

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570009  
 研究課題名（和文） マイクロサテライト不安定性はミスマッチ修復異常のみによってもたらされているか？  
 研究課題名（英文） Is microsatellite instability caused merely by defective DNA mismatch repair?  
 研究代表者  
 織田 信弥（ODA SHINYA）  
 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究部・研究室長  
 研究者番号：40333372

## 研究成果の概要：

マイクロサテライト不安定性(microsatellite instability, MSI)と DNA ミスマッチ修復(DNA mismatch repair, MMR)異常との正確な関係を明らかにするために、まず、腫瘍組織標品において、詳細な観察をおこなった。その結果、大腸癌においては、これまで主たるマイクロサテライト配列変化とみられていた MSI-H を呈する集団には、MMR 遺伝子変異をもつものと、そうでないものとの間に特徴的な分子背景の違いがみられた。興味深いことに、前者はこれまで先天的変異(すなわち非ポリポーシス遺伝性大腸癌(HNPCC))と考えられていたが、後天的変異や HNPCC でないものも見出され、MMR 異常と MSI の関係がこれまで考えられてきた以上に複雑であることが明らかとなった。また、MSI が生じる生物学的条件についてもさらなる検討をおこなった。MSI は一般に、MMR 異常をもつ細胞でみとめられるとされるが、その生成機序から、実際に変化が固定され、可視化するには、独立した且つ十分に長い複製の歴史を必要とする。このことを、MMR 遺伝子に既知の欠損をもつヒト大腸癌由来株化培養細胞を用いて明かにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学(基礎生物学)

科研費の分科・細目：5701 遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム、癌、ゲノム安定性、DNA 修復

## 1. 研究開始当初の背景

1993年、ポリポーシスを伴わない遺伝性大腸癌 (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) において、真核生物ゲノム上に散在するリピート配列、マイクロサテライトの不安定化、すなわちマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) が報告された。HNPCC はゲノム維持機構の破綻により発がんを来すことが知られた最初の遺伝性症候群であり、発がんの基礎となるゲノム不安定化の機序として、リピート不安定性が注目された。同年末には、この HNPCC 家系内に DNA ミスマッチ修復 (DNA mismatch repair, MMR) 系を構成する遺伝子の変異が遺伝