

「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

H25 年度
実績報告

五十嵐 和彦

東北大学大学院医学系研究科
教授

定量的エピゲノム解析法の開発と細胞分化機構の解明

§ 1. 研究実施体制

(1) 「東北大学」グループ

- ① 研究代表者:五十嵐 和彦 (東北大学医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 定量的 ChIP-Seq (Q-ChIP-Seq) 法の開発
 - ・ エピゲノムマップ-転写因子結合マップ-発現プロファイルの統合解析によるドライバーエピゲノム同定
 - ・ 骨髄腫のエピゲノム比較

§ 2. 研究実施の概要

定量的 ChIP-Seq (Q-ChIP-Seq) 法の開発

ChIP-Seq 技術は、免疫沈降した DNA のシーケンス反応を行い、ゲノム上にはり付いたタグ数をカウントすることでヒストン修飾量や転写因子結合量を判定する方法である。現行の方法では、全タグ数が同一であるという前提条件下ではじめて、サンプル間の比較が可能となるが、これは現実的には成立しない可能性がある。特に、細胞分化の際には、ヘテロクロマチン量やユークロマチン量が大幅に変化する可能性があり、このような場合、従来法を用いた比較は困難であると予想される。本プロジェクトで対象とする形質細胞は、ゲノムの多くがヘテロクロマチン化していること、そのヘテロクロマチン領域が核膜直下に密集して車軸状核を形成することが知られている。形質細胞分化系をモデル細胞として用いて、ChIP-Seq を定量的に実施する技術開発を進めている。通常の細胞は二倍体であるので、特定の DNA 領域に対する転写因子結合は (0, 1, 2) といったデジタルな分布状態を示すはずである。しかし、細胞一個一個で考えればこうであっても、分化細胞であっても遺伝子発現状態やエピゲノム状態は不均質であることが予想されることから、Q-ChIP-Seq 技術は分化細胞のなかで集団分布を比較するうえでも重要な技術になる可能性がある。本年度は B 細胞受容体遺伝子に組み換え VDJ をノックインしたマウスから単離した B リンパ球を素材とする高効率形質細胞分化系を用いて、時系列 RNA-sequence 解析を実施し、形質細胞分化に伴って 10 倍以上の大きな変動を示す遺伝子 1,000 程度を特定した。これら遺伝子のいくつかについて、そのクロマチン状態を通常の ChIP 法を用いて測定し、発現と関連した変動を示すことを見いだした。次年度は、これら遺伝子領域を陽性対照として Q-ChIP-Seq 法の性能を検証していく予定である。

クロマチンプロテオミクスによるエピゲノム制御因子の同定

細胞分化に伴うクロマチンの制御に関わるタンパク質は、細胞分化の前後でその量や翻訳後修飾が変動する可能性がある。形質細胞ヘテロクロマチン形成に関わるタンパク質を特定するために、B リンパ球細胞株および形質細胞株よりクロマチンを調整し、質量分析によるプロテオミクス解析を実施した。さらに、原子量の異なる安定同位体炭素で標識されたアミノ酸存在下でこれら細胞を培養することで、ペプチド量の相対比較を行った (SILAC 法)。既知タンパク質の量的変動が明確に検出され、これら細胞株を用いる戦略の妥当性を示すことができた。また、クロマチン制御に関わることが知られているものの、細胞分化との関係は不明であるような転写因子やクロマチン因子の変動を見いだした。さらに、リン酸化ペプチドを相対定量することで、これら候補因子の中には、形質細胞分化にともなってリン酸化が変動する可能性があるものも見いだすことができた。

骨髄腫エピゲノム解析へ向けた準備

上記の時系列 RNA-sequence データを、抗原刺激直後の増殖期、形質細胞分化期とに分けて解析することで、それぞれの時期に発現が誘導されたり逆に抑制される遺伝子群を抽出した。これらパターンを基礎データとして、ヒト骨髄腫トランスクリプトームデータとの比較を進め、骨髄腫の異常遺伝子発現を特定し、そのエピゲノムを調べていく。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

- 1 Kera, Y., Katoh, Y., Ohta, M., Matsumoto, M., Takano-Yamamoto, T. and Igarashi, K. Methionine adenosyltransferase II-dependent histone H3K9 methylation at the COX-2 gene locus. *J. Biol. Chem.* 288, 12592-13601, 2013, (DOI: 10.1074/jbc.M112.429738).
- 2 Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C. A., Bonelli, M., Sciume, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., Yu, Z., Liu, H., Takahashi, H., Rao, M., Muranski, P., Crompton, J. G., Punkosdy, G., Bedognetti, D., Wand, E., Hoffmann, V., Rivera, J., Marinocola, F. M. Nakamura, A., Sartorelli, V., Kanno, Y., Gattinoni, L., Muto, A., Igarashi, K., O'Shea, J. J., and Restifo, N. P. Bach2 represses effector programmes to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature*, 498, 506-510, 2013, (DOI: 10.1038/nature12199).
- 3 Swaminathan, S., Huang, C., Geng, H., Chen, Z., Harvey, R., Kang, H., Ng, C., Titz, B., Hurtz, C., Sadiyah, M. F., Nowak, D., Thoennissen, G. B., Rand, V., Graeber, T. G., Koeffler, H. P., Carrooll, W. L. Willman, C. L., Hall, A. G., Igarashi, K., Melnick, A. and Muschen, M. BACH2 mediates negative selection and p53-dependent tumor suppression at the pre-B cell receptor checkpoint. *Nature Med.*, 19, 1014-1022, 2013, (DOI: 10.1038/nm.3247).
- 4 Tsukumo, S., Unno, M., Muto, A., Takeuchi, A., Kometani, K., Kurosaki, T., Igarashi, K. and Saito, T. Bach2 maintains T cells in a naïve state by suppressing effector memory-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 10735-10740, 2013, (DOI: 10.1073/pnas.1306691110).
- 5 Kikuchi, T., Tokunaka, M., Kikuti, Y.Y., Carreras, J., Ogura, G., Takekoshi, S., Kojima, M., Ando, K., Hashimoto, Y., Abe, M., Takata, K., Yoshino, T., Muto, A., Igarashi, K., and Nakamura, N. Over-expression of BACH2 is related to ongoing somatic hypermutation of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Pathol. Int.*, 63, 339-344, 2013, (DOI: 10.1111/pin.12076).
- 6 Nakamura, A., Shibuya, R. E., Itoh-Nakadai, A., Muto, A., Shima, H., Saigusa, D., Aoki, J., Ebina, M., Nukiwa, T. and Igarashi, K. The transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function. *J. Exp. Med.* 210, 2191-2204, 2013, (DOI: 10.1084/jem.20130028).
- 7 Haldar, M., Kohyama, M., So, A.Y., Kc, W., Wu, X., Briseño, C.G., Satpathy, A.T., Kretzer, N.M., Arase, H., Rajasekaran, N.S., Wang, L., Egawa, T., Igarashi, K.,

Baltimore, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. Heme-Mediated SPI-C Induction Promotes Monocyte Differentiation into Iron-Recycling Macrophages. *Cell* 156, 1223-1234, 2014, (DOI: 10.1016/j.cell.2).

8 Ichikawa, S., Fukuhara, N., Katsushima, H., Takahashi, T., Yamamoto, J., Yokoyama, H., Sasaki, O., Fukuhara, O., Nomura, J., Ishizawa, K., Ichinohasama, R., Muto, A., Igarashi, K., and Harigae, H. Association between BACH2 expression and clinical prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* in press, 2014, (DOI: 10.1111/cas.12361).