

平成22年 5月26日現在

研究種目： 特定領域研究

研究期間： 2005～2009

課題番号： 17013066

研究課題名（和文）胃がん発症関連遺伝子のゲノムの解析と分子病態の解明

研究課題名（英文）Genetic approach to elucidate roles of stomach cancer related genes

研究代表者

山本 健 (YAMAMOTO KEN)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60274528

研究成果の概要（和文）：胃がん発症に関連する遺伝子を明らかにするために、連鎖解析と相関解析を実施し、21番染色体上に同定されたSTCH遺伝子の機能解析を行った。STCHが小胞体局在分子であること、細胞死に関連する分子であることを明らかにした。さらに胃がん細胞にSTCH遺伝子変異が生じていること、この変異が細胞死に抵抗性であることを明らかにした。また、胃がんにおけるゲノム構造異常を分析し、新しい胃がん関連遺伝子候補を複数明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Genome-wide linkage study followed by association analyses on candidate chromosomes revealed stomach cancer-related gene, STCH, on chromosome 21. We indicated that STCH localizes ER and is involved in apoptosis pathway. Somatic mutation was identified in STCH gene in stomach cancer. We demonstrated that the STCH mutation endows anti-apoptotic property to cells. We also identified novel chromosomal aberrations of stomach cancer which will be important targets in future research for better understanding of stomach cancer pathogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	12,800,000	0	12,800,000
2006年度	12,800,000	0	12,800,000
2007年度	12,800,000	0	12,800,000
2008年度	11,500,000	0	11,500,000
2009年度	11,500,000	0	11,500,000
総計	61,400,000	0	61,400,000

研究分野：ゲノム医科学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：がん，ゲノム，遺伝子多型，相関解析，連鎖解析，細胞死，リジンメチル化

1. 研究開始当初の背景

我が国における胃がんは、死亡率の減少を認めるものの、未だに死亡の主要原因疾患であり、罹患率は横ばい傾向にある。胃がんの発症には、複数の遺伝要因と環境要因の多段

階にわたる相互作用が関与していると考えられ、疫学調査を行って、どのような環境要因が胃がん発症のリスクとなるかを明らかにすると同時に、胃がん発症の遺伝要因を解明することは、新しい検査法や診療法を開発

するための基盤を築くのみならず、何よりも個々人の遺伝や環境の背景に基づく予防法を確立することに繋がり有意義である。

2. 研究の目的

本研究課題では、胃癌発症に関わる遺伝子について、1) これまでの罹患同胞対全ゲノムアプローチにより得られた胃癌発症に関連する候補染色体領域に着目し、特に、既に相関検定が終了し、胃癌との統計学的な関連が示唆された 21 番染色体に位置する STCH 遺伝子の機能解析を分子・細胞・個体レベルで進めること、2) 胃癌細胞における染色体構造変異を、より解像度の高い高密度 SNP アレイを用いてゲノム解析し、新規のがん抑制候補遺伝子を同定して発がんとの関連を明らかにすること、3) がん発症に深く関与する遺伝子転写制御のうち、ヒストンメチル化酵素に焦点を当て、その新しい機能を解明すること、の3つのアプローチから推し進め、胃癌発症のゲノムの背景の一端を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) STCH 遺伝子の解析

TN ペア検体が利用可能な 56 検体を対象として、STCH の5つのエクソンを Sequence し、体細胞変異の有無について検討し、変異体における機能変化を明らかにする。

STCH 分子の一次構造は、HSP70 分子と相同性を有する。しかしながら、HSP70 とは異なり、C 末側のペプチド結合ドメインを欠き、また、熱ショックでは発現誘導されない。STCH 遺伝子の誘導機構は不明であるが、コアプロモーター領域に種を越えて保存された配列が存在し、Yeast では、その配列に結合する転写因子が知られていることから、ヒトにおけるオーソログをクローニングし、STCH 遺伝子転写制御との関連を解析する。STCH 分子と細胞増殖との関連を検討するために、安定発現細胞株を樹立し、細胞死との関連を検討する。

