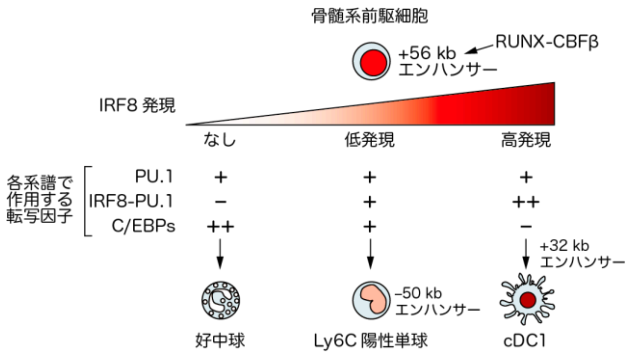
41　転写因子による単核貪食細胞の分化制御機構の解明	田村　智彦

【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、単球ー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（Δ+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】Δ+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、Δ+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



41. 転写因子による単核貪食細胞の分化制御機構の解明

田村　智彦

横浜市立大学 大学院医学研究科 免疫学

Key words：IRF8，単核貪食細胞，エンハンサー，転写因子，RUNX-CBF β

緒　言

造血幹細胞から成熟細胞への分化過程において、血球細胞はそれぞれの細胞種に特異的な遺伝子発現パターンを確立することで、複数の前駆細胞段階を経て分化していく。この遺伝子発現パターンの制御には、遺伝子発現を調節するゲノム領域であるエンハンサーと、そこに結合する鍵となる転写因子が重要な役割を果たしている。Interferon regulatory factor 8（IRF8）は単核貪食細胞系に含まれる単球と樹状細胞の分化に必須の転写因子であり、その一方で好中球の分化を阻害する作用を持つ［1］。

単球と樹状細胞は自然免疫・獲得免疫の両者に重要な役割を果たす免疫細胞である。単球はLy6C陽性単球とLy6C陰性単球に分類され、樹状細胞は 1 型古典的樹状細胞（cDC1）、2 型古典的樹状細胞（cDC2）、形質細胞様樹状細胞（pDC）に分類される。pDC の一部はリンパ球系と考えられているが、その他は全て骨髄系細胞である。造血幹細胞から分化した多能性前駆細胞（MPP）は、顆粒球－単球前駆細胞（GMP）および単球－樹状細胞前駆細胞（MDP）を産生する。cDC は共通樹状細胞前駆細胞（CDP）を経て MDP から分化し、単球は GMP および MDP の両者から共通単球前駆細胞（cMoP）を経て分化する［1］。過去に我々は、単核貪食細胞分化において、IRF8 は MDP から CDP への分化と、MDP または GMP から cMoP を経て Ly6C 陽性単球へ分化する段階で必須であることを示した［2］。しかし、この単一の転写因子がどのようにして単球と樹状細胞という 2 つの細胞系譜の分化を支持するのかについては不明であった。

IRF8 は単核貪食細胞前駆細胞において、他の転写因子と協調あるいは拮抗することでエンハンサーランドスケープを確立し、単球や樹状細胞に特異的な遺伝子の発現を誘導する［3，4］。IRF8 は MPP から発現を開始し、MDP へ分化する段階で発現が上昇する。そこから樹状細胞へ分化する過程ではさらに発現が高まる一方で、単球へ分化する過程では発現が徐々に低下していく。この *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、これまでに Ly6C 陽性単球での *Irf8* 発現は 50 kb 上流のエンハンサー（－50 kb）が重要であり、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（＋41 kb）と 32 kb 下流（＋32 kb）のエンハンサーが連続的にスイッチして働くことが重要であることが報告されている［5］。－50 kb エンハンサーは PU.1、＋41 kb エンハンサーは E タンパク質、＋32 kb エンハンサーは BATF3 と IRF8 自身というように、これらのエンハンサーはそれぞれ異なる転写因子によって活性が制御されており、その結果として各分化段階で IRF8 は異なる役割を果たしている［6～8］。しかし、IRF8 の発現が MDP より上流においてどのように制御されているのかは不明であった。

本研究では遠位エンハンサーによる *Irf8* の発現制御に着目し、単核貪食細胞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修飾を解析することで、*Irf8* の転写開始点の 56 kb 下流（＋56 kb）に造血幹前駆細胞から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同定した。CRISPR/Cas9 システムを用いてこの領域をマウス生体内で欠損させると、*Irf8* 発現は MPP の段階から骨髄系全体で著明に低下した。その結果として、CDP が失われた一方で、Ly6C 陽性単球は過剰に産生された。さらに、このエンハンサーは転写因子 RUNX-CBF によって駆動され、それによって制御される IRF8 の発現量依存的に造血前駆細胞の分化が cDC1、Ly6C 陽性単球、好中球のいずれかに運命決定されることを明らかにした。この結果は、系譜決定に関わる転写因子の重要なエンハンサーが前駆細胞の分化を適切な細胞系譜へ導くことを示している［9］。

方法および結果

1. IRF8 発現調節を制御するエンハンサーの探索

まず IRF8 の発現調節機構を明らかにするために、造血幹前駆細胞から単核貪食細胞へ分化する過程の種々の分化段階の細胞をマウス生体内から単離し、特に *Irf8* 遺伝子座に着目して、活性化エンハンサーの分布を 27 番リジンがアセチル化されたヒストン H3（H3K27ac）のクロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-seq）によって解析した。その結果、これまでに報告されていたいずれのエンハンサーよりも遠位である *Irf8* の転写開始点から 56 kb 下流に新規のエンハンサー領域が存在することを発見した。この領域は多能性造血前駆細胞の段階から活性化し始め、単核貪食細胞の前駆細胞へと分化が進むにつれて活性がさらに上昇していた（図 1）。

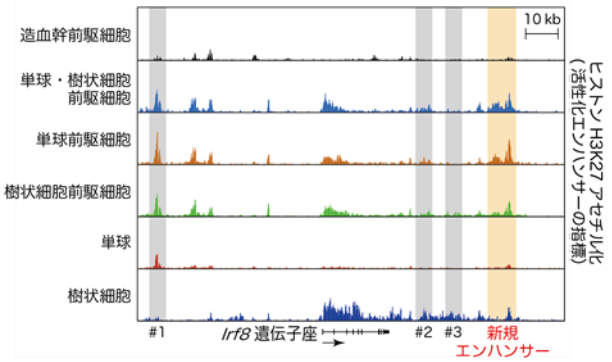


図 1. 単核貪食細胞の各分化段階での *Irf8* 遺伝子座の活性化エンハンサーの分布
既に報告されていた#1、#2、#3（灰色）のエンハンサーに加え、3'側に新規エンハンサー領域（オレンジ）を見出した。

2. 新規 *Irf8* エンハンサー領域の機能解析

この新たに見出したエンハンサー領域（*Irf8* ＋56 kb エンハンサー）の生体内での働きを調べるために、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（Δ＋56 kb マウス）を作製した。IRF8 は MPP の段階から発現を開始し、単核貪食細胞系の細胞において高発現するが、このエンハンサーを欠損すると、IRF8 の発現量は MPP から骨髄系のほぼ全ての分化段階で著明に低下し、CDP および cDC1 が消失した。これは *IRF8* 欠損マウスと同様の結果であった。しかし意外にも Ly6C 陽性単球については、*IRF8* 欠損マウスとは反対に、著明に増加した（図 2）。

3. 新規 *Irf8* エンハンサーを制御する上流転写因子の探索

この＋56 kb エンハンサーを制御する転写因子を探索するために、まず造血幹前駆細胞のオープンクロマチン領域を ATAC-seq によって解析した結果、＋56 kb エンハンサー領域は MPP の段階で初めてオープンになることが明らかになった。次に＋56 kb エンハンサー領域と同様の活性化パターンを示す領域をゲノム全体から選択して、モチーフ解析を行った結果、制御転写因子候補として PU.1 と RUNX–CBF が得られた。PU.1 はミエロイド分化における広範なエンハンサーへの作用が知られており、より特異的に単核貪食細胞分化を制御する転写因子として RUNX–CBF β に着目した［10］。RUNX–CBF の *Irf8* 発現、単核貪食細胞分化への影響を評価するために、樹状細胞の *in vitro* 分化系を用いて、*Cbfb* 遺伝子をノックダウンした前駆細胞の分化能を評価した。その結果、*Cbfb* の発現低下によって樹状細胞分化は前駆細胞の段階で障害され、*Irf8* 遺伝子の発現も著明に低下した。このことから、RUNX–CBF β が前駆細胞において *Irf8* 発現を正に制御することが明らかになった（図 3）。この作用が＋56 kb エンハンサーに対する直接的な影響かを評価するために、＋56 kb エンハンサー領域のレポーターアッセイを行なった結果、この領域は有意なエンハンサー活性を示した。さらに領域内の RUNX–CBF β 結合配列への変異導入により活性の低下が認められた。このこと

から、RUNX–CBF が＋56 kb エンハンサー領域への直接作用によって、造血前駆細胞における *Irf8* 遺伝子の発現を制御することが明らかになった。

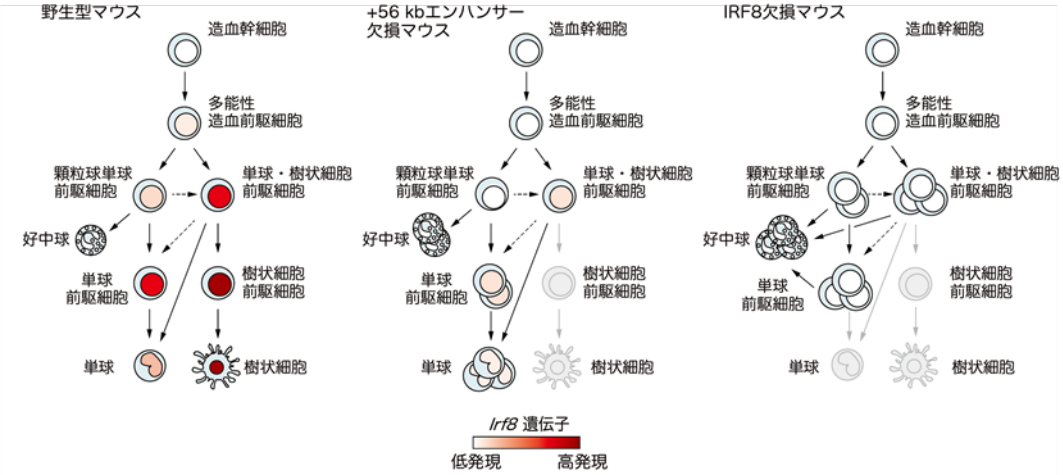


図2. *Irf8* ＋56 kbエンハンサー欠損マウスにおける骨髄系細胞分化の変化

野生型マウス（左）と比較して、*IRF8* 欠損マウス（右）では単球・樹状細胞への分化が障害され、その前駆細胞が蓄積した。それらの細胞も好中球へ分化するために著しい好中球の増加を認めた。さらに *Irf8* ＋56 kb エンハンサー欠損マウス（中央）では、*IRF8* 欠損マウスと同様に樹状細胞はその前駆細胞から産生が損なわれたが、*IRF8* 欠損マウスとは逆に単球が増加した。

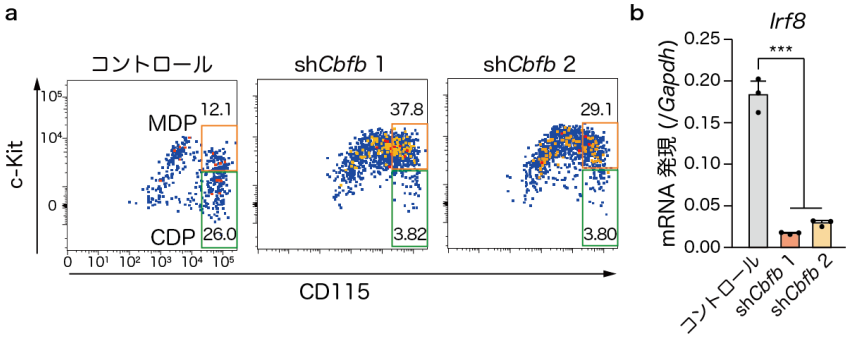


図3. Cbfbノックダウンによる樹状細胞への分化阻害

a) *Cbfb* shRNA 導入による樹状細胞前駆細胞の分化阻害。コントロール shRNA（左）、*Cbfb* shRNA（中央および右）の FACS 図。

b) *Irf8* 遺伝子の発現における *Cbfb* ノックダウンの影響。qRT-PCR によって評価した（mean±SD、n=3、* $p<0.001$、student's *t*-test）。

考　察

今回の研究結果から、生体内での単核貪食細胞分化では、複数ある *Irf8* エンハンサーはそれぞれ異なる分化段階や細胞系譜で作用することで、IRF8 発現のタイミングや量を精密に制御していることが明らかになった。そして、そのように調節される IRF8 の発現量が、好中球・単球・樹状細胞のいずれを産生するかの運命決定に極めて重要であることが明らかになった。このような細胞分化の運命決定メカニズムは、他の転写因子や細胞種でも見られる普遍的な仕組みであることが予想される。

また、ヒトにおいてIRF8の発現量や活性の低下は、*IRF8*遺伝子自身の変異や慢性骨髄性白血病の原因遺伝子*BCR-ABL*などによって引き起こされ、免疫不全や好中球増多症の原因となり得る［1］。加えて*Irf8*の上流転写因子であるRUNX–CBFβの遺伝子異常は、急性白血病などの血液がんの原因の一つとなることが知られている［10］。したがって、本研究の成果はこれらの病態解明・治療法の開発にも繋がると考えられる。

エンハンサーが遺伝子の発現制御に重要であることは広く認知されてきているが、詳細な分子機構にはまだ不明な点が多い。今後、*Irf8*遺伝子と複数のエンハンサー群がどのように相互作用して細胞分化に最適な遺伝子発現を導くかについてさらなる解析を進めることは、細胞分化の基本原理の解明に繋がると考える。

本研究の成果は、Nature Immunology誌に発表された［9］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学大学院医学研究科免疫学の村上紘一氏、佐々木悠博士、西山晃准教授、黒滝大翼講師、川瀬航氏、藩龍馬助教、横浜市立大学先端医科学研究センターの中林潤准教授、北里大学理学部生物科学科幹細胞講座の神﨑理子氏、関田洋一准教授、木村透教授、横浜市立大学大学院医学研究科幹細胞免疫制御内科の中島秀明教授、米国国立衛生研究所のKeikoOzato博士である。この場を借りて深謝する。また、研究費の支援を頂いた上原記念生命科学財団に感謝申し上げる。

文　献

1) Tamura T, Kurotaki D, Koizumi S. Regulation of myelopoiesis by the transcription factor IRF8. Int J Hematol. 2015 Apr;101(4): 342-51. doi: 10.1007/s12185-015-1761-9. Epub 2015 Mar 7. PMID: 25749660.

2) Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ban T, Ichino M, Sasaki H, Matsunaga S, Yoshinari M, Ryo A, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. IRF8 inhibits C/EBPα activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. Nat Commun. 2014 Sep 19; 5: 4978. doi: 10.1038/ncomms5978. PMID: 25236377.

3) Kurotaki D, Kawase W, Sasaki H, Nakabayashi J, Nishiyama A, Morse HC 3rd, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T. Epigenetic control of early dendritic cell lineage specification by the transcription factor IRF8 in mice. Blood. 2019 Apr 25;133(17):1803-1813. doi: 10.1182/blood-2018-06-857789. Epub 2019 Feb 22. PMID: 30796024; PMCID: PMC6484390.

4) Kurotaki D, Nakabayashi J, Nishiyama A, Sasaki H, Kawase W, Kaneko N, Ochiai K, Igarashi K, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T. Transcription Factor IRF8 Governs Enhancer Landscape Dynamics in Mononuclear Phagocyte Progenitors. Cell Rep. 2018 Mar 6;22(10):2628-2641. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.048. PMID: 29514092.

5) Durai V, Bagadia P, Granja JM, Satpathy AT, Kulkarni DH, Davidson JT 4th, Wu R, Patel SJ, Iwata A, Liu TT, Huang X, Briseño CG, Grajales-Reyes GE, Wöhner M, Tagoh H, Kee BL, Newberry RD, Busslinger M, Chang HY, Murphy TL, Murphy KM. Cryptic activation of an *Irf8* enhancer governs cDC1 fate specification. Nat Immunol. 2019 Sep;20(9):1161-1173. doi: 10.1038/s41590-019-0450-x. Epub 2019 Aug 12. PMID: 31406378; PMCID: PMC6707878.

6) Schönheit J, Kuhl C, Gebhardt ML, Klett FF, Riemke P, Scheller M, Huang G, Naumann R, Leutz A, Stocking C, Priller J, Andrade-Navarro MA, Rosenbauer F. PU.1 level-directed chromatin structure remodeling at the *Irf8* gene drives dendritic cell commitment. Cell Rep. 2013 May 30;3(5):1617-28. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.007. Epub 2013 Apr 25. PMID: 23623495.

7) Bagadia P, Huang X, Liu TT, Durai V, Grajales-Reyes GE, Nitschké M, Modrusan Z, Granja JM, Satpathy AT, Briseño CG, Gargaro M, Iwata A, Kim S, Chang HY, Shaw AS, Murphy TL, Murphy KM. An Nfil3-Zeb2-Id2 pathway imposes Irf8 enhancer switching during cDC1 development. Nat Immunol. 2019 Sep;20(9):1174-1185. doi: 10.1038/s41590-019-0449-3. Epub 2019 Aug 12. PMID: 31406377; PMCID: PMC6707889.

8) Grajales-Reyes GE, Iwata A, Albring J, Wu X, Tussiwand R, Kc W, Kretzer NM, Briseño CG, Durai V, Bagadia P, Haldar M, Schönheit J, Rosenbauer F, Murphy TL, Murphy KM. Batf3 maintains autoactivation of *Irf8* for commitment of a CD8α^+ conventional DC clonogenic progenitor. Nat Immunol. 2015 Jul;16(7):708-17. doi: 10.1038/ni.3197. Epub 2015 Jun 8. PMID: 26054719; PMCID: PMC4507574.

9) Murakami K, Sasaki H, Nishiyama A, Kurotaki D, Kawase W, Ban T, Nakabayashi J, Kanzaki S, Sekita Y, Nakajima H, Ozato K, Kimura T, Tamura T. A RUNX-CBFβ-driven enhancer directs the *Irf8* dose-dependent lineage choice between DCs and monocytes. Nat Immunol. 2021 Mar;22(3):301-311. doi: 10.1038/s41590-021-00871-y. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33603226.

10) Blyth K, Cameron ER, Neil JC. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. Nat Rev Cancer. 2005 May;5(5):376-87. doi: 10.1038/nrc1607. PMID: 15864279.