

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670180

研究課題名(和文) 胃癌におけるクロマチンリモデリング因子異常とそれら諸因子の機能の解明

研究課題名(英文) Aberration of chromatin remodeling factors in gastric cancer and its significance

研究代表者

宇於崎 宏 (UOZAKI, Hiroshi)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：10296246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の発癌、進行にクロマチンリモデリング因子がどのように関与しているかを明らかにするため、手術材料で発現状態を検索し、臨床病理学的因子との比較を行った。468例の胃癌、47例の胃腺腫を免疫組織化学的に検索した結果、癌の進行と共にARID1A、1B、2の発現が低下することが分かった。特にARID1Aが臨床病理学的因子と強く関連していた。他のクロマチンリモデリング因子もほぼ同様の傾向であった。これまで突然変異がARID1Aの低下の原因とされていたが、今回、培養細胞での研究でARIDの発現がDNAメチル化の影響を受けていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the significance of chromatin remodeling factors in gastric cancer. We investigated 468 cases of gastric cancer and 47 cases of gastric adenoma with immunohistochemical staining. ARIDs were down-regulated in those gastric neoplasms and gradually decreased during gastric carcinogenesis. ARID1A is strongly related to clinicopathological factors among ARIDs. Decrease of ARID1A solely associated to poorer prognosis in advanced gastric cancer. Other chromatin remodeling factors, such as SMARCC1, PBRM1, and BRG1, showed similar decrease in gastric neoplasms. Further study using cell culture revealed that DNA methylation might cause ARIDs decrease.

研究分野：消化管、癌

キーワード：胃癌 クロマチンリモデリング因子 メチル化 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

日本では胃癌の罹患率は高く、発癌機構の解明による予防が待たれる。最近、DNAメチル化、small RNA、ヒストン修飾に続くエピジェネティックな遺伝子発現調整機構として、クロマチンリモデリング因子が注目されている。同因子は核クロマチンの構造を変化させ、細胞分化、遺伝子発現の調節に関わる。核異型、粗造な核クロマチンは癌細胞の形態学的特徴であるが、クロマチン制御因子は形態変化と遺伝子発現変化を密接に結びつける分子であり、病理組織学的に興味深く、また発癌メカニズムの解明においても重要である。

[背景1：クロマチンリモデリング因子と癌]  
核クロマチンは安定な構造体ではなく、細胞分化や外部からの影響で変動する。重要な役割を果たすのが、クロマチンリモデリング因子である。大きく4つのファミリーに分類されている。いずれも複数の分子からなる複合体であるが、それぞれの組み合わせの役割は十分に明らかになっていない。各種の癌でクロマチンリモデリング因子の異常が報告されている。胃癌では SWI/SNF ファミリーを構成する ARID1A(AT-rich interaction domain 1A=BAF250A)、BRG1、BRM の変異や発現低下が報告されている。

[背景2：一部の胃癌にエピジェネティックな異常が関与している]  
胃癌の1/3から1/2が癌関連遺伝子の高メチル化状態を示す。特に胃癌の10%弱をしめる Epstein-Barr (EB)ウイルス関連胃癌ではメチル化が顕著で、他の胃癌でメチル化が少ないポリコム抑制複合体(PRC)にまで及んでいることを我々は報告した(Cancer Res 2011)。また、EBウイルス関連胃癌では、クロマチンリモデリング因子の一つである ARID1A の発現が低下している事を我々は報告している(Virchows Arch 2012)。このように EBウイルス関連胃癌を中心とする高メチル化胃癌では、他のエピジェネティックな異常も高頻度に起こっている可能性が高い。

### 2. 研究の目的

胃癌の実際の症例および培養細胞を利用して、胃癌におけるクロマチン制御異常の全体像を明らかにし、発癌との関連を解明することが目標である。

クロマチンリモデリング因子を構成する多数の分子を検索することで、複合体異常の全体像を明らかにする。また、臨床病理学的因子との比較により、異常と発癌との関連や各因子の機能・意義を明らかにする。前癌段階や癌随伴病変での異常も検索することで、発癌初期や発癌前の早期発見・予防につながる知見を得ることができる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 外科材料による研究

468例の胃癌、47例の胃腺腫を対象にティシューアレイを構築して、免疫組織化学的染色を行った。抗 ARID1A ウサギ抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 ARID1B マウス抗体 (Abnova, clone 2D2)、抗 ARID2 ウサギ抗体 (Bethyl Lab) を用いて行った。そのほか、P53, hMLH1、miR-21 の発現についても検索を行った。ARID の染色の評価は染色強度(0-3)と陽性率(0-4)を掛け合わせた score を用いた。Score の他、2群に分ける解析では ARID1A, ARID1B は8以上か否か、ARID2 は3以上か否かで分けた。

#### (2) 培養細胞を用いた研究

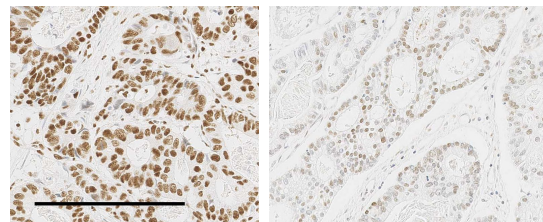
胃癌細胞株 AGS, NUGC3, MKN45, MKN74 を用いて、5-Aza-dC による脱メチル化処理を行い、その前後で ARID の発現の変化を観察した。また、同じ細胞株で siRNA による ARID の抑制を行い、増殖率、移動能の変化を調べた。

統計学的解析は  $P < 0.05$  をもって有意とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 外科材料による研究

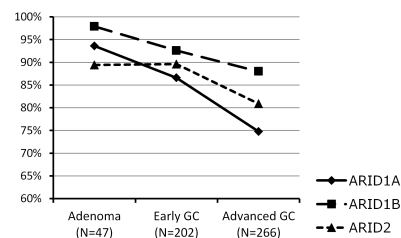
ARID の陽性像はいずれも核に見られた(下図、左 ARID1A、右 ARID1B)。



その score 分布は胃癌では ARID1A 30/7/8/6/32/11/173/4/197, ARID1B 1/1/6/5/24/10/208/4/209, ARID2 31/5/35/101/162/14/91/5/24(いずれも 0/1/2/3/4/6/8/9/12)となった。非腫瘍部と比べると陽性率は減少していた。

ARID 相互の関連があり、1つが減少していると他の ARID が減少していることが有意に多かった ( $P < 0.01$ )。

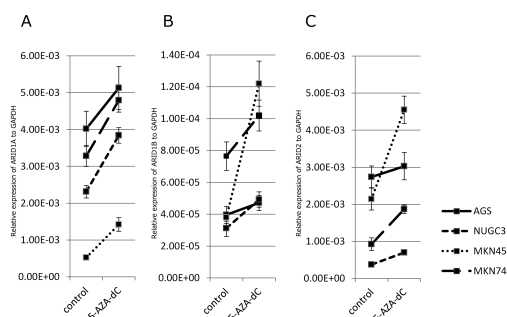
臨床病理学的因子との関連では、腺腫、早期癌、進行癌に分けて陽性率をプロットすると、すべての ARID が徐々に陽性率が減少していくことが分かった(下図)。



そのほか、ARID1A の発現低下についてはリンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移、EBV 陽性、hMLH1 発現低下との関連があった。ARID1B と ARID2 ではリンパ管侵襲、リンパ節転移、hMLH1 減少との関連があった。予後との比較を行ったが、ARID1A は予後と有意な関連が見られたが、ARID1B、2 は予後と関連は明らかではなかった。p53 との関連は見られなかった。hMLH1 との関連はゲノム不安定性と ARID の発現低下が関係していると考えられ、ARID にも突然変異が起こっていることが予想される。しかし、hMLH1 の低下には DNA メチル化も関与しており、そのことは特に EBV 関連胃癌で顕著であるが、メチル化と ARID 低下との関係も十分に考えられる。

## (2) 培養細胞による研究

4 つの胃癌細胞全てが、5-Aza-dC による脱メチル化処理後に ARID 全ての発現を増加させた(下図)。従来、ARID に着目されているのは癌で一定の割合で突然変異が生じていることが次世代シーケンサーにより明らかになった事が大きいですが、本実験によって、癌細胞での ARID の低下にはメチル化も関与していることが示唆された。



siRNA による ARID の低下状態を確認した後、72-120 時間での増殖率の変化を調べたが、一定の傾向は明らかにならなかった。また wound healing 法および Boyden chamber 法による移動能の検索でも一定の傾向は明らかにはならなかった。ARID の低下がどのような機序で癌の進展に関与しているかは更に実験が必要である。

## (3) まとめと展望

胃癌では ARID1A を中心として、ARID の発現低下が観察された。その発現低下は癌の進展と有意に関係していた。培養系での研究では ARID の低下に DNA メチル化が関与していることが示唆され、従来の突然変異以外によっても発現低下していると考えられた。他の SWI/SNF 構成蛋白である SMARCC1 や PBRM1, BRG1 についても検索を進めているが、ARID 発現低下との関連がそれらにも観察される他、癌の進展との関連もあり、クロマチンリモデリング因子の複数の異常が癌の進展に関与していることが分かった。

その後、ティッシュアレイを 850 例まで増

やして、ARID を含むクロマチンリモデリング因子の発現を検索したが、以上と同様の結果であり、より細かい変化が明らかにはなかったが、ARID1A が最大の影響を与えていた。

エピジェネティックな変化として良く研究されている microRNA の中で miR-21 についても検索を追加し、ARID や他の因子との関連を検索したが、クロマチンリモデリング因子と miR-21 の発現状態の関連は明らかでなかった。癌間質に発現する miR-21 も癌の進展と関連していたが、ARID 発現との関連は見いだせず、別の機序での関与と考えた。

以上の外科材料を中心とする研究を他の腫瘍、特に尿路上皮癌でも検索しているが、ARID が発現低下している割合は胃癌ほどではなく、ARID と癌との関係は臓器毎に少し異なっていることが分かった。

## <引用文献>

Shain AH, Pollack JR: The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. PLoS One 8: e55119, 2013.

Oike T, Ogiwara H, Nakano T, Yokota J, Kohno T: Inactivating mutations in SWI/SNF chromatin remodeling genes in human cancer. Jpn J Clin Oncol 43: 849-855, 2013.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Ohno R, Uozaki H, Kikuchi Y, Kumagai A, Aso T, Watanabe M, Watabe S, Muto S, Yamaguchi R. H. Both cancerous miR-21 and stromal miR-21 in urothelial carcinoma are related to tumour progression. Histopathology. 2016; Vol. 69, pp.993-999, DOI: 10.1111/his.13032. 査読有.

松坂 恵介, 宇於崎 宏,【消化管 I-上部消化管-】 EB ウイルス関連胃癌、病理と臨床, 2016 年, 34 巻 pp959-962. 査読無.

Aso T, Uozaki H, Morita S, Kumagai A, Watanabe M. Loss of ARID1A, ARID1B, and ARID2 expression during progression of gastric cancer. Anticancer Res. 2015; Vol. 35, pp. 6819-6827. 査読有.

<http://ar.iiarjournals.org/content/35/12/6819.long>

### 〔学会発表〕(計1件)

阿曾 達也, 熊谷 有紗, 渡邊 雅人, 森田 茂樹, 高橋 芳久, 宇於崎 宏  
胃癌及び胃腺腫における ARID1A・ARID1B・ARID2 の発現状態とその意義 日本病理学会誌 104 巻 1 号 Page306(2015.03)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.teikyo-u.ac.jp/~patho/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇於崎 宏 (UOZAKI, Hiroshi)  
帝京大学・医学部・教授  
研究者番号：10296246

### (2) 連携研究者

森田 茂樹 (MORITA, Shigeki)  
東京大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：30707021

阿曾 達也 (ASO, Tatsuya)  
帝京大学・医学部・助教  
研究者番号：30585401

熊谷 有紗 (KUMAGAI, Arisa)  
帝京大学・医学部・助教  
研究者番号：50596963