

**Methylation silencing of ULK2 causes transformation to poorly-
differentiated cancers via epithelial-mesenchymal transition**

*ULK2*メチル化サイレンシングは上皮間葉転換を促進し、
低分化型癌細胞へ変化させる

富山大学博士論文(医学)

富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程 生命・臨床医学専攻

消化器造血器腫瘍制御内科学

元尾伊織

目次

要旨

1. 序論

2. 材料と方法

2.1 組織検体

2.2 細胞培養

2.3 RNA 干渉

2.4 RT-PCR

2.5 ウェスタンブロッティング

2.6 Migration assay

2.7 細胞免疫染色

2.8 Proliferation assay

2.9 TUNEL 染色

2.10 mRNA マイクロアレイ解析

2.11 組織免疫染色

2.12 メチル化特異的 PCR

2.13 統計解析

3. 結果

3.1 *ULK2* ノックダウン胃癌細胞株の遊走能と EMT の評価

3.2 *ULK2* 発現低下が遊走能と EMT を亢進するメカニズムの検証

3.3 胃癌組織における *ULK2* 発現と *ULK2* 発現低下が生じる発癌ステップの解明

3.4 正常胃上皮細胞での *Ulk2* ノックダウンとその遊走能と増殖能の評価

3.5 胃癌における *ULK2* 発現低下のメカニズムの解明

4. 考察

5. 総括

6. 参考文献

【要旨】

〔目的〕

低分化型癌は浸潤能が強く、予後不良である。上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) は癌浸潤の最初のステップである。ULK2はオートファジーの開始に関わる重要な蛋白質であり、ULK2発現低下は肺癌細胞株で遊走能とEMTを亢進したという報告があるが、胃癌におけるULK2の役割は不明である。

本研究では、胃癌の遊走能とEMTにおけるULK2の働きおよび臨床的意義を解明することを目的とした。

〔方法並びに成績〕

まず、胃癌細胞株 (NUGC3とMKN45) で *ULK2* をノックダウンし、ULK2発現低下により遊走能とEMTが亢進することを確認した。次に、ULK2発現低下による遊走能とEMT亢進のメカニズムを調べるため、mRNA発現の変動をmRNAマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果、NUGC3とMKN45に共通して発現が上昇する92遺伝子の中で24遺伝子が遊走能と関連し、そのうち10遺伝子がEMTと関連した。同様に、共通して発現が低下する225遺伝子の中で30遺伝子が遊走能と関連し、そのうち4遺伝子がEMTと関連した。また、パスウェイ解析を行った結果、NUGC3とMKN45で細胞接着や細胞遊走に関連するパスウェイが誘導されていた。以上の結果から、胃癌細胞株ではULK2発現低下によって、遊走能とEMTに関連する遺伝子が発現変動し、実際に遊走能とEMTが亢進することを確認した。

次に、ULK2発現低下の臨床的意義について検討した。胃癌をLauren分類に従い腸型とびまん型に分類し、ULK2免疫染色を行った。正常胃上皮 (n=3) と腸型胃癌 (n=3) では全例でULK2発現を認めたが、びまん型胃癌 (n=4) では全例でULK2発現は低下していた。びまん型胃癌の発癌経路には、transformation経路とde novo経路がある。まず、transformation経路におけるULK2発現を評価するため、腸型成分を含むびまん型胃癌 (n=4) を解析した。全例で腸型成分ではULK2発現を認めたが、びまん型成分ではULK2発現が低下していた。次に、de novo経路におけるULK2の発現を評価するため、早期胃癌のびまん型胃癌 (n=1) を解析した結果、早期胃癌でも既にULK2の発現が低下していた。これらの結果から、びまん型胃癌はいずれの経路を経た場合でもULK2発現低下していること、transformation経路では腸型胃癌となった後にULK2発現低下が生じることが示された。

そして、de novo経路でのULK2発現低下が発癌過程の第1ステップとして生じる可能性を評価するため、ラット正常胃上皮細胞 (RGE1-01) で *Ulk2* をノックダウンした。RGE1-01での *Ulk2* 発現低下は遊走能と増殖能を抑制し、アポトーシスを誘導した。これらの結果から、ULK2発現低下は発癌過程の第2ステップ以降で働くことが示された。

最後に、ULK2発現低下のメカニズムとしてDNAメチル化の関連を確認するた

め、びまん型胃癌からDNAを抽出して、腫瘍部と非腫瘍部の *ULK2* のDNAメチル化状態を調べた (n=2)。その結果、全例で腫瘍部では *ULK2* がメチル化されていたが、非腫瘍部ではメチル化されていなかった。この結果から、びまん型胃癌の *ULK2* はメチル化サイレンシングされていることが示された。

〔総括〕

ULK2 メチル化サイレンシングが腸型胃癌または発癌過程の第2ステップ以降として前癌細胞に生じると、EMTが亢進され、低分化型癌であるびまん型胃癌に誘導されることが示唆された。

1. 序論

癌は上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) によって浸潤し(1)、低分化型癌ではその浸潤能が強く予後不良である。低分化型癌の発生メカニズムが解明されれば、癌治療の発展や生命予後の延長が期待される。EMTはオートファジーと関連し(1-3)、オートファジー関連遺伝子の中で *ULK2* と *ATG4A* が EMT との関連を報告されている。*ATG4A* については、その過剰発現が胃癌細胞株でオートファジー非依存的に EMT を亢進させることが報告されている(4)。ULK2はオートファジーの開始に関わる重要な蛋白であり(5)、細胞の分化、脂質代謝、腫瘍とも関連している(6)。ULK2の発現低下は肺癌細胞株で遊走能と EMT を亢進させた(7)が、胃癌におけるULK2の役割は不明である。

本研究では、胃癌の遊走能とEMTにおけるULK2の働きおよび臨床的意義を解明することを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 組織検体

以前に連結不可能な状態で匿名化され、胃癌の病理診断情報が付随していた 11 人分の手術検体（パラフィン切片）を用いた。

2.2 細胞培養

NUGC3はJapanese Collection of Research Bioresources (Tokyo, Japan) から購入し、MKN45とAGSはAmerican Type Culture Collection (Rockville, MD) から購入した。これらの細胞はRPMI1640 (10%FBS, 1%Antibiotic-Antimycotic) により、37°C 5%CO₂の条件で培養した。RGE1-01は温度感受性SV40を導入されたラットの胃から樹立された条件的な不死化正常胃上皮細胞である(8)。RGE1-01はDulbecco's modified Eagle's medium /Ham's F-12 (10%FBS, 1%Antibiotic-Antimycotic) により、33°C 5%CO₂の条件で培養した。

2.3 RNA 干渉

RNA 干渉実験は siULK2、Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) を用い、reverse transfection protocol に従った。NUGC3 は siULK2 (10nM) を 48 時間、MKN45 は siULK2 (400nM) を 72 時間、RGE1-01 は siULK2 (30nM) を 48 時間反応させた。ネガティブコントロールには Stealth RNAi siRNA Negative Control HiGC (ThermoFisher Scientific) を使用した。

2.4 RT-PCR

RT-PCR は特異的プライマー（補足表 1）、SYBR Green I (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME)、iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, Richmond, CA) を用いて行った。QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) のプロトコールに従い、total RNA 1 μ g から cDNA を合成した。mRNA の発現レベルはヒトでは *GAPDH*、ラットでは *Ppia* でそれぞれ標準化した。

2.5 ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは既報に従って施行した(9)。蛋白 15 μ g を 7.5%または 12%のポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、その後メンブレンに転写した。ブロッキングの後、一次抗体反応（4°C、一晚）を行った。メンブレンを洗浄した後、二次抗体反応（室温、30分間）を行い、ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) で撮影した。caspase-3 (catalog no. 9665) は CST (Danvers, MA) から購入し、actin (catalog no. sc-1615) は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX) から購入した。

2.6 Migration assay

Migration assay は 24-well Transwell permeable supports with 8- μ m pores (Corning Incorporated, Corning, NY) を用いて、既報に従って施行した(10)。トランスウェルの upper chamber に細胞と siRNA を分注し、トランスフェクションを行った。upper chamber の培養液を交換し、bottom chamber に新鮮な培養液を加えて、24、48、72 時間後に遊走細胞を顕微鏡下でカウントした。

2.7 細胞免疫染色

RNA 干渉後の細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、ブロッキング後に E-cadherin (CST) または Vimentin (CST) で一次抗体反応を行った。その後、E-cadherin に対して Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (ThermoFisher Scientific)、Vimentin に対して Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (ThermoFisher Scientific) による二次抗体反応を行った。VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Gdynia, Poland) でマウントし、LSM 780 confocal microscopy (Zeiss, Jena, Germany) で観察した。

2.8 Proliferation assay

Proliferation assay は既報に従って、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて施行した(9)。RNA 干渉後の細胞を 96 ウェルプレートに播種し、24、48、72 時間後に生細胞数を吸光度 (450nm) により測定した。

2.9 TUNEL 染色

TUNEL 染色は RNA 干渉後の細胞に対して ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7101 (Merck, Darmstadt, Germany) のプロトコールに従って、施行した。視野内の全細胞数とアポトーシス細胞数を顕微鏡下でカウントし、アポトーシス細胞の割合を計算した。

2.10 mRNA マイクロアレイ解析

mRNA マイクロアレイ解析は SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray Ver3.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて、プロトコールに従って施行した。*ULK2* ノックダウン細胞のシグナル値がコントロール細胞と比較し、2 倍以上または半分以下に変化 (発現上昇または低下) したものを発現変動遺伝子 (Differentially expressed gene: DEG) と定義した。パスウェイ解析は DAVID v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov>) を用いて、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>) のデータベースを元に施行した。パスウェイは p 値 < 0.01 を有意と定義した。

2.11 組織免疫染色

胃癌手術検体（パラフィン切片）を脱パラフィン後に熱で抗原賦活した。ブロッキングを行い、ULK2 (ThermoFisher Scientific) で一次抗体反応（4°C、一晚）を行った。EnVision+ System-HRP labeled polymer anti-rabbit secondary antibody (Dako, Glostrup, Denmark) で二次抗体反応（室温、30 分間）させ、ヘマトキシリン染色後に顕微鏡で観察した。

2.12 メチル化特異的 PCR

胃癌手術検体（パラフィン切片）の腫瘍部と非腫瘍部からそれぞれ DNA を抽出した。*ULK2* mRNA 発現はプロモーター領域のメチル化により調整されており、プロモーター領域に対するメチル化配列特異的および非メチル化配列特異的なプライマーセット（補足表 2）を用いて、既報に従い、メチル化特異的 PCR を施行した(11)。コントロールに用いる完全メチル化 DNA と非メチル化 DNA はそれぞれ、SSI メチル化酵素 (New England Biolabs, Beverly, MA) によりメチル化されたゲノム DNA と GenomiPhi amplification system (GE Healthcare) によって増幅されたゲノム DNA を用いた。

2.13 統計解析

図はGraphPad Prism 7.0 software (GraphPad, La Jolla, CA) を用いて作成した。各実験の平均値はステューデントt検定で解析した。両側検定でp値が0.05未満を有意とした。

3. 結果

3.1 *ULK2* ノックダウン胃癌細胞株の遊走能と EMT の評価

はじめに、3つの胃癌細胞株 (NUGC3、MKN45、AGS) で *ULK2* mRNA 発現を測定し、NUGC3 と MKN45 で十分に発現していることを確認した (図 1A)。次に、NUGC3 と MKN45 に対して siULK2 によるノックダウン実験を行い、*ULK2* mRNA 発現が有意に減少することを確認した (図 1B)。その後、*ULK2* ノックダウン細胞の遊走能を migration assay で評価した。NUGC3、MKN45 のいずれの細胞でも、*ULK2* ノックダウン細胞は siRNA トランスフェクション後 24、48、72 時間で遊走細胞数が有意に増加した (図 1C)。また、EMT を上皮系マーカーの E-cadherin と間葉系マーカーの Vimentin を用いて、細胞免疫染色で評価した。NUGC3 と MKN45 のいずれの細胞でも、コントロール細胞では E-cadherin の発現が強く、Vimentin の発現を認めなかったが、*ULK2* ノックダウン細胞では E-cadherin の発現が減弱し、Vimentin の発現を認めた (図 1D)。これらの結果から、胃癌細胞株でも *ULK2* 発現低下が遊走能と EMT を亢進させることが示された。

3.2 *ULK2* 発現低下が遊走能と EMT を亢進するメカニズムの検証

ULK2 発現低下による遊走能と EMT 亢進のメカニズムを調べるため、NUGC3 と MKN45 において、*ULK2* ノックダウン細胞とコントロール細胞の遺伝子発現を mRNA マイクロアレイ解析で比較した。NUGC3 の DEG は 2896 遺伝子 (発現上昇は 1545 遺伝子、発現低下は 1351 遺伝子)、MKN45 の DEG は 1949 遺伝子 (発現上昇は 794 遺伝子、発現低下は 1155 遺伝子) であった。NUGC3 と MKN45 のいずれの細胞でも発現が上昇した遺伝子は 92 遺伝子あり、そのうち遊走能と関連するものは 24 遺伝子、EMT と関連するものは 10 遺伝子 (*OLFM4*, *MGP*, *VIM*, *SPINK1*, *MACC1*, *NOV*, *IGFBP7*, *TGFBI*, *GALC*, *TGM2*) であった (図 2A)。また、NUGC3 と MKN45 のいずれの細胞でも発現が低下した遺伝子は 225 遺伝子あり、そのうち遊走能と関連するものは 30 遺伝子、EMT と関連するものは 4 遺伝子 (*LCN2*, *CPS1-IT1*, *TET3*, *SFRP1*) であった (図 2B)。

そして、*ULK2* ノックダウンによる遺伝子群の変化を確認するために、パスウェイ解析を行った。NUGC3 では 21 パスウェイ、MKN45 では 13 パスウェイが有意に変動し、そのうち 8 パスウェイが共通して変動した (図 2C)。その中には focal adhesion、chemokine signaling pathway といった細胞接着や細胞遊走に関わるパスウェイが含まれていた。これらの結果から、*ULK2* 発現低下による遊走能と EMT の亢進が、実際に遊走能と EMT に関連する遺伝子の変動を伴って起こっていたことが示された。

3.3 胃癌組織における *ULK2* 発現と *ULK2* 発現低下が生じる発癌ステップの解明

胃癌を Lauren 分類によって腸型とびまん型に分類し、*ULK2* 発現を免疫染色で評価した。正常胃上皮 (n=3) および腸型胃癌 (n=3) では全例で *ULK2* 発現を認めたが、びまん型

胃癌 (n=4) では全例でULK2発現が低下していた (図3A)。つまり、びまん型胃癌の発癌経路においてULK2発現低下が生じることが示唆された。

びまん型胃癌の発癌経路は腸型胃癌からびまん型胃癌に変化する経路と腸型胃癌を経ずに直接びまん型胃癌が発生する経路が知られており、前者を transformation 経路、後者を de novo 経路と定義した。まず、腸型成分を含むびまん型胃癌 (n=4) を用いて、transformation 経路における ULK2 発現を評価した。全例で腸型成分では ULK2 発現を認めたが、びまん型成分では ULK2 発現が低下していた (図 3B)。次に、早期胃癌のびまん型胃癌 (n=1) を用いて、de novo 経路における ULK2 発現を評価した結果、早期胃癌でも既に ULK2 発現が低下していた (図 3C)。これらの結果から、びまん型胃癌はいずれの経路を経た場合でも ULK2 発現低下しており、transformation 経路では腸型胃癌となった後に ULK2 発現低下が生じることが示唆された。

3.4 正常胃上皮細胞での *Ulk2* ノックダウンとその遊走能と増殖能の評価

De novo 経路での ULK2 発現低下が発癌過程の第 1 ステップとして生じる可能性を評価するため、ラット正常胃上皮細胞 (RGE1-01) を用いて実験を行った。はじめに、RGE1-01 で *Ulk2* mRNA が発現していることを確認した (図 4A)。次に、RGE1-01 に対して siUlk2 によるノックダウン実験を行い、*Ulk2* mRNA 発現が有意に減少することを確認した (図 4B)。遊走能を migration assay で評価した結果、*Ulk2* ノックダウン細胞では、siRNA トランスフェクション後 24、48、72 時間で遊走細胞数が有意に減少した (図 4C)。また、増殖能を proliferation assay で評価した結果、*Ulk2* ノックダウン細胞では生細胞数は有意に減少した (図 4D)。*Ulk2* ノックダウンによるアポトーシスへの影響について、cleaved caspase-3 蛋白のウエスタンブロッティングと TUNEL 染色で評価した。その結果、*Ulk2* ノックダウンにより cleaved caspase-3 は増加し (図 4E)、TUNEL 染色でもアポトーシス細胞は有意に増加した (図 4F)。これらの結果から、正常胃上皮細胞で ULK2 発現が低下すると、アポトーシスが誘導され、決して腫瘍は発生しないことが示された。つまり、de novo 経路でのびまん型胃癌発生過程において、ULK2 発現低下は第 2 ステップ以降で働くことが示唆された。

3.5 胃癌における ULK2 発現低下のメカニズムの解明

ULK2発現が低下しているびまん型胃癌 (n=8) のうち、PCRに適した品質のDNAが得られた検体 (n=2) では、全例腫瘍部分で *ULK2* がメチル化され、非腫瘍部分ではメチル化されていなかった (図5)。この結果から、びまん型胃癌の *ULK2* は DNA メチル化により発現が抑制されていることが示された。

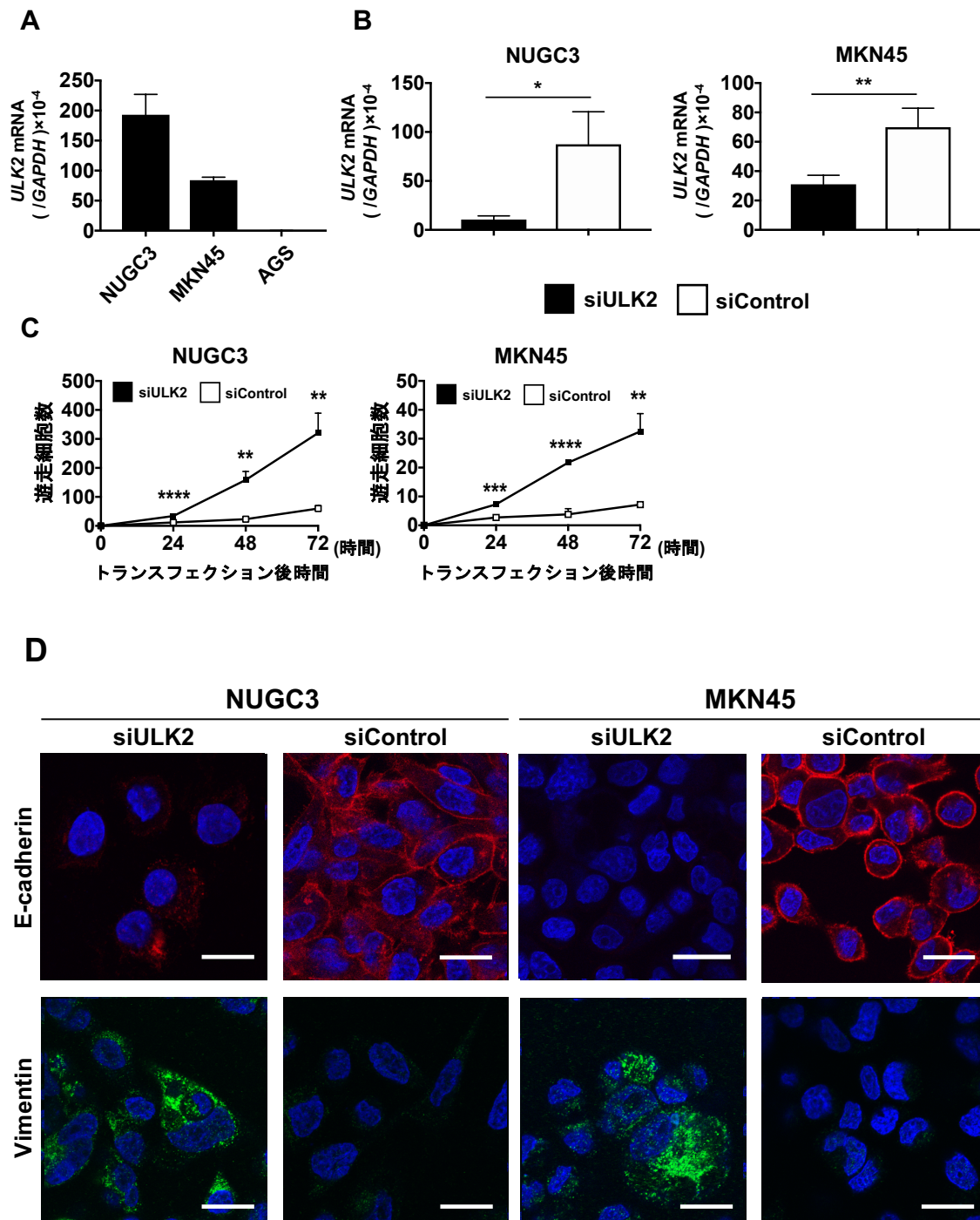
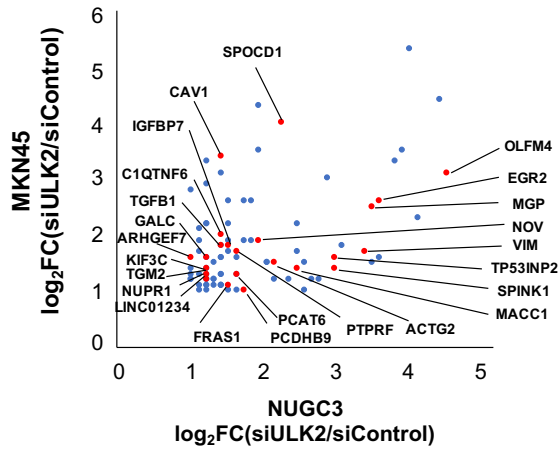
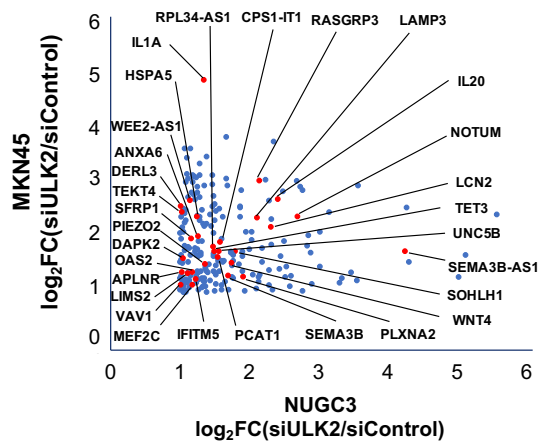


図1 胃癌細胞株において *ULK2*mRNA は発現する。*ULK2* 発現低下は遊走能と EMT を亢進する。(A) (B)胃癌細胞株 (NUGC3, MKN45, AGS) の *ULK2* mRNA 発現に対する RT-PCR。(C) *ULK2* ノックダウン細胞とコントロール細胞の migration assay。(D) *ULK2* ノックダウン細胞とコントロール細胞の細胞免疫染色。DAPI (青), E-cadherin (赤), Vimentin (緑)。White bar = 200 μ m。siULK2, siRNA of *ULK2*; siControl, negative control siRNA。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, スチューデント t 検定。

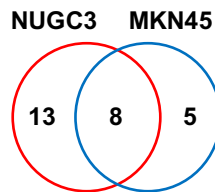
A



B



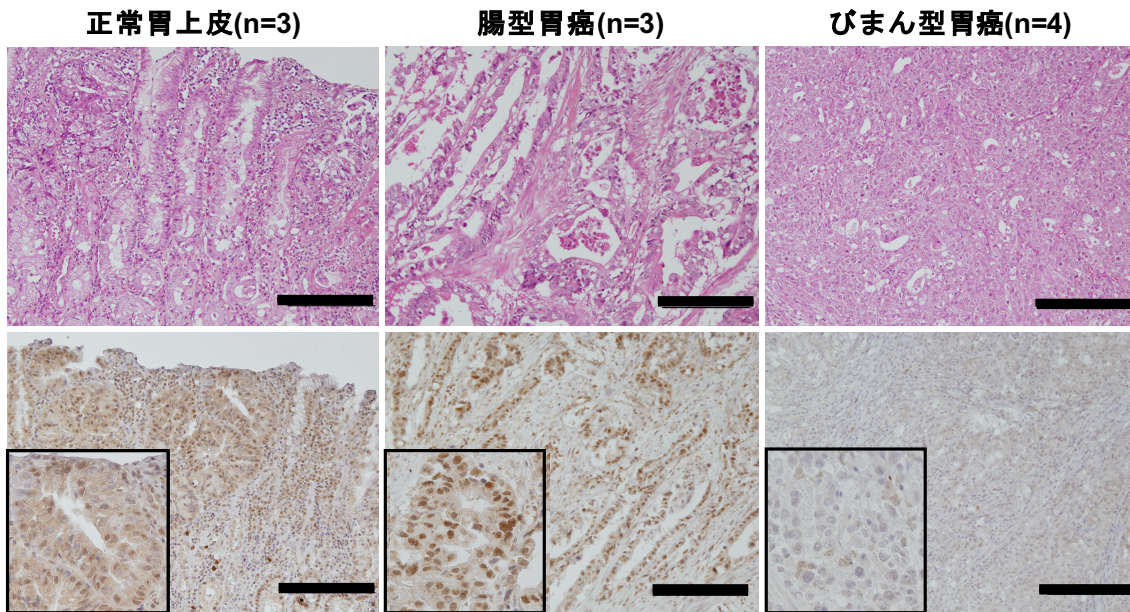
C



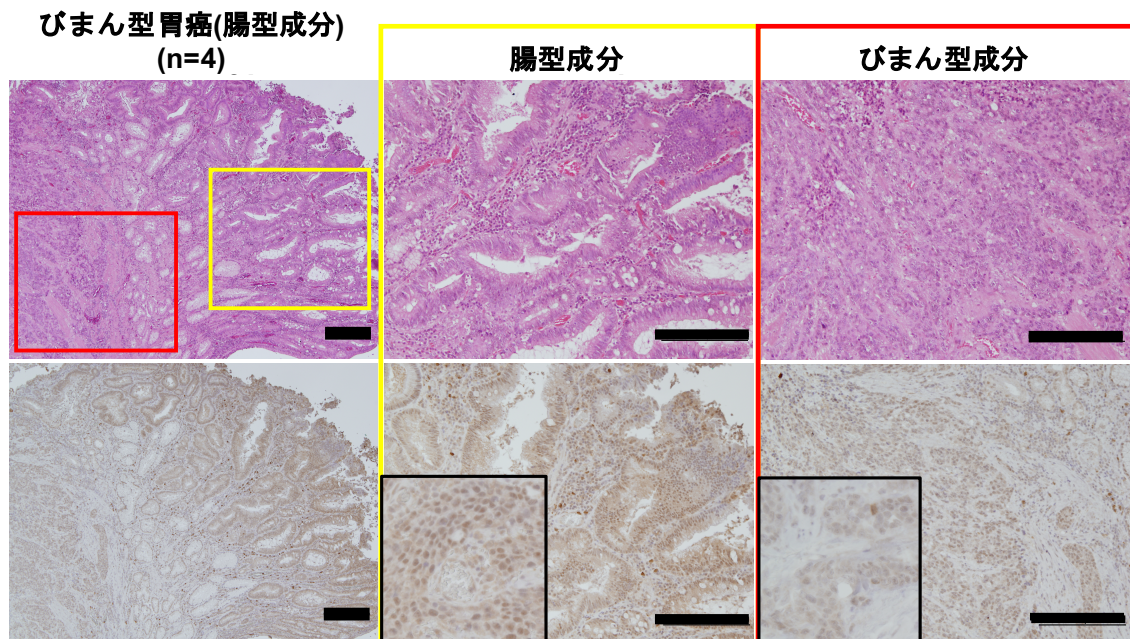
KEGG pathway enrichment	NUGC3	MKN45
	p value	p value
Cytokine-cytokine receptor interaction	8.79E-08	3.99E-07
TNF signaling pathway	7.67E-04	1.67E-05
Focal adhesion	3.56E-03	1.44E-03
Chemokine signaling pathway	1.15E-03	3.20E-03
NOD-like receptor signaling pathway	4.59E-05	5.65E-03
Osteoclast differentiation	9.60E-05	5.23E-03
Rheumatoid arthritis	3.36E-05	1.30E-04
Influenza A	5.96E-03	2.83E-03

図 2 胃癌細胞株で ULK2 発現低下は遊走能、EMT 亢進に関連する遺伝子を変動させる。(A)NUGC3 と MKN45 で共通して発現が上昇した 92 遺伝子 (遊走能に関連する 24 遺伝子は赤色)。(B) NUGC3 と MKN45 で共通して発現が低下した 225 遺伝子 (遊走能に関連する 30 遺伝子は赤色)。(C) *ULK2* ノックダウン細胞のパスウェイ解析。siULK2, siRNA of *ULK2*; siControl, negative control siRNA; log₂FC (siULK2/siControl) , log₂ fold change between the gene expressions of siULK2 cells and siControl cells.

A



B



C

早期胃癌のびまん型胃癌 (n=1)

腫瘍部

非腫瘍部

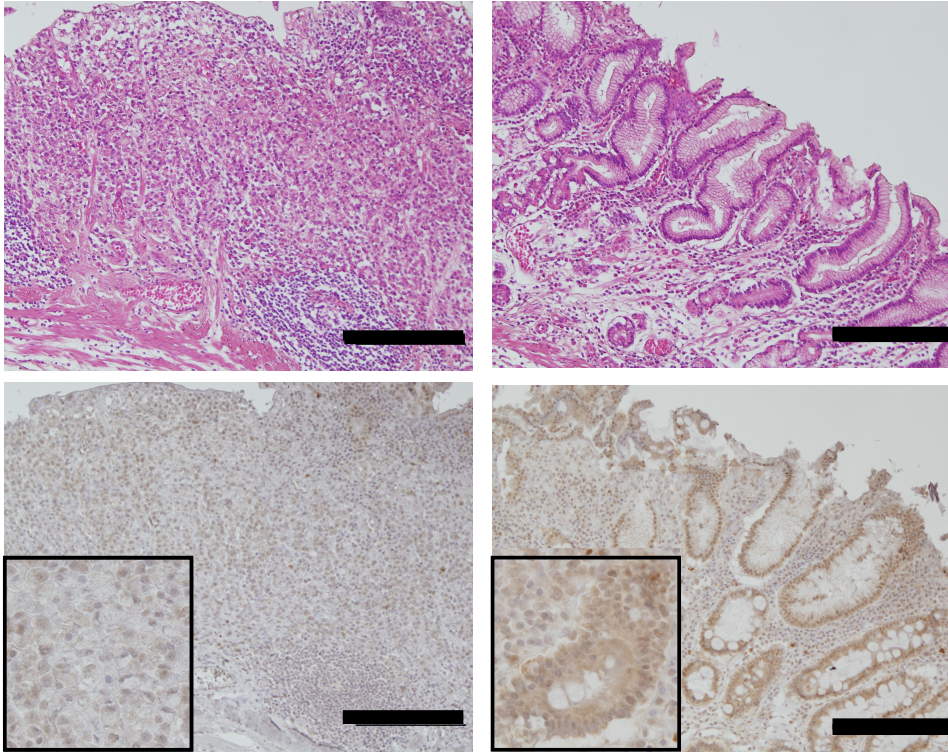


図3 びまん型胃癌では ULK2 発現は低下する。上段は HE 染色、下段は ULK2 免疫染色。(A) 正常胃上皮 (n=3), 腸型胃癌 (n=3), びまん型胃癌 (n=4) の ULK2 免疫染色。(B) 腸型成分を含むびまん型胃癌 (n=4) の腸型成分とびまん型成分の ULK2 免疫染色。(C) 早期胃癌のびまん型胃癌 (n=1) の腫瘍部分と非腫瘍部分の ULK2 免疫染色。Black bar = 200 μ m。黄色枠は腸型成分。赤枠はびまん型成分。黒枠は強拡大。

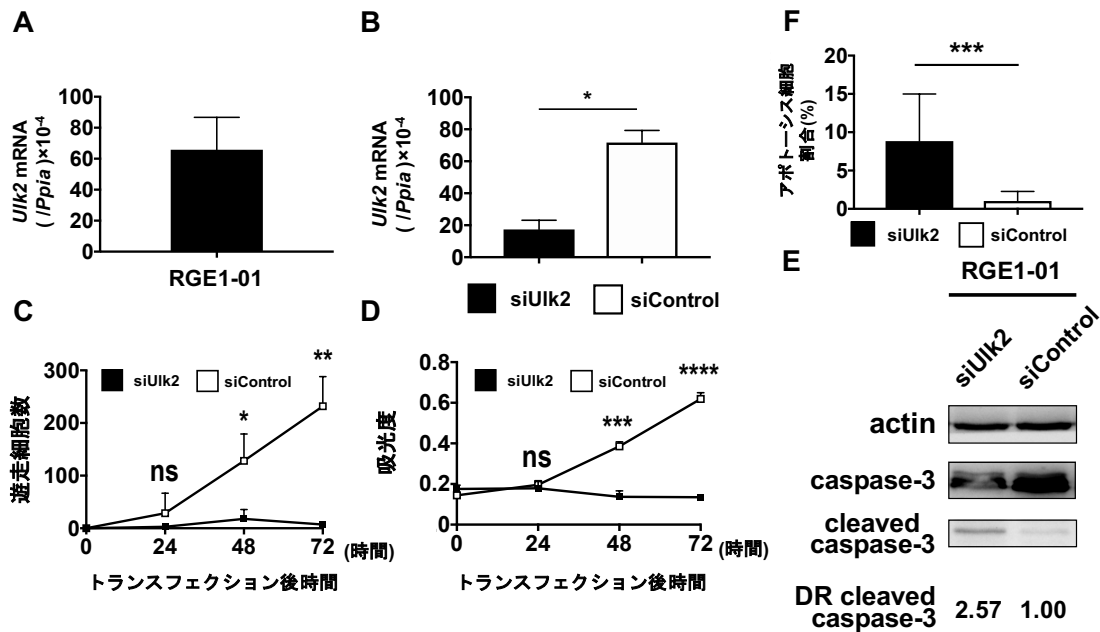


図4 ラット正常胃上皮細胞において *Ulk2* mRNA は発現する。*Ulk2* 発現低下はアポトーシスを誘導する。(A) (B) RGE1-01 の *Ulk2* mRNA 発現に対する RT-PCR。(C) *Ulk2* ノックダウン細胞に対する migration assay。(D) *Ulk2* ノックダウン細胞に対する proliferation assay。(E) *Ulk2* ノックダウン細胞に対する cleaved caspase-3 蛋白のウエスタンブロッティング。actin をインターナルコントロールとした。(F) *Ulk2* ノックダウン細胞に対する TUNEL 染色。siUlk2, siRNA of *Ulk2*; siControl, negative control siRNA; ns, not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, スチューデント t 検定。

びまん型胃癌

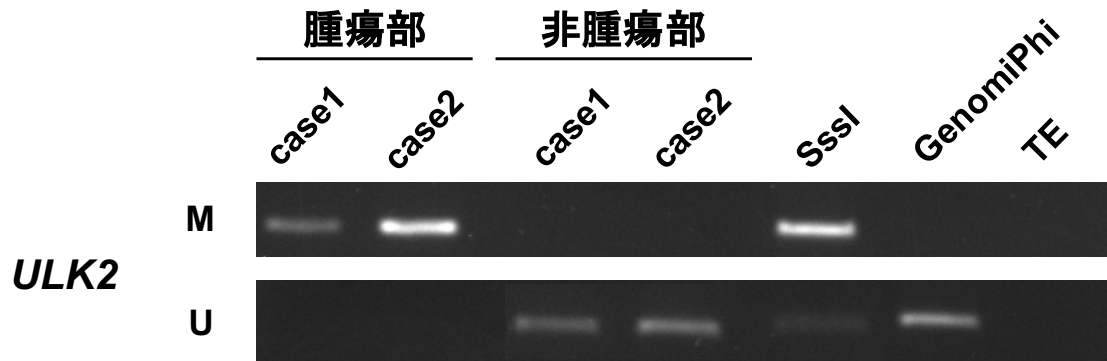


図5 びまん型胃癌では *ULK2* はメチル化サイレンシングされている。びまん型胃癌の腫瘍部と非腫瘍部に対する *ULK2* のメチル化特異的 PCR。Sss I; 完全メチル化 DNA。GenomiPhi; 完全非メチル化 DNA。M; メチル化 DNA 特異的プライマーを用いた PCR。U; 非メチル化 DNA 特異的プライマーを用いた PCR。

補足表 1 RT-PCR のプライマーと条件

属	遺伝子シンボル		プライマー配列 (5'→3')	長さ(bp)	温度 [§] (°C)
Human	<i>ULK2</i>	F	AATTCTGCATCACCATGTGC	299	60
		R	CGCCGACAGTCTTCTCTCA		
Rat	<i>GAPDH</i>	F	AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG	102	
		R	AGGGGTCATTGATGGCAACA		
	<i>Ulk2</i>	F	TGAAGCCCCTGAACTACCAG	250	
		R	CGCCTTCATGTACAACACCA		
<i>Ppia</i>	F	TGACTTCACACGCCATAAT	98		
	R	AGATGCCAGGACCTGTATGC			

§ アニール温度。

補足表 2 メチル化特異的 PCR のプライマーと条件

遺伝子シンボル	状態 [‡]		プライマー配列 (5'→3')	長さ(bp)	温度 [§] (°C)
<i>ULK2</i>	M	F	AACGGAGTTCGTAGTTCGTAATTC	160	58
		R	GCCTTAAAAACCGCAACG		
	U	F	TTAGAATGGAGTTTGTAGTTTGTAATTT	168	60
		R	ACACACCTTAAAAACCACAACA		

‡ M、メチル化 DNA 特異的プライマー;U、非メチル化 DNA 特異的プライマー。§ アニール温度。

4. 考察

本研究では、胃癌細胞株においてULK2発現低下が遊走能とEMTに関連する遺伝子を変動させ、実際に遊走能とEMTが亢進することを確認した。さらに、びまん型胃癌で *ULK2* メチル化サイレンシングが生じていることを確認し、それがtransformation経路では腸型胃癌になった後に、de novo経路では発癌過程の第2ステップ以降に生じることを解明した。今回、ULK2の発現低下が低分化型癌への誘導に寄与する可能性が示され、ULK2が予後増悪因子や治療ターゲットとしての臨床応用が期待される。

結論として、*ULK2* メチル化サイレンシングは EMT を亢進し、低分化型癌であるびまん型胃癌を誘導することが示唆された。

5. 総括

本研究により、胃癌細胞株において ULK2 発現低下が遊走能と EMT に関連する遺伝子を変動させ、実際に遊走能と EMT が亢進すること、および、びまん型胃癌で *ULK2* メチル化サイレンシングが transformation 経路では腸型胃癌になった後に、de novo 経路では発癌過程の第 2 ステップ以降に生じることを明らかとした。これらの結果から、ULK2 の発現低下が低分化型癌への誘導に寄与する可能性が示され、今後 ULK2 が予後増悪因子や治療ターゲットとしての臨床応用が期待出来る。

6. 参考文献

1. Colella B, Faienza F, & Di Bartolomeo S (2019) EMT Regulation by Autophagy: A New Perspective in Glioblastoma Biology. *Cancers* 11(3).
2. Voulgari A & Pintzas A (2009) Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 1796(2):75-90.
3. White E (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 12(6):401-410.
4. Yang SW, Ping YF, Jiang YX, Luo X, Zhang X, Bian XW, & Yu PW (2016) ATG4A promotes tumor metastasis by inducing the epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties in gastric cells. *Oncotarget* 7(26):39279-39292.
5. Shin SH, Lee EJ, Chun J, Hyun S, & Kang SS (2015) ULK2 Ser 1027 Phosphorylation by PKA Regulates Its Nuclear Localization Occurring through Karyopherin Beta 2 Recognition of a PY-NLS Motif. *PLoS One* 10(6):e0127784.
6. Lee EJ & Tournier C (2011) The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy. *Autophagy* 7(7):689-695.
7. Kim YH, Baek SH, Kim EK, Ha JM, Jin SY, Lee HS, Ha HK, Song SH, Kim SJ, Shin HK, Yong J, Kim DH, Kim CD, & Bae SS (2016) Uncoordinated 51-like kinase 2 signaling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in A549 lung cancer cells. *FEBS Lett* 590(9):1365-1374.
8. Tabuchi Y, Arai Y, Ohta S, Shioya H, Takahashi R, Ueda M, Takeguchi N, Asano S, & Obinata M (2002) Development and characterization of conditionally immortalized gastric epithelial cell lines from transgenic rats harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *Cell Struct Funct* 27(2):71-79.
9. Muhammad JS, Nanjo S, Ando T, Yamashita S, Maekita T, Ushijima T, Tabuchi Y, & Sugiyama T (2017) Autophagy impairment by Helicobacter pylori-induced methylation silencing of MAP1LC3Av1 promotes gastric carcinogenesis. *Int J Cancer* 140(10):2272-2283.
10. Kong F, Sun T, Kong X, Xie D, Li Z, & Xie K (2018) Kruppel-like Factor 4 Suppresses Serine/Threonine Kinase 33 Activation and Metastasis of Gastric Cancer through Reversing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res* 24(10):2440-2451.
11. Ando T, Yoshida T, Enomoto S, Asada K, Tatematsu M, Ichinose M, Sugiyama T, & Ushijima T (2009) DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: Its possible involvement in the formation of epigenetic field defect. *Int J Cancer* 124(10):2367-2374.