

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591977

研究課題名(和文)大腸癌に対する新しいエピジェネティックセラピーの開発

研究課題名(英文)Development of new epigenetic therapy for colon cancer

## 研究代表者

坂本 快郎(sakamoto, yasuo)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00452897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌において、JMJD3は正常粘膜で高発現、癌細胞で低発現であった。大腸癌根治切除例において、癌細胞のJMJD3の発現が低いほど予後不良であった。in vitroの検討で、JMJD3はp15を介して細胞周期やアポトーシス制御することで細胞増殖を抑制しており、癌細胞ではJMJD3の発現が低下することで、細胞増殖、抗apoptosisに働くことを見いだした。

また、大腸癌肝転移に対して術前化学療法後に肝切除を施行した症例において、EZH2高発現症例ほど予後不良であった。大腸癌細胞株においてEZH2をknockdownすると、オキサリプラチンに対する感受性が増加することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：We found that the expression of JMJD3 was high in the normal mucosa and low in a cancer cell in colorectal cancer samples. Moreover, we found that the cases with high expression of JMJD3 were significantly better prognosis rather than with low expression of JMJD3 in cases of colorectal cancer performed radical resection. We confirmed that JMJD3 suppressed cell proliferation of colorectal cancer cell line controlling cell cycle and apoptosis through p15 in vitro. Moreover, we confirmed that cell proliferation of colon cancer cell line increased by JMJD3 knockdown using siRNA.

In addition, in the cases with colorectal liver metastasis who underwent hepatectomy after preoperative chemotherapy, the cases with high EZH2 expression was significantly worse prognosis rather than with low expression of EZH2. EZH2 was related to response of preoperative chemotherapy. We confirmed that chemosensitivity for oxaliplatin of colon cancer cell line increased by knockdown of EZH2 using siRNA.

研究分野：消化器外科学

キーワード：JMJD3 EZH2 大腸癌 cell cycle apoptosis オキサリプラチン p15

1. 研究開始当初の背景

< ヒストンコード >

ヒストンは H2A,H2B,H3,H4 それぞれがダイマーを形成し集まった 8 量体である。各ヒストンの N 末端のリジン残基にメチル化、アセチル化などの修飾が入ることであたかも遺伝情報の如く、細胞における遺伝子発現に影響を与えつつ次世代への細胞へと受け継がれる。このことはヒストンコードと呼ばれ (Science. 293:1074-80, 2001)、H3K27 のメチル化は遺伝子不活性化のヒストンコードであり、癌抑制遺伝子の不活性化と関連している (Curr Opin Cell Biol. 14:286-98,2002)。これまでに多くのメチル化・脱メチル化酵素が同定されており、H3K27 の特異的メチル化酵素として EZH2 が、脱メチル化酵素として JMJD3 が同定されている。 (Biochim Biophys Acta. 1815:75-89, 2011)

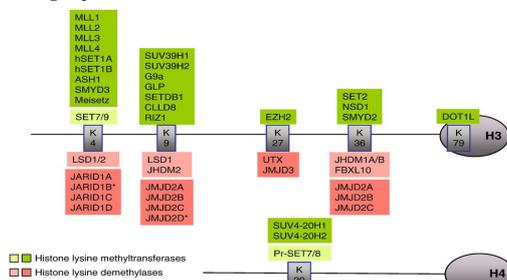


Fig.1 ヒストンのメチル化と酵素

< EZH2 および JMJD3 と癌との関連 >

EZH2 まず前立腺癌において転移巣ほど強発現しており、予後規定因子となりうるとの報告がされた (Nature. 419:624-9, 2002) (Fig.2)、乳癌 (Proc Natl Acad Sci U S A. 100:11606-11, 2003)、胃癌 (Cancer Sci. 97:484-91, 2006) においても同様の報告がなされている。このことから、EZH2 はヒストンコードを介して癌抑制遺伝子の発現を抑制していると考えられる。一方、JMJD3 は癌での発現低下を認め、癌抑制遺伝子の可能性が示唆されているが (Gene Dev. 23:1171-76, 2009) (Gene Dev. 23:1177-82)、予後との相関性などは不明である。

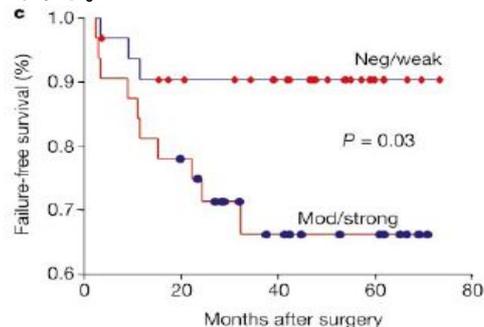


Fig.2 EZH2 発現量と前立腺癌の予後

< 大腸癌肝転移の現状 >

我が国における大腸癌の死亡者数は一貫して増加傾向にあり、2009 年部位別がん死亡率では第 3 位であった。近年、FOLFOX 療法や FOLFIRI 療法といった抗癌剤治療に加え、Bebacizumab、Cetuximab、Panitumumab といった分子標的薬の進歩により、切除不能と診断された大腸癌肝転移症例が化学療法によって切除可能となる症例が増加している。無論、大腸癌肝転移症例では外科的切除が最も治療効果が高く、化学療法などによって如何に切除可能な状態とできるかが予後を大きく左右することとなる。しかしながら、これらの化学療法の進歩にも関わらず、切除可能症例は肝転移症例の約 30%程度であり、さらなる予後の改善のためには新たな治療法の開発が必要と考えられる。

2. 研究の目的

< 我々のこれまでの研究成果 >

我々には以前よりエピジェネティクスを研究対象としており、これまでにメチル化 DNA 結合タンパク質 MBD1 と EZH2 が属するポリコームタンパク質群の一つである hPc2 による転写抑制機構や (J Biol Chem. 282:16391-400, 2007) (Fig.3)、EZH2 の発現が上昇と膵管内乳頭性腫瘍 (IPMN) の癌化との関連性を報告している (Ann Surg Oncol. In press)。今回の研究は、これらの研究成果を大腸癌領域へと応用し、大腸癌肝転移症例の予後の改善のために新たな治療法の開発と、その臨床応用を最終目的としている。

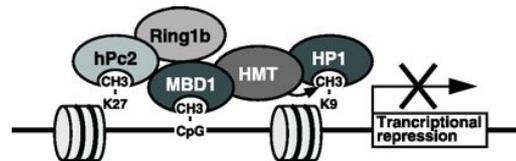


Fig.3 MBD1 と hPc2 による転写抑制機構

研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか

< 大腸癌細胞株における H3K27 のメチル化と EZH2 および JMJD3 の分子生物学的解析 >

これまでの研究に準じた分子生物学的手法 (PCR、RT-PCR、Western blotting 法など) を用いて、大腸癌細胞株における EZH2 および JMJD3 の発現状況および H3K27 のメチル化レベルを解析する。さらに siRNA 法によって EZH2 あるいは JMJD3 を Knock down することで H3K27 のメチル化レベルの変化、細胞増殖や浸潤能への影響を解析する。

< 大腸癌肝転移症例における EZH2 および JMJD3 の発現状況と予後との関連の解析 >

当科において外科的に切除された 100 例以

上の大腸癌肝転移症例の切除標本検体を用いて、EZH2 および JMJD3 の発現状況および H3K27 のメチル化レベルを確認する。さらにその発現レベルと予後との相関性を統計的に解析する。

< 化学療法施行例における EZH2 および JMJD3 の発現状況と治療効果との関連の解析 >

当科のデータベースから大腸癌肝転移症例の臨床経過を詳細に検証することで、化学療法の治療効果と EZH2 および JMJD3 の発現との相関性を検討する。また、化学療法に使用した薬剤と発現状況の関係についても検討する。

< 大腸癌細胞株を用いて既存の抗癌剤との相乗作用に関する検討 >

EZH2 の高発現が卵巣癌におけるシスプラチン抵抗性と関連しているとの報告があることから(Cancer Biol Ther. 10:788-95, 2010)、EZH2 高発現細胞株において EZH2 を Knockdown することで抗癌剤感受性の増強が得られる可能性がある。このことを分子生物学的に検討する。

### 3. 研究の方法

まず、JMJD3 に関して研究を行うこととした。

(1) JMJD3 の発現量と大腸癌切除例の予後との関連に関する検討

当科にて手術を施行した大腸癌症例の凍結サンプルから RNA を抽出し、JMJD3 の発現量を生上部と癌部で比較した。さらに予後との関連を調べた。

(2) in vivo における検討

大腸癌細胞株を用いて in vitro assay を行った。siRNA の手法を用いて JMJD3 を knockdown して、細胞増殖の変化を確認した。また、JMJD3 を knock した後の変化を FACS analyzer を用いて cell cycle および apoptosis について評価した。

(3) EZH2 と抗癌剤感受性に関する検討

術前に化学療法を施行した大腸癌肝転移症例において、EZH2 の発現量と予後および奏効度との関連を検討した。さらに siRNA にて EZH2 を knockdown して抗癌剤感受性の変化を検討した。

### 4. 研究成果

大腸癌切除標本をサンプルとして解析した結果、JMJD3 は正常粘膜では発現が高く、癌細胞において有意に発現が低下していることが分かった。その中でも大腸癌根治切除例において、癌細胞での JMJD3 の発現が低いほど予後不良であることを見いだした。in vitro の検討において、JMJD3 は p15 を介して、細胞周期やアポトーシス制御することで、細胞増殖を抑制しており、癌細胞では JMJD3

の発現が低下することで、細胞増殖、抗 apoptosis に働くことを見いだした。以上の内容で現在論文投稿中である。

また、術前化学療法後に肝切除を施行した症例において、EZH2 高発現症例ほど予後不良である事を見いだした。そこで、大腸癌細胞株を用いて、オキサリプラチンに対する感受性を検討したところ、EZH2 を knockdown すると抗癌剤感受性が増加することを見いだした。こちらは現在実験を継続中である。

### 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 13 件)

1. Nakahara O, Takamori H, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Tanaka H, Chikamoto A, Horino K, Beppu T, Kanemitsu K, Honda Y, Iyama K, Baba H: Carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: loss of microRNA-101 promotes overexpression of histone methyltransferase EZH2. *Ann Surg Oncol* 19 (S3):S565-71, 2012. 査読有
2. Sakamoto Y, Sakaguchi Y, Akimoto H, Chinen Y, Kojo M, Sugiyama M, Morita K, Saeki H, Minami K, Soejima Y, Toh Y, Okamura T: Safe laparoscopic resection of a gastric gastrointestinal stromal tumor close to the esophagogastric junction. *Surg Today* 42(7):708-11, 2012. 査読有
3. Iwagami S, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ida S, Nagai Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: Pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation level in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 19(8):2726-32, 2012. 査読有
4. Mima K, Beppu T, Chikamoto A, Miyamoto Y, Nakagawa S, Kuroki H, Okabe H, Hayashi H, Sakamoto Y, Watanabe M, Kikuchi K, Baba H: Hepatic resection combined with radiofrequency ablation for initially unresectable colorectal liver metastases after effective chemotherapy is a safe procedure with a low incidence of local recurrence. *Int J Clin Oncol* 18(5):847-55, 2013. 査読有
5. Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Karashima R, Imamura Y, Ida S, Ishimoto T, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H: p53 immunohistochemical expression and patient prognosis in

- esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 30(4):728, 2013. 査読有
6. Nakagawa S, Okabe H, Sakamoto Y, Hayashi H, Hashimoto D, Yokoyama N, Sakamoto K, Kuroki H, Mima K, Nitta H, Imai K, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H: Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes progression of cholangiocarcinoma cells by regulating cell cycle and apoptosis. *Ann Surg Oncol* 20 (S3):S667-75, 2013. 査読有
  7. Nakagawa S, Sakamoto Y, Okabe H, Hayashi H, Hashimoto D, Yokoyama N, Tokunaga R, Sakamoto K, Kuroki H, Mima K, Beppu T, Baba H: Epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A inhibits the growth of cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep* 31(2):983-8, 2014. 査読有
  8. Yoshida N, Watanabe M, Baba Y, Ishimoto T, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Karashima R, Baba H: Influence of preoperative docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil on the incidence of complications after esophagectomy for resectable advanced esophageal cancer. *Dis Esophagus* 27(4):374-9, 2014. 査読有
  9. Beppu T, Sakamoto Y, Imai K, Hayashi H, Nitta H, Miyamoto Y, Chikamoto A, Watanabe M, Baba H: A patient with colorectal liver metastases with para-aortic regional lymph node metastases who survived for 7 years. *Int Canc Conf J* 3(3):153-7, 2014. 査読有
  10. Ikuta Y, Takamori H, Sakamoto Y, Hashimoto D, Chikamoto A, Kuroki H, Sakata K, Sakamoto K, Hayashi H, Imai K, Nitta H, Hirota M, Kanemitsu K, Beppu T, Baba H: The modified Glasgow Prognostic Score (mGPS) is a good predictor of indication for palliative bypass surgery in patients with unresectable pancreatic and biliary cancers. *Int J Clin Oncol* 19(4):629-33, 2014. 査読有
  11. Arima K, Watanabe M, Iwatsuki M, Ida S, Ishimoto T, Nagai Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: Volvulus of an ileal pouch-rectal anastomosis after subtotal colectomy for ulcerative colitis: report of a case. *Surg Today* 44(12):2382-4, 2014. 査読有
  12. Miyamoto Y, Watanabe M, Ishimoto T, Baba Y, Iwagami S, Sakamoto Y, Yoshida N, Masuguchi S, Ihn H, Baba H: Fascia lata onlay patch for repairing infected incisional hernias. *Surg Today* 45(1):121-4, 2015. 査読有
  13. Yoshida N, Baba Y, Watanabe M, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Iwagami S, Kurashige J, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Baba H: Triangulating Stapling Technique Covered with the Pedicled Omental Flap for Esophagogastric Anastomosis: A Safe Anastomosis with Fewer Complications. *J Am Coll Surg* 220(2):e13-6, 2015. 査読有
- 〔学会発表〕(計5件)
1. 徳永竜馬、中川茂樹、坂本快郎、泉大輔、小澄敬祐、江藤 弘二郎、杉原栄考、原田和人、村田飛鳥、澤山浩、辛島龍一、井田智、今村裕、石本崇胤、岩上志朗、馬場祥史、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、大腸癌におけるJMJD3による腫瘍増殖制御機構の解明、第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月4日、京都、国立京都国際会館
  2. Ryuma Tokunaga, Yasuo Sakamoto, Mayuko Ohuchi, Yuji Miyamoto, Yukiharu Hiyoshi, Shiro Iwagami, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Hideo Baba, JMJD3 suppresses progression of colorectal carcinoma by regulating cell cycle and anti-apoptosis. AACR Annual Meeting 2014, 2014年4月9日、San Diego, California
  3. 徳永竜馬、中川茂樹、坂本快郎、泉大輔、小澄敬祐、江藤弘二郎、杉原栄考、原田和人、澤山浩、辛島龍一、井田智、今村裕、岩上志朗、馬場祥史、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、大腸癌におけるJMJD3を介した腫瘍増殖抑制機構の解明、JDDW2014 第22回日本消化器関連学会週間(第12回日本消化器外科学会大会)、2014年10月25日、神戸、神戸国際展示場
  4. 徳永竜馬、坂本快郎、大内繭子、宮本裕士、馬場秀夫、miR 186-5pはJMJD3を抑制することで大腸癌における腫瘍増殖を促進させる、第69回日本大腸肛門病学会学術集会、2014年11月7日、横浜、横浜ベイホテル東急・パシフィコ横浜
  5. 徳永竜馬、坂本快郎、大内繭子、中村健一、清住雄希、泉大輔、小澄敬祐、高城克暢、東孝暁、江藤弘二郎、杉原栄考、原田和人、坂田和也、坂本慶太、日吉幸晴、岩上志朗、馬場祥史、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、miR 186-5pはヒストン脱メチル化酵素JMJD3/KDM6Bの抑制

を介し大腸癌における腫瘍増殖を促進させる、第 25 回日本消化器癌発生学会総会、2014 年 11 月 13 日、福岡、ホテル日航福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 快郎 (SAKAMOTO, yasuo)

熊本大学医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00452897

### (2) 研究分担者

林 尚子 (HAYASHI, naoko)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医

師

研究者番号：20452899

別府 透 (BEPPU, toru)

熊本大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：70301372

渡邊 雅之 (WATANABE, masayuki)

公益財団法人がん研究会・がん研有明病院・食道担当部長

研究者番号：80254639

宮本 裕士 (MIYAMOTO, yuji)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80551259