

# 有糸分裂チェックポイント遺伝子 CHFR のがん診断・治療への応用

豊田 実

## 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関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関連する 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関与する。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。

## 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 Prophase 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、paclitaxel や 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と考えられた。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、CHFR の発現抑制を認め、微小管阻害剤処理による mitotic index の増加や薬剤感受性の増強を認めた(図1)。これらの結果より、CHFR は微小

管障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、腓液、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。大腸癌や胃癌以外でも、口腔扁平上皮癌、成人 T 細胞性白血病において、CHFR の異常メチル化による発現消失を認め、その不活化は幅広い腫瘍において重要であることが示唆された。

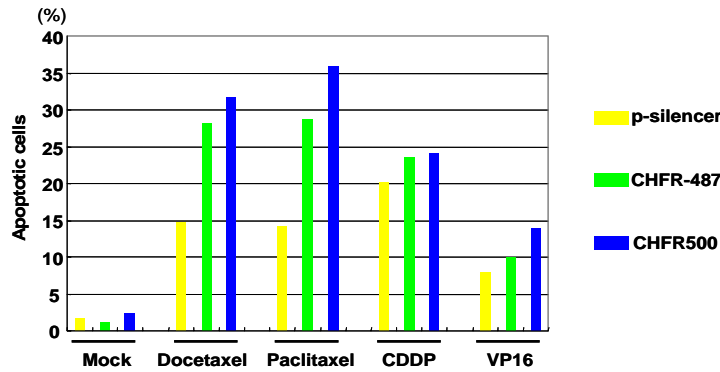


図1. CHFR のノックダウンにより微小管障害剤、Docetaxel、Paclitaxel に対する薬剤感受性が増強した。

## 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。大腸癌や胃癌においては、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 (CIMP)を示す腫瘍に特異的に認められた(図2)。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きている可能性が示唆された。

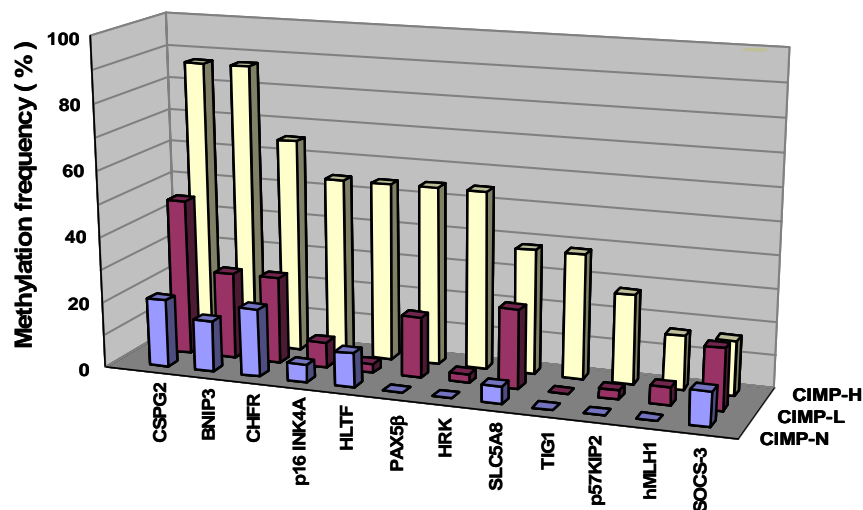


図2. CHFR の異常メチル化は、ゲノムワイドな異常メチル化、CpG island methylator phenotype (CIMP)を有する腫瘍で高率に認められる。

### 3) CHFR が関与するシグナル伝達経路の解析

CHFR が関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 による網羅的解析を行った。CHFR の導入により、IL-8をはじめとする NF- $\kappa$ B の標的遺伝子の発現が抑制されており、CHFR が NF- $\kappa$ B を抑制する可能性が示唆された。

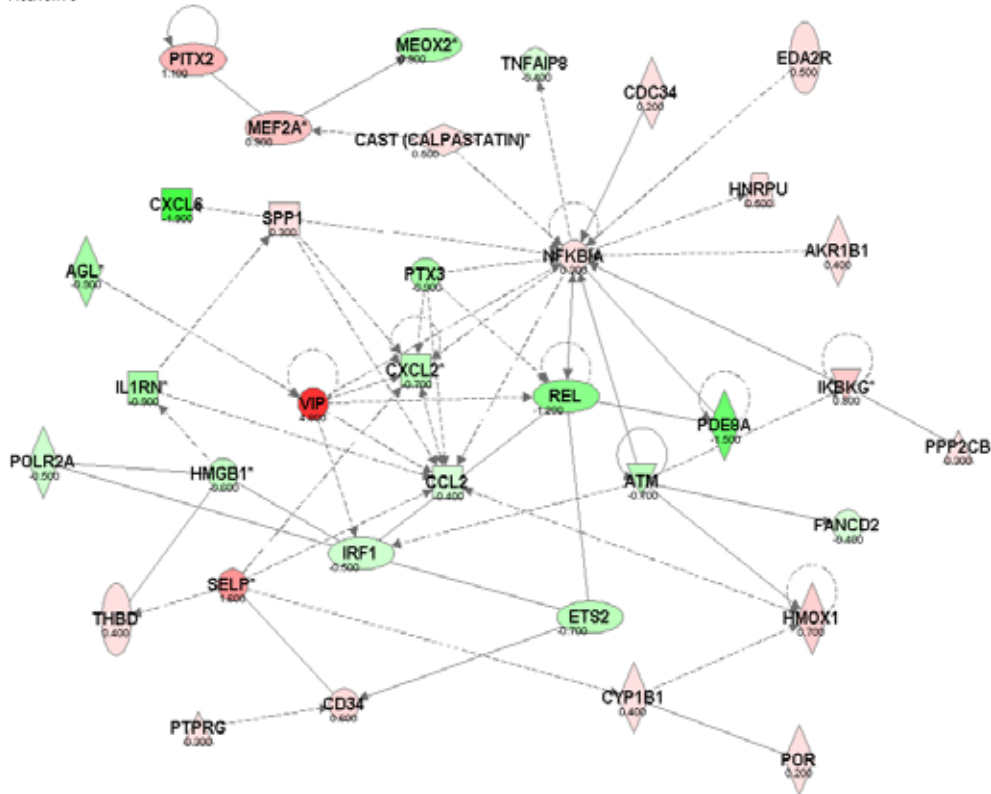


図3. CHFR の遺伝子導入により発現が上昇(赤字)あるいは減少した遺伝子(緑字)と NF- $\kappa$ B 経路  
CHFR 導入により発現が変動した遺伝子をマイクロアレイで解析し、Ingenuity にて可視化した。

また、CHFR により発現が抑制される遺伝子群には、Jun を始めとする MAPK 経路の下流遺伝子が多数存在し、CHFR による微小管ストレス応答に MAPK 経路の抑制が関与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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B を抑制していることが示唆された。クロマチン免疫沈降法により、CHFR による、IL-8 の発現抑制には、p53 のプロモーターへの結合が阻害されていることが関与すると考えられた。

### 4) CHFR ノックアウトマウスの作成

CHFR<sup>-/-</sup> 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<sup>-/-</sup>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、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。CHFRノックアウトマウスを作製し、バッククロスにより、C57B6のバックグラウンドを持ったヘテロ欠失マウスを作製中である。

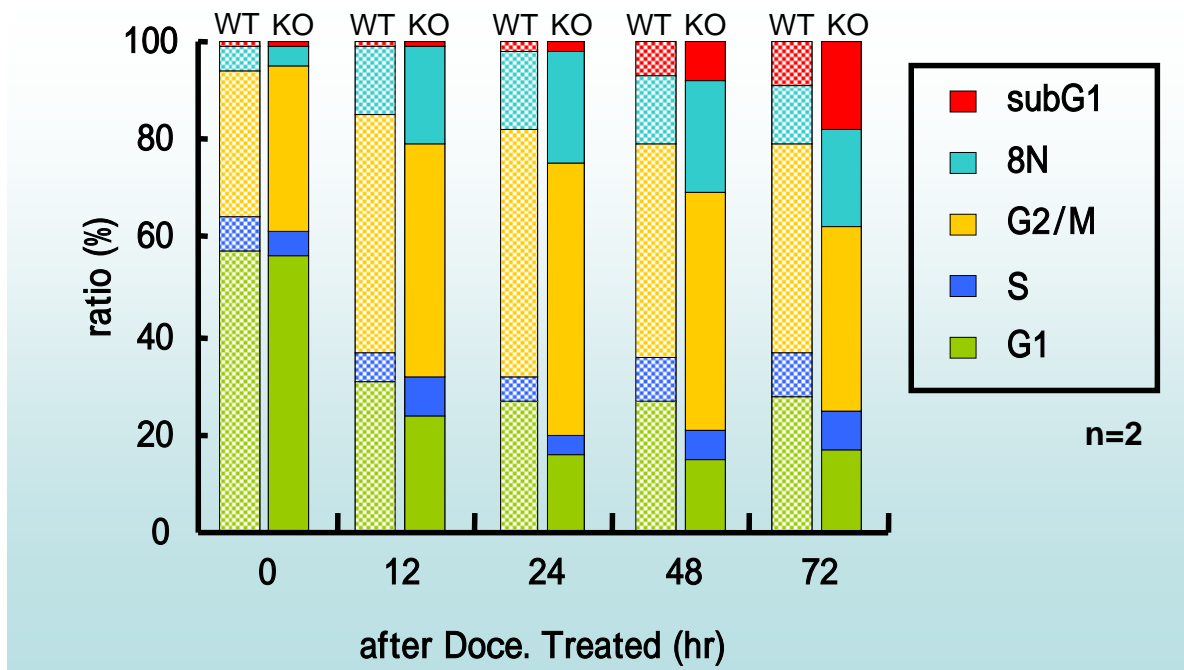


図4. CHFRノックアウトマウス由来のMEF(KO)は、docetaxel処理により、8NおよびsubG1分核の細胞がWTマウス由来MEF(WT)に比べ優位に多い。

### 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、そのシグナルを伝へ、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<sup>-/-</sup>マウス由来のMEFに微小管ストレスを与えた際、wild type MEFにくらべ、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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。

## 研究成果リスト

### (1)原著論文

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)

原著論文総数: 14 篇

### (2)その他の成果

#### 著作物

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. 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
5. Toyota M, Imai K, Shinomura Y. Haploinsufficiency in multiploid colorectal cancer. J Gastroenterol, 40: 771-772, 2005.
6. 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: 121-1124, 2005.
7. Watanabe M, Takagi A, Matsuzaki T, Kami D, Toyota M, Hirokawa Y, Shiraishi T. Knowledge of epigenetic influence for prostate cancer therapy. Curr. Cancer Drug Targets, 6: 365-384, 2006.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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. Minoru Toyota: 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 (2004/1/28)
2. 豊田 実: がんのシグナル異常における DNA メチル化の役割。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 (2005/12/7)
3. 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 (2006/11/21)

#### 特許出願

研究期間累積件数: 国内 2 件、外国 1 件