

平成21年 5月13日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590340
 研究課題名（和文） 転写因子GATAのエピジェネティックな異常と胃がんの臨床病理学的諸性状との関連
 研究課題名（英文） Epigenetic alterations of GATA transcription factor genes in gastric cancers
 研究代表者
 秋山 好光（AKIYOSHI YOSHIMITSU）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
 研究者番号：80262187

研究成果の概要：

発生・分化に関与するGATA転写因子は6種類が単離されている。GATA4とGATA5はがん細胞でメチル化異常が見つかったが、それらの異常と発がんとの関連性は不明である。本研究では、胃がんにおけるGATA4/5のメチル化および機能的役割について解析した。GATA4/5のメチル化異常は胃がん細胞のみならず、がん組織でも見つかった。またGATAの強制発現実験により、いくつかのがん抑制遺伝子の発現が変化し、細胞増殖抑制も起こった。以上、GATA4/5のメチル化による発現消失は胃がんの発症において重要と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理、メチル化、GATA転写因子、胃がん

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現制御機構には“DNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現に関する情報”としてエピジェネティックなメカニズムの関与が知られている。エピジェネティックな変化はDNAメチル化に加え、ヒストンアセチル化とメチル化、およびクロマチン再構築による総和的で複雑なものである。これまで細胞

のがん化の要因として、遺伝子突然変異や染色体欠失の蓄積などジェネティックな異常が考えられてきたが、これだけでは多段階発がん過程の全体像をいまだ十分に説明できなかった。近年、遺伝子プロモーター領域のCpGアイランドにおけるDNAメチル化異常が複数の腫瘍で見つかり、エピジェネティックな異常は発がんにおいて重要な役割を果た

すことが明らかとなった。

発生・分化に関する転写因子GATAはGATA結合配列(WGATAR)をプロモーター領域にもつ様々な遺伝子に結合して、それら下流の遺伝子発現を制御している。GATAはこれまでに6種類(GATA1~6)が単離され、GATA1~3は血液系細胞で、GATA4~6は主に消化管や心臓で特異的に発現していることが報告されている。GATA1/2/3と血液系細胞の分化・がん化の関係は国内外で調べられているが、GATA4/5/6の消化管細胞の発生・分化に関する研究は少なく、特にGATA5の機能解析は殆どない。

GATAと発がんとの関係では、GATA異常として突然変異やDNAメチル化異常が報告されている。例えば、ダウン症候群患者における急性巨核球性白血病ではGATA1の突然変異が多く、一部の乳がんではGATA3の突然変異が見つかっている。我々は、胃がん、大腸がん、肺がんおよび卵巣がんでGATA4/5発現の低下や消失が起こっていることを明らかにし、その原因の一つはGATA4/5のメチル化異常が関与していることを報告した。これまでの研究により、trefoil factor 1 (TFF1)などのがん抑制遺伝子やムチン(Muc2, 3A/B, 4)、ペプシノーゲンなどの分化関連遺伝子がGATAの標的遺伝子の一つであることがわかっているが、その数は少ない。従って、GATA4/5の機能を明らかにするには、それらの標的遺伝子の網羅的解析が重要と考えられる。

以上のように、がんの発症においてGATAの異常がどのような役割を果たしているのかは不明な点が多い。

2. 研究の目的

GATA4/5のメチル化異常は様々ながん検出されている。GATAは転写因子なので、もしメチル化を受けて発現低下または消失すると、その下流の様々な標的遺伝子の発現にも影響を及ぼし、その結果、がんの増殖・進展に繋がることが推測される。

GATA4/5発現は心臓や消化管で強く発現していることが知られている。我々の研究では、GATA4/5発現は胃がん細胞で低下していることがわかった。本研究は、GATAの発がんへの関与を明らかにすることである。そこで、胃がんを対象とし、GATA4/5のメチル化とがんの臨床病学的諸性状との関連を調べる。更に、GATA4/5の機能的役割について解明する。

3. 研究の方法

(1) 胃がんにおけるGATAメチル化解析

胃がん細胞株7例(MKN7, MKN45, MKN74, KATO-III, NUGC3, NUGC4, AGS)を用いた。GATA4/5/6のメチル化は、メチル化特異的PCR(MSP)で判定した。

インフォームドコンセントが得られた胃

がん組織77例を対象とした。これら胃がん組織の多くはホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、MSP解析した。GATA4/5の異常と胃がんの臨床病学的諸性状との関連性を調べた。

(2) GATA4/5強制発現

GATA4/5のコード領域をRT-PCRで増幅し、pcDNA系発現ベクターに組み込んだ。更に、両者のアデノウイルス発現ベクターを構築した。それら発現ベクターを胃がん細胞へtransfection(または感染)させ、GATA4/5強制発現後の、細胞増殖やアポトーシスを調べた。更に、GATA強制発現後に変化した下流遺伝子を網羅的にマイクロアレイ法で調べた。

(3) GATA4/5のノックダウン

siRNAを用いて、GATA4/5をそれぞれノックダウンした。(2)で明らかになったGATA下流遺伝子の発現について、RNA干渉後の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 胃がんにおけるGATAメチル化異常

非がん部胃粘膜上皮では、GATA4/5/6発現は陽性であり、メチル化は認められなかった。また、腸上皮化生粘膜上皮の有無に関わらず、GATA4/5のメチル化は認められなかった。

一方、胃がん培養細胞株におけるGATA4/5/6の発現とMSP解析の結果、GATA4は1例(MKN74)、GATA5は2例(MKN74とKATO-III)でメチル化陽性であった(図1)。

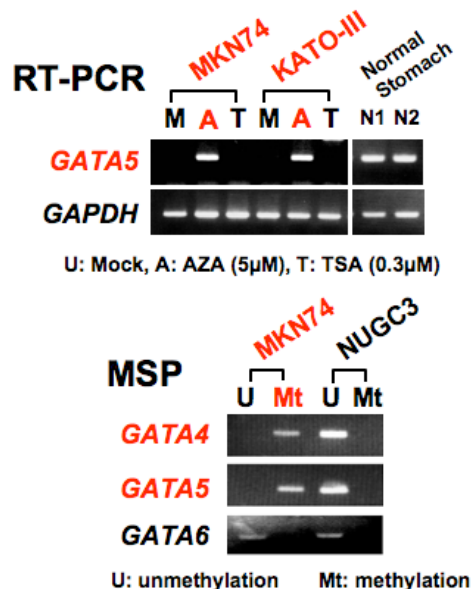


図1 胃がん細胞株におけるGATA4/5/6のメチル化と発現解析

GATAのメチル化陽性細胞株では、遺伝子発

現は陰性であった。一方、GATA6 は全例で発現陽性であり、メチル化は認められなかった。

GATA4/5 のメチル化はそれぞれ胃がん組織 77 例中 10 例 (13.0%) と 30 例 (39.0%) であり、GATA5 の異常頻度は GATA4 よりも有意に高かった ($P=0.0002$) (図 2)。GATA5 は早期がん (11/28)、進行がん (19/49) とともに約 40% がメチル化陽性であった。一方、GATA4 のメチル化は進行がん (10/49) でのみ検出され、深達度に関連性が認められた。GATA4 メチル化陽性がんはリンパ節転移陽性例が多い傾向が認められた ($P=0.06$)。GATA のメチル化異常と他の臨床病理学的諸性状との関連性は認められなかった。

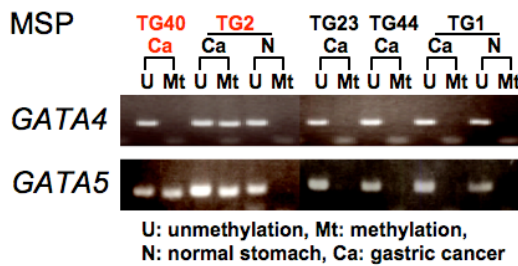


図2 胃がん組織におけるGATA4/5のメチル化

次に、胃がんの症例数を増やし、GATA5 とその他複数のがん関連遺伝子 (p16, CDX2, BMP2, CACNA2D3 など) のメチル化と胃がん患者の生活習慣との関連性を調べた。喫煙歴、食生活、運動量などの生活習慣については患者よりアンケート調査を行った。GATA5 のメチル化異常と生活習慣との関連性は認められなかったが、CDX2、BMP2 のメチル化はお茶の摂取量と逆相関した。

(2) GATA4/5 強制発現下での細胞形態変化の観察と細胞周期・アポトーシスの変化

RT-PCR 解析の結果、MKN74 は GATA4/5 発現陰性で、KATO-III は GATA5 発現陰性であった。そこで、これら 2 つのがん細胞に GATA4/5 を強制発現させ、以下の実験を行った。まず、MKN74 細胞に GATA4/5 を強制発現させたところ、細胞増殖抑制効果が認められた。更にコロニーフォーメーション解析を行った結果、GATA4/5 強制発現により、コロニー形成能が低下した (図 3)。GATA 強制発現後の MKN74 細胞ではアポトーシスを示す変化は認められなかった。