Conventional な STCH 遺伝子破壊マウスを作成し、個体レベルでの発がんについて解析をすすめる。

(2) 高密度 SNP アレイを用いた胃癌における染色体構造変化の解析

発がん過程で生じるがん遺伝子の増幅あるいはがん抑制遺伝子の欠失を高解像度で検出し、新規の胃癌関連遺伝子を同定する目的で、高密度 SNP アレイを用いた染色体コピー数の解析を行う。これには、SNP のデータ取得率が良く、安定した結果が得られるイルミナ社の Hap317K SNP アレイを用い、25 検体の正常部と腫瘍部の DNA を対象とする。得られた SNP データについて、SNP プローブ蛍光強度、および、アレルの相対頻度を、「BeadStudio Version3.0」によって算出し、蛍光強度については、がん部位と正常部位と

の比を取ることによって、胃癌細胞でのゲノム構造異常をプロファイリングする。

(3) ヒストンメチル化酵素 SET9 の機能解析

SET9 による転写制御機構の新しい側面を解明するために、PCAF の化学修飾とそれによる機能変化を主として生化学的に解析する。

4. 研究成果

(1) STCH 遺伝子の解析

STCH 遺伝子は、1994 年に HSP70 ファミリーの 1 つとして報告されたが、その分子機能は不明のままであった。まず、発現の組織分布および細胞内局在を検討したところ、臓器では、心筋や骨格筋を除き、ユビキタスな発現を認めた。また、胃癌高分化型腺がん 15 検体を用い、正常部を対照に発現変化を検討したところ、胃癌細胞においては約 3 分の 1 に低下していた ($p=0.007$)。STCH 分子は、細胞内では小胞体に局在し、HSP70 とは異なる分布を示した。STCH 分子は、HSP70 とは異なり、N 末側に 22 アミノ酸から成る疎水性のリーダー配列を有している。リーダー配列を欠いた変異 STCH 分子 (DL-STCH) は細胞質に均一に分布することから、この 22 アミノ酸が小胞体局在に必須であることが判明した。

STCH の機能を解析するために複数の安定過剰発現細胞を 293 細胞において樹立した (STCH-293s)。STCH-293s は、正常培地において、経時的細胞数変化、BrdU 取り込み、のいずれもコントロール細胞と比較して差異を示さなかったが、TRAIL によって誘導される細胞死に対して高感受性を示した。この細胞死には、カスパー 3、9 の活性化が伴っており、Pancaspase 阻害剤で抑制された。また、小胞体局在シグナルを欠く DL-STCH の過剰発現細胞株は、TRAIL による細胞死感受性を獲得せず、STCH の小胞体局在が細胞死感受性に必須であることが明らかとなった。

また、56 組の TN ペア DNA を対象として、胃癌細胞での STCH 遺伝子体細胞変異を検討したところ、1 ペアにヘテロ体細胞変異 668del112bp (del1223V-226L) を認めた。del1223V-226L は、STCH 分子の ATP 結合ドメインのうち、HSP70 ファミリー間で保存された Phosphate2 部位の 4 アミノ酸欠損である。変異 STCH 分子の ATP 結合能を野生型と比較したところ、著しく低下しており、機能喪失型の変異であることが明らかとなった。さらに、del1223V-226L-STCH を安定発現した細胞株では、野生型 STCH の過剰発現細胞株にみられた TRAIL に対する細胞死感受性が低下しており、STCH の細胞死感受性獲得に、ATP 結合ドメインが重要であることが示された。

胃癌細胞では発現低下が認められること、過剰発現によって TRAIL による細胞死感受性を獲得すること、また機能喪失型体細胞変異が胃癌細胞で認められ、変異分子では

細胞死感受性低下をもたらすこと、などより、STCH 分子が細胞死のシグナルに関わる因子であり、遺伝子多型による遺伝子発現量の個体間の差異が、発がん感受性を規定する遺伝背景である可能性が示唆される。

これまでの申請者の研究においては、STCH の遺伝子多型が発現量に影響を及ぼしているという決定的な証拠は得られていない。細胞に対する何らかの外的刺激が伴って初めて遺伝子多型に規定された発現量の差が生じる可能性が否定できない。これまで STCH 遺伝子の発現を誘導する外的刺激は明らかにされておらず、STCH 遺伝子プロモーター領域の解析を進めた。ヒト STCH 遺伝子の-10 から-30 にかけての塩基配列は種を超えて保存されている。この領域が STCH の発現を制御する転写因子の結合部位と想定し、既存の転写因子コンセンサスを探索したところ、Yeast で知られる Stress response element (STRE) を見出した。Yeast では、STRE に結合する転写因子が同定されており、ヒトにおけるオーソログは EGR である。EGR には EGR1-4 が知られており、レポーターアッセイによって、STCH プロモーターとの機能的相互作用を検討したところ、特に、EGR1, 3 が STCH 遺伝子発現を活性化することが明らかとなった。また、Band shift assay によっても、in vitro で STCH プロモーターに結合することを明らかにした。EGR 1 は、胃がん細胞株にピロリ菌を感染させた時に強く誘導される遺伝子として報告されている。したがって、ピロリ菌感染が、EGR を介して STCH の遺伝子発現を誘導していることが想定され、今後明らかにすべき課題であろう。

また、遺伝子欠損マウスは、ホモ欠損マウスの胎生致死が示され、ヘテロマウスでの自然発癌は認められなかった。したがって、明確な癌抑制遺伝子としての機能は否定的であった。

(2) 胃がんにおけるゲノム構造変化の解析

高密度 SNP アレイによって、より解像度の高いゲノム構造変化を捉えることが可能である。新規がん抑制遺伝子を最終的に同定する目的で、25 組の TN ペア DNA を用いて研究を進めた。LOH や染色体コピー数の変化は、全染色体領域で認められた。染色体短腕または長腕全体に及ぶ染色体コピー数の変化は 7p, 8p, 8q で高頻度に認められた (>25%)。限局的な狭い染色体領域の LOH やコピー数の変化は、3p14.2, 4p16.1, 4q22, 6q26, 9p24.1-9p23, 16q23.2, 20p12.1 に高頻度に認められ、これらは common fragile site として知られる FRA3B, FRA4, FRA6E, FRA16D を含んでいた。一方、これまで LOH が知られていない複数の遺伝子 (シグナル関連分子、転写因子、タンパク分解酵素などをコードしている) を約 10%程度の頻度で検出した。今

回同定された幾つかの新規がん抑制遺伝子候補は、胃発がんのメカニズムを知る上で有用な研究材料となるであろう。

(3) ヒストンメチル化酵素 SET9 の機能解析

リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化などのヒストンのさまざまな共有結合修飾は、高度に組織化されたクロマチンの機能変化に関与し、発癌をはじめ、多くの基本的な生命現象に影響を与える。ヒストン H3-K4, -K9, -K27, -K36, -K79, H4-K20 に特異的なヒストンメチル化酵素 (HMTase) がこれまでに多数同定され、その機能の観点から転写活性あるいは転写抑制に区別されている。最近、複数のグループにより Set9, Smyd2, G9a などの HMTase が非ヒストンタンパクをターゲットとし、リジンメチル化を介して機能制御を行うことを報告した。このように、リジンメチル化に対する関心はもはやヒストンにとどまっではない。SET ドメインを持つ HMTase の中でも、Set9 はその基質認識において特徴的な性質を有している。Set9 は元来、H3-K4 特異的な HMTase として同定されたが、この Set9 は遊離ヒストン H3-K4 に対しては強い活性を持つにもかかわらず、ヌクレオソームヒストン H3-K4 に対しては活性を有していなかった。その一方で Set9 は活性化因子による転写を促進することが示されたが、これは Set9 が非ヒストンタンパクの機能を制御し、転写を活性化する役割を持つことを示唆している。本研究において、Set9 が p300/CBP-associated factor (PCAF) の複数のリジン残基を *In vitro* および *In vivo* でメチル化することを同定した。本研究では、PCAF メチル化部位の詳細なマッピングを行い、新たに見出されたメチル化部位周囲のアミノ酸配列が既知の Set9 認識配列とは異なることを示した。すなわち、Set9 がリジンメチル化を介して PCAF の機能を制御している可能性、ならびに更なる Set9 ターゲットが存在する可能性を示唆した。

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 8 件、すべて査読あり)

① Shiota M, Yokomizo A, Tada Y, Uchiyama T, Inokuchi J, Tatsugami K, Kuroiwa K, Yamamoto K, Seki N, Naito S, P300/CBP-associated factor regulates Y-box binding protein-1 expression and promotes cancer cell growth, cancer invasion and drug resistance. *Cancer Science*, 2010 in press

② Masatsugu T, Yamamoto K. Multiple lysine methylation of PCAF by Set9 methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Mar 27;381(1):22-26.

③ Yamagata N, Furuno K, Sonoda M,

Sugimura H, Yamamoto K. Stomach cancer-derived del223V-226L mutation of the STCH gene causes loss of sensitization to TRAIL-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Nov 21;376(3):499-503.

④ Yokomizo A, Yamamoto K, Kinukawa N, Tsunoda T, Koga H, Naito S. Association analysis of glutathione-S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism with urothelial cancer susceptibility and myelosuppression after M-VAC chemotherapy. *Int J Urol*. 2007 Jun;14(6):500-504.

⑤ Shide K, Shimoda K, Kamezaki K, Kakumitsu H, Kumano T, Numata A, Ishikawa F, Takenaka K, Yamamoto K, Matsuda T, Harada M. Tyk2 mutation homologous to V617F Jak2 is not found in essential thrombocythaemia, although it induces constitutive signaling and growth factor independence. *Leuk Res*. 2007 Aug;31(8):1077-1084.

⑥ Furuno K, Masatsugu T, Sonoda M, Sasazuki T, Yamamoto K. Association of Polycomb group SUZ12 with WD-repeat protein MEP50 that binds to histone H2A selectively in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jul 7; 345 (3): 1051-1058.

⑦ Aoki M, Yamamoto K, Ohyama S, Yamamura Y, Takenoshita S, Sugano K, Minamoto T, Kitajima M, Sugimura H, Shimada S, Noshiro H, Hiratsuka M, Sairenji M, Ninomiya I, Yano M, Uesaka K, Matsuno S, Maehara Y, Aikou T, Sasazuki T. A genetic variant in the gene encoding the stress70 protein chaperone family member STCH is associated with gastric cancer in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Sep 23; 335 (2): 566-574.

⑧ Aoki M, Yamamura Y, Noshiro H, Sakai K, Yokota J, Kohno T, Tokino T, Ishida S, Ohyama S, Ninomiya I, Uesaka K, Kitajima M, Shimada S, Matsuno S, Yano M, Hiratsuka M, Sugimura H, Itoh F, Minamoto T, Maehara Y, Takenoshita S, Aikou T, Katai H, Yoshimura K, Takahashi T, Akagi K, Sairenji M, Yamamoto K, Sasazuki T. A full genome scan for gastric cancer. *J Med Genet*. 2005 Jan; 42 (1): 83-87.

[学会発表] (計9件)

① 政次俊宏, 山本健, 宮崎耕治 (2009, 10/1) メチル化酵素 Set9 による PCAF 分子リジン残基のメチル化
第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜.

② T. Masatsugu and K. Yamamoto. (2008, 10/28-30).

PCAF acetyltransferase activity is

regulated by Set9-mediated methylation.
第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋.

③ 古野憲司, 菅野康吉, 山本健 (2007, 9/12-15).

Illumina317KSNP アレイを用いた胃癌細胞染色体の遺伝子異常プロファイリング.

日本人類遺伝学会第 52 回大会, 東京.

④ 山方伸茂, 山本健 (2007, 10/3-5).

胃癌感受性遺伝子 STCH の発現解析.

第 66 回日本癌学会学術総会, 横浜.

⑤ 政次俊宏, 山本健 (2006, 9/28-30).

E2F6 転写制御に関わる SUZ12-EZH2 複合体.

第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜.

⑥ 山方伸茂, 山本健 (2006, 9/28-30).

新規小胞体局在分子 STCH の機能解析.

第 65 回日本癌学会学術総会, 横浜.

⑦ M. Aoki, K. Yamamoto, T. Sasazuki. (2005, 4/18-21)

Genome-wide scan for gastric cancer by affected sibpair method.

Human Genome Meeting 2005, Kyoto.

⑧ 山本健. (2005, 6/24-25)

罹患同胞対全ゲノム連鎖解析による胃がん発症関連遺伝子の探索.

第 11 回日本家族性腫瘍学会学術集会ワークショップ, 東京.

⑨ 山本健. (2005, 9/29)

罹患同胞対連鎖解析による胃がん発症関連遺伝子の探索.

第 4 回北陸ポストゲノム研究フォーラム, 金沢.

[図書] (計4件)

① 山本健. 2009.

大腸がんハイリスクと遺伝子多型.

大腸癌 Frontier vol.2, No.1, 17-22.

② 山本健. 2008.

癌における大規模 SNP 関連解析の現状.

医学のあゆみ, 225, 861-865.

③ 山本健. 2008.

全ゲノム関連解析と大腸癌発症関連遺伝子多型.

Cancer Frontier, 10, 116-122

④ 山本健. 2005.

全ゲノムを対象とした胃がん発症を規定する遺伝要因の探索.

福岡医学雑誌, 96, 25-33.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本健 (YAMAMOTO KEN)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号: 60274528

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: