

厚生労働科学研究費補助金

がん克服戦略研究事業

がん発生に関与するゲノム不安定性と、
がん関連遺伝子の機能の解明に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 輝彦

平成15（2003）年4月

目 次

I. 総括研究報告		
がん発生に關与するゲノム不安定性と、がん關連遺伝子の機能の解明に關する研究		
吉田 輝彦	-----	1
II. 分担研究報告		
1. 体細胞を用いた統計的遺伝学的解析による DNA 修復およびチェックポイント機構の		
発がんへの關与の解明と治療への応用に關する研究		
武田 俊一	-----	6
2. がん關連刷り込み遺伝子の発現異常とゲノム不安定性に關する研究		
押村 光雄	-----	8
3. 遺伝子安定性におけるホリ (ADP-リホース) 代謝の役割に關する研究		
益谷 美都子	-----	13
4. 個体におけるがん關連遺伝子の機能の把握に關する研究		
落谷 孝広	-----	19
III. 研究成果の刊行に關する一覽表	-----	21

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

がん発生に関与するゲノム不安定性と、がん関連遺伝子の機能の解明に関する研究

主任研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所 部長

研究要旨 本研究においては、臨床的に問題となるがん発生の背景をなすゲノム不安定性の分子機構を明らかにするとともに、それらの遺伝子を含むがん関連遺伝子の個体レベルでの機能解明を行う系の確立を行い、がんの最も本質的な異常の理解に基づいた、がんの新しい診断・治療・予防法開発のための基礎的情報を提供する事を目指す。本年度の主な成果は以下の通り：①ヒトがんにおける代表的な染色体領域増幅ユニットの解析データの蓄積から、がんにおける遺伝子増幅生成分子機構として、duplication-mediated rolling circle modelを提唱した。また、17q12の共通増幅領域内の最後の遺伝子としてCAB2を明らかにした。②酵母ではDNA修復に関係するRad18が、動物細胞で抗がん剤によるDNA損傷からの回復や、外的要因によるDNA損傷がない状態でのゲノムの維持に関与することを明らかにした。③大腸がん組織において、正常ではゲノム刷り込みを受けている遺伝子の発現・メチル化異常が高頻度に見られ、刷り込みセンターであるLIT1に機能破綻があることを示唆し、さらに19qの新規刷り込み遺伝子を検索、脳腫瘍での発現異常を明らかにした。④Poly(ADP-ribose) polymerase (Parp-1) ^{-/-}マウスにおいて発がん物質投与後のgpt及びred/gam遺伝子における欠失型の突然変異体頻度がParp-1^{+/+}マウスより1.6倍上昇することを示した(p<0.05)。Poly(ADP-ribose) glycohydrolase (Parg) ^{-/-} ES細胞は抗がん剤や電離放射線への感受性が亢進しており、アポトーシスも強く誘導されることを見出した。⑤線維芽細胞増殖因子ファミリーのトランスフォーミング遺伝子HST-1/FGF-4が放射線によって生じるクリプト細胞のアポトーシスを抑制し、腸管上皮細胞の増殖および遊走を促進する活性があること等から、この遺伝子が組織修復に関与していることを示唆した。

分担研究者

吉田 輝彦	国立がんセンター研究所	部長
武田 俊一	京都大学医学研究所	教授
押村 光雄	鳥取大学医学部	教授
益谷 美都子	国立がんセンター研究所	室長
落谷 孝広	国立がんセンター研究所	室長

A. 研究目的

本研究においては、がん発生に関与するゲノム不安定性の分子機構と、それに関与する遺伝子を明らかにするとともに、それらの遺伝子を含むがん関連遺伝子の機能を、遺伝子組換え動物の系を作成するなどして個体レベルで解明する。最終的にはがんの最も本質的な異常を理解することによ

り、がんの新しい診断・治療・予防法の確立のための基礎的情報を提供する事を目指す。具体的な研究項目とその目的は以下の通り。

①がんの遺伝子増幅の分子機構と、増幅ユニット中のがん関連遺伝子の同定：がんの発生と進展は、複数の遺伝子異常の蓄積の結果であり、その蓄積の背景には、がん細胞におけるgenetic及びepigeneticなゲノム不安定性があるという基本概念がほぼ確立された。内外の研究により、DNA傷害の検知やそれに反応した細胞周期調節、細胞死誘導、DNA mismatches修復など、細胞が持つゲノムの安定性に関わる分子機構の一部が明らかにされつつあるが、本研究が対象とする、がんにおいて高頻度に見られる遺伝子増幅、欠失、転座、逆位などの、double strand breakを契機とした gross chromosomal abnormalityの分子機構につ

いては未だ多くが今後の研究課題となっている。ヒト固形がんでも高頻度かつ特異的に遺伝子増幅が見られる染色体領域の増幅ユニットの構造解析の知見を集積し、その背後にある分子機構を説明するモデルを提唱する。また、代表的遺伝子増幅領域に含まれるがん関連遺伝子を同定する。

②DNA修復およびチェックポイント経路：染色体DNAには酸素ラジカルなどの代謝産物による内的要因および紫外線などの外的要因により大量の損傷が生じる。また、DNA複製や染色体の娘細胞への分配時にさまざまなエラーが起りうる。これらのDNA損傷の発生を監視し、一時的に細胞分裂の進行を停止させて、問題を解決してから分裂周期に進むためのDNA修復経路やチェックポイント経路が染色体DNAの構造の維持のためにどのような働きをしているかを理解し、発がん過程への関わりを解明、さらにはがん治療によって生じたゲノム損傷の修復過程を解析し、耐性の分子機構解明とその克服法の開発につなげる。

③がん関連刷り込み遺伝子の発現異常：近年、刷り込み遺伝子の発現異常や染色体構造の異常が種々のがんの発生・進展に関係していることが明らかになりつつある。刷り込み遺伝子は特定の染色体領域にクラスターを形成する特徴があり、クロマチン構造の後生的な修飾によって染色体ドメインレベルで発現調節を受けると考えられている。刷り込み遺伝子の発現異常と発がんとの関連の全体像を明らかにするため、がんにおける刷り込み遺伝子の発現異常を網羅的に解析し、発がんとも刷り込み遺伝子の発現異常の機構を明らかにするとともに、新規刷り込み遺伝子を同定、がんとの関わりについて解析する。

④遺伝子不安定性におけるpoly(ADP-ribose)代謝の役割：Poly(ADP-ribose)代謝の発がん過程における遺伝子不安定性との関連を明らかにするため、無処理状態あるいは発がん物質処理後のpoly(ADP-ribose)合成酵素(Parp-1)欠損マウスにおける点突然変異・欠失型変異や、遺伝子発現の変化を検索する。また、poly(ADP-ribose)の主要な分解酵素であるpoly(ADP-ribose)glycohydrolase(Parg)遺伝子欠損マウスを作成する。昨年度までに作成したParg^{-/-}欠損ES細胞におけるDNA損傷応答能を調べる。さらに、種々のヒトの腫瘍におけるParp-1の遺伝子異常の有無を調べる。

⑤生体の放射線障害防御機構におけるHST-1/FGF-4遺伝子の機能：HST-1/FGF-4発現アデノウイ

ルスベクターによるマウスへの遺伝子導入が、致死量の放射線障害を防御することを見出したが、その作用機序を解明する。

B. 研究の方法

①がんの遺伝子増幅の分子機構と、増幅ユニット中のがん関連遺伝子の同定：10q26、11q13、17q12等ヒト固形がんでも高頻度に増幅する領域について、共通増幅ユニットの構造を、Southern blot解析、FISH解析、array CGH解析などにより明らかにした。特に、増幅単位の結合部位をクローニングし、その構造の塩基配列を含めた詳細な解析を行った。c-ERBB2遺伝子を含む17q12の共通増幅領域に存在する遺伝子の網羅的探索を進め、昨年度までに同定したCAB1遺伝子とc-ERBB2の新規プロモーターの間に、増幅に伴って発現している新しい遺伝子を見出し、CAB2と名付けた。酵母orthologの検索や、細胞内局在等の解析から、その機能を予測した。

②DNA修復およびチェックポイント経路：ニトリトリリンパ細胞株、DT40から既知の遺伝子のノックアウト細胞の系統的作製を進め、その変異クローンの染色体安定性と、放射線照射およびシスプラチンに対する感受性を解析した。

③がん関連刷り込み遺伝子の発現異常：69例の大腸がん患者より、がん部及びその周辺の非がん部組織の提供を受け、転写領域内に位置する制限酵素多型(RFLP)を用いて11番染色体刷り込み領域の代表的遺伝子であるH19、IGF2、HASH2、LIT1、IMPT1、IPLのアレル特異的な発現の有無を解析した。また、親起源の明らかなヒト染色体を1本保持するマウスA9雑種細胞株を用いて19番染色体上の候補領域約380kbを検索し、染色体特異的にメチル化状態にあるCpGアイランドを把握、その近傍に位置するexpressed sequence tag (EST)を検索して遺伝子を同定した。

④遺伝子不安定性におけるpoly(ADP)ribose代謝の役割：Parp-1欠損マウスと突然変異体検出用遺伝子マーカーを導入したgpt deltaトランスジェニックマウスとの交配体マウスを用いて無処理状態、及びN-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP)を単回投与した一週間後の、肝臓でのgpt及びred/gam遺伝子における突然変異体頻度を調べた。Parp-1欠損ES細胞における遺伝子発現をGeneChipを用いて、網羅的に野生型細胞株と比較した。Pargヘテロ欠損ES細胞を用いてParg欠損

マウス作出を試みた。Pargホモ欠損ES細胞におけるDNA損傷応答能を調べ、poly(ADP-ribose)の蓄積とapoptosisの過程を調べた。Parp-1のがん細胞株及び腫瘍組織における遺伝子異常を調べ、遺伝子増幅やrearrangement等の遺伝子不安定性との相関を検討した。

⑤生体の放射線障害防御機構におけるHST-1/FGF-4遺伝子の機能：7週齢雄のICRマウスにHST-1/FGF-4発現アデノウィルスベクターAxHST-1と、対照のAxWtを 1×10^9 pfu腹注し、4日後に致死量である9Gyの全身照射を行った。血清中のHST-1/FGF-4蛋白質の発現量の測定、腸管の組織学的解析、TUNEL法によるアポトーシスの評価、腸管上皮細胞の増殖・遊走能へのHST-1/FGF-4蛋白質の効果を解析した。

(倫理面への配慮) 本研究におけるヒト由来試料に対する遺伝子解析は、体細胞遺伝子異常及び遺伝子のメチル化異常を明らかにすることを目的としており、従って共通指針の適用範囲外である。しかし「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を可能な限り踏まえて研究を行った。また、動物の操作は、すべて国立がんセンター研究所動物倫理委員会の定める規則に基づいて、動物愛護の精神のもとに行われた。以上より倫理上の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

①がんの遺伝子増幅の分子機構と、増幅ユニット中のがん関連遺伝子の同定：ヒトがんにおける代表的な染色体領域増幅ユニットの解析データの蓄積を説明できる唯一のがんにおける遺伝子増幅生成分子機構として、duplication-mediated rolling circle modelを新たに提唱した。これはDNA複製に抑制がかかる配列を断端として、二本鎖切断により2単位の増幅ユニットがエピソームに飛び出し、head-to-headまたはhead-to-tailに連結した二量体環状構造を作る。この分子がrolling circle型の複製を繰り返して遺伝子増幅配列を作り、それが他の染色体に挿入され、マーカー染色体を形成するというモデルである。また、17q12の共通増幅領域の構造・発現解析からこの領域の最後の遺伝子としてCAB2を同定した。ヒト成人組織では広く発現が認められ、特に甲状腺及び胎盤で発現が高かった。予測されるCAB2蛋白質は319アミノ酸からなり、酵母及び線虫の

COS16遺伝子産物とそれぞれ33%、28%の相同性を示すことがわかった。これらの蛋白質は10個の膜貫通ドメインを持つ膜蛋白質と考えられ、疎水性プロファイルは良く保存されていることから、CAB2はCOS16のヒトorthologであると結論した。GFP融合遺伝子の細胞内局在の結果を併せ、CAB2/hCOS16が酵母COS16同様Mn²⁺代謝に関連し、DNA複製や修復系のMn²⁺要求性酵素群の機能制御を通して、遺伝子不安定性に関わる可能性を示唆した。

②DNA修復およびチェックポイント機構：様々なDNA修復経路、チェックポイント経路の1重/2重変異クローンをDT40から系統的に作成し表現型を解析した。そして各経路が、(a)ゲノム構造維持、(b)放射線照射/シスプラチンなどによって生じたゲノム損傷の修復の2点において、どのような役割分担をしているかを系統的に解析した。高等真核細胞では、大腸菌RecAのホモログであるRad51が相同DNA組み換えで最も重要な役割を持ち、Rad51の活性を制御していると考えられている5種類のRad51 paralog (Rad51B/C/D、XRCC2/3)、Brca1、Brca2、ファンconi分子群と呼ばれる蛋白質が存在する。Rad51 paralogが欠失するとシスプラチンなどのクロスリンカーに高感受性になること、抗体遺伝子に変異が蓄積したり、シスプラチン存在下にもかかわらずDNA複製が早まることを見出した。また、細胞内に大量に発生する塩基損傷(酸素ラジカルなど内的要因やシスプラチン、紫外線など外的要因による)後のDNA複製を完了させる為に、損傷塩基を鋳型にして1-2塩基のみDNA合成する特殊な損傷乗り越えDNAポリメラーゼが生物界に広く保存されている。最近、ヒトで8種類のポリメラーゼが新たに発見され、このうちのポリメラーゼkと損傷乗り越えの制御因子であるRad18をそれぞれ欠失させた細胞を作製・解析したところ、Rad18は、シスプラチンに高感受性であった。

③がん関連刷り込み遺伝子の発現異常：ヒト大腸がんに対して、染色体11p15領域のインプリント領域に存在するゲノム刷り込み遺伝子群のアレル特異的発現解析を行い、インプリント異常(LOI)を検索したところ、H19、IGF2、LIT1、IMPT1で両アレル性発現を認めた。しかしその頻度は8-56%と様々であり、また、がん特異的にLOIを示したLIT1やH19に対し、IGF2では非がん部組織でも両アレル性に発現、さらにIMPT1では両方の場合が混在しているなど、LOIとその制御の多

様性・複雑性が明らかになった。一方、ヒト新規刷り込み遺伝子の同定を目指して、ヒト正常細胞において親由来依存性に、アレル特異的なメチル化を受けている142ヶ所のdifferential methylation region (DMR) 候補領域を探索した。親起源の明らかなヒト染色体を1本保持するマウスA9雑種細胞株を用い、19番染色体上のこれらDMR候補領域のメチル化状態を検索した結果、約380kb領域内に母方染色体特異的にメチル化状態にあるCpGアイランドを計6ヶ所同定した。それらのCpGアイランド近傍に位置する6つの expressed sequence tag (EST) を同定、それらに対応する遺伝子の内、LOC125888とLOC125890について、それぞれ父性および母性発現のインプリンティング遺伝子であることを明らかにした。LOC125888は、C2H2タイプのzinc finger motifを14個有する蛋白質をコードし、glioma細胞9株中2株において発現の消去が認められた。また、脳組織では発現の認められなかったLOC125890は9株中7株において活性化が認められた。

④遺伝子不安定性におけるpoly(ADP)ribose代謝の役割：Parp-1欠損下での遺伝子の不安定性をin vivoで調べるために作成したParp-1欠損マウスと突然変異体検出用遺伝子マーカーを導入したgpt deltaトランスジェニックマウスとの交配体を用いてBHP投与後の肝臓でのgpt及びred/gam遺伝子における突然変異体頻度を調べた。BHP投与後の肝臓での点突然変異体頻度はParp-1+/+及びParp-1-/-マウスの間で差を認めなかったが、Parp-1-/-マウスではred/gam遺伝子における欠失型の突然変異体頻度がParp-1+/+マウスより1.6倍上昇していた(p<0.05)。Parp-1欠損下では、microhomologyを介さないend-joining型の修復により生じたと考えられる欠失型変異が増加していた。また、rearrangementを伴う欠失変異体は、Parp-1+/+マウスでは認められなかったが、Parp-1-/-マウスでは4/29(14%)に認められ、有意に増加していた(p<0.05)。また、Parp-1欠損ES細胞株と野生型ES細胞株の遺伝子発現プロファイルの違いを12,488個の遺伝子をプローブセットにもつマイクロアレイを用いて解析し、発現量に3倍以上差の認められた遺伝子(p<0.05)128個を同定した。Parp-1-/-ES細胞株において発現の増加を示した遺伝子25個のうち3個はtrophoblastの分化に関わる遺伝子であった。Poly(ADP-ribose)の主要分解酵素であるpoly(ADP-ribose)glycohydrolase

(Parg)について、Parg-/- ES細胞株を樹立し、細胞内poly(ADP-ribose)含量がベースラインで3倍増加していることを確認した。Parg-/- ES細胞はアルキル化剤methyl-methanesulfonate (MMS)やガンマ線照射に対する致死感受性が野生型細胞株よりも各々約1.5倍亢進、apoptotic細胞の割合が野生株に比較して早くから増加しており、DNAの断片化も早期に認められた。ヒト胃がん細胞株MKN28でPARP-1遺伝子のcatalytic domainを含む領域の配列の再配列を見出した。

⑤生体の放射線障害防御機構におけるHST-1/FGF-4遺伝子の機能：HST-1/FGF-4遺伝子発現アデノウイルスベクターをあらかじめ感染させたマウスは、致死量の放射線照射に耐性であった。その機構として、骨髄造血系の保護に加え、HST-1/FGF-4は腸管においても放射線障害によるクリプト細胞のアポトーシスを抑制するほか、腸管上皮細胞の細胞運動能や増殖の促進を介して組織修復に関与する事を示唆する知見を得た。

D. 考察

①がんの遺伝子増幅の分子機構と、増幅ユニット中のがん関連遺伝子の同定：がんにおける遺伝子増幅はbreakage-fusion-bridge cyclesでは説明できないことから、新しい遺伝子増幅形成のモデルを提唱した。今後はこのモデルの機能に関与する分子群を同定するとともに、同様の構造的特徴を持つため増幅・欠失等が起きやすい染色体脆弱部位を明らかにし、周辺のがん関連遺伝子を網羅的に検索する。また、DNA二本鎖切断修復に関わる酵母COS16遺伝子のヒトorthologであるCAB2遺伝子増幅のがん化における意義を明らかにする。

②DNA修復およびチェックポイント機構：相同DNA組み換えは、少なくとも10種類以上の分子から校正される複雑な生化学反応であり、試験管内で全過程を再現できていない。損傷乗り越えDNA合成のような単純な反応でも、in vitroのデータが遺伝子ノックアウト細胞の表現型と必ずしも一致しない。また、多くのDNA修復経路は互いに相補的である。そのため複数種類の経路を同時に欠損させると、細胞レベルで増殖できなくなることが多い。従って本研究のように体細胞株を使い、かつ相補性の解析が可能なリバーシジェネティクスが遺伝子組換え動物に加えて重要である。

③がん関連刷り込み遺伝子の発現異常：IGF2ではがん組織において高頻度のLOIが認められ、さ

らに非がん部組織でも両アレル性に発現していることから、IGF2の発現が大腸がんの易罹患性に影響を与える可能性が示唆された。一方、インプリントセンターと考えられているLIT1では17例中9例でがん特異的LOIが認められたが、LIT1 DMRのメチル化状態と発現との間に相関は認められず、がんにおいては発現調節機構自体が異常をきたしていることが示唆された。がん化の進行過程で様々な後成的修飾の変化が蓄積した状態においてはクロマチン構造自体も大きく変化していることが予想され、遺伝子発現の異常もDNAのメチル化だけでなく様々な要因により引き起こされると考えられる。腫瘍化にともなうメチル化状態の異常によりLOC125890の発現制御がLOC125888の制御下におかれている可能性がある。他のがんにおける刷り込み異常の有無についても解析していく。

④遺伝子不安定性におけるpoly(ADP)ribose代謝の役割：Parg-1欠損下でBHP投与後、欠失型変異が上昇していたことから、Parg-1欠損下ではmicrohomologyを介した修復が抑制され、microhomologyを介さないend-joining型の修復を介して、欠失型変異が増加することが示唆された。Parg-1の機能欠損下でのin vivoにおけるDNA損傷修復は、Parg-2等の他のPargファミリー分子によって十分には補えず、Parg-1欠損マウスの発がん感受性の亢進に関連すると考えられる。ヒトの腫瘍におけるParg-1遺伝子異常について解析を更に進める必要がある。Parg-1欠損下で、特定の遺伝子群の発現低下あるいは発現誘導が認められたことから、Parg-1がpoly(ADP-ribosyl)化を介して遺伝子発現の制御に関与することが示唆された。発がんの過程において、Parg-1の機能異常によるepigeneticな変化が起きることが予測されるためこの点について今後研究を進める。DNA損傷からの回復過程において、蛋白質のpoly(ADP-ribosyl)化に並んで、その分解系の重要性が示唆された。Parg欠損下でのDNA損傷後のpoly(ADP-ribose)蓄積が誘導するapoptosisの機序については今後の課題である。DNAを標的とする抗がん剤にPargの阻害剤を併用することで、抗がん剤増感効果をもたらすことが予測されるため、この点について検討を行う。今後、作成したParg欠損マウスを用いて遺伝子不安定性、DNA損傷応答能、及び発がん感受性を野生型マウスと比較する。

⑤生体の放射線障害防御機構におけるHST-1/FGF-4遺伝子の機能：放射線による腸管や骨髄への

障害はがん治療の成否を左右する重要な治療合併症である。HST-1/FGF-4の主要な働きとして腸管のクリプト細胞のアポトーシスを抑制し、また組織を修復する働きが明らかになったことで、この遺伝子の生体における新たな機能を明らかにすることができた。また、HST-1/FGF-4あるいはその分子経路を作用点とする放射線障害の予防薬を開発する可能性が開けた。

E. 結論

昨年度より継続している遺伝子増幅、DNA修復系、DNAメチル化による刷り込み、poly(ADP-ribose)代謝系を切り口にした、発がんとはがん治療に関わるゲノム不安定性の分子機構の解明を進めた。がんにおける主な遺伝子増幅機構を初めて説明するduplication-mediated rolling circle modelを提唱した。17q12の共通増幅領域内の最後の遺伝子としてCAB2を明らかにした。相同組換えと損傷乗り越えDNA合成は、がんを含む分裂細胞でゲノムの構造維持に関わり、相同組換えは放射線やシスプラチンによる損傷の修復においても重要な役割を果たす事を示唆した。がんの発生には刷り込み遺伝子の発現異常が関わっているが、その制御機構の多様性・複雑性を示し、細胞遺伝学的手法により、新規刷り込み遺伝子を同定した。Parg-1の欠損はin vivoにおいてDNA損傷後に欠失型変異を誘導し、その結果、発がん過程における遺伝子不安定化の誘発に関与する可能性を示した。Parg-1がpoly(ADP-ribosyl)化を介して遺伝子発現の制御に関与することが示唆された。Pargによるpoly(ADP-ribose)分解がDNA損傷後のapoptosis誘導に関与することが判った。また、線維芽細胞増殖因子ファミリーのHST-1/FGF-4の個体レベルでの機能解明を進め、放射線治療の有害事象を抑制する方法開発のシーズを提供した。

F. 健康危険情報

該当するもの無し。

G. 研究発表

本報告書が添付される式A(4)厚生労働科学研究費補助金研究報告書に記載された通り。

H. 知的所有権の取得状況

本報告書が添付される様式A(4)厚生労働科学研究費補助金研究報告書に記載された通り。

体細胞を用いた統計的遺伝学的解析によるDNA修復及びチェックポイント機構の
発がんへの関与の解明と治療への応用に関する研究

分担研究者 武田俊一 京都大学医学研究科 教授

研究要旨 ニワトリBリンパ細胞株、DT40は、高等真核細胞で唯一、酵母の実験系のような系統的な”機能の破壊”の実験が行なえる系である。我々は、様々なDNA修復経路、チェックポイント経路の1重/2重変異クローンをDT40から系統的に作成し表現型を解析した。そして各経路が、(1)ゲノム構造維持、(2)放射線照射/シスプラチンなどによって生じたゲノム損傷の修復の2点において、どのような役割分担をしているかを系統的に解析した。

A. 研究目的

染色体DNAには酸素ラジカルなどの代謝産物による内的要因および紫外線などの外的要因により大量の損傷が生じる。生命体は、これらの損傷を修復する様々な経路を獲得した。また、DNA複製や染色体の娘細胞への分配時にさまざまな事故が起りうる。そこで生命体は、これらの事故の存在や各作業ステップの完了をモニターするシステムを持っている。そして、事故が起った時に一時的に細胞分裂の進行を停止し、問題を解決してから分裂周期に進む。これらの一連の機構をチェックポイントと呼ぶ。これらのDNA修復経路やチェックポイント経路に異常が生じると、変異や染色体異常が蓄積し、発癌の可能性が高まる。我々の研究の第一の目的は、これらの経路が染色体DNAの構造の維持のためにどのような働きをするかを解明することにある。

放射線治療やシスプラチンなどの一部の抗癌剤は、染色体DNAに損傷することにより、チェックポイント経路を活性化して細胞死を誘導する。ゆえに癌治療の開発のためには、チェックポイントやDNA修復経路の理解が必須である。我々の研究の第二の目的は、放射線照射/シスプラチンなどによって生じたゲノム損傷がどのように修復されるかを解析することにある。

B. 研究方法

ニワトリBリンパ細胞株、DT40から既知の遺伝子のノックアウト細胞を系統的に作製する。そして、この変異クローンの、染色体安定性と、放射線照射およびシスプラチンに対する感受性を解析する。

(論理面への配慮)

我々の研究は、ニワトリ細胞株を使った解析であるので、倫理的な問題はない。

C. 研究結果

(1) Brca2遺伝子欠失細胞の作製

Brca2遺伝子は、家族性の乳癌と卵巣癌の原因となる腫瘍抑制遺伝子である。Brca2は、相同DNA組み換えに関与するが、酵母にその相同遺伝子が存在しない。Brca2遺伝子のエキソン11からC末端までを完全に欠失させたマウスは胎生致死であるのに対して、Brca2遺伝子のエキソン11の中央部からC末端までを欠失させたマウスは数週齢まで育つことがある。このマウスから樹立した細胞株は、表現型が株ごとに違うので、細胞レベルの解析に必ずしも適していない。

我々は、ニワトリBrca2遺伝子の機能解析を進めるために、内在性のBrca2遺伝子に様々な人工的改変を加えることによってBrca2変異細胞を作製した。これまでに、Brca2コンディショナル完全欠失細胞（致死）、BRC3モチーフ（エキソン11）からC末端までを完全に欠失させた変異細胞、BRC8モチーフ（エキソン11）からC末端までを完全に欠失させた変異細胞、Brca2 C末端の核移行シグナルのみを欠失した変異細胞を作製した。

(2) Rad51パラログ遺伝子の機能解析

高等真核細胞では、Rad51タンパク分子（大腸菌RecAのホモログ、多数のRad51がDNA上に重合し、そのDNAと相同な配列を検索）が相同DNA組み換えで最も重要な役割をもつ。そして、高等真核細胞ではRad51の活性を制御していると考えられている5種類のRad51パラログ（Rad51B/C/D、XRCC2/3）、Brca1、Brca2、ファンコニ分子群と呼ばれるタンパクが存在する。我々は、Rad51パラログが欠失するとシスプラチンなどのクロスリンカ

一に高感受性になることを見出した。海外との共同研究でRad51パラログが欠失すると、抗体遺伝子に変異が蓄積したり、シスプラチン存在下にもかかわらずDNA複製が早まることを見出した(論文:3)。

(3) 損傷乗り越えDNA合成の解析

細胞内に大量に発生する塩基損傷(酸素ラジカルなど内的要因やシスプラチン、紫外線など外的要因による)の多くは、複製ポリメラーゼを停止させる。大腸菌から高等真核細胞まで、複製を完了させる為に、損傷塩基を鋳型にして1-2塩基のみDNA合成できる特殊な損傷乗り越えDNAポリメラーゼをもつ。最近3年間にヒトで8種類のポリメラーゼが新たに発見された。我々は、このうちのポリメラーゼκ(論文:1)と損傷乗り越えの制御因子であるRad18(論文:2)をそれぞれ欠失させた細胞を作製・解析した。Rad18は、シスプラチンに高感受性であった。

D. 考察

相同DNA組み換えは、10種類以上の分子が参加する複雑な生化学反応であり、試験管内で全過程を再現できていない。また、損傷乗り越えDNA合成のような単純な反応でも、in vitroのデータが遺伝子ノックアウト細胞の表現型と必ずしも一致しない(論文:2)。ゆえに我々が行っているリバースジェネティクスによる解析が重要である。

多くのDNA修復経路は互いに相補的である。そのため複数種類の経路を同時に欠損させると、細胞レベルで増殖できなくなることが多い(論文:3)。ゆえに、体細胞株を使ったりリバースジェネティクスがノックアウトマウスと同様に重要である。この相補性の解析が可能なのが我々の実験系のメリットである。

E. 結論

相同組み換えと損傷乗り越えDNA合成とは、癌を含む分裂細胞でゲノムの構造維持のために重要な働きをする。また、相同組み換えは、放射線やシスプラチンによる損傷の修復においても中心的な役割をもつ。

F. 健康危険情報 該当するものなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada, T., Sonoda, E., Yamashita, Y. M., Koyoshi, S., Tateishi, S., Yamaizumi, M., Takata, M., Ogawa, O., and Takeda, S. (2002)

Involvement of Vertebrate Pol κ in Rad18-independent Postreplication Repair of UV damage. *J. Biol. Chem.* Vol.277: 48690-5

2. Yamashita, Y. M., Okada, T., Matsusaka, T, Sonoda, E., Cho, Z., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M., and Takeda, S. (2002) *RAD18* and *RAD54* cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *EMBO J.* Vol.21: 5558-5566

3. XRCC3 and RAD51 Modulate Replication Fork Progression on Damaged Vertebrate Chromosomes (2003) J. Henry-Mowatt¹, D. Jackson, J.-Y. Masson, P. A. Johnson, P. M Clements, F. E. Benson, L. H. Thompson, S. Takeda, S. C. West, and K. W. Caldecott. *Mol. Cell in press*

2. 学会発表

Gordon conference, Mammalian DNA Repair, Jan. 19-24, 2003, アメリカ、招待講演

H. 知的財産権の出願・登録 該当するものなし。

がん関連刷り込み遺伝子の発現異常とゲノム不安定性に関する研究

分担研究者 押村 光雄 鳥取大学医学部・教授

研究要旨

従来より、LIT1 遺伝子はこの領域のインプリントセンター（IC）と考えられているため、ヒト大腸がんにおける LIT1 の刷り込みの消失（LOI）および 11 番染色体 11p15 における刷り込み遺伝子群の存在する領域の発現異常について解析した。53%の症例において LIT1 の LOI が認められたが、LOI が認められる症例において、正常細胞観察されるように周辺の刷り込み遺伝子が LIT1 によって制御されている知見は得られなかった。したがって、大腸がんにおいては、LIT1 の IC としての役割に破綻が生じるなど、構成的修飾の異常により正常な遺伝子調節機構が維持されていないと考えられる。さらに、ヒト染色体を 1 本含むマウス A9 細胞を用いて、ヒト新規刷り込み遺伝子を同定した。

A. 研究目的

刷り込み遺伝子は特定の染色体領域にクラスターを形成する特徴があり、クロマチン構造の後生的な修飾によって染色体ドメインレベルで発現調節を受けると考えられている。本研究では、刷り込み遺伝子の発現異常と発がんとの関連の全体像を明らかにするため、1) がんにおける刷り込み遺伝子の発現異常を網羅的に解析し、発がん刷り込み遺伝子の発現異常の機構を明らかにするとともに、2) 新規刷り込み遺伝子を単離する。

B. 研究方法

1) 大腸がん組織及びその周辺正常組織における 11 番染色体刷り込み領域の発現解析

本研究では、同一患者から摘出された大腸がん部及び非がん部組織を使用した。凍結保存したおよそ 1cm 四方の組織を乳鉢に採り、液体窒素を入れ凍結状態を保ちながらすばやく乳棒ですり潰し粉末状に粉碎した。粉碎した組織は DNA 抽出用としてミクロスパーテル 2 杯分を 2ml チューブに、残り全量を RNA 抽出用として 15ml チューブに回収し、使用時まで -80°C で凍結保存した。これを全 69 検体のがん部及び非がん部組織について行った。

転写領域内に位置する制限酵素多型（Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP）を用い、H19, IGF2, HASH2, LIT1, IMPT1, IPL についてアレル特異的な発現を解析した。PCR 反応液の組成は、MQ 水 14.4µl, 10xPCR buffer 2µl, 2mM dNTPs 2µl, 20µM 各プライマー 0.5ml, 5U/µl Ampli Taq DNA ポリメラーゼ（Applied Biosystems）0.1µl, 鋳型 DNA

100ng/µl（あるいは cDNA 0.5µl）を加え、全反応量を 20µl とした。まず、非がん部組織のゲノム DNA を PCR 法により増幅した後、多型に位置する制限酵素で 2 日消化した。アガロースゲルあるいはアクリルアミドゲルで分離し、エチジウムブロマイド染色の後、デンシトグラフ（ATTO, Tokyo, Japan）で多型解析を行い、ヘテロの検体を特定した。次にヘテロの検体についてがん部ゲノム DNA および非がん部、がん部 cDNA を用い、同様に解析し、アレル特異的な発現様式を検討した。

2) ヒト染色体を含む A9 雑種細胞株は父方染色体を保持する細胞株、母方細胞株を保持する細胞株それぞれ 3 株ずつ使用した。培養には最終濃度 10% の牛血清及び 800µg/ml の G418 を添加した DMEM を使用した。EB ウイルス感染によりヒト B 細胞から樹立されたリンパ芽球様細胞株及びヒトグリオーマ細胞株 HTB-12, HTB-13, HTB-14, HTB-16, HTB-17, HTB-138, CRL-1620, CRL-2020 及び U-251-MG 最終濃度 10% の牛胎児血清, 100U/ml のペニシリン G 及び 100µg/ml のストレプトマイシンを添加した RPMI1640 培地で培養を行った。全ての細胞は 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養を行い、培地交換及び継代はそれぞれ適時行った。ヒト正常脳組織検体は、ゲノム DNA 及び total RNA の抽出に使用した。

（倫理面への配慮）

種々のがん細胞における刷り込み遺伝子の発現解析に関しては、鳥取大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) ヒト大腸がんにおける 11 番染色体 11p15

インプリント領域におけるゲノム刷り込み遺伝子群の発現解析

H19 のアレル特異的発現の解析：RFLP 解析にて、informative な症例を 26 例確認した。これらについて発現解析を行った結果、非がん部では 1 例を除きすべて片アレル発現を示した。また、がん部においても 24/26 例で片アレル発現を示し、LOI の頻度は 2/26 例 (8%) であった。

IGF2：RFLP 解析にて、informative な症例を 25 例確認した。発現解析の結果、がん部で片アレル発現を示したのが 10 例、両アレル発現を示したのが 14 例であり、56%で LOI が認められたが、これらの非がん部組織すべてにおいても両アレル発現を呈していた。

Hash2：RFLP 解析にて、informative な症例を 19 例確認した。しかしながら、調べたほとんどの症例で両アレル発現を認めたことから、HASH2 は大腸組織でも刷り込み発現を呈しないと考えられた。

LIT1：RFLP 解析にて、informative な症例を計 17 例確認した。このうち、がん部で片アレル発現を示したのが 8 例、両アレル発現を示したのが 9 例 (53%) であった。一方、非がん部組織では全ての検体において片アレル発現を示した。このことから、LIT1 の LOI は IGF2 とは異なり、がん特異的であることが示された。

IMPT1：RFLP 解析にて、informative な症例を 24 例確認した。IMPT1 は多様な発現様式を示した。がん特異的な LOI も 7/24 例 (29%) と高頻度で認められたものの、非がん部、がん部ともに両アレル発現を示したのが 6/24 例 (25%)、非がん部では両アレルから発現しているのもかかわらず、がん部で

A

がん部で発現減少	がん部で発現上昇	発現量に変化なし
9/53 (17%)	20/53 (38%)	24/53 (45%)

B

p57 ^{KIP2}	がん部で発現上昇	がん部で発現減少	発現量に変化なし
LIT1			
LIT1でLOI(+)	5/7 (72%)	1/7 (14%)	1/7 (40%)
LIT1でLOI(-)	1/5 (20%)	2/5 (40%)	2/5 (40%)

表2 大腸がんにおけるp57^{KIP2}の発現解析
A: 53 症例の大腸がんについてp57^{KIP2}の発現解析を行った。非がん部とがん部の GAPDHの発現量を基準とし、非がん部およびがん部の発現量を決定した。求めた非がん部とがん部の発現量を比較しての増減を求めた。
B: LIT1 LOIとp57^{KIP2}の発現量との相関

片アレル発現を示すのが 3/24 例 (13%)、非がん部とがん部で発現しているアレルが変わる allelic change を示したのが 2/24 例 (8%) であった。

IPL：RFLP 解析をしたが (Qian et al 1997), informative な症例は得られなかつ

た。

P57^{KIP2}：がん抑制遺伝子としての機能が予

表1 大腸がん部および非がん部組織における11p15.5刷り込み領域のアレル特異的発現

	非がん部			がん部		
	Mo	Bi	ND	Mo	Bi	ND
H19 (n=26)	20	1	5	24	2	0
IGF2 (n=25)	9	12	4	10	14	1
HASH2 (n=19)	1	11	7	2	15	3
LIT1 (n=17)	17	0	0	8	5	0
IMPT1 (n=24)	10	10	4	8	15	1

Mo:片アレル発現 Bi:両アレル発現 ND: Not detected

想される p57^{KIP2} について、非がん部およびがん部における発現量を RT-PCR 法により解析し、比較検討した。その結果、がん部で発現が上昇していた症例が 38%と、がん部で発現が減少していた症例 (17%) よりも多かった。発現量の増減の認められなかった症例も 45%であり、p57^{KIP2} は大腸がんではがん抑制能を持たないことが示唆された。



図1 ヒト11P15.5領域の刷り込み遺伝子

これは複製型、非複製型領域、異相性領域を有していない領域を示す。H19はマウスH19、IGF2はマウスIGF2、LIT1はマウスLIT1、IMPT1はマウスIMPT1を示す。H19はマウスH19、IGF2はマウスIGF2、LIT1はマウスLIT1、IMPT1はマウスIMPT1を示す。H19はマウスH19、IGF2はマウスIGF2、LIT1はマウスLIT1、IMPT1はマウスIMPT1を示す。

LIT1-DMR：正常リンパ芽球細胞において、LIT1 プロモーター領域の CpG アイランドは親由来特異的なメチル化を受け、LIT1 の発現調節に関与している領域 (differential methylation region; DMR) であることが知られている。今回大腸がん組織における DMR のメチル化状態をサザンプロット法により解析し、発現様式とメチル化状態との相関を検討した。結果、低メチル化状態および高メチル化状態になっている症例はそれぞれ 8/60 例、1/60 例あったが、メチル化状態と LIT1 の LOI には相関は見出されなかった。

2) ヒト新規刷り込み遺伝子の探索

ヒト正常細胞においてアレル間で異なるメチル化状態にある 142 ヶ所の differential methylated region (DMR) 候補領域が明らかにした。親起源の明らかなヒト染色体を 1 本保持するマウス A9 雑種細胞株を用い、19 番染色体上のこれら DMR 候補領域のメチル化状態を検索した結果、約 380kb 領域内に母方染色体特異的にメチル化状態にある CpG アイランドを計 6 ヶ所同定した。それらの CpG ア

イランド近傍に位置する転写物について A9 雑種細胞株におけるアレル特異的な発現様式を RT-PCR により検索し、6 つの父性発現様式を示す expressed sequence tag (EST) を得た。それらの内、LOC125888 と LOC125890 の 2 つの転写物についてリンパ芽球様細胞の家系検体を用い発現解析を行い、それぞれ父性および母性発現のインプリンティング遺伝子であることを明らかにした。さらに RACE および RT-PCR を行い、遺伝子の全長配列を得、各遺伝子に 4 つの isoform の存在を明らかにした。LOC125888 isoform1, 2 は C2H2 タイプのジンクフィンガーモチーフを 14 個有するタンパク質をコードする遺伝子であった。19q には脳腫瘍の発生に関与する刷り込み遺伝子の存在が示唆されていることから、グリオーマ細胞株における新規刷り込み遺伝子 LOC125888 と LOC125890 の発現解析を行った。9 株中 2 株において LOC125888 発現の消去が認められた。また、脳組織では発現の認められなかった LOC125890 は LOC125888 と同様な発現様式を示し、9 株中 7 株において活性化が認められた。さらに、母親由来、父親由来のヒトの 7 番染色体をそれぞれ別に保持する A9 細胞を用い、ヒトの 7q21-q31 領域に存在する EST について、親由来により異なる発現を示す遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、過去に刷り込みを受けていると報告されている PEG10 を含む 7 つの EST が親由来特異的な発現を示すことが明らかとなった。多型解析の結果、そのうちの 1 つである DLX5 がヒト正常リンパ芽球細胞と脳組織において刷り込みを受けていることを確認した。さらに、前述の候補遺伝子のマウスホモログについても刷り込みの検証を行った。JF1/Ms と C57BL/6J を相互交配させた F1 マウスを作製し、多型解析を行った結果、その中の 1 つの遺伝子 Calcr が脳特異的な刷り込みを受けていることを明らかとした。

D. 考察

1) IGF2 では、25 例中 14 例と高頻度で LOI が認められ、さらにこれらの症例ではその非がん部組織でも両アレルから発現しており、IGF2 の発現が大腸がんの易罹患性に影響を与える可能性が示唆された。LIT1 では 17 例中 9 例で LOI が認められたが、IGF2 とは異なり、がん特異的に LOI を生じていることから、大腸がんの進展に何らかの関わりがあることが示唆された。また、p57^{KIP2} の発現量は大腸がん組織において様々に変化していたことより、p57^{KIP2} は少なくとも大腸がんにおいては、がん抑制能を持たないことを示唆している。さ

らに、親由来特異的なメチル化を受け、LIT1 の発現制御に関与している LIT1 DMR のメチル化状態を解析し、発現様式との相関を検討したが、それらに相関は認められず、がんにおいては、発現調節機構自体が異常をきたしていることが示唆された。以上、大腸がんにおいて特定遺伝子の発現やメチル化状態の異常がかなり高頻度に引き起こされること、LIT1 のインプリントセンターとしての役割に破綻が生じるなど後成的修飾の異常により正常な遺伝子発現調節機構が維持されていないことが明らかとなった。がん化の進行過程で様々な後成的修飾の変化が蓄積した状態においては、クロマチン構造自体も大きく変化していることが予想され、遺伝子発現の異常も DNA のメチル化だけでなく様々な要因により引き起こされると考えられる。このように、大腸がんにおける 11p15.5 のインプリントドメインの制御機構の解明とその分子を明らかにすることは、がん化のメカニズムを解明する上で極めて重要である。

2) 腫瘍化にともなうメチル化状態の異常により LOC125890 の発現制御が LOC125888 の制御下におかれていることが考えられる。また、刷り込み遺伝子の脳腫瘍等のがんにおける発現異常を検討する予定である。また、発見された新規刷り込み遺伝子の種々のがん細胞における刷り込み異常について解析していく予定である。

E. 結論

がんの発生には刷り込み遺伝子の発現異常が関わっていると思われるが、その制御メカニズムは不明である。今後メカニズムの解明はがんの治療にとって重要である。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Nakabayashi, K., Fernandez, B.A., Teshima, I., Shuman, C., Proud, V.K., Curry, C.J., Chitayat, D., Grebe, T., Ming, J., Oshimura, M., Meguro, M., Mitsuya, K., Deb-Rinker, P., Herbrick, J.A., Weksberg, R. and Scherer, S.W.: Molecular genetic studies of human chromosome 7 in Russell Silver syndrome. *Genomics*, 79: 186-196, 2002
2. Hori, N., Nakano, H., Takeuchi, T.,

- Kato, H., Hamaguchi, S., Oshimura, M. and Sato, K.: A dyad Oct-binding sequence functions as a maintenance sequence for the unmethylated state within the H19/Igf2-imprinted control region. *J. Biol. Chem.*, 277: 27960-27967, 2002
3. Kugoh, H., Nakamoto, H., Inoue, J., Funaki, K., Barrett, J.C. and Oshimura, M.: Multiple human chromosome carrying tumor-suppressor functions for the mouse melanoma cell line B16-F10, identified by micorcell-mediated chromosome transfer. *Mol. Carcinog.*, 35: 148-156, 2002
 4. Feinberg, A.P., Oshimura, M. and Barrett, J.C.: Epigenetic mechanisms in human disease. *Cancer Res.*, 62: 6784-6787, 2002
 5. Kadota, M., Shirayoshi, Y. and Oshimura, M.: Elevated apoptosis in pre-mature neurons differentiated from mouse ES cells containing a single human chromosome 21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 299: 599-605, 2002
 6. Kugoh, H., Shigenami, K., Funaki, K., Barrett, J.C. and Oshimura, M.: Human chromosome 5 carries a putative telomerase repressor gene. *Genes, Chrom. & Cancer*, 36: 37-47, 2003
 7. Yawata, T., Kamino, H., Kugoh, H., Kato, M., Nomura, N., Oishi, M., Horikawa, I., Barrett, J.C. and Oshimura, M.: Identification of a ≤ 600 -kb region on human chromosome 1q42.3 inducing cellular senescence. *Oncogene*, 22: 281-290, 2003
 8. Jovenot, Y., Gregory, P.D., Ginja, V., Zhang, L., Oshimura, M., Feinberg, A.P., Wolffe, A.P. and Ohlsson, R.: Targeted activation and repression of imprinted genes by synthetic zinc finger transcription factors. *Gene Therapy*, in press
 9. Suda, T., Kato, M., Hiratsuka, M., Fujiwara, M., Irizawa, Y. and Oshimura, M.: Use of real-time RT-PCR for the detection of allelic expression of an imprinted gene. *Intl. J. Mol. Med.*, in press
 10. Kashiwagi, A., Meguro, M., Hoshiya, H., Haruta, M., Ishino, F., Shibahara, T. and Oshimura, M.: Predominant maternal expression of the mouse *Atp10c* in hippocampus and olfactory bulb. *J. Hum. Genet.*, in press
 11. Okita, C., Meguro, M., Hoshiya, H., Haruta, M., Sakamoto, Y. and Oshimura, M.: A new imprinted cluster on the human chromosome 7q21-q31, identified by human-mouse monochromosomal hybrids. *Genomics*, in press
 12. Hoshiya, H., Meguro, M., Kashiwagi, A., Okita, C. and Oshimura, M.: *Calcr*, a brain-specific imprinted mouse calcitonin receptor gene in the imprinted cluster of proximal region of chromosome 6. *J. Hum. Genet.*, in press
- 2) 学会発表
1. 須田哲司, 加藤基伸, 藤原睦憲, 押村光雄
「定量PCRを用いた刷り込み遺伝子 MEST の発現パターン解析」
日本癌学会第 61 回総会 (東京) 2002 年 10 月 1~3 日
 2. 前川真治, 大塚晋, 難波栄二, 白石昌彦, 目黒牧子, 押村光雄
「ヒト 19 番染色体上の新規インプリンティングドメインの同定」
第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜市) 2002 年 12 月 10~12 日
 3. Oshimura, M.
"Disruption of Genomic Imprinting in Cancer"
Epigenetic Mechanisms in Human Disease, Bethesda, USA, May 30-31, 2002
 4. 中野星児, 目黒牧子, 押村光雄
「大腸がんにおけるゲノム刷り込み遺伝子の解析」
日本人類遺伝学会第 47 回大会 (名古屋市) 2002 年 11 月 13~15 日
 5. 星谷英寿, 目黒牧子, 沖田千芽, 押村光雄
「ヒト 7 番染色体上の新規刷り込み遺伝子の同定とそのマウスホモログの刷り込

み解析」

日本人類遺伝学会第 47 回大会（名古屋市）2002 年 11 月 13～15 日

6. Oshimura, M.

“Novel mechanistic studies of genomic imprinting”

Cancer Genetics and Epigenetics,
Ventura, USA, Jan. 5-10, 2003

H. 知的財産の出願・登録状況

該当事項無し

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

遺伝子安定性におけるポリ (ADP-リボース) 代謝の役割に関する研究

分担研究者 益谷 美都子

国立がんセンター研究所・生化学部・担がん生体研究室室長

研究要旨

Parp-1 欠損マウスにおいて *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) 投与後の肝臓での突然変異体頻度を調べたところ、点突然変異体頻度は *Parp-1*^{+/+} 及び *Parp-1*^{-/-} マウスの間で差を認めなかったが、*Parp-1*^{-/-} マウスでは欠失型の突然変異体頻度が *Parp-1*^{+/+} マウスより 1.6 倍上昇していた ($p < 0.05$)。変異スペクトラムの解析から、*Parp-1* 欠損下では、microhomology を介さない end-joining 型の修復により生じたと考えられる欠失型変異が増加することを見出した。*Parp-1* 欠損下でのゲノム不安定化が、発がん感受性の亢進に関連することが示唆された。さらに、*Parp-1* 欠損下での遺伝子発現への影響について、野生型及び *Parp-1*^{-/-} ES 細胞株を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。*Parp-1*^{-/-} ES 細胞株において、特定の遺伝子群の発現低下あるいは発現誘導が起きることから、*Parp-1* がポリ ADP-リボシル化を介して遺伝子発現の制御に関与することが示唆された。*Parp-1*^{-/-} ES 細胞株において発現誘導を示した 25 個の遺伝子のうち、3 個の遺伝子が trophoblast の分化に関わる遺伝子であった。

ポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼホモ欠損 (*Parg*^{-/-}) ES 細胞株は、アルキル化剤 methylmethanesulfonate (MMS) やガンマ線照射に対する致死感受性が亢進した。*Parg*^{-/-} ES 細胞株では、MMS 処理後、ポリ ADP-リボシル化タンパク質の顕著な蓄積が認められ、apoptosis の早期誘導と亢進が認められた。DNA 損傷後の細胞死の制御に、ポリ ADP-リボースの分解に関わることを示唆された。また、*Parg* ヘテロ欠損 (*Parg*^{+/-}) ES 細胞株を用いて *Parg* ヘテロ欠損ヘテロマウス系統を作出した。

A. 研究目的

ポリ (ADP-リボース) 代謝と発がん、また、発がん過程における遺伝子不

安定性の関連については未だ解明されていない点が多い。本研究においては、ポリ (ADP-リボース) 代謝の発

がん過程における遺伝子不安定性との関連を調べるために、無処理状態あるいは発がん物質処理後のポリ(ADP-リボース)合成酵素(Parp-1)欠損マウスにおける点型や欠失型等の変異や遺伝子発現の変化を調べる。また、ポリ(ADP-リボース)の主要な分解酵素であるポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ(Parg)遺伝子の片側アレルを破壊したマウスES細胞を用いて、Parg欠損マウスを作出する。昨年度作成したParg^{-/-}欠損ES細胞におけるDNA損傷応答能を調べる。さらに、種々のヒトの腫瘍におけるParp-1の遺伝子変異の有無を調べる。これにより発がん過程におけるポリ(ADP-リボース)代謝の役割が明らかになれば、がんの予防及び治療を考える上で、有用な基礎的資料となると考えられる。

B. 研究方法

- 1) Parp-1欠損マウスと突然変異体検出用遺伝子マーカーを導入したgpt deltaトランスジェニックマウスとの交配体マウスを用いて無処理状態及びN-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) 2 g/kg・体重を腹腔内に単回投与し一週間後、肝臓でのgpt及びred/gam遺伝子における突然変異体頻度を調べる。
- 2) Parp-1の遺伝子発現への関与

について調べるために、Parp-1欠損ES細胞における遺伝子発現をGeneChip™を用いて網羅的に野生型細胞株と比較する。

- 3) Pargヘテロ欠損ES細胞を用いてParg欠損マウスを作出する。
- 4) Pargホモ欠損ES細胞におけるDNA損傷応答能を調べ、ポリ(ADP-リボース)の蓄積とapoptosisの過程を調べる。
- 5) Parp-1のがん細胞株及び腫瘍組織における遺伝子異常を調べ、遺伝子増幅やrearrangement等の遺伝子不安定性との相関を検討する。

(倫理面への配慮)

実験動物の使用に際しては、動物愛護上の配慮を十分に行なった。腫瘍組織における遺伝子発現異常及び遺伝子異常を調べる際は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い倫理面に配慮し、インフォームド・コンセントを得て行なった。

C. 研究結果

- 1) Parp-1欠損下での遺伝子の不安定性をin vivoで調べるために、昨年度までに、Parp-1欠損マウスと突然変異体検出用遺伝子マーカーを導入したgpt deltaトランスジェニックマウスとの交配体マウスを作成した。これを用いてBHP投与後の肝

臓での *gpt* 及び *red/gam* 遺伝子における突然変異体頻度を調べた。BHP 投与後の肝臓での点突然変異体頻度は *Parp-1^{+/+}* 及び *Parp-1^{-/-}* マウスの間で差違を認めなかった。一方、*Parp-1^{-/-}* マウスでは *red/gam* 遺伝子における欠失型の突然変異体頻度が *Parp-1^{+/+}* マウスより 1.6 倍上昇していた ($p < 0.05$)。 *Parp-1* 欠損下では、microhomology を介さない end-joining 型の修復により生じたと考えられる欠失型変異が増加していた。また、rearrangement を伴う欠失変異体は、*Parp-1^{+/+}* マウスでは認められなかったが、*Parp-1^{-/-}* マウスでは 4/29 (14%) に認められ、有意に増加していた ($p < 0.05$)。

