

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08763

研究課題名（和文）胃がんに関連したARID2遺伝子の新規SNP機能解析及びその臨床応用

研究課題名（英文）Functional analysis of a novel single nucleotide polymorphism within ARID2 gene associated with gastric cancer development.

研究代表者

中村 洋子（NAKAMURA, Yohko）

千葉県がんセンター（研究所）・がん予防センター・主任上席研究員

研究者番号：60260254

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん予防策の構築を目指す先行研究から、申請者らはがん発症のリスクと関連することが予想される1塩基多型（SNP）を同定した。本研究では、その候補SNPの一つであるARID2遺伝子上に見られるSNPの胃がん発症における意義を検討した。その結果、ヒト胃がん細胞株（MKN74）において、このSNPは細胞増殖や遺伝子発現調節を司るARID2の機能喪失型変異である可能性が見いだされた。また、当該SNPを持つノックインマウスでは血球細胞の分化異常が認められ、このSNPが抗がん免疫に影響を及ぼす可能性が示唆された。以上から、当該SNPは多面的に胃がんの発がんを促進するリスク因子である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で解析したARID2遺伝子上のSNPのアレル頻度には人種間差があり、欧米人と比べ日本を含む東アジア人で特徴的に高い。東アジア地域ではピロリ菌感染による胃がん発症率が世界的に見ても極めて高いことから、胃がん発生との関連性が想起される。したがって、胃がん発症率の低下を目指し、その保有者に対する積極的な生活習慣指導や定期検査の介入へと展開しうる可能性を示した本研究結果の社会的意義は極めて大きいと考える。また、ノックインマウスの解析からARID2が免疫担当細胞の終末分化に関与する新たな機能が見いだされた。このことはARID2研究の新しい局面を拓く学術的意義があると考え、今後の展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：To establish cancer prevention strategies based on individual genetic traits, we conducted a molecular epidemiologic cohort study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) that might be associated with the risk of cancer development. In this study, we examined the significance of one of the candidate SNPs obtained from our previous study, a nonsynonymous SNP within ARID2 gene, in the development of gastric cancer. According to the present results, this SNP was likely to be a loss-of-function mutation of the tumor suppressor ARID2 in a human gastric cancer cell line (MKN74). In addition, knock-in mice bearing this SNP showed abnormal differentiation of immunocytes such as myeloid cells, implying that this SNP might affect anti-cancer immunity. Together, these results suggest that the SNP within ARID2 is a risk factor for gastric cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：胃がん ARID2遺伝子 SNP ゲノム がん予防

1. 研究開始当初の背景

長年の発がん研究から「がん」は、細胞増殖や細胞死を司る遺伝子の異常（遺伝的要因）によって発生することが明らかとなった。一方で、タバコなどに含まれる化学物質は遺伝子変異を誘発するため、喫煙などの生活習慣（環境的要因）は、ある種のがんの発生リスクを高めることが長年の疫学調査から明らかにされており、がんは生活習慣病の一つと考えられる。しかし、発がんにおける遺伝的因子と環境的因子との関係には不明な点が多く残されている。このため、分子疫学コホート研究の推進は、この疑問を解くための重要な手法と考えられる。

日本多施設共同コホート研究（J-MICC STUDY）は、個人の体質を考慮した生活習慣病の予防対策に必要な基礎資料を提供することを目的に発足した。これまで20年以上にわたって追跡している10万人以上の日本国民の健康状況と研究資源は、疫学研究分野において多大な成果を挙げている。申請者らは2006年からJ-MICC STUDYに参画し、千葉県北西部で収集してきた住民の疫学情報と血液試料を用いてがん発症のリスクに関連する生殖細胞系列SNVの探索を行っている。がん関連遺伝子パネルのエクソーム解析で末梢血単核球由来DNAを検討した結果、胃がんを発症した「リスク群」において有意に高頻度で検出される生殖細胞系列での一塩基亜型（SNV）を複数同定した。

その中で、クロマチンリモデリングに関与する*ARID2*遺伝子上に見られる非同義型SNVは、変異アレル頻度が約2.5%の一塩基多型（SNP）である。興味深いことに、このSNPの頻度は人種間で差があり、世界的に胃がん発症率の高い東アジア地域で高い。また、千葉県がんセンターバイオバンクに収集された複数の胃がん検体からも検出された。これらの結果から、当該SNPは胃がん発症との関連性を有する可能性が強く示唆される。しかし、多くの疾患に対する病的変異と同様に、当該SNPのコードする変異が疾患の発症に影響する分子機序については解析の余地が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、胃がんのリスク予測、予防、治療への応用を目指し、*ARID2* 遺伝子上に認められる非同義型SNPに着目し、胃がん発症・進展における当該SNPの意義を分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *ARID2* の非同義型SNP発現細胞の樹立とその細胞生物学的解析

当該SNPを含む変異型*ARID2* 遺伝子あるいは野生型*ARID2* 遺伝子発現ベクターを用いて、当該遺伝子を強制発現するヒト腎上皮由来293T細胞あるいはヒト胃がん由来MKN74細胞を樹立する。293T細胞は抗*ARID2*抗体による免疫沈降実験に供した。MKN74細胞はタイムラプス撮影による細胞増殖解析を行い、さらに当該細胞から抽出したRNAはマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子解析に供した。

(2) *ARID2* の非同義型SNPノックインマウスを用いた解析

申請者らが樹立した当該SNPを導入したノックインマウス（以下KIマウスという）を使用する。化学発癌モデルの作製は、発がん物質であるメチルニトロソ尿素（MNU）は飲水に混ぜて1週間投与した後1週間通常の飲水を与え、これを4回繰り返した。その後、通常の飲水のみでさらに40週飼育し、体重変化や異常行動の有無を観察した。これらの発癌実験と並行して、KIマウスの骨髄、肝臓、脾臓から単核球を採取し、各種の免疫担当細胞マーカーに

対する蛍光色素標識抗体で細胞を染色し、フローサイトメトリー法で細胞表面の抗原マーカーの発現レベルを解析した。

(3) 変異型 ARID2 遺伝子を持つ胃がん(腺がんおよび管状腺がん)に特徴的な遺伝子発現プロフィールの同定

当センターバイオバンクが保有する胃がん検体から、組織型(腺がんや管状腺がんなど)や病期の異なる症例を抽出し、当該 SNP の有無について PCR 法とサンガーシークエンス法を用いて遺伝子型を同定した。続いて ARID2 の SNP および野生型保有患者の胃がん組織から抽出した RNA を使用し、マイクロアレイ解析を行い、当該 SNP を保有する症例に特徴的な遺伝子発現パターンの有無を検討した。

4. 研究成果

(1) ARID2 遺伝子上の非同義型 SNP は機能喪失型変異である。

本研究で着目する非同義型 SNP は、ARID2 の機能に重要であると考えられる機能ドメイン中のアミノ酸配列に変化をもたらす。そのため、当該 SNP によってコードされる変異型 ARID2 (以下 MUT という) の PBAF 複合体形成能や遺伝子発現の制御機能が異常であることが推定された。そこで、まず初めに PBAF 複合体形成能への影響を検討した。野生型 ARID2 (以下 WT という) あるいは MUT をコードする cDNA を、ヒト腎上皮由来 293T 細胞内で一過性に発現させ、抗 ARID2 抗体による免疫沈降実験を行うと、293T 細胞内の WT タンパク質は、PBAF 複合体を構成するサブユニットである BAF180、BAF150、および BAF47 と相互作用していた。同様に、MUT タンパク質もこれらのタンパク質との相互作用が認められた。したがって、当該 SNP による変異は正常な PBAF 複合体の形成には影響しない可能性が示唆された。次に、ARID2 の機能に対する影響を検討するため、ナンセンス変異によって正常な ARID2 蛋白質を持たないヒト胃がん由来 MKN74 細胞に、レンチウイルスベクターを用いて WT あるいは MUT の cDNA を導入した強制発現細胞株を作製した。この遺伝子導入によって ARID2 発現量は mRNA レベルおよびタンパク質レベルで上昇していた。この結果を踏まえて得られた細胞株の増殖速度を解析したところ、コントロールベクター導入細胞 (Mock) と比較して、WT の強制発現は MKN74 細胞の増殖速度を低下させたが、MUT を強制発現した MKN74 細胞の増殖速度は Mock 細胞のそれと差がなかった。このことから、ARID2 は胃がん細胞の増殖速度を低下させる機能を有するが、MUT ではその効果がないことが明らかになった。最後に、遺伝子発現調節への影響をマイクロアレイ法で解析した。Mock 細胞を基準にすると、WT の強制発現によって様々な遺伝子の発現が増強あるいは低下していたが、MUT 発現細胞ではその変化は小さく限定的であった。また、Gene Enrichment 解析の結果から、WT 発現細胞では Mock 細胞と比較してインターフェロンに対して応答する遺伝子群の発現が低下していた。これらの遺伝子群は ARID2 によって発現調節を受けている可能性が先行研究ですでに示されており、今回の解析結果はそれと矛盾しない。以上の結果から、本研究で着目している ARID2 遺伝子上の非同義型 SNP は機能喪失型の遺伝子変異である可能性が示唆された。

(2) ARID2 遺伝子上の非同義型 SNP は血球細胞の分化に影響する

当該 SNP の発がんにおける意義を解析するために、化学発がんモデルによる解析を実施した。本研究では発がん物質であるメチルニトロソ尿素 (MNU) の飲水投与による胃部での

発がんモデルを採用し、当該 SNP を導入した KI マウス、あるいは野生型マウスに投与した。しかし、MNU 投与後の観察期間を経過しても、KI マウスならびに野生型マウスの胃での発がんを示す証拠は得られなかった。発がん物質の投与条件など検討が必要ではあるが本研究期間中での実施は困難であったため、当該 SNP が発がんを促進する可能性については検討の余地が残された。

上記(1)の結果で、MUT の発現はインターフェロン応答性遺伝子群の発現制御に影響を及ぼしていた。その結果から、生体中の免疫応答、特にがん予防における免疫監視への影響する可能性を着想した。そこで、野生型マウスおよび KI マウスの脾臓から単核球を単離し、それに含まれる免疫担当細胞の割合をフローサイトメトリー法で解析した。しかし、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、マクロファージ、樹状細胞の割合やそれぞれのマーカー抗原の発現パターンは両者の間で差が見られなかった。次に、肝臓から単核球を単離し、それに含まれる免疫担当細胞の割合をフローサイトメトリー法で解析した。野生型マウスと比較して KI マウスではミエロイド系細胞のマーカーの発現パターンが大きく異なっていた。これらの結果を踏まえて血球分化に影響があったと仮定し、骨髄中の血球前駆細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。しかし予想に反して、両者のミエロイド系前駆細胞の割合に大きな差は認められなかった。肝臓には骨髄由来および組織常在性のマクロファージが存在する。今回の結果から、ARID2 が組織常在性マクロファージの分化に関与する可能性が示唆された。マクロファージの中にはがん免疫を抑制し腫瘍細胞の増殖を支持する細胞（腫瘍関連マクロファージ、TAM）も含まれるので、当該 SNP が宿主の腫瘍免疫や免疫監視に影響を及ぼす可能性が示唆された。一方、マクロファージの分化において ARID2 が機能しているという知見は新規であり、今後の研究を展開していきたいと考える。

(3) 胃がん組織における当該 SNP の意義

(1)と(2)の結果を踏まえ、実際の胃部での機能を検討した。具体的には、千葉県がんセンターバイオバンクに収蔵された胃がん患者由来の胃組織（非がん部）から DNA を抽出し、当該組織に当該 SNP の有無を解析した。解析した胃がん由来検体では当該 SNP（アレル頻度：0.0327）が検出されたが、その一方で同バイオバンク内に収蔵された肝臓がん患者では当該 SNP は検出されず、両者の変異アレル頻度の差は統計学的に有意であった。次に、非がん部由来の凍結組織から RNA を抽出しマイクロアレイを実施して、両者における網羅的な遺伝子発現パターンの差があるかどうかを検討すると、発現量の異なる遺伝子が認められた。興味深いことに、657 遺伝子（88%）と非常に広範な遺伝子が、野生型 ARID2 を有する検体群より当該 SNP 保有群でその発現量が上昇していた。Gene Enrichment 解析の結果から、これらの発現上昇していた遺伝子群には転写制御、あるいは DNA 結合性因子が含まれていた。すなわち、MUT はこれらの転写制御因子の発現を高めることで広範な遺伝子の発現制御に影響を及ぼし、その結果として発がんを促進した可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉県がんセンター研究所
<https://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	下里 修 (SHIMOZATO Osamu) (30344063)	千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター 腫瘍ゲノム研究室・室長 (82504)	
研究分担者	巽 康年 (TATSUMI Yasutoshi) (00450578)	千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター 腫瘍ゲノム研究室・研究員 (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------