

# 大腸癌における ING2 遺伝子発現の 治療マーカーとしての有用性の検討

隈元謙介<sup>1), 2)</sup>、鈴木 聡<sup>1)</sup>、中村 泉<sup>1)</sup>、大木進司<sup>1)</sup>、竹之下誠一<sup>1)</sup>

1) 福島県立医科大学 器官制御外科、2) 埼玉医科大学総合医療センター 消化管一般外科

## 1. はじめに

大腸癌は、消化器領域腫瘍の中で罹患率が増加傾向の一途をたどっており、2015年には癌罹患率のトップになると予測されている。近年の大腸癌の治療は、早期であれば内視鏡治療や腹腔鏡手術と低侵襲治療が施されるが、進行癌においては手術、化学療法による生存期間の延長はあるものの、再発転移に対する奏効率にも頭打ちの感があり、新たな分子標的遺伝子の検索とその治療への応用が期待される。

分子標的遺伝子として期待される遺伝子は、その遺伝子の発現が劇的に癌化により変化しうるものが理想である。また、その変化により多くの癌関連遺伝子やアポトーシス関連遺伝子などの発現に直接的あるいは間接的に影響を与えるとより効果的であると考えられる。近年、クロマチンリモデリングに関与する遺伝子は、細胞における遺伝子発現転写調節をダイナミックにつかさどるため癌研究の分野において大いに着目されている。

1996年 Inhibitor of growth (ING) 1遺伝子が p53と連動して細胞停止、アポトーシス、細胞老化などに関与し癌抑制遺伝子としての機能を有することが報告された後、この ING1 遺伝子のホモロジー検索により1996年 ING1Lとしてクローニングされたのが ING2である。

ING2遺伝子の発現は、正常組織において精巣での発現が強く、この点は ING1と違って特筆すべき点である。また、大腸癌の癌部と非癌部での発現を比較した結果、癌部での発現亢進が認められた。近年、ING2遺伝子が HDAC1や mSin3A と複合体を形成していることがわかり、これらの複合体がヒストン H3K4のトリメチル化に結合することが報告されたことから、ING2がクロマチンリモデリングに関与していることが判明した。従来から、ヒストン H3K4のトリメ

チル化は遺伝子発現活性に寄与していることが知られており、ING2遺伝子はなんらかの遺伝子発現の制御に関与していることが示唆された。

われわれは、大腸癌における ING2の発現が、非癌部に比べて癌部で発現が亢進していることを確認した。この機序として、ING2の転写領域に NF- $\kappa$ B 結合配列が存在し、NF- $\kappa$ B により ING2の発現が亢進しているものと考えられた。また、癌において ING2の発現亢進により MMP13の発現を誘導することが判明し、癌の浸潤転移に関与している可能性が示唆された。

ING2がクロマチンリモデリングに関与し、さまざまな遺伝子の発現制御に関与していると考えられることから、大腸癌の化学療法や放射線療法に対する感受性や耐性に関わる遺伝子群の発現制御にも関与している可能性が示唆される。今回はわれわれは、この ING2遺伝子の発現が、下部直腸癌の術前放射線治療効果予測マーカーとして有用であるか検討するとともに化学療法に関与する ABC トランスポーターの発現や大腸癌以外の癌でも有用性があるか否か検討した。

## 2. 方法

ING2遺伝子は、クロマチンリモデリングに関連したさまざまな遺伝子の発現を制御していると考えられる。そのうちの1つとしてすでに MMP13を報告しているが、他にも多くの遺伝子発現に影響を与えることが予想される。これらの中に化学放射線療法の感受性に関与する遺伝子群が含まれる可能性があるため、

- ①まず ING2遺伝子の発現が直腸癌の術前放射線(化学)療法の効果と関係があるかどうか調べる。放射線(化学)療法施行前に採取された生検組織を用いて ING2の発現を免疫組織学的染色法にて検索する。この結果と、実際の放射線(化学)療法

表1 分子マーカーの発現と治療効果

		0*	1a*	1b*	2*	p値
p53	+	3	8	2	4	0.68
	-	1	2	2	3	
p21	+	0	4	1	2	0.41
	-	4	6	3	5	
Bax	+	4	10	4	7	1
	-	0	0	0	0	
MDM2	+	3	9	4	6	0.75
	-	1	1	0	1	
ING2	+	3	9	4	1	0.005
	-	1	1	0	6	

\* 大腸癌取扱規約に基づく治療効果判定

の奏効率との関係を調べる。

- ②さらに ING2を過剰発現した細胞株を用いて、ING2発現により変動する遺伝子をあらためてマイクロアレイ法で検索し、連動する遺伝子を調べる。
- ③化学療法に関連して、ABC トランスポーターと SLC トランスポーターの遺伝子発現と関連がないかどうかを調べるため、上述の細胞株を使って PCR 法にて71種類の代表的な ABC トランスポーターと SLC トランスポーターの発現変化を検索する。
- ④直腸癌に限らず、化学放射線療法を施行する食道癌ではどのような傾向にあるか調べる。

これらのことから、ING2遺伝子が治療マーカーとして有用であるか評価する。もし、有用である場合には、ING2遺伝子を分子標的とした治療を考慮し、ING2遺伝子の発現を制御することにより、化学療法や放射線治療の治療効果を増強し、進行大腸癌の治療に貢献するものと考えられる。

### 3. 結果

#### (1) 下部直腸癌に対する術前放射線（化学）療法の効果と ING2の発現

2003年より当科にて術前放射線（化学）治療を施行された進行下部直腸癌25例の術前放射線治療前の生検組織について、ING2, p53とその関連遺伝子 p21, Bax, MDM2の発現を免疫学的組織染色法にて調べた。生検組織の各遺伝子の発現と術前放射線（化学）治療後の組織の病理学的効果判定結果との相関を解析した（表1）。その結果、ING2の発現が弱い症例で、有

表2 ING2高発現により発現が亢進する遺伝子

Gene symbol	Gene Bank Accession number	Average ratio
ING2	NM_001564	38.85
LGALS1	NM_002305	4.04
C19orf30	NM_174947	3.98
GADD45B	NM_015675	3.84
MYL1	NM_079422	3.35
HSPA1A	NM_005345	3.27
VEGF	NM_003378	3.10
CSH1	NM_022641	3.04
DHRS2	NM_005794	2.15

意に放射線（化学）療法の効果が強いことが判明した（ $p=0.005$ ）。従来からよく調べられている p53とその関連遺伝子 p21, Bax, MDM2の発現と放射線（化学）療法の効果の間に統計学的に有意な相関は認められなかった。

#### (2) ING2遺伝子発現と連動する遺伝子の探索

ING2の発現と直腸癌に対する術前放射線（化学）療法の効果との相関が認められたことより、ING2遺伝子が放射線（化学）療法の感受性や耐性を規定する遺伝子の発現制御に関与していることが推測された。そこで、ヒト培養細胞株293細胞に一過性に ING2の発現ベクターを遺伝子導入しING2高発現株を作製した。Mock 細胞との間で mRNA の発現変化をマイクロアレイ法にて解析した（方法の詳細は、Kumamoto, K. *et al.* Int. J. Cancer 2009参照）。ING2の発現と連動して発現が2倍以上亢進した遺伝子は、表2に示すように LGALS1, C19orf30, GADD45B, MYL1, HSPA1A, VEGF, CSH1, DHRS2であった。

#### (3) ING2遺伝子発現と連動する ABC および SLC トランスポーター遺伝子の探索

抗癌剤の耐性獲得には、ABC および SLC トランスポーターの関与が知られている。そこで、上記マイクロアレイに用いた RNA サンプルを使用し、RT-PCR にて71種類の ABC および SLC トランスポーター（ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA9, ABCA12, ABCA13, ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB6, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC10, ABCC11, ABCC12, ABCD1, ABCD3, ABCD4,

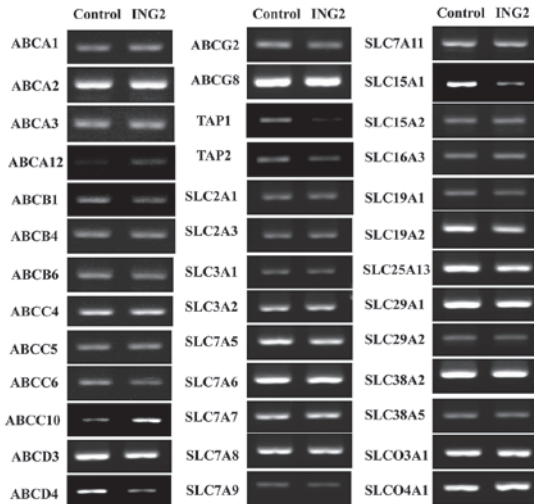


図1 ING2発現に連動するトランスポーター遺伝子の検索

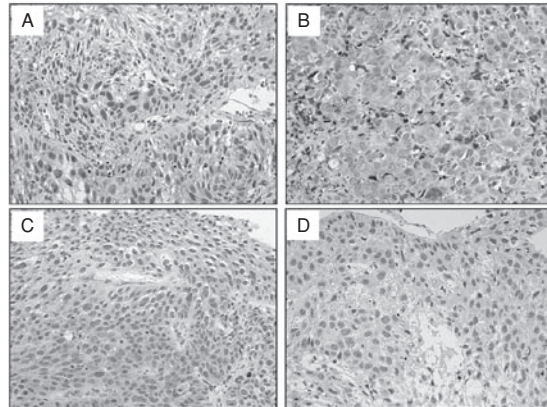


図2 食道癌におけるING2の発現と化学放射線療法の効果

ABCF1, ABCG2, ABCG8, TAP1, TAP2, SLC2A1, SLC2A2, SLC2A3, SLC3A1, SLC3A2, SLC5A1, SLC5A4, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A9, SLC7A11, SLC10A1, SLC10A2, SLC15A1, SLC15A2, SLC16A3, SLC19A1, SLC19A2, SLC22A1, SLC22A2, SLC22A3, SLC22A6, SLC22A7, SLC22A8, SLC22A9, SLC25A13, SLC28A1, SLC28A2, SLC28A3, SLC29A1, SLC29A2, SLC38A2, SLC38A5, SLCO1A2, SLCO1B1, SLCO1B3, SLCO2A1, SLCO2B1, SLCO3A1, SLCO4A1) の発現変化を調べた。35サイクルで発現が検出できた遺伝子について、図1にPCR結果を呈示した。ING2高発現により、ABCA12とABCC10の発現が亢進していた。一方、ABCB1, ABCD4, TAP1, TAP2, SLC15A1はING2高発現により、発現が減弱していた。

(4) 食道癌におけるING2遺伝子の発現と化学放射線療法の効果

進行食道癌の治療にも化学放射線療法が施行されており、食道癌についてもING2の発現が効果予測の分子マーカーとして有用であるかどうか、CR, PR症例とSD, PD症例の生検組織を用いてING2の発現を免疫染色にて調べた。その結果、今回症例数は少ないもののCR, PR症例ではING2の染色性が弱く(図2A, B)、SD, PD症例では、ING2が核に強く発現していた(図2C, D)。

4. 考察

本邦における下部直腸癌に対する治療戦略は施設間で異なり、術前放射線療法はあまり一般的ではない。これまでの欧米のRCTでは、生存率には寄与しないものの、術前放射線治療施行後にTMEを施行された群でTME単独施行群に比べて局所再発率が有意に低下したと報告されている。進行直腸癌に対する術前照射の利点としては、微小転移巣の制御と腫瘍縮小効果による肛門温存の適応拡大等が考えられる。このような恩恵を十分に享受できる症例を選択すれば、生存率の改善も期待できる可能性はある。今回われわれは、放射線化学療法の効果予測に役立つ分子マーカーの検索において、ING2遺伝子が有用である可能性を見出した。ING2の発現が減弱している状態では、放射線や抗癌剤の感受性が高まることが示唆された。言い換えれば、ING2遺伝子が発現していると放射線や抗癌剤に耐性であるといえ、ING2の発現と連動する遺伝子をマイクロアレイ法によって検索した。候補となった遺伝子群の中には、HSP70 (HSPA1A) というストレス関連遺伝子があった。HSP70の発現は、以前から放射線や抗癌剤の耐性と関連があるという報告もある一方、関連がなかったという報告もありコンセンサスは得られていない。今回われわれの調べた症例でHSP70の染色も施行したが、ING2発現の認められた症例でHSP70の発現は認められたが、ING2発現の低

い症例でも HSP70 の発現が認められている症例もあり、実際の癌では必ずしも HSP70 が ING2 によってのみ制御されているわけではないという結果であった。その他、候補となっている遺伝子については、放射線や抗癌剤の耐性という機能があるかどうか不明であり今後検証していきたい。

さらに近年大腸癌に対する化学療法は、著しく生存期間の延長に寄与している。その一方、やはり抗癌剤耐性を克服しなければならない課題である。MDR1 や MRP1 といった ABC トランスポーターの関与は、抗癌剤耐性のメカニズムを説明する上で不可欠である。その観点から、この ING2 遺伝子と ABC および SLC トランスポーターの関連があるかどうか調べた。今回検索した遺伝子のうち ING2 の発現と正の相関を認めた遺伝子は ABCA12 と ABCC10 の 2 種類であったのに対し、ING2 の発現と負の相関を認めた遺伝子が ABCB1, ABCD4, TAP1, TAP2, SLC15A1 と多かった。ING2 は、HDAC や mSin3A といったクロマチンリモ

デリングで遺伝子の発現抑制に関連する遺伝子と複合体を形成することから ING2 を過剰発現することで連動する遺伝子の発現が抑制されることも考えられる。いずれにしても、これら連動する遺伝子群についても直接的あるいは間接的に発現制御しているのか明らかにし、機能解析に努めていきたい。

ING2 が分子マーカーとして大腸癌に限らず他の癌への応用が可能かどうか調べるため、食道癌の化学放射線療法施行症例についても検討したところ、直腸癌の結果同様、ING2 の発現が核に強く発現している症例よりも発現が弱い症例のほうが化学放射線療法の効果が認められた。これはまだプレリミナリーなデータであり今後症例を増やして検討する必要がある。

今回の研究成果より、ING2 が放射線や抗癌剤という細胞ストレスに対してなんらかの役割を果たしている可能性が示唆されたことより、各々のデータについて今後詳細に検討していきたい。

**抗悪性腫瘍剤 / キナーゼ阻害剤**  
 創薬、処方せん医薬品 注意-医師等の処方せんにより使用すること

**スーテント®カプセル 12.5mg**  
 SUTENT® Capsule スニチニブリンゴ酸塩カプセル

「効能・効果」、「用法・用量」、「警告・禁忌・原則禁忌を含む使用上の注意」、「効能・効果に関連する使用上の注意」、「用法・用量に関連する使用上の注意」及び「副作用」の詳細は、添付文書をご参照ください。

ファイザー株式会社  
 〒151-8585 東京都渋谷区代々木3-22-7  
 資料請求先：製品情報センター

2009年7月作成