

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591985

研究課題名(和文)EMAST大腸がんの発生機構の解明と悪性度予測因子の検索

研究課題名(英文)Studies in molecular events of EMAST colorectal cancer and prognostic factors

研究代表者

逸見 仁道 (HEMMI, Hiromichi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：90165514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロサテライト不安定性(MSI)はゲノム不安定性の一つであり、高頻度のMSI-Hと低いMSI-LおよびEMASTとに分類される。EMAST腫瘍は大腸がん約6割を占め、予後不良である。本研究ではEMAST腫瘍発生の分子機構の解明を通して大腸がんの診断や治療に結びつく研究を行うことを目的とした。培養細胞を用いて試験管内でのEMAST発生に成功し、その要因としてp53遺伝子変異と長期間の低酸素培養であることが明らかとなった。更に、Warburg効果として知られている経路や遺伝子の発現が顕著であり、特徴的な分子も見出された。これらの分子が診断等に役立つかどうかは今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Microsatellite instability (MSI) is a hypermutable phenotype in human cancers. Elevated microsatellite alterations at select tetranucleotides (EMAST), distinct from MSI-high and MSI-low, found in around 60% of colorectal cancer in Japan and USA. Here, we studied molecular events accompanying with generation of EMAST. First, we succeeded establishment of in vitro system for EMAST generation using human colorectal cell lines. p53 gene mutation and long-term cultivation under hypoxia is important for the generation. Pathways and changes in gene expression were mostly known as Warburg effects. However, characteristic molecules such as caveolins and keratin-associated proteins were found. In addition, inhibitors of such pathways and molecules were listed. Whether these inhibitors and characteristic molecules are really useful for cure and/or diagnosis for colorectal cancer, further detailed studies are required.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：ゲノム不安定性 EMAST 大腸がん p53 低酸素 DNAミスマッチ修復

1. 研究開始当初の背景

大腸がんの予後は集約的治療法の確立等により、近年、飛躍的に改善された。しかしながら、高ステージ (IIIb,IV) の予後は極めて悪く、新たな視点による診断法や治療法の改善や開発が望まれている。我々は、大腸がんで頻度の高い elevated microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats (EMAST)腫瘍に着目した。EMAST腫瘍は2000年に Ahrendt らにより肺小細胞癌で報告され、従来から知られていた DNA ミスマッチ修復(MMR)遺伝子 hMLH1 や hMSH2 の欠損により引き起こされる microsatellite instability-high (MSI-H)とは異なるゲノム不安定性の様式として定義された [1]。その後、頭頸部癌や腎癌など様々な癌種で見られることが判明したが、その原因や臨床的意義については不明であった。我々は、大腸癌細胞株を用いた研究から EMAST の原因遺伝子が MMR 遺伝子の1つ hMSH3 であることを米国 Baylor 大の Boland グループと共同で2008年に報告し [2]、また、米国でも本邦でも散発性大腸癌では高頻度(60%)であることを見出した[2,3]。我々の報告に引き続き、同様の報告が韓国や米国 UCSD のグループからも出され、かつ、腫瘍の進展に伴った頻度の上昇も見出され [4,5]、hMSH3 発現低下は EMAST および MSI-L を示すことが追試された[5]。しかしながら、hMSH3 発現低下の分子機構や EMAST 腫瘍発生機構は不明であった。そこで、まず hMSH3 遺伝子の発現低下機構の解明を行った。EMAST 腫瘍では hMSH3 遺伝子の機能喪失につながるような変異は見出されず、発現低下は遺伝子変異以外の機構によると考えられた。すでに、hMLH1 や hMSH2 の MMR 遺伝子の発現抑制が知られている低酸素状態に着目し検討を行ったところ、p53 の状態により発現抑制パターンが異なること並びに p53 変異細胞で起こるパターンが EMAST 腫瘍発生機構として考えやすいことを見出した[6]。しかしながら、分子レベルでの EMAST 発生機序を考察した場合、低酸素による hMSH3 発現低下のみでは EMAST は生ぜず、さらに検証が必要であると考えられた。腫瘍塊では酸素の供給が不安定である。酸素供給が十分な状態と不十分な状態を往き来すると考えられている。このような微小環境での酸素供給の不安定性により hMSH3 遺伝子発現は抑制と促進の間を行き来することにより EMAST 腫瘍の誘発を招いているのではないかと推論した。EMAST 発生には、MutS (hMSH2+hMSH6) 経路が機能していることが必須であり、MutS (hMSH2+hMSH3) のみ機能喪失していると考えるのが自然である。従来報告のある低酸素による MMR 遺伝子 (hMSH2,hMSH6 及び hMLH1) の発現抑制[7,8]のみによる説明では大部分の大腸がんは MSI-H 腫瘍ということになるが、MSI-H 腫瘍は高々15%程

度であり、更なる詳細な検討が必要である。また、MMR を含む DNA 修復には DNA 複製反応、即ち、細胞増殖が必須であり、細胞増殖や生存に關与する遺伝子の発現増強も同時に起こっていると推察できる。

EMAST の意義については、高ステージや転移腫瘍でさらに高頻度で見つかることから、悪性度ならびに転移の指標になる可能性が大きい[4,5,9]。しかしながら、現状での EMAST 判定のための手順は簡便ではなく、判定のための簡便法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では EMAST 腫瘍発生機構を詳細に検討することにより、腫瘍の生存や腫瘍幹細胞としての特徴を示す遺伝子の情報伝達系の解明を通じて、新規の腫瘍マーカーとなりうる遺伝子の同定へとつながる研究を目指す。即ち、以下の2段階で研究を進める。

- 1) hMSH3 発現制御 (抑制と促進) を指標として EMAST 腫瘍発生条件を明らかにする。
- 2) 同条件下で増殖および生存を直接的ないしは間接的に制御する遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

EMAST 発生の分子機構の解明を行うため、ヒト大腸がん由来樹立細胞株 SW480, SW620, HCT116 などを低酸素ならびに通常酸素分圧にて培養し、ミスマッチ修復遺伝子の発現の変化を調べた。この情報をもとに EMAST 発生のための培養条件を検討した。EMAST を含む MSI は mono-nucleotide repeat 2 種 (BAT25, BAT26), di-nucleotide repeat 1 種 (APC), tetra-nucleotide repeat 6 種 (MYCL1, L17686, UT5320, D9S242, D20S82, D11S488) の合計 9 種の MSI マーカーを用いて調べた。遺伝子発現はマイクロアレイ、qRT-PCR, Western blot 法などを用いて検討した。細胞増殖抑制は WST-8 による吸光度測定により行った。

4. 研究成果

1) EMAST 発生条件の検討

ヒト大腸がん由来細胞株 SW480 (p53 変異株) および HCT116+3+5 (p53 野生株) の hMSH3

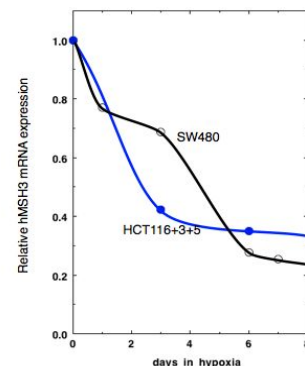


図1. 低酸素下でのSW480およびHCT116+3+5細胞におけるhMSH3 mRNA発現の経時的変化

mRNA 発現に対する低酸素の影響を調べたところ、SW480 は 6 日まで、HCT116+3+5 は 3 日まで低下を続けそれ以降はプラトーに達することが分かった(図 1)。また、SW480 ではタンパクレベルでも同様の結果を得た(図 2)。また、hMLH1 のタンパク発現は低酸素 7 日目で約 7 割残っていた。これらに結果から 6~7 日間の低酸素培養時には、MutS 経路は働き、MutS 機能は減弱していることが考えられた。

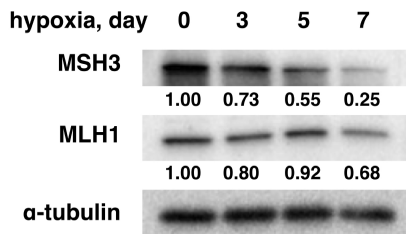


図2. 低酸素下でのSW480細胞におけるhMSH3およびhMLH1タンパク発現の経時的変化

そこで、SW480 および SW620 を低酸素で 7 日間培養し、細胞クローニングを行い、MSI を調べた。得られたクローンから DNA を抽出し、親株と nucleotide repeat 数を比較した。その結果、SW480 では 4 クローン(9.8%)、SW620 では 6 クローン(7.5%) が tetra で不安定を示したが、mono や di では安定であった(表 1)。一方、通常酸素濃度で同期間培養から得られたクローンには全く不安定性は見出されなかった。以上の結果から、培養細胞を低酸素で 7 日間程度培養することにより、EMAST が生じることが明らかとなった。

表1. Efficiency of EMAST generation

| cell line | Nos. of clones |       | generation efficiency, % |
|-----------|----------------|-------|--------------------------|
|           | analyzed       | EMAST |                          |
| SW620     | 80             | 6     | 7.5                      |
| SW480     | 41             | 4     | 9.8                      |

EMAST 発生が見られた細胞株はいずれも p53 変異株であり、低酸素による hMSH2, hMSH6, hMLH1 などの MMR 遺伝子発現抑制パターンと考え合わせると矛盾のない結果であるが[6,9]、p53 野生株での EMAST 発生頻度についても検討しておく必要があると考えた。当初、HCT116 とその亜株を用いて、細胞クローニングを試みたが、選択マーカーに対する感受性が変化するなど高いゲノム不安定性を示し、上手くいかなかった。現在、変異株に p53 発現ベクターを導入した実験系を確立中であり、現時点では結論に至っていない。しかしながら、p53 野生株では、MHH3 のみならず MSH2 の発現抑制も起こるので、理論的には EMAST を引き起こす可能性は低く、むしろ MSI-H になる可能性が高い。P53 変異株でのみ EMAST が起こるのか、MMR 遺伝子発現制御に p53 分子が直接関わっているという報告

はなく、その分子機構の解明に興味を持たれた。

## 2) EMAST 発生時の遺伝子発現

SW620 での EMAST 発生時の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて調べた。通常酸素濃度培養時と低酸素培養時の遺伝子発現を比較した。Pathway 解析したところ、低酸素培養時に顕著に上昇したのは嫌気性糖代謝経路や MAPK pathway の活性化など、Warburg effect として知られている代謝経路が大部分であった。発現上昇率が大きかった遺伝子を見てみると幾つか特徴的な傾向が見られた(表 2)。

表2. The top 10 most up-regulated and down-regulated genes

| change-fold*                | gene symbol     | Description  |
|-----------------------------|-----------------|--|
| <b>up-regulated genes</b>   |                 |  |
| 279.6                       | KRTAP3-1        | keratin associated protein 3-1   |
| 149.1                       | NDRG1           | N-myc downstream regulated 1, transcript variant 2                                       |
| 52.8                        | UCN2            | urocortin 2  |
| 47.0                        | EGLN3           | egl nine homolog 3 ( <i>C. elegans</i> )   |
| 36.9                        | ITGB2           | integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit), transcript variant 1 |
| 36.8                        | IGF2            | insulin-like growth factor 2 (somatomedin A), transcript variant 1                       |
| 28.8                        | SLC2A14         | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14                     |
| 28.6                        | EDN1            | endothelin 1, transcript variant 1   |
| 28.4                        | SLC2A3          | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3                      |
| 27.2                        | RGCC (C13orf15) | regulator of cell cycle (chromosome 13 open reading frame 15)                            |
| <b>down-regulated genes</b> |                 |  |
| 35.0                        | SPINK1          | serine peptidase inhibitor, Kazal type 1   |
| 24.2                        | CDX2            | caudal type homeobox 2   |
| 23.5                        | ITPR2           | inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2  |
| 21.7                        | DDC             | dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase), transcript variant 2           |
| 19.5                        | SNAR-A3         | small ILF3/NF90-associated RNA A3 (SNAR-A3), small nuclear RNA                           |
| 18.7                        | HIST1H2AI       | histone cluster 1, H2ai  |
| 16.0                        | HIST1H3H        | histone cluster 1, H3h   |
| 15.8                        | PRSS1           | protease, serine, 1 (trypsin 1)  |
| 15.4                        | HIST2H3A        | histone cluster 2, H3a   |
| 14.9                        | HIST1H2BF       | histone cluster 1, H2bf  |

\*Change value are calculated by dividing H7 by N7 for up-regulated group and N7 by H7 for down-regulated group.

Ca<sup>2+</sup> の細胞内流入に関わっている Caveolin 類やインテグリンは、MAPK pathway の上流にあり増殖に関与していると考えられた。また、keratin associated proteins の上昇も顕著ではあるが、現在のところ、役割は不明である。

## 3) 分子標的阻害剤の細胞増殖阻害作用

マイクロアレイ解析結果を踏まえて、標的分子の明らかとなっている阻害剤を用いて増殖抑制効果を調べた。その結果、低酸素培養下で増殖抑制活性が増強される阻害剤として、K<sup>+</sup> ionophore (valinomycin, nigericin), Na<sup>+</sup> ionophore (monensin), Ca<sup>2+</sup> channel blocker (diltiazem) など細胞内イオン濃度制御を無効にする薬剤、growth factor receptor 阻害剤 AG1024 (IGF1R, IR), SU1498 (VEGFR) が見いだされた。一方、活性化していることが示された MAPK pathway 上にあるタンパクが標的となっている阻害剤である U0126 や PD98059 などは阻害活性の減弱が見られた。これらの結果から cation transport ならびに tyrosine kinase receptor のうち VEGFR や IGF1R が分子標的の候補として挙げられた。一方、有効性が減弱した阻害剤から標

的分子として再考を要するもの ( tubulin, ATPase など ) も明らかとなった。

#### 4) 終わりに

大腸がん細胞株の低酸素培養により EMAST が生じることを明らかにしたが、EMAST の原因遺伝子が MSH3 であることから [2]、MSH3 機能低下による EMAST 発生と悪性化との関連について興味がわく。すなわち、EMAST 発生の延長上に悪性化があるのか、あるいは単純に悪性化は EMAST と並行して起こっていることなのかということである。これまで直接的な証拠はないが、遺伝子のコーディング領域に tetra-nucleotide repeat が見出されないことなどを考えると、悪性化は平行して起こっており、MSH3 機能低下を招く腫瘍の微細環境が重要であろうと考える。そういった意味で、本研究により見出された EMAST 発生の条件は今後の大腸がん研究に役立つと思われる。また、試験管内で見出された知見が臨床の現場で役立つかどうか、動物実験等で検証する必要がある。

#### < 引用文献 >

1. Ahrendt SA, et al.: Microsatellite instability at selected tetranucleotide repeats is associated with p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000 May 1;60(9):2488-91.
2. Haugen AC, et al.: Genetic instability caused by loss of MutS homologue 3 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 2008 Oct 15;68(20):8465-72.
3. Yamada K, et al.: Microsatellite instability at tetranucleotide repeats in sporadic colorectal cancer in Japan. *Oncol Rep.* 2010 Feb;23(2):551-61.
4. Lee SY, et al.: Microsatellite Alterations at Selected Tetranucleotide Repeats Are Associated With Morphologies of Colorectal Neoplasias. *Gastroenterology.* 2010 Aug 11.
5. Devaraj B, et al.: Relationship of EMAST and microsatellite instability among patients with rectal cancer. *J. Gastrointest Surg.* 2010 Oct;14(10):1521-8.
6. Li J, et al.: Down-regulation of MutS homolog 3 by hypoxia in human colorectal cancer. *Biophysica Biochemia Acta, Mol. Cell Res.* 2012 Apr;1823(4):889-99..
7. Mihaylova VT, et al.: Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2003 May;23(9):3265-73.
8. Koshiji M, et al.: HIF-1 $\alpha$  induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutS $\alpha$  expression. *Mol Cell.* 2005 Mar 18;17(6):793-803.
9. Carethers JM, et al. EMAST is a Form of Microsatellite Instability That is Initiated by

Inflammation and Modulates Colorectal Cancer Progression. *Genes (Basel).* 2015 Mar 31;6(2):185-205.

#### 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 1 件 )

Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Koike J, Hemmi H, Balaguer F, Nagasaka T, Koi M, Boland CR, Goel A. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut.* 2013 Sep;62(9):1315-26. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301846. ( 査読有 )

#### [ 学会発表 ] ( 計 8 件 )

有田通恒, 黒岩 実, 上條岳彦, 近藤元就, 逸見仁道. N-myc 非増幅神経芽腫細胞株 SK-N-SH が示す低酸素応答の施設間多様性. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2014 年 11 月 28 日, 岡山コンベンションセンター ( 岡山県・岡山市 )

有田通恒, 近藤元就, 逸見仁道. EMAST 大腸がんの悪性化に寄与する遺伝子の検索. 第 73 回日本癌学会学術集会, 2014 年 9 月 27 日, パシフィコ横浜会議センター ( 神奈川県・横浜市 )

Garcia M, Hemmi H, Koi M., et al. Pathological Significance of MSI-L/EMAST and 9p24.2 LOH in Colorectal Cancers. *Digestive Disease Week 2014*, May 4, 2014, Chicago (USA)

有田通恒, 酒井 正人, 黒岩 実, 近藤元就, 逸見仁道: N-myc 非増幅神経芽腫細胞が示す MAPK 経路活性化を介した低酸素性 N-myc 発現増加と増殖亢進. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月 25 日, ヒルトン福岡シーホーク ( 福岡県・福岡市 )

有田通恒, 久郷裕之, 近藤元就, 逸見仁道: 低酸素条件における大腸がん由来細胞での EMAST の発生誘導. 第 72 回日本癌学会学術集会, 2013 年 10 月 3 日, パシフィコ横浜会議センター ( 神奈川県・横浜市 )

有田通恒, 児井稔, 久郷裕之, 近藤元就, 逸見仁道: DNA ミスマッチ修復遺伝子 MSH3 による EMAST 腫瘍発生の分子機構. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 12 日, 福岡国際会議場 ( 福岡県・福岡市 )

逸見仁道, 有田通恒, 柴田祐充子, 岩崎維和夫, 黒岩実, 中川原 章, 近藤元就: 神経芽腫における低酸素下での MAPK 経路による N-myc の活性化. 第 5 4 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012 年 12 月 1 日パシフィコ横浜会議センター.(神奈川県・横浜市)

Hemmi H, Arita M, Koike J, Kikuchi Y, Funahashi K, Ohhira T, Kugoh H, Kondo M: Hypoxic down-regulation of DNA mismatch repair gene hMSH3 and genetic instability of colorectal cancer. 71st Annual Meeting of Japanese Cancer Association (English oral session), Sep 20, 2012, Royton Sapporo (Hokkaido・Sapporo)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 制癌剤

発明者: 逸見仁道、有田通恒

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2014-146085

出願年月日: 2014 年 07 月 16 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

逸見 仁道 (HEMMI, Hiromichi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号: 9 0 1 6 5 5 1 4

##### (2) 研究分担者

小池 淳一 (KOIKE, Junichi)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号: 3 0 3 3 9 1 5 5

有田 通恒 (ARITA, Michitsune)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号: 8 0 3 0 7 7 1 9