

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790383

研究課題名（和文） 日本人家族性胃がんの発症に関与する遺伝的要因の同定

研究課題名（英文） Identification of genetic factors involved in the development of familial gastric cancer in Japanese population

研究代表者

山田 英孝（YAMADA HIDETAKA）

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：30397400

研究成果の概要（和文）：

日本人の家族性胃がんにおいて *CDH1* 遺伝子の生殖細胞系列変異およびコピー数異常を同定し、これらの変異が家族性胃がんにおける胃がんの発症に寄与することを明らかにした。生殖細胞系列における *CDH1* 遺伝子の片アレル特異的なプロモータ領域のDNAのメチル化は胃がんの主な発症要因ではないことを明らかにした。網羅的遺伝子発現解析によって数種類の遺伝子の発現量が家族性胃がん群で変動していることが観察された。

研究成果の概要（英文）：

Germline mutation and copy number alteration of the *CDH1* gene were identified in familial gastric cancer in Japanese population. Functional analysis showed that these mutations contribute to carcinogenesis in patients with familial gastric cancer. Germline mono-allelic hypermethylation of the *CDH1* promoter is not a major predisposing factor for gastric cancer. Global gene expression analysis showed that level of expression of several gene have varied in the familial gastric cancer group.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：家族性胃がん、生殖細胞系列変異、コピー数異常、E-カドヘリン、*CDH1*、MLPA法、DNAメチル化、網羅的遺伝子発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

日本人の胃がんの多くは散発性の胃がんであるが、3%程度は家族性の胃がんである。散発性の胃がんでは、さまざまながん遺伝子、がん抑制遺伝子の遺伝子変異やプロモータ領域のメチル化などの異常が体細胞で報告

されている。しかしながら、このような遺伝子異常は、がん化の随伴現象によるものなのか、がん化の原因となるものなのかの判断が難しい。胃がん発症に関与する候補遺伝子として、様々な遺伝子が報告されており、胃がん発症の機序について解明されつつあるが、

完全に明らかにされたとは言い難い。家族性胃がんでは、胃がんの家族歴がない人と比較して胃がん発症のリスクが高まることが報告されており、このような症例は既に生殖細胞で遺伝子の異常が存在することが考えられる。現在まで、様々な研究グループが家族性胃がんの遺伝的要因として E-カドヘリン (CDH1) 遺伝子の生殖細胞系列変異を報告している。CDH1 遺伝子は散発性の胃がんでも遺伝子異常が報告されていることから、家族性胃がんの遺伝的要因となる生殖細胞系列変異を同定することは、胃がん発症の遺伝的要因を明らかにすることにつながる。しかしながら、日本人の家族性胃がんの生殖細胞系列変異の報告はわずかであり、日本人の家族性胃がんの遺伝的要因を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

日本人の家族性胃がんにおける生殖細胞系列の遺伝子変異、コピー数異常、発現異常を同定することにより日本人の胃がんの胃がん発症における遺伝的要因を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 家族性胃がんにおける CDH1 遺伝子の生殖細胞系列変異およびコピー数異常の探索

日本人の家族性胃がんにおける CDH1 遺伝子の生殖細胞系列変異およびエクソン単位でのコピー数異常をシーケンシング法、MLPA 法により探索した。同定した変異およびコピー数異常については CDH1 の機能への影響を調べた。

(2) 胃がんにおける生殖細胞系列の CDH1 遺伝子の片アレル特異的なプロモーター領域の DNA のメチル化の探索 : CDH1 遺伝子の生殖細胞系列変異を有しない家族性胃がん患者の血液および腫瘍組織で CDH1 タンパク質を発現していない散発性胃がん患者の非腫瘍組織から抽出した DNA をについて PCR-RFLP 法を用いて CDH1 遺伝子のプロモーター領域にある 3 種類に遺伝子多型 (rs5030625, rs16260, rs28372783) の遺伝子型を調べた。これらの多型のうち少なくとも 1 種類の遺伝子型がヘテロであった症例の DNA についてバイサルファイトシーケンシング法によって生殖細胞系列における CDH1 遺伝子の片アレル特異的なプロモーター領域の DNA のメチル化を探索した。

