

# 研究報告書

## 「免疫細胞の運命維持におけるエピジェネティック制御機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年10月～平成27年3月

研究者: 伊川 友活

### 1. 研究のねらい

T細胞およびB細胞は感染防御において互いに協調し合いながら重要な役割を果たす。T細胞およびB細胞がその機能を発揮するためには分化・成熟過程においてそれぞれの細胞の運命が厳格に制御・維持されなければならない。この維持にはクロマチンレベルのエピジェネティックな転写制御が必要であると考えられるが詳細は明らかでない。我々は最近、ポリコーム群タンパクがT細胞の分化過程および成熟後の維持に不可欠であることを見いだした(未発表)。驚くべき事にポリコームタンパク複合体の構成分子である*Ring1A*および*Ring1B*を欠いたT細胞はB細胞へ運命転換されることが明らかとなったのである(図1)。本研究ではこのポリコームタンパクによるT細胞系列のアイデンティティの確立及び安定性維持機構を解明することを目的とする。本研究により免疫細胞の運命維持におけるエピジェネティック制御機構が明らかになるだけでなく、将来的に白血病発症機序の解明、免疫細胞を用いた新しい細胞療法の開発に結びつくと考えられる。

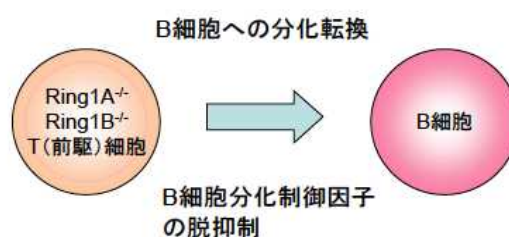


図1. *Ring1A*<sup>-/-</sup>/*Ring1B*<sup>-/-</sup> T (前駆) 細胞のB細胞への運命転換

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では*Ring1A/B*ダブルノックアウトマウスの胸腺細胞を用いてポリコームタンパクがT細胞の生成過程においてその運命の確立・維持にどのように関わっているかを明らかにすることを目的に研究を行った。まず、*Ring1A/B*のT細胞分化における機能を明らかにするために、*Lck-CRE*トランスジェニック(Tg)マウスと*Ring1A*<sup>-/-</sup>/*Ring1B*<sup>flx/flx</sup>マウスを掛けあわせることによりT細胞特異的*Ring1A/B*コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作成した。このマウスの胸腺を解析したところ、T細胞分化が未分化な段階で顕著に阻害されていた。次にこのマウスのT前駆細胞の分化能を調べるために、放射線照射したNOGマウスへ移植したところ、驚いたことに移植後4～6週後に骨髄および脾臓においてB細胞様細胞が検出された。この細胞がT細胞由来であるかどうか確かめるためにゲノムDNAの遺伝子再構成の状態を調べた。その結果、運命転換されたB細胞では免疫グロブリン(Ig)のD<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>、V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub>2、V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub>5およびV<sub>λ</sub>1-J<sub>λ</sub>のすべての遺伝子座においてオリゴクローナルな遺伝子再構成が認められた。また、同様にT細胞受容体(TCR) Dβ-Jβ2.6、Vβ-Jβ2.6についても多様

な再構成バンドが検出された。このことは既に TCR $\beta$ 鎖遺伝子再構成を開始していた、すなわち T 系列へ運命決定されていた T 前駆細胞が B 細胞へ運命転換し、多様な遺伝子再構成パターンを持つ B 細胞クローンを生成していることを示している。次に運命転換された B 細胞の機能を調べるために、Cdkn2a, Ring1A/B TKO マウス胸腺の T 前駆細胞を移植した NOG マウスから脾臓の B 細胞を採取し、CFSE ラベルした後 LPS によって刺激した。培養4日後に細胞を回収し FACS を用いて解析したところ、この B 細胞は正常な脾臓 B 細胞と同様の増殖を示した。また、培養液中に IgM 抗体を産生していた。従って Ring1A/B 欠失により運命転換された B 細胞は、少なくとも *in vitro* において B 細胞として一定の機能を有することが明らかとなった。最後に T 細胞分化における Ring1A/B の役割を明らかにするために、LckCRE-Ring1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup> Pax5<sup>fl/fl</sup>(TKO)マウスを作成し、このマウスの胸腺および脾臓細胞を FACS によって解析した。驚いたことに胸腺細胞数はコントロールの Ring1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup> マウスとほぼ同程度まで回復していた。このことから T 細胞分化においては転写因子 Pax5 が Ring1A/B の重要な標的遺伝子の一つであることが明らかとなった。

## (2) 詳細

### 1) T 細胞特異的 Ring1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup> コンディショナルノックアウト(cKO)マウスの作成および解析

Ring1A/B の T 細胞分化における機能を明らかにするために、T 細胞特異的に CRE タンパクを発現する Lck-CRE トランスジェニック(Tg)マウスと Ring1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup> マウスを掛けあわせることにより Ring1A/B コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを作成し解析を行った。このマウスから T 細胞を作る器官である胸腺を採取し、胸腺細胞を T 細胞分化マーカーである CD4 および CD8 で染色した。これをフローサイトメーター(FACS)により解析すると Ring1A 単独の

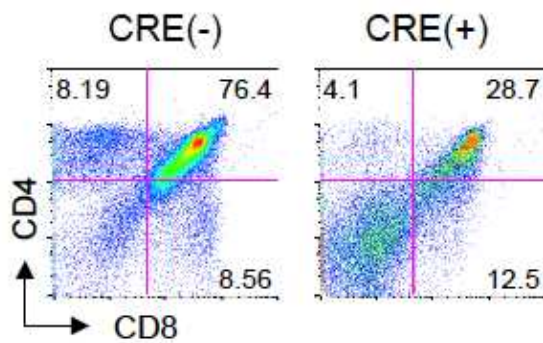


図 2. LckCre-Ring1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup> マウス

欠損マウスでは T 細胞分化に全く異常が認められなかったのに対して Ring1A/B cKO マウスでは、T 細胞分化が未分化な CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (Double negative: DN)段階で顕著に阻害されていた(図2)。この変異マウス由来胸腺細胞の遺伝子発現プロファイルを正常な胸腺細胞と比較したところ、ポリコムタンパクのターゲットである p16<sup>ink4a</sup>/p19<sup>Arf</sup> の脱抑制と共に、B 細胞分化に必須の転写因子である Ebf1、Pax5 及び B 細胞特異的遺伝子(Cd79a, Cd79b, VpreB1, …… など)の脱抑制が見られた。さらに変異マウス胸腺細胞では細胞表面に B 細胞特異的マーカーである CD19 の発現が認められた。そこでこの胸腺 T 前駆(DN3)細胞の B 細胞への分化能を調べるために LckCre-Cdkn2a<sup>-/-</sup>Ring1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup> TKO マウスより採取した胸腺 DN3 細胞を放射線照射した免疫不全マウス(NOG マウス)に移植した。4週間後にマウスを解析したところ、驚くべき事に、骨髄および脾臓から胸腺細胞由来の B 細胞が検出された。この細胞は表面に IgM を発現していたが TCR の発現は認められなかった(図3)。さらに DN3 細胞だけでなくより分化の進んだ CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Double positive: DP)細胞を移植しても同様の結果が得られ

た。この結果はポリコームタンパクが T 細胞としてのアイデンティティの確立・安定性維持に必須であることを示唆している。

次にポリコームタンパクの DP 段階以降の役割を明らかにするために Lck-CRE Tg マウスの代わりに CD4-CRE Tg マウスを用いて解析した。CD4CRE-*Ring1A*<sup>-/-</sup>*Ring1B*<sup>fl/fl</sup> マウスの胸腺、脾臓を調べたところ、いずれにおいても T 細胞分化は正常で殆ど異常が認められなかった。この結果は DP 段階以降の分化・成熟に *Ring1A/B* は必須でないことを示している。

## 2) 運命転換された B 細胞の遺伝子再構成の解析

以上の解析から *Ring1A/B Cdkn2a* TKO マウスの胸腺 T 前駆細胞は B 細胞へ運命転換することが示唆された。しかし、この B 細胞が本当に T 細胞由来であるかどうか明らかではない。そこで運命転換した B 細胞からゲノム DNA を精製し、PCR 法を用いて TCRβ 鎖及び IgH, IgL 鎖の遺伝子再構成を調べた。まず、IgH 鎖 D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>、および IgL 鎖 V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub>、V<sub>λ</sub>-J<sub>λ</sub> について解析を行った。その結果、運命転換された B 細胞では D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>、V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub>2、V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub>5 および V<sub>λ</sub>1-J<sub>λ</sub> のすべての遺伝子座においてオリゴクローナルな遺伝子再構成が認められた。また、同様に TCR Dβ-Jβ2.6、Vβ-Jβ2.6 についても解析したところ、いずれにおいても多様な再構成バンドが検出された。このことは、運命転換の頻度は低いものの、既に TCRβ 鎖遺伝子再構成を開始していた、すなわち T 系列へ運命決定されていた T 前駆細胞が B 細胞へ運命転換し、多様な遺伝子再構成パターンを持つ B 細胞クローンを生成していることを示している。さらに、この運命転換をよりはっきりと証明するために TCRβ 鎖および IgH 鎖の両方の遺伝子再構成を1個の細胞から検出する実験系を開発し、少なくとも5クローンにおいて両方の遺伝子座の遺伝子再構成を検出することに成功した。このことは T 前駆細胞が B 前駆細胞へ運命転換したことを確証している。

## 3) 運命転換された B 細胞の機能解析

運命転換された B 細胞の機能を調べるために、*Cdkn2a, Ring1A/B* TKO マウス胸腺の DP 細胞を移植した NOG マウスから脾臓の B 細胞を採取し、CFSE ラベルした後 LPS によって刺激した。培養4日後に細胞を回収し FACS を用いて解析したところ、この B 細胞は正常な脾臓 B 細胞と同様の増殖を示した。また、培養液中の抗体量を解析したところ、IgM 抗体を産生していた。しかし IgG 抗体は検出されなかったことから、ポリコームタンパクがクラススイッチに重要であることが示唆された。従って *Ring1A/B* 欠失により運命転換された B 細胞は、少なくとも

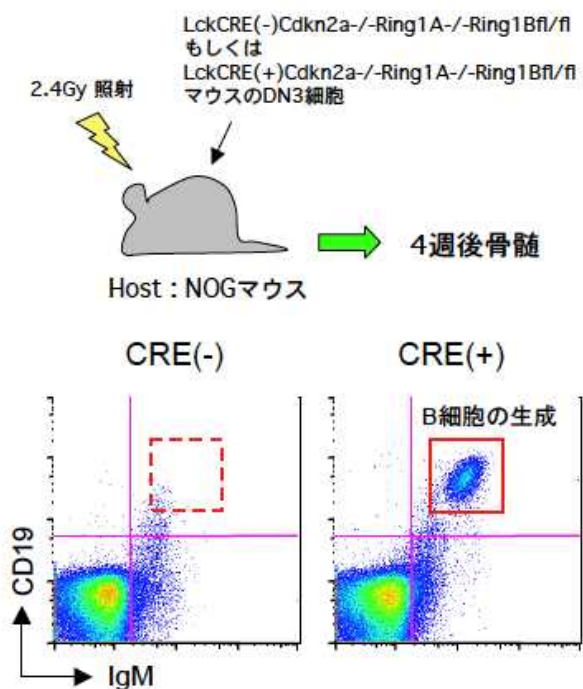


図3. LckCRE-Cdkn2a<sup>-/-</sup>Ring1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup> マウスの胸腺 T 前駆細胞から B 細胞への運命転換

*in vitro*においてB細胞として一定の機能を有することが明らかとなった。

#### 4) 胸腺T細胞におけるRing1BのChIP解析

T細胞分化におけるRing1Bの機能を更に詳しく調べるために、正常なマウスより胸腺T細胞を採取し、網羅的なクロマチン免疫沈降(ChIP-on-chip)解析を行った。Ring1BのEBF1, PAX5, IRF4およびIRF8遺伝子の転写制御領域への結合を調べたところ、いずれも胸腺T細胞において高い結合が認められた。同様にH3K4me3の割合を調べたところ、EBF1領域には比較的高い頻度で認められたものの、それ以外の領域には認められなかった。一方、ポリコームタンパクが制御していることが知られているH3K27me3はすべての遺伝子の転写調節領域において認められ、Ring1Bの結合と一致していた。これらB細胞関連遺伝子座におけるRing1Bの結合およびH3K27me3の結果はChIP-PCRによっても確認された。このことはEBF1, PAX5, IRF4およびIRF8の発現が正常な胸腺T細胞ではほとんど認められないことと一致している。これらの結果から胸腺T細胞ではRing1Bが少なくともEBF1, PAX5, IRF4およびIRF8の発現を直接制御することによって、B細胞への運命転換を抑制していることが示唆された。

#### 5) LckCRE-Ring1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup>マウスとPax5<sup>fl/fl</sup>マウスを掛け合わせるとT細胞分化は回復するか？

これまでの解析から、T細胞分化過程におけるポリコームのターゲット遺伝子の一つとしてPax5が示唆された。そこでT細胞分化におけるRing1A/Bの役割を解析するために、LckCRE-Ring1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup> Pax5<sup>fl/fl</sup>(TKO)マウスを作成し、このマウスの胸腺および脾臓細胞をFACSによって解析した。驚いたことに胸腺細胞数はコントロールのRing1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup>マウスとほぼ同程度まで回復していた。またT細胞の各分化段階(DN, DP, CD4SP, CD8SP)の割合をコントロールのRing1A<sup>-/-</sup>Ring1B<sup>fl/fl</sup>マウスと比較したところ、いずれにおいても殆ど差が認められなかった。さらに脾臓のT細胞についても同様に解析したところ、コントロールと同程度の成熟T細胞が認められた。このことからT細胞分化においてはPax5がRing1A/Bの重要な標的遺伝子の一つであることが明らかとなった。

### 3. 今後の展開

以上の結果から、ポリコームタンパクがPax5の発現を抑制することによりT細胞系へ決定後の運命維持に重要な働きをすることが明らかとなった。ただし、ポリコームが重要なのは胸腺DP細胞段階までで、これ以降は必須でない。今後はRing1AB-DKO, Ring1AB Cdkn2a-TKOおよびRing1AB Pax5-TKOの胸腺細胞の遺伝子発現を比較することにより、ポリコームの機能を明らかにしたい。現在行なっているRNA-SeqとChIP-Seq解析を組み合わせることにより、正常なT細胞分化過程において、あるいはポリコームを欠損させることによって起こるB細胞への分化転換過程においてエピジェネティックな変化がどのように起こっているのかを網羅的に解析する。また、ポリコームの標的遺伝子としてEBF1も予想されるが、EBF1KOマウスとRing1A/B DKOマウスを掛け合わせることにより、PAX5と同様にT細胞分化が回復するのかどうか検討する。このようにしてT細胞とB細胞が生成される過程でポリコームがどのよ

うに働いているのかを明らかにしたい。また、ポリコームは白血病との関連も示唆されているので将来的には白血病の発症機構の解明に結びつくように努力したい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では *Ring1A/B* ダブルノックアウトマウスの胸腺細胞を用いてポリコームタンパクが T 細胞の生成過程においてその運命の確立・維持にどのように関わっているかを明らかにすることを目的に研究を行った。上記の通り、*Ring1A/B* ダブルノックアウトマウスの T 前駆細胞は B 細胞へ運命転換することが明らかとなった。また、転写因子である Pax5 が T 細胞分化におけるポリコームタンパクの最も重要な標的遺伝子の1つであることも明らかとなった。途中、実験系の確立やマウスの掛け合わせなどに予想以上に時間がかかる部分もあったが、ほぼ当初の計画通り、データを得ることができた。研究費も予定通り執行された。現在論文を作成しており、投稿の準備中である。今後速やかに publish 出来るよう努力したい。また、このさきがけ領域では様々な仲間と出会い、見聞を広めることができた。領域内での共同研究も進行中である。今後は細胞分化におけるエピジェネティック制御機構の解明に取り組み、免疫細胞にとどまらず、様々な細胞の分化・発生過程にポリコームを含めたエピジェネティクスがどのように関与しているのか明らかにしたい。また、正常な分化過程から逸脱した白血病などがんの発症機構の解明にも取り組み、新しい治療法の開発に結びつくよう努力したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

T細胞およびB細胞がその機能を発揮するためには分化・成熟過程においてそれぞれの細胞の運命が厳格に制御・維持されなければならない。しかしその詳細は明らかでなかった。伊川氏はポリコーム群タンパクが T 細胞の分化過程及び成熟後の維持に不可欠であることを見出した。ポリコーム(PCR1)の構成因子である *Ring1AB* のノックアウトマウスが、T 細胞から B 細胞への運命転換の表現型を示したのである。また、ポリコームの重要な標的として Pax5 を同定した。このことより、ポリコームが T 細胞の分化状態の維持に必要であることの発見、また、免疫細胞の細胞系譜決定の機構の一つを解き明かしたその功績は大きい。伊川氏は免疫に限らず細胞の分化・発生過程のエピジェネティックなメカニズムに関心があり、研究レベルも高く、その解明は基盤的研究なのでいずれ治療に結びつく社会・経済的波及効果が期待できる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Ikawa T. Genetic and epigenetic control of early lymphocyte development. *Curr Top*

	<i>Microbiol Immunol.</i> 2014 381:1-20
2.	Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, <u>Ikawa T</u> , Otsubo T, Kawamura YI, Dohi, Tajima S, Matsumoto H, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. <i>Nat Immunol.</i> 2014 15: 571-579
3.	Okuyama K, <u>Ikawa T</u> , Gentner B, Hozumi K, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. MicroRNA-126-mediated control of cell fate in B-cell myeloid progenitors as a potential alternative to transcription factors. <i>Proc Natl Acad Sci USA.</i> 2013 110: 13410-13415
4.	Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, <u>Ikawa T</u> , Shimizu K, Fujii S, Koseki H, Kawamoto H. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells. <i>Cell Stem Cell.</i> 2013 12: 31-36,
5.	Seo W, <u>Ikawa T</u> , Kawamoto H, Taniuchi I. Runx1-Cbfb facilitates early B lymphocyte development by regulating expression of Ebf1. <i>J Exp Med.</i> 2012 209 1255-1262

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表:

- ・ 伊川友活 “ポリコム群タンパク Ring1A/B は Pax5 の発現を抑制することにより T 細胞系列へ決定後の運命を維持する”Kyoto T cell Conference 2014 年 5 月 16 日 京都市
- ・ Ikawa T “Polycomb group proteins Ring1A/B are required for the maintenance of T cell fate.” Gene expression & signaling in the immune system. 2014 年 4 月 22 日 コールドスプリングハーバー、アメリカ
- ・ Ikawa T “Maintenance of T cell identity by Polycomb group proteins.” RIKEN Epigenetics in Yokohama 2014 年 2 月 17 日 横浜市
- ・ Ikawa T “Maintenance of T cell identity by Polycomb group complexes.” 日本免疫学会 2013 年 12 月 12 日 千葉市
- ・ Ikawa T “Roles of Polycomb group proteins in the maintenance of T cell fate.” 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 2013 年 12 月 12 日 ミラノ、イタリア
- ・ Ikawa T “A genetic network during the T cell lineage specification.” The 6<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T cell conference 2013. 2013 年 6 月 3 日 京都市
- ・ Ikawa T “Maintenance of T cell fate after the commitment to the T cell lineage.” 日本免疫学会 2012 年 12 月 6 日 神戸市
- ・ Ikawa T “Gene regulatory networks in T cell lineage specification” FANTOM5 MEETING 2012 年 10 月 31 日 横浜市
- ・ 伊川友活 “T 細胞系列へ決定後の運命維持機構”Kyoto T cell Conference 2012 年 7 月 6

日 京都市

- ・ **Ikawa T** “Induction of myelo-lymphoid stem cells by suppressing E-protein activities.” Gene expression & signaling in the immune system. 2012 年 4 月 25 日 コールドスプリングハーバー、アメリカ

**招待講演:**

- ・ **Ikawa T** “Genetic and epigenetic control of early lymphocyte development.” Max Planck Institute of Immunology and Epigenetics 2014 年 10 月 20 日 フライブルク、ドイツ
- ・ **Ikawa T** “Maintenance of T cell fate by polycomb group proteins.” France-Japan Immunology meeting 2014 年 10 月 23 日 カシス、フランス
- ・ **伊川友活** 「細胞分化の研究に魅せられて」新学術領域「細胞運命制御」若手の会 2014 年 4 月 18 日 浜松市
- ・ **Ikawa T** “Epigenetic regulation in T cell lineage commitment.” The 5<sup>th</sup> LJI & IMS-RCAI Workshop 2013 年 10 月 30 日 横浜市
- ・ **伊川友活** 「T 細胞から B 細胞へのリプログラミング」第17回血液化学セミナー 2011 年 11 月 6 日 東京

**受賞:**

- ・ 2012 年 4 月 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
- ・ 2011 年 11 月 第6回日本免疫学会研究奨励賞

**日本語文献:**

- ・ **伊川友活**, 宮井智浩. B細胞系列への運命決定を制御する転写因子.臨床免疫・アレルギー科 61:704-710, 2014
- ・ **伊川友活**, 河本宏. T細胞運命決定マスター遺伝子の同定. 感染・炎症・免疫 41:81-83, 2011