

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23501327

研究課題名(和文)ゲノム網羅的関連解析により導かれた胃がん発生抑制分子経路の解明とその創薬への応用

研究課題名(英文)Study of PSCA, a gastric cancer susceptibility gene

研究代表者

佐伯 宣久 (Saeki, Norihisa)

独立行政法人国立がん研究センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：80466200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：prostate stem cell antigen (PSCA) 遺伝子のがん抑制的に機能する分子機構の解明を試みたところ、PSCAは胃がん以外に胆のうがんでもがん抑制効果を持ち、炎症・免疫関連遺伝子の発現を誘導することがわかった。また、胃がんのリスクと関連する一塩基多型(SNP) rs2294008のTアレルが、転写因子YY1を介してPSCAの発現を抑制することが示され、このアレルを持つ人では、胃がん抑制的に機能するPSCA遺伝子の胃粘膜上皮細胞での発現が抑制され、胃がんを発症しやすくなるものと推察された。加えて、胆のう上皮、膵臓ランゲルハンス島、脳での同遺伝子の発現を新たに確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was revealed that the gene has the tumor suppressive function in gallbladder cancer as well as in gastric cancer, and that gene influences expression of genes related to inflammation and immune system. Moreover, the result of this study suggests that PSCA gene is suppressed in gastric epithelial cells by a T allele of single nucleotide polymorphism (SNP) rs2294008 which recruits a suppressive transcription factor YY1 to the PSCA promoter, predisposing to gastric cancer. In addition, exploration of novel expression sites of the gene detected PSCA in the gallbladder epithelium, islets of the pancreas and neuronal cells in the brain. Although the function of PSCA protein is far from being thoroughly explored at molecular level, new and important insight was obtained in this study.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：胃がん 疾患感受性遺伝子 がん抑制遺伝子 胆のうがん

1. 研究開始当初の背景

東アジアを中心に胃がんの発生数は世界的にみて多く、日本においては肺がんについて死亡数が第2位のがんである。胃がんはその病理組織像から大きく Intestinal type と Diffuse type に分類される。Intestinal type 胃がんがピロリ菌感染を主要原因として発生するのに対し、Diffuse type 胃がんはピロリ菌感染などの環境要因の影響を比較的受けずに発生すると考えられており、発症年齢も比較的若いこともあって、遺伝的な発生要因が想定されている。肺がんに対する喫煙習慣対策と同じように、Intestinal type 胃がんはピロリ菌感染対策を徹底することにより近い将来その発生数が減少すると予測されている。これに対し、環境要因の影響を比較的受けない Diffuse type 胃がんについては有効な予防対策がなく、想定されている遺伝的な発生要因、すなわち易罹患性遺伝子及びそのリスク多型を同定することにより、個人のリスク評価とそれに基づいた介入、遺伝的易罹患性を補うための予防創薬などの研究が可能になるものと期待されるが、国内外において Diffuse type 胃がんの易罹患性遺伝子の解明とその臨床応用は進んでいなかった。

研究代表者の所属する研究グループは、世界で初めて Diffuse type 胃がんの易罹患性遺伝子を探索するためのゲノム網羅的関連解析を行い、Prostate stem cell antigen (PSCA) を同定した。研究代表者による機能解析を行った結果、PSCA 遺伝子の第1エクソン上にある一塩基多型 (SNP rs2294008) の2つのアレル T と C のうち、関連解析でリスク側にある T は PSCA 遺伝子プロモーターの転写活性を減弱させることが明らかになるなど、PSCA が胃上皮細胞において胃がんの発生を抑制する機能を持つことが示唆された (Sakamoto, Saeki, et al. Nat Genet 2008)。PSCA 遺伝子は前立腺がんなど多くのがんで発現が上昇し、これらのがんにおいてはがん促進的に機能していることが報告されており、胃がんにおける PSCA 遺伝子の発現抑制及びがん抑制機能は例外的なものであった。PSCA が機能する分子経路の活性を増強させることで Diffuse type 胃がんの予防が可能になるものと期待されたが、PSCA タンパクは Glycosylphosphatidyl - inositol (GPI) アンカーを持つ膜タンパクであることから、何らかの細胞内シグナル伝達に関与していると想定されているものの、その発現調節メカニズムやリガンド、細胞内シグナル伝達経路は不明であった。

2. 研究の目的

胃上皮細胞で PSCA が機能する分子経路を解明することにより、PSCA が胃がん発生抑制的に機能するメカニズムを明らかにする。そして、この PSCA 分子経路の機能を強化することによる胃がん予防法の開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) PSCA 遺伝子の発現に関わる転写因子の同定と上流の発現制御分子経路の解明

