

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861221

研究課題名(和文) 肝癌特異的な変異遺伝子ARID2の肝癌エピゲノム異常誘導機構の解明

研究課題名(英文) The consequence of AT-rich interacting domain 2 (ARID2) depletion in liver cancers

研究代表者

古田 繭子 (Furuta, Mayo)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：00647183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：合計245症例の全ゲノムシーケンスの解析結果から、肝癌特有の変異遺伝子ARID2遺伝子について機能欠失型点突然変異とゲノム構造異常が合計13% (33/245)の肝がん検体において変異を検出した。全遺伝子変異との比較解析から、ARID2遺伝子の変異は最も有意な変異遺伝子群の一つであることが示唆された。さらに予後との相関解析においては、ARID2とPBRM1に変異を持つクラスターが最も予後不良であることが示唆された。さらに肝癌細胞株を用いて機能解析を行った結果、ARID2は肝癌において腫瘍抑制的に働くことが示唆された。今後肝癌で検出された変異について長期的な安定発現により詳細に影響を実証する。

研究成果の概要(英文)：In liver cancers, totally we found somatic non synonymous mutations, short insertion-deletions or structural variations around ARID2 gene in 33 cases from the WGS analysis of 245 cases, resulting in 13% of liver cancers have genomic alterations in ARID2. In addition, subgroup harboring mutations in ARID2 showed the worse prognosis indicating their importance in tumorigenesis. Since the somatic mutations in ARID2 are significantly enriched with nonsense or indel mutations, the role of ARID2 in liver cancers was thought to be tumor-suppressive. To determine the native ARID2 role in hepatocarcinogenesis, we first analyzed their activity on cell growth. Knockdown of ARID2 in ARID2-intact liver cancer cell lines promoted their growth, while overexpression suppressed their growth. These results indicate that somatic loss-of-function mutations in component of chromatin regulators such as ARID2 could lead the genome-wide gene expression or epigenomic change appeared in liver cancers.

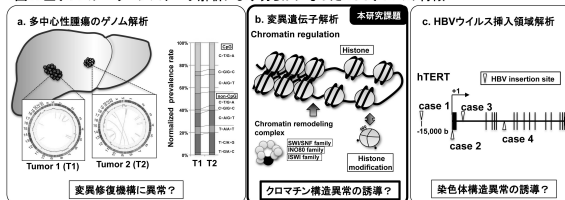
研究分野：分子生物学 がんゲノム

キーワード：肝がん ARID2 ゲノム変異

1. 研究開始当初の背景

HCC は、癌に由来する死因の世界第三位にあたる予後不良の癌である。HCC のリスク因子としては HCV や HBV などのウイルス感染、飲酒・喫煙・食事などの生活習慣に起因する肝障害、変異誘発物質への暴露などがあるが、その多くが長い期間を経て多段階に癌が形成されることから、患者個人間での腫瘍の病態やゲノム異常に大きな差異があることが特徴的である。研究代表者らのグループは国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC) の一環としてウイルス性 HCC の全ゲノムシーケンス (WGS) を進行中であり、既に 27 症例を用いた全ゲノムシーケンスの変異解析から肝細胞癌に特徴的な変異を報告した (Fujimoto, et al., Nat. Genet., 2012)。その中で明らかになった所見 (図 1) として、a. 同一患者由来の多発性腫瘍に検出されたゲノム構造異常や変異は異なっており、起源が同じではない一方で、特徴的な塩基置換パターンを共有していること (変異修復機能の異常に起因する可能性; 図 1a)、p53 に代表される既知の重要な癌関連遺伝子に高頻度に変異が見つかった一方で、b. HCC ゲノム特徴的にクロマチンリモデリングに関わる遺伝子群に多くに変異が見つかり (クロマチン構造異常を誘導する可能性; 図 1b)、さらに HBV ウイルスのゲノム挿入部位の詳細な解析から、c. テロメアの伸長に関わる逆転写酵素をコードする TERT に多く挿入されていること (テロメア長異常による染色体構造異常を誘導する可能性; 図 1c) が明らかになった。これらの変異はいずれも単因子がゲノムワイドな異常を引き起こす要因となりうる変異であり、HCC が長い期間を経て発症する早期の基盤を形成する因子となることが考えられる。驚くべき事に、その中でも HCC 症例の約 60% にクロマチン制御関わるいずれかの因子にゲノムの変異が検出 (図 1b) された事から、その特別な重要性が示唆される。

図1: 全ゲノムシーケンスデータ解析により明らかになったHCCゲノムの特徴



単因子の変異がゲノムワイドな異常を引き起こす可能性

2. 研究の目的

そこで本研究では、図 1b に示した肝細胞癌において変異が認められたクロマチンリモデリング遺伝子について、その中でも

特に HCC 特有に検出された変異遺伝子 ARID2 に着目した。ARID2 は SWI/SNF ファミリーのクロマチンリモデリング複合体 PBAF に必須な構成因子であり (Yan et al., Genes Dev., 2005; 図 2)、2011 年に機能欠失型の mutation が HCC において初めて報告された (Li et al., Nat. Genet. 2011)。研究代表者らのグループでも約 5-10% の頻度で複数の症例で mutation を検出し、報告している (Fujimoto, et al., Nat. Genet. 2012; Table 1)。他の癌腫についても WGS や Exome 解析が世界各国で

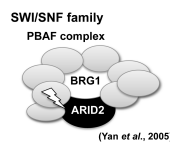


図2: SWI/SNF構成因子ARID2

Table 1: ARID2に検出されたmutation

Case ID	Genotype	Type	
(WGS; n=27)	+T	coding indel	7.4% (2/27)
HCC	AC	nonsynonymous	
(Validation study; n=120)			5.8% (7/120)
1	AT	nonsynonymous	
2	CG	nonsynonymous	
3	GT	nonsynonymous	
4	GT	nonsynonymous	
5	-C	coding indel	
6	-T	coding indel	
7	-A	coding indel	

盛んに施行されているにも関わらず、ARID2 の変異は他の癌腫では変異の頻度が比較的低く注目されていない事から、HCC 特有の癌化過程に関わる重要な癌関連遺伝子である事が示唆される。しかし、HCC をはじめ、癌における ARID2 の機能や下流の標的遺伝子は報告されておらず、詳細な機能の解明が期待される。

3. 研究の方法

本研究では、主に次の二つの解析を柱に、統合的な ARID2 の機能解析を行った。

I. HCC 臨床検体の WGS と RNA シークエンス (RNA-seq) の情報から、ARID2 に変異をもつ症例を選出し、ARID2 変異に特徴的にみられるパターン (DNA と RNA レベルでのコピー数や発現量・塩基置換パターン・再構成や Fusion) の抽出を試み、検証を行った。

II. HCC 細胞株を用いた in vitro 解析系で ARID2 下流の制御遺伝子と結合ゲノム領域を同定し、ARID2 のゲノムワイドまたは遺伝子特異的な機能の解明を試みた。

4. 研究成果

肝癌の全ゲノムシーケンスを合計 245 症例について拡大し、点突然変異検出パイプラインの改良と他のゲノム異常検出パイプラインの構築を完了した。解析パイプラインの改良により、より高精度に変異の検出が完了したとともに、点突然変異に加えてゲノム構造異常のリストの作成が完了した。ゲノム構造異常は遺伝子に与える影響が大きい重要な変異であるため、これらを加えて肝がんにおける ARID2 変異頻度を考察する必要があった。その結果、24 症例について機能欠失型点突然変異を認め、さらに 9 症例について ARID2 遺伝子内ゲノム構造異常が検出され、

これらを統合すると *ARID2* は約 13% (33/245)の肝がん検体において変異を有することが明らかとなり、これは肝がんにおける *ARID2* 変異の重要性を示唆している。

我々は、肝がんにおける *ARID2* の役割を検討するため、*ARID2* 発現のある肝がん細胞株を用いて siRNA によるノックダウン実験と、*ARID2* 欠損細胞株への一過性の過剰発現を行った。その結果、*ARID2* のノックダウンと過剰発現により、細胞増殖の亢進と抑制が観察された。*ARID2* の点突然変異は機能欠失型変異が有意に多いことと一致して、*ARID2* は腫瘍抑制遺伝子として機能することが示唆された。さらに HCC で検出された点突然変異の影響を検証するための各変異を模倣した *ARID2* 発現コンストラクト作成を作製した。細胞株を用いた一過性の過剰発現ではナンセンス変異については過剰発現させたタンパクは予想された通りの構造の異常を示した。*ARID2* 欠損した肝癌細胞株へ一過性の過剰発現による細胞増殖への影響は、多くの変異体で共通の変化が観察されなかった。以上の結果から、これらの変異の細胞増殖への影響は一過性の過剰発現では観察されなかった。

一方で、本解析で用いた 245 症例に加えて合計 300 症例について全ゲノムシーケンスを完了し、報告した (Fujimoto, Furuta *et al*, *Nature Genetics*, 2016)。*ARID2* 遺伝子の変異は最も有意な変異遺伝子群の一つであることが示唆された。さらに予後との相関解析においては、*ARID2* と *PBRM1* に変異を持つクラスターが最も予後不良であることが示唆された。

以上の結果から ARID ファミリー遺伝子群の変異により塩基置換パターンに特徴的な変化を起こすことが明らかとなり、これらはクロマチン構造異常によってひきおこされると考えられた。

今後、*ARID2* 変異による影響を詳細に明らかにする為にはゲノム編集や長期的な安定発現、クロマチン構造の変化を追跡可能な解析系を用いて実証する必要がある。

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 1 件)

Fujimoto A, Furuta M*, Totoki Y, Tsunoda T, Kato M, Shiraishi Y, Tanaka H, Taniguchi H, Kawakami Y, Ueno M, Gotoh K, Ariizumi SI, Wardell CP, Hayami S, Nakamura T, Aikata H, Arihiro K, Boroevich KA, Abe T, Nakano K, Maejima K, Sasaki-Oku A, Ohsawa A, Shibuya T, Nakamura H, Hama N, Hosoda F, Arai Y, Ohashi S, Urushidate T, Nagae G, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Ojima H,

Hiraoka N, Okusaka T, Kubo M, Marubashi S, Yamada T, Hirano S, Yamamoto M, Ohdan H, Shimada K, Ishikawa O, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Aburatani H, Shibata T, Nakagawa H.

Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer.

Nat Genet. 2016 Apr 11.

DOI: 10.1038/ng.3547. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

古田 繭子, Ha Hai Nguyen, 藤本 明洋, 白石 友一, 宮野 悟, 角田 達彦, 中川 英刀 「クロマチンレギュレーター *ARID2* の肝癌における変異の意義」

第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド (兵庫・神戸)

古田 繭子, Ha Hai Nguyen, 藤本 明洋, 白石 友一, 宮野 悟, 角田 達彦, 中川 英刀 「肝癌に特徴的な変異遺伝子 *ARID2* の肝癌エピゲノム異常誘導における意義」

第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド (兵庫・神戸)

古田 繭子, Ha Hai Nguyen, 藤本 明洋, 白石 友一, 宮野 悟, 角田 達彦, 中川 英刀 「肝癌に特徴的な変異遺伝子 *ARID2* の肝癌エピゲノム異常誘導における意義」

第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

Mayuko Furuta, Ha Hai Nguyen, Akihiro Fujimoto, Yuichi Shiraishi, Satoru Miyano, Tatsuhiko Tsunoda, Hidewaki Nakagawa

Genome-wide integrative analysis for the determination of the consequence of AT-rich interactin domain 2 (*ARID2*) depletion in hepatocellular carcinoma
AACR Annual Meeting 2013, April 6-10, Washington, DC, USA

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

古田 繭子 (Furuta Mayuko)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医

科学研究センター・研究員
研究者番号：00647183

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
中川 英刀 (Nakagawa Hidewaki)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・チームリーダー
研究者番号：50361621

藤本 明洋 (Fujimoto Akihiro)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・副チームリーダー
研究者番号：30525853