

るpoly(ADP-リボース)合成酵素-1によるATMのキナーゼ活性制御第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003.

13. Kusuoka O. Masutani M., et al., Spontaneous development of maxillary incisor lesions in aged poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) knockout mice. 第20回日本毒性病理学会/第5回国際毒性病理学会合同国際会議、神戸、2004.

14. Masutani, M. et al. Involvement of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in recovery from DNA damage and modulation of apoptosis. American Association for Cancer Research 95th Annual Meeting. Orlando, 2004.

15. 塩川素子、益谷美都子ら、胚細胞腫瘍におけるpoly(ADP-ribose) polymerase-1の遺伝子異常の解析. 日本産婦人科学会第56回学術講演会、2004.

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11-123074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、国内優先権主張特許 特願2003-285257号 ポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ活性欠損胚性幹細胞株.

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 落谷 孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室 室長

研究要旨 発がん・がん転移に関係する遺伝子群、特に増殖因子や細胞周期調節遺伝子に焦点を絞り、マウス個体レベルでの遺伝子不安定性や発がん・転移に直結する機能を解析するのが目的である。本年度は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二重鎖RNA (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顕著に抑制したことから、HST-1/FGF-4遺伝子は精巣腫瘍の悪性度を左右する遺伝子であり、そのsiRNAによる抑制はヒト精巣腫瘍の新たな治療法につながる可能性を示した。

A. 研究の目的

近年のヒトゲノムプロジェクトの進展は、生命現象を細胞、分子レベルで解明するのに革命的な情報を与えている。しかし、種々の分子生物学の発展にもかかわらず、これらの急速に蓄積しつつある遺伝子、とくに発がんや転移に関与する遺伝子群の情報をすぐさまヒトのがん治療や生命現象の理解に役立てるための方法論や実験系の開発は不十分である。本研究においては動物個体レベルでの検討を中心に、発がん・転移の分子メカニズムの解明のもとになるがん関連遺伝子の機能解析を行う。本研究の進展は、遺伝子治療や細胞移植治療等の21世紀をにやう新がん医療の基礎造りに貢献することが期待できる。

B. 研究方法

昨年度までにHST-1/FGF-4遺伝子およびサイクリン遺伝子の個体レベルでの遺伝子発現制御が可能なCre/loxによるコンディショナルトランスジェニックマウスのラインの作製に成功し、両遺伝子を、組織特異的に発現誘導する系を確立し、それらの遺伝子の発がんに関する作用を検討してきた。その過程で、HST-1/FGF-4遺伝子は正常の精巣で発現し、造精機能を調節しているほか、精巣腫瘍では高発現し、自身の受容体に働いて自立増殖し、腫瘍の成長や転移に関与していることが明らかとなってきた。本年度はこのHST-1/FGF-4に対す

るsiRNAをデザインし、その発現抑制効果を検討するとともに、動物個体の同所移植モデルにおいてsiRNA投与が腫瘍の増殖や転移の抑制に有効かどうかを検討する。また、サイクリンD1遺伝子の皮膚発がんにおける作用について、培養ケラチノサイトを用いたモデル実験によって解析する。

（倫理面への配慮）

本実験計画に置いては、倫理に関わるようなヒトに関する材料、受精卵等は全く扱うことはない。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る。

C. 研究結果

1) HST-1/FGF-4のsiRNAによる精巣腫瘍の抑制：
HST-1/FGF-4遺伝子はヒト精巣腫瘍で高い発現を示し、また自身はその高親和性受容体を発現しているため、オートクラインの機構で自立増殖し、種々のがん細胞としての特徴を示している可能性が考えられる。今回はこのHST-1/FGF-4遺伝子の発現をsiRNAに寄って抑制することをまず試みた。siRNAは情報に従って候補4配列を合成し、この遺伝子を高発現する精巣腫瘍細胞株、NEC8細胞の発現抑制を検討した結果、FGF-4の発現をタンパク質レベルで80%抑制するsiRNA配列を同定した。このsiRNAの精巣腫瘍抑制効果をNEC8細胞の精巣への

同所移植モデルにて検討した結果、siRNA投与によって精巣腫瘍のFGF-4タンパク質は30%以下に低下し、さらに精巣での腫瘍の増殖抑制と遠隔臓器への転移が抑制される結果を得た。

2) サイクリンD1遺伝子によるVEGFの発現誘導：皮膚発がんを高頻度で誘発するサイクリンD1遺伝子のコンディショナルトランスジェニックマウスの皮膚のケラチノサイトの培養系の実験から、サイクリンD1の発現は、VEGFを誘導すること、さらにこの現象はマウス個体の皮膚でも同様に生じることが明らかとなった。

D. 考察

増殖因子や細胞調節因子のトランスジェニック動物は多々報告されているが、我々のめざすHST-1/FGF-4およびCyclinD1の個体レベルでの遺伝子発現制御が可能なCre/loxによるコンディショナルトランスジェニックマウスの報告と、それらを用いた遺伝子不安定性と発がんや疾患、遺伝子産物の生理機能に関する研究は他にない。これらの動物モデルとsiRNAによる遺伝子発現抑制を用いた結果を考察すると、1) HST-1・FGF-4遺伝子の発現の亢進は精巣腫瘍の悪性度に深刻に影響を及ぼし、その遺伝子の発現抑制は精巣腫瘍の新たな治療戦略として有用であることが動物実験の結果より示された。さらに我々のデータはsiRNAはHST-1/FGF-4遺伝子の発現抑制に極めて有効な方法であることを示すものである。2) 我々の開発したサイクリンD1 コンディショナルトランスジェニックマウスは皮膚発がんのモデルとして優秀な実験系である。この系を用いて、マウス皮膚においても血管新生に関係するVEGFのケラチノサイトからの放出がサイクリンD1によって制御されることを明らかにした。今後はケラチノサイトの増殖、分化とサイクリンD1遺伝子発現がもたらす遺伝子不安定性分子群との関係に迫る研究の展開が期待される。

E. 結論

Cre/loxシステムによる個体レベルでの遺伝子発

現制御系が遺伝子不安定性の解明の格好なモデルとして有用であることが判明し、これを用いて精巣腫瘍や皮膚発がんの遺伝子不安定性の分子メカニズムを解析する道が開けた。

F. 健康危険情報

本研究の方法、材料、実験結果、および動物個体が人体の健康に害を及ぼす可能性はまったくない。また、使用する危険物、毒物については研究所の危険物、毒物取扱い規定に準じた安全な取扱いを遵守している。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Hirai K, Sasaki H, Sakamoto H, Takeshita F, Asano K, Kubota Y, Ochiya T, Terada M. Antisense oligodeoxynucleotide against HST-1/FGF-4 suppresses tumorigenicity of an orthotopic model for human germ cell tumor in nude mice. *J Gene Med.* 5: 951-957, 2003.
2. Hirai K, Sasaki H, Yamamoto H, Sakamoto H, Kubota Y, Kakizoe T, Terada M, Ochiya T. HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition. *Exp Cell Res.* 294: 77-85, 2004.
3. Sasaki H, Hirai K, Yamamoto Y, Tanooka H, Sakamoto H, Iwamoto T, Takahashi T, Terada M, Ochiya T. HST-1/FGF-4 plays critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene.* in press.
4. Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto T, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M, Ochiya T. Atelocollagen-mediated delivery of synthetic small interfering RNA for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.* in press.

