

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390354
 研究課題名（和文）新しい胃癌の癌抑制遺伝子 RUNX3 の細胞分化・癌化機構の解明と予防・治療への応用
 研究課題名（英文）Molecular analysis of novel tumor suppressor RUNX3 in gastric cancers and its clinical application
 研究代表者
 阪倉 長平 (SAKAKURA CHOUHEI)
 京都府立医科大学・医学研究科・講師
 研究者番号：10285257

研究成果の概要：

我々は、世界に先駆けて Runx3 ノックアウトマウスを作製し、その解析より RUNX3 遺伝子が胃粘膜の発生や分化に重要な役割をはたしており、この異常が胃粘膜の脱分化や異常増殖や癌化に関連することを示した。さらに将来的にはこれらに基づく胃粘膜の発癌リスク予測や胃癌の転移予測などの遺伝子診断や遺伝子治療を目指しており、胃癌の発癌予防や消化管粘膜再生にも応用しようと考えている。また RUNX3 遺伝子の関与する疾患は主に胃癌と考えられていたが、我々は、肝細胞癌、膵臓癌、大腸癌においても RUNX3 遺伝子の関与の可能性を示唆するデータを得ており (*Oncogene*, 2004, 2007)、これらの癌においても RUNX3 遺伝子の異常を指標とした遺伝子診断や遺伝子治療への応用を行ないつつある。

RUNX3 は TGF β 依存性アポトーシスに重要な役割を果たしており、食道扁平上皮癌における放射線化学療法の感受性に関与していることが明らかになった (*Oncogene*, 2007)。また RUNX3 遺伝子の関与する疾患は主に胃癌と考えられていたが、RUNX3 メチル化を指標とした定量メチル化診断システムを用いた血清診断は従来の腫瘍マーカーを補完しうる新しい胃癌の血清診断マーカーになりうる可能性が示唆された (*Anticancer Res.* 2009, in press)。さらに我々は日立ソフト Luminex システムにより、多数の検体における複数遺伝子のメチル化を定量的に短時間で測定しうる迅速血清診断システムを確立し、実地臨床に応用しつつある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
年度			
総計	9,500,000	2,850,000	12,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：RUNX3, 胃癌, 遺伝子診断, 胃十二指腸外科

1. 研究開始当初の背景

Runx 遺伝子ファミリー (Runx1, Runx2,

Runx3) は、遺伝子発現調節をつかさどる転写因子として機能することが知られており、シヨ

ウジョウバエの体節形成に重要とされる segmentation gene RUNT と高いホモロジーを有しており、ショウジョウバエからヒトまで進化の過程で高度に保存されてきた遺伝子群である。急性骨髄性白血病 FAB-M2 亜群における 8;21 転座の切断点からクローニングされた Runx1 遺伝子は、この遺伝子ファミリーの一つであり、ノックアウトマウスの解析結果から血球分化に極めて重要な役割をはたしており、現在ではヒト急性白血病に関連する最も頻度の高い標的であることが明らかにされている (Okuda et al., *Cell*, 1996)。また Runx2 遺伝子はノックアウトマウスの解析結果から骨形成に重要な役割をはたしており、ヒトの常染色体優性性の骨疾患で鎖骨頭蓋異形成症 (cleidocranial dysplasia: CCD) の原因遺伝子であると考えられている (Komori et al., *Cell*, 1997)。このように RUNX 遺伝子ファミリーは、ヒトの疾患に深く関わる重要な遺伝子群であることが明らかとなってきた。これに対し Runx3 遺伝子はノックアウトマウスの解析がまだなされておらず、その機能と疾患への関連が注目されていた。また Runx3 遺伝子は 1 番染色体短腕 1p36 にマップされるが、この領域は以前より胃癌、乳癌、神経芽細胞腫などで高頻度の欠失が報告されており、様々な腫瘍に関連する癌抑制遺伝子の存在が強く示唆されている。この領域より p73 などが候補遺伝子として単離されたが、上記疾患の候補遺伝子としては別の抑制遺伝子の存在が予想されていた。

2. 研究の目的

今回我々は、世界に先駆けて Runx3 ノックアウトマウスを作製し、その解析より RUNX3 遺伝子が胃粘膜の発生や分化に重要な役割をはたしており、この異常が胃粘膜の脱分化や異常増殖や癌化に関連することを示した。さらに胃癌細胞株及び臨床検体における RUNX3 遺伝子の高頻度のコピー数減少、主にメチル化による発現低下、機能喪失型変異を確認しており、RUNX3 が胃癌の新規がん抑制遺伝子であることを報告した (Li, Ito, Sakakura, Fukamachi, (equally contributed) et al., *Cell*, 2002)。また胃癌の発生母地である慢性胃炎粘膜や腸上皮化生における RUNX3 の解析や胃癌の転移浸潤における RUNX3 の関与を明らかとし (*Clin Cancer Res*, 2005)、将来的にはこれらに基づく胃粘膜の発癌リスク予測や胃癌の転移予測

などの遺伝子診断や遺伝子治療を目指しており、胃癌の発癌予防や消化管粘膜再生への応用を目的としている。

3. 研究の方法

(1) 我々は RUNX3 を胃癌の抑制遺伝子として報告したが、各種消化器癌 (食道癌、肝細胞癌、膵臓癌、胆管癌、大腸癌など) における RUNX3 のコピー数変化やメチル化を検討した。
(2) 食道癌放射線耐性株及び臨床検体における発現変化と放射線化学療法の効果の関連を検討した。
(3) RUNX3 メチル化を指標とした定量メチル化診断システムを構築し、これを消化器癌の血清診断に応用し、再発や転移など診断マーカーとしての有用性について検討した。

4. 研究成果

RUNX3 は TGFβ 依存性アポトーシスに重要な役割を果たしており、食道扁平上皮癌における放射線化学療法の感受性に関与していることが明らかになった (*Oncogene*, 2007)。また RUNX3 遺伝子の関与する疾患は主に胃癌と考えられていたが、我々は、食道癌、肝細胞癌、膵臓癌、胆管癌、大腸癌においても RUNX3 遺伝子の関与の可能性を示唆するデータを得ており (*Oncogene*, 2004, 2007)、これらの癌においても RUNX3 遺伝子の異常を指標とした遺伝子診断や遺伝子治療への応用の可能性が示唆された。

さらに RUNX3 メチル化を指標とした定量メチル化診断システムを用いた血清診断は従来の腫瘍マーカーを補完しうる新しい胃癌の血清診断マーカーになりうる可能性が示唆された (*Anticancer Res*. 2009, in press)。さらに我々は日立ソフト Luminex システムにより、多数の検体における複数遺伝子のメチル化を定量的に短時間で測定しうる迅速血清診断システムを確立し、実地臨床に応用しつつある。

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 18 件) 全て査読有

- ① Quantitative Analysis of Tumor-derived Methylated *RUNX3* Sequences in the Serum of Gastric Cancer Patients. Sakakura C, Hamada T, Nishio M, Miyagawa K, Miyashita A, Nagata H, Kin S, Fukuda K, Nakase Y, Hagiwara A, Nakanishi M, Yamazaki J,

- Yoshikawa S, Okamoto K, Kokuba Y, and Otsuji E. *Anticancer Res* (in press)
- ② Laparoscope-assisted superlow anterior resection combined with inter-sphincteric rectal dissection for very low advanced rectal cancers combined with preoperative chemotherapy.
Sakakura C, Nishio M, Miyagawa K, Miyashita A, Nagata H, Kin S, Fukuda K, Nakase Y, Hagiwara A, Nakanishi M, Yamazaki J, Yoshikawa S, Okamoto K, Kokuba Y, and Otsuji E. *Hepatogastroenterology* (in press)
- ③ Attenuated response to liver injury in moesin-deficient mice: Impaired stellate cell migration and decreased fibrosis.
Okayama T, Kikuchi S, Ochiai T, Ikoma H, Kubota T, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Sakakura C, Sonoyama T, Kokuba Y, Doi Y, Tsukita S, Bissell DM, Otsuji E. *Biochim Biophys Acta*. 1782(9):542-8, 2008.
- ④ Overexpression of RegIV in peritoneal dissemination of gastric cancer and its potential as a novel marker for the detection of peritoneal micrometastasis.
Miyagawa K*, Sakakura C*, Nakashima S, Yoshikawa T, Fukuda K, Kin S, Nakase Y, Shimomura K, Oue N, Yasui W, Hayasizaki H, Okazaki Y, Yamagishi H, Hagiwara A, Otsuji E. (*These authors are equally contributed)
Anticancer Res. 28(2B):1169-79, 2008.
- ⑤ Serum concentration of Reg IV in patients with colorectal cancer: overexpression and high serum levels of Reg IV are associated with liver metastasis.
Oue N, Kuniyasu H, Noguchi T, Sentani K, Ito M, Tanaka S, Setoyama T, Sakakura C, Natsugoe S, Yasui W. *Oncology*. 2007;72(5-6):371-80. Epub 2008.
- ⑥ Setoguchi R, Tachibana M, Naoe Y, Muroi S, Akiyama K, Tezuka C, Okuda T, Taniuchi I.
Repression of the transcription factor Th-POK by Runx complexes in cytotoxic T cell development.
Science, 319(5864):822-5, 2008.
- ⑦ Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Okuda T, Kanakura Y.
AML1/runx1 works as a negative regulator of C-MPL in hematopoietic stem cells.
J Biol Chem. 283(44), 30045-56, 2008.
- ⑧ Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fujii S, Fujimori T, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T.
Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology*. 135(3):889-98, 2008.
- ⑨ Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, Takahashi R, Chiba T. Parkin as tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 27(46), 6002-11, 2008.
- ⑩ Kido M, Watanabe N, Okazaki T, Akamatsu T, Tanaka J, Saga K, Nishio A, Honjo T, Chiba T.
Fatal Autoimmune Hepatitis Induced by Concurrent Loss of Naturally Arising Regulatory T Cells and PD-1-Mediated Signaling. *Gastroenterology*, 135(4); 1333-43, 2008.
- ⑪ Ueda Y, Takada Y, Haga H, Nabeshima M, Marusawa H, Ito T, Egawa H, Tanaka K, Uemoto S, Chiba T. Limited benefit of biochemical response to combination therapy for patients with recurrent hepatitis C after living-donor liver transplantation.
Transplantation, 85(6):855-62, 2008.
- ⑫ Shio S, Yazumi S, Ogawa K, Hasegawa K, Tsuji Y, Kida M, Yamauchi J, Ida H, Tada S, Uemoto S, Chiba T. Biliary

- complications in donors for living donor liver transplantation.
Am J Gastroenterol. 103(6):1393-8, 2008.
- ⑬ Regeneration of skeletal muscle using in situ tissue engineering on an acellular collagen sponge scaffold in a rabbit model.
Kin S, Hagiwara A, Nakase Y, Kuriu Y, Nakashima S, Yoshikawa T, Sakakura C, Otsuji E, Nakamura T, Yamagishi H.
ASAIO J. 53(4):506-13, 2007.
- ⑭ Restoration of RUNX3 enhances transforming growth factor-beta-dependent p21 expression in a biliary tract cancer cell line.
Hasegawa K, Yazumi S, Wada M, Sakurai T, Kida M, Yamauchi J, Hisatsune H, Tada S, Ida H, Nakase Y, Sakakura C, Hagiwara A, Chiba T.
Cancer Sci 98(6):838-43, 2007.
- ⑮ Frequent silencing of RUNX3 in esophageal squamous cell carcinomas is associated with radioresistance and poor prognosis.
Sakakura C, Miyagawa K, Fukuda KI, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Ida H, Yazumi S, Yamagishi H, Okanoue T, Chiba T, Ito K, Hagiwara A, Ito Y.
Oncogene;26(40):5927-38, 2007.
- ⑯ Endocrine cell and nerve regeneration in autologous in situ tissue-engineered small intestine.
Nakase Y, Nakamura T, Kin S, Nakashima S, Yoshikawa T, Kurou Y, Miyagawa K, Sakakura C, Otsuji E, Ikada Y, Yamagishi H, Hagiwara A.
J Surg Res, 137(1):61-68, 2007
- ⑰ In situ Tissue Engineering of the Bile Duct Using Polypropylene Mesh-Collagen Tubes
Nakashima S, Nakamura T, Miyagawa K, Yoshikawa T, Kin S, Kuriu Y, Nakase Y, Sakakura C, Otsuji E, Hagiwara A and Yamagishi H.
Int J of Art Org, 30(1):75-85, 2007.
- ⑱ Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T.
Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium.
Nat Med.13(4):470-6, 2007.
- [学会発表] (計 5件)
- ① 新しい胃癌の癌抑制遺伝子 RUNX3 の細胞分化・癌化機構の解析とトランスレシヨナルリサーチへの応用
阪倉長平、大辻英吾、伊藤嘉明
第 50 回日本消化器病学会 東京、2008.10.3
ワークショップ
- ② 新しい胃癌の癌抑制遺伝子 RUNX3 の細胞分化・癌化機構の解析とトランスレシヨナルリサーチへの応用
阪倉長平、西尾 実、宮下 篤史、生駒久視、中西正芳、窪田 健、市川大輔、菊池正二郎、藤原 斉、岡本和真、落合登志哉、国場幸均、谷口弘毅、園山輝久、千葉 勉、大辻英吾、伊藤嘉明
第 63 回日本消化器外科学会 札幌、2008.7.21
ワークショップ
- ③ 新しい胃癌の癌抑制遺伝子 RUNX3 の細胞分化・癌化機構の解析とトランスレシヨナルリサーチへの応用
阪倉長平、大辻英吾、伊藤嘉明
第 17 回日本癌治療病態研究会 京都、2008.5.21
ワークショップ
- ④ 新しい胃癌の癌抑制遺伝子 RUNX3 の細胞分化・癌化機構の解明と予防・診断への応用
阪倉長平、宮川公治、金 修一、中瀬有遠、福田賢一郎、中島 晋、吉川徹二、萩原明於、山岸久一、伊藤公成、伊藤嘉明
第 61 回日本消化器外科学会 東京、2007.7.21,
シンポジウム
- ⑤ 新しい胃癌の癌抑制遺伝子 RUNX3 の細胞分化・癌化機構の解明と診断・治療への応

用

阪倉長平、宮川公治、金 修一、中瀬有
遠、福田賢一郎、中島 晋、吉川徹二、
萩原明於、山岸久一、伊藤公成、伊藤嘉
明

第79回日本胃癌学会総会 名古屋、

2007. 2. 25,

ワークショップ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪倉 長平(Sakakura Chouhei)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：10285257

(2) 研究分担者

奥田 司(Okuda tsukasa)
京都府立医科大学・医学研究科・
准教授
研究者番号 30291587

千葉 勉(Chiba tsutomu)
京都大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号 30188487