(3) 網羅的遺伝子発現解析による家族性胃がんの遺伝的要因の探索 : 健常者と家族性胃がん患者の血液から抽出した RNA を用いて、

網羅的遺伝子発現解析を行い、家族性胃がん mRNA の発現に変動が観察される遺伝子を探索した。

## 4. 研究成果

(1) 家族性胃がんにおける CDH1 遺伝子の生殖細胞系列変異およびコピー数異常の探索 : シーケンシング法によって 1 家系で c. 1212delC 変異を MLPA 法によって 1 家系で CDH1 遺伝子のエクソン 3 が欠失している変異 (c. 164-?\_387+?del) を同定した。これらの変異は正常な CDH1 タンパク質よりも短いタンパク質 ( p. Asn405Ilefs\*12 、 p. Val155Glyfs\*38) を産生することが予想された。これら変異型と野生型の CDH1 タンパク質の安定発現細胞株を樹立し、各 CDH1 タンパク質の発現を免疫蛍光法によって調べたところ、野生型の CDH1 タンパク質は細胞膜に局在していたが、2 種類の変異型は細胞膜に局在していなかった。次に、2 種類の変異型における細胞間接着への影響を調べる為に slow aggregation assay を行ったところ、野生型の CDH1 タンパク質は細胞接着能を有していたが、2 種類の変異型タンパク質は野生型と比較して明らかに細胞接着能が損なわれていた。以上のことから、本研究で見つけた CDH1 遺伝子の生殖細胞系列変異は家族性胃がんにおける胃がんの発症に寄与することが示唆された。

(2) 胃がんにおける生殖細胞系列の CDH1 遺伝子の片アレル特異的なプロモーター領域の DNA のメチル化の探索 : CDH1 遺伝子の生殖細胞系列変異を有しない家族性胃がんの血液および腫瘍組織で CDH1 を発現していない散発性胃がん非腫瘍組織から抽出した DNA のうち CDH1 遺伝子のプロモーター領域の 3 種類の遺伝子多型のうち少なくとも 1 種類の遺伝子型がヘテロである症例について CDH1 遺伝子のプロモーター領域の DNA のメチル化の程度を二つのアレルの間で比較した。二つのアレルの間で DNA のメチル化の程度に違いがある症例は見つかったが、片アレル特異的に DNA のメチル化が起きている症例は見つからなかった。以上のことから、生殖細胞系列における CDH1 遺伝子の片アレル特異的なプロモーター領域の DNA のメチル化は胃がんにおける主な発症要因ではないことが示唆された。

(3) 網羅的遺伝子発現解析による家族性胃がんの遺伝的要因の探索 : 健常者群と家族性胃がん患者群との間で 2 倍以上の有意な発現変動を示した遺伝子は観察されなかったが、わずかではあるが発現量に有意な差がみられた遺伝子が数種類存在した。

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11件)

- ① Kahyo T, Iwaizumi M, Shinmura K, Matsuura S, Nakamura T, Watanabe Y, Yamada H, Sugimura H. A novel tumor-derived SGOL1 variant causes abnormal mitosis and unstable chromatid cohesion. *Oncogene*. 30: 4453-63, 2011. 査読有
- ② Shinmura K, Goto M, Suzuki M, Tao H, Yamada H, Igarashi H, Matsuura S, Maeda M, Konno H, Matsuda T, Sugimura H. Reduced expression of MUTYH with suppressive activity against mutations caused by 8-hydroxyguanine is a novel predictor of a poor prognosis in human gastric cancer. *J Pathol*. 225: 414-23, 2011. 査読有
- ③ Yamada H, Shinmura K, Ito H, Kasami M, Sasaki N, Shima H, Ikeda M, Tao H, Goto M, Ozawa T, Tsuneyoshi T, Tanioka F, Sugimura H. Germline alterations in the CDH1 gene in familial gastric cancer in the Japanese population. *Cancer Sci*. 102: 1782-8, 2011. 査読有
- ④ Shinmura K, Igarashi H, Goto M, Tao H, Yamada H, Matsuura S, Tajima M, Matsuda T, Yamane A, Funai K, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Sugimura H. Aberrant expression and mutation-inducing activity of AID in human lung cancer. *Ann Surg Oncol*. 18: 2084-92, 2011. 査読有
- ⑤ Tao H, Shinmura K, Yamada H, Maekawa M, Osawa S, Takayanagi Y, Okamoto K, Terai T, Mori H, Nakamura T, Sugimura H. Identification of 5 novel germline APC mutations and characterization of clinical phenotypes in Japanese patients with classical and attenuated familial adenomatous polyposis. *BMC Res Notes*. 3: 305, 2010. 査読有
- ⑥ Goto M, Shinmura K, Nakabeppu Y, Tao H, Yamada H, Tsuneyoshi T, Sugimura H. Adenine DNA glycosylase activity of 14 Human MutY homolog (MUTYH) variant proteins found in patients with

- colorectal polyposis and cancer. *Hum Mutat*. 31: E1861-74, 2010. 査読有
- ⑦ Sato N, Kageyama S, Chen R, Suzuki M, Mori H, Tanioka F, Yamada H, Kamo T, Tao H, Shinmura K, Nozawa A, Sugimura H. Association between neuropeptide Y receptor 2 polymorphism and the smoking behavior of elderly Japanese. *J Hum Genet*. 55: 755-60, 2010. 査読有
  - ⑧ Yamada H, Shinmura K, Yamamura Y, Kurachi K, Nakamura T, Tsuneyoshi T, Yokota N, Maekawa M, Sugimura H. Identification and characterization of a novel germline p53 mutation in a patient with glioblastoma and colon cancer. *Int J Cancer*. 125: 973-6, 2009. 査読有
  - ⑨ Yamada H, Shinmura K, Goto M, Iwaizumi M, Konno H, Kataoka H, Yamada M, Ozawa T, Tsuneyoshi T, Tanioka F, Sugimura H. Absence of germline mono-allelic promoter hypermethylation of the CDH1 gene in gastric cancer patients. *Mol Cancer*. 8: 63, 2009. 査読有
  - ⑩ Goto M, Shinmura K, Igarashi H, Kobayashi M, Konno H, Yamada H, Iwaizumi M, Kageyama S, Tsuneyoshi T, Tsugane S, Sugimura H. Altered expression of the human base excision repair gene NTH1 in gastric cancer. *Carcinogenesis*. 30:1345-52, 2009. 査読有
  - ⑪ Iwaizumi M, Shinmura K, Mori H, Yamada H, Suzuki M, Kitayama Y, Igarashi H, Nakamura T, Suzuki H, Watanabe Y, Hishida A, Ikuma M, Sugimura H: Human Sgol Down-regulation Leads to Chromosomal Instability in Colorectal Cancer. *Gut*. 58: 249-60, 2009. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Yamada Hidetaka, Shinmura Kazuya, Mori Hiroki, Goto Masanori, Iwaizumi Moriya, Konno Hiroyuki, Kataoka Hideki, Yamada Masami, Ozawa Takachika, Tsuneyoshi Toshihiro, Tanioka Fumihiko, Sugimura Haruhiko: Absence of germline mono-allelic promoter hypermethylation of the *CDH1* gene in gastric cancer patients 第69回 日本癌学会学術総会 2010年9

月 22-24 日 大阪

- ② Yamada Hidetaka, Shinmura Kazuya, Yamamura Yasuhiro, Kurachi Kiyotaka, Nakamura Toshio, Tsuneyoshi Toshihiro, Yokota Naoki, Maekawa Masato, Sugimura Haruhiko: Identification and characterization of a novel germline *p53* mutation in a patient with glioblastoma and colon cancer 第 68 回 日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 1-3 日 名古屋
- ③ 山田英孝、新村和也、山村泰弘、倉地清隆、中村利夫、常吉俊宏、横田尚樹、前川真人、相村春彦：神経膠芽腫と大腸がんを発症した患者における *p53* 遺伝子の新規生殖細胞系列変異の同定および機能解析 がん予防大会 2009 愛知 2009 年 6 月 16-17 日 名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 英孝 (YAMADA HIDETAKA)  
浜松医科大学・医学部・特任研究員  
研究者番号：30397400

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし