

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：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
2. 研究開発課題名： 定量的エピゲノム解析法の開発と細胞分化機構の解明
3. 研究開発代表者： 五十嵐 和彦（東北大学大学院医学系研究科）
4. 研究開発の成果

本年度は、形質細胞分化時のエピゲノム変化を定量的 ChIP-Seq (Q-ChIP-Seq) なども組み合わせて特定することを進めた。これまでの研究から、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 ヶ程度を特定した。この系を用いてより効率良く形質細胞分化を誘導できる抗原刺激条件などを確定した上で、転写因子 Bach2、IRF4、ヒストン H3 リジン K27 アセチル化 (H3K27Ac)、H3S10 リン酸化 (H3S10P)、H3K9 トリメチル化 (H3K9Me3) などの ChIP-Seq を実施した。これらデータを統合解析することで、IRF4 結合領域を含み、形質細胞分化とともにヘテロクロマチン状態が亢進し、近辺遺伝子発現が抑制されるゲノム領域を複数同定することができた。また逆に、形質細胞分化とともにユークロマチン化が促進し、周辺遺伝子発現が亢進するゲノム領域も複数同定することができた。この情報を用いて、近傍遺伝子の B 細胞性維持や形質細胞分化における役割について、さらに解析を進めた。

中でも、B 細胞では Bach2 によりヒストンが脱アセチル化され(後述)、形質細胞では IRF4 によりアセチル化されるゲノム領域に位置し、形質細胞分化とともに発現が著明に上昇する遺伝子を見いだした。これまでの先行研究から、この遺伝子産物は転写活性化にもヘテロクロマチン化を介した抑制にも作用することが報告されているが、B 細胞や形質細胞を含め、細胞分化における機能はほとんど報告されていないことから、同遺伝子の B 細胞特異的遺伝子破壊マウスを海外研究者との共同研究で作成した。このマウスでは未熟 B 細胞までの分化はほとんど正常であったが、末梢リンパ組織における成熟 B 細胞は野生型の 1/4 程度に減少していた。この成熟 B 細胞をリポポリサッカライドで刺激したところ、抗体遺伝子クラススイッチや形質細胞分化の頻度に変化していたことから、Bach2 および IRF4 の下流で形質細胞分化を制御することが考えられた。現在、このマウスにおいて、形質細胞における遺伝子発現やクロマチン制御異常の有無を検索中である。

Bach2 は形質細胞分化を抑制することで B 細胞としての特性維持や機能発現に関わることをこれまでに報告してきたが、エピゲノム制御との関係は不明であった。Bach2 を B 細胞より精製し、相互作用因子候補を質量分析計にて同定した。その中にヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 が含まれていた。Bach2 と HDAC3 の相互作用は、免疫沈降実験により内在性レベルでも確認することができた。さらに ChIP により Bach2 標的遺伝子の制御 DNA 領域の少なくとも一部には HDAC3 も動員されること、この動員は Bach2 に依存することを見いだした。さらに、これら Bach2 標的遺伝子制御領域のヒストンは、野生型マウスでは B 細胞において低アセチル化状態に保たれるのに対して、Bach2 欠損 B 細胞ではアセチル化が亢進することを見いだした。したがって、Bach2 は HDAC3 と協働することで B 細胞の標的遺伝子ヒストンを特異的に脱アセチル化し、形質細胞型エピゲノムが形成されることを防いでいることが考えられた。

以上の結果から、B 細胞型エピゲノムと形質細胞型エピゲノムのスイッチには Bach2 の活性変化が関わることを予想された。そこで、B 細胞に抗原刺激を行い、Bach2 の翻訳後修飾の変動を定量質量分析により調べた。その結果、Bach2 は 72 カ所のセリン/スレオニンリン酸化部位を有すること、中でも 1 カ所のセリンのリン酸化が mTOR 経路の下流で誘導されると、Bach2 は核に留まることができず、細胞質に蓄積することを見いだした。このリン酸化は形質細胞分化やそのエピゲノム制御とも密接に関わることを考え、さらに検討を進めている。

【作成上の留意事項】

本報告書は、当機構ホームページ上での公開を予定しています。知的財産関連の情報（*）、個人情報等公開に適さない内容を含まないようご注意ください。

- (1) 研究者等は当該報告書を提出した時点で、公表について承諾したものとします。
- (2) 当該年度の研究開発課題全体（研究開発分担者がいる場合はその分を含む）の成果が明らかになるように図表を含め1ページ以内で簡潔に記載してください。
- (3) 本文の文字の大きさは、10～12ポイント程度とします。
- (4) 当機構に提出の際はPDFに変換したファイルを送付してください。

（*）公表資料の作成にあたっての注意事項

研究成果の公表により、特許権を取得できない、ノウハウとして秘匿すべき事項（例えば、製造条件の詳細）が第三者に知られる、研究開発において第三者に先を越されるといった事態が起こり得ます。特に、創薬研究については、化合物情報(有効成分)、生物活性情報と治療対象疾患の情報から第三者が容易に研究内容を把握できてしまうため、下記のように、化合物情報と生物活性情報（治療対象疾患）のいずれかを公表しないと工夫をすることが必要です。公表資料に記載する事項については、各研究機関の知財担当者等と相談することをお勧めします。

例1. ある化合物の生物活性が新規である場合

× AB12（名称から化学構造式が明らか）のYZキナーゼ阻害活性

○ 化合物XのYZキナーゼ阻害活性

→ 公表資料においては、例えば、化合物情報の具体的な開示を避ける。

例2. 標的（YZキナーゼ）が抗がん剤のターゲットとして新規である場合

× 化合物Xを有効成分とするYZキナーゼ阻害剤—新規機序による抗がん剤の開発

○ 化合物Xを有効成分とする新規抗がん剤の開発

→ 公表資料においては、YZキナーゼが抗がん剤の新規ターゲットとなることは、できる限り開示しない。化合物Xの具体的な開示も避ける。