

T細胞初期発生におけるガン遺伝子 PU.1 の発現抑制メカニズムの解明

細川裕之

東海大学 医学部 基礎医学系 生体防御学

【研究の背景】

T細胞は免疫システムの中で司令塔の役割を果たし、体内に侵入する全ての病原体を特異的に認識する抗原受容体レパートリーを持っている。そのレパートリーは理論上 1×10^8 個にも及ぶ。T細胞分化プログラムは骨髄に存在する前駆細胞が、胸腺に移入し胸腺微小環境から Notch シグナルを受け取ることでスタートする。その後、T前駆細胞は胸腺内で抗原受容体遺伝子の再構成を行い、莫大な多様性に富んだ抗原受容体を細胞表面に発現する。1つのT細胞は1つの抗原受容体しか発現しないことから、T細胞が 1×10^8 ものレパートリーを獲得するためには、T前駆細胞の数はそれ以上必要になる。その一方、骨髄から胸腺へ移入する前駆細胞の数は1日あたり10個程度である。Notchシグナルを受けたT前駆細胞は、胸腺内でT細胞抗原受容体の遺伝子再構成を行う前に十分な前駆細胞数を確保するために、7~10日間激しく増殖する。この激しい増殖を制御する転写因子が PU.1 である。PU.1 は ETS ファミリーに属する転写因子で、様々な血球細胞の発生や機能に重要な役割を果たす。T細胞系列においては、最も初期のT前駆細胞で高発現するが、T細胞抗原受容体の遺伝子再構成が起きる直前に、その発現がシャットオフされる。成熟T細胞における PU.1 の脱抑制はT細胞急性リンパ性白血病の原因となることが報告されており、T細胞において PU.1 の発現を適切に抑制することは、その恒常性の維持に極めて重要である。

【目 的】

申請者は、PU.1 会合分子のプロテオミクス解析や PU.1 および PU.1 会合分子の ChIP-seq 解析を行うことで、PU.1 がどのような分子メカニズムでT前駆細胞の増殖を制御しているか明らかにしてきた。しかし、PU.1 の発現がどのようにT細胞抗原受容体の遺伝子再構成が起こる直前に、正しいタイミングで抑制されるのかは明らかにされていない。本研究では、Notchシグナルによって誘導される転写因子 GATA3 と Runx1 に着目し、PU.1 が発生段階特異的に発現抑制される分子メカニズムの解明を目的とした。

【方 法】

申請者は、Cas9 を恒常的に発現するマウスの骨髄から精製した造血幹細胞を、Notch リガンドを発現するストローマ細胞上で培養し、T細胞の初期発生を *in vitro* で再現する方法と、レトロウイルスを用いてガイド RNA を発現させる方法を組み合わせる事で、発生段階特異的にターゲット遺伝子や特定のゲノム領域を欠失させる方法を独自に確立した。そこで本研究では、GATA3 と Runx1 が発生段階特異的に結合する PU.1 遺伝子座のゲノム領域がサイレンサーとして働くか、CRISPR/Cas9 システムにより細胞レベルで解析した。さらに、発生段階特異的なサイレンサーと考えられるゲノム領域には、3つの Runx モチーフと1つの GATA モチーフが存在していた。そこで、それぞれのモチーフに直接変異を導入したときの PU.1 の発現量について検討を行った。これらの解析から、GATA3 と Runx1 によって制御されている発生段階特異的なサイレンサー候補領域の PU.1 発現制御における生理的な役割の解明を試みた。

【結 果】

はじめに、T 細胞の初期発生を *in vitro* で再現する方法とレトロウイルスにより遺伝子導入を組み合わせることで PU.1 の発現に対する転写因子 GATA3 と Runx1 の過剰発現の影響を検討した。その結果、胸腺移入直後の PU.1 を高発現している T 前駆細胞では、GATA3 および Runx1 を過剰発現することで PU.1 の発現が強く抑制されることがわかった。反対に、PU.1 の発現が抑制された抗原受容体の遺伝子再構成直前の細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いてステージ特異的に GATA3 および Runx1 をノックアウトすることで、PU.1 の発現が脱抑制されることを明らかにした。さらに、胸腺移入直後と遺伝子再構成直前の T 前駆細胞を用いて GATA3 および Runx1 の ChIP シークエンス解析を行い、遺伝子再構成直前の細胞に特異的な GATA3 および Runx1 の結合シグナルを PU.1 遺伝子のイントロン領域に見出した。そこで、GATA3 および Runx1 が発生段階特異的に結合する PU.1 遺伝子座のイントロン領域を細胞レベルで欠失、または Runx および GATA モチーフに point mutation を導入した時の PU.1 の発現レベルを検討すると、胸腺移入直後の T 前駆細胞では PU.1 の発現に変化はなかったが、遺伝子再構成直前の T 前駆細胞において特異的に PU.1 の脱抑制が観察された (Hosokawa et al., *J Exp Med*, 2021)。

【考 察】

本研究により、GATA3 および Runx1 が発生段階特異的に PU.1 遺伝子座のイントロン領域に結合することで、PU.1 の発現抑制のタイミングをコントロールしている事が明らかにされた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

PU.1 は様々な血球細胞の発生や機能を制御する転写因子で、マクロファージや樹状細胞、顆粒球、赤芽球前駆細胞、B 細胞、T 前駆細胞において細胞系列特異的なターゲット遺伝子の発現を制御する。PU.1 の発現量は血球細胞の系列や、発生段階によって厳密に制御されており、PU.1 発現制御機構の破綻が様々なタイプの白血病の原因となることから、PU.1 の発現制御および発現量をコントロールする分子機構の解明や、その制御法の開発は生命科学における重要課題の一つである。本研究により、T 前駆細胞における発生段階特異的な PU.1 の発現抑制メカニズムの一端が明らかにされた。今後、PU.1 発現制御法に関する分子メカニズムに基づいた新たなコンセプトの提示が期待される。

【参考・引用文献】

Hosokawa H*, Koizumi M, Masuhara K, Romero-Wolf M, Tanaka T, Nakayama T and Rothenberg EV*. :Stage-specific action of Runx1 and GATA3 controls silencing of PU.1 expression in mouse pro-T cells. *J Exp Med*. 218(8): e20202648 (2021) *Co-corresponding authors