

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460352

研究課題名(和文) 遺伝子ネットワークによる形質細胞分化の調節プロセスの解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory process of plasma cell differentiation by gene regulatory networks

研究代表者

武藤 哲彦 (Muto, Akihiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80343292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：液性免疫応答を司るBリンパ球は、抗原により活性化されると抗体を分泌する形質細胞へ最終分化を遂げる。この過程でクラススイッチ反応により、抗体のアイソタイプが変換される。これらの応答は遺伝子ネットワークにより制御される。その変化は、個々の細胞で確率的に生じると考えられていた。本研究では、シングルセルレベルで遺伝子ネットワークの変化を解析した。その結果、遺伝子ネットワークの調節はBach2の発現量に依存することを解明した。

研究成果の概要(英文)：Upon antigen exposure, B lymphocytes (B cells), which are responsible for the humoral immune response, finally differentiate to antibody-secreting plasma cells (PCs). During this final differentiation, some B cells undergo class switch recombination (CSR) to switch their immunoglobulin isotype from IgM to IgG and so on. Among individual B cells, it has been believed that PC differentiation and CSR are stochastically regulated by gene regulatory network (GRN). In this study, flowcytometric analysis revealed that proportions of differentiated PCs and CSR were increased in cell division number dependent manner. The levels of Bach2 expression were decreased following cell division. However, after same number of cell divisions, they showed different levels of Bach2 expression. This study revealed that the expression levels of Bach2 affect the status of GRN and determine cell fate by using single cell PCR.

研究分野：分子生物学

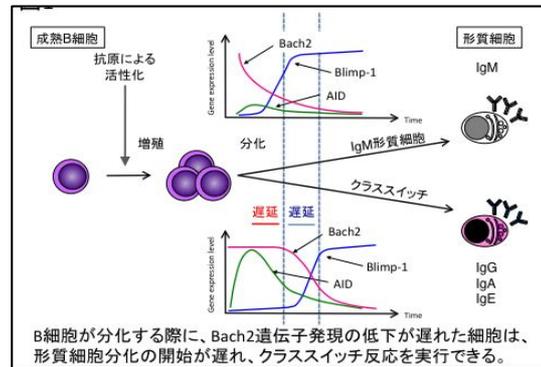
キーワード：転写因子 Bach2 B cell

### 1. 研究開始当初の背景

外来の抗原で活性化された成熟 B 細胞 (B リンパ球) は、抗体を産生・分泌する形質細胞へ最終分化を遂げる。このとき、B 細胞は当初の抗体遺伝子の遺伝情報通りの IgM を産生・分泌する形質細胞へ分化するか、もしくは他のアイソタイプ抗体 (IgG、IgA、IgE) を産生・分泌する形質細胞へ分化するか、という細胞運命の選択に直面する。IgM 以外のアイソタイプ抗体を分泌する形質細胞へ分化する B 細胞は、クラススイッチ DNA 組換え (CSR) 反応によって、抗体遺伝子の遺伝情報を改変した後に、形質細胞へ分化する。

CSR 反応の過程や最終的に抗体分泌に特殊化した形質細胞へ分化する過程で、細胞の遺伝子発現パターンが変化する。本研究開始当初でも、この遺伝子発現パターンの変化を調節する転写因子群とそれら標的遺伝子群で形成される遺伝子ネットワークの解明が進められていた。しかしながら、B 細胞の活性化や分化の過程で、この遺伝子ネットワークが如何に変化するのか、そして、遺伝子ネットワークの変化を駆動する転写因子は何かという点は諸説あり、完全な解明には至っていなかった。当時の共通認識として、成熟 B 細胞の遺伝子ネットワークを司る主要な転写因子は Pax5 であるのに対して、形質細胞分化のマスター制御因子は Blimp-1 転写因子であることは解明されていた。そして、これらの転写因子は、お互いの遺伝子発現を抑制する拮抗関係にあることも解っていた。このことから第一世代の遺伝子ネットワークモデルでは、Pax5-Blimp-1 の排他的関係を基盤としたトグルスイッチ型 (切り替えスイッチ型) のコア回路によって切り替わる遺伝子ネットワークの調節モデルが提唱された。

第一世代の遺伝子ネットワーク調節モデルであるトグルスイッチ型の遺伝子回路は、B 細胞か形質細胞かという 2 つの細胞状態を規定できた。しかしながら、CSR 反応を実行する経路をたどる細胞状態を規定できないことが課題として残されていた。私たちは転写因子 Bach2 が Blimp-1 をコードする遺伝子である *Prdm1* 遺伝子の発現を抑制する遺伝子回路は、CSR 反応を実行する経路の細胞に必須であることを示した。この結果を踏まえて、遅延式細胞分化モデル Delay-Driven diversity Model を提唱した。すなわち、活性化 B 細胞の運命決定は、Bach2 の活性に依存し、例えば Bach2 の活性が高く維持された B 細胞では *Prdm1* 遺伝子の発現上昇が遅れ、形質細胞分化が停滞する間に CSR 反応を実行して抗体遺伝子の遺伝情報を改変し、抗体のアイソタイプ変換をするというコンセプトである (右図)。



### 2. 研究の目的

活性化 B 細胞のうち、CSR を実行するのは細胞集団の一部の細胞だけであり、その運命決定は確率的である。細胞の運命決定を左右する遺伝子ネットワークは、各遺伝子の発現データに基づいて構築された。しかしこの発現データは、細胞を集団として解析した結果であり、分化途上の状態としての亜集団を捉えていない。従って、Bach2 の発現レベルが CSR の実行と本当に相関関係があるのかを単一細胞 (シングルセル) レベルで検討することで、私たちの提唱した遅延式細胞分化モデルを検証する必要がある。本研究では、シングルセル PCR 法やフローサイトメトリーを用いたシングルセルレベルでの遺伝子発現解析を実行し、活性化 B 細胞の分化過程を制御するコア遺伝子回路を同定し、遺伝子ネットワークの変化を捉えることで、形質細胞への最終分化過程での細胞運命決定のプロセスを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) シングルセル PCR

本研究では、最終的にシングルセル PCR 法によって、個々の細胞 (シングルセル) レベルで遺伝子ネットワークを解明することを目指した。シングルセル PCR 法は単一細胞を対象として、48 から 96 遺伝子の発現を同時に定量 PCR で解析できる。細胞を集団としてサンプルにした場合には、結果が平均化されてしまうため、全ての細胞で中程度に発現している状況と半数が高発現で残りの半数が低発現であるという状況を区別できない。従って、細胞分化の途上で遺伝子発現が誘導されるもしくは低下し始めたばかりの亜集団を判別して見いだすことができない。シングルセル PCR ではこれらの問題を解決できる。

#### (2) レポーターマウス

本研究では *Bach2* 遺伝子座に蛍光タンパク質遺伝子である RFP を組み込んだノックインマウスおよび *Prdm1* 遺伝子に蛍光タンパク質遺伝子である EGFP を組み込んだトランスジェーンを導入したトランスジェニックマウスを用いた。これらのマウスは *Bach2* の発現量を RFP の蛍光量で、*Blimp-1* の発現量を GFP の蛍光量に置き換えて検討できる。フローサ

イトメトリーを用いた解析にかけることで、シングルセルレベルで各遺伝子の発現をリアルタイムにモニターできるという利点がある。Bach2 の検出を RFP とし、Blimp-1 の検出を GFP としたことで、転写因子とその標的遺伝子の発現を同時にモニターできる試みは新しい。さらに分化マーカーを追加することで、遺伝子発現の結果である細胞分化状態をも同時に検出できる。

