

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23616005

研究課題名(和文)大腸癌におけるHOPXの治療標的の可能性

研究課題名(英文)Therapeutic potential of HOPX target genes in CRC

研究代表者

大木 暁(Ooki, Akira)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50348546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌ではHOPX遺伝子はEphA2発現を低下する。EphA2は未分化型癌に特徴的であるが、大腸癌でもEphA2発現は未分化癌で高かった。(p=0.0083)。未分化大腸癌のEphA2の発現はHOPXメチル化高値例の半分の症例で高発現を示し、HOPXメチル化低値例ではほとんど高発現を認めなかった。このことは予後不良な未分化大腸癌ではHOPXのメチル化・EphA2の発現上が悪性機序として考えられた。以上の結果から予後不良の未分化大腸癌における治療標的としてEphA2に注目することが重要と考え、今後EphA2治療標的の可能性について更なる検討をしたい。

研究成果の概要(英文)：In colorectal cancer, HOPX hypermethylation is closely associated with poorly differentiated histology. As EphA2 is also known to be characteristics to poorly differentiate histology in CRC, and EphA2 was identified as a potential downstream target of HOPX in our previous studies, we are focusing on EphA2 as a therapeutic target in CRC. EphA2 expression is found in 15 out of poorly differentiated CRC, 12 from moderately differentiated CRC, and only 6 cases of 20 highly differentiated CRC (p=0.0083). We then examined 21 poorly differentiated CRC in detail, and EphA2 expression was recognized in about half cases with HOPX hypermethylation (n=11), while EphA2 expression was defective in 2 cases with HOPX hypomethylation. These findings suggested that HOPX may be causative molecule to overexpress EphA2 in primary CRC. In conclusion, EphA2 might be the optimal therapeutic target in primary CRC.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：エピジェネティクス

キーワード：大腸癌 HOPX EphA2 未分化 メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

癌は遺伝子異常によって生じる疾患であるが、遺伝子変異・増幅・欠損に加え epigenetic な異常も起きていることが知られている。なかでも遺伝子発現を調節すると考えられている遺伝子プロモーター領域に存在する CpG アイランドの Cytosine 残基のメチル化は、メチル化シトシンに MeCP2 タンパクを動員することにより HDAC 分子を誘導しクロマチンの凝集に関連し遺伝子発現低下の主な機序として知られている。癌では Oncogene の発現上昇と癌抑制遺伝子の発現低下がダイナミックに生じていることが知られているが、遺伝子発現低下の主要な分子機序として DNA メチル化が大きな役割を果たしていることがこれまでの研究で明らかになってきている。われわれは、DNA メチル化で発現が低下している遺伝子を同定するために Pharmacological Unmasking Microarray 法を開発し腫瘍抑制遺伝子を数多く同定してきた。CRBP1, Apolipoprotein D, PGP9.5, NMDAR2B, HOPX 等がそれにあたる。HOPX 遺伝子は homeobox only protein と呼ばれており、様々なヒト臓器において分化誘導に関わることが知られている。特に、最近では stem cell の marker として注目されており、大腸発生の際に +4 cell という増殖能が低い stem cell の marker として特に利用されている。われわれは、大腸癌において HOPX 遺伝子の役割を明らかにする研究を行ってきたが、HOPX 遺伝子は癌においてメチル化が生じており、発現が低下し、その変化を有する大腸癌は予後不良であることを明らかにしてきた。さらに大腸癌においては未分化大腸癌という比較のまれな悪性度の高い種類の癌で高頻度にメチル化を起こしていることがわかり、未分化大腸癌の特徴である可能性があらと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では未分化大腸癌において HOPX メチル化が高頻度であることから、HOPX 下流で生じる Oncogene の発現変化から未分化大腸癌に特徴的な治療標的を同定することとした。

## 3. 研究の方法

(1) 研究代表者らは、それまでの検討で大腸癌株化細胞に HOPX 遺伝子を導入して安定発現株を G418 を用いて樹立し、包括的遺伝子発現を Affymetrix microarray を用いて行い、Mock 細胞に比較して HOPX 株で発現上昇する遺伝子と発現低下する遺伝子を同定していた。HOPX 遺伝子の下流の遺伝子候補としては Oncogenic な分子の発現低下が認められ、cFox, cJun, EphA2, Cyr61 等が上がっていた。われわれは、その発現変化を RT-PCR で確認していたが、今回の研究は Real time PCR による正確な定量から始めることとした。これらの遺伝子のなかでも EphA2 に特に注目したが、その理由としては HOPX メチル化が低分化大腸癌で高頻度に起こっている変化であることと、EphA2 高発現が大腸癌を含む様々な癌腫で低分化癌の特徴であることを報告されていたからである。Real time PCR の結果 HOPX 遺伝子導入株 (DLD1, HCT116) の両者で EphA2 発現の低下が確認され、HOPX 遺伝子発現により EphA2 発現が抑制されることが示唆された。発現低下の程度としては DLD1, HCT116 でそれぞれ 30%~40%の発現減弱であり統計学的に有意な低下であった。株化細胞においてのこの結果に基づいて、臨床検体でも HOPX 発現と EphA2 の関連を検証することとした。

(2) EphA2 に対するマウスモノクローナル抗体を購入し大腸癌ホルマリン切片の免疫染色をおこなった。EphA2 の染色に関しては主として癌細胞に染色された。間質の染色は

軽度またはほとんど見られなかった。HOPX 染色の陽性コントロールとしては膵臓のラ氏島を用いて毎回 HOPX 強陽性であることを確認した。癌細胞の染色は homogeneous 見られることもあったが、発現の弱い例では heterogeneous に見られることもあった。癌細胞で 20%以上の明らかな染色をする場合を EphA2 陽性例、それ以外の症例を EphA2 陰性例として大腸癌を分類した。われわれが今回検討した症例は原発大腸癌 61 例であり、低分化大腸癌 21 例、中分化大腸癌 20 例、高分化大腸癌 20 例を用いた。EphA2 発現の陽性率は、低分化・中分化・高分化癌でそれぞれ 21 例中 15 例 (75%)、20 例中 12 例 (60%)、20 例中 6 例 (30%) であり、発現の割合は分化型組織型と統計学的に有意な差を認めた ( $p=0.0083$ )。

(3) 次に 21 例の低分化癌の HOPX メチル化レベルを調べた。メチル化レベルは組織より抽出した DNA の濃度を測定し  $\mu\text{g}$  を bisulfite 処理を加え、メチル化 DNA に特異的な配列を用いて定量的 MSP (methylation specific PCR) を用いて測定した。メチル化レベルは癌と正常をもっとも強く層別化することのできる 2.89 をカットオフ値として用いそれより高い値を高メチル化症例、それより低い値を低メチル化症例として分類した。低分化大腸癌 21 例のうち 15 例が HOPX 高メチル化症例であり、それは中高分化大腸癌の頻度より優位に高いことが以前の研究で明らかになっている。今回は、HOPX メチル化と EphA2 の発現についての相関を調べた。EphA2 の発現は HOPX メチル化高値例 15 例のうち 11 例で高発現を示し、逆に HOPX メチル化低値例 6 例中 EphA2 高発現を認めたものは 2 例のみであった。このことは低分化大腸癌において HOPX メチル化高値例においては EphA2 の発現亢進が認められることを臨床検体で確認したこととなった。

(4) 最後に HOPX について免疫染色を行った。11 例について調べた。7 例の低分化大腸癌と 4 例の分化型大腸癌について検討した。7 例の低分化大腸癌はいずれも HOPX メチル化高値例であるが 4 例で劇的に発現が低下していた。このうち 3 例で EphA2 発現陽性であった。一方、分化型大腸癌 (中分化および低分化) 4 例は 2 例で HOPX タンパク陽性であったがいずれも EphA2 陰性であった。以上の結果から HOPX タンパクが低下し、EphA2 タンパクの発現が亢進している低分化大腸においては HOPX-EphA2 経路の活性化により悪性度が高まっている可能性が示唆された。また、低分化大腸癌の特徴とはいえその特徴は排他的なものではなく、分化型大腸癌においても同経路の活性化が起こっている癌が低い頻度ながらあることも確認された。これらの結果を踏まえると大腸癌において予後不良な低分化癌や予後が悪い分化癌において本経路の抑制を考慮に入れた治療標的の可能性があると考えられた。

(5) われわれは、新規癌特異的メチル化遺伝子 HOPX を同定してその癌特異性についての検討、臨床病理学的因子についての検討、予後の検討、下流遺伝子についての検討を加えることで大腸癌の一部の症例に特徴的な悪性度機序が存在することを明らかにした。今回の研究では HOPX-EphA2 について特に注目して検討することでこれまでに知られていなかった新たな癌悪性度原因機序が明らかになると同時に治療標的としての有望性を提唱できた。さらなる治療実験、前臨床試験を通じてこの結果を臨床応用へと近づけていきたいと考えている。

#### 4. 研究成果

今回の研究成果として大腸癌における HOPX メチル化の悪性度への分子機序の解明が一部行えたことが挙げられ、このことは将

来の大腸癌の治療戦略に影響するデータが得られたと考えられた。

HOPX メチル化は予後の不良な stage III 大腸癌で予後因子になることがわかっており、stage III 大腸癌の予後不良例は術後補助化学療法を含めた新たな治療戦略を必要とすると考えられる症例群である。そのような症例の予後不良に対する分子機序の一部が解明されたことは、今後患者選択、分子機序に基づいた治療法開発に極めて有用な情報を提供すると考えられる。実際に stage III 大腸癌での EphA2 の治療標的としての可能性については今後の検討が待たれるが、われわれは HOPX-EphA2 axis を明らかにすることにより実際の臨床への応用の足掛かりを手にした。

EphA2 は Ephrin の receptor であり、Ephrin 投与により発現が低下することが知られている。これはとりもなおさず Ephrin が治療薬としてのポテンシャルを有し、実際に clinical phase で検討中であることを考えると大きな進歩である。EphA2 を制御する方法としてはそれ以外にも様々な方法が提案されている。今後は状況に応じた抑制法を選択しながら癌の制御の研究にさらに邁進したい。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

山下継史, 加藤弘, 藁谷美奈, 大木暁, 河又寛, 江間玲, 細田桂, 森谷宏光, 桜本信一, 片田夏也, 渡邊昌彦: 消化器癌浸潤転移に関する epigenetic 異常同定と癌診断・治療への応用. 第 113 回日本外科学会定期学術集会 (ポスターセッション (77)) 「大腸 発癌・悪性度-1」, 2013 年 4 月 11 日, 福岡. (日本外科学会雑誌, 114 (2): 626, 2013.)

Keishi Yamashita, Mina Waraya, Hiroshi Katoh, Akira Ooki, Hiroshi Kawamata,

Kazunori Nakamura, Hiroshi Nishimiya, Akira Ema, David Sidransky, Masahiko Watanabe: Epigenetic conversion on p53 pathway in human cancer: The clinical potential of p53 mutation status as a predictive biomarker for drug sensitivity by epigenetic treatment. AACR2013: American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013, 2013 年 4 月 10 日, Washington, DC/USA.

山下継史, 藁谷美奈, 加藤弘, 大木暁, 河又寛, 根本昌之, 柴田智隆, 三重野浩朗, 片田夏也, 渡邊昌彦: 食道扁平上皮癌の Epigenome 解析. 第 66 回日本食道学会学術集会 (シンポジウム 3 食道癌からサイエンスを考える), 2012 年 6 月 22 日, 軽井沢. (日本食道学会学術集会プログラム・抄録集, 66 回: 136, 2012.)

山下継史, 藁谷美奈, 加藤弘, 大木暁, 渡邊昌彦: 大腸がんにおける癌抑制遺伝子 HOPX と AP-1 (c-Fos/c-Jun) 経路のクロスリンクと細胞死. 第 112 回日本外科学会定期学術集会 (サージカルフォーラム (88)) 「大腸 基礎-1 (発癌)」, 2012 年 4 月 14 日, 千葉. (日本外科学会雑誌, 113 (2): 403, 2012.)

Akira Ooki, Keishi Yamashita, Masahiko Watanabe: Therapeutic potential of PRL-3 targeting and clinical significance of PRL-3 genomic amplification in gastric cancer. ISW2011: International Surgical Week (Poster Exhibition Stomach/Duodenum), 2011 年 8 月 28 日-9 月 1 日, 横浜市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大木 暁 (OOKI, Akira)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 50348546