

# 膵がん危険因子となる新規遺伝子多型の細胞病理学的解析

愛知医科大学医学部

病理学講座 講師 猪子誠人

愛知県がんセンター研究所

がん予防研究分野 分野長 松尾恵太郎

## 1. 研究の背景・目的

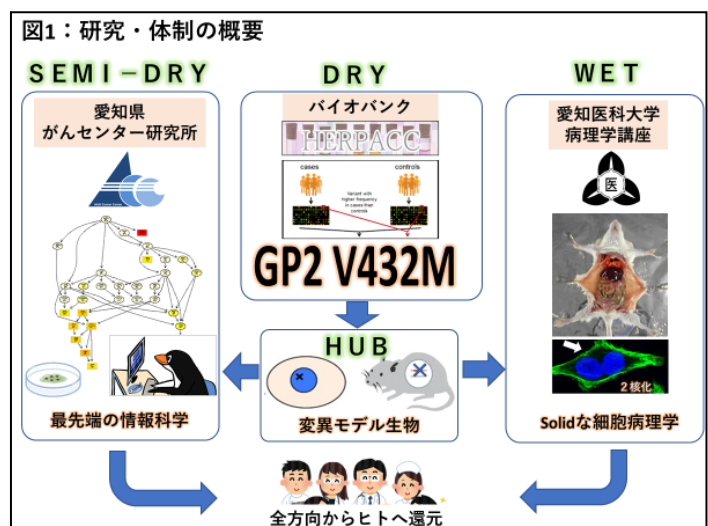
膵癌は予後が悪く、罹患率は高くないが死亡率はがんの中で第4位と高い。既知の膵がんの危険因子は喫煙、飲酒、糖尿病、家系などだが、遺伝的素因についてはほとんどわかっていない。

愛知県がんセンター研究所・松尾恵太郎分野長らを中心としたグループは、いち早く日本人膵がんの大規模な全ゲノム相関解析(GWAS)を行い、膵がん発症と一塩基多型の頻度との関連を統計学的に調べた。その結果、膵がん危険因子となる新たな遺伝子多型をGP2(Glycoprotein-2) 遺伝子座のV432M変異として見出した(文献1)。先行研究を調査した結果、GP2は膵臓や腸管M細胞に特異的な分泌蛋白質すなわち輸送に関わる蛋白質としての報告はあるものの、発癌との関わりを推し測れる解析はなかった。

本研究の目的は、このGP2遺伝子変異による新規膵がん発症機序を、細胞病理学的に解明することである。具体的にはGP2の発現が確認された細胞・動物でGP2のノックダウンや変異体導入を行い、その生物学的効果を確認する。並行して、愛知県がんセンター研究所では最新情報科学を駆使することで、モデル生物をHUBとした発現・パスウェイ解析(semi-dry解析)を強力に進める。両者の相互補完により、ヒトへの還元に値する説得力を備えたGP2V432M発がん仮説の実証を目指す。

## 2. 研究の対象ならびに方法

概要(図1):本研究では、愛知県がん

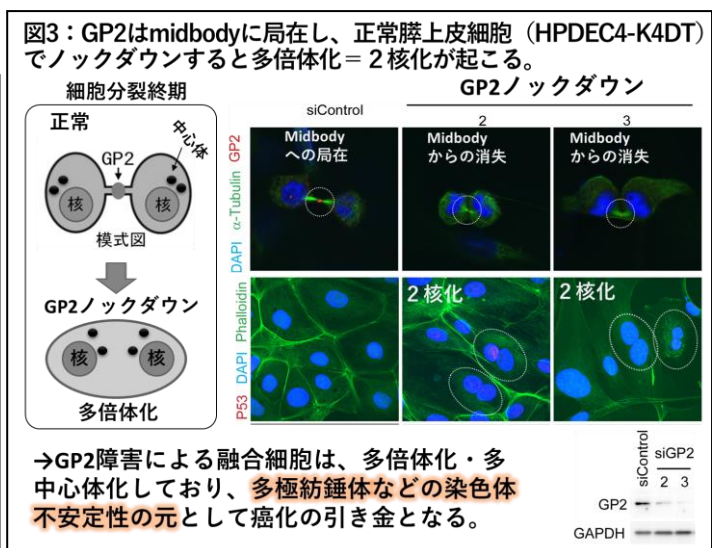
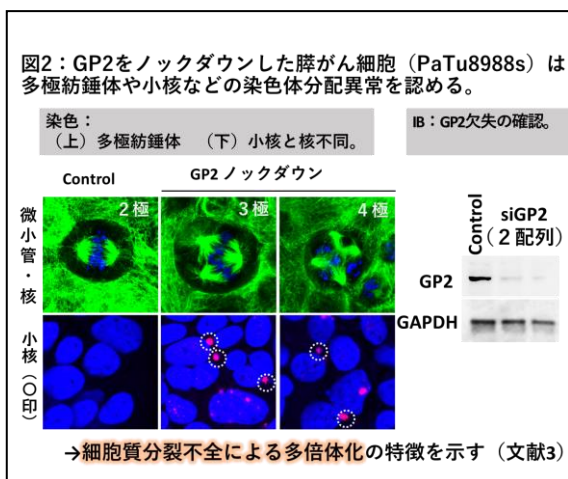


センター研究所を主体としたバイオバンクのビッグデータより抽出した日本人膵がん関連遺伝子変異「GP2 V432M」について、まず変異モデル細胞・マウスをゲノム編集で、また欠失細胞を遺伝子ノックダウンで作成する。これらの変異モデル生物を共有資源すなわち hub として、愛知県がんセンター研究所では発現解析・パスウェイ解析などの semi-dry 解析を、愛知医科大学では細胞・生物レベルでの wet な病理解析を行い、最終的に統合することで迷いのない分子病態解釈に至ることを目標とする。具体的な結果を以下に示す。

### 3. 研究結果

**GP2 遺伝子変異モデル生物の作製**：GP2 V432M 変異を模したゲノム編集マウスはヘテロ体ホモ体共に作成が完了し、表現型の観察中である。これは広島大学原医研・宮本達雄准教授らとの共同研究による。同変異を導入したゲノム編集膵臓がん細胞株(PaTu8988s)は、愛知県がんセンター研究所・がん標的治療トランスレーショナルリサーチ分野・細野 祥之ユニット長によって作成され、GP2V432M 変異が一意のがんシグナルの変動を起こすことが確認された（論文）。愛知医科大学（報告者）では GP2 変調による発がん過程を細胞レベルで調べるため、さらになん化する前の正常膵上皮細胞株（HPDEC4-K4DT、国立がん研究センター研究所・清野透主任分野長提供、文献 2）を主に用いて GP2 の一過性ノックダウン、恒常的ノックダウンおよび、GP2V432M の発現誘導を行い、その表現型を比較した。

**GP2 変異生物の細胞病理学解析**：愛知医科大学（申請者）では、まず p53 が機能欠失型の膵臓がん細胞株(PaTu8988s)で GP2 遺伝子をノックダウンしたところ、多極紡錘体や小核などの染色体分配異常が認められた（図 2）。これは細胞質分裂不全すなわち細胞融合に特徴的な所見である（文献 3）。そのため GP2 が特異的に発現する 2 つの膵臓細胞株（PaTu8988s と HPDEC4-K4DT）で



GP2 の免疫染色を行ったところ、細胞質分裂に重要な構造体である midbody にその局在を認め、それがノックダウンで消失することを確認した (図 3)。

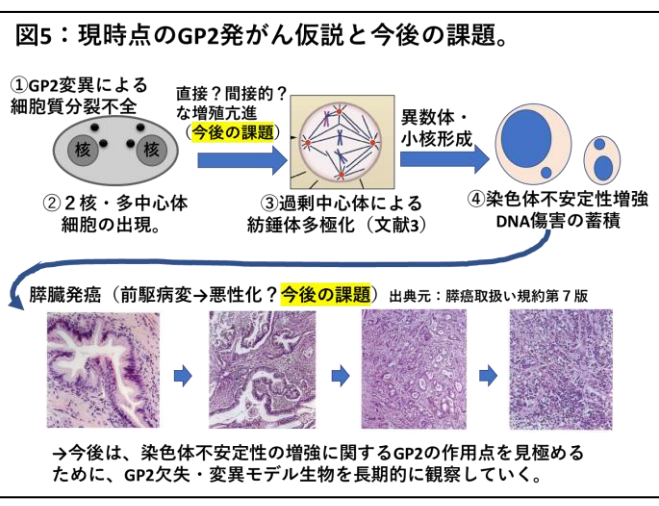
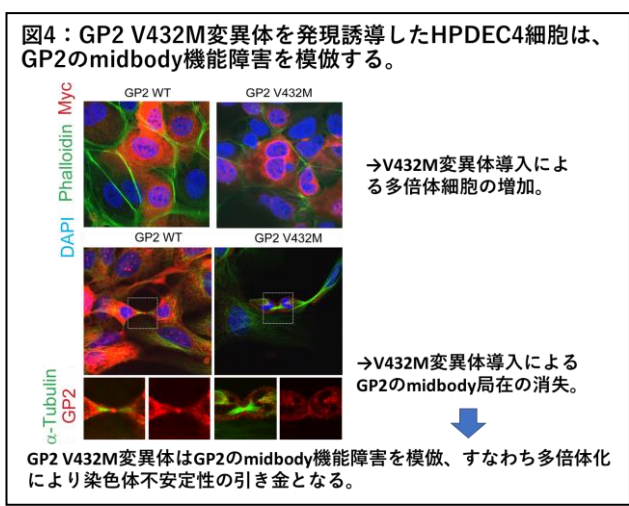
次に、GP2 変調による発がんのプロセスをさらに詳しく検討するため、p53 の正常な正常膀胱上皮細胞株 (HPDEC4-K4DT) で GP2 ノックダウンの表現型を再検討したところ、2 核化=多倍体化細胞の出現を認めた (図 3)。これは正常細胞で見られる細胞質分裂不全の特徴である。このことから GP2 の機能欠失で細胞質分裂不全に至ることが細胞種を超えて確認された。

続いて GP2 V423M 変異体の生物効果を確認するため、これを正常膀胱上皮細胞株で発現誘導したところ、本来の GP2 の midbody への局在が消失するとともに、二核細胞の出現を認めた (図 4)。すなわち、GP2 V423M 変異体は本来の GP2 の midbody 機能、特に細胞質分裂への寄与を阻害している可能性が非常に高い。

#### 4. 考察 (図 5)

以上の結果から、GP2 の欠失およびそれに準ずる V432M 変異による機能障害では細胞質分裂不全による多倍体細胞が出現する。これががん化に必要な染色体不安定性と元となっていることまでは明らかにすることができた。一方で、染色体不安定性を発癌に至らせるには DNA チェックポイント機能の喪失などさらなる要因が必要である (文献 3)。驚いたことに、正常膀胱上皮細胞での GP2 ノックダウンでは本来は DNA 保全のために上昇するはずの p53、p21 が早々に減少する異常性を認めた (解析進行中)。GP2 自体は細胞内輸送に関わることから、おそらく DNA チェックポイント蛋白質が輸送・分解系の変調により減少しており、その結果発癌を加速している可能性がある。

今後はこのような染色体不安定性の増強に関する GP2 の作用点を見極めるために、恒常的な GP2 ノックダウン・変異細胞を用いた形質転換確認実験、また変異マウスの発癌



観察などの **wet** 実験を行いつつ、分子基盤も補いながら共同研究を進めていく予定である。

## 5. 文献

- 1) Yingsong Lin, Masahiro Nakatochi, Hidemi Ito, Yoichiro Kamatani, **Akihito Inoko**, Hiromi Sakamoto, Fumie Kinoshita, Yumiko Kobayashi, Hiroshi Ishii, Masato Ozaka, Takashi Sasaki, Masato Matsuyama, Naoki Sasahira, Manabu Morimoto, Satoshi Kobayashi, Taito Fukushima, Makoto Ueno, Shinichi Ohkawa, Naoto Egawa, Sawako Kuruma, Mitsuru Mori, Haruhisa Nakao, Yasushi Adachi, Masumi Okuda, Takako Osaki, Shigeru Kamiya, Chaochen Wang, Kazuo Hara, Yasuhiro Shimizu, Tatsuo Miyamoto, Yuko Hayashi, Yasuyuki Hosono, Hiromichi Ebi, Tomohiro Kohmoto, Issei Imoto, Yoshinori Murakami, Masato Akiyama, Kazuyoshi Ishigaki, Koichi Matsuda, Makoto Hirata, Katsuaki Shimada, Takuji Okusaka, Takahisa Kawaguchi, Meiko Takahashi, Yoshiyuki Watanabe, Kiyonori Kuriki, Aya Kadota, Kenji Wakai, Taiki Yamaji, Motoki Iwasaki, Norie Sawada, Shoichiro Tsugane, Kengo Kinoshita, Nobuo Fuse, Fumiki Katsuoka, Atsushi Shimizu, Satoshi S. Nishizuka, Kozo Tanno, Ken Suzuki, Yukinori Okada, Momoko Horikoshi, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki, Teruhiko Yoshida, Fumihiko Matsuda, Michiaki Kubo, Shogo Kikuchi, Keitaro Matsuo: Genome-wide association meta-analysis identifies novel GP2 gene risk variants for pancreatic cancer in the Japanese population, **BioRxiv**, 10.1101/498659, 2018
- 2) Yuki Inagawa, Kenji Yamada, Takashi Yugawa, Shin Ichi Ohno, Nobuyoshi Hiraoka, Minoru Esaki, Tatsuhiko Shibata, Kazunori Aoki, Hideyuki Saya, Tohru Kiyono: A human cancer xenograft model utilizing normal pancreatic duct epithelial cells conditionally transformed with defined oncogenes, **Carcinogenesis**, 35(8), 1840-6, 2014
- 3) Takeshi Fujiwara, Madhavi Bandi, Masayuki Nitta, Elena V. Ivanova, Roderick T. Bronson, David Pellman: Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells, **Nature**, 437:1043-7, 2005

## 6. 論文発表

Yingsong Lin, Masahiro Nakatochi, Yasuyuki Hosono, Hidemi Ito, Yoichiro Kamatani, **Akihito Inoko**, Hiromi Sakamoto, Fumie Kinoshita, Yumiko Kobayashi, Hiroshi Ishii, Masato Ozaka, Takashi Sasaki, Masato Matsuyama, Naoki Sasahira, Manabu Morimoto, Satoshi Kobayashi, Taito Fukushima, Makoto Ueno, Shinichi Ohkawa, Naoto Egawa,

Sawako Kuruma , Mitsuru Mori , Haruhisa Nakao , Yasushi Adachi , Matsumi Okuda , Takako Osaki , Shigeru Kamiya , Chaochen Wang , Kazuo Hara , Yasuhiro Shimizu , Tatsuo Miyamoto , Yuko Hayashi , Hiromichi Ebi , Tomohiro Kohmoto , Issei Imoto , Yumiko Kasugai , Yoshinori Murakami , Masato Akiyama , Kazuyoshi Ishigaki , Koichi Matsuda , Makoto Hirata , Kazuaki Shimada , Takuji Okusaka , Takahisa Kawaguchi , Meiko Takahashi , Yoshiyuki Watanabe , Kiyonori Kuriki , Aya Kadota , Rieko Okada , Haruo Mikami , Toshiro Takezaki , Sadao Suzuki , Taiki Yamaji , Motoki Iwasaki , Norie Sawada , Atsushi Goto , Kengo Kinoshita , Nobuo Fuse , Fumiki Katsuoka , Atsushi Shimizu , Satoshi S. Nishizuka , Kozo Tanno , Ken Suzuki , Yukinori Okada , Momoko Horikoshi , Toshimasa Yamauchi , Takashi Kadowaki , Herbert Yu , Jun Zhong , Laufey Amundadottir , Yuichiro Doki , Hideshi Ishii , Hidetoshi Eguchi , David Bogumil , Christopher Haiman , Loic Le Marchand , Masaki Mori , Harvey Risch , V Wendy Setiawan , Shoichiro Tsugane , Kenji Wakai , Teruhiko Yoshida , Fumihiko Matsuda , Michiaki Kubo , Shogo Kikuchi , Keitaro Matsuo: Genome-wide association meta-analysis identifies novel GP2 gene risk variants for pancreatic cancer, **Nat. Commn.**, in press.