

平成21年6月10日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591573
 研究課題名（和文） CHIP-chip法/Oligofish法によるヒトがん組織の網羅的転写機能解析
 研究課題名（英文） The comprehensive analysis of human cancer tissue by ChIP/Oligofish methods
 研究代表者
 中西 一彰（NAKANISHI KAZUAKI）
 北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
 研究者番号：80374338

研究成果の概要：

マウスによる ChIP 法を応用した転写因子のターゲット遺伝子、機能解析を行った。肝特異的 KO マウス STAT3 - KO マウスでは肝細胞増殖はほぼ完全に抑制されていたが、PDK1/Akt 経路の代償性の活性化により肝再生は維持された。活性型 STAT3 の導入により、肝細胞分裂が誘導された。ChIP 法により、STAT3 の新たなターゲットとして Net 遺伝子を見出した。Net は、肝細胞にて STAT3 により制御されており、肝再生に影響を与えていた。STAT3 は、CyclinD1、Myc、Net などを制御し、肝再生に関わっていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：クロマチン免疫沈降法、肝再生、肝癌、STAT3、PDK1/Akt

1. 研究開始当初の背景

種々の生物のゲノム配列が決定されたことに伴い、高密度オリゴヌクレオチドアレイ解析は遺伝子発現、ゲノムタイピングのみならず、ゲノム機能解明のためのますます強力な解析ツールとなってきている。タイピングアレイはすでにアレル別染色体変異やコピー数多型 (Copy Number Polymorphism, CNP) の解析に応用されており、またゲノム配列を連続的に合成したタイピングアレイは、最近になり新規転写産物の発見、ChIP-on-chip 解

析によって転写因子結合部位すなわち下流標的遺伝子の探索、ゲノムメチル化やクロマチン修飾などエピジェノミクス解析にまでその応用範囲が拡がりつつある。また、ゲノム DNA の変化を高精度に検出することで、細胞への生物学的な影響を解明することができると考えられる。

このような背景により、タイピングアレイを用いた転写因子結合部位の探索やエピジェノミクス解析については、従来からの個別的な解析を質的、量的に飛躍的に進め、細胞の癌化などを含めた細胞機能の解析に大きく

貢献すると期待された。

我々は、これまで従来の ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) 法などを持ちいて、肝の種々の病態において以下の解析を行ってきた。個々のシーケンシング・パターンより注目するターゲットを設定し、個別に機能解析、遺伝子発現解析を行ってきた。我々は、さらに解析をすすめる、ターゲットとなることが確認された遺伝子上流の転写因子結合部分を bait として、逆に蛋白質複合体を釣り上げ解析する。(Oligo-fishing 法) これらにより、転写因子を中心とした蛋白質複合体の解析を行なうことが可能となり、蛋白質相互作用によるターゲット遺伝子への制御のメカニズムを解明する手がかりとなると考えられる。

2. 研究の目的

本プロジェクトでは、以下のことを目的として行われた。

マウスモデルによる ChIP 法および Oligo-fishing 法を応用した STAT3 のターゲット遺伝子スクリーニングおよび STAT3 蛋白質複合体の解析をおこなうことにより、発がんに関与する STAT3 転写因子の新たなターゲット遺伝子の探索、同定とその役割を解析する。

また、これらの検討により、肝の再生および癌化における STAT3、NF- κ B、AP-1 などの転写因子の役割と機能の関係を確認する。

3. 研究の方法

マウスを用いた動物モデルによる実験：

(1) 肝特異的 STAT3/Akt ノックアウトマウスおよびコントロールマウスにおける肝切除モデル

肝特異的ノックアウトマウスは、Alb promoter 下に制御される Cre recombinase により、Cre-LoxP システムを利用して作成した (*J Hepatol* 43(5): 799-807, 2005, *Nat Med* 10(2): 168-174, 2004, *J Clin Invest* 112:989-998, 2003)。70%肝切除前、切除後 4 時間、72 時間にて、肝組織をサンプリングして、下に述べるアッセイを行なった。

(2) STAT3/Akt 遺伝子 (constitutive active mutant) 導入による肝細胞増殖実験モデル

Constitutive active form の STAT3 および Akt を組み込んだアデノウィルスベクター (作成済み) をマウス肝にこれらの蛋白質を発現させ、細胞内蛋白質機能を制限する。ベクター-galactosidase を組み込んだウィルスベクターをコントロールとして、①と同様に、肝切除を行なった。

(3) PDK1 遺伝子 KO マウスおよび③STAT3/PDK1 ダブル KO マウスにおける肝切除実験

②と同様に、肝特異的 PDK1 ノックアウトマウスあるいはダブルノックアウトマウスを作成し、同様の実験を行なった。

【アッセイ】

[1] Chromatin Immunoprecipitation 法 (ChIP 法) によるターゲット遺伝子の解析
1) ChIP 法による目的蛋白質と DNA との複合物の抽出。

肝組織を formaldehyde にて処理し、protein-DNA を complex として fix した後、sonication あるいは DNase をもちいて free の DNA の部分を切断した。その後、目的蛋白質 (転写因子) に対する抗 STAT3 抗体を用いて免疫沈降法と同様の手技にて、protein-DNA complex を抽出した。以後、以下の方法によりそれぞれ解析を進めた。蛋白質消化後、以下の 2 種類の操作を行ない、肝切除前後の肝組織および肝特異的 STAT3 ノックアウトマウスとコントロールマウス間にて比較検討した。ChIP 上にアプライして、データを網羅的に解析した。その後、a) 網羅的アッセイの結果得られたデータをもとに、対象となる転写因子のターゲットを質的・量的に解析する。ターゲットを決定後、それら DNA (enhancer/repressor) を cloning/sequencing して同定し、bioinformatics にて一連の遺伝子群を探索した。

b) *in vitro* の系を持ちいて、reporter assay および Northern blot/RT-PCR 法により、転写因子とそれら遺伝子群の関連を確認した。

4. 研究成果

(1) 肝特異的 STAT3KO マウスにおける肝切除モデル

肝特異的 STAT3 - KO マウスにおいては、肝細胞増殖はほぼ完全に抑制されていたが、肝細胞内の PDK1/Akt 経路が代償性に活性化して肝再生を維持していた。逆に、活性化型 STAT3 を肝細胞に導入することにより、肝細胞分裂は著明に増加した。ChIP 法をもちいた検索により、STAT3 の新たなターゲット遺伝子として、Net 遺伝子を見出した。Net 遺伝子は、肝細胞にて STAT3 によりその発現が制御されており、肝再生に影響を与えていた。

(2) PDK1 遺伝子 KO マウスおよび③STAT3/PDK1 ダブル KO マウスにおける肝切除実験

PDK1 の KO マウスあるいは PDK1/STAT3 ダブル KO マウスによる肝切除実験では、STAT3 機能は十分に保たれていたが、肝はほとんど再生せず、致死的でした。STAT3 自体は、CyclinD1、Myc あるいは Net などを制御して、細胞増殖をコントロールすることにより、肝再生にかかわっていたが、PDK1 経路は肝再生においてはより本質的な役割を果たしていると考えられた。

本研究では、肝再生における STAT3 の役割と新たなターゲット遺伝子を同定した。また肝再生あるいは肝細胞癌の増殖において本質的な役割を果たすものとして、STAT3 および PDK1/Akt の作用を確認した。

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 8 件)

1. Sanae Haga, Michitaka Ozaki, Hiroshi Inoue, Yasuo Okamoto, Wataru Ogawa, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Satoru Todo. The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 49:204-214, 2009. (査読あり)
2. Osamu Ikeda, Michitaka Ozaki, Soichiro Murata, Ryota Matsuo, Yoritaka Nakano, Motonobu Watanabe, Katsuji Hisakura, Andriy Myronovych; Nobuhiro Ohkohchi. Autonomic regulation of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Surg Res* 152(2):218-223, 2008. (査読あり)
3. N. Gotohda, H. Iwagaki, M. Ozaki, T. Kinoshita, M. Konishi, T. Nakagohri, S. Takahashi, S. Saito, T. Yagi, N. Tanaka. Deficient response of IL-6 impaired liver regeneration after hepatectomy in patients with viral hepatitis *Hepato-Gastroenterology* 55(85):1439-44, 2008. (査読あり)
4. Naoto Gotohda, Hiromi Iwagaki, Michitaka Ozaki, Taira Kinoshita, Masaru Konishi, Toshio Nakagohri, Shinichiro Takahashi, Shinya Saito, Takahito Yagi, Noriaki Tanaka. The significant correlation between surgical stress of hepatectomy and changes in the serum levels of HGF, IL-6 and soluble Fas in the patients with viral hepatitis. *Hepato-Gastroenterology* 55(85):1400-3, 2008. (査読あり)
5. Yoshiaki Miura, Magumi Hato, Yasuro Shinohara, Hiromitsu Kuramoto, Jun-ichi Furukawa, Masaki Kurogochi, Hideyuki Shimaoka, Mitsuhiko Tada, Kazuaki Nakanishi, Michitaka Ozaki, Satoru Todo, and Shin-Ichiro Nishimura. BlotGlycoABCTM: An

integrated glycoblotting technique for rapid and large-scale clinical glycomics. *Mol Cell Proteomics* 7(2):370-7, 2008. (査読あり)

6. Hui-qi Zhang, Sanae Haga, Moto Fukai, Yuko Oikawa, Hiroshi Inoue, Wataru Ogawa, Arihiko Kano, Atsushi Maruyama, Xin-Yuan Fu, Hiroyuki Furukawa, Satoru Todo, Shin Enosawa, Michitaka Ozaki. Identification of *de novo* STAT3 target gene in liver regeneration. *Hepatology Res* 38(4):374-84, 2008. (査読あり)
7. Sanae Haga, Keita Terui, Moto Fukai, Yuko Oikawa, Kaikobad Irani, Hiroyuki Furukawa, Satoru Todo, Michitaka Ozaki. Preventing hypoxia/reoxygenation damage to hepatocytes by p66^{SHC} ablation: up-regulation of anti-oxidant and anti-apoptotic proteins. *J Hepatology* 48: 422-432, 2008. (査読あり)

(総説)

1. 尾崎倫孝: 肝障害・再生のメカニズム— Jak/STAT3 およびPI3-K/Akt経路の役割と意義— *生化学* 80(5), 399-408, 2008. (査読なし)

[学会発表] (計 8 件)

シンポジウム、招待講演 (海外)

1. Michitaka Ozaki. #1 molecular mechanism of liver injury, protection and regeneration, #2 bio-imaging of molecular functions and tumor by optic probes. *Japan-Denmark Joint Workshop on "Molecular Cancer Research"*. Tokyo, 2009. 1. 19-20.

特別講演、シンポジウム、ワークショップ、および招待講演など (国内)

1. 尾崎倫孝 「肝の障害と再生のメカニズム— Jak/STAT3 およびPI3-K/PDK1/Akt経路の役割と意義—」セミナー@東京大学医学研究所、東京、2008. 11. 14
2. 尾崎倫孝、高橋将人、藤堂省: 「北海道大学第一外科における組織バンクの構築と解析の実際」シンポジウム 22 「バイオマーカー研究最前線」第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋、2008. 10. 28
3. 尾崎倫孝、芳賀早苗、井上啓、小川渉、村田宏、岩垣博巳、藤堂省 「肝再生シグナルの解析と再生不全の要因—肝切除後再生時の肝細胞増殖・成長・アポトーシスの責任シグナルと肝再生への影響—」第 15 回肝細胞研究会、静岡、2008. 6. 27

一般講演 (国内)

1. 芳賀 早苗、及川 優子、小澤岳昌、James Remington、古川博之、藤堂省、尾崎倫孝 「生体光イメージング法による臓器移植の新たな展開 -分子機能イメージングによるグラフト機能評価・予後予測の可能性-」 **第44回日本移植学会総会**、大阪、2008. 9.
2. 芳賀 早苗、及川 優子、藤堂 省、尾崎 倫孝 「加齢肝の再生不全におけるp66^{shc}の関与とその機序」 **第15回肝細胞研究会**、静岡、2008. 6. 27- 28
3. 富岡 伸元、齋藤 総一郎、多田 光宏、高橋 典彦、片岡 昭彦、中西 一彰、高橋 将人、尾崎 倫孝、平野 隆、藤堂 省 「高解像度BAC array CGH 解析により抽出された胃癌の予後に関連するゲノム異常領域」 **第12回がん分子標的治療研究会総会**、東京、2008. 6. 26-27
4. 横尾 英樹、近藤 格、中西 一彰、神山 俊哉、尾崎 倫孝、藤堂 省、廣橋 説雄 「プロテオーム解析による肝細胞癌の早期再発マーカーの探索」 **第12回がん分子標的治療研究会総会**、東京、2008. 6. 26-27

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 一彰 (NAKANISHI KAZUAKI)
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教
研究者番号：80374338

(2) 研究分担者

尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)
北海道大学・大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：80256510

(3) 連携研究者

藤堂 省 (TODO SATORU)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60136463