

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字	IMAI KOUZO					
①研究代表者氏名	今井 浩三		②所属研究機関・部局・職	札幌医科大学・学長		
③研究課題名	和文	遺伝子不安定性ならびにメチル化異常による消化器癌の発生とその分子標的治療				
	英文	The role of microsatellite instability and aberrant methylation in development of gastrointestinal cancer, and application to molecular target therapy.				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	18,600	18,800	18,900	18,800	18,900	94,000
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
今井 浩三	札幌医科大学・学長	消化器病学	研究の総括と遂行			
豊田 実	札幌医科大学・医学部・講師	消化器病学	前癌および癌病変におけるメチル化解析			
山本 博幸	札幌医科大学・医学部・助手	消化器病学	遺伝子不安定性の解析			
伊東 文生	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授	消化器病学	メチル化DNAアレイの検討			
遠藤 高夫	札幌医科大学・医学部・助教授	消化器病学	食道癌発癌の解析			
有村 佳昭	札幌医科大学・医学部・講師	消化器病学	遺伝子不安定性とメチル化異常の解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>DNA ミスマッチ修復遺伝子の異常によるマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability: MSI) は、家族性非ポリポーシス大腸癌 (HNPCC) のみならず、散発性の大腸癌や胃癌の発癌に関与する。最近、ミスマッチ修復遺伝子の一つである hMLH1 や癌の発生に重要な E-cadherin が DNA メチル化により不活化されることが明らかとなり、MSI とメチル化異常は発癌において重要な役割を果たしていることが示唆される。しかし、他段階発癌の過程における MSI とメチル化異常を系統的に解析した例はほとんどなく、発癌におけるインパクトに関しては不明な点が多かった。</p> <p>これまで我々は、大腸癌および胃癌における MSI および DNA メチル化による癌関連遺伝子の抑制の役割を明らかにしてきた。特に、散発性大腸癌においてはゲノムワイドなメチル化の異常である、CpG アイランドメチル化形質 (CpG island methylator phenotype, CIMP) の結果、ミスマッチ修復酵素 hMLH1 に異常メチル化がおきることが、MSI の主要な原因であることを明らかにした。また、MSI とメチル化の異常が炎症性腸疾患や慢性肝炎など、癌化の早期の段階でおこることについて知見を得つつある。</p> <p>これらの研究成果をふまえ、本研究では、MSI や異常メチル化により不活化される癌関連遺伝子を同定し、消化器癌の発生と進展における役割を明らかにする。異常メチル化はエピジェネティックな変化であり、メチル化阻害剤により遺伝子発現の回復が可能である。メチル化されている遺伝子を分子標的とした消化器癌治療へ向けた基礎的検討を行う。</p>						

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

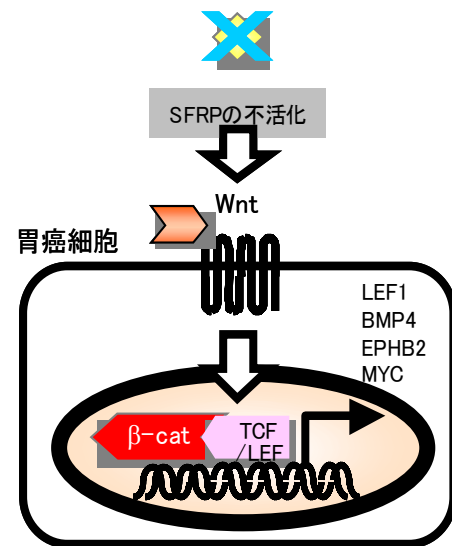
1. エピジェネティックな異常によるマイクロサテライト不安定性の誘発

大腸癌および胃癌における遺伝子不安定性、特にマイクロサテライト不安定性とメチル化による遺伝子サイレンシングの関連について解析を行った。その結果、散発性大腸癌でマイクロサテライト不安定性を有する癌の約80%がゲノムワイドなDNAメチル化の異常、CpG island methylator phenotype(CIMP)によるhMLH1の異常メチル化が原因であることを明らかにした。CIMP陽性マイクロサテライト不安定性陽性の大腸癌は、p16遺伝子のメチル化頻度やBRAFの遺伝子点突然変異の頻度が高く、p53変異の頻度が低いなど、異常を認める遺伝子に特徴を有し、CIMPを介した発癌経路はHNPCC型の大腸癌とは異なるパスウェイで発癌すると考えられた。

2. エピジェネティックな異常によるWNTおよびRasシグナル異常の解析

メチル化により不活化されている遺伝子の網羅的解析により、WNTシグナルの負の制御因子である、SFRP遺伝子ファミリーやWIF1が大腸癌および胃癌において、異常メチル化により高頻度に不活化されていることを明らかにした (Nat Genet, 2004、

Oncogene, 2005)。特に胃癌においてはAPCやβ-cateninの変異を認めない場合でも、WNTシグナルの活性化を認め、異常メチル化により不活化されることがWNT経路の活性化において重要な役割を果たしていると考えられた。また、SFRPの遺伝子導入により活性化した、β-catenin/TCFを抑制することが可能であった。以上の結果よりSFRP遺伝子が治療の分子標的として重要である可能性が示唆された。また、Rasの負の制御因子RASSF遺伝子群の異常メチル化について解析し、RASSF2が大腸癌および胃癌において異常メチル化により高率に不活化されていること、Rasシグナルの活性化には、K-rasやBRAF遺伝子の変異だけでなく、RASSF2遺伝子のエピジェネティックな異常が重要であることを明らかにした(Gastroenterol, 2005)。



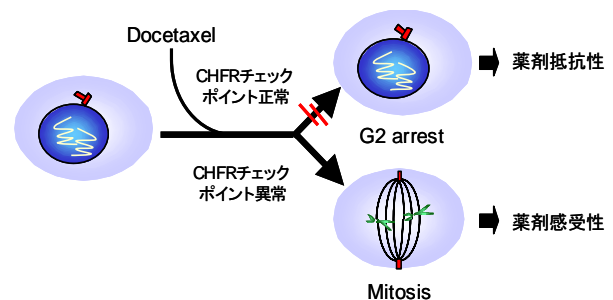
Wntシグナル経路の活性化

3. 異常メチル化を指標とした抗がん剤感受性予測

分裂期チェックポイント遺伝子CHFRの異常メチル化が、大腸癌および胃癌において高率に認められることを明らかにした。CHFRの異常メチル化を有する癌細胞は微小管阻害剤投与により、分裂期の進行が停止せず、薬剤感受性が高いことを明らかにした。CHFRの異常メチル化を指標として、抗がん剤感受性を予測することが可能であった(Proc Natl Acad Sci USA, 2003)。

4. エピジェネティックな異常を標的とした癌治療法

異常メチル化により起こる遺伝子サイレンシングにヒストン脱アセチル化が関与することにいち早く着目し、DNAメチル化阻害剤とヒストン脱アセチル化阻害剤の併用が消化器癌の治療戦略を考える上で重要であることを明らかにした。特にメチル化阻害剤でBNIP3の発現誘導により、低酸素誘導性アポトーシスを誘導出来ることを明らかにした。



⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

ヒトゲノムの配列が明らかとなった現在、多くの遺伝子の一次構造が明らかとなり、それら遺伝子の発現を制御する機構の解明が急務となっている。DNAメチル化やヒストン修飾の異常は、癌の発生や進展に重要な役割を果たすことが明らかとなってきただけでなく、新規治療法開発のための分子標的としても注目を集めている。我々は、本研究において、消化器癌における遺伝子不安定性に、メチル化異常が深く関与することを明らかにした。ゲノムワイドなメチル化の異常がミスマッチ修復酵素の異常を引き起こすことを見出し、従来の発癌機構の概念を覆しただけでなく、エピジェネティックな異常を考慮した大腸癌発癌モデルの原型として、多くの研究者に影響を与えている。

メチル化の網羅的解析法の開発でも成果を上げている。メチル化により不活化されている新規癌関連遺伝子同定の目的で、methylated CpG island amplification (MCA) 法を開発した。MCA法はCGH arrayやゲノムアレイと組み合わせることにより、異常メチル化をゲノムレベルで網羅的に解析する上で、非常に有用な方法として多くの研究者に用いられている。また、MCA法により同定されたメチル化マーカー (MINTs) はCIMPを解析するための遺伝子マーカーとして多くの研究者に利用されている。また、メチル化酵素阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の組み合わせ投与により、発現誘導された遺伝子をマイクロアレイにより解析する手法を確立した。これらのゲノムスクリーニングにより、新たに癌抑制遺伝子候補の同定にも成功している(特許出願中)。

従来、癌における異常メチル化と遺伝子サイレンシングについて多くの報告がなされているが、メチル化している遺伝子の癌化における役割を詳細に検討した例は少なかった。われわれは、癌におけるシグナル伝達異常に関与する分子の網羅的解析により、細胞周期チェックポイントやアポトーシス、WNTシグナルやRasシグナル、腫瘍抗原提示の異常など、癌化に関与する多くのシグナルパスウェイに、異常メチル化をはじめとするエピジェネティックな異常が関与することを明らかにした。

メチル化の標的遺伝子として同定したCHFRに関しては特に大きな展開を見せた。われわれが、大腸癌、胃癌におけるCHFR異常メチル化を報告した後、肝癌、乳癌、白血病、口腔扁平上皮癌など多くの腫瘍において、CHFRの不活化がおきていることが証明された。また、CHFRノックアウトマウスは発がん感受性になることが明らかとなり、CHFRの癌抑制遺伝子としての作用も証明された(Nat Genet, 2004)。また、CHFRがメチル化している腫瘍が微小管阻害剤に感受性が高いことを明らかにし、CHFRの異常メチル化を薬剤感受性のマーカーとして用いる試みも行った。CHFRがメチル化していない腫瘍は微小管阻害剤に抵抗性であるが、CHFRをRNA干渉法などの手法でノックダウンすることにより、薬剤感受性の増強に成功した。これらの結果は、CHFRが分子標的として重要であることを示唆する。現在われわれは、本研究をさらに展開し、CHFRと結合する分子の同定を行っている。

これらの研究成果は、エピジェネティックな異常により不活化される新規癌抑制遺伝子の同定や癌化における役割の解明、消化器癌の早期診断法の開発、新規抗癌剤の開発に向けた研究のための重要な知見と考えられる。本研究で得られた実験結果は、消化器癌の病態解明や新しい診断・治療法の開発だけでなく、遺伝子制御の分子機構の解明や炎症性疾患、加齢に伴うエピジェネティックな異常の解明に有用である可能性が高く、その波及効果は大きいと考えられる。

研究代表者らはこれまで当該研究に関し、Nature誌、Nature Genetics誌、Gastroenterology誌、PNAS誌などに国際的に高い評価を受けている論文を発表した実績がある。ゲノムワイドなメチル化に関する論文(Toyota et al, PNAS, 1999、Toyota et al. PNAS, 2000)はこれまで合計430回にわたり引用され(ISI Journal citation report)、多くの研究者に影響を与えている。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

- ① Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M, Issa JP, Hinoda Y, Imai K, Tokino T. The RAS effector RASSF2 is a novel tumor suppressor in colorectal cancer. **Gastroenterol**, 129: 156-169, 2005.
2. Idogawa M, Yamada T, Honda K, Sato S, Imai K, Hirohashi S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a component of the oncogenic T-cell factor-4/beta-catenin complex. **Gastroenterol**, 128: 1919-1936, 2005.
3. Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, Domingo E, Woerner SM, Wilson AJ, Konrad L, Laiho P, Espín E, Armengol M, Imai K, Yamamoto H, Mariadason JM, Gebert JF, Aaltonen LA, Simo Schwartz S, Arango D. Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. **Cancer Res**, 65: 10170-10173, 2005.
4. Taniguchi H, Yamamoto H, Hirata T, Miyamoto N, Oki M, Noshio K, Adachi Y, Endo T, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 in human gastrointestinal cancers. **Oncogene**, 24: 7946-7952, 2005.
5. Naishiro Y, Yamada T, Idogawa M, Honda K, Takada M, Kondo T, Imai K, Hirohashi S. Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic beta-catenin protein. **Oncogene**, 24:3141-3153, 2005.
6. Murai M, Toyota M, Suzuki H, Satoh A, Akino K, Mita H, Tokino T, Imai K. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. **Clin Cancer Res**. 11: 1021-1027, 2005.
7. Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, Imsumran A, Arimura Y, Endo T, Hinoda Y, Lee CT, Nadaf S, Carbone DP, Imai K. Insulin-like growth factor I receptor blockade enhances chemotherapy and radiation responses and inhibits tumour growth in human gastric cancer xenografts. **Gut**, 54: 591-600, 2005.
8. Kurokawa S, Arimura Y, Yamamoto H, Adachi Y, Endo T, Sato T, Suga T, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K. Tumour matrilysin expression predicts metastatic potential of stage I (pT1) colon and rectal cancers. **Gut**, 54: 1751-1758, 2005.
9. Maruyama R, Aoki F, Toyota M, Sasaki Y, Akashi H, Mita H, Suzuki H, Akino K, Ohe-Toyota M, Maruyama Y, Tatsumi H, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Comparative genome analysis identified the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. **Cancer Res**, 2006, in press.
- ⑩ Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP's complements genetic alterations to allow constitutive Wnt pathway signaling in human colorectal cancer. **Nat Genet**, 36: 417-422, 2004.
11. Satoh A, Toyota M, Ikeda H, Morimoto Y, Akino K, Sasaki Y, Mita H, Suzuki H, Takamura Y, Kanaseki T, Soejima H, Urano T, Yanagihara K, Hinoda Y, Endo T, Fujita M, Hosokawa M, Sato N, Tokino T, Imai K. Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with absence of interferon- γ induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells. **Oncogene**, 23, 8876-8886, 2004.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

12. Adachi K, Toyota M, Sasaki Y, Ishida S, Mustumi-Ohe Toyota, Maruyama R, Hinoda Y, Saito T, Imai K, Kudo R, Tokino T. Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene. **Oncogene**, 23: 7791-7798, 2004.
13. Terasawa K, Sagae S, Toyota M, Tsukada K, Satoh A, Imai K, Tokino T, Kudo R. Epigenetic inactivation of TMS1/ASC in ovarian cancer. **Clin. Cancer Res.** 10: 2000-2006, 2004.
14. Oliveira C, Westra JL, Arango D, Imai K, Yamamoto H, Aaltonen LA, Seruca R, Hofstra RM. Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. **Hum Mol Genet.** 13: 2303-2311, 2004.
15. Adachi K, Toyota M, Sasaki Y, Ishida S, Mustumi-Ohe Toyota, Maruyama R, Hinoda Y, Saito T, Imai K, Kudo R, Tokino T. Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene. **Oncogene**, 23: 7791-7798, 2004.
16. Adachi M, Zhang Y, Zhao X, Minami T, Kawamura R, Hinoda Y, Imai K. Synergistic effect of histone deacetylase inhibitors FK228 and m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide with proteasome inhibitors PSI and PS-341 against gastrointestinal adenocarcinoma cells. **Clin Cancer Res.** 10: 3853-3862, 2004.
17. Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Fujita M, Hosokawa M, Hinoda Y, Imai K. Association of matrilysin-2 (MMP-26) expression with tumor progression and activation of MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, 25: 2353-2360, 2004.
18. Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T. Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. **Nature**, 424: 516-523, 2003.
- ①9 Toyota M, Sasaki Y, Satoh A, Ogi K, Kikuchi T, Suzuki H, Mita H, Tanaka N, Itoh F, Issa JP, Jair KW, Schuebel KE, Imai K, Tokino T. Epigenetic inactivation of CHFR in human tumors. **Proc Natl Acad Sci USA.** 100: 7818-7823, 2003.
20. Satoh A, Toyota M, Itoh F, Sasaki Y, Suzuki H, Ogi K, Kikuchi T, Mita H, Yamashita T, Kojima T, Kusano M, Fujita M, Hosokawa M, Endo T, Tokino T, Imai K. Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer. **Cancer Res.** 63: 8606-8613, 2003.
21. Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, Ito H, Itoh F, Lee CT, Nadaf S, Carbone DP, Imai K. Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer. **Cancer Res.** 63: 6432-6441, 2003.
22. Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I, Toyota M, Yamashita T, Tanaka T, Imai K, Nakamura Y, Tokino T. Identification of the interleukin-4 receptor α gene as a direct target for p73. **Cancer Res.** 63: 8145-8152, 2003.
23. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Obata T, Imai K, Kantarjian HM, Issa JP, Garcia-Manero G. Aberrant DNA methylation of p57KIP2 identifies a cell-cycle regulatory pathway with prognostic impact in adult acute lymphocytic leukemia. **Blood.** 101: 4131-4136, 2003.
24. Obata T, Toyota M, Satoh A, Sasaki Y, Ogi K, Akino K, Suzuki H, Mita H, Tokino T, Imai K. Identification of HRK as a target of epigenetic inactivation in colorectal and gastric cancer. **Clin Cancer Res.** 9: 6410-6418, 2003.

