

# 分子生命科学

Shinpei Kawaoka (Charlie)

Group leader, Contextual Biology Group,  
JST ERATO SATO Live Bio-forecasting project

Senior Researcher, Disease Dynamics group

The Thomas N. Sato BioMEC-X Laboratories

Advanced Telecommunication Research International (ATR)

# 講義の目的

- 複製、転写、翻訳、代謝、シグナル伝達などの基礎知識
- ゲノム以外のオミクスデータの基礎知識
- ゲノムデータを扱う上での遺伝学、進化学の基礎知識

を理解する

# 全部は無理なので。。。

- 比較的最新の創薬の流れの一部を理解する、というモチベーションで講義をすすめます
- そういった現場の研究に、今回の実習で習ったNGS解析がどのように使われているかを理解することも目指します

(ちょっとジャーナルクラブ的な感じで。。。)

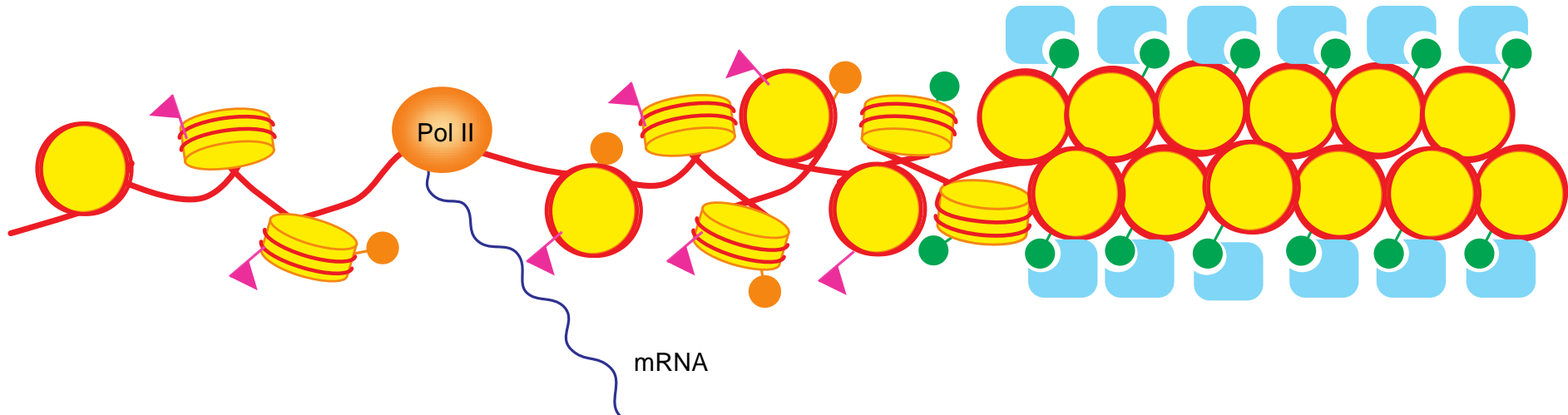
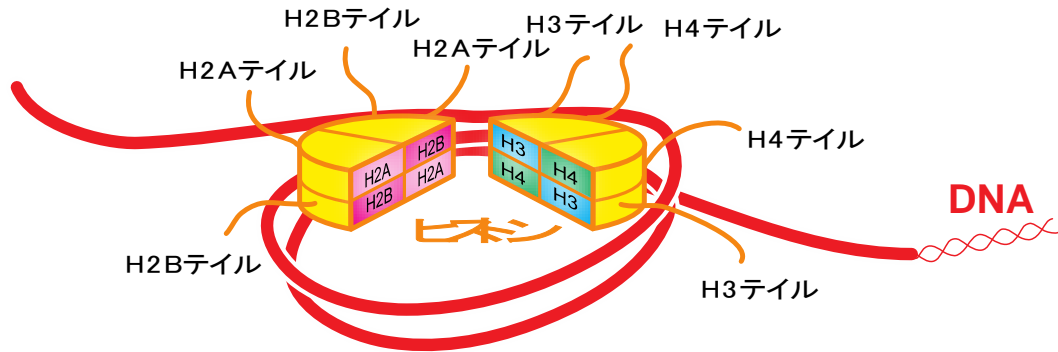
# 疾患とエピジェネティクス

- せっかくなので、ChIP-seqを使った実験がどんなふうに使役されたか、役に立ちつつあるか、ということ、河岡自身の体験談などに基づいて説明
- 上記を説明する、という文脈で、基本的な知識を解説
- 仲野徹先生の「エピジェネティクス」おすすめです

# ジェネティクス、エピジェネティクス

- ジェネティックな変異—DNA配列そのものの変異
- エピジェネティックな変異—DNA配列の変化を伴わない、DNA周辺環境の変化 (DNAのメチル化とか、ヒストンの修飾とか)

# ざっくり説明すると



# 分かりやすい例として、がん

- がん(悪性腫瘍)の発生には、染色体転座などによる新たながん遺伝子の登場(BCR-ABLなど)、ポテンシャルながん遺伝子の制御異常(例えばMycの過剰発現)、がん抑制遺伝子の変異、不活性化(例えばp53など)が伴うことが知られている。基本的に、このようなgeneticな変異は、巻き戻すことができない。

# 疾患に特異的なエピジェネティックな変化

- DNAメチル化プロファイルの変化 (DNAメチル化は基本的に当該領域の転写を負に制御すると考えられている)
- エンハンサーのレパートリーの変化 (疾患特異的なエンハンサー→あとで詳しく説明)
- エピジェネティックな制御を行う遺伝子の変化 (そもそも白血病などでは、エピジェネティックな制御を行う遺伝子のジェネティックな変異がその原因になっているケースが多い)



Genetic=(基本的には)irreversible

Epigenetic=reversible

- 上記のような考えが、「エピジェネティックな変化」をターゲットにして疾患を治療したらいいんじゃないか、という考えを産んでいる(もののひとつである)

# エピジェネティクスと創薬の (ポテンシャルな)成功例について紹介

- キーワード: RNAi、RNAiスクリーニング、クロマチン制御タンパク質、Brd4、JQ1/iBET、エンハンサー、エンハンサーセラピー

# 薬のターゲットはどうやって探すのか？

- RNAiスクリーニング
- 仮説ベース
- 化合物ライブラリー

# RNAiスクリーニング

## RNAiのしくみ

- ビデオ

(<https://www.youtube.com/watch?v=QMoeqCBoljQ>)をみる

# そもそもRNAiの仕組み

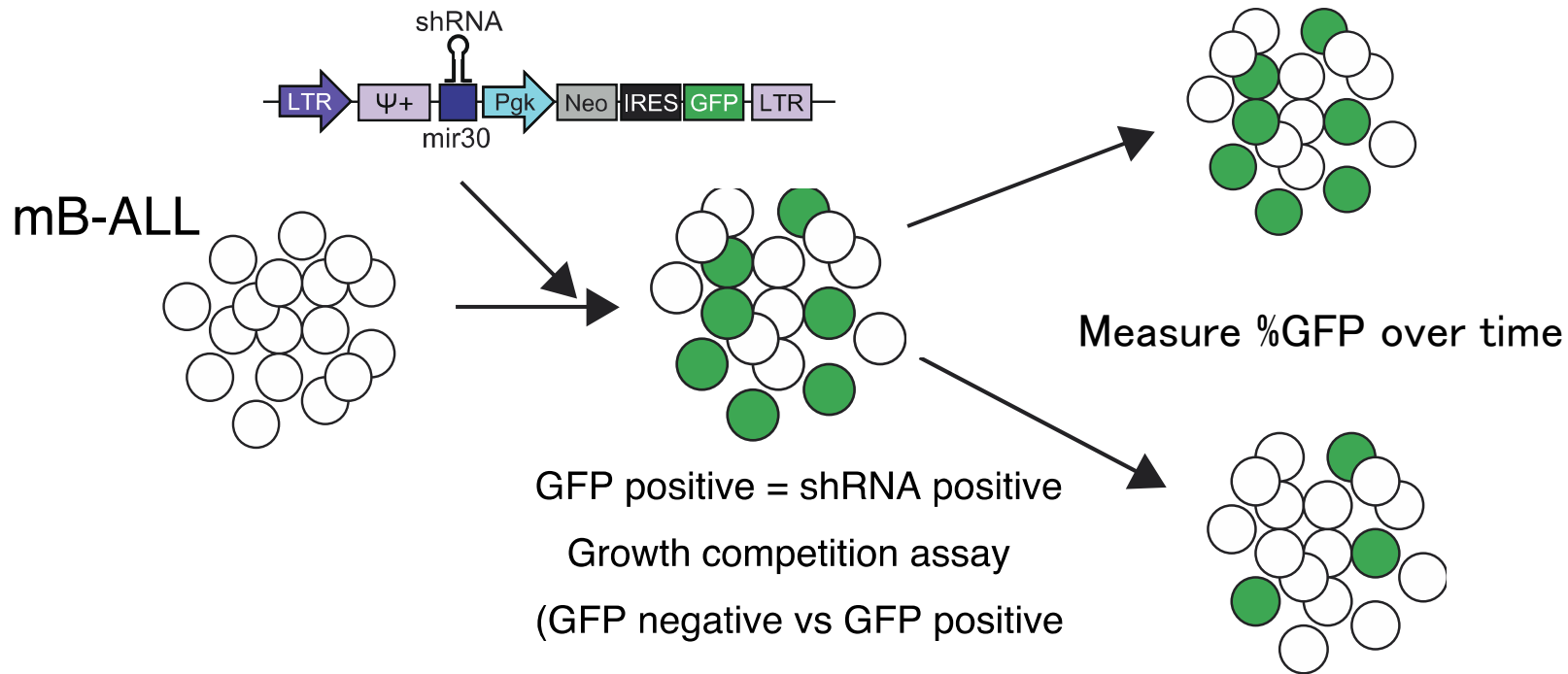
- エフェクタータンパク質Argonaute (イメージ: はさみ)
- Agoをガイドすることのできる小さなRNA

# そもそもRNAiの仕組み

- ガイドの小さなRNAの配列をこちらでデザインしてやれば、自分の好きな配列をターゲットすることができる
- たくさんのターゲット配列のセット→ライブラリ、と呼ぶ

# How RNAi screen works

Retroviral vector harboring a shRNA and GFP

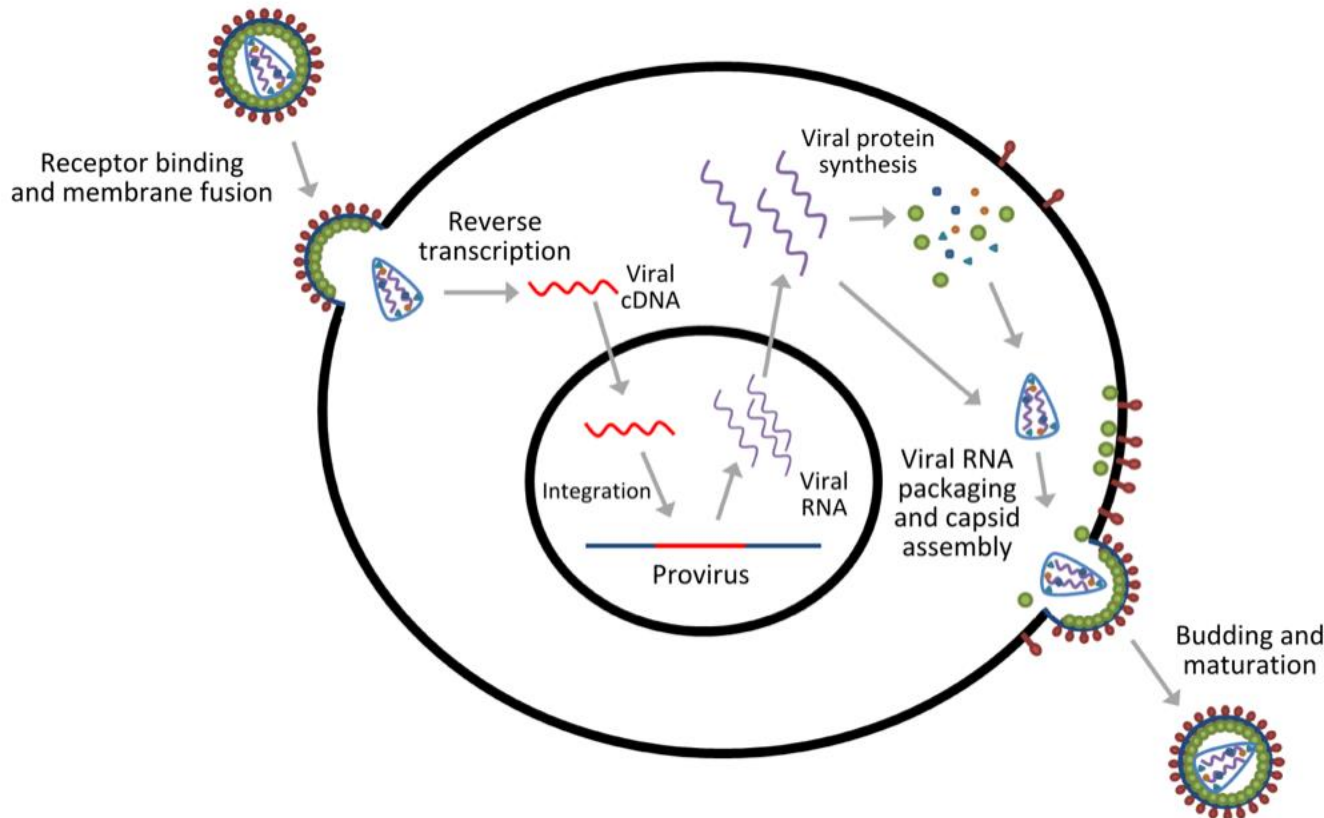
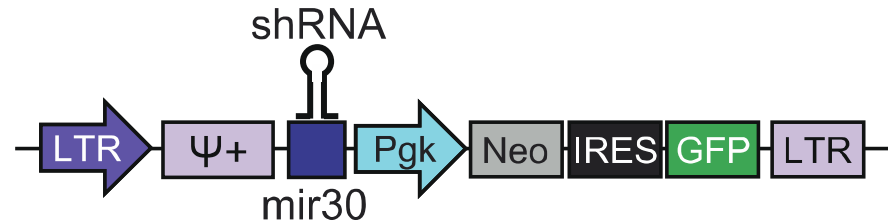


**GFP depletion = critical role in cell cycle/survival**

1. Measure %GFP on day2 and day12 by flow cytometry
2. Score "GFP fold depletion" by day2/day12

# レトロウイルスベクター

## Retroviral vector harboring a shRNA and GFP



<http://www.labome.com/method/Nucleic-Acid-Delivery-Lentiviral-and-Retroviral-Vectors.html>



# がん細胞のサバイバルに必須な 遺伝子を探す

- 同じことをいろいろな細胞種に対して行うことで、がん細胞は殺すけれども正常細胞は殺さない、というようなファクターを探すことが可能

# 化合物ライブラリー 「かたち」が分かっていることの重要性

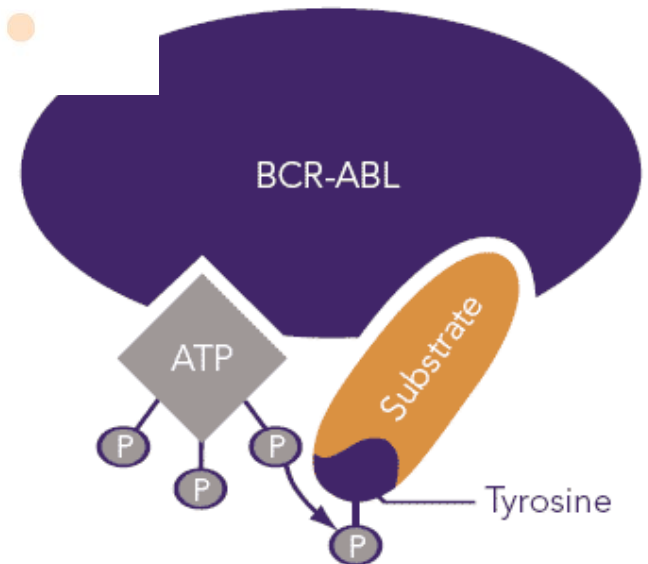
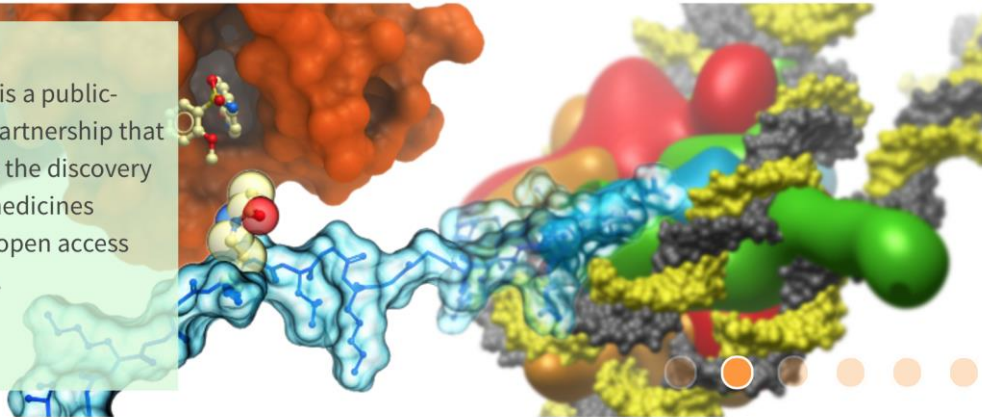
 Search

News Careers Publications Contact

About Science Reagents & Resources People News & Outreach

## About

The SGC is a public-private partnership that supports the discovery of new medicines through open access research.