### (3) B 細胞培養系での分化誘導実験系

マウスの脾臓 B 細胞は、リポポリサッカライド (LPS) およびサイトカインによる刺激下で培養系にて分化誘導可能である。この時 B 細胞集団は一部の細胞はクラススイッチを実行し、一部の細胞は形質細胞へ分化する。これらの応答が同時に生じるため同じタイミングで細胞を採取することが可能であり、これはすなわち実験誤差となるマウス個体間差異や培養日数の差異を排除できる利点がある。B 細胞は細胞分裂回数ごとに分化頻度が異なることが知られている。本研究では培養開始時に B 細胞に Cell Trace Violet (CTV) 染色を実施することで細胞分裂回数を特定し、サンプル採取の際に分裂回数を揃えて実験誤差を減らすことに努めた。CTV 染色により、細胞分裂回数と遺伝子ネットワークの変化の関係を解析できる。

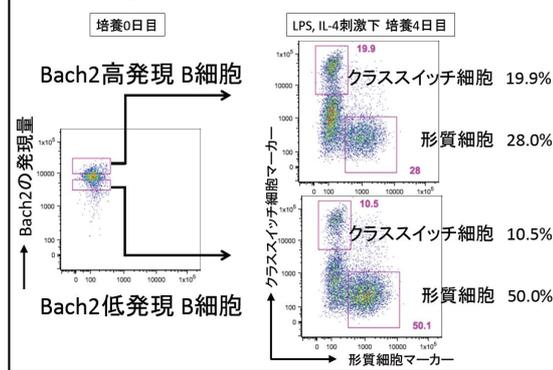
### (4) Bach2 複合体解析

Bach2 と協調的に働く因子を同定する目的で、B 細胞株に FLAG タグ融合 Bach2 タンパク質を安定発現する細胞株を作成した。このタグに対する抗体を用いて、Bach2 タンパク質複合体を精製し、質量分析解析をおこない相互作用する因子を同定した。

## 4. 研究成果

(1) Bach2-RFP トランスジェニックマウスから脾臓 B 細胞を採取し RFP の蛍光量と Bach2 の遺伝子発現量が相関するか調べた。その結果、RFP の発現量が高い B 細胞では Bach2 の遺伝子発現量が高く、RFP の発現量が低い B 細胞では Bach2 の遺伝子発現量が低いことをフローサイトメトリーで回収した細胞集団をサンプルとして用いた定量 PCR によって確認できた。その上で RFP 高発現 B 細胞と RFP 低発現 B 細胞を採取し、別々の培養系で形質細胞への分化誘導を実施した。RFP 高発現 B 細胞と低発現 B 細胞を比較したところ、多くの RFP 高発現 B 細胞が CSR を実行した。一方で、RFP 低発現 B 細胞からは RFP 高発現細胞に比べて多くの B 細胞が形質細胞へ分化した。これの結果から、Bach2 の遺伝子発現量は B 細胞の活性化応答に影響を及ぼすことを明らかにできた。すなわち、Bach2 の発現量が高い細胞はクラススイッチし、低い細胞は形質細胞へ分化する傾向を帯びた(図1)。

図1 Bach2「高」発現細胞は、胚中心反応のクラススイッチする頻度が高く、Bach2「低」発現細胞は、形質細胞へ分化する傾向にある。



(2) B 細胞は細胞分裂回数を重ねるごとに分化した細胞の頻度が上昇することが知られている。はじめに、培養日数と Bach2 の遺伝子発現量との相関関係を調べた。培養 0 日から培養 4 日目までの B 細胞において、RFP 蛍光量の変化をフローサイトメトリーで解析した。その結果、細胞集団における RFP の蛍光量の平均は、培養日数を経るごとに減少することを確認した。これは、以前に報告したように(2004 Nature, 2010 EMBO J.) Bach2 の遺伝子発現量が徐々に低下するという結果と一致した。次に培養 3 日目に、細胞分裂回数と Bach2 遺伝子発現との相関関係を Bach2-RFP ノックインマウスを用いて調べた。その結果、細胞分裂回数を重ねるに従って、徐々に RFP の蛍光量の平均が減少することがわかった。

