

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19075

研究課題名(和文) 網羅的クロマチン構造解析を用いた β -cateninの新規標的遺伝子探索

研究課題名(英文) Identification of new beta-catenin target genes using genome-wide analyses of chromatin structure

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子(ゲノム)の変化だけではなく、エピゲノムと呼ばれる修飾、構造の変化が癌の発生、進展には重要であるとされている。本研究では、肝細胞癌における、主要な遺伝子変化である、 β -catenin (CTNNB1)の変異に注目し、同変異がクロマチン構造というエピゲノムの変化にどのように影響を及ぼすかを、網羅的、統合的に解析した。そして、 β -catenin遺伝子変異に特異的なクロマチン構造の変化を抽出し、さらに、治療の標的となり得る、 β -cateninが直接作用する遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：It is known that not only genetic changes but also epigenetic alterations are important for the genesis and prognosis of cancer. In this project, we focused on beta-catenin (CTNNB1) mutations in hepatocellular carcinoma and revealed how these beta-catenin mutations affect the chromatin structure using integrated genome-wide analyses. Briefly we detected changes in chromatin structure, which were specific to the beta-catenin mutations. Finally we identified novel direct targets of beta-catenin, which might be candidates for therapeutic targets.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 ゲノム エピゲノム FAIRE

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は世界的に予後不良の疾患であり、日本では慢性 C 型肝炎、肝硬変を背景とした発癌がその特徴であった。近年、日本の肝炎ウイルス感染者、あるいは肝炎ウイルスの持続感染を背景とした発癌は減少傾向にある一方で、所謂非 B 非 C 型肝炎肝細胞癌は増加傾向にあり、日本における肝細胞癌の死亡率、死亡者数は、依然として、高い水準のままである。

このような状況下において、治療標的となり得るような分子メカニズムを解明すべく、肝細胞癌のゲノム、エピゲノム研究が多くなされている。特に、ゲノムの変化は、近年の大規模研究によって、多くのメカニズムが明らかになった。その一方で、癌の発生・進展過程で蓄積するとされるエピゲノム変化は、クロマチン構造変化などは、まだ不明な点も多い。また、ゲノム変化とエピゲノム変化の統合解析を行っている研究も比較的少ない。

2. 研究の目的

本研究では、肝細胞癌の発生・進展過程で蓄積するゲノム、エピゲノム変化双方に注目し、それらを統合解析することで、肝細胞癌における主要遺伝子変異がエピゲノムに及ぼす変化を解明することをその目的とした。特に、ゲノムの変化として β -catenin (*CTNBL1*) 遺伝子変異に、エピゲノムの変化としてクロマチン構造の変化に注目し、 β -catenin 変異によって引き起こされるクロマチン構造の変化を明らかにすることを目標とした。この際、生体内で起こっている現象に特に注目し、肝細胞癌の手術検体を用いて、研究を進めることとした。そして、種々の網羅的解析と統合的に評価することによって、 β -catenin の新たな標的遺伝子、ひいては、 β -catenin 変異肝細胞癌において治療標的となり得る候

補遺伝子を同定することを、最終的な目標とした。

3. 研究の方法

網羅的にクロマチン構造変化を捉える方法として、in vivo FAIRE-seq (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements followed by next generation sequencing) に注目し、肝細胞癌の手術検体から採取した凍結組織検体を用いて、in vivo FAIRE-seq を行った。また、同じ凍結組織検体を用いて Exome-Seq (Whole Exome sequencing) および RNA-seq (RNA-sequencing) を行い、網羅的な遺伝子変異変異解析および遺伝子発現解析を行った。

これらのデータの統合解析を行うとともに、 β -catenin 変異肝癌培養細胞 (HepG2) の β -catenin ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation followed by next generation sequencing) の結果も併せ、 β -catenin の標的遺伝子の同定を試みた。さらに手術検体より作成された FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) 検体を用いて組織アレイを作成し、免疫組織学的に肝細胞癌における標的遺伝子のタンパク発現を評価すると共に、臨床病理データを用いてその臨床病理学的特徴を解析した。

4. 研究成果

肝細胞癌の手術検体から採取した凍結組織検体を用いて行った in vivo FAIRE-seq により、肝細胞癌の癌部、非癌部に特異的なヌクレオソーム・フリー領域が網羅的に同定された。また、同じ凍結組織検体を用いて行った Exome-seq の結果から、 β -catenin 変異症例に注目し、 β -catenin 変異に特異的なヌクレオソーム・フリー領域を抽出した。

このようにして同定された β -catenin 変異に特異的なヌクレオソーム・フリー領域には、 β -catenin 変異肝癌培養細胞 (HepG2) の β -catenin ChIP-seq の結果から、有意に β -catenin の結合が確認され、また同時に標的 (候補) 遺伝子が同定された。さらに、RNA-seq の結果を踏まえ、 β -catenin 標的 (候補) 遺伝子のうち、特に発現変化の大きい遺伝子を抽出した。候補遺伝子の中で、近年その機能が解明されつつある遺伝子 X に注目し、肝細胞癌約 250 症例より作成した組織アレイを用いて、免疫組織化学的に β -catenin 変異症例で遺伝子 X が高発現していることを確認した。さらに臨床病理データを用いて解析を行ったところ、遺伝子 X 高発現群は、一部の組織学的特徴との相関が見られたが、予後との有意な関連は見られなかった。これら一連の結果は、現在科学誌への投稿準備を進めている。

また、免疫組織学的検討の際に行った、遺伝子 X 以外の肝細胞癌の免疫組織学的検討、あるいは臨床病理データベース作成の際に行った、肝細胞癌の組織学的検討および肝内胆管癌の組織学的検討から、複数の新たな知見を得ることができた。

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 5 件)

1. Hayashi A, Misumi K, Shibahara J, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M. Distinct Clinicopathologic and Genetic Features of 2 Histologic Subtypes of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2016 Aug;40(8):1021-30.
2. Hayashi A, Misumi K, Shibahara J,

Kokudo N, Kato Y, Fukayama M. Immunohistochemistry using monoclonal antibody MsMab-2 is useful to detect IDH1 R132L in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Pathol Int*. 2016

Oct;66(10):578-582.

3. Misumi K*, Hayashi A*, Shibahara J, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M. (*These authors equally contributed) Intrahepatic cholangiocarcinoma frequently shows loss of BAP1 and PBRM1 expression, and demonstrates specific clinicopathological and genetic characteristics with BAP1 loss. *Histopathology*. 2017 Apr;70(5):766-774.
4. Yamamoto M, Akamatsu N, Hayashi A, Togashi J, Sakamoto Y, Tamura S, Hasegawa K, Fukayama M, Makuuchi M, Kokudo N. Safety and efficacy of venous reconstruction in liver resection using cryopreserved homologous veins. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2017 Sep;24(9):511-519.
5. Fujiwara N, Nakagawa H, Enooku K, Kudo Y, Hayata Y, Nakatsuka T, Tanaka Y, Tateishi R, Hikiba Y, Misumi K, Tanaka M, Hayashi A, Shibahara J, Fukayama M, Arita J, Hasegawa K, Hirschfield H, Hoshida Y, Hirata Y, Otsuka M, Tateishi K, Koike K. CPT2 downregulation adapts HCC to lipid-rich environment and promotes carcinogenesis via

acylcarnitine accumulation in obesity. *Gut*. 2018 Feb 6. pii: gutjnl-2017-315193.

(3) 連携研究者

なし

[学会発表] (計 1 件)

(4) 研究協力者

1. 吉川 修平, 牧瀬 尚大, 林 玲匡, 藤田 隆教, 野村 征太郎, 永江 玄太, 緑川 泰, 深山 正久, 油谷 浩幸. 次世代シーケンスによる肝細胞癌のクロマチンアクセシビリティ解析 第75回 日本癌学会総会 2016年10月6日-8日 横浜

なし

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

東京大学 医学部・大学院医学系研究科
病因・病理学専攻 人体病理学・病理診断学
分野 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 (Hayashi, Akimasa)
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