

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590402

研究課題名（和文） ゲノム不安定化を指標とした抗癌剤耐性評価法の開発と応用

研究課題名（英文） Estimation of the role of genomic instability on drug response and its application for cancer chemotherapy.

研究代表者

幅野 渉 (HABANO WATARU)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50332979

研究成果の概要（和文）：抗癌剤治療では患者間での治療効果や副作用出現の差が認められる。また治療効果に抵抗を示す耐性の克服も課題となる。このような薬物感受性が変動する機構を明らかにし、患者ごとに最適な抗癌剤治療を実施することが重要である。本研究は癌細胞の特徴であるゲノム不安定化に着目し、薬物の代謝（分解）に関わる生体内の酵素の変化が DNA メチル化により生み出され、薬物感受性が変動する原因となることを明らかにした。DNA メチル化が抗癌剤による治療効果を評価する有用な指標となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Inter-individual differences in drug efficacy and toxicity are often observed in cancer chemotherapy. Drug resistance is an especially difficult problem. Therefore, understanding the mechanism of such variability in drug response is the key to personalized drug therapy. This study found that DNA methylation plays a role in the regulation of drug-metabolizing enzymes and can be associated with the variability in drug response. DNA methylation is expected to provide useful information for cancer chemotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：癌、ゲノム不安定化、薬剤感受性、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する薬物治療では、患者ごとに薬物応答性を考慮した有効かつ安全な治療（テーラーメイド薬物治療）が求められる。薬物応答性に個体差を生ずる原因としては、シトクロム P450 (CYP) や UDP グルクロン酸転移酵素 (UGT) などの薬物代謝酵素あるいは薬物トランスポーターの遺伝子多型の関

与が証明されており、癌治療への応用が期待されている。例えばタモキシフェンによる乳癌治療では、CYP2D6 薬物代謝酵素の遺伝子多型が有用な情報となっている (J Pharm Sci. 96:2244 [2007])。

だが治療開始期には有効であったとしても、薬剤耐性により根絶治療が困難となる場合も多い。その原因としては、抗癌剤の代謝

不活性化や細胞外排出の促進、膜透過性の低下などによる薬剤感受性の低下が考えられる。実際に耐性を獲得した癌細胞では、このような薬物動態に関わる因子の多様な変異が観察される (Clin Cancer Res. 6:4618 [2000])。従って抗癌剤耐性の克服に成功するためには、上記のような遺伝的個性の他に、「薬物感受性の変化」の個体差 (癌の個性) も考慮した治療が必要となる。だが、患者ごとに薬物感受性の変化 (すなわち薬物動態関連因子の変化) を予測して最適な抗癌剤を選択し投与量を決定することは現状では困難である。

癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異が長い年月を経て蓄積されることを考慮すると、このような薬物動態関連因子の変化 (変異) が抗癌剤治療中に効率よく蓄積するためには、何らかの機構の関与が必要と考えられる。そこで我々は抗癌剤耐性獲得の機構として、癌細胞の性質である「ゲノム不安定化」に着目した。癌におけるゲノム不安定化の様式には、染色体不安定化 (chromosomal instability, CIN) やマイクロサテライト配列不安定化 (Microsatellite instability, MSI)、CpG islandメチル化 (CIMP) がある。特にDNAメチル化の標的部位であるプロモーター領域のCpG islandは、薬物動態関連遺伝子内にも存在することがわかっている。すなわちゲノム不安定性を有する癌細胞は、DNAメチル化を通じて薬剤感受性の異なるクローンを高頻度に生み出す能力を持ち合わせていると考えることもできる。実際にDNAメチル化がゲノムの広範囲で起こる大腸癌では、抗癌剤による治療成績が良好でない場合が多い。複数の抗癌剤を併用することの意義はここにあり、例えば5-FU (Oncology 71:437 [2006]) やイリノテカン (Ann Sur Oncol. 14:1752 [2006]) と同時に低用量の脱メチル化剤を併用すると治療効果が改善する場合がある。これは癌細胞が耐性を獲得する前に、DNAメチル化というゲノム不安定化の「芽」を未然に摘んでいると考えることもできる。このようなゲノム不安定化の「芽」の中から、特に薬剤感受性に関わる薬物動態関連遺伝子が見つかれば、抗癌剤応答性評価のための重要な指標となることが期待できる。

## 2. 研究の目的

大腸癌培養細胞を対象として、DNAメチル化により発現が制御される薬物動態関連遺伝子を同定し、ゲノム不安定化が薬物感受性の変動と関連する可能性を検討する。そのために1)網羅解析、および2)特定の薬物代謝酵素に着目した解析、を実施する。1)では腸管代謝の *in vitro* モデルとして広く利用されているCaco-2およびLS180を対象とし、BeadChipを用いてゲノム全体のDNAメチル化

状態を網羅解析する。特に両細胞間でDNAメチル化状態が異なる薬物動態関連遺伝子が検出された場合には、DNAメチル化によりこれらの遺伝子の発現が制御され、これが薬剤感受性の変動要因となる可能性が高い。2)では特にCYP3A4 pathwayに着目し、その発現制御に関わる転写調節因子群などを対象に、大腸癌細胞におけるDNAメチル化および遺伝子発現解析を行う。CYP3A4は酵素量および基質となる薬物がもっとも多い重要な薬物代謝酵素であるとともに、遺伝子多型では説明できない個体間の代謝変動が認められる。多くの抗癌剤もCYP3A4の基質となることから、ゲノム不安定化によりその代謝変動要因を明らかにすることは抗癌剤治療において大きな意義がある。

## 3. 研究の方法 (図1)

### (1) DNAメチル化で制御される薬物動態関連因子の網羅的探索

大腸癌細胞Caco-2およびLS180細胞よりゲノムDNAを抽出し、sodium bisulfite処理により非メチル化シトシンのみをウラシルに変換した。このDNAを対象にHumanMethylation27BeadChip (イルミナ社、図2)を用いて各27,578 CpG部位 (14,495遺伝子)におけるメチル化レベルを蛍光色素の強度 (0~1)により評価した。両細胞間で蛍光強度の差が0.5以上となるCpG部位 (遺伝子)をCluster3.0を用いて検索した。その中から薬物動態関連因子のみを抽出し、8種の大腸癌細胞 (Caco-2, Ls180, LoVo, HT29, HCT116, SW48, SW620, DLD1)を対象にbisulfite sequencing および COBRA (combined bisulfite restriction analysis) 法によりDNAメチル化状態を調べた。

### (2) CYP3A4 pathwayに着目した転写調節因子などの解析

CpG island Searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>)によりCYP3A4、pregnane X receptor (PXR)、vitamin D receptor (VDR) および protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1)において、CpG islandもしくはCpG richな領域の存在が証明された。6種の大腸癌細胞 (Caco-2, Ls180, LoVo, HT29, HCT116, SW48)を対象に各遺伝子のmRNA発現量をリアルタイムPCRにより測定するとともに、bisulfite sequencing および COBRA 法によりDNAのメチル化状態を調べた。

### (3) 脱メチル化誘導細胞における遺伝子発現量の解析

6種の大腸癌細胞に脱メチル化剤5-aza-2'-deoxycytidine (DAC)を72時間

処理し、ゲノム DNA および total RNA を回収した。上記 (1)、(2) の遺伝子を対象に DNA メチル化および mRNA 発現量の解析を行った。

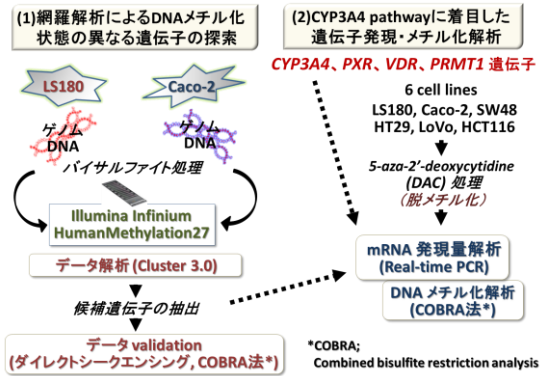


図 1. 研究デザイン

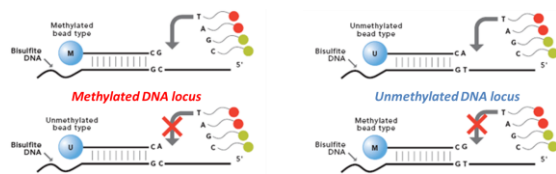


図 2. HumanMethylation BeadChip 法の原理

#### 4. 研究成果

##### (1) DNA メチル化で制御される薬物動態関連因子の網羅的検索

両細胞間で DNA メチル化状態に差がある 2,688 CpG 部位 (9.7%) が同定された。その中には Caco-2 細胞においてメチル化レベルが高い 2,381CpG 部位 (8.6%)、および LS180 細胞においてメチル化レベルが高い 307 CpG 部位 (1.1%) が含まれていた (図 3)。薬物動態関連因子としては、CYP1B1 や UGT1A1 など が検出された (図 4)。8 種の大腸癌細胞では、CYP1B1 遺伝子のメチル化は 2 細胞 (Caco-2、SW48)、UGT1A1 遺伝子のメチル化は LS180 を除く 7 細胞で認められた (図 5)。脱メチル化剤処理による mRNA 発現量は DNA メチル化を有する細胞においてのみで認められたことから (図 6)、これらの遺伝子はメチル化によって発現が制御されていることが証明された。

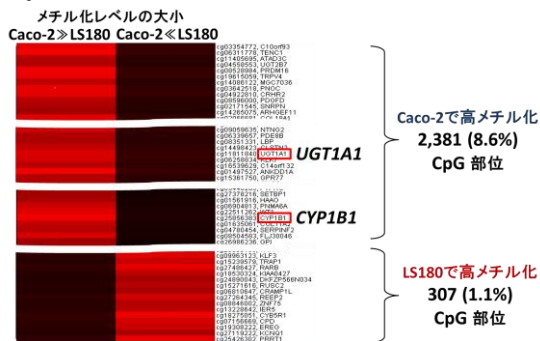


図 3 Cluster 3.0 による解析

Symbol	CpG ISLAND	Caco-2	LS180	Product	Distance (nt)	CpG ISLAND LOCATIONS
CYP1B1	TRUE	0.831552	0.037692	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	388	2-38154099-38158196
CYP1B1	TRUE	0.964784	0.125816	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	73	2-38154099-38158196
UGT1A1	FALSE	0.850385	0.890869	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 precursor	564	
UGT1A1	FALSE	0.860166	0.212538	UDP glycosyltransferase 1 family, polypeptide A1 precursor	247	
VDR	TRUE	0.028843	0.026471	vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor	499	12-46584581-46585908
VDR	TRUE	0.120673	0.161039	vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor	158	12-46584581-46585908

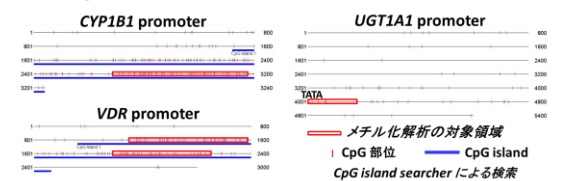


図 4. 抽出された薬物動態関連遺伝子

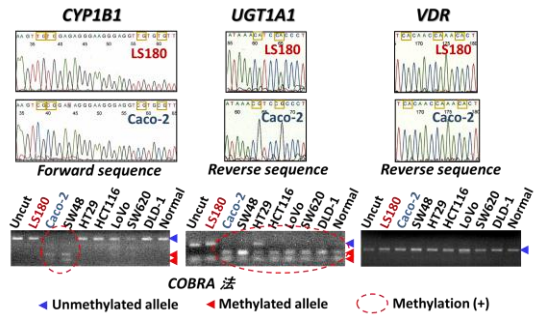


図 5. DNA メチル化状態の確認

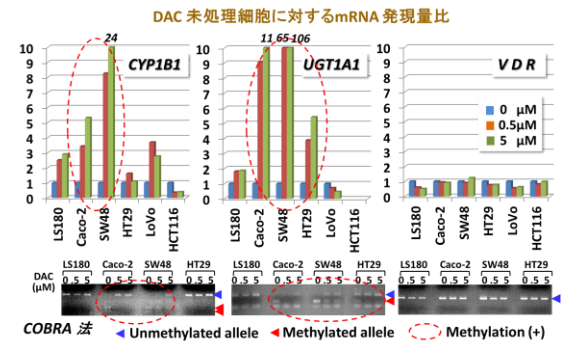


図 6. 脱メチル化による mRNA 発現量変化

##### (2) CYP3A4 pathway に着目した転写調節因子などの解析

6 種の大腸癌細胞は、CYP3A4、PXR、VDR の各遺伝子の mRNA 発現量の高い細胞群 (LS180、LoVo) および低い細胞群 (Caco-2、HT29、HCT116、SW48) に分類された (図 7)。脱メチル化剤処理により CYP3A4 および PXR 遺伝子の mRNA 発現が上昇することから、これらの遺伝子の発現は DNA メチル化により制御されていることが証明された。この脱メチル化剤処理による mRNA 発現量の上昇 (回復) は、低発現細胞においてのみで認められた (図 8)。両細胞群の間で DNA メチル化状態が異なるのは PXR 遺伝子プロモーター領域のみであった (表 1)。この領域の PCR 産物を pCR4-TOPO プラスミドベクターに組み込み、TOP10 大腸菌形質転換によるクローニングを行い、クローンごとの DNA メチル化状態を評価した。mRNA 発現量との相関がもっとも強く認められたの

は、PXR プロモーター内 TATA ボックス近傍領域の CpG 部位のメチル化であった(図 9 左)。mRNA 発現上昇細胞における同 CpG 部位の脱メチル化は、HpyCH4IV 制限酵素認識部位を利用した COBRA 法によっても確認された(図 9 右)。以上の結果より、大腸癌細胞における CYP3A4 発現量の変動要因としては、その転写活性化因子である PXR のプロモーター領域の DNA メチル化が関与する可能性が示唆された(図 10)。

本研究は、DNA メチル化が抗癌剤感受性評価の重要な指標となる可能性を示した。今後は癌治療のみならず多方面での薬物治療において、DNA メチル化が薬剤感受性の変動要因として有用な指標となることが期待される。

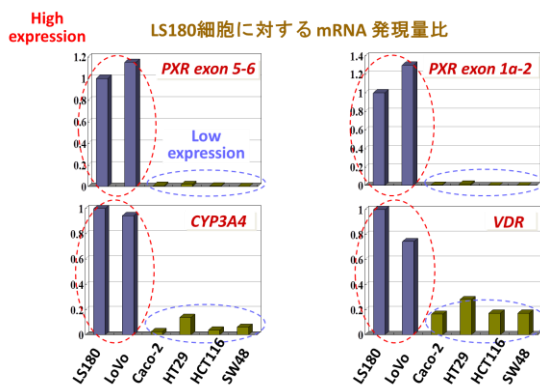


図 7. CYP3A4 pathway の mRNA 発現解析

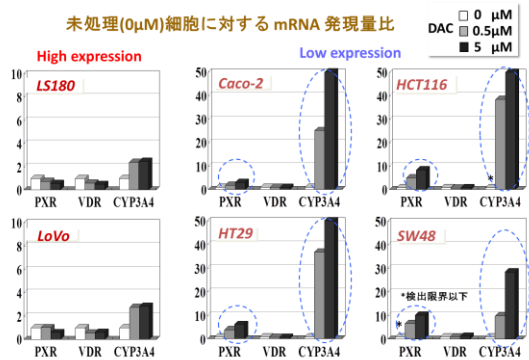


図 8. 脱メチル化による mRNA 発現量変化

	PXR		CYP3A4	VDR	PRMT1
	Promoter	Exon 3	5'UTR	promoter	promoter
High					
LS180	-	+	+-	-	-
LoVo	-	+	+-	-	-
Low					
Caco-2	+	+	+-	-	-
HT29	+	+	+-	-	-
HCT116	+	+	+-	-	-
SW48	+	+	+-	-	-
正常組織	+	-	+-	-	-
癌組織	-	+	+-	-	-

-, unmethylated, +, methylated, +-, partially methylated

表 1. CYP3A4 pathway の DNA メチル化状態

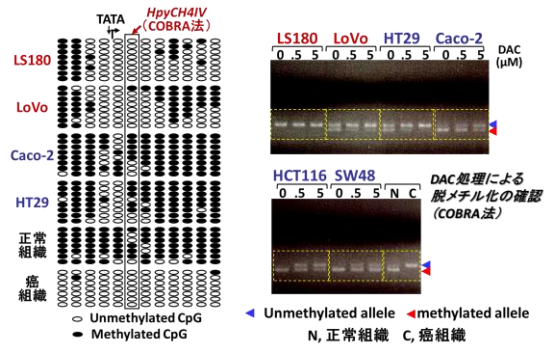


図 9. クローニングによるメチル化部位同定と COBRA 法による脱メチル化の確認

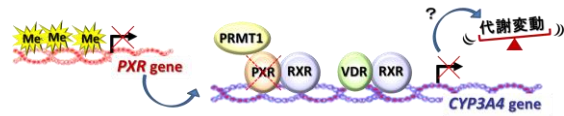


図 10. PXR プロモーターメチル化による CYP3A4 発現・代謝変動のモデル

### 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 12 件)

- Ozawa S, Gamou T, Habano W, Inoue K, Yoshida M, Nishikawa A, Nemoto K, Degawa M. Altered expression of GADD45 genes during the development of chemical-mediated liver hypertrophy and liver tumor promotion in rats. *J Toxicol Sci.* 2011;36(5):613-23.
- Nemoto K, Tanaka T, Ikeda A, Ito S, Mizukami M, Hikida T, Gamou T, Habano W, Ozawa S, Inoue K, Yoshida M, Nishikawa A, Degawa M. Super-induced gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor 2C subunit in chemical-induced hypertrophic liver in rats. *J Toxicol Sci.* 2011;36(5):507-14.
- Hatakeyama S, Mikami T, Habano W, Takeda Y. Expression of connexins and the effect of retinoic acid in oral keratinocytes. *J Oral Sci.* 2011;53(3):327-32.
- Onodera S, Chiba T, Sugai T, Habano W. A genetic association between  $\beta$ 3-adrenoceptor and cholinergic receptor muscarinic 3 polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Hepatogastroenterology.* 2011;58(110-111):1474-8.
- Terashima J, Habano W, Gamou T, Ozawa

- S. Induction of CYP1 family members under low-glucose conditions requires AhR expression and occurs through the nuclear translocation of AhR. Drug Metab Pharmacokinet. 2011;26(6):577-83.
- ⑥ Habano W, Gamo T, Terashima J, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, Ozawa S. Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. BMC Cancer. 2011;11:81.
- ⑦ Tomita K, Chiba T, Sugai T, Habano W. Association between tumor necrosis factor- $\alpha$  and Fc- $\gamma$  receptor polymorphisms with infliximab in Crohn's disease. Hepatogastroenterology. 2010;57(99-100):535-9.
- ⑧ Sato H, Nakamura S, Habano W, Wakabayashi G, Adachi Y. Human intestinal spirochaetosis in northern Japan. J Med Microbiol. 2010;59(Pt 7):791-6.
- ⑨ Sugai T, Habano W, Endoh M, Konishi Y, Akasaka R, Toyota M, Yamano H, Koeda K, Wakabayashi G, Suzuki K. Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers. Int J Cancer. 2010;127(11):2500-9.
- ⑩ Sugai T, Habano W, Jiao YF, Toyota M, Suzuki H, Tsukahara M, Koizuka H, Akasaka R, Koeda K, Wakabayashi G, Suzuki K. Molecular analysis of single isolated glands in gastric cancers and their surrounding gastric intestinal metaplastic mucosa. Oncol Rep. 2010;23(1):25-33.
- ⑪ Nakai K, Oyanagi M, Hitomi J, Ogasawara K, Inoue T, Kobayashi M, Nakai K, Suwabe A, Habano W, Baba T, Yoshida H, Ogawa A. Screening the single nucleotide polymorphisms in patients with internal carotid artery stenosis by oligonucleotide-based custom DNA array. Bioinform Biol Insights. 2009;1:63-9.
- ⑫ Habano W, Gamo T, Sugai T, Otsuka K, Wakabayashi G, Ozawa S. CYP1B1, but not CYP1A1, is downregulated by promoter methylation in colorectal cancers. Int J Oncol. 2009;34(4):1085-91.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Habano W, Gamou T, Terashima J, Ozawa S. Global DNA methylation analysis in

Caco-2 and LS180 colon cancer cells. 日本薬物動態学会第 26 回年会. 平成 23 年 11 月 16 日. 広島.

- ② Habano W, Gamou T, Terashima J, Sugai T, Ozawa. Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells. 日本薬物動態学会第 25 回年会. 平成 22 年 10 月 8 日. さいたま.
- ③ Habano W, Gamou T, Terashima J, Sugai T, Ozawa. Methylation of PXR, VDR, and PRMT1 genes and their roles in the regulation of CYP3A4 expression in colon cancer cells. 日本薬物動態学会第 24 回年会. 平成 21 年 11 月 27 日. 京都.

[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  
 該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

幅野 渉 (HABANO WATARU)  
 岩手医科大学・薬学部・准教授  
 研究者番号 : 50332979

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし