

博士論文

肝細胞癌におけるヒストン修飾、クロマチン構造の解析

林 玲 匡

目次

第1章 序文.....	2
第2章 肝細胞癌における H3K27ac および H3K27me3 の免疫組織学的検討.....	4
2.1 背景と目的.....	4
2.2 材料と方法.....	5
2.2.1 材料.....	5
2) 組織アレイの作成.....	6
3) 凍結組織検体の保存.....	6
4) 倫理委員会の承認に関する事項.....	6
2.2.2 方法.....	6
1) 免疫組織化学染色.....	6
2) 免疫組織化学染色の解析.....	7
3) ウェスタンブロッティング.....	8
4) 蛍光二重染色.....	9
5) 統計学的評価.....	9
2.3 結果.....	10
1) 肝細胞癌および背景肝におけるグローバルなヒストン修飾状態.....	10
2) 肝細胞癌における H3K27ac および H3K27me3 の染色レベルの分布.....	10
3) H3K27 修飾と臨床病理学的因子の関係.....	11
4) 同一癌組織内および同一癌細胞核内における H3K27ac および H3K27me3 の分布... ..	12
2.4 考察.....	12
1) 癌部・非癌部における H3K27ac および H3K27me3 のグローバルな修飾レベルの違い.....	13
2) 症例間における癌部での H3K27ac および H3K27me3 のグローバルな修飾レベルの違い.....	14
第3章 凍結手術検体を用いた <i>in vivo</i> ChIP-seq および FAIRE-seq の確立.....	18
3.1 背景と目的.....	18
3.2 材料と方法.....	20
3.2.1 材料.....	20

1) 症例の選択	20
2) 倫理委員会の承認に関する事項	21
3.2.2 方法	21
1) 凍結手術検体を用いたヒストン修飾の ChIP	21
2) 凍結手術検体を用いた FAIRE 法	24
3) 次世代シーケンサーによる ChIP および FAIRE サンプルの解析	25
4) シーケンスリードの解析	27
3.3 結果	27
1) 各種方法による OCT コンパウンド包埋組織の凍結粉砕固定の比較	28
2) H3K27ac および FAIRE のピークの分布	28
3.4 考察	30
1) in vivo ChIP-seq および in vivo FAIRE-seq プロトコルの確立	30
2) H3K27ac および FAIRE のピークのゲノムワイドな分布	31
第 4 章 CTNNB1 の遺伝子変異に注目した in vivo FAIRE-seq による癌での転写制御メカニズ ムの解明の一例	33
4.1 背景と目的	33
4.2 材料と方法	34
4.2.1 材料	34
1) 症例の選択	34
2) 培養細胞	35
3) 倫理委員会の承認に関する事項	35
4.2.2 方法	35
1) 凍結手術検体を用いた FAIRE-seq	36
2) モチーフ解析	36
3) CTNNB 変異肝癌細胞株 HepG2 における、HNF4A の ChIP-seq	36
4) 公開データの利用による HepG2 の FOXA1 ChIP-seq	37
5) 遺伝子発現との統合解析	37
4.3 結果	38
1) FAIRE ピークのモチーフ解析	38
2) HepG2 における β -catenin、HNF4A、FOXA1 の結合部位	38
3) 癌・非癌部共通のエンハンサー領域の FAIRE ピークと HNF4A、FOXA1 の共局在	39

4) <i>CTNNB1</i> 変異症例の癌特異的エンハンサー領域の FAIRE ピークと β -catenin、HNF4A、FOXA1 の結合.....	39
4.4 考察.....	40
1) エンハンサー領域における癌・非癌部共通の FAIRE ピーク.....	40
2) <i>CTNNB1</i> 変異症例でのエンハンサー領域における癌特異的な FAIRE ピーク.....	41
第 5 章 結語.....	44
謝辞.....	45
参考文献.....	47
図 1 クロマチン構造とヒストン修飾.....	56
図 2 癌部および非癌部における H3K27ac および H3K27me3 の修飾.....	57
図 3 解析ソフトを用いた免疫組織化学的結果の定量解析.....	58
図 4 癌部における H3K27ac および H3K27me3 の H スコアの分布.....	59
図 5 低 ac/低 me3、高 ac/低 me3、低 ac/高 me3、高 ac/高 me3 各群の代表的な組織顕微鏡像.....	60
図 6 Kaplan–Meier analysis 法を用いた生存解析.....	61
図 7 H3K27ac および H3K27me3 の蛍光二重染色.....	62
図 8 p53 および β -catenin の代表的な組織顕微鏡像.....	63
図 9 癌部・非癌部における H3K27 修飾酵素の遺伝子発現.....	64
図 10 癌部における症例間の H3K27 修飾酵素の遺伝子発現の違い.....	65
図 11 ChIP-seq (H3K27ac) および FAIRE-seq の概念図.....	66
図 12 4 種の粉砕法による H3K27ac および FAIRE の相対的濃縮率.....	67
図 13 (a) H3K27ac ChIP-seq、(b) FAIRE-seq のピーク例.....	68
図 14 MACS のアルゴリズムによって同定された (a) H3K27ac ChIP-seq、(b) FAIRE-seq のピーク.....	69
図 15 FAIRE のピーク周囲 H3K27ac のピーク.....	70
図 16 癌・非癌部共通の FAIRE のピークに見られた代表的モチーフ.....	71
図 17 (a) <i>CTNNB1</i> 正常 (b) <i>CTNNB1</i> 変異症例での癌特異的 FAIRE のピークに見られた代表的モチーフ.....	72

図 18 HepG2 における β -catenin、FOXA1、HNF4A の共局在	73
図 19 癌・非癌部共通のエンハンサー領域の FAIRE ピーク (1397 ヶ所) に対する FOXA1、HNF4A のピークの重なり	74
図 21 CTNNB1 変異症例のエンハンサー領域の癌特異的ピーク TOP1000 と β -catenin、FOXA1、HNF4A のピーク	76
図 22 CTNNB1 変異症例の癌特異的 FAIRE ピークと β -catenin・HNF4A・FOXA1 の共局在	77
図 23 CTNNB1 の体細胞突然変異と β -catenin の蓄積	78
表 1 H3K27ac および H3K27me3 の発現と肝細胞癌における臨床病理学的因子との相関 ...	79
表 2 H3K27 修飾と肝細胞癌における臨床病理学的因子の相関	80
表 3 H3K27 修飾と分子的な特徴との相関	81
表 4 H3K27 修飾と患者アウトカム (単変量解析)	76
表 5 H3K27 修飾と患者アウトカム (多変量解析)	83
表 6 癌・非癌部共通でエンハンサー領域に共局在する HNF4A・FOXA1 によって制御されている遺伝子候補リスト	84
表 7 癌・非癌部に共通してエンハンサー領域に共局在する HNF4A・FOXA1 によって制御されている候補遺伝子の遺伝子オンロジー解析	85
表 8. CTNNB1 変異症例で癌特異的 FAIRE ピークに CTNNB、HNF4A、FOXA1 が見られ、癌での発現上昇が確認された遺伝子	86

略語一覧

ChIP : Chromatin immunoprecipitation (クロマチン免疫沈降)

ChIP-seq : Chromatin immunoprecipitation followed by next generation sequencing (次世代シーケンサー併用のクロマチン免疫沈降、全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス)

FAIRE : Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (調節エレメントのホルムアルデヒド支援単離)

FAIRE-seq : Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements followed by next generation sequencing (次世代シーケンサー併用の調節エレメントのホルムアルデヒド支援単離、全ゲノム調節エレメントのホルムアルデヒド支援単離シーケンス)

CTNNB : Catenin beta (β カテニン)

H3K27ac : Histone H3 lysine 27 acetylation (ヒストン H3 リジン 27 のアセチル化)

H3K27me3 : Histone H3 lysine 27 methylation (ヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化)

HNF4A : Hepatocyte nuclear factor-4A

FOXA1 : Forkhead box A1

LEF : Lymphoid enhancer-binding factor

TCF : T-cell factor

要旨

本研究では、肝細胞癌におけるエピゲノム異常の解明を目的として、肝癌臨床組織における特異的ヒストン修飾と臨床病理学的特徴の評価および、クロマチン構造異常とその標的遺伝子の探索を行った。ホルマリン固定パラフィン包埋標本の定量的免疫染色評価では、H3K27ac や H3K27me3 修飾レベルが癌部でそれぞれ有意に上昇しており、双方の修飾が高レベルにある症例は p53 の核内集積や低分化度とも関連し、臨床的にも予後不良である傾向を認めた。クロマチン構造異常とその標的遺伝子の探索は、新たに確立した組織の ChIP-seq 法、FAIRE-seq 法で行った。オープンクロマチン領域のモチーフ解析で肝細胞分化のマスター制御因子 (FOXA1、HNF4A) の認識配列の濃縮を癌部・非癌部共通に認めたが、*CTNNB1* の変異肝癌では加えて TCF/LEF の認識配列の濃縮を認めた。本解析系は組織検体のエピゲノム異常の全容解明に有用であると考えられる。

第1章 序文

近年、国際コンソーシアムを中心とした大規模スタディにより、肝細胞癌を含むさまざまな癌において、ゲノム異常・ゲノム構造異常・遺伝子発現異常および転写制御異常 (エピゲノム異常) が包括的に明らかになりつつある[1,2]。これまでに行われた解析結果から、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[3]。エピゲノム修飾は、化学的制御と物理的制御に大別されるが、化学的制御の代表が「ヒストンコード」と称される種々のヒストンテールの修飾である[4]。ヒストンテールの数十に及ぶアミノ酸に対して修飾が報告されてきたが、それぞれの修飾に対して、これを特異的に付加する酵素 (writer) と除去する酵素 (eraser) の発見が相次いでおり、こうした修飾単独あるいは組み合わせを認識するクロマチン結合タンパク (reader) が転写制御を担っている。癌では、このようなヒストン修飾酵素・関連タンパクそのものにも異常が挙げられており、新たな治療標的として注目されている[5]。一方、物理的制御としては、一次 (ヌクレオソーム) および高次よりなるクロマチン構造が重要である。クロマチン構造は正常な細胞分化・発生の過程でダイナミックに変化し (クロマチンリモデリング)、この時空間的な制御が必須であるだけでなく、その制御異常は発生異常や癌化などの疾患にも関与していることから近年特に注目されている[6]。

代表的な細胞種におけるヒストン修飾状態・クロマチン構造のプロファイルは、2000年代に発足した ENCODE (The Encyclopedia of DNA Elements) プロジェクトで公開されており、多くの生物の転写制御の全容解明に広く貢献してきた[7,8]。ここで用いられている癌細胞株など培養細胞を用いた実験は、繰り返し実験を行うことができ、

再現性も高い。一方で、冒頭に述べた大規模スタディの結果からは、同じ癌種の中でも分子生物学的性質の異なる複数のサブグループが存在することは明らかであり、少数の癌細胞株で得られる知見で癌にみられる多様なエピゲノム異常の全てを説明することは困難と考えられる。また、培養細胞は、その初代培養においても、もとの癌組織の一部クローンのみが選択的に生存・増殖している可能性が否定しえず、継代培養後もさらにクローン選択が進行している可能性もある。そこで、癌細胞株を中心にこれまで行われてきた解析系を、ヒト凍結手術検体あるいはホルマリン固定パラフィン包埋サンプルに応用する手法の確立が不可欠と考えられた。本研究では、臨床組織検体を用いたヒストン修飾解析、クロマチン構造解析により、その標的遺伝子・標的領域の解析を通して、転写制御プログラムの解明を試みた。

本研究では、ヒストン修飾として、遺伝子発現を正に活性化する領域 (エンハンサー領域) に特徴的にみられる H3 リジン 27 のアセチル化 (H3K27ac) に注目した。遺伝子発現状態は転写開始点が存在するプロモーター領域のクロマチン状態とよく相関するが、細胞系譜に特有の遺伝子発現調節においては、エンハンサーのクロマチン状態も深く関与していることが知られている[9]。また、最近では、H3K27ac を指標とするエンハンサー領域が、遺伝子の立体構造形態 (ゲノムトポロジー) においても重要なことが示されている。本研究では、この H3K27ac を軸に、臨床組織検体を用いたヒストン修飾解析、クロマチン構造解析を行った。

第2章 肝細胞癌における H3K27ac および H3K27me3 の免疫組織学的検討

2.1 背景と目的

多数の癌組織において、ヒストン修飾酵素やグローバルなヒストン修飾レベルの変化が報告されている [10-12]。肝細胞癌においては、ヒストン H3 リジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) やヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) の染色レベルの上昇が予後不良因子であることが報告されている [13,14]。一方で、肝細胞癌におけるグローバルなヒストンアセチル化レベルに関しては、一貫した結果が得られていない。ヒストン H3 リジン 9 のアセチル化 (H3K9ac) やヒストン H4 リジン 8 のアセチル化 (H4K8ac) が背景肝組織に比べ、癌で染色レベルが高いことが既報で述べられているが、臨床的な意義はわかっていない [15]。

本研究では、序文で述べた通り、ヒストン H3 リジン 27 のアセチル化 (H3K27ac) と同じアミノ酸に入る修飾である H3K27me3 の関連に注目した。H3K27ac は H3K4me1 と同様、エンハンサー領域に特徴的なヒストンマークとされているが、より転写活性化に強く相関する修飾である。一方、H3K27me3 は、初期発生における転写プログラムで抑制的な役割を果たすヒストン修飾であり、様々な細胞系譜への分化を制御する転写因子群が、いわゆる **bivalent mark** と呼ばれる H3K4me3 と H3K27me3 の二重の修飾でコントロールされている [16]。本研究では、それぞれの修飾に特異的なモノクローナル抗体を用いて、これらの相反する作用を有する修飾のグローバルなレベルを同時に評価した。本研究で使用したモノクローナル抗体は、Antibody Validation Database でその特異性が確認されており [17]、クロマチン免疫沈降 [18] や免疫組織学的検討 [19] に複数の論文で用いられている。また、免疫組織学的結果を定量的に解析するために、

バーチャルスライドと画像解析ソフトを使用した[20]。さらに、同一組織内および同一細胞核内の H3K27ac および H3K27me3 の分布・局在を調べるため、蛍光二重染色を実施した。同一細胞核内の H3K27ac および H3K27me3 の分布・局在は、凍結組織検体を用いて行い、シグナル解析ソフト (Leica Application Suite (LAS), Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて定量的にシグナル強度を評価した。最後に、肝癌におけるゲノム変化とエピゲノム変化の関係性を明らかにするために、主要なドライバー遺伝子である p53 と β -catenin の免疫組織学的検討を行い、これらの染色状態と H3K27ac および H3K27me3 のグローバルなレベルの関係性を症例ごとに比較検討した[21]。

2.2 材料と方法

2.2.1 材料

1) 症例の選択

免疫組織化学的評価には、東京大学医学部附属病院肝胆膵外科において、1995年から2006年に幕内基準[22]に基づき切除された、初発肝細胞癌 198 例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた。ウエスタンブロッティングおよび蛍光二重染色には、2011年以降に同様の基準によって切除された初発肝細胞癌例の凍結検体を用いた。なお、各例の病理組織学的診断については、日本肝癌研究会により提唱されている原発性肝癌取扱い規約に基づき、2人以上の病理専門医によってなされている [23]。

2) 組織アレイの作成

免疫組織化学的評価のため、前述のごとく選択された初発肝細胞癌の組織アレイを作成した。ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルから、各ブロックの腫瘍・非腫瘍部を2箇所ずつ、2 mmの細い円筒状に組織を打ち抜いて、多数の組織を整列させ、一つのブロックに包埋した [24]。

3) 凍結組織検体の保存

新鮮手術検体は、2009年から2012年に幕内基準[22]に基づき切除された肝細胞癌症例を用いた。肉眼的に分別した癌部および非癌部を、8 mm角程度の大きさに切り出した後、迅速にOCTコンパウンド (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA) 中に包埋し、ドライアイス・アセトン法により凍結した。凍結検体は、使用するまで-80°Cで保管した。

4) 倫理委員会の承認に関する事項

東京大学医学部附属病院での病理組織検体を用いた研究については、「肝腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」という題目で東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理委員会に申請し、承認を受けている(審査番号 G2210)。

2.2.2 方法

1) 免疫組織化学染色

H3K27ac および H3K27me3 の免疫組織化学的検討は、肝細胞癌のヒストンメチル化の免疫組織学的検討の既報同様、組織アレイを用いた [13,14] 。ランダムに抽出され

た 10 症例については、癌・非癌境界部を含むブロックの全組織切片も同時に評価した。p53 および β -catenin の免疫組織化学的検討は、癌部の全組織切片で行った [25]。

4 μ m 厚に薄切した組織切片あるいは組織アレイ切片スライドを、抗 H3K27ac マウスモノクローナル抗体(CMA309; 1:1000 で希釈, 大阪大学の木村宏先生よりご提供) および抗 H3K27me3 ラビットモノクローナル抗体 (#9733; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; 1:200 で希釈) で染色した[26]。免疫染色工程は、自動染色装置 Benchmark® XT (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) の同社標準プロトコルを用いて行った。全症例の組織切片スライドは、同様の手法を用いて、抗 p53 抗体 (NCL-p53-505; Novocastra Laboratories, Newcastle, UK; 1:50 で希釈) あるいは抗 β -catenin 抗体 (610154; BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA; 1:300 で希釈) でも染色した。

2) 免疫組織化学染色の解析

免疫組織化学染色を施された組織マイクロアレイスライドは、バーチャルスライド (Nano Zoomer®, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) にデジタル画像として取り込んだ後、画像解析ソフト(Tissue Studio®, Definiens AG, Munich, Germany)を用いて解析した。解析結果は、複数の既報のごとく、陽性細胞率 (0-100%) に染色強度 (1-3) を乗じた組織学的スコア (0-300) として症例ごとに算出した [27-29]。既報では、病理医の目視による染色強度の分類が行われていたが、本研究では、画像解析ソフトの陽性群分類機能を用いて、各々の核に割り当てられる DAB (brown diaminobenzidine) 値を基に陽性群を 3 群に分類した。病理医の目視による染色強度分類と画像解析ソフトによる染色強度分類が相関することは既に確認されている[30]。また、本研究では、

画像解析ソフトの学習機能を利用し、解析の対象とすべき細胞として代表的な肝細胞 50 個と肝細胞癌 50 個を、解析から除外すべき細胞として代表的な内皮細胞 50 個と炎症細胞 50 個を選択し、これらから自動的に算出されるサイズ選択、形態（縦横比）を基に内皮細胞や炎症細胞を除外した。なお、全ての核の DAB 値やサイズ、形態の分布を基に組織スコアや基準値を算出することも検討したが、本研究で用いた解析ソフトは、病院などで病理医の目視法に代わるものとして開発されており、データ量の観点から、各々の核の情報をデータとして全て残す機能は備えていなかった。

p53 あるいは β -catenin の陽性・陰性の判定は、全細胞の 5%以上に核内集積像が確認される場合を陽性とし、二人の病理医（林玲匡および山内直子）が各々独立に判定した [25]。判定の不一致を認めたサンプルは、p53 染色で 198 例中 7 例 (4%)、 β -catenin 染色で 198 例中 5 例 (3%) であり、これらの症例では両者がともに検鏡下に評価した上で決定した。

3) ウェスタンブロッティング

組織凍結検体を、Leica 社のクライオスタットを用いて 10 μ m 厚で 20 枚薄切の後、lysis buffer (10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1.0% Triton X-100, 1.0% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 1 mmol/L of phenylmethylsulfonyl fluoride with protease inhibitor cocktail) で溶解させた。10 μ g のタンパクを各レーンにロードし、15% SDS polyacrylamide ゲルを用いてタンパクの分離・電気泳動を行った。PVDF メンブレンに転写してブロッキングの後、抗 H3K27ac マウスモノクローナル抗体 (CMA309; 1:2000 で希釈) あるいは抗 H3K27me3 ラビットモノクローナル抗体 (#9733; 1:1000 で希釈) を用いて 4°Cで一晩、一次抗体反応を行った。メンブレンを TBS-T で洗浄の後、各々HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (NA931V; GE Healthcare UK, Little

Chalfont, UK; 1:5000) あるいは HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (NA9340V; GE Healthcare UK, Little Chalfont, UK; 1:5000) を用いて二次抗体反応を行った。二次抗体反応を行ったメンブレンは、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare UK, Little Chalfont, UK) を用いて化学発光させ、LAS3000UV (FUJIFILM, Tokyo, Japan) にて検出した。

4) 蛍光二重染色

4 μm で薄切した FFPE 組織検体あるいは凍結組織検体スライドを、ブロッキングの後、抗 H3K27ac マウスモノクローナル抗体 (CMA309; 1:1000 で希釈) と抗 H3K27me3 ラビットモノクローナル抗体 (#9733; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; 1:500 で希釈) の混合抗体を用いて、室温で 2 時間一次抗反応を行った。洗浄後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA; 1:1000 で希釈) および Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA; 1:1000 で希釈) の混合抗体を用いて、室温で 1 時間二次抗体反応を行った。免疫標識された組織スライドは、Leica 社の共焦点レーザーキャン顕微鏡 TCS SP5 で観察した。凍結組織検体スライドの観察画像中の蛍光強度の分布は、Leica Application Suite (LAS) を用いて解析した[31]。

5) 統計学的評価

全ての統計学的評価は、JMP Pro 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。P 値は 0.05 未満を有意とした。カテゴリー化されたデータは、 χ^2 検定あるいは、Fisher の正確確率検定を用いた。予後因子に関しては、単変量解析で有意な因子のみを用いて、Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析も行った。病理学的病期は、

腫瘍径や腫瘍数、脈管侵襲などの因子により判定されているため、多変量解析から除外した [23]。

2.3 結果

1) 肝細胞癌および背景肝におけるグローバルなヒストン修飾状態

免疫組織化学染色では、H3K27ac および H3K27me3 とも非癌部に比べ癌部の細胞の核に主に明瞭な陽性像が得られた (図 2a)。ウエスタン・ブロットの結果でも H3K27ac および H3K27me3 の修飾レベルが癌部で有意に高いことが示された (図 2b)。癌部・非癌部の免疫組織化学染色の定量結果の例を図 3a に示す。198 例中 71 例 (約 40%) は、80%以上の腫瘍細胞の核に強陽性像が観察され (染色強度 2-3, H-スコア > 200)、70 例 (約 40%) では、種々の染色強度が混在して観察された (染色強度 1-3, H-スコア 100-200)。残りの 57 例 (約 20%) では、50%以下の腫瘍細胞核に中～弱陽性像が見られた (染色強度 1-2, H-スコア < 100)。一方、背景肝組織では、80%以上の症例で、比較的少数の肝細胞に弱～中陽性像が観察された (染色強度 1-2, H-スコア < 50)。全体としては、H3K27ac の H-スコアは、癌部で 156.7 ± 86.8 (平均 \pm 標準偏差、レンジ 9 - 293)、非癌部で 40.3 ± 33.0 (レンジ 3 - 159) であった。H3K27me3 の染色強度は、癌部で 151.8 ± 78.1 (レンジ 9 - 296)、非癌部で 64.7 ± 45.6 (レンジ 8 - 211) であった。Mann-Whitney 検定では、H3K27ac、H3K27me3 とも癌部の H-スコアは非癌部の H-スコアに比べて、有意に高いことが示された ($P < 0.001$ 、図 3b)。

2) 肝細胞癌における H3K27ac および H3K27me3 の染色レベルの分布

肝細胞癌における H3K27ac および H3K27me3 の H-スコアの分布を図 4 に示す。両

者に明らかな相関は見られず (相関係数 $r = 0.165$)、各々の修飾染色レベルは独立したものと考えられた。各症例は、既報のヒストン H3 リジン 27 の免疫組織化学的検討と同様に、H-スコアによって高レベル群 (H-スコア > 150) と低レベル群 (H-スコア ≤ 150) に分類した [29]。

3) H3K27 修飾と臨床病理学的因子の関係

ヒストン修飾の染色レベルと臨床病理学的因子との関連を検討した結果を表 1 に示す。H3K27ac レベルの高い群では、低分化度の腫瘍が有意に見られ、H3K27me3 レベルの高い群では、低分化かつ脈管侵襲を伴う腫瘍が有意に見られた。H3K27me3 に関しては、Cai らが、H3K27me3 の染色レベルが高い一群に低分化で脈管侵襲を示すものが多いと報告しており、これと合致する結果であった[13]。

H3K27ac および H3K27me3 の染色レベルの組み合わせによって分類した 4 群 (高 ac/高 me3 群、高 ac/低 me3 群、低 ac/高 me3 群、低 ac/低 me3 群) 群の代表的な組織顕微鏡像を図 5 に示す。

これら 4 群と臨床病理学的因子との関連を調べると、高 ac/高 me3 群で有意に低分化の腫瘍が多く (表 2)、p53 陽性症例に多いことも確認された (表 3)。p53 染色および β -catenin 染色の代表的な組織顕微鏡像は図 8 に示す。p53 の核内集積との有意な相関は、H3K27ac および H3K27me3 で 2 群に分類した際は見られなかった。

臨床病理学的因子との解析結果から、高 ac/高 me3 群は、p53 核内集積や低分化という肝細胞癌における予後不良因子との相関が示されたため、次にこの群が独立した予後因子となり得るかを調べた。予後の平均追跡期間は、45.0 ヶ月 (レンジ 2.3-196. ヶ月)、術後 5 年の全生存率は 40.4%、無再発生存率は 19.2%であった。Kaplan–Meier

解析結果を図 6 に示す。その結果、4 群間の比較において、高 ac/高 me3 群で、全生存期間、無病生存期間が有意に短かった (log-rank 検定では、各々 $P=0.021$ 、 $P=0.039$)。また、各群間の χ^2 乗検定では、ボンフェローニ調整 (有意水準を $P < 0.05/4C_2 = 0.05/6$ とする) 後も、全生存において、高 ac/高 me3 群は、低 ac/低 me3 より有意に予後不良であった。さらに、Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析および多変量解析でも、高 ac/高 me3 群は、低 ac/低 me3 より有意に予後不良であることが確認された。

4) 同一癌組織内および同一癌細胞核内における H3K27ac および H3K27me3 の分布

FFPE 組織検体での抗 H3K27ac 抗体および抗 H3K27me3 抗体を用いた蛍光二重染色の顕微鏡像を図 7a に示す。同一癌組織中に、H3K27ac あるいは H3K27me3 のみに強い陽性像を示す細胞も混在するが、全体としては双方に陽性像を示す細胞が多く見られた。

凍結組織検体での抗 H3K27ac 抗体および抗 H3K27me3 抗体を用いた蛍光二重染色の顕微鏡像を図 7b に示す。H3K27ac が核の中心で主に染色されるのに対し、H3K27me3 は核の辺縁に偏在しており、この 2 つの修飾はドット状の領域として排他的に分布していた。画像解析ソフトを用いた蛍光強度の定量的解析でも、H3K27ac の蛍光強度のピークが核の中心付近にあるのに対して、H3K27me の蛍光強度のピークは核の辺縁に認められた (図 7c)。

2.4 考察

1) 癌部・非癌部における H3K27ac および H3K27me3 のグローバルな修飾レベルの違い

H3K27ac および H3K27me3 のグローバルな染色レベルは背景肝と比較して、癌部で有意に高いことが示された。H3K9ac や H4K8ac が、背景肝組織に比べ、癌で染色レベルが高いことはすでに報告があるが[15]、本研究の解析で H3K27ac に関しても同様の結果が確認された。また、Cai らは、H3K27me3 の癌での染色レベル周囲の正常肝組織より高いことに言及しており、今回もそれと合致する結果となった[13]。

H3K27ac は、p300/CBP などのアセチル化酵素によってその修飾を受け、HDACs (Histone deacetylases) と称される一連の脱アセチル化酵素によってその修飾が除去される[32]。H3K27me3 は、メチル化酵素である EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) によってその修飾を受け、脱メチル化酵素である JMJD3 (Jumonji domain-containing 3) や UTX (Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on X chromosome) によってその修飾が除去される[32]。H3K27me3 が癌部で高い理由については、その修飾酵素の遺伝子発現レベルからある程度は説明が可能であり、肝細胞癌においては EZH2 の発現が上昇していることが報告されている [33]。また、先端科学技術センターの遺伝子発現データベース (凍結手術検体 53 例より抽出した RNA を Human U133 Plus 2.0 array GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA)を用いて解析) でも、EZH2 の発現が癌部で高い一方、JMJD3 の発現は癌部でやや低下していることが確認された (図 9a)。

H3K27ac に関わる修飾酵素としては、癌部で p300 [34,35]および HDACs [36,37]双方の発現レベルがともに高いことが報告されている。先端科学技術センターの遺伝子発現データベースでも、p300 の遺伝子発現が癌部でやや上昇している一方で、HDAC は癌部で発現が上昇しているものと低下しているものが見られた (図 9b) 。癌部で

p300 と HDAC の発現が高い理由として、癌での細胞周期の亢進が挙げられる。p300 を含むヒストンアセチル化酵素[38]および HDAC[39]は、ともに細胞周期に必要であり、癌では細胞周期の亢進に伴ってこれらの遺伝子の発現が上昇している可能性が考えられる。

2) 症例間における癌部での H3K27ac および H3K27me3 のグローバルな修飾レベルの違い

肝細胞癌全体においては、H3K27ac および H3K27me3 の修飾レベルに明らかな相関は見られなかったが、H3K27me3 および H3K27ac 染色レベルが同時に高い症例は、有意に p53 の核内集積を示し、形態学的に低分化な腫瘍であることが示された。肝細胞癌全体では、H3K27ac および H3K27me3 の修飾酵素の発現レベルにも一定の相関は見られないとされており、前述の先端科学技術センターの遺伝子発現データベースを用いても修飾酵素間に明らかな相関は見られなかった (図 10)。しかし、H3K27ac および H3K27me3 の修飾酵素の発現は、いくつかの臨床病理学的因子との相関が報告されている。肝細胞癌において p300 タンパクが高発現している症例は、低分化で予後不良なことが示されており[34,35]、EZH2 が mRNA レベル[33]あるいはタンパクレベル[40]で高発現している症例は低分化の癌が多いことが知られている。これらの報告から、低分化癌においては、H3K27ac および H3K27me3 双方の修飾酵素の発現が高いと考えられ、これは、低分化癌において H3K27ac および H3K27me3 の修飾レベルが高いという本研究結果と矛盾しないと考える。

p53 は多くの癌で高頻度に変異を認める癌抑制遺伝子であり、p53 の遺伝子変異と p53 の核内集積には相関があることが報告されている[41]。ヒストン修飾酵素との関

係では、乳癌において、p53 の核内集積と p300 の発現との相関が報告されており[42]、食道癌では、p53 の変異や核内集積と EZH2 発現との関連が報告されている[40]。In vitro では、変異 p53 に伴う転写制御異常として、正常 p53 に対して変異 p53 の割合が増えることで、p53 経路を介した EZH2 プロモーター領域の抑制が解除され、EZH2 の発現が上昇することが示されている [43]。Di Agostino らは、変異 p53 が NF-Y と共に CDK1 (Cyclin-dependent kinase 1)、CCNB1 (Cyclin B1)、CCNB2 (Cyclin B2) などの細胞周期関連の遺伝子のプロモーターに p300 をリクルートし、ヒストンのアセチル化を促進することを示している[44]。なお、肝細胞癌においては、p53 の核内集積を来す症例は低分化であることが知られており[45]、p53 変異症例において、細胞増殖関連遺伝子の発現が上昇している一方、肝臓の分化に必要な遺伝子の発現が低下していることが報告されている[46]。これらの報告からは、p53 の変異が H3K27 の修飾酵素の発現レベルや相互作用を変化させ、H3K27ac や H3K27me3 の修飾レベルを変化させるとともに、標的遺伝子の発現を変化させ、形態学的に低分化な腫瘍を呈する可能性が考えられる。しかし、詳細なメカニズムについては不明な部分が多く、今後検討していく必要がある。

H3K27me3 および H3K27ac という同一部位の 2 つの修飾の核内の分布については、蛍光二重染色と共焦点レーザー顕微鏡を用いることで染色領域が異なっていることが示された。すなわち、H3K27ac が核の中心のユークロマチン領域に主に見られる一方で、H3K27me3 は核の辺縁のヘテロクロマチン領域に主に観察された[47]。H3K27ac は転写活性化領域とするクロマチンを転写ファクトリーにリクルートするエンハンサーマークとして働く一方で、H3K27me3 は時空間的に制御される転写因子が抑制される際にポリコム複合体の認識する目印となっている[16]。こうした染色

の分布が異なることは、ヒストンメチル化酵素やアセチル化酵素の活性が細胞核内に等しく存在するのではなく、核内でも局所的に活性化された領域があることを示唆している。また、それぞれの修飾の作用を考慮すると、H3K27ac や H3K27me3 の修飾レベルともに上昇している癌では、H3K27ac の修飾によって、癌原遺伝子や代謝遺伝子、細胞周期関連遺伝子などが活性化しており、H3K27me3 の修飾によって癌抑制遺伝子や分化関連遺伝子が抑制されている可能性が考えられる。今後、細胞の phenotype に対応する分子生物学的機構まで理解を深めるには ChIP-seq などを用いた標的領域も含めた検討が必要であるとともに、RNA-seq などによる発現解析との比較が必要であると考えられる。

H3K27me3 および H3K27ac 染色レベルが同時に高い症例が、臨床的には予後不良であったことも興味深い。肝細胞癌における予後不良因子としては、形態学的特徴として低分化癌が[48]、分子学的特徴として p53 の変異や核内集積が報告されているが[49]、本研究から、エピゲノム的特徴として H3K27ac および H3K27me3 の修飾レベルの上昇があることが示された。このようなグローバルなヒストン修飾レベルに基づく層別化は、予後予測マーカーとなり得るとともに、最近肝細胞癌の治療薬として注目されている HDAC 阻害薬[50]など、エピゲノム創薬の治療効果判定などにも有用である可能性があると考えられる。

なお、今後研究を進めていく上で、本研究で用いた解析ソフトのプログラムの validation も必要である。本研究では、病理医が選んだ代表的な細胞の情報から、解析ソフトが、認識した全ての細胞に対して、自動的に解析対象／除外の選定を行うプログラムを用いた。病理医が、解析の対象とすべき細胞 (肝細胞、肝癌細胞)と、解析から除外すべき細胞 (炎症細胞、内皮細胞) の代表的な細胞を目視により選択し、対象

／除外とした細胞の核の面積、核の縦横比の分布の違いから、自動的に解析対象のカットオフ値が算出される仕組みである。これまでも病理医の目視法と解析ソフトのプログラムを比較・検討した報告はあるが[30]、主に免疫染色の陽性／陰性の基準や染色強度の一致について言及されており、除外の適否については検証されていない。今後は除外の適否に関しても、従来 of 病理医による目視法と解析ソフトのプログラムを比較・検討する必要があると考える。

第3章 凍結手術検体を用いた *in vivo* ChIP-seq および FAIRE-seq の確立

3.1 背景と目的

免疫組織化学的検討により、肝細胞癌で H3K27ac および H3K27me3 の修飾レベルが癌部で亢進しており、両方が亢進している症例では悪性度が高いことが示されたが、この転写制御異常を分子生物学的に理解するには、その標的遺伝子の同定を含むゲノムワイドな局在解析が不可欠である。本章では、これらの結果のうち、特に癌部での H3K27ac の修飾レベルの上昇に注目し、癌部・非癌部の H3K27ac のゲノムワイドな局在解析を目指した。また、H3K27ac がエンハンサーマークであり、リジン残基のアセチル化による電荷の変化により、クロマチン構造を緩め、ヌクレオソーム・フリー領域を形成する作用があることから、癌部・非癌部でのクロマチン構造の変化を探索すべく、ヌクレオソーム・フリー領域のゲノムワイドな分布解析も同時に目指すこととした。

H3K27ac のゲノムワイドな局在解析として、ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by next generation sequencing) 法を試みた(図 11)。ChIP-seq 法は、クロマチン免疫沈降法 (ChIP: chromatin immunoprecipitation) と次世代シーケンサーを組み合わせた方法である。ChIP 法自体は、細胞内での対象タンパクの DNA 結合領域を同定する手法として 1980 年代に開発されたものである[51]。2000 年代に入ると、これをゲノムタイリング DNA マイクロアレイと併用した ChIP-chip (Chromatin Immunoprecipitation coupled with DNA microarray analysis) が可能になり、DNA 結合タンパクの分布がゲノムワイドに解析可能になった[52]。その後、次世代シーケンサーの登場とともに、網羅性・解像度の高い ChIP-seq へと発展し[53]、現在ではゲノムワ

イドにヒストン修飾や転写因子結合部位を解析する最も一般的な手法になった[54]。

ヌクレオソーム・フリー領域をゲノムワイドに解析する方法としては、FAIRE-seq (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements followed by next generation sequencing) 法を試みた (図 11) 。FAIRE-seq 法は、ホルムアルデヒド固定した細胞核画分に対してフェノール・クロロホルム精製を行い、DNA・タンパク架橋が起こりにくいヌクレオソーム・フリー領域の DNA を水層に分離することで、これをゲノムワイドに回収、濃縮するという手法である[55]。

本研究では、これら ChIP-seq や FAIRE-seq を凍結組織検体で行うことをその目的とした。組織検体用いた ChIP-seq や FAIRE-seq のプロトコルや解析例もいくつか報告はされているが[56-58]、主に切除直後の非凍結の臨床組織や液体窒素でそのまま凍結した臨床組織が利用されており、通常病理で保管されているような OCT コンパウンド包埋には、プロトコルの改定、最適化が必要であると考えられた。既存のプロトコルを詳細に検討すると、クロマチン固定が非常に重要なステップであり[58,59]、組織検体では、組織内で固定を均一にするため、組織を十分に粉砕する必要があると考えられた。既報では、「①メスでの細断粉砕法」、「②乳鉢での圧迫粉砕法」などが推奨されているが、本研究では、本研究室で成功実績のある「③クライプレスでの圧迫粉砕法」や、今回新規に考案した「④オクライオスタットでの薄切粉砕法」も試みることにした。そして、4 種類の組織粉砕法と既存の ChIP-seq、FAIRE-seq プロトコルを組み合わせ、新たな *in vivo* ChIP-seq、*in vivo* FAIRE-seq プロトコルの開発を目指した。なお、4 種類の組織粉砕法と既存の ChIP 法、FAIRE 法で得られたサンプルは、シーケンスの前に定量的 PCR を用いて、その濃縮率を比較、評価した。先端科学技術研究センターの蓄積データから、この濃縮率が 10 倍以上では、良好なシーケンスデー

タを得られる可能性が高く、逆に 5 倍以下（特に 3 倍以下）では、ピークの同定の困難なバックグラウンドの高いデータとなる可能性が高いことが予想されている。本研究では、シーケンス前の濃縮確認で、良好な濃縮を得られた ChIP および FAIRE サンプルを次世代シーケンサーにより解析することとした。

シーケンス後の解析は、MACS のアルゴリズムにおいてそのピークを同定し[60]、転写開始点からの距離によって癌部・非癌部のピークをプロモーター領域のものとエンハンサー領域のものに分類した[61,62]。近年の研究結果から、プロモーター領域とエンハンサー領域では、ヒストン H3 リジン 4 などの修飾のパターンが異なり[63]、エンハンサー領域の活性化ヒストン修飾は、各組織の遺伝子発現パターンを反映していることが示されている[9]。また、最近の総説でも、発癌において、エンハンサー領域のクロマチン構造の制御がどのようにされているかが、今後の研究課題であるとされている[6]。

3.2 材料と方法

3.2.1 材料

1) 症例の選択

In vivo ChIP-seq および *in vivo* FAIRE-seq には、東京大学医学部附属病院において、2009 年から 2012 年に幕内基準に基づき切除された肝細胞癌の凍結手術検体のうち、その FFPE サンプルが第 2 章(2.3)の基準で高 ac/高 me3、低 ac/低 me3 を示す 2 例（高 ac/高 me3 例：THCC99、以下症例 1 とする。低 ac/低 me3 例：THCC 12-11、以下症例 2 とする）を用いた。凍結方法は前述（第 2 章、2.2.1）と同じ方法を用いており、新

鮮手術検体の癌部および非癌部を、8 mm 角程度の大きさに切り出した後、迅速に OCT コンパウンド (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA) 中に包埋し、ドライアイス・アセトン法により凍結した。凍結検体は、使用するまで-80°Cで保管した。

2) 倫理委員会の承認に関する事項

東京大学医学部附属病院での病理組織検体を用いた研究については、「肝腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」という題目で東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理委員会に申請し、承認を受けている (審査番号 G2210)。

3.2.2 方法

1) 凍結手術検体を用いたヒストン修飾の ChIP

1.1) 各種方法による OCT コンパウンド包埋組織の凍結粉碎固定

OCT コンパウンド内の凍結サンプルを用いて、以下の 4 方法による検体の粉碎を比較した。

- ① 約 3 mm 角の凍結組織を OCT コンパウンド中から切り出し、氷上でメスを用いて、約 1 mm 角以下になるように細断する
- ② 約 3 mm 角の凍結組織を OCT コンパウンド中から切り出し、融解しないように迅速に液体窒素を入れた鉢に入れ、乳棒ですりつぶす
- ③ 約 3 mm 角の凍結組織を凍結させたまま OCT コンパウンド中から切り出し、十分に冷やしたクライオプレスで粉碎する
- ④ OCT コンパウンド中に凍結組織を包埋した状態で、クライオスタットを用いて

10 μm の厚さで 20 枚薄切する

上記の 4 方法によって得られたサンプルは、液体窒素にひたした 10 ml のファルコンチューブに凍結したまま移し、予め最終濃度が 1%になるように調製した室温のホルムアルデヒド-PBS 溶液と混合させて、クロマチン固定を行った。

1. 2) 凍結粉砕固定後のクロマチン免疫沈降

クロマチン固定後の工程は一般的な ChIP プロトコルに準じて行った[64]。1%ホルムアルデヒド・PBS 溶液を加えて室温で 10 分間振盪し、タンパク質の DNA への固定化 (クロスリンク) を行った。その後、最終濃度が 0.125 mM になるようにグリシン溶液を添加して反応を停止させ、遠心して上清を除去して得られたペレットに、核溶解バッファー(10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 % SDS) を添加してクロマチンを抽出した。サンプルを氷冷しながら、超音波細胞破碎装置 UD-201 (Tomy Seiko, Tokyo, Japan) を用い、200~500 bp 程度にクロマチン DNA が分布するように、断片化を行った。断片化したサンプルを高速遠心 (4°C, 15000g, 15 分間) して得られたクロマチン溶解液に、セファロースビーズを添加して非特異的吸着物質を除去し、免疫沈降用のクロマチン調製液を得た (調製液の一部はインプット用サンプルとして分取した)。この調製液に 1 ml あたり 2 μg の抗 H3K27ac 抗体 (CMA309; 大阪大学の木村宏先生よりご提供) を添加し、4°Cで一晩反応させた。一晩反応させたサンプルに、プロテイン A およびプロテイン G セファロースビーズを 50% スラリーで 20 μl ずつ加え、4°Cでさらに 2 時間回転させながらビーズに抗体を吸着させた。遠心して上清を除去して得られた反応抗体吸着ビーズを、洗浄バッファーで洗浄した。洗浄後、ビーズに 100 μl の溶出バッファーおよびプロナーゼを添加し (終濃度 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、

42°Cで2時間、その後65°Cで一晩回転させながら脱クロスリンク反応を行った。この際、-80°Cで保管していたインプットサンプルにも同様にプロナーゼを添加し、脱クロスリンク反応を行った。

こうして得られた ChIP DNA 抽出溶液およびインプット DNA 抽出液を QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DNA の精製を行った。

1.3) 定量的 PCR による ChIP サンプルの濃縮確認

クロマチン免疫沈降における標的領域の濃縮は ChIP サンプルおよびインプットサンプルを用いた定量的 PCR により評価した。1 ul の鋳型 DNA に対して、10 倍濃縮 PCR バッファー (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl; pH 8.3, 2 mM MgCl₂, 0.01%ゼラチン) を 2.5μL、2mM dNTP を 2.5 μL、100μM プライマーを各々0.05μL、Taq ポリメラーゼを 0.5μL、100 倍希釈 SYBER Green I を 0.075μL、精製水を 18.325μL 加え、PCR 反応を行った。94°Cで3分間熱変性を行い、続いて94°Cでの変性を20秒間、59°Cでアニーリングを20秒間、72°Cの伸長反応のサイクルを20秒間、というサイクルを40回行った。結合領域 (陽性コントロール) のプライマー、および内部標準領域 (陰性コントロール) のプライマーは下記の通りである。なお、結合領域のプライマーは、ハウスキーピング遺伝子の *GAPDH* の転写開始点近傍に設計し、内部標準領域のプライマーはホメオティック遺伝子群の *HOXA1* の転写領域に設計した。

GAPDH フォワードプライマー: CACGTAGCTCAGGCCTCAAGA

GAPDH リバースプライマー: GGCTGCGGGCTCAATTTAT

HOXA1 フォワードプライマー: GAGAGTTTGCCACCCTGTT

HOXA1 リバースプライマー: TGTGTGTGAGTTTGCTGGTTGT

こうして得られた SQ 値から、以下の式により、濃縮率を求めた。

$$\text{濃縮率} = (\text{ChIP 結合領域 SQ 値/インプット結合領域 SQ 値}) / (\text{ChIP 内部標準領域 SQ 値/インプット内部標準領域 SQ 値})$$

2) 凍結手術検体を用いた FAIRE 法

2.1) 各種方法による包埋組織の凍結粉砕固定

凍結手術検体を用いた FAIRE 法を行う際も、1.1) 同様に、OCT コンパウンド内に凍結サンプルを用いて、4 種類の凍結粉砕固定法を用いて比較した。

2.2) 凍結粉砕固定後の FAIRE

クロマチン固定後の工程プロトコルは培養細胞株における FAIRE 法のプロトコルに準じて行った[58,65]。最終濃度が 1%になるように事前に調整したホルムアルデヒド-PBS を加えて手で激しく振りながら溶解させた後、室温で 10 分間振盪しタンパク質の DNA への固定化 (クロスリンク) を行った。その後、最終濃度が 0.125 mM になるようにグリシン溶液を添加して反応を停止させ、遠心して上清を除去して得られたペレットに、核溶解バッファーを添加してクロマチンを抽出した。サンプルを氷冷しながら、超音波細胞破碎装置 UD-201 (Tomy Seiko, Tokyo, Japan) を用い、200~500 bp サイズが中心になるようにクロマチン DNA の断片化を行った。断片化したサンプルを高速遠心 (4°C, 15000g, 15 分間) してクロマチン溶解液を得た (調製液の一部はインプット用サンプルとして-80°Cで保管した)。この溶解液よりフェノール・クロロホルム抽出を行った。クロマチン溶解液に PCI 溶液 (フェノール、クロロホルム、イソ

アミルアルコールを 25:24:1 の割合で混合) を添加・振盪した後、遠心で水層を分離・回収し、ヌクレオソーム・フリー領域の DNA 溶液を得た。得られた DNA 溶液に CIA 溶液 (クロロホルムとイソアミルアルコールを 24:1 の割合で混合) を添加・振盪した後、遠心をしてフェノールを除去した。この DNA 溶液に、エタノール沈殿を施し、塩を除去した。さらにリボヌクレアーゼ (RNase) を 1 ug 加えて 37°C で 30 分間加温して RNA を除去し、プロナーゼを 1 ug 添加して 56°C で 1 時間加温してタンパクを除去した。最後に QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 用いて DNA の精製を行い FAIRE サンプルとした。

なお、インプット用サンプルには、予めリボヌクレアーゼ付加による RNA 除去、およびプロナーゼ添加によるタンパク除去を行い、その後 65°C で一晩脱クロスリンク反応を行った。一晩反応の後、フェノール・クロロホルム抽出を行った。フェノール・クロロホルム抽出後は、エタノール沈殿によって塩を除去した後、QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 用いて DNA の精製を行った。

2. 3) FAIRE サンプルの濃縮確認

2. 2) のようにして得られた FAIRE サンプルおよびインプットサンプルを、定量的 PCR により解析した。PCR の手順および、プライマーは ChIP と同じもの (page 20) を用いた。こうして得られた SQ 値から、以下の式により、濃縮率を求めた。

$$\text{濃縮率} = (\text{FAIRE ヌクレオソーム・フリー領域 SQ 値} / \text{インプット結合領域 SQ 値}) / (\text{FAIRE 内部標準領域 SQ 値} / \text{インプット内部標準領域 SQ 値})$$

3) 次世代シーケンサーによる ChIP および FAIRE サンプルの解析

精製し、濃縮を確認した ChIP サンプルおよび FAIRE サンプルを、次世代シーケン

シーケンス解析は、4手法の固定法のうち、定量的 PCR で最も良好な濃縮を得られた薄切粉碎固定法で得られた ChIP/FAIRE サンプルを用いて行った。ライブラリの作成や Illumina GAIIX での解析手順は既報に準じて、以下のように行った [66]。

3.1) シングルエンドライブラリー作成

精製された ChIP サンプルおよび FAIRE サンプルの DNA 末端を平滑化した。QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DNA を精製した後、ChIP サンプルの末端に terminal transferase で A を付加した。MinElute PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製後、2%アガロースゲルを用いて 100V で 70 分間泳動を行い、サイズが 275~325 bp、375~425 bp に相当する部分を切り出し、QIAGEN Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製した。この DNA サンプルに対して、18 サイクル (98°C 10 秒間、65°C 30 秒間、72°C 30 秒間を 1 サイクルとする) の PCR 反応を行った。PCR 産物を MinElute PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製して、シーケンス用ライブラリとした。

3.2) ライブラリの確認

作成したライブラリ 1 µl を使用して、Agilent バイオアナライザーによってライブラリの有効濃度とサイズを確認した。さらに、増幅後のライブラリについても、作成前と同様の手法を用いて定量 PCR による濃縮評価を行った。

3.3) Illumina GAIIX での解析

濃度および濃縮を確認したサンプルを Illumina GAIIX (Illumina Inc, San Diego,

California, USA) で解析した。

4) シーケンスリードの解析

4.1) ヒトゲノムへのマッピングとピークの抽出

GAIIX によって配列決定された 36 bp のシングルエンドのショートリードを、CASAVA 1.7 ソフトウェア (Illumina Inc, San Diego, California, USA) によってヒトゲノムリファレンス (hg19) にマッピングし、シーケンス配列のポジションを決定した。このようにして得られたシーケンス配列 (タグ) のヒトゲノム上での分布を MACS プログラム (バージョン 1.3.7.1) によって統計学的に検定し、P 値 $<1e-5$ の領域を有意に濃縮した領域と判定した [60]。その他のパラメータは、--tsize を”36”に、--gsize を”1865500000”に、--mfold を”10”に、--nomodel、--nolambda、--wig に設定した。濃縮の程度を表す P 値は、IGB (Integrated Genome Viewer, Affymetrix) を用いて、ピークとして可視化した[67]。

4.2) 転写開始点からの位置によるピークの割り当てと分類

$p < 1e-5$ を満たす各ピーク領域の遺伝子アノテーションは、最も転写開始点 (TSS: Transcription Start Site) の近い遺伝子に割り当てた[56]。TSS より 2000 bp 以内にあるものプロモーター領域、それより遠方にあるものをエンハンサー領域として分類した [61,62]。

3.3 結果

1) 各種方法による OCT コンパウンド包埋組織の凍結粉砕固定の比較

4種の粉砕固定を行った H3K27ac の ChIP サンプルおよび FAIRE サンプルを定量的 PCR で濃縮を評価した結果を、図 12 に示す。

④クライオスタットでの薄切粉砕法は、①メスでの細断粉砕法、②乳鉢での圧迫粉砕法、③クライオプレスでの圧迫粉砕法と比較し、H3K27ac の ChIP 法、FAIRE 法いずれにおいても、最も良好な濃縮を得られた。

2) H3K27ac および FAIRE のピークの分布

臨床組織検体を用いた H3K27ac の ChIP-seq および FAIRE-seq の代表的なゲノム・ブラウザー上のピークの例を図 13 に示す。ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* は癌部・非癌部で殆ど変化が見られない一方で、アポトーシス関連遺伝子として知られる *TNFRSF1B* では非癌部特異的ピークが、肝細胞癌の治療標的として注目されている *GPC3* では癌部特異的ピークが見られた。

2. 1) H3K27ac のピークのゲノムワイドな分布

症例 1 での H3K27ac 陽性領域の解析結果を図 14a に示す。癌部では 54221 ヶ所、非癌部で 45631 ヶ所の H3K27ac のピークが同定された。癌部・非癌部共通のピークは 30709 ヶ所、癌特異的なピークが 23512 ヶ所、非癌部特異的なピークが 14922 ヶ所であった。癌部・非癌部に共通するピークの約 40%がプロモーター領域に存在している一方、癌部あるいは非癌部いずれかで同定されたピークは、その 90%程度がエンハンサー領域に見られた。

これらの傾向は、別の凍結組織サンプル (症例 2) でも確認された。癌部で 48601 ヶ

所、非癌部で 43851 ヶ所 H3K27ac のピークが同定され、癌部・非癌部共通のピークは 32732 ヶ所、癌特異的なピークが 15869 ヶ所、非癌部特異的なピークが 11119 ヶ所であった。共通ピークの約 40%がプロモーター領域に存在している一方、非癌部特異的ピーク約 85%、癌部特異的ピークの 90%以上がエンハンサー領域に見られた。

2.2) FAIRE のピークのゲノムワイドな分布

MACS のアルゴリズムにより、癌部で 45935 ヶ所、非癌部で 45935 ヶ所の FAIRE ピークが同定された。癌部・非癌部共通のピークは 30709 ヶ所、癌特異的なピークが 23512 ヶ所、非癌部特異的なピークが 14922 ヶ所であった。癌部・非癌部共通のピークおよび癌特異的・非癌部特異的ピークを図 14b に示す。共通ピークの約 40%がプロモーター領域に存在している一方、癌部あるいは非癌部特異的ピークはその 90%程度がエンハンサー領域に見られた。

これらの傾向は、別の凍結組織サンプル (症例 2) でも確認された。癌部で 38946 ヶ所、非癌部で 30054 ヶ所の FAIRE のピークが同定され、癌部・非癌部共通のピークは 14931 ヶ所、癌特異的なピークが 24015 ヶ所、非癌部特異的なピークが 15123 ヶ所であった。共通ピークの約 40%がプロモーター領域に存在している一方、非癌部特異的ピーク約 85%、癌部特異的ピークの 90%以上がエンハンサー領域に見られた。

2.3) FAIRE のピークの周囲の H3K27ac のゲノムワイドな分布

H3K27ac 修飾は、転写因子とそれに関連する複合体が結合する部位に領域的に分布するのに対して、FAIRE で濃縮される領域は転写因子が直接結合するヌクレオソーム・フリー領域に限定される。図 15a に GAPDH の転写開始点周囲の例を示すが、転写因子の結合部位に FAIRE の鋭いピークを認め、H3K27ac 周囲に二峰性のなだらかな

なピークを認める。ゲノムワイドに同定された FAIRE の陽性領域より MACS score の上位 2000 を抽出して、そのピーク周囲 5000 bp の H3K27ac 修飾の分布を表示したところ、癌部・非癌部ともに FAIRE のピーク周囲に二峰性に H3K27ac のピークが存在していることが確認された (図 15b)。第 2 章同様の評価方法において、癌での H3K27ac の染色レベルの高い (H スコア 202) 本症例では、癌部と非癌部で H3K27ac のピークレベルが異なっていた。また、癌部特異的あるいは非癌部特異的な FAIRE のピーク周囲においては、H3K27ac レベルも異なっていた。

3.4 考察

1) in vivo ChIP-seq および in vivo FAIRE-seq プロトコルの確立

OCT コンパウンド包埋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、臨床組織検体を用いた ChIP-seq 法および FAIRE-seq 法を確立することができた。クロマチン断片化とホルマリン固定は、培養細胞株でのクロマチン免疫沈降法においても、最も重要なステップの一つであり [59]、FAIRE 法でヌクレオソーム・フリー領域の DNA が有効に濃縮できない原因として最も多いのは、クロマチンの固定不良であるとされている [58]。本研究で新規に考案したクライオスタットでの薄切粉碎法は、従来の方法と比べて組織サンプルの均一な固定が可能であったと考えられる。これは、クライオスタットを用いることで、凍結状態のまま、組織から一層程度の細胞層まで薄切粉碎可能となったためと考える。また、組織の融解と同時にホルマリン固定を行うことで、タンパクの分解も最小限に抑えられていると考えられる。OCT コンパウンド包埋による組織凍結は手術中の迅速診断でも用いられている手法であり、凍結保存法としても一般的である。よって、この様な試料から安定して

ChIP-seq および FAIRE-seq が行えることは、臨床診療において凍結保管されている検体を用いてエピゲノムの解析が行えることに繋がり、その汎用性は大きい。特に、貴重症例や既に臨床経過の判明している過去症例においても適用できることから、本手法の確立は意義が大きいと考えられる。ただし、本プロトコルの validation として、今後サンプル数を増やして各種組織粉砕法で比較・検討することが必要である。また、既報の培養細胞に対する標準プロトコルとの比較として、培養細胞のペレットを OCT コンパウンドで凍結包埋した上で本 in vivo ChIP seq プロトコルあるいは in vivo FAIRE-seq プロトコルで行ったものを、標準法での結果と比較・検討する必要がある。

2) H3K27ac および FAIRE のピークのゲノムワイドな分布

1)で確立した手法を用いて、同一患者の癌部・非癌部凍結組織検体における、H3K27ac 修飾部位およびヌクレオソーム・フリー領域をゲノムワイドに解析した。その結果、癌部・非癌部特異的な H3K27ac および FAIRE のピークが主にエンハンサー領域に見られることが確認された。この結果は、近年、癌細胞株あるいは細胞の分化系で蓄積されたきた、ゲノムワイドな H3K27ac やクロマチン構造の解析結果と合致するものである。Akhtar-Zaidi らは、大腸癌細胞株とヒト正常陰窩上皮を用いて H3K27ac の ChIP-seq を行い、癌・正常でエンハンサー領域の H3K27ac のパターンが異なることを示している[68]。また、Creyghton らは、ES 細胞から肝細胞やリンパ球への分化の系を用いて、分化段階ごとに H3K27ac の修飾部位が異なることを示している。各種臓器の培養細胞株を用いて行われた FAIRE および DNase-seq のデータの統合解析においても、細胞株特有のヌクレオソーム・フリー領域は、エンハンサー領域に集中していることが示されており[61]、最近の報告でも、DNase 高感受性領域 (DHS: DNase

Hypersensitivity Site) に細胞分化の痕跡が残ることが報告されている[69]。これらの近年の研究結果は、発癌や分化の過程において、特にエンハンサー領域の転写因子の結合とそれにともなうヒストン修飾・ヌクレオソーム・フリー領域の変化が重要であることを示唆しており、これは最近の複数の総説で言及されている[16,70,71]。H3K27ac 修飾は、転写活性化の初期段階で転写複合体の安定的な形成以前に先駆けてみられるパイオニア因子の結合マークであると考えられている[71]。すなわち、配列特異的に結合する転写因子と複合体を形成することで p300/CBP が局所的にリクルートされ、その領域に H3K27ac 修飾が付加されると考えられている。これらの転写因子は、固有の DNA 結合ドメインを介した特定の DNA 配列 (シスエレメント) に対する親和性が強く、二本鎖 DNA との結合と解離を繰り返しながら、コアヒストンのないヌクレオソーム・フリー領域を形成している[72]。今後は、このヌクレオソーム・フリー領域の配列解析を行うことで、その領域に結合する転写因子を高解像度に予測することが可能であり[61]、これは現在課題とされているエンハンサー領域のクロマチン構造制御を解明する糸口になると考えられる。また、今後、発癌に伴うエピゲノム変化の解析を進めるにあたり、癌部・非癌部のペア凍結組織検体を用いた本解析法は有効であると考えられる。すなわち、本研究のように、癌・非癌部を同一患者の手術検体で ChIP-seq や FAIRE-seq を行い、その臨床的背景を揃えることで、発癌に伴うエピゲノムの変化をより specific に捉えることが可能であると考えられる。そして、今回同定されたエンハンサー領域の癌特異的あるいは非癌部特異的なヌクレオソーム・フリー領域のモチーフ解析を行うこと、さらに遺伝子発現や遺伝子変異と結び付けた統合解析を行うことにより、発癌におけるエピゲノムのさらなる解明に寄与することが期待される。

第4章 *CTNNB1* の遺伝子変異に注目した *in vivo* FAIRE-seq による癌での転写制御メカニズムの解明の一例

4.1 背景と目的

近年のエピゲノム研究において、主要な流れは主に2つある。1つは、遺伝子の時間的、空間的発現を制御する調節性配列を3次元でより正確にマッピングしようとする試みである[73]。ペアエンドタグの配列解析によるクロマチン相互作用解析(ChIA-PET: Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing)は空間的な相互作用を明らかにし、クロマチン免疫沈降物をラムダエキソヌクレアーゼ処理するChIP-exo (chromatin immunoprecipitation combined with lambda exonuclease digestion followed by sequencing)は転写因子の結合部位をより正確に同定することを可能にした。もう一つは、ゲノムとエピゲノムを統合解析しようとする試みであり、特に癌の領域でこれは注目されている[32]。癌では、遺伝子変異や染色体コピー数変異、染色体構造異常などの多くのゲノム変化が起こっているが、実際これらとともに見られるエピゲノム変化とどのような関係にあるかについては不明な部分も多い。癌での各種のゲノム解析が当初主に細胞株で行われた後、臨床組織で幅広く行われたごとく、エピゲノム解析も今後臨床検体で行われる予想される。

本章では、ゲノム・エピゲノムの相互作用のうち、第3章において確立した、ヒト凍結組織サンプルを用いたFAIRE-seqを用いて、ゲノムの変異がエピゲノムにおよぼす変化をゲノムワイドに解析することを目指した。ゲノムの変異としては、肝細胞癌のエキソームシーケンスからも、ドライバー遺伝子として確認されている *CTNNB1* に注目する[21,74]。 *In vitro* の結果からは、 *CTNNB1* 変異によって核内に蓄積した

β -catenin が他の転写因子と共にクロマチン構造を変化させ、その標的遺伝子を活性化することが報告されているが[75]、本章では *in vivo* FAIRE-seq により、同一患者の癌部・非癌部のデータから、クロマチン構造の変化をゲノムワイドに同定することを目指した。そして、*CTNNB1* 変異肝癌で見られる癌特異的なヌクレオソーム・フリー領域において、どのような転写因子が結合しているかをモチーフ解析から予想し、その転写制御の一端を明らかにすることを目的とした。転写因子は、固有の DNA 結合ドメインを介した特定の DNA 配列（シスエレメント）に対する親和性が強く、二本鎖 DNA との結合と解離を繰り返しながら、コアヒストンのないヌクレオソーム・フリー領域を形成している[72]。モチーフ解析は、このヌクレオソーム・フリー領域の配列解析を行う手法であり、その領域に結合する転写因子を高解像度に予測するものである[61]。モチーフ解析の結果予想された転写因子については、*CTNNB1* 変異肝癌細胞株 (HepG2) を用いて転写因子の ChIP-seq を行い、このピークがヌクレオソーム・フリー領域と一致するかを確認することとした。

4.2 材料と方法

4.2.1 材料

1) 症例の選択

In vivo FAIRE-seq には、東京大学医学部附属病院において、2009 年から 2012 年に幕内基準に基づき切除された肝細胞癌の凍結手術検体のうち、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、すでに whole exome sequence および RNA sequence により遺伝子変異および遺伝子発現

解析が行われた4症例を使用した。既報[21,74]およびICGCプロジェクトの変異解析から、肝細胞癌ではp53シグナル経路である*TP53*、Wnt/ β catenin経路である*CTNNB1*、クロマチン・リモデラーである*ARID1/2A*などの遺伝子変異が多いことが判明している。本研究では、*TP53*変異2症例（Wnt/ β catenin経路遺伝子やクロマチン・リモデラー遺伝子は正常）、*CTNNB1*変異2症例（p53シグナル経路遺伝子やクロマチン・リモデラー遺伝子は正常）を用いた。なお、DNAおよびRNAの抽出には、QIAamp DNA minikit (Qiagen, Hilden, Germany)およびRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)が用いられ、解析にはHiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA)が用いられた。凍結方法は第2章(2.2.1)と同じ方法を用いている。

2) 培養細胞

本章では、培養細胞(HepG2)による転写因子(HNF4AおよびCTNNB)のChIP-seqを行った。HepG2は、15歳の肝芽腫由来の細胞株であり、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより分与されたものを使用した。

3) 倫理委員会の承認に関する事項

東京大学医学部附属病院での病理組織検体を用いた研究については、「肝腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」という題目で東京大学大学院医学系研究科・医学部研究倫理委員会に申請し、承認を受けている(審査番号G2210)。

4.2.2 方法

1) 凍結手術検体を用いた FAIRE-seq

方法は、第3章 (3.2.2) に記載の通りである。クライオスタットによる薄切粉碎法を用いて固定した。

2) モチーフ解析

FAIRE-seq により同定された共通ピーク、あるいは癌部・非癌部特異的領域のモチーフ解析を行った。癌部・非癌部特異的なピークのうち、MACS による fold enrichment の上位 500 までを選び、そのピークの前後 200 bp の DNA 配列を抽出した。抽出した DNA 配列に対して、DME (The Discriminating Matrix Enumerator) を用いて同領域に濃縮する特徴的な転写因子の認識配列を抽出した[76]。癌部と非癌部の配列セットをそれぞれ比較し、お互いをバックグラウンド配列とした。DME アルゴリズムのパラメータは以下の通りである; -z (ZOOPS model), -n= 100, -w= 8 or 12。DME の選出した候補に対して、STAMP を用いて既知の転写因子モチーフデータベース TRANSFAC および JASPAR[77,78]と照合し、P 値が 1.0×10^{-6} 未満の転写因子モチーフを有意なものとした[79,80]。関心領域中に存在するモチーフ候補の検索には TRAP (Transcription factor affinity prediction)を用いた[81]。

3) CTNNB 変異肝癌細胞株 HepG2 における、HNF4A の ChIP-seq

HepG2 は、DMEM に 10%FBS および 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培地で培養した。培養は全て 37°C、5%の CO₂ インキュベータ内で行った。

HepG2 における転写因子の ChIP は、既報の転写因子 ChIP に準じて行った[82]。クロマチン固定のステップでは、通常ホルマリン固定に加えて DSP (dithiobis succinimidyl propionate) による化学架橋を行った。培養細胞を細胞溶解バッファ

(10 mM HEPES-KOH, pH 7.8, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 % NP-40) で懸濁して核抽出を行った後、20 mM の DSP で 30 分回転しながら化学架橋を行った。PBS で洗浄後、1% のホルムアルデヒドで 10 分間回転しながらメチレン架橋を行い、グリシン溶液を添加して反応を停止させた。その後の方法は、第 3 章と同様である。なお、免疫沈降反応の抗体には、抗 β -catenin マウスポリクローナル抗体 (sc7199, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 、抗 HNF4A (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha) マウスポリクローナル抗体 (sc8987, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) をそれぞれクロマチン調整液 1ml あたり 5ug ずつ用いた。

シーケンスで決定したリード配列のアラインメント、ヒトゲノム上での分布に基づくピークコール解析は、第 3 章 (3.2.2) と同様の方法で行った。

4) 公開データの利用による HepG2 の FOXA1 ChIP-seq

HepG2 の FOXA1 (Forkhead box A1) の ChIP-seq データは、公開データを利用した (GSM803461) 。データは ENCODE (The Encyclopedia of DNA Elements) プロジェクトで公開されている配列データ (GSM803461) を、ダウンロードサイト (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/downloads.html>) より入手して、第 3 章と同じ解析方法・基準 (MACS プログラムのバージョン 1.3.7.1、P 値 $<1e-15$ を有意) で行った。

5) 遺伝子発現との統合解析

全ての FAIRE-seq および ChIP-seq のピークは、最も転写開始点 (TSS: Transcription Start Site) の近い遺伝子に割り当てることとした[56]。遺伝子の発現は、RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) で、 $RPKM \geq 1$ を発現ありと定義した[83]。癌における遺伝子発現の上昇は、癌において発現している ($RPKM \geq 1$) の遺伝子のうち、

「癌の RPKM/非癌部での RPKM \geq 1.5」を有意なものとした[84]。遺伝子オントロジー解析には、DAVID Bioinformatics Resources 6.7 を用いた[85]。

4.3 結果

1) FAIRE ピークのモチーフ解析

癌・非癌部の共通のエンハンサー領域のモチーフ解析を図 16 に示す。基本転写因子である Sp1 (Specificity Protein 1) やインスレーター活性に必要な CTCF (CCCTC-binding factor) のモチーフとともに、HNF4A (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha) や FOXA1 (Forkhead box A1)、PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) など、肝細胞への分化および肝組織の基本的機能に重要な転写因子のモチーフが確認された。

癌特異的エンハンサー領域のモチーフ解析を図 17 に示す。癌特異的なエンハンサー領域には、HNF4A や FOXA1 が共通して見られ、*CTNNB1* 変異症例では、これに加えて TCF (T-cell factor) や LEF (Lymphoid enhancer-binding factor) の強いモチーフ濃縮が確認された。

2) HepG2 における β -catenin、HNF4A、FOXA1 の結合部位

CTNNB1 変異肝癌細胞株 (HepG2) の当研究室での ChIP-seq (β -catenin、HNF4A)および ENCODE の公開する ChIP-seq データ(FOXA1) から、9248 の β -catenin 結合領域、23785 の HNF4A 結合領域、47063 の FOXA1 結合領域をそれぞれ同定した。これら 3 因子の共局在を図 18 に示す。 β -catenin、HNF4A にはその 50%程度に FOXA1 との共

局在が見られた。

3) 癌・非癌部共通のエンハンサー領域の FAIRE ピークと HNF4A、FOXA1 の共局在
癌・非癌部共通のエンハンサー領域の FAIRE ピークと HNF4A、FOXA1 のピークの
重なりを図 19 に示す。4 症例の癌・非癌部共通のエンハンサー領域の FAIRE ピーク
として、1397 ヶ所が同定され、その 70%以上に HNF4A、FOXA1 のピークが見られた。
全体の約 30%に HNF4A と FOXA1 が共局在しており、図 20 のように *HNF4A* および
PPARG のエンハンサー領域の癌・非癌部共通の FAIRE ピークに HNF4A、FOXA1 の
共局在が確認された。HNF4A と FOXA1 の共局在が見られる癌・非癌部共通のエンハ
ンサー領域の FAIRE ピーク 439 ヶ所をその最近傍の遺伝子に割り当てると、366 遺伝
子に相当した。そのうち 212 遺伝子 (58%) は解析を行ったすべての症例の癌・非癌
部で遺伝子発現 (RPKM \geq 1) が確認された (表 6)。遺伝子オントロジー解析からは、
代謝関連遺伝子群と共に、遺伝子の転写促進に関与する遺伝子群が癌・非癌部共通の
エンハンサー領域に共に局在する HNF4A および FOXA1 によって制御されている可
能性が示唆された (表 7)。

4) *CTNNB1* 変異症例の癌特異的エンハンサー領域の FAIRE ピークと β -catenin、
HNF4A、FOXA1 の結合

CTNNB1 変異症例の癌特異的エンハンサー領域の FAIRE ピークと β -catenin、HNF4A、
FOXA1 の結合を図 21 に示す。*CTNNB1* 変異症例の癌特異的エンハンサー領域の
FAIRE ピーク上位 1000 の約 40%に β -catenin、HNF4A、FOXA1 いずれかの結合が見
られた。 β -catenin の結合は約 15%に見られ、その多くは FOXA1 と共局在しており、
約半数に HNF4A との共局在が見られた。癌特異的 FAIRE ピークの例を図 22 に示す。

AXIN2 および *TCF7L2* のエンハンサー領域の FAIRE ピークに β -catenin、HNF4A、FOXA1 の共局在が確認された。また、 β -catenin、HNF4A、FOXA1 の共局在が確認された 59 ヶ所 (症例 3) および 49 ヶ所 (症例 4) の癌特異的なエンハンサー領域の FAIRE ピークを最近傍の遺伝子に割り当てると、58 遺伝子 (症例 3) および 46 遺伝子 (症例 4) となった。これらの遺伝子のうち、癌での発現上昇が見られたものは、36 遺伝子 (症例 3) および 29 遺伝子 (症例 4) であった (表 8)。

4.4 考察

1) エンハンサー領域における癌・非癌部共通の FAIRE ピーク

癌・非癌部に共通するエンハンサー領域の FAIRE ピークのモチーフ解析では、基本転写因子である Sp1 やインスレーター活性に必要な CTCF とともに、HNF4A や FOXA1、PPAR などのモチーフが確認された。実際、癌・非癌部に共通するのエンハンサー領域の FAIRE ピークには、HepG2 において同定された HNF4A や FOXA1 の結合領域が確認され、特に約 40% で HNF4A や FOXA1 の共局在が確認された。

HNF4A は、肝臓における分化のマスター制御因子であり、肝臓で恒常的に発現している遺伝子のうち 40% 程度に HNF4A の結合モチーフがあるとされている[86-88]。また、FOXA ファミリー (FOXA1, FOXA2, FOXA3) もまた、肝臓の発生に必須の転写因子である[89-91]。FOXA1 と FOXA2 は、肝臓においては、相互補完可能な機能を有していると考えられる。その結合部位は類似しており[92]、FOXA1[93]、FOXA2[94]、いずれのノックアウトマウスも肝臓は正常に発生し、肝酵素発現も正常である。(但し、FOXA1 ノックアウトマウスはラングハンス島形成不全のために生後 2~11 日に低血糖のために死亡する[93]。)

HNF4A[87,95,96]、FOXA ファミリー[97-99]とも主に代謝関連の遺伝子を制御していると考えられる。両者は少なからず共局在していると考えられ、マウス肝臓を用いた *in vivo* ChIP-seq によるゲノムワイドな解析からは、FOXA2 近傍に HNF4A の結合モチーフがあり[100]、エンハンサー領域においても両者が共局在していることが示されている[101]。

本研究でも、癌・非癌部共通のエンハンサー領域の FAIRE ピークにおいて、HNF4A と FOXA1 の共局在が確認された。また、これら 2 因子の共局在により制御されていると考えられる遺伝子の約半数に恒常的発現が見られた。興味深いことに、遺伝子オントロジー解析では、代謝関連遺伝子の他に、遺伝子の転写促進に関わる遺伝子群が見られた。Odom らの肝臓の初代培養細胞を用いた実験では、HNF4A が FOXA1 などとともにフィードバックループを形成する転写制御ネットワークを制御していることが示されており[102]、今回の結果は、こうした転写制御ネットワークをヒト臨床肝臓組織でのエンハンサー領域解析を通じて確認できた点でも意義が大きいと考えられる。

2) *CTNNB1* 変異症例でのエンハンサー領域における癌特異的な FAIRE ピーク

癌特異的なエンハンサー領域の FAIRE ピークのモチーフ解析でも、FOXA1 や HNF4A のモチーフの濃縮が確認され、特に *CTNNB1* 変異症例では、 β -catenin と結合する転写因子である TCF や LEF のモチーフ濃縮が確認された。

β -catenin がその中心をなす古典的 Wnt シグナル経路も、肝臓発生に重要である[103,104]。最近の研究では、飢餓などの特殊な環境下や[105]、Lgr5 (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5) 陽性肝幹細胞で[106]で Wnt のシグナル

の亢進が見られていることが報告されているが、正常肝全体では古典的 Wnt シグナルは中心静脈周囲に見られる程度にとどまる。一方、古典的 Wnt シグナルの亢進は、肝細胞癌を含む種々の腫瘍、代謝疾患などで報告されている[107]。肝癌における Wnt シグナル亢進の原因では、*CTNNB1* の体細胞変異が最も高頻度である。変異部位はエクソン 3 に集中しており、今回用いた症例もこの部分に変異が見られた (図 23)。エクソン 3 領域は CK1 (Casein Kinase I) と GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) によりリン酸化されるアミノ酸配列およびユビキチンリガーゼ β TrCP/EP の認識アミノ酸配列を含んでいる。よって、エクソン 3 異常によりリン酸化やユビキチン化を受けなくなった変異 β -catenin が分解されず、核内に移行して、TCF/LEF 配列に結合して標的遺伝子を活性化している。*CTNNB1* 変異例で、TCF/LEF の強いモチーフ濃縮が確認されたことは、こうした標的遺伝子のエンハンサー領域が恒常的にオープンクロマチンの状態にあることを示している。

また、興味深いことに FOXA1 のモチーフも共通して見られた。特に、*CTNNB1* 変異症例において、癌特異的エンハンサー領域の FAIRE ピークに一致する β -catenin の結合領域は、その大部分が FOXA1 と共局在していた。FOXA1 は、肝臓において分化のマスター制御因子の一員であるとともに、転写複合体の形成に先行して DNA 配列に結合するパイオニア因子でもあり、特定のシス配列をヌクレオソーム・フリー状態に誘導する機能を有する一群に属している[108]。本研究の結果からも、*CTNNB1* の変異によって核内に蓄積した β -catenin が癌特異的なヌクレオソーム・フリー領域を形成する際には、パイオニア因子である FOXA1 が必要である可能性が示唆される。FOXA1 は、 β -catenin 以外にもクロマチンに結合する際に様々な共局在因子と相互作用し、癌における転写制御に重要であると考えられている[109]。肝細胞癌、乳癌、前立腺癌

では、エストロゲン受容体 (ER: estrogen receptor) あるいはアンドロゲン受容体 (AR: androgen receptor) などのホルモン受容体との共局在が報告されている[84,110,111]。最近の研究でも、FOXA1 と TCF が HepG2 においても共局在することが示されているが[112]。本研究結果でも癌特異的な FOXA1 と β -catenin の結合領域の半分以上に HNF4A の共局在を認めている。これら 3 因子の共局在については、HepG2 において既に示されているが[113]、これらがエンハンサー領域におけるクロマチン構造の変化に深く関与し、近傍の遺伝子の発現の変化にも寄与していることが示唆された。

以上の結果からは、癌におけるクロマチン構造の変化には、パイオニア因子を主体とした転写因子の共局在が重要であると考えられる[71]。特に、*CTNNB1* 変異例では、変異 β -catenin が HNF4A や FOXA1 と共局在することによって、癌の発生・進展に寄与している可能性があると考えられる。なお、*CTNNB1* 正常例でも、癌特異的なヌクレオソーム・フリー領域に FOXA1 や HNF4A のモチーフが確認されており、今後はこれらの共局在因子を探究することで、新たな癌の転写制御メカニズムを見出せる可能性があると考えられる。なお、本研究をさらに進めていく上で、今後サンプル数を増やすとともに validation を行っていく必要がある。また、本解析系を、肝細胞癌の主要な変異遺伝子であり、近年クロマチン・リモデラーとして注目されている *ARID1A* や *ARID2* 変異症例に応用することにより、クロマチン・リモデラー変異がクロマチン構造に及ぼす影響を解明する糸口としたい。

第5章 結語

本研究は、肝癌臨床検体における転写制御異常の理解を目的として、グローバルなヒストン修飾状態の評価およびゲノムワイドなヒストン修飾、クロマチン状態および転写因子の結合部位の同定に成功した。

前半の研究 (第2章) では、ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルを用いて、H3K27ac および H3K27me3 のグローバルな修飾レベルの免疫組織化学をバーチャルスライドや画像解析ソフトを用いて、定量的に評価した。後半の研究 (第3章、第4章) では、OCT コンパウンド包埋凍結組織サンプルを用いて、H3K27ac のゲノムワイドな分布をクロマチン構造と共に解析した。クライオスタット薄切粉碎固定法を採用することで、H3K27ac の ChIP-seq および FAIRE-seq を確実にできるプロトコルを確立した。同手法により同定された癌特異的なエンハンサー領域 (FAIRE ピーク) のモチーフ解析から、*CTNNB1* 変異症例で TCF/LEF、HNF4A、FOXA1 のモチーフを確認した。*CTNNB1* 変異細胞株である HepG2 の β -catenin、HNF4A、FOXA1 の結合領域は、癌特異的なエンハンサー領域の FAIRE ピークと良好に一致した。

これらの研究結果は、肝癌発癌に伴うエピゲノムの変化を、*in vivo* で、グローバルかつゲノムワイドに見出したものである。特に、臨床で一般的に使用される方法の凍結サンプルを用いて、ChIP-seq や FAIRE-seq などを行える解析手法を確立できたことは意義が大きい。これらの解析手法は、肝細胞癌のみならずさまざまな固形癌における転写制御異常の解明に貢献することが期待される。

謝辞

本研究の指導教官である東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、深山正久教授には、本研究の遂行にあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を賜りました。

本研究の指導委託教官である東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、油谷浩幸教授には、本研究の遂行にあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を賜りました。

本研究の遂行にあたり、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、山内直子助教、東京医科歯科大学難治疾患研究所ゲノム病理学、石川俊平教授、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、永江玄太助教、野村征太郎博士研究員に多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました。

本研究の解析にあたり、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、藤田隆教研究員に多大なるご指導、ご協力を賜りました。

本研究の試料作製にあたり、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、椎名香織技術員に多大なるご協力を賜りました。

本研究の標本作製、実験操作にあたり、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、佐久間慶技術専門職員、山村はるみ技術補佐員、長野ゆみこ職員にご

協力賜りました。

本研究全般において、東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、柴原純二准教授、森川鉄平講師、国田朱子助教、宮川隆助教、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野、辰野健二博士研究員、山本尚吾特任研究員、関元昭博士研究員、野中綾博士研究員、岡部篤史博士研究員、上田宏生博士研究員には、数々のご教示、ご協力を頂きました。

本研究で、ご指導、ご鞭撻、ご高配、ご協力賜りました上記の方々、および東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野の皆さまに、深謝申し上げる次第です。

大阪大学大学院生命機能研究科、木村宏准教授からは、H3K27ac のマウスモノクローナル抗体のご提供を頂きました。厚く御礼申し上げます。

東京大学肝胆膵外科、人工臓器・移植外科 國土典宏教授には、患者データのご提供を頂きました。御礼申し上げます。御礼申し上げます。

参考文献

1. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA (2009) The cancer genome. *Nature* 458: 719-724.
2. International Cancer Genome C, Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, et al. (2010) International network of cancer genome projects. *Nature* 464: 993-998.
3. Garraway LA, Lander ES (2013) Lessons from the cancer genome. *Cell* 153: 17-37.
4. Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
5. Dawson MA, Kouzarides T (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150: 12-27.
6. Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 11: 726-734.
7. Consortium EP, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, et al. (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447: 799-816.
8. Qu H, Fang X (2013) A brief review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 11: 135-141.
9. Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, et al. (2009) Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459: 108-112.
10. Greer EL, Shi Y (2012) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 13: 343-357.
11. Selvi BR, Mohankrishna DV, Ostwal YB, Kundu TK (2010) Small molecule modulators of histone acetylation and methylation: a disease perspective. *Biochim Biophys Acta* 1799: 810-828.
12. Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, et al. (2009) Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol* 174: 1619-1628.
13. Cai MY, Hou JH, Rao HL, Luo RZ, Li M, et al. (2011) High expression of H3K27me3 in human hepatocellular carcinomas correlates closely with vascular invasion and predicts worse prognosis in patients. *Mol Med* 17: 12-20.
14. He C, Xu J, Zhang J, Xie D, Ye H, et al. (2012) High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 43: 1425-1435.

15. Bai X, Wu L, Liang T, Liu Z, Li J, et al. (2008) Overexpression of myocyte enhancer factor 2 and histone hyperacetylation in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 134: 83-91.
16. Ong CT, Corces VG (2011) Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat Rev Genet* 12: 283-293.
17. Egelhofer TA, Minoda A, Klugman S, Lee K, Kolasinska-Zwierz P, et al. (2011) An assessment of histone-modification antibody quality. *Nat Struct Mol Biol* 18: 91-93.
18. Pasini D, Cloos PA, Walfridsson J, Olsson L, Bukowski JP, et al. (2010) JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* 464: 306-310.
19. Kim KY, Hysolli E, Park IH (2011) Neuronal maturation defect in induced pluripotent stem cells from patients with Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14169-14174.
20. Rojo MG, Bueno G, Slodkowska J (2009) Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. *Folia Histochem Cytobiol* 47: 349-354.
21. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, et al. (2012) Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 44: 694-698.
22. Makuuchi M, Kosuge T, Takayama T, Yamazaki S, Kakazu T, et al. (1993) Surgery for small liver cancers. *Semin Surg Oncol* 9: 298-304.
23. Japan LCSGo (2003) General Rules for the Clinical and Pathological Study of Primary Liver Cancer, 2nd English edition. Tokyo: Kanehara.
24. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, et al. (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844-847.
25. Torbenson M, Kannangai R, Abraham S, Sahin F, Choti M, et al. (2004) Concurrent evaluation of p53, beta-catenin, and alpha-fetoprotein expression in human hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 122: 377-382.
26. Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Goto Y, Takizawa N, Nozaki N (2008) The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct* 33: 61-73.
27. Van Den Broeck A, Brambilla E, Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Brambilla C, et al. (2008)

- Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 14: 7237-7245.
28. Song L, Robson T, Doig T, Brenn T, Mathers M, et al. (2013) DNA repair and replication proteins as prognostic markers in melanoma. *Histopathology* 62: 343-350.
 29. Tamagawa H, Oshima T, Numata M, Yamamoto N, Shiozawa M, et al. (2013) Global histone modification of H3K27 correlates with the outcomes in patients with metachronous liver metastasis of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 39: 655-661.
 30. Braun M, Kirsten R, Rupp NJ, Moch H, Fend F, et al. (2013) Quantification of protein expression in cells and cellular subcompartments on immunohistochemical sections using a computer supported image analysis system. *Histol Histopathol* 28: 605-610.
 31. Salichs E, Ledda A, Mularoni L, Alba MM, de la Luna S (2009) Genome-wide analysis of histidine repeats reveals their role in the localization of human proteins to the nuclear speckles compartment. *PLoS Genet* 5: e1000397.
 32. Shen H, Laird PW (2013) Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 153: 38-55.
 33. Sudo T, Utsunomiya T, Mimori K, Nagahara H, Ogawa K, et al. (2005) Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 92: 1754-1758.
 34. Yokomizo C, Yamaguchi K, Itoh Y, Nishimura T, Umemura A, et al. (2011) High expression of p300 in HCC predicts shortened overall survival in association with enhanced epithelial mesenchymal transition of HCC cells. *Cancer Lett* 310: 140-147.
 35. Li M, Luo RZ, Chen JW, Cao Y, Lu JB, et al. (2011) High expression of transcriptional coactivator p300 correlates with aggressive features and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Transl Med* 9: 5.
 36. Quint K, Agaimy A, Di Fazio P, Montalbano R, Steindorf C, et al. (2011) Clinical significance of histone deacetylases 1, 2, 3, and 7: HDAC2 is an independent predictor of survival in HCC. *Virchows Arch* 459: 129-139.
 37. Rikimaru T, Taketomi A, Yamashita Y, Shirabe K, Hamatsu T, et al. (2007) Clinical significance of histone deacetylase 1 expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 72: 69-74.
 38. Howe L, Auston D, Grant P, John S, Cook RG, et al. (2001) Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes Dev* 15: 3144-3154.
 39. Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G (2009) Epigenetic inheritance during the cell cycle.

Nat Rev Mol Cell Biol 10: 192-206.

40. Yamada A, Fujii S, Daiko H, Nishimura M, Chiba T, et al. (2011) Aberrant expression of EZH2 is associated with a poor outcome and P53 alteration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Oncol* 38: 345-353.
41. Hsu HC, Tseng HJ, Lai PL, Lee PH, Peng SY (1993) Expression of p53 gene in 184 unifocal hepatocellular carcinomas: association with tumor growth and invasiveness. *Cancer Res* 53: 4691-4694.
42. Vleugel MM, Shvarts D, van der Wall E, van Diest PJ (2006) p300 and p53 levels determine activation of HIF-1 downstream targets in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 37: 1085-1092.
43. Tang X, Milyavsky M, Shats I, Erez N, Goldfinger N, et al. (2004) Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. *Oncogene* 23: 5759-5769.
44. Di Agostino S, Strano S, Emiliozzi V, Zerbini V, Mottolese M, et al. (2006) Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* 10: 191-202.
45. Ng IO, Lai EC, Chan AS, So MK (1995) Overexpression of p53 in hepatocellular carcinomas: a clinicopathological and prognostic correlation. *J Gastroenterol Hepatol* 10: 250-255.
46. Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, et al. (2002) Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell* 13: 1929-1939.
47. Littau VC, Allfrey VG, Frenster JH, Mirsky AE (1964) Active and Inactive Regions of Nuclear Chromatin as Revealed by Electron Microscope Autoradiography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52: 93-100.
48. Tamura S, Kato T, Berho M, Misiakos EP, O'Brien C, et al. (2001) Impact of histological grade of hepatocellular carcinoma on the outcome of liver transplantation. *Arch Surg* 136: 25-30; discussion 31.
49. Mann CD, Neal CP, Garcea G, Manson MM, Dennison AR, et al. (2007) Prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer* 43: 979-992.
50. Bolden JE, Shi W, Jankowski K, Kan CY, Cluse L, et al. (2013) HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses. *Cell Death Dis* 4: e519.
51. Solomon MJ, Larsen PL, Varshavsky A (1988) Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene.

Cell 53: 937-947.

52. Lieb JD, Liu X, Botstein D, Brown PO (2001) Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet* 28: 327-334.
53. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, et al. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823-837.
54. Furey TS (2012) ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet* 13: 840-852.
55. Giresi PG, Kim J, McDaniell RM, Iyer VR, Lieb JD (2007) FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res* 17: 877-885.
56. Barrera LO, Li Z, Smith AD, Arden KC, Cavenee WK, et al. (2008) Genome-wide mapping and analysis of active promoters in mouse embryonic stem cells and adult organs. *Genome Res* 18: 46-59.
57. Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, et al. (2009) ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* 457: 854-858.
58. Simon JM, Giresi PG, Davis IJ, Lieb JD (2012) Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat Protoc* 7: 256-267.
59. Nelson JD, Denisenko O, Bomsztyk K (2006) Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc* 1: 179-185.
60. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, et al. (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9: R137.
61. Song L, Zhang Z, Grasfeder LL, Boyle AP, Giresi PG, et al. (2011) Open chromatin defined by DNaseI and FAIRE identifies regulatory elements that shape cell-type identity. *Genome Res* 21: 1757-1767.
62. Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, et al. (2012) c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 151: 68-79.
63. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, et al. (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39: 311-318.
64. Carey MF, Peterson CL, Smale ST (2009) Chromatin immunoprecipitation (ChIP). *Cold Spring Harb Protoc* 2009: pdb prot5279.
65. Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, Wakabayashi K, Yu J, et al. (2011) Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI

- family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 7: e1002311.
66. Parkinson NJ, Maslau S, Ferneyhough B, Zhang G, Gregory L, et al. (2012) Preparation of high-quality next-generation sequencing libraries from picogram quantities of target DNA. *Genome Res* 22: 125-133.
 67. Nicol JW, Helt GA, Blanchard SG, Jr., Raja A, Loraine AE (2009) The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* 25: 2730-2731.
 68. Akhtar-Zaidi B, Cowper-Sal-lari R, Corradin O, Saiakhova A, Bartels CF, et al. (2012) Epigenomic enhancer profiling defines a signature of colon cancer. *Science* 336: 736-739.
 69. Stergachis AB, Neph S, Reynolds A, Humbert R, Miller B, et al. (2013) Developmental fate and cellular maturity encoded in human regulatory DNA landscapes. *Cell* 154: 888-903.
 70. Bulger M, Groudine M (2011) Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 144: 327-339.
 71. Calo E, Wysocka J (2013) Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol Cell* 49: 825-837.
 72. Voss TC, Schiltz RL, Sung MH, Yen PM, Stamatoyannopoulos JA, et al. (2011) Dynamic exchange at regulatory elements during chromatin remodeling underlies assisted loading mechanism. *Cell* 146: 544-554.
 73. Rivera CM, Ren B (2013) Mapping human epigenomes. *Cell* 155: 39-55.
 74. Huang J, Deng Q, Wang Q, Li KY, Dai JH, et al. (2012) Exome sequencing of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 44: 1117-1121.
 75. Mosimann C, Hausmann G, Basler K (2009) Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 276-286.
 76. Smith AD, Sumazin P, Zhang MQ (2005) Identifying tissue-selective transcription factor binding sites in vertebrate promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1560-1565.
 77. Matys V, Fricke E, Geffers R, Gossling E, Haubrock M, et al. (2003) TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. *Nucleic Acids Res* 31: 374-378.
 78. Sandelin A, Alkema W, Engstrom P, Wasserman WW, Lenhard B (2004) JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* 32: D91-94.
 79. Mahony S, Benos PV (2007) STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif

- similarities. *Nucleic Acids Res* 35: W253-258.
80. Boyle AP, Song L, Lee BK, London D, Keefe D, et al. (2011) High-resolution genome-wide in vivo footprinting of diverse transcription factors in human cells. *Genome Res* 21: 456-464.
 81. Roeder HG, Kanhere A, Manke T, Vingron M (2007) Predicting transcription factor affinities to DNA from a biophysical model. *Bioinformatics* 23: 134-141.
 82. Matsuura K, Jigami T, Taniue K, Morishita Y, Adachi S, et al. (2011) Identification of a link between Wnt/beta-catenin signalling and the cell fusion pathway. *Nat Commun* 2: 548.
 83. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5: 621-628.
 84. Li Z, Tuteja G, Schug J, Kaestner KH (2012) Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer. *Cell* 148: 72-83.
 85. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44-57.
 86. Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE, Jr. (1990) Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4: 2353-2365.
 87. Bolotin E, Liao H, Ta TC, Yang C, Hwang-Verslues W, et al. (2010) Integrated approach for the identification of human hepatocyte nuclear factor 4alpha target genes using protein binding microarrays. *Hepatology* 51: 642-653.
 88. Wallerman O, Motallebipour M, Enroth S, Patra K, Bysani MS, et al. (2009) Molecular interactions between HNF4a, FOXA2 and GABP identified at regulatory DNA elements through ChIP-sequencing. *Nucleic Acids Res* 37: 7498-7508.
 89. Kaestner KH (2010) The FoxA factors in organogenesis and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 20: 527-532.
 90. Lee CS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH (2005) The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature* 435: 944-947.
 91. Le Lay J, Kaestner KH (2010) The Fox genes in the liver: from organogenesis to functional integration. *Physiol Rev* 90: 1-22.
 92. Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M (1998) Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 281: 692-695.

93. Shih DQ, Navas MA, Kuwajima S, Duncan SA, Stoffel M (1999) Impaired glucose homeostasis and neonatal mortality in hepatocyte nuclear factor 3alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10152-10157.
94. Sund NJ, Ang SL, Sackett SD, Shen W, Daigle N, et al. (2000) Hepatocyte nuclear factor 3beta (Foxa2) is dispensable for maintaining the differentiated state of the adult hepatocyte. *Mol Cell Biol* 20: 5175-5183.
95. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, et al. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413: 131-138.
96. Fang B, Mane-Padros D, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM (2012) Identification of a binding motif specific to HNF4 by comparative analysis of multiple nuclear receptors. *Nucleic Acids Res* 40: 5343-5356.
97. Bochkis IM, Rubins NE, White P, Furth EE, Friedman JR, et al. (2008) Hepatocyte-specific ablation of Foxa2 alters bile acid homeostasis and results in endoplasmic reticulum stress. *Nat Med* 14: 828-836.
98. Friedman JR, Kaestner KH (2006) The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci* 63: 2317-2328.
99. Kaestner KH, Katz J, Liu Y, Drucker DJ, Schutz G (1999) Inactivation of the winged helix transcription factor HNF3alpha affects glucose homeostasis and islet glucagon gene expression in vivo. *Genes Dev* 13: 495-504.
100. Wederell ED, Bilenky M, Cullum R, Thiessen N, Dagpinar M, et al. (2008) Global analysis of in vivo Foxa2-binding sites in mouse adult liver using massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res* 36: 4549-4564.
101. Hoffman BG, Robertson G, Zavaglia B, Beach M, Cullum R, et al. (2010) Locus co-occupancy, nucleosome positioning, and H3K4me1 regulate the functionality of FOXA2-, HNF4A-, and PDX1-bound loci in islets and liver. *Genome Res* 20: 1037-1051.
102. Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, et al. (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303: 1378-1381.
103. Cadigan KM, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11: 3286-3305.
104. Zaret KS, Grompe M (2008) Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 322: 1490-1494.

105. Boj SF, van Es JH, Huch M, Li VS, Jose A, et al. (2012) Diabetes risk gene and Wnt effector Tcf7l2/TCF4 controls hepatic response to perinatal and adult metabolic demand. *Cell* 151: 1595-1607.
106. Huch M, Dorrell C, Boj SF, van Es JH, Li VS, et al. (2013) In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494: 247-250.
107. Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149: 1192-1205.
108. Zaret KS, Carroll JS (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* 25: 2227-2241.
109. Lam EW, Brosens JJ, Gomes AR, Koo CY (2013) Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nat Rev Cancer* 13: 482-495.
110. Hurtado A, Holmes KA, Ross-Innes CS, Schmidt D, Carroll JS (2011) FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. *Nat Genet* 43: 27-33.
111. Robinson JL, Carroll JS (2012) FoxA1 is a key mediator of hormonal response in breast and prostate cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 68.
112. Wang J, Park JS, Wei Y, Rajurkar M, Cotton JL, et al. (2013) TRIB2 acts downstream of Wnt/TCF in liver cancer cells to regulate YAP and C/EBPalpha function. *Mol Cell* 51: 211-225.
113. Frietze S, Wang R, Yao L, Tak YG, Ye Z, et al. (2012) Cell type-specific binding patterns reveal that TCF7L2 can be tethered to the genome by association with GATA3. *Genome Biol* 13: R52.

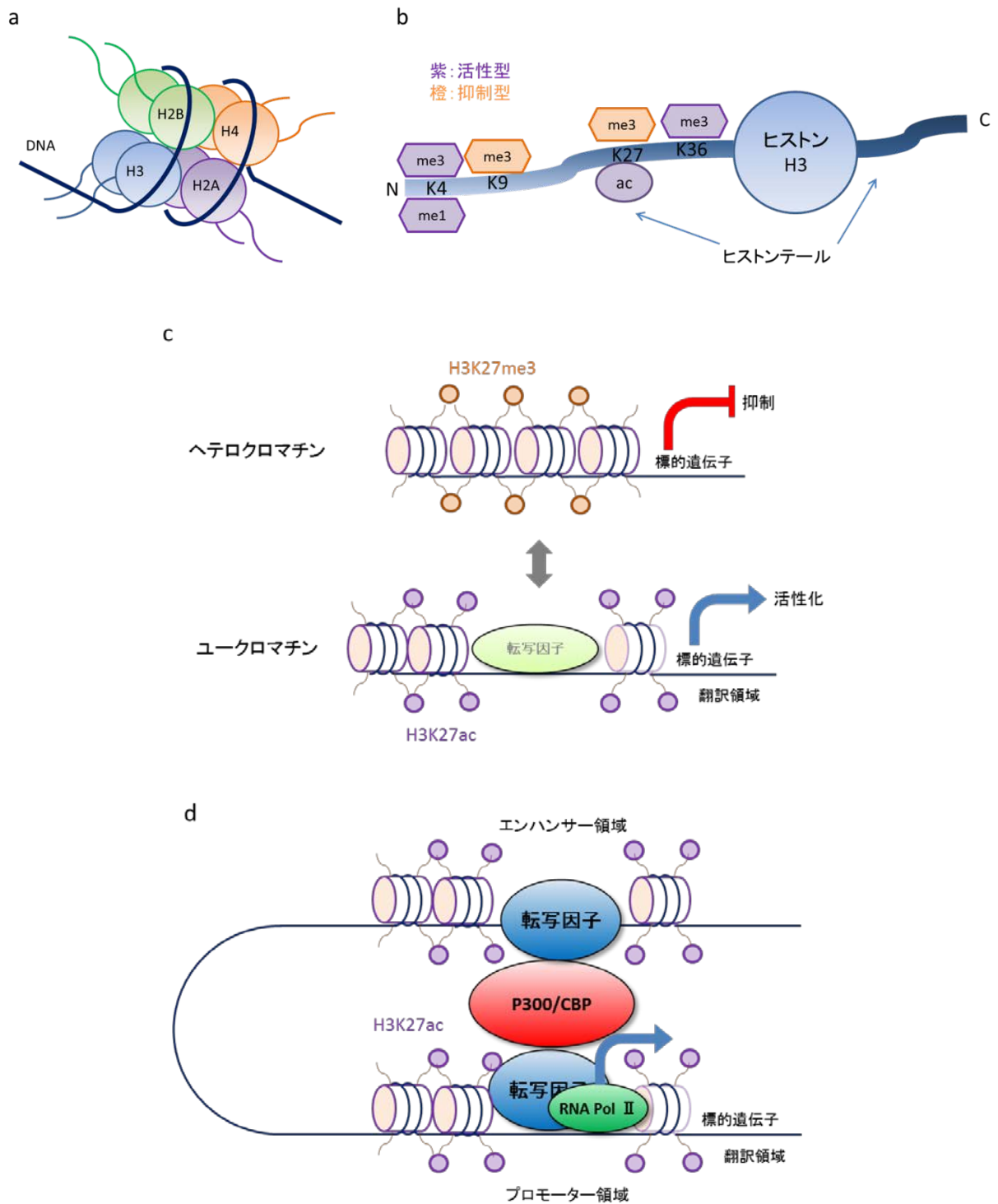
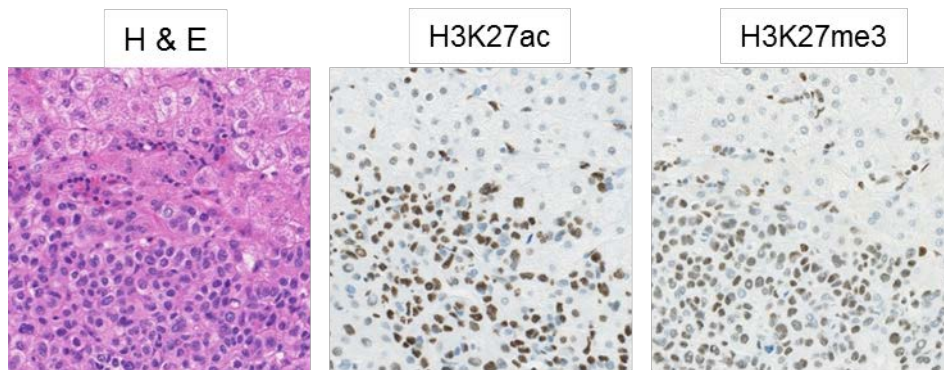


図1 クロマチン構造とヒストン修飾

- (a) H2A、H2B、H3、H4の2分子8量体からなるヒストンタンパク質にコアDNAが約1.7回転巻き付いてクロマチンが形成されている。
- (b) ヒストンH3のヒストン・テールに見られる主なヒストン修飾
- (c) H3K27me3がヘテロクロマチンを形成して標的遺伝子を不活性化するのに対して、H3K27acはユークロマチンを形成して標的遺伝子を活性化する
- (d) H3K27acに定義される活性エンハンサー領域は活性プロモーター領域とループ構造を形成して、標的遺伝子を活性化する。

a



b

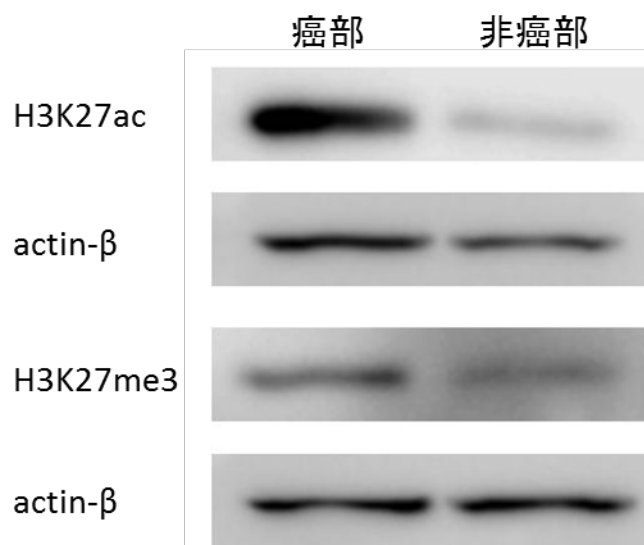


図2 癌部および非癌部における H3K27ac および H3K27me3 の修飾

(a) 癌・非癌部境界領域の H&E、H3K27ac および H3K27me3 の組織顕微鏡写真像
(b) 癌部・非癌部の凍結組織検体を用いたウエスタン・ブロット解析。actin-β をローディングコントロールとして使用。

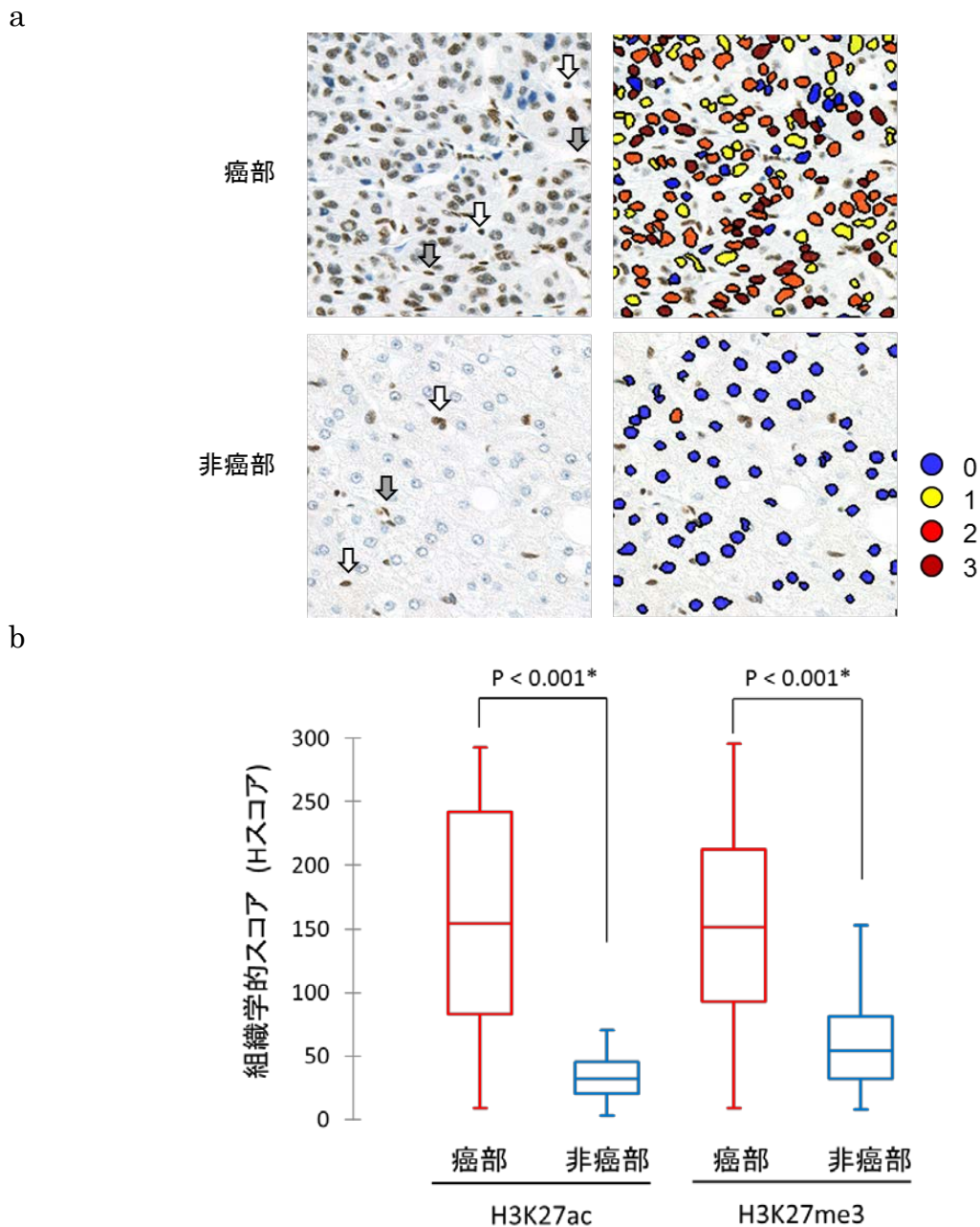


図3 解析ソフトを用いた免疫組織化学的結果の定量解析

(a) バーチャルスライドに取り込まれた癌部および背景肝の画像は Tissue Studio (Definiens AG, Munich, Germany) によって定量的に解析された。各々の核は、DAB (brown diaminobenzidine) 発色の程度によって 0 (陰性)、1 (弱陽性)、2 (中陽性)、3 (強陽性)に割り当てられる。大部分の炎症細胞 (白矢印) および内皮細胞 (灰色矢印)は、核のサイズと形態のセレクションにより、本解析から除外されている。

(b) 癌部と非癌部では、組織学的スコア (Hスコア) に有意な差が見られた ($P < 0.001$)。統計解析は、Mann-Whitney 検定を用いた。

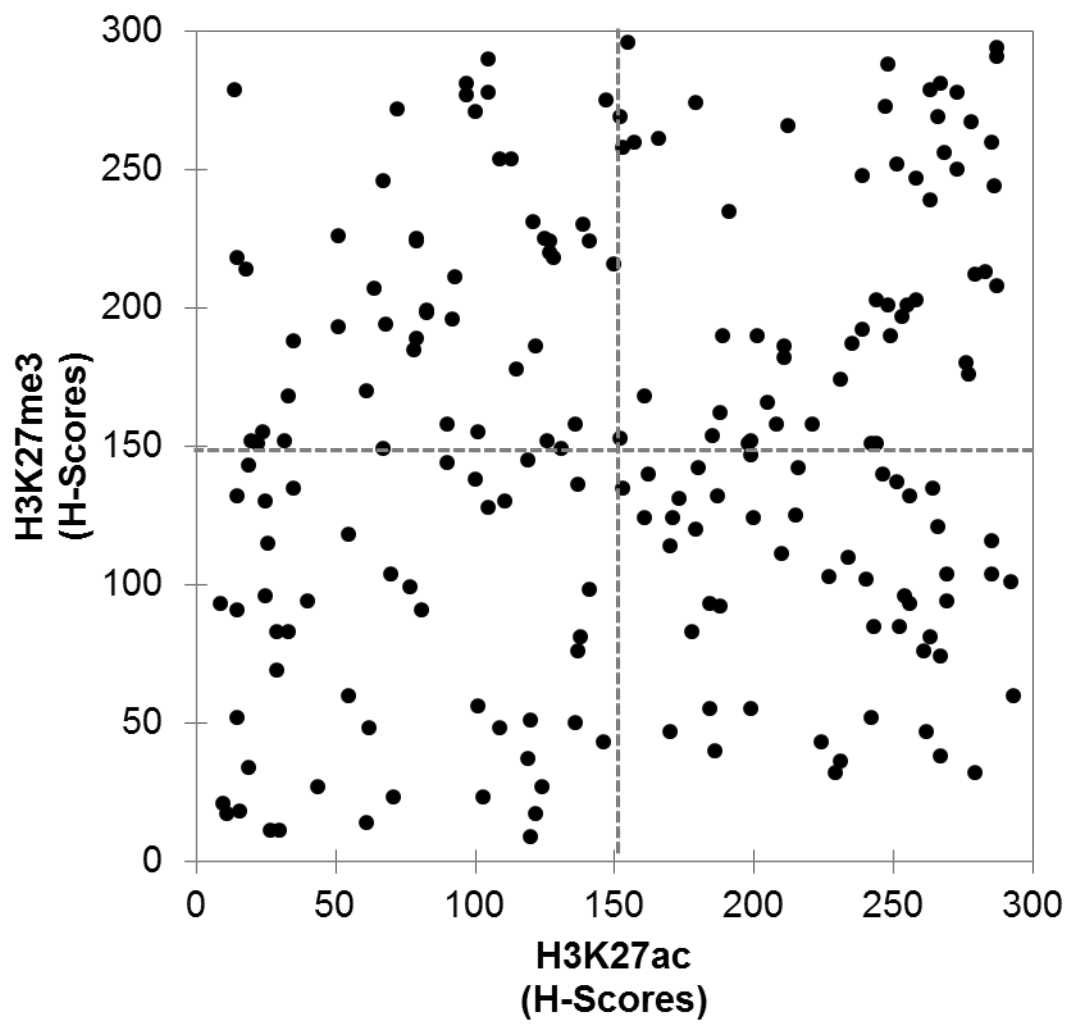


図4 癌部における H3K27ac および H3K27me3 の H スコアの分布
H スコア=150 と点線で記す。

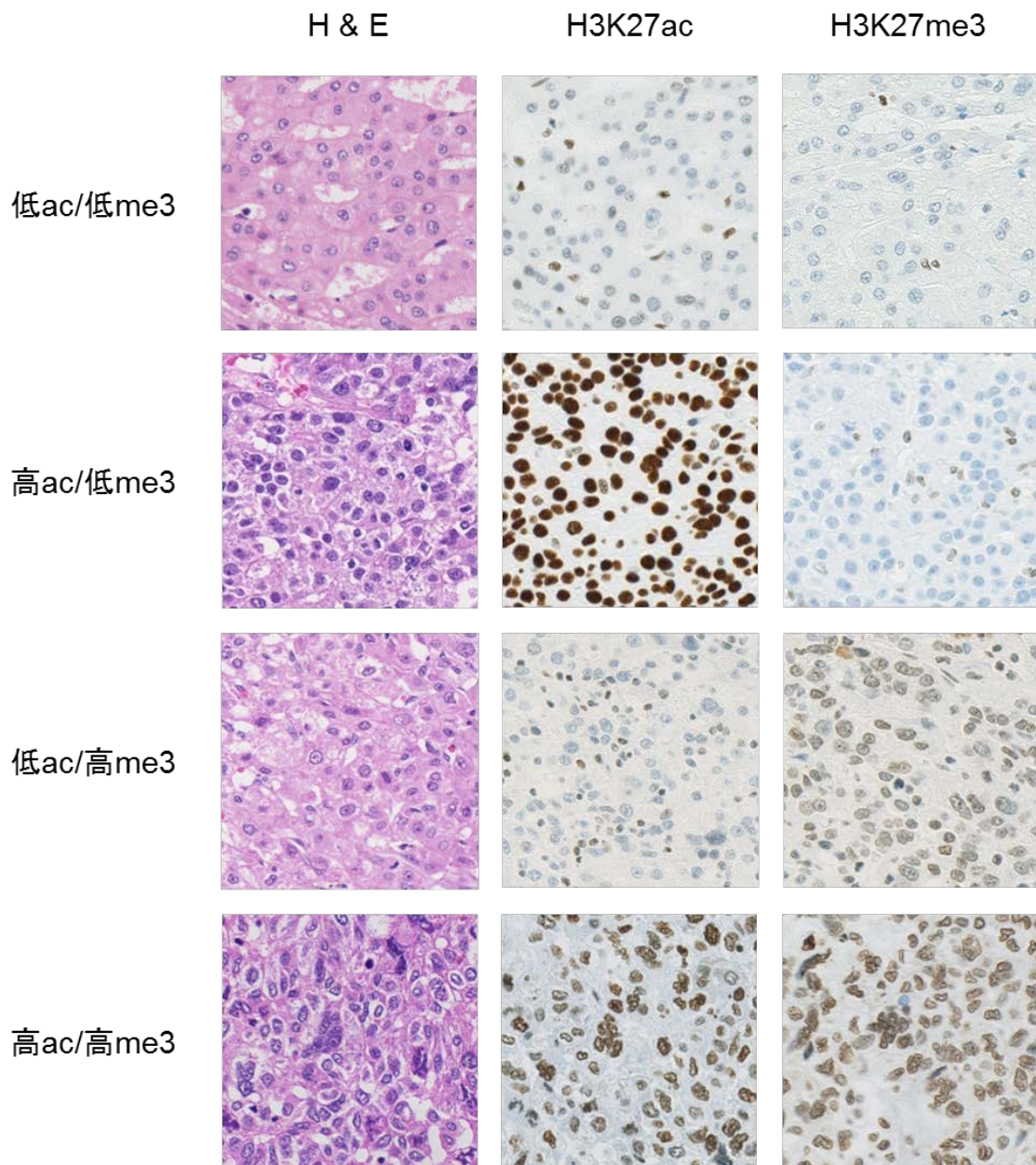
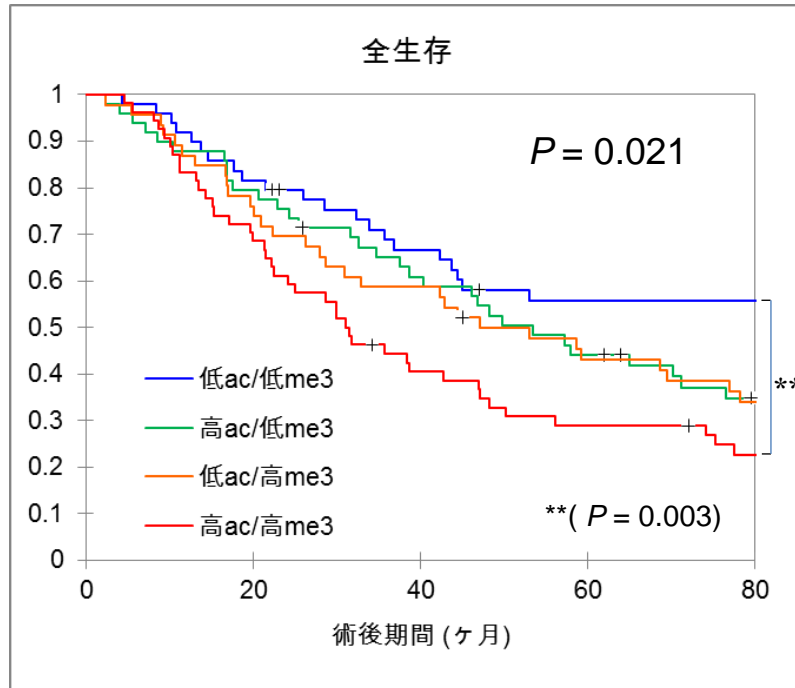


図5 低ac/低me3、高ac/低me3、低ac/高me3、高ac/高me3各群の代表的な組織顕微鏡像

a



b

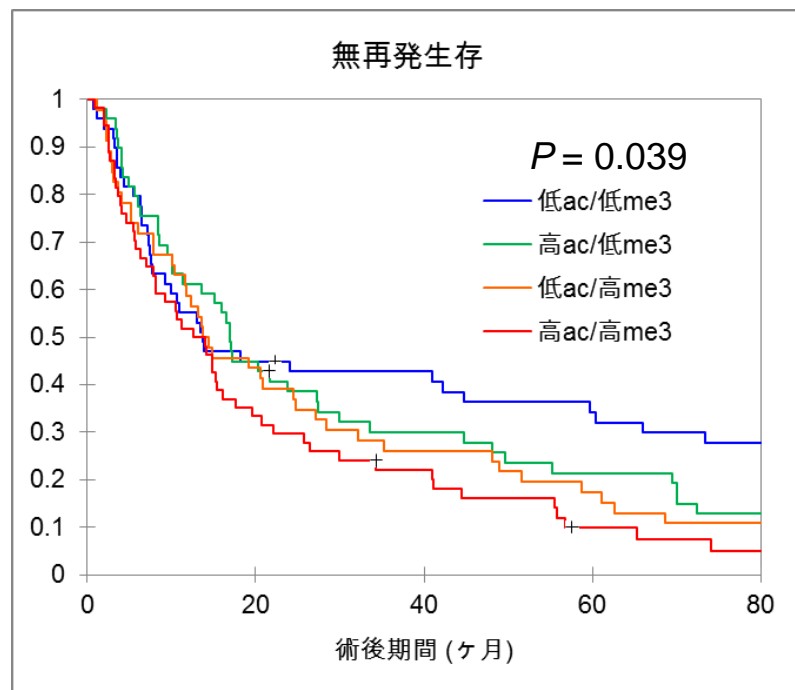
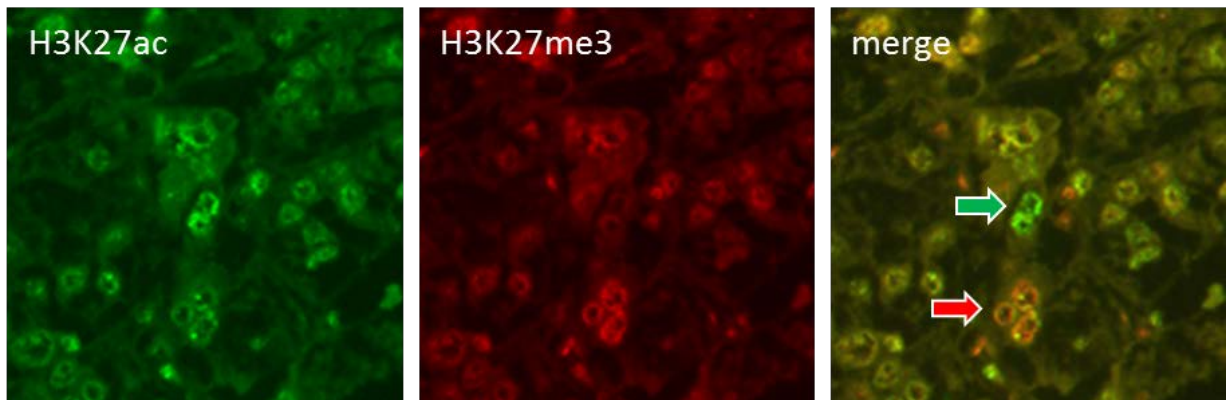
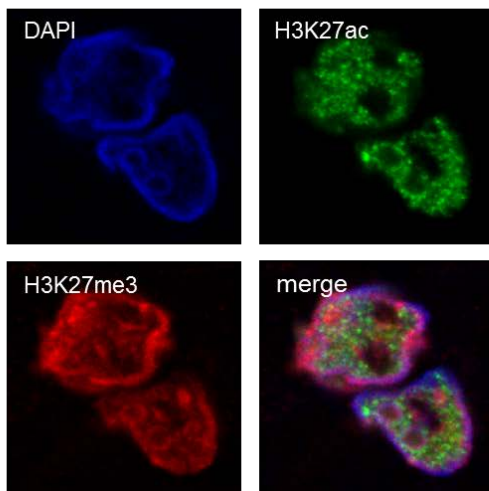


図6 Kaplan-Meier analysis 法を用いた生存解析
H3K27 のヒストン修飾 4 群の(a) 全生存および (b) 無再発生存を示す。Log-rank 検定では、これら 4 群間で全生存 ($P = 0.021$)、無再発生存 ($P = 0.039$)とも有意な差が見られた。各群間の χ^2 検定では、ボンフェローニ調整後も、全生存において高 ac/高 me3 群は、低 ac/低 me3 群に比べ有意に予後不良であった ($P = 0.003 < 0.05/6$)。

a



b



c

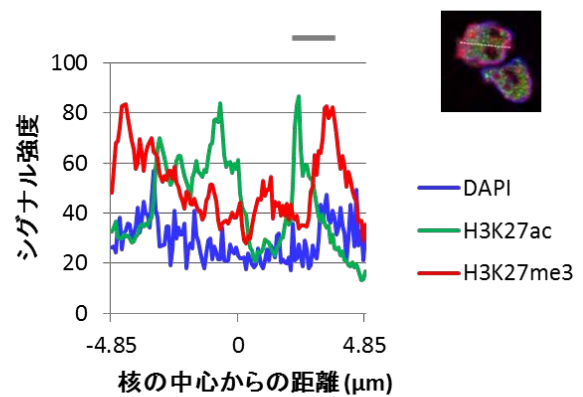


図7 H3K27ac および H3K27me3 の蛍光二重染色

(a) FFPE 検体を用いた H3K27ac および H3K27me3 の蛍光二重染色の組織顕微鏡像。一部に H3K27ac(緑矢印)や H3K27me3(赤矢印)の一方が強い陽性を示す細胞が見られる。

(b) 凍結組織検体を用いた H3K27ac および H3K27me3 の蛍光二重染色の組織顕微鏡像。染色領域が核内で異なっていることが分かる。

(c) (b)の LAS (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) による蛍光強度の画像解析。核小体領域を灰色太線で示す。

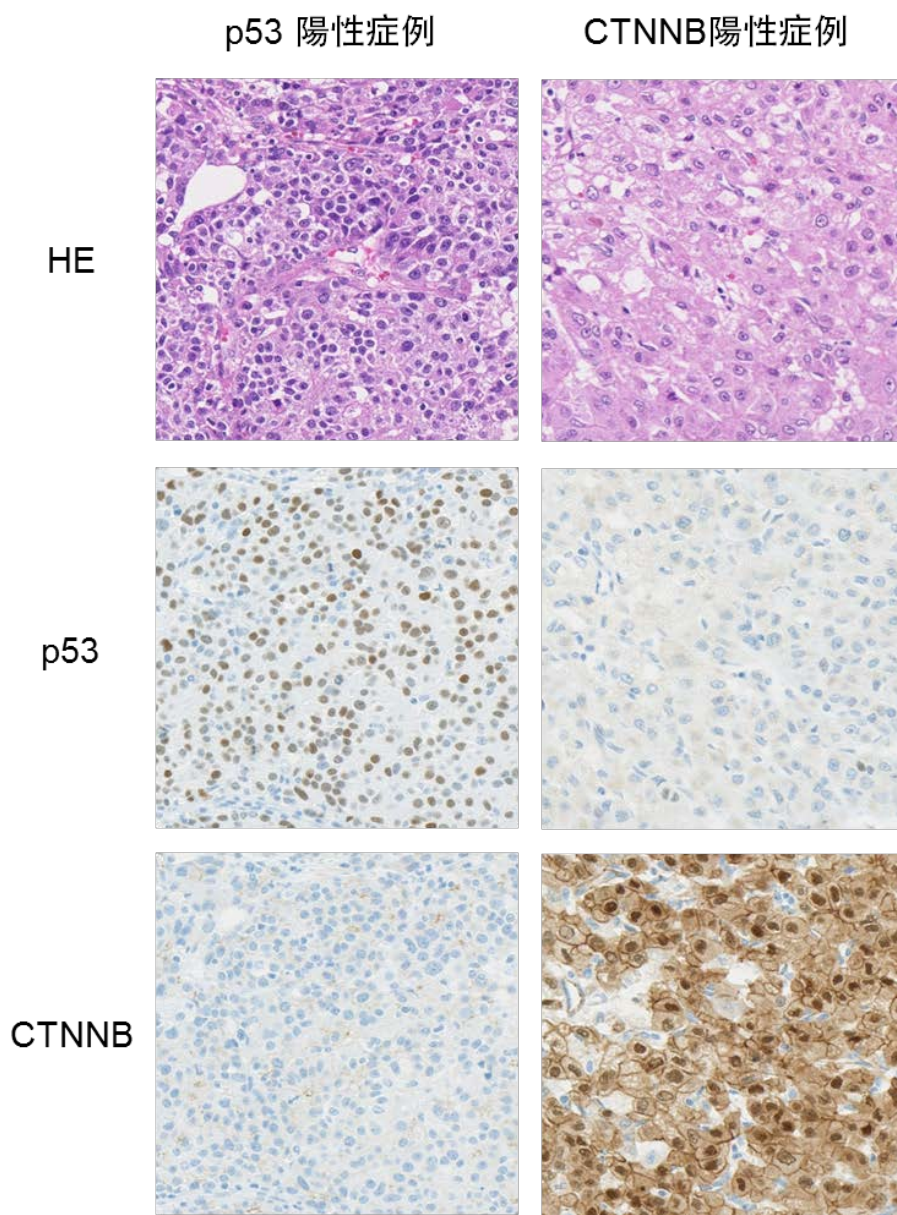
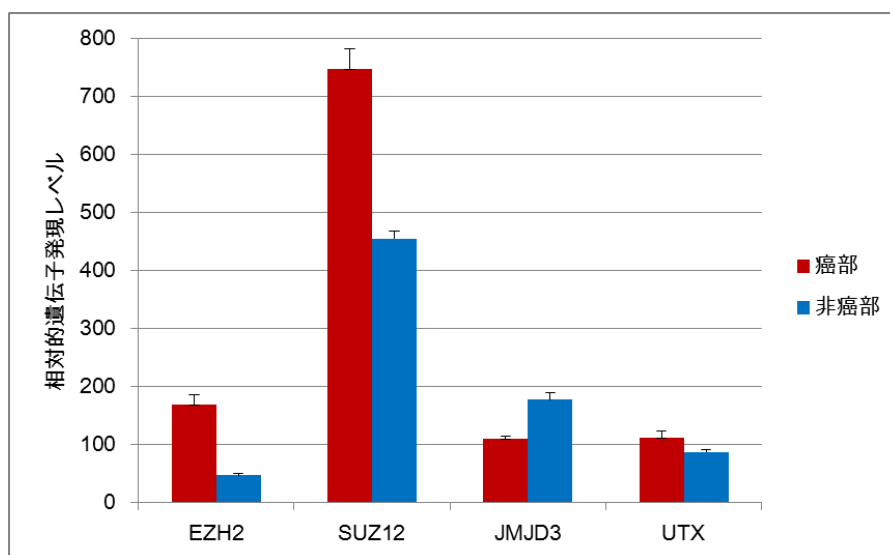


図 8 p53 および β -catenin の代表的な組織顕微鏡像

a



b

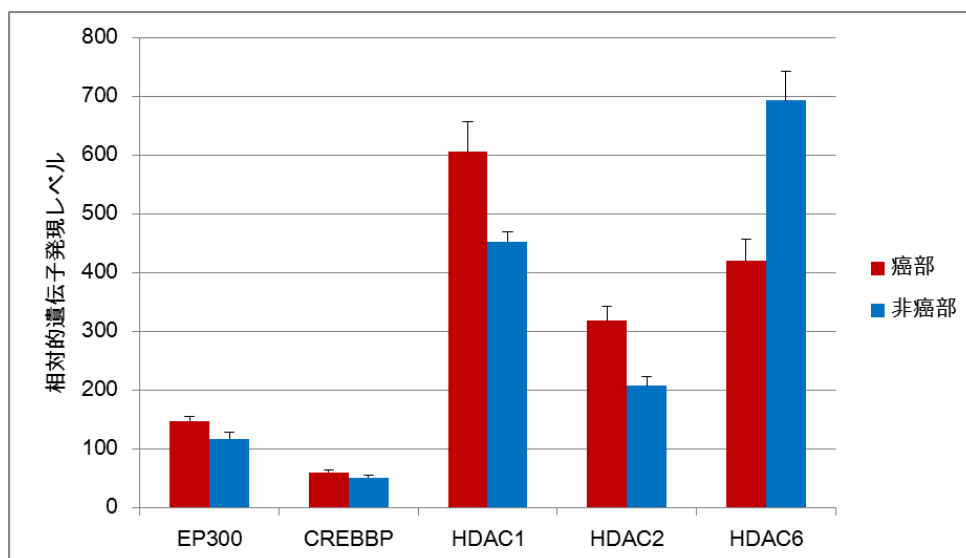


図9 癌部・非癌部における H3K27 修飾酵素の遺伝子発現

(a) H3K27me3 修飾関連酵素の遺伝子発現

(b) H3K27ac 修飾関連酵素の遺伝子発現

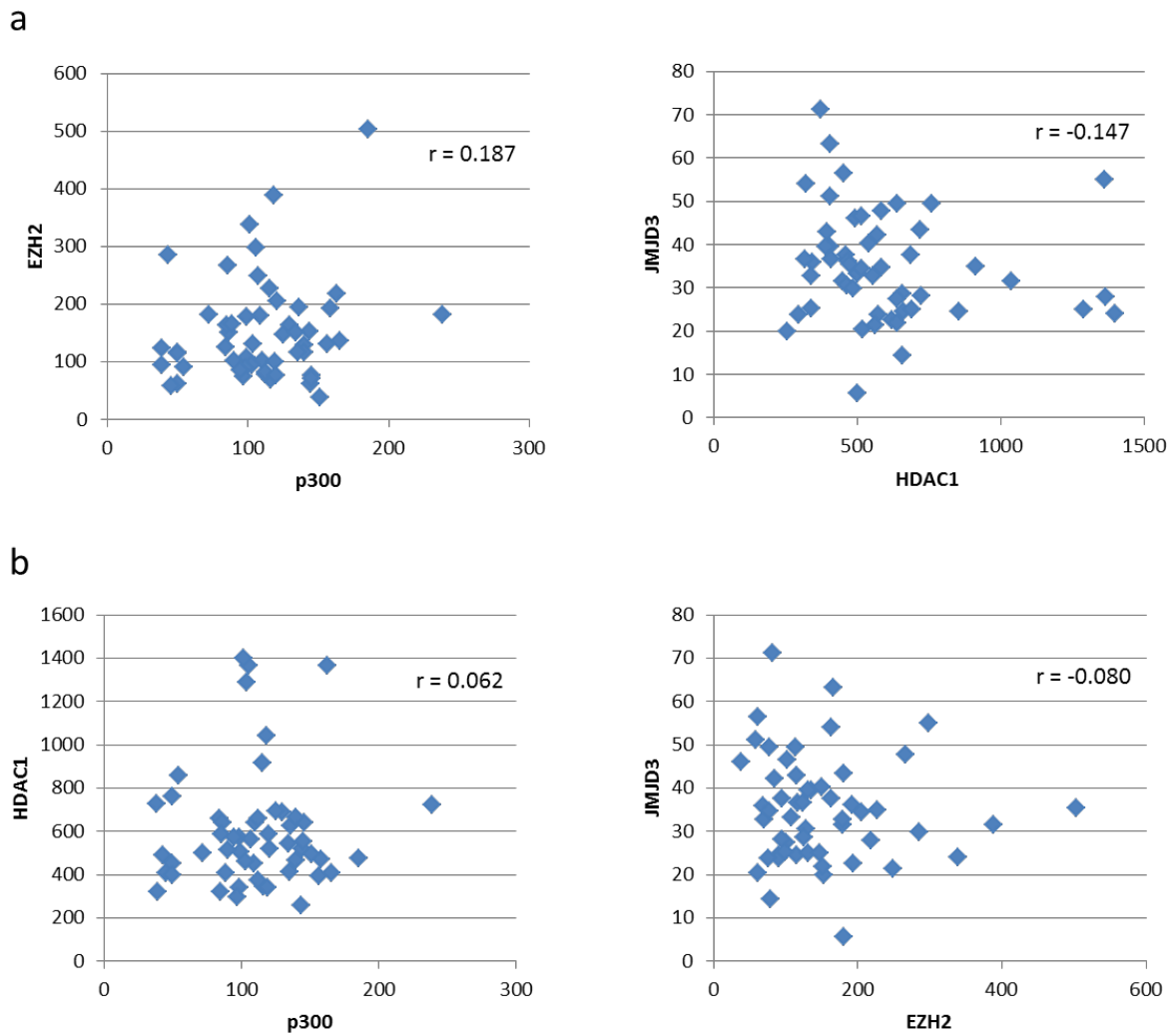


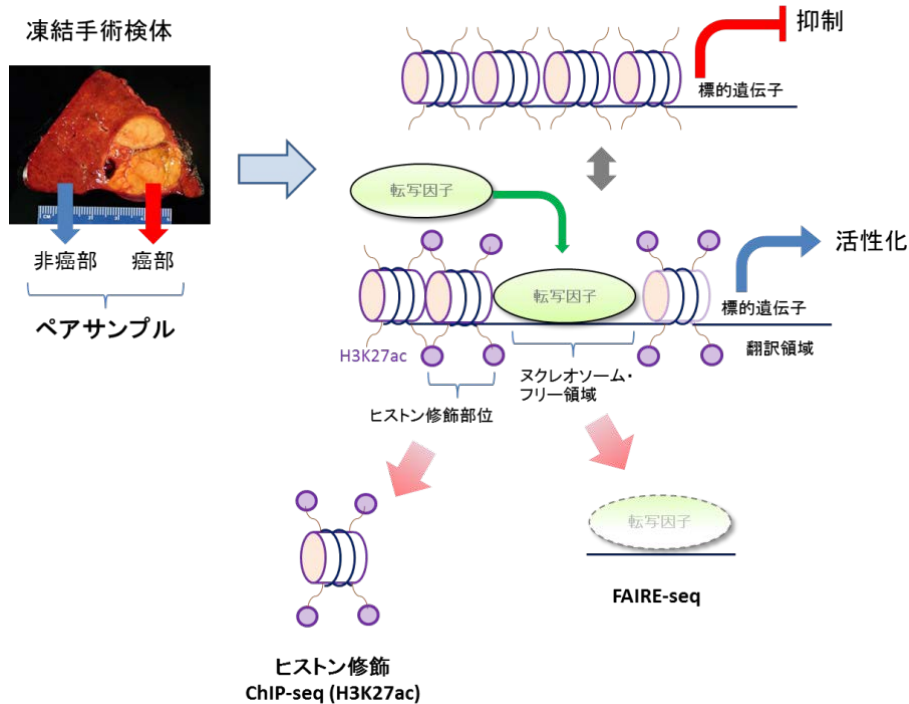
図 10 癌部における症例間の H3K27 修飾酵素の遺伝子発現の違い

(縦軸および横軸は全て相対的遺伝子発現レベルである)

(a) H3K27 修飾の代表的な writer 同士(EZH2 および p300)、eraser 同士(JMJD3 および HDAC1)の比較

(b) H3K27ac および H3K27me3 の代表的な writer と eraser の比較

a



b

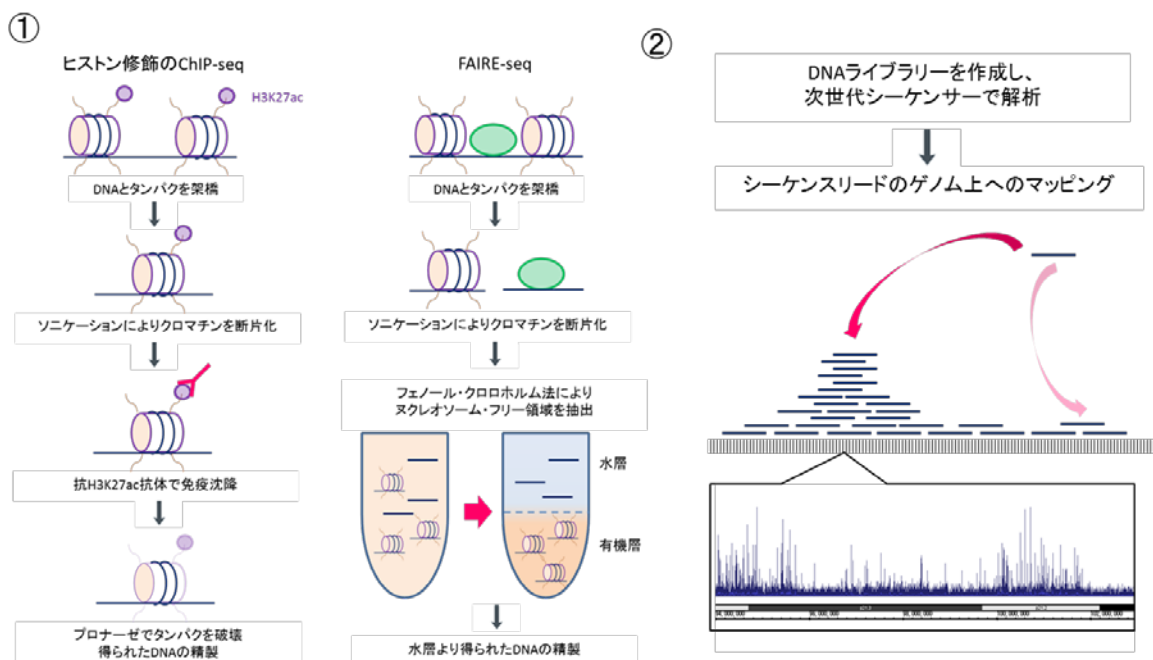


図 11 ChIP-seq (H3K27ac) および FAIRE-seq の概念図

(a) 癌部・非癌部をペアとする凍結手術検体を用いてヒストン修飾の ChIP-seq (H3K27ac) および FAIRE-seq を行う。

(b) ChIP-seq および FAIRE-seq の概要。①のようにして抽出された DNA は、②のようにして次世代シーケンサーで解析、マッピングされる。

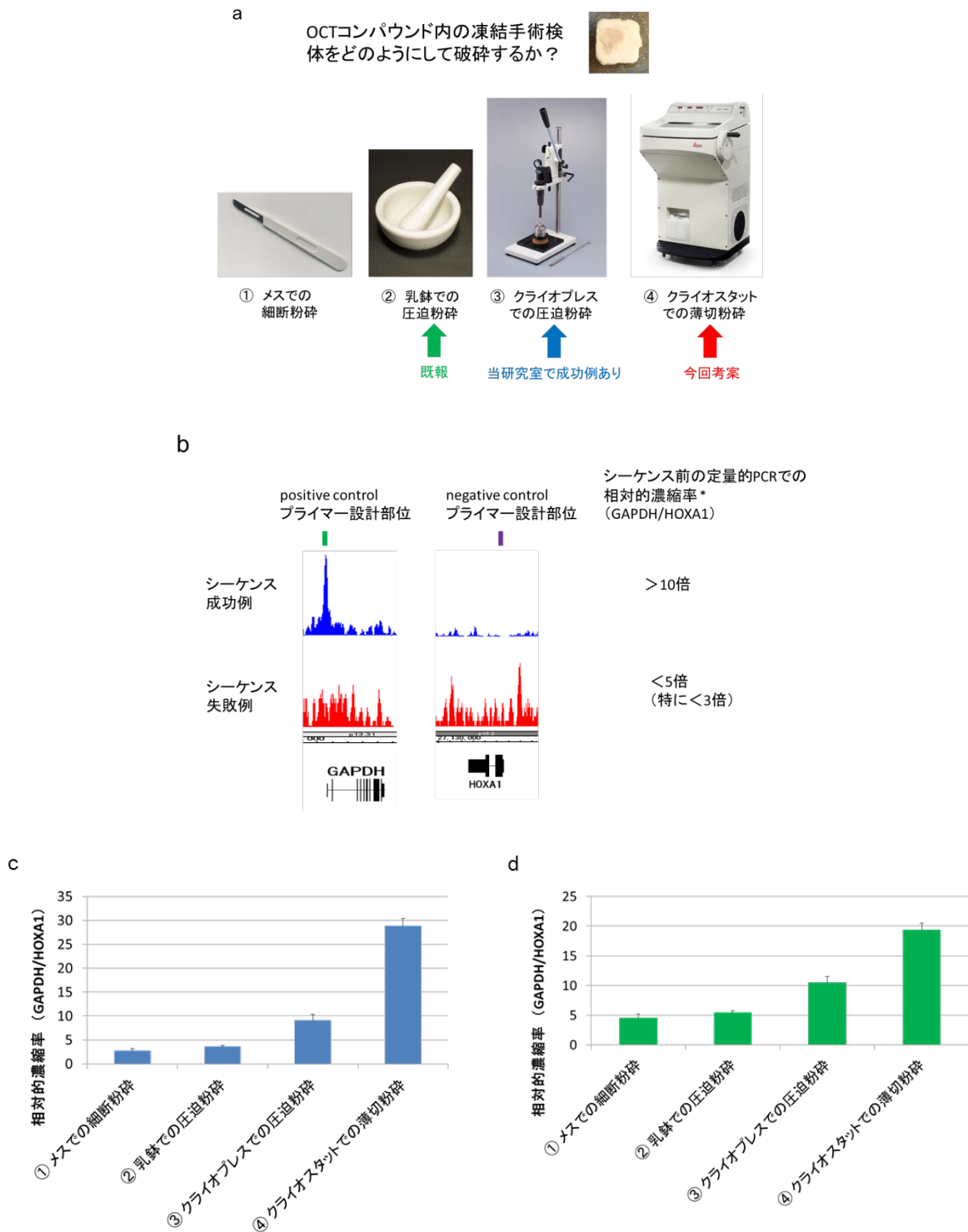


図 12 4 種の粉碎法による H3K27ac および FAIRE の相対的濃縮率

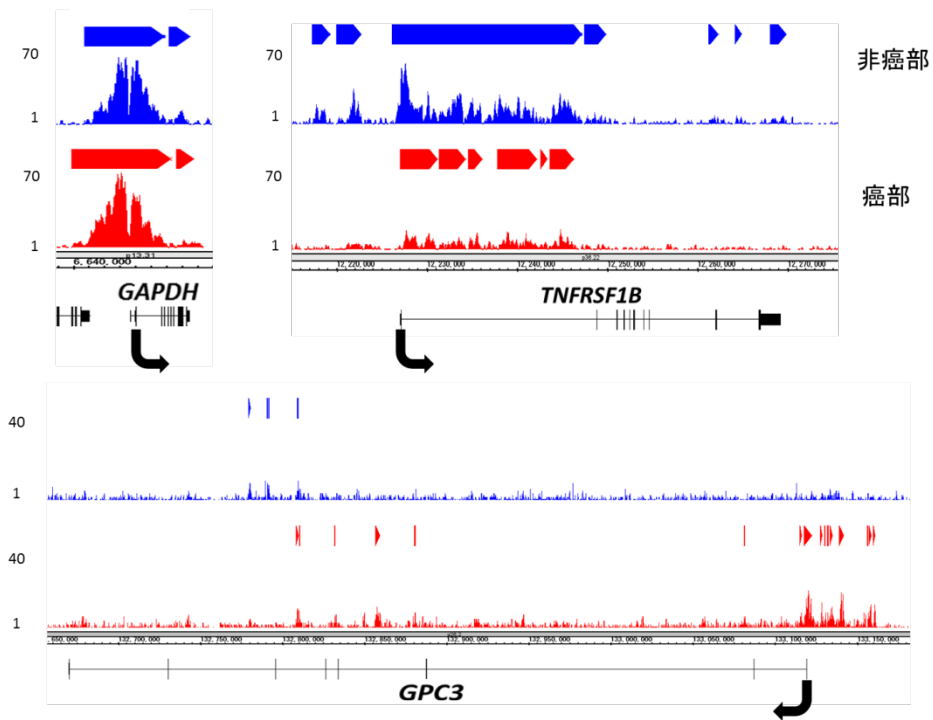
(a) 4 種の薄切法の概念図

(b) シーケンスの成功・失敗例とシーケンス前の定量的 PCR での相対的濃縮率。シーケンス成功例では、バックグラウンドのシグナルが低く、シーケンス前の定量的 PCR での濃縮率が 10 倍以上を示すことが多い。

(c) H3K27ac の ChIP サンプルを定量的 PCR で解析

(d) FAIRE の ChIP サンプルを定量的 PCR で解析

a



b

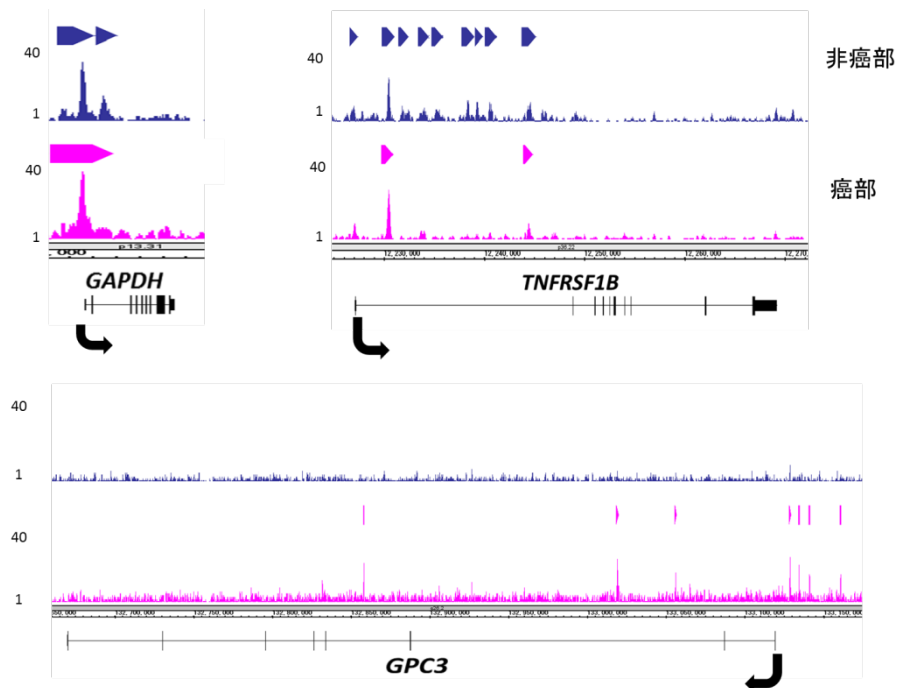
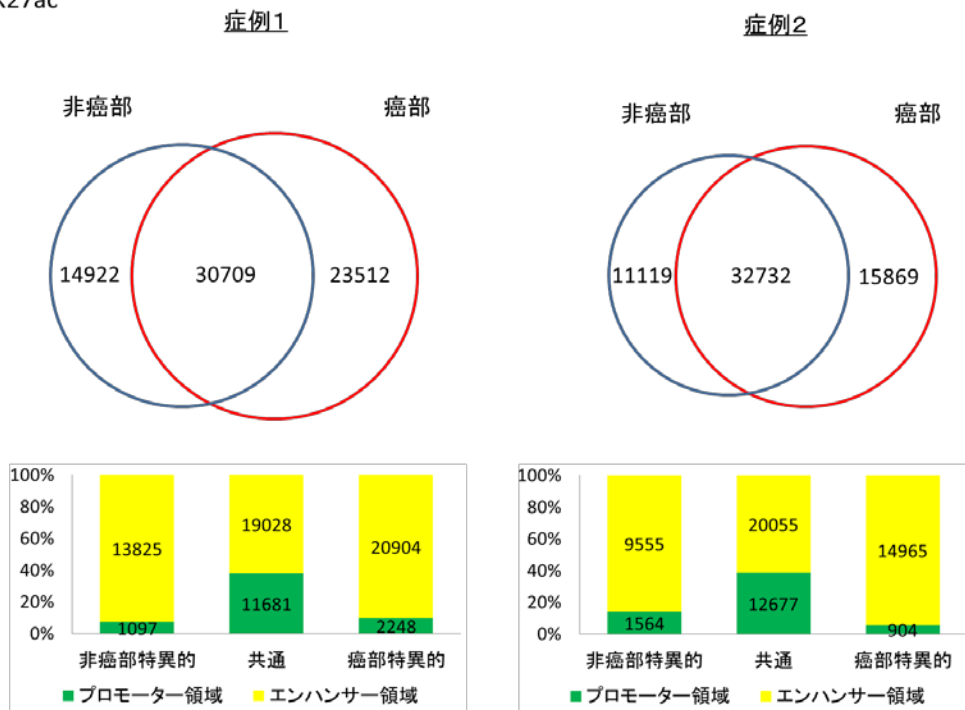


図 13 (a) H3K27ac ChIP-seq、(b) FAIRE-seq のピーク例

上段に MACS により同定されたピーク領域を示す。ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* は癌部・非癌部で殆ど変化が見られない一方で、アポトーシス関連遺伝子として知られる *TNFRSF1B* では非癌部特異的のピークが、肝細胞癌の治療標的として注目されている *GPC3* では癌部特異的なピークが見られた。

a

H3K27ac



b

FAIRE

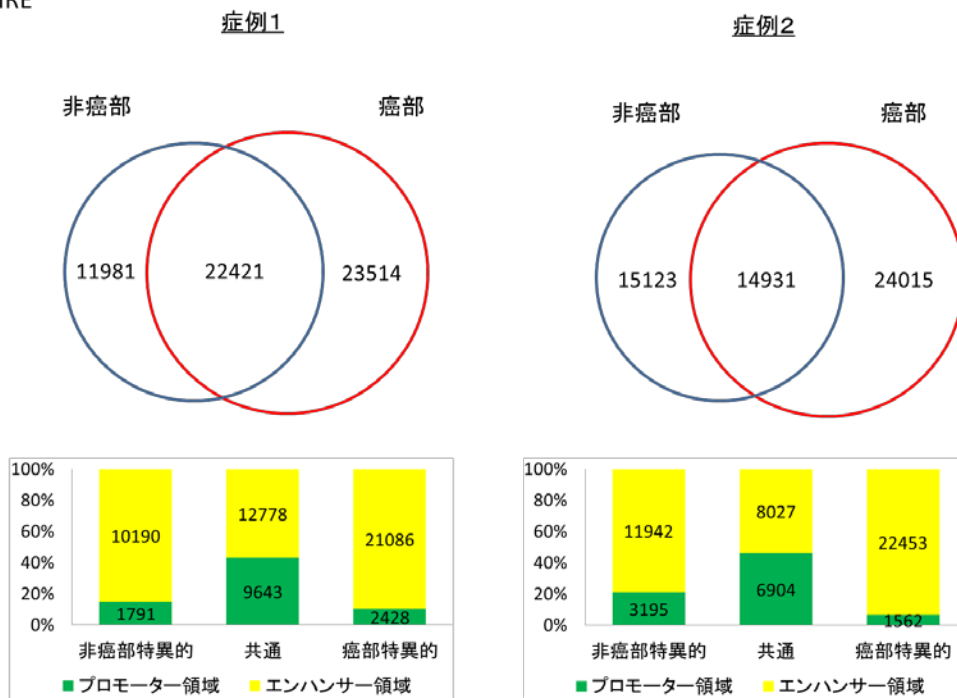
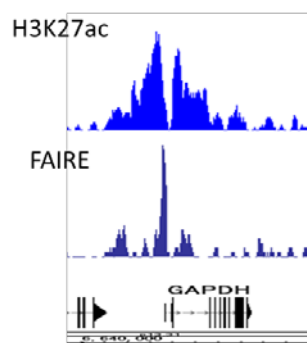


図 14 MACS のアルゴリズムによって同定された (a) H3K27ac ChIP-seq、(b) FAIRE-seq のピーク

a



b

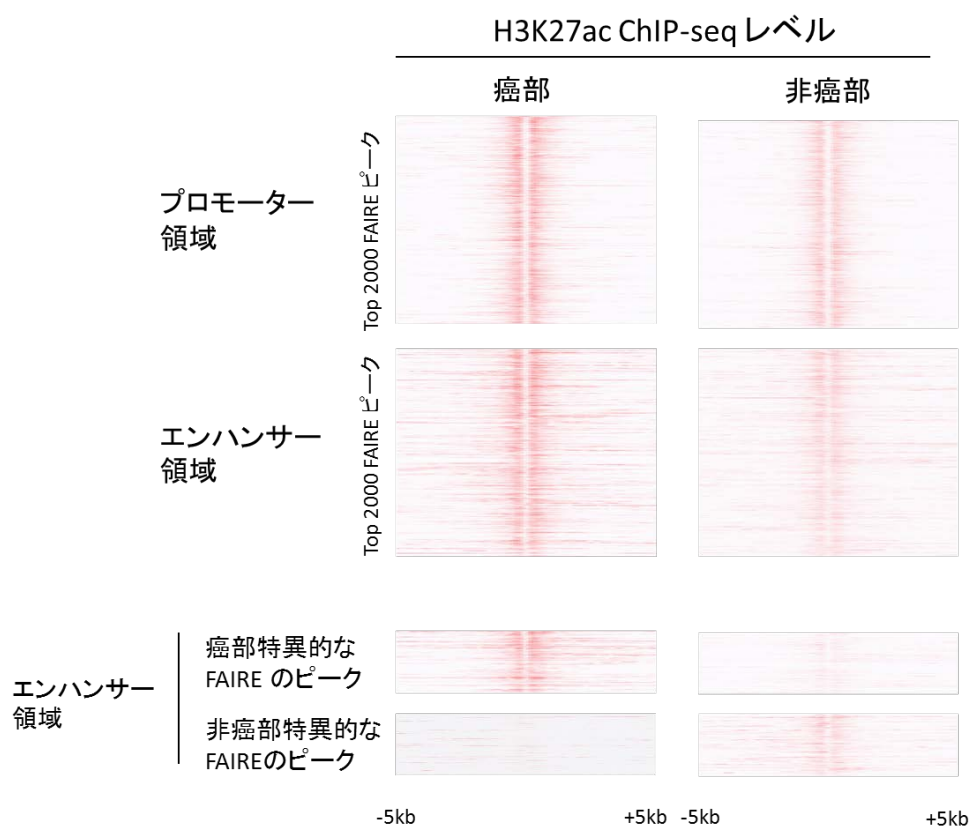


図 15 FAIRE のピーク周囲 H3K27ac のピーク

(a) *GAPDH* 周囲の FAIRE および H3K27ac のピーク

(b) プロモーター領域 TOP2000、エンハンサー領域 TOP2000、エンハンサー領域の癌部・非癌部特異的な FAIRE のピーク周囲の H3K27ac の ChIP-seq レベル

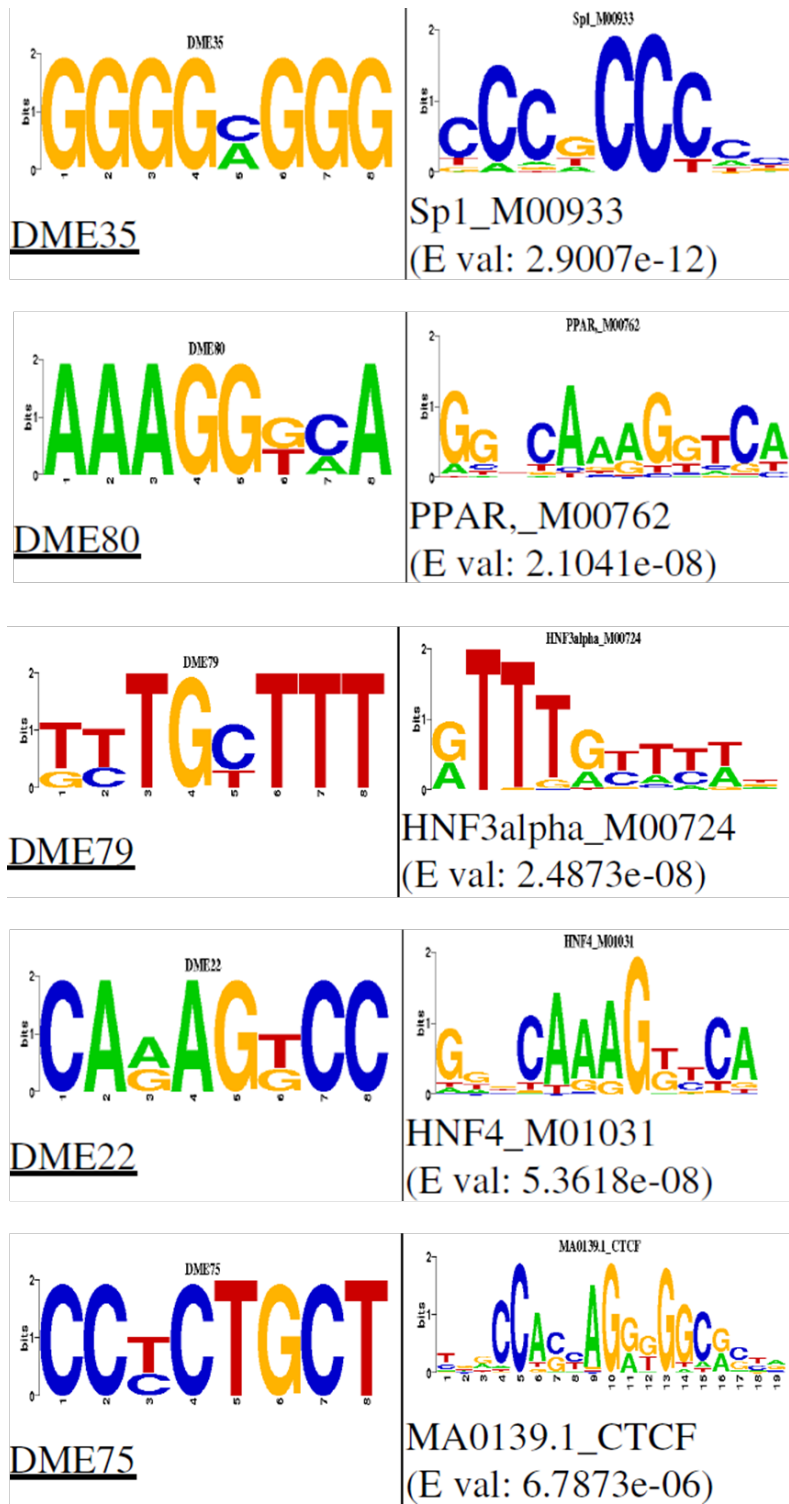
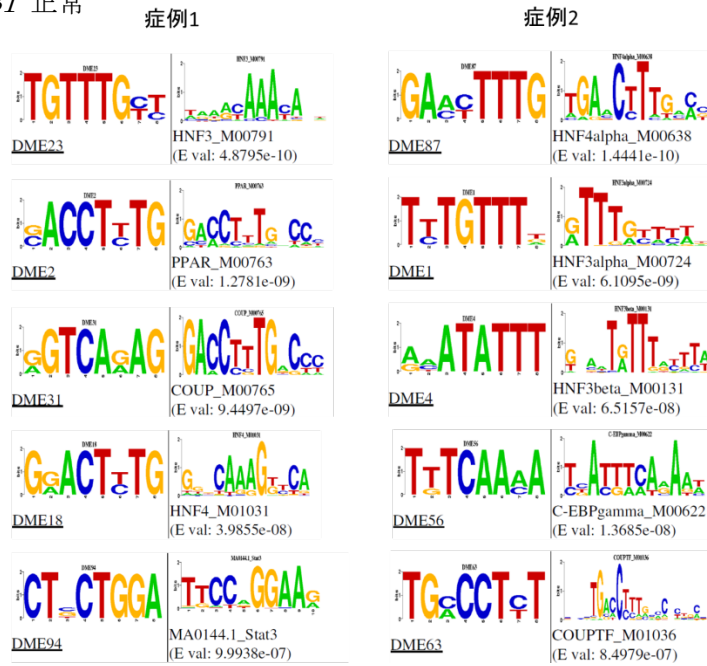


図 16 癌・非癌部共通の FAIRE のピークに見られた代表的モチーフ
 基本点転写因子である Sp1 やインスレーター結合タンパクである CTCF のモチーフと
 ともに、肝臓のマスター制御因子とされる HNF4A や FOXA1 (HNF3A)、PPAR のモチ
 ーフが確認された。

a

CTNNB1 正常



b

CTNNB1 変異

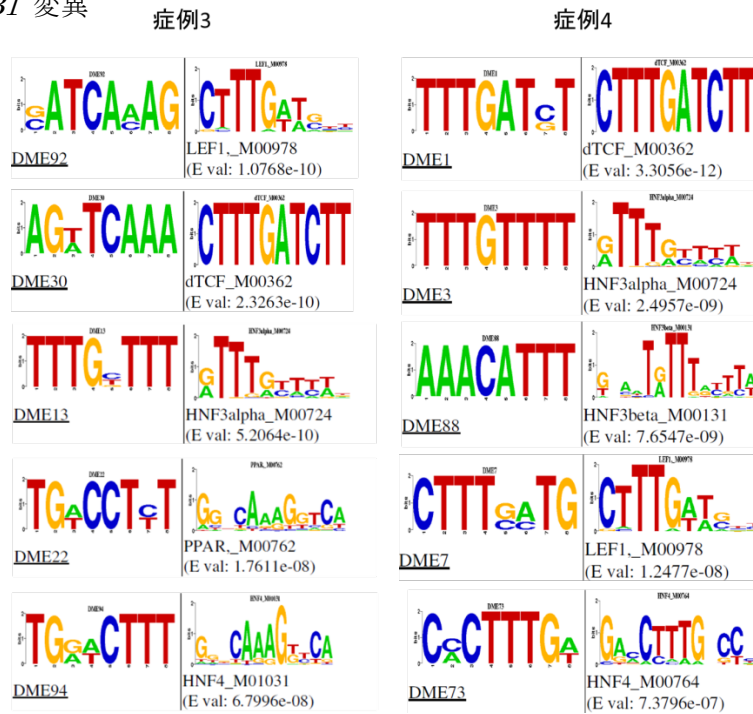


図 17 (a) *CTNNB1* 正常 (b) *CTNNB1* 変異症例での癌特異的 FAIRE のピークに見られた代表的モチーフ

CTNNB1 変異症例では、TCF や LEF のモチーフが見られた。

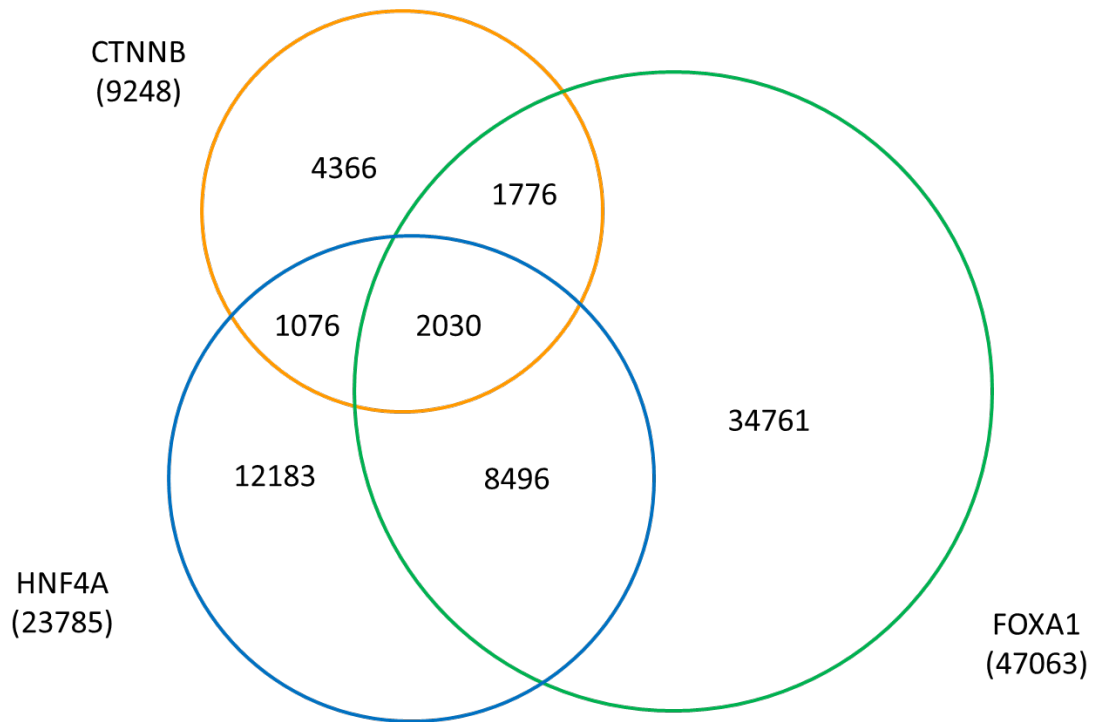
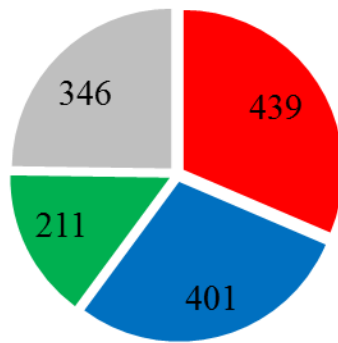


図 18 HepG2 における β -catenin、FOXA1、HNF4A の共局在



■ FOXA1、HNF4Aが共局在 ■ FOXA1のみ
■ HNF4Aのみ ■ それ以外

図 19 癌・非癌部共通のエンハンサー領域の FAIRE ピーク (1397 ヶ所) に対する FOXA1、HNF4A のピークの重なり
 70%以上に FOXA1、HNF4A のいずれかのピークが見られ、約 30%に FOXA1 と HNF4A の共局在が見られた。

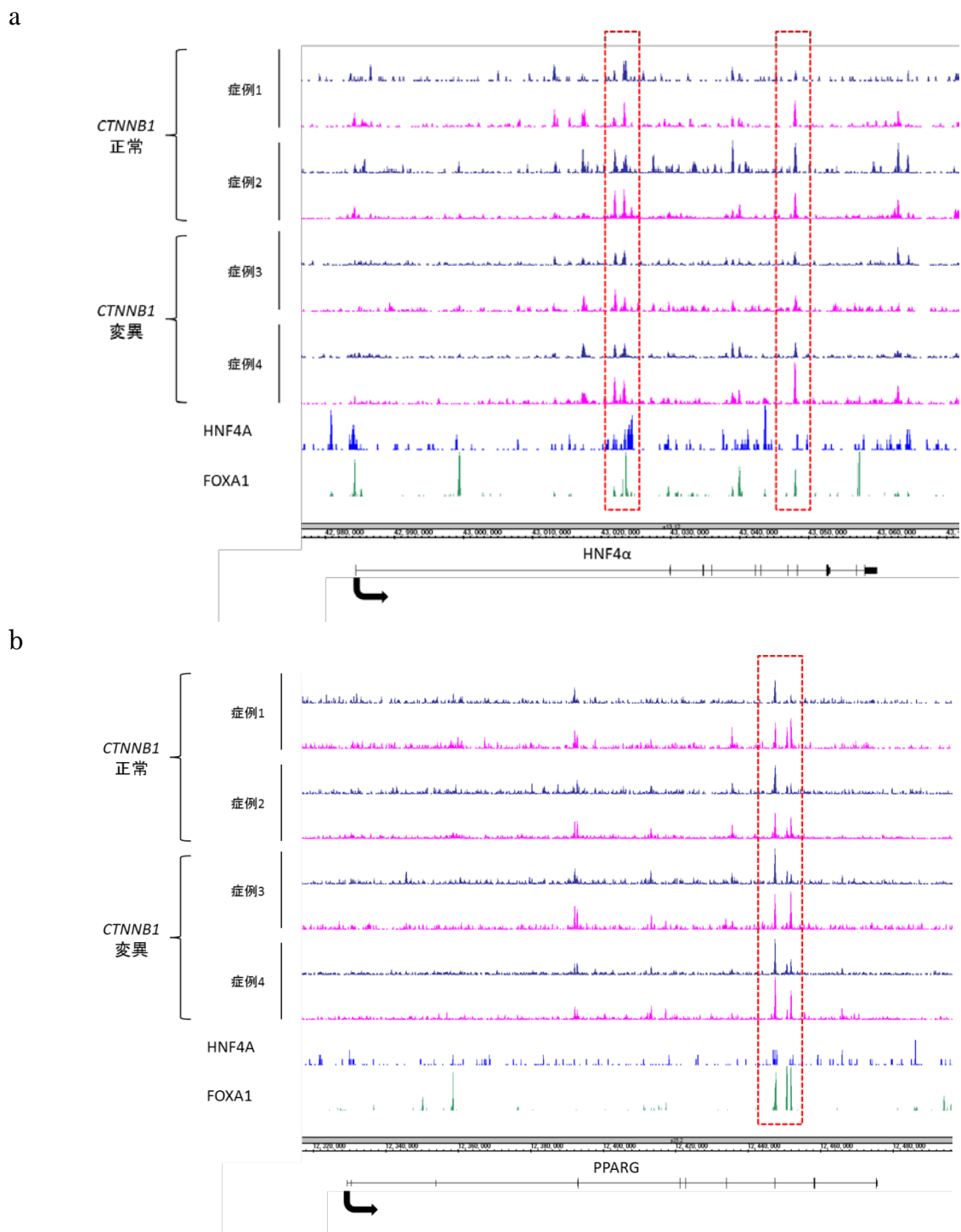
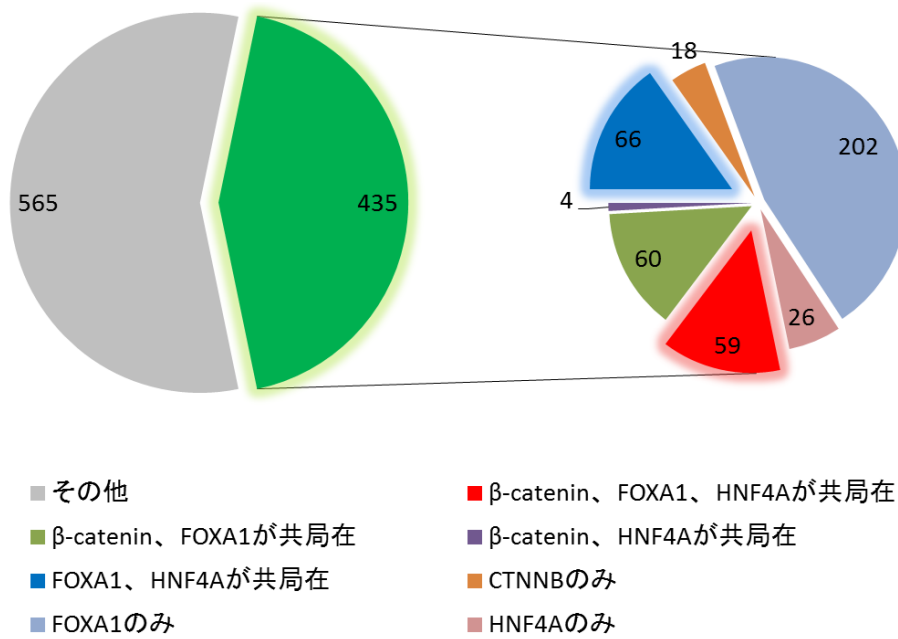


図 20 癌・非癌部共通の FAIRE ピークと HNF4A・FOXA1 の共局在の例
 (各症例とも藍色が非癌部、桃色が癌部の FAIRE である)
 (a) *HNF4A* および (b) *PPARG* のエンハンサー領域の癌・非癌部共通の FAIRE ピークに
HNF4A、*FOXA1* の共局在が見られた。

a (症例 3)



b (症例 4)

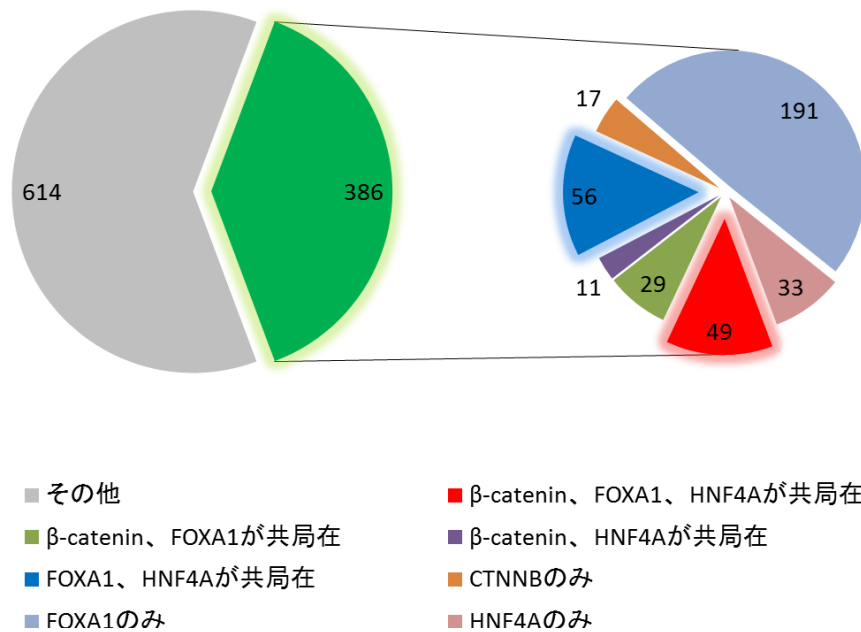


図 21 *CTNNB1* 変異症例のエンハンサー領域の癌特異的ピーク TOP1000 と β -catenin、FOX A1、HNF4A のピーク

(a) 症例 3、(b) 症例 4 のいずれにおいても約 40% のピークに β -catenin、FOX A1、HNF4A のいずれかのピークが見られた。 β -catenin のピークは 10% 強に見られ、大部分に FOX A1 との共局在が見られた。

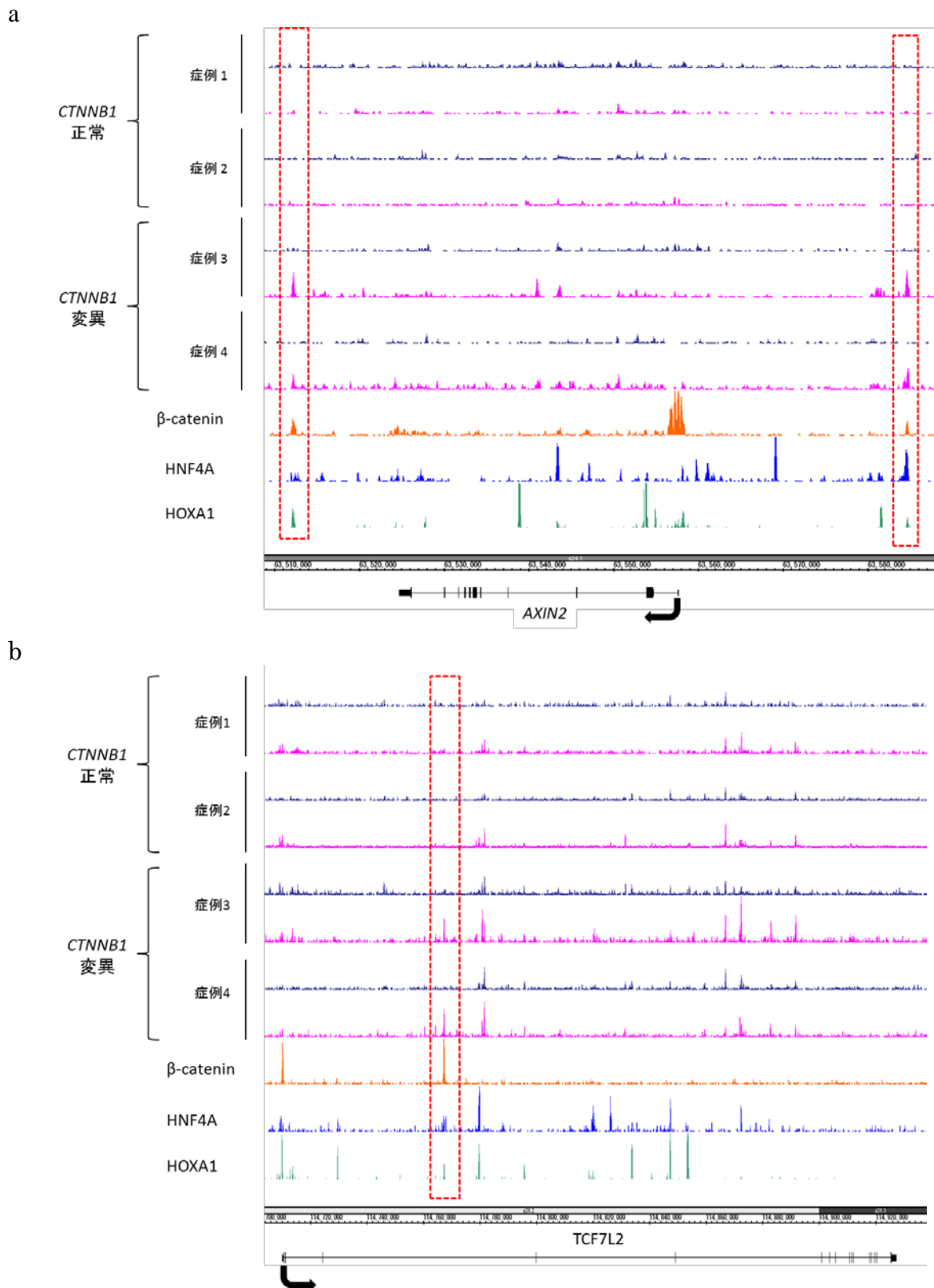
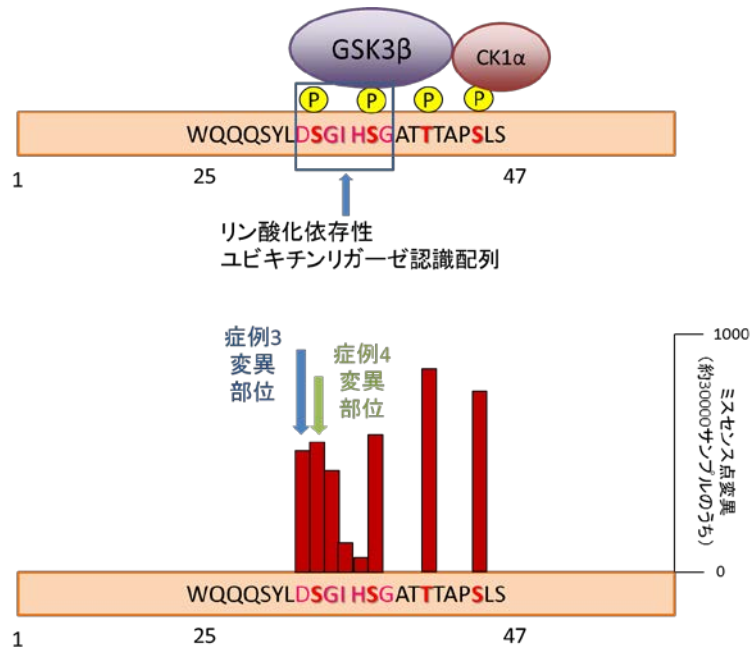


図 22 *CTNNB1* 変異症例の癌特異的 FAIRE ピークと β -catenin・HNF4A・FOXA1 の共局在 (各症例とも藍色が非癌部、桃色が癌部の FAIRE である)
 (a) *AXIN2* および (b) *TCF7L2* のエンハンサー領域の *CTNNB1* 変異症例の癌特異的ピークに β -catenin、HNF4A、FOXA1 の共局在が見られた。

a



b

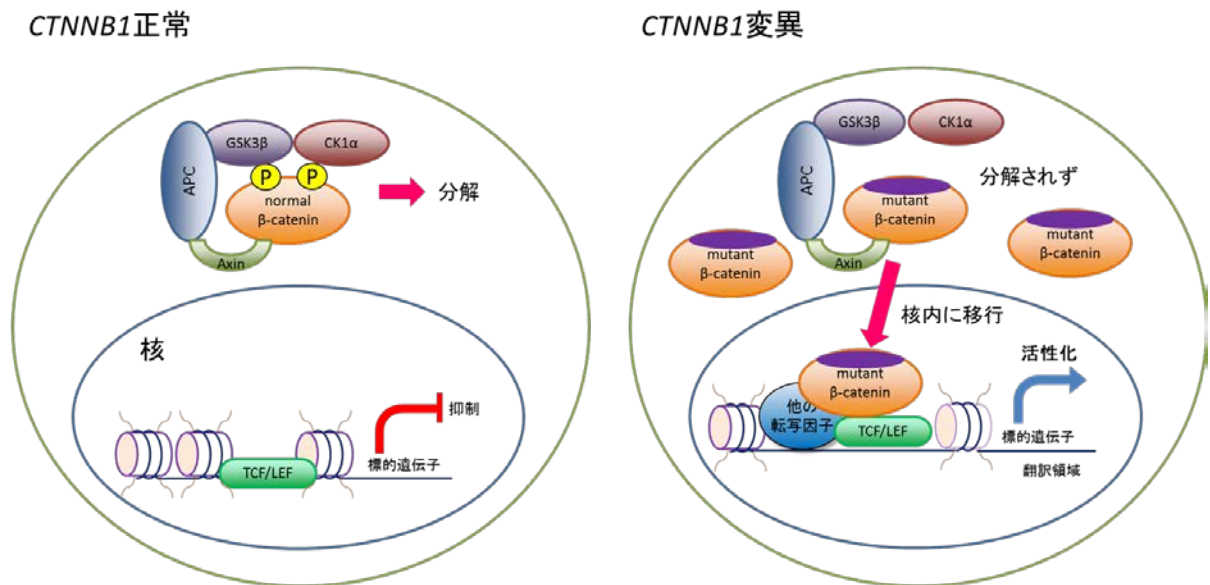


図 23 CTNNB1 の体細胞突然変異と β -catenin の蓄積

- (a) β -catenin のリン酸化部位とその付近の変異の分布。COSMIC データベースにある CTNNB1 の変異の分布でのホットスポットに本研究で用いた症例 (症例 3,4) も変異があることが確認されている。
- (b) 正常、癌での β -catenin の分解と蓄積。癌ではリン酸化部位に変異の入った β -catenin が蓄積して核内に移行して、TCF/LEF と結合の上、その標的遺伝子を活性化する

表1 H3K27ac および H3K27me3 の発現と肝細胞癌における臨床病理学的因子との相関

臨床病理学的特徴	全症例	H3K27ac		P 値	H3K27me3		P 値
		低	高		低	高	
全症例	198	95	103		98	100	
年齢 (歳)				0.449			0.762
≤ 60	64	28	36		33	31	
> 60	134	67	67		65	69	
性別				0.739			0.615
男性	152	74	78		77	75	
女性	46	21	25		21	25	
HBs 抗原				0.615			0.926
陽性	45	20	25		22	23	
陰性	153	75	78		76	77	
HCV 抗体				0.763			0.453
陽性	132	62	70		68	64	
陰性	66	33	33		30	36	
背景肝の肝硬変				0.252			0.984
あり	113	50	63		56	57	
なし	85	45	40		42	43	
病理学的病期				0.328			0.074
ステージ 1	18	10	8		11	7	
ステージ 2	86	40	46		49	37	
ステージ 3	74	32	42		28	46	
ステージ 4a	20	13	7		10	10	
最大腫瘍径 (mm)				0.150			0.634
≤ 50	144	74	70		73	71	
> 50	54	21	33		25	29	
組織学的分化度				0.015*			0.004*
高分化	52	32	20		33	19	
中分化	115	54	61		57	58	
低分化	31	9	22		8	23	
腫瘍数				0.911			0.882
1	130	62	68		65	65	
≥ 2	68	33	35		33	35	
脈管侵襲				0.544			0.010*
あり	64	33	31		23	41	
なし	134	62	72		75	59	

表2 H3K27 修飾と肝細胞癌における臨床病理学的因子の相関

臨床病理学的因子	症例数	H3K27 修飾				P 値
		低 ac/ 低 me3	高 ac/ 低 me3	低 ac/ 高 me3	高 ac/ 高 me3	
全症例	198	49	49	46	54	
年齢 (歳)						0.763
≤ 60	64	16	17	12	19	
> 60	134	33	32	34	35	
性別						0.809
男性	152	40	37	34	41	
女性	46	9	12	12	13	
HBs 抗原						0.896
陽性	45	11	11	9	14	
陰性	153	38	38	37	40	
HCV 抗体						0.428
陽性	132	31	37	31	33	
陰性	66	18	12	15	21	
背景肝の肝硬変						0.405
あり	113	28	28	22	35	
なし	85	21	21	24	19	
病理学的病期						0.195
ステージ 1	18	5	6	5	2	
ステージ 2	86	24	25	16	21	
ステージ 3	74	14	14	18	28	
ステージ 4a	20	6	4	7	3	
最大腫瘍径 (mm)						0.354
≤ 50	144	40	33	34	37	
> 50	54	9	16	12	17	
組織学的分化度						0.003*
高分化	52	19	14	13	6	
中分化	115	27	30	27	31	
低分化	31	3	5	6	17	
腫瘍数						0.584
1	130	30	35	32	33	
≥ 2	68	19	14	14	21	
脈管侵襲						0.052
あり	64	12	11	21	20	
なし	134	37	38	25	34	

表 3 H3K27 修飾と分子的な特徴との相関

分子的な特徴	症例数	H3K27 修飾				P 値
		低 ac/ 低 me3	高 ac/ 低 me3	低 ac/ 高 me3	高 ac/ 高 me3	
全症例	198	49	49	46	54	
p53						0.032*
陽性	50	9	10	9	22	
陰性	148	40	39	37	32	
CTNNB						0.302
陽性	43	11	7	9	16	
陰性	155	38	42	37	38	

表 4 H3K27 修飾と患者アウトカム (単変量解析)

	全生存			無再発生存		
	ハザード比	95% 信頼区間	P 値	ハザード比	95% 信頼区間	P 値
年齢 >60 歳 (対 ≤60)	1.378	0.955 - 1.988	0.087	1.247	0.902 - 1.724	0.182
性別 女性 (対 男性)	1.255	0.863 - 1.827	0.235	1.034	0.729 - 1.468	0.851
HBs 抗原陽性 (対 陰性)	0.951	0.632 - 1.432	0.811	1.065	0.741 - 1.533	0.733
HCV 抗体陽性 (対 陰性)	1.204	0.84 - 1.727	0.312	1.233	0.893 - 1.704	0.204
肝硬変あり (対 なし)	1.804	1.275 - 2.554	< 0.001*	1.529	1.127 - 2.075	0.006
病理学的病期			< 0.001*			< 0.001*
ステージ 2 (対 ステージ 1)	1.948	0.885 - 4.289	0.098	1.334	0.75 - 2.374	0.327
ステージ 3 (対 ステージ 1)	4.683	2.131 - 10.29	< 0.001*	3.281	1.838 - 5.857	< 0.001*
ステージ 4 (対 ステージ 1)	6.286	2.644 - 14.94	< 0.001*	3.543	1.778 - 7.061	< 0.001*
最大腫瘍径 >50 mm (対 ≤50)	1.517	1.06 - 2.173	0.023*	1.691	1.217 - 2.349	0.002*
組織学的分化度			0.011*			0.011*
中分化 (対 高分化)	1.149	0.769 - 1.716	0.497	1.146	0.803 - 1.635	0.453
低分化 (対 高分化)	2.186	1.309 - 3.649	0.004*	2.009	1.261 - 3.2	0.003*
腫瘍数 ≥2 (対 1)	2.219	1.58 - 3.114	< 0.001*	1.985	1.451 - 2.717	< 0.001*
脈管侵襲 陽性 (対 陰性)	2.592	1.843 - 3.644	< 0.001*	2.587	1.887 - 3.548	< 0.001*
p53 陽性 (対 陰性)	1.516	1.053 - 2.183	0.025*	1.502	1.072 - 2.104	0.018*
CTNNB 陽性 (対 陰性)	1.343	0.909 - 1.986	0.139	1.345	0.942 - 1.92	0.103
H3K27 修飾			0.023*			0.040*
高 ac/低 me3 (対 低 ac/低 me3)	1.347	0.82 - 2.213	0.239	1.275	0.822 - 1.98	0.278
低 ac/高 me3 (対 低 ac/低 me3)	1.519	0.924 - 2.499	0.099	1.537	0.986 - 2.395	0.058
高 ac/高 me3 (対 低 ac/低 me3)	2.054	1.285 - 3.284	0.003*	1.823	1.186 - 2.802	0.006*

表 5 H3K27 修飾と患者アウトカム (多変量解析)

	全生存			無再発生存		
	ハザード比	95% 信頼区間	P 値	ハザード比	95% 信頼区間	P 値
肝硬変あり (対 なし)	1.877	1.300 - 2.711	< 0.001*	1.812	1.301 - 2.523	< 0.001*
最大腫瘍径 >50 mm (対 ≤50)	1.295	0.854 - 1.961	0.223	1.502	1.028 - 2.195	0.036*
組織学的分化度			0.325			0.113
中分化 (対 高分化)	0.800	0.516 - 1.242	0.320	0.805	0.544 - 1.191	0.278
低分化 (対 高分化)	1.335	0.732 - 2.434	0.346	1.266	0.733 - 2.186	0.398
腫瘍数 ≥2 (対 1)	2.123	1.464 - 3.078	< 0.001*	1.771	1.261 - 2.489	< 0.001*
脈管侵襲 陽性 (対 陰性)	2.212	1.495 - 3.274	< 0.001*	2.224	1.540 - 3.210	< 0.001*
p53 陽性 (対 陰性)	1.052	0.697 - 1.588	0.808	1.235	0.850 - 1.795	0.267
H3K27 修飾			0.149			0.683
高 ac/低 me3 (対 低 ac/低 me3)	1.499	0.902 - 2.490	0.118	1.270	0.809 - 1.994	0.299
低 ac/高 me3 (対 低 ac/低 me3)	1.573	0.922 - 2.681	0.096	1.261	0.789 - 2.016	0.332
高 ac/高 me3 (対 低 ac/低 me3)	1.753	1.049 - 2.932	0.032*	1.282	0.797 - 2.063	0.305

表 6 癌・非癌部共通でエンハンサー領域に共局在する HNF4A・FOXA1 によって制御されている遺伝子候補リスト

ABHD2	CPEB4	GFOD2	MCFD2	RAI14	TMEM9
ACAA1	CRY2	GFRA1	MED29	RBM33	TNFRSF1A
ACSL3	CSNK1D	GJB1	MIA3	RBM47	TNS1
ACTN1	CUX1	GOLT1A	MKNK2	RELA	TOB1
ADCK3	CYB5A	GPI	MLLT1	RFK	TRAP1
ADM	CYTH1	GPRC5C	MLXIP	RHOBTB3	TRIB3
AGT	DCUN1D4	HABP4	MPRIP	RHOU	TTI1
AKR1C3	DDX19A	HECTD1	MRPL48	ROCK1	UBC
ALB	DSP	HHEX	MTUS1	RPS10	UBE2H
ALG8	DST	HIPK2	MYH9	RREB1	UGP2
ANXA2	DUSP1	HLA-E	MYLK	SDC4	UNG
AP2A2	EBLN2	HNF4A	NCOA3	SEMA4B	VAV2
AQP7	EEF2K	HS1BP3	NDRG1	SERPINA3	VPS52
ARHGAP12	EML4	IER2	NDST1	SERPINF2	WDR59
ARHGAP5	ENC1	IL6ST	NES	SERTAD2	WSB1
ARL4C	ENO1	INHBE	NEURL1B	SH3BP4	XBP1
ATP5H	EPAS1	IP6K2	NFE2L1	SLC17A9	YPEL2
ATXN10	EPDR1	IRF2	NFIC	SLC22A23	ZC3H7B
AZIN1	ERGIC1	IRF2BPL	NRIP1	SLC23A2	ZFAND2A
BCL2L1	ERRFI1	KANK1	ONECUT1	SLC25A33	ZFAND3
BHLHE40	F11R	KIAA0930	OXNAD1	SLC9A8	ZFP36
BTN2A1	FAM20A	KLF13	PACSIN3	SMAD3	ZFP36L1
C10orf11	FAM45B	KLF6	PARN	SPEN	ZKSCAN1
C19orf12	FBRS	KLF9	PCBD2	SPG7	ZMIZ1
C1orf85	FBXO31	KPNA2	PCSK6	SREBF1	ZNF131
C20orf7	FBXO7	KRAS	PDE4DIP	STARD13	ZNF217
C22orf13	FGG	KRT18	PGCP	STK24	ZNF445
C5AR1	FGL2	LACTB	PHLDA1	STRN3	
C5orf27	FKBP5	LBR	PHYHD1	TARBP1	
C8B	FLNB	LDHA	PLCG2	TBC1D8	
CAST	FNDC3B	LOC284751	PLIN2	TBL1XR1	
CEBPD	FRG1B	LPP	PPARG	TEAD1	
CENPC1	FTH1	LRP3	PPP2R1B	THRB	
CHD1L	GADD45B	LYRM4	PSMA6	TLE1	
CHDH	GALNT2	MACF1	PSMD14	TM2D3	
COLEC11	GANC	MAF	RAB11A	TMCO7	
COPG	GCLC	MAP3K14	RAB4A	TMEM127	

表7 癌・非癌部に共通してエンハンサー領域に共局在する HNF4A・FOXA1 によって制御されている候補遺伝子の遺伝子オンロジー解析

遺伝子オンロジー用語	遺伝子数	P 値	含まれる遺伝子
positive regulation of transcription, DNA-dependent	22	2.54E-07	SREBF1, MAF, KLF6, TBL1XR1, PCBD2, THRБ, EPAS1, KLF13, STRN3, RELА, PPARG, SMAD3, TEAD1, NRIP1, TNFRSF1A, HHEX, HNF4A, NCOA3, ZMIZ1, HIPK2, NFIC, SERTAD2
positive regulation of RNA metabolic process	22	2.91E-07	SREBF1, MAF, KLF6, TBL1XR1, PCBD2, THRБ, EPAS1, KLF13, STRN3, RELА, PPARG, SMAD3, TEAD1, NRIP1, TNFRSF1A, HHEX, HNF4A, NCOA3, ZMIZ1, HIPK2, NFIC, SERTAD2
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	19	4.81E-07	MAF, SREBF1, KLF6, TBL1XR1, THRБ, EPAS1, KLF13, STRN3, RELА, PPARG, SMAD3, TEAD1, NRIP1, TNFRSF1A, HHEX, HNF4A, ZMIZ1, HIPK2, NFIC
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	27	4.97E-07	ONECUT1, THRБ, PPARG, TNFRSF1A, ENO1, MAF, SREBF1, KLF6, TBL1XR1, KLF9, EPAS1, KLF13, RELА, STRN3, TEAD1, SMAD3, TLE1, SPEN, NRIP1, TARBP1, HHEX, HNF4A, ZMIZ1, HIPK2, IRF2, CUX1, NFIC
positive regulation of transcription	23	1.00E-06	SREBF1, MAF, KLF6, TBL1XR1, PCBD2, THRБ, EPAS1, KLF13, STRN3, RELА, PPARG, SMAD3, TEAD1, NRIP1, TNFRSF1A, HHEX, HNF4A, NCOA3, ZMIZ1, HIPK2, UBC, NFIC, SERTAD2
positive regulation of macromolecule metabolic process	29	1.05E-06	GCLC, THRБ, IL6ST, PPARG, TNFRSF1A, PACSIN3, AGT, SERTAD2, MAF, SREBF1, TBL1XR1, KLF6, PCBD2, EPAS1, KLF13, RELА, STRN3, SMAD3, TEAD1, NRIP1, HHEX, PSMD14, PSMA6, HNF4A, NCOA3, ZMIZ1, HIPK2, UBC, NFIC
positive regulation of gene expression	23	1.64E-06	SREBF1, MAF, KLF6, TBL1XR1, PCBD2, THRБ, EPAS1, KLF13, STRN3, RELА, PPARG, SMAD3, TEAD1, NRIP1, TNFRSF1A, HHEX, HNF4A, NCOA3, ZMIZ1, HIPK2, UBC, NFIC, SERTAD2
positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	23	5.23E-06	SREBF1, MAF, KLF6, TBL1XR1, PCBD2, THRБ, EPAS1, KLF13, STRN3, RELА, PPARG, SMAD3, TEAD1, NRIP1, TNFRSF1A, HHEX, HNF4A, NCOA3, ZMIZ1, HIPK2, UBC, NFIC, SERTAD2
positive regulation of cellular biosynthetic process	24	7.00E-06	SREBF1, MAF, KLF6, TBL1XR1, PCBD2, THRБ, EPAS1, KLF13, STRN3, RELА, PPARG, SMAD3, TEAD1, NRIP1, TNFRSF1A, HHEX, HNF4A, NCOA3, ZMIZ1, AGT, HIPK2, UBC, NFIC, SERTAD2

表 8. *CTNNB1* 変異症例で癌特異的 FAIRE ピークに *CTNNB*、*HNF4A*、*FOXA1* が見られ、癌での発現上昇が確認された遺伝子

症例 3		症例 4	
ARL4A	LYPLAL1	AKIRIN2	SMAD3
AXIN2	MYH9	ATE1	SMURF2
BCL2L1	NDUFC2	AXIN2	SNTB1
CMIP	PARP11	BMP4	STK39
CPLX2	RFC3	CPLX2	STT3B
DLG5	RHBG	DLG5	TCF7L2
DSP	SAMD4A	ELOVL5	TLR5
EEF1E1	SEMA3F	FAM169A	TNS3
FAM105B	SMYD2	FAM50B	UPF1
FAM178A	STARD13	FEZ2	USP7
FAM50B	STRA13	IFNGR1	ZNRF3
HIST1H4H	STT3B	ISM1	
HLF	TBX4	NOTUM	
IRS1	TCF7L2	RHBG	
KLHDC4	UGGT1	ROCK2	
LAMC1	UGP2	RYK	
LITAF	USP7	SAMD4A	
LOH12CR1	ZNRF3	SEMA3F	