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

25. Takekawa M, Tatebayashi K, Itoh F, Adachi M, Imai K, Saito H. Smad-dependent GADD45beta expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF-beta. **EMBO J.** 21: 6473-6482, 2002.
26. Kikuchi T, Toyota M, Itoh F, Suzuki H, Obata T, Yamamoto H, Kakiuchi H, Kusano M, Issa JP, Tokino T, Imai K. Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. **Oncogene**, 21: 2741-2749, 2002.
27. Adachi M, Imai K. The proapoptotic BH3-only protein BAD transduces cell death signals independently of its interaction with Bcl-2. **Cell Death Differ.** 9: 1240-1247, 2002.
28. Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H, Fukushima H, Sasaki S, Perucho M, Imai K. Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinomas with widespread microsatellite instability. **Cancer Res.** 61: 3139-3144, 2001.
29. Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Fukushima H, Sasaki S, Mukaiya M, Hirata K, Imai K. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. **J Clin Oncol.** 19: 1118-1127, 2001.
30. Yamamoto H, Yamashita K, Perucho M. Somatic mutation of the beta2-microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. **Gastroenterology.** 120: 1565-1567, 2001. Nishimura S, Adachi M, Ishida T, Matsunaga T, Uchida H, Hamada H, Imai K. Adenovirus-mediated transfection of caspase-8 augments anoikis and inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma cells. **Cancer Res.** 61: 7009-7014, 2001.
31. Naishiro Y, Yamada T, Takaoka AS, Hayashi R, Hasegawa F, Imai K, Hirohashi S. Restoration of epithelial cell polarity in a colorectal cancer cell line by suppression of beta-catenin/T-cell factor 4-mediated gene transactivation. **Cancer Res.** 61: 2751-2758, 2001.
32. Kaneto H, Sasaki S, Yamamoto H, Itoh F, Toyota M, Suzuki H, Ozeki I, Iwata N, Karino Y, Satoh T, Toyota J, Satoh M, Endo T, Omata M, Imai K. Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. **Gut.** 48: 372-377, 2001.
33. Adachi Y, Itoh F, Yamamoto H, Arimura Y, Kikkawa-Okabe Y, Miyazaki K, Carbone DP, Imai K. Expression of angiomodulin (tumor-derived adhesion factor/mac25) in invading tumor cells correlates with poor prognosis in human colorectal cancer. **Int J Cancer.** 95: 216-222, 2001.
34. Fukushima H, Yamamoto H, Itoh F, Nakamura H, Min Y, Horiuchi S, Iku S, Sasaki S, Imai K. Association of matrilysin mRNA expression with K-ras mutations and progression in pancreatic ductal adenocarcinomas. **Carcinogenesis.** 22: 1049-1052, 2001.
35. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP and Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. **Cancer Res.** 61: 3573-3577, 2001.
36. Ueki T, Toyota M, Skinner H, Walter KM, Yeo CJ, Issa JP, Hruban RH, Goggins M. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. **Cancer Res.** 61: 8540-8546, 2001.