

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790261

研究課題名 (和文) 転写因子 Bach による B 細胞初期分化調節機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of regulatory mechanism of early B cell development by Bach transcriptional factors

研究代表者

武藤 哲彦 (MUTO AKIHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80343292

研究成果の概要 (和文)：

リンパ球分化は造血幹細胞 (HSC) より始まるが、多能性前駆細胞 (MPP) からリンパ系前駆細胞 (LMPP) への分化を調節する転写因子ははっきり分かっていない。私たちは Bach1 と Bach2 のダブルノックアウトマウス (DD マウス) において、HSC や MPP が野生型マウスと同等であるのに対して、LMPP が減少していることを突き止めた。また、幼若な B 細胞である pro-B 細胞や pre-B 細胞も野生型マウスに比べて減少していた。これらの表現型は Bach1 や Bach2 単独ノックアウトマウスでは見られない。従って、Bach1 と Bach2 は LMPP からのリンパ球への系列決定に必要であり、その過程で役割を相互に補うと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

Lymphocytes develop from hematopoietic stem cells (HSC). The transcription factors that regulate the lymphoid-primed multipotent progenitors (LMPP) development form the multipotent progenitors (MPP) remain to be identified. We found a significant reduction in the frequency and total cell numbers of LMPP but not HSC and MPP in Bach1 and Bach2 double deficient mice (DD mice). The numbers of pro-B cells and pre-B cells of DD mice were also reduced to 30% of WT mice. Bach1 and Bach2 single knockout mice showed no obvious defect in these populations in bone marrow. Therefore, Bach1 and Bach2 are required for the cell fate specification of the lymphocyte lineage including LMPPs and they compensate for each other in this process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞医化学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 造血細胞から B 細胞に運命決定する過程と B 細胞分化の初期では、転写因子 *Ikaros*、*PU.1*、*E2A*、*EBF*、*Pax5* の遺伝子制御ネットワークが働く。一方、分化の後期と形質細胞への最終分化の過程では *OCA-B*、*Bcl-6*、*Blimp-1*、*Irf4*、*XBP-1* の転写調節因子が構成する遺伝子制御ネットワークが注目されている。B 細胞分化は、詳細に分化段階が定義されている上に、マウス遺伝学を始め、様々な解析手法や実験系が確立されており、細胞分化モデルのひとつである。さらに、抗原刺激に応答して抗体産生細胞へ分化するため、細胞応答モデルとしても活用できる。しかしながら、分化に伴い変化するネットワークで、この分化の鍵となる転写因子は何かなど、全容が明らかになったとは言えない。

(2) 私たちは、B 細胞特異的な転写因子 *Bach2* が B 細胞の免疫応答を調節する重要な鍵因子であることを明らかにしてきた。*Bach2* ノックアウトマウスの解析から、B 細胞の免疫応答である抗体遺伝子のクラススイッチ DNA 組換え (CSR) および体細胞突然変異 (SHM) に *Bach2* が関与することを報告した。*Bach2* ノックアウト B 細胞の CSR と SHM の障害は、両方の応答に必須の RNA 編集酵素類似因子 *AID* の遺伝子発現の誘導障害が原因であった。その後、*Bach2* の直接標的遺伝子として、形質細胞分化に必須の転写因子 *Blimp-1* を突き止めた。また、*Blimp-1* 遺伝子の転写を抑制する際に、転写抑制因子 *Bcl6* とのタンパク質間相互作用が重要であることを示した。その後の解析から *Bach2* が形質細胞への分化と活性化応答の遺伝子ネットワークを切り換える役割を果たすことを示唆していた。さらに最近、ヘム応答性転写因子として研究を進めてきたファミリー因子の *Bach1* が、B 細胞の分化初期でも重要な役割を担うことを明らかにした。

(3) これまでに私たちは、転写因子 *Bach2* が B 細胞の分化後期と B 細胞の活性化応答に重要な役割を担うことを一貫して明らかにしてきた。また、*Bach1* が酸化ストレス応答性に p53 依存性の転写ネットワークを抑制し、細胞老化に関わることを明らかにしていた。B 細胞の遺伝子ネットワークの調節というテーマの下でこれまで個々に進めてきた *Bach1* と *Bach2* の研究を統合する時にある。

## 2. 研究の目的

「細胞の分化及び各種の細胞応答」は、「遺伝子制御ネットワークの変化」とも捉えられる。本研究では、遺伝子制御ネットワークが

どの様に細胞分化と応答を調節するのかを明らかにしたい。*Bach2* ノックアウトマウスの B 細胞では、分化初期に以上は無い。しかし、B 細胞には *Bach2* のファミリー因子 *Bach1* も発現する。従って、分化の初期段階では、*Bach1* が *Bach2* の役割を概ね代償していた可能性がある。しかし、*Bach1* ノックアウトマウスのこれまでの解析からは、B 細胞分化と活性化応答ともに異常が見いだせていないため、B 細胞における *Bach1* の役割ははっきりしなかった。そこで、*Bach1* と *Bach2* のダブルノックアウトマウスを作製して、解析したところ、分化の初期から重篤な障害として B 細胞数の減少が観察された。従って、B 細胞分化のう後期の免疫応答では *Bach1* は *Bach2* の機能を代償出来ないのに対し、B 細胞分化の初期では、*Bach1* と *Bach2* が協調的に働いて、お互いの役割を補完できる可能性が有る。本研究では *Bach2* と *Bach1* が B 細胞の初期分化では如何に遺伝子ネットワークを調節するかを明らかにし、B 細胞分化の研究を通じて *Bach* 因子群が鍵になる因子であることを示していきたい。そのために *Bach1* と *Bach2* が個々もしくは協調的に調節する遺伝子発現ネットワークの実体を解明する。さらに、ネットワークの切り換え調節を担うことを示せば、B 細胞の分化や活性化応答の調節機構を転写調節の切り換えという視点から説明出来る可能性がある。

## 3. 研究の方法

(1) *Bach1*、*Bach2* ダブルノックアウトマウスの表現型の解析。野生型マウス、*Bach1* 単独ノックアウトマウス、*Bach2* 単独ノックアウトマウスおよび *Bach1* と *Bach2* ダブルノックアウトマウスの骨髓細胞を採取し、細胞表面の分化マーカーに対する蛍光抗体で免疫染色後にフローサイトメーターを用いて解析し、分化マーカーに基づいて血液細胞の各分化段階に分画し、各々の分化段階の細胞頻度を測定した。同マウスの B 細胞の分化や活性化応答での障害を明らかにする。まずは、骨髓で B 細胞に分化した細胞分画を比較する。そのうえで造血系の前駆細胞分画を比較する。そこで造血幹細胞 (HSC)、マルチポテント前駆細胞 (MPP)、リンパ系傾倒前駆細胞 (LMPP)、リンパ球共通前駆細胞 (CLP) を分画して検討する。

(2) *Bach* 制御下の遺伝子ネットワークの同定。*Bach1* と *Bach2* は転写因子であることから、ノックアウト B 細胞で見いだされる表現型や様々な障害は *Bach* 因子の制御下にある遺伝子群の発現異常が原因と予想される。そこで、*Bach1* もしくは *Bach2* 単独ノックアウト

トマウスおよびダブルノックアウトマウスの未熟な分化段階の血液細胞をセルソーターで分取し、RNA抽出、cDNA合成のち、定量PCR法にて様々な遺伝子発現を野生型マウス由来の細胞と比較する。

(3) Bach1 と Bach2 が制御する遺伝子群の同定。DNA マイクロアレイを用いて、骨髄の Bach1 と Bach2 のダブルノックアウト B 細胞と野生型 B 細胞での遺伝子発現様式を比較する。このとき、並行して Bach1 単独ノックアウト B 細胞と Bach2 単独ノックアウト B 細胞の遺伝子発現も比較する。FACS 解析による分化異常の検討からは、Bach1 単独または Bach2 単独ノックアウト B 細胞で分化障害は見出せないが、詳細な遺伝子発現の解析からは、何らかの微細な遺伝子発現の異常を見出せる可能性がある。たとえば予備的な実験結果からは Bach2 の直接標的遺伝子である Blimp-1 遺伝子の発現は Bach2 単独ノックアウト B 細胞では高いが、Bach1 単独ノックアウト B 細胞では野生型と同等である。しかし、DDB 細胞での Blimp-1 の発現は Bach2 単独ノックアウトのそれを遥かに上回っている。DNA マイクロアレイの結果を総合して、Bach1 が主導的に制御する遺伝子群、Bach2 が主導的に制御する遺伝子群、および Bach ファミリー因子両者で制御する遺伝子群を区別する。

#### 4. 研究成果

(1) Bach1 と Bach2 のダブルノックアウトマウス (DD マウス) では、B 細胞の最も幼若な分化段階の pro-B 細胞の段階から減少する。しかしながら、細胞増殖能や抗体遺伝子の組換えに異常は認められなかった。そこでリンパ球系の前駆細胞が減少する可能性を検討した。すると、DD マウスの骨髄では、リンパ球系前駆細胞の数が野生型マウスに比べて減少していた (図 1)。この異常は、Bach1 や Bach2 の単独ノックアウトマウスでは見られなかった。従って、リンパ球系前駆細胞の分化段階において、Bach 因子は互いに補い合いながら分化調節をしている可能性がある。

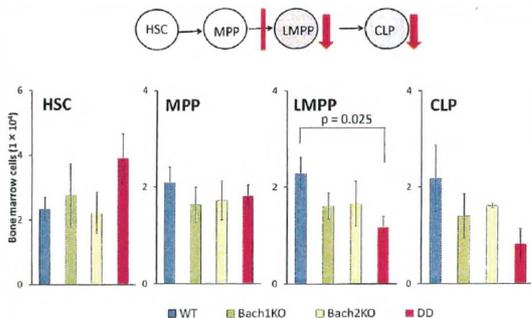


図 1) 野生型 (WT)、Bach1 単独ノックアウト (Bach1KO)、Bach2 単独ノックアウト (Bach2KO)、Bach1Bach2 ダブルノックアウト (DD) マウス骨髄におけるリンパ球系の前駆細胞分画 (HSC、MPP、LMPP、CLP) の細胞数比較。

(2) DD マウスから B 細胞の前駆細胞を採取し遺伝子発現を検討したところ、B 細胞分化に必須の転写因子 Pax5 や EBF の発現が低下していることを突き止めた (図 2)。この結果は、Bach 因子は B 細胞の初期の分化でも重要な役割を担うことを強く示唆する。

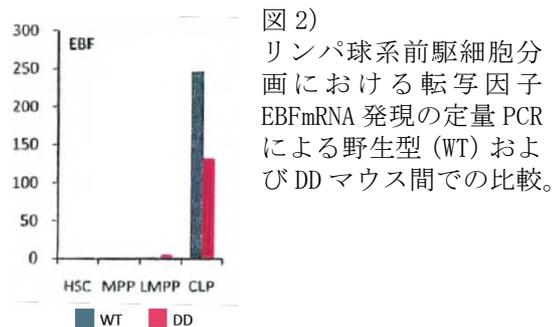


図 2)

リンパ球系前駆細胞分画における転写因子 EBFmRNA 発現の定量 PCR による野生型 (WT) および DD マウス間での比較。

(3) DNA マイクロアレイ実験の結果、野生型 B 細胞に対して Bach1 単独ノックアウト B 細胞で 2 倍以上遺伝子発現の変化が見られた遺伝子は 568 遺伝子であった。そして、野生型 B 細胞に対して Bach2 単独ノックアウト B 細胞で 2 倍以上遺伝子発現の変化が見られた遺伝子は 1164 遺伝子であった。さらに、野生型 B 細胞に比べて、Bach1 と Bach2 ダブルノックアウト B 細胞で 2 倍以上遺伝子発現の変化があるものは 1314 遺伝子であった。なかでも、Bach1 単独ノックアウト B 細胞でのみ変動がみられた遺伝子は 290 遺伝子であり、Bach2 単独ノックアウト B 細胞でのみ変化の見られた遺伝子は 444 遺伝子であった。ここでダブルノックアウト B 細胞でのみ遺伝子発現が変動した遺伝子は 578 遺伝子であった。したがって、この 578 遺伝子のなかに Bach1 と Bach2 ダブルノックアウト B 細胞の分化障害の原因を解明する遺伝子が含まれると予想された。

#### 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 4 件)

1. Miki Watanabe-Matsui, Akihiko Muto, Toshitaka Matusi, Ari Itoh-Nakadai, Nakajima Osamu, Kazutaka Murayama, Masayuki Yamamoto, Masao Ikeda-Saito,

Kazuhiko Igarashi, Heme regulates B-cell differentiation, antibody class switch, and heme oxygenase-1 expression in B cells as a ligand of Bach2、Blood、査読有、未定、2011、In press

2. Akihiko Muto, Kyoko Ochiai, Yoshitaka Kimura, Ari Itoh-Nakadai, Kyatharin Calame, Dai Ikebe, Satoshi Tashiro, Kazuhiko Igarashi、Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cell to promote antibody class switch、EMBO J.、査読有、vol. 29、2010、p 4048-4061

3. S. Okada, A. Muto, E. Ogawa, A. Nakanome, Y. Katoh, S. Ishikawa, S. Aiba, K. Igarashi, R. Okuyama、Bach1-dependent and -independent regulation of heme oxygenase-1 in leucocytes、J. Biol. Chem.、査読有、vol. 285、2010、p23581-23589

4. A. Harusato, Y. naito, T. Takagi, S. Yamada, K. Mizushima, Y. Hirai, R. Horie, K. Inoue, K. Fukumoto, I. Hirata, T. Omatsu, E. Kishimoto, K. Uchiyama, O. Haneda, T. Ishikawa, S. Kokura, H. Ichikawa, A. Muto, K. Igarashi, T. Yoshikawa、Inhibition of Bach1 ameliorates indomethacin-induced intestinal injury in mice、J. Physiol. Pharmacol.、査読有、vol. 7、2009、p 149-154

[学会発表] (計4件)

1. A. Muto、The repression of plasma cell differentiation by Bach2 allows activated B cells to execute class switch recombination、ESF-JSPS Frontier Science Conference Series for Young Researchers Cutting Edge Immunology and its Clinical Application、2011年3月1日 Hulshort, The Netherlands

2. A. Muto、The repression of plasma cell differentiation by Bach2 allows activated B cells to execute class switch recombination、Tohoku University Global COE for conquest of Signal Transduction Diseases with “Network Medicine” Internal Minisymposium、2011年2月4日仙台

3. A. Muto, K. Ochiai, Y. Kimura, K. Calame, D. Ikebe, S. Tashiro, K. Igarashi、Structure and dynamics of the B cell gene regulatory network that balances antibody class switch and plasma cell differentiation、14<sup>th</sup> International Congress of Immunology、2010年8月25日

神戸

4. 武藤哲彦、五十嵐和彦、Bach2 is required for B-1 cell development、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日横浜

[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

<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 哲彦 (MUTO AKIHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80343292

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：