

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790306

研究課題名（和文） SWI/SNF複合体の異常による発癌機構の解析、胃癌・消化管分化への影響の解明

研究課題名（英文） Dysfunction of the chromatin remodeling SWI/SNF complex effects the gastric tumorigenesis and gastrointestinal differentiation.

研究代表者

山道 信毅（YAMAMICHI NOBUTAKE）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30463897

研究成果の概要（和文）：胃癌の多様な組織型は、浸潤・転移能や患者の予後、治療の選択を決定する重要な因子である。胃癌組織型決定に Brm（Brm 型 SWI/SNF 複合体）が重要な役割を果たしていることを示唆する我々のこれまでの研究成果を踏まえ、Brm の制御を受ける *villin* 遺伝子を解析したところ、上流の発現制御領域に転写因子 Cdx2 が結合し、SWI/SNF 複合体と共役して発現が制御されていることが分かった。消化管分化に重要な遺伝子の多くは Cdx2 に制御されていることが知られているが、胃癌で生じる Brm の発現低下～欠失は SWI/SNF 複合体と Cdx2 の協調に異常を来たして Cdx2 下流の遺伝子群の発現を狂わせ、結果として多様な胃癌組織型が生じることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The histologic type of gastric cancer is quite important for prediction of the patient's prognosis, evaluating the risk of invasion and/or metastasis, selection of the anti-tumor therapy, etc. Based on our recent study showing a correlation between Brm-deficiency and undifferentiated status of gastric cancer, we analyzed the expression of *villin* gene and found that Brm-type chromatin-remodeling SWI/SNF complex cooperatively regulates *villin* expression with Cdx2. Brm-deficiency in gastric canceration should influence expression of many gastrointestinal genes regulated by Cdx2, a transcription factor essential for intestinal development and homeostasis. It is strongly suggested that the correlation between Brm-deficiency and various histologic features of gastric cancer is based on the interaction with Cdx2 and the Brm-type SWI/SNF complex.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：胃癌、腸上皮化生、エピジェネティクス、消化管分化、Cdx2、SWI/SNF 複合体、Brm、miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体は哺乳類では 10～12 の構成因子から成る約 1.4MDa のタンパク質複合体で、ATP の分解エ

ネルギーを使いクロマチン構造を変換することによって様々な遺伝子の発現を制御するエピジェネティクスの最重要分子の一つである。主任研究者は SWI/SNF 複合体の触媒

サブユニット Brm が胃癌において高頻度に欠失しており、胃癌の組織型によってその欠失率が大きく異なること、腸刷子縁の構成タンパク質 villin が Brm (Brm 型 SWI/SNF 複合体) によって発現制御を受けていることを、2007 年に報告した (*Cancer Research*, 67:10727-10735, 2007)。腸分化マーカー villin は組織特異性の高い細胞骨格タンパク質であり、正常胃粘膜では全く発現していないが、ピロリ菌感染によって生じる腸上皮化生に伴って胃粘膜に誘導されてくることが知られている (Moll R. *Virchows Arch* 1987;54:155)。

## 2. 研究の目的

胃癌は同じ消化管由来癌である大腸癌や食道癌と比べて多様性に富み、様々な組織型が存在している。我が国の分類では、胃癌の組織型は主に高分化型管状腺癌 (tub1)・中分化型管状腺癌 (tub2)・低分化型腺癌 (por)・印環細胞癌 (sig)・粘液癌 (muc)・乳頭腺癌 (pap) の 6 つに分類されるが、浸潤能・転移能や患者の予後、治療の選択に直結しており、胃癌の性質を規定する極めて重要な因子である。しかし、胃癌の組織型決定の機構は現在も殆ど解明されていない。

Brm 型 SWI/SNF 複合体が胃癌組織型と関連し、特に腸分化マーカーである villin の発現制御に関与するというこれまでの研究成果を踏まえ、さらに詳細な検討を目的として研究を行なった。

## 3. 研究の方法

ヒト villin 遺伝子について、5'-RACE 法・Primer walking (RT-PCR)・プライマー伸長法により転写開始点を決定し、プロモーター領域への結合転写因子の予測をもとに、*in vitro*での発現制御を詳細に解析する。その結果を踏まえて、臨床検体で詳細な解析を行なう。

## 4. 研究成果

本研究ではこれまでの研究成果を踏まえ、まず villin 遺伝子の発現制御解析を行なった。5'-RACE 法・Primer walking (RT-PCR)・プライマー伸長法によりヒト villin 遺伝子の転写開始点を決定し、その上流配列を解析すると、約 1kb 上流に高度に保存された領域を発見した。この約 45bp の領域には Cdx タンパク質 (Cdx1, Cdx2, Cdx4) の結合配列が重複しており、他に結合が予想される転写因子は認めなかった。そこで 30 種類の消化管由来細胞株を用いて villin・Cdx1・Cdx2・Cdx4 の発現解析を行なったところ、villin 発現細胞の殆どで Cdx2 のみが発現していた。Cdx2 の過剰発現と knock down を SW480 細胞に対して行なうと、それぞれ villin mRNA の増加

と減少が認められ、villin が Cdx2 に制御されることが確認された。また、villin 遺伝子上流領域の欠失変異を用いたルシフェラーゼアッセイを行なったところ、同定した高度保存領域が発現の主たる調節領域であり、かつ、それが Cdx2 依存性であることが示された。際に胃癌検体での発現解析を行なうと、villin を発現する全 39 症例で Cdx2 の発現部位が完全に一致したため、Cdx2 が villin の主要な発現調節因子であると結論した。

転写因子が特定の DNA 配列を認識して結合するためにはヌクレオソーム構造が開いている必要があり、そのために多くの転写因子はクロマチン構造変換因子と共役すると考えられている。そこで GST pull-down 法・免疫沈降法を用いて解析したところ、Cdx2 がクロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体 (特に Brm 型) と強く結合することが分かった。さらにクロマチン免疫沈降法を行なったところ、同定した高度保存領域に Cdx2 と SWI/SNF 複体の双方が動員されていることが確認された。Cdx2 制御下遺伝子には villin 以外にも *LI-cadherin* や *MUC2* など多くの腸分化マーカー遺伝子が存在しており、これらの制御も同様であることが予想される。上述の通り、我々は Brm (Brm 型 SWI/SNF 複合体) が胃癌で高頻度に欠失し、胃癌組織型と明瞭に相関することを報告しているが、本研究から、慢性萎縮性胃炎から腸上皮化生、胃癌発症への進展する過程で生じる Brm の発現欠失が Cdx2 制御下遺伝子の発現異常を来し、結果として胃癌の性質に影響していることが示唆された (*Exp Cell Research*, 315:1779-1789, 2009)。

我々はさらに、胃癌の組織型と深く関連する遺伝子のスクリーニングを行ない、胃癌組織型・消化管分化と関与している可能性の高い *Cathepsin E (CTSE)* 遺伝子を発見した (未発表データ)。作成した CTSE 遺伝子上流配列の欠失変異を用いたレポーターアッセイにより、発現に重要なプロモーター領域を同定している (未発表データ)。現在はこの配列に結合する可能性のある消化管分化に重要な転写因子を探索中である。また、これに加えて CTSE の癌化や消化管分化への影響を検証するために、CTSE を発現するレトロウイルスベクターを作製するとともに、様々な組織型の胃癌 (tub1, tub2, por, sig, muc, pap) の外科手術病理検体・内視鏡治療切除検体を使用し、CTSE の免疫染色を開始している。CTSE の発現は既に報告した Cdx2 の制御下にある villin と対照的であり、両遺伝子上流の検索により、組織型決定の鍵となる転写因子や制御機構が見付かる可能性があると考えている。

また、エピジェネティクスと発癌に関する付随研究として、日常臨床で頻用されるホル

マリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE 標本) における miRNA の検出系の樹立を平行して行なった。近年、miRNA は様々な病態に関与していることが明らかとなってきたが、胃癌・大腸癌をはじめとする消化器癌においても重要な役割を示唆する報告が相次いでいる。そこで本付随研究では miRNA 検出系の臨床応用を視野に、胃癌にくらべ均一性が高く、病変の評価が容易な大腸癌手術切除検体を用いて研究を開始した。その結果、Locked nucleic acid (LNA) と CSA-II 法の組み合わせた *in situ hybridization* 法 (ISH) により、FFPE 標本における miRNA の検出に成功した (*Clin Cancer Res.* 15:4009-4016. 2009)。今後、胃癌におけるエピジェネティクス研究において、LNA と CSA-II を用いた ISH 法を、基礎・臨床の両面から応用してゆく予定である。

#### 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 6 件)

① Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for colorectal epithelial neoplasms. Niimi K, Fujishiro M, Kodashima S, Goto O, Ono S, Hirano K, Minatsuki C, Yamamichi N, Koike K. *Endoscopy*. 2010;42:723-729. (査読有り)

② A second-look endoscopy after endoscopic submucosal dissection for gastric epithelial neoplasm may be unnecessary: a retrospective analysis of postendoscopic submucosal dissection bleeding. Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S, Niimi K, Hirano K, Yamamichi N, Koike K. *Gastrointest Endosc.* 2010;71:241-248. (査読有り)

③ Long-term outcomes of endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal squamous cell neoplasms. Ono S, Fujishiro M, Niimi K, Goto O, Kodashima S, Yamamichi N, Omata M. *Gastrointest Endosc.* 2009;70:860-866. (査読有り)

④ Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts. Mizutani T, Ishizaka A, Tomizawa M, Okazaki T, Yamamichi N, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Iba H. *J Virol.* 2009;83:11569-11580. (査読有り)

⑤ Locked nucleic acid *in situ* hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, Fujita S, Mizutani T, Furukawa C, Fujishiro M, Ichinose M, Shioyama K, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4009-4016. (査読有り)

⑥ Cdx2 and the Brm-type SWI/SNF complex cooperatively regulate villin expression in gastrointestinal cells. Yamamichi N, Inada K, Furukawa C, Sakurai K, Tando T, Ishizaka A, Haraguchi T, Mizutani T, Fujishiro M, Shimomura R, Oka M, Ichinose M, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H. *Exp Cell Res.* 2009;315:1779-1789. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

① Cdx2 と SWI/SNF 複合体による腸上皮化生進展の分子機構——villin 遺伝子に着目して (第 9 回消化器病フォーラム、2010. 11. 20、東京)

② クロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体の胃癌における発現異常 触媒サブユニット Brm の発現欠失、組織型・分化マーカーとの関係。 (JDDW 2009、2009. 10. 13、京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○ 取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他] 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山道 信毅 (YAMAMICHI NOBUTAKE)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30463897

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし