

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21113

研究課題名(和文)腫瘍内エピゲノム不均一性を解明する1細胞クロマチン構造解析技術の開発

研究課題名(英文)Analysis of the chromatin status in an ultra-low scale

研究代表者

田中 梓(Tanaka, Azusa)

京都大学・医学研究科・特別研究員(PD)

研究者番号：70749796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エピゲノムの異常をターゲットとした創薬の開発が期待される一方、多種多様なヒストンマークを1つずつ調べる従来の手法では、エピゲノムの全体像を理解することは難しい。そこで本研究では、オープンクロマチン領域をゲノムワイドで検出するATAC-seqという技術に改良を加え非常に少数の細胞を用いたクロマチン構造解析を行った。細胞数の限られる成人T細胞白血病(ATL)の臨床サンプル30例のクロマチン構造を健康人サンプルと比較解析することでATLで特異的に機能が亢進している転写因子と、機能が減弱している転写因子の絞り込みを行った。

研究成果の概要(英文)：It is now accepted that the initiation and progression of cancer, traditionally seen as a genetic disease, also involves epigenetic aberrations. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is an oncogenic retrovirus and the etiological agent of adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL). Here, we performed ATAC-seq on ATL cell samples and discovered global alterations in the chromatin status. For this experiment, we modified original ATAC-seq protocol to apply this method to limited number of cells in clinical samples. To characterize differences in chromatin accessibility in ATL cells and normal human CD4+ memory T cells, we searched for regions of gained and lost genome accessibility. Motif analysis of increased accessible sites in ATL cells identified a strong enrichment in bZIP family transcription factors. Now we are performing a knock down experiment to confirm the importance of this transcription factor.

研究分野：エピゲノム

キーワード：エピゲノム 細胞分化 成人T細胞白血病 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

近年の DNA シークエンス技術の著しい発展により、様々ながんを対象に、発がんメカニズムの解明や治療標的の発見を目指した網羅的変異解析が行われてきた。肝細胞がん、肝内胆管がんにおいてはクロマチン制御遺伝子の変異が検出され、TCGA (The Cancer Genome Atlas) による 200 例の成人急性骨髄性白血病の解析ではエピゲノム修飾に関わる遺伝子に高頻度に変異が観察された (Fujimoto et al., Nat. Genet., 2012; Jiao et al., Nat. Genet., 2013; Cancer Genome Atlas Research. N. Engl. J. Med., 2013)。さらに研究代表者の先行研究により、成人 T 細胞白血病症例においても、アポトーシス関連遺伝子のプロモーター領域にエピジェネティックな修飾に異常があることが明らかにされ、エピゲノム変異も ATL 発症を導く要因であることが示唆された (Tanaka-Nakanishi et al., Cancer Res., 2014)。さらに、肺がん細胞株を用いた研究では、クロマチン構造などのエピゲノム異常を持つ腫瘍内の一部の細胞が、治療抵抗性にも大きく関係していることが明らかとなった (Sharma et al., Cell, 2010)。このようにエピゲノム制御の異常は発がん及び薬剤抵抗性に大きな影響を及ぼすことが示唆される一方、その一因となる腫瘍内のエピゲノム不均一性を解明する解析手法は開発途上であった。また細胞数の必要な従来のクロマチン構造解析技術では細胞数の限られる臨床サンプルを用いた解析は困難であり、これらの理由より必要細胞数の少ないクロマチン構造解析技術の確立が求められていた。

2. 研究の目的

多くの先行研究において、がんは「遺伝子変異の蓄積」と考えられ、様々ながんを対象に、発がんメカニズムの解明や治療標的分子の発見を目指した網羅的変異解析が行われてきた (Jiao et al., Nat. Genet., 2013; Nik-Zainal, Nat. Genet., 2014)。成人 T 細胞白血病 (ATL) における網羅的な遺伝子解析も 2015 年に報告され、ATL 細胞では T 細胞受容体/NF- κ B シグナル伝達経路をはじめ、T 細胞の機能に関連するシグナル伝達経路に変異が集積していることが明らかとなった (Kataoka et al., Nat. Genet., 2015; Kataoka et al., Nature, 2016)。その一方で、エピゲノムの異常もゲノム変異と同様にがん化を導く要因とする知見が集まりつつある。例えば、様々なヒストンマークの解析により ATL 細胞には、H3K27 のトリメチル化が蓄積している、という報告があり、その異常を引き起こすヒストンメチル化酵素 EZH2 をターゲットとした治験が開始された (Yamagishi et al., Cancer Cell, 2012)。また、これまでの申請者の研究においても、ATL 由来の細胞株でアポトーシス関連遺伝子のプロモーター領域にエピジェネティックな修飾に異

常があることを明らかにしている (Tanaka-Nakanishi et al., Cancer Res., 2014)。このように、エピゲノムの異常をターゲットとした創薬の開発が期待される一方、多種多様なヒストンマークを 1 つずつ調べる従来の手法では、エピゲノムの全体像を理解することは難しい。そこで本研究では、オープンクロマチン領域をゲノムワイドで検出する ATAC-seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing) 法という技術に着目した。ATAC-seq は、Transposase がオープンクロマチン領域にアクセスしやすい特性を利用するシークエンス法であり 2013 年に発表された (Buenrostro et al., Nat. Methods, 2013)。

本研究では従来の ATAC-seq 法に改良を加え、さらに少ない細胞数で ATAC-seq を行えるような実験手法の開発と、その手法を用いて細胞内不均一性の高い iPS 細胞や、貴重な臨床サンプルでのクロマチン構造解析を行うことを目指した。

3. 研究の方法

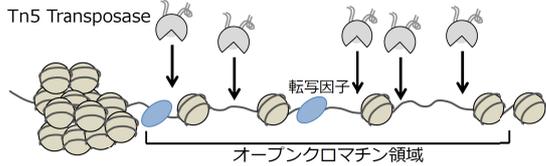
(1) 1 細胞クロマチン構造解析技術の開発

初年度は 1 細胞クロマチン構造解析技術の開発を行った。一般的にクロマチン構造解析では 1×10^6 の 6 乗オーダー以上の細胞数を必要とするが、ATAC-Seq により、 10^3 の 3 乗オーダーの細胞からオープンクロマチン領域の検出が可能となった。そこで ATAC-seq のすべてのステップを、サンプルをチューブの外に出すことなく 1 本のチューブ内で行うことができるように改良した。この改良した ATAC-seq と Fluidigm 社のマイクロフルイデックスを用いることで 1 細胞からのクロマチン構造データを取得した。

(2) 成人 T 細胞白血病症例サンプルにおけるクロマチン構造異常の解析

成人 T 細胞白血病 (ATL: Adult T-cell Leukemia) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1: Human T-cell Leukemia Virus type 1) の感染により発症する難治性の T 細胞悪性腫瘍である。ATL 細胞でのエピゲノム異常を網羅的に解析するために、ATAC-seq を用いて、細胞数の限られる ATL 症例サンプルのクロマチン構造解析を行った。HTLV-1 自体は様々な細胞に感染するが、ATL 細胞はその 90%以上が CD4 陽性メモリー T 細胞である (Richardson et al., J. Virol., 1990)。そのため、CD4 陽性メモリー T 細胞への細胞増殖を促す何らかの分子機構が存在するのではないかと推定され、オープンクロマチンのデータから ATL 細胞で特異的に機能していると考えられる転写因子の絞り込みを行った (図 1)。また、HTLV-1 関連疾患には ATL の他に HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) が存在する。その他、HTLV-1 に感染しているが ATL や

HAM を発症していない無症候キャリアも存在する。ATL 症例を HAM 症例や無症候キャリアのクロマチン構造を比較することで、ATL 発症に関わる必要な因子の絞り込みを目指した。



- ① Transposaseによるオープンクロマチン領域の切断とタグ配列の挿入
- ② 切断されたDNA断片の精製とPCRによる増幅
- ③ 次世代シーケンサーによる配列情報の取得
- ④ 配列情報から位置情報を取得 (マッピング)
- ⑤ ピークを検出
- ⑥ 濃縮したモチーフを抽出
- ⑦ モチーフから転写因子を推定

次世代シーケンサーによって解読された1本1本の塩基配列(リード)は、レファレンス配列を参照してゲノム上に配置される。マッピングされたリードの集積度からピーク領域の情報が得られる。

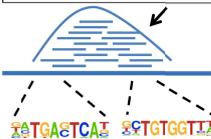


図1 本研究で用いる ATAC-seq からモチーフ解析までの流れ

4. 研究成果

(1) 1細胞クロマチン構造解析

Fluidigm 社のマイクロフルイディクスを用いて 1 細胞レベルで ATAC-seq を行うにあたり、障害となった実験過程が存在した。ATAC-seq は 1:Lysis, 2:Transposase による DNA の切断、3:DNA に結合している transposase の除去、4:PCR による増幅 というおおまかに 4 つのステップからなる。そのうち、”DNA に結合している transposase の除去”は PCR のステップに移行するにあたり必須の処理であった。しかし、もともとの ATAC-seq のプロトコルではカラム精製を用いていたため、別の手法を検討する必要があった。様々な条件を検討した結果 SDS を加えさらに熱処理することで transposase を DNA から脱離させることに成功した。しかしながら SDS を高濃度で加えるとその後に行う PCR の酵素の機能不全を引き起こすため SDS 濃度の最適化も行った。これらの改良を加え、Fluidigm 社の C1system を用いて 1 細胞 ATAC-seq を実行した。32 個の 1 細胞 ATAC-seq のデータをコンピューター内でマージさせ、その結果を 500 細胞、100 細胞のバルクのデータと比較したところ、GAPDH 周辺のみならず、ゲノム全体で見てもピークが非常に似た傾向を持つことがわかり、このシングルセルのデータの信ぴょう性が示された。今後はより高次の解析が必要だが、現時点では方向性の正しさを示す結果を得たと考えられる。(図 2)

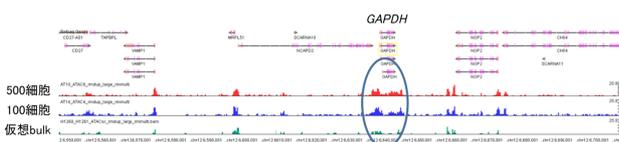


図2 1細胞 ATAC-seq データの妥当性の検証

(2) 成人 T 細胞白血病症例サンプルにおけるクロマチン構造異常の解析

(1)で開発した少数細胞用のクロマチン構造解析技術を用いて、ATL 症例でのオープンクロマチンの解析を行った。具体的には 30 例の ATL 症例、比較対象として健常人の CD4 陽性メモリー T 細胞、HAM 症例、無症候キャリアサンプルを用いた。ATL 症例と健常人のオープンクロマチンを比較解析すると、ATL 症例特異的にクロマチンがオープンとなっている領域はゲノム全体でおよそ 4200 箇所、クローズとなっている領域はおよそ 2900 箇所であった。これらの領域を Homer (Heinz et al., Mol. Cell, 2010) 等の情報学的手法を用いて、モチーフ解析した結果、オープン領域には bZIP ファミリーに属する転写因子が結合する配列が濃縮しており、これらの転写因子の機能亢進が ATL 細胞で起きていることが示唆され現在実験的な検証を行っている。一方、クローズ領域には Ets ファミリーに属する転写因子が結合する配列が濃縮しており、これらの転写因子の機能低下が示唆された。一般的に転写開始点周辺にオープンクロマチン領域が濃縮する傾向にあるが、ATL 症例ではその濃縮の度合いが弱まっている事を明らかにした (図 3)。この結果は、ATL 症例では、クロマチンが転写開始点周辺に限らず全体的に緩み、Transposase のクロマチンへのアクセシビリティがゲノムワイドに上昇している事を示唆すると考えられる。

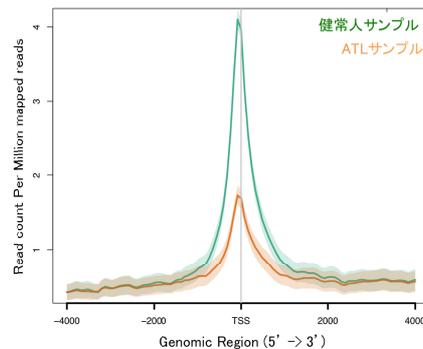


図3 転写開始点周辺におけるリードの集積度

Roadmap Epigenome Project ではゲノム上のどの位置が転写開始点周辺なのか、エンハンサー領域なのか、または機能を持たない領域なのか等、ゲノム全体が 15 種類の状態に分類され、公開されている。このデータを上述の ATL 特異的にオープン/クローズな領域に割り当てると、オープンになっている領域はその大部分が”はっきりとした機能を持たない領域”であったのに対し、クローズとなっている領域は転写開始点周辺や、エンハンサー領域といった重要な機能を有する領域であった。

