

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860232

研究課題名(和文)クロマチンリモデリング因子ARID1A発現消失の胃癌における意義の解明

研究課題名(英文)Significance of expression loss of chromatin remodeler ARID1A in gastric cancer

研究代表者

阿部 浩幸 (Abe, Hiroyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40708632

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)：胃癌におけるクロマチンリモデリング遺伝子ARID1Aの発現消失の意義をサブタイプ(EBV関連胃癌、MSI-H胃癌、その他)に分けて解析した。EBV陰性でMSI-Hでない胃癌細胞株を用いたARID1Aノックダウンによる網羅的遺伝子発現解析により、細胞増殖や細胞周期に関わる遺伝子の発現が変化しやすいことが判明した。またMTT assayによりARID1Aノックダウンが細胞増殖を抑制することが確認された。またARID1Aノックダウンにより発現が上昇する遺伝子のうち一部をARID1Aと同時にノックダウンすると、感染効率が下がることが判明し、ARID1A発現低下がEBV関連胃癌の成立に重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Significance of ARID1A (one of the chromatin remodeling gene) in gastric cancer was analyzed in each subtype of gastric cancer (EBV, MSI-H, and the others). Using gastric cancer cell lines, mRNA microarray revealed expression of genes related to cell proliferation or cell cycle are frequently altered by knockdown of ARID1A. Knockdown of ARID1A suppressed proliferation of gastric cancer cell lines in MTT assay. Knockdown of one gene which is overexpressed by knockdown of ARID1A resulted in decrease of infection efficiency of EBV into gastric cancer cell lines. The result indicates the importance of ARID1A in the establishment of EBV-associated gastric cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：胃癌 ARID1A EBV

1. 研究開始当初の背景

ARID1A はクロマチンリモデリング複合体 SWI/SNF を構成するサブユニットの一つで、卵巣明細胞癌等の様々な癌で遺伝子変異が報告されている。胃癌ではマイクロサテライト不安定性(MSI-H)胃癌及び Epstein-Barr virus(EBV)関連胃癌において高頻度な遺伝子変異と発現消失が報告されたが、遺伝子変異が特定のサブタイプに多い理由や ARID1A 変異の発癌における役割には不明な点が多かった。

2. 研究の目的

胃癌における ARID1A 変異及び発現消失の意義をサブタイプ(MSI-H 胃癌、EBV 関連胃癌、その他)に分けて解析し、マイクロサテライト不安定性やEBV 感染と ARID1A との関係性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)胃癌細胞株における ARID1A ノックダウンとマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析

EBV 陰性で MSI でもない一般の胃癌細胞株 MKN74 及び NUGC3 を用いて siRNA による ARID1A ノックダウンを行い、48 時間後に RNA を回収した。コントロールの siRNA を用いた場合の RNA と比較した二色法による mRNA 発現マイクロアレイ(東レ 3D-Gene)を行い、ARID1A ノックダウンにより発現が上昇する遺伝子や低下する遺伝子を抽出した。

得られた遺伝子リストで Gene Ontology 解析を行い、ARID1A ノックダウンで細胞に生じる変化について検討した。

EBV 関連胃癌と ARID1A との関係を検討するため、the Cancer Genome Atlas (TCGA)による胃癌網羅的シーケンスの公開データ(Nature 2014)から ARID1A 変異あり症例と変異なし症例の間で発現量の異なる遺伝子群を抽出し、細胞株のマイクロアレイのデータと比較して共通する遺伝子を抽出した。

(2)ARID1A 発現低下が EBV 感染効率に与える影響の解析

胃癌細胞株には EBV 陽性リンパ腫由来細胞株 Akata を接触させることにより、比較的効率よく EBV を感染させることができることが報告されている(Imai S et al. J Virol 1998)。我々は ARID1A をノックダウンしたのちに Akata 法で EBV を感染させると EBV 感染効率が上昇することを発見した(unpublished data)。そこで上記(1)で抽出した ARID1A ノックダウンにより発現が上昇する遺伝子を選び、ARID1A と同時にノックダウンすることにより EBV 感染効率に変化が生じるか否かを検討した。

