

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22542

研究課題名(和文) 病理検体を用いたChIPseq法の開発と疾患特異的スーパーエンハンサーの同定

研究課題名(英文) Development of ChIPseq method using pathological specimens and identification of disease-specific super-enhancer

研究代表者

山田 健人 (Yamada, Taketo)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60230463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：疾患関連遺伝子は、スーパーエンハンサー(SE)と呼ばれる強力なエンハンサーの影響下で、疾患特異的にその発現が制御されている。このSE解析に必須であるクロマチン免疫沈降塩基配列決定法(ChIPseq)をホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織の病理検体に応用すべく、変性蛋白質を高親和性で認識しうるモノクローナル抗体の作成を通じた高感度ChIPseq法の開発を行い、さらに本法を用いた神経変性疾患、代謝性疾患、感染症、がんにおける疾患特異的なSEとその形成機構を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患特異的SE解析はSEを治療標的とする上で重要である。SE解析は、生細胞で行われFFPE検体を用いた解析は、2010年にFaneli、2016年にCejasが新法を開発したが、その後の報告はなく汎用性の面で新法が必要と考えた。そこで変性SE構成分子に対する新規MoAbが必須と考え、変性架橋蛋白質に対するMoAbの確立を突破口として、DNA蛋白質複合体の抽出やDNA断片化の至適化を進めることでFFPE高感度ChIPseq法の開発を行った。本法は疾患の詳細な臨床情報や病理診断があり、膨大な蓄積がある病理FFPE検体を用いた疾患特異的SEの同定やそれに基づくバイオマーカーの探索に有用と考える。

研究成果の概要(英文)：Super-enhancer (SE), which is composed of large clusters of enhancers densely loaded with mediator complex, transcription factors, and chromatin regulators, drive high expression of genes implicated in disease-specific manner. In this study, the novel method for SE identification in pathology archives as formaldehyde-fixed paraffin-embedded(FFPE) materials was developed by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIPseq) using new monoclonal antibodies against degenerated antigens such as H3K9, H3K27, BRD4 and MED1 with high affinity to antigens in FFPE samples. This improved ChIPseq protocol was used for the validation of disease-specific epigenetic biomarkers in FFPE human samples. As a result, some biomarkers for SE were detected in colon carcinoma cells using FFPE-ChIPseq.

研究分野：分子病理学

キーワード：スーパーエンハンサー ホルマリン固定パラフィン包埋組織 クロマチン免疫沈降塩基配列決定法 モノクローナル抗体 がん

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

これまでがん細胞において細胞表面分子 CD26 がヒト化抗体との結合により、抗原・抗体複合体が核内移行し、CD26 が RNA ポリメラーゼ II (POL II) のサブユニット POLR2A の転写を阻害することを見出した(①)。そこで、POL II 阻害分子をヒト化抗体へ結合させ、新規 ADC によるがん細胞の POL II 標的療法を開発した(特願 2017-538530, PCT/JP2016/076542)。この POL II 標的療法の invitro での分子機構の解析の中で、がん特異的スーパーエンハンサー(SE)においても、POL II が重要な機能を有していることが明らかとなってきた。現在、SE における POL II を標的としたがん治療法を開発中であるが、これまでの SE 研究は、ほとんどが生細胞あるいは凍結材料での ChIPseq 解析であるため、がん種特異的な SE 研究は途上であり、SE に関連したバイオマーカーの探索も進んでいない。そこで、多くの疾患について膨大な試料の蓄積がある FFPE 病理検体に着目し、がん種あるいは疾患特異的な SE 解析がその突破口となりうると考えた。この FFPE 検体を用いた ChIPseq 解析での障壁は、1) 変性架橋蛋白質を効率よく高親和性で認識するモノクローナル抗体(MoAb) の欠如、2) 長期間固定された細胞・組織からの DNA 蛋白質複合体の抽出、3) DNA 断片化の条件設定、4) 検体の固定・保存による核酸の状態、である。実際、ChIPseq 解析を駆使する研究者は、抗体の質を最重要視しており、現在は主流であるポリクローナル抗体(PoAb)においては、力価、特異性やロット間の差異が欠点と指摘している。これまでに抗体療法の標的分子の発現解析のために、FFPE に至適化した MoAb の開発に成功していたため、本研究では、この技術をさらに応用し、ホルマリン固定で DNA 架橋・変性した蛋白質を高い特異性で効率よく免疫沈降可能な MoAb の開発を考案するに至った。

2. 研究の目的

疾患関連遺伝子は、スーパーエンハンサー(SE)と呼ばれる強力なエンハンサーの影響下で、疾患特異的にその発現が制御されている(②)。SE は、ヒストン H3K27 のアセチル化が広範囲に起こっているゲノム領域であり、多くのメディエーター、転写因子、コアクチベーターが凝集しているが、疾患特異的 SE とその形成機構には不明な点が多い(③)。この SE 解析に必須であるクロマチン免疫沈降塩基配列決定法(ChIPseq)においては、DNA に結合した蛋白質を DNA とホルマリン固定で架橋してから免疫沈降することで行われるが、このホルマリン固定で変性した DNA 架橋蛋白質を高親和性で認識しうる抗体が鍵である。

一方、全身の多くの疾患について、生検・手術・剖検によるホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織の膨大な病理検体があり、臨床情報と病理診断さらには一部の症例では、遺伝子解析情報も蓄積されている。これらの検体は、生細胞・組織がすでにホルマリン固定されているため、DNA 結合蛋白質が架橋された状態で保存されている。

われわれは、最近、ホルマリン固定変性蛋白質を高親和性で認識しうるモノクローナル抗体の作成法を開発した(特願 2013-158533, PCT/JP2014/070084, 特願 2018-049308)。

そこで本研究では、生細胞や凍結試料ではなく、疾患ごとに膨大な蓄積がある FFPE 病理検体での ChIPseq 解析を可能にすべく、

- 1) ChIPseq 至適抗体の確立を通じた高感度 ChIPseq 法の開発
- 2) 本法を用いて神経変性疾患、代謝性疾患、感染症、がんにおける疾患特異的な SE とその形成機構を明らかにする、ことを目的とするものである。

3. 研究の方法

1) ChIPseq至適抗体の確立を通じた高感度ChIPseq法の開発

8M 尿素緩衝液で変性した抗原（各種修飾ヒストン H3K9,27 および SE 結合蛋白質 BET ファミリー-BRD4, MED1）を合成ポリマーアジュバンドとともに BALB/c マウスへ免疫し、ハイブリドーマを作成、変性抗原を個相化したウェルにて ELISA 法で一次スクリーニングを行い、さらに DNA 架橋変性抗原で二次スクリーニングを行なった。得られた抗体は、ウエスタンブロット、免疫沈降、BIAcore にて活性を測定するとともに、各種修飾ヒストン蛋白質ペプチドによる吸収試験および抗原遺伝子欠損細胞株を用いた免疫沈降にて特異性を確認した。確立した抗体が高感度で ChIPseq により SE を検出するが検証するために、がん遺伝子とその SE 領域が明らかながん細胞株 (MKN7, HT29, MOLM13, MM1.s) とその細胞で形成された腫瘍（凍結組織とホルマリン固定組織および FFPE 組織）を用いて、ChIPseq を行い SE 検出感度を検証した。

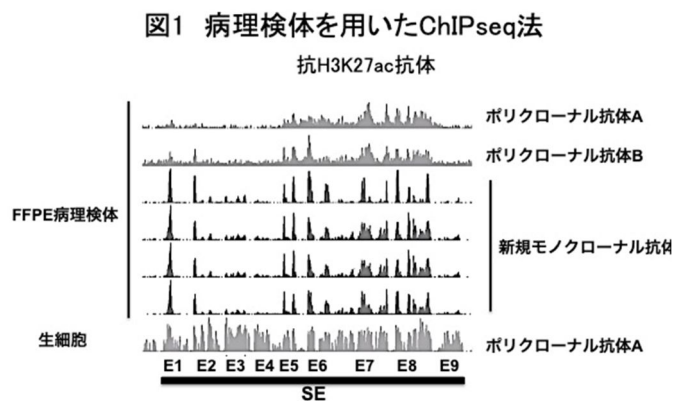
2) がんにおける疾患特異的 SE とその形成機構の解明

確立した抗体を用いて、各種がん（大腸癌、パーキットリンパ腫）の FFPE 検体（病変部位と健常部位）による ChIPseq を行い SE を同定した。また大腸癌検体において、アセチル化ヒストン H3K27 および BRD4 に対する抗体による ChIPseq にて重複して同定しえた SE の中で比較的狭い領域にピークがあるものを選択し、その領域の一部をビオチン誘導体付加した人工核酸プローブとして、大腸癌細胞株 HT29 を用いて、PiCh法 (Proteomics of isolated chromatin segments) により、固定、クロマチン溶解、ハイブリダイズ後にストレプトアビジン・ビーズで精製し、蛋白質を調整後、銀染色とウエスタンブロットでマーカー蛋白質を確認後、ゲルから蛋白質を抽出し、質量分析計にて蛋白質を同定した。

4. 研究成果

1) ChIPseq至適抗体の確立を通じた高感度ChIPseq法の開発

修飾ヒストン H3K9,27 および SE 結合蛋白質 BET ファミリー-BRD4, MED1 について、変性抗原蛋白質を合成ポリマーアジュバンドとともに BALB/c マウスへ免疫し、ハイブリドーマを作成、変性抗原を個相化したウェルにて ELISA 法で一次スクリーニングを行った。さらに DNA 架橋変性抗原で二次スクリーニングを行い、ウエスタンブロット、免疫沈降、BIAcore にて活性を測定するとともに、各種修飾ヒストン蛋白質ペプチドによる吸収試験および抗原遺伝子欠損細胞を用いた免疫沈降にて特異性を確認した。また、がんにおける疾患特異的 SE とその形成機構の解明を行うために各疾患の FFPE 検体（病変部位と健常部位）について得られた抗体を用いて高感度 ChIPseq 法を行なった（図 1）。



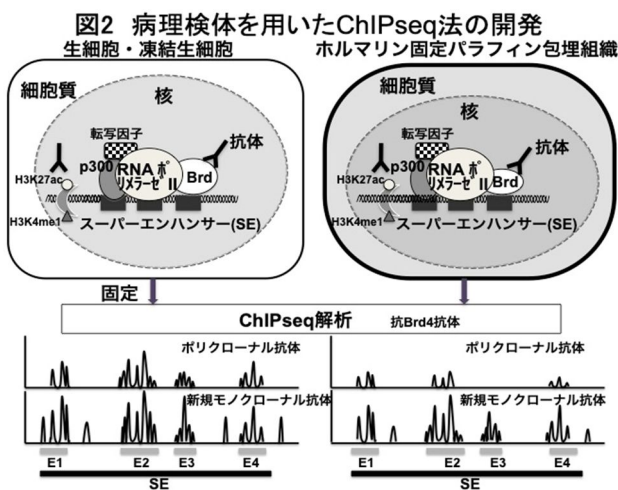
新規モノクローナル抗体を用いることで SE 中の E1, E2, E5, E6 構造が明瞭に同定できるようになった。また E5-E8 構造の非特異的ノイズの減少が認められた。

2) がんにおける疾患特異的 SE とその形成機構の解明

大腸癌検体について ChIPseq にて重複して同定しえた SE の中で比較的狭い領域にピークがあ

るものを選択し、その領域の一部をビオチン誘導体付加した人工核酸プローブとして、大腸癌細胞株 HT29 を用いて、PICCh 法により、固定、クロマチン溶解、ハイブリダイズ後にストレプトアビジン・ビーズで精製し、蛋白質を調整後、銀染色とウエスタンブロットで複数の蛋白質を同定した。現在、これらの分子が SE 構成分子あるいはバイオーカーとなりうるか検討している。

疾患特異的 SE の同定や構造解析は、エピジェネティクス研究のみならず、SE を治療標的とする上でも重要である(④)。SE の詳細な解析は、生細胞・凍結組織で行われ、これまでに主要な疾患において幾つかの特異的 SE が同定されてきた(②③④⑤)。また FFPE 検体を用いた免疫沈降によるエピジェネティクス解析は、2010 年に Faneli らが PAT-ChIP-seq 法を報告したのが最初であり(⑥)、2016 年には Cejas らが Fit-seq 法を開発し、がん特異的エンハンサーの解析を報告した(⑦)。いずれも FFPE 検体で ChIPseq 法が可能であることを初めて示した重要な報告である。しかし現在までに同法を用いた他のグループによる研究報告はなく、汎用性の面で技術革新が必要と考えられる。これらの研究は、いずれも修飾ヒストンに対する PoAb のみを用いており、多彩な SE 構成分子に対する FFPE 検体 ChIPseq 解析可能な MoAb が必須である。そこで ChIPseq で鍵となる変性架橋蛋白質に対する MoAb の確立を突破口として、DNA 蛋白質複合体の抽出や DNA 断片化の至適化を進めることで FFPE 検体での高感度 ChIPseq 法の開発に挑戦しその改良に成功した(図 2)。本法の確立は、ほとんどの疾患について詳細な臨床情報や病理診断があり、また膨大な蓄積がある病理 FFPE 検体を用いるため、疾患特異的 SE の同定やそれに基づくバイオマーカーの探索に有用である。さらに変性架橋蛋白質に対する高親和性抗体は、ChIPseq のみならず、免疫沈降法を応用可能な他のクロマチン解析(ヒストン修飾イメージング、ChIP 法および LC-MS/MS によるクロマチン結合蛋白質同定)への広い応用を可能とする技術革新の礎となる。



変性抗原を認識する新規モノクローナル抗体は FFPE 病理検体での ChIPseq 解析による SE 構造同定に有用と考えられる。

なり

<引用文献>

- ① Yamada K, Hayashi M et al. Nuclear Localization of CD26 Induced by a Humanized Monoclonal Antibody Inhibits Tumor Cell Growth by Modulating of POLR2A Transcription. PLoS One 8, 2013, e62304
- ② Hnisz D, Abraham BJ et al. Super-Enhancers in the Control of Cell Identity and Disease. Cell 155, 2013, 934-947
- ③ Sabari BR, Dall'Agnes A et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. Science 361, 2018, 379-391

- ④ Shin HY. Targeting super-enhancers for disease treatment and diagnosis. *Mol Cells* 41, 2018, 506-514
- ⑤ Mansour MR, Abraham BJ et al. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science* 346, 2014, 1373-1378
- ⑥ Fanelli M, Amatori S et al. Pathology tissue-chromatin immunoprecipitation, coupled with high-throughput sequencing, allows the epigenetic profiling of patient samples. *PNAS* 107, 2010, 21535-21540
- ⑦ Dejas P, Li L et al. Chromatin immunoprecipitation from fixed clinical tissues reveals tumor-specific enhancer profiles. *Nat Med* 22, 2016, 685-691

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hatano R, Yamada T, Madokoro H, Otsuka H, Komiya E, Itoh T, Narita Y, Iwata S, Yamazaki H, Matsuoka S, Dang NH, Morimoto C	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of novel monoclonal antibodies with specific binding affinity for denatured human CD26 in formalin-fixed paraffin-embedded and decalcified specimens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0218330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0218330.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishida H, Yamada T	4. 巻 2019
2. 論文標題 Monoclonal Antibody Therapies in Multiple Myeloma: A Challenge to Develop Novel Targets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 6084012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/6084012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi M, Madokoro H, Yamada K, Nishida H, Morimoto C, Sakamoto M, Yanagawa H, Yamada T	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel antibody-drug conjugate with anti-CD26 humanized monoclonal antibody and transcription factor I1H (TFI1H) inhibitor, triptolide, inhibits tumor growth via impairing mRNA synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers11081138.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Corridoni D, Antanaviciute A, Gupta T, Fawcner-Corbett D, Aulicino A, Jagielowicz M, Parikh K, Repapi E, Taylor S, Ishikawa D, Hatano R, Yamada T, Xin W, Slawinski H, Bowden R, Napolitani G, Brain O, Morimoto C, Koohy H, Simmons A	4. 巻 26
2. 論文標題 Single-cell Atlas of Colonic CD8+ T-cells in Inflammatory Bowel Disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 1480-1490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41591-020-1003-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sumiyoshi M, Kotani Y, Ikuta Y, Suzue K, Ozawa M, Katakai T, Yamada T, Kanaho Y, Watanabe T, Matsuda S	4. 巻 206
2. 論文標題 Arf1 and Arf6 synergistically maintain survival of T cells during activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 366-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000971	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Y, Hatano R, Hirota N, Isambert N, Trillet-Lenoir V, Podoll T, Umezawa Y, Takao S, Iwata S, Hosono O, Taguchi T, Yamada T, Dang NH, Ohnuma K, Angevin E, Morimoto C	4. 巻 9
2. 論文標題 Serum soluble CD26/DPP4 titer variation is a potential prognostic biomarker in cancer therapy with a humanized anti-CD26 antibody.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomarker Research	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40364-021-00273-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hayashi M, Madokoro H, Yamada T
2. 発表標題 Anti-CD26 Humanized Monoclonal Antibody Conjugated to Triptolide Inhibits Tumor Cell Growth via Transportation into Nucleus and Impaired RNA Polymerase II
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 健人、坂元 亨宇、森本 幾夫、林 睦
2. 発表標題 Anti-CD26 humanized antibody-triptolide conjugate transports into nucleus and inhibits RNA polymerase II activity
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会(
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishida H, Yamada T
2. 発表標題 Humanized anti-CD26 monoclonal antibody targets clonogenic side population cells in multiple myeloma
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	林 睦 (Hayashi Mutsumi) (60327575)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	
研究分担者	西田 浩子 (Nishida Hiroko) (80317130)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------