様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ５ 月 ２４ 日現在

機関番号：　１１３０１
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2017
課題番号：　２６４６１４８２

研究課題名（和文）エピジェネティクス解析を用いたヒスタミン産生調節因子の探索

研究課題名（英文）Exploratory research for histamine production regulators using epigenetic analysis

研究代表者
工藤　久智（Kudo, Hisaaki）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：８０６４７６７８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,700,000円

研究成果の概要（和文）：ヒスタミン産生誘導実験と細胞試料の調整としてマウスマスト細胞細胞株P815の脱メチル化による転写活性実験を行った。P815細胞株を脱メチル化剤・5-アザシチジンを用いて処理するとプロモーター領域に脱メチル化が起こり、Hdc遺伝子の転写活性化が促進されることが報告されており、同様の処理を行いクロマチン免疫沈降(ChIP)解析のための試料調整を行った。この際に同時に調整した試料からcDNAを合成し、発現解析を行ったところHdc遺伝子の発現上昇が上記報告と同様に示された。また、ChIP解析予定のプロモーター領域にプライマーを設計し、PCRを行ったところ17箇所中15箇所で増幅の確認を示した。

研究成果の概要（英文）：Transcription activity experiment by demethylation of murine mast cell line P815 was performed as an experiment for inducing histamine production and preparation of cell samples. It has been reported that when the P815 cell line is treated with the demethylating agent; 5-azacytidine, demethylation occurs in the promoter region and the transcriptional activation of the Hdc gene is promoted, and the same treatment is carried out and chromatin immunity Sample preparation for sedimentation (ChIP) analysis was performed. At this time, cDNA was synthesized from the sample prepared at the same time and the expression analysis was carried out. As a result, an increase in expression of the Hdc gene was shown as in the above report. In addition, primers were designed in the promoter region to be analyzed for ChIP and PCR was carried out, and amplification was confirmed at 15 out of 17 sites.

研究分野：　発生生物学

キーワード：　ヒスタミン

１．研究開始当初の背景

ヒスタミンはアレルギー性炎症反応の仲介物質として有名であり、抗原−IgE 抗体複合体がマスト細胞上のIgE受容体に過剰に結合すると、ヒスタミンの含まれている細胞内顆粒が細胞外に大量に放出されアレルギー反応を引き起こす。H1～H4 の４種類のヒスタミン受容体がクローン化されており、中枢神経・消化管・血管内皮細胞・平滑筋など全身の様々な場所で発現している。ヒスタミンはこれらの受容体に結合し、アレルギー反応を誘発するだけではなく、通常時は生体防御反応の仲介・血圧降下・血管拡張・血管透過性亢進・平滑筋収縮・腺分泌促進に働く。また、神経組織では神経伝達物質として働き、覚醒状態の維持・食行動の抑制・記憶学習能の修飾などの生理機能を促進する。

生体内のヒスタミンは、ヒスチジンを基質としてヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）によってのみ合成されている。マクロファージ・リンパ球・好中球は無刺激下においてヒスタミンを産生しないが、各種炎症刺激が加わると、これら細胞も HDC の発現を誘導し、ヒスタミンを産生・放出する。したがって、*Hdc* 遺伝子の組織特異的な転写制御機構や HDC 活性の誘導機構が解明されれば、アレルギー疾患や炎症性疾患の病態解明や治療法の開発につながることが期待され、また、血管、消化器、神経系疾患の解明にも役立つ可能性がある。

[*Hdc* 遺伝子の転写制御]

研究代表者らのグループは、マウスやゼブラフィッシュの系を用いて *Hdc/hdc* 遺伝子発現制御の研究を行ってきた。これまでに *Hdc* プロモーター領域における CpG 配列のメチル化の検討を行い(Kuramasu, Ohtsu,et al., 1998, Suzuki-Ishigaki, Ohtsu, et al., 2000)、*Hdc* プロモーター内の GC ボックスへの Sp1 の結合を報告した(Kuramasu, Ohtsu, et al., 1998)。また、HDC ノックアウトマウスを作成し、ヒスタミン合成の欠損によりアレルギー疾患、睡眠、胃液の分泌に重要な働きをしていることを示した(Ohtsu, et al., 2001, 2002)。さらに、*Hdc* 遺伝子のエクソン部分を緑色蛍光蛋白質(GFP)遺伝子に置換した BAC (Bacterial Artificial Chromosome)発現ベクター(295 kbp)を導入したトランスジェニック(Tg)マウスを作成した。

[HDC-GFP BAC マウス]

この Tg マウスでは、発現が既に報告されいている結節乳頭核ニューロンと胃に緑色蛍光が観察され(未発表データ)、この領域（295 kbp）の転写活性によって内在性 HDC の発現が再現されていることが示された。また、HDC-GFP BAC マウスの腹腔への大腸菌接種実験において接種後の腹腔細胞の蛍光強度が上昇していることが確認された。（未発表データ）

一方、研究代表者らはゼブラフィッシュ *hdc* プロモーター領域を用いた Tg レポーターフィッシュの作成を試みたが、用いた 3 kbp の領域では有意の発現が得られず、*Hdc* 遺伝子の発現制御にはより広い領域に存在する制御領域が必要であることが予想された。また、研究代表者らのグループは、ゼブラフィッシュのヒスタミン産生系が覚醒や *orexin/hypocretin* 神経の発生を制御することを報告した。

以上のことから、HDC はアレルギーのみならず、炎症過程や神経系を制御する重要な因子であり、約 300 kbp の BAC の中に存在するシス配列を介した *Hdc* 遺伝子の発現調節機構を明らかにすることが、これら疾患の治療法の開発につながることが期待された。

２．研究の目的

ヒスタミンはマスト細胞、マクロファージにおいて合成され、I 型アレルギー反応や炎症反応の化学伝達物質である。生体内では、ヒスチジン脱炭酸酵素（HDC, L-histidine decarboxylase）によりヒスチジンから合成される系が唯一の合成系であるため、*Hdc* 遺伝子の転写機構を研究することにより、ヒスタミン産生の制御を可能とする知見を得ることを目的とした。本研究では、ChIP 法等を用いて *Hdc* 遺伝子領域のクロマチン構造および転写因子結合の検討を行い、炎症反応時のヒスタミン産生の誘導機構を明らかにすることを目指した。

３．研究の方法

ヒスタミン産生細胞の *Hdc* 遺伝子の制御領域同定

転写活性化状態に誘導した異なる種類のヒスタミン産生細胞から試料を調整し、その試料を用いて ChIP（クロマチン免疫沈降）解析を行い、それら３種の試料を用いた実験の結果を比較検討することにより、感染・アレルギー反応特異的に制御される *Hdc* 転写活性化領域のゲノム情報を調べることを計画した。

ヒスタミン産生誘導実験と細胞試料の調整
・マスト細胞細胞株の脱メチル化による転写活性化実験

マウス・マスト細胞細胞株 P815 を脱メチル化剤、5-アザシチジンで処理するとプロモーター領域の脱メチル化が起こり、*Hdc* 遺伝子の転写が活性化する(Suzuki-Ishigaki, Ohtsu, et al., 2000)。5-アザシチジンの添加前後で細胞を回収し、ホルムアルデヒド固定後に-80°C で保存し、解析を行った。

４．研究成果

ヒスタミン産生誘導実験と研究試料の調整としてマウスマスト細胞細胞株 P815 の脱メチル化による転写活性化実験を行った。P815 細胞株は脱メチル化剤・5-アザシチジンを用

いて処理すると脱メチル化が起こり、Hdc 遺伝子の転写が活性化することが報告されていた。同様の処理を行いクロマチン免疫沈降(ChIP)解析のための試料を調整した。この際に同時に調整した試料から cDNA を合成し、発現解析を行ったところ Hdc 遺伝子の発現上昇が上記報告と同様に示された。一方、CTCF と H3K4me3 の結合が予想される Hdc プロモーター領域について ChIP 解析用のプライマーを設計した。設計した 17 箇所中 15 箇所については想定通りの PCR 反応が確認された。
同試料をもとに ChIP 解析を行おうと実験条件の検討を行ってきたが、ChIP 解析については今後の課題としたい。

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３件）

① Shiwa Y, Hachiya T, Furukawa R, Ohmomo H, Ono K, Kudo H, Hata J, Hozawa A, Iwasaki M, Matsuda K, Minegishi N, Satoh M, Tanno K, Yamaji T, Wakai K, Hitomi J, Kiyohara Y, Kubo M, Tanaka H, Tsugane S, Yamamoto M, Sobue K, Shimizu A., **Adjustment of Cell-Type Composition Minimizes Systematic Bias in Blood DNA Methylation Profiles Derived by DNA Collection Protocols.** 査読有、PLoS One. 2016 Jan 22;11(1):e0147519. doi: 10.1371/journal.pone.0147519. eCollection 2016.

② Motoike IN, Matsumoto M, Danjoh I, Katsuoka F, Kojima K, Nariai N, Sato Y, Yamaguchi-Kabata Y, Ito S, Kudo H, Nishijima I, Nishikawa S, Pan X, Saito R,Saito S, Saito T, Shirota M, Tsuda K, Yokozawa J, Igarashi K, Minegishi N, Tanabe O, Fuse N, Nagasaki M, Kinoshita K, Yasuda J, Yamamoto M., **Validation of multiple single nucleotide variation calls by additional exome analysis with a semiconductor sequencer to supplement data of whole-genome sequencing of a human population.** 査読有、BMC Genomics, 15:673. doi: 10.1186/1471-2164-15-673., (2014)

〔学会発表〕（計５件）

① 工藤久智、**ゲノムコホート研究を支えるバイオバンクの構築について**、NGS 現場の会　第５回研究会、招待講演、仙台国際センター（宮城県仙台市）、2017 年 5 月 22 日～2017 年 5 月 24 日

② Hisaaki Kudo, Kaname Kojima, Riu Yamashita, Yosuke Kawai, Takahiro Nobukuni, Ichiko Nishijima, Noriko Ishida, Takahiro Terakawa, Atsushi Hozawa, Kozo Tanno, Soichi Ogishima, Mamoru Satoh, Atsushi Shimizu, Makoto Sasaki, Masao Nagasaki, Masayuki Yamamoto, Naoko Minegishi, **Evaluation of Biobank Sample Correctness and Integrity in TMM Biobank,** ISBER2017 Annual Meeting and Exhibits **ポスター発表、カナダ トロント**、2017 年 5 月 9 日～2017 年 5 月 12 日

③ H. Kudo, I. Nishijima, T. Terakawa, T. Nobukuni, N. Ishida, R. Yamashita, Y. Yamaguchi-Kabata, K. Kojima, S. Saito, S. Ogishima, F. Katsuoka, M. Nagasaki, J. Yasuda, M. Satoh, N. Minegishi, M. Sasaki, M. Yamamoto, T.Study group, **Reliability of ID Management in a Japanese Population-Based Biobank** , Europe Biobank Week 2016, ポスター発表，オーストリア ウィーン、2016 年 9 月 13 日～2016 年 9 月 16 日

④ Hisaaki Kudo, Ichiko Nishijima, Takahiro Terakawa, Takahiro Nobukuni, Sakae Saito, Soichi Ogishima, Fumiki Katsuoka, Masao Nagasaki, Jun Yasuda, Naoko Minegishi, Masayuki Yamamoto, **Assessment of ID Integrity with ABO blood typing from Questionnaire to Genomic Data in Japanese Biobank: ToMMo**, ISBER2015 Annual Meeting and Exhibits, ポスター発表、米国アリゾナ州フェニックス、2015 年 5 月 5 日～2015 年 5 月 9 日

⑤ 工藤久智、**バイオバンクにおけるメガ級（数百万本）のサンプルの管理について**、生命医薬情報学連合大会、招待講演、仙台国際センター（宮城県仙台市）、2014 年 10 月 4 日

〔図書〕（計１件）

① 工藤久智，寺川貴裕，山下理宇**バイオバンクにおける試料の品質管理 ― 東北メディカル・メガバンク計画での取り組み**ヒト疾患のデータベースとバイオバンク情報をどう使い、どう活かすか？ゲノム医療をどう実現するか？ 2017 年　実験医学増刊　Vol.35 No.17 Page122(2936)-127(2941)

６．研究組織
(1)研究代表者
　工藤　久智（KUDO, Hisaaki）

東北大学　東北メディカル・メガバンク機
構・助教
研究者番号：８０６４７６７８