

「エピゲノム研究に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」
平成 23 年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

白髭 克彦

東京大学 分子細胞生物学研究所・教授

エピゲノム解析の国際標準化に向けた新技術の創出

§1. 研究実施体制

(1)「新規エピゲノム技術開発」グループ

① 研究代表者: 白髭 克彦 (東京大学分子細胞生物学研究所、教授)

② 研究項目

- ・微量組織からの ChIP-seq 解析法の構築
- ・オリゴクローナル抗体の性能評価

(2)「細胞」グループ

① 主たる共同研究者: 和田 洋一郎 (東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学部門、特任准教授)

② 研究項目

- ・標準エピゲノム解析
- ・病態エピゲノム解析
- ・新規エピゲノム解析手法の開発

(3)「抗体開発」グループ

① 主たる共同研究者: 木村 宏 (大阪大学生命機能研究科、准教授)

② 研究項目

- ・オリゴクローナル抗体の開発

(4)「情報解析」グループ

① 主たる共同研究者: 光山 統泰 (産業技術総合研究所生命情報工学研究センター、研究チーム長)

②研究項目

- ・エピゲノム情報解析パイプラインの構築
- ・エピゲノムデータベースの構築

§ 2. 研究実施内容

2.1 微量組織からの ChIP-seq 解析法の構築およびオリゴクローナル抗体の性能評価

研究開始後3年目での実用化を狙いつつ、RNA およびタンパク結合プロファイル解析の微量組織化を実施する。実用化後は種々の血管内皮より ChIP-seq 解析を系統的に行っていく。

① 微量組織からの ChIP-seq 解析法の構築

今年度は HeLa 細胞を主として用い、抗体開発グループより提供を受けたヒストン修飾抗体を用い細胞破碎条件、微量 DNA 増幅法を改良しながら、解析を行った。結果、少なくとも HeLa 細胞を用いた場合はヒストン H3K4 メチル化修飾、および、K79 修飾について、10 の 7 乗用いた場合の 4 割の部位について網羅することが出来た。今後、IHEC 標準細胞である IMR90、また、実際のエピゲノム解析目的である血管内皮細胞を用い、研究を進めて行く予定である。また、情報学的に、微量化サンプルに特化した解析法の構築を試み、情報学的に擬陽性を減らすことが可能か試行錯誤を重ねた。最終的にはどのような方法よりも、Biological duplication あるいは triplication により、実験的に擬陽性を減らす手段が最善であると結論した。

② オリゴクローナル抗体の性能評価

抗体開発グループと共同で、ヒストン修飾プロファイル技術の標準化を目指し、抗体特性の ChIP-seq 解析による評価を行った。IHEC 標準細胞である IMR90 を用いて、木村等が開発した H3K9me3 と H3K27me3 に対する個別抗体とそれらを混合したオリゴ化抗体、および市販抗体を用いて行った ChIP 産物を現在、鋭意、シーケンス中である。

2.2 ヒト内皮細胞の調製およびエピゲノム解析

日本人における 3 大死因はがん・脳血管障害・虚血性心疾患であり、後者二つは高脂血症・慢性炎症を起因とする動脈硬化によって引き起こされる。特に血管の最内層を裏打ちする内皮細胞は、臓器と部位に応じた形態的、機能的多様性こそが特徴であり、その刺激応答の破綻が血管疾患の根底にある。ヒトの全身に分布する血管系は、組織毎に異なる刺激を受けるばかりか、肺からの距離に応じて変化する酸素分圧、心臓からの距離と分岐の回数に応じて低下する内圧、流速など内部に含む血流からも異なる情報を受ける。このような環境情報は、細胞においてエピゲノム情報として蓄積されており、動脈硬化などの発症機序を解明するには、血管の機能維持や血管の新生における基本原理をエピゲノム情報によって理解する必要がある。

細胞グループは、従来からトランスクリプトーム解析によって血管内皮細胞の多様性を明らかにし、HP 上にて公開している (www.lsbm.org)。特にヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて転写因子、ヒ

ストン修飾、RNA ポリメラーゼ II、コヒーシンなどのエピゲノム解析の経験を有しており、その成果も学術誌に報告している。当グループは本研究において心血管系細胞の標準エピゲノム解析と病態エピゲノム解析に供する細胞の単離と培養を行うと同時に、新しいエピゲノム解析手法の開発を行うことを目的に、3項目の研究を実施し、今年度末の進捗状況は以下の通りである。

① 標準エピゲノム解析

標準エピゲノム解析では、最大 15 種類の内皮細胞から対象細胞を選別し、指定のエピゲノム情報 9 種類を得る。今年度は、細胞組織バンクとの連携関係を構築し、生体内のエピゲノム情報を失わずに細胞を調整するため、異なる試薬を用いた数通りの細胞単離及び培養方法の比較検討を開始している。今後主要なヒストン修飾情報を比較検討して細胞調製方法の最適化したうえで調整を進める予定である。

② 病態エピゲノム解析

疾患発症を引き起こす慢性的な外部刺激は、生体内で病変局所のエピゲノム情報に蓄えられている可能性がある。そこで、病態エピゲノム解析を実施するため、国内協力医療機関における病理検体から、初代培養技術を用いてエピゲノム解析に使用可能な内皮細胞を調製する計画である。今年度は、連携機関における倫理委員会にヒト組織を用いたエピゲノム解析の計画の申請を開始しており、承認され次第ヒト心血管系組織からの内皮細胞初代培養を実施する。

③ 新規エピゲノム解析手法の開発

エピゲノム情報のうちクロマチン相互作用解析は重要な手法である。細胞グループは、海外の共同研究者と共に網羅的なクロマチン相互作用解析を行い、炎症性刺激を受けた内皮細胞において、クロマチン構造がダイナミックに変動している様子を世界に先駆けて観察することに成功した。しかし、現在の手法によって網羅的な解析を実施するには大量の検体を必要とする等の問題点が残っており、今後より簡便かつ正確な手法の開発を目指す。また、5 ヒドロキシメチル化 DNA 等の新たなエピゲノム修飾も明らかになりつつあり、網羅的解析方法の開発も行う予定である。

2.3 オリゴクローナル抗体の開発

IHEC によるヒストン修飾のエピゲノム解析には、修飾特異的抗体を用いた ChIP-seq が用いられるが、そのデータの質は抗体の特異性に依存する。部位特異的ヒストン修飾抗体の開発は、研究者や企業により全世界的に行われているが、ほとんどの抗体はウサギポリクローナルであり、特異性やロット間での再現性が問題である。従って、綿密な性能評価と同一ロットの大量供給が可能なモノクローナル抗体の開発は標準エピゲノムデータの取得を行う上で非常に重要となる。そこで、本研究では、修飾ヒストン特異的オリゴクローナル抗体の開発を行っている。オリゴクローナル抗体とは、同一の標的を認識する異なるモノクローナル抗体を混合したものであり、モノクローナル抗体の特異性を保持しつつポリクローナル抗体以上の感度を有すると考えられる。

本年度は、IHEC 標準修飾のうち H3K9me3 と H3K27me3 に関して、それぞれを特異的に認識する抗体の特異性の検討を開始した。抗体としては、独自に開発した複数のモノクローナル抗体および市販ポリクローナル抗体を用いた。最初に、リジンのメチル化修飾をミミック(模倣)するよ

うな修飾を部位特異的に持つ組み換えヒストン(Active Motif)を用いたウェスタンブロッティングにより、H3K9me3 抗体の特異性を検討した。その結果、H3K9me3 に対する市販ポリクローナル抗体は H3K9me3 に加えて H3K27me3 との交差がみられたのに対し、モノクローナル抗体 3 種類はいずれも H3K27me3 とは反応しなかった。この結果は、様々なヒストン修飾ペプチドがスライドガラス上に固定された修飾ペプチドアレイ(Active Motif)によっても一部確認された。一方、H3K27me3 抗体についても同様にウェスタンブロッティングで解析した結果、市販ポリクローナル抗体は H3K27me3 に加えて H3K9me3 とも交差した。しかし、H3K27me3 モノクローナル抗体の少なくとも一つは、H3K9me3 とは交差せず、その高い特異性が確認された。また、IHEC 標準細胞である IMR90 を用いて、H3K9me3 と H3K27me3 に対する個々の抗体とそれらを混合したオリゴ化抗体、および市販抗体を用いて ChIP を行った。電気泳動と定量 PCR により評価を行った結果、オリゴ化により DNA の回収率が向上したことが明らかになった。これらのサンプルの差異を検討するため、シーケンス解析が進行中である。

2.4 エピゲノムデータベースとエピゲノム情報解析パイプラインの構築

今年度は、エピゲノムデータベース構築のための基盤整備を行った。基盤整備の内容は、計算機環境の整備とエピゲノム情報解析パイプラインの構築である。計算機環境の整備では、大規模配列解析を高速で処理可能にする分散処理環境の構築を行った(調達件名:「エピゲノム用配列情報解析計算サーバー」)。エピゲノム情報解析パイプライン構築では、独自の RNA-seq 解析パイプラインを構築した。DNA methylation 解析用パイプラインと、Histone modification 解析用パイプラインについては、外注作業(契約件名:「エピゲノム情報解析パイプライン構築作業」)にて構築を行った。

上記の情報解析パイプラインはエピゲノムデータベースと統合したサービスとして提供する。これを実現するために、現時点では情報解析パイプライン用インタフェースとして、世界的に広く知られている Galaxy (<http://galaxy.psu.edu>)を利用して公開準備中である(公開予定 URL は <http://epigenome.cbrc.jp/galaxy/>)。エピゲノムデータのブラウジングには UCSC Genome Browser を用いたサービスを提供している (<http://epigenome.cbrc.jp/cgi-bin/hgGateway>)。IHEC における情報共有については、3 月 5 日・6 日にかけて米国テキサス州ヒューストンの Baylor College of Medicine (BCM) で開催されて The 3rd Epigenome Informatics Workshop に参加し、米国でのエピゲノム情報共有ネットワークと、米国におけるエピゲノム情報の統合プラットフォームで BCM の A. Milosavljevic のグループによって開発された Genboree (<http://www.genboree.org>) について使用方法等のチュートリアルを受け、現在 Genboree 開発スタッフの助力を受けて本エピゲノムデータベースにも Genboree をインストールし、IHEC 向けサービスとして提供する準備をしている。米国エピゲノム情報統合リリース版の Epigenome Atlas (release 5)についても本エピゲノムデータベースにてミラーリングを行い、提供準備中である。

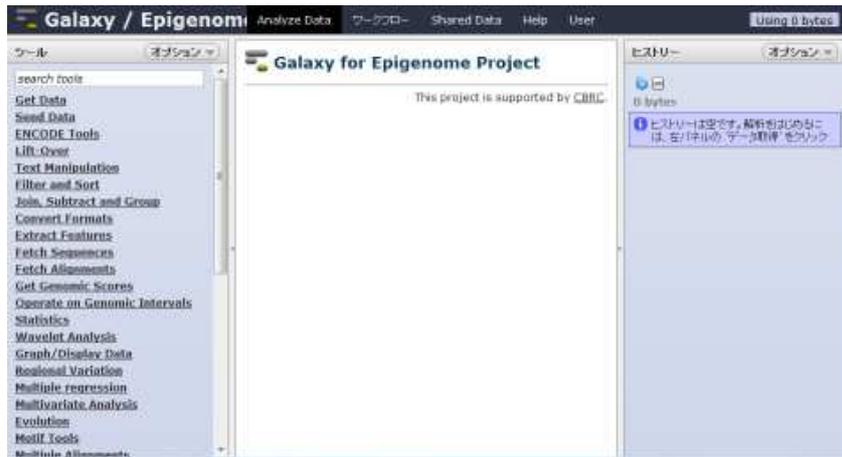


図1 現在公開中のエピゲノムパイプライン公開用 Galaxy トップ画面
(<http://epigenome.cbrc.jp/galaxy/>)