

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591672

研究課題名(和文) ヒトMC1Rシグナルの次世代シーケンシングとChIPアレイによる解析

研究課題名(英文) ChIP-seq analysis of human MC1R signaling

研究代表者

古村 南夫 (FURUMURA, Minao)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：10315070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養メラノサイトのcAMPシグナルが定常以下に抑制されるとコピキタスなMITF関連転写因子TFEB、TFE3、TCF4の発現が亢進する。関連miRNAを、マイクロアレイにより培養メラノサイトの高発現miRNAを絞り込み検討した。miR-30b、-146a、および-29aが転写因子シグナルとクロストークして標的遺伝子の発現制御に関わる可能性が示された。ChIP-on-Chip法と転写因子特異抗体を使用し、標的遺伝子とシグナルを解明するためChIP-SeqによりTCF4結合サイトのゲノムワイド同定を試みたが、次世代ディープシーケンシングによる個別の遺伝子の同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Ubiquitous MITF-related transcription factors TFEB, TFE3 and TCF4 were found to be significantly over-expressed in cultured melanocytes when the cAMP level was suppressed below steady state. To discover relevant functional miRNA-transcription factor relationships, differentially expressed miRNAs were screened by miRNA microarray. Three miRNA, miR-30b, -146a, and -29a, including miRNA known to interact with these transcription factors, were found to be over-expressed. To explore genome-wide binding sites of TCF4 transcription factor, genome-wide ChIP-seq was performed on cultured melanocytes with seven anti-TCF4 antibodies. However, even though in the entire chromosome views the TCF4 data show more peaks than the negative control, all seven TCF4-specific antibody validation results appeared to be negative, since targeted deep sequencing reveals no significant results.

研究分野：皮膚科学

キーワード：メラニン生成 メラノサイト 転写因子 クロマチン免疫沈降法 次世代シーケンシング

1. 研究開始当初の背景

(1) メラノコルチン1レセプター (MC1R) シグナルの複雑性:

最近の MC1R シグナルの概念: MC1R 下流のシグナルは、複雑な調節機構が存在する。MSH (メラノサイト刺激ホルモン) が MC1R を刺激し細胞内 cAMP 増加を介しシグナル誘導する機能以外の機能は予想以上に複雑である。MC1R シグナル研究はマウスフェノタイプ (毛色) によるが、ヒトでは同様の発現型はなく、ヒトでは疾患関連遺伝子関連以外でこのシグナルの構成因子と機能は未解明の部分が多い。下流では、ヒトメラノーマの MC1R 変異により、wild-type では主要細胞増殖 MAPK シグナルを伝達する ERK1/2 活性化が起こらず、代わりに cKIT シグナル経路とのクロストークがメラノーマの増殖に関わるような複数経路も明らかにされた。

アゴウチ蛋白によるシグナルの複雑性: このシグナルは cAMP の低下による従来の MSH と MC1R によるもの単なる反転ではないことが、我々と 09 年以降の共同研究者により明らかにされた。培養メラノサイトは ASIP によって、ユーフェオメラニンスイッチと、メラノプラスト様の脱分化や増殖低下が起きるが、ASIP 蛋白の一部のみでは、MC1R を介して異なるシグナル活性化を cAMP 依存性・非依存性に起こすことが明らかにされた。C-末端のみの ASIP は MC1R 抑制で basal レベルの cAMP 低下の点では変わらないが、メラニン生成のスイッチや脱分化や増殖の変化は起きず (Hida et al, 2009)、異なる部位が異なったシグナルが MC1R を介している。

GPCR スーパーファミリー受容体 MC1R が伝える多種多様なシグナル: MC1R の基本構造は G 蛋白結合性受容体 (GPCR) スーパーファミリーで、最大の特徴としてアゴニストやアンタゴニストにより多種多様な複数のシグナル活性化や異なる下流のエフェクターを介して生物学的作用を発揮する。現在よりも多くの機能発揮が予想され、包括的解析技術で再検討の余地がある。

(2) MCR1 シグナルで起こる変化分子機構解明とその経緯

包括的遺伝子解析で明らかにされた断片的情報に基づくもの: MCR1 シグナルで起こる変化の分子機構を解明するために、我々は 1990 年代後半から米国 NIH の Vincent J Hearing 博士と共同で MSH あるいは ASIP により発現が変化する遺伝子の包括的スクリーニングを行ない、また、関連する転写因子を明らかにしその機能について究明を進めた (Furumura et al. 1998, Furumura et al. 2001, Le Pape et al., 2009)。

ASIP は転写因子 TCF4 (ITF2) 代表される、メラノサイトの脱分化やオンコジーンとして癌化に関係すると思われる遺伝子の発見や、下流の遺伝子群の発現パターン解析では、DNA 修復に関連する遺伝子や抗酸化作用に関連する遺伝子発現低下などが認められた。MSH と反対の効果すなわち正反対の遺伝子発現パターンだけでなく、ヒトメラノーマの発生に関わる細胞内シグナルにも深く関係している可能性が示唆された。

MC1R と ASIP や MITF 以外のシグナル決定因子のヒト以外での発見:

転写因子以外に細胞外 attractin (ATAN) が ASIP と相互作用し、MC1R 活性化に付加的に関わる。-defensin CBD103 の変異で MC1R と ASIP には関係なく MC1R に結合しイヌの黒毛の表現型をとる。Mahogunin (MGAN) は細胞内タンパクで機能喪失変異では ASIP が効果消失しその下流のタンパクとされる。ヒトではこのようなシグナル経路は全く未解明である。

定常状態の cAMP シグナルを抑制時に発現や転写活性が大きく変化する転写因子:

GPCR の持つ特有の複雑性を排除するために、メラノサイトの cAMP より下流のシグナルを操作し遺伝子発現のスクリーニングも試みた。我々は、ヒト培養メラノサイトで MIT 関連転写因子の TEFB と TEF3 は cAMP 抑制によって発現が亢進し、PAR-AP にて PARS を活性化しても同様の変化が起こることを見出した (古村ほか、2010)。

また連携研究者とこのシグナル上の発現パターン解析から転写因子関与を検索したところ、転写因子 CUX1 の関与が予測されている。

2. 研究の目的

MC1R はヒトを含む哺乳類でメラニン生成シグナルの鍵となる制御因子である。

MSH は MC1R を刺激しメラニン生成促進を起こす一方、アゴウチ蛋白は MSH に拮抗しメラニンの色調が薄いフェノタイプ (ユーメラニンフェオメラニンスイッチ) を誘導し、ヒトにおいても頭髪や眼の色やメラノーマ発症にかかわる重要なシグナルである。

これまで多くの転写因子やシグナルタンパクが MC1R の下流で変化することが、マウスの毛色の遺伝子や、MC1R の活性修飾実験から明らかにされたが複雑でヒトでは未解明な部分が多い。最新の次世代シーケンサーによる網羅的トランススクリプトーム解析とマイクロアレイの DNA 転写因子蛋白相互作用解析による ChIP-on-Chip でこれらの因子のヒトでの発現や相互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

培養メラノサイト (Melanocyte) メラノセル-正常ヒト表皮メラニン細胞 NHMC、Medium 254 + HMGS、クラボウ)を用いた。

(2) 培地への添加薬剤

細胞内 cAMP シグナル修飾のため、MSH、forskolin または adenylylate cyclase 阻害薬の SQ22536 を添加した。

(3) マイクロアレイ解析

cDNA マイクロアレイ解析

cAMP シグナル活性化と阻害作用の薬剤を添加後メラノサイトから total RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) で抽出した。アジレント 2100 バイオアナライザーにて RNA の純度検定後、250ng の total RNA からビオチン標識 cRNA の合成を行い、10 μ g の cRNA にて Human Genome U133 Plus 2.0 Array をプローブアレイするハイブリダイゼーション後、Affimetrix 社 GeneChip Expression Array を用いて解析した。階層クラスタリング他発現解析用アレイのデータマイニング解析については主に GeneSpringGX11 を用いた。

miRNA 発現のマイクロアレイ解析

miRNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて miRNA を抽出し、2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies) の RNA 純度検定後、miRBase release 21 (JUN, 2014) に基づいた Homo sapiens miRNA (1872 precursors, 2578 mature) を搭載する miRNA microarray (Agilent Technologies) にて解析した。サンプルを脱リン酸化精製、Cy3 エンドラベリングし、ハイブリダイゼーションをアレイ上を行い quality control と発現を比較し解析した。階層クラスタリングなどのアレイデータマイニング解析には、GeneSpringGX11 を用いるとともに、miRNA Target Database 解析は、インターネット上の解析用 miRBase, microRNA.org, TargetScanS, MiRTrail 各サイトにデータをアップロードし解析した。

(4) ChIP-seq 解析

クロマチン分画の調製

SQ22536 添加メラノサイト培養細胞の DNA とタンパク質をホルムアルデヒドで架橋した後、細胞を可溶化し、ソニケーションまたは酵素により DNA を断片化した。

免疫沈降

磁気ビーズを用いて抗体に結合しているタンパク質/DNA 複合体を捕捉し、磁気ビーズを洗浄した。

DNA の精製

クロマチンの溶出のために、マグネットを用いて磁気ビーズを沈殿させ、新しいチューブに上清を移し、脱架橋、Proteinase K 処理を行った後、反応を終了させ DNA を精製した。

上記の方法にて、クロマチン DNA を用いて、7 回の ChIP 反応を行った。抗体については、anti-ITF2 Ab sc-48947 X (K-12, Lot A1707), sc-48948 X (K-15, Lot B2007) and sc-48950 X (N-18, Lot H1610) (Santa Cruz BioTech 社), anti-TCF4 Abcam (ab175542, Lot.GR139755-1), Abcam (ab185736, Lot.GR204909), GenWay (GWB-D430DC, Lot.QC0776-41081), TCF4, GenWay (GWB-4794E3, Lot.QC7859-41635) の 7 種を用いた。前 3 者は C 末端が蛋白全体、後 4 者は N 末端近傍の ITF2B に特異的なペプチド配列に対する抗体として選択した。得られた ChIP-DNA は standard Illumina ChIP-Seq ライブラリーに取り込み、200 万以上のリードを得た。

リードは human genome (hg19) にアラインメントし、重複リードを除去後、それぞれの抗体毎のアラインメントを得た。

4. 研究成果

cDNA マイクロアレイ解析

10nM MSH, 20 μ M forskolin, 300 μ M SQ22536, 10 μ M 培養ヒトメラノサイトに添加後 24 時間で total RNA を抽出し、GeneChip Expression Array 解析を行った。

Early response gene を中心に解析する目的で、24 時間での遺伝子発現解析を行った。実験系が正常に機能していることを確認するコントロールは、dopachrome tautomerase (DCT) 遺伝子発現の増加が、MSH 及び forskoline で確認された。

これまでに確認された、TFEB の遺伝子発現比については、cAMP 刺激時に比較して、SQ22536 によって 2 倍発現量が亢進していることから、実験系が正常に反応していることが示唆された。

マイクロアレイデータのデータマイニング

cAMP 刺激で発現が亢進した 24 遺伝子中パスウェイ解析で cAMP 関連遺伝子が 7 遺伝子 (29%) でその半数が Wnt シグナルにも関連する遺伝子であった。次に、cAMP シグナル活性化により発現低下し、cAMP シグナル阻害後に増加した 22 遺伝子中 Wnt シグナル関連遺伝子が 8 遺伝子 (36%) で cAMP 関連遺伝子は 4 遺伝子 (18%) であった (表 1)。

表1. cAMP活性化で発現低下、cAMP阻害で亢進

Gene Symbol	Human Pathway	Gene Symbol	Human Pathway
Down	Up	Down	Up
ADAM10	✓	ADAM10	✓
ADAM12	✓	ADAM12	✓
ADAM17	✓	ADAM17	✓
CA12	✓	CA12	✓
CA13	✓	CA13	✓
CA14	✓	CA14	✓
CA15	✓	CA15	✓
CA16	✓	CA16	✓
CA17	✓	CA17	✓
CA18	✓	CA18	✓
CA19	✓	CA19	✓
CA20	✓	CA20	✓
CA21	✓	CA21	✓
CA22	✓	CA22	✓
CA23	✓	CA23	✓
CA24	✓	CA24	✓
CA25	✓	CA25	✓
CA26	✓	CA26	✓
CA27	✓	CA27	✓
CA28	✓	CA28	✓
CA29	✓	CA29	✓
CA30	✓	CA30	✓
CA31	✓	CA31	✓
CA32	✓	CA32	✓
CA33	✓	CA33	✓
CA34	✓	CA34	✓
CA35	✓	CA35	✓
CA36	✓	CA36	✓
CA37	✓	CA37	✓
CA38	✓	CA38	✓
CA39	✓	CA39	✓
CA40	✓	CA40	✓
CA41	✓	CA41	✓
CA42	✓	CA42	✓
CA43	✓	CA43	✓
CA44	✓	CA44	✓
CA45	✓	CA45	✓
CA46	✓	CA46	✓
CA47	✓	CA47	✓
CA48	✓	CA48	✓
CA49	✓	CA49	✓
CA50	✓	CA50	✓
CA51	✓	CA51	✓
CA52	✓	CA52	✓
CA53	✓	CA53	✓
CA54	✓	CA54	✓
CA55	✓	CA55	✓
CA56	✓	CA56	✓
CA57	✓	CA57	✓
CA58	✓	CA58	✓
CA59	✓	CA59	✓
CA60	✓	CA60	✓
CA61	✓	CA61	✓
CA62	✓	CA62	✓
CA63	✓	CA63	✓
CA64	✓	CA64	✓
CA65	✓	CA65	✓
CA66	✓	CA66	✓
CA67	✓	CA67	✓
CA68	✓	CA68	✓
CA69	✓	CA69	✓
CA70	✓	CA70	✓
CA71	✓	CA71	✓
CA72	✓	CA72	✓
CA73	✓	CA73	✓
CA74	✓	CA74	✓
CA75	✓	CA75	✓
CA76	✓	CA76	✓
CA77	✓	CA77	✓
CA78	✓	CA78	✓
CA79	✓	CA79	✓
CA80	✓	CA80	✓
CA81	✓	CA81	✓
CA82	✓	CA82	✓
CA83	✓	CA83	✓
CA84	✓	CA84	✓
CA85	✓	CA85	✓
CA86	✓	CA86	✓
CA87	✓	CA87	✓
CA88	✓	CA88	✓
CA89	✓	CA89	✓
CA90	✓	CA90	✓
CA91	✓	CA91	✓
CA92	✓	CA92	✓
CA93	✓	CA93	✓
CA94	✓	CA94	✓
CA95	✓	CA95	✓
CA96	✓	CA96	✓
CA97	✓	CA97	✓
CA98	✓	CA98	✓
CA99	✓	CA99	✓
CA100	✓	CA100	✓

図1.

培養ヒトメラノサイトとcDNA Microarray (Affymetrix U133plus2)を用いた遺伝子発現プロファイリングデータの階層クラスタリング解析 (ヒートマップ) それぞれの条件での包括的遺伝子発現パターンを階層クラスタリングによりサブグループ化した。2つの間に、高い相関性が認められた。

1. Control
2. alpha MSH 10nM
3. Forskolin 20μM
4. SQ22536 300μM



クラスター解析とマウスメラノサイトのデータとの比較

遺伝子発現パターンの類似性を観るためにクラスター解析を行った。全検体でPまたはMフラグを示したプローブを用いてクラスタリングを行ったところ、cAMP刺激群の2つのデータがクラスターを形成した(図1)。cDNAオリゴマイクロアレイを用いて、DAVIDによるシグナル経路の同定を網羅的に行ったところ、マウスとほぼ同様に Wnt シグナルや、Notch シグナル、ホメオドメイン転写因子などを介した細胞増殖シグナル経路などに関連した遺伝子の発現変化が認められ、マウス由来のメラノサイトに類似した細胞内シグナルの修飾や変化が確認できた。しかしながら、活性化されるシグナルと、抑制されるシグナルが、マウスで見られるような、cAMPの刺激と抑制によって全く対称的に相反する方向に動くことが確認できず、マウス由来のメラノサイトではあるが、メラノーマに近い melan-a 細胞と、初代培養で多数の成長因子を加えて培養したヒト皮膚由来の培養メラノサイトの違いのためか、詳細に検討すると、シグナルの反応性が若干異なっていた。これが、種の違いによる相違かどうか、今後の検討が更に必要である。

miRNA 発現のマイクロアレイ解析と転写因子、パスウェイデータとの相関

miRNA microarray で培養ヒトメラノサイトに高発現している約 40 種類の miRNA を抽出した。継代培養後の複数の Asian 由来 2 ロット、Asian/Caucasian, Caucasian 由来の各 1 ロットの新生児包皮皮膚由来の初代培養メラノサイトの miRNA の発現を比較検討したが、ほぼ同様の結果を得た。次に cAMP シグナルを定常状態以下に抑制する adenylylate cyclase 阻害薬の SQ22536 添加時に低下し、反対に cAMP シグナルを刺激後には上昇がみられる miRNA を抽出し、qRT-PCR にてその発現を確認した。

TFEB および TFE3 の発現が cAMP シグナルを抑制したときに亢進するため、その mRNA の 3' UTR へ特異的結合後に、発現抑制する miRNA 検索を miRNA.org のサイトで施行した。hsa-miR-146a, 29a, 30b は発現低下が cAMP

抑制時に起こるため TFEB および TFE3 の発現上昇に何らかの役割を果たしている可能性があった。また、hsa-miR-146a, 29a の 2 者に関しては、2 つの転写因子に作用できる可能性があり、さらに種間の 3' -UTR のターゲットシ - ケンス保存も TargetScanS でみられた。cDNA アレイから得られた、活性化シグナルと miRNA 発現の関連付けを試みたが、miRTrail の相関性解析では、Wnt/Notch signal pathway や細胞周期関連で発現が変化する遺伝子群とメラノサイトで高発現している miRNA 発現パターンの中で、有意な相関は、得られたデータの mRNA・miRNA 統合解析では確認できなかった。

ChIP-seq 解析

SQ22536 添加メラノサイトのクロマチンを用いて、抗体毎に 7 回の ChIP 反応を行った。各々の 200 万以上のリードを得たため、ChIP 反応は問題ないと判断された。ゲノムに沿ったフラグメント密度をシグナルマップとして IGB 上で作製した。有意なピークを同定するために、MACS ピークを検索したところ、7 つのサンプルについて、それぞれピークは前 3 者で、307, 120, 354, 後 4 者では、ENCODE blacklist of false ChIP-Seq peaks を除外した値で、49, 296, 43, 33 で全てのサンプルで、バックグラウンドレベルに近かった。IGB のスクリーンショットを図 2 に示す。Ab185736, Lot. GR204909-1 については、弱いものの有意なピークが少数得られたが、シーケンスの読み深度が浅く、シーケンシングによる有意な遺伝子同定が出来なかった(図 2)。今後更に、次世代シーケンシング解析に適した抗体の検索が必要であると考えられた。

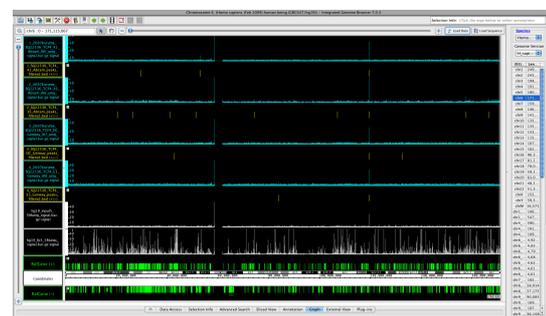
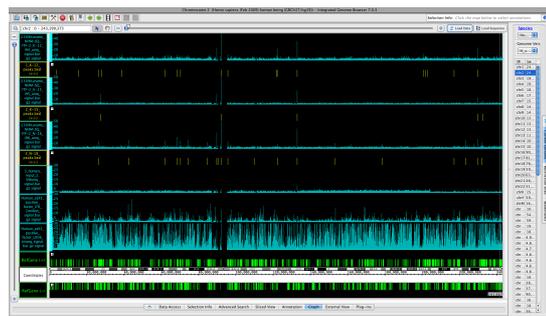


図 2 Entire chr2 及び 6 の IGB Export 画像 3 抗体[上]、4 抗体[下]の MACS ピークを示す

<引用文献>

1. Hida T et al., Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22:623-34, 2009
2. Furumura M, Sakai C, Potterf SB, Vieira WD, Barsh GS, Hearing VJ. Characterization of genes modulated during pheomelanogenesis using differential display. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7374-8, 1998
3. Furumura M, Potterf SB, Toyofuku K, Matsunaga J, Muller J, Hearing VJ. Involvement of ITF2 in the transcriptional regulation of melanogenic genes. *J Biol Chem.* 276:28147-54, 2001
4. Le Pape E, Passeron T, Giubellino A, Valencia JC, Wolber R, Hearing VJ. Microarray analysis sheds light on the dedifferentiating role of agouti signal protein in murine melanocytes via the Mc1r. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 106:1802-7.

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)

- Tsuchisaka A, Furumura M, Hashimoto T. Cytokine Regulation during Epidermal Differentiation and Barrier Formation. *J Invest Dermatol* 査読有 134: 1194-1196, 2014
doi: 10.1038/jid.2014.15.
- Kawachi Y, Maruyama H, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ichikawa E, Furumura M, Otsuka F: NF1 gene silencing induces upregulation of vascular endothelial growth factor expression in both Schwann and non-Schwann cells. *Exp Dermatol*. 査読有 22:262-5, 2013.
doi: 10.1111/exd.12115.
- 古村南夫:メラノサイトの細胞内シグナル解析によるカフェオレ斑発症機序の解明 *日本レ病学誌*, 査読無 4: 48-53: 2013

〔学会発表〕(計2件)

- 古村南夫:分子標的薬治療による色素沈着症と白斑,第1回日本白斑研究会総会, 2015年4月,グランフロント大阪タワー, 大阪
- 古村南夫:メラノサイトの細胞内シグナル解析によるカフェオレ斑発症機序の解明 Non-Ras-GAP functions of neurofibromin in melanocytes may be involved in the pathogenesis of café-au-lait spots, 第4回日本レックリ

ングハウゼン病学会(JSRD), 2012年11月,慶應義塾大学三田キャンパス,東京

〔図書〕(計3件)

- 古村南夫, NF1 like syndrome (Legius症候群)とカフェオレ斑を伴う症候群,皮膚科臨床アセット 15(金田真理編), 173-6, 中山書店, 東京, 2013
- 古村南夫, 神経線維腫症1型の色素斑の病態,皮膚科臨床アセット 15(金田真理編), 177-80, 中山書店, 東京, 2013
- 古村南夫, メラニン生成機序:最新の理解,皮膚科臨床アセット 11(古江増隆編), 14-22, 中山書店, 東京, 2012

〔産業財産権〕

出願状況

なし

取得状況

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

古村 南夫 (FURUMURA Minao)
久留米大学・医学部皮膚科・准教授
研究者番号: 10315070

(2)研究分担者

橋本 隆 (HASHIMOTO Takashi)
久留米大学・皮膚細胞生物学研究所・教授
研究者番号: 20129597