

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 28 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590446

研究課題名(和文) 胃癌悪性化に関わる第20番染色体長腕上の責任遺伝子の同定

研究課題名(英文) Screening of target genes for chromosome 20q

研究代表者

塚本 善之 (Tsukamoto, Yoshiyuki)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00433053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に胃癌の高頻度ゲノム増幅領域として、染色体20q13領域を同定した。さらに、この領域においてゲノム増幅に伴い発現亢進する遺伝子として、DDX27を同定した。本研究では胃癌細胞におけるDDX27発現亢進の意義を明らかにする。免疫組織染色を行ったところ、DDX27は高頻度に発現亢進することを発見した。臨床病理学因子との比較ではDDX27発現亢進は静脈侵襲および肝転移の頻度と相関し、患者の予後不良と相関した。また、DDX27を発現抑制すると細胞周期抑制を介したコロニー形成能の抑制が認められた。以上の結果、胃癌の新しい治療標的としてDDX27を同定した。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have reported that gain at chromosome 20q13 is the most common genomic copy number aberration in gastric cancer (GC) (29/30 cases), and that among the genes located in this region, we have identified DDX27 as a candidate target for GC. Here, we analyzed the significance of DDX27 upregulation in GC cells. We found that DDX27 was frequently upregulated in GC tissues, and significantly associated with venous invasion and liver metastasis. Furthermore, high expression of DDX27 was independently associated with poorer prognosis. Knockdown of DDX27 reduced the ability of GC cells to form colonies, but had little effect on their invasiveness. We also found that knockdown of DDX27 reduced the viability of GC cells through inhibition of cell cycle progression independently of apoptosis. Thus, our results suggest that expression of DDX27 contributes to colony formation by GC cells through cell cycle control and may be a potential therapeutic target for GC patients.

研究分野：分子病理学

キーワード：胃癌 20q13 DDX27

1. 研究開始当初の背景

胃癌は日本における癌死亡率の第二位を占める。診断技術の進歩により、初期に発見される早期胃癌の治療成績は向上したが、悪性度が高まった進行胃癌の治療成績は良好ではない。この原因として、進行胃癌に対して外科治療以外に効果的な補助療法が確立されていないことが挙げられる。近年、癌発症のメカニズム解明が大きく進み、癌は遺伝子異常の蓄積によって引き起こされることが明らかとなってきた。そしてその異常を標的とする分子標的治療が急速に進歩している。これまで多くの研究グループが胃癌の網羅的遺伝子異常解析を実施し、多数の標的候補分子を同定してきた。しかし、未だに胃癌の効果的な分子標的治療は確立されていない。この原因として、多数の標的候補の中から実際に胃癌の悪性化を促進させる遺伝子異常を選び出すのが困難であることが考えられる。早期胃癌は悪性度が低く、切除術が効果的であるのに対し、進行胃癌は転移・再発の頻度が高く、外科手術だけでなく補助的な治療も必要である。従って、胃癌において分子標的治療を確立させるためには、「複雑な遺伝子異常の中から、悪性化に直接関与する遺伝子異常を同定することが重要である。」と考えた。

このような視点で我々は、早期胃癌 20 症例と進行胃癌 30 症例についてアレイ CGH によりゲノムコピー数を網羅的に解析したさらに進行胃癌 30 症例については、ゲノム異常に伴い異常発現する遺伝子を網羅的に解析している。これらの解析により、我々は 20q13 領域のゲノム増幅は進行胃癌で有意に高頻度であることを発見した。この結果から、我々は「20q13 領域のゲノム増幅は胃癌の悪性化に関与する」と仮説を立てた。

20q13 ゲノム増幅領域の最小共通領域

(46-49Mb) には 43 の遺伝子がコードされている。遺伝子発現解析より、43 遺伝子のうち 8 遺伝子 (CSE1L, DDX27, ZNFX1, B4GALT5, ZNF313, Kua, UBE2V1, CEBPB) がゲノムコピー数の増加に伴い 2 倍以上発現亢進していた。我々はこれら 8 遺伝子を胃癌悪性化関連候補遺伝子 (以下、候補遺伝子) として選別した。予備実験ではあるが、既に候補遺伝子の機能解析を開始している。20q13 領域のゲノム増幅を持つ胃癌細胞株 (MKN74) へそれぞれの遺伝子に対する siRNA を導入し、発現を抑制した後、細胞増殖能を解析したところ、いずれの遺伝子も細胞増殖へは影響しなかった。一方で、浸潤能を解析したところ、8 遺伝子のうち 3 遺伝子 (DDX27, ZNFX1, CEBPB) の発現抑制で浸潤能が低下することを発見した。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究成果をさらに発展させ、8 つの候補遺伝子について、

(1) 発現亢進と臨床病理学的意義との関連性、
(2) 癌化能 (細胞増殖能、抗アポトーシス能、浸潤能、足場非依存性増殖能)、
(3) 癌化能に関わるシグナル伝達経路、
を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子の胃癌症例における発現を明らかにするため、胃癌 140 症例を用いて免疫組織染色を行った。

(2) 候補遺伝子の胃癌細胞における機能を明らかにするため、胃癌細胞 11 株を用いて発現量を確認した。

(3) 候補遺伝子の高発現細胞株において候補遺伝子の発現抑制を行い、マトリゲルトランスウェルアッセイにより胃癌細胞株の浸潤能に対する影響を解析した。

(4) 候補遺伝子のコロニー形成能を解析するため、候補遺伝子の発現抑制を行った後に通常プレート上、もしくはソフトアガー上でのコロニーフォーメーションアッセイを行った。

(5) 候補遺伝子の発現抑制によるアポトーシスへの影響はロッッシュ社のアポトーシス測定キットを用いた。

(6) 候補遺伝子の発現抑制による細胞周期への影響は Propidium Iodide を取り込ませた後に FACS 解析を行い、明らかにした。

(7) 候補遺伝子の細胞内局在は二重蛍光免疫染色法により明らかにした。

(8) 候補遺伝子の安定発現細胞株はライフテクノロジー社のウィルス作製キットを用いて、ウィルス感染させ、抗生剤で選択培養することにより樹立した。

(9) 候補遺伝子の発現抑制により影響を受けるシグナル伝達経路は、発現抑制した細胞の遺伝子発現アレイ解析を行った後に、パスウェイ解析ソフト (Ingenuity Pathway Analysis) により明らかにした。

(10) 候補遺伝子の安定発現抑制細胞株は、サーモフィッシャー社のレンチウィルスによる発現抑制キットを用いた。

(11) 候補遺伝子を安定的に発現抑制した細胞株を免疫不全マウスへ移植し、個体における腫瘍形成能への影響を明らかにした。

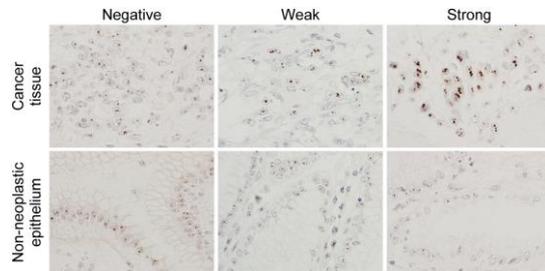
4. 研究成果

我々は、これまでのスクリーニングで得られた 8 遺伝子について、まずもっとも癌との関連が高いと考えられる DDX27 遺伝子について解析を行った。これを選択した理由は、第一に、我々のスクリーニングの中で最も癌部における発現量が亢進しており、発現量の亢進とゲノムコピー数の増加が最も相関していたからである。また、DDX27 と胃癌との関連は全く報告が無いため、DDX27 と胃癌との関連を明らかにすることで、それが新しい発見となり、さらに、どのように胃癌に影響するか明らかにすることで、胃発癌・進

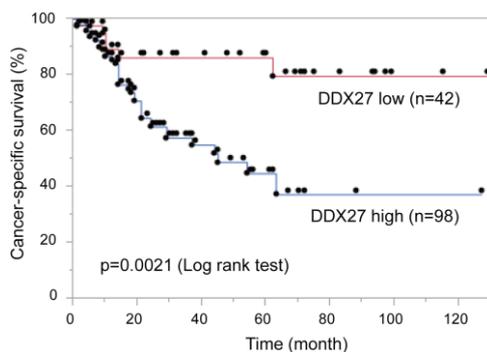
行の新しいメカニズム解明だけでなく、胃癌に対する新規の治療法開発につながると考えたからである。

(1)胃癌における DDX27 発現。

まず、DDX27 が実際の胃癌症例で発現亢進しているか解析した。DDX27 は解析した 140 症例のうち 98 症例で発現亢進していた。

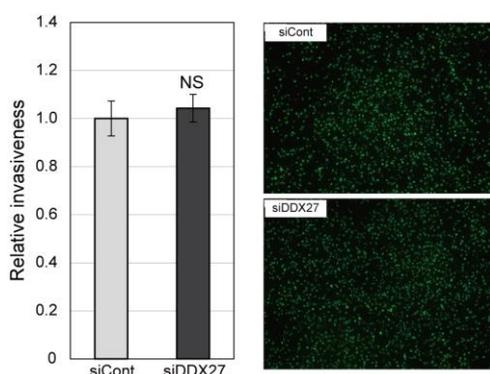


臨床病理学因子との相関解析では、DDX27 発現は年齢、性別、深達度、ステージ、リンパ節転移の有無とは相関が見られないが、静脈侵襲および肝転移の発生頻度と強く相関していた。さらに、DDX27 の高発現は患者の予後不良と相関しており、深達度とともに胃癌の独立予後因子であることがわかった。

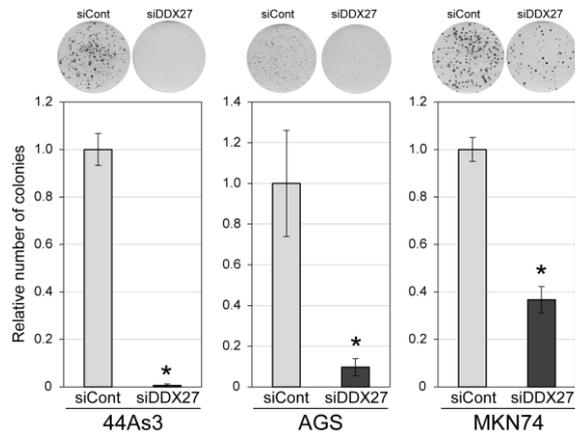


(2)胃癌細胞の浸潤能、コロニー形成能における DDX27 の役割。

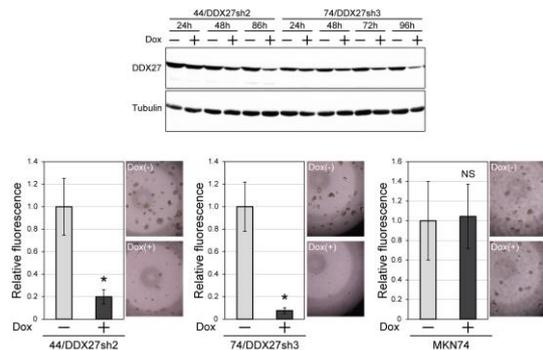
DDX27 が解析した胃癌細胞 11 株の中で、AGS, 44As3, MKN74 において特に発現量が高かったため、これらの細胞株を用いて DDX27 の機能解析を行った。DDX27 が胃癌組織において、脈管侵襲と肝転移の頻度と相関していたことから、DDX27 は胃癌細胞株の浸潤能、コロニー形成能、生存に関与すると考え、これらの癌化能に対する DDX27 発現抑制の影響を解析した。まず、44As3 で DDX27 を発現抑制し、浸潤能を解析したところ、ほとんど影響が見られなかった。



この結果は、DDX27 が胃癌細胞の浸潤能にほとんど影響しないことを示唆する。次に、AGS, 44As3, MKN74 で DDX27 を発現抑制し、コロニー形成能を解析した。その結果、いずれの細胞株においても強い抑制効果が認められた。

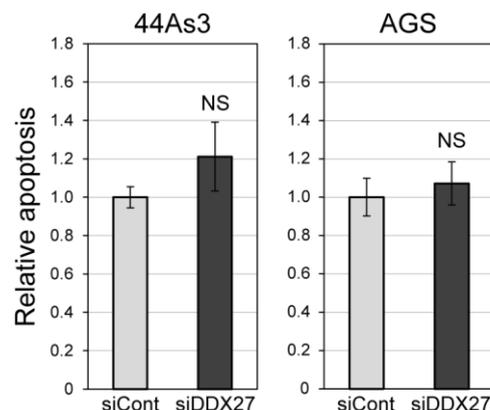


さらに、ソフトアガー上のコロニー形成能も DDX27 発現抑制により強く抑制されることを発見した。これらの結果から、DDX27 は胃癌細胞のコロニー形成能において重要な役割を果たすことが示された。

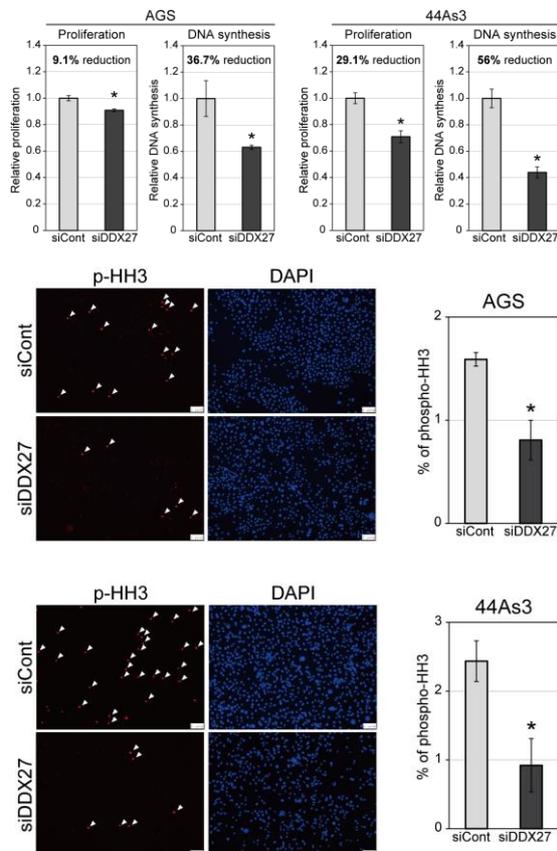


(3) DDX27 はアポトーシス誘導では無く、細胞周期の抑制により胃癌細胞のコロニー形成能を抑制する。

次に、DDX27 がどのようなメカニズムで胃癌細胞のコロニー形成能を制御するか明らかにするため、まず DDX27 発現抑制によるアポトーシスへの影響を解析した。AGS と 44As3 において解析したところ、いずれも影響が見られなかった。



一方で、細胞周期のイベントのうち、DNA合成(下図 DNA synthesis)と細胞分裂(下図 pHH3)の頻度を解析したところ、AGSと44As3の両方でどちらのイベントも抑制されていることがわかった。



これらの結果から、DDX27はアポトーシス誘導ではなく、細胞周期の抑制を介して胃癌細胞のコロニー形成能を抑制していることが明らかとなった。

(4)DDX27発現抑制はAGSにおいてはTP53の誘導により細胞周期を抑制し、44As3においては別のメカニズムで細胞周期を抑制する。

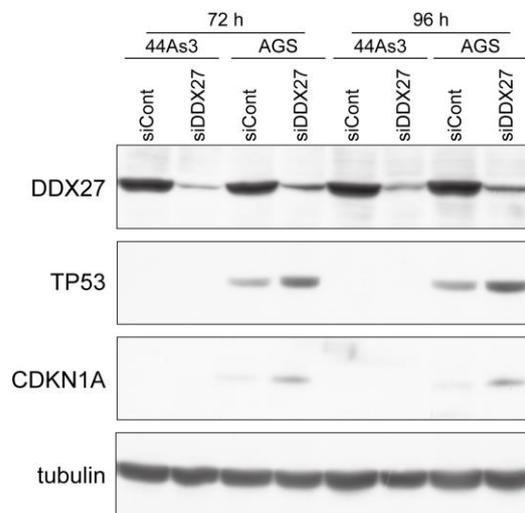
次に、DDX27がどのようなシグナル伝達を介して胃癌細胞株の細胞周期を制御するか明らかにするため、DDX27発現抑制後に網羅的遺伝子発現解析を行い、関連するシグナル伝達経路をIPAソフトウェアにより解析した。その結果、44As3では顕著なシグナル伝達経路が見つからなかったが、AGSにおいてはTP53の活性化が示唆された。

AGS

Transcription Regulator	Predicted Activation State	Regulation z-score	p-value	Target molecules in dataset
TP53	Activated	2.237	2.44E-02	ATF3,FAS,IP2A,MDM2,MDM1,MDM4,MDM5,MDM6,MDM7,MDM8,MDM9,MDM10,MDM11,MDM12,MDM13,MDM14,MDM15,MDM16,MDM17,MDM18,MDM19,MDM20,MDM21,MDM22,MDM23,MDM24,MDM25,MDM26,MDM27,MDM28,MDM29,MDM30,MDM31,MDM32,MDM33,MDM34,MDM35,MDM36,MDM37,MDM38,MDM39,MDM40,MDM41,MDM42,MDM43,MDM44,MDM45,MDM46,MDM47,MDM48,MDM49,MDM50,MDM51,MDM52,MDM53,MDM54,MDM55,MDM56,MDM57,MDM58,MDM59,MDM60,MDM61,MDM62,MDM63,MDM64,MDM65,MDM66,MDM67,MDM68,MDM69,MDM70,MDM71,MDM72,MDM73,MDM74,MDM75,MDM76,MDM77,MDM78,MDM79,MDM80,MDM81,MDM82,MDM83,MDM84,MDM85,MDM86,MDM87,MDM88,MDM89,MDM90,MDM91,MDM92,MDM93,MDM94,MDM95,MDM96,MDM97,MDM98,MDM99,MDM100
NFKB (complex)	Activated	2.224	2.09E-02	ATF3,BCL2,CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK10,CDK11,CDK12,CDK13,CDK14,CDK15,CDK16,CDK17,CDK18,CDK19,CDK20,CDK21,CDK22,CDK23,CDK24,CDK25,CDK26,CDK27,CDK28,CDK29,CDK30,CDK31,CDK32,CDK33,CDK34,CDK35,CDK36,CDK37,CDK38,CDK39,CDK40,CDK41,CDK42,CDK43,CDK44,CDK45,CDK46,CDK47,CDK48,CDK49,CDK50,CDK51,CDK52,CDK53,CDK54,CDK55,CDK56,CDK57,CDK58,CDK59,CDK60,CDK61,CDK62,CDK63,CDK64,CDK65,CDK66,CDK67,CDK68,CDK69,CDK70,CDK71,CDK72,CDK73,CDK74,CDK75,CDK76,CDK77,CDK78,CDK79,CDK80,CDK81,CDK82,CDK83,CDK84,CDK85,CDK86,CDK87,CDK88,CDK89,CDK90,CDK91,CDK92,CDK93,CDK94,CDK95,CDK96,CDK97,CDK98,CDK99,CDK100
STAT1	Activated	1.183	1.88E-03	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
JUN	Activated	0.853	3.41E-02	ATF3,FAS,MDM2,MDM4,MDM6,MDM8,MDM10,MDM12,MDM14,MDM16,MDM18,MDM20,MDM22,MDM24,MDM26,MDM28,MDM30,MDM32,MDM34,MDM36,MDM38,MDM40,MDM42,MDM44,MDM46,MDM48,MDM50,MDM52,MDM54,MDM56,MDM58,MDM60,MDM62,MDM64,MDM66,MDM68,MDM70,MDM72,MDM74,MDM76,MDM78,MDM80,MDM82,MDM84,MDM86,MDM88,MDM90,MDM92,MDM94,MDM96,MDM98,MDM100
RUNX1T1	Activated		3.78E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
Ctcf	Activated		6.70E-03	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
Bcl-2	Activated		3.78E-02	MDM2,MDM4,MDM6,MDM8,MDM10,MDM12,MDM14,MDM16,MDM18,MDM20,MDM22,MDM24,MDM26,MDM28,MDM30,MDM32,MDM34,MDM36,MDM38,MDM40,MDM42,MDM44,MDM46,MDM48,MDM50,MDM52,MDM54,MDM56,MDM58,MDM60,MDM62,MDM64,MDM66,MDM68,MDM70,MDM72,MDM74,MDM76,MDM78,MDM80,MDM82,MDM84,MDM86,MDM88,MDM90,MDM92,MDM94,MDM96,MDM98,MDM100
ATM	Activated		4.27E-03	MDM2,MDM4,MDM6,MDM8,MDM10,MDM12,MDM14,MDM16,MDM18,MDM20,MDM22,MDM24,MDM26,MDM28,MDM30,MDM32,MDM34,MDM36,MDM38,MDM40,MDM42,MDM44,MDM46,MDM48,MDM50,MDM52,MDM54,MDM56,MDM58,MDM60,MDM62,MDM64,MDM66,MDM68,MDM70,MDM72,MDM74,MDM76,MDM78,MDM80,MDM82,MDM84,MDM86,MDM88,MDM90,MDM92,MDM94,MDM96,MDM98,MDM100
FAS	Activated		4.60E-02	MDM2,MDM4,MDM6,MDM8,MDM10,MDM12,MDM14,MDM16,MDM18,MDM20,MDM22,MDM24,MDM26,MDM28,MDM30,MDM32,MDM34,MDM36,MDM38,MDM40,MDM42,MDM44,MDM46,MDM48,MDM50,MDM52,MDM54,MDM56,MDM58,MDM60,MDM62,MDM64,MDM66,MDM68,MDM70,MDM72,MDM74,MDM76,MDM78,MDM80,MDM82,MDM84,MDM86,MDM88,MDM90,MDM92,MDM94,MDM96,MDM98,MDM100
MDM2	Activated		3.28E-04	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM4	Activated		1.28E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM6	Activated		1.79E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM8	Activated		2.08E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM10	Activated		2.54E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM12	Activated		2.12E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM14	Activated		1.70E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM16	Activated		2.12E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM18	Activated		3.78E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM20	Activated		3.97E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM22	Activated		4.19E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100
MDM24	Activated		2.25E-02	CDK3,CDK5,CDK7,CDK9,CDK11,CDK13,CDK15,CDK17,CDK19,CDK21,CDK23,CDK25,CDK27,CDK29,CDK31,CDK33,CDK35,CDK37,CDK39,CDK41,CDK43,CDK45,CDK47,CDK49,CDK51,CDK53,CDK55,CDK57,CDK59,CDK61,CDK63,CDK65,CDK67,CDK69,CDK71,CDK73,CDK75,CDK77,CDK79,CDK81,CDK83,CDK85,CDK87,CDK89,CDK91,CDK93,CDK95,CDK97,CDK99,CDK100

Upstream analysisによりp53の活性化が1位で予想された

実際、44As3ではTP53が欠失しており、ウェスタンブロットにおいても発現が確認されなかったが、AGSではTP53発現が確認され、DDX27発現抑制によりさらに誘導され、その下流の遺伝子であるCDKN1Aの発現量も促進することがわかった。



以上の結果から、DDX27はTP53を制御しており、発現抑制することでTP53の蓄積が起こり、それにより細胞周期の抑制が起こることが示唆された。TP53が欠失した場合にも細胞周期の抑制が誘導されているが、このメカニズムについては今後の解析が必要である。

(5)まとめ

以上の結果から、本研究において胃癌の進行に関連する20q13領域から新たな癌関連遺伝子、DDX27、の単離に成功した。この成果は現在論文投稿中で平成27年度中に一般公開される予定である。我々は胃癌の進行に関わりのある遺伝子に着目して研究を進めてきたが、今回解析したDDX27は実際に、発現亢進が患者の予後不良と強く相関しており、我々が目指した遺伝子の同定に成功したと言える。我々が着目している20q13領域はほぼ全ての胃癌でゲノム増幅していることから、多くの胃癌でDDX27が発現亢進していることが予想されたが、実際に、70%の胃癌症例で発現亢進していた。さらに、DDX27発現亢進と胃癌との関連はまだ全く明らかにされていないため、この関連性を明らかにすることで、胃癌進行のメカニズム解明だけでなく、新しい胃癌治療法の開発につながると確信する。本研究からはDDX27が癌抑制遺伝子であるTP53を制御することで癌細胞にとってコロニー形成能に有利な影響を与えることが示唆された。今後、DDX27がどのようなタンパク質と結合し、どのようなシグナル伝達を介して胃癌の進行を促進させるか明らかにすることが必須である。

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 3 件)

1. Hanada K, Uchida T, Tsukamoto Y (全 10 名).

Helicobacter pylori infection introduces DNA double-strand breaks in host cells. 2014, Infect Immun. 査読有
82(10):4182-9. doi: 10.1128/IAI.02368-14.

2. Yoshioka S, Tsukamoto Y et al (全 10 名).

Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. 2013, PLoS One. 査読有 8(2):e56165. doi: 10.1371/journal.pone.0056165.

3. Matsuo M, Nakada C, Tsukamoto Y et al (全 8 名).

MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2. 2013, Molecular Cancer. 査読有 25:12:15. doi: 10.1186/1476-4598-12-15.

[学会発表] (計 4 件)

1. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference

The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics
Dec. 16 (Mon.) - 18 (Wed.), 2013 「Tokyo Bay Maihama Hotel Club & Resorts (千葉県浦安市)」

Poster presentation 3-11

“Genome-wide Analysis of DNA Copy Number Aberrations in Gastric Cancer”
Yoshiyuki Tsukamoto

2. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3 日 「パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)」
P-1308

「MiR-29c is downregulated in gastric cancers and regulates cell proliferation by targeting RCC2」
Yoshiyuki Tsukamoto

3. 第 23 回日本消化器癌発生学会総会 2012 年 11 月 15 日 「ルネッサンスリゾートナルト(徳島県鳴門市)」
P-5-6 (ポスター発表)

「胃癌における miR-29c の発現機能解析」
塚本善之

4. 103rd AACR ANNUAL MEETING April 4, 2012 (March 31- April 4), 「Chicago, USA」.

Abstract#5097 (Poster)

“Genome-wide analysis of DNA copy number aberrations in gastric cancer”
Yoshiyuki Tsukamoto

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/byori2/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚本善之 (TSUKAMOTO, Yoshiyuki)

大分大学・医学部分子病理学講座・助教

研究者番号：00433053

(2)研究分担者

柳原五吉 (YANAGIHARA, Kazuyoshi)

国立研究開発法人国立がん研究センター

臨床開発センター

研究者番号：20158025