

令和元年5月28日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19943

研究課題名(和文)大腸癌における、エピジェネティクスを標的とした新規分子標的治療薬の検討

研究課題名(英文) Investigation of novel molecular targeted therapeutics based on epigenetics in colorectal cancer.

研究代表者

徳永 竜馬 (TOKUNAGA, Ryuma)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：20594881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、JMJD3が大腸癌患者において正常部で高発現であり、その大腸癌局所での低発現は予後不良因子であること、癌抑制遺伝子p15INK4bを制御し大腸癌進展を抑制することを初めて明らかにした。また、マイクロRNAアレイの結果からJMJD3を抑制するマイクロRNAとしてmiR186-5pを同定した。さらに、miR186-5pが大腸癌細胞のアポトーシスを抑制し、細胞周期をすすめ、増殖能を上げることを見出し、臨床検体においてmiR186-5pとJMJD3の発現量が逆相関することを確認した。しかしmiR186-5pの発現量と予後や腫瘍進行度と有意な相関関係は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は本邦における癌罹患数および臓器別癌死亡数で上位を占め、世界的に研究がすすめられている癌腫である。我々は大腸癌におけるエピジェネティクスを標的とした新規分子標的治療薬を開発することを目標として本研究を行った。今まで大腸癌におけるJumonji-domain containing 3 (JMJD3)の役割については報告がなく、今回の研究においてmiR186-5pがJMJD3を制御すること、および癌の進展に関わっていることを初めて示すことができた。これはmiR186-5pやJMJD3をターゲットとした新規治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We showed for the first time that JMJD3 low expression in colorectal cancer was a poor prognostic factor and that JMJD3 regulated p15INK4b to suppress tumor progression. In addition, miR186-5p was identified as a microRNA which suppressed JMJD3 from the result of a microRNA array. Furthermore, we found that miR186-5p suppressed apoptosis, promoted cell cycle, and increased proliferation in colorectal cancer cell, and confirmed that the expression levels of miR186-5p and JMJD3 are inversely correlated in clinical samples. However, no significant correlation was detected between the expression level of miR186-5p and the patient prognosis or tumor progression status.

研究分野：消化器癌(主に大腸癌)における集学的治療および橋渡し研究

キーワード：大腸癌 マイクロRNA 細胞周期 血管新生 上皮間葉転換 化学療法 JMJD3 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Jumonji-domain containing 3 (JMJD3) は Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) が特異的にメチル化するヒストン 3 リジン 27(H3K27)の脱メチル化酵素であり、p16INK4a を再活性化させることでがん細胞の増殖を抑制することが報告されている。EZH2 は、癌抑制遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現を抑制することにより、癌の発育・進展に関与することが報告されているが、JMJD3 に関しては、報告が少なく、大腸癌における役割は明確ではない。

### 2. 研究の目的

種々の癌種における治療成績の改善には化学療法・分子標的治療の進歩がその一翼を担っている。大腸癌においてはその進歩が明瞭であり、切除不能進行再発大腸癌の生存期間は著明な延長を認めている。しかし、依然として化学療法・分子標的薬に抵抗性を示す症例があるため、新規癌治療法の開発が不可欠である。近年、発癌および癌進展における後天的DNA 修飾によるエピジェネティックな遺伝子発現制御の関与が明らかにされてきている。本研究の目的は大腸癌進展におけるJMJD3 を介したエピジェネティックな遺伝子制御機構の解明と新たな癌治療開発の基礎を築く事である。

### 3. 研究の方法

マイクロRNAアレイを用いて、JMJD3を制御するマイクロRNAとしてmiR186-5pを同定した。大腸癌細胞株においてmiR186-5p の過剰発現及び発現抑制を行い、癌の発育進展、抗癌剤感受性の変化を検討する。さらには、miR186-5p、JMJD3 を介したエピジェネティックな制御機構を明らかにする。本研究ではmiR186 - 5 p がJMJD3 を介してp15INK4b/CDH1/VASH1/TFAP2E の制御を行っているという仮説に基づいて、ルシフェラーゼリポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降等を用いてこれを証明する。続いて、in vitro において確認された制御機構を、ヒト検体・in vivo において検討し、生体内での動態を確認する。in vivo での増殖能・浸潤/転移能を評価し、生体内におけるmiR186 - 5 p の役割および臨床応用への可能性を検討する。

### 4. 研究成果

我々は、JMJD3が大腸癌患者において正常部で高発現 (図1) であり、その大腸癌局所での低発現は予後不良因子であること (図2)、および癌抑制遺伝子p15INK4bを制御し大腸癌進展を抑制するメカニズムを初めて明らかにした。また、マイクロRNAアレイの結果から2種類のmiRを検出し、in vitroにてJMJD3を抑制するmiRとしてmiR186-5pを同定した。大腸癌細胞株においてmiR186-5pを強制発現させたところ、JMJD3の発現およびCDH1、VASH1、TFAP2Eとい

図1

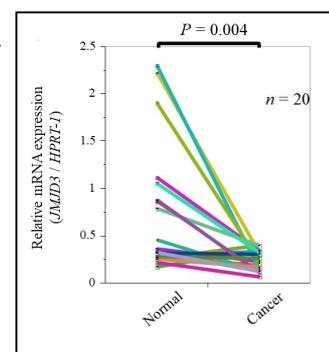
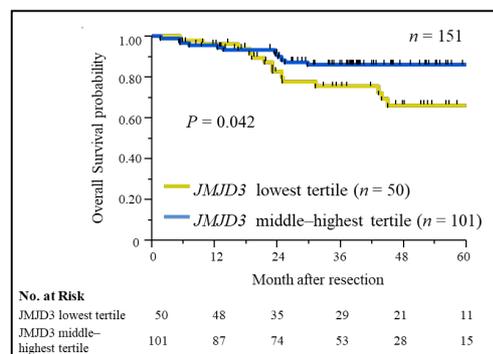


図2



った大腸癌における重要な遺伝子の発現抑制を確認できた。過剰発現を行い、controlと比較することで現象の変化(MTT assayにて増殖能、PI染色・AnnexinV染色・FACS解析にて細胞周期、等)に及ぼす影響を確認したところ、miR186-5pは大腸癌細胞のアポトーシスを抑制し、細胞周期をすすめ、増殖能を上げることがわかった。public databaseの臨床サンプルを用いてmiR186-5pの正常部および癌部での発現量を確認

したところ、癌部で有意に高発現であった (図3)。また、miR186-5pとJMJD3の発現量の関連を確認したところ、逆相関するという結果であった (図4)。さらにmiR186-5pの発現量と予後や臨床病理学的因子との関連を検索したが、仮説と異なり、miR186-5pの発現量は予後や腫瘍進行度と有意な相関関係は認めなかった。以上より研究は比較的順調に進行していたが、in vitroのデータと臨床サンプルを用いた結果の理論的整合性を認めなかった。

図 3

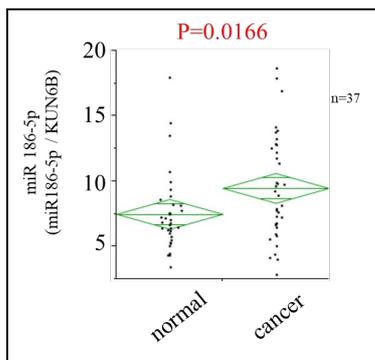
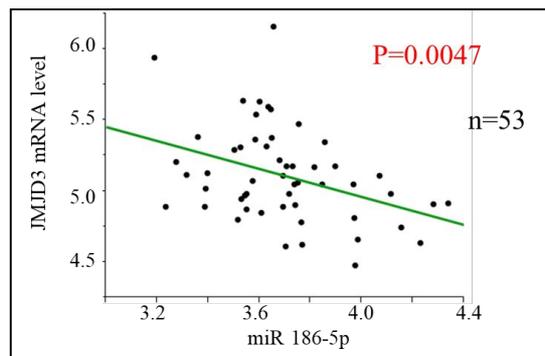


