

論文の内容の要旨

論文題目 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

要旨

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。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。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。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）や、調節する酵素（editor）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、癌の新たな治療標的としても注目されている。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、制御異常が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。

本研究では、まず、肝細胞癌臨床組織におけるヒストン修飾状態の定量的評価と臨床病理学的特徴を解析した。ヒストン修飾は、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。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。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。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。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 のグローバルなタンパク発現を H3K27me3 のタンパク発現の関連と共に免疫組織化学的に評価した。この際、近年開発されたバーチャル・スライドや画像解析ソフトを用いて、定量的評価を目指した。その結果、H3K27ac や H3K27me3 とも癌部において、そのタンパク発現が上昇していることを見出した。また、癌部において H3K27ac・H3K27me3 とも高発現している症例は、p53 の核内集積や脱分化と関連しており、予後不良であることが示された。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、その分布が異なることが示された。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。p53 の核内集積と p53 変異には相関があるとされ、H3K27ac の writer である p300 や H3K27me3 の writer である EZH2 と p53 変異との関連については、いくつかの癌で報告されている。既報からは、変異 p53 は H3K27ac と H3K27me3 のグローバルな修飾レベルを同時に活性化する可能性があると考えられたが、その詳細なメカニズムは不明な部分が多く、今後検討していく必要があると考えられた。また、H3K27ac がエンハンサーとしての作用を有する一方で、H3K27me3 はサイレンサーとしての作用を有している。肝細胞癌においては、増殖・浸潤関連の遺伝子が発現上昇し、アポトーシス・分化関連の遺伝子が発現低下しており、これらの修飾のエンハンサーやサイレンサーとしての役割を考えると、H3K27ac は増殖・浸潤関連の遺伝子周囲に、H3K27me3 はアポトーシス・分化関連の遺伝子周囲にあると予想された。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。この際、次世代シーケンサーを併用した H3K27ac の ChIP-seq および FAIRE-seq による解析を試みた。まず、クライオスタット薄切破砕固定法により、OCT コ

ンパウンド包埋凍結組織サンプルより、安定して H3K27ac の ChIP-seq および FAIRE-seq を行えるプロトコルを確立した。そして、同手法により、約 30000 前後の H3K27 ピーク、FAIRE ピークを同定し、FAIRE ピーク周囲に二峰性に H3K27ac のピークがあることを確認した。また、これらのピークのうち、癌特異的・非癌部特異的なピークは、主にエンハンサー領域に集中していることを見出した。また、癌特異的なエンハンサー領域に分布するヌクレオソーム・フリー領域のモチーフ解析からは、HNF4a や FOXA1 のモチーフが確認され、CTNNB1 変異症例では TCF/LEF のモチーフが確認された。CTNNB 変異細胞株である HepG2 の CTNNB、HNF4a、FOXA1 の結合領域は、癌特異的なエンハンサー領域の FAIRE ピークと少なからず一致した。

これらの結果により、*in vivo* での肝細胞癌における癌化メカニズムをエピゲノムの観点から見出した。特に、通常、病院などで行われている凍結方法のサンプルを用いて、ChIP-seq や FAIRE-seq などを行える解析手法を確立できたことは大きい。本研究で得られたメカニズムを証明するには、さらなる追加実験が必要であるが、これらの解析手法は、予後不良である肝細胞癌、あるいは他の癌腫における新たな治療標的のスクリーニングに貢献すると考える。