(3) Bach2 の遺伝子発現と標的遺伝子 Blimp-1 の遺伝子発現の関係を調べた。そこで、Bach2-RFP ノックインマウスと Blimp-1-EGFP トランスジェニックマウスを交配して得られた Bach2-RFP:Blimp-1-EGFP トランスジェニックマウスから脾臓 B 細胞を採取し、培養系での分化誘導実験系をおこなった。その上で、フローサイトメトリーにてシングルセルレベルで各遺伝子の発現量を蛍光量に置き換えて解析した。その結果、Blimp-1 を発現する細胞は分化誘導後に出現すること、Blimp-1 発現細胞では Bach2 遺伝子発現が低いことをシングルセルレベルで初めて証明できた。前述のように、分裂回数を経るごとに Bach2 の遺伝子発現量は低下するが、同一分裂回数内でより Bach2 の発現量の低い細胞から Blimp-1 を発現する細胞が出現することがわかった。

(4) Bach2 の遺伝子発現とクラススイッチを実行する細胞との相関関係を調べた。Bach2-RFP ノックインマウスから脾臓 B 細胞を採取し、培養系での分化誘導実験をおこなった。その後、フローサイトメトリーにて、IgG1 にクラススイッチした細胞での Bach2 の遺伝子発現量を調べた。その結果、IgG1 陽性細胞は Bach2 を高発現する B 細胞から出現するという結果を得た。このような結果をシ

シングルセルレベルで初めて実証できた。

(5) シングルセル PCR による遺伝子発現解析では、細胞ごとの Bach2 遺伝子発現の違いが B 細胞から形質細胞への分化過程で重要な転写因子群の遺伝子発現パターンにどのように影響を与えるのかを調べた。その結果、Bach2 の発現が高い細胞と低い細胞では遺伝子発現パターンが大きく異なるという結果を得た。本実験では、予備実験結果から最も差が出やすい培養日数を決め、細胞分裂回数も特定の細胞分裂回数のみをシングルセル PCR 用の細胞採取の対象として行うことで、はじめて得られた結果であると考えられる。

(6) Bach2 による *Prdm1* 遺伝子の転写抑制が形質細胞分化とクラススイッチの実行に必須であることをシングルセルレベルで示すことができた。しかし、Bach2 による転写抑制の共役因子は不明であった。そこで、B 細胞株に FLAG タグ付きの Bach2 を安定発現させ、免疫沈降によって得られた Bach2 タンパク質複合体を質量分析 (Mass spectrometry; MS) 解析をおこなって、構成因子を検出同定した。その結果、Bach2 複合体にはヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3、抑制性転写共役因子 NcoR1、NcoR2 および DNA 複製関連核内因子 Rif1 が含まれることを突き止め、発表論文 1: Tanaka 他 2016 JBC として報告した。同論文では Bach2 が *Prdm1* 遺伝子のプロモーター領域とイントロンに結合することをクロマチン免疫沈降法で明らかにした。ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 とともに Bach2 は *Prdm1* 遺伝子の活性化の指標であるヒストン H3K9 のアセチル化修飾を取り除き転写抑制に寄与することを明らかにした。

## 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 10 件)

1: Tanaka H, (Muto, A., 15 人中 2 番目) Epigenetic Regulation of the Blimp-1 Gene (*Prdm1*) in B Cells Involves Bach2 and Histone Deacetylase 3, *J Biol Chem.*, 査読あり、2016、vol.291、p6316-30、doi: 10.1074/jbc.M116.713842.

2: Ando R, (Muto, A., 15 人中 14 番目) The Transcription Factor Bach2 Is Phosphorylated at Multiple Sites in Murine B Cells but a Single Site Prevents Its Nuclear Localization., *J Biol Chem.*, 査読あり、2016、vol.291、p1826-40、doi: 10.1074/jbc.M115.661702.

3: Jang KJ, (Muto, A., 13 人中 5 番目) Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates., *Nat Commun.*, 査読あり、2015、vol.6:6750、doi: 10.1038/ncomms7750.