# 仮説ベースの考え方

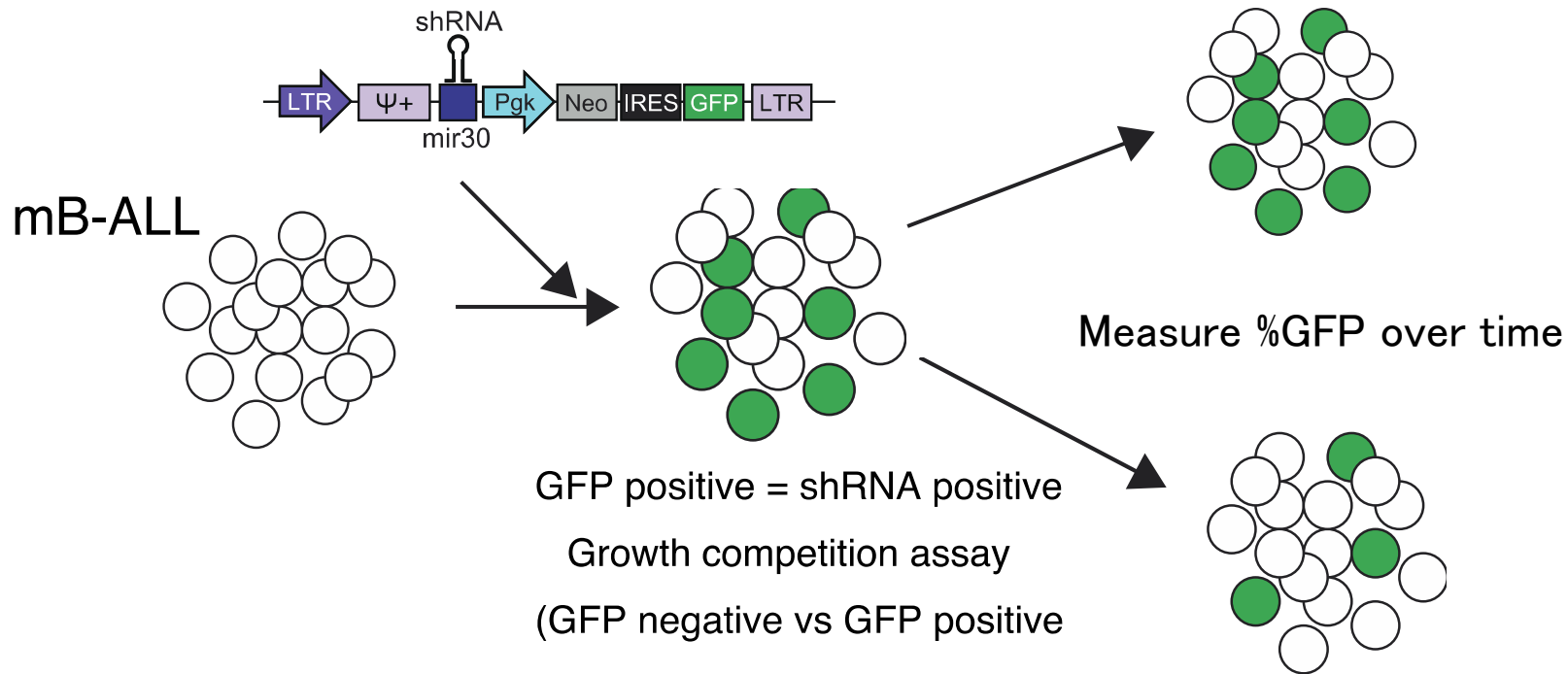
- これをたただけばいいんじゃないか、という仮説に基づいてとりあえずやってみる
- (主観)誰かがこれを見つけた、という情報を得て後だしでやっているように見えるときもある。。。

# 本題

- 前半—RNAiスクリーニングによって実際に抗がん剤が開発されつつある様子を、RNAiの基礎知識やウイルスベクターについて学びながら解説
- 後半—前半部分の機能的、生物学的根拠が、NGSを使った実験で明らかにされていく様子を解説

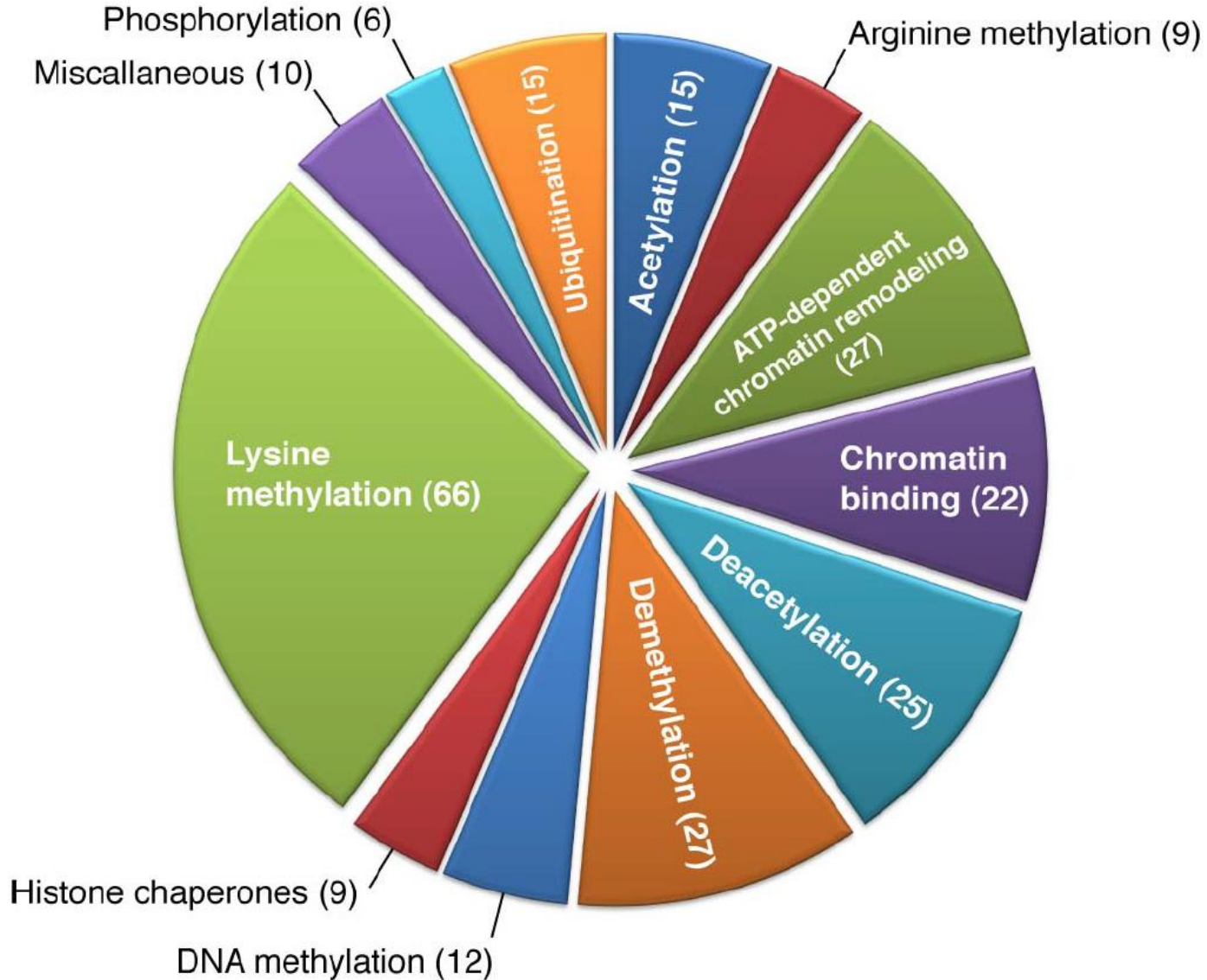
# How RNAi screen works

Retroviral vector harboring a shRNA and GFP



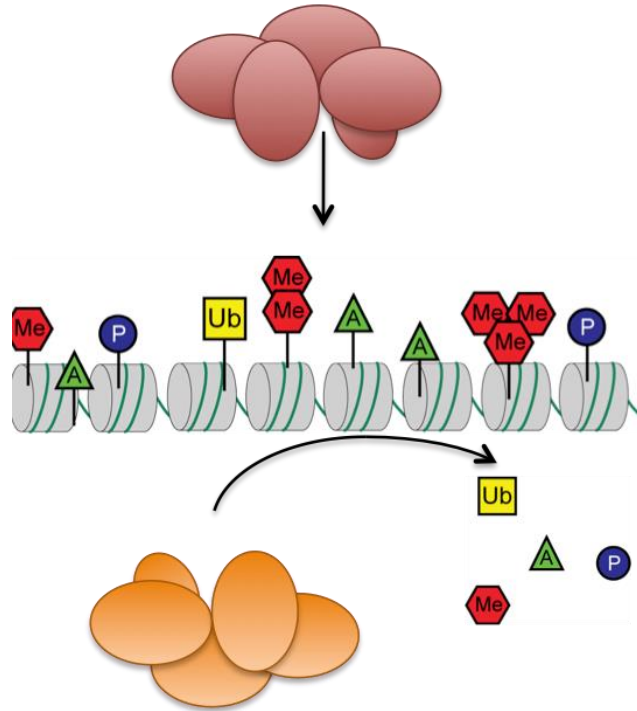
1. Measure %GFP on day2 and day12 by flow cytometry
2. Score "GFP fold depletion" by day2/day12

# クロマチン制御因子



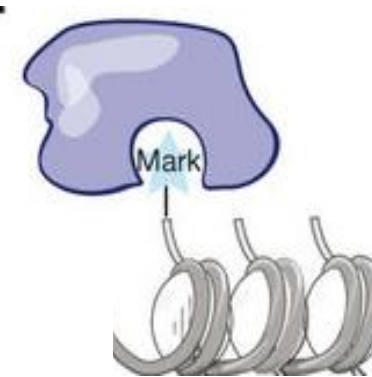
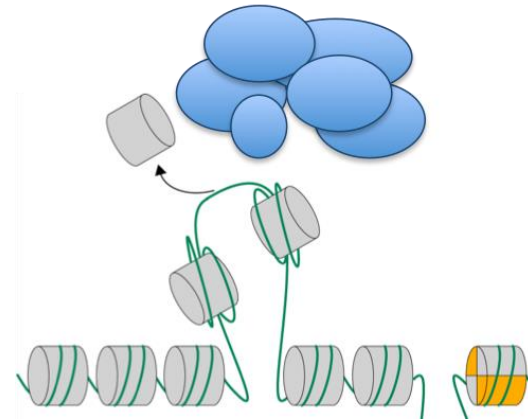
# クロマチン制御因子

‘Writers’



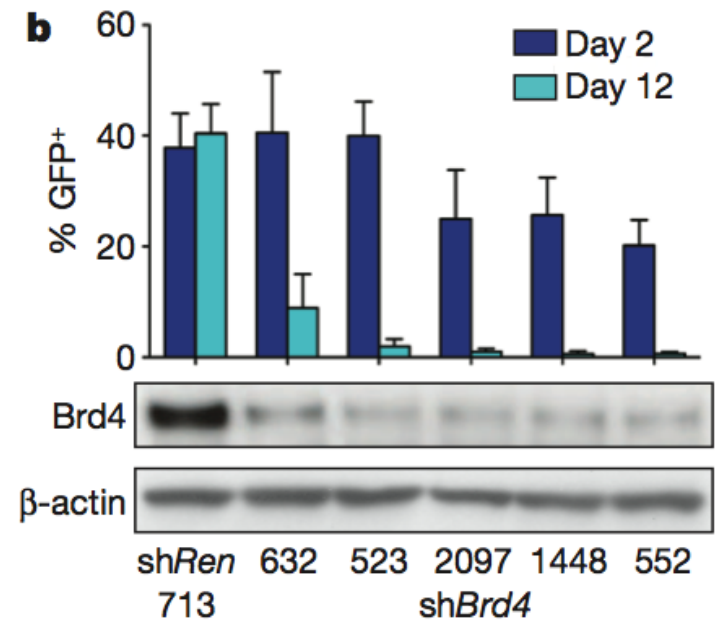
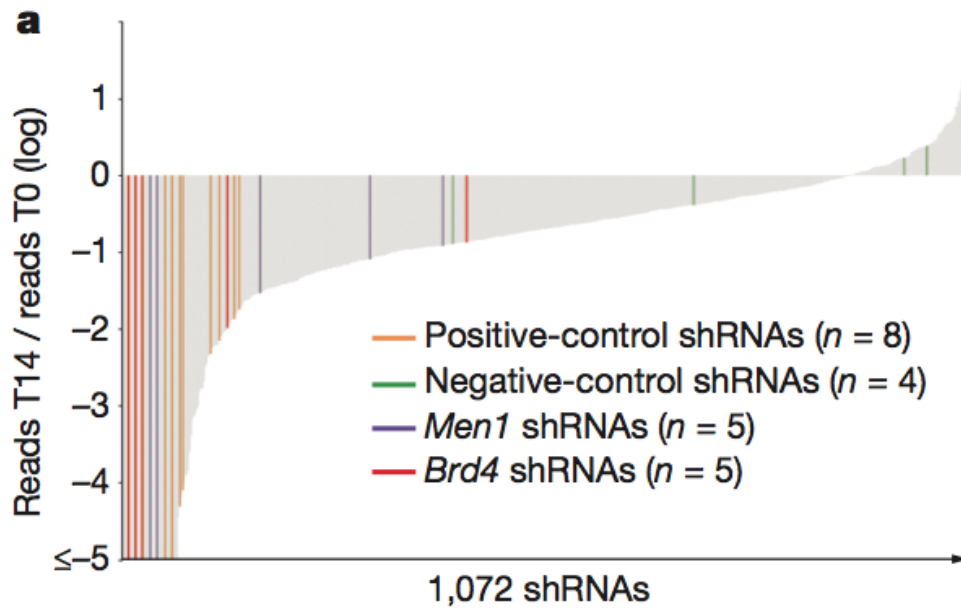
‘Erasers’

‘Remodelers’



‘Readers’

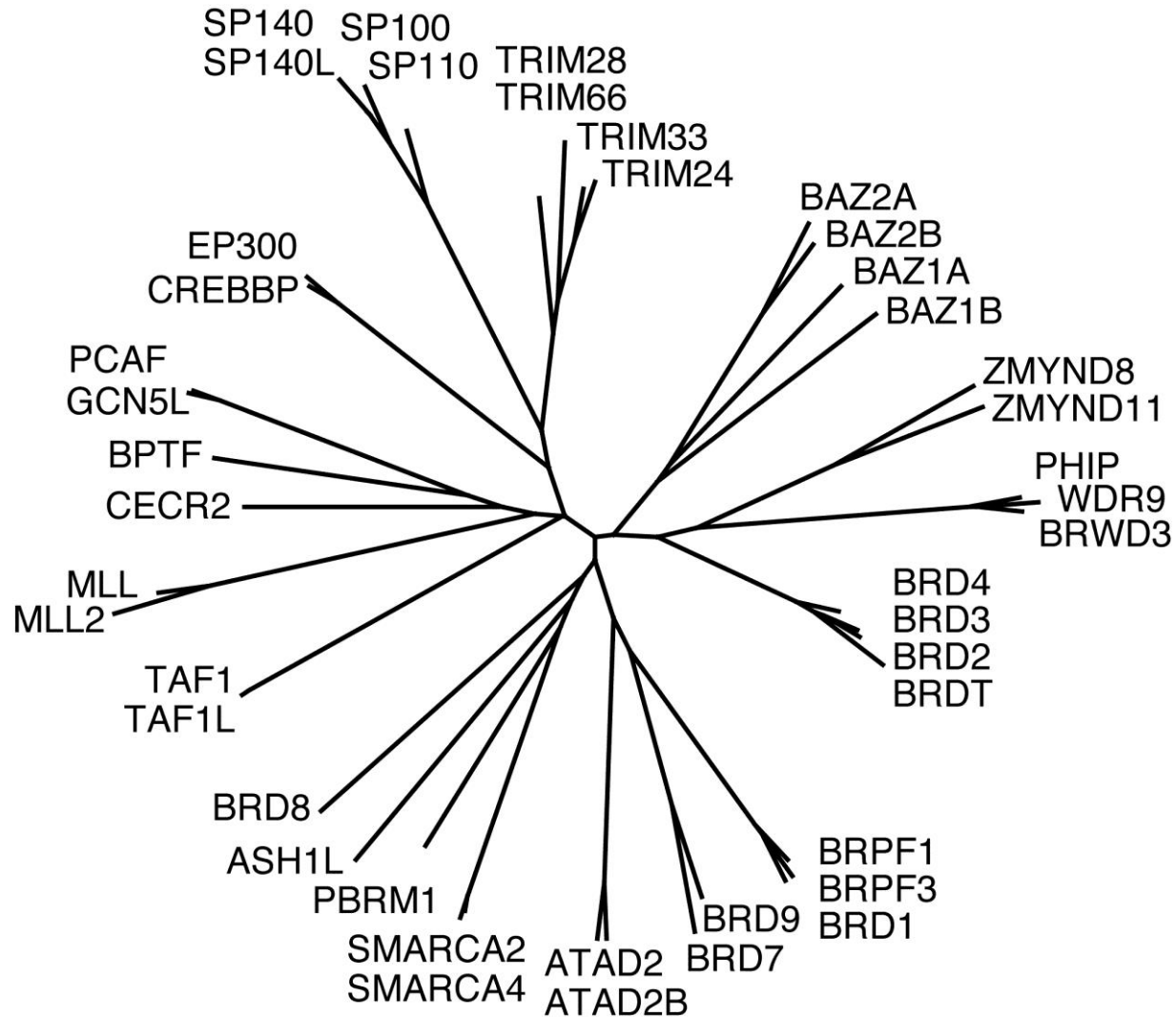
# RNAiスクリーニングの実際 (Zuber et al., 2011 Nature)



