

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15661

研究課題名(和文)非コードRNA転写によるエンハンサー活性制御と免疫不全症、発がんメカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation for control of enhancer activity by non-coding RNA transcription and mechanism of developing primary immunodeficiency and oncogenesis under the disrupted non-coding transcription.

研究代表者

磯田 健志 (ISODA, TAKESHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80815225

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)：T細胞の系列決定に関わるBCL11bのスーパーエンハンサーの活性化には、Thymocyte differentiation factor (ThymoD)と名付けた長鎖非コードRNAの転写が必須である。ThymoD転写が破綻したマウスでは複合免疫不全症だけでなくT細胞系腫瘍を発症する。T細胞系腫瘍では後の遺伝子変異により、ThymoDの転写量が回復する腫瘍が確認された。ThymoD低発現腫瘍、高発現腫瘍の全エクソン解析、RNAseq解析を実施し生じている変異の同定を試みた。また、ヒトにおけるThymoDの役割を同定するため細胞株及び白血病患者さんの検体を用いたシークエンス解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスBcl11bスーパーエンハンサー上のThymoDの転写停止は、転写因子Bcl11bの発現低下から、複合免疫不全症に関与しT細胞系腫瘍を発症する。タンパク質をコードしない遺伝子の転写量が疾患に関与することを示唆している。非コードRNAであるThymoDの転写量に関する因子を探索することで免疫能並びに腫瘍細胞に対して治療標的を見つけられる可能性がある。また、ヒトにおけるThymoD転写領域の同定を行い、ThymoD転写によるエンハンサー活性化機構を解明することで、エンハンサーの発現量の違いによる疾患の分類や病態解析、エンハンサーを制御する治療薬の開発につなげていくことが目標である。

研究成果の概要(英文)：BCL11b is essential transcription factor for T cell lineage commitment.

Transcription of thymocyte differentiation factor (ThymoD), which is located on BCL11b super-enhancer, is necessary for activation of BCL11b super-enhancer. Mouse with stopped ThymoD transcription by inserting poly-A sequence into ThymoD control region develop primary combined immunodeficiency and T cell leukemia or lymphoma. In these leukemia or lymphoma cells, we observed recovery of amount of ThymoD transcription plausibly due to additional mutations. We have tried to identify distinct mutations between tumors with low ThymoD expression and tumors with high ThymoD expression. In addition, to identify the role of ThymoD in human T- and B-cell leukemia cell line and primary patients sample, we are now planning long read sequencing, RNA-seq, ATAC-seq, ChIP-seq and HiC.

研究分野：血液腫瘍・免疫学

キーワード：エンハンサー活性制御 非コードRNA 免疫不全症 急性リンパ性白血病 非ホジキンリンパ腫 T細胞分化 エピジェネティクス 運命決定

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞系列決定に必須の転写因子 Bcl11b のエンハンサー上にある長鎖非コード RNA (lncRNA) thymocyte differentiation factor (ThymoD) の転写が、細胞の核内におけるゲノムの配置転換に先行して生じ、エンハンサーの核膜抑制区分からの解放に必須であることを見出した。Bcl11b のスーパーエンハンサーにおいて転写される ThymoD の転写活動を停止させるマウスを作成し、その表現型と転写の役割について探索を行った。ThymoD の転写を停止させたマウスでは、エンハンサーの核膜抑制区分から転写領域への移行が抑制され、T細胞分化障害を生じ重症複合型免疫不全症の表現型を示すだけでなく、さらには T細胞系のリンパ腫ないしは白血病を発症するドライバー変異となることが確認された。ThymoD の転写は、転写領域の脱メチル化、クロマチン修飾、ループ形成に關与する CTCF 結合の促進、Cohesin 複合体の誘導を促進し、エンハンサーとプロモーターの新規ループ形成を促す。これらの結果より、先行する非コード RNA 座位における転写が、各細胞系列決定に關わるエンハンサーの核膜抑制帯からの解放を誘導し、エンハンサー活性化に貢獻するモデルが示された (Isoda et al. Cell 2017)。しかしながら、非コード RNA の転写が、エンハンサードメインの低メチル化にどのように關与するか課題を残していた。脱メチル化因子が關与することが推測されるが、メチル化調節機構の詳細は不明である。

2. 研究の目的

非コード RNA 転写の破たんに影響すると考えらえる遺伝子の変異や構造異常が、先天性免疫不全症を含む原因不明の疾患群、癌のクローン形成過程に關与すると想定される。非コード RNA 転写とエンハンサーの初期活性化機構の詳細を明らかとするだけでなく、転写領域にリクルートされる複合体の探索を行い、非コード RNA 転写障害によりエンハンサー活性化機構が破綻した疾患群の同定、病態探索、治療標的につなげることを目指す。

3. 研究の方法

ThymoD 転写領域の脱メチル化機構の解明

ThymoD の転写領域における R ループ形成、脱メチル化機構の解明のため、リンパ球前駆細胞から T細胞分化誘導実験を行う。T細胞の分化誘導が繰り返しできるように、培養血液前駆細胞 (cultured common lymphoid progenitor: cCLP) と多能前駆細胞 (induced Leukocyte Stem: iLS) 細胞を用いて実験を行う。

ThymoD 低発現もしくは高発現腫瘍のクロマチンリモデリング機構の解析

ThymoD 転写障害で生じたマウス T細胞系腫瘍に対して、RNAseq、全エクソン解析を実施する。

ヒト ThymoD 転写産物、転写領域の探索

ヒト ThymoD の同定に向けて、ロングリードシーケンサーを用いた転写産物の同定を計画した。ThymoD 領域がヒトの T細胞系列で特異的に活性化されるか、公共データベースを用いて確認を行い、T細胞系列特異的に同領域のクロマチンがオープンとなり、エンハンサーマークを示すヒストン修飾、ThymoD 及び BCL11b の遺伝子発現が上昇することを確認する。2020 年度第 2 回先進ゲノム支援の援助も受けてヒト白血病細胞株 5 株、患者白血病検体及び健常者 T細胞についての解析を計画した。患者検体の準備には東京医科歯科大学内及び解析施設である国立遺伝学研究所での倫理審査書類作成及び承認取得後実施した。

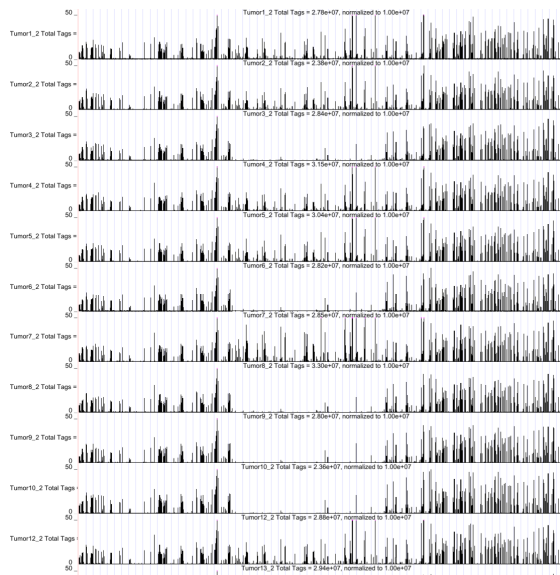
4. 研究成果

ThymoD 転写領域の脱メチル化機構の解明

T細胞系列決定前と系列決定後で R ループ形成、メチル化の評価を行うため、cCLP 及び iLS 細胞から目的の分化段階の細胞が十分得られていることを確認した。今後変異導入後の実験、薬剤投与により、R ループ形成への影響、メチル化状態の定量評価を予定している。

ThymoD 低発現もしくは高発現腫瘍のクロマチンリモデリング機構の解析

腫瘍細胞の RNAseq 解析では ThymoD の転写が改善する腫瘍がおおよそ半数に確認された。全エクソンシーケンズで 13 検体中 6 検体で 1.2Mb に及ぶ非コード RNA クラスター領域の欠損を確認した (図)。また 4 検体で 11 番染色体上にある転写因子 X の変異ないしは欠失を認めた。その他、プロモーター活性化の抑制に關与する Nurd 複合体、H3K4 のメチル基分解酵素として働く Kdm1a 複合体の構成タンパク質の変異を同定している。今後 T細胞の分化誘導系を用いてこれら遺伝子異常によるエンハンサー活性制御の影響について検討を行う。



図、エクソームによる 1.2Mb の非コード RNA クラスターの欠損領域

ヒト ThymoD 転写産物、転写領域の探索

PacBio Iso-Seq 用のサンプルは ThymoD 標的領域の転写量が低いことを想定し、非コード RNA に加えて周囲にあるコード RNA を含む 2.5Mb の領域について濃縮法を用いて実施した。本法は PacBio 用の library prep kit の PCR プライマー配列に対してデザインした blocker を用いて実施した。またロングリードシーケンサー用の DNA 抽出には Qiagen Genomic-tip を用いた。解析用検体は提出済みでありシーケンス結果を確認していく。今後は、ヒト ThymoD アイソフォームの正確な同定を行い、機能解析を予定している。ヒト ThymoD-BCL11 b 領域の核内局在解析、Hi-C 法を用いた 3 次元構造解析、ヒト ThymoD 領域に集積する複合体の網羅的プロテオーム解析を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshi Isoda, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi	4. 巻 110
2. 論文標題 Noncoding RNA transcription at enhancers and genome folding in cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2328-2336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14107.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matthew Denholtz, Yina Zhu, Zhaoren He, Hanbin Lu, Takeshi Isoda, Simon Dohrmann, Victor Nizet, Cornelis Murre	4. 巻 34
2. 論文標題 Upon Microbial Challenge, Human Neutrophils Undergo Rapid Changes in Nuclear Architecture and Chromatin Folding to Orchestrate an Immediate Inflammatory Gene Program	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes and Development	6. 最初と最後の頁 149-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.333708.119.	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 Inoue Maiko, Isoda Takeshi, Yamashita Motoi, Tomoda Takahiro, Inoue Kento, Okano Tsubasa, Ohkawa Teppei, Endo Akifumi, Mitsuiki Noriko, Kamiya Takahiro, Yanagimachi Masakatsu, Yamamoto Kouhei, Inaba Yuichiro, Sasaki Toru, Takagi Masatoshi, Kanegane Hirokazu, Imai Kohsuke, Morio Tomohiro	4. 巻 41
2. 論文標題 Cytomegalovirus Laryngitis in Primary Combined Immunodeficiency Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 243 ~ 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10875-020-00873-9	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8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Isoda T, Nishimura A, Morio T, Takagi M
2. 発表標題 非コードRNA転写による核内局在転換はT細胞への系列決定を誘導しT細胞系腫瘍の抑制に関与する
3. 学会等名 第 62 回 日本小児血液・がん学会学術集会 シンポジウム 4 血液基礎、核ダイナミクスから non-mRNA による細胞制御（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 磯田健志、森尾友宏
2. 発表標題 非コードRNA転写異常を背景とした免疫不全、発がんの病態探索
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム3 病態探索に挑む（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋佑脩、岡野翼、谷田けい、磯田健志、小林法元、藤原享志、座波清誉、野々山恵章、今井耕輔、森尾友宏、金兼弘和
2. 発表標題 BTK転写調節の異常によるX連鎖無ガンマグロブリン血症の3家系
3. 学会等名 第2回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯田健志
2. 発表標題 Non-coding RNA ThymoD transcription modulates nuclear architecture to specify T-cell fate and inhibits T-cell malignancies
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Isoda, A. Nishimura, S. Miyamoto, T. Morio, M. Takagi, C. Murre
2. 発表標題 Non-Coding RNA ThymoD Transcription Modulates Nuclear Architecture to Orchestrate T-Cell Fate and Block T-Cell Malignancies
3. 学会等名 50th SIOF（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Isoda, Akira Nishimura, Satoshi Miyamoto, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Cornelis Murre
2. 発表標題 ThymoD modulates nuclear architecture to specify T-cell fate and blocks T-cell malignancies
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯田健志、高木正稔
2. 発表標題 Non-coding RNA transcription modulates nuclear architecture to specify T-cell fate and blocks T-cell malignancies
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯田健志
2. 発表標題 非コードRNA転写によるエンハンサー、プロモーターの相互作用の誘導が、T細胞の運命決定を指揮する
3. 学会等名 第28回京都T細胞カンファレンス学術集会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------