

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860543

研究課題名(和文) 肝炎・肝癌誘導因子LT の発現を制御する高次エピゲノム構造の解析とその臨床応用

研究課題名(英文) Analysis of the higher-order regulatory mechanism of LT-beta epigenome, leading to clinical application.

研究代表者

渡邊 丈久 (WATANABE, TAKEHISA)

熊本大学・その他の研究科・助教

研究者番号：20634843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：・NF- κ Bシグナルが恒常的に活性化している肝癌細胞株を用いて、LT の活性化にはNF- κ B の恒常的活性化が重要であることを示した。またNF- κ B阻害薬によりLT の発現が抑制されることから、NF- κ B阻害薬によるLT 高発現群に対する個別化医療の可能性を見出した。
・従来、LT の発現確認には組織検査が必要であった。血清exosome中のLT が定量的に検出できること、肝癌患者の腫瘍部分のLT 発現と血清exosome中のLT 発現とに正の相関があることを見出した。またexosome中のLT 高発現群は低発現群と比べ予後不良であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using the hepatic cell-line which NF- κ B signal was activated constitutively, we showed that constant activation of NF- κ B was important to activation of LT . In addition, we found the possibility of NF- κ B as one of personalized medicine for the LT overexpression group, because the expression of LT was controlled by NF- κ B inhibitor.

・An tissue examination was necessary to confirm LT expression, conventionally. We found that LT in serum exosome could be detected quantitatively. We also found LT expression in the liver cancer tissue was in proportion to LT in serum exosome. In addition, the group highly expressed LT in exosome had a poorer prognosis than low expression group.

研究分野：消化器内科

キーワード：LT NF- κ B CTCF epigenetics exosome

1. 研究開始当初の背景

・ Lymphotoxin (LT)B は、肝炎ウイルスに感染した肝細胞や一部の肝細胞癌で発現を認めるほか、肝特異的にLTBを発現させたマウスでは慢性肝炎から肝細胞癌が生じることから、肝炎・肝細胞癌の誘導因子として近年注目されている炎症性サイトカインである。LTBはTNFファミリーに属しており、同じファミリーのTumor necrosis factor (TNF)、LT α と隣接して存在する遺伝子クラスター (TNF/LT遺伝子座) により転写されている。

・ DNAとタンパク質の複合体であるクロマチンの高次構造は、遺伝子変異を介さず発現を調節する、いわゆるエピジェネティクスによる遺伝子発現制御のメカニズムの一翼を担っている。遺伝子クラスターにおいては、ゲノム上では離れているエンハンサーやプロモーターといった遺伝子発現の制御配列が、高次クロマチン構造により空間的に近接し相互作用することが発現制御に関わるとされている。

・ 我々は先行研究において、ヒト肝細胞におけるLTBのエピジェネティックな発現制御メカニズムを調べるために、クロマチン高次構造のkey分子であるCTCF (CCCTC-binding factor)に注目した。我々はCTCF抗体によるクロマチン免疫沈降法(ChIP)を基にした網羅的解析を行い、TNF/LT遺伝子座に4つのCTCF結合部位(TC1~TC4)が存在することを見出した。

・ またUCSC Genome Browserなどのデータベースを用い組織特異的な遺伝子発現を制御するエンハンサーやプロモーター等の制御配列を推定する方法を確立し、TNF/LT遺伝子座に存在するエンハンサー(TE2)を同定することで実証した。それにより細胞核内のDNAの3次元的位置関係、すなわち高次クロマチン構造の解析法である3C法の要点となるDNA配列を絞ることができ、assayの効率を上げることが可能にした。

・ 結果的にCTCFおよびその結合配列 (TC1~TC4)がTNF/LT遺伝子座の高次クロマチン構造およびLTBの発現制御に関与すること、炎症刺激により活性化したNF- κ BシグナルによりTNF/LT遺伝子座の高次構造が変化しTNF/LT遺伝子群を発現することを明らかにした。このようにLTBの発現と高次クロマチン構造の関係は明らかになった。しかし、LTB発現時に高次クロマチン構造を変化させる詳細な分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

高次クロマチン構造の変化に関与しLTB発現を制御する分子メカニズムを明らかにする。肝炎・肝細胞癌の誘導因子であるLTBの高発現群に対する個別化医療を提供する。そのためにLTB高発現群の臨床像を明らかにし、新規病態診断法を開発する。最終的にLTB遺伝子発現の調節を目的とした“エピジェネティック治療薬”の開発を目指す。

3. 研究の方法

高次クロマチン構造変化のメカニズムの解明

LTBの発現制御にはCTCFを介した高次クロマチン構造が重要である。CTCFは翻訳後修飾がその機能に必要であることが知られている。とくにPARP1により制御されるCTCFのポリADPリボシル化(PAR化)は高次構造の構成に必要であるとされる。我々は2次元電気泳動法、ウエスタンブロット法を用いてCTCFの翻訳後修飾を解析した。

高次クロマチン構造に影響を与える因子の検索

慢性肝炎ではLTB発現時の高次クロマチン構造の変化が遷延していることが考えられる。我々はLTBの発現が、炎症に関与する代表的転写因子であるNF- κ Bの影響を受けることを先行研究で見出した。そこでNF- κ Bシグナルが恒常的に活性化している肝癌細胞株を用いて、NF- κ BがLTB発現や高次構

造に与える影響について定量的 RT-PCR 法、3C 法を用いて解析した。

LTβ 発現群に対する新規診断法の開発

・LTβ 発現新規診断法の開発として、ゲノム高次構造を臨床サンプルで行う *in vivo* 3C 法の開発に着手した。3C に用いるプライマーは従来の *in vitro* 3C 法のものそのまま使用し、固定条件、制限酵素反応、連結反応等の条件検討を行った。

・また、個別化医療に役立てるため、患者の LTβ 発現状況をより低侵襲に確認するための手法の開発に着手した。特に、癌細胞が局所で分泌した細胞外小胞、いわゆる exosome が末梢血中で補足されることに着目し、exosome 中に LTβ が検出可能かどうかウエスタンブロット法で確認した。

4. 研究成果

高次クロマチン構造変化のメカニズムの解明

LTβ の発現制御には CTCF を介した高次クロマチン構造が重要である。我々は 2 次元電気泳動法、ウエスタンブロット法を用い CTCF の翻訳後修飾の解析を行った。その結果 PAR 化やアセチル化が生じることがわかった。とくに PARP1 により制御される CTCF のポリ ADP リボシル化 (PAR 化) は高次構造の構成に必要であるとされ、PARP 阻害薬を用いると *TNF/LT* 遺伝子座の遺伝子発現は、CTCF を knock down した際と同様に、LTβ の特異的制御がみられなくなった。よって CTCF の PAR 化は CTCF による LTβ のエピゲノム制御高次構造維持に必要と考えた。

高次クロマチン構造に影響を与える因子の検索

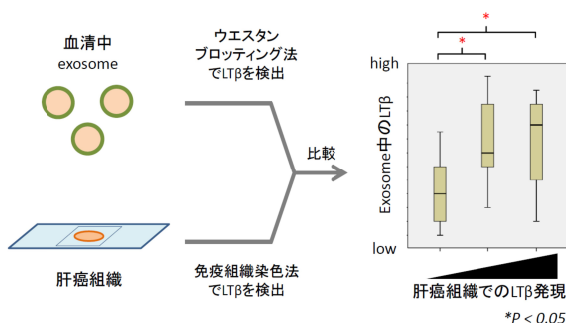
NF-κB シグナルが恒常的に活性化している肝癌細胞株を用いて、NF-κB が LTβ 発現や高次構造に与える影響について定量的 RT-PCR 法、3C 法を用いて解析した。その結果、炎症刺激により特異的な高次クロマチン構造の変化が持続することで、LTβ 発現が

惹起されることを明らかにし、LTβ の活性化には NF-κB の恒常的活性化が重要であることが示された。また NF-κB 阻害薬により LTβ の発現が抑制されることから、NF-κB 阻害薬による LTβ 高発現群に対する個別化医療の可能性を見出した。

LTβ 発現群に対する新規診断法の開発

LTβ 発現の診断法の一つとして *in vivo* 3C 法を検討した。結果として、臨床サンプルではホルマリンによる DNA-蛋白間の固定が一樣でなく、高次構造の解析結果に一定の傾向は得られるものの、有意な結論を得るに至らなかった。

・LTβ は細胞膜結合型のサイトカインとして局所的に作用するため、LTβ の発現確認には組織検査など侵襲的な検査が必要であった。特に個別化医療を行うためには患者の LTβ 発現状況を”より低侵襲”に検出することが求められる。我々は患者血清より exosome を抽出し、exosome 中の LTβ を定量的に検出することに成功した。また、肝癌患者の腫瘍部分の LTβ 発現と血清 exosome 中の LTβ 発現とに正の相関があることを見出し、肝癌組織中の LTβ を反映している可能性が示唆された。さらに、臨床データとの対比より、exosome 中の LTβ 高発現群は低発現群と比べ予後不良であることを明らかにした。このことは LTβ 発現群に対する個別化治療を考える上で、臨床上、治療選択および予後予測に大変重要であると考えられた。



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. The longitudinal effect of the *aldehyde dehydrogenase 2* *2 allele on the risk for non-alcoholic fatty liver disease. Oniki K, Watanabe T (3 番目/9 人中), et al. **Nutrition & Diabetes**, *in press*.
2. The retrovirus HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the human genome. Satou Y, Watanabe T (9 番目/12 人中), et al. **PNAS** 11, 3054-59, 2016
3. Evaluation of sorafenib treatment and hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma: a comparative study using the propensity score matching method. Fukubayashi K, Watanabe T (4 番目/12 人中), et al. **Cancer Medicine** 8, 1214-23, 2015
4. 脳死肝移植登録中に B 型急性 1 型肝炎を発症した原発性胆汁性肝硬変の 1 例. 平江麻衣, 渡邊丈久 (2 番目/11 人中) **肝臓** 55, 176-181, 2014.
5. NF-κB シグナル研究のこれまでの変遷特集 / 肝胆膵領域における NF-κB 研究の最前線. 渡邊丈久、佐々木裕. **肝胆膵** 68, 495-503, 2014.
6. 肝硬変の定義と概念. 渡邊 丈久、佐々木裕. **最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC** 44 肝硬変 改訂第 2 版, 最新医学社 13-19, 2013.
7. 肝癌治療後の化学療法による再発予防. 田中基彦、渡邊丈久 (2 番目/5 人中) **The Liver Cancer Journal** 5, 100- 109, 2013.
8. Pancreatic metastasis from mixed adenoneuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a case report. Nishimura C, Watanabe T, (7 番目/17 人中), et al. **Case Reports in Oncology** 6, 256-262, 2013.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. AASLD 2015.11.17
Lymphotoxin-β regulated by NF-κB is a useful biomarker related to poor prognosis in hepatocellular carcinoma.
Takehisa Watanabe, (1 番目/11 人中), et al.
2. 第 51 回日本移植学会総会 2015.10.2
臓器横断的シンポジウム 移植医療における HCV 治療 up-to-date (シンポジウム)
「当院における DAA 登場後の移植後 C 型肝炎に対する治療の検討」
渡邊丈久 (1 番目/11 人中)、佐々木裕
3. 第 51 回日本肝臓学会総会 2015.5.21
肝細胞癌の亜分類と個別化医療 (ワークショップ)
肝炎・肝細胞癌誘導因子である LTβ の発現様式を用いた肝細胞癌の個別化医療の可能性. 渡邊丈久、田中基彦、佐々木裕
4. 第 58 回日本糖尿病学会 5/21-24, 2015 (口演)
Glutathione S-transferase K1 遺伝子変異が肥満及び非アルコール性脂肪性肝疾患に及ぼす影響. 鬼木健太郎, 渡邊丈久 (12 番目/16 人中),
5. 日本消化器病学会 九州支部 第 85 回市民公開講座 「おなかの病気を考える」 ~よくわかる最新の話~ 2015.9.5
「生活習慣に関連した肝臓の病気」(口演)
渡邊丈久
6. 第 50 回 肝臓研究会 2014.6.5-6 (パネルディスカッション)
肝炎・肝細胞癌誘導因子である LTβ の慢性炎症におけるエピゲノム制御の解析.
渡邊丈久 (1 番目/11 人中)、佐々木裕
7. 腹部超音波での描出困難例の結節に対する仮想超音波での RFA の治療支援の経験 (主題). 立山雅邦、渡邊丈久 (7 番目/10 人中)
8. 第 21 回 肝細胞研究会 2014.6.27. 肝病態形成における NF-κB 解析の意義
佐々木裕、渡邊丈久

9. 第21回日本門脈圧亢進症学会 2014.9.12-13. (パネルディスカッション) C型肝硬変におけるペグインターフェロン、リバビリン併用療法(3剤併用療法を含む)の現状とその予後に関する検討. 立山雅邦、渡邊丈久 (8番目/11人中)
10. 第21回日本門脈圧亢進症学会 2014.9.12-13 門脈腫瘍侵襲を伴う進行肝細胞癌症例における食道胃静脈瘤の合併率と予後との関連についての検討(一般演題) 吉丸洋子、渡邊丈久 (4番目/7人中)
11. 第100回日本消化器病学会総会 2014.4.23-26. 肝予備能良好進行肝細胞癌の治療成績と長期生存例における後治療の意義(主題) 福林光太郎、渡邊丈久 (7番目/10人中)
12. 第50回日本肝臓学会総会. 初回 conventional-TACE 症例の治療効果と TACE 不応因子の解析(一般演題) 福林光太郎、渡邊丈久 (7番目/11人中)
13. 第50回日本肝臓学会総会. 当科および関連施設における Peginterferonα2a 投与症例の検討(一般演題) 立山雅邦、渡邊丈久 (7番目/18人中)
14. 肝癌分子標的治療研究会 2014.6.21 当科におけるソラフェニブ治療反応性の検討(主題). 泉和寛、渡邊丈久 (6番目/10人中)
15. The 2nd JSGE International Topic Conference 2013.3.22. The regulation of Lymphotoxinβ is involved in the higher-order chromatin conformation of the *TNF/LT* locus in hepatocellular carcinoma cells. Takehisa Watanabe, (1番目/8人中), et al.

〔図書〕(計2件)

1. アルコール性肝障害と肝炎ウイルス. 渡邊 丈久、佐々木 裕. Hepatology practice シリーズ第2巻 NASH・アルコール性肝障害の診療を極める ~基本

から最前線まで~, 文光堂 265-269, 2013.

2. 肝細胞癌と癌幹細胞. 渡邊丈久、佐々木 裕. 専門医のための消化器病学 第2版, 医学書院, 436-438, 2013.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊丈久 (WATANABE Takehisa)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 20634843