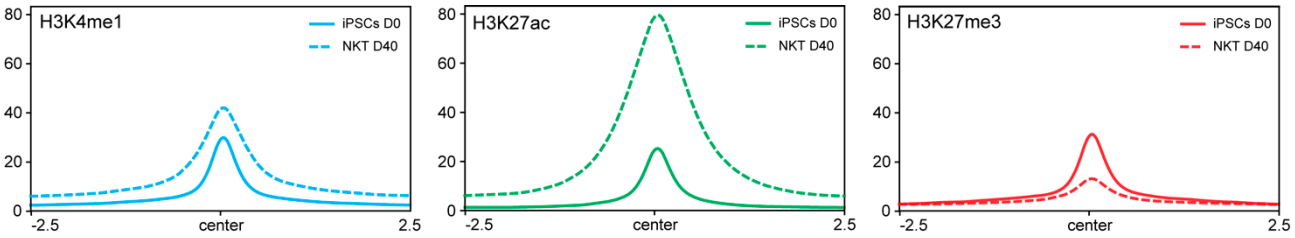
157　エンハンサーが制御するNKT細胞への分化運命決定機構	薬師寺　那由他

【目的】リンパ球の一つである NKT 細胞は、他の免疫細胞を活性化することで高い抗腫瘍効果をもたらす。がん免疫治療法への利用が期待されるが、ヒト末梢血中には 0.01～0.1%しか存在せず、試験管内で治療に必要な細胞数まで増殖させることは困難である。我々の研究室では、ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞を再度 NKT 細胞へと分化させることでこの問題に取り組んできている。しかしながら、現行の分化誘導法は計 40 日間にわたり、最終的に Va24、Vb11、CD3、CD45 全てを強く発現している NKT 細胞の割合は全体の約 20～30%と誘導効率にばらつきがあるのが現状である。がん免疫治療法の実施に向けて、十分な細胞量を安定かつ迅速に供給するためには、工程期間の短縮と誘導効率の改善が大きな課題である。そこで分化誘導期間の短縮と高い誘導効率を兼ね備えた次世代の分化誘導法の開発に向け、本研究では現行の分化誘導法を用いて、NKT 細胞への分化運命を規定するような発現制御領域（エンハンサー）を同定し、その制御機構を明らかにすることを目指した。

【方法】ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞から NKT 細胞への分化誘導過程における遺伝子発現状態の遷移を明らかにするため、分化誘導前の iPS 細胞と分化誘導後 40 日目の NKT 細胞を用いて、RNA-seq を行った。次に、それらの遺伝子群の発現を制御するエンハンサー候補を調べるために、iPS および分化誘導後 40 日目の NKT 細胞を用いて、エンハンサー領域の指標となるヒストンアセチル化酵素 P300 およびヒストン修飾状態を認識する抗体を用いて、CUT&Tag 法によるクロマチンプロファイリングを行った。

【結果】ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞と分化誘導後 40 日目の NKT 細胞を用いて遺伝子発現比較を行った結果、NKT 細胞では予想通り免疫細胞を特徴づけるような遺伝子群の発現が上昇していることがわかった。これらの遺伝子の TSS 領域周辺におけるヒストン修飾状態をみたところ、NKT 細胞では転写の活性化およびエンハンサー活性の指標となる H3K4me1 と H3K27ac のシグナルが高くなっており、反対に転写の抑制に作用する H3K27me3 のシグナルは低くなっていた。また、エンハンサー領域の指標となる P300 のプロファイリングを行ったところ、およそ 6,800 ヶ所において強い結合がみられた。分化誘導の NKT 細胞において、P300 結合領域における H3K4me1、H3K27ac および H3K27me3 のシグナルを調べたところ、分化誘導後の NKT 細胞では転写活性に作用する H3K4me1 と HeK27ac の濃縮状態が iPS 細胞のものよりも上昇していることが明らかとなった。

P300 結合領域周辺 5kb 内でのヒストン修飾の濃縮状態から明らかとなった
iPS 細胞と NKT 細胞におけるエンハンサーの活性の違い



157. エンハンサーが制御する NKT 細胞への分化運命決定機構

薬師寺　那由他

*東京理科大学 生命医科学研究所 免疫生物学研究部門

Key words：エンハンサー，ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞，NKT 細胞，CUT&Tag

緒　言

リンパ球の一つであるナチュラルキラーT（NKT）細胞は、ナチュラルキラー（NK）細胞マーカーと T 細胞抗原受容体（TCR）の両方を発現する T 細胞の一種である。活性化した NKT 細胞は他の免疫細胞を共に活性化することで、高い抗腫瘍効果をもたらすことが知られている。この特徴からがん免疫治療法への利用が期待されるが、NKT 細胞はヒト末梢血中には 0.01～0.1%しか存在せず、試験管内で治療に必要な細胞数まで増殖させることは非常に困難である。我々の研究室では、ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞を再度 NKT 細胞へと分化させることでこの問題に取り組んできており、これまでにマウス生体内に移植したヒト iPS 細胞由来 NKT 細胞が腫瘍細胞の増殖を抑制することを明らかにした［1］。しかしながら計 40 日間にわたる現行の分化誘導法では（図 1）、最終的に Va24、Vb11、CD3、CD45 全てを強く発現している NKT 細胞の割合は全体の約 20～30%ほどである。がん免疫治療法の実施に向けて、十分な細胞量を安定かつ迅速に供給するためには、工程期間の短縮と誘導効率の改善が次の課題である。これまでの現行の分化誘導法では、その分化過程で一体どのような遺伝子発現の変遷をかさねた細胞群が最終的に NKT 細胞へと分化するのか、不明な点が多かった。我々はそれらの遺伝子群とその発現を制御する領域（エンハンサー）を明らかにし、人為的にそれらの遺伝子発現を制御することで、分化誘導期間の短縮と誘導効率の上昇が可能となるのではないかと予想した。そこで本研究では、現行の分化誘導過程を用いて、NKT 細胞への分化運命を規定する発現制御領域（エンハンサー）を同定し、その制御機構を解明することを目的とした。この成果をもとに、ヒト iPS 細胞から NKT 細胞への新規分化誘導法の開発を目指す。

方　法

1.　ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞を用いた NKT 細胞への分化誘導

ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞は通常、iMatrix-511 でコートしたディッシュ上にて、AK02N を用いて培養した。分化誘導時には iPS 細胞塊を OP9 フィーダー細胞上にて 13 日間培養し、造血細胞系列への分化誘導を行った。続いてそれらの細胞群を回収し、OP9-DLL フィーダー細胞上へと移植し、IL-7、SCF3、Flt-3L を添加した培養液中で 17 日間培養することで、NKT 細胞系列への分化を誘導した。その後回収した細胞群を IL-7、IL-15 を添加した培養液中で 10 日間維持純化培養を行った（図 1）。

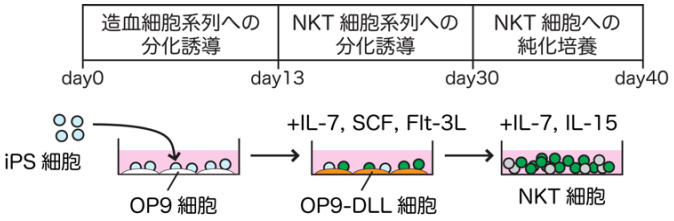


図 1.　ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞から NKT 細胞への分化誘導工程
分化誘導工程は、iPS 細胞から造血細胞系列への分化誘導、次に NKT 細胞系列への誘導、最後に NKT 細胞の純化培養という 3 段階で行われる。

*現在の所属：理化学研究所 生命医科学研究センター 免疫器官形成研究チーム

2.　iPS 細胞および分化誘導後 40 日目の NKT 細胞における遺伝子発現解析

分化誘導前の iPS 細胞と分化誘導後 40 日目の NKT 細胞を用いて、どのような遺伝子の発現が大きく変化しているかを明らかにするために、トランスクリプトーム解析（RNA-seq）を行った。NKT 細胞に関しては、分化誘導後 40 日目の細胞群を Va24 抗体、Vb11 抗体、CD3 抗体、CD4 抗体で染色したのち、さらに死細胞を識別するために 7-AAD 抗体を用いて染色した。その後、セルソーターを用いて、Va24 抗体、Vb11 抗体、CD3 抗体、CD4 抗体で強く染色している細胞群のみを回収し、NKT 細胞として全ての実験に用いた。

3.　iPS 細胞および分化誘導後 40 日目の NKT 細胞におけるクロマチンプロファイリング

本研究では、まず分化誘導前の iPS 細胞と分化誘導後 40 日目の NKT 細胞という比較的均一性が高く、細胞数が豊富なサンプルを用いているものの、今後分化誘導途中の細胞群を用いて同様の解析を行う場合、1. 分化途中の細胞が示す不均一性、2. 均質な細胞群の数の少なさ、が障壁となると考えた。そのため、将来的に発生する問題を回避するため、少数細胞でクロマチンプロファイリングが行える Cleavage Under Targets and Tagmentation（CUT&Tag）法が有用であると判断し、その導入を行った。CUT&Tag 法は 2019 年に Steven Henikoff 教授らによって開発された Tn5 トランスポザーゼを利用した実験手法であり、条件を満たせば 1 細胞からクロマチンプロファイリングを行えるという大きな利点がある［2］。実験系の最適化を行ったのち、前項目で明らかとなった、大きな発現変化を示す遺伝子群に着目し、これらの遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー領域における転写活性あるいはエンハンサー活性状態を調べるために、これらの指標となる H3K4me1 と H3K27ac の修飾状態を調べた。また、エンハンサーを同定するために、エンハンサー領域の指標となるヒストンアセチル化酵素 P300 の結合状態を網羅的に調べた。

結　果

1. iPS 細胞から NKT 細胞への分化誘導によって発現が大きく変動する遺伝子群の同定

分化誘導前の iPS 細胞および分化誘導後 40 日目の NKT 細胞における遺伝子発現状態を、特に変化が大きかった 500 遺伝子に着目して主成分分析（PCA）にて比較した結果、両者は全く異なっていることを示した（図 2A）。また NKT 細胞の biological replicate 間での差は大きくないことから、分化誘導の実験系は問題ないことが確認できた。

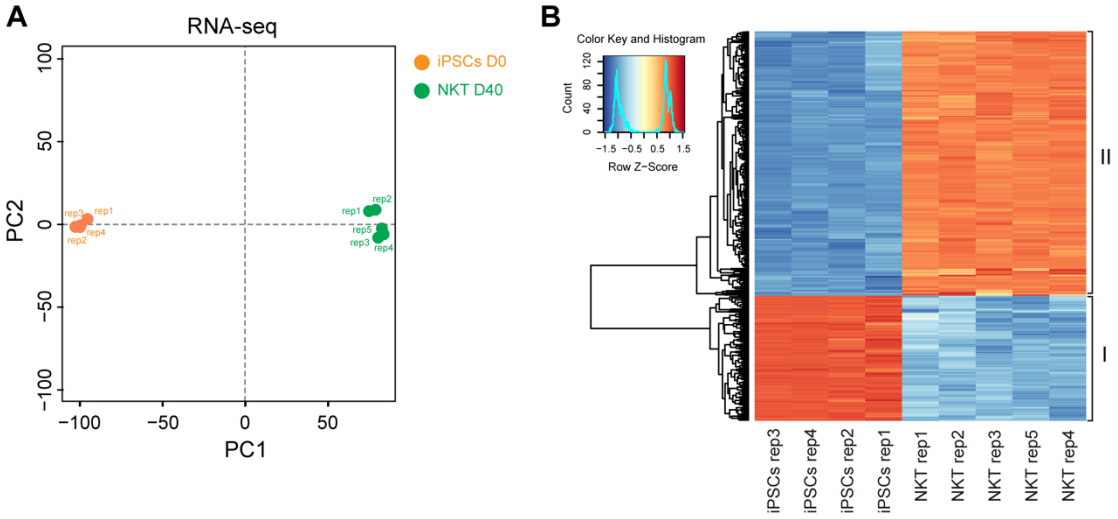


図 2.　iPS 細胞から NKT 細胞への分化誘導に伴う遺伝子群の発現変動

A)　RNA-seq の結果に基づいた主成分分析。iPS 細胞（オレンジ）と分化誘導後 40 日目の NKT 細胞（緑）の類似性は全くなく、また各 replicate 間の差もほとんど見られない。

B)　遺伝子発現の変動を示したヒートマップ。iPS 細胞では発現が強く、NKT 細胞では発現が低い遺伝子群は Cluster I、iPS 細胞では発現が低く、NKT 細胞では発現が高い遺伝子群は Cluster II へと分類される。

次に大きく発現変化を示した遺伝子群に着目し、それらの発現変化をヒートマップにて可視化したところ、iPS 細胞と NKT 細胞での発現に差が見られた遺伝子は大きく分けて二つの Cluster を形成していることがわかった（図 2B）。iPS 細胞でのみ発現が強く、分化誘導後の NKT 細胞では発現が低いものは Cluster I へ、iPS 細胞では発現が低く、NKT 細胞では発現が高くなるものは Cluster II へとそれぞれ分類された。これらの Cluster に含まれる遺伝子群の特徴を調べたところ、Cluster I は細胞の未分化性維持に関わるものが多く、Cluster II は免疫細胞の増殖や活性化に関与する遺伝子群がほとんどであった。

2. NKT 細胞への分化過程における遺伝子発現を制御するヒストン修飾のダイナミックな変動

クロマチンを構成するヒストンタンパク質は様々な修飾を受けることにより、遺伝子の発現を制御することがわかっている。一般的に、ヒストン H3 タンパク質の 27 番目のリジン残基のトリメチル化（H3K27me3）は転写抑制に作用しており、反対にヒストン H3 タンパク質の 27 番目のリジン残基のアセチル化（H3K27ac）とヒストン H3 タンパク質の 4 番目のリジン残基のモノメチル化（H3K4me1）は転写活性化に作用している。これらのヒストン修飾は遺伝子の発現状態にあわせて、遺伝子の転写開始点（TSS）では H3K27me3 あるいは H3K27ac が濃縮し、エンハンサーでは H3K27ac と H3K4me1 の蓄積がみられることがわかっている。

そこで、本研究では RNA-seq から明らかとなった分化過程で大きく発現が変動した遺伝子群に着目し、これらのプロモーター領域におけるヒストン修飾の状態がどのようになっているかを CUT&Tag 法を用いて解析した（図 3）。iPS 細胞で発現が強い遺伝子が含まれる Cluster I においては、TSS における H3K4me1 と H3K27ac の濃縮が強いことに加えて、H3K27me3 の濃縮も見られたことから、バイバレントな状態にあることが明らかとなった（図 3 左）。NKT 細胞では Cluster I の遺伝子群は基本的に転写抑制の指標である H3K27me3 の濃縮が高く、H3K4me1 および H3K27ac の濃縮は圧倒的に低かった。反対に、Cluster II に含まれる遺伝子群においては、NKT 細胞で H3K4me1 と H3K27ac の濃縮が圧倒的に高く、H3K27me3 の濃縮はほとんど見られない程度であった（図 3 右）。これらの結果は、iPS 細胞から NKT 細胞への分化過程においてヒストン修飾状態のダイナミックな変動を伴う遺伝子発現変化が行われていることを示唆している。

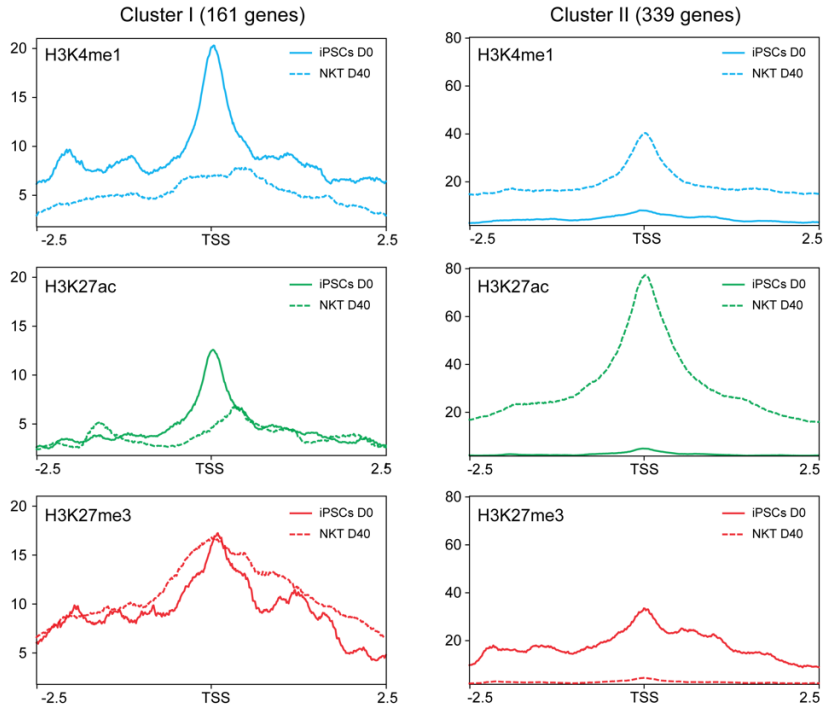


図 3. 転写開始領域（TSS）を含む周辺 5kb 領域内におけるヒストン修飾の状態
Cluster I（左）と Cluster II（右）に含まれる遺伝子群の TSS 周辺 5kb 領域内における H3K4me1、H3K27ac、H3K27me3 のヒストン修飾の状態を、iPS 細胞（実線）と NKT 細胞（点線）で比較した。縦軸は normalized read density を示す。

3. iPS 細胞から NKT 細胞への分化を制御しうるエンハンサーの同定とその活性状態

iPS 細胞から NKT 細胞への分化誘導過程において、NKT 細胞への分化誘導に必要な遺伝子群の発現を制御するエンハンサーを同定するために、エンハンサー領域の指標となるヒストンアセチル化酵素 P300 に着目した。特に、P300 の働きによるエンハンサー領域のヒストンアセチル化（H3K27ac）がエンハンサーの活性化には必要であることが知られている［3］。そこで CUT&Tag 法を用いて、P300 の結合状態を網羅的に解析したところ、iPS 細胞において P300 の強い結合は 6,800 ヶ所で認められた。これらの領域におけるヒストン修飾状態を iPS 細胞と分化誘導後の NKT 細胞で比較したところ、NKT 細胞においては P300 結合領域での非常に高い H3K27ac の蓄積が認められ、反対に H3K27me3 のレベルは減少していることを見出した（図 4）。これらの結果はエンハンサー領域が機能的に活性化していることを示唆するものである。

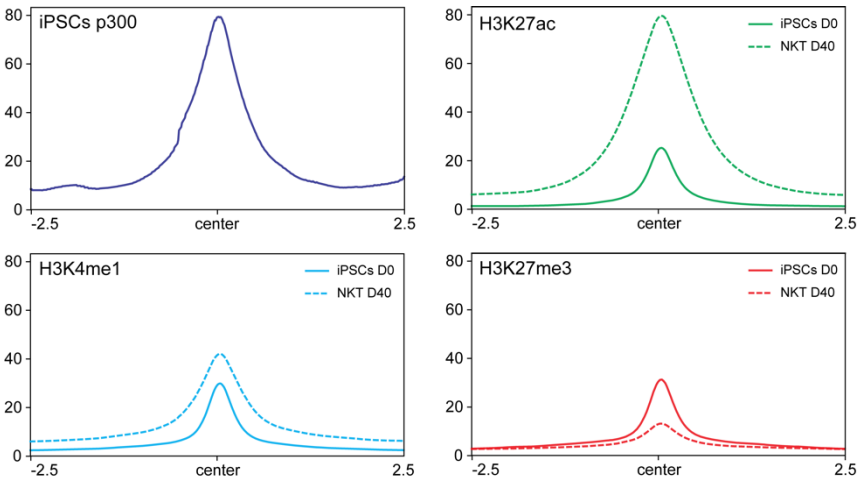


図 4. エンハンサー領域周辺 5kb 領域内におけるヒストン修飾の状態
iPS 細胞で観察された P300 結合領域の周辺 5kb 領域内における、H3K4me1、H3K27ac、H3K27me3 のヒストン修飾の状態を、iPS 細胞（実線）と NKT 細胞（点線）で比較した。縦軸は normalized read density を示す。

考　察

ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞から NKT 細胞への分化誘導過程において、どのような遺伝子発現変遷をたどった細胞群が NKT 細胞へと分化していくのかは依然不明のままである。しかしながら、今回の実験結果から、分化誘導処理で大きく発現変動する遺伝子群の同定と、それらの遺伝子発現制御がヒストン修飾状態と相関していることを明らかにした。加えて、P300 のクロマチンプロファイリングにより、NKT 細胞への分化に寄与するエンハンサー候補を明らかにすることができた。今後は、分化誘導過程における経時的な遺伝子発現解析およびクロマチンプロファイリングを 1 細胞レベルで行うことで、遺伝子発現変動をより詳細に明らかにするだけでなく、NKT 細胞への分化運命を制御するコアエンハンサーの同定とその機能解析を進めていく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所生命医科学研究センター免疫器官形成研究チームの古関明彦チームリーダーである。また本計画の遂行にあたり、実験の要となる細胞培養および CUT&Tag 法のセットアップに関して、同チームの椙下紘貴博士、近藤隆博士、北原玄太氏、小林美登里氏、大越桃子氏には多大なご支援を頂いた。この場を借りて厚く御礼申し上げる。

文　献

1) Yamada D, Iyoda T, Vizcardo R, Shimizu K, Sato Y, Endo TA, Kitahara G, Okoshi M, Kobayashi M, Sakurai M, Ohara O, Taniguchi M, Koseki H, Fujii SI. Efficient Regeneration of Human Vα24+ Invariant Natural Killer T Cells and Their Anti-Tumor Activity In Vivo. Stem Cells. 2016 Dec;34(12):2852-2860. doi: 10.1002/stem.2465. Epub 2016 Aug 1. PMID: 27422351

2) Kaya-Okur HS, Wu SJ, Codomo CA, Pledger ES, Bryson TD, Henikoff JG, Ahmad K, Henikoff S. CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells. Nat Commun. 2019 Apr 29;10(1):1930. doi: 10.1038/s41467-019-09982-5. PMID: 31036827

3) Raisner R, Kharbanda S, Jin L, Jeng E, Chan E, Merchant M, Haverty PM, Bainer R, Cheung T, Arnott D, Flynn EM, Romero FA, Magnuson S, Gascoigne KE. Enhancer Activity Requires CBP/P300 Bromodomain-Dependent Histone H3K27 Acetylation. Cell Rep. 2018 Aug 14;24(7):1722-1729. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.041. PMID: 30110629