

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) Bach2を標的とするへムによる腫瘍免疫活性化戦略の開発
(英語) Development of strategy to induce tumor immunity by inactivating Bach2 with heme
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東北大学大学院医学系研究科 教授 五十嵐 和彦
所属 役職 氏名： (英語) Kazuhiko Igarashi, Professor, Graduate School of Medicine, Tohoku University
- 実施期間： 平成28年9月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) Bach2を標的とするへムによる腫瘍免疫活性化戦略の開発
へム操作法の開発
- 開発課題名： (英語) Development of strategy to induce tumor immunity by inactivating Bach2 with heme ~ development of strategies to alter amount of heme ~
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学大学院医学系研究科 教授 張替 秀郎
所属 役職 氏名： (英語) Hideo Harigae, Professor, Graduate School of Medicine, Tohoku University

II. 成果の概要（総括研究報告）

野生型および *Bach2* 欠損マウスにメラノーマを移植し、形成された腫瘍に浸潤した T リンパ球の種類や数を比較した。CD8 陽性細胞をソートし RNA を抽出、cDNA を作成した。定量 PCR 法を用いて細胞傷害作用や疲弊に関わることが知られている遺伝子群について、発現を比較した。さらに、網羅的な発現比較を DNA マイクロアレイ法を用いて実施した。

Bach2 の直接標的遺伝子を同定するために、マウスクロマチン免疫沈降-シーケンス (ChIP-Seq) 実験を行った。発現解析結果と統合することで、*Bach2* により直接制御される遺伝子を多数同定した。ジーンオントロジー解析により、これらを機能別に分類した。

メラノーマ移植マウスにヘムを腹腔内投与するための予備的実験を試行した。文献等で報告されている量を投与したところ、激しい腹膜炎が生じたことから、がん移植モデルのような経時調査が必要な実験には適さないことが判明した。

Bach2 を認識するモノクローナル抗体について、さらにウエスタンブロット等の条件検討を進めた。

Bach2 のリン酸化による調節をさらに調べるため、各種反応を試験管内で行い、質量分析によりリン酸化残基の特定を進めた。これまで 72 カ所のリン酸化部位を報告しているが、あらたに複数の部位を同定することができた。そのリン酸化酵素の同定を阻害剤等を用いることで進めた。

Bach2 をノックダウンするため、siRNA 配列の選別を進めたが、少なくとも初代培養 T 細胞等では十分な発現低下を得ることができなかった。

Melanoma cells were transplanted into wild-type and *Bach2*-deficient mice, and tumor development was compared. After 1-2 weeks, tumors were dissected and T cells within the tumors were counted using surface markers. CD8+ T cells were sorted to isolate RNAs, which were then converted to cDNA for quantitative PCR analysis. Expression of genes involved in cytotoxic functions and T cell exhaustion were analyzed. To further understand genome-wide alterations in gene expression, DNA microarray analysis was performed.

To identify direct target genes of *Bach2* in T cells, chromatin immunoprecipitation and sequencing (ChIP-Seq) analysis was performed. By integrating with the above DNA array results, many putative target genes were identified. Using gene ontology (GO) analysis, these candidate genes were stratified depending on their known and/or suspected functions.

After transplantation of melanoma cells, we carried out injection of hemin to increase intracellular heme. Although the conditions used here were reported previously by us and others, after several days, severe inflammatory response was observed. Therefore, other methods of injection and/or increasing heme concentration will be necessary.

To detect endogenous Bach2 using immunoblotting and immunohistochemistry analyses, conditions for using monoclonal Bach2 antibody generated in house were optimized.

To understand regulation of Bach2 by phosphorylation, several in vitro reactions were carried out. Resulting samples were analyzed by mass spectrometry to identify new phosphorylation sites. While 72 phosphorylation sites were reported previously by our group, additional phosphorylation sites were identified in this analysis. Using various kinase inhibitors, we identified a critical protein kinase which appeared responsible for this particular phosphorylation of Bach2.

To carry out knock down of Bach2 in T cells, we compared several siRNA. However, efficiency of reduction was not sufficiently high in primary T cells. We will prepare additional siRNAs in the near future.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 6 件)

1. Igarashi, K., Kurosaki, T. and Roychoudhuri, R. BACH transcription factors in innate and adaptive immunity. ***Nature Rev. Immunol.*** in press (2017)
2. Itoh-Nakadai, A., Matsumoto, M., Kato, H., Sasaki, J., Uehara, Y., Sato, Y., Ebina-Shibuya, R., Morooka, M., Funayama, R., Nakayama, K., Ochiai, K., Muto, A. and Igarashi, K. A Bach2-Cebp gene regulatory network for the commitment of multipotent hematopoietic progenitors. ***Cell Rep.*** 18, 2401-2414 (2017)
3. Kobayashi, M., Kato, H., Hada, H., Itoh-Nakadai, A., Fujiwara, T., Muto, A., Inoguchi, Y., Ichianagi, K., Houjo, W., Tomosugi, N., Sasaki, H., Harigae, H. and Igarashi, K. Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. ***Haematologica***, 102, 454-465 (2016)
4. Suenaga, T., Watanabe-Matsui, M., Uejima, T., Shima, H., Matsui, T., Ikeda-Saito, M., Shirouzu, M., Igarashi, K., and Murayama, K. Charge-state-distribution analysis of Bach2 intrinsically disordered heme binding region. ***J. Biochem.*** 160, 291-298 (2016)

5. Roychoudhuri, R., Clever, D., Li, P., Wakabayashi, Y., Quinn, K.M., Klebanoff, C.A., Ji, Y., Sukumar, M., Eil, R.L., Yu, Z., Spolski, R., Palmer, D.C., Pan, J.H., Patel, S.J., Macallan, D.C., Fabozzi, G., Shih, H.Y., Kanno, Y., Muto, A., Zhu, J., Gattinoni, L., O'Shea, J.J., Okkenhaug, K., Igarashi, K., Leonard, W.J., and Restifo, N.P. BACH2 regulates CD8⁺ T cell differentiation by controlling access of AP-1 factors to enhancers. *Nature Immunol.* 17, 851-860 (2016)
6. Ando, R., Shima, H., Tamahara, T., Sato, Y., Watanabe-Matsui, M., Kato, H., Sax, N., Motohashi, H., Taguchi, K., Yamamoto, M., Nio, M., Maeda, T., Ochiai, K., Muto, A., and Igarashi, K. The transcription factor Bach2 is phosphorylated at multiple sites in murine B cells but a single site prevents its nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 291, 1826-1840 (2016)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 松本光代、佐藤好宏、佐藤正規、舟山亮、中山啓子、海野倫明、五十嵐和彦 網羅解析を通して門脈結紮時における肝再生の分子メカニズムにせまる NGS 現場の会第五回研究会 (2017年5月22-24日 仙台 仙台国際センター展示場) ポスター発表
2. Akihiko Muto, Sax Nicolas, Mitsuyo Matsumoto, Kazuhiko Igarashi. Elucidation of Gene Regulatory Network in Activated B cells by Single-Cell Analysis 第89回 日本生化学会大会 (2016年9月26日 月曜日 仙台市 東北大学川内北キャンパス) 口頭発表
3. 五十嵐和彦 ”Inner myeloid の遺伝子制御ネットワークとその環境応答機構” 日本生化学会大会シンポジウム「細胞外環境を転写とエピゲノムへ統合する分子機構」 2016年9月26日

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
無し

(4) 特許出願
無し