

【目的】 造血幹細胞から血球細胞への分化においては、各細胞種特異的な遺伝子発現パターンの確立が必須である。この遺伝子発現パターンの確立には、遺伝子発現を調節するエンハンサーと、そこに結合する鍵となる転写因子が重要な役割を果たす。Interferon regulatory factor 8 (IRF8) は単球と樹状細胞からなる単核貪食細胞の分化に必須の転写因子であり、一方で好中球の分化を阻害する。IRF8 の発現は多能性前駆細胞から開始され、単球-樹状細胞前駆細胞で発現が上昇する。この発現上昇は1型古典的樹状細胞 (cDC1) への分化過程でさらに強まる一方、Ly6C 陽性単球への分化過程で発現が低下する。Irf8 の発現は、Irf8 遺伝子座に存在する複数のエンハンサーによって制御されており、Ly6C 陽性単球では 50 kb 上流のエンハンサー (-50 kb) が、共通樹状細胞前駆細胞から cDC1 への分化においては 41 kb 下流と 32 kb 下流のエンハンサーが重要な役割を持つ。しかし IRF8 の発現がより上流の前駆細胞でどのように制御されているのか、また、この単一の転写因子がどのように単球と樹状細胞という二つの系譜の分化を支持するかは不明であった。

【方法】 エンハンサーによる Irf8 の発現制御に着目し、まず単核貪食細胞への分化過程の各細胞種における Irf8 遺伝子座の活性化ヒストンの状態をクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) によって網羅的に解析した。この解析により、造血幹前駆細胞から単核貪食細胞前駆細胞への分化段階で活性が高まっていく新規エンハンサー領域を Irf8 の転写開始点の 56 kb 下流 (+56 kb) に同定した。CRISPR/Cas9 システムを用いてこのエンハンサー領域を欠損したマウス ($\Delta+56$ kb) を作製し、生体内におけるこのエンハンサーの機能を解析した。

【結果】 $\Delta+56$ kb マウスでは、多能性前駆細胞から骨髄系細胞全体で Irf8 の発現が著減した。さらに共通樹状細胞前駆細胞が失われた一方で、Ly6C 陽性単球が過剰に産生された。IRF8 欠損造血前駆細胞に外来性に IRF8 を導入することで、IRF8 高発現細胞ならびに低発現細胞の分化能を評価した。その結果、IRF8 高発現細胞は cDC1 へ、IRF8 低発現細胞は Ly6C 陽性単球へ分化した。IRF8 欠損細胞は好中球へ分化したことから、造血前駆細胞における IRF8 の発現量が好中球・単球・樹状細胞の分化運命を決定することが明らかになった。また、野生型、 $\Delta+56$ kb と IRF8 欠損マウスにおける単核貪食細胞系の様々な分化段階の細胞のエンハンサー分布を ChIP-seq で解析したところ、IRF8 の発現量に応じて協調 (PU.1 など) あるいは抑制 (C/EBP) する転写因子が変化することで、適切な遺伝子発現パターンが確立されることがわかった。さらに、+56 kb エンハンサーの制御転写因子を同定するために、+56 kb エンハンサー領域と同様の活性化パターンの推移を示す領域をゲノム規模でモチーフ解析した結果、RUNX-CBF β が候補として浮かび上がった。Cbfb のノックダウン実験やレポーターアッセイによって、RUNX-CBF β は+56 kb エンハンサーへ直接作用することにより造血前駆細胞で Irf8 遺伝子発現を正に制御し、樹状細胞分化をもたらすことが明らかになった。以上の結果から、RUNX-CBF β によって駆動される+56 kb エンハンサーによって制御される IRF8 発現量によって、好中球・単球・樹状細胞のいずれに分化するかという前駆細胞の運命決定がなされることが明らかになった (発表論文: Murakami et al, Nat Immunol 22: 301-311, 2021)。

IRF8 発現量依存性の単核貪食細胞分化運命決定モデル

