次構造変化を理解するためにHi-C解析を行った。その結果、単球や樹状細胞の分化に伴いクロマチン高次構造が大きく変化することがわかった。今後はクロマチン高次構造変化の分子メカニズムについて解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が関係する血液学・免疫学分野ではその重要性にも関わらずHi-Cは限られた研究室でのみ実施されている。本研究者はこの国際共同研究により微量細胞を用いたHi-C実験系を構築した。この技術を必要とする国内あるいは国外の研究者と積極的に共同研究を行いこの分野の発展に貢献していきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Mononuclear phagocytes, including monocytes and dendritic cells, play crucial roles in immune responses and tissue homeostasis. We have been studying the molecular mechanisms underlying monocytes and dendritic cells differentiation from the viewpoint of epigenomic regulation by transcription factors. Recent findings suggested that higher-order chromatin structure formation is involved in the establishment of cell type-specific gene expression patterns. In this international joint research program, we performed Hi-C analysis to understand 3D chromatin structure reorganization during monocyte and dendritic cell differentiation. As a result, we found that the chromatin structures dynamically change at the progenitor stage. In the future study, we plan to investigate the molecular mechanism and biological significance of chromatin structure change during monocyte and dendritic cell differentiation.

研究分野：単核貪食細胞のエピゲノム解析

キーワード：単球 樹状細胞 クロマチン高次構造

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

単球や樹状細胞を含む単核食細胞は自然免疫および獲得免疫応答さらに組織恒常性の維持などにおいて極めて重要な役割を有している。一方、これらの細胞の過剰あるいは異常な産生や活性化が免疫不全、自己免疫疾患、アレルギー疾患、がんなどの病態形成に関与することが知られている。そのためこれまでに単核食細胞が発現する分子に対する抗体や細胞の除去や活性化を狙った治療法の開発が試みられてきた。より効果的に単核食細胞を制御する方法を開発するには、これまでよりも深いレベルでこれら細胞の分化や機能の分子メカニズムを理解する必要がある。

単球や樹状細胞は骨髓造血幹細胞から中間的前駆細胞を介して分化する。本研究者はこれまでに単球や樹状細胞の分化機構について転写因子によるエピゲノム制御の観点から研究を行ってきた (Kurotaki et al. *Blood* 121, 1839, 2013; *Nat Commun* 5, 4978, 2014; [総説] Kurotaki et al. *Int Immunol* 29, 97, 2017)。エンハンサーは転写因子により認識されるゲノム領域であり、転写因子が結合することでプライミングおよび活性化される。そのようなエンハンサーはヒストン修飾の違いにより区別することが可能である (図1上)。例えばプライミングされたエンハンサーにはヒストン H3 の 4 番目のリジンの単メチル化 (H3K4me1) が生じ、活性化したエンハンサーでは H3K27 のアセチル化 (H3K27ac) が起こる。本研究者は単球や樹状細胞の分化過程におけるエンハンサーの変化を理解するために、マウス生体に由来する単球、樹状細胞、複数段階の前駆細胞を用いてエンハンサーに関連するヒストン修飾 (H3K4me1 および H3K27ac) や転写因子のクロマチン免疫沈降シーケンス (chromatin immunoprecipitation sequencing; ChIP-seq) を行った。その結果、単球や樹状細胞の前駆細胞において転写因子 IRF8 が発現し、単球や樹状細胞関連遺伝子のエンハンサーに結合することで、プライミング・活性化することがわかった (Kurotaki et al. *Cell Rep* 22, 2628, 2018)。

さらに、これらの遺伝子の発現は単球や樹状細胞に分化する段階で強く誘導されることを解明した (図1下)。

しかし、このエンハンサーの活性化と遺伝子発現誘導の間にあるタイムラグがどのような分子メカニズムにより制御されているのか不明であり、クロマチン高次構造などの変化が関与する可能性が考えられた。また本研究者を含めほとんどの研究では、エンハンサーは直近の遺伝子を制御するという仮定で解析を行っている。そのようなクロマチン高次構造を考慮しない解析法では転写因子による遺伝子発現制御を正確に理解することは難しい。そこで本国際共同研究では網羅的クロマチン高次構造解析法を渡航先で修得するのみならず、より微量細胞での解析方法を共同開発し、単球、樹状細胞の分化過程におけるクロマチン高次構造とその形成機構を明らかにする。さらにこれまでに得たエンハンサー関連ヒストン修飾データと統合解析を行い、単球、樹状細胞の分化機構の理解の深度を飛躍的に高める。

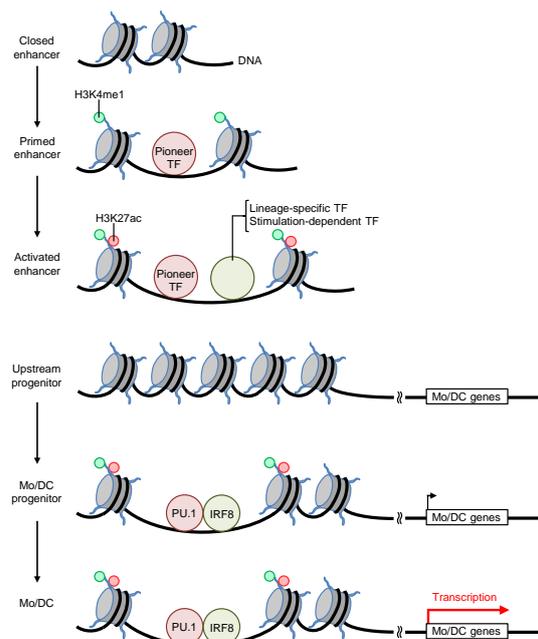


図1. 転写因子によるエンハンサーの制御

## 2. 研究の目的

転写因子によるエンハンサーを介した細胞種特異的遺伝子の発現制御を正確に理解するためには、エンハンサーがどの遺伝子のプロモーターと物理的に近接しているかを理解することが極めて重要である。ChIP-seq 等の技術によってエンハンサー候補領域を同定することは比較的容易になったが、現在一般的に行われているエンハンサーと遺伝子とをひも付ける方法はゲノムの配列上最も近いという単純な方法である。しかし、遠くにある遺伝子とエンハンサーがクロマチン高次構造の変化により物理的に近接する場合も多く、上述の方法ではクロマチン高次構造を考慮した場合に比較して著しく解析の精度が落ちる。さらに最近核内コンパートメントやトポロジカル関連ドメインと呼ばれるクロマチン高次構造が細胞種特異的な遺伝子発現制御に関わることが明らかにされてきている。また単球や樹状細胞の各分化段階における網羅的クロマチン高次構造解析はこれまでに行われていない。

染色体立体配座捕捉法 (Hi-C) は 3C (chromosome conformation capture) 法を応用した方法で、クロマチン高次構造を網羅的に解析することができる (図 2; Rao et al. *Cell* 159, 1665, 2014)。本国際共同研究では現在最も信頼できるクロマチン高次構造解析法の 1 つである Hi-C 技術を修得し、マウス生体由来する単球、樹状細胞、骨髄造血前駆細胞を用いて Hi-C を行うことで、単球と樹状細胞の分化制御機構を理解することを目的とする。

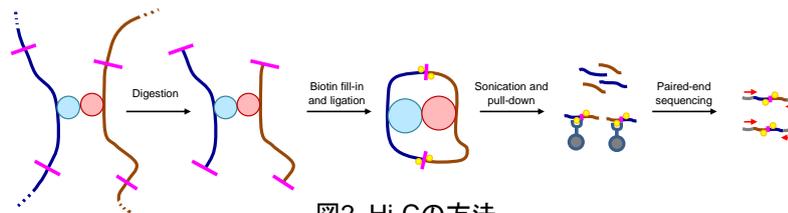


図2. Hi-Cの方法

### 3. 研究の方法

本研究者は上述の目的を達成するために 2018 年 8 月から 2019 年 2 月まで 6 カ月間米国メリーランド州に長期出張した。クロマチン高次構造解析法 (Hi-C) を修得するために、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health, NIH) の Keji Zhao 博士、Pedro P. Rocha 博士、Keiko Ozato 博士と国際共同研究を行った。Keiko Ozato 博士が所有する野生型マウスや遺伝子改変マウスから樹状細胞前駆細胞と成熟樹状細胞を単離し、Keji Zhao 博士や Pedro P. Rocha 博士が有する Hi-C プロトコルを用いて実験を行った。

最初の約 2 か月間は研究実施に必要な様々な事務手続きのためにほとんど実験を行うことはできなかったが、Hi-C に関する複数のプロトコルを収集し、試薬・消耗品などの準備、さらに共同研究者と入念なディスカッションを行った。その後、磁気ビーズやフローサイトメーターを用いてマウス骨髄や脾臓から樹状細胞や樹状細胞前駆細胞を分離し、Hi-C の条件検討を行った。検討した項目は細胞数、細胞固定の際の細胞懸濁に用いるバッファーの種類、DNA 濃縮の方法、PCR のサイクル数、使用する制限酵素・チューブ・次世代シーケンシングライブラリ調整用キットの選択など多岐にわたった。特にライブラリ調整用キットの選択は重要であり、最適化することで 10 倍以上効率が改善された。その結果、10 万個のマウス生体由来細胞で極めて質の高い Hi-C ライブラリを作製することに成功した。さらに作製した Hi-C ライブラリを 50 塩基ペアエンドで 1 サンプルあたり約 5 億リードを解析し、Hi-C データを得ることができた。Hi-C の解析パイプラインを確立するために、共同研究者らが使用しているバイオインフォマティクス解析ツールを NIH の解析サーバーを用いてテストしたが、6 カ月が経過したため帰国となった。

日本に帰国後より少ない細胞数で Hi-C を行うためにさらなる条件検討を行った。その結果、1 万個の細胞で十分な質の Hi-C ライブラリを得ることができた。最終的に造血幹細胞、複数段階の前駆細胞、単球、樹状細胞の Hi-C データを得ることができた。また現在公開されている数十の Hi-C 解析用バイオインフォマティクスツールを検討し、独自の解析パイプラインを構築することに成功した。

### 4. 研究成果

Hi-C データから解析可能なクロマチン高次構造には核内コンパートメントやトポロジカル関連ドメインなどがある (Oudelaar et al. *Nat Rev Genet* 22, 154, 2021)。核内コンパートメントの形成には層分離と呼ばれる現象が関与し、トポロジカル関連ドメインの形成には CTCF のゲノムへの結合とコヒーシオン複合体によるループ形成が関与する。今回の研究で取得した Hi-C データのバイオインフォマティクス解析を行った結果、これらのクロマチン高次構造が分化に伴って大きく変化することがわかった。本成果に関して、現在論文を執筆中であり、詳細については論文出版後に改めて報告する。