2) 学会発表

落谷孝広 FGF国際会議、FGF-4の生理作用と病態との関係、2003年10月12-15日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

「組織障害予防」特願平11-53389 国際特許出願中

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, <u>Yoshida T</u> , Saijo N, Ozawa S, Sawada J.	Three novel single nucleotide polymorphisms in UGT1A9.	Drug Metabol Pharmacokin	18	SNP6(146)-SNP9(149)	2003
Jinno H, Saeki M, Saito Y, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, Sai K, Kaniwa N, Ando M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, <u>Yoshida T</u> , Saijo N, Ozawa S, Sawada J.	Functional characterization of human UDP-glucuronosyltransferase 1A9 variant, D256N, found in Japanese cancer patients.	J Pharmacol Exp Ther	306	688-693	2003
Suzuki K, Ohnami S, Tanabe C, Sasaki H, Yasuda J, Katai H, Yoshimura K, Terada M, Perucho M, <u>Yoshida T</u> .	The genomic damage estimated by arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting is useful for the prognosis of gastric cancer.	Gastroenterology	125	1330-40	2003
Itoda M, Saito Y, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, <u>Yoshida T</u> , 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,	18	SNP14(212)-SNP19(217)	2003
Tanabe C, Aoyagi K, Sakiyama T, Kohno T, Yanagitani N, Akimoto S, Sakamoto M, Sakamoto H, Yokota J, Ohki M, Terada M, <u>Yoshida T</u> , Sasaki H.	Evaluation of a whole-genome amplification method based on adaptor-ligation PCR of randomly sheared genomic DNA.	Genes, Chrom & Cancer	38	168-176	2003
Suzuki K, Aoki K, Ohnami S, Yoshida K, Kazui T, Kato N, Inoue K, Kohara M, <u>Yoshida T</u> .	Adenovirus-mediated gene transfer of interferon α inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes.	Biochem Biophys Res Commun	307	814-819	2003
Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, Aoki K, Suzuki K, Kanai Y, Haga K, Asaka M, Ramirez F, <u>Yoshida T</u> .	Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Kr _{ppel} -like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer.	Biochem Biophys Res Commun	308	251-256	2003
Ohnami S, Aoki K, Yoshida K, Ohnami S, Hatanaka K, Suzuki K, Sasaki H, <u>Yoshida T</u> .	Expression profiles of pancreatic cancer cell lines infected with antisense K-ras-expressing adenoviral vector.	Biochem Biophys Res Commun	309	798-803	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hatanaka K, Ohnami S, Yoshida K, Miura Y, Aoyagi K, Sasaki H, Asaka M, Terada M, <u>Yoshida T</u> , Aoki K.	A simple and efficient method for constructing an adenoviral cDNA expression library.	Mol Ther.	8	158-66	2003
Kim S-R, Nakamura T, Saito Y, Sai K, Nakajima T, Saito H, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, <u>Yoshida T</u> , Saijo N, Ozawa S, Sawada J.	Twelve novel single nucleotide polymorphisms in the CES2 gene encoding human carboxylesterase 2 (hCE-2).	Drug Metabol Pharmacokin	18	327-332	2003
Sai K, Kaniwa N, Itoda M, Saito Y, Hasegawa R, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, <u>Yoshida T</u> , 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	13	741-757	2003
Yoshimura K, Hanaoka T, Ohnami S, Kohno T, Liu Y, <u>Yoshida T</u> , 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	48	654-658	2003
Mori K, Aoyagi K, Ueda T, Danjoh I, Tsubosa Y, Yanagihara K, Matsuno Y, Sasako M, Sakamoto H, Mafune K, Kaminishi M, <u>Yoshida T</u> , Terada M, Sasaki H.	Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritonea washings.	Biochem Biophys Res Commun	313	913-917	2004
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, <u>Yoshida T</u> , Saijo N.	UGT1A1 Haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese cancer patients.	Clinical Pharmacology and Therapeutics		in press	
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, <u>Yoshida T</u> , 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.	Mutation in brief	#681	online	

