

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893045

研究課題名(和文) 遺伝子変異に基づいた肝細胞癌におけるクロマチン構造の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive Analysis of Chromatin Structure in Hepatocellular Carcinoma Based on Somatic Mutation

研究代表者

林 玲匡 (HAYASHI, Akimasa)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40735396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌の発生、進展には、遺伝子そのもの変化(変異)だけではなく、それを制御する機構の変化も重要である。本研究では、遺伝子を制御する機構として、DNAとタンパク質の複合体であるクロマチンの構造に注目し、網羅的解析により、癌の発生、進展におけるその変化を捉えようとした。具体的には、肝細胞癌の手術凍結検体を用いて、FAIREという手法と次世代シーケンサーを合わせた実験系により、クロマチン構造の変化を網羅的に解析した。特に、発癌に重要とされる遺伝子の変異によって、どのようにクロマチン構造が変化することに注目し、CTNNB1という遺伝子の変異によって、クロマチン構造が変化する領域の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：In genesis and progression of tumor, not only genetic changes (gene mutations) but also alteration of systems that regulate genes are required. In this research, we focused on chromatin structure composed of DNA and proteins as one of the regulation systems of genes, and tried to identify genome wide chromatin structure changes through genesis and progression of cancer. We identified the genome wide chromatin structure using frozen surgical specimens of hepatocellular carcinoma with the FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) method and a next generation sequencer, and compared the chromatin structure between hepatocellular carcinoma and background liver. By examining the chromatin structure changes based on the somatic mutations of oncogenes, we identified the regions of chromatin alteration specific to CTNNB1 mutation.

研究分野：肝細胞癌, エピゲノム, ゲノム

キーワード：肝細胞癌 FAIRE エピゲノム ゲノム

1. 研究開始当初の背景

近年の解析結果から、肝細胞癌の発生・進展過程では、他の癌腫同様にゲノム変化だけでなくエピゲノム変化も多数蓄積していることがわかっている。エピゲノム変化のうち、その物理的制御であるクロマチン構造（およびその変化）は重要であるとされており、これまでも各種網羅的解析が行われている。クロマチン構造の網羅的解析手段の一つとして、FAIRE-seq (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements followed by next generation sequencing) が有名である。これは、フェノール・クロロホルム法を応用してヌクレオソーム・フリー領域を単離し、その後次世代シーケンサーで解析するものである。肝癌培養細胞を用いた FAIRE-seq によりエピゲノムの変化が明らかになりつつある一方で、癌臨床組織検体を用いた肝細胞癌の FAIRE-seq は行われておらず、in vivo での状態は不明な点も多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌臨床組織検体におけるヌクレオソーム・フリー領域を網羅的に解析・同定する(in vivo FAIRE-seq 法)ことにより、肝細胞癌におけるクロマチン構造異常を明らかにすることである。さらに、ヌクレオソーム・フリー領域の塩基配列解析(モチーフ解析)より、肝細胞癌の転写制御異常に関与している重要因子を推定し、症例ごとに蓄積しているドライバー遺伝子変異との関連を、転写ネットワーク異常の観点より明らかにする。

3. 研究の方法

肝細胞癌症例の凍結手術検体を用いて、癌部・非癌部の in vivo FAIRE-seq を行い、網羅的にヌクレオソーム・フリー領域を同定する。(東京大学先端研油谷研究室との共同研究により、凍結組織検体の組織粉碎およびホル

マリン固定のステップを最適化することで、凍結臨床組織検体を用いた in vivo FAIRE-seq 法の確立に成功している。) 同定されたヌクレオソーム・フリー領域から、癌部特異的あるいは非癌部特異的なヌクレオソーム・フリー領域を抽出し、それぞれのモチーフ解析を行うことで転写因子を予想し、転写ネットワーク(転写制御)を解明する。さらに、国際がんゲノムコンソーシアム(ICGC; International Cancer Genome Consortium) プロジェクトにおいて、既に行われた whole exome sequence および RNA sequence による遺伝子変異および遺伝子発現解析のデータとの統合解析を行うことで、主要なドライバー遺伝子(CTNNB1 など)に基づいた転写ネットワークの違いを明らかにする。

4. 研究成果

15例の肝細胞癌症例の in vivo FAIRE-seq を行い、約 25000~35000 程度のヌクレオソーム・フリー領域の抽出に成功した。そして、抽出された領域をもとに、癌・非癌部共通のヌクレオソーム・フリー領域、癌・非癌部特異的なヌクレオソーム・フリー領域を同定した。その後、同時に行った whole-exome sequencing (WES)による網羅的遺伝子解析の結果から、CTNNB1 変異症例に特異的なヌクレオソーム・フリー領域(約 300 領域)の抽出に成功した。モチーフ解析の結果から、同領域には TCF や LEF のモチーフの強い濃縮が確認された。さらに、肝癌培養細胞(HepG2)の ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation followed by next generation sequencing)の結果から、これらの領域に有意に CTNNB1 の結合があることが確認された。以上の結果により、プロモーター領域のみならず、エンハンサー領域の CTNNB1 の新規標的遺伝子候補が抽出された。個別の遺伝子の発現の変化やその臨床病理学的特徴については、現在追加解析中である。

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6件)

Havashi A, Shibahara J, Misumi K, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M. Histologic Assessment of Intratumoral Lymphoplasmacytic Infiltration is Useful in Predicting Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2016 May 19;11(5):e0155744. (査読有)

Abe H*, Havashi A*, Kunita A, Sakamoto Y, Hasegawa K, Shibahara J, Kokudo N, Fukayama M. Altered expression of AT-rich interactive domain 1A in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Mar 1;8(3):2763-70. (* Equal contributors) (査読有)

Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Havashi A, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*. 2014 Dec;46(12):1267-73. (査読有)

Shibahara J, Havashi A, Misumi K, et al. Clinicopathologic characteristics of hepatocellular carcinoma with reactive ductule-like components, a subset of liver cancer currently classified as combined hepatocellular-cholangiocarcinoma with stem-cell features, typical subtype. *Am J*

Surg Pathol. 2016 May;40(5):608-16. (査読有)

Ando S, Shibahara J, Havashi A, Fukayama M. β -catenin alteration is rare in hepatocellular carcinoma with steatohepatitic features: immunohistochemical and mutational study.

Virchows Arch. 2015 Nov;467(5):535-42. (査読有)

Shibahara J, Ando S, Havashi A, et al. Clinicopathologic characteristics of SALL4-immunopositive hepatocellular carcinoma. *Springer Plus*. 2014 Dec; 3:721. (査読有)

[学会発表](計7件)

Havashi A, Misumi K, Shibahara J, et al. Lymphocyte Infiltration is a New Promising Prognostic Factor in Hepatocellular Carcinoma. 12 -18 March 2016, Seattle, WA, USA.

Havashi A, Shibahara J, Misumi K, et al. Distinct Clinicopathologic and Genetic Features of Two Histologic Subsets of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. The 105th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology. 12 -18 March 2016, Seattle, WA, USA.

林 玲匡, 柴原 純二, 山内 直子ら. 肝細胞癌背景肝組織における H3K27ac 修飾レベルの臨床病理学的検討. 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日, 名古屋国際会議場, 名古屋
牧瀬 尚大, 林 玲匡ら, 次世代シーケンズによる肝細胞癌のクロマチン構造解析. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日-10 月 10 日, 名古屋国際会議場, 名古屋

田頭 周, 谷内田 真一, 垣内 美和子, 六反 啓文, 林 玲匡ら. Multi lesion analysis

of alpha fetoprotein producing gastric cancer. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日-10 月 10 日, 名古屋国際会議場, 名古屋

垣内 美和子, 上田 宏生, **林 玲匡**, 山本 尚吾, 辰野 健二, 小池 和彦, 石川 俊平, 油谷 浩幸. Genomic characterization of diffuse-type gastric cancer. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日-9 月 27 日, パシフィコ横浜, 横浜

辰野 健二, 上田 宏生, 山本 尚吾, 永江 玄太, 辻 真吾, **林 玲匡**ら. Large scale and integrated cancer genome analysis revealed frequent TERT alterations in hepatocellular carcinoma. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日-9 月 27 日, パシフィコ横浜, 横浜

〔図書〕なし

〔産業財産権〕

○出願状況 なし

○取得状況 なし

〔その他〕

東大病理ホームページ

<http://pathol.umin.ac.jp/index.shtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 玲匡 (Akimasa HAYASHI)

東京大学, 医学部附属病院, 助教

研究者番号: 40735396

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし