

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390353

研究課題名（和文） 大腸がんにおける DNA メチル化の調節機構解明と遺伝子診断・治療への応用

研究課題名（英文） Mechanistic analysis on DNA methylation in colorectal cancer and its application to diagnosis and therapy

研究代表者

川上 和之 (KAWAKAMI KAZUYUKI)

金沢大学・がん研究所・准教授

研究者番号：00293358

研究成果の概要（和文）：大腸がんのメチル化プロファイルを解析し、メチル化マーカーの臨床応用法を検討した。その結果、long interspersed nuclear element 1 (LINE-1)メチル化の測定は予後予測と術後フッ化ピリミジン系経口抗癌剤による補助治療効果の予測の両方に有用であると考えられた。大腸がん細胞で検討すると、LINE-1 の発現は 5-FU により増加し、同時に DNA の損傷が誘導されることから LINE-1 がコードする DNA 切断酵素活性が 5-FU の効果発現に関与していると示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the clinical value of methylation profile for the prognosis of colorectal cancer (CRC) and for the survival benefit from adjuvant chemotherapy with oral fluoropyrimidines. CpG island methylator phenotype (CIMP) was relatively rare in Japan and its clinical value is limited. In contrast, methylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) was a potential predictive marker for survival benefit from adjuvant chemotherapy with oral fluoropyrimidines in CRC patients. CRC cell lines treated with 5-FU showed increased expression of LINE-1 mRNA. This was associated with upregulation of the phospho-histone H2A.X in cells with low LINE-1 methylation, but not in cells with high LINE-1 methylation. The 5-FU-mediated induction of phospho-histone H2A.X, a marker of DNA damage, was inhibited by knockdown of LINE-1. These findings could be important for achieving personalized chemotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	9,700,000	2,910,000	12,610,000

研究分野：腫瘍学

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：大腸がん、メチル化、抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化の異常はがんに共通したエピジェネティックな変化であり、遺伝子情報発現のパラダイム (DNA→RNA→蛋白) 上、がん固有の遺伝子発現セットを維持する機構の最上位に位置する。遺伝子発現調節の指令塔的役割に加え、DNA メチル化は可逆的な変化であることから、がん治療に適したターゲットとしてその分子機構解明を推進すべき重要な現象である。さらに、がんに特異的なメチル化パターンは、がん診断の高感度マーカーとして利用可能であり、実臨床への応用が期待される。

がんにおける DNA メチル化の異常には特定遺伝子プロモーター領域の高度のメチル化とゲノム全体の低メチル化があり、一見全く逆の現象が DNA 上に観察される。大腸がんにおけるプロモーター領域のメチル化に関しては国際的にも解析が進んでおり、複数領域に共通して高メチル化を認める腫瘍表現型 CpG island methylated phenotype (CIMP) の存在が明らかとなっている。CIMP はメチル化獲得・維持機構を考察する上で重要な臨床モデルであり、我々は CIMP と葉酸代謝上の中心的な酵素である gamma-glutamyl hydrolase (GGH) 発現との関連を見出した。この関連性から、葉酸代謝がメチル化の獲得・維持に関与していると示唆される。また、プロモーター領域の脱メチル化には核酸除去修復システムによる DNA の脱アミノ化と修復が関与していると考えられており、がんでは、このシステムの障害により異常メチル化が蓄積すると考えられる。プロモーター領域のメチル化に比較してゲノム全体のメチル化は解析が遅れている。Long interspersed nuclear element 1 (LINE-1) はゲノム全体に分布する反復配列であり、LINE-1 のメチル化はゲノム全体のメチル化の良い代用マーカーである。我々は LINE-1 のメチル化定量法を開発し、プロモーター領域のメチル化に加え、ゲノム全体のメチル化の臨床的意義を探索する準備を整えてきた。以上の背景から、大腸がんにおいてプロモーター領域とゲノム全体のメチル化プロファイルを解析し、メチル化マーカーの臨床的活用法を探索すると共に、異常メチル化の獲得機構を葉酸代謝と脱メチル化システムから解明可能であるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、臨床的な大腸がん病変における DNA メチル化異常のプロファイルを把握し、メチル化マーカーによるがん遺伝子診断の確立をめざす。また、メチル基供給システムである葉酸代謝と、脱メチル化システムに焦点を当て、異常メチル化の獲得・維持機構を

解明する。そして、DNA メチル化の制御による新規がん治療法の開発と目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸がんにおけるメチル化プロファイルの解析

300 例の大腸がん手術検体より DNA を抽出し、MethyLight 法により p16, hMLH1, APC, TIMP3, CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1 のプロモーター領域のメチル化を定量した。高メチル化を認める遺伝子数別に、0 から 1 遺伝子を CIMP-negative、2 から 4 遺伝子を CIMP-Low、5 遺伝子以上を CIMP-High、と定義した。ゲノム全体のメチル化を LINE-1 により評価するため、LINE-1 の配列をターゲットとしたマルチカラー MethyLight 法を開発した。以上のメチル化のプロファイルに加え、Microsatellite instability (MSI) phenotype および、K-ras, B-raf の遺伝子変異を同時に解析し、臨床病理学的諸因子との関連を検討した。また、抗がん剤投与情報、予後の判明している 155 例においてメチル化マーカーと予後・抗がん剤感受性との相関性を解析した。さらに、laser capture microdissection を用いて、がん組織の複数部位と転移巣からがん細胞を分離採取し、同一症例内から採取された臨床検体でメチル化マーカーは安定的であるのかを確認した。

(2) LINE-1 低メチル化と 5-FU の効果が関連するメカニズムの解析

LINE-1 メチル化が 5-FU の効果と関連するメカニズムを解析するため、大腸がんの培養細胞 (SW480, SW48, HCT116, HT29, Caco2, CaR-1) を用いて、LINE-1 のメチル化、mRNA 発現量を解析した。mRNA は Northern blotting で解析した。また、5-FU 投与時の LINE-1 の発現量変化を Northern blotting で、DNA 障害の程度をリン酸化ヒストン H2A.X の Western blotting で解析した。さらに、RNA 干渉による LINE-1 発現抑制下でのリン酸化ヒストン H2A.X の変化も解析した。

(3) 核酸除去修復システムと DNA メチル化の関連性解析

メチル化シトシンの脱アミノ化と、脱アミノ化による G:T ミスマッチを除去修復する酵素群として APOBEC (1, 2, 3A, 3B, 3C, 3D, 3F, 3G), AID, TDG, MBD4 の発現を定量 RT-PCR 法を用いて解析した。大腸がん 80 例から RNA を抽出し、各遺伝子発現量と CIMP 表現型との関連性を統計解析した。

(4) GGH 発現と DNA メチル化の直接的関連性解析

CIMP-High の表現型を示す大腸がん細胞 RKO に GGH を安定強制発現させた細胞 (RKO-GGH) を作成した。コントロールとして、ルシフェラーゼ遺伝子を安定強制発現させ

た細胞(RKO-GL3)を同時に作成した。これらの細胞からDNAを抽出し、メチル化レベルを定量した。また、脱メチル化剤を投与しメチル化レベルを低下させた後、継代培養によるメチル化レベルの回復速度を検討した。

4. 研究成果

(1)大腸がんにおけるメチル化プロファイルの解析

CIMP-negative, -Low, -Highはそれぞれ83, 11, 6%の症例で認められた。8%の症例でMSIをみとめた。K-ras, B-rafの遺伝子変異の頻度はそれぞれ39%と9%であった。MSI, CIMP-high症例では有意にLINE-1メチル化が高かった。CIMP-high症例ではB-raf遺伝子変異が、CIMP-low症例ではk-ras遺伝子変異が多かった。CIMP-negative症例では、k-ras遺伝子変異を認める症例でLINE-1のメチル化が高かった。以上の結果から、臨床大腸がんの分子生物学的分類においてK-ras, B-raf, MSI, CIMP, LINE-1メチル化による分類が可能であり、各サブグループでの発がん経路を検討する必要があると考えられた。しかし、B-raf, MSI, CIMP-highそれぞれの頻度は低く、臨床的にマーカーとしての利用価値は限定的であると考えられた。

