

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590395

研究課題名（和文）AFP産生胃癌におけるエピジェネティックな遺伝子制御

研究課題名（英文）Epigenetic regulation of gene expression in AFP-producing gastric adenocarcinoma

研究代表者

岸本 充（KISHIMOTO TAKASHI）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：90323401

研究成果の概要（和文）：AFP産生胃癌は胃癌の中で悪性度の高い亜型である。GATA-4は消化管や肝臓の発生に関与する遺伝子である。通常の胃腺癌と比較検討した結果、AFP産生胃癌においてGATA-4の発現は通常胃癌で見られるDNAのメチル化でなくヒストンの脱アセチル化により抑制されていることが解明された。

研究成果の概要（英文）：AFP-producing adenocarcinoma is a highly malignant variant of the gastric cancer. GATA-4 is a gene that is involved in both gastrointestinal and hepatic differentiation. GATA-4 expression was restricted by DNA methylation in common-type gastric adenocarcinomas, whereas, we found that it was restricted by histone deacetylation in AFP-producing adenocarcinomas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：AFP産生胃癌，エピジェネティック，GATA-4

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) AFP産生胃癌

## ① 定義

AFP産生胃癌とは、AFP産生が認められる胃癌の総称である。胃原発性上皮性腫瘍、胃原発性胚細胞性腫瘍、および転移性腫瘍の3つに大別されるが、一般にAFP産生胃癌という場合には、通常型腺癌の亜型のひとつである胃原発性上皮性腫瘍を意味する場合が多い。胃原発性上皮性AFP

産生腫瘍は、組織学的に肝細胞癌に類似する肝様腺癌や胎児消化管上皮に類似する胎児消化管上皮類似癌（あるいは淡明細胞腺癌）が知られている。また、稀ではあるが通常型腺癌でAFPを産生する場合もある。

## ② 臨床病理学的特徴

AFP産生胃癌は胃癌の2-5%程度を占めるとされている。脈管侵襲傾向が強く早期より肝転移やリンパ節転移を来しやすい。そのため、通常型胃

癌に比し悪性度が高く、予後は不良である。また、化学療法に抵抗性を示す症例が多く報告されている。

### ③ 発生機序

AFP 産生胃癌の発生機序は不明である。我々は、内胚葉組織の分化に関連する転写因子の関与を仮定し、肝臓癌の外科切除材料や AFP 産生胃癌細胞株を用いて、分子病理学的に発生機序を検討してきた。これまでに、AFP 産生と通常型腺癌とを比較検討した結果、肝細胞の発生分化に関与するとされる転写因子群の中で、HNF-4 $\alpha$ 、C/EBP $\beta$  の発現が異なっていることを報告した。また、胃及び肺の肝臓癌において HNF-4 $\alpha$  が高発現していることを報告した。

### (2) エピジェネティクス

DNA のメチル化やヒストンのメチル化・アセチル化など染色体の後天的な修飾による遺伝子発現の制御機構。個体の発生・分化における遺伝子発現に関与している。悪性腫瘍においては、エピジェネティックな遺伝子制御の異常により、癌抑制遺伝子を含み種々の遺伝子の発現の異常を来し、発癌や悪性形質の獲得に関与すると考えられている。AFP 産生胃癌におけるエピジェネティックな遺伝子制御の検討はいまだ十分に行われていない。

### (3) GATA-4

消化管や肝臓の発生に関与することが知られている転写因子である。通常の胃腺癌での発現抑制は DNA のメチル化によると報告されている。

## 2. 研究の目的

通常型胃腺癌に比し AFP 産生胃癌が高度悪性である原因を解明することが究極の目的である。我々は胎児肝あるいは胎児消化管への分化転換が高度悪性形質獲得に関係すると推論している。そのため、AFP 産生胃癌における分化関連遺伝子の発現およびその制御の異常を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒストン脱アセチル化阻害による検討

#### ① TSA 処理による遺伝子発現の変化

ヒストンの脱アセチル化が AFP 産生腫瘍の肝細胞形質や腺細胞形質に影響しているかを検討する目的で、ヒストン脱アセチル化阻害剤の TSA で処理後に AFP, albumin, transferrin, GPD, CYP, G6PT, Cdx1, CEA, MUC2, MUC5AC, MRP2, MRP3, MRP6 の発現を RT-PCR で検討した。

#### ② TSA 処理による薬剤耐性能の変化

ヒストン脱アセチル化が AFP 産生腫瘍の

薬剤抵抗性に関与しているかを検討する目的で、TSA 処理による cisplatin 感受性の変化を検討した。

### (2) 肝細胞分化関連転写因子の検討

#### ① 肝臓癌における発現

これまで我々は、HNF-1、HNF-4、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$  などの liver-enriched nuclear factor と呼ばれる肝細胞分化関連因子の肝臓癌あるいは AFP 産生胃癌における発現を検討してきた。今回さらに肝臓癌外科切除症例に関し GATA-4、HEX、FOXA1/HNF-3 $\alpha$  の発現を検討した。

#### ② AFP 産生胃癌細胞におけるエピジェネティックな制御の検討

Methylation specific PCR (MSP), chromatin immunoprecipitation (ChIP) にて GATA-4 発現のエピジェネティックな制御を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒストン脱アセチル化阻害による検討

#### ① TSA 処理による遺伝子発現の変化

RT-PCR にて、TSA 処理により CEA の mRNA の発現亢進および MRP6 mRNA の発現抑制が認められた。しかし、Real-time RT-PCR にて発現変化を確定することができなかった。その他、AFP, albumin, transferrin, GPD, CYP, G6PT, Cdx1, MUC2, MUC5AC, MRP2, MRP3 では明らかな変化は認められなかった。

#### ② TSA 処理による薬剤耐性能の変化

AFP 産生胃癌細胞 GCIY では、TSA 処理による cisplatin 感受性の有意な変化は認められなかった。

### (2) 肝細胞分化関連転写因子の検討

#### ① 肝臓癌における発現

免疫染色にて、肝臓癌症例において GATA-4 は 1/9 例で陽性、HEX は 1/9 例で陽性 (細胞質に陽性)、FOXA1 は 5/9 例で陽性であった。一方通常胃癌では GATA-4 は 33/34 例、HEX は 11/33 例 (核あるいは細胞質)、FOXA1 は 11/11 例で陽性であった。胃癌症例における GATA-4 の発現頻度はこれまで報告された頻度よりやや高い結果であったが、肝臓癌では GATA-4 の発現が抑制されていることが示唆された (図 1)。

#### ② AFP 産生胃癌細胞におけるエピジェネティックな制御の検討

AFP 産生胃癌細胞株 3 株の GATA-4 発現を RT-PCR で検討した結果 2 株で発現が認められなかった (図 2)。GATA-4 の発現が GATA-4 遺伝子プロモーター領域のメチル化によるものかを MSP にて検討した。AFP 産生胃癌細胞株では 3 株中 2 株で GATA-4 の発現が認められなかったが、3

株いずれも GATA-4 DNA のメチル化は認められなかった (図 3)。GATA-4 発現の認められなかった 2 株は、ヒストン脱アセチル化阻害により、GATA-4 の発現が誘導された (図 4)。ChIP アッセイで検索した結果、GATA-4 転写制御領域のヒストン H3, H4 のアセチル化状態と GATA-4 の発現とが一致した (図 5)。一方、通常胃癌細胞株では、これまでの報告同様に、GATA-4 DNA のメチル化により GATA-4 発現が抑制されていた (図 6、7)。以上の結果から、AFP 産生胃癌細胞では通常胃癌細胞と異なりヒストンアセチル化が GATA-4 発現抑制に関与していると考えられる。AFP 産生胃癌において通常胃癌とことなるエピジェネティックな遺伝子制御機構の存在が示唆される。

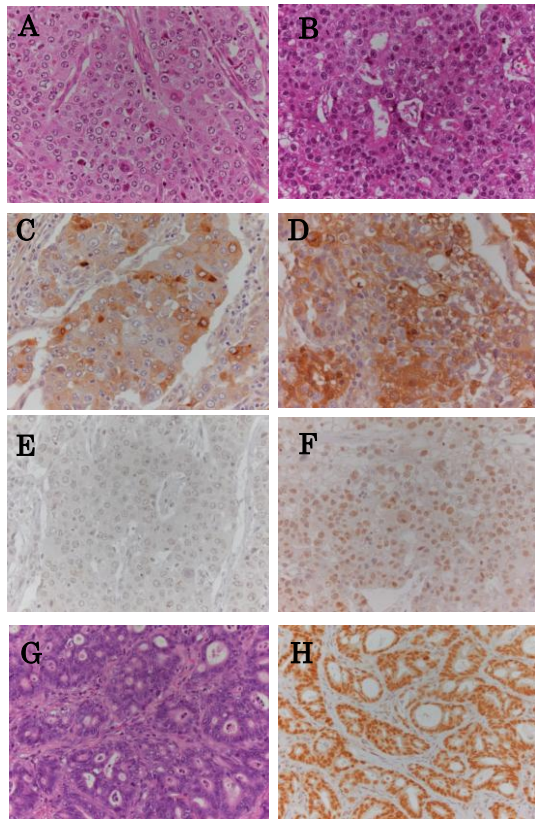


図 1 肝様腺癌と通常型腺癌の GATA 4 発現。肝様腺癌の H-E 染色 (A、B)、AFP の免疫染色 (C、D)、GATA-4 の免疫染色 (E、F)。A、C、E は GATA-4 陰性の同一症例。B、D、F は GATA-4 陽性の同一症例。G は通常型腺癌の H-E 染色、H は GATA-4 の免疫染色

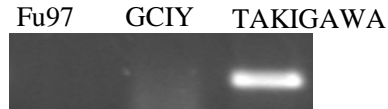


図 2 AFP 産生胃癌細胞における GATA-4 の発現 (RT-PCR) TAKIGAWA のみ発現が認められた。

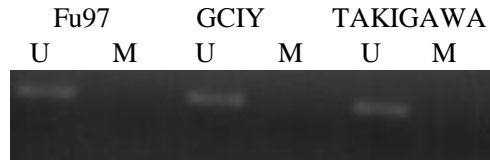


図 3 AFP 産生胃癌細胞において GATA-4 遺伝子のプロモーター領域にメチル化は認められなかった (MSP) U: 非メチル化、M: メチル化

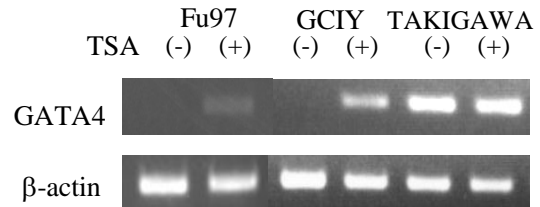


図 4 GATA-4 発現の認められなかった 2 株では、TSA によりヒストン脱アセチル化を阻害した結果、GATA-4 の発現が誘導された

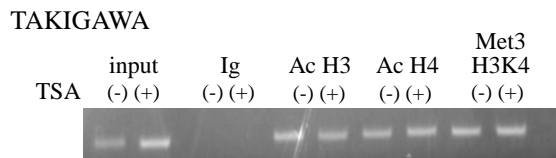
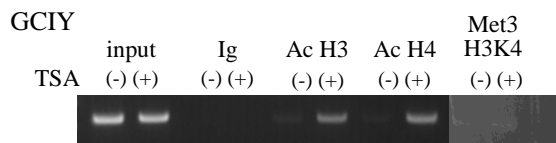
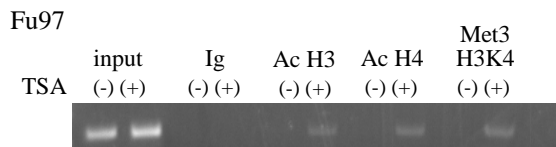


図 5 GATA-4 転写制御領域のヒストン H3, H4 のアセチル化状態 (ChIP)。GATA-4 の発現の認められない Fu97、および GCIY では、GATA-4 プロモーター領域のヒストン H3 およ

びH4は低アセチル化状態であったが、GATA-4発現の認められるTAKIGAWAではGATA-4プロモーター領域のヒストンH3およびH4は高アセチル化状態であった。Ig：コントロール抗体、AcH3：抗アセチル化ヒストンH3抗体、AcH4：抗アセチル化ヒストンH4抗体、Met3H3K4：抗トリメチル化ヒストンH3K4抗体

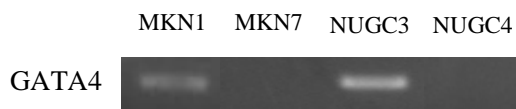


図6 通常型胃癌細胞株におけるGATA-4の発現(RT-PCR)。MKN1とNUGC3で発現が認められる。

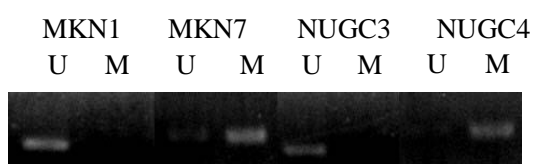


図7 通常型腺癌におけるGATA-4遺伝子プロモーター領域のメチル化状態(MSP)。GATA-4発現の認められる細胞(MKN1、NUGC3)ではメチル化されていないが、GATA-4発現の認められない細胞(MKN7、NUGC4)ではメチル化されている。U：非メチル化、M：メチル化

#### 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10件)

- 1) Yamamura N, Kishimoto T, Epigenetic regulation of GATA4 expression by histone modification in AFP-producing gastric adenocarcinoma, *Exp Mol Pathol*, 査読有、2012 Mar 24, [Epub ahead of print]
- 2) Furuya Y, Wakahara T, Akimoto H, Kishimoto T, Hiroshima K, Yanagie H, Yasuhara H, Clear cell adenocarcinoma with enteroblastic differentiation of the ascending colon, *J Clin Oncol*, 査読有、2011;29:e647-9.
- 3) Ishibashi K, Kishimoto T, Yonemori Y, Hirashiki K, Hiroshima K, Nakatani Y, Primary hepatoid adenocarcinoma of the uterine corpus: A case report with immunohistochemical study for expression of liver-enriched nuclear

factors. *Pathol Res Pract*, 査読有、2011;207:332-6.

- 4) Watanabe S, Kishimoto T, Yokosuka O, Hepatocyte growth factor inhibits anoikis of pancreatic carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase pathway, *Pancreas*, 査読有、2011;40:608-14.
- 5) Nizawa T, Oshitari T, Kimoto R, Kajita F, Yotsukura J, Asanagi K, Baba T, Takahashi Y, Oide T, Kiyokawa T, Kishimoto T, Yamamoto S, Early-stage mucinous sweat gland adenocarcinoma of eyelid. *Clin Ophthalmol*, 査読有、2011;5:687-9.
- 6) 細川勇、竹内男、大塚将之、吉富秀幸、岸本充、宮崎勝、非典型的な画像所見を呈した非機能性膵神経内分泌腫瘍の1例、*日本臨床外科学会雑誌*、査読有、2011;72:1008-14.
- 7) Oshitari T, Yotsukura J, Asahagi K, Baba T, Kishimoto T, Yamamoto S, Relationship between chronic sclerosing dacryoadenitis with high level of IgG4 and Castleman disease. *Clin Ophthalmol*, 査読有、2010;5:23-5.
- 8) Kajita F, Oshitari T, Yotsukura J, Asanagi K, Baba T, Kishimoto T, Yamamoto S, Case of primary diffuse large B-cell lymphoma of lacrimal sac in a Japanese patient. *Clin Ophthalmol*, 査読有、2010;4:1351-4.
- 9) Shida T, Kishimoto T, Furuya M, Nikaido T, Koda K, Takano S, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Tanizawa T, Nakatani Y, Miyazaki M, *Cancer Chemother Pharmacol*, 査読有、2010;65:889-93.
- 10) Shimofusa R, Ueda T, Kishimoto T, Nakajima M, Yoshikawa M, Kondo F, Ito H, Recent advances in visualization and imaging in HBP science: Magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma: a pictorial review of novel insights into pathophysiological features revealed by magnetic resonance imaging, *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 査読有、2010;17:583-9.

[学会発表] (計10件)

- 1) 岸本充、渡辺聡、富居一範、清川貴子、横須賀収、Hepatocyte growth factorによる膵癌細胞のanoikis抑制、第100

- 回日本病理学会 2011 年 4 月 30 日、横浜
- 2) 岩本雅美、清川貴子、大出貴士、米盛葉子、岸本充、中谷行雄、脱分化を伴う子宮内膜間質肉腫(ESS)の一例、第 100 回日本病理学会会誌、2011 年 4 月 29 日、横浜
  - 3) 米盛葉子、坂入祐一、岸本充、吉野一郎、大塚将之、宮崎勝、中谷行雄、両側肺転移巣から発見された腓 solid pseudopapillary tumor の 1 症例、第 100 回日本病理学会会誌、2011 年 4 月 28 日、横浜
  - 4) 大出貴士、岸本充、廣島健三、溝渕輝明、鈴木実、吉野一郎、中谷行雄、印環細胞癌への分化を伴った ALK 陽性 endobronchial polypoid adenocarcinoma の 1 例、第 99 回日本病理学会、2010 年 4 月 27 日、東京

[図書] (計 3 件)

- 1) 岸本充、医学書院、胃と腸、特殊型胃癌の病理像と臨床的特徴；肝様腺癌病理の立場から、2010 年、1935-1940
- 2) 岸本充、文光堂、病理と臨床、病理形態学キーワード；胃肝様、2010 年、120-121
- 3) 岸本充、日本臨床社、消化管症候群(上)、2009 年、307-310

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岸本 充 (KISHIMOTO TAKASHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：9 0 3 2 3 4 0 1

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：