次に、アデノウイルス発現ベクターを用いて GATA 発現陰性細胞へ GATA4/5 を強制発現させた。このベクターは GFP を含むため、感染効率 (発現陽性細胞) を顕微鏡下で簡単に観察できる利点がある (図 4)。GATA4/5 強制発現させた MKN74 と GATA5 強制発現させた KATO-III 細胞を用いて、マイク

ロアレイ解析を行った。コントロールは β -

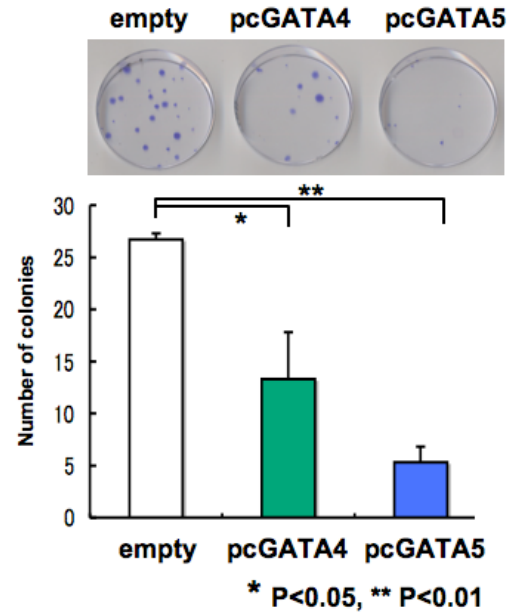


図3 コロニーフォーメーション解析

ラクトシダーゼを入れたベクターを用いた。その結果、約 70 個の遺伝子が少なくとも一方の細胞株で 4 倍以上の発現亢進が認められた。その中には、胃細胞の分化マーカーの一つである Pepsinogen A やがん抑制遺伝子的な機能を持つ TFF1 や Dsiabled-2 遺伝子が含まれていた。また、MKN74 細胞における GATA4/5 の標的遺伝子は良く似ていた。

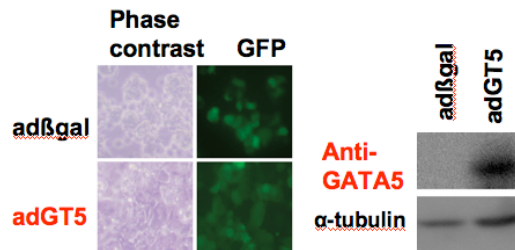


図4 MKN74胃がん細胞へのアデノウイルスGATA5感染

(3) GATA4/5 標的遺伝子の解析

マイクロアレイで検出された GATA4/5 の標的遺伝子について、RT-PCR 法で確認した。まず、GATA 強制発現後の MKN74 と KATO-III 細胞を用いて、候補標的遺伝子から複数のがん関連遺伝子を選んで、それらの発現を調べた (図 5)。その結果、Pepsinogen A は GATA5 によって発現亢進し、TFF1 や Dsiabled-2 遺伝子は GATA4/5 の両方の標的遺伝子であることがわかった。

GATA を機能阻害することは GATA の生理的役割を知る上で重要である。そこで GATA4/5 発現が共に陽性の AGS と HSC43 細胞を対象と

し、GATA4/5 の siRNA をトランスフェクションした。RT-PCR の結果、これら細胞では GATA4/5 発現が低下し、さらに上記の遺伝子の発現も低下した。

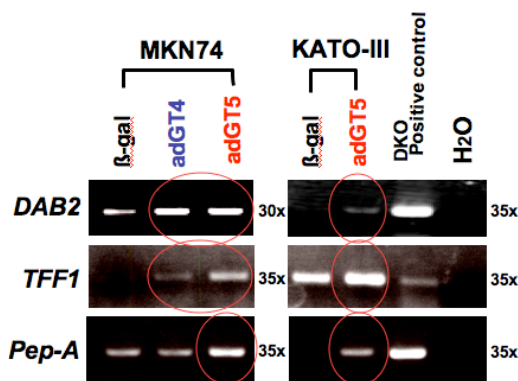


図5 GATA4/5強制発現後の標的遺伝子変化

以上より、GATA4/5 は細胞増殖の抑制に関わり、両者の機能は似ていると考えられる。GATA4/5 の下流標的遺伝子には、分化関連やがん抑制遺伝子的なものが存在しており、GATA4/5 はその発現を正に制御していることが示唆された。GATA4/5 の発現異常はそれら下流遺伝子の発現に影響を及ぼし、その総和的な異常が胃がんの発症に関与すると推測された。

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 8 件)

- ① Hellebrekers DMEI, Lentjes, MHFM, van den Bosch SM, Akiyama Y (9 番目), 他 18 名. GATA4 and GATA5 are potential tumor suppressors and biomarkers in colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, 2009, in press. (査読有)
- ② Yuasa Y, Nagasaki H, Akiyama Y (3 番目), 他 6 名. DNA methylation status is inversely correlated with green tea intake and physical activity in gastric cancer patients. **International Journal of Cancer**, 124, p2677-2682, 2009. (査読有)
- ③ Wanajo A, Sasaki A, Nagasaki H, Shimada S, Otsubo T, Owaki S, Shimizu Y, Eishi Y, Kojima K, Nakajima Y, Kawano T, Yuasa Y & Akiyama Y: Methylation of the calcium channel-related gene, *CACNA2D3*, is frequent and a poor prognostic factor in gastric cancer. **Gastroenterology**, 135, p580-590, 2008. (査読有)
- ④ 秋山好光, 湯浅保仁. miRNA 発現プロファ

イル解析による癌に診断への応用. 実験医学, 26, p173-178, 2008. (査読無)

⑤ Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K & Yuasa Y: SOX2 is frequently down-regulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell cycle arrest and apoptosis. **British Journal of Cancer**, 98, p824-831, 2008. (査読有)

⑥ Jin S-H, Akiyama Y, Fukamachi H, Yanagihara K, Akashi T & Yuasa Y: IQGAP2 inactivation through aberrant promoter methylation and promotion of invasion in gastric cancer cells. **International Journal of Cancer**, 122, p1040-1046, 2008. (査読有)

⑦ Tani Y, Akiyama Y, Fukamachi H, Yanagihara K & Yuasa Y: Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 133, p263-269, 2007. (査読有)

⑧ Jinawath A, Akiyama Y, Sripa B & Yuasa Y: Dual blockade of the Hedgehog and ERK1/2 pathways coordinately decreases proliferation and survival of cholangiocarcinoma cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 133, p271-278, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① Akiyama Y, 他. Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis. 9th Korea-Japan Symposium on Cancer and Ageing Research. 2009年3月12日, Damyang, 韓国.
- ② 秋山好光, 他. 胃がんにおける転写関連遺伝子 GATA4/5 のメチル化異常と機能解析. BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 2008年12月12日, 神戸.
- ③ 秋山好光, 他. 胃がん細胞における転写因子 GATA5 の標的遺伝子の解析. 第67回日本癌学会総会, 2008年10月28日, 名古屋.
- ④ 秋山好光, 他. 胃がん発症における電位依存性カルシウムチャンネル関連遺伝子のメチル化. 第2回日本エピジェネティクス研究会年会 2008年5月10日, 三島.
- ⑤ Akiyama Y, 他. Promoter hypermethylation of the calcium channel-related gene, *CACNA2D3*, is frequent and an independently poor prognostic factor in gastric carcinomas. AACR 99th Annual Meeting 2008, 2008年4月15日, San Diego, 米国.
- ⑥ Akiyama Y, 他. Hypermethylation of GATA4 and GATA5 transcription factor genes

in gastric cancer. The 12th Korea-Japan Cancer Research Workshop, 2007年12月22日, 札幌.

⑦ Akiyama Y, 他. *GATA4* and *GATA5* transcription factor genes were frequently silenced by methylation in gastric cancer. The 8th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2007年8月11日, 岐阜.

⑧ Wen X-Y, Akiyama Y, 他. Loss of transcription factor *GATA-4/-5* by hypermethylation correlated with progression of gastric carcinomas. AACR 97th Annual Meeting, 2007年4月, Los Angeles, 米国.

⑨ 秋山好光, 他. Frequent methylation of *GATA4* and *GATA5* transcription factor genes in gastric cancer. 第66回日本癌学会総会, 2007年10月4日, 横浜.

⑩ 秋山好光, 他. 胃がんにおける転写関連遺伝子 *GATA4/5* のメチル化の解析. 第14回日本がん予防学会・第8回日本がん分子疫学研究会・第30回日本がん疫学研究会合同大会, 2007年7月13日, 東京.

⑪ 秋山好光, 他. 転写因子 *GATA-5* の遺伝子プロモーター領域の解析. 第1回日本エピジェネティクス研究会年会, 2007年6月15日, 大阪.

〔図書〕(計1件)

① 秋山好光(共著)、羊土社、バイオ実験 誰もがつまづく失敗&ナットク解決法、2008年、236頁 (p115-135 担当) .

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山好光 (AKIYAMA YOSHIMITSU)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80262187

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし