

審査の結果の要旨

林 玲 匡

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、肝細胞癌を含む様々な癌において、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。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。

1. 肝細胞癌におけるヒストン修飾異常は予後不良群の指標

まず、ホルマリン固定パラフィン包埋サンプルを用いて、ヒストン H3 リジン 27 のアセチル化 (H3K27ac) およびヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) のグローバルな修飾レベルを免疫組織化学的に定量評価した。これは、H3K27ac および H3K27me3 のモノクローナル抗体を用いて自動染色装置で染色したスライドを、バーチャルスライドに取り込んでデジタル画像化し、解析ソフトを用いて修飾レベルをスコア化するという手法である。その結果、非癌部と比較して、癌部で H3K27ac および H3K27me3 の修飾レベルは有意に高く、癌部で H3K27ac・H3K27me3 双方の修飾レベルが高い群は、p53 陽性を示す低分化な癌が多く、予後不良であることを発見した。

2. 肝癌組織を用いたゲノムワイドなエピゲノム異常解析方法の確立

次に、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。今回新規に開発したクライオスタット薄切粉砕法を用いることで、H3K27ac の *in vivo* ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by next generation sequencing) および *in vivo* FAIRE-seq (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements followed by next generation sequencing) の新規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 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。FFPE サンプルを用いた免疫組織化学的定量的ヒスト

ン修飾レベル解析は、今後エピゲノムの観点から予後や薬剤感受性を評価に有用であると考えられる。また、新規に開発した薄切粉碎破砕固定法により、結臨床手術検体で ChIP-seq や FAIRE-seq などの網羅的解析が可能になった。

これらの解析手法は、肝細胞癌のみならず各種固形癌におけるエピゲノム異常や転写制御異常の解明にも有用であると考え、学位の授与に値するものと考えられる。