

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21591728

研究課題名(和文)大腸癌における ING2 遺伝子発現の臨床学的意義の検討

研究課題名(英文)The clinical significance of ING2 expression in colorectal cancer

研究代表者

隈元 謙介 (Kumamoto, Kensuke)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60457778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000 円、(間接経費) 750,000 円

研究成果の概要(和文)：大腸癌における ING2 発現の生物学的意義を解明し、分子標的治療の開発を目的とする。ING2 の発現は、免疫組織学的解析で、6割の症例で癌組織での発現が強く認められた。cDNA マイクロアレイの結果、ING2 高発現株で、MMP13 の発現が上昇していた。また ING2 高発現細胞で有意に浸潤能が亢進したことから、ING2 発現亢進は、MMP13 を介した浸潤転移に関与している可能性が示唆された。直腸癌の ING2 発現と術前化学放射線治療後の病理学的効果を解析した結果、ING2 発現が弱い症例で、有意に化学放射線療法の奏効率が高く、進行下部直腸癌の術前化学放射線療法の効果予測に有用である可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The biological significance of the ING2 gene expression in colon cancer will be clarified by in vitro experiments using colon cancer cell lines. The aim of this study is to develop the molecules target treatment in clinical practice. In immunohistochemical analysis of ING2 with 130 colorectal cancer, the strong staining was observed in 78 (60%) cases. Overexpression of ING2 induced MMP13 mRNA expression using a colon cancer cell line, HCT116, into which adenoviral ING2 expression vector was transfected, in cDNA microarray analysis. ING2 overexpressed cells acquired the ability of invasion, leading to suggest that enhanced ING2 expression in colorectal cancer might be associated with cellular invasion and metastasis. Weak expression of ING2 was associated with the effect of preoperative chemoradiotherapy for advanced lower rectal cancer. Therefore ING2 could be the useful marker for the effect of preoperative chemoradiotherapy for advanced lower rectal cancer.

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

キーワード：大腸癌 ING2

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、近年消化器領域腫瘍の中で罹患率が欧米並みであり、2012年の大腸癌の新規罹患患者数は約12万人である。大腸癌による死亡者は、2010年で4万8000人であり、部位別の死亡者数では男性では、肺がん、胃がんに次いで3位、女性では1位で乳がんの死亡者の倍近いと報告されている。食生活の欧米化に伴って死亡、罹患とも増えており、2015年にはがん罹患率のトップになると予測されている。今後も引続き早期発見のための検診等の普及を期待される。同時に進行大腸癌の標準治療においても手術療法、化学放射線療法は不可欠であるものの、癌の転移浸潤に対する奏効率にも頭打ちの感があり、新たな分子標的遺伝子の検索とその治療への応用が期待される。

分子標的遺伝子として期待される遺伝子は、その遺伝子の発現が劇的に癌化により変化しうるものが理想である。また、その変化により多くの癌関連遺伝子やアポトーシス関連遺伝子などの発現に直接的あるいは間接的に影響を与えうるとより効果的であると考えられる。近年、クロマチンリモデリングに關与する遺伝子は、細胞における遺伝子発現転写調節をダイナミックにつかさどるため癌研究の分野において大いに着目されている。われわれは、クロマチンリモデリングに關与すると報告された Inhibitor of Growth 2 (ING2) 遺伝子に着目し、遺伝子の消化器癌、特に大腸癌での発現解析をするとともに、大腸癌培養細胞を用いてこの遺伝子の転写発現制御機構またその機能について調べることにより ING2 遺伝子の臨床的意義を明らかにする。さらには、今後治療の標的分子になりうるかどうか検討する。

ING ファミリー遺伝子は、核移行シグナルと PHD ドメインを有する共通性からこれまで5種類報告されている。これらはい

ずれも癌抑制遺伝子 p53 との関係が示唆されており、細胞周期、アポトーシス、細胞老化、また DNA 修復に關与していると考えられている。我々は、最近この ING2 遺伝子が p53 の下流で p53 の活性により ING2 遺伝子の発現が低下し、細胞老化を誘導することを発見した (Kumamoto K *et al.*, *Cancer Research*. 2008)。また ING2 遺伝子はクロマチンリモデリングに強く關与していることが近年報告されており (Shi X *et al.*, *Nature*. 2006; Pena PV *et al.*, *Nature*. 2006)、ING2 遺伝子が様々な遺伝子の発現制御に關わっていると考えている。当初 ING2 遺伝子がクローニングされた際に、大腸癌におけるそのメッセンジャーRNA の解析において、癌組織で正常部に比べて発現が亢進していることが報告されている (Shimada Y *et al.*, *Cytogenet Cell Genet*. 1998)。我々も予備実験として大腸癌における ING2 の発現を RT-PCR にて調べてみた結果やはり癌で発現が亢進していることがわかった。また、癌細胞が ING2 を発現していることを確かめるため In situ hybridization 法により ING2 が間質細胞ではなく癌細胞に強く発現していることを確かめている。しかし、大腸癌において発現が亢進されるメカニズムやその発現が細胞生物学的にどのように寄与しているのかいまだ不明な点が多い。これらを明らかにすることにより、癌の特性を見出し、分子標的遺伝子としての可能性を展開していきたい。

## 2. 研究の目的

本研究では、大腸癌臨床検体を用いて大腸癌における ING2 遺伝子の発現解析と大腸癌培養細胞株を用いて ING2 遺伝子の転写発現制御また大腸癌における臨床学的意義を解明し、臨床応用可能となりうる分子標的治療の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)大腸癌臨床検体における ING2 遺伝子の発現解析：大腸癌臨床検体 100 例の癌組織と正常組織のトータル RNA を抽出し、ING2 遺伝子の mRNA の発現をリアルタイム PCR 法を用いて解析する。また、ING2 遺伝子のタンパクの発現を免疫学的組織染色法にて調べる。

(2) ING2 遺伝子の過剰発現により連動する遺伝子群の解析：アデノウイルスを用いた ING2 発現ベクターを作製する。大腸癌培養細胞株の中から、ING2 遺伝子の発現の比較的弱い細胞株を選び、その細胞にウイルスを介して ING2 遺伝子を過剰発現させ、そのとき連動する遺伝子をマイクロアレイ法を用いて探索する。

(3)培養細胞株を用いて ING2 遺伝子発現によるフェノタイプの観察：大腸癌培養細胞株に ING2 遺伝子を過剰発現させ、細胞の表現系もしくは機能に変化がないか調べる。

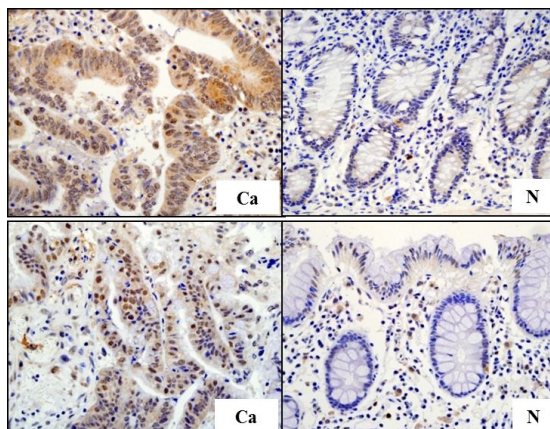
(4) 2003 年より当科にて術前化学放射線治療を施行された進行下部直腸癌 25 例の術前放射線治療前の生検組織について、ING2、p53 とその関連遺伝子 p21、Bax、MDM2 の発現を免疫学的組織染色法にて調べた。この結果と、化学放射線療法の奏効率との関係を調べた。

#### 4. 研究成果

(1)大腸癌臨床検体 80 例の癌部と正常組織における *ING2*mRNA の発現は、正常組織に比べて癌部で有意に亢進していた ( $p<0.001$ )。

そこで、大腸癌臨床検体 130 例を対象に ING2 の発現を抗 ING2 抗体を用いて、免疫組織学的染色を施行した。癌細胞の核に強い染色が認められた(図 1)。正常粘膜細胞にはほとんど発現が認められなかった(図 1)。78 例(60%)の症例で癌細胞での発現

が強く認められた。



(図 1) 大腸癌における ING2 の発現

以上の結果から、大腸癌の 6 割程度の症例において、ING2 の発現が亢進していることが判明した。

(2)大腸癌における ING2 発現亢進の生物学意義について検討した。アデノウイルスベクターを用いて、ING2 の発現ベクターを構築した。大腸癌培養細胞株 HCT116 に遺伝子導入し、ING2 高発現株を作製した。ING2 高発現株と Mock 細胞から total RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイを行った。その結果、ING2 高発現株で Mock 細胞に比べて MMP13 の発現が上昇していた。

今回、大腸癌培養細胞以外に正常細胞の培養細胞株として 293 細胞に ING2 を高発現し、同様に cDNA マイクロアレイ解析を行った。ING2 の発現と連動して発現が 2 倍以上亢進した遺伝子は、LGALS1、C19orf30、GADD45B、MYL1、HSPA1A、VGF、CSH1、DHRS2 であった。

この結果から、ING2 の発現上昇に伴い癌細胞の浸潤転移と関係している MMP13 の発現も連動しており、大腸癌における ING2 発現亢進により、MMP13 を介した浸潤転移に関与している可能性が示唆された。

(3)(2)で作成した ING2 の高発現細胞株 HCT116(Ad-ING2 HCT116)を用いて、Mock 細胞を対照に細胞増殖と浸潤能の評価を行

った。その結果、Ad-ING2 HCT116 は、Mock 細胞と増殖性においては差異は認められなかった。また、浸潤アッセイで、Ad-ING2 HCT116 の方が、Mock 細胞に比べて、有意に浸潤能が亢進した。このとき、MMP13 の阻害剤を用いたところ、浸潤能は抑制されたことから、ING2 発現亢進により、MMP13 を介した浸潤転移に関与している可能性が示唆された。

(4) 進行下部直腸癌の生検組織の各遺伝子の発現と術前化学放射線治療後の組織の病理学的効果判定結果との相関を解析した結果、ING2 の発現が弱い症例で、有意に化学放射線療法の効果が強いことが判明した ( $p=0.005$ )。p53 とその関連遺伝子 p21、Bax、MDM2 の発現と化学放射線療法の効果の間に統計学的に有意な相関は認められなかった。今回我々は、放射線化学療法の効果予測に役立つ分子マーカーの検索において、ING2 遺伝子が有用である可能性を見出した。ING2 の発現が減弱している状態では、放射線や抗癌剤の感受性があがることが示唆された。

#### 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6件)

隈元 謙介、石橋 敬一郎、石田 秀行、大腸癌-最新の研究動向-VIII.大腸癌の治療戦略 化学療法 FOLFOX 療法の治療効果予測因子の探索(TS、ERCC1 など)、日本臨牀、査読無、69 巻、2011、494-499

隈元 謙介、石橋 敬一郎、石田 秀行、特集 消化器癌における分子標的治療 4.大腸癌における分子標的治療 a)切除不能大腸癌における分子標的治療、外科、査読無、73 巻、2011、243-251 Saito M、Kumamoto K、Robles AI、

Horikawa I、Furusato B、Okamura S、Goto A、Yamashita T、Nagashima M、Lee TL、Baxendale VJ、Rennert OM、Takenoshita S、Yokota J、Sesterhenn IA、Trivers GE、Hussain SP、Harris CC. Targeted disruption of Ing2 results in defective spermatogenesis and development of soft-tissue sarcomas. PLoS One. 査読有、5 巻、2010、e15541. doi: 10.1371

隈元 謙介、ING2、GI. Research、査読無、17 巻、2009、87-88

Kumamoto K、Fujita K、Kurotani R、Saito M、Unoki M、Hagiwara N、Shiga H、Bowman ED、Yanaiharu N、Okamura S、Nagashima M、Miyamoto K、Takenoshita S、Yokota J、Harris CC. ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. Int J Cancer、査読有、125 巻、2009、1306-1315 Unoki M、Kumamoto K、Takenoshita S、Harris CC. Reviewing the current classification of inhibitor of growth family proteins. Cancer Sci. 査読有、100 巻、2009、1173-1179. doi: 10.1111

[学会発表](計3件)

隈元 謙介、石橋 敬一郎、天野 邦彦、桑原 公亀、大澤 智徳、岡田 典倫、岩間 毅夫、石田 秀行、当科における StageIV 大腸癌の治療成績の検討、第 66 回日本大腸肛門病学会学術集会、2011

隈元 謙介、石橋 敬一郎、岡田 典倫、田島 雄介、幡野 哲、天野 邦彦、桑原 公亀、大澤 智徳、芳賀 紀裕、石田 秀行、大腸癌における TS,ERCC1 遺伝子発現と FOLFOX 治療効果の検討、第 111 回日本外科学会定期学術集会

[ 誌上開催 ] 2011

隈元 謙介、門馬 智之、鈴木 聡、中村 泉、大木 進司、竹之下 誠一、PD1-14 下部直腸癌に対する術前化学放射線療法の有用性の検討と治療予測因子の探索、第 64 回日本大腸肛門病学会学術集会、2009

[ 図書 ] (計 0 件)

[ 産業財産権 ]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[ その他 ]

ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

隈元 謙介 ( KUMAMOTO, Kensuke )

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 60457778

(2)研究分担者

竹之下 誠一 ( TAKENOSHITA Seiichi )

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 10167489