

有糸分裂チェックポイント遺伝子 CHRF のがん診断・治療への応用

豊田 実

1. 研究のねらい

細胞周期のチェックポイントは細胞に様々なストレスが加えられた際、細胞がストレスに対応するため、細胞周期を停止させ、問題を修復することに重要である。がんにおいては、しばしば細胞周期のチェックポイントに關与する遺伝子に異常が起き、その分子機構について報告されてきた。われわれは、これまで報告が少ない有糸分裂期チェックポイントに關連する CHFR について、がんにおける異常メチル化によるサイレンシングについて報告した(Proc Natl Acad Sci USA, 2003)。CHFR は ring finger domain を有する、ユビキチンリガーゼで、G2 期から分裂期への途中 prophase において、微小管ストレスがあった際、核膜が崩壊するか否かのチェックポイントに關与する。しかし、チェックポイントの分子機構や生理的役割、ユビキチンの基質などについては未知の点が多い。本研究では、CHFR による分裂期チェックポイントの分子機構を明らかにし、がんにおける微小管阻害剤感受性予測への応用や、分子標的としての可能性について検討する。また、CHFR 不活化の機構として、DNA メチル化を有するがんの特徴を明らかにする。さらに、ノックアウトマウスの作成による、個体における機能解析や発がんにおける役割の解析を行う。

2. 研究成果

1). CHFR 遺伝子の異常メチル化を指標とした微小管阻害剤感受性の予測および癌診断

CHFR が異常メチル化を示すがん細胞株は、微小管阻害剤処理により、Cyclin B1 の核への蓄積、Histone H3ser10 のリン酸化、核の凝集など分裂期前期チェックポイントの異常を示した。CHFR が異常メチル化を示すがん細胞株は docetaxel などの微小管阻害剤により誘導されるアポトーシスに高い感受性を示した。口腔扁平上皮癌臨床例の術前化学療法においても、CHFR の異常メチル化は、docetaxel によるネオアジュバント治療の感受性予測に有用であった³⁾。CHFR が正常に機能している腫瘍細胞は微小管阻害剤投与により、G2 期に停止してしまい薬剤抵抗性を示す。そこでわれわれは、CHFR をノックダウンすることにより、微小管阻害剤の作用を増強出来るか検討した。CHFR ノックダウンするための shRNA ベクターを作成し、CHFR が発現している細胞株に導入したところ、微小管阻害剤処理後の mitotic index の増加や薬剤感受性の増強を認めた³⁾。これらの結果より、CHFR は微小管阻害剤の感受性を増強する重要な分子標的と考えられた。また、CHFR の異常メチル化は、便や胃液、尿、胆汁液からも検出可能であり、癌の分子マーカーとして有用である可能性が示唆された。

2). CHFR 遺伝子の異常メチル化と CpG island methylator phenotype、EB ウイルス

CHFR がメチル化している腫瘍の特色を明らかにする目的で、CHFR 以外の遺伝子のジェネティックあるいはエピジェネティックな異常の解析を行った^{1,2,4-6)}。大腸癌においては、CHFR の異常メチル化は、ゲノムワイドな異常メチル化、CpG island methylator phenotype (GIMP)を示す腫瘍に特異的に認められた。これらの腫瘍は、K-ras あるいは BRAF 遺伝子の異常が非常に高率で、p53 の遺伝子変異をほとんど有しない、などの特徴を有した。胃癌においては、Epstein-Barr ウイルス陽性の胃癌において CHFR のメチル化を高率に認めた。以上の結果から、異常メチル化はランダムに起きているのではなく、メチル化の制御機構に異常を有する腫瘍に特異的に起こっている可能性が示唆された⁶⁾。

3). CHFR と相互作用する分子の解析

CHFR の機能を明らかにする目的で、Two hybrid screening 法により、CHFR と相互作用する分子の同定を試みた。その結果、PARP1、TAB2 が CHFR と相互作用する分子として同定された。PARP1 は CHFR がメチル化している大腸癌細胞株 HCT116 に CHFR を遺伝子導入すると、PARP1 はユビキチン化を認め、CHFR の新しい基質と考えられた。

4). CHFR が關与するシグナル伝達経路の解析

CHFR が關与するシグナル伝達経路の解析する目的で、adenovirus vector により CHFR を遺伝子導入し、

発現が変動する遺伝子を cDNA microarray により網羅的に解析した。CHFR の遺伝子導入により、IL-8 をはじめとする NF- κ B の標的遺伝子の発現が抑制されており、CHFR が NF- κ B を抑制する可能性が示唆された。ルシフェラーゼアッセイにより、CHFR を HCT116 細胞に遺伝子導入すると NF- κ B の転写活性が抑制されることが明らかとなった。また、この転写抑制は ring finger ドメインを欠く変異体にも認められ、CHFR が E3 活性非依存的に NF- κ B を抑制していることが示唆された。

5). CHFR ノックアウトマウスの作成

CHFR^{-/-}マウスは正常に発生し、CHFR は個体の発生には必須でないことが示唆された。CHFR^{-/-}マウス由来の MEF は、docetaxel 処理により、8n 細胞の出現、アポトーシスの増強を認めた。CHFR が染色体の安定性の維持に重要であることが示唆された。

3. 今後の展開

CHFR による分裂期チェックポイントの分子機構に関しては、現在でも不明な点が多い。Yu らは、CHFR が Aurora-A をユビキチン化により分解し、G2/M チェックポイントに作用すると報告した(Nat Genet, 2005)。Aurora-A はしばしばがんにおいて過剰発現しているため、CHFR のメチル化による消失が Aurora-A の過剰発現を介して癌化に関与する可能性がある。しかし、実際の腫瘍細胞、臨床例では、CHFR と Aurora-A の発現は必ずしも逆相関しておらず、Aurora-A 以外の基質の存在が示唆される。一方、CHFR が微小管ストレスをどのように察知し、そのシグナルを伝え、核膜崩壊を遅らせるのかについて、明確な答えは無い。がん細胞においては、既に様々な遺伝子異常が蓄積しており、メチル化により CHFR を欠損している細胞に CHFR を導入しても、生理的なユビキチン化の基質を同定できない恐れがある。今後、CHFR^{-/-}マウス由来の MEF に微小管ストレスを与えた際、wild type MEF に比べ、発現量が亢進する分子を同定することが必要と考えられる。

CHFR が NF- κ B の経路に関与することは予想外であったが、癌抑制遺伝子としての機能や、炎症への関与を考えると興味深い。生化学的実験では、NF- κ B 抑制における、CHFR の作用点をピンポイントで抑えることができておらず、今後の課題である。今後、ノックアウトマウスを用いた個体レベルでの解析により、炎症や癌の感受性に CHFR 欠損がどのような役割を果たしているか明らかにする。

遺伝子メチル化解析に関しては、CHFR がメチル化している大腸癌や胃癌の分子異常を網羅的に解析し、メチル化陽性腫瘍の特徴を明らかにした。今後異常メチル化がなぜ起こるのかについて、前癌病変の解析を詳細に行いたい。また、最近では、DNA メチル化に、RNA 依存性遺伝子サイレンシングが関与する可能性も見出し、今後さらに研究を進める予定である。

4. 研究成果リスト

原著論文

1. 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.
2. 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.
3. Ogi K, Toyota M, Mita H, Satoh A, Kashima L, Sasaki Y, Suzuki H, Akino K, Noguchi M, Shinomura Y, Imai K, Hiratsuka H and Tokino T. Small interfering RNA-induced CHFR silencing sensitizes oral squamous cell cancer cells to microtubule inhibitors. *Cancer Biol. Ther.* 4: 773-780, 2005.
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.

5. 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.
6. Kusano M, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Aoki F, Fujita M, Hosokawa M, Shinomura Y, Imai K, Tokino T. Genetic, epigenetic and clinicopathological features of gastric cancers with CpG island methylator phenotype and an association with Epstein-Barr virus. *Cancer*, 106, 1467-1479, 2006.
7. Maruyama R, Aoki F, Toyota M, Sasaki Y, Akashi H, Mita H, Suzuki H, Akino K, Ohe-Toyota M, Maruyama Y, Tatsumi H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Comparative genome analysis identified the vitamin D receptor gene as a direct target of p53-mediated transcriptional activation. *Cancer Res.* 66: 4574-4583, 2006.
8. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, Nishikawa N, Watanabe Y, Sasaki Y, Abe T, Yamamoto E, Tarasawa I, Sonoda T, Mori M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Identification of DFNA5 as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci.*, Published on line, Nov 3, 2006.

総説

9. 豊田 実, 鈴木 拓, 上野理子, 今井浩三. 発がんに関与するエピジェネティクス. わかる実験医学・エピジェネティクスがわかる. 押村光雄. 編集. 羊土社. pp111-116, 2004.
10. 佐藤亜由美, 豊田 実, 今井浩三. DNA メチル化による染色体機能異常. *医学のあゆみ*, 208: 841-846, 2004.
11. 上野理子, 豊田 実, 野島正寛, 今井浩三. 発がんにおける DNA メチル化異常の役割. *血液・腫瘍科*, 48: 455-461, 2004.
12. 鈴木 拓, 豊田 実, 今井浩三. 癌エピジェネティクスとメチル化解析法の進展. *実験医学*. 23: 2144-2145, 2005.
13. Toyota M, Imai K, Shinomura Y. Haploinsufficiency in multiploid colorectal cancer. *J Gastroenterol*, 40: 771-772, 2005.
14. Toyota M, Issa JP. Epigenetic changes in solid and hematopoietic tumors. *Semin. Oncol.* 32: 521-530, 2005. Issa JPJ, Shen L, Toyota M. CIMP, at last. *Gastroenterol*, 129: 1121-1124, 2005.
15. Watanabe M, Takagi A, Matsuzaki T, Kami D, Toyota M, Hirokawa Y, Shiraiishi T. Knowledge of epigenetic influence for prostate cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, 6: 365-384, 2006.
16. Suzuki H, Toyota M, Sato H, Sonoda T, Sakauchi F, Mori M. Roles and causes of abnormal DNA methylation in gastrointestinal cancer. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 7: 177-185, 2006.
17. 今井浩三, 豊田 実, 佐藤裕信, 篠村恭久. 遺伝子メチル化と発がん. *日本内科学会雑誌*. 95: 362-367, 2006.
18. 豊田 実, 鈴木 拓. エピジェネティクスと造血器腫瘍. *Front Wave in Hematology*. 16, 4-7, 2006.
19. 豊田 実, 鈴木 拓, 今井浩三, 篠村恭久. 癌のエピジェネティクス異常、蛋白質核酸酵素, 51: 2043-2048, 2006.

学会発表

1. Toyota M, DNA methylation and gastrointestinal malignancies: Functional consequences and clinical application. 6th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. Hawaii, USA (2004)

2. Mita H, Toyota M, Satoh A, Ogi K, Kashima L, Sasaki Y, Akino K, Suzuki H, Imai K, Tokino T. Functional analysis of checkpoint ligase CHFR under mitotic stress. 96th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Anaheim, USA (2005)
3. 豊田 実. Epigenetic な異常を標的とした消化器癌の分子標的治療. 第 33 回東北大学加齢医学研究所シンポジウム、Oncogenic addict:がんにおける gain of function シグナルと分子標的薬、仙台 (2005)
4. 豊田 実. 消化器癌におけるエピジェネティックな異常の解析と臨床応用. 第 2 回癌学会カンファレンス、蓼科 (2005)
5. 豊田 実、がんのシグナル異常における DNA メチル化の役割. 第 28 回日本分子生物学会、ワークショップ、2005 年、福岡 (2005)
6. Toyota M, Epigenetic alterations in gastrointestinal cancer: Functional consequences and clinical application. Third International Symposium of Korea Biomedical Genomic Research Association and National Genome Research Institute “Human Genome Research on Diseases: From Genes to Protein. Soul, Korea (2006)
7. Mita H, Toyota M, Kashima L, Satoh A, Ogi K, Sasaki Y, Suzuki H, Idogawa M, Akino K, Shitashige M, Yamada T, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Analysis of mitotic checkpoint ligase CHFR interacting proteins. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Washington DC, USA (2006)
8. 豊田 実、渡辺嘉行、今井浩三. 慢性炎症を基盤とした発癌過程における DNA メチル化の蓄積と発癌リスク予測. 第 48 回日本消化器病学会大会. シンポジウム、札幌 (2006)
9. 豊田 実、消化器がんのエピジェネティクス: がん化の分子機構から臨床応用へ、第3回京都 GIフォーラム、京都 (2006)

特許出願:国内 2 件、外国 1 件

謝辞

さきがけ研究を行うにあたり、サポートして頂きました JST 本部および領域事務所の皆様、ご指導頂いたアドバイザーの諸先生、札幌医科大学今井浩三学長、同がん研究所分子生物学、時野隆至教授、教室員の皆様、同内科学第一講座、篠村恭久教授に深謝申し上げます。