

60. 自然免疫応答を司る三次元クロマチン構造の機能解析

黒滝 大翼

熊本大学 国際先端医学研究機構 免疫ゲノム構造学研究室

Key words : 自然免疫細胞, 樹状細胞, クロマチン高次構造, 遺伝子発現制御, 細胞分化

緒言

古典的樹状細胞 (DC) は、自然免疫および獲得免疫の誘導に不可欠である。DC は病原体やダメージ関連分子パターン等を認識し、自然免疫系を活性化するサイトカイン・ケモカインなどの分子を産生する。また、抗原提示を通じて、ナイーブ T 細胞をヘルパー T 細胞や細胞傷害性 T 細胞に分化誘導する。DC には主に二種類の亜集団が存在し、DC1 は結核菌やウイルス等の細胞内病原体に対する宿主防御に必須であるのに対し、DC2 は細胞外細菌、寄生虫、真菌等に対する免疫応答に必要である。DC は骨髄造血幹細胞から中間の前駆細胞を経て分化する。FLT3 受容体を発現する前駆細胞集団が DC の系譜への分化能を有する。マウスの造血系において最も上流に位置する FLT3 発現前駆細胞集団はリンパ球系多能性前駆細胞 (lymphoid primed multipotent progenitor : LMPP) である。LMPP は MDP、CDP、プレ DC へと分化する。プレ DC はその後脾臓などの末梢組織に移動し、そこで DC1 や DC2 へと分化する。

間期の哺乳類細胞において、DNA は核内コンパートメント、TAD、プロモーター・エンハンサー相互作用などのクロマチン高次構造を形成する。Hi-C は全ゲノム規模での三次元クロマチン構造を解析する技術であり、Hi-C によりゲノムがメガベーススケールの活性化型の A コンパートメントと不活性化型の B コンパートメントに分類されることがわかった。A コンパートメントは、ヒストン H3 リジン 27 アセチル化 (H3K27ac) などの活性化型ヒストン修飾を持つゲノム領域が含まれ、核内部空間や核スペckルに局在している。B コンパートメントは、抑制的ヒストン修飾を持つクロマチンから構成され、核膜近傍や核小体に局在している。同じコンパートメント (すなわち A あるいは B) にあるゲノム領域は互いに相互作用し、反対のコンパートメントの遺伝子座は反発する傾向がある。最近の知見によると、コンパートメントは、相分離と同様のメカニズムによって、類似した分子特性を持つクロマチンが会合することによって形成される可能性が示されている。TAD はゲノム局所的に会合したクロマチンドメイン構造であり、DNA に結合した CTCF とリング状のコヒーシ複合体を介したループの押し出しによって形成される。TAD は、エンハンサー・プロモーター相互作用を同じ TAD 内の遺伝子に制限するインシュレーターとして機能することが示唆されてきた。しかし、急速な CTCF やコヒーシンの除去は、必ずしもこの仮説を支持しない。エンハンサー・プロモーター相互作用はコヒーシン、メディエーター複合体、転写因子などに仲介される可能性がある。このようにクロマチン高次構造形成の分子基盤は徐々に明らかにされつつあるが、遺伝子発現制御におけるこれら構造の機能はまだ解明されていない。

これまでに DC の分化や活性化に伴うクロマチン高次構造形成についての知見は得られていない。本研究では、LMPP、MDP、CDP、DC1、DC2 を含む DC 系譜細胞集団において Hi-C を行った。DC 特異的遺伝子座を含むゲノム領域では、DC 特異的 TAD の形成に先んじて、A コンパートメントへのシフトが見られた。また、DC 前駆細胞では IRF8 が B から A へのコンパートメントへの変化を促進することもわかった。さらに、感染誘導性遺伝子座を含むゲノム領域のクロマチン高次構造は、刺激を受けていない DC においてすでに確立されていた。このように、クロマチン高次構造の形成は、DC 特異的な遺伝子発現パターンの確立と密接に関係していることが示された [1]。現在、DC において形成されたクロマチン高次構造が感染誘導性遺伝子の発現誘導に関与するかについて検討しており、少なくとも一部の炎症関連遺伝子群の発現制御に影響するとの予備検討結果を得ている。

方法

1. マウス

C57BL/6 背景雄の 8 週齢から 10 週齢の野生型および *Irf8*^{-/-}マウスを用いた。

2. *Toxoplasma gondii* 感染

T. gondii (Pru 株) は、Human Foreskin Fibroblast を用いて維持した。10⁴個の *T. gondii* タキゾイトをリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、マウスに腹腔内接種した。

3. 細胞の単離

骨髄細胞は大腿骨と脛骨を 10%FBS 含有 RPMI1640 で洗浄することにより得た。脾細胞は Liberase と DNase I で処理することにより得た。骨髄前駆細胞を分離するために、lineage marker 陰性 (Lin⁻) 細胞を Lineage Cell Depletion Kit を用いて濃縮した。Lin⁻細胞を蛍光標識抗体で染色した後、FACS Aria II を用いてフローサイトメトリー解析を行った。DC1 および DC2 はそれぞれ CD8⁺および CD4⁺ DC 分離キットを用いて磁気ビーズを用いて分離した。FACS と磁気ビーズを用いた細胞集団の純度 95%以上であった。

4. Hi-C

単離した細胞をホルムアルデヒドで固定した。核を溶解バッファーで単離し、37°C で Dpn II で消化した。DNA の突出末端を、Klenow DNA ポリメラーゼを用いてビオチン標識 dATP を fill-in した。サンプルを T4 DNA Ligase で 16°C で処理した。ライゲーションした DNA をフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコールを用いて精製し、Covaris ME220 を用いてせん断した。ビオチン標識 DNA 断片を濃縮するために、ストレプトアビジン C1 ビーズを用いた。Hi-C ライブラリーを作製するために、KAPA hyper prep kit を使用した。各 Hi-C ライブラリーは Illumina HiSeq または NextSeq 500 でシーケンスした。

5. Hi-C データ解析

Hi-C データの初期処理は、Homer ソフトウェアのウェブサイトの指示に従った。核内コンパートメントを同定するために、Homer runHiCpca.pl モジュールを用いて Hi-C データの主成分分析を行った。TAD は Juicer Arrowhead アルゴリズムを用いて同定した。LMPP、MDP、CDP、DC1、および DC2 における TAD は、Homer merge2Dbed.pl モジュールを用いてユニークな TAD の共通セットにマージした。

結果

1. DC 分化の過程において活性化型コンパートメントのリモデリングは遺伝子発現に先行する

DC 分化過程におけるクロマチン高次構造変化を理解するために、マウスから単離した LMPP、MDP、CDP、DC1、DC2 に対して Hi-C を行った (図 1a)。Hi-C データを用いて核内コンパートメントと TAD を観察することができた。DC 分化に伴うコンパートメントの変化を理解するために、マウスゲノムを 25 kb のビンに分割し、核内コンパートメントの PC1 値を算出した後、k-means クラスタリングを行った (図 1b)。DC 分化の過程において、ゲノムの大部分は一貫して同じコンパートメントに存在し、33.7%が A コンパートメントであり (CL3)、51.3%が B コンパートメント (CL4 と CL5) であった。その一方で、ゲノムの 15.0%がコンパートメントスイッチを起こした。LMPP から DC への分化に伴って、CL1 は B から A へと変化し、CL2 の領域は A から B へと変化した。コンパートメント、クロマチンの活性化、遺伝子発現の時間的關係を調べるために、Hi-C、H3K27ac クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq)、RNA シーケンス (RNA-seq) データの統合解析を行った。CL1 (B-to-A) 領域では、MDP の段階から H3K27ac が蓄積し、次いで CDP において PC1 値が増加した。成熟

DC の段階において、CL1 領域に関連する遺伝子の RNA 発現が増加した (図 1c)。以上のデータは、エンハンサーの活性化の後に A へのコンパートメント化が生じ、最終的に DC 特異的遺伝子の発現誘導につながることを示している。

