

B細胞分化における転写因子 Erg の機能と ALL 治療

京都大学医生物学研究所再生免疫学分野

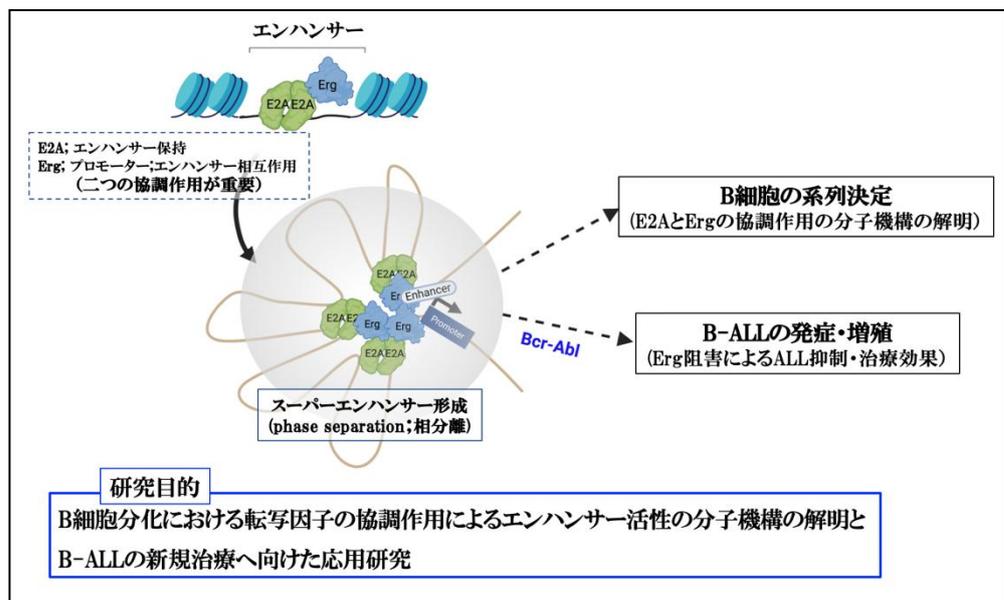
宮崎 正輝

※ 現在、このテーマについての論文投稿の準備を始める段階にきていることから、内容に関しては、公開できないデータもあり、詳細は控えさせて下さい。代わりに、関連する内容で研究助成金を使用したプロジェクトが先日、Genes and Development からアクセプトを頂いたので (Acknowledgement にアステラス病態代謝研究会からのご支援を頂いたプロジェクトであることを記載しております)、その内容を記載したいと思います。

【研究目的】

Basic-Helix-Loop-Heix (bHLH) 型転写因子 E2A は標的遺伝子のエンハンサー領域に結合して遺伝子発現プログラムを制御し、獲得免疫リンパ球である T, B 細胞の分化系列決定に必須の役割を果たす。また E2A は B 細胞性急性白血病 (B-ALL) などにおいて染色体転座による遺伝子融合 (E2A-HLF や E2A-Pbx) が認められており、癌化にも深く関わる事が知られている。これまでの研究から E2A の結合がエンハンサー領域の保持に必須であることが判明してきたが、E2A の結合だけで標的遺伝子の発現を決定するのではなく他の転写因子との協調作用が適正な遺伝子発現に必須であると考えられるが、その分子機構は未解明である。そこで E2A が制御するエンハンサー領域の転写因子結合配列解析から、転写因子 Erg に着目した。Erg は前立腺癌などの癌細胞で高発現しており、血球分化では血液幹細胞で高発現し、共通リンパ球前駆細胞 (CLP) から T, B 前駆細胞まで発現が高く維持されているが、成熟 T, B 細胞では全く発現を認めない。Erg の機能解析のためリンパ球特異的な Erg 遺伝子欠損マウス (Erg KO) ($Erg^{fl/fl}IL7R^{Cre}$) を作製したところ、骨髄の B 細胞分化の顕著な障害を認め、B 細胞分化に必須の新規の転写因子であることがわかった (論文準備中)。また遺伝子欠損マウスの掛け合わせにより Erg と E2A が T, B 細胞分化において協調的に働くことも証明された。また B 細胞性急性白血病との

関連する実験結果も得られた (論文準備中)。以上の実験結果から、本研究課題では 1) E2A と Erg によるエンハンサー制御の分子機構を解明することで B 細胞分化の系列決定の本態を明らかにする、2) B-ALL の発症と増殖維持における E2A と Erg の協



調機能についても解析を進めていく。本研究は、リンパ球分化に伴う遺伝子発現プログラム確立におけるエ

ンハンサー制御、特に転写因子群による協調作用の分子機構を解明することを目的とし、その研究成果を将来的なリンパ性白血病の治療応用へと発展させていく（図1）。

実験結果については、現在、論文作成中であり、公開を控えさせていただきます。

【Notch1-E2A の増幅回路により T 細胞系列を規定し、同時に自然リンパ球分化を抑制する】

細胞の分化・活性化において、環境からのシグナル（外因子）と細胞系列特異的な転写因子（内因子）の協調作用が、細胞の運命を決定する。T 細胞系列への運命決定において必須の環境シグナルは、Notch シグナルであり、胸腺上皮細胞（TECs）で発現する Delta-like ligand 4 (DLL4)と胸腺細胞で発現する Notch1 により起こる。一方、必須の内因子は E2A であり、T 細胞分化においては同じ E-protein である HEB と相補的に働くことを我々はこれまで明らかにしてきた。Notch1 シグナルまたは E2A/HEB の欠損では、胸腺の T 細胞分化が完全に消失し、代わりに胸腺内で自然リンパ球 (innate lymphoid cell; ILC)が発生する。しかしながら、Notch1 シグナルと E2A がどの様にして T 細胞分化を誘導するのか、どう協調的に働くかは、全く明らかでなかった。そこで Notch シグナルと E2A の協調作用を明らかにするため、様々な遺伝子変異マウスを掛け合わせ、その詳細を明らかにした。また、細胞分化は、突然に決定するものではなく、少しずつの変化の蓄積によって起こることから、シングルセルレベルでのエンハンサー領域の変化とそれに伴う遺伝子発現の解析が必要になる。そこで、胎児胸腺細胞を用いて、新しいシングルセル解析である single cell Multiome (同一単一細胞での scRNA-seq + scTAC-seq) 解析を行い、分化系譜解析 (developmental trajectory) とそれに伴うエンハンサー領域の変化と遺伝子発現変動の解析を行なった。

結果、胸腺内の初期 T 前駆細胞 (ETPs)においては、E2A は Notch1 の 5'側に存在するエンハンサー領域に結合し、その領域の活性を制御することが明らかになった。さらに Notch シグナルによって E2A の拮抗因子である Id2 の発現が抑制され、結果的に E2A の転写因子としての活性が増幅することが明らかとなった(E2A-Notch1 Amplifier Circuit)。そしてこの増幅回路が働くことで、T 細胞に特徴的な遺伝子発現、特に T 細胞受容体 (T cell receptor; TCR)の V(D)J 遺伝子再構成に関わる Rag1/Rag2 や XRCC6 (Ku70)、そして TCR シグナル分子 (CD3e, CD3d, pTa etc) などが誘導されることが、bulk RNA-seq/ATAC-seq だけでなく scMultiome 解析でも明らかとなった。加えて、Notch シグナルはそれ単独でも ILC 分化に必須の転写因子である Rora や Id2 の発現を抑制することが明らかとなった (図3)。

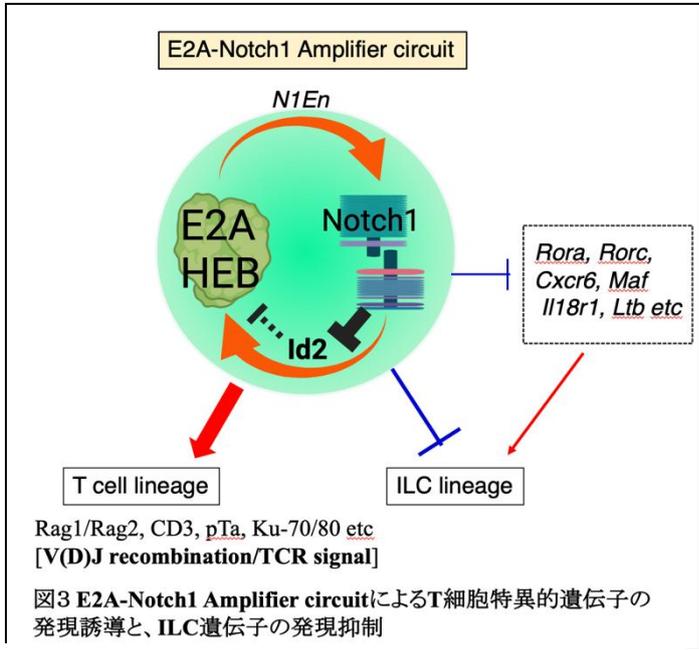


図3 E2A-Notch1 Amplifier circuitによるT細胞特異的遺伝子の発現誘導と、ILC遺伝子の発現抑制

この T 細胞と自然リンパ球 (ILC) 分化を分ける分子機構の生物学的意義は何か？

この T 細胞と自然リンパ球 (ILC) 分化を分ける分子機構の生物学的意義は何か？

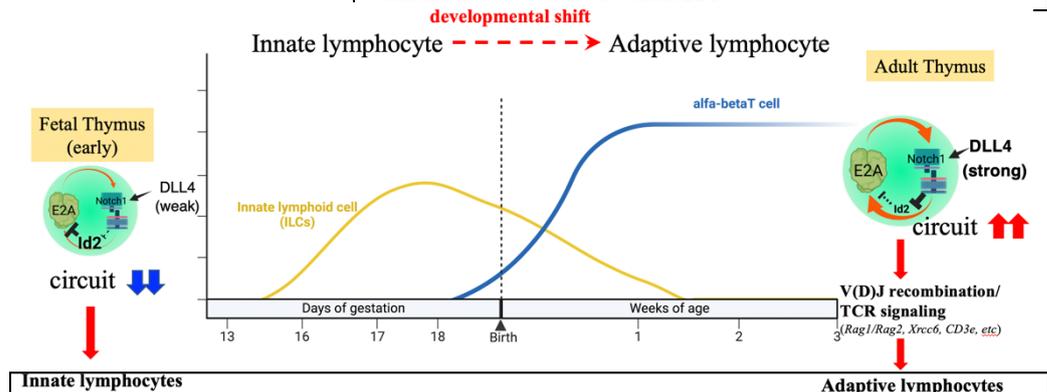


図4 DLL4-Notch1シグナルの変動によるE2A-Notch1増幅回路の変化とそれによる胸腺内の分化シフト (自然免疫型リンパ球 (ILC) から獲得免疫リンパ球 (T細胞))

ここで胸腺内 ILC 分化を詳細に解析した。驚いたことに胸腺内 2 型 ILC (ILC2) は、年齢によって大きく変動し、胎齢期・新生児期では比較的多いが、幼少期／成獣期では急激に減少し、殆どいなくなる。この ILC 分化の変動と Notch シグナル／E2A の活性についてさらに解析を進めたところ、胸腺上皮細胞 (TECs) での DLL4 の発現の変動が T 前駆細胞での Id2 の発現抑制に影響を与えていることがわかった。以上のことから、胸腺発生における年齢によるリンパ球の分化の変動; 自然免疫型リンパ球 (ILC) から獲得免疫リンパ球 (T 細胞) への変遷 (Developmental shift) が、DLL4-Id2-E2A-Notch1 の制御軸の変化により制御されていることを提唱することができた (図 4)。

以上の内容は、アステラス病態代謝研究会の研究助成金の支援を受けて進められて、2025 年 1 月に **Genes and Development** よりアクセプトされた (謝辞にて記載)。