(3)ARID1A ノックダウンが DNA メチル化に与える影響の検討

EBV 関連胃癌は高度な DNA メチル化によるエ

ピジェネティックな変化が特徴的である(Matsusaka K et al. Cancer Res 2011)が、ARID1A 発現とメチル化の関係については良く分かっていない。そこで ARID1A ノックダウンによる DNA メチル化関連遺伝子の変化について検討した。具體的には、DNA メチル化の維持に重要な遺伝子であり、EBV 関連胃癌ではウイルスの潜伏感染遺伝子 LMP2A により発現が上昇することが報告されている DNTM1(Hino R et al. Cancer Res 2009)の発現を RT-PCR 法で調べた。

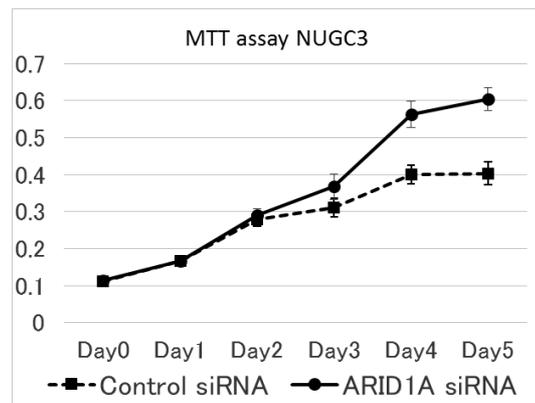
4. 研究成果

(1)ARID1A ノックダウンによる胃癌細胞株の遺伝子発現変化

胃癌細胞株 MKN74 及び NUGC3 で ARID1A をノックダウンしたところ、2 細胞株共通でコントロール siRNA と比べ発現の上昇した遺伝子 205 種類、発現の低下した遺伝子 42 種類が同定された。ARID1A 遺伝子産物が、クロマチン構造を開く働きを有する SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の一部を構成することを考えると、発現が上昇する遺伝子の方が多数認められたことは意外であった。

発現が上昇した遺伝子群で Gene Ontology 解析を行ったところ、細胞周期や細胞分裂、DNA 複製や DNA 構造の調節に関連する遺伝子が集積していることが判明した。

ARID1A ノックダウンにより細胞増殖が亢進することは既に複数のグループにより報告されていたが、このことを裏打ちする結果であった。細胞増殖の亢進は我々の検討(MTT assay)でも確認された。



(図1) ARID1A ノックダウンと細胞増殖

TCGA による胃癌網羅的シーケンスの公開データにおいて、EBV 関連胃癌の ARID1A 変異あり症例が変異なし症例に比べ発現が上昇していた遺伝子群と、今回の細胞株の ARID1A ノックダウンで発現が上昇していた遺伝子群とを比較したところ、共通する遺伝子として Lamin B1 (LMNB1)が見つかった。LMNB1 は核膜を構成するタンパクの一つであり、細胞増殖への関与も報告されている。

(2)ARID1A 発現低下が EBV 感染効率に与える

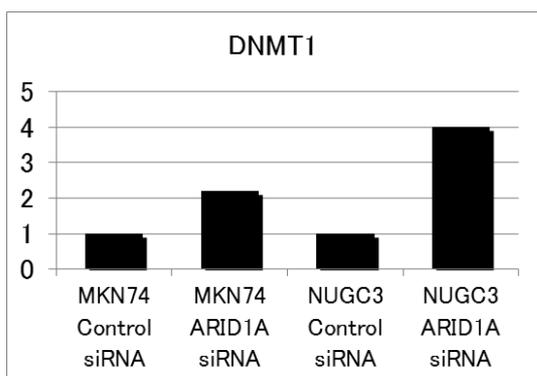
影響の解析

上記(1)の解析で、EBV 関連胃癌における ARID1A 発現低下により発現が上昇する遺伝子の一つとして LMNB1 が見つかった。そこで LMNB1 を ARID1A と同時にノックダウンしたところ、ARID1A 単独のノックダウンにより認められた EBV 感染効率上昇が打ち消されることが判明した。但し、LMNB1 のノックダウン自体が比較的強い細胞増殖抑制効果を有しており、Akata 法による EBV 感染期間(1 日~2 日)における胃癌細胞自体の細胞増殖抑制が影響している可能性は否定できず、結果の解釈には注意が必要と考えている。

(注)ARID1A ノックダウンでも細胞増殖抑制効果が見られるが(上記図 1 を参照)、細胞増殖抑制効果は 4 日目以降に顕在化しており、EBV 感染期間(1 - 2 日間)では胃癌細胞の細胞増殖自体が感染効率に影響したとは考えにくい。

(4)ARID1A ノックダウンによる DNA メチル化関連遺伝子の発現への影響

胃癌細胞株 MKN74 と NUGC3 を用いて、ARID1A ノックダウン後 48 時間の DNMT1 発現変化を RT-PCR 法で検討した。その結果、いずれの細胞株においても ARID1A ノックダウンにより DNMT1 の発現が mRNA レベルで上昇することが確認された(図 2)。ARID1A 発現低下が DNA メチル化においても何らかの意義を有すると考えられた。



(図 2) ARID1A ノックダウンと DNMT1 発現

(補足)MSI-H 胃癌の whole section における ARID1A 発現の clonal loss

今回の研究期間ではマイクロサテライト不安定性胃癌における ARID1A について十分な検討は行えなかったが、少数例の検討では、腫瘍内の一部の領域のみ ARID1A の発現が消失した領域を有する症例が EBV 関連胃癌と比較して高頻度に認められていた。MSI-H 胃癌における ARID1A の変異と発現消失はミスマッチ修復異常に伴う二次的な変化であり、発癌の初期ではなく癌の進行に伴い二次的に生じる変化と考えられた。

TCGA やその他の胃癌網羅的シーケンスによる報告のデータを参照すると、EBV 関連胃

癌の ARID1A 変異の多くが点突然変異による stop codon 出現(truncating mutation)であるのに対し、MSI-H 胃癌の ARID1A 変異の多くが frameshift mutation であった。このデータも ARID1A 遺伝子変異がマイクロサテライト不安定性の原因ではなく結果であることを示唆している。

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 4 件)

1. Abe H, Morikawa T, Saito R, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. In Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma a high density of CD66b-positive tumor-associated neutrophils is associated with intestinal-type histology and low frequency of lymph node metastasis. *Virchows Arch* 掲載確定(印刷中)

2. Abe H, Kaneda A, Fukayama M. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma: Use of Host Cell Machineries and Somatic Gene Mutations. *Pathobiology* 82:212-23 2015.

3. Abe H, Hayashi A, Kunita A, Sakamoto Y, Hasegawa K, Shibahara J, Kokudo N, Fukayama M. Altered expression of AT-rich interactive domain 1A in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8:2763-70 2015.

4. 阿部浩幸, 深山正久. 胃癌と EB ウイルス. *臨床消化器内科* 30:769-772 2015.

[学会発表](計 5 件)

1. Abe H, Hayashi A, Kunita A, Sakamoto Y, Hasegawa K, Shibahara J, Kokudo N, Fukayama M. CD66b-Positive Tumor-Associated Neutrophils in Epstein-Barr Virus Associated Gastric Carcinoma: A Comparative Study with CD8-Positive Cytotoxic T-Lymphocytes. Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology. May 15th 2016. シアトル(アメリカ合衆国)

2. Abe H. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma: the latest update. The 10th Japan-Korea Gastrointestinal Pathology Seminar. Feb 20th 2016. 東京(日本)

3. 阿部浩幸, 国田朱子, 日向宗利, 牛久綾, 深山正久. EBV 関連胃癌における miRNA 発現と exosome を介した細胞外分泌. 第 12 回 EB ウイルス研究会. 2015 年 7 月 20 日. ビッグ

ハート出雲(島根県出雲市).

4. 阿部浩幸, 森川鉄平, 西東瑠璃, 深山正久. EBV 関連胃癌における好中球浸潤は組織型、深達度、及びリンパ節転移と相関する. 第 104 回日本病理学会総会. 2015 年 5 月 1 日. 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市).

5. 阿部浩幸, 林玲匡, 国田朱子, 深山正久. EBV 関連胃癌における ARID1A 発現消失はヒストンアセチル化の消失と相関する. 第 103 回日本病理学会総会. 2014 年 4 月 25 日. 広島国際会議場(広島県広島市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿部 浩幸 (ABE HIROYUKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40708632