155例で予後解析を行ったが、MSI, CIMPと予後との関連比較は症例数が少なく統計解析は困難であった。また、LINE-1のメチル化レベルとMSI, CIMPは相関性があることから、MSI, CIMP症例を除いた131例で予後解析を行った。LINE-1のメチル化レベルを中央値でL1-highとL1-lowに分類し、予後との関連を検討した。その結果、手術単独治療例ではL1-low群はL1-high群に比較して有意に予後不良であった。多変量解析でも、LINE-1のメチル化が手術単独治療例における唯一の統計学的に有意な予後因子であった。また、LINE-1のメチル化別に術後フッ化ピリミジン系経口抗がん剤（以下単に抗がん剤）の効果を検討したところ、L1-low群では抗がん剤投与により有意に予後改善が見られたが、L1-high群では抗がん剤投与による予後改善効果は認められなかった。以上の結果から、大腸がんにおけるLINE-1メチル化の測定により、術後のフッ化ピリミジン系経口抗がん剤使用を個別化できる可能性が示唆された。

laser capture microdissectionにより大腸がんの中心部と浸潤部別にLINE-1のメチル化レベルを定量したところ、両部位での差を認めなかった。さらに、原発巣とリンパ節転移巣、遠隔転移巣間でLINE-1のメチル化レベルの相違を検討したが、統計学的に有意な差を認めなかった。これらの結果から、同一症例のがん臨床検体ではLINE-1メチル化レベルは安定的であり、臨床診断に適したマ

ーカーであると考えられた。

(2)LINE-1低メチル化と5-FUの効果が相関するメカニズムの解析

大腸がん細胞においてLINE-1のメチル化レベルと6kbの完全長LINE-1 mRNAの発現性に逆相関が認められた。また、5-FU処理によりLINE-1 mRNAの発現増大を認め、LINE-1の低メチル化細胞(SW480, Caco2)では同時にDNA損傷のマーカーであるリン酸化ヒストンH2A.Xの誘導が観察された。一方LINE-1の高メチル化細胞(CaR-1)ではリン酸化ヒストンH2A.Xは誘導されなかった。さらに、SW480においてRNA干渉を用いてLINE-1の発現を抑制すると、5-FU処理によるリン酸化ヒストンH2A.Xの誘導も抑制された。以上の結果から、5-FUによるDNA損傷のメカニズムにLINE-1の発現が関与していると示唆され、今後、LINE-1発現制御による5-FUの新規効果増強法を開発したい。

(3)核酸除去修復システムとDNAメチル化の関連性解析

核酸除去修復システムに関与する複数の遺伝子発現を、80例の大腸がん定量RT-PCRにより測定したが、今回測定した遺伝子の発現性とCIMP表現型との間に有意な相関は認められなかった。この結果から、プロモーター領域のDNAメチル化獲得機序にシチジンデアミナーゼ活性とG:T mismatches修復機構の関連は少ないと考えられた。

(4)GGH発現とDNAメチル化の直接的関連性解析

GGHを安定強制発現させた細胞(RKO-GGH)とコントロール細胞(RKO-GL3)のLINE-1メチル化レベルには差を認めなかった。しかし、一旦脱メチル化剤でメチル化のレベルを低下させて、その後の回復を観察したところ、RKO-GGHではRKO-GL3に比較してLINE-1メチル化の回復が遅かった。この結果から、葉酸代謝がDNAのメチル化獲得に関与していることが直接的に証明された。一方で、既に異常な高メチル化を獲得した状態では、葉酸代謝の変化によってもDNAメチル化は変動しないと示唆された。今後は、脱メチル化剤などのエピジェネティック薬の効果と葉酸代謝の関連をさらに検討し、エピジェネティック薬の効果増強法を開発したい。

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20件)

① Kawakami K, (他4名), Minamoto T. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation is a potential biomarker for the prediction of response to oral fluoropyrimidines in microsatellite

stable and CpG island methylator phenotype-negative colorectal cancer. *Cancer Sci* 102 (2011), 166-174, 査読有

②Saito K, Kawakami K, (他 3 名), Minamoto T. Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 16 (2010), 2418-2426, 査読有

③Peterson AJ, Kawakami K, Minamoto T, (他 8 名). Helicobacter pylori infection promotes methylation and silencing of trefoil factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans. *Gastroenterology* 139 (2010), 2005-2017, 査読有

④Jin MJ, Kawakami K, (他 6 名), Minamoto T. Different histological types of non-small cell lung cancer have distinct folate and DNA methylation levels. *Cancer Sci* 100 (2009): 2325-2330, 査読有

⑤Mai W, Kawakami K, (他 7 名), Minamoto T. Deregulated glycogen synthase kinase 3 β sustains gastrointestinal cancer cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase. *Clin Cancer Res* 15 (2009): 6810-6819, 査読有

⑥Kawakami K, (他 7 名), Minamoto T. Low expression of γ -glutamyl hydrolase mRNA in primary colorectal cancer with the CpG island methylator phenotype. *Br J Cancer* 98 (2008):1555-1561, 査読有

⑦Iacopetta B, Kawakami K, Watanabe T. Predicting clinical outcome of 5-fluorouracil-based chemotherapy for colon cancer patients: is the CpG island methylator phenotype the 5-fluorouracil-responsive subgroup? *Int J Clin Oncol* 13 (2008): 498-503, 査読有

[学会発表] (計 37 件)

①松之木愛香, 川上和之, (他 3 名), 源 利成. LINE-1 methylation is stable in primary and synchronous metastatic colorectal cancer tissues. 第 69 回日本癌学会学術集会, 2010 年 9 月 23 日, 大阪国際会議場 (大阪府).

②小竹優範, 川上和之, (他 4 名), 源 利成. Distinct DNA methylation profiles and genetic signatures in human colorectal cancer. 第 69 回日本癌学会学術集会, 2010 年 9 月 23 日, 大阪国際会議場 (大阪府).

③小竹優範, (他 8 名), 川上和之, 源 利成. ヒト消化管がん組織検体資源化によるがん研究と個別化医療への応用: Project K の試み. 第 65 回日本消化器外科学会総会, 2010 年 7 月 14 日, 海峡メッセ下関 (山口県).

④Saito K, Kawakami K, (他 3 名), Minamoto T. LINE-1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. 101st Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2010. 4. 19, Washington Convention Center (USA)

⑤川上和之, 源 利成. LINE-1メチル化解析による大腸がんの予後・抗癌剤感受性診断. 第20回消化器癌発生学会総会, 2009年11月26日, オリエンタルホテル広島 (広島県)

⑥川上和之, 源 利成. DNAメチル化マーカーによる大腸がんの予後・抗癌剤感受性診断. 第17回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2009) / 第51回日本消化器病学会大会, 2009年10月15日, 国立京都国際会館 (京都府)

⑦川上和之, (他 4 名), 源 利成. Augmentation of LINE-1 expression is a possible mechanism underlying cytotoxic effect of 5-FU in colorectal cancer. 第68回日本癌学会総会学術集会, 2009年10月2日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑧Iacopetta B, Kawakami K. The CpG island methylator phenotype as a predictor of response to 5FU-based chemotherapy in colon cancer. 第68回日本癌学会総会学術集会, 2009年10月3日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑨Kawakami K, (他4名), Minamoto T. Allele-specific inhibition of thymidylate synthase expression by small interfering RNA. Annual Meeting 2009 of the American Association for Cancer Research, 2009. 4. 20, Colorado Convention Center (USA)

⑩斎藤健一郎, 川上和之, (他 3 名), 源 利成. LINE-1 hypomethylation is a novel prognostic factor in non-small cell lung cancer. 第67回日本癌学会学術総会, 2008年10月29日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

⑪川上和之, (他 4 名), 源 利成. 遺伝子多型とアレル欠失を利用した癌特異的治療開発. 第19回日本消化器癌発生学会総会, 2008年8月28日, 別府 亀の井ホテル (大分県)

⑫Kawakami K, (他 5 名), Minamoto T. Methylation level of LINE-1 repeats as a prognostic factor for the patients with primary colorectal cancer. Annual Meeting 2008 of the American Association for Cancer Research, 2008. 4. 14, San Diego Convention Center (USA)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 癌患者の外科的手術後の治療選択方法

及び予後診断

発明者：川上和之，源 利成

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2008-264695

出願年月日：2008 年 10 月 1 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/shuyoseigyo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 和之 (KAWAKAMI KAZUYUKI)

金沢大学・がん研究所・准教授

研究者番号：00293358

(2) 研究分担者

源 利成 (MINAMOTO TOSHINARI)

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号：50239323

(3) 連携研究者

曾我 朋義 (SOGA TOMOYOSHI)

慶應義塾大学・環境情報学部・教授

研究者番号：60338217

石垣 靖人 (ISHIGAKI YASUHITO)

金沢医科大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：20232275