

61. E-Id 転写因子による遺伝子発現プログラム発動の解明

宮崎 正輝

*京都大学 再生医科学研究所

Key words : T 細胞分化・活性化, 転写制御, Id 因子

緒言

細胞の分化・活性化の過程において、その分化系列、または活性化に特異的な転写因子は、新たな遺伝子発現プログラムを発動し、同時に他の系列へのプログラムを抑制することで細胞の運命を適正に制御すると考えられている。この制御の破綻は、分化異常、活性化異常や細胞の癌化などを引き起こすと考えられる。T 細胞は獲得免疫の中心的な免疫細胞であり、T 細胞受容体(TCR)により特異的な抗原を認識して活性化し、炎症に応じて様々なエフェクター T 細胞へと分化する。この活性化・分化には、転写因子群のネットワークによる調整が必須であることが知られている。bHLH 型転写因子 E2A は、二量体を形成し DNA に結合することで標的遺伝子の発現を制御する¹⁾。この E-Id 因子のバランスは、T 細胞の分化・活性化を制御する重要な転写制御の軸であるが、それがどのようにエンハンサー機能を変化させ、高次クロマチン構造を変えるのか、未だ明らかにされていない。この研究課題に取り組むため、Id 因子である Id2/Id3 欠損 T 細胞を用いて、E-Id 因子のバランスの破綻がどのように T 細胞の活性化に影響を与えるのか、さらに活性化 T 細胞からリンパ腫への進展はどのような分子メカニズムで行われるのか、分子生物学手法を用いてその分子機構の解明を行った。このモデルはヒト検体では解析が不可能であり、モデルとして非常に意義のある研究となりうる。

方法および結果

1. ChIP-seq 及び RNA-seq 解析によるエンハンサー解析と遺伝子発現

Id2/Id3 欠損 T 細胞では、ナイーブ CD4T 細胞が刺激なしに活性化し、濾胞性ヘルパー T (TFH) 細胞へと分化してしまう。さらにこの TFH 細胞は、NKT 細胞や gamma-deltaT 細胞などの自然免疫型の T 細胞に必須の転写因子である PLZF²⁾を高発現しているため、自然型濾胞性ヘルパー T (innate TFH) 細胞と名付けた。さらに、T 細胞特異的 Id2/Id3 欠損マウスでは、8~12 ヶ月齢マウスにおいて半数近くで T 細胞リンパ腫を発生する³⁾。この T 細胞リンパ腫細胞は、innate TFH 細胞から発生すると考えられることから、どのようにして、活性化 T 細胞がリンパ腫へと変貌していくのか、その分子機構を探るため、野生型 CD4SP 細胞、Id2/Id3 欠損 (ダブルノックアウト: dKO) CD4SP 細胞、そして Id2/Id3 欠損リンパ腫細胞を用いて ChIP-seq (ヒストン H3K4 me1/2, H3K27Ac) 解析及び、RNA-seq 解析を行い、エピジェネティック制御と遺伝子発現を検討した。

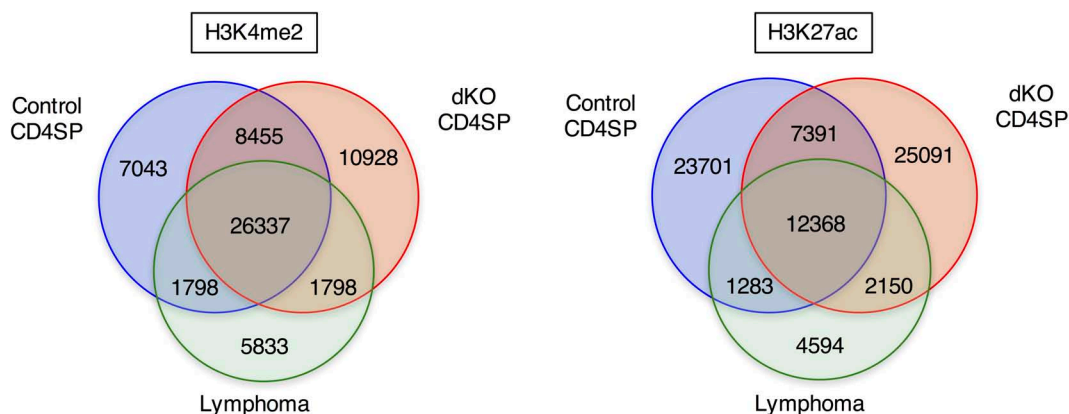


図1. エンハンサー (H3K4me2) とアクティブ (H3K27ac) マーカー : ChIP-seq Control と Id2/Id3 dKO CD4 細胞、リンパ腫細胞におけるエンハンサー解析。

エンハンサーマーカーである H3K4me2 (ジメチル) 及びアクティブマーカーである H3K27ac (アセチル化) の ChIP-seq 解析の結果、活性化型である dKO CD4SP 細胞や野生型 CD4SP 細胞 (ナイーブ T 細胞) に比較して、Lymphoma 細胞では、その絶対数の減少が認められた (図1)。さらに H3K4me2 と H3K27ac の結果を合わせて、アクティブエンハンサーについても解析を行った。

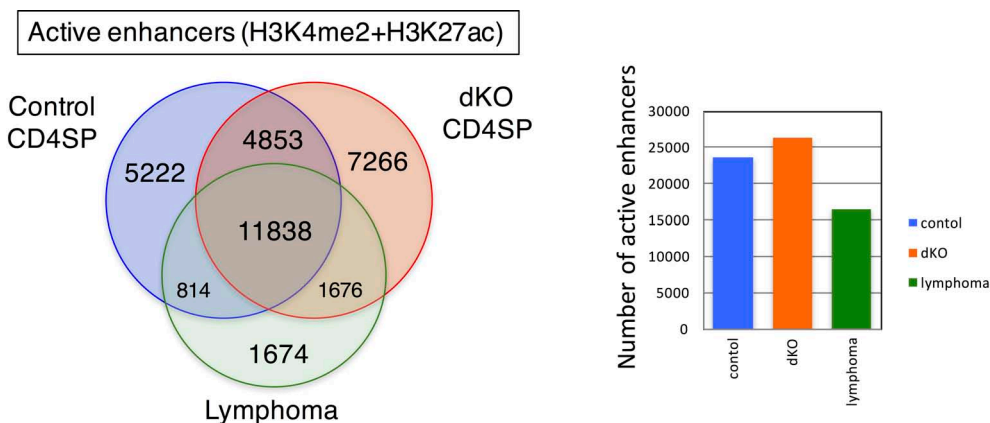


図2. アクティブエンハンサー解析 エンハンサー領域のうち、アクティブのもの解析と絶対数。

結果、K4me2、K27ac 両方 (+) であるアクティブエンハンサーの絶対数は、活性化型である dKO CD4SP 細胞で増加するのに対して、Lymphoma 細胞では明らかに減少していた (図2)。通常、がん細胞では全体の遺伝子発現が上昇し、細胞が活性化していることから、エンハンサーの数及びアクティブエンハンサーの絶対数は増加していると予想していたが、驚いたことに実際は全く逆の結果であった。

2. ATAC-seq 解析によるオープンクロマチン領域の同定

細胞のプログラムは遺伝子発現により規定されている。細胞分化において、エンハンサー領域のクロマチンアクセシビリティの変動は、遺伝子発現に先立って起こる (Regulome 調節)。こうしたエンハンサーのアクセシビリティを評価するため、ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequence) を行い⁴⁾、ゲノムワイドにオープンクロマチン領域を同定し、さらにプロモーターとエンハンサー領域を転写開始点からの距離で分離し、解析を

行った。ChIP-seq 解析と同様に、野生型 CD4SP 細胞、Id2/Id3 欠損 CD4SP 細胞と Id2/Id3 欠損リンパ腫細胞を使用し、ATAC-seq 解析を行った。

更に、H3K4me2 (エンハンサー) を母集団とし、H3K27ac, ATAC-seq の結果を合わせて、アクティブエンハンサーでありオープンクロマチンであるエンハンサーについて、3 種類の細胞での比較を行った。

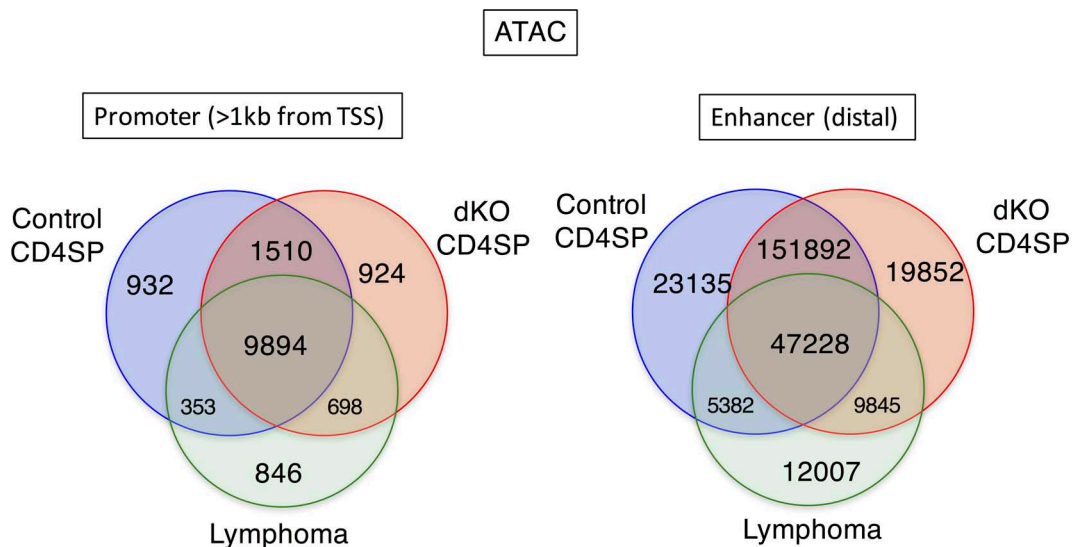


図 3. ATAC-seq によるオープンクロマチン領域の解析
ATAC-seq 解析によるオープンクロマチン領域の解析 (プロモーターとエンハンサー)。

結果、Id2/Id3 欠損 T 細胞では、アクティブエンハンサーでありクロマチンアクセシビリティがあるエンハンサー (active open enhancer) の絶対数が増加し、さらに新たなエンハンサー領域が open に変化した (図 3, 4)。一方、リンパ腫細胞では、逆に active open enhancer が減り、絶対数も明らかに減少した。このことは癌化すると、新たな Regulome が形成されるよりも、エンハンサーを失う傾向が強いことを意味する。

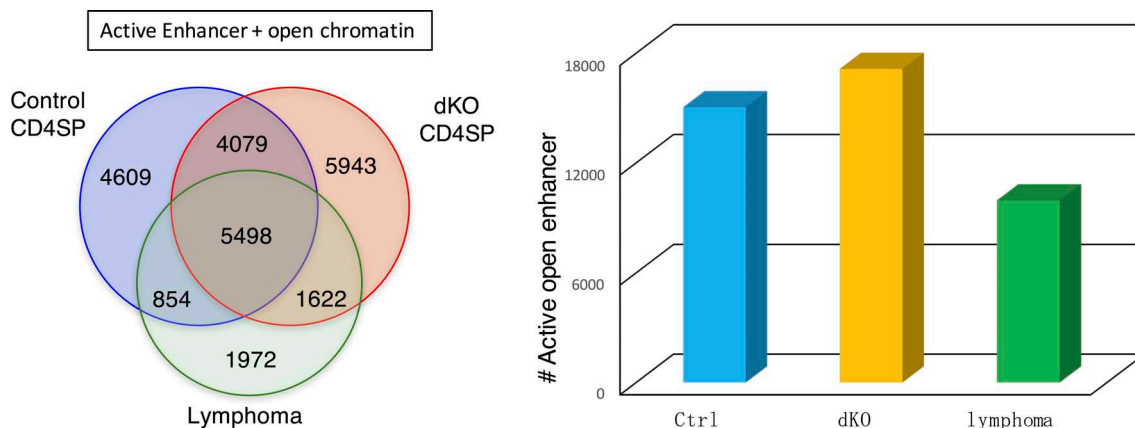


図 4. オープンアクティブエンハンサー
ATAC-seq 解析と ChIP 解析によるオープンアクティブエンハンサー解析。

3. T細胞リンパ腫と p19/Arf の発現抑制

緒言で述べたように、T細胞特異的 Id2/Id3 欠損マウスでは、8~12ヶ月齢マウスにおいて半数近くでT細胞リンパ腫を発生することを報告してきた³⁾。しかし、3~4ヶ月齢では、リンパ腫の発生を認めないことから、新たな分子機構がリンパ腫発生に必要であることが想定された。しかしながらその分子機構は未だ明らかでない。リンパ腫のRNA-seq法によるトランスクリプトーム解析から、Id2/Id3欠損T細胞ではp19/Arfが高発現している一方、複数のId欠損リンパ腫細胞ではp19/Arfの遺伝子発現が低下していることを見出した³⁾。p19/Arfは、p53依存的に細胞周期を制御していることで知られ、また腫瘍抑制因子として非常に有名である⁵⁾。このことから、p19/Arfの発現抑制がリンパ腫発生の原因ではないかと考え、Id2/Id3欠損マウスとInk4a/Arf (*Cdkn2a* 遺伝子)のトリプルノックアウト(TKO)マウスの作製を試みた。

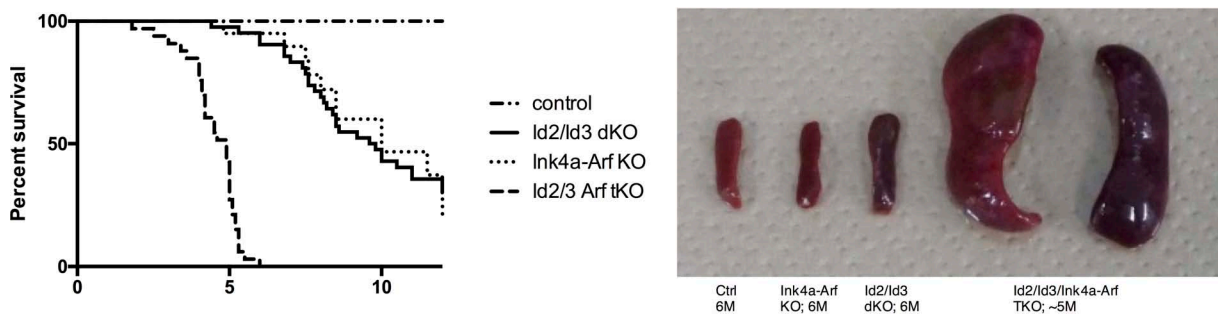


図5. Id2/Id3 Ink4a-Arf TKO マウスの生存曲線とリンパ腫発生

左) Id2/Id3 Ink4a-Arf TKO、Id2/Id3 dKO、Ink4a-Arf KO、control マウスの生存曲線。
右) TKO、dKO マウスの脾臓写真。

結果、Id2/Id3/Ink4a-Arf TKO マウスでは、4~5ヶ月齢で死亡した(図5)。Ink4a-Arf やId2/Id3 dKO マウスでは、6ヶ月齢ではリンパ腫の発生を認めない一方、4ヶ月齢のId2/Id3/Ink4a-Arf TKO マウスではその殆どが、リンパ腫の発生を認めた。以上の結果は、Id2/Id3欠損T細胞からのリンパ腫の発生には、Ink4a-Arfの発現抑制が大きく関与していることを証明する結果である。

考 察

以上の結果から、Id2/Id3の欠損がエンハンサーの機能、つまりRegulome調節に影響を及ぼし、T細胞を活性化の状態に変化させていることが明らかになった。リンパ腫細胞との比較から、エンハンサーの数は低下し、オープンクロマチン領域も減少しており、癌細胞への変化は単に活性化が極端になっているのではなく、活性化細胞の持つRegulomeを失い、先鋭化すると考察される。つまり癌細胞特異的なRegulomeは、活性化T細胞とoverlapする一方、そこからエンハンサーを失う傾向があると推察される。更にInk4a-Arfの発現が、活性化T細胞からリンパ腫への癌化を抑制していることが示唆されたが、では何故、Ink4a-Arfの発現抑制が起こるのか?その分子機構を解明できれば、細胞の癌化の道筋の解明に繋がる重要な発見と考えられ、現在、解析を進めている。

今回の癌化のモデルは、ヒトのサンプルでは行うことが不可能である。何故なら、癌化するoriginの細胞が同定されないこと、またそのoriginの活性化T細胞を*in vivo*から集めることが困難であるからである。今回のマウスモデルでは、それらの問題を解決し、癌化に繋がる過程の分子機構を詳細に解析することが可能であり、基礎研究として大変意義深い研究課題であると言える。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所の河本宏教授、宮崎和子研究員、Baylor研究所のLin YC先生、カリフォルニア大学サンディエゴ校のMurre特別教授である。

文 献

- 1) Murre, C. Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat Immunol.* 2005;6:1079-1086. doi: 10.1038/77881. Pubmed PMID: 11248796
- 2) Eric S Alonzo and Derek B Sant' Angelo. Development of PLZF-expressing innate T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2011;23:220-227. doi:10.1016/j.coi.2010.12.016. Pubmed PMID:21257299
- 3) Miyazaki M, Miyazaki K, Chen S, Chandra V, Wagatsuma K, Agata Y, Rodewald HR, Saito R, Chang AN, Varki N, Kawamoto H, Murre C. The E-Id protein axis modulates the activities of the PI3K-AKT-mTORC1-Hif1 α and c-myc/p19Arf pathways to suppress innate variant TFH cell development, thymocyte expansion, and lymphomagenesis. *Genes. Dev.* 2015; 29(4): 409-25. doi:10.1101/gad.255331.114. Pubmed PMID: 25691468
- 4) Buenrostro, JD., Giresi, PG., Zaba, LC., Chang, HY., and Greenleaf, WJ. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods* 2013; 10, 1213-1218. doi: 10.1038/nmeth.2688. Pubmed PMID:24097267
- 5) Matthew J. Ahearne, Rebecca L. Allchin, Christopher P. Fox and Simon D. Wagner. Follicular helper T - cells: expanding roles in T-cell lymphoma and targets for treatment. *British Journal of Haematology.* 2014; 166(3):326-335. doi:10.1111/bjh.12941. Pubmed PMID:24815671