図 4



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Tokunaga R, Sakamoto Y, Nakagawa S, Miyake K, Izumi D, Kosumi K, Taki K, Imamura Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Baba H: The Prognostic Significance of Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2016; 23: 678-85. doi: 10.1245/s10434-015-4879-3
2. Harada K, Baba Y, Shigaki H, Ishimoto T, Miyake K, Kosumi K, Tokunaga R, Izumi D, Ohuchi M, Nakamura K, Kiyozumi Y, Kurashige J, Iwatsuki M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H: Prognostic and clinical impact of PIK3CA mutation in gastric cancer: pyrosequencing technology and literature review. *BMC Cancer* 2016; 16: 400. doi: 10.1186/s12885-016-2422-y
3. Izumi D, Yoshida N, Watanabe M, Shiraiishi S, Ishimoto T, Kosumi K, Tokunaga R, Taki K, Higashi T, Harada K, Miyata T, Ida S, Imamura Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yamashita Y, Baba H.: Tumor/normal esophagus ratio in (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for response and prognosis stratification after neoadjuvant chemotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *J Gastroenterol* 2016; 51: 788-95. doi: 10.1007/s00535-015-1150-4
4. Tokunaga R, Sakamoto Y, Nakagawa S, Ohuchi M, Izumi D, Kosumi K, Taki K, Higashi T, Miyamoto Y, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Baba H.: CONUT: a novel independent predictive score for colorectal cancer patients undergoing potentially curative resection. *Int J Colorectal Dis* 2017 32(1):99-106. doi: 10.1007/s00384-016-2668-5
5. Tokunaga R, Imamura Y, Nakamura K, Ishimoto T, Nakagawa S, Miyake K, Nakaji Y, Tsuda Y, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Saeki H, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Oda Y, Bass AJ, Maehara Y, Baba H: Fibroblast growth factor receptor 2 expression, but not its genetic amplification, is associated with tumor growth and worse survival in esophagogastric junction adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016; 7: 19748-61. doi: 10.18632/oncotarget.7782

6. Alberto Puccini, Martin D. Berger, Madiha Naseem, Ryuma Tokunaga, Francesca Battaglin, Shu Cao, Diana L. Hanna, Michelle McSkane, Shivani Soni, Wu Zhang, Heinz-Josef Lenz: Colorectal cancer: epigenetic alterations and their clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1868: 439-48. doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.09.003
7. Tokunaga R, Akiyoshi T, Hiyoshi Y, Fukunaga Y, Ueno M. Laparoscopic resection of a tumour in the ischio-rectal fossa - a video vignette. *Colorectal Dis* 2017; 19: 787-8. doi: 10.1111/codi.13806
8. Tokunaga R, Sakamoto Y, Nakagawa S, Izumi D, Kosumi K, Taki K, Higashi T, Miyata T, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H: Comparison of systemic inflammatory and nutritional scores in colorectal cancer patients who underwent potentially curative resection. *Int J Clin Oncol* 2017; 22: 740-8. doi: 10.1007/s10147-017-1102-5
9. Tokunaga R, Sakamoto Y, Nakagawa S, Yoshida N, Baba H: The utility of tumor marker combination, including serum P53 antibody, in colorectal cancer treatment. *Surg Today* 2017; 47: 636-42. doi: 10.1007/s00595-016-1464-8
10. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, McSkane M, Baba H, Lenz HJ: CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2017; 63: 40-7. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.007

〔学会発表〕(計0件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：馬場 秀夫

ローマ字氏名：BABA Hideo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。