

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893027

研究課題名(和文) IgH-BCL2転座発生に関わる核内構造とDNAダメージの関与

研究課題名(英文) The contribution of chromosomal structure and DNA damage to IgH-BCL2 chromosomal translocation

研究代表者

山根 有人 (YAMANE, ARITO)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60701323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性リンパ腫で二番目に頻度が高い濾胞性リンパ腫の90%以上にみられるIgH-BCL2の染色体転座の原因を明らかにするため次世代シーケンサーを用いた解析を行った。これまでの研究から染色体転座の発生がおきると考えられているPro-B細胞ではこれらの遺伝子座同士は近接しておらず、DNAダメージの寄与がより多いことが示唆された。どのようなDNAダメージがこの転座の原因となっているのかを調べることは今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Follicular lymphomas are second frequent occurring malignant lymphoma in the world. More than ninety percent of cases have the same recurrent chromosomal translocation between IgH and BCL2 loci. To elucidate mechanism of generation of IgH-BCL2 translocation, we used Next generation sequencing technologies to observe interaction of genome-wide loci and DNA damage throughout the genome. IgH locus and BCL2 locus were not most frequent interacting loci in the mouse Pro-B cells in which the translocation is believed to occur. The result suggests the contribution of DNA damage is most important factor. The cause of DNA damage is remain to be elucidated in future studies.

研究分野：血液内科

キーワード：がんの発生

## 1. 研究開始当初の背景

染色体転座はリンパ腫などのがんにおける主要な遺伝子異常の一つの形態であり、その病態と強く関連するため、その発生機序を解明することはがんの発生原因を特定することや予防に繋がる可能性があり、重要である。筆者はこれまでに、近年の革新的な技術の一つである次世代シーケンシングを用いて、これまでの手法では観察することが困難であった核内構造の検討、DNA ダメージ発生部位の検出、網羅的な染色体転座の解析などに携わってきた (*Nature* 2012, *Cell Report* 2013, *Science* 2013, *Nature Immunology* 2011, *Cell* 2011)。特に筆者が注目していたのは悪性リンパ腫の中でもゲノム編集酵素である AID (activated cytidine deaminase) が正常の B リンパ球の成熟過程においてゲノム編集を行う過程が、その染色体転座の発生に関与する可能性が強く示唆されていたバーキットリンパ腫でみられる IgH-Myc 転座である。その IgH-Myc 転座には、これまで染色体転座の発生に重要な要素であると指摘されているものとして (1) 遺伝子座同士の核内での物理的距離と (2) AID による特異的な DNA ダメージ、(3) 生存のアドバンテージによるクローン選択、が上げられるが、どの要素がより重要なのかについては明らかとなっていなかった。我々の次世代型シーケンサーを利用したゲノムワイドな検討の結果、(2) の特異的な DNA ダメージがより重要であるとの結論を得た (*Nature* 2012)。

今回の研究課題として取り上げた濾胞性リンパ腫 (Follicular Lymphoma) は悪性リンパ腫の中でも 2 番目に頻度の高い疾患であり、低悪性度であるため進行はゆっくりであるが、治癒する可能性は低く、長い期間でみると難治性の命にかかわる疾患であると言える。将来的には治療や予防の介入が必要であるが、現時点ではこの疾患に特異的な染色体転座であることが 30 年前から知られている IgH-BCL2 転座についても、発生要因やタイミングは明らかになっておらず、病因を特定するに至っていない。濾胞性

リンパ腫の表面抗原解析からは、この腫瘍細胞は未梢性の濾胞中心 B 細胞の性質を持つことが明らかとなっているにも関わらず、この染色体転座の発生のタイミングとしては過去の研究から、骨髄での未熟な B 細胞の発生段階である ProB 細胞の段階と考えられており、その段階で B リンパ球の正常発生の一環として抗体の可変領域から多様な抗体遺伝子を形成するために行われる VDJ recombination の中心的な働きを担うゲノム編集酵素 RAG 蛋白質が関わっている可能性が示唆されている。これは、主に染色体転座のブレイクポイントの解析から IgH 領域の DJ ジャンクションの周辺での転座発生が多いという解析結果によるものであるが、BCL2 の転座のブレイクポイントについては、そこに RAG 蛋白質がダメージを与えるのか、また他の要因が関連しているのか、については議論のあるところである。また筆者は本研究に関わる RAG 蛋白質のゲノムワイドな網羅的な結合についても同蛋白質の発見者である David Schatz 博士のグループとの共同研究により検討を行った (*Cell* 2010, *Cell* 2015) 経験がある。

## 2. 研究の目的

### **次世代シーケンシングを用いた、濾胞性リンパ腫でみられる t(14;18) 転座の発生機序の解明**

筆者はこれまでゲノム全体での B リンパ球における特異的な DNA ダメージ (*Cell Report* 2013) や B リンパ腫の染色体転座、特に IgH/Myc 転座の発生機構についての検討 (*Nature* 2012) を行ってきた。この技術を応用して、濾胞性リンパ腫で認められる t(14;18) IgH/BCL2 転座の発生機構を (1) 核内 DNA 構造の解析、(2) RAG 蛋白質やその他の要素による DNA ダメージのゲノムマッピング、(3) B 細胞分化過程でのヒストン修飾の変化の検討、により明らかにし、将来の発生予防などに繋がる基礎知識とすることが本研究の目的である。特に DNA ダメージの検出についてはゲノムワイドに検出する方法は世界的にはまだ少なく、53BP1-/- 細胞を用いた RPA ChIP-seq による検出方法は筆者らが開発した方

法であり、それをこの解析にも応用することでこれまでに未解決であるこの染色体転座の発生原因の解明につなげることも目的の一つである。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、平成 25 年度に (1)マウス ProB 細胞培養系の確立、(2)ヒストン修飾の ChIP アッセイによるマッピング (3)4C-seq による核内構造の検討、を行い、ProB 細胞内での核内のエピジェネティックな情報を収集する。平成 26 年度には(1)RPA ChIP-seq による DNA ダメージのマッピング、(2)データの Bioinformatics 解析および総括を行い、これらの情報の重要性の検討と原因の考察をした。これらの手法の大部分はいずれも申請者が以前の研究にて用いてきた方法であり、Igh-BCL2 転座が優先的に起きる理由についての考察を行った。

### 4. 研究成果

概要：

悪性リンパ腫で二番目に頻度が高い濾胞性リンパ腫の 90%以上にみられる Igh-BCL2 の染色体転座の原因を明らかにするため次世代シーケンサーを用いた解析を行った。これまでの研究から染色体転座の発生がおきると考えられている Pro-B 細胞ではこれらの遺伝子座同士は近接しておらず、DNA ダメージの寄与がより多いことが示唆された。どのような DNA ダメージがこの転座の原因となっているのかを調べることは今後の課題である。

当初の計画では ChIP-seq 法を用いて、ゲノム全体でのヒストン修飾の評価を行う予定であったが、当初使用した次世代シーケンサー Ion Proton はデータを得るために必要なクオリティに欠け、大幅な技術的労力と時間を費やした後最終的にこれまでに実績のある Illumina 社の機器へと移行する必要があった。日本国内の研究施設にはおそらく導入時の予算やプロモーションの関係、またほとんど経験のない人が導入機器を決定することが多いという事情から

Ion Proton が数多く導入されているが、研究期間中にも Ion Proton を使用した論文はほとんど見かけることはない状態であった。世界的には事実上の業界標準として Illumina 社の機器を使用する必要があったが、他施設においても使用できるところ数多くあったが、共同利用できるようになっている施設はほぼなく、研究期間の二年目に当施設にも NextSeq500 が導入されたことでこの解析に値するレベルでの検討を行うことが可能となった。

初年度に行ったマウス ProB 細胞の単離および培養系の確立ではマウス E17.5 胎児肝より、抗 c-kit-PE, 抗 B220-APC 抗体を用い、Aria cell sorter (群馬大学学内共同利用施設が保有)にて ProB 細胞を純化し、骨髄ストローマ細胞株である OP9 細胞との共培養を IL-7 存在下で行うことにより、細胞を増殖させ、実験に十分な細胞数を得ることができるようになった。また IL-7 を培養液から除去することで PreB 細胞への分化誘導および、RAG 蛋白質の発現誘導が行える実験系が動くことが確認できた。

次に行ったヒストン修飾の評価のための ChIP-seq アッセイでは Bcl-2 の転座ホットスポット領域の観察では、これまでに考えられてきたようなヒストン H3K4me3 や H3K27Ac などのアクティブなヒストン修飾は認められなかった。RAG 蛋白質コンプレックス、特に RAG2 は H3K4me3 修飾をアンカーとして結合するということが過去の研究から明らかとなっているが、今回の BCL2 の染色体転座についてはこの、H3K4me3 -> RAG 結合を介した染色体転座の誘発は考えにくいということが明らかとなった。CTCF はゲノム内の構造を支える因子であり、一般的には染色体転座の発生と関与している可能性も示唆されている。ProB 細胞におけるこの CTCF については BCL2 領域に関して転座のホットスポットに CTCF 結合領域は認められず、関与が少ない可能性が示唆された。

また、4C-seq 法を用いた核内での染色体の相互間の物理的近接の評価では、図 1 に示すよう

に IgH 領域からみた接触頻度において、Bcl-2 領域は特に頻度の高い領域とは言えず、この物理的近接状態よりも Bcl-2 領域におきる DNA ダメージの発生が転座により重要な要素であることが強く示唆された。

またこれらの次世代シーケンス解析のデータ解析手法としては業務用コンピューターの導入およびセットアップ、コマンドラインソフトウェアの入手、インストールなどを行った。4C-seq の実験と並行して、新たに他の研究機関より 4C-seq 解析用のソフトウェアが発表されたため、その導入を行った。

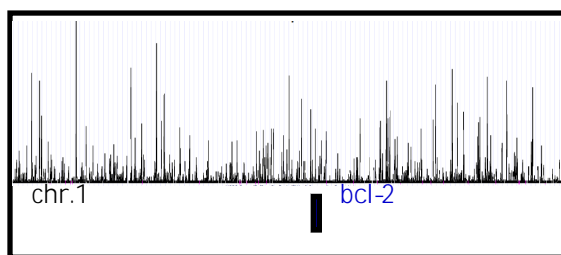
当初予定した DNA ダメージの評価については RPA ChIP-seq 法の解析のための 53BP1-/-マウスの骨髄中 ProB 細胞を前述のセルソーターを用いた方法にて純化し、培養を行うことで細胞数を増加させることに成功した。しかし RPA-ChIP-seq 法による DNA ダメージの検出には細胞周期が回転しており、S 期にいるものの頻度が高い必要があった。且つ、RAG 蛋白質が誘導されるためには、培養している ProB 細胞の培養液から IL-7 を除去することにより、分化誘導する必要があった。IL-7 を除去することにより RAG 蛋白質を誘導したときには、53BP1-/-細胞ではアポトーシスに陥ってしまう細胞の割合が高く、RAG 蛋白質を誘導した後に細胞周期を再び回す手法を開発する必要性があり、この条件設定を行うことに時間がかかったため、現時点ではデータを取得するに至らなかった。研究遂行中に他のグループより BLESS 法という G1 期の細胞の DNA ダメージも検出できるような手法が発表され、今後はこの方法での検討も検討したいと考えている。

また、この研究課題からの派生として、BCL2 領域の遺伝子の 3 次元構造を元にした制御領域、特に新規エンハンサーの同定をこれまでに得たデータを利用して行うことができると考えられるため、検討中である。この新規エンハンサー領域とプロモーター領域に存在するヒストン H3K4me3 修飾が三次元構造をもち、結合するこ

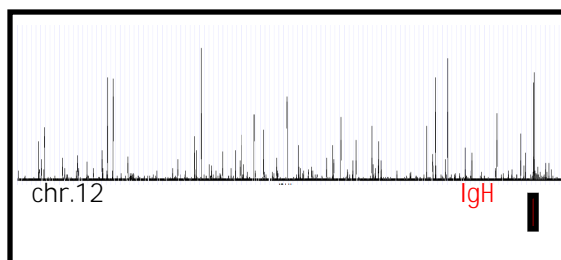
とにより RAG 蛋白質がセントロメア側に大きく離れた転座のホットスポット領域に作用することができる可能性があるため、この BCL2 の 3 次元構造および新規エンハンサー領域の解析は IgH-BCL2 染色体転座の要因を解析するという本研究の目的にも深く関わるものであるため、今後の検討課題として重要であると考えている。

(図 1)

4C-seq from IgH



4C-seq from bcl-2



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

- 1) Kouzine F\*, Wojtowicz D\*, Yamane A\* (\*equally contributed)(他7名) Global regulation of promoter melting in naive lymphocytes. *Cell* 153(5): 988-99, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.cell.2013.04.033.
- 2) Di Virgilio M\*, Callen E\*, Yamane A\* (\*equally contributed)(他11名) Rif1 Prevents Resection of DNA Breaks and Promotes Immunoglobulin Class Switching. *Science* 339(6120): 711-5, 2013. 査読有 doi: 10.1126/science.1230624.
- 3) Yamane A., (他10名) RPA Accumulation during Class Switch Recombination Represents 5'-3' DNA-End Resection during the S-G2/M Phase of the Cell Cycle.

*Cell Rep* 3(1):138-47, 2013 査読有

doi: 10.1016/j.celrep.2012.12.006.

4) Nakahashi H, (他17名, 9番目, Yamane A)

A Genome-wide Map of CTCF Multivalency  
Redefines the CTCF code.

*Cell Rep* 3(5): 1678-89, 2013 査読有

doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.024.

5) Jankovic M, (他10名, 5番目, Yamane A)

53BP1 Alters the Landscape of DNA  
Rearrangements and Suppresses AID-Induced  
B Cell Lymphoma.

*Mol Cell* 49(4): 623-31, 2013 査読有

doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.029.

6) Kieffer-Kwon KR, (他 25 名, 15 番目

Yamane A) Interactome maps of mouse gene  
regulatory domains reveal basic  
principles of transcriptional regulation.

*Cell* 155(7):1507-20, 2013 査読有

doi: 10.1016/j.cell.2013.11.039.

7) Teng G, (他 13名, 4番目 Yamane A) RAG

Represents a Widespread Threat to the  
Lymphocyte Genome.

*Cell* 162(4): 751-65, 2015

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 山根有人 DNA ダメージが B 細胞リン  
パ腫における IgH-Myc 染色体転座の発生を  
規定する 第 22 回日本癌病態治療研究会  
2013/6/28 東京都江東区

2) 山根有人 B 細胞リンパ腫における染  
色体転座の発生機序の解析 第60回北関東  
医学会総会奨励賞受賞講演 2013/9/27 群  
馬県前橋市

3) 山根有人 ナイーブリンパ球の遺伝子  
発現におけるプロモーター融解の制御 第  
72 回日本癌学会学術総会 2013/10/5 神奈  
川県横浜市

4) 山根有人 DNA damage defines sites of  
recurrent IgH-Myc chromosomal  
translocations in B lymphocytes 第75回日本  
血液学会総会 2013/10/11 北海道札幌市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山根有人 (Yamane, Arito)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 60701323