PSCA 遺伝子上流の DNA 断片をクローニングし、培養細胞を用いてレポーターアッセイを行い、PSCA の発現に重要な発現調節領域を同定した。

発現調節領域に存在する既知の転写因子の結合配列や SNP rs2294008 の周辺に変異を加えてレポーターアッセイを行うことにより、PSCA の発現に重要な転写因子の同定を試みた。

(2) PSCA シグナル伝達経路の解明

FLAG タグの付いた PSCA タンパクを培養細胞にて産生させ、抗 FLAG 抗体固定化ビーズを用いて FLAG-PSCA タンパクを精製することにより、共沈してくるタンパクを単離し、質量分析を行って共沈したタンパクすなわち PSCA 結合タンパクの同定を試みた。

PSCA を培養細胞に導入し、これを免疫不全マウスに接種して腫瘍を形成させ、この腫瘍の遺伝子発現解析を行った。

(3) PSCA 発現部位の探索

胃粘膜上皮以外の PSCA ががん抑制的に機能する組織を同定することにより、PSCA の持つがん抑制的機能の解明につなげるために、複数の正常組織及びそのがんについて、抗 PSCA 抗体を用いた免疫染色を行った。

4. 研究成果

本研究で得られた PSCA に関する新たな知見は以下の4点である。

(1) PSCA は胆のう、膵臓ランゲルハンス島、脳でも発現している。

・免疫染色により、胆のう上皮 (Ono et al. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012、図1)、膵臓のランゲルハンス島にある4種の内分泌細胞 (Ono et al. *Anat Cell Biol*, 2012、図2) 及び脳の神経細胞、グリア細胞及び脈絡叢細胞 (Ono et al. 投稿中) で発現していることが本研究で明らかになった。

・PSCA は前立腺がんや膵臓がんにおいて治療標的分子として研究が進められており、PSCA の正常組織での発現部位を把握することは、重篤な副作用を回避する観点から重要と考えられる。

(2) PSCA は胆のうがんでもがん抑制的に機能する。

・PSCA は多くのがんで発現が上昇しており、

胃がんにおける発現低下は例外的なものであったが、PSCAは胆のうがんでも発現が低下していることが明らかとなり(図1)、培養細胞を用いた解析により *in vitro* 及び *in vivo* で細胞増殖抑制効果を持つことも明らかとなった(Ono et al. *Genes Chromosomes Cancer*, 2012)。

・PSCAは組織によりがん促進的あるいは抑制的に機能することがわかったが、これは何らかの細胞内シグナル伝達を行うことが想定されているPSCAのシグナル伝達経路が、組織によって異なっているためと推測され、PSCAの機能研究に有用な知見が得られたと考えられる。また、PSCAの持つがん抑制的機能の解明に胆のう上皮も利用できることがわかった。

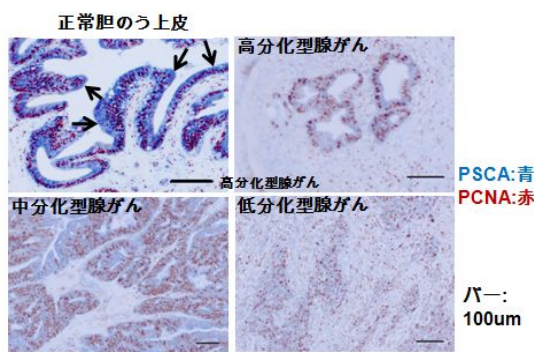
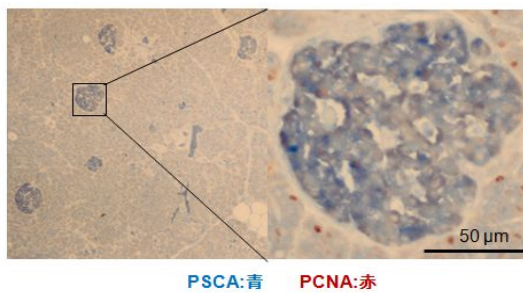


図1 PSCAの胆のう上皮での発現と胆のうがんでの発現低下(免疫染色)



Modified from Ono H et al. *Anat Cell Biol*, 2012

図2 膵臓ランゲルハンス島でのPSCAの発現(免疫染色)

(3)PSCAシグナル伝達経路は炎症・免疫関連遺伝子の発現を制御する。

・PSCA結合タンパク(PSCAと相互作用するタンパク)の同定がPSCAシグナル伝達経路の解明の重要な手掛かりとなると考え試みたが、同定には至らなかった。

・PSCAを導入したがん細胞によりマウスに形成された腫瘍の発現解析により、S100 calcium-binding protein A9 (*S100A9*)や*S100A8*、*S100P*; interleukin 8 (*IL8*)、Interleukin-1 receptor antagonist (*IL1RN*)

など、炎症・免疫関連遺伝子の発現がPSCAにより誘導されることが明らかとなった(Saeki et al. *Anticancer Res*, in press)。

・PSCAシグナル伝達経路の下流についてはこれまでほとんど解明されていなかったが、本研究によりその一端が明らかとなった。

(4)一塩基多型 rs2294008 の T アレルは転写因子 YY1 を介して、PSCA 遺伝子の発現を抑制する。

・レポーターアッセイによって T アレルは PSCA 遺伝子のプロモーター活性を阻害する効果を持つことがわかっていたが、その機序は不明であった。レポーターアッセイにおいて C アレルを持つ PSCA 遺伝子上流の DNA 断片は転写活性を示し、C アレルを T アレルに置き換えるとその転写活性は著しく減弱するが、この T への置換により転写因子 Yin Yang 1 (YY1) の結合コンセンサス配列が形成されることが明らかとなり、T アレル近傍の塩基を置換することによってこのコンセンサス配列を崩すと、減弱した転写活性は元のレベルまで回復した(図3)。これらのことより、T アレルは転写抑制機能で知られるポリコム群転写因子 YY1 をプロモーター近辺にリクルートすることにより PSCA 遺伝子の発現を抑制することが示唆された(Saeki et al. *Genes Cells*, in press)。

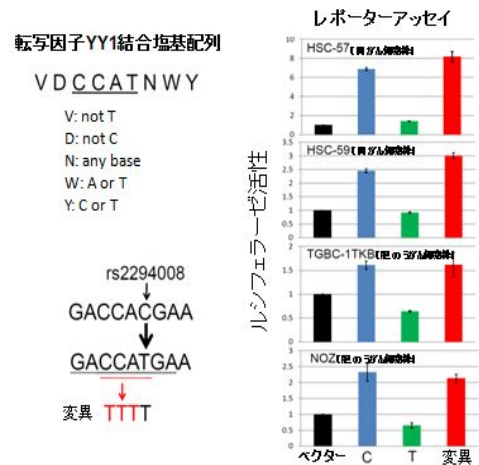


図3 一塩基多型 rs2294008 の T アレルは転写因子 Yin Yang 1 (YY1) の結合配列を形成し、PSCA 遺伝子のプロモーター活性を阻害する

・T アレルは症例対照関連解析において胃がんのリスクと関連し、胃がん罹患率の高い日本と韓国において多くの人がこのアレルを持つことが先行研究によってあきらかとなっている。このアレルを持つ人は、胃がん抑制的に機能すると想定される PSCA 遺伝子の胃粘膜上皮細胞での発現が抑制され、胃がんを発症しやすくなるものと推察される(図4)。

・症例対照関連解析にて胃がんリスクと関連することが示されている T アレルが胃がん抑制機能を持つ PSCA 遺伝子の発現を抑制する

分子メカニズムが明らかとなった。これによりTアレルが胃がんリスクのマーカースとしてより信頼できるものとなり、Tアレルの個人のリスク評価への応用とそれによる予防的介入の根拠となる知見が得られたと考えられる。

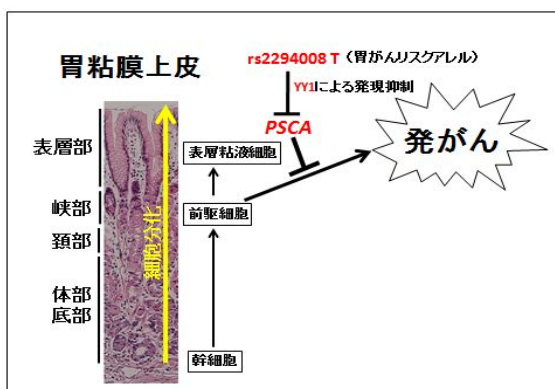


図4 SNP rs2294008 の T アレルは転写因子 YY1 を介して胃がん抑制的機能を持つ PSCA 遺伝子の胃粘膜上皮での発現を抑制し、これにより胃がんが発生しやすくなる (仮説)

5. 主な発表論文等 (研究代表者に下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Saeki N, Ono H, Sakamoto H, Yoshida T. Down-regulation of immune-related genes by PSCA in gallbladder cancer cells implanted into mice. *Anticancer Res* (in press).

Saeki N, Ono H, Yanagihara K, Aoyagi K, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T. rs2294008 T, a risk allele for gastric and gallbladder cancers, suppresses a PSCA promoter by recruiting a transcription factor YY1. *Genes Cells* (in press). doi: 10.1111/gtc.12228.

