

101. 濾胞性リンパ腫における染色体転座の発生機構の解明

山根 有人

Key words : 染色体転座

群馬大学 大学院医学系研究科
病態腫瘍薬理学講座

緒言

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¹⁾、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。特にパークリットリンパ腫でみられる IgH-Myc 転座に関して、これまで染色体転座の発生にどちらも重要と言われていた (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 ダメージの比較をして、(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。また、筆者は本研究に関わる RAG 蛋白の網羅的な結合についても同蛋白の発見者である David Schatz 博士のグループとの共同研究により検討を行った経験がある。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。

方法、結果および考察

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、後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。

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、AriaII 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、OP9 細胞との共培養を行うことにより、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。

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ず、これによる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、染色体転座の発生と関わっている可能性²⁾も示唆されているが、BCL-2 領域に関しては転座のホットスポットに CTCF 結合領域は認められず、関与は少ないことが示唆された。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。

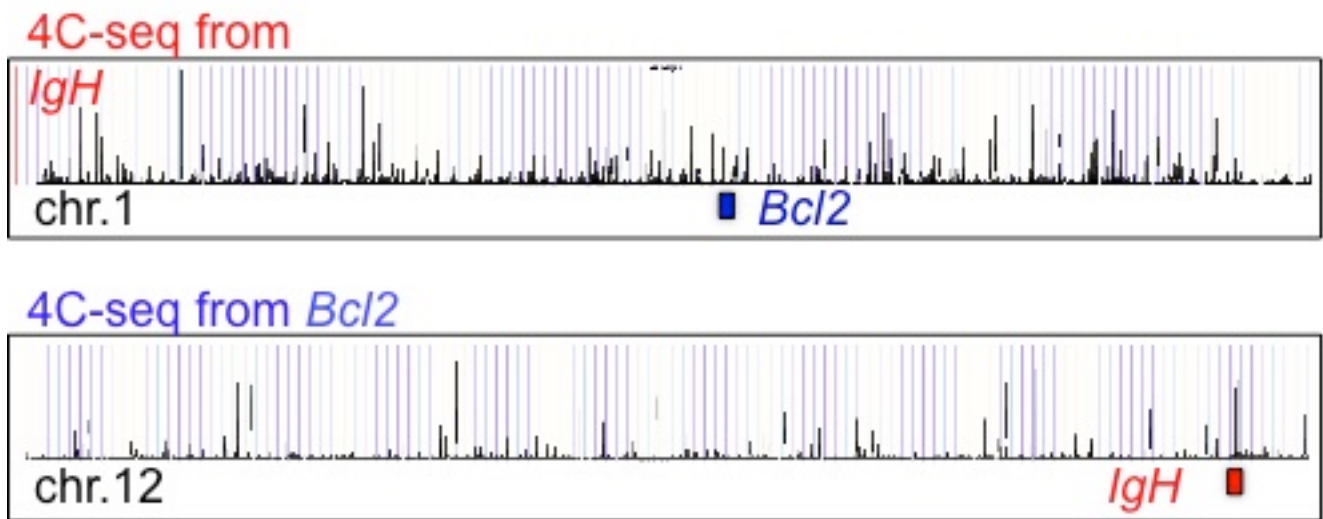


図1. 4C-seqによるコンタクト頻度.

クロスリンクしたマウス ProB 細胞を用い、IgH および Bcl-2 領域に設定したプライマーを用いてそれぞれの領域からの物理的近接性を評価した。これらの領域が特異的に近接しているわけではないことが明らかである。

DNA ダメージの評価については RPA CHIP-SEQ 法や BLESS 法を用いてゲノムワイドに解析を行う予定であるが、現時点ではその条件検討のための予備実験を行っており、確立次第、その評価を行い、広く使用されている RAG ノックアウトマウスも使用し、RAG による DNA ダメージの評価も行う予定である。また近年同定されたクラススイッチ関連因子である RIF1³⁾についてもそのコンディショナルノックアウトマウスを用いて今後評価して行く予定である。また共同研究者の研究室にて筆者も関わった RAG 蛋白質の直接の結合領域を CHIP-Seq 法にて観察するための抗体等の技術も最近になり開発されており⁴⁾、今後、これを利用して特に BCL2 領域の転座ホットスポットでの RAG 蛋白質の結合についても評価を行っていく。

以上のように時間的な制約から研究については現時点では目標の未達部分が多くあるが、研究施設に新たな次世代型シーケンサーも導入され、解析環境も整ってきたため、今後の展開を見込んでいる。

共同研究者

本研究の共同研究者は群馬大学大学院医学系研究科の大高行博である。

文 献

- 1) Kouzine, F., Wojtowicz, D., Yamane, A., Resch, W., Kieffer-Kwon, K. R., Bandle, R., Nelson, S., Przytycka, T., Levens, D. & Casellas, R. : Global regulation of promoter melting in naive lymphocytes. *Cell*, **153** : 988-999, 2013.
- 2) Nakahashi, H., Kwon, K. R., Resch, W., Vian, L., Dose, M., Stavreva, D., Hakim, O., Pruett, N., Nelson, S., Yamane, A., Qian, J., Dubois, W., Welsh, S., Phair, R. D., Pugh, B. F., Lobanenko, V., Hager, G. L. & Casellas, R. : A Genome-wide map of CTCF multivalency redefines the CTCF code. *Cell Rep.*, **3** : 1678-1689, 2013.
- 3) Di Virgilio, M., Callen, E., Yamane, A., Zhang, W., Jankovic, M., Gitlin, A. D., Feldhahn, N., Resch, W., Oliveira, T. Y., Chait, B. T., Nussenzweig, A., Casellas, R., Robbiani, D. F. & Nussenzweig, M. C. : RIF1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science*, **339** : 711-715, 2013.
- 4) Teng, G., Maman, Y., Resch, W., Kim, M., Yamane, A., Qian, J., Kieffer-Kwon, K. R., Mandal, M., Ji, Y., Meffre, E., Clark, M. R., Cowell, L. G., Casellas, R. & Schatz, D. G. : RAG represents a widespread threat to the lymphocyte genome. *Cell*, **162** : 751-765, 2015.