The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	REGULATIONS OF ZINC HOMEOSTASIS AND GENETIC PROGRAM DURING EARLY B CELL DEVELOPMENT
Author(s)	宮井, 智浩
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56109
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　宮 井　智 浩　　）	
論文題名	REGULATIONS OF ZINC HOMEOSTASIS AND GENETIC PROGRAM DURING EARLY B CELL DEVELOPMENT （B細胞初期分化における亜鉛恒常性および遺伝子プログラムの制御）

論文内容の要旨

B細胞は獲得免疫系を司るリンパ球の一種であり、他の血液細胞と同様、造血幹細胞より分化する。B細胞への系列決定過程においては、多能性前駆細胞が環境刺激による細胞内シグナルを遺伝子発現制御に転換し、系列特異的な分子群の発現が誘導されることが重要である。また、外的因子によって増殖や細胞死といった細胞の生理的機能が制御されることも知られている。本研究では、B細胞初期分化における亜鉛の役割および遺伝子発現制御機構を精査した。

骨組織は多様なミネラルの貯蔵プールとして知られる。そのうち亜鉛(Zn)は生体内で鉄に次いで2番目に多い必須微量金属元素であり、その欠乏はリンパ球欠乏を伴う免疫不全をはじめとする多種の疾患の発症に関与することが知られているが、その分子メカニズムは不明であった。そこで第1章では、B細胞の産生過程における亜鉛の関与の可能性を考え、細胞内亜鉛濃度や局在の制御に必須である亜鉛トランスポーターに着目し、特にB細胞において高発現が認められるSLC39A10/ZIP10亜鉛トランスポーター（以下ZIP10）の機能に関して、主にコンディショナルノックアウトマウスの表現系解析により検討を加えた。B細胞初期分化過程でのZIP10欠損により、B細胞分化は最初期段階から顕著に障害され、その結果、成熟B細胞数が著減した。その分子機序をin vitroで詳細に検討した結果、多様なCaspase酵素群の異常な活性亢進を伴うアポトーシスの亢進が認められた。また、ZIP10の発現はB細胞初期分化に重要であるIL-7サイトカイン刺激によるJAK-STAT経路を介して誘導されることも明らかにした。すなわち、JAK-STAT-ZIP10-Zn^{2+}-Caspaseという亜鉛シグナル機軸がB細胞初期分化過程での細胞生死の制御に重要であることを明らかにした。STATが過剰に活性亢進しているヒトB細胞リンパ腫検体においてZIP10の高発現が認められたことから、ZIP10からの亜鉛流入がCaspase依存性の細胞死を抑え、がん病態における細胞生存の亢進に寄与している可能性が考えられ、亜鉛やそのトランスポーターが血液がんにおける治療のターゲットになりうる可能性が示唆された（Miyai et al. *PNAS.* 2014)。

一方で、亜鉛はZn fingerドメインを代表するタンパク質の立体構造形成に必須であり、Zn finger型の転写因子の機能調節に重要である。B細胞初期分化過程では分化環境に応じて転写因子やエピジェネティック因子によって適切な遺伝子発現制御が必要となるが、このような多様な因子群がどのように相互作用して段階的な分化運命決定過程が進行するのか未だに明らかになっていない。我々は近年、B細胞分化に必須な転写因子であるE2Aの活性をその阻害タンパク質であるId3の過剰発現によって抑制することで、未分化な造血前駆細胞をin vitroで無限に増幅・維持することが可能な新たな細胞培養系を確立した（Ikawa et al. *Stem Cell Reports.* 2015）。この系では、改変エストロゲン受容体をId3に結合した融合タンパク（Id3-ER^{T2}）の機能を4-hydroxytamoxifen（4-OHT）により調節することで、人為的にE2Aの機能阻害を誘導することも可能である（induced leukocyte stem cell: iLS細胞と命名）。つまり、この培養系では造血前駆細胞からB細胞分化を同調的に誘導することが可能となり、B細胞初期分化過程における遺伝子発現の推移を経時的に追跡することができる。第2章では、バイオインフォマティクス解析によりB細胞初期分化過程での転写制御ネットワークの解明を試みた。iLS細胞の培養系から4-OHTを除去し、同調的にB細胞を誘導する系において、16点の経時サンプルを回収し、RNA-seqを用いてB細胞運命決定過程におけるトランスクリプトームの遷移を解析した。その結果、これまでB細胞発生における機能が未知であった転写因子群が一過的・連続的に誘導される「転写因子ウェーブ」が起こることを見出した。例えば、Nr4aやEgr1といった最初期遺伝子やNfil3といった転写因子群の発現が最も早く活性化され、発現抑制及び過剰発現系を用いてこれらの因子の機能が正常なB細胞分化に必要であることを確認した。さらに、バイオインフォマティクス解析により転写制御ネットワークの構築を試みた結果、B細胞特異的な転写因子の活性化と同時にポリコム複合体による遺伝子発現抑制が誘導され、B細胞分化に不適切な因子群の発現を安定的に阻害している可能性が示唆された。本研究によって、B細胞への運命決定において報告されてきた個々の因子の発現動態を統合し、これまで機能が未知であった数々の因子群のB細胞運命決定に対する寄与の可能性を示唆する結果が得られた。現在、ネットワークの検証およびハブ因子の探索を行っており、B細胞運命決定において重要な新規の因子の同定が期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（ 宮井　智浩 ）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　招聘教授	谷 内　一 郎
	副 査　特任教授	黒 崎　知 博
	副 査　教授	山 本　雅 裕

論文審査の結果の要旨

獲得免疫系において重要なB細胞は、造血幹細胞から様々な細胞運命決定過程を経て分化する。申請者は、B細胞の初期分化過程において、亜鉛トランスポーターZIP10を介して輸送される亜鉛イオンがCaspaseの活性を制御することで細胞の生存維持に重要であることを見出した。さらに多能性前駆細胞からB細胞への分化を誘導できる培養系を用い、B細胞運命決定過程における遺伝子発現の動的変化を網羅的に解析した。その結果、B細胞特異的な転写プログラムが開始する以前に、これまで着目されていなかった多数の転写因子が一過的に誘導されることを見出し、これがB細胞への分化誘導に重要であることを示した。さらに、バイオインフォマティクス解析により転写制御ネットワークを明らかにした。亜鉛恒常性や新規転写因子群のB細胞初期分化への関与の発見は優れた研究成果であり、博士学位授与に相当すると承認された。