Saeki N, Sakamoto H, Yoshida T. Mucin 1 gene (*MUC1*) and gastric-cancer susceptibility. *Int J Mol Sci* 15(5): 7958-7973, 2014. doi: 10.3390/ijms15057958

Ono H, Saeki N. Five gastric cancer-susceptibility loci identified by genome-wide association studies. *J Gastroint Dig Sys* S12, 2013. doi: 10.4172/2161-069X.S12-015

Saeki N, Ono H, Sakamoto H, Yoshida T. Genetic factors related to gastric-cancer susceptibility identified using a genomewide association study. *Cancer Sci* 104(1): 1-8, 2013. doi: 10.1111/cas.12042.

Ono H, Chihara D, Chiwaki F, Yanagihara K, Sasaki H, Sakamoto H, Tanaka H, Yoshida T, Saeki N, Matsuo K. Missense allele of a single nucleotide polymorphism rs2294008 attenuated anti-tumor effects of prostate stem cell antigen (PSCA) in gallbladder cancer cells. *J Carcinog* 12:4, 2013. doi: 10.4103/1477-3163.109030.

Ono H, Yanagihara K, Sakamoto H, Yoshida T, Saeki N. Prostate stem cell antigen gene is expressed in islets of pancreas. *Anat Cell Biol* 45(3):149-154, 2012. doi: 10.5115/acb.2012.45.3.149.

Ono H, Hiraoka N, Lee YS, Woo SM, Lee WJ, Choi IJ, Saito S, Yanagihara K, Kanai Y, Ohnami S, Chiwaki F, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Saeki N. Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 51(1):30-41, 2012. doi: 10.1002/gcc.20928.

[学会発表](計 9 件)

佐伯宣久, 小野弘恵, 青柳一彦, 佐々木博己, 柳原五吉, 坂本裕美, 吉田輝彦. 一塩基多型 rs2294008 の T アレルは転写因子 YY1 を介して、がん抑制機能を持つ PSCA 遺伝子の発現を抑制し、胃がん易罹患性の原因となる. 第 37 回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2014 年 11 月

小野弘恵, 坂本裕美, 吉田輝彦, 佐伯宣久. Prostate stem cell antigen (PSCA) の正常脳組織及び脳腫瘍での発現. 第 73 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2014 年 9 月

Hiromi Sakamoto, Norihisa Saeki, Hidemi Itoh, Keitro Matsuo, Hidetaka Yamada, Haruhiko Sugimura, Hitoshi Ichikawa, Hiroki Sasaki, Teruhiko Yoshida. Towards the Genetics and Genomics of Diffuse Gastric Cancer. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference (The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics), Tokyo Bay Maihama Hotel Club & Resorts (Urayasu-shi., Chiba) December 16-18, 2013

小野弘恵, 坂本裕美, 吉田輝彦, 佐伯宣久. 膵管がんが発現が誘導される PSCA 遺伝子は正常膵臓のランゲルハンス島で発現している. 第 72 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2013 年 10 月

Saeki N, Choi IJ, Lee YS, Yoon KA, Kook MC, Park SR, Kim YW, Ono H, Sakamoto H, Matsuo K, Yoshida T. Gastric-cancer susceptibility genes identified through collaboration between Japanese and Korean research groups. The 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop, Busan Korea, Nov 30 - Dec 2 2012.

小野弘恵, 千原大, 千脇史子, 佐々木博己, 坂本裕美, 吉田輝彦, 松尾恵太郎, 佐伯宣久. 胃がん・膀胱がん易罹患性関連遺伝子 PSCA 上のミスセンス SNP は胆のうがん細胞において PSCA のがん抑制機能を減弱させる. 第 71 回日本癌学会学術総会.

ロイトン札幌（北海道札幌市）2012 年 9 月

吉田輝彦、佐伯宣久、斎藤聡、松尾恵太郎、佐々木博己、大浪澄子、小野弘恵、坂本裕美、片井均。胃がんのゲノム網羅的関連解析。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）2011 年 10 月

坂本裕美、佐伯宣久、斎藤聡、松尾恵太郎、佐々木博己、大浪澄子、小野弘恵、片井均、梶村春彦、吉田輝彦。胃がんのゲノム網羅的遺伝素因の探索。第 70 回日本癌学会学術総会。名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）2011 年 10 月

小野弘恵、平岡伸介、金井弥栄、佐々木博己、坂本裕美、吉田輝彦、佐伯宣久。全ゲノム網羅的関連解析（GWAS）により同定された胃がん易罹患性関連遺伝子 *PSCA* の機能解析。平成 23 年度文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』平成 23 年度がん若手研究者ワークショップ。アートランドホテル蓼科（長野県茅野市）2011 年 8 月

〔図書〕（計 1 件）

Saeki N, Ono H. Prostate stem cell antigen and pancreatic cancer. *In*: Endocrine disease. (iConcept Press Ltd. ed.), pp.1-24, iConcept Press Ltd., Hong Kong, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 宣久（SAEKI, Norihisa）
独立行政法人国立がん研究センター
研究所 主任研究員
研究者番号：80466200

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし