

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293229

研究課題名(和文) B細胞系列への運命決定における代謝調節機構の役割

研究課題名(英文) Roles of metabolic regulation in B cell fate determination

研究代表者

伊川 友活 (Ikawa, Tomokatsu)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60450392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞を含むすべての血液・免疫細胞は造血幹細胞から作られる。その過程で多能性の造血幹細胞は徐々に分化能が限定されていき、最終的にB細胞にしかたない前駆細胞に運命決定される。様々な転写因子がB細胞への運命決定に関わっているが、詳細は明らかでない。特に、これら転写因子の標的遺伝子として示唆されている細胞内代謝調節遺伝子の役割は不明である。我々は最近B細胞への運命決定における分子機構を調べることに成功し、新しい分化誘導系を開発した。この培養系を用いてB細胞への運命決定に必要なエネルギー代謝関連の遺伝子をスクリーニングを行ったところ、インスリンシグナルがB細胞分化に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：All hematopoietic / immune cells including B cells are generated from hematopoietic stem cells(HSCs). HSCs gradually specify their differentiation potential to finally commit to the B cell lineage. Although transcription factors (TFs) are shown to be essential for the cell fate decision, the roles of the TFs in regulating cellular metabolisms remain to be determined. We have recently established a culture system to examine the molecular mechanisms of B cell fate determination. Using this system, we demonstrated that the insulin signals are important for early B cell differentiation.

研究分野：免疫学、血液学

キーワード：B細胞 運命決定 代謝 造血幹細胞 分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は様々な系列決定過程を経て最終的にB細胞にしかたれない前駆細胞となる。この運命制御には転写因子が重要な働きをしているが、詳細は明らかでない。解析の大きな障害となっているのが、良い実験モデルがないことにある。

申請者らはカリフォルニア大学サンディエゴ校のC. Murte教授との共同研究により、転写因子E2Aを欠損したマウスではリンパ系とミエロイド系共通の前駆細胞段階で分化が停止し、このリンパ・ミエロイド前駆細胞が自己複製することを示した(Ikawa et al. *Immunity*, 2004)。この用法を応用し、E2Aの阻害タンパクの1つであるId3を用いることにより、多能前駆細胞を生体外で増幅することに成功した(Ikawa et al. *Stem Cell Reports*, 2015)。我々はこの前駆細胞をiLS(induced Leukocyte Stem)細胞と名付けた。iLS細胞は細胞の分化・増殖を自在に操ることが出来るため、細胞の運命制御の研究に最適である。我々は、Id3とエストロゲンレセプター(ERT2)を融合したId3-ERT2レトロウイルスベクターを作成することによりiLS細胞をさらに改良することに成功した。このId3-ERT2を用いると、タモキシフェンによって分化停止・誘導をより厳密に制御することが可能となる。すなわち、タモキシフェンを加え続ける限りは多能性を維持するが、これを除去するとB細胞への分化が誘導され、わずか7日間でB前駆細胞への系列決定が完了する。

そこで本研究では、この分化誘導可能なiLS細胞を用いて、B細胞への運命決定に必要なエネルギー代謝系遺伝子をスクリーニングし、その機能を明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

B細胞を含むすべての血液・免疫細胞は造血幹細胞から作られる。その過程で多能性の造血幹細胞は徐々に分化能が限定されていき、最終的にB細胞にしかたれない前駆細胞に運命決定される。E2A、EBF1、PAX5など様々な転写因子がB細胞への運命決定に関わっているが、詳細は明らかでない。特に、これら転写因子の標的遺伝子として示唆されている細胞内代謝調節遺伝子の役割は不明である。我々は最近B細胞への運命決定における分子機構を調べることで出来る新しい分化誘導系を開発した。この培養系を用いると、7日間で多能前駆細胞からB細胞系列への運命決定を誘導することが出来る。そこで本研究ではこの培養系を用いてB細胞への運命決定に必要なエネルギー代謝関連の遺伝子をスクリーニングし、その機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) iLS細胞の作成およびB細胞への分化誘導、網羅的発現解析

iLS細胞の作成にはId3-ERT2レトロウイルスを用いる。Id3-ERT2をマウス胎仔肝臓の造血幹細胞へ導入しタモキシフェン作用させながらTSt-4ストローマ細胞上で培養する。TSt-4細胞は通常はB細胞への分化を支持するがId3がE2Aの機能を阻害するため、B細胞分化が初期の段階で停止し、多能前駆細胞として増幅する。この細胞を継代、増幅させることによって培養1ヶ月ほどで均質なiLS細胞が大量に作成できる。

次にこの培養系からタモキシフェンを除去することによってB細胞への分化を誘導する。B細胞へ分化誘導後、0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144時間後(計15ポイント)に細胞を採取し、RNAを精製する。得られたRNAはRNA-seq法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行う。これにバイオインフォマティクス解析を加えることにより、B細胞への運命決定における遺伝子発現の推移を解析する。経時サンプル(細胞)は同時にChIP-seq解析を行い、H3K4me3やH3K27me3などヒストンの修飾状況も解析する。これらのデータを元にB細胞特異的に発現する細胞内代謝系遺伝子をスクリーニングしその発現パターンを確認する(図1)。

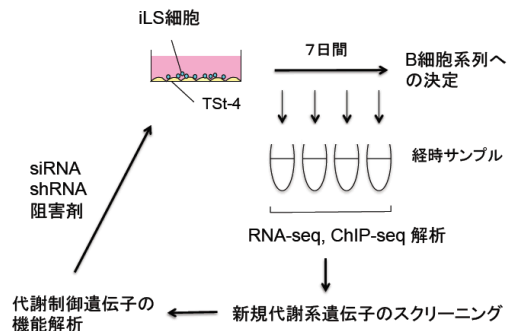


図1 iLS細胞を用いた新規スクリーニング系

(2) B細胞特異的に発現する代謝調節因子のスクリーニング

(1)で得られた結果から代謝調節因子を選び出し、通常のB細胞分化における発現パターンを確認する。その際には、公共データベースを用いたり、実際の骨髄細胞における発現をRT-PCRで確認したりする。スクリーニングの際には、B細胞分化に重要な転写因子であるE2A、EBF1、PAX5などの標的遺伝子として報告されているものを優先的に選び出す。こうして得られた候補遺伝子に対するshRNAを作製し、iLS細胞を用いて機能阻害実験を行う。具体的にはiLS細胞にshRNAウイルスを感染させ、タモキシフェン存在下で分化を停止させながら培養する。2日後に細胞を回収し、感染細胞(GFP陽性)をソーティングする。この細胞をTSt-4ストローマ細胞上で

IL-7 存在下に培養し B 細胞へ分化誘導する。7 日後に細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて CD19 陽性細胞が出現するかどうかが調べる。CD19 陽性細胞の出現を抑制する効果が認められた因子については GFP 陽性細胞を経時的に採取し、遺伝子発現プロファイル、および免疫グロブリン (Ig) H 鎖の D-J および V-DJ 遺伝子再構成などを調べ、B 細胞分化の抑制状態を詳細に検討する。

(3) 造血幹細胞を用いた B 細胞分化阻害実験

(2) で得られた候補遺伝子について正常な B 細胞分化における機能を阻害剤や shRNA を用いて確認する。具体的にはマウス胎仔肝臓の造血幹細胞へ shRNA を導入し、TSt-4 ストローマ細胞上で B 細胞へ分化誘導する。培養 7 ~ 10 日後に細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて CD19 陽性細胞の存在を確認する。B 細胞分化阻害効果が認められた因子については(2)と同様に IgM 陽性細胞の出現、遺伝子発現プロファイル、IgH 鎖の遺伝子再構成などを詳細に調べる。このようにして通常の B 細胞分化過程で機能しているのか否か検討する。

4. 研究成果

(1) iLS 細胞の B 細胞への分化誘導系を用いて代謝系遺伝子のスクリーニングを行った結果、Chst3, Pde2a, Insulin receptor substrate (Irs)1 など様々な遺伝子の発現が B 細胞分化とともに上昇することが明らかとなった。興味深いことに Irs1 は B 細胞への分化誘導後、一過性に発現が上昇していた (図 2)。既に報告されていた論文で調べると、これら代謝系遺伝子の多くは B 細胞分化に必須の転写因子である EBF1, PAX5 の標的遺伝子であった。次に、これらの遺伝子発現を骨髄中の前駆細胞を用いて解析したところ、造血幹細胞や多能前駆細胞段階では発現が認められなかったが、プロ B 細胞において発現が上昇していた。このことは生体内においても B 細胞分化が進むにつれて細胞内代謝系遺伝子の発現が上昇していることを示している。

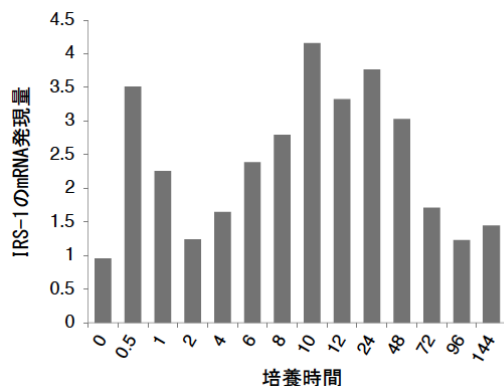


図 2 iLS 細胞から B 細胞への分化誘導時における Irs-1 の発現変動

(2) (1) で候補となった代謝系遺伝子に対する shRNA や阻害剤を用いて、機能解析を行った。その結果、Irs1 の発現を阻害すると iLS 細胞から B 細胞系列への運命決定が抑制された。また、IRS-1 に対する shRNA は胎仔肝臓および骨髄の造血幹細胞からの B 細胞への分化も阻害した。同様に、Insulin 受容体に対する shRNA を作成し、造血幹細胞へ導入すると、B 細胞への分化が阻害された。このことは IRS-1 を含めたインスリンシグナルが B 細胞の生成に重要な役割をはたすことを示唆している。

(3) (2) によって明らかとなったインスリンシグナルの B 細胞初期分化における役割を解析した。IRS-1 を欠損したマウスを解析したところ、骨髄において B 細胞数が著減していた。また、脾臓の B 細胞の機能成熟にも異常が認められた。次に IRS-1 欠損マウス骨髄から造血幹細胞を採取し、TSt-4 ストローマ細胞と共培養したところ、B 細胞への分化が顕著に阻害されたことから、IRS-1 は B 細胞の分化・成熟を直接制御していると考えられた。このことは IRS-1 を含めたインスリンシグナルが、正常な B 細胞の分化や機能維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。

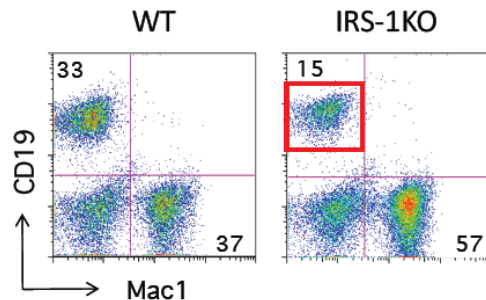


図 3 IRS-1 欠損マウス骨髄中の B 細胞

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 9 件)

- Miyai T, Takano J, Endo TA, Kawakami E, Agata Y, Motomura Y, Kubo M, Kashima Y, Suzuki Y, Kawamoto H, Ikawa T. Three-step transcriptional priming that drives the commitment of multipotent progenitors toward B cells. *Genes Dev.* 32:112-126, (2018) 査読あり

DOI: 10.1101/gad.309575.117.

- Noguchi S, Ikawa T ら(178 人中 75 番目). FANTOM5 CAGE profiles of human and

mouse samples. **Sci Data**. 4: 170112, (2017) 査読あり

DOI: 10.1101/gad.309575.117.

3. **Ikawa T**, Masuda K, Endo TA, Endo M, Isono K, Koseki Y, Nakagawa R, Kometani K, Takano J, Agata Y, Katsura Y, Kurosaki T, Vidal M, Koseki H, Kawamoto H. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of the B-lineage program. **Genes Dev**. 30: 2475-2485, (2016) 査読あり

Epub 2016 Dec 2.

4. Masuda J, Kawamoto H, Strober W, Takayama-E, Mizutani A, Murakami H, **Ikawa T**, Kitani A, Maeno N, Shigehiro T, Satoh A, Seno A, Arun V, Kasai T, Fuss IJ, Katsura Y, Seno M. Transient Tcf3 gene repression by TALE-tanscription factor targeting. **Appl Biochem Biotechnol**. 180: 1559-1573, (2016) 査読あり

Epub 2016 Jul 12.

5. Calés C, Pavón L, Starowicz K, Pérez C, Bravo M, **Ikawa T**, Koseki H, Vidal M. Role of Polycomb RYBP in maintaining the B-1 to B-2 B-cell lineage switch in adult hematopoiesis. **Mol Cell Biol**. 36:900-912, (2015) 査読あり

DOI: 10.1128/MCB.00869-15.

6. **Ikawa T**, Masuda K, Huijskens MJAJ, Satoh R, Kakugawa K, Agata Y, Miyai T, Germeraad WTV, Katsura Y, Kawamoto H. Induced developmental arrest of early hematopoietic progenitors leads to the generation of leukocyte stem cells. **Stem Cell Reports**. 5:716-727, (2015) 査読あり

DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.09.012.

7. Inoue T, Morita M, Hijikata A, Fukuda-Yuzawa Y, Adachi S, Isono K, **Ikawa T**, Kawamoto H, Koseki H, Natsume T, Fukao T, Ohara O, Yamamoto T, Kurosaki T. CNOT3 contributes to early B cell development by controlling Igh rearrangement and p53 mRNA stability. **J Exp Med**. 212:1465-1479, (2015) 査読あり

DOI: 10.1084/jem.20150384.

8. Iguchi T, Aoki K, **Ikawa T**, Taoka M, Taya C, Yoshitani H, Toma-Hirano M, Koiwai O, Isobe T, Kawamoto H, Masai H, Miyatake S. BTB-ZF protein Znf131 regulates cell growth of developing and mature T cells. **J Immunol**. 195:982-993, (2015) 査読あり

DOI: 10.4049/jimmunol.1500602.

9. Arner E, Daub CO, Vitting-Seerup K, Andersson R, Lilje B, Drabløs F, ..., **Ikawa T** (36 out of 109), ... ; FANTOM Consortium, Hume DA, Forrest AR, Sandelin A, Carninci P, Hayashizaki Y. Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. **Science**. 347:1010-1014, (2015) 査読あり

DOI: 10.1126/science.1259418.

[学会発表] (計 17 件)

1. 伊川友活 Immunosome development. 日本免疫学会 2017 年
2. 伊川友活 Three-step transcriptional priming that drives multipotent progenitors toward B cells. 日本免疫学会 2017 年
3. 伊川友活 Epigenetic maintenance of T cell identity by Polycomb-mediated suppression of Pax5. 日本分子生物学会 2017 年
4. 伊川友活 A road map that guides the development of B cells. The 3rd Tsinghua-RIKEN Joint Symposium 2017 年
5. 伊川友活 Transcriptional networks during B lymphocyte commitment. FASEB meeting 2017 年
6. 伊川友活 A challenge as a young chief investigator in IMS. RIKEN Sakura Symposium 2017 年
7. 伊川友活 Identification of gene regulatory networks during hematopoietic stem cell differentiation by the single-cell analysis. RIKEN Single cell Workshop 2017 年
8. 伊川友活 A critical role of non-canonical PRC1 for specification to lymphoid lineage. KTCC 2017 年
9. 伊川友活 Dynamic transcriptional cascades and epigenetic regulation that orchestrate B cell fate determination. 日本免疫学会 2016 年

10. 伊川友活 Transcriptional networks that establish B cell identity. 国際免疫学会 2016年
11. 伊川友活 異性型 Polycomb repressive complex は造血幹細胞からリンパ球系列への運命決定に重要である. KTCC 2016年
12. 伊川友活 Transcriptional regulatory networks that regulate B cell fate determination. CSHL meeting 2016年
13. 伊川友活 Identification of the gene regulatory networks during hematopoietic stem cell differentiation by the single-cell analysis. Single cell Workshop 2016年
14. 伊川友活 Transcriptional networks that control B cell fate determination. 日本分子生物学会 2015年
15. 伊川友活 Role of IRS-1 in early B cell development. 日本免疫学会 2015年
16. 伊川友活 Epigenetic maintenance of T cell fate by Polycomb group proteins. 内藤カンファレンス 2015年
17. 伊川友活 B細胞系列への運命決定における転写制御ネットワークの解明. KTCC 2016年

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ims.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊川 友活 (Ikawa Tomokatsu)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：60450392