Zuber et al., 2011 Nature



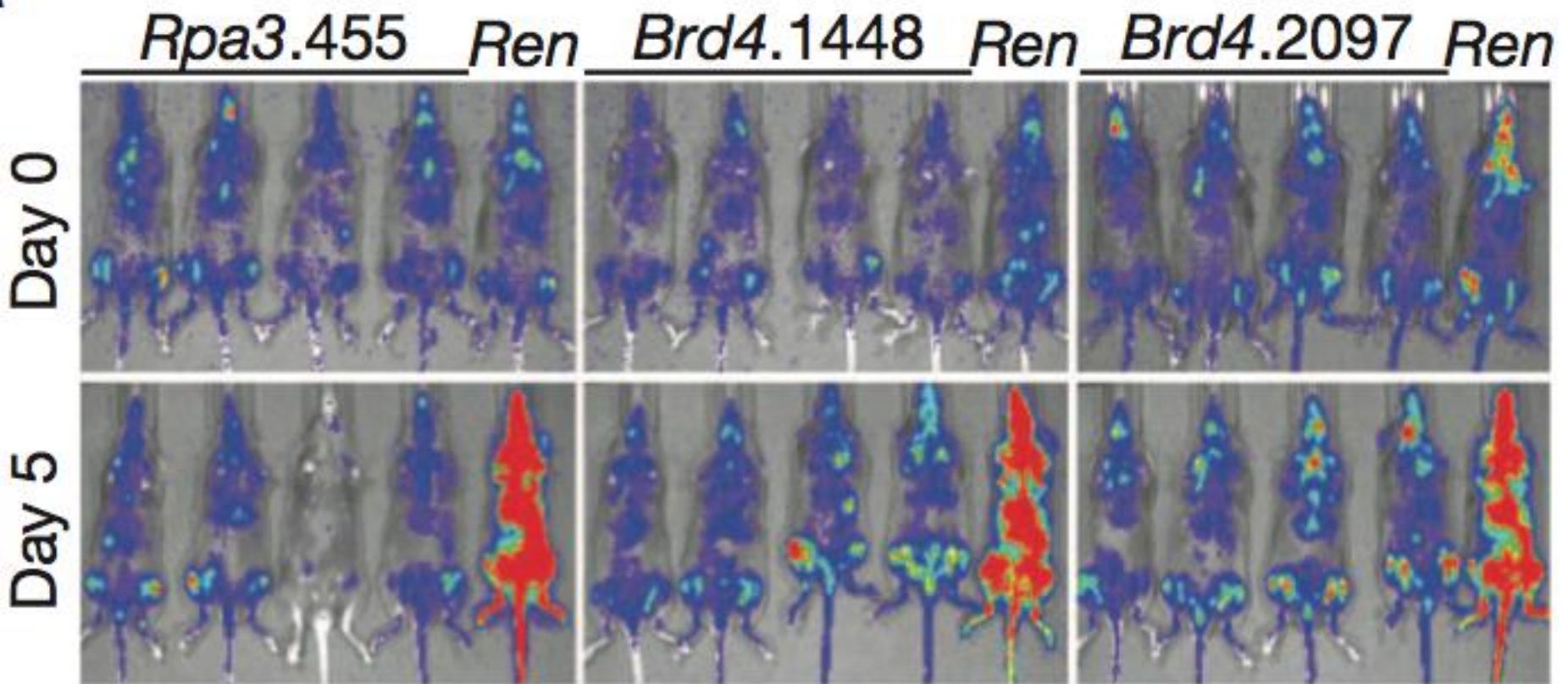
# ブロモドメインタンパク質



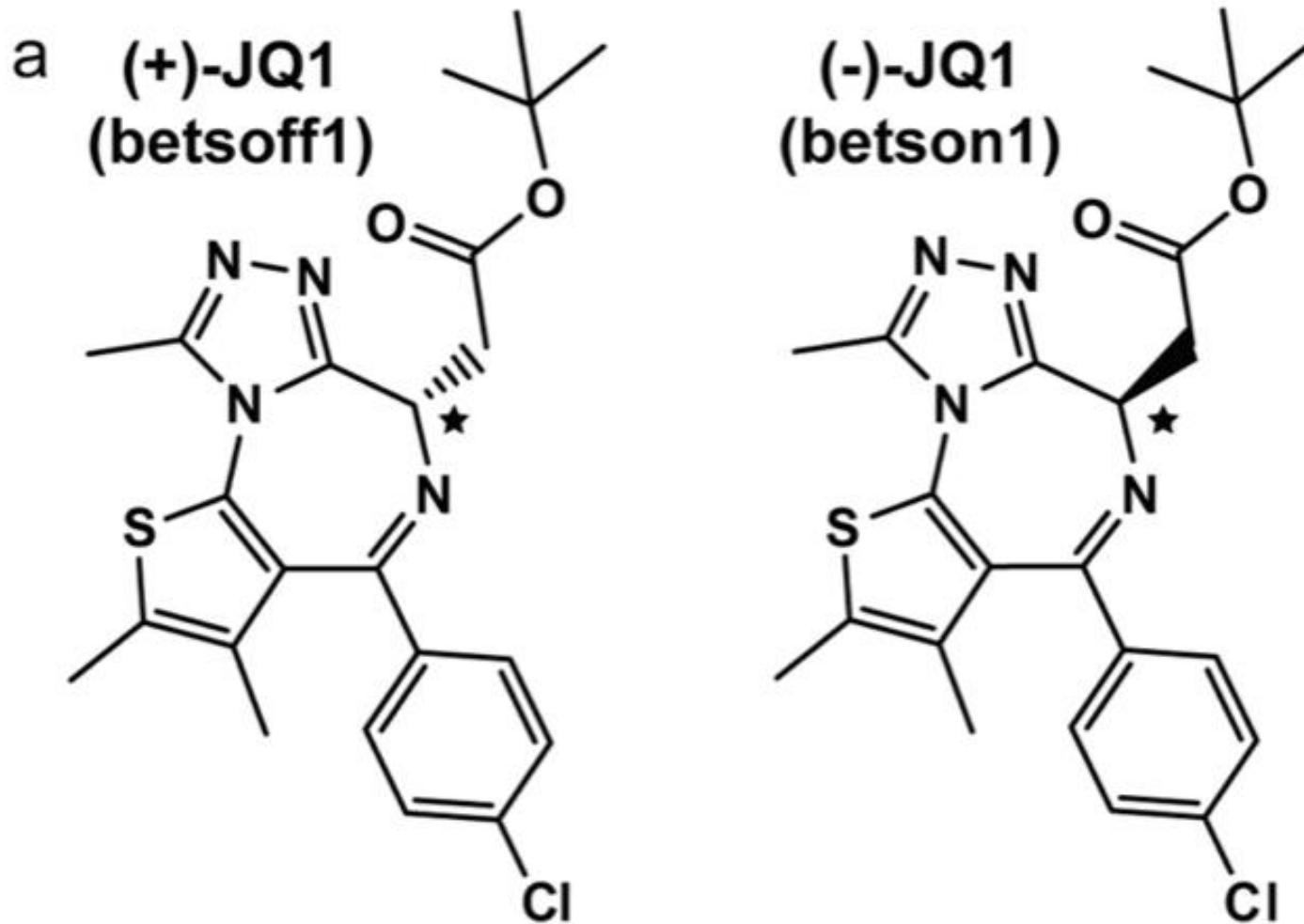
# Brd4 (Bromo-domain containing4)

- ブロモドメイン→アセチル化ヒストン結合ドメイン
- アセチル化ヒストン→多くが「転写活性○」マーク

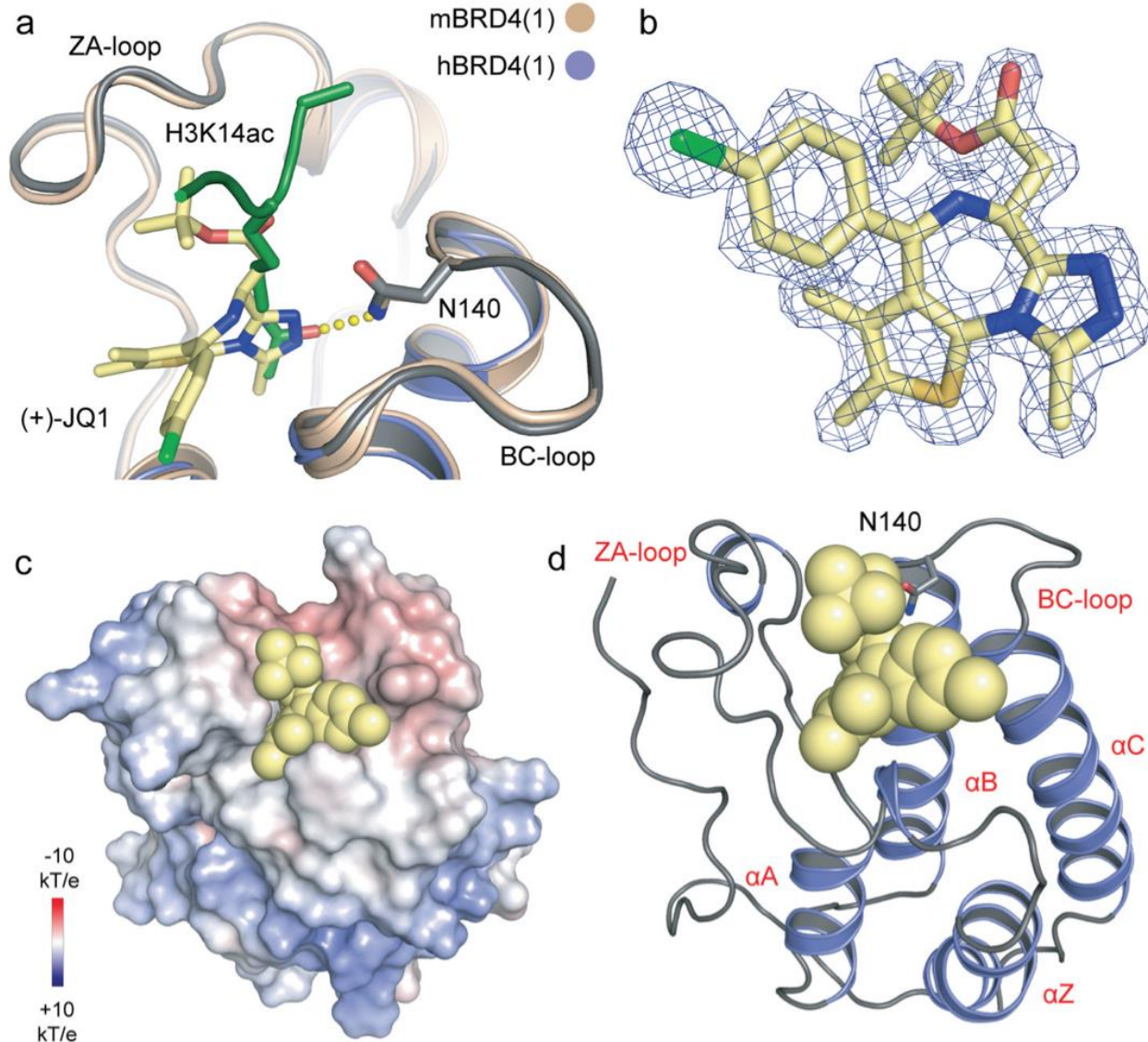
# マウス個体における実験でも、Brd4 ノックダウンによる白血病細胞の死が 確認された



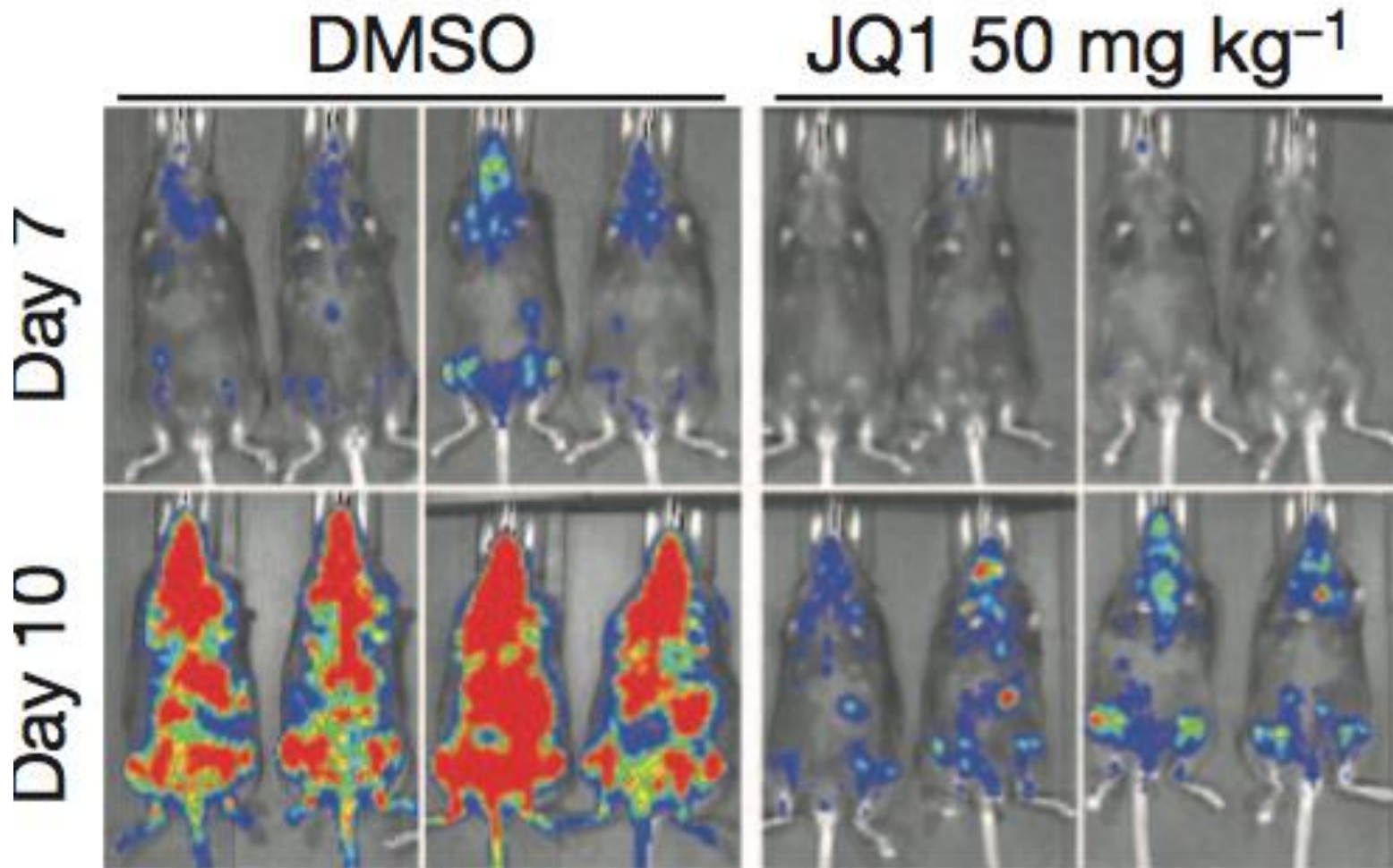
# RNAiスクリーニングと化合物合成が かみあった！



# JQ1はBrd4(とBrd1-3, そしてBrd-T)の ブロモドメインに結合する



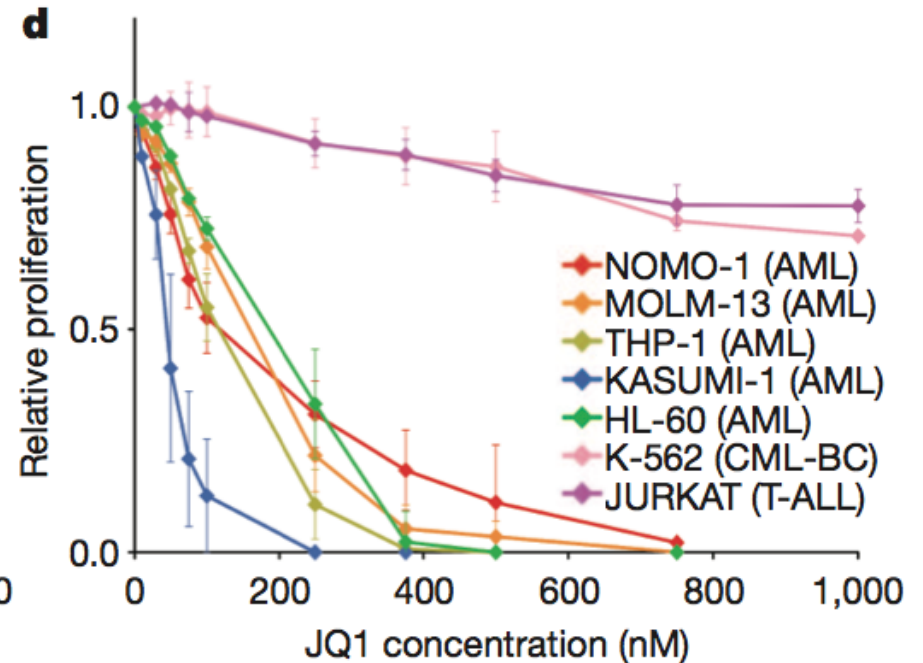
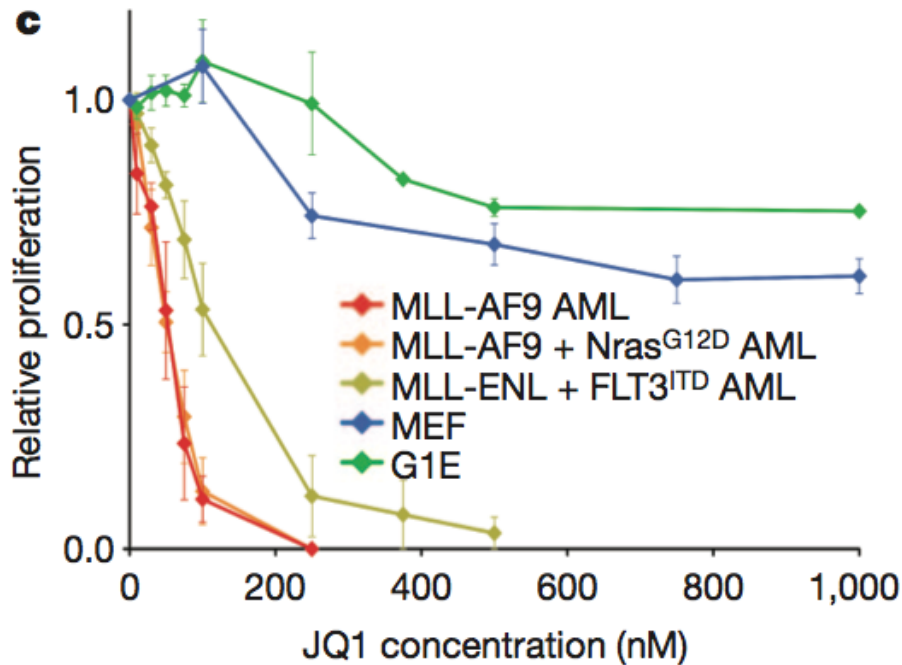
# JQ1によるanti-leukemic effect



# Brd4をターゲットにする合理性

- Brd4がなくても大丈夫な細胞がたくさんある
- Brd4の発現自体は特異的ではない。。。。

# なのに、Brd4がなくても死なない細胞がある



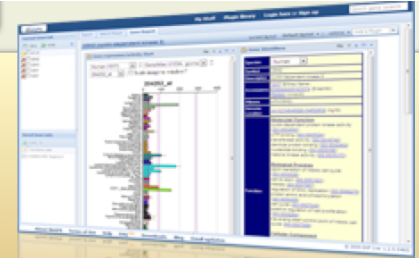


# BioGPS




## BIOGPS


A free *extensible* and *customizable* **gene annotation portal**, a complete resource for learning about **gene and protein function**.




[Plugins »](#) [Datasets »](#)

## Simple to use

1  **Search**  
for your gene of interest

2  **View**  
the gene annotation report

3  **Browse**  
the gene report layouts

4  **Build**  
your own gene report

[Details »](#)

## Search genes here:

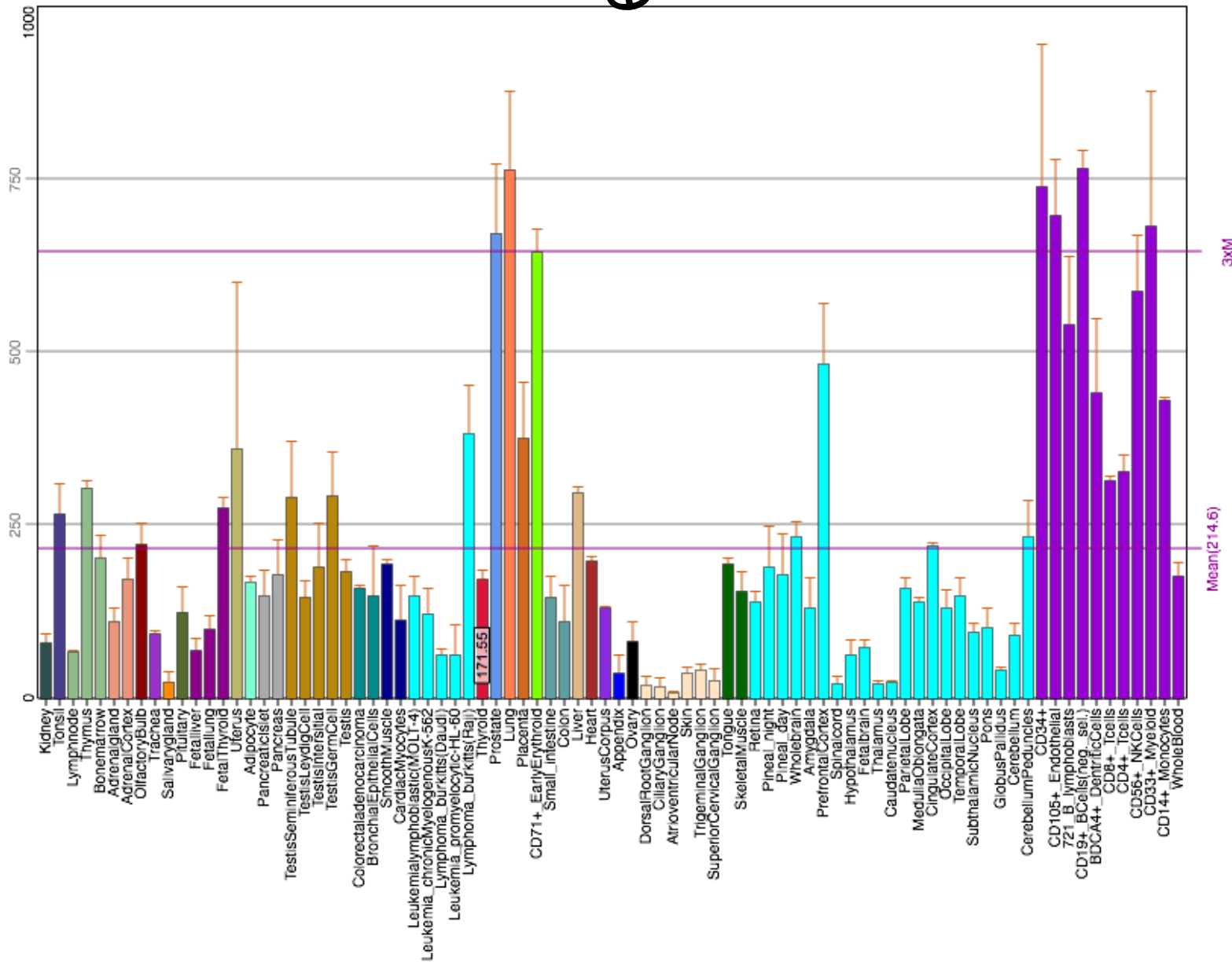
Press Ctrl-Enter or click

## Example Searches

(click to try these samples)

[Gene Symbol\(s\)](#)  
[Wildcard queries](#)  
[Gene Ontology](#)  
[Affymetrix IDs](#)  
[Interpro](#)  
[Genomic interval](#)

# Brd4はいろんな組織で発現している

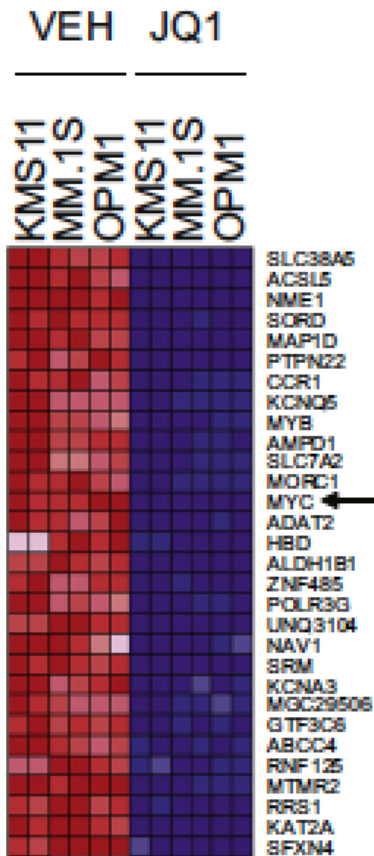


# 一体なんのせいで死ぬのか？

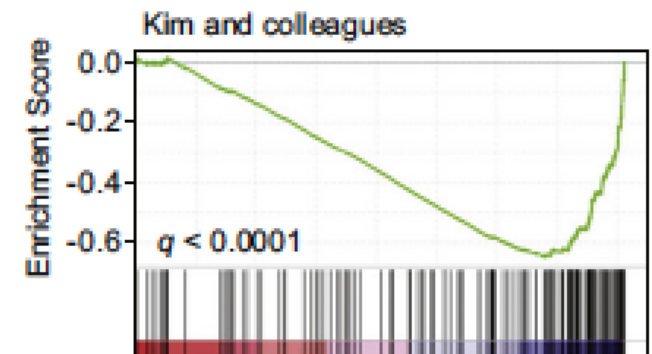
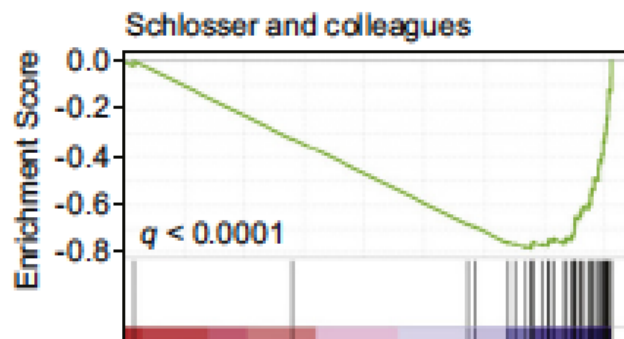
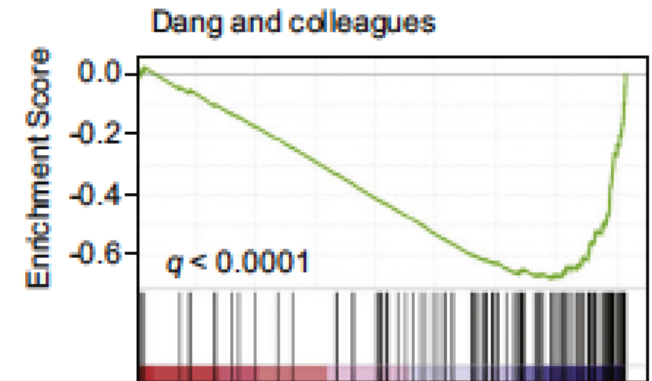
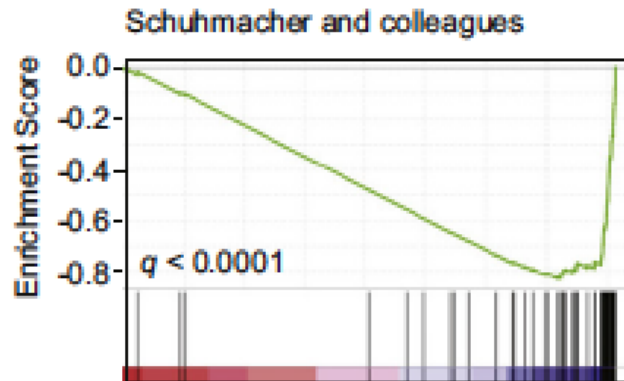
- どういうふうにしたら理解できるか？

# Brd4 RNAi/JQ1处理 → NGS Gene Set Enrichment Analysis

A



B

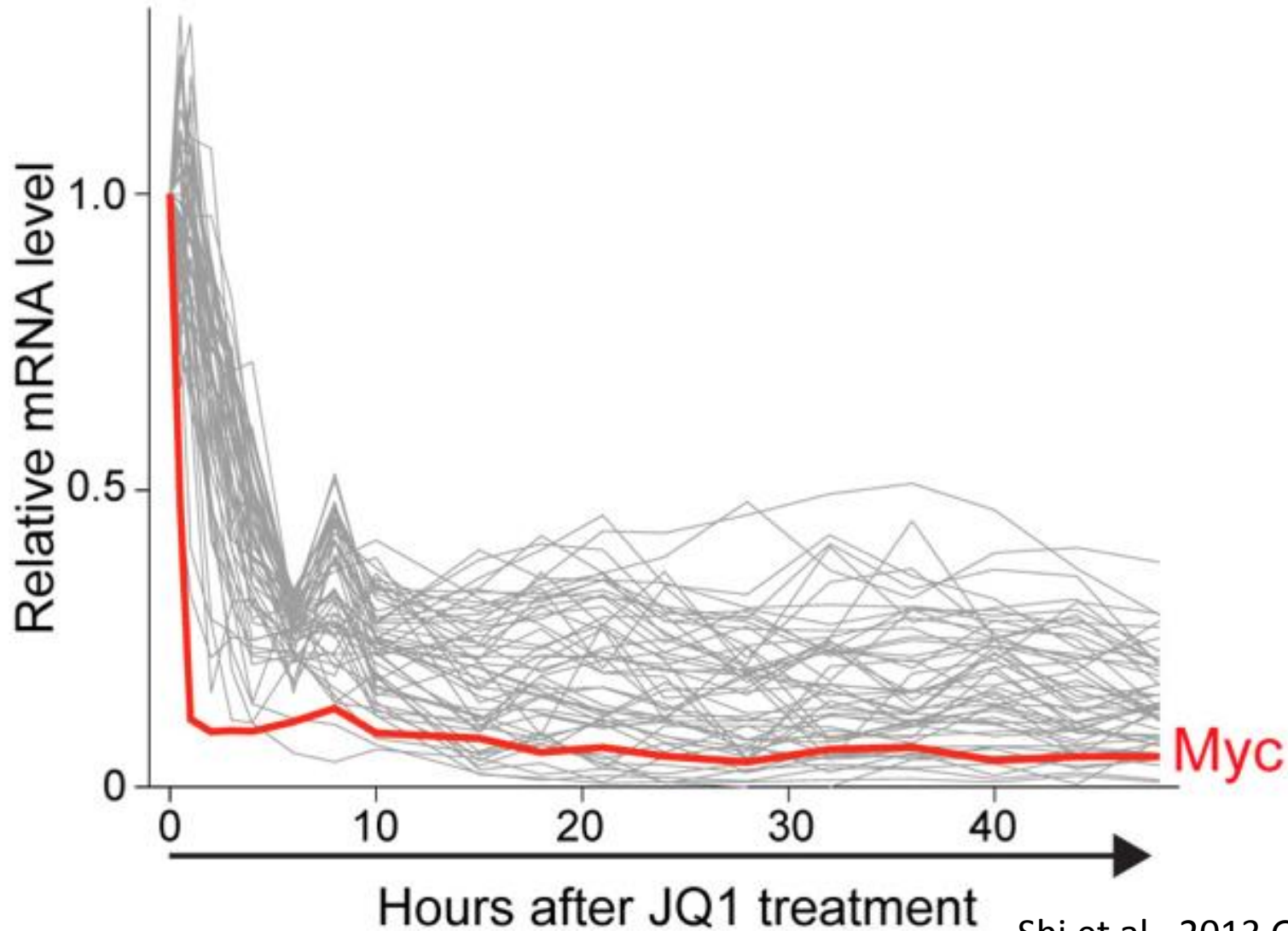


# 変化≠大事

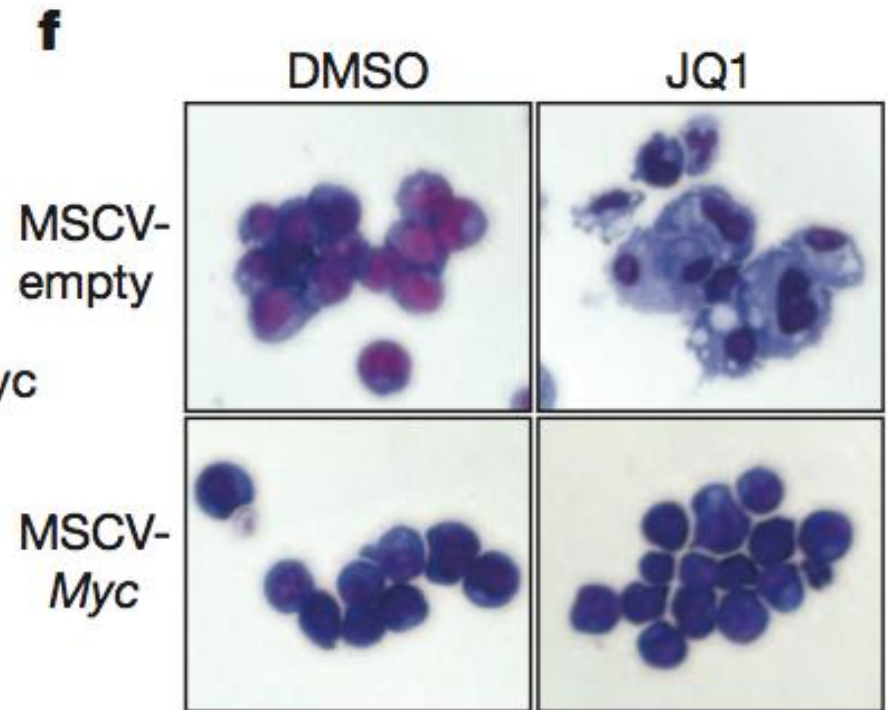
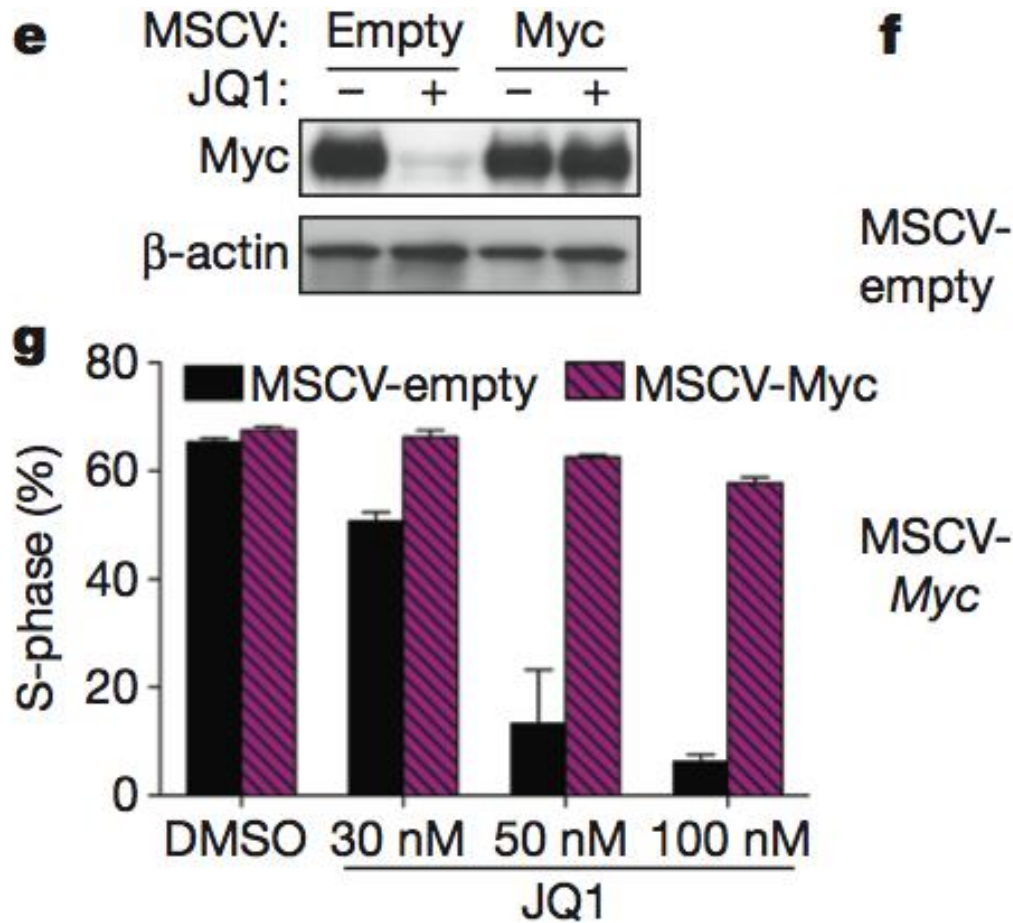
- どういうふうにしたら大事な変化を見つけられるか？
- 変化≠大事、というのは、解析をする上でも意識しておくの良い事実のひとつだと思います

# タイムコース(それでも間接的)

A



# 遺伝学的レスキュー実験



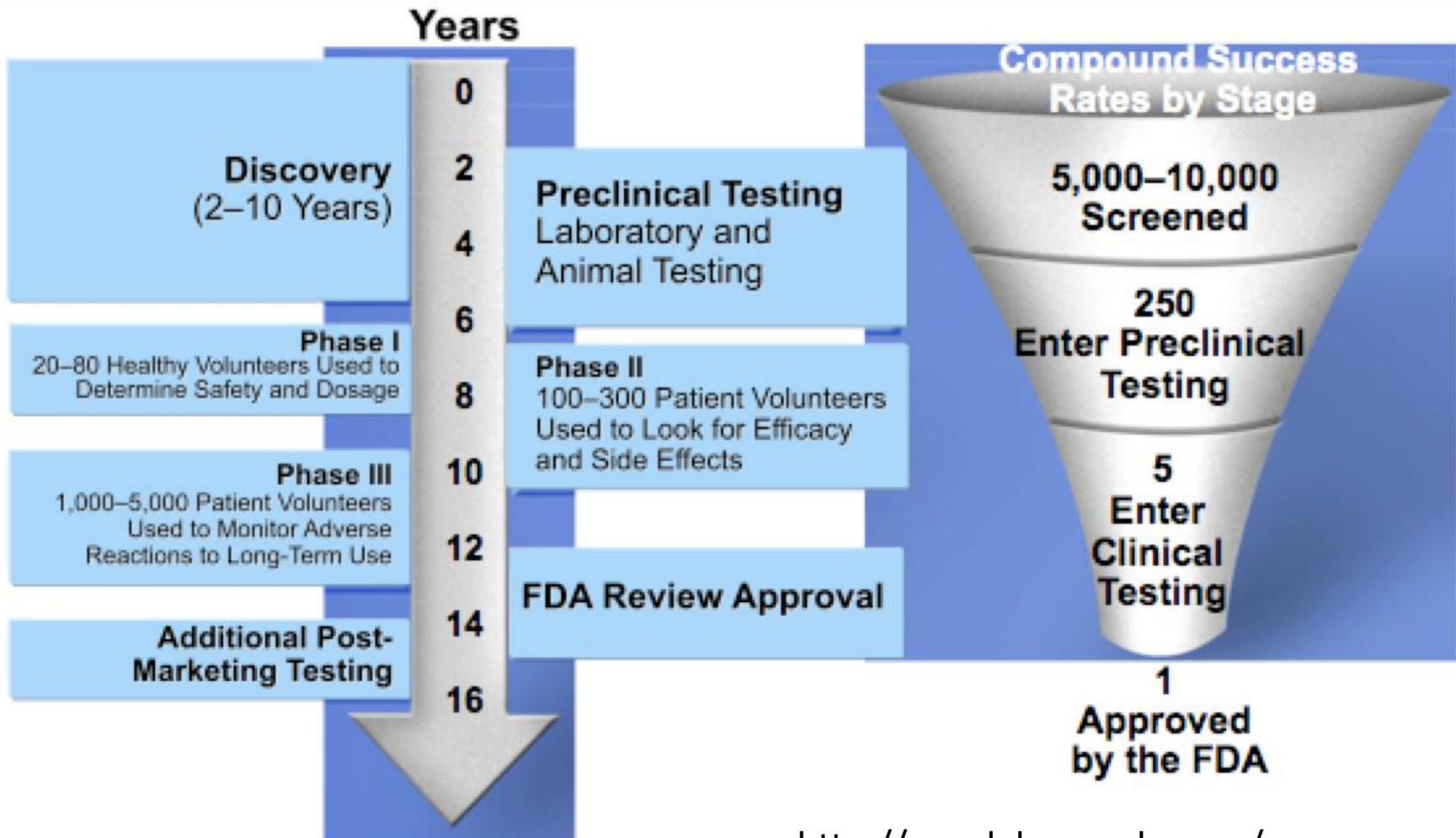
# Brd4の機能阻害をすることで白血病細胞を殺すことができる！

- JQ1をはじめとするiBETは実際にclinical trialsに入っている
- Brd4の機能阻害でどうして白血病細胞が死ぬのか、ということを知る前に、薬の開発のことを少しだけ

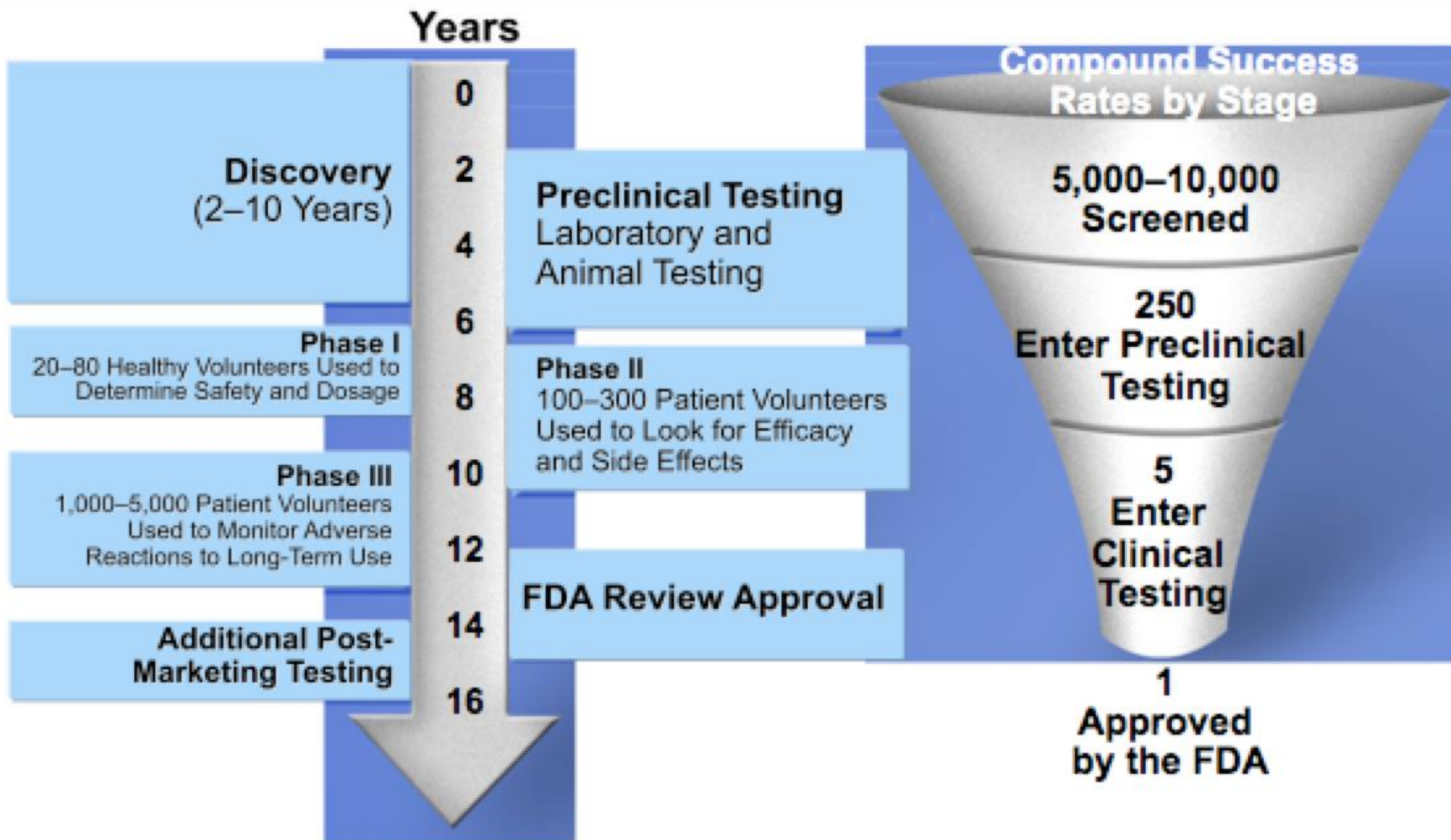


# 薬の開発の実際

## Validation validation validation



# 時間がかかるし、失敗率も高い



# どんどん作ってどんどん使う!?

## Structural Genomics Consortium



SGC



Search

[News](#) [Careers](#) [Publications](#) [Contact](#)

[About](#) ▾

[Science](#) ▾

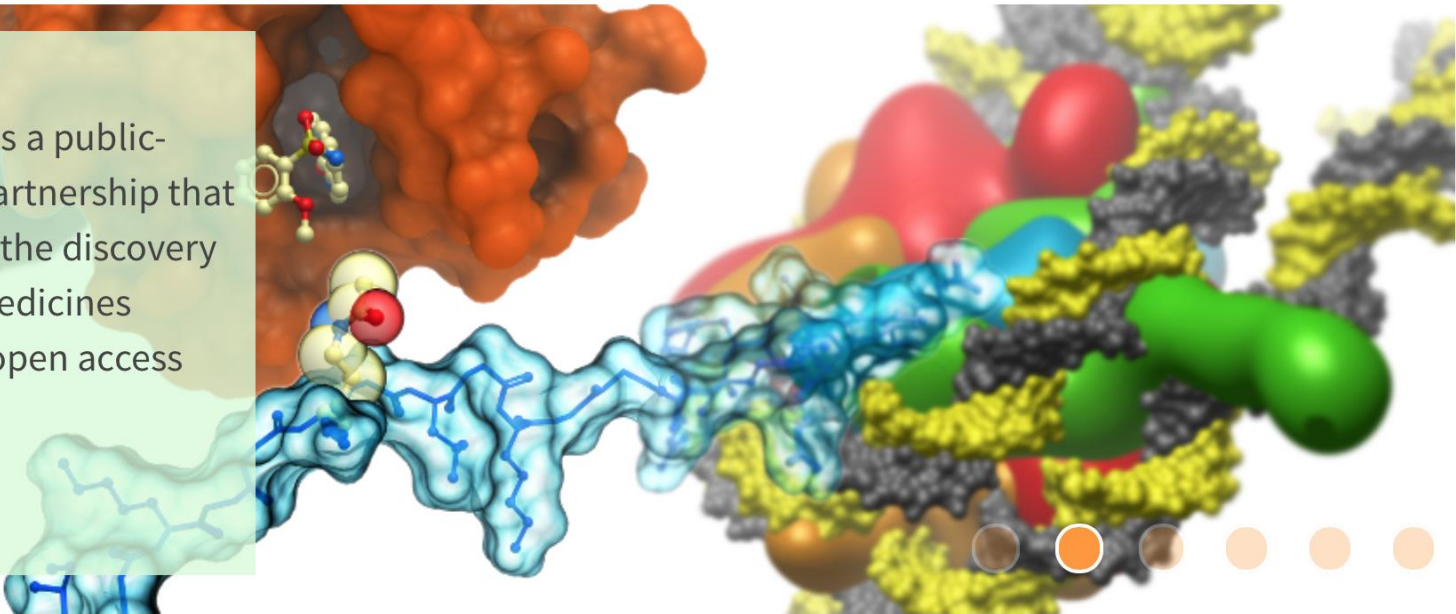
[Reagents & Resources](#) ▾

[People](#) ▾

[News & Outreach](#) ▾

### About

The SGC is a public-private partnership that supports the discovery of new medicines through open access research.



# なんだかんだで素早いアメリカ

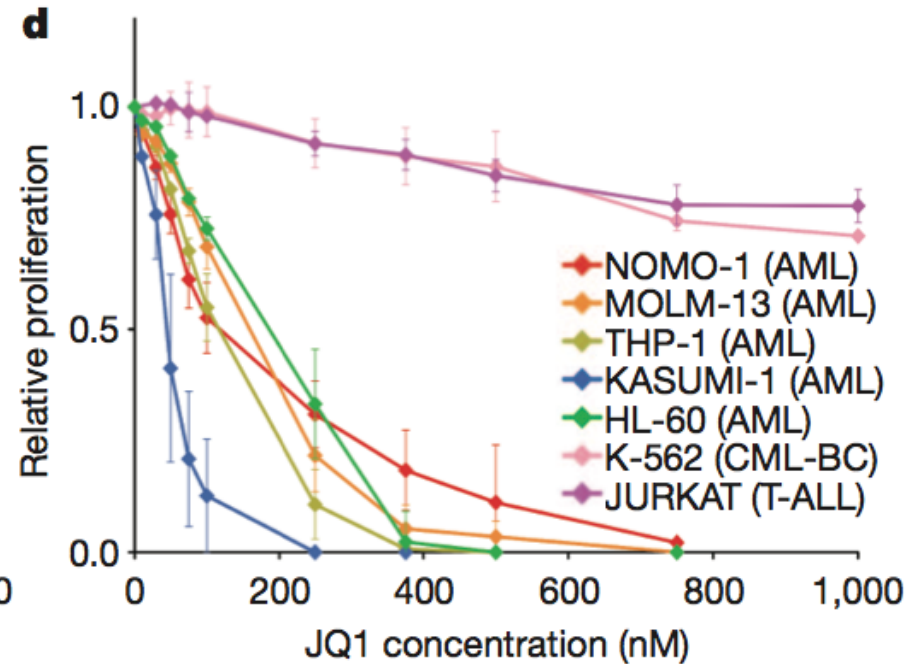
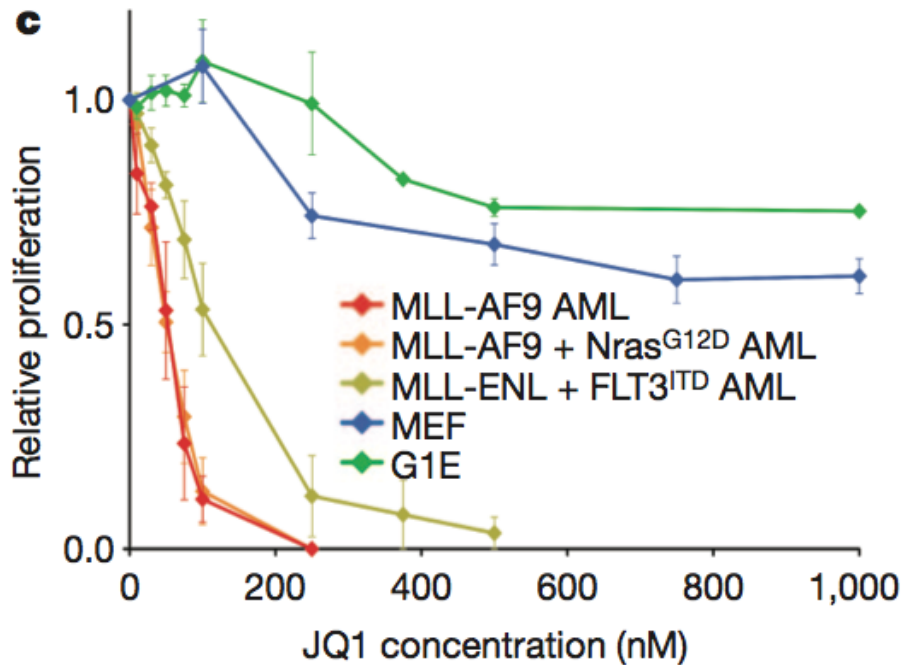
- 既にいくつかのiBETがclinical phaseに突入している (参照: ClinicalTrials.gov)
- iBETは男性経口避妊薬として使われる可能性も!? Brd-Tのお話

The screenshot shows the ClinicalTrials.gov website interface. At the top, there is a search bar with the text "Example: 'Heart attack' AND 'Los Angeles'" and a "Search" button. Below the search bar, there are navigation links: "Advanced Search", "Help", "Studies by Topic", and "Glossary". A blue navigation bar contains "Find Studies", "About Clinical Studies", "Submit Studies", "Resources", and "About This Site". The breadcrumb trail reads "Home > Find Studies > Search Results". The search results section shows "1 study found for: Brd4" with links to "Modify this search" and "How to Use Search Results". Below this, there are tabs for "List", "By Topic", "On a Map", and "Search Details". There are also options to "Show Display Options", "Download", and "Subscribe to RSS". A checkbox option is present: "Include only open studies" (checked) and "Exclude studies with unknown status" (unchecked). The results table has columns for Rank, Status, and Study. The first result is:

Rank	Status	Study
1	Recruiting	<a href="#">A Study to Investigate the Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Clinical Activity of GSK525762 in Subjects With NUT Midline Carcinoma (NMC) and Other Cancers</a> Condition: Carcinoma, Midline Intervention: Drug: GSK525762

At the bottom right, there is a "TO TOP" link.

# どうして白血病細胞ばかり死ぬのか？



# おさらい

- Brd4はいわゆるgeneral co-activatorとして理解されていた
- 全てのエンハンサー、全てのプロモーターに局在している、とされてきた
- しかし、Brd4の機能を阻害して死ぬのは、一部の細胞だけであった

どうしてgeneralそうなタンパク質がある特定の細胞の生存に大事なのか？

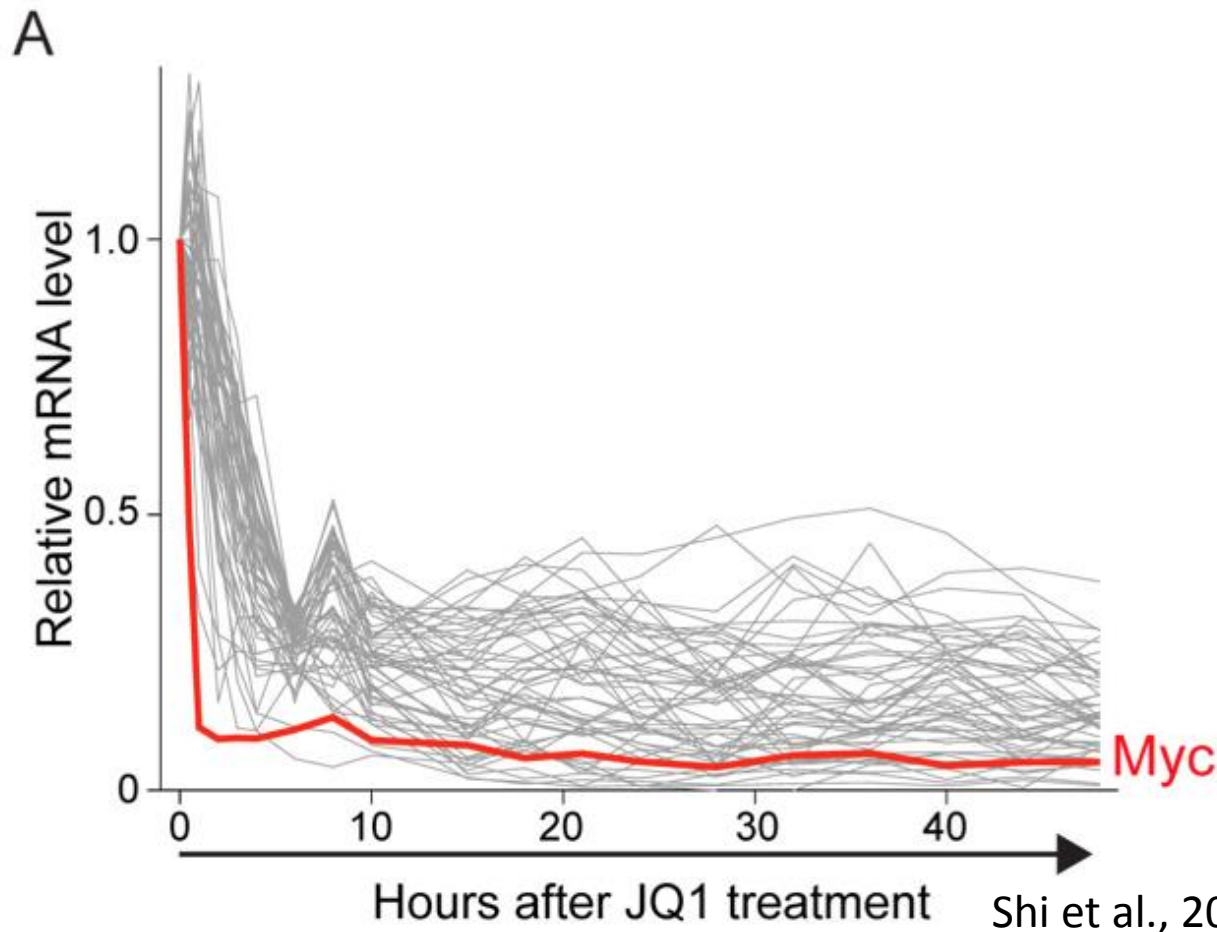
どうして全てのプロモーターやエンハンサーで検出されるようなタンパク質の機能阻害で、遺伝子特異的な効果があらわれるのか？

# 大規模なChIP-seq解析がもたらした 進展

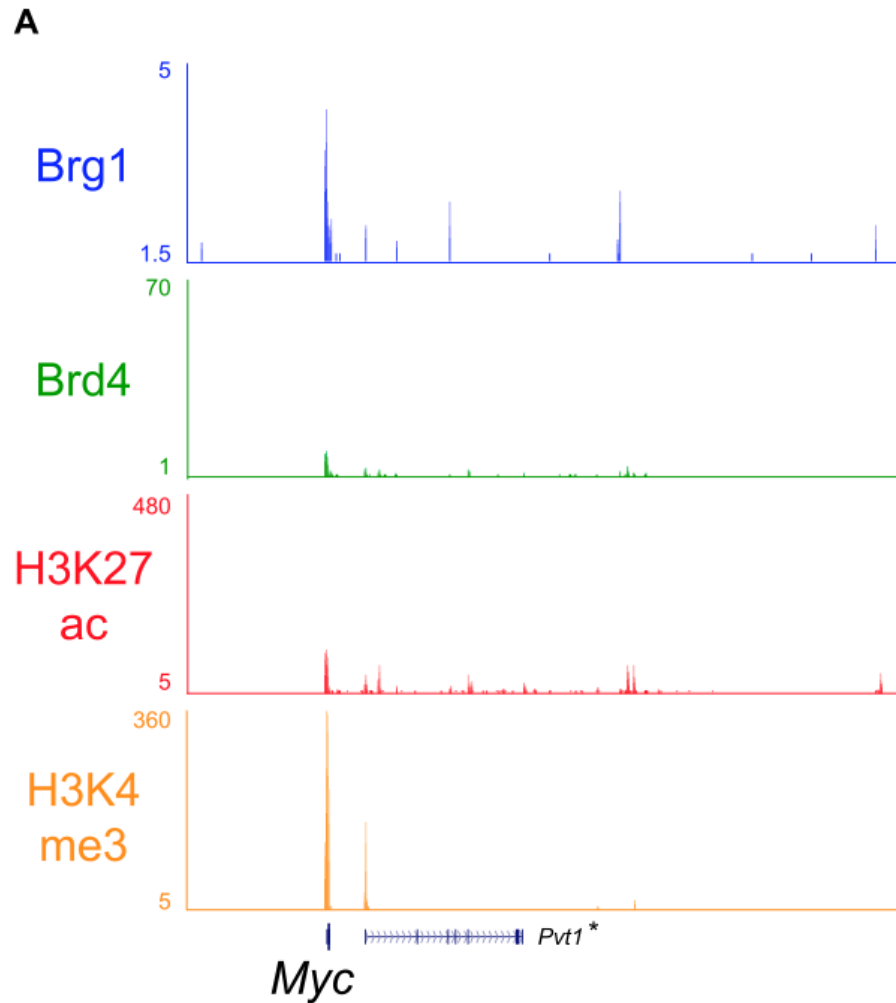
- さまざまながん細胞やES細胞におけるChIP-seq解析によって、「どうしてgeneralなco-activatorsの機能阻害で遺伝子特異的な効果があられやすいのか」という問題の解決への糸口が見つかった
- 複数のグループが同時に報告をしたが、河岡が最も身近で見ていた、Vakocラボベースのストーリーを紹介します



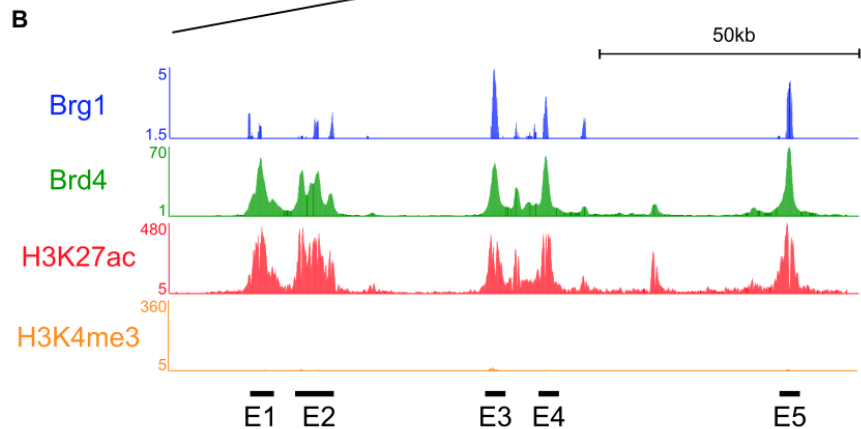
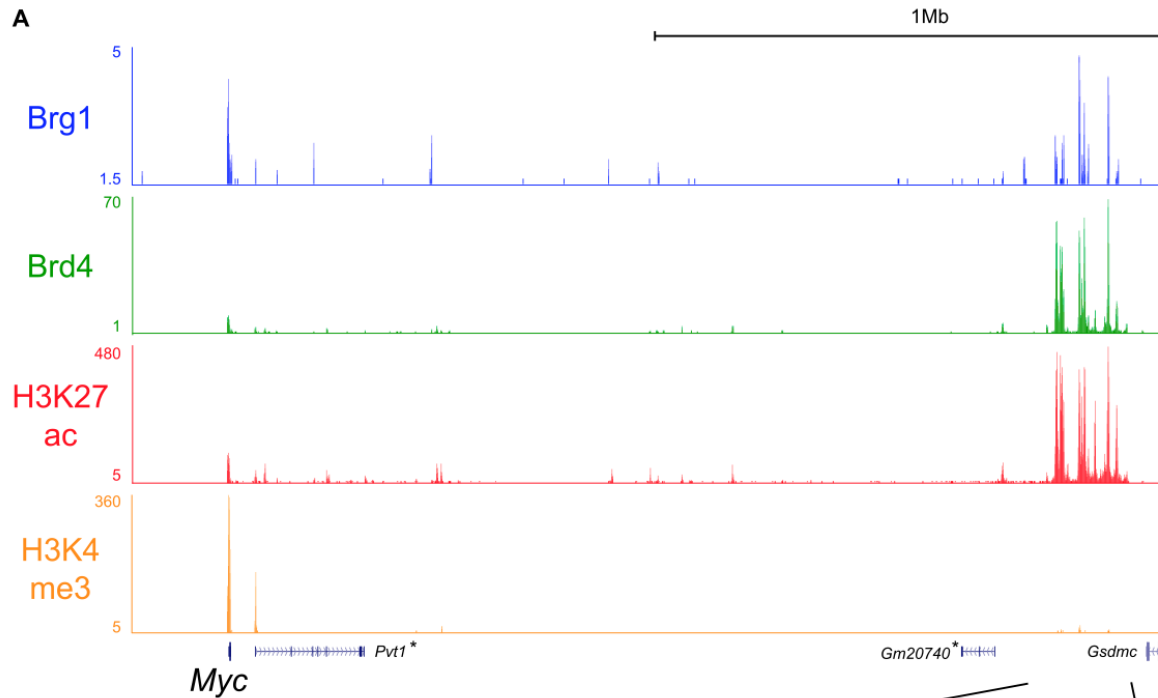
白血病細胞におけるJQ1処理でMycの発現が急激に落ちてくる (そしてそれは他の多くの細胞では観察されない)



# 白血病細胞でChIP-seqをして、Mycの locusを観察してみた

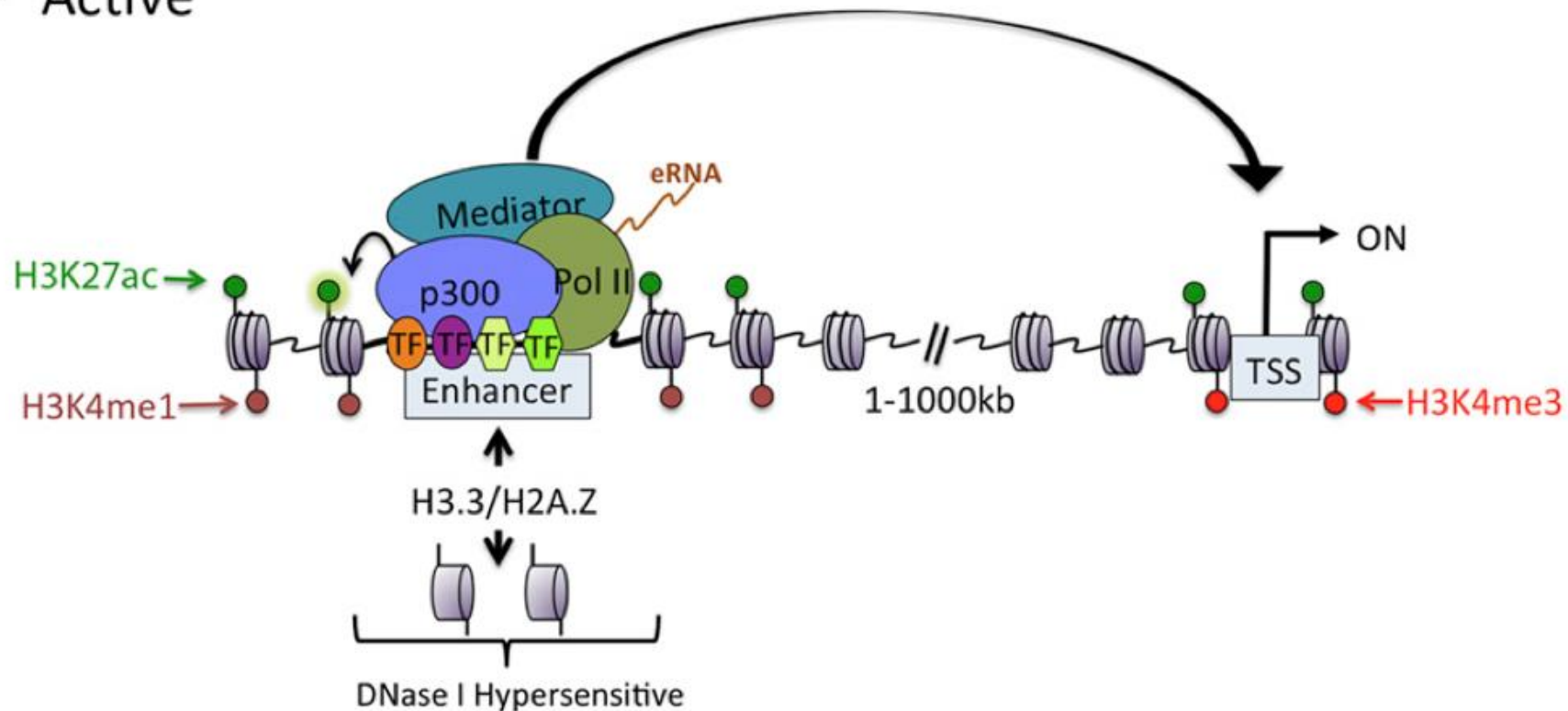


# すごく大きなエンハンサーが！

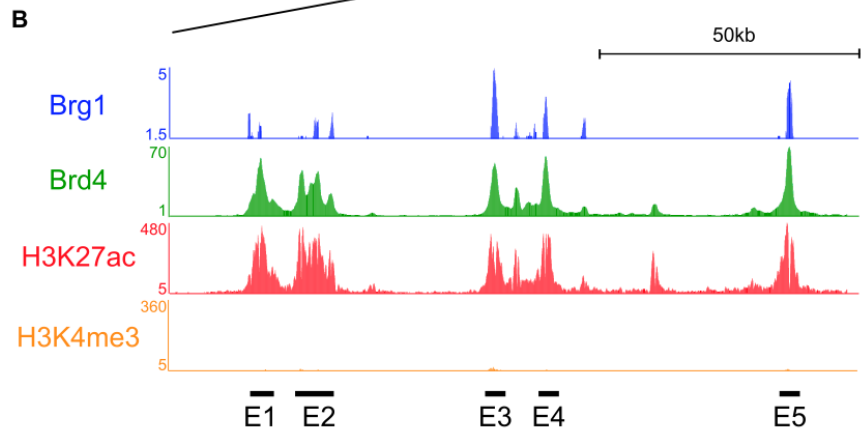
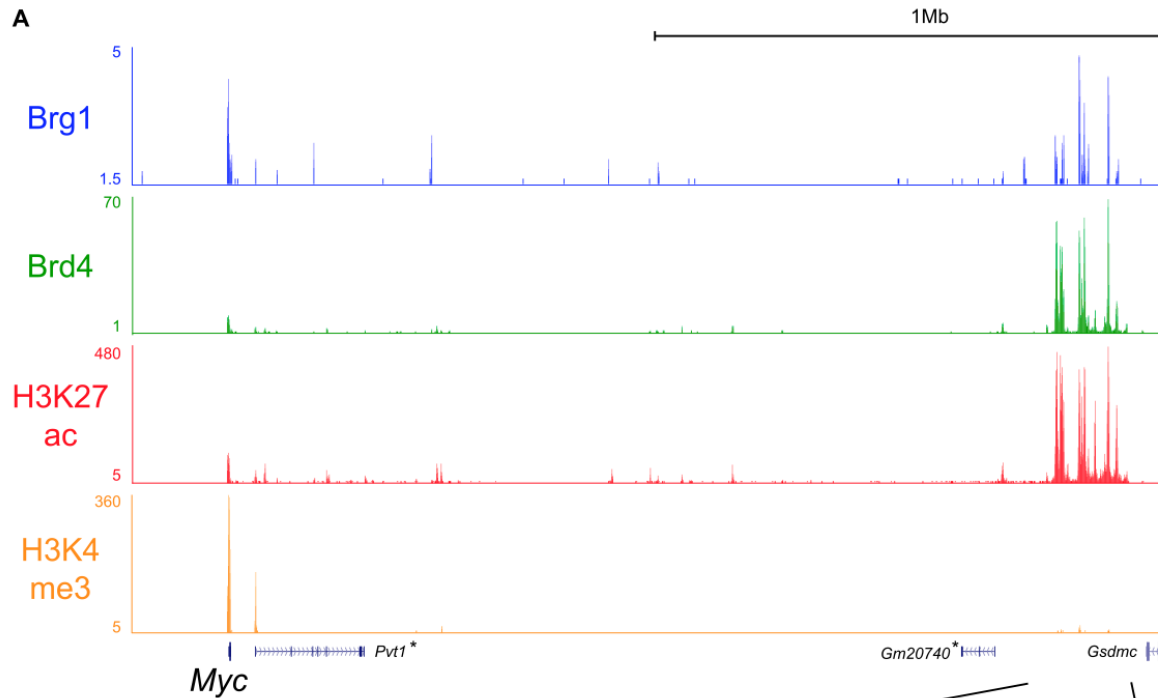


# エンハンサーって？

A Active

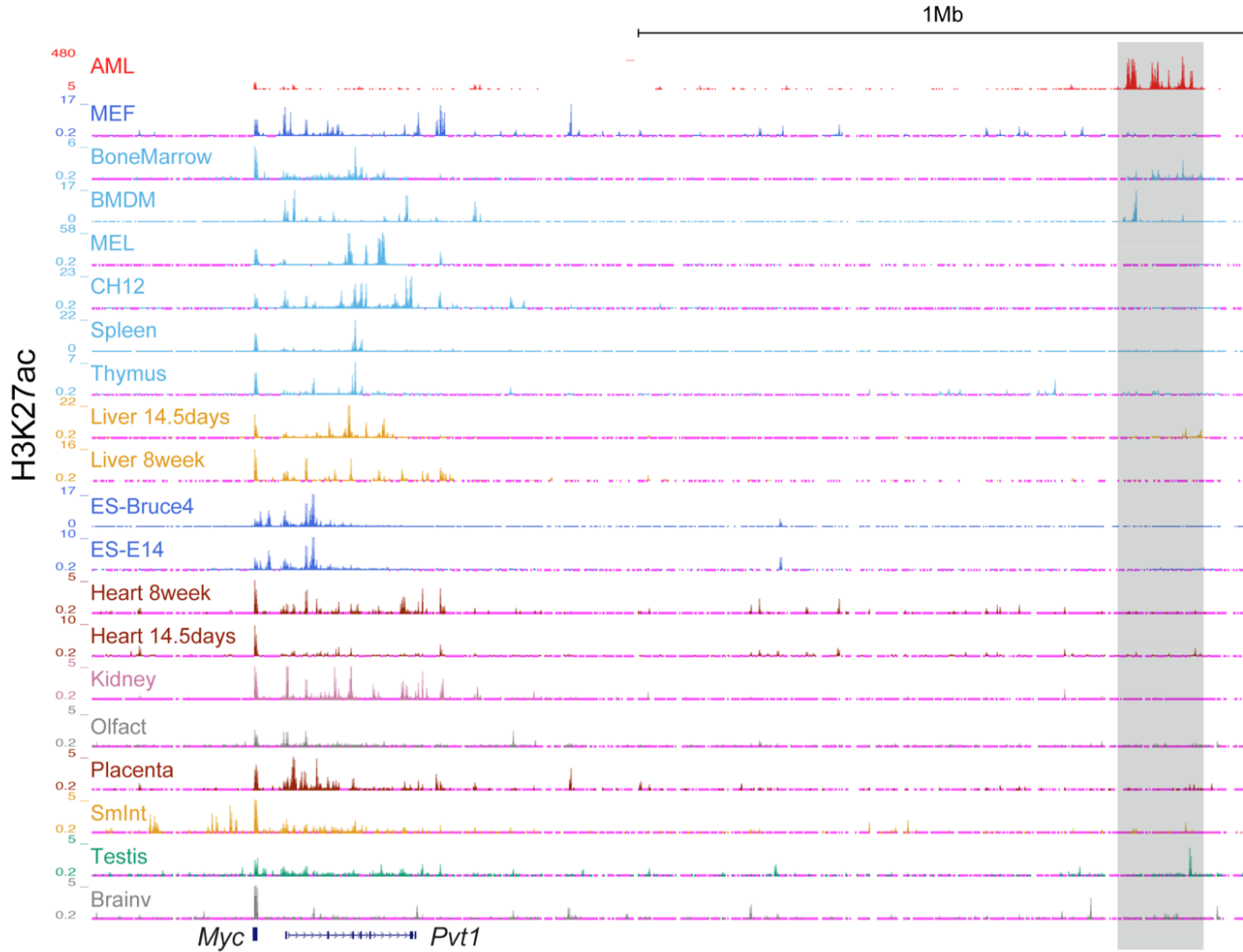


# すごく大きなエンハンサーが！

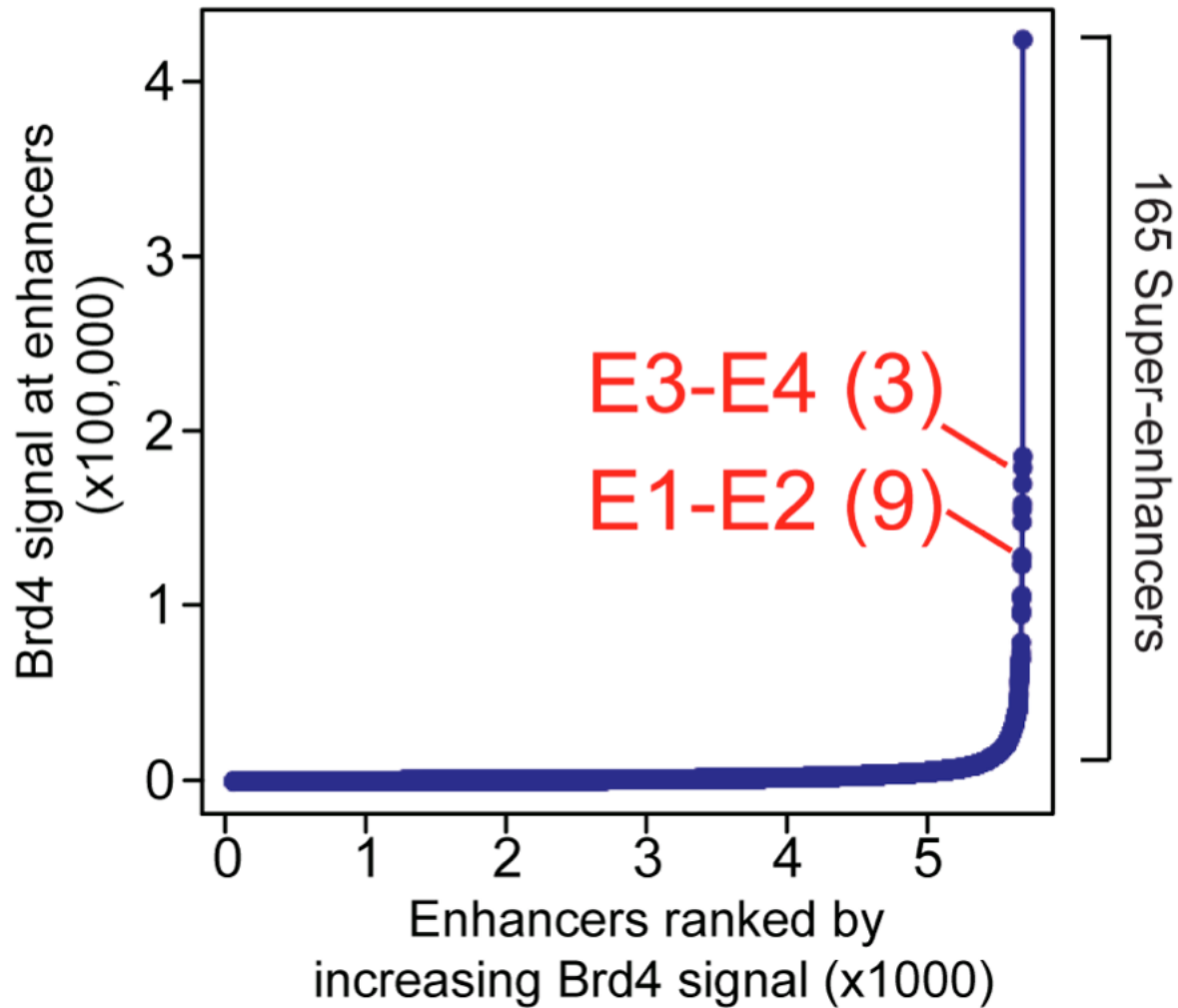


# しかも組織特異的！

A



# スーパーエンハンサー



ピークコールの結果からこれを作れますか？

# RNA-seqとの融合

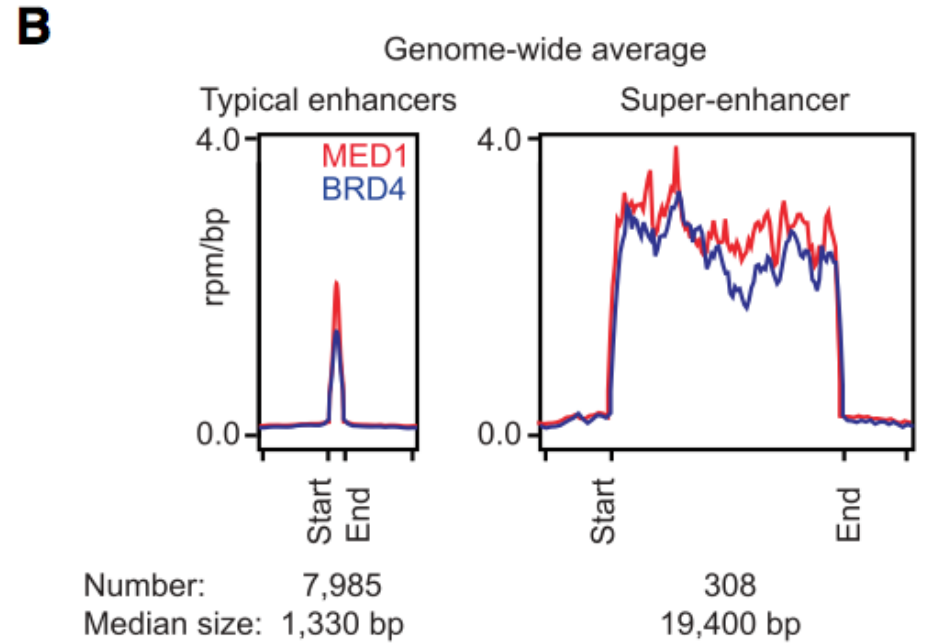
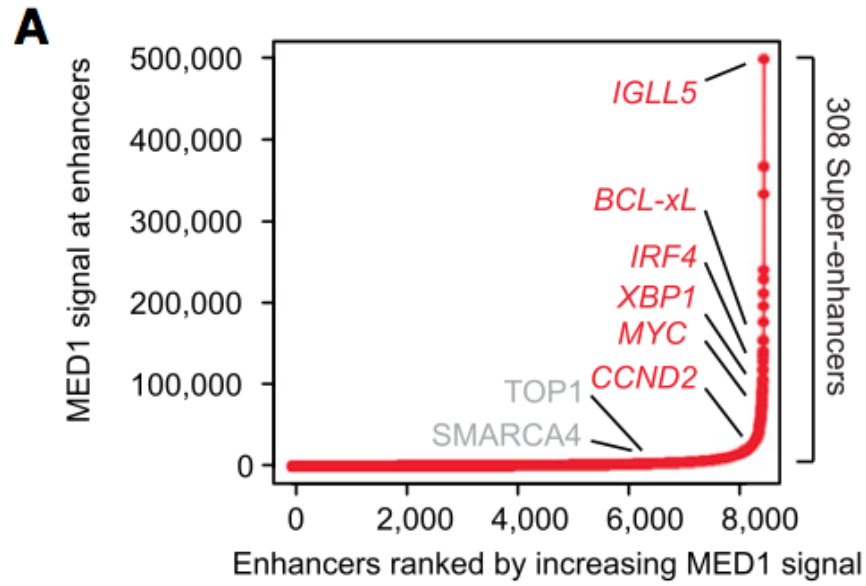
## Super enhancerは脆弱？

- MITのRichard Youngのグループによるより網羅的な解析によって、スーパーエンハンサーは、
  1. とても大きくて
  2. 大事な遺伝子の近くにあって
  3. General co-activatorsの阻害に弱いらしい

ということが明らかにされた



# 1. 大きい

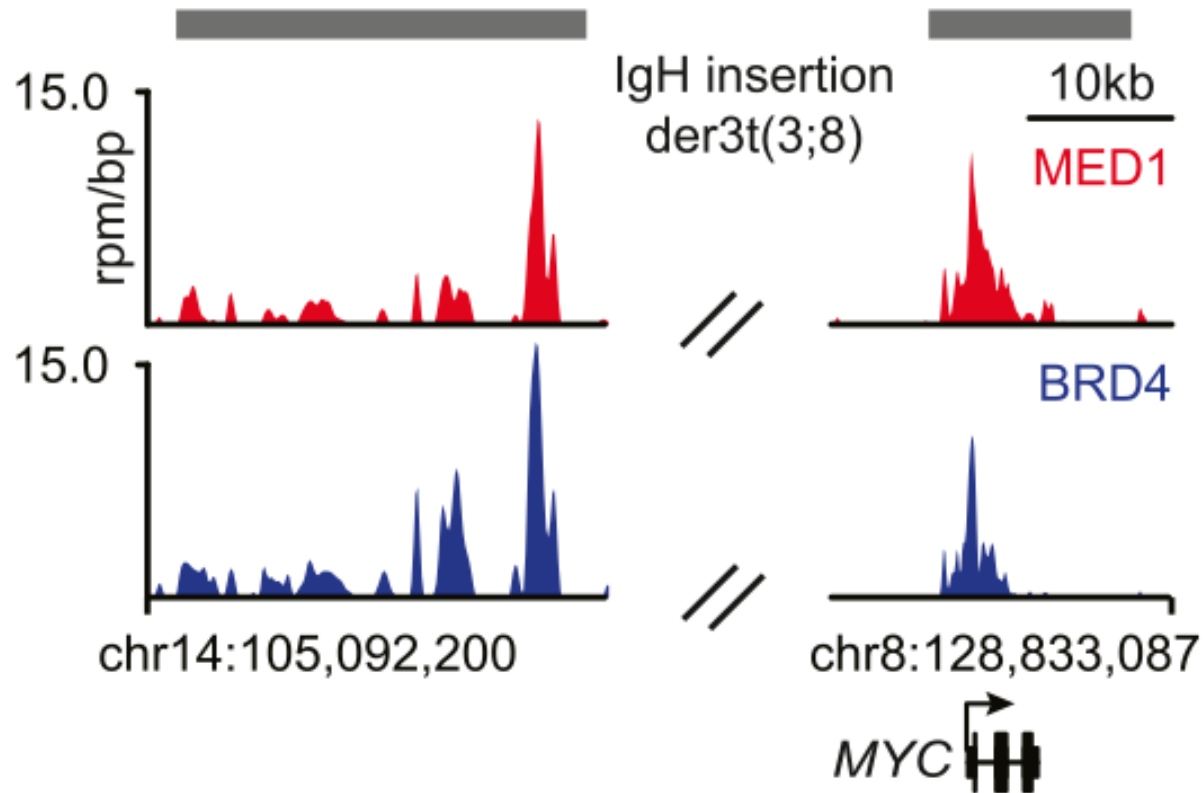


	Total	Density at signal constituents	Total	Density at signal constituents
MED1:	1 unit	1 unit	18 unit	3.4 unit
BRD4:	1 unit	1 unit	16 unit	3.7 unit
H3K27Ac:	1 unit	1 unit	10 unit	1.9 unit

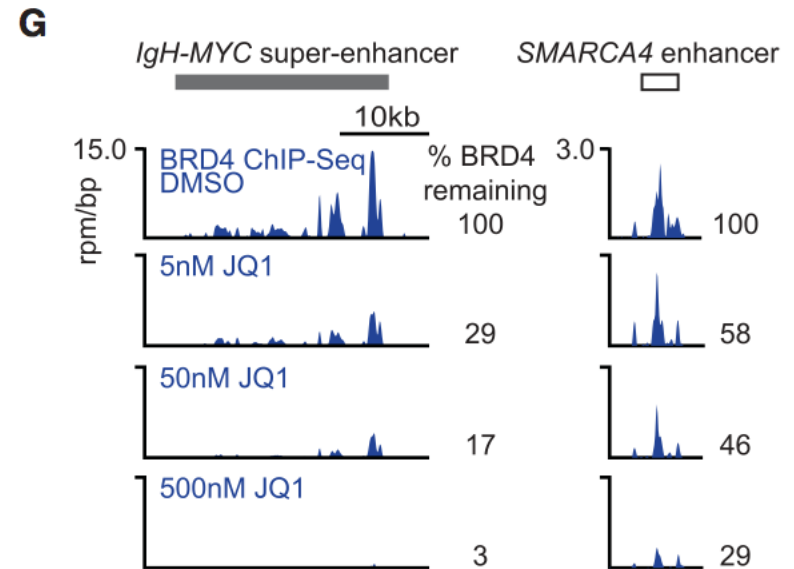
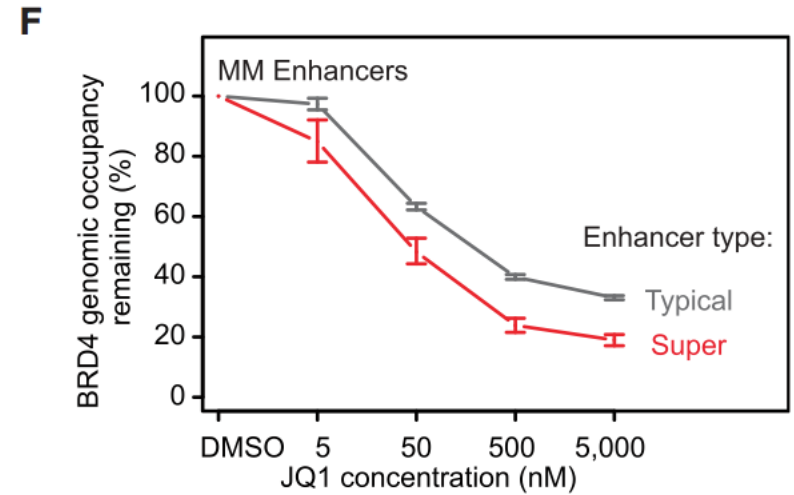
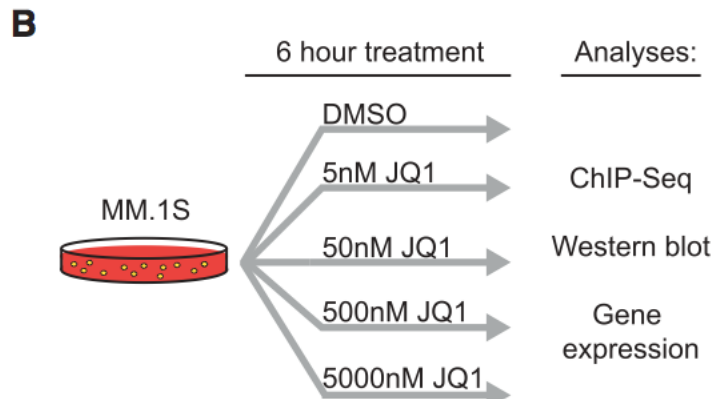
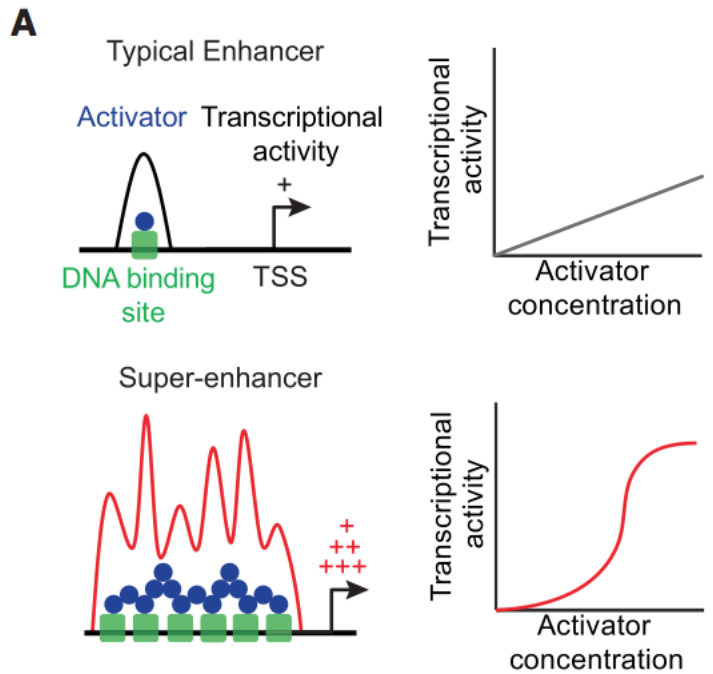
## 2. 大事な遺伝子のそばにある

**A**

Super-enhancers:



# 3. 阻害に弱い

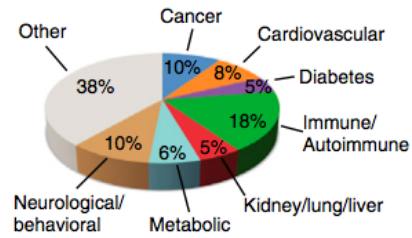


# もしかしてエンハンサーがおかしくなっている病気があるのかも？

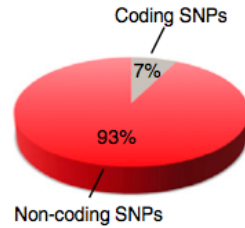
- GWAS (Genome-Wide Association Study)
- 例えばSNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型)

**A**

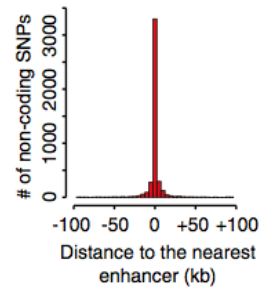
5,303 SNPs from 1,675 GWAS studies



Coding vs. non-coding SNPs



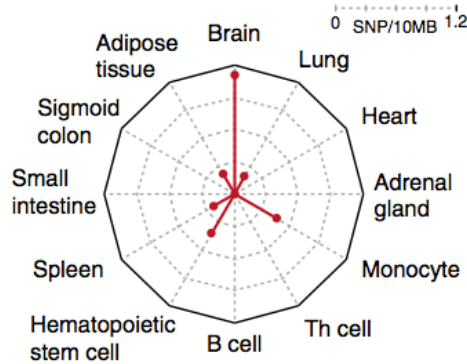
Proximity to enhancers



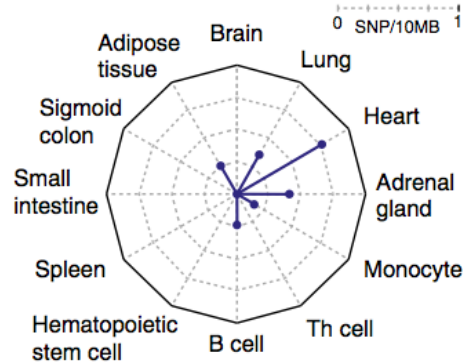
実はSNPsがマップされるノンコーディング領域がたくさんある。。。

**B**

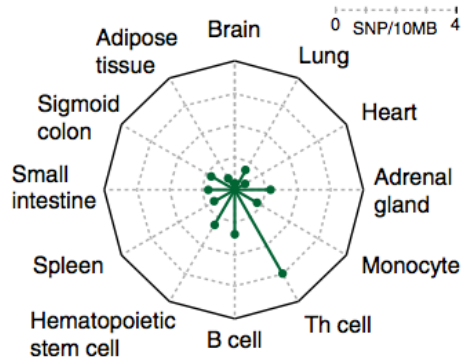
Alzheimer's disease  
(27 non-coding SNP)



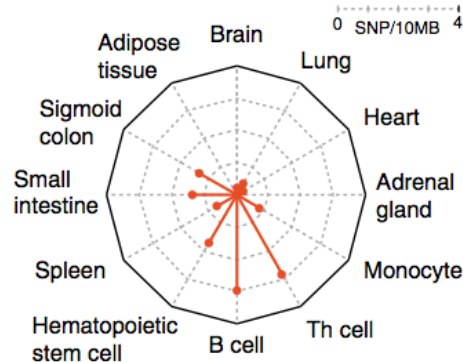
Electrocardiographic traits  
(15 non-coding SNP)

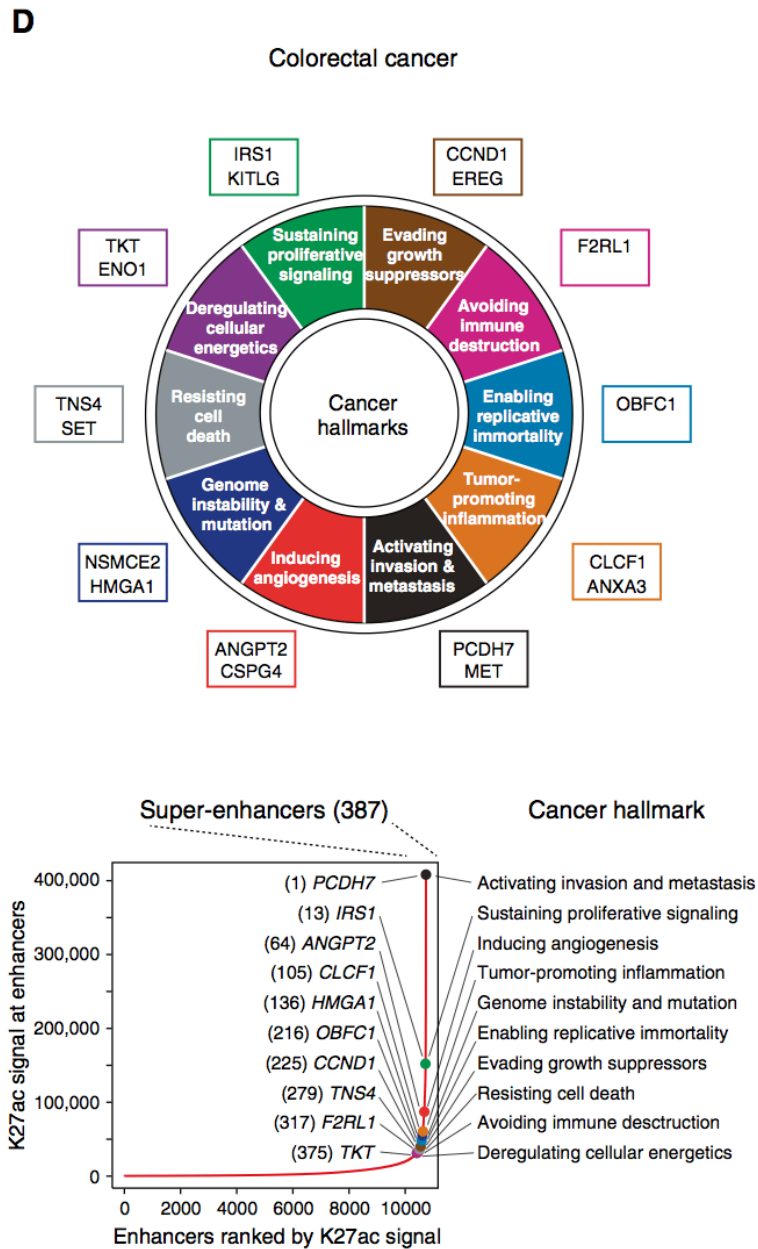
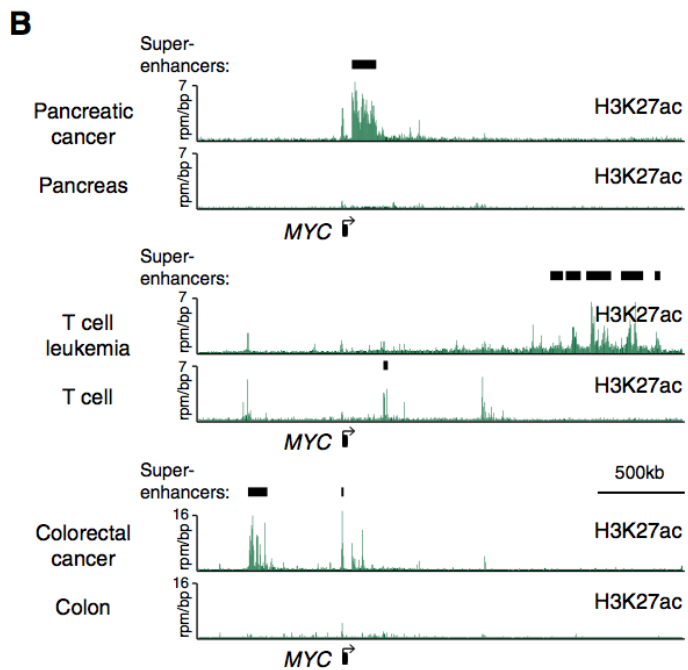
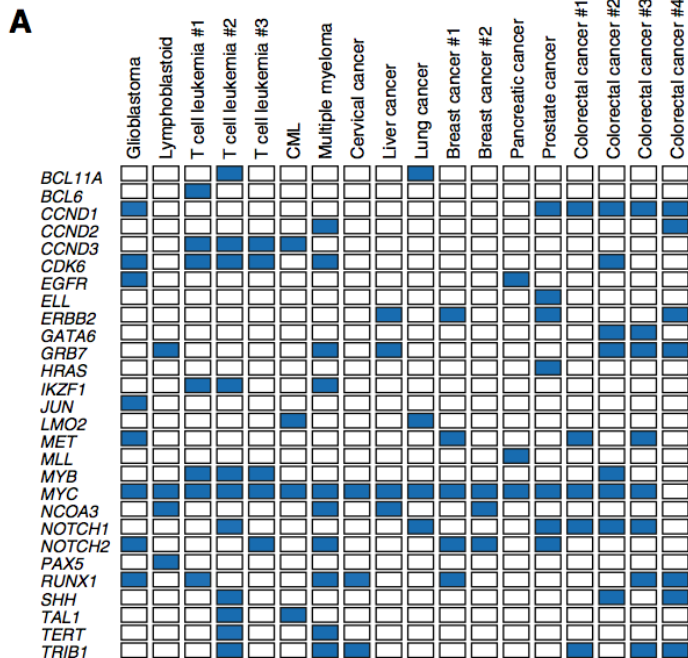


Type 1 diabetes  
(67 non-coding SNP)



Rheumatoid arthritis  
(77 non-coding SNP)





# エンハンサーセラピー？

- 結局、遺伝子の機能というのは、細胞によってさまざま (文脈特異的)
- なので、ある遺伝子を全身でノックアウトしたら、いろんなことが起こってしまう
- 細胞系譜特異的、という特徴を活かして、エンハンサーをターゲットにしたセラピーがあり得るのではないか？

# 大規模シーケンスとインフォーマティクス

- どんどん簡便になっていることもあり、その「当たり前さ」はますます大きくなっている
- 何ができて、何ができないか、ということをしっかり認識しつつ、大規模シーケンスデータを上手に料理できるようになれば楽しい！



# まとめ

- RNAiスクリーニングや化合物合成、NGS解析を有機的に組み合わせることによって、薬の候補物質が発見され、その作動原理が研究されている
- こういった「役に立つ」流れから基礎的に面白そうなことが出てくることもある！