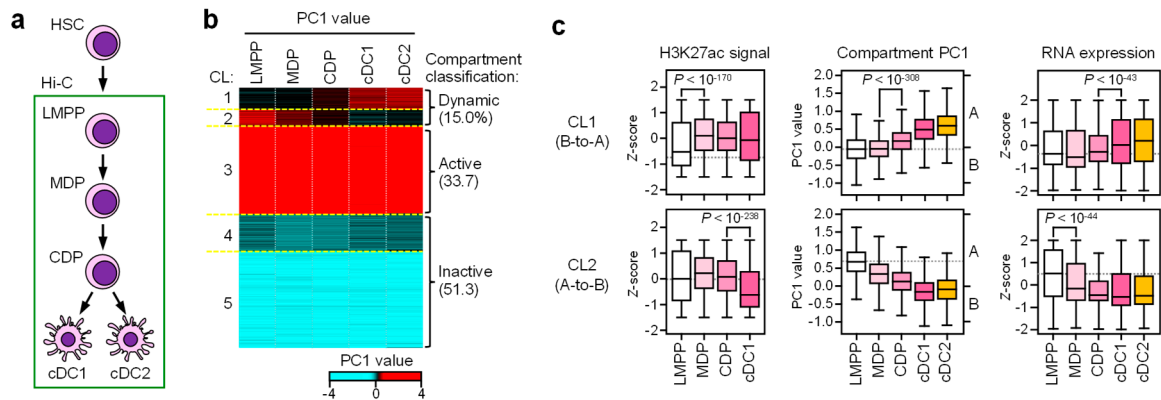


図 1. DC 分化における核内コンパートメント動態

- DC の分化モデル。
- DC 分化過程における核内コンパートメントの変化をゲノムワイドに評価。マウスのゲノムを 25 kb のビンに細分化し、103,531 の領域を PC1 値計算の対象とした。k-means 法を用いてゲノム領域を 5 つにクラスタリングした。赤は A コンパートメント、青は B コンパートメントを示す。
- CL1 または CL2 ゲノム領域における H3K27ac レベル、コンパートメント PC1 値、および遺伝子発現レベルの動態。統計的有意性の算出には両側 Student の t 検定を用いた。

2. DC 特異的 TAD 形成は分化後期に起こる

次に、DC 分化過程における TAD 内相互作用の変化を解析した。それぞれの細胞種において同定した TAD を統合することで、合計 7,311 個のユニークな TAD が同定された。DC 分化の過程において、TAD 内相互作用は細胞種特異的に確立されることがわかった (図 2a)。次に、DC 共通 CL3 における TAD 内相互作用の増加、H3K27ac の蓄積、および RNA 発現の関係を調べた。MDP の段階において H3K27ac が蓄積していた。CL3 TAD に含まれる遺伝子は DC1 と DC2 の段階で誘導され、TAD 内のクロマチン相互作用の増加と密接に関連していた (図 2b)。これらの結果は、DC 特異的 TAD は分化の比較的后期に確立され、DC 亜集団特異的遺伝子発現と密接な関連があることを示している。

3. 転写因子 IRF8 は B から A へのコンパートメント転換を促進する

これまでの結果は、ゲノム領域の A コンパートメント化が、DC 特異的遺伝子発現のクロマチン構造的基盤を提供することを示唆している。DC 前駆細胞における転写因子によるクロマチン活性化が、A コンパートメントへのスイッチングを制御している可能性を考慮し、B から A コンパートメントへの変化を示すゲノム領域に存在するオープンクロマチン領域で *de novo* モチーフ解析を行った。PU.1、CTCF、RUNX 結合モチーフは全ての前駆細胞ステージで検出されたが、PU.1-IRF 複合エレメントは MDP と CDP で有意に濃縮されたが、LMPP では頻度が低かった (図 3a)。9 つの IRF ファミリー転写因子の中で、IRF8 だけが MDP と CDP で高発現していた (図 3b)。A コンパートメント形成における IRF8 の役割を理解するために、*Irf8*^{-/-} MDP を分離して Hi-C を行った。コンパートメントスイッチングにおける IRF8 の直接的な影響をより明確にするために、IRF8 ChIP-seq と Hi-C データの統合解析を行った。野生型 MDP で IRF8 が結合していた 4,447 のゲノム領域のうち、942 領域で *Irf8*^{-/-} MDP においてコンパートメント PC1 値が減少していた (図 3c)。これらの結果は、IRF8 が DC 前駆細胞において活性化型のコンパートメント化を促進し、DC 系列特異的な遺伝子発現をもたらすことを示している。

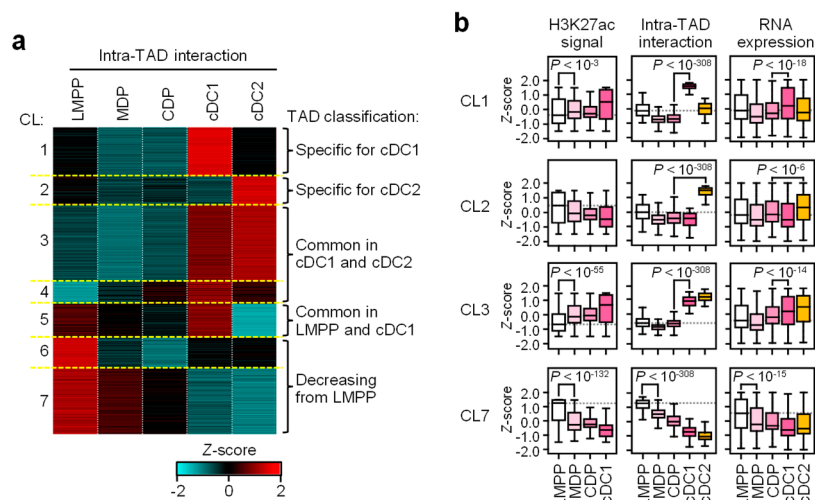


図 2. DC 分化過程における TAD 内相互作用の動態

- a) DC 分化における TAD 内相互作用形成のカイネティクス。
- b) DC 分化過程における H3K27ac レベル、TAD 内相互作用、RNA 発現の変化。統計的有意性の算出には両側 Student の t 検定を用いた。

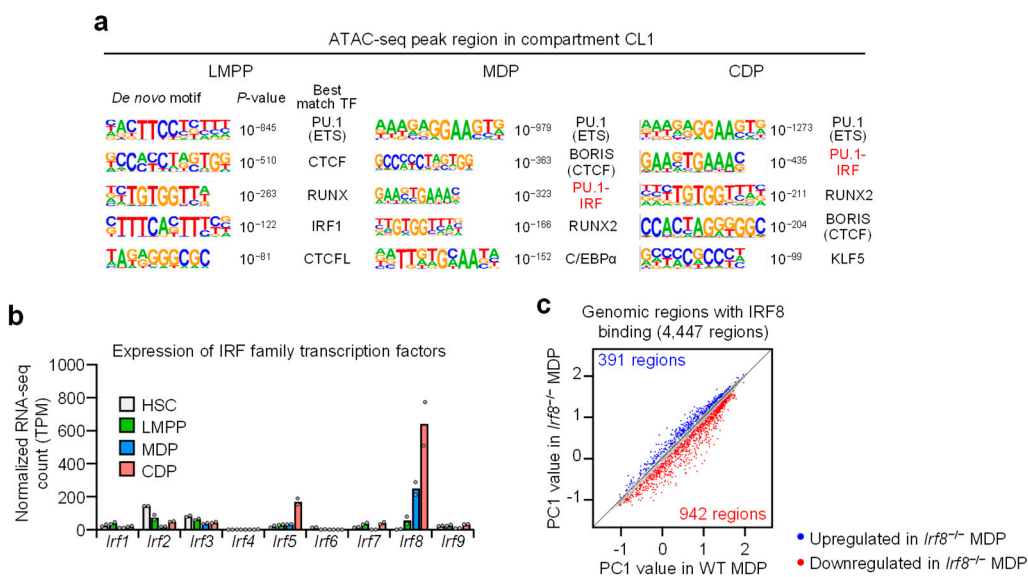


図 3. IRF8 は DC 前駆細胞において A コンパートメント化を誘導する

- a) 図 1a で定義したコンパートメント CL1 におけるオープンクロマチン領域の *de novo* モチーフ解析。統計的有意性の算出には二項検定を用いた。
- b) 造血幹細胞および前駆細胞集団における IRF ファミリー転写因子遺伝子の RNA 発現。
- c) IRF8 結合部位における野生型 MDP と *Irif8*^{-/-} MDP の PC1 値の比較。IRF8 結合部位は、野生型 MDP の IRF8 ChIP-seq データを用いて同定した。

4. 宿主防御遺伝子のクロマチン構造は、未感染の DC であらかじめ確立されている

感染時、DC は活性化され、サイトカインやケモカインなどの宿主防御関連遺伝子を急速に発現する。宿主防御関連遺伝子のクロマチン構造が分化や感染時にどのように再編成されるかを明らかにするために、細胞内寄生病原体 *Toxoplasma gondii* 感染後の DC1 において RNA-seq と Hi-C を行った。ここでは *T. gondii* 感染マウス由来 DC1 を Tx DC1 と記載する。Tx DC1 では、コントロール DC1 と比較して、621 および 483 遺伝子の発現がそれぞれ誘導および抑制された (図 4a)。Hi-C 解析の結果、*T. gondii* に誘導される遺伝子座を含むゲノム領域は、DC の分化を通じて、大部分が A コンパートメントに属していることがわかった (図 4b)。他の DC 特異的遺伝子と同様に、これらの遺伝子を含むゲノム領域は MDP の段階から H3K27ac レベルの増加を示した。興味深いことに、これらのゲノム領域における TAD 内相互作用は、感染していない DC1 ですでに確立されており、*T. gondii* 感染によって強化されることはなかった。これらの結果は、感染および刺激応答性遺伝子の高次クロマチン構造が、刺激前の定常状態の DC においてあらかじめ確立されていることを示唆している。現在、形成されたクロマチン高次構造が宿主防御関連遺伝子の発現誘導に関与するかについて検討しており、少なくとも一部の遺伝子の発現に影響する予備検討結果を得ている。

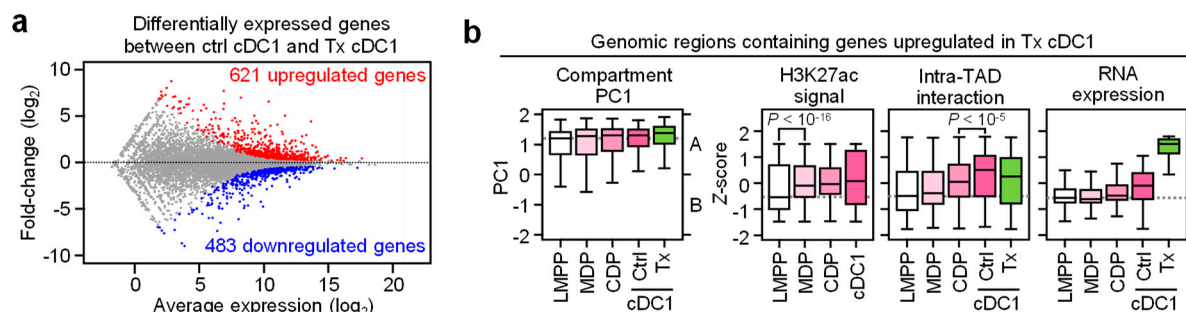


図 4. DC1 における宿主防御関連遺伝子のクロマチン構造再編成

- コントロール DC1 と *T. gondii* 感染マウスの DC1 (Tx cDC1) の間で発現が異なる遺伝子。
- 宿主防御関連遺伝子座におけるクロマチン構造再編成の動態。統計的有意性の算出には両側 Student の t 検定を用いた。

考 察

今回の解析結果から、DC が分化していく過程において、DC に重要な遺伝子のクロマチン高次構造が大きく変化することがわかった。この知見を応用することで、例えば白血病細胞など病的な前駆細胞のクロマチン高次構造を解析し、その性状を正しく理解することで、新たな診断・治療法開発につながられる可能性がある。また、DC は病原体やがんに対する免疫応答に必須の役割を担うが、その過剰あるいは異常な活性化は自己免疫疾患を引き起こしたりがんを増悪させたりすることも知られている。本研究は、それらの疾患の理解や治療法の開発に役立つことも期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学の田村智彦博士、西山晃博士、川瀬航博士、国立感染症研究所の永宗喜三郎博士、福本隼平博士、米国国立衛生研究所の Pedro P. Rocha 博士、Keiko Ozato 博士、Keji Zhao 博士、Kairong Cui 博士、Keita Saeki 博士である。

文 献

- 1) Chromatin structure undergoes global and local reorganization during murine dendritic cell development and activation. Kurotaki D, Kikuchi K, Cui K, Kawase W, Saeki K, Fukumoto J, Nishiyama A, Nagamune K, Zhao K, Ozato K, Rocha PP, Tamura T. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022 Aug 23;119(34):e2207009119. doi: 10.1073/pnas.2207009119.