今回の国際共同研究により生体由来する少数細胞で Hi-C を実行することが可能になった。これにより単球や樹状細胞分化におけるクロマチン高次構造変化の詳細を明らかにすることができた。本研究者は 2021 年 4 月から熊本大学国際先端医学研究機構において「免疫ゲノム構造学研究室」を立ち上げた。今後は新しい研究室において単球や樹状細胞の核内におけるクロマチン高次構造の生物学的・免疫学的な意義について徹底的な解析を行い、これらの細胞が関与する疾患の新しい治療法の開発につなげていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 黒滝大翼, 佐々木悠, 田村智彦	4. 巻 78
2. 論文標題 UP-TO-DATE 赤脾髄マクロファージ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 751-757
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 田村智彦, 黒滝大翼	4. 巻 60
2. 論文標題 造血におけるシングルセル解析の進歩	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1075-1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.60.1075	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 黒滝大翼, 田村智彦	4. 巻 80
2. 論文標題 転写因子IRF8による樹状細胞分化のエピジェネティック制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 96-100
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 Izawa N, Kurotaki D, Nomura S, Fujita T, Omata Y, Yasui T, Hirose J, Matsumoto T, Saito T, Kadono Y, Okada H, Miyamoto T, Tamura T, Aburatani H, Tanaka S	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Cooperation of PU.1 with IRF8 and NFATc1 defines chromatin landscapes during RANKL induced osteoclastogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 e3689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.3689	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 Kurotaki D, Kawase W, Sasaki H, Nakabayashi J, Nishiyama A, Morse HC 3rd, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T	4. 巻 133
2. 論文標題 Epigenetic control of early dendritic cell lineage specification by the transcription factor IRF8 in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1803 ~ 1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2018-06-857789	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 Kurotaki D, Yoshida H, Tamura T	4. 巻 138
2. 論文標題 Epigenetic and transcriptional regulation of osteoclast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115471.	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 Matsuki H, Hiroshima Y, Miyake K, Murakami T, Homma Y, Matsuyama R, Morioka D, Kurotaki D, Tamura T, Endo I	4. 巻 28
2. 論文標題 Reduction of gender-associated M2-like tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment of patients with pancreatic cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 174-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.883.	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 Murakami K, Sasaki H, Nishiyama A, Kurotaki D, Kawase W, Ban T, Nakabayashi J, Kanzaki S, Sekita Y, Nakajima H, Ozato K, Kimura T, Tamura T	4. 巻 22
2. 論文標題 A RUNX-CBF -driven enhancer directs the Irf8 dose-dependent lineage choice between DCs and monocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 301-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-00871-y.	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 Ototake Y, Yamaguchi Y, Asami M, Komitsu N, Akita A, Watanabe T, Kanaoka M, Kurotaki D, Tamura T, Aihara M	4. 巻
2. 論文標題 Downregulated IRF8 in monocytes and macrophages of patients with systemic sclerosis may aggravate the fibrotic phenotype	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2021.02.015.	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kurotaki D, Kawase W, Sasaki H, Nakabayashi J, Nishiyama A, Morse HC III, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T
2. 発表標題 Transcription factor IRF8 epigenetically controls early dendritic cell lineage specification
3. 学会等名 Single Cell Biology - EMBO Workshop, Tokyo International Exchange Center, Tokyo, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurotaki D, Rocha PP, Cui K, Nakabayashi J, Saeki K, Zhao K, Ozato K, Tamura T
2. 発表標題 3D chromatin structure dynamics during dendritic cell differentiation in vivo
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会, 東京国際フォーラム (東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurotaki D, Rocha PP, Cui K, Nakabayashi J, Saeki K, Zhao K, Ozato K, Tamura T
2. 発表標題 Chromatin architecture dynamics during dendritic cell development in vivo
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会, アクトシティ浜松 (浜松)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒滝大翼, Pedro P. Rocha, Kairong Cui, 中林潤, 川瀬航, 原田生起, 佐伯恵太, Keji Zhao, Keiko Ozato, 田村智彦
2. 発表標題 樹状細胞分化における三次元クロマチン高次構造動態解析
3. 学会等名 第24回造血器腫瘍研究会, 神戸臨床研究情報センター (神戸)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒滝大翼
2. 発表標題 単球・樹状細胞分化を制御する遺伝子発現制御機構の解明
3. 学会等名 梅原賞授与式 記念講演会, 横浜市立大学医学部 (横浜) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kurotaki D
2. 発表標題 Epigenetic regulation of mononuclear phagocyte development
3. 学会等名 Meeting of Leukemic and Hematopoietic Stem Cells, Kumamoto City Medical Association, Kumamoto, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kurotaki D, Kawase W, Sasaki H, Nakabayashi J, Nishiyama A, Morse HC 3rd, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T
2. 発表標題 Epigenetic control of early dendritic cell lineage specification by the transcription factor IRF8
3. 学会等名 Genetics and Epigenetics of Development Affinity Group Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒滝 大翼
2. 発表標題 転写因子 IRF8によるミエロイド細胞分化のエピジェネティック制御
3. 学会等名 第148回 NIH金曜会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurotaki D
2. 発表標題 3D chromatin structure dynamics during dendritic cell differentiation and activation
3. 学会等名 4th KAIST-KU Workshop and Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>横浜市立大学医学部免疫学教室ホームページ  <a href="https://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/publication/">https://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/publication/</a>          横浜市立大学プレスリリース  <a href="https://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/news/201902kurotaki.html">https://www.yokohama-cu.ac.jp/amedrc/news/201902kurotaki.html</a></p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ザオ ケージ  (Zhao Keji)	米国国立衛生研究所・Systems Biology Center・Senior Investigator	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	オザト ケイコ  (Ozato Keiko)	米国国立衛生研究所・Section on Molecular Genetics of Immunity・Chief	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ペドロ ロシャ  (Rocha Pedro)	米国国立衛生研究所・Unit on Genome Structure and Regulation・Tenure-Track Investigator	

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

アメリカ合衆国	NHLBI, NIH	NICHD, NIH		
ベルギー	Ghent University			