

# 「RUNX 転写因子を中心とした転写制御ネットワークによる T 細胞の運命決定とその破綻による T-ALL 発症メカニズムの解明」

東海大学 医学部 基礎医学系 生体防御学 准教授  
細川 裕之

## 要旨

私たちの体を形成する 30 兆を超える細胞は 1 つの受精卵に由来し、200 種類以上の細胞からなると言われている。幹細胞から機能分化した細胞系列を作り出す分子機構の解明は、生命現象を理解するための根幹に位置する極めて重要な研究課題と言える。多くの細胞系列の運命決定は、系列特異的なマスター転写因子によって制御されると考えられている。しかし、我々の最近の研究結果から、発生段階によって発現量の変化しない転写因子が、発生段階特異的なゲノム領域への結合を介して、ターゲット遺伝子をダイナミックに変化させる事で T 細胞の運命決定をコントロールしていることが分かってきた。本研究では、発現量の変化しない転写因子が発生段階特異的な機能を発揮する分子メカニズムをオミクス手法を用いて解明すると共に、その機能破綻によって誘導される T 細胞の腫瘍化 (T-ALL の発症) を制御する分子メカニズムに基づいた新規治療戦略の創出を目指した。

## 背景・目的

骨髄に存在するリンパ球前駆細胞 (Lymphoid progenitor; LP) が胸腺へ移入し Notch シグナルを受け取ることで T 細胞分化プログラムがスタートする。T 前駆細胞はいくつかの発生段階を経て、成熟 T 細胞へと分化する (図 1)。T 細胞の初期発生において多くの転写因子の発現プロファイルがダイナミックに変化するが、特定のマスター転写因子は存在しないと考えられている<sup>(1)</sup>。RUNX 転写因子は LP から成熟 T 細胞に至るまで恒常的に発現し、各発生段階でステージ特異的な役割を果たすことがその遺伝子欠損マウスの解析から示唆されていた。我々は、後述する Cas9 発現 LP 細胞株などを用いて、T 前駆細胞において発生段階特異的、且つ acute に RUNX 機能欠損を誘導する方法を独自に確立し、これまで解析が不可能であった、T 前駆細胞における RUNX の機能欠損が発生段階特異的な転写制御ネットワークの破綻を誘導し、T 細胞分化が障害される事を明らかにした<sup>(2)</sup>。さらに我々は、転写因子複合体のプロテオミクス解析を手がかりにマルチオミクス解析を行うことで、T 細胞の初期発生を制御する転写因子群の作用機序について明らかにしてきた。これらの解析から、発現量の変化しない RUNX 転写因子が、様々な転写因子群と会合し、DNA 結合サイトをダイナミックに変化させることで、発生段階特異的な機能を発揮していることを明らかにした<sup>(1-4)</sup>。すなわち、RUNX 転写因子は特定の DNA 配

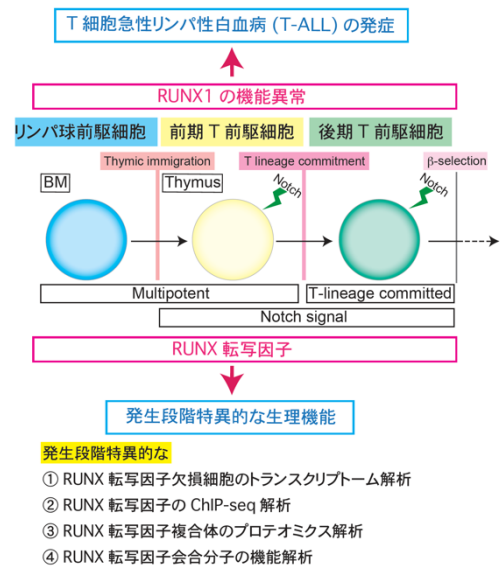


図 1、本研究の概要

列を直接認識して結合する転写因子であるにもかかわらず、形成するタンパク質複合体によってゲノム上の結合領域をダイナミックに変化させ、T 細胞の初期発生に必須の役割を担っていることを明らかにした。これらの研究成果から、新しい遺伝子発現制御メカニズムとして、転写因子は直接 DNA に結合し遺伝子発現を制御するだけでなく、複合体構成分子を別の複合体から奪い取ることによって、直接的な DNA 結合を介さずに遺伝子発現をコントロールする、という新しいコンセプト (co-factor redeployment model) を提示した<sup>(1)</sup>。図 2 に示すように、このモデルでは、転写因子 B はコファクター C を奪い取ることによって直接的な DNA 結合を介さずに遺伝子 X の発現を抑制する。さらに、転写因子 A とコファクター C の発現量は変化しないが、発生段階特異的な機能を果たすことになる。このように、転写因子複合体の組み換えによる発現量の変化しない分子群のゲノム上の再配置が細胞系列決定の普遍的なメカニズムであると考えている。例えば、このコンセプトを iPS 細胞に当てはめると、山中 4 因子がほぼ全ての細胞の形質をリセットするメカニズムを容易に説明しうる。このように、co-factor redeployment model は細胞系列決定の分子メカニズムの解明に大きく貢献する可能性を秘めている。さらに、様々な細胞系列決定機構の破綻と腫瘍化などの疾患が、co-factor redeployment の機能不全によって引き起こされることが想定され、これまで原因が不明であった様々な疾患の原因究明に貢献することが期待される。

T 細胞の初期発生において RUNX 転写因子は、転写因子 A とコファクター C の役割を同時に担う極めてユニークな転写因子であると考えられる。そこで本研究では、Notch シグナル依存的に誘導される T 細胞の初期発生において、発現量の変化しない RUNX 転写因子のゲノム上の再配置がどのように制御されているのか、特に発生段階特異的な RUNX 転写因子複合体の再構築に着目し、RUNX 転写因子を中心とした転写制御ネットワークが生理的な T 細胞の運命決定を制御する分子機構の統合的な理解を試みた。

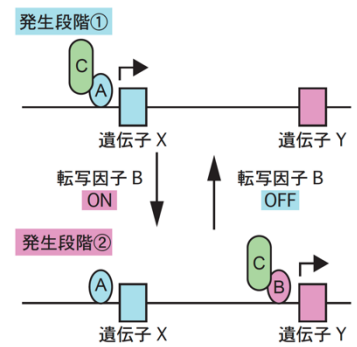


図 2. co-factor redeployment model

## 方法

T 細胞の初期発生を *in vitro* で再現する方法として、Notch リガンドを発現させたストローマ細胞とリンパ球前駆細胞を共培養する方法が広く用いられている。この方法の問題点として、マウスの生体内にリンパ球前駆細胞は極わずかしが存在せず、また、極めてヘテロな細胞集団である事が挙げられる。我々はこの問題を解決するために、B 細胞分化のマスター転写因子である EBF1 を欠損したリンパ球前駆細胞を B 細胞分化条件下で培養することにより、T 細胞分化能を保持したリンパ球前駆細胞株を樹立することに成功した<sup>(5)</sup>。この細胞はストローマ細胞上でサイトカインと共に培養すると容易に増殖し、Notch シグナルを誘導することで生理的な T 細胞の初期発生を *in vitro* で再現することが出来るだけでなく、リンパ球欠損マウスに移入することで *in vivo* において機能的な成熟 T 細胞へ分化する能力を有している。この細胞株を用いて均一な性質を持ったリンパ球前駆細胞や T 前駆細胞を *in vitro* で増殖させることで、大量の細胞を必要とするクロマチン免疫沈降や、生化学的にタンパク質複合体を精製することが可能になった。さらに、Cas9 を全身性に発現するマウスからリンパ球前駆細胞株 (Cas9-LP 株) を確立し、レトロウイルスによる sgRNA の導入により発生段階特異的に標的遺伝子をノックアウトできるシステムを構築した<sup>(6)</sup>。そこで本研究では Cas9 発現 LP 株を用いて、T 細胞の初期発生におけるステージ特異的な、①RUNX 転写因子欠損細胞のトランスクリプトーム解析、②RUNX 転写因子の結合するゲノム領

域の網羅的解析 (ChIP-seq 解析)、③RUNX 転写因子複合体のプロテオミクス解析、④発生段階特異的な RUNX 会合分子の機能解析を行った (図 1)。

## 結果

我々は、Cas9 発現 LP 細胞を Notch リガンドを発現するストローマ細胞上で培養する事で、均一な性質を持った LP から発生段階の異なる T 前駆細胞を大量培養する方法を確立した。Notch シグナルを受けた T 前駆細胞は 3 日間ほど多能性を有した前期 T 前駆細胞にとどまり、同じ培養をさらに 7 日間 (合計 10 日間) 続けると全ての細胞が T 細胞への運命決定がなされた後期 T 前駆細胞へ移行する (図 1)。この培養系にレトロウイルスによる sgRNA や cDNA の導入を組み合わせることで、LP や前期および後期 T 前駆細胞においてステージ特異的、且つ acute (3 日以内) に RUNX 欠損や変異型 RUNX1 の影響を解析する実験系を独自に確立した。本研究において、この実験系を用いてリンパ球前駆細胞、前期および後期 T 前駆細胞を用いた RUNX1 の ChIP-seq 及び、RUNX 機能欠損細胞のトランスクリプトーム解析を行い、多くの発生段階特異的な RUNX 結合ゲノム領域と RUNX ターゲット遺伝子を同定した (図 3)。さらに、Myc-および Flag-tag を付加した RUNX1 発現レトロウイルスベクターを作製し、リン

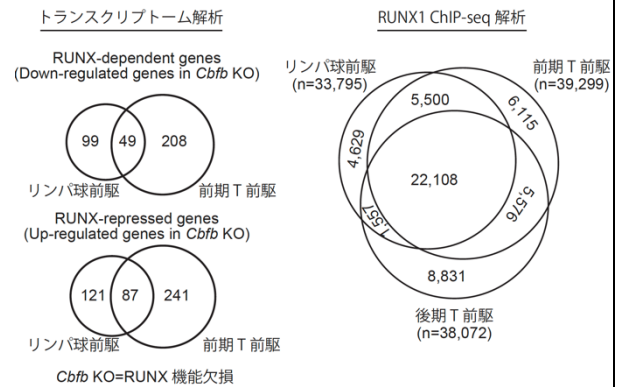


図 3、T 前駆細胞における発生段階特異的な RUNX 転写因子

パ球前駆細胞においてステージ特異的、且つ acute (3 日以内) に RUNX 欠損や変異型 RUNX1 の影響を解析する実験系を独自に確立した。本研究において、この実験系を用いてリンパ球前駆細胞、前期および後期 T 前駆細胞を用いた RUNX1 の ChIP-seq 及び、RUNX 機能欠損細胞のトランスクリプトーム解析を行い、多くの発生段階特異的な RUNX 結合ゲノム領域と RUNX ターゲット遺伝子を同定した (図 3)。さらに、Myc-および Flag-tag を付加した RUNX1 発現レトロウイルスベクターを作製し、リンパ球前駆細胞および、前期、後期 T 前駆細胞に発現させ、これらの細胞を用いて two-step アフィニティー精製、および質量分析を行うことで、ステージ特異的な RUNX1 複合体の網羅的な同定を行った。RUNX1 の過剰発現はリンパ球前駆細胞や T 前駆細胞に細胞死を誘導する。そこで、Myc-Flag-RUNX1 に ERT2 タンパク質をフュージョンし、タモキシフェン依存的に核移行するシステムを構築した (図 4A)。このシステムにより、タグ付きの RUNX1 をタモキシフェン依存的に核移行させ、細胞死を誘導する前に発生段階特異的な RUNX1 複合体の精製および質量分析を行い、多くの発生段階特異的な RUNX1 会合分子と、いくつかの発生段階特異的な RUNX1 の翻訳後修飾の同定に成功した (図 4B)。現在、ステージ特異的な RUNX1 会合分子、RUNX1 結合ゲノム領域、RUNX ターゲット遺伝子の情報を統合的に解析し、RUNX1 が発生段階特異的な機能を発揮する分子メカニズムの解明に向けた実験を行っている。

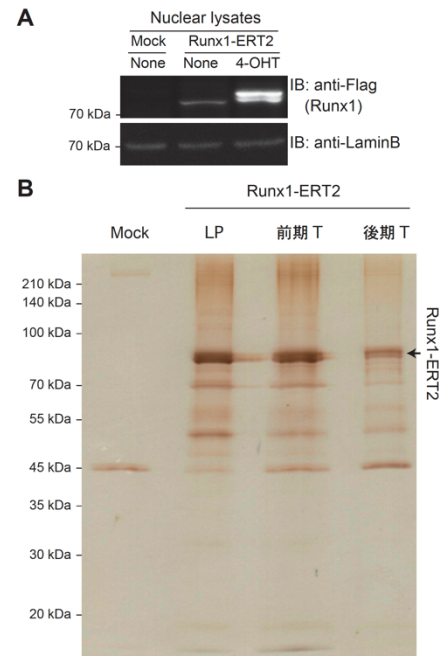


図 4、タモキシフェン依存的な RUNX1 の核移行と発生段階特異的な Runx1 タンパク質複合体の精製

## 考察

T 細胞急性リンパ性白血病 (T-ALL) は、未熟な T 前駆細胞が過剰に増殖する悪性腫瘍である。RUNX1 は

特に悪性度の高い T-ALL を引き起こす最も主要な原因遺伝子のひとつとして知られている。T-ALL 患者における RUNX1 遺伝子の体細胞変異は、DNA 結合ドメインとタンパク質相互作用に関わる機能ドメインに集中しており、これらの変異型 RUNX1 はドミナントネガティブ体として働き、RUNX 転写因子の生理的な機能の一部を破綻させることで腫瘍化を誘導すると推測されているが、その分子メカニズムは不明である。本研究では、T 細胞の初期発生における生理的な RUNX 転写因子の作用機序について解析したが、今後は、患者変異型 RUNX1 が単純な機能欠損や複合体形成不全を起こすだけでなく、野生型 RUNX1 が形成する発生段階特異的な転写因子複合体の再構築とゲノム上の再配置 (functional conversion) を積極的に阻害することで T 前駆細胞の腫瘍化を誘導するという、新しいメカニズムによる腫瘍化の可能性を視野に入れ機能解析を行う予定である。さらに、その異常をコントロールする事で T 前駆細胞の腫瘍化を抑制することが出来るか検討し、将来的には T-ALL の発症メカニズムに基づいた新規治療戦略の創出を目指す。

### 共同研究者

該当なし

### 引用論文

1. Hosokawa H and Rothenberg EV. How transcription factors drive choice of T cell fate. *Nat Rev Immunol.* 2021. 21(3):162-176
2. Shin B\*, Hosokawa H\*, Romero-Wolf M, et al. RUNX1 and RUNX3 drive progenitor to T-lineage transcriptome conversion in mouse T cell commitment via dynamic genomic site switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. 118(4):e2019655118 \*Co-first authors
3. Hosokawa H, Ungerback J, Wang X, et al. Transcription factor PU.1 represses and activates gene expression in early T cells by redirecting partner transcription factor binding. *Immunity.* 2018. 48(6):1119-1134
4. Hosokawa H, Romero-Wolf M, Yui MA, et al. Bcl11b sets pro T cell fate by site specific cofactor recruitment and by repressing Id2 and Zbtb16. *Nat Immunol.* 2018. 19(12):1427-1440
5. Hirano K\*, Hosokawa H\*, Koizumi M, et al. LMO2 is essential to maintain the ability of progenitors to differentiate into T-cell lineage in mice. *eLife.* 2021. 10:e68227 \*Co-first authors
6. Koizumi M, Kama Y, Hirano K, et al. Transcription factor, Zbtb1, interacts with Lmo2 and maintains the T-lineage differentiation capacity of lymphoid progenitor cells. *J Biol Chem.* 2022. 298(11):102506

### 助成研究に関連した発表論文

該当なし