2) *Parp-1* の遺伝子発現制御への関与を調べるために、*Parp-1* 欠損 ES 細胞株と野生型 ES 細胞株を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。12,488 個の遺伝子・EST のうち、*Parp-1^{-/-}* ES 細胞と野生型 ES 細胞の間で発現量に 3 倍以上差違の認められた遺伝子 ($p < 0.05$) は 128 個あり、このうち 103 個の遺伝子が *Parp-1^{-/-}* ES 細胞株において発現低下を示した。逆に 25 個の遺伝子が *Parp-1^{-/-}* ES 細胞株において発現の増加を示した。そのうち 3 個の遺伝子は trophoblast の分化に関わる遺伝子であった。マウス ES 細胞においては、*Parp-1* が直

接的あるいは間接的に特定の遺伝子群の発現調節に関与し、細胞分化の制御に関わることが示唆された。

3) ポリ (ADP-リボース) の主要な分解酵素であるポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (*Parg*) について、*Parg^{+/+}*、*Parg^{-/-}* ES 細胞株を樹立した。*Parg^{-/-}* ES 細胞株は、アルキル化剤 methylmethanesulfonate (MMS) やガンマ線照射に対する致死感受性が野生型細胞株よりも各々約 1.5 倍亢進することをコロニー形成法を用いて明らかにした。細胞内ポリ ADP-リボース含量を HPLC を用いて検討したところ、*Parg^{-/-}* ES 細胞株では、野生型細胞株に比較して無処理状態で 3 倍、0.3 mM MMS 処理 1 時間後には 40 倍に増加していた。0.3 mM MMS 処理後、ポリ ADP-リボシル化タンパク質の顕著な蓄積が認められた。*Parg^{-/-}* ES 細胞では、MMS 処理後、apoptotic 細胞の割合が野生株に比較して早くから増加しており、DNA の断片化も早期に認められた。

4) ヒト腫瘍における *PARP-1* 遺伝子異常を調べるため、*PARP-1* 遺伝子の 23 exon について PCR の primer set を設定し、遺伝子変異の検索を行った。サザンブロット法で *PARP-1* 遺伝子異常が検出された胃がん細胞株 MKN28 について解析した結果、*PARP-1* の auto-modification domain から触

媒 domain をコードする領域の配列の rearrangement を見い出した。また、胚細胞腫瘍組織 13 例の遺伝子変異の検索を行った。

D. 考察

1) Parp-1 欠損下で BHP 投与後、欠失型変異が上昇していたことから、Parp-1 が end-joining 型修復に関与し、Parp-1 欠損下では、microhomology を介した修復が抑制され、microhomology を介さない end-joining 型の修復を介して、欠失型変異が増加することが示唆された。Parp-1 の機能欠損下での *in vivo* における DNA 損傷修復は、Parp-2 等の他の Parp ファミリー分子によって十分には、補えないといえる。Parp-1 欠損下でのゲノム不安定性の増加が、BHP 投与後の、Parp-1 欠損マウスの発がん感受性の亢進に関連すると考えられる。ヒトの腫瘍における Parp-1 遺伝子異常について解析を更に進める予定である。

2) Parp-1 欠損下で、特定の遺伝子群の発現低下あるいは発現誘導が認められたことから、Parp-1 がポリ ADP-リボシル化を介して遺伝子発現の制御に関与することが示唆された。発がんの過程において、Parp-1 の機能異常による epigenetic な変化が起きることが予測されるためこの点につ

いて今後研究を進める。

3) DNA 損傷からの回復過程において、タンパク質のポリ ADP-リボシル化と共にポリ ADP-リボース分解の重要性が示唆された。Parg 欠損下では DNA 損傷後、ポリ ADP-リボースの蓄積により、早期に apoptosis 誘導が起きることが判った。ポリ ADP-リボースの蓄積が誘導する apoptosis の機序を明らかにしていくことで apoptosis の制御機構の解明に貢献できると考えられる。また、DNA を標的とする抗がん剤に Parg の阻害剤を併用することで、抗がん剤増感効果をもたらすことが予測されるため、この点について検討を行う。今後、作成した Parg 欠損マウスを用いて遺伝子安定性、DNA 損傷応答能、及び発がん感受性を野生型マウスと比較する。

E. 結論

本研究により、Parp-1 の欠損は、*in vivo* において DNA 損傷後に欠失型変異を誘導することがわかった。また、このことが発がん過程における遺伝子不安定化の誘発に関与する可能性を示した。また、Parp-1 がポリ ADP-リボシル化を介して遺伝子発現の制御に関与することが示唆された。Parg によるポリ (ADP-リボース) 分解が DNA 損傷後の apoptosis 誘導へ関与することが判った。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Cross J.C., Masutani M., *et al.* Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol. Cell Endocrinol.* 187, 207-212, 2002.
2. Ikejima, M., Masutani M. *et al.* Purification and characterization of poly(ADP-ribose) polymerase from *Sarcophaga peregrina*. *Proc. Jpn. Acad.*, 78, Ser. B, 282-285, 2002.
3. Masutani M., and Miwa, M. Poly(ADP-ribose) and cancer: In relation to the lectures presented by Dr. Gilbert de Murcia. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 32, 483-487, 2002.
4. Hemberger, M., Masutani M. *et al.* *Parp1*-deficiency induces differentiation of ES cells into trophoblast derivatives. *Dev. Biol.*, in press. 2003.
5. Hemberger, M., Masutani M. *et al.* Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells depending on depth of invasion. *Dev. Dyn.*, in press. 2003.
6. Shibata, A., Masutani M. *et al.* Improvement of the Spi assay for *gpt delta* mice by including magnesium ions during plaque formation. *Environ. Mol. Mutagen.*, in press. 2003.
1. Nozaki, T., Masutani M. *et al.* Hyperploidy in embryonic fibroblasts immortalized from *Parp-1* knockout mouse. American Association for Cancer Research 93rd Annual Meeting. San Francisco, 2002.
2. 益谷美都子、野崎中成ら、ポリ(ADP-リボース)代謝の生体内での役割. 第75回生化学会大会、京都、2002.
3. 柴田淳史、益谷美都子ら、*gpt delta/Parp-1* 欠損マウスにおける *N*-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) 投与後の突然変異. 第60回日本癌学会総会、東京、2002.
4. 藤原久子、益谷美都子ら、*Parp-1* 欠損マウスの肝臓における azoxymethane 投与後の異所性骨形成. 第60回日本癌学会総会、東京、2002.
5. 野崎中成、益谷美都子ら、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ活性欠損 ES 細胞株におけるアルキル化剤とガンマ線に対する感受性亢進. 第60回日本癌学会総会、東京、2002.
6. 柴田淳史、益谷美都子ら *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いた *Parp-1* 欠損マウスにおける突然変異の解析. 第46回日本薬学会関東支部大会、東京、2002.
7. 柴田淳史、益谷美都子ら、*gpt delta* マウスにおける変異検出系としての Spi-assay の改良. 第24回日本環境変異原学会、東京、2002.

2. 学会発表

8. 楠岡修、益谷美都子ら、Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1)ノックアウトマウスにみられた歯牙病変.
第 19 回日本毒性病理学会、東京、2003.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 益谷美都子ら、特開平 11-123704 号 ポリ(ADP-リボース)合成酵素活性欠損マウス胚性幹細胞.

2. 益谷美都子ら、特許願 2002-225190 号 肝臓における異所性骨及び／または骨髄の形成誘導方法.

3. 益谷美都子ら、特許願 2002-225937 号 ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ活性欠損胚性幹細胞株.