以上をまとめると、ATL 症例ではクロマチンが全体的に緩むことで、本来ならば機能す

べきでない転写因子群が DNA に結合し、細胞に異常分化を起こすという新たな病態モデルが示唆される。

これらの解析および実験に加え、最終年度はこれらの研究に必須である HTLV-1 ゲノムにコードされるウイルスタンパク質が宿主細胞にどのような影響を与えているのかという知見をまとめ、その総説が *Frontiers in Microbiology* に掲載された。

今後の展望としては、現時点では健康人と ATL 症例の比較解析を主に進めてきたため ATL 症例と HAM 症例、ならびに ATL 症例とキャリアサンプルの比較解析が終了していないため、データ解析を進める。また、上述の解析結果を実験的に検証すべく、機能亢進が示唆された転写因子のノックダウン実験を行う。また HTLV-1 側因子の寄与を明らかにするために HTLV-1 ゲノムにコードされるウイルスタンパク質との相互作用を免疫沈降法等により検証する。さらにデータベースにある様々な血球系の ATAC-seq のデータを利用し、ATL 細胞のクロマチン状態は本当に CD4 陽性メモリー T 細胞に最も近い状態をとるのか、別の血球系との類似性の有無を検証し ATL 細胞の起源にクロマチンデータから迫る。

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 5 件)

A. Tanaka, M. Matsuoka, “HTLV-1 Alters T cells for Viral Persistence and Transmission”, *Frontiers in Microbiology*, 9:461,2018

DOI: 10.3389/fmicb.2018.00461

M. Mandai, A. Watanabe, Y. Kurimoto, Y. Hirama, C. Morinaga, T. Daimon, M. Fujihara, H. Akimaru, N. Sakai, Y. Shibata, … A. Tanaka (39 人中 34 番目), C. Okada, N. Takasu, S. Ogawa, S. Yamanaka, M. Takahashi (23 名省略), “Autologous Induced Stem Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration”, *New England Journal of Medicine*, 376(11):1038-1046, 2017

DOI: 10.1056/NEJMoa1608368

J.Ueki, M. Nakamori, M. Nakamura, M. Nishikawa, Y. Yoshida, A. Tanaka, A. Morizane, M. Kamon, T. Araki, MP. Takahashi, A. Watanabe, N. Inagaki, H. Sakurai, “Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability”, *Scientific Reports*, 7:42522, 2017

DOI: 10.1038/srep42522

M. Nishizawa, K. Chonabayashi, M. Nomura, A. Tanaka, M. Nakamura, A.

Inagaki, M. Nishikawa, I. Takei, A. Oishi, K. Tanabe, M. Ohnuki, H. Yokota, M. Koyanagi-Aoi, K. Okita, A. Watanabe, A. Takaori-Kondo, S. Yamanaka, Y. Yoshida, “Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity”, *Cell Stem Cell*, 19 (3), 341-354, 2016

DOI: 10.1016/j.stem.2016.06.019

K. Kitazawa, T. Hikichi, T. Nakamura, K. Mitsunaga, A. Tanaka, M. Nakamura, T. Yamakawa, S. Furukawa, M. Takasaka, N. Goshima, A. Watanabe, K. Okita, S. Kawasaki, M. Ueno, S. Kinoshita, S. Masui, “OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition”, *Cell Reports*, 15 (6), 1359-1368, 2016

DOI: 10.1016/j.celrep.2016.04.020

[学会発表](計 3 件)

田中梓、安永純一郎、藤本明洋、松岡雅雄「成人 T 細胞白血病細胞のクロマチン構造解析」第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会(大阪)、2017 年 8 月 19 日

Azusa Tanaka, Jun-ichirou Yasunaga, Masao Matsuoka, Akihiro Fujimoto “Human T-cell leukemia virus alters the epigenetic landscape and core regulatory circuitry in infected cells” Keystone Symposia Conference: Single Cell Omics, Stockholm (Sweden), 2017 年 5 月 30 日

田中梓、中村正裕、渡辺亮、“Dynamics of Epigenome During Cardiac Differentiation: A New Approach to Chromatin Status at Ultra-low Level” 第 40 回内藤コンファレンス、ポスター発表 (58)、札幌、2015 年 9 月 17 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 梓 (TANAKA Azusa)

京都大学・医学研究科・特別研究員 (PD)

研究者番号：70749796

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし