

# 学位論文抄録

肝細胞癌におけるヒト TNF/LT 遺伝子座の高次クロマチン変換と  
遺伝子制御

(Spatiotemporal regulation of higher-order chromatin and gene expression  
in human TNF/LT locus in hepatocellular carcinoma cells)

渡邊 丈久

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器内科学

指導教員

佐々木 裕 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻消化器内科学

中尾 光善 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻細胞医学

## 学位論文抄録

【目的】細胞の炎症応答は、一連の遺伝子発現プログラムで実行されている。TNF/LT $\alpha$ /LT $\beta$ のサイトカインは炎症・組織修復や腫瘍化に関わっており、これらの遺伝子は *TNF/LT* 遺伝子座に位置して NF- $\kappa$ B 経路で調節されている。このような遺伝子クラスターでは、プロモーター、エンハンサー、インスレーター（クロマチンの境界）が重要な役割を果たすことが判明してきたが、ヒト *TNF/LT* 遺伝子座における転写調節と高次クロマチンの制御については不明である。本論文では、炎症と腫瘍化が強く関連する肝細胞において、インスレーターと高次クロマチン構造に関わる CCCTC-binding factor (CTCF) が *TNF/LT* 遺伝子座の制御に果たす役割、炎症応答における *TNF/LT* 遺伝子座の3次元のクロマチン構造の変換を明らかにすることを目的とした。

【方法】クロマチン免疫沈降-DNA チップ/シーケンスの解析データに基づいて、*TNF/LT* 遺伝子座での CTCF 集積部位 (TC) を同定した。ヒト肝臓由来の細胞株 (Hep3B と NeHepLxHT) を用いて、TNF 刺激で NF- $\kappa$ B 経路を活性化した。*TNF/LT* 遺伝子群の発現を定量 RT-PCR 等で解析し、CTCF 等の結合をクロマチン免疫沈降法で調べた。CTCF に対する RNA 干渉法を用いて、*TNF/LT* 遺伝子群の発現状況を検討し、ルシフェラーゼ・レポーター法による CTCF の機能解析、エンハンサーの同定を行った。Chromosome Conformation Capture (3C) 法を用いて、同遺伝子座におけるクロマチン構造について解析した。さらに、肝細胞癌の免疫組織染色法によって TNF と LT $\beta$  の発現を調べた。

【結果】*TNF/LT* 遺伝子座にエンハンサー遮断活性をもつ4つの CTCF 集積部位 (TC1~TC4)、TNF 刺激応答性のエンハンサー (TE2) を見出した。そのうち TC3 は、NF- $\kappa$ B 経路で早期に活性化される LT $\alpha$ /*TNF* プロモーターと TE2 を含むドメイン、遅れて活性化される LT $\beta$  プロモーターを含むドメインの間に位置してクロマチン境界と考えられた。CTCF をノックダウンした Hep3B 細胞では、*TNF* の発現は低下し、他方、LT $\beta$  の発現は増加した。3C 法では、TNF 刺激の後、最初に *TNF/LT* 遺伝子座全体が収縮して、TE2 と LT $\alpha$ /*TNF* プロモーターが相互作用した。その後遺伝子座全体が弛緩し、TE2 と LT $\beta$  プロモーターが相互作用していた。肝細胞癌組織で TNF のみ陽性、TNF/LT $\beta$  の共陽性は認めしたが、LT $\beta$  のみ陽性の症例はなかった。

【考察】CTCF は、*TNF/LT* 遺伝子座の転写調節とともに、高次クロマチン構造の時空間的な変換に関与することが明らかになった。肝細胞における NF- $\kappa$ B 経路の活性化に伴い、インスレーターの相互作用でクロマチン構造の収縮、その後の弛緩が調節されて、エンハンサーとプロモーターの選択性がなされている可能性が示唆された。

【結論】CTCF は、炎症刺激を受けた肝細胞において *TNF/LT* 遺伝子座の発現調節と高次クロマチンの時空間制御に関与することが明らかになった。また、*TNF/LT* 遺伝子座の CTCF 依存性の高次クロマチン構造が炎症応答を特徴づける可能性を示唆する。これらの解析法および高次クロマチン構造は、新しい細胞識別法としての応用が期待できる。