

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 輝彦

平成16 (2004) 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と総括		
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	-----	7
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	-----	10
3. 遺伝子安定性におけるポリ (ADP-リボース) 代謝の役割に關する研究		
益谷 美都子	-----	15
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	-----	20
III. 研究成果の刊行に關する一覽表	-----	23

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腫瘍ゲノム解析・情報研究部 部長

研究要旨 ①固形がんで高率に遺伝子増幅を示す17q12の共通増幅領域近傍からGSDMAを同定し、種々の解析から機能的がん抑制遺伝子であることを示した。また、GSDMファミリーを同定し、上皮の幹細胞及びその分化の制御と異常に深く関わっている重要な分子群であることを示唆した。②Brca2遺伝子欠失ニワトリB細胞株を作成し、相同DNA組換え機能の低下、ゲノム不安定性、シスプラチン高感受性、DNA損傷部位へのRad51重合の遅れ、点変異の蓄積を示した。エラーを起こしやすい損傷乗り越えDNAポリメラーゼ α とRad18の各欠損細胞は、シスプラチンに高感受性を示した。③プロモーター領域のCpG islandの欠失による遺伝子LIT1の機能消失は、周辺刷り込み遺伝子の発現異常を誘導させる。LIT1 non-coding RNA分子の関与によるクロマチン構造の変化が刷り込み領域における発現制御機構の中で重要な働きをしていることを示唆した。④Poly(ADP-ribose) glycohydrolase欠損(Parg^{-/-})ES細胞株におけるアルキル化剤処理後の致死感受性の増強には、apoptosisの早期誘導と亢進、及びpoly(ADP-ribosyl)化蛋白質の蓄積が関与することを示唆した。ヒトがんにおけるPARP-1遺伝子の発現低下及び点突然変異を見出した。⑤ヒト精巣腫瘍で高発現するHST-1/FGF-4遺伝子の機能を抑制するsiRNAをデザインした。このsiRNAはヌードマウスに移植された腫瘍のHST-1/FGF-4タンパク質の産生を激減させるとともに、精巣腫瘍や多臓器への転移を抑制した。

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ことで、がんの最も本質的な異常の理解に貢献し、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。具体的な研究項目とその目的は以下の通り。

①がんの代表的遺伝子増幅ユニット近傍のがん関連遺伝子及びそのparalogの同定と機能解析：ヒト固形がんで最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切断点は、しばしばホットスポットに集積する。その部分はゲノム脆弱性を示す構造と、機能的がん抑制遺伝子が存在する可能性が考えられる。胃がん・乳がん等で高頻度に増幅する17q12領域近傍から同定したがん抑制遺伝子候補gasdermin (GSDM) につい

て、そのparalogの同定と機能解析を行う。

②体細胞を用いたDNA修復経路、チェックポイント経路の解析：DNA修復経路・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するかを解明する。その知見を基に、放射線照射や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明らかにし、耐性の分子機構解明とその克服法の開発の基礎的情報を提供する。

③がん関連刷り込み遺伝子の発現制御機構の解析：刷り込み遺伝子の多くはクラスターを形成して存在し、共通の調節分子を利用して数100kb～数Mbの広範囲にわたる発現制御を受けている。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、ゲノムドメインレベルでの発現制御機構を解明する。

④遺伝子不安定性におけるpoly(ADP-ribose)代謝の役割：poly(ADP-ribose)の代謝はDNA修復、DNA組み換えや細胞死の誘導に関与すると考えられ

る。その合成酵素Parp-1と分解酵素Pargの、発がん及び遺伝子安定性における役割を明らかにする。また、ヒト腫瘍組織やがん細胞株におけるPARP-1の遺伝子異常を検索する。

⑤siRNAによるHST-1/FGF-4遺伝子の機能抑制：ヒト精巣腫瘍で高発現するHST-1/FGF-4の機能をsiRNAにより抑制し、これらの腫瘍におけるHST-1/FGF-4の意義を明らかにすると共に、新たな分子標的治療の可能性を検討する。

B. 研究の方法

①がんの代表的遺伝子増幅ユニット近傍のがん関連遺伝子及びそのparalogの同定と機能解析：GSDMAのcDNA発現アデノウィルスベクターを構築し、胃がん細胞株に導入、アポトーシス誘導能を解析した。遺伝子データベースのホモロジー検索、PCR cloning等によりGSDMAのファミリー遺伝子をヒト及びマウスについて探索した。同定した遺伝子について、食道粘膜及び食道がんにおける発現をRT-PCRで解析した。特に、食道粘膜については、レーザー微小切り出し法 (LCM) により、食道上皮幹細胞を含むと考えられる層と分化層を分画して解析した。

②体細胞を用いたDNA修復経路、チェックポイント経路の解析：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し、それら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制御機構の解明：11番染色体刷り込み領域の代表的遺伝子であり、KvLQT1遺伝子のアンチセンス転写物であるLIT1の発現をRT-PCR、(DNA-)FISH、RNA-FISH、RNA/DNA-FISHを組み合わせて解析した。KvLQT1のイントロン部分の配列で構成されたプローブによって検出されるシグナルがLIT1 RNA分子特異的なものであるかどうかは、親起源の明らかなヒト11番染色体を各々1本保持するシリアンハムスター細胞CHOを用いたRNA FISHにより確認した。

④遺伝子不安定性におけるpoly (ADP)ribose代謝の役割：Methylmethanesulfonate (MMS) とγ線照射後のParg^{-/-}ES細胞のDNA損傷応答能及び細胞死

の過程をフローサイトメトリー及びDNA ladder形成により測定し、野生型(Parg^{+/+})ES細胞と比較した。ヒト腫瘍細胞株及び腫瘍組織におけるParp-1遺伝子の発現及び異常をえん塩基配列解析により調べた。Parp-1の蛋白質レベルと細胞内polyADP-ribosylationレベルをwestern blot法を用いて調べた。

⑤siRNAによるHST-1/FGF-4遺伝子の機能抑制：HST-1/FGF-4に対するsiRNAを複数デザインし、HST-1/FGF-4発現に対する効果を検討した。また、精巣腫瘍細胞株ヌードマウス同所移植モデルにおいて、siRNA投与の抗腫瘍効果について解析した。

(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・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を可能な限り踏まえて研究を行った。また、動物の操作は、各施設の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がんの代表的遺伝子増幅ユニット近傍のがん関連遺伝子及びそのparalogの同定と機能解析：CMVプロモーターによりGSDMA遺伝子を発現するアデノウィルスベクターAdCMV-GSDMAをmoi=50でGSDMAの発現が抑制されている胃がんMKN28細胞に感染させたところ、TUNELアッセイにより顕著なアポトーシスが誘導された。GSDMA遺伝子上流の転写制御領域を解析したところ、LMO及びRunt結合配列があること、EMSAやsiRNAを用いた解析によりLMO1及びRUNX3がGSDMAプロモーター領域に結合して転写制御に関わっていることを見出した。GSDMAのparalogを少なくとも3種同定し、GSDMB、GSDMC、GSDMDと名付けた。そのうちのGSDMBは胃のneck-isthmus層、食道のbasal cell層に限局して発現し、GSDMCとGSDMDは細胞分裂層で発現していることを見出した。GSDMBは一部のがんで遺伝子増幅及び過剰発現を認めた。

②体細胞を用いたDNA修復経路、チェックポイント経路の解析：相同DNA組換えに直接的に関与する

と考えられるBrca2遺伝子を変異させたDT40細胞を作製した。BRC3モチーフからC末端までを完全に欠失させた変異細胞 (brca2tr細胞) を詳細に表現型解析したところ、マウスと同様の相同DNA組換え機能の低下、ゲノム不安定性、高いシスプラチン感受性、DNA損傷部位へのRad51 (大腸菌RecAホモログ) 重合の遅れなどの表現型が観察された。相同DNA組換え能は、抗体遺伝子の可変領域の多様性獲得機構を指標として解析したが、brca2tr細胞では、組換え頻度の顕著な減少とともに、抗体可変領域に特徴的に、多数の点変異が蓄積していることがわかった。同様の点変異の蓄積は、Rad51パラログ遺伝子欠損株でも観察された。

一方、細胞内に大量に発生する塩基損傷 (酸素ラジカル、シスプラチン、紫外線などによる) による複製停止を解除する為、損傷塩基を鋳型にして1-2塩基のみ合成できる特殊な、エラーを起こしやすい損傷乗り越えDNAポリメラーゼが複数知られている。それらを欠失させた細胞を作製したところ、ポリメラーゼxとRad18の各欠損細胞は、シスプラチンにきわめて高い感受性を示した。

③がん関連刷り込み遺伝子の発現制御機構の解明：刷り込み遺伝子LIT1は約50kb以上の転写物をコードしエキソン/イントロン構造を持たず明確なORFも認められない。このnoncoding RNA分子が関わる遺伝子発現制御機構を明らかにするため、LIT1の転写産物であるRNA分子の動的挙動をフォローするRNA FISH解析を行った。LIT1 RNAはヒト正常リンパ球由来細胞株、ヒト正常線維芽細胞において各々96%、98%と高頻度に間期核内で検出され、LIT1 DNA近傍に局在していた。さらに、Fiber RNA-FISH解析により、クロマチン上に集積するLIT1 RNAが観察された。

④遺伝子不安定性におけるpoly (ADP)ribose代謝の役割：Parg^{-/-} ES細胞株におけるアルキル化剤処理後の致死感受性の増強にはapoptosisの早期誘導と亢進、及びpolyADP-ribosyl化タンパク質の蓄積が関与することが示唆された。アルキル化剤MMS処理後のParg欠損下でのDNA損傷応答と細胞死亢進には、 γ 線照射の場合と異なり、p53リン酸化の増強が関連することが示唆された。ヒト大腸腫瘍株1/9株、白血病・リンパ腫株2/6株、肉腫株1/4株においてPARP-1遺伝子の発現低下を示した。ヒト胚細胞腫瘍及び細胞株計19例の解析から、PARP-1遺

伝子のM129T及びE251Kの点突然変異を見出した。E251Kは種間で保存されたアミノ酸残基の変化であり、体細胞変異の可能性が高い。E251Kのアミノ酸変化を有するNEC8細胞株では、2種のPARP-1モノクローナル抗体によりPARP-1蛋白質が検出されず、PARP-1活性も約半分に低下を示した。胚細胞腫瘍細胞株NEC15、Tera-2、及びE251K変異を有するNEC8株では、細胞内polyADP-ribosylationレベルの顕著な低下が認められた。

⑤siRNAによるHST-1/FGF-4遺伝子の機能抑制：siRNAは常法通りの方法で、候補4配列を合成し、HST-1/FGF-4を高発現するヒトembryonal cell carcinoma細胞株NEC8への影響を解析したところ、蛋白質レベルでHST-1/FGF-4の発現を80%抑制するsiRNAを見出した。このsiRNAのin vivo抗腫瘍効果をNEC8の同所移植モデルで検討したところ、精巣腫瘍のHST-1/FGF-4蛋白質は30%以下に低下し、精巣での腫瘍増殖の抑制と、遠隔臓器への転移を抑制した。

D. 考察

①がんの代表的遺伝子増幅ユニット近傍のがん関連遺伝子及びそのparalogの同定と機能解析：17q12共通増幅領域の外側から分離したGSDMA遺伝子は、強いアポトーシス誘導を起こす活性を持ち、変異マウスは、上皮の過形成を起こすことなどから消化管上皮の分化制御に関与する可能性が高い。GSDMAのプロモーター解析から、TGF- β の下流の転写因子によってその発現が制御されていることが示唆された。さらに少なくとも4つのファミリー遺伝子が同定され、幹細胞を含むと思われる層で発現が高く、がん細胞においてもがん遺伝子的に作動しているGSDMBなど、GSDMファミリーが各種上皮の分化とがん化で重要な役割を果たす可能性は高いと考えられた。

②体細胞を用いたDNA修復経路、チェックポイント経路の解析：Rad51パラログとBrca2は相同DNA組換えの同じ過程で機能すると考えられた。その仮説を検定する為に現在、brca2tr/xrcc3 2重欠損株を作製中である。また点変異蓄積には損傷乗り越えDNA合成が関与していると考えられるので、brca2tr細胞において損傷乗り越えDNAポリメラーゼ遺伝子をノックアウトする予定である。一般

に、DNA修復蛋白質は少ない発現量でもよく機能するので、siRNAによる抑制には限界がある。DNA修復欠損株は、医薬品がもつ作用機構解明や潜在の変異原性の検出に有効である。

③がん関連刷り込み遺伝子の発現制御機構の解明：Noncoding RNAとして機能を持つと推測されるLIT1遺伝子の周辺遺伝子制御機構の解明を目的とし、RNA-FISH法を用いLIT1 RNAの発現動態を解析した。その結果、LIT1 RNA分子は細胞周期を通して安定に核内のLIT1 DNA領域周辺にとどまっている可能性が示唆され、このことがインプリンティングセンターとしての役割担うための重要な現象と考えられた。Fiber RNA-FISHの結果LIT1 RNAのシグナルはクロマチンファイバーに沿った状態で検出された。これらのことより、Lit1 RNAは、X染色体のほぼ全域にわたってシスに結合することでX染色体の不活化を引き起こすXist RNAと同様の機構で、クロマチンの構造変化に伴うヘテロクロマチン化などを通してドメインレベルの遺伝子発現制御に関わっている可能性が示唆された。LITの発現異常が認められるがんにおいて、そのRNA分子の挙動を詳細に解析し発がんとの関わりを明らかにする必要がある。

④遺伝子不安定性におけるpoly(ADP)ribose代謝の役割：DNA傷害剤の種類によりParg欠損の細胞死亢進の機序は異なり、アルキル化剤の場合はapoptosisの早期誘導過程に、γ線照射の場合には、より遅延性の細胞死に影響を及ぼすことが考えられ、DNA損傷からの回復過程において、蛋白質のポリADP-リボシル化と共にポリ(ADP-リボース)分解の重要性が示された。また、Parg阻害剤が抗がん剤の増感剤となる可能性が示唆された。今後、Parg阻害剤の検索とその抗がん剤の増感剤としての基礎的検討が必要である。腫瘍細胞株においてPARP-1遺伝子発現低下を示す例、ヒト胚細胞腫瘍及び細胞株でPARP-1遺伝子のアミノ酸配列変化を伴う塩基変化の例が認められた。これらの塩基変化と発がんとの関連について調べていく必要がある。また、顕著な細胞内polyADP-ribosylationレベルの低下を示す胚細胞腫瘍細胞株では、PARP-1以外のポリ(ADP-リボース)代謝酵素が機能異常を来している可能性がある。

⑤siRNAによるHST-1/FGF-4遺伝子の機能抑制：HST-1/FGF-4は正常精巣で発現して造精機能の調節

に関わるほか、精巣腫瘍でも高率に高発現を示してオートクリンループを形成していると考えられる。本研究で認められたsiRNAの腫瘍形質抑制効果は、精巣腫瘍のがん形質発現においてHST-1/FGF-4信号伝達系が重要な働きをしており、治療の分子標的候補であること、siRNAの治療薬としての開発の可能性を示唆した。

E. 結論

17q12の共通増幅領域近傍からGSDMAを同定し、種々の解析から機能的がん抑制遺伝子であることを示した。また、GSDMファミリーは、上皮の幹細胞及びその分化の制御と異常に深く関わっている重要な分子経路要素であることが示唆され、新しい研究分野を拓いたと言える。相同組み換えと損傷乗り越えDNA合成とは、がん等の分裂細胞でゲノムの構造維持のために重要である。また、放射線やシスプラチンによるDNA損傷の修復にも中心的な役割を持ち、耐性克服の重要な標的である。LIT1 RNAは細胞周期を通して安定にLIT1 DNA周辺領域に局在し、RNAによるクロマチン構造の変化がドメインレベルの遺伝子発現制御に重要な役割を担っているものと考えられた。Poly(ADP-ribose)分解の主要酵素であるPargがDNA損傷後のapoptosis誘導へ関与することが判った。ヒト腫瘍細胞株でPARP-1の遺伝子異常、発現あるいは機能低下が認められ、がん化への関与が示唆された。ヒト精巣腫瘍においてHST-1/FGF-4は重要な分子経路であり、逆に分子標的治療の格好な目標となると期待される。また、効率の良いsiRNAにより、直接、このがん遺伝子発現を抑制し、がんをコントロールできる可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当するもの無し。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K,

- Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S, Sawada J. Three novel single nucleotide polymorphisms in UGT1A9. *Drug Metabol Pharmacokin*, 2003, 18(2):SNP6(146)-SNP9(149).
2. Jinno H, Saeki M, Saito Y, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Sai K, Kaniwa N, Ando M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S, Sawada J. Functional characterization of human UDP-glucuronosyltransferase 1A9 variant, D256N, found in Japanese cancer patients. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 306(2): 688-693.
3. Suzuki K, Ohnami S, Tanabe C, Sasaki H, Yasuda J, Katai H, Yoshimura K, Terada M, Perucho M, Yoshida T. The genomic damage estimated by arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting is useful for the prognosis of gastric cancer. *Gastroenterology*, 2003, 125: 1330-40.
4. Itoda M, Saito Y, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S, Sawada J. Eight novel single nucleotide polymorphisms in ABCG2/BCRP in Japanese cancer patients administered irinotecan. *Drug Metabol Pharmacokin*, 2003, 18(3):SNP14(212)-SNP19(217).
5. Tanabe C, Aoyagi K, Sakiyama T, Kohno T, Yanagitani N, Akimoto S, Sakamoto M, Sakamoto H, Yokota J, Ohki M, Terada M, Yoshida T, Sasaki H. Evaluation of a whole-genome amplification method based on adaptor-ligation PCR of randomly sheared genomic DNA. *Genes, Chrom & Cancer*, 2003, 38:168-176.
6. Suzuki K, Aoki K, Ohnami S, Yoshida K, Kazui T, Kato N, Inoue K, Kohara M, Yoshida T. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon α inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307:814-819.
7. Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, Aoki K, Suzuki K, Kanai Y, Haga K, Asaka M, Ramirez F, Yoshida T. Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Krüppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308:251-256.
8. Ohnami S, Aoki K, Yoshida K, Ohnami S, Hatanaka K, Suzuki K, Sasaki H, Yoshida T. Expression profiles of pancreatic cancer cell lines infected with antisense K-ras-expressing adenoviral vector. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309:798-803.
9. Hatanaka K, Ohnami S, Yoshida K, Miura Y, Aoyagi K, Sasaki H, Asaka M, Terada M, Yoshida T, Aoki K. A simple and efficient method for constructing an adenoviral cDNA expression library. *Mol Ther*. 2003;8(1):158-66.
10. Kim S-R, Nakamura T, Saito Y, Sai K, Nakajima T, Saito H, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Ozawa S, Sawada J. Twelve novel single nucleotide polymorphisms in the CES2 gene encoding human carboxylesterase 2 (hCE-2). *Drug Metabol Pharmacokin*, 2003, 18(5):327-332.
11. Sai K, Kaniwa N, Itoda M, Saito Y, Hasegawa R, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kitamura Y, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics*, 2003, 13:741-757.
12. Yoshimura K, Hanaoka T, Ohnami S, Kohno T, Liu Y, Yoshida T, Sakamoto H, Tsugane S. Allele frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 40 candidate genes for gene-environment studies on cancer: data from population-based Japanese random samples. *J Hum Genet*, 2003, 48:654-658.
13. Mori K, Aoyagi K, Ueda T, Danjoh I, Tsubosa Y, Yanagihara K, Matsuno Y, Sasako M, Sakamoto H, Mafune K, Kaminishi M, Yoshida T, Terada M, Sasaki H. Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer

cells in cytology negative peritonea washings. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4):913-917.

14. Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Katori N, Jinno H, Hasegawa R, Kaniwa N, Sawada J, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Kitamura Y, Kamatani N, Minami H, Ohtsu A, Shirao K, Yoshida T, Saijo N. UGT1A1 Haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese cancer patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, in press.

15. Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Watanabe H, Shiseki K, Saeki M, Nakamura T, Kurose K, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Hanai S, Nakajima T, Matsumoto K, Saito H, Goto Y, Kimura H, Katoh M, Sugai K, Minami N, Shirao K, Tamura T, Yamamoto N, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kitamura Y, Kamatani N, Ozawa S, and Sawada J. Haplotypes of CYP3A4 and Their Close Linkage With CYP3A5 Haplotypes in a Japanese Population. *Human Mutation*. Mutation in brief. #681 online 2004.

16. Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S, Sasaki H, Nomizu T, Konishi F, Fujita S, Moriya Y, Nagai H. Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004, 2:147-56.

17. 小杉真司、野水整、小原孝男、金子明博、吉田輝彦、執印太郎、大塚藤男、石川秀樹、富和清隆. 2003. 我が国における家族性腫瘍の遺伝子診断と遺伝カウンセリング. *家族性腫瘍*. 3(1):30-33.

18. 吉村公雄、吉田輝彦. 2003. Common disease-common variant仮説. *分子精神医学* 3(1):43-44.

19. 菅野康吉、吉田輝彦、和泉秀子、児玉哲朗. 2003. がんの遺伝子診療の現状—臨床の立場から

—. *医療* 57(6):390-394.

2) 学会発表

1. 吉田輝彦. 2003. 財団法人医療研修推進財団. 平成14年度専門(メディカルオンコロジー)指導医養成講習会④分子生物学(基礎と臨床の接点)国際研究交流会館3階.

2. 吉田輝彦、坂本裕美、吉村公雄、大浪澄子、下田忠和、片井均. 2003. 胃がんリスク要因のゲノムワイド解析. 第62回日本癌学会総会.

3. 菅野康吉、吉田輝彦、鈴木茂伸、金子明博、児玉哲郎. 2003. 網膜芽細胞腫の遺伝子診療. 第41回癌治療学会ワークショップ.

4. 吉田輝彦. 2003. 多因子遺伝病としての癌研究. 第41回癌治療学会ワークショップ.

5. 菅野康吉、吉田輝彦、和泉秀子、梅澤志乃、鈴木茂伸、金子明博. 2004. 網膜芽細胞腫の遺伝カウンセリング. 日本遺伝カウンセリング学会.

H. 知的所有権の取得状況

該当事項なし

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

分担研究者 武田 俊一 京都大学大学院医学研究科 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、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/シスプラチンなどで生じたDNA損傷の修復、の2点における役割分担を系統的に解析した。我々の解析結果は、(1)発がん機構の解明と、(2)より効果的な癌治療法プロトコルの作成とに貢献できる。

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放射線治療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もつ。一方、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。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つ。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。また遺伝子ノックインや抗体作製などによって新たな表現型アッセイ系を開発する。

（倫理面への配慮）

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遺伝子欠失細胞の解析

Brca2遺伝子は、家族性の乳癌と卵巣癌の原因になる腫瘍抑制遺伝子である。Brca2は、相同DNA組換え（以下にHRと略す）にたぶん直接的に関与する。Brca2遺伝子のエクソン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遺伝子のエクソン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、Brca2の機能解析に必ずしも適していない。

我々は、ニワトリBrca2遺伝子（論文：1）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。そのなかで、これまでにBRC3モチーフからC末端までを完全に欠失させた変異細胞（同様の変異マウスが存在、以下にbrca2tr細胞と記述）を詳細に表現型解析した。brca2tr細胞は、同様の変異マウス由来細胞と同じ表現型を示した。すなわちHR機能の低下、ゲノム不安定性、放

射線よりもシスプラチンの方により高い感受性、DNA損傷部位へのRad51（大腸菌RecAホモログ）重合の遅れなどの表現型が観察された。

我々は、HRにおけるBrca2の役割を解明する目的で、抗体遺伝子の可変領域のHRによる多様性獲得機構（Ig gene conversionと呼ぶ）について解析した。ヒトやマウスBリンパ細胞がV(D)J組換えで可変領域を多様性するのに対して、ニワトリBリンパ細胞は主にHRによって可変領域を多様性する。DT40細胞も培養中に可変領域を連続的に多様性するので、様々な遺伝子欠損がHRに与える影響をIg gene conversionを調べることによって詳細に解析できる。具体的には、Ig gene conversionを起こした後の、可変領域の塩基配列を決定して、組換え頻度のみならず、組換え領域の長さ、fidelity、組換えに伴う点変異を調べることができる（マウスの実験系では組換え頻度しかわからない）。

brca2tr細胞では、予想通り組換え頻度は大きく減少していた。興味深いことには、抗体可変領域に多数点変異が蓄積していることがわかった（定常領域には蓄積なし）。同様のパターンの点変異の蓄積は、Rad51パラログ遺伝子（Rad51B/C/D, XRCC2/3）欠損株でも観察され（論文：2）、これらの欠損株とbrca2tr細胞とはその表現型がきわめて似ていることがわかった。ゆえにRad51パラログとBrca2はHRの同じステップで機能すると考えられ、その仮説を検定する為に現在、brca2tr/xrcc3 2重欠損株を作製中である。また点変異蓄積には次に述べる損傷乗り越えDNA合成が関与していると考えられるので、brca2tr細胞で損傷乗り越えDNAポリメラーゼ遺伝子をノックアウトする予定である。

(2) 損傷乗り越えDNA合成の機能解析

細胞内に大量に発生する塩基損傷（酸素ラジカル、シスプラチン、紫外線などによる）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生物は、複製停止を解除する為、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。これらのポリメラーゼは、損傷乗り越えという柔軟性と引き換えにエラー（点変異）頻度が高い。最近5年間にヒトで少なくとも9種類のポリメラーゼが新たに発見された。我々は、ポリメラーゼのk（論文：3）、z（論文：5）、l、h、q

と損傷乗り越えの制御因子であるRad18（論文：4）をそれぞれ欠失させた細胞を作製・解析した。zとRad18の各欠損細胞は、シスプラチンにきわめて高い感受性を示した。

(3) タモキシフェンと女性ホルモンの変異原性

Tamoxifenは、estrogen受容体に拮抗剤として作用し、乳癌の治療に使われている。Tamoxifenとestrogenは、発がん作用があるが、それらの変異原性（tumor initiation）については未解明のままであった（estrogenのtumor promotion活性は有名）。我々は、損傷乗り越え欠損株では生理的濃度のestrogenや治療濃度のTamoxifen処理によって染色体断裂が誘導されることを解明した（論文：6）

D. 考察

DNA修復欠損株は、医薬品がもつ作用機構解明や潜在的変異原性の検出に有効である。DNA修復タンパクは少ない発現量でもよく機能しうるので、siRNA実験には限界があり、定量的なデータを得る為にヌル遺伝子欠損細胞が必須である。

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である。また、放射線やシスプラチン、タモキシフェン、女性ホルモンによるDNA損傷を修復する時も中心的な役割をもつ。

F. 健康危険情報

Estrogenの変異原性（C-3）

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Sonoda, E., Okada, T., Zhao, G. Y., Tateishi, S., Araki, K., Yamaizumi, M., Yagi, T., Verkaik, N. S., van Gent, D. C., Takata, T., and Takeda, S. (2003) Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of polz in maintaining genome stability in vertebrates. EMBO J. 22: 3188-97
2. Mizutani, A., Okadal, T., Shibutani, S., Sonodal, E., Hoheggerl, H., Nishigori, C., Miyachi, Y., Takeda, S., and Yamazoel, M.

(2004) Extensive chromosomal breaks are induced by tamoxifen and estrogen in DNA repair deficient cells., Cancer Research, rapid communication, in press.

H. 知的財産権の出願・登録
該当するものなし。

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

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

分担研究者 押村 光雄 鳥取大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 ヒト11p15.5領域のインプリントクラスター内に存在するnoncoding RNA LIT1が関わる発現制御機構の解析を通してクロマチドメインレベルにおける遺伝子発現制御機構を明らかにするために、Fluorescence in situ hybridization (FISH)法による可視化させたLIT1 RNA分子の細胞内発現動態の解析を試みた。LIT1 RNAはヒト正常リンパ球由来細胞株、ヒト正常線維芽細胞において各々96%、98%と高頻度に間期核内で検出され、LIT1 DNA近傍に局在していた。さらにFiber RNA-FISHにより、クロマチン上に集積するLIT1 RNAが観察された。一方、UBE3a遺伝子は65%、59%で間期核内にRNAシグナルが検出され、クロマチンファイバーに沿ったシグナルも認められなかった。これらのことより、LIT1 RNAは細胞周期を通して安定にLIT1 DNA周辺領域に局在し、noncoding RNAによるクロマチン構造の変化がドメインレベルの遺伝子発現制御に重要な役割を担っていることが示唆された。

A. 研究目的

哺乳類において、刷り込み現象の対象となる刷り込み遺伝子の多くはクラスターを形成して存在し、共通の調節分子を利用してドメインレベルで数百kb～数Mbの広範囲にわたる発現制御を受けている。これらの発現制御には、DNAおよびヒストンのメチル化や、アセチル化等、エピジェネティックなクロマチン構造の変化が深く関与している。本研究においては、遺伝子の発現異常と発がんと関連の全体像を明らかにするため、ドメインレベルでの発現制御機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 細胞培養

本研究においては、ヒト正常リンパ球由来培養細胞株 LCL FPC59、ヒト正常線維芽培養細胞株 NHF (Normal Human Fibroblast)、チャイニーズハムスター由来のヒト父方11番染色体を1本保持するCHO11P-8培養細胞株、また、そのLIT1遺伝子上流のプロモーター領域(CpGアイランド)を欠失させたCHO11P Δ CPG-10培養細胞株およびヒト母方11番染色体を1本保持するCHO11M-15培養細胞株を用いた。LCL FPC59およびNHF細胞は、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むDMAEM培地で行った。CHO11P-8、

CHO11P Δ CPG-10およびCHO11M-15の培養は10% FCS、3 μg/ml Blasticidin Sを含むF-12 培地で行った。各細胞は37℃、5% CO2条件下で培養した。

2) RT-PCRによるRNAの発現解析

Total RNAはmanufacturer's instructionに従いRNeasy column(Qiagen)を用いて回収し、RNase-free DNase I処理を行った。First strand cDNA合成はrandom d(N)6 primerおよびM-MLV Reverse Transcriptaseを用いて行った。RT-PCR反応はAmpliAq Goldを用い、以下に示すプライマーセットおよびプロトコールに従った。

LIT1-F 5'-GAGTTTAAACACGTGTGTG-3'

-R 5'-CAGCACAAGAGCTTTTTGA-3'

KvLQT1-F 5'-CGCGTCTCCATCTACAGCAC-3'

-R 5'-GACAGAGCTCCCCACAC-3'

UBE3a-F 5'-AGCTGCAAAGCATCTAATAG-3'

-R 5'-CTTTAAATCAATTCTAGCGC-3'

LIT1 RT-PCRはステップダウンPCRを用いてプロダクトの増幅を行った。はじめに、95℃、10分間

で初期変性を行った。その後95℃、30秒で変性、62℃、30秒でアニーリング、72℃、30秒で伸張反応を行った。この条件に従い3サイクルにつき2℃ずつ温度を下げ、合計9サイクルの反応を行った。続いて95℃、30秒で変性、56℃、30秒でアニーリング、72℃、30秒で伸張反応を行った(35サイクル)。最後に72℃、1分の最終伸張を行った。

KvLQT1 RT-PCRの変性、伸張反応条件は上記LIT1 RT-PCRと同一であり、アニーリング条件は67℃、30秒、3サイクル、65℃、30秒、3サイクル、63℃、30秒、3サイクル、61℃、30秒、35サイクルである。

UBE3a RT-PCRは95℃、10分間で初期変性を行った。続いて95℃、30秒で変性、55℃、30秒でアニーリング、72℃、45秒で伸張反応を行った(30サイクル)。また、最後に72℃、1分の最終伸張を行った。

得られた増幅断片は2% アガロースゲルにより泳動後、エチジウムブロマイドで染色を行った。

3) In Situ Hybridizationのための細胞調整

LIT1、UBE3a RNA-FISHは、細胞をポリ-L-リジンコーティングを行ったスライドグラス上に展開し、室温、10分間の静地により細胞をスライドグラス上に付着させた。スライドグラスをPBS(-)で軽く洗浄し細胞が付着していることを確認後、固定を行った。NHF、CHO11P-8、CHO11PΔCPG-10およびCHO11M-15は5×10⁴個をLab-Tek II Chamber slide(Nunc)で培養し、7~8割コンフルエントの状態をPBS(-)で2度洗浄し、固定後風乾させた。

4) Stretched DNA Fiberの調整

前日に培地交換を行ったLCL FPC59を遠心回収し、PBS(-)に浮遊させ3×10⁵個/mlの細胞密度に調整した。細胞浮遊液をスライドグラスの一端に滴下し風乾させた。溶解液を重層し、室温、5分間の静地で核タンパク質を可溶化した。その後スライドグラスを傾斜させ、溶解液をスライドグラス上に展開し、傾斜させたまま20分間風乾させた。風乾後固定を行った。

5) FISH法

DNA-FISHプローブはニックトランスレーションキットを用いてジゴキシゲニン-16-dUTPで標識を行った。得られた標識プローブをホルムアミドに溶解し、75℃、10分間で変性させた。作成した細胞調整標本は70%ホルムアミド/2×SSCで70℃、2分間変性させた後、即座に冷70%エタノールに浸した。90%、100%エタノールシリーズを通し、風乾させたものを以後のハイブリダイゼーションに用いた。また、ヒトプラセンタDNAを加え、ゲノミックプローブ中に含まれる反復配列に由来する非特異的なシグナルの抑制を行った。

37℃、湿箱中で一晩ハイブリダイゼーションを行った後、50%ホルムアミド/2×SSC、37℃、10分間で洗浄を行った。2×SSC、1×SSC、4×SSCでそれぞれ洗浄した後、ヒツジ由来抗ジゴキシゲニンIgG-ローダミンを37℃、1時間ハイブリダイズさせることで検出を行った。

細胞核の対比染色はPI(500 ng/ml)またはDAPI(250 ng/ml)により行った。

6) RNA-FISH

プローブの作製、ハイブリダイゼーションとその検出法は基本的にDNA-FISHと同様である。ただし、すべての試薬はRNaseフリーで調整を行い、染色体標本の変性は行わない。また、プローブはビオチン-11-dUTPで標識し、以下のような手順でシグナルを増幅させて検出を行った。37℃、湿箱中で一晩ハイブリダイゼーションを行った後、50%ホルムアミド/2×SSC、37℃、10分間で洗浄を行った。続いて2×SSC、1×SSC、4×SSCで洗浄を行い、アビジン-FITCを37℃、1時間ハイブリダイズさせた。2×SSC、0.05% Triton-X/2×SSC、2×SSCで洗浄し、ビオチン化-抗アビジンを37℃、1時間ハイブリダイズさせた。再び2×SSC、0.05% Triton-X/2×SSC、2×SSCで洗浄し、最終的にアビジン-FITCを37℃、1時間ハイブリダイズさせてシグナルの増幅、検出を行った。ハイブリダイゼーションの前にRNase A(Qiagen)処理(100 μg/ml、37℃、1時間)を行ったスライドをコントロールとして用いた。

7) RNA/DNA-FISH

RNA-FISHを行ったスライドをミリQ水に浸し、水中でカバーガラスを外した。バックグラウンドの除去を目的としたRNase A処理を行い、重ねてDNA-FISHを行った。

得られたシグナルは蛍光顕微鏡(Nikon ECLIPSE 800)を用いて×1000で観察を行った。

C. 研究結果

プロモーター領域のCpGアイランドの欠失による刷り込み遺伝子LIT1の機能消失は、周辺刷り込み遺伝子の発現異常を誘導させた。このことより、LIT1は、クラスター内の遺伝子発現をシスに制御する刷り込みセンター(IC)として重要な機能をもつことが示唆された。しかし、この刷り込み遺伝子は、約50kb以上の転写物をコードしエキソン/イントロン構造を持たず明確なORFも認められないことから、RNAとして機能していると考えられるが、全くその働きは明らかにされていない。本年度においては、このnoncoding RNA分子が関わる遺伝子発現制御機構を明らかにするため、可視化させてLIT1の転写産物であるRNA分子の動的挙動をフォローする解析アプローチとしてRNA FISH 解析を試みた。

父性発現を呈するLIT1は、KvLQT1遺伝子の antisense transcriptであることからKvLQT1 のイントロン部分の配列で構成されたプローブによって検出されるシグナルがLIT1 RNA分子特異的なものであるかどうかを確認するため、親起源の明らかヒト11番染色体を各々1本保持するシリアンハムスター細胞CHOを用いてRNA FISH を行った。RNA FISHシグナルは、KvLQT1の発現を示さず、LIT1が発現している父親由来の染色体を保持するCHO細胞のみに観察された。このことより、検出されたシグナルはLIT1のRNA分子であることが立証された。また、LIT1 RNAはヒト正常リンパ球由来細胞株、ヒト正常線維芽細胞において各々96%、98%と高頻度に間期核内で検出され、LIT1 DNA近傍に局在していた。さらに、Fiber RNA-FISH解析により、クロマチン上に集積するLIT1 RNAが観察された。一方、E6-APユビキチンタンパク質リガーゼをコード

しているUBE3a遺伝子は65%、59%で間期核内にRNAシグナルが検出され、クロマチンファイバーに沿ったシグナルも認められなかった。これらのことより、LIT1 RNAは細胞周期を通して安定にLIT1 DNA周辺領域に局在し、刷り込み領域における発現制御機構の中でRNA分子の関与によるクロマチン構造の変化が重要な働きをしている可能性が示唆された。

D. 考察

noncoding RNAとして機能を持つと推測されるLIT1遺伝子の周辺遺伝子制御機構の解明を目的とし、RNA-FISH法を用いLIT1 RNAの発現動態を解析した。その結果、LIT1 RNA分子は細胞周期を通して安定に核内のLIT1 DNA領域周辺にとどまっている可能性が示唆された。

RNA-FISHにより検出したLIT1 RNAは、プローブとして2本鎖ゲノミックDNAを用いたためアンチセンスのKvLQT1遺伝子産物も検出する可能性が考えられた。しかし、(1)RT-PCRでLIT1 RNAの発現が確認されなかった細胞株(CHO11pΔCPG-10、CHO11M-15細胞株)においてRNAシグナルは観察されなかった。(2)RNA-FISHは染色体DNAに変性操作を加えない。(3)プローブがKvLQT1のイントロン部分にあたる。これらのことよりU90095プローブはLIT1 RNAを特異的に検出していると考えられた。また、タンパク質に翻訳される刷り込み遺伝子UBE3aのRNA-FISHを行い、LIT1 RNA-FISHによって得られるシグナルとの比較を行った。その結果、どちらの核においてもDNA領域周辺にRNAシグナルが観察された。しかし、シグナルが観察される間期核の割合が大きく異なっていた。これらの結果より、タンパク質に翻訳される刷り込み遺伝子とは明らかに異なるLIT1 RNAの特性が示唆され、LIT1 RNAが染色体上に集積し細胞周期を通じて安定に維持されていることがインプリンティングセンターとしての役割担うための重要な現象と考えられた。

現在、noncoding RNAとしてその働きが明らかになっている分子の一つにXist RNAがあげられる。Xist RNAは、ほ乳類における遺伝子量補正機構として知られるX染色体不活化に関わり、不活化されるX染色体から特異的に転写される。また、転写産物であるRNA分子がそのX染色体のほぼ全域にわ

たつてシスに結合する結果、160 MbにわたるX染色体のほぼ全長にわたつて遺伝子の不活化を引き起こす。興味深いことに、Fiber RNA-FISHの結果LIT1 RNAのシグナルはクロマチンファイバーに沿った状態で検出された。これらのことより、Lit1 RNAはXist RNA同様に機能をもつRNAとしてクロマチンの構造変化に伴うヘテロクロマチン化などを通してドメインレベルの遺伝子発現制御に関わっている可能性が示唆された。

今後は、LITの発現異常が認められるがんにおいて、そのRNA分子の挙動を詳細に解析し発がんとの関わりを明らかにする。さらに、LIT1 RNA分子がクロマチンのどの領域まで広がり集積しているかを明らかにし、ヘテロクロマチン化に関与している分子との相互関係などを把握することにより、noncoding RNAの遺伝子発現制御機構の解明を目指す。

E. 結論

LIT1 RNAは細胞周期を通して安定にLIT1 DNA周辺領域に局在し、RNAによるクロマチン構造の変化がドメインレベルの遺伝子発現制御に重要な役割を担っていることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Soejima, H., Nakagawachi, T., Wei Z., Urano, T., Matsuoka, S., Higashimoto, K., Kitajima, Y., Takeuchi, M., Nakayama, M., Oshimura, M., Miyazaki, K., Joh, K., Mukai, T.: Silencing of imprinted p57KIP2 gene expression is associated with loss of histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in esophageal cancer. *Oncogene*, in press.

2. Maegawa, S., Itaba, N., Otsuka, S., Kamitani, H., Watanabe, T., Tahimic, CGT.,

Nanba, E., Oshimura, M.: Coordinate downregulation of a novel imprinted transcript ITUP1 with PEG3 in glioma cell lines. *DNA Research*, in press.

3. Higashimoto, K., Urano, T., Sugiura, K., Yatsuki, H., Joh, K., Zhao, W., Iwakawa, M., Ohashi, H., Oshimura, M., Niikawa, N., Mukai, T., Soejima, H.: Loss of CpG methylation is strongly correlated with loss of histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet.*, 73:948-956, 2003.

4. Yuan, J., Luo, RZ., Fujii, S., Wang, L., Hu, W., Andreeff, M., Pan, Y., Kadota, M., Oshimura, M., Sahin, AA., Issa, JP., Bast, RC Jr., Yu, Y.: Aberrant methylation and silencing of ARHI, an imprinted tumor suppressor gene in which the function is lost in breast cancers. *Cancer Res.*, 63:4174-4180, 2003.

5. Fujii, S., Luo, RZ., Yuan, J., Kadota, M., Oshimura, M., Dent, SR., Kondo, Y., Issa, JP., Bast, RC Jr., Yu, Y.: Reactivation of the silenced and imprinted alleles of ARHI is associated with increased histone H3 acetylation and decreased histone H3 lysine 9 methylation. *Hum Mol Genet.*, 12:1791-1800, 2003.

6. Okita, C., Meguro, M., Hoshiya, H., Haruta, M., Sakamoto, YK., Oshimura, M.: A new imprinted cluster on the human chromosome 7q21-q31, identified by human-mouse monochromosomal hybrids. *Genomics*, 81:556-559, 2003.

2) 学会発表

1. 押村光雄「ゲノム刷り込み異常と癌」日本癌学会第62回総会（名古屋市）2003年9月25日（木）～27日（土）

2. 副島英伸、浦野健、松倉史朗、中川内哲治、北島吉彦、押村光雄、古川鋼一、宮崎耕治、向井常博「食道癌におけるp57 KIP2のエピジェネティク

ク調節機構」日本癌学会第62回総会（名古屋市）

2003年9月25日（木）～27日（土）

3. 前川真治、白石昌彦、押村光雄「ヒトグリオーマ発生への関与が疑われる新規インプリンティング遺伝子の同定」日本癌学会第62回総会（名古屋市）2003年9月25日（木）～27日（土）

4. 押村光雄「エピジェネティックと疾患の関わり」日本人類遺伝学会第48回大会（長崎市）2003年10月21日（火）～24日（金）

5. 大塚晋、前川真治、鷺野伸恵、板場則子、白石昌彦、押村光雄、難波栄二「DMRを指標としたヒト新規インプリンティングドメインの検索」日本人類遺伝学会第48回大会（長崎市）2003年10月21日（火）～24日（金）

6. 木村元思、香月康宏、沖田千芽、星谷英寿、甲斐義輝、阿部智志、押村光雄「新規刷り込み遺伝子DLX5の同定とマウスホモログの刷り込み解析」日本人類遺伝学会第48回大会（長崎市）2003年10月21日（火）～24日（金）

7. 中野聖児、目黒牧子、豊田実、副島英伸、向井常博、浦野健、押村光雄「大腸癌におけるゲノム刷り込み遺伝子LIT1の発現異常」日本人類遺伝学会第48回大会（長崎市）2003年10月21日（火）～24日（金）

8. 東元健、副島英伸、趙衛、大橋博文、岩川眞由美、八木ひとみ、城圭一郎、押村光雄、新川詔夫、向井常博「Beckwith-Wiedemann症候群患者におけるDMR-LIT1のCpG脱メチル化はヒストンH3リジン9脱メチル化に強く関与する」日本人類遺伝学会第48回大会（長崎市）2003年10月21日（火）～24日（金）

9. 副島英伸、中川内哲治、趙衛、東元健、松倉史朗、押村光雄、宮崎耕治、城圭一郎、向井常博「食道癌のp57 KIP2発現減少はインプリンティング調節領域DMR-LIT1のヒストンH3リジン9脱メチル化に関与する」日本人類遺伝学会第48回大会（長崎市）2003年10月21日（火）～24日（金）

10. 堀直裕、中野博、河野香織、押村光雄、佐藤建三「マウスH19およびIgf2のインプリント制御領域内を脱メチル化するシス配列」第26回日本分子生物学会（神戸市）2003年12月10日（水）～13日（土）

（土）

11. 東元健、趙衛、八木ひとみ、北島吉彦、押村光雄、新川詔夫、城圭一郎、向井常博、副島英伸「KIP2/LIT1サブドメインの刷り込み制御機構と疾患」第26回日本分子生物学会（神戸市）2003年12月10日（水）～13日（土）

12. 坂元裕樹、春田雅之、押村光雄「DT40細胞を用いたヒト15q11-q13刷り込みドメインにおけるPWS ICの同定と機能解析」第26回日本分子生物学会（神戸市）2003年12月10日（水）～13日（土）

13. 板場則子、鷺野伸恵、大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、押村光雄「アレル特異的メチル化を指標としたヒト新規インプリンティングドメインの検索：2番および5番染色体の解析」第26回日本分子生物学会（神戸市）2003年12月10日（水）～13日（土）

14. 鷺野伸恵、板場則子、大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、押村光雄「アレル特異的メチル化を指標としたヒト新規インプリンティングドメインの検索：22番染色体の解析」第26回日本分子生物学会（神戸市）2003年12月10日（水）～13日（土）

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

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

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 室長

研究要旨 Parp-1^{-/-}マウスにおいてアルキル化剤処理後、欠失及び挿入変異頻度が上昇していた。特に挿入/rearrangementを伴う欠失変異頻度が上昇していたことからParp-1は non-homologous end-joining repairにおいて、挿入/rearrangementを抑制していることが示唆された。またParp-1^{-/-}マウス不死化線維芽細胞において中心体増加と共に染色体倍加が観察され、がん化過程で認められる染色体倍加との関連が示唆された。

ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ欠損(Parg^{-/-})ES細胞株におけるアルキル化剤処理後の致死感受性の増強には、apoptosisの早期誘導と亢進、及びpolyADP-ribosyl化タンパク質の蓄積が関与することが示唆された。Parg欠損下ではアルキル化剤及びガンマ線照射後の致死感受性が増強し、Parg阻害剤が抗がん剤の増感剤となる可能性を見出した。

ヒト大腸腫瘍株1/9株、白血病・リンパ腫株2/6株、肉腫株1/4株がPARP-1遺伝子の発現低下を示した。また、ヒト胚細胞腫瘍16例及び胚細胞腫瘍細胞株9株におけるPARP-1遺伝子の多型及び突然変異を解析した結果、既知の3か所の一塩基多型(SNP)の他に、アミノ酸残基129番目のMetからThrへの置換(M129T)及び251番目のGluからLysの置換(E251K)を伴う塩基変化が新たに認められた。特にE251Kは種間で保存されたE251の変化であり、体細胞変異の可能性が高い。胚細胞腫瘍細胞株NEC15、Tera-2、及びE251K変異を有するNEC8株では、細胞内polyADP-ribosylation活性の顕著な低下が認められた。

A. 研究目的

DNA損傷後に核内Parp-1は活性化され、NADを基質としたポリ(ADP-リボース)合成が起きる。Parp-1はDNA修復、DNA組み換えに関与することが示唆されている。また、Parp-1はNADの枯渇を介したAIF (apoptosis-inducing factor)依存性のアポトーシスをはじめとする細胞死を誘導する。ポリ(ADP-リボース)はDNA損傷後、一過性に存在し、PargによりADP-リボースへと分解される。本研究においては、Parp-1とPargの、発がん及び遺伝子安定性における役割を明らかにする。また、ヒト腫瘍組織やがん細胞株におけるPARP-1の遺伝子異常を検索する。これによりポリ(ADP-リボース)代謝の異常が発がん過程にどのように関与するかについて明らかになれば、がん発生機構の理解につながり、がんの予防を考える上で、有用な基礎的資料となると考えられる。また、DNA損傷応答へのポリ(ADP-リボース)代謝の関与を明らかにすることでDNA損傷を作用点とする抗がん剤の作用機序の解明

に寄与できると期待される。

B. 研究方法

1) 昨年度、Parp-1欠損マウスにおいて発がん剤 N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) 2 g/kg体重投与後に検出した遺伝子変異のスペクトラムを詳細に解析した。また、欠失変異体における欠失領域の境界における塩基配列の構造上の特徴を調べる。

2) Parp-1の染色体倍加抑制への関与を調べるために、中心体数をg-tubulinに対するポリクローナル抗体を用いた蛍光免疫染色法により測定した。各不死化胚性線維芽細胞を2回にわたってクローン化した後、倍数性の変化と中心体数の測定を行った。また、Parg^{-/-}ES細胞における姉妹染色分体交換(SCE)頻度と中心体数の変化についても計測した。

3) Methylmethanesulfonate (MMS) と γ 線照射後の Parg^{-/-}ES細胞のDNA損傷応答能及び細胞死の過程をフローサイトメトリー及びDNA ladder形成により測定し、野生型(Parg^{+/+})ES細胞と比較した。CaspaseによるPARP-1の切断及びp53のリン酸化状態等の変化は、western blot法により経時的に調べた。

4) ヒト腫瘍細胞株及び腫瘍組織におけるParp-1遺伝子の発現及び異常をシーケンス法により調べた。Parp-1のタンパク質レベルと細胞内polyADP-ribosylation レベルをwestern blot法を用いて調べた。

(倫理面への配慮)

実験動物の使用に際しては、国立がんセンターにおける「動物実験に関する指針」を遵守し、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^{-/-}マウスにおいてアルキル化剤BHP処理後、欠失及び挿入変異頻度が上昇していた。特にParp-1^{-/-}マウスにおいて1 kb以上の欠失変異の変異は、2.3倍(p<0.05)、挿入変異は6.5倍、野生型マウスより上昇が認められた。大部分の挿入変異は、A/Tの挿入であった。欠失変異の分布は、Parp-1^{-/-}マウスでは、野生型マウスに比較して広いスペクトラムを示した。また、Parp-1^{-/-}マウスでは、recombination/rearrangementを伴う欠失変異頻度が上昇していた。これらの変異は、欠失境界にmicrohomologyを有さない場合が多かった。

2) 初代培養Parp-1^{-/-}線維芽細胞は顕著な染色体数倍加と中心体数増加を示さなかった。Parp-1^{-/-}不死化線維芽細胞においては、染色体倍加と共に中心体増加が認められた。2回クローン化を行った複数のParp-1^{-/-}細胞株においてendoreduplicationを示すパターンは観察されなかった。Parp-1^{-/-}細胞株では、染色体倍加亢進と

中心体数増加との間に相関がみられた。また、Parp-1^{-/-}細胞株ではノコダゾール処理後、多倍体細胞の出現頻度が高い傾向を示した。一方、Parp-1^{-/-}ES細胞株及びParg^{-/-}ES細胞株において中心体数増加は、認められなかった。Parg^{-/-}ES細胞株においてSCEの増加は、無処理及びMMS処理後も認められなかった。

3) Parg^{-/-}ES細胞株におけるアルキル化剤処理後の致死感受性の増強には、apoptosisの早期誘導と亢進、及びpolyADP-ribosyl化タンパク質の蓄積が関与することが示唆された。一方、 γ 線5 Gy照射後24時間以内に起こるapoptosisの過程は両genotype間で差は認められなかった。p53のser15のリン酸化はParg^{+/+}及びParg^{+/-}細胞では0.3 mM MMS処理5時間後から認められたが、Parg^{-/-}ES細胞では1時間後から検出され、処理5時間後Parg^{+/+}及びParg^{+/-}細胞に比較して亢進していた。 γ 線5 Gy照射後のp53のser15のリン酸化は、Parg^{+/+}、Parg^{+/-}、及びParg^{-/-}ES細胞において照射一時間後から認められ差はなかった。従ってアルキル化剤MMS処理後のParg欠損下でのDNA損傷応答と細胞死亢進には、 γ 線照射の場合と異なり、p53リン酸化の増強が関与することが示唆された。

4) ヒト大腸腫瘍株1/9株、白血病・リンパ腫株2/6株、肉腫株1/4株がPARP-1遺伝子の発現低下を示した。また、ヒト胚細胞腫瘍16例及び胚細胞腫瘍細胞株3株におけるPARP-1遺伝子の多型及び突然変異の解析結果、3か所の既知の一塩基多型(SNP)が検出された。この他に、アミノ酸残基129番目のMetからThrへの置換(M129T)及び251番目のGluからLysの置換(E251K)を伴う塩基変化が新たに認められた。特にE251Kは種間で保存されたE251の変化であり、体細胞変異の可能性が高い。E251Kのアミノ酸変化を有するNEC8細胞株では、2種のPARP-1モノクローナル抗体によりPARP-1タンパク質が全く検出されなかった。PARP-1活性は約半分以下を示した。これらのモノクローナル抗体のepitope領域の構造変化が考えられる。胚細胞腫瘍細胞株NEC15、Tera-2、及びE251K変異を有するNEC8株では、細胞内polyADP-ribosylationレベルの顕著な低下が認められた。

D. 考察

Parp-1欠損マウスにおいてアルキル化剤BHP投与後、欠失型及び挿入型変異頻度が上昇していた。BHPにより生じるDNA傷害は、base excision repair (BER)により修復されると考えられるがParp-1欠損下では、BERの遅滞が起こり、二本鎖DNA切断に移行し、非相対的end-joining型修復 (NHEJ)を介して欠失型及び挿入型変異頻度が上昇する可能性が考えられる。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NHEJ型修復を介して、欠失型変異が増加することが示唆された。また、Parp-1欠損下ではrecombination/rearrangementを伴う欠失変異が増加しており、NHEJ型修復から相同組み換え型修復への移行率が上昇していた。従って、Parp-1は、二本鎖DNA切断時にHR抑制的に機能すると考えられる。Parp-1欠損下でのこのような特徴的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。

Parp-1欠損不死化線維芽細胞では、染色体倍加と相関した中心体数増加が認められた。Parp-1欠損ES細胞及び初代培養Parp-1欠損線維芽細胞は顕著な染色体数倍加と中心体数増加を示さなかったことから、Parp-1欠損下では、不死化過程で中心体数増加を伴う染色体数倍加が起こりやすいことが示唆される。

Parg欠損下ではアルキル化剤MMS処理後、ポリ (ADP-リボース)の蓄積を伴い、早期にapoptosis誘導が起きる。この細胞死の過程はp53の活性化を介するが、主にcaspase非依存性であることが示唆された。一方、g線照射後の細胞死もParg欠損下で増加するが、この過程はp53の活性化を介し、かつcaspase依存性であった。g線照射後のParg欠損ES細胞におけるポリ (ADP-リボース)の蓄積は、MMS処理の場合より早く消失した。従って、DNA傷害剤の種類によりParg欠損の細胞死亢進の機序は異なり、アルキル化剤の場合はapoptosisの早期誘導過程に、g線照射の場合には、より遅延性の細胞死に影響を及ぼすことが考えられる。

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)分解の重要性が示された。また、Parg阻害剤が抗

がん剤の増強剤となる可能性が示唆された。今後、Parg阻害剤の検索とその抗がん剤の増感剤としての基礎的検討が必要である。

腫瘍細胞株においてPARP-1遺伝子発現低下を示す例が認められた。また、ヒト胚細胞腫瘍及び胚細胞腫瘍細胞株でアミノ酸配列変化を伴う変異の可能性のあるPARP-1遺伝子の塩基変化が2例認められた。これらの塩基変化と胚腫瘍発生との関連について調べる必要がある。また、顕著な細胞内polyADP-ribosylationレベルの低下を示す胚細胞腫瘍細胞株3株を見出した。これらの株では、PARP-1以外のポリ (ADP-リボース)代謝酵素が機能異常を来している可能性がある。今後、PARP-1を含む他のPARPファミリー分子及び他のポリ (ADP-リボース)代謝酵素の機能、及び遺伝子異常をヒト腫瘍において調べることで、がん化とポリ (ADP-リボース)代謝との関連が更に明らかになると考えられる。

E. 結論

本研究により、Parp-1の機能欠損は、*in vivo*において欠失型及び挿入型変異を誘導することが明らかになった。また、不死化の過程で中心体数異常を伴う染色体倍加が起きやすいことを見出した。これらの遺伝子不安定性を通じてParp-1の機能欠損は、がん発生過程に関与する可能性が考えられる。実際に、ヒト腫瘍細胞株でPARP-1の遺伝子異常、発現あるいは機能低下が認められ、がん化への関与が示唆された。また、ポリ (ADP-リボース)分解の主要酵素であるParg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. Nozaki, T., Masutani, M., et al. :
Parp-1 deficiency implicated in colon and

liver tumorigenesis induced by azoxymethane. *Cancer Science*, 94:497-500, 2003.

2. El-Khamisy S.F., Masutani M., et al. : A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 31: 5526-5533, 2003.

3. Masutani M., et al. : Poly(ADP-ribose) and carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 38: 339-348, 2003.

4. Watanabe F., Masutani M., et al. : Impairment in S-phase entry of splenocytes of Parp-1 knockout mice. *Proc. Jpn. Acad.*, 79, Ser. B:248-251, 2003.

5. Gunji A., Masutani M., et al. : Lack of altered frequency of sister-chromatid exchanges in poly(ADP-ribose) glycohydrolase-deficient mouse ES cells treated with methylmethanesulfonate. *Proc. Jpn. Acad.*, 79, Ser. B:305-307, 2003.

6. Shibata A., Masutani M., et al. : Efficient method for mapping and characterizing structures of deletion mutations in gpt delta mice using Southern blot analysis with oligo DNA probes. *Environ. Mol. Mutagen.* 2004, in press.

7. Masutani M., et al. : Poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene in human tumor cell lines: its expression and structural alteration. *Proc. Japan Acad.* 2004;Ser. B:in press.

2) 学会発表

1. Masutani, M. et al. Functional studies of poly(ADP-ribose) metabolism by gene-targeting in mice. 第76回生化学会大会、横浜、2003.

2. Yoshida T., Masutani M., et al., Analysis of poly(ADP-ribose) metabolism in poly(ADP-ribose) glycohydrolase-deficient mouse ES cell lines using a new quantification method of poly(ADP-ribose). 第76回生化学会大会、横

浜、2003.

3. Fujihara H., Masutani M., et al., Time-course study of heterotopic ossification in the liver of Parp-1^{-/-} mice after azoxymethane treatment. 第76回生化学会大会、横浜、2003.

4. Ogino H., Masutani M., et al., Gene expression profiling in the liver during the process of heterotopic ossification in Parp-1 knockout mice after azoxymethane administration. 第76回生化学会大会、横浜、2003.

5. 松尾英晃、益谷美都子ら、放射光X線分光顕微鏡による個別HeLa細胞の分析. X線分析討論会 兵庫、2003.

6. 益谷美都子ら、Parp-1欠損マウスにおける発がん感受性及びin vivo 突然変異の解析. 発がん病理研究会、高山、2003.

7. 柴田淳史、益谷美都子ら、Parp-1欠損マウスにおけるin vivo 突然変異の解析. 第61回日本癌学会総会、名古屋、2003.

8. 郡司明美、益谷美都子ら、Parg欠損ES細胞株におけるmethylmethanesulfonate処理後のapoptosisの早期誘導と亢進. 第61回日本癌学会総会、名古屋、2003.

9. Shibata A., Masutani M., et al., Involvement of Parp-1 in the suppression of deletion mutation accompanying insertion/rearrangement after treatment with an alkylating agent in vivo. The 4th International Symposium on DNA Replication, Recombination, and Repair. Hyogo, 2003.

10. 郡司明美、益谷美都子ら、Parg欠損ES細胞株におけるmethylmethanesulfonate処理後のp53のser15のリン酸化亢進. 第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003.

11. 菅生紀之、益谷美都子ら、DNA polymerase b欠損マウスにおける神経細胞死へのpoly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)の関与 第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003.

12. 渡邊文晶、益谷美都子ら、DNA損傷応答におけ