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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,	2	147-56	2004
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	30-33	2003
吉村公雄、吉田輝彦.	Common disease-common variant仮説	分子精神医学	3	43-44	2003
菅野康吉、吉田輝彦、和泉秀子、児玉哲朗.	がんの遺伝子診療の現状－臨床の立場から－	医療	57	390-394	2003
Henry-Mowatt, J., Jackson, D., Masson, J-Y., Johnson, P.A., Clements, P.M., Benson, F.E., Thompson, L.M., Takeda, S., West, S.C. and Caldecott, K.W.	XRCC3 and RAD51 Modulate Replication Fork Progression on Damaged Vertebrate Chromosomes	Mol. Cell	11	1109-1117	2003
Sonoda, E., Okada, T., Zhao, G.Y., Tateishi, S., Araki, K., Yamaizumi, M., Yagi, T., Verkaik, N.S., van Gent, D.C., Takata, M., and Takeda, S.	Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of polz in maintaining genome stability in vertebrates	EMBO J	22	3188-3197	2003
Mizutani, A., Okada, T., Shibutani, S., Sonoda, E., Hochegger, H., Nishigori, C., Miyachi, Y., Takeda, S., and Yamazoe, M.	Extensive chromosomal breaks are induced by tamoxifen and estroagen in DNA repair deficient cells.	Cancer Research		in press	2004
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
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
Higashimoto, K., Urano, T., Sugiura, K., Yatsuki, H., Joh, K., Zhao, W., Iwakawa, M., Ohashi, H., <u>Oshimura, M.</u> , 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
Soejima, H., Nakagawachi, T., Wei Z., Urano, T., Matsuoka, S., Higashimoto, K., Kitajima, Y., Takeuchi, M., Nakayama, M., <u>Oshimura, M.</u> , 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	
Maegawa, S., Itaba, N., Otsuka, S., Kamitani, H., Watanabe, T., Tahimic, CGT., Nanba, E., <u>Oshimura, M.</u>	Coordinate downregulation of a novel imprinted transcript ITUP1 with PEG3 in glioma cell lines	DNA Resarch		in press	
Nozaki, T., <u>Masutani, M.</u> , et al.	Parp-1 deficiency implicated in colon and liver tumorigenesis induced by azoxymethane.	Cancer Science	94	497-500	2003
El-Khamisy S.F., <u>Masutani M.</u> , 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
<u>Masutani M.</u> , Nakagama, et al.	Poly(ADP-ribose) and carcinogenesis.	Genes Chromosomes Cancer	38	339-348	2003
Watanabe F., <u>Masutani M.</u> , et al.	Impairment in S-phase entry of splenocytes of Parp-1 knockout mice.	Proc. Jpn. Acad.,	79, Ser. B	248-251	2003
Gunji A., <u>Masutani M.</u> , 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shibata A., <u>Masutani M.</u> , 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.	Ser. B,	in press.	2004
<u>Masutani M.</u> , et al.	Poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene in human tumor cell lines: its expression and structural alteration.	Proc. Japan Acad.	Ser. B,	in press.	
Hirai K, Sasaki H, Sakamoto H, Takeshita F, Asano K, Kubota Y, <u>Ochiya T.</u> , Terada M.	Antisense oligodeoxynucleotide against HST-1/FGF-4 suppresses tumorigenicity of an orthotopic model for human germ cell tumor in nude mice.	J Gene Med.	5	951-957	2003
Hirai K, Sasaki H, Yamamoto H, Sakamoto H, Kubota Y, Kakizoe T, Terada M, <u>Ochiya T.</u>	HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition.	Exp Cell Res	294	77-85	2004
Sasaki H, Hirai K, Yamamoto Y, Tanooka H, Sakamoto H, Iwamoto T, Takahashi T, Terada M, <u>Ochiya T.</u>	HST-1/FGF-4 plays critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation.	Oncogene		in press.	
Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto T, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M, <u>Ochiya T.</u>	Atelocollagen-mediated delivery of synthetic small interfering RNA for effective gene silencing in vitro and in vivo.	Nucleic Acids Res,		in press.	