4: Watanabe-Matsui M, (Muto, A., 7 人中 5 番目) Heme binds to an intrinsically disordered region of Bach2 and alters its conformation., *Arch Biochem Biophys.*, 査読あり、2015、vol.565、p25-31、doi: 10.1016/j.abb.2014.11.005.

5: Itoh-Nakadai A, (Muto, A., 16 人中 3 番目) The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program., *Nat Immunol.*, 査読あり、2014、vol.15、p1171-80、doi: 10.1038/ni.3024.

6: Igarashi K, (Muto, A., 4 人中 4 番目) Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network., *Immunol Rev.*, 査読あり、2014、vol.261、p116-25、doi: 10.1111/imr.12201.

7: Ichikawa S, (Muto, A., 14 人中 12 番目) Association between BACH2 expression and clinical prognosis in diffuse large B-cell lymphoma., *Cancer Sci.*, 査読あり、2014、vol.105、p437-44、doi: 10.1111/cas.12361.

8: Nakamura A, (Muto, A., 10 人中 4 番目) Transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function., *J Exp Med.*, 査読あり、2013、vol.210、p2191-204、doi: 10.1084/jem.20130028.

9: Kikuchi T, (Muto, A., 15 人中 13 番目) Over-expression of BACH2 is related to ongoing somatic hypermutation of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of de novo diffuse large B-cell lymphoma., *Pathol Int.*, 査読あり、2013、vol.63、p339-44、doi: 10.1111/pin.12076.

10: Tsukumo S, (Muto, A., 8 人中 3 番目) Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 査読あり、2013、vol.110、p10735-40、doi: 10.1073/pnas.1306691110.

11: Roychoudhuri R, (Muto, A., 30 人中 27 番目) BACH2 represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis., *Nature.*, 査読あり、2013、vol.498、p506-10、doi: 10.1038/nature12199.

[学会発表](計 7 件)

1: 武藤、天然変性ハプタンパク質 Bach2 のヘムによる制御、よこはま NMR 研究会第 54 回ワークショップ、2016 年 1 月 8 日、「理科学研究所横浜事業所 交流棟ホール(神奈川県横浜市)」

2: 武藤、B 細胞活性化応答を制御する遺伝子ネットワークのシングルセル解析、RIMS 研究

会 生物現象におけるパターン形成と数理、  
2015年10月23日、「京都大学数理解析研究  
所（京都府京都市）」

3: 武藤ほか、Bach2の発現量が活性化B細胞  
の運命を決定する、第37回日本分子生物学  
会、2014年11月27日、「パシフィコ横浜（神  
奈川県・横浜市）」

4: 武藤、Bach2の発現量による活性化B細胞  
の運命決定、CREST研究会、2014年12月24  
日、「東北大学（宮城県 仙台市）」

5: 武藤ほか、Bach2 and HDAC3 repress  
Blimp-1 gene expression in B cells through  
the histone deacetylation、Cold Spring  
harbor Asia Conference: Frontiers of  
Immunology in Health and Diseases、2014  
年9月2日、「蘇州（中国）」

6: 武藤ほか、B細胞レセプターシグナルによ  
る細胞増殖と生存応答でのBach2の役割、冬  
のワークショップ、2014年1月31日「舌切  
雀のお宿ホテル磯部ガーデン（群馬県・安中  
市）」

7: 田中、武藤ほか、Bach2, HDAC3 and Rif1  
repress Blimp-1 gene expression in B cells  
through the deacetylation of histone H3 K9、  
第36回日本分子生物学会、2013年12月4日、  
「神戸国際展示場（兵庫県・神戸市）」

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：坑リン酸化 Bach2 抗体及び抗腫瘍免疫  
活性化剤のスクリーニング方法  
発明者：五十嵐和彦ほか8名  
権利者：東北大学  
種類：特許  
番号：特願 2015-219945  
出願年月日：2015年11月9日  
国内外の別：国内

〔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・准教授

研究者番号：80343292