

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390321

研究課題名(和文)ゲノムの低メチル化とレトロポゾンの活性化を特徴とする大腸がんの診断・治療開発

研究課題名(英文)Molecular analysis of colorectal cancer with LINE-1 hypomethylation and its application to cancer diagnosis and therapy

研究代表者

川上 和之(KAWAKAMI, KAZUYUKI)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00293358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの主要なレトロポゾンであるLINE-1が低メチル化により活性化している大腸がんにおいて、5-FUの効果が高いメカニズムを解析した。その結果、LINE-1の発現自体は直接5-FUの効果に影響を与えておらず、LINE-1の低メチル化によりクロマチン構造が弛緩することが5-FUの効果に関与していると判明した。LINE-1の発現亢進は細胞障害よりもむしろ細胞増殖に関与しており、5-FUとの併用効果を認める抗がん剤ではLINE-1の発現を抑制することが抗腫瘍効果発現メカニズムの一つであると示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism by which 5-FU is effective on the tumor with LINE-1 hypomethylation. LINE-1 expression status is not associated with tumor sensitivity to 5-FU. Chromatin structure looses in the tumor with LINE-1 hypomethylation. Colorectal cancer cell with loosed chromatin is more sensitive to 5-FU compared to one with condensed chromatin. The results suggest that the association between LINE-1 hypomethylation and chromatin structure underlies mechanism of anticancer activity of 5-FU. Knockdown of LINE-1 expression results in suppression of cancer growth. Many anticancer drugs inhibit LINE-1 expression, suggesting that suppression of LINE-1 might be one of mechanism by which 5-FU and other anticancer drugs shows synergistic effect. These findings could be important for achieving personalized chemotherapy and developing novel strategy using 5-FU.

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 レトロポゾン メチル化 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

人における主要なレトロポゾン配列である、long interspersed nucleotide element 1 (LINE-1)や Alu element (ALU)は正常の大腸組織では DNA の高度メチル化により発現抑制されている。大腸がんではゲノムの低メチル化により LINE-1 が異常発現し、その結果ゲノムの不安定性を獲得していると考えられる。一方、LINE-1 のメチル化状態はがん患者の予後や抗がん剤感受性の予測因子になることが報告されている。大腸がんにおいては、遺伝子欠失や転座、loss of heterozygosity (LOH)、aneuploidy などの多彩な DNA の構造異常がゲノムの不安定化に伴って認められ、レトロポゾンの活性化がその一因であると考えられる。

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。ゲノムの約 40%がレトロポゾンにより成り立っていることから、ゲノムの低メチル化はすなわちレトロポゾン配列の低メチル化と言い換えることができる。人における主要なレトロポゾン配列である LINE-1 は、ゲノム上を転位する機能を持つ配列であり、その低メチル化と高発現はゲノムの不安定化の主要因と考えられる。また、ゲノム全体に広く分布する LINE-1 の低メチル化はクロマチン構造の弛緩を介して、LINE-1 近傍に存在する多数の遺伝子を異常発現亢進させる。大腸がんでは、LINE-1 低メチル化に起因する上記 2 つの分子経路が発がん重要な役割を持つと示唆される。以上の背景から、大腸がんの診断・治療、予防にはゲノムの低メチル化とレトロポゾン (LINE-1) 発現亢進のメカニズムを理解することが重要と考えられる。さらに、抗がん剤 5-FU の投与により LINE-1 の発現は亢進し、DNA の 2 重鎖切断を誘導することから、一定レベルを超えた LINE-1 の発現は細胞にとって有害となり、このメカニズムが 5-FU の効果発現に寄与していると考えられる。このように抗がん剤の作用機序として LINE-1 発現の関与が示唆されていることから、ゲノムの低メチル化によりレトロポゾン (LINE-1) が活性化している大腸がんでは、LINE-1 の細胞障害性機能を利用して新規がん治療開発が可能であるとの発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、多数の大腸がん認められるゲノムの低メチル化とレトロポゾンの活性化に焦点を当て、その分子生物学的制御機構を解明し、がんの診断・治療、予防に応用することを目的とする。特に、ヒトの主要なレトロポゾンである LINE-1 のメチル化や発現状態が抗がん剤 5-FU の効果に影響するメカニズム解明を介してがん治療

の個別化や新規治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

1) 5-FU による LINE-1 発現亢進のメカニズム解析

5FU による LINE-1 発現誘導の機序を解明するため、LINE-1 のプロモーターをルシフェラーゼの上流に挿入したレポータープラスミドを構築する。これを SW480 に一過性あるいは恒常性に発現させ、5-FU 投与時のレポーター活性を測定する。また、LINE-1 mRNA の分解速度を解析するため、SW480 細胞を Actinomycin D 処理後経時的に細胞を回収し、RNA 抽出後 Northern blotting により LINE-1 mRNA を定量する。

2) LINE-1 発現に影響する薬剤のスクリーニング

上記の LINE-1 レポーターを安定発現する SW480 を使用して、複数の薬剤暴露によるレポーター活性の変化を解析する。

3) 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 をターゲットとする shRNA をテトラサイクリンにより調節性に発現する細胞を SW480 を親株として作成する。この細胞を使用して、LINE-1 発現の有無が 5-FU の効果に直接影響するのかを観察する。5-FU の効果は MTT アッセイおよびコロニー形成法により評価する。

4) 5-FU の効果とクロマチン構造の関連解析

クロマチン構造を定量的に評価できる解析法、Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Element (FAIRE)法を改変してゲノム全体のクロマチン構造を評価する手法を開発する。この方法を用いて LINE-1 メチル化の高い細胞 (CaR-1) と低い細胞 (SW480) における 5-FU 投与時のクロマチン構造の変化を観察する。また、各細胞において 5-FU 投与後の DNA 損傷をリン酸化ヒストン H2A.X の染色により評価する。

5) 大規模大腸がん症例における DNA メチル化解析

約 500 例の大腸がん症例を対象として CpG island methylator phenotype (CIMP)、microsatellite instability (MSI)、Kras, Braf 変異、チミジル酸合成酵素 (TS) 遺伝子型を解析し、LINE-1 メチル化との相関関係を解析する。

4. 研究成果

1) 5-FU による LINE-1 発現亢進のメカニズム解析

作成した LINE-1 レポータープラスミドを SW480 に一過性発現させ、5-FU 投与時のレポーター活性を測定したが、有意な変化を認めなかった。5-FU による LINE-1 発現誘導は転写後の変化と考えられたため、

Actinomycin D を用いて、LINE-1 mRNA の分解速度を解析した。しかし、5-FU 投与により RNA の分解速度にも変化は認めなかった。また、LINE-1 RNA と TS の結合や、LINE-1 蛋白の核移行も認めなかった。そこで、上記レポーターを安定発現する SW480 を作成して解析したところ、5-FU 投与によりレポーター活性の亢進を認めた。これらの結果から、5-FU による LINE-1 発現誘導はクロマチン構造の変化を介していると思われた。

2) LINE-1 発現に影響する薬剤のスクリーニング

複数の薬剤暴露による LINE-1 レポーター活性の変化を解析した結果、既知の抗癌剤やリン酸化阻害剤の多くは LINE-1 の発現を抑制する効果があり、抗腫瘍効果のメカニズムとして LINE-1 を介した機序をさらに検討する価値があると思われた。そこで、5-FU とオキザリプラチン併用時の LINE-1 発現状態を解析した。大腸がん細胞 SW480 を 5-FU 処理すると LINE-1 の発現は亢進するが、オキザリプラチンとの同時処理により LINE-1 の発現はむしろ減弱し、細胞増殖も抑制された。この結果から、臨床で使用されている 5-FU とオキザリプラチンの相乗効果には LINE-1 の発現制御も影響する可能性が示唆された。

3) 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

RNA 干渉を利用して LINE-1 発現を抑制した状態で 5-FU の抗腫瘍効果を解析した。MTT アッセイとコロニー形成法を利用して解析したが、いずれの方法においても LINE-1 の発現は 5-FU の効果に直接関与しなかった。また、LINE-1 のノックダウンにより SW480 の増殖は抑制され、LINE-1 の発現亢進は細胞障害よりもむしろ細胞増殖に関与していると思われた。

4) 5-FU の効果とクロマチン構造の関連解析

LINE-1 のメチル化レベルが高く、クロマチンが凝集している細胞 CaR-1 では 5-FU 投与によるクロマチン構造の変化は軽微であった。LINE-1 のメチル化レベルが低く、クロマチンが弛緩している細胞 SW480 では、5-FU 投与によりクロマチンの弛緩は著明に増強した。抗ヒストン H3 抗体を用いた ChIP アッセイで解析したところ、SW480 ではヒストンと結合する総 DNA 量は減少したが、CaR-1 では変化を認めなかった。クロマチンの弛緩に伴って SW480 では核内にリン酸化ヒストン H2AX の focus が出現し、DNA の 2 重鎖切断が起こっていると思われた。クロマチン凝集のマーカーであるヒストン Lys9 メチル化とリン酸化ヒストン H2AX を 2 重染色すると、両蛋白は核内で排他的に存在し、DNA の 2 重鎖切断はクロマチンの弛緩部位に起こると確認された。以上の結

果から、LINE-1 の低メチル化を認めるがんでクロマチン構造が弛緩しているため、5-FU の DNA 取り込みによる DNA2 重鎖切断が起こりやすく、この機序が 5-FU への高感受性の背景にあると考えられた。

5) 大規模大腸がん症例における DNA メチル化解析

500 例の大腸がん症例を使用して複数の既存バイオマーカーと LINE-1 メチル化の関係を探索した結果、K-ras codon 12 に変異のある大腸がんでは LINE-1 メチル化は有意に高いという関係を認めた。K-ras codon 13 の変異と LINE-1 メチル化には有意な関係を認めなかった。B-raf 遺伝子の変異を伴う大腸がんでは LINE-1 メチル化は有意に高かった。また、一部の症例を用いて TS 遺伝子型と LINE-1 メチル化の関係を解析すると、TS の遺伝子座における LOH を認める大腸がんでは LINE-1 メチル化は有意に低かった。TS の遺伝子型は LOH により 2, 3G, 3C のいずれかのアレルだけが残存することになるが、これらのアレルのうち 3G が残存している症例では LINE-1 メチル化は有意に高かった。また、LOH を認めない大腸がんに限って解析すると、LINE-1 メチル化は概ね高値であったが、3C/3C の遺伝子型を持つ大腸がんだけは他の遺伝子型と比較して LINE-1 メチル化は有意に低かった。以上の結果から大腸がんの予後や抗がん剤感受性との関連を認める複数の既存バイオマーカーと LINE-1 メチル化との間には多くの相関関係を認め、LINE-1 自体を予後予測や抗がん剤の個別化に利用できると示唆された。

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 6 件)

Loh M, Chua D, Yao Y, Soo RA, Garrett K, Zeps N, Platell C, Minamoto T, Kawakami K, Iacopetta B, Soong R. Can population differences in chemotherapy outcomes be inferred from differences in pharmacogenetic frequencies? *Pharmacogenomics J* 13:423-429. 2013
doi: 10.1038/tpj.2012.26 査読有

Pyko IV, Nakada M, Sabit H, Teng L, Furuyama N, Hayashi Y, Kawakami K, Minamoto T, Fedulau AS, Hamada J. Glycogen synthase kinase 3 inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation via c-Myc signaling. *Carcinogenesis* 34:2206-2217. 2013
doi: 10.1093/carcin/bgt182 査読有

Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo

Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto K, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. *PLoS One* 8:e55289. 2013

doi: 10.1371/journal.pone.0055289 査読有

Matsunoki A, Kawakami K, Kotake M, Kaneko M, Kitamura H, Ooi A, Watanabe G, Minamoto T. LINE-1 methylation shows little intra-patient heterogeneity in primary and synchronous metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 12:574. 2012
doi: 10.1186/1471-2407-12-574 査読有

Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakamura Y, Takata T, Nakaya N, Nakajima H, Sato I, Zhao X, Kitano A, Kawakami K, Tanaka T, Takegami T, Tomosugi N, Minamoto T, Motoo Y. Glycogen synthase kinase 3 inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *J Gastroenterol* 47:321-333. 2012

doi: 10.1007/s00535-011-0484-9 査読有

Mimura M, Masuda A, Nishiumi S, Kawakami K, Fujishima Y, Yoshie T, Mizuno S, Miki I, Ohno H, Hase K, Minamoto T, Azuma T, Yoshida M. AP1B plays an important role in intestinal tumorigenesis with the truncating mutation of an APC gene. *Int J Cancer* 130:1011-1020. 2012

doi: 10.1002/ijc.26131 査読有

〔学会発表〕(計8件)

Kondo Y, Hayashi H, Watabe T, Miwa Y, Kinoshita S, Higashimoto H, Sugisaki H, Nakajima G, Kawakami K, Hayashi K, Yamamoto M. Isolation and molecular profiling of a circulating tumor cell by using a novel single cell picking system. 9th International Symposium on Minimal Residual Cancer, 2013. 9. 25, Pullman Paris Bercy (France)

Kaneko M, Kawakami K, Kotake M, Kitamura H, Watanabe G, Minamoto T. LINE-1 methylation level is a potential marker of the sensitivity to 5-FU plus oxaliplatin in colorectal cancer cells. 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2012. 9. 20, ホテルロイトン札幌(北海道)

Kawakami K, Matsunoki A, Kotake M, Kaneko M, Kitamura H, Watanabe G, Minamoto T. Knockdown of LINE-1 enhances sensitivity to 5-FU in LINE-1-hypomethylated colorectal cancer cell. 2012. 7. 8, 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Centre Convencions International Barcelona, Spain

Matsunoki A, Kawakami K, Kotake M,

Kaneko M, Watanabe G, Minamoto T. LINE-1 methylation level is a molecular marker with little intra-patient heterogeneity in primary and synchronous metastatic colorectal cancer. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, 2012. 4. 2, McCormick Place in Chicago (USA)

松之木愛香, 川上和之, 小竹優範, 金子真美, 源利成. 多重蛍光 MethyLight による LINE-1 のメチル化解析と大腸がんにおけるその臨床的意義. 第22回日本消化器癌発生学会, 2011年11月26日, ホテルニューオータニ佐賀(佐賀県)

小竹優範, 川上和之, (他4名), 源利成. リンパ節および遠隔転移を伴う大腸がんにおける高頻度の LINE-1 低メチル化. 第70回日本癌学会学術集会, 2011年10月5日, 名古屋国際会議場(愛知県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 和之 (KAWAKAMI KAZUYUKI)
東京女子医科大学・医学部・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