

エピジェネティックな異常による消化器癌発生の分子機構と 診断・治療への応用

Molecular mechanisms involved in epigenetic alterations in
gastrointestinal cancer and its application to diagnosis and therapy

今井 浩三 (Kohzoh Imai)

札幌医科大学・学長



研究の概要

消化器癌において DNA メチル化により不活化される遺伝子を解析し、WNT、Ras、p53 など重要なシグナル経路に関連する遺伝子がエピジェネティックな異常の標的であること、遺伝子サイレンシングの分子機構に RNA 干渉系が関与することを明らかにした。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：メチル化・エピジェネティクス・トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景・動機

DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな異常は消化器癌発生の分子機構として重要と考えられ、またメチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化阻害剤が臨床応用されつつある。しかし、DNA メチル化が起こる分子機構や、遺伝子サイレンシングの癌化における役割については不明な点が多い。特に最近、microRNA などの機能性 RNA や RNA 干渉系がエピジェネティックな異常に関与することが示唆され、その分子機構の解明は急務である。

2. 研究の目的

エピジェネティックな遺伝子サイレンシングの分子機構を解明し、診断・治療の分子標的を探索する。また、RNA 干渉系の DNA メチル化における役割を明らかにする。これらの基礎的研究で得られた知見をもとに、消化器癌の新しい診断・治療法開発へ向けた基盤的研究を行う。

3. 研究の方法

DNA メチル化、遺伝子発現、ヒストン修飾に関して網羅的解析を行った。上記研究のため、遺伝子解析システム ABI7900、Agilent マイクロアレイスキャナー、Agilent ハイブリダイゼーションオープンを購入した。

4. これまでの成果

1) 消化器癌のシグナル経路異常における エピジェネティックな異常の役割

大腸癌および胃癌における DNA メチル化を網羅的に解析し、WNT の負の制御因子である SFRP、Ras の負の制御因子である RASSF2 が高頻度に異常メチル化により不活化され、消化器癌における WNT や Ras シグナル活性化に関与することを明らかにした (Nat Genet, 2004; Gastroenterol, 2005, Oncogene, 2007)。また、p53 の遺伝子変異がない大腸癌および胃癌において、p53 の標的遺伝子が DNA メチル化により不活化されることで、p53 の機能異常を引き起こしていることを明らかにした。

2) DNA メチル化を標的とした新しい消化器癌診断法の開発

糞便中の DNA を用いた大腸癌診断や、胃癌における内視鏡的胃粘膜切除後の残存病変の検出に、胃洗浄液からのメチル化が、また、膵癌の早期診断に膵液中からの異常メチル化の検出が有効であることを示した。

Bisulfite-pyrosequencing 法によるメチル化検出を行った。その結果、*H. pylori* 関連胃炎において、遺伝子のメチル化が非感染胃粘膜に比べ、有意に高いことを示し、メチル化の定量が発癌リスク予測のマーカーとなりうる可能性が示唆された。

3) エピジェネティックな異常により不活化されるmicroRNAの網羅的解析

大腸癌細胞においてエピジェネティックに不活化される miRNA をスクリーニングし、癌関連 miRNA を同定するため、大腸癌細胞株 HCT116 において、5-aza-dC による DNA メチル化酵素 (DNMT) 阻害、あるいは DNMT ノックアウトにより発現誘導される miRNA を TaqMan RT-PCR により解析した。その結果、37 種類の miRNA が DNA メチル化阻害により発現上昇し、そのうち 12 個について DNA メチル化による遺伝子サイレンシングを受けていることを明らかにした。その中の一つ、mir34 は大腸癌臨床例の 90% でメチル化されており、mir34 が不活化されることで、標的遺伝子の MET や CDK4 の発現制御異常が起こり、癌化に関与することが示唆された。

4) RNA 干渉系の DNA メチル化維持における役割

癌における DNA メチル化異常がどのようなメカニズムで形成・維持されるのかは不明である。われわれは、RNA 干渉経路と DNA メチル化との関連を解析するため、DICER hypomorphic 大腸癌細胞株 (Dicer-ex5) における遺伝子サイレンシングの状態を比較した。Dicer-ex5 細胞と HCT116 細胞の遺伝子発現プロファイルの比較により、31 個の遺伝子が、DNA メチル化阻害、あるいは DNMT1、DNMT3B のノックアウト細胞と同等の遺伝子発現誘導を認めた。Dicer-ex5 細胞では、SFRP4 や ICAM1 遺伝子の脱メチル化とヒストン H3K4 メチル化の上昇、H3K27 のメチル化の低下を認め、Dicer 機能が、癌細胞におけるエピジェネティックな遺伝子サイレンシングの維持に DICER が必要であることが示唆された。以上の結果から、SFRP4 や ICAM1 などの少なくとも一部の遺伝子に関しては、Dicer 機能が DNA メチル化の維持に重要であり、RNA 干渉系と癌における DNA メチル化の関与を初めて示した。今後、DNA メチル化を誘発する内因性の RNA 分子を同定し、RNA 干渉系を標的とした癌治療の分子標的探索を進める予定である。

5. これまでの進捗状況と今後の計画

- 1) エピジェネティックな異常の標的の同定と機能解析は順調に進んでいる。
- 2) RNA 干渉系の DNA メチル化における役割について、さらに解析を進める。
- 3) 発癌リスク予測や早期診断を目指した、トランスレーションリサーチを推進する。

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Ting A, Suzuki H (Equally contributed), Cope L, Schuebel K, Lee B, Toyota M, **Imai K**, Shinomura Y, Tokino T, Baylin SB. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG Island hypermethylation in human cancer cells. **Cancer Res**, 68: 2570-2575, 2008.
2. Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Homma T, Fujikane T, Ohmura T, Nishidate T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Sonoda T, Sasaki Y, Urano T, **Imai K**, Hirata K, Tokino T. Gene amplification and overexpression of PRDM14 in breast cancer, **Cancer Res**, 67: 9649-9657, 2007.
3. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, **Imai K**, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. **Oncogene**, 26: 4699-4713, 2007.
4. 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.

ホームページ等

<http://web.sapmed.ac.jp/im1/>