

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02878

研究課題名(和文) 制御領域の変異同定と非コードRNA転写・スーパーエンハンサー活性化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanistic Insights into Non-Coding RNA Transcription and Super-Enhancer Activation via Control Region Mutations

研究代表者

磯田 健志 (Isoda, Takeshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80815225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞は免疫機能の中心的役割を果たす。Bcl11b転写因子はT細胞の系列決定に必須であり、その発現はスーパーエンハンサー上の非コードRNA ThymoDの転写により制御される。ThymoD転写の停止は、複合免疫不全症、T細胞系腫瘍の発症に関与する。本研究ではヒトにおけるThymoD領域を同定し、ThymoD転写により、領域のメチル化、クロマチン修飾、3次元構造への影響を評価することを主な目的とした。ヒトにおけるThymoD領域の同定を行い、スーパーエンハンサー活性化機構のメカニズム解明を目指した。同領域の構造維持に転写が重要であり、ゲノム構造は白血病のサブタイプにより異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムの3次元構造の評価は、白血病、そのほかの腫瘍、遺伝性疾患の分類に寄与できると想定される。今回、ヒトThymoD領域を同定でき、5種類のB細胞系・T細胞系白血病細胞株及び正常T細胞を用いた構造解析で、同領域の近接性を示すtopologically associated domain (TAD)に違いがあることが示された。転写に影響する異なる阻害剤を用いた検討で、新生RNA転写を抑制すると、TAD構造および周囲のクロマチン修飾に影響を与えることが判明した。ThymoD転写、DNAメチル化、クロマチン制御、TAD形成の制御機構を理解することで、疾患の分類、治療応用への展開へとつなげていく。

研究成果の概要(英文)：T cells play a central role in immune function. The Bcl11b transcription factor is essential for T cell lineage commitment, and its expression is regulated by the transcription of the non-coding RNA ThymoD (thymocyte differentiation factor) located on a super-enhancer of Bcl11b. Disruption of ThymoD transcription is associated with the development of combined immunodeficiency diseases and T cell lineage hematological malignancy. This study aims to identify the ThymoD region in humans and evaluate how ThymoD transcription regulates methylation, chromatin modifications, and three-dimensional structure at the transcribed region. We identified the ThymoD region in humans and aimed to elucidate the mechanisms of super-enhancer activation. Our findings suggest that transcription is crucial for maintaining the genome structure of ThymoD-BCL11B region and that the genomic structure varies depending on the subtype of leukemia.

研究分野：胎児医学および小児成育学関連

キーワード：非コードRNA ThymoD エピジェネティクス 白血病 免疫不全症 メチル化 転写 ゲノムの3次元構造

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞は、感染防御、がん免疫、アレルギー、自己免疫疾患、生活習慣病など多くの病気に関わるだけでなく、変異により免疫不全、白血病・リンパ腫を発症する。申請者らは、*Bcl11b* のスーパーエンハンサー上で転写される非コード RNA である *ThymoD* (thymocyte differentiation factor) を発見し、これが T 細胞の系列決定に必須であることを示した。*ThymoD* の転写を停止させたマウスでは、*Bcl11b* の発現が低下して T 細胞分化異常を来す複合型免疫不全症を生じるだけでなく T 細胞系悪性腫瘍を発症する (Isoda et al. *Cell* 2017)。*ThymoD* の転写領域はクロマチン修飾、Cohesin 複合体、Ctcf などのリクルート促進し、スーパーエンハンサーの活性化、相分離を誘導し、*Bcl11b* とのループ形成に関与することを示してきた。*ThymoD* 転写により、新たな 3 次元構造の変化を生じ、*ThymoD*-*Bcl11b* の近接性を示す topologically associated domain (TAD) を形成し、核膜の抑制領域から核内の転写領域に局在を変化させる。しかしながら、*ThymoD* 転写領域は T 細胞の系列決定期に低メチル化状態となることが確認されたが、脱メチル化機構の詳細については未解明であった。

2. 研究の目的

このような背景のもと、*ThymoD* 転写によるスーパーエンハンサー活性化の初期メカニズムを明らかにし、「核内局在の変化」を時間空間的に可視化する。ヒトにおける *ThymoD* 領域の変異が与えるゲノムの構造変化を Hi-C 法により評価し、診断、病態解析、治療応用へ展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *ThymoD* 転写とゲノムの 3 次元構造の検討

B 細胞系及び T 細胞系白血病細胞株を用いて *ThymoD*-*BCL11B* 領域のクロマチンの状態を ATAC-seq、転写産物を RNA-seq、ChIPseq による RNA ポリメラーゼ II の結合状態及びヒストン修飾、3 次元構造を捉える Hi-C 法を実施した。アクチノマイシン D、BRD4 阻害剤、CDK7 阻害剤を添加しゲノムの 3 次元構造に変動を認めるか、時間軸での解析を実施した。

(2) *ThymoD* 転写とメチル化制御機構の解明

スーパーエンハンサー上で生じる非コード RNA *ThymoD* 転写が DNA メチル化に影響するか検討を行った。前述の阻害剤をそれぞれを添加し、ChIP-seq による脱メチル化に関わる TET2 の結合状態、ヒストン修飾、3 次元構造の変化を Hi-C 法、ゲノムのメチル化状態について target capture バイスルファイトシーケンス法を用いて実施した。

(3) *ThymoD* 転写領域にリクルートされる候補分子の同定

白血病細胞株に dCas9-APEX2 システムを用いた標的ゲノム周辺の蛋白質修飾法を用いたプロテオミクス解析の準備を行った。

4. 研究成果

(1) *ThymoD* 転写とゲノムの 3 次元構造の検討

ThymoD 転写産物、*BCL11B* スーパーエンハンサーの活動性は T 細胞系白血病細胞株で高く、B 細胞系白血病細胞株では抑制されていた。3 種類の T 細胞系白血病細胞株間でも転写量、オープンクロマチン、ヒストン修飾に差異があり、活性化状態に差があることを確認した (図 1)。

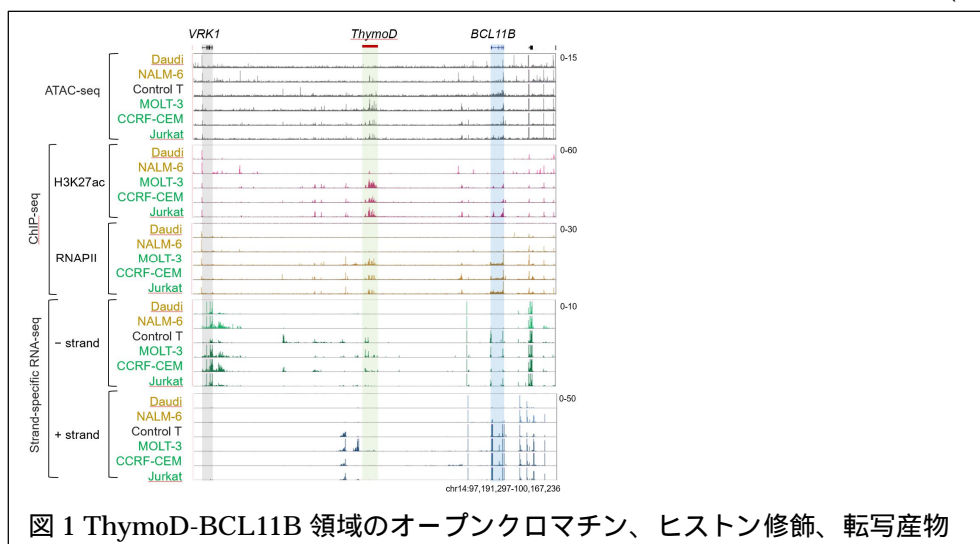
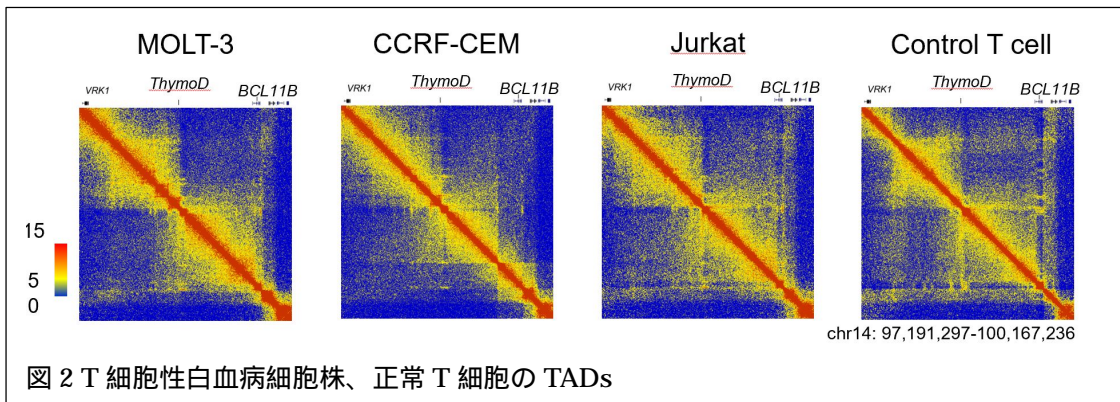


図 1 *ThymoD*-*BCL11B* 領域のオープンクロマチン、ヒストン修飾、転写産物

さらに、5種類の細胞株及び正常T細胞に対してHi-C法を実施した。B細胞白血病細胞株において *ThymoD-BCL11B* 領域の TAD 形成がなされないのに対して、正常T細胞及びすべてのT細胞性白血病細胞株においては TAD 形成を確認できた。3種類のT細胞性白血病細胞株において *ThymoD-BCL11B* 領域のドメイン構造が異なることを確認した(図2)。



(2) *ThymoD* 転写とメチル化制御機構の解明

アクチノマイシンD、BRD4阻害剤、CDK7阻害剤それぞれを添加し *ThymoD* 転写を停止させ、時間軸でTET2の結合状態、ヒストン修飾をChIP-seq法で評価すると、時間経過とともにTET2の結合状態、ヒストン修飾状態の減弱を確認している(図3)。同じ時間経過で3次元構造をHi-C法を用いて解析すると、アクチノマイシンDでループ形成の減弱およびドメイン構造の崩れを確認した(図4)。

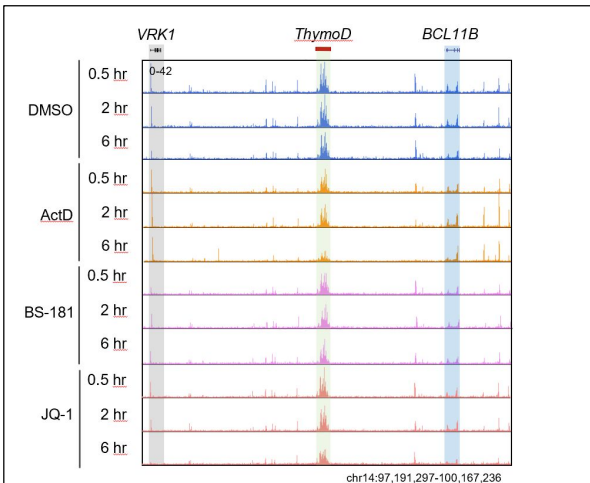
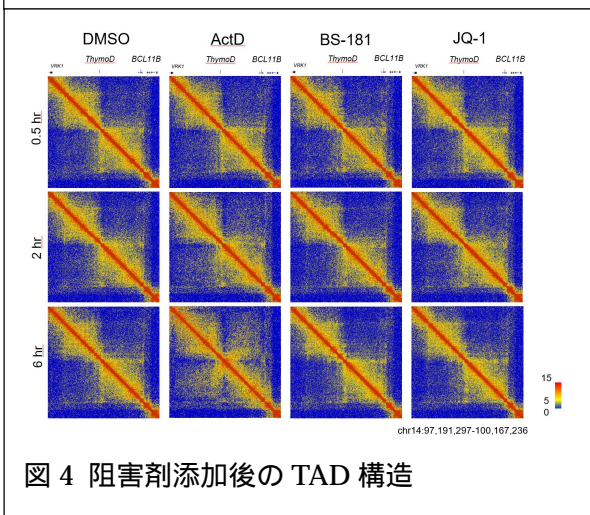


図3 阻害剤添加後のヒストン修飾



(3) *ThymoD* 転写領域にリクルートされる候補分子の同定

白血病細胞株に dCas9-APEX2 システムを用いた標的ゲノム周辺の蛋白質修飾法を用いたプロテオミクス解析の準備を行った。一部の細胞株に dCas9-APEX2 の導入に成功し、標的領域に対する sgRNA 発現プラスミドの作成を終えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Niizato Daiki, Isoda Takeshi, Mitsuiki Noriko, Kaneko Shuya, Tomomasa Dan, Kamiya Takahiro, Takagi Masatoshi, Imai Kohsuke, Kajiwara Michiko, Shimizu Masaki, Morio Tomohiro, Kanegane Hirokazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Case report: Optimized ruxolitinib-based therapy in an infant with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 977463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.977463	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 Eguchi Shiori, Isoda Takeshi, Yamaguchi Asuka, Takagi Masatoshi	4. 巻 64
2. 論文標題 Novel variants for Glanzmann thrombasthenia manifesting with purpura at birth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 e15149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.15149	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 Sbihi Zineb, Tanita Kay, Bachelet Camille, Bole Christine, Jabot-Hanin Fabienne, ...Isoda Takeshi (24人中20番目)、...、Kanegane Hirokazu, Latour Sylvain	4. 巻 42
2. 論文標題 Identification of Germline Non-coding Deletions in XIAP Gene Causing XIAP Deficiency Reveals a Key Promoter Sequence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 559 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10875-021-01188-z	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 Tomomasa Dan, Isoda Takeshi, Mitsuiki Noriko, Yamashita Motoi, Morishita Aoi, Tomoda Takahiro, Okano Tsubasa, Endo Akifumi, Kamiya Takahiro, Yanagimachi Masakatsu, Imai Kohsuke, Kanegane Hirokazu, Takagi Masatoshi, Morio Tomohiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Successful ruxolitinib administration for a patient with steroid refractory idiopathic pneumonia syndrome following hematopoietic stem cell transplantation: A case report and literature review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 e05242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.5242	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 Nishimura A, Yokoyama K, Naruto T, ... Isoda T(14番名), ... Morio T, Mizutani S, Tojo A, Takagi M (計53名)	4. 巻 9
2. 論文標題 Myeloid/natural killer (NK) cell precursor acute leukemia as a distinct leukemia type	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadj4407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adj4407	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 Nagamatsu Yuichi, Isoda Takeshi, Inaji Motoki, Oyama Jun, Niizato Daiki, Tomomasa Dan, Mitsuiki Noriko, Yamashita Motoi, Kamiya Takahiro, Imai Kohsuke, Kanegane Hirokazu, Morio Tomohiro, Takagi Masatoshi	4. 巻 24
2. 論文標題 Intracranial residual lesions following early intensification in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia: a case report	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BMC Pediatrics	6. 最初と最後の頁 304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12887-024-04790-3	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 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 4. 西村聡、佐々木麻起子、高木正稔、磯田健志
2. 発表標題 非コードRNA転写とスーパーエンハンサー活性化によるゲノムの3次元構造維持機構
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯田健志
2. 発表標題 ロングリードシーケンサーを用いた先天性免疫不全症・白血病発症機構の解明
3. 学会等名 令和3年度川野小児医学奨学財団助成研究成果発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Nishimura, Makiko Sasaki, Riski Muhaimin, Yukie Tanaka, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Takeshi Isoda
2. 発表標題 Non-coding RNA transcription and super-enhancer activation facilitate 3D genome structure
3. 学会等名 The 14th International Workshop on Advanced Genomics (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	高木 正稔 (Takagi Masatoshi) (10406267)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授 (12602)	
研究分担者	森尾 友宏 (Morio Tomohiro) (30239628)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

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