

エピゲノム制御による 免疫細胞の分化運命決定機構

東京理科大学 研究推進機構 生命医科学研究所 教授 い かわ 伊川 ともかつ 友活

はじめに

T細胞やB細胞はリンパ球と呼ばれ、生体防御に重要な役割を果たす。リンパ球を含む全ての免疫細胞は血液のもととなる造血幹細胞から作られる。造血幹細胞は骨髄中でT細胞へある程度運命づけられたあと、胸腺に移動しT細胞に分化・成熟する。一方、B細胞は骨髄で分化する。細胞の運命決定や運命維持が正常に行われるためには、適切な時期に適切な遺伝子セットを発現することが必要である。この遺伝子発現の制御に関わるのが「転写因子」と「エピジェネティック因子」である。転写因子は分化に必要な遺伝子の発現を正に制御すると同時に、不必要な遺伝子の発現を抑制する。一方、エピジェネティック因子は遺伝子発現状態を維持するのに重要であると考えられている。転写因子とエピジェネティック因子は互いに協調しながら、細胞の運命を決定し、その形質を維持する。転写因子の機能は様々な遺伝子改変動物や分子生物学的アプローチにより明らかとなっているのに対し、エピジェネティック因子による制御機構は不明な点が多い。我々は、エピジェネティック因子の一つであるポリコーム群 (PcG) タンパクに注目し、T細胞やB細胞の発生・分化における役割を明らかにしてきた。そこで、本稿では我々の研究成果を中心に、リンパ球の生成を司るエピジェネティック制御に関する最新の知見を概説したい。

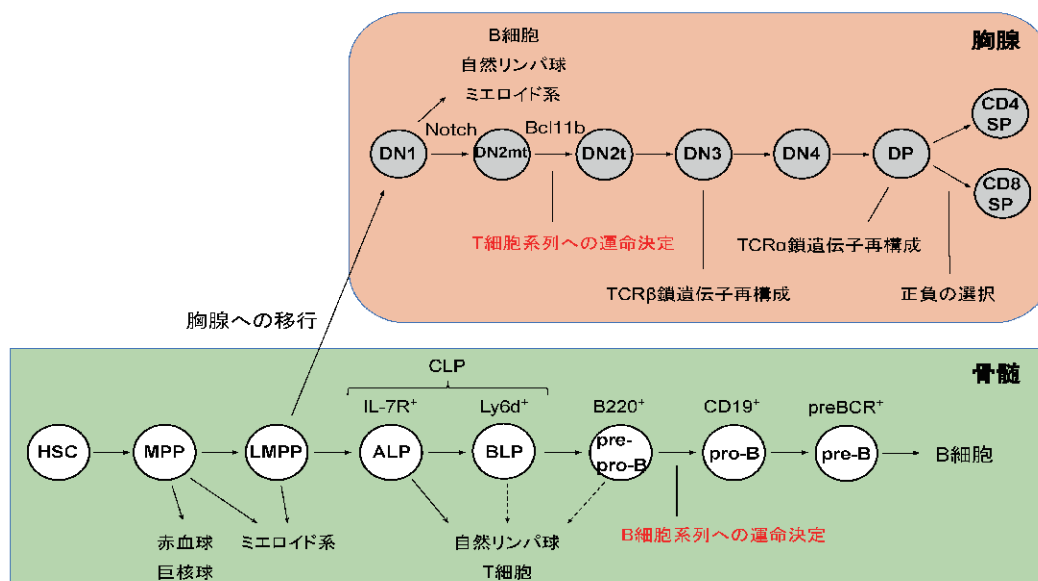
T細胞の分化過程

T細胞は胸腺において分化する。T細胞の分化経路は細胞表面のしるし（抗原マーカー）を用いて細かく分けられている。研究グループによって用いられるマーカーや前駆細胞の呼び方は若干違うが、一般的によく知られている分化過程は【図1】のようになる¹⁾。胸腺に移行する前駆細胞は諸説あるが、現在では主にリンパ系多能前駆細胞 (Lymphoid-primed multipotent progenitor: LMPP) と考えられている。LMPPは骨髄で生成され、T、Bリンパ球やミエロイド系細胞（顆粒球、

マクロファージなど）への分化能は保っているが、赤血球や巨核球への分化能を失っている。胸腺のT細胞はCD4とCD8によってCD4とCD8を発現しない細胞 (double negative: DN細胞)、CD4とCD8を両方発現する細胞 (double positive: DP細胞)、CD4だけを発現するCD4 single positive (SP) 細胞とCD8だけを発現するCD8SP細胞の4つの分画に分けられ、DN→DP→CD4SPあるいはCD8SPの順番に分化する。DN細胞はc-kitとCD25の発現で更にc-kit⁺CD25⁻ (DN1)、c-kit⁺CD25⁺ (DN2)、c-kit⁻CD25⁺ (DN3)、c-kit⁻CD25⁻ (DN4) の4つの分画に分けられ、DN1→DN2→DN3→DN4の順番で分化が進む。DN2細胞はさらにT細胞とミエロイド系細胞への分化能を持つDN2mt細胞とT細胞系列に運命づけられたDN2t細胞に分けられる。胸腺の最も未分化なDN1細胞はT細胞以外にも自然リンパ球やミエロイド系細胞への分化能を保っているが、胸腺上皮細胞からNotchシグナルを受けることにより、T細胞系列へ分化能が限定され、最終的にDN2t段階でT細胞系列へ運命決定される。この過程にはBcl11bという転写因子が重要であることが示されている。T細胞系列へ決定された前駆細胞はDN3およびDP段階においてT細胞受容体 (TCR) β 鎖およびTCR α 鎖の遺伝子再構成を行う。遺伝子再構成に成功しTCRを発現した細胞は正負の選択を経て、CD4SP（ヘルパーT細胞）、もしくはCD8SP（キラーT細胞）となる。

B細胞の分化過程

B細胞は抗体産生を司るリンパ球であり、成体では骨髄で分化する。造血幹細胞からB細胞への分化経路は、細胞の分化能・細胞表面マーカーの発現・免疫グロブリン遺伝子の再構成などにより詳細が明らかとなっている【図1】。造血系の全ての系列に分化する能力をもつ造血幹細胞 (hematopoietic stem cell; HSC) はまず自己複製能を失って多能前駆細胞 (multipotent progenitor; MPP) となり、ついで赤血球・巨核球への分化能を失ってリンパ系多能前駆細胞 (lym-



【図 1】リンパ球の分化経路

T 細胞および B 細胞の分化過程を示す。T 細胞は胸腺で、B 細胞は骨髄で生成される。HSC：造血幹細胞、MPP：多能前駆細胞、LMPP：リンパ系多能前駆細胞、CLP：共通リンパ系前駆細胞、ALP：全リンパ系前駆細胞、BLP：B リンパ系前駆細胞、pre-pro-B：プレプロ B 細胞、pro-B：プロ B 細胞、pre-B：プレ B 細胞、DN：ダブルネガティブ、DP：ダブルポジティブ、SP：シングルポジティブ、TCR：T 細胞受容体

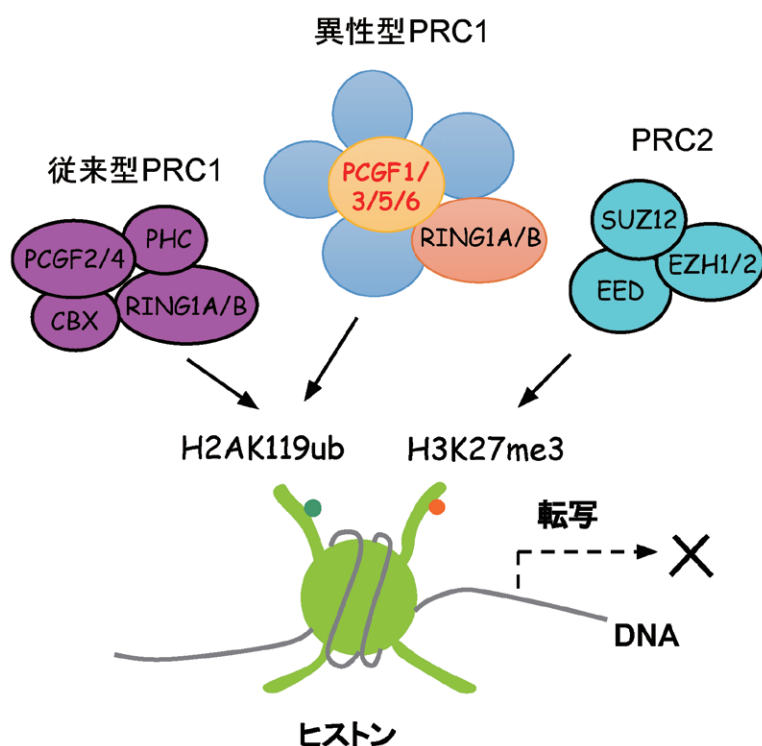
phoid-primed multipotent progenitor; LMPP) となる。この細胞がミエロイド系への分化能を失うと共通リンパ系前駆細胞 (common lymphoid progenitor; CLP) となり、T 細胞・B 細胞・自然リンパ球などのリンパ球系列のみに分化能が限定される。この CLP とよばれる細胞集団は細胞表面マーカー Ly6d の発現の有無により、すべてのリンパ球系への分化能を維持した亜集団 (All-lymphoid progenitor; ALP) と B 細胞系列に方向付けられた亜集団 (B-cell biased lymphoid progenitor; BLP) に区分される。ここから次の段階に移るのを機に細胞は汎 B 細胞マーカーである B220 (CD45R) を発現するようになり、「B 前駆細胞」と呼ばれる段階に入る。その最初のステップはプレプロ B (pre-pro-B) 細胞である。この段階で B 細胞以外への分化能力はほぼ失われるが、わずかに T 細胞などへの分化能を残している。B 細胞へと完全に運命が決定づけられるのは次のプロ B (pro-B) 細胞の段階である。pro-B 細胞以降、もうひとつの汎 B 細胞マーカーである CD19 が発現するようになり、免疫グロブリン重鎖 (heavy chain of immunoglobulin; IgH) の再構成など B 細胞を特徴付ける細胞の変化が始まる。以降、免疫グロブリン軽鎖 (light chain of immunoglobulin; IgL) 再構成や自己反応性クローンの排除、親和性成熟やクラススイッチといったいくつかの過程を経て、機能的に成熟した B 細胞が産生される。

ポリコーム群タンパクとリンパ球分化

PcG タンパクはショウジョウバエのホメオティック遺伝子の発現を抑制する遺伝子群として 1940 年代に同定された。PcG 遺伝子は哺乳動物を含む多くの生物種で保存されており、発生、分化、幹細胞の維持などに重要な役割を果たす²⁾。

PcG タンパクは主に Polycomb repressive complex (PRC) 1 と PRC2 の 2 つの複合体によって構成される【図 2】。PRC1 は CBX, PHC, PCGF2 (MEL18) もしくは PCGF4 (BMI-1), RING1A/B からなり、PRC2 は SUZ12, EED, EZH1/2 からなる。PRC1 はヒストン H2A の 119 番目のリジン (K119) のユビキチン化 (H2AK119ub) を、PRC2 はヒストン H3 の 27 番目のリジン (K27) のトリメチル化 (H3K27me3) を行うことにより転写を抑制すると考えられている。このように PRC1 および PRC2 が協調して分化に必要な遺伝子発現を抑制し、幹細胞の維持に関わる。

一方、生化学的解析により、RING1A/B は含まれるものの、従来型の PcG 複合体には含まれない異性型 PcG 複合体の存在が示されている³⁾。PRC1 は含まれる PCGF タンパク (PCGF1-6) により 6 種類 (PRC1.1-1.6) に分けられる。PCGF2, PCGF4 の形成する従来型 PRC1 と比べ、異性型 PRC1 と呼ばれる PCGF1, PCGF3, PCGF5, PCGF6 の形成する複合体の機能は不明である。



【図2】ポリコーム群タンパクによる遺伝子発現制御

ポリコーム群タンパクはPRC (Polycomb repressive complex) 1とPRC2の2つの複合体からなる。PRC1がヒストンタンパクのH2AK119ubを、PRC2がH3K27me3を行うことにより標的遺伝子の転写が阻害される。PRC1はPCGF2/4を含む従来型PRC1とPCGF1/3/5/6を含む異性型PRC1に分けられる。

PRC1あるいはPRC2を構成する因子の遺伝子欠損マウスの解析から、造血系におけるPcGタンパクの役割が明らかとなっている。従来型PRC1の構成要素であるPCGF4 (BMI-1) 欠損マウスの解析からPCGF4が造血幹細胞の維持に重要であることが示された⁴⁾。PCGF4は、細胞周期阻害タンパクであるINK4a (p16), ARF (p19) の発現を抑制することにより、造血幹細胞の自己複製を制御している。また、PCGF4はB細胞分化に必須の転写因子である、*Ebf1* や *Pax5* の遺伝子発現を抑制することにより、造血幹細胞の維持に関わることも示されている。H2AK119ubを媒介する酵素であるRING1AおよびRING1Bは機能的にそれぞれ補完すると考えられていたが、RING1A欠損マウスは目立った表現型がないのに対して、RING1Bを欠損した造血幹細胞はその増殖能や分化能に異常が見られた。また、胚性幹 (Embryonic Stem: ES) 細胞においてもRING1Bを欠損させるとH2AK119ubが著しく低下することから、RING1Bが主要なユビキチンリガーゼであると考えられた。

PRC2も造血系および免疫系細胞の生成に重要であることが示されている。EZH2欠損マウスではB細胞およびCD4T細胞の分化が異常であることが報告された。EZH1あるいはEZH2を造血幹細胞で欠損させ

ると、いずれも胎仔期の造血は正常であるが、成体の造血系に異常が認められることから、造血幹細胞の自己複製に重要であることが示唆されている。EEDやSUZ12を欠損させた造血幹細胞においても同様の異常が認められることから、PRC2は造血系細胞の生成に重要であることが示された。また、急性骨髄性白血病や急性リンパ性白血病など様々な白血病細胞においてEED, EZH2, SUZ12の変異が認められることから、PRC2はがん化にも関わっていることが示唆されている。

T細胞分化においてはPCGF2やPCGF4が胸腺のT細胞分化に重要であることが示されている。PCGF2欠損マウスでは胸腺細胞が正常マウスに比べて1/10に減少していた。この欠損マウスの胸腺ではT細胞分化の特定の段階での停止は認められなかったが、TCR遺伝子再構成前の増殖が特に抑制されていた。また、PCGF4欠損マウスにおいても同様にT前駆細胞の増殖阻害が認められた。PcGタンパクの標

的遺伝子の1つであるp19とPCGF4を両方欠損させると部分的に分化が回復することからPCGF4はp19の発現を抑制することにより、T細胞分化を促進していると考えられた。しかし、PCGF2, PCGF4いずれの欠損においてもPRC1の機能を完全に消失しているわけではないのでPRC1がT細胞分化をどのように制御しているのか詳細は不明であった。

PcGタンパクはT細胞の運命維持に必須である

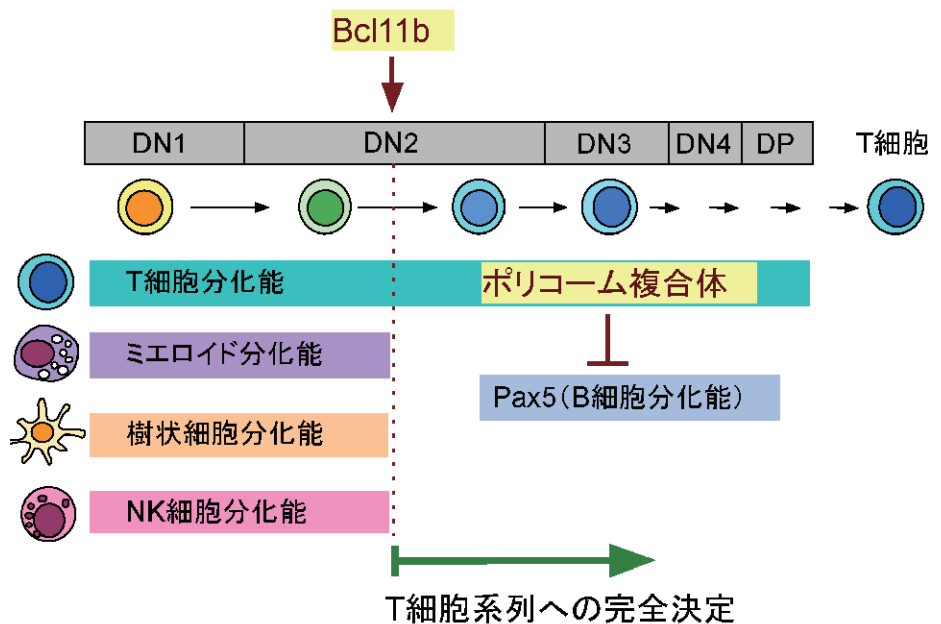
そこで我々は、PRC1のT細胞分化における役割を調べるために、T細胞特異的なRING1A/Bダブル欠損マウス (*LckCre-Ring1a^{-/-}Ring1b^{fl/fl}* マウス) を作製した。RING1A/B欠損マウスの胸腺細胞は正常マウスに比べて細胞数が1/20程度に激減していた。フローサイトメーター (FACS) によってT細胞分化を調べるとDP細胞およびSP細胞の割合が大きく減少し、ほとんどの細胞がDN段階で分化が停止していた。次に、PcGタンパクの標的遺伝子としてp16およびp19が示唆されているのでこれらのタンパクをコードする *Cdkn2a* 遺伝子座を欠損させたマウスとRING1A/B欠損マウスを交配した。このRING1A/B, CDKN2Aトリプル欠損マウスのT細胞分化は部分的に回復していた

が、完全には回復しなかった。このことは p16, p19 以外にも RING1A/B の標的遺伝子が存在することを示唆していた。マイクロアレイを用いて DN 細胞における遺伝子発現を網羅的に解析したところ、RING1A/B 欠損マウスにおいて *Blnk* や *Ebf1* などの B 細胞関連遺伝子の発現が上昇していた。このことから、RING1A/B は T 前駆細胞において B 細胞関連遺伝子の発現を制御していると考えられた。

RING1A/B を欠損した T 前駆細胞の分化能を調べるために、RING1A/B, CDKN2A 欠損マウスおよび正常マウスの胸腺の DN3 細胞をソーティ

ングし、放射線照射した免疫不全 (NOG) マウスに移植した。移植 6 週間後に脾臓、および骨髄を解析したところ、正常マウスの DN3 細胞からは脾臓においてヘルパー T 細胞およびキラー T 細胞が生成されていた。しかし、RING1A/B, CDKN2A 欠損マウスの DN3 細胞を移植したマウスからは T 細胞が全く生成されていなかった。このマウスの骨髄細胞を調べると、驚いたことに免疫グロブリン (IgM) 陽性の B 細胞が生成されていた。この B 細胞の mRNA 発現を調べると、*Ebf1*, *Pax5* など主な B 細胞関連遺伝子が正常な骨髄の B 細胞と同レベルで発現していた。さらにこの細胞は T 細胞に特異的に発現している、*Tcf1* や *Gata3* の発現を消失していた。このことから、T 前駆細胞に運命づけられた DN3 細胞が RING1A/B を欠損すると B 細胞に運命転換することが明らかとなった。

次に、RING1A/B の T 細胞分化における主な働きが B 細胞関連遺伝子プログラムを抑制することかどうかを調べるために、RING1A/B 欠損マウスと B 細胞分化のマスターレギュレーターである PAX5 の欠損マウスを交配し、RING1A/B, PAX5 トリプル欠損マウスを作製した。このマウスの胸腺を調べたところ、CD4-CD8 の FACS パターンは正常マウスとほぼ同じパターンを示した。また、 $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞を生成し、胸腺細胞数もほぼ同程度にまで回復していた。このことから、RING1A/B は T 細胞系列へ決定された T 前駆細胞段階において、*Pax5* を含めた B 細胞関連遺伝子



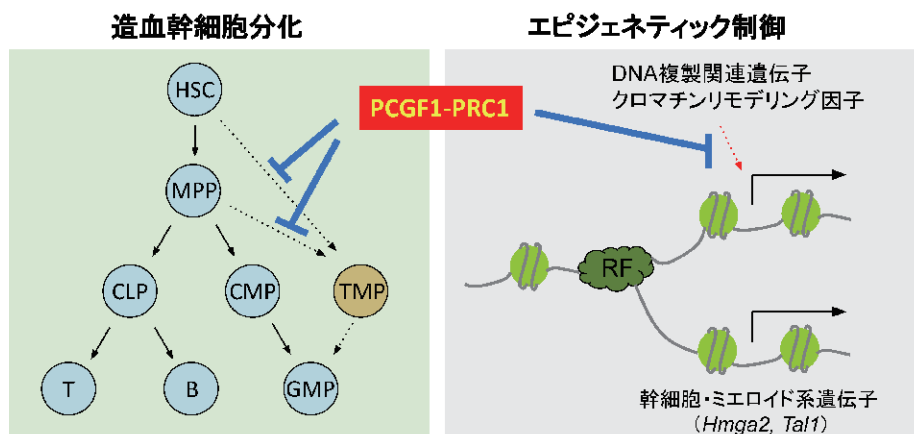
【図 3】ポリコム群タンパクによる T 細胞分化・運命制御機構

DN2 段階で T 細胞系列への運命決定が起こる。この過程には転写因子 Bcl11b が重要であることが示されている。T 細胞系列へ決定した T 前駆細胞はポリコム複合体によりその運命が維持される。ポリコム複合体は B 細胞分化に重要な Pax5 の発現を抑制する。

プログラムを抑制することにより T 細胞分化を促進していることが明らかとなった【図 3】⁵⁾。

異性型 PcG タンパク PCGF1 は造血幹細胞から B 細胞への運命制御に重要である

先述の通り、PRC1 は従来型 PRC1 と異性型 PRC1 に大別されるが、異性型 PRC1 の機能は不明な点が多い。そこで我々は、血液細胞特異的に PCGF1 を欠損するマウスを用いて、PCGF1 の造血幹・前駆細胞における役割を解析した。ERT2Cre-PCGF1^{fl/fl} マウスの骨髄細胞を放射性照射したマウスに移植し、タモキシフェンを用いて PCGF1 を造血系細胞特異的に欠損させたマウスを解析すると、骨髄における B 細胞分化が pre-pro-B 細胞段階から傷害され、ミエロイド系細胞が増加していた。このマウスの造血幹細胞には異常が認められなかったが、MPP, LMPP, CLP が減少する一方で、共通ミエロイド系前駆細胞 (CMP) や顆粒球・マクロファージ前駆細胞 (GMP) が増大していた。また、シングルセル RNA シーケンシング解析から、PCGF1 欠損血液前駆細胞のみに TMP (一過性ミエロイド前駆細胞) が検出された【図 4】。このことから、PCGF1 はリンパ球系・ミエロイド系細胞の運命決定に重要であることが示唆された⁶⁾。この分子メカニズムを解明するために、造血幹・前駆細胞における PcG タンパクの標的遺伝子を探索したところ、*Hmga2* や



【図 4】 PCGF1 による造血幹細胞分化制御機構

PCGF1-PRC1 はミエロイド系細胞への分化を抑制することにより、リンパ球の分化を促進する。PCGF1-PRC1 は DNA 複製関連遺伝子やクロマチンリモデリング因子と相互作用し、幹細胞系・ミエロイド系遺伝子の発現を抑制する。CMP：共通ミエロイド系前駆細胞、GMP：顆粒球・マクロファージ前駆細胞、TMP：一過性ミエロイド前駆細胞、RF：replication fork

Tal1 など幹細胞系・ミエロイド系遺伝子の発現を抑制していることが明らかとなった。興味深いことに、これらの標的遺伝子座では、RING1B の結合や H2AK119ub は正常であったが、H3K27me3 は低下していた。このことから、PCGF1-PRC1 は従来型 PRC1 とは異なるメカニズムで標的遺伝子の発現を制御していると考えられた。そこで、PCGF1 と相互作用するタンパクを液体クロマトグラフ質量分析装置を用いて解析したところ、MCM7 や RUVBL1/2 など DNA 複製やクロマチンのリモデリングに関わるタンパクが同定された。実際、PCGF1 欠損血液前駆細胞では、DNA 複製やヌクレオソーム形成に異常が認められた。したがって、PCGF1-PRC1 は従来型 PRC1 とは標的遺伝子やその発現制御機構が異なることが明らかとなった【図 4】⁶⁾。また、血液・免疫系の形成において従来型 PRC1 と異性型 PRC1 は大きな機能差があることを示唆している。現在、PCGF2/4 および PCGF1/3/5 を血液細胞特異的に欠損するマウスを用いて従来型 PRC1 と異性型 PRC1 の役割の違いを解析している。

おわりに

本稿では、われわれの研究成果を中心に、転写因子およびエピジェネティック因子による T 細胞および B 細胞の分化制御機構について概説した。これまで、各系列特異的な転写因子が細胞の分化運命制御に重要であることが示されてきたが、本研究によりこれまでどちらかと言えば細胞系列の特異性がないと考えられて

きたエピジェネティック因子が細胞の運命制御に深く関わっていることが示された。すなわち、PcG タンパクというたったひとつのエピジェネティック因子の変異によって免疫細胞の運命が転換することが世界で初めて明らかとなった。また、造血系において異性型 PRC1 は従来型 PRC1 とは違う機能を持つことも明らかとなった。しかし、PcG タンパクによる免疫細胞の分化制御機構は未だ不明な点が多い。例えば、標的遺伝子は PcG タンパクによりどのよう

に認識されるのか、また従来型 PRC1 と異性型 PRC1 はどのような機能差があるのかなど根本的な課題が残されている。今後、免疫細胞の分化や運命維持におけるエピジェネティック制御の詳細を明らかにすることで、PcG タンパクが関与する免疫不全や白血病など様々な疾患の分子機構の解明に結びつくことが期待できる。

【参考文献】

- 1) Ikawa T. Genetic and epigenetic control of early lymphocyte development. *Curr Top Microbiol.* 381: 1–20, 2014
- 2) Aloia L, Di Stefano B, Di Croce L. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development.* 2013; 140: 2525–34.
- 3) Gao Z, Zhang J, Bonasio R, Strino F, Sawai A, Parisi F, Kluger Y, Reinberg D. PCGF Homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell.* 45: 344–356. 2012
- 4) Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihlaja M, Weissman IL, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature.* 423: 302–5. 2003
- 5) Ikawa T, Masuda K, Endo TA, Isono K, Koseki Y, Nakagawa R, Kometani K, Takano J, Agata Y, Katsura Y, Kurosaki T, Vidal M, Koseki H and Kawamoto H. Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of B lineage program. *Genes Dev.* 30: 2475–2485. 2016
- 6) Takano J, Ito S, Dong Y, Sharif J, Nakajima-Takagi Y, Umeyama T, Han YW, Isono K, Kondo T, Iizuka-Y, Miyai T, Koseki Y, Ikegaya M, Saki-hara M, Bardwell VJ, Nakayama M, Ohara O, Hasegawa Y, Hashimoto K, Arner E, Klose RJ, Iwama A, Koseki H, and Ikawa T. PCGF1-PRC links chromatin repression with DNA replication during hematopoietic cell lineage commitment. *Nat Commun.* In press