

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08456

研究課題名(和文) 胃がんにおけるCIMP誘発メカニズムの解明

研究課題名(英文) CpG island methylator phenotype is induced by SWI/SNF defects in gastric cancers

研究代表者

山田 晴美 (Yamada, Harumi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：10769425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SWI/SNF複合体、なかでもARID1Aの機能異常がCIMP誘発の原因になっているのかを明らかにすることを目的とした。293FT細胞およびGES1細胞を用いてARID1Aノックアウト細胞を樹立し、ゲノム網羅的メチル化解析を行ったところ、ARID1A KOによりCpGアイランド内外のCpG部位において異常メチル化が誘発されることが示された。さらにChIP-seqにより、親細胞で元々H3K27me3が付いていた部位およびARID1A不活化によりH3K27me3が増加した部位に異常メチル化が誘発されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CIMPは予後や薬剤感受性など癌の臨床的特徴と相関し、癌治療戦略において重要な形質である。しかし、膠芽腫や大腸癌を除く癌では、その誘発機構は不明である。ARID1Aはがん抑制遺伝子として広く知られており、胃がんをはじめとする様々ながんにおいて、予後との関連や治療標的としての報告が多数存在する。しかしながら、CIMP誘発の原因遺伝子としての報告はなかった。

本研究により、ARID1A機能異常が胃がんにおけるCIMP誘発の一因となっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mutations of SWI/SNF components, especially ARID1A, was associated with the CIMP, as well as EBV infection, in gastric cancers, and also in uterine endometrial and colorectal cancers, which are not affected by EBV infection. Genome-wide DNA methylation analysis showed that ARID1A knockout (KO) in cultured 293FT cells and gastric epithelial cells, GES1, induced aberrant DNA methylation of a substantial number of CpG sites. DNA methylation was induced at genomic regions with high levels of pre-existing histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and those with acquired H3K27me3 by ARID1A KO. These results showed that the ARID1A mutation induced aberrant DNA methylation, and this is likely to be one of the potential mechanisms of CIMP induction.

研究分野：がんエピジェネティクス

キーワード：CIMP DNAメチル化 ARID1A クロマチンリモデリング エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃がんなどの炎症関連がんにおいては、多数の遺伝子がメチル化されている状態、即ち、CpG アイランドメチル化形質 (CpG island methylator phenotype ; CIMP) は、予後や治療効果と関連することが知られている。一方で、その形成メカニズムは十分に解明されていない。CIMP は、予後や薬剤感受性など癌の臨床的特徴と相関し、癌治療戦略において重要な形質である。しかし、膠芽腫や大腸癌を除く癌では、その誘発機構は不明である。

胃癌では、EBV 関連胃癌は高度な CIMP を示すことが多く、クロマチンリモデリング因子 SWI / SNF 複合体の構成因子のひとつである *ARID1A* の変異頻度が高い。しかし、SWI / SNF 複合体の機能異常が CIMP を誘発するののかについては明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、SWI / SNF 複合体、なかでも *ARID1A* の機能異常が CIMP 誘発の原因になっているのかを明らかにすることを目的とする。さらにその分子メカニズムを、遺伝子のメチル化感受性の変化およびメチル化調節因子の変化に着目して解明する。

3. 研究の方法

(1) *ARID1A* ノックアウト細胞の樹立

ゲノム編集に適し、DNA メチル化されうる CpG アイランドが多数残っている 293FT 細胞 (ヒト胎児由来腎臓上皮細胞) を用いて、CRISPR-Cas9 システムにより *ARID1A* のノックアウト (*ARID1A* KO) 細胞を樹立する。より強い異常メチル化誘発を観察するために、長期間にわたり培養を継続する。また、GES1 細胞 (胃正常細胞株) を用いて同様に *ARID1A* KO 細胞を樹立する。

(2) *ARID1A* ノックアウト細胞のゲノム網羅的メチル化解析および発現解析

上記で樹立したそれぞれのゲノム編集細胞において、Infinium MethylationEPIC BeadChip アレイによるゲノム網羅的メチル化解析を行い、*ARID1A* ノックアウトにより異常メチル化が誘発されるかどうかを明らかにする。また、ゲノム網羅的発現解析も行う。

(3) *ARID1A* ノックアウト細胞におけるメチル化調節因子の解析

ARID1A ノックアウト細胞におけるメチル化調節因子の発現変化を RT-PCR 及び Western Blot 法により解析する。

(4) *ARID1A* ノックアウト細胞におけるメチル化標的領域クロマチンの変化の解析

ARID1A ノックアウト細胞における、DNA メチル化プレマーク H3K27me3 の変化を ChIP-seq 法により解析する。

4. 研究成果

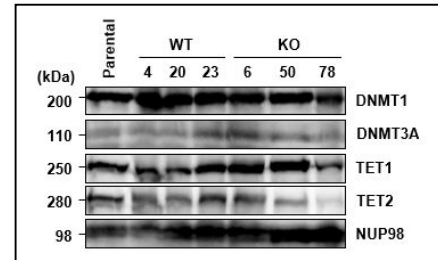
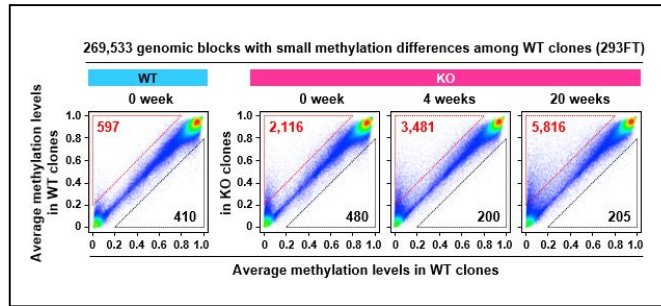
【令和元年度】

293FT 細胞を用いて、CRISPR-Cas9 システムにより *ARID1A* のノックアウト (KO) 細胞を 4 株樹立し、20 週にわたり長期培養を行った。親クローン 1 株、野生型 (WT) クローン 3 株および KO

クローン 3 株につき、培養開始後 0、4、20 週時点でゲノム網羅的メチル化解析を行った。その結果、KO クローンでは培養期間依存的にメチル化レベルが上昇 (>0.2) するゲノム領域が多いことが分かった (0 週:2,116、4 週後:3,481、20 週後:5,816 領域)。

以上の結果から、ARID1A の不活化により異常 DNA メチル化が誘発されることを明らかにした。

次に、ARID1A 不活化による CIMP 誘発の分子メカニズムを解明するために、ARID1A KO 細胞における DNA メチル化関連因子 DNMT と TET の mRNA の発現変化を調べたところ、発現レベルは変化しないことが分かった。

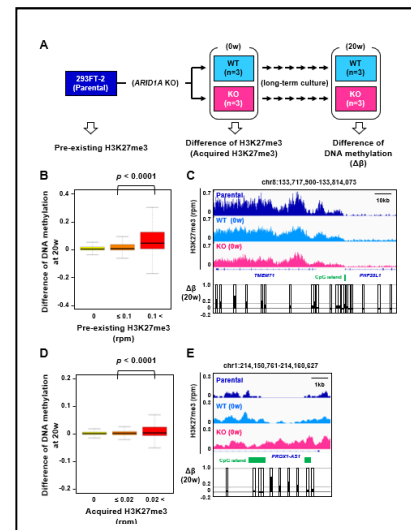


【令和 2 年度】

ARID1A 不活化による CIMP 誘発の分子メカニズムを解明するために、DNA メチル化のプレマークである H3K27me3 の局在変化を ChIP-seq 法により解析した。その結果、ARID1A ノックアウトにより H3K27me3 レベルが増加し、そのような領域で DNA メチル化が誘発されやすいことがわかった。さらに、ゲノム網羅的発現解析では、エピジェネティック制御因子には大きな変化がないことがわかった。

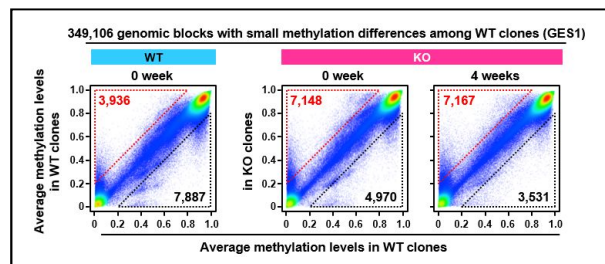
また、公的データベースを使用した解析により、胃がん以外に子宮内膜がんや大腸がんでも ARID1A 不活化と CIMP に相関があることがわかった。

以上の結果から、ARID1A の不活化により H3K27me3 の局在変化が起き、H3K27me3 レベルが上昇した領域に DNA メチル化が誘発されるという新たなメカニズムを解明した。



【令和 3 年度】

これまでの解析に使用していた 293FT 細胞に加え、胃正常上皮細胞 GES1 でも ARID1A ノックアウトによりメチル化異常が誘発されるかを検討した。GES1 親クローン 1 株、野生型 (WT) クローン 3 株および KO クローン 3 株につき、培養開始後 0、4 週時点でゲノム網羅的メチル化解析を行った。その結果、ARID1A KO クローンでは、0 週時点で、7,148 領域でメチル化レベルが上昇 (>0.2) した。しかし、期間依存的なメチル化領域の増加は認めなかった。これは、GES1 は正常細胞であるが、メチル化領域が多いがん細胞に近いメチル化パターンを有しているためと考えられた。



1-3 年目までの成果より、ARID1A の機能欠失が CIMP を誘発することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada Harumi, Takeshima Hideyuki, Fujiki Ryoji, Yamashita Satoshi, Sekine Shigeki, Ando Takayuki, Hattori Naoko, Okabe Atsushi, Yoshikawa Takaki, Obama Kazutaka, Katai Hitoshi, Kaneda Atsushi, Ushijima Toshikazu	4. 巻 532
2. 論文標題 ARID1A loss-of-function induces CpG island methylator phenotype	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 215587 ~ 215587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2022.215587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Harumi Yamada
2. 発表標題 SWI/SNF defects induces CpG island methylator phenotype in gastric cancers
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田晴美, 竹島秀幸, 牛島俊和
2. 発表標題 CpG island methylator phenotype is induced by SWI/SNF defects in gastric cancers
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田晴美, 竹島秀幸, 若林美香, 牛島俊和
2. 発表標題 CpG island methylator phenotype is induced by SWI/SNF defects in gastric cancers
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田晴美, 竹島秀幸, 坂井義治, 牛島俊和
2. 発表標題 胃がんにおけるCIMPはクロマチンリモデリング複合体SWI/SNFの機能異常により誘発される
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田晴美, 竹島秀幸, 若林美香, 牛島俊和
2. 発表標題 ARID1A loss-of-function induces the CpG island methylator phenotype
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田晴美, 竹島秀幸, 牛島俊和
2. 発表標題 ARID1A loss-of-function induces the CpG island methylator phenotype
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会・第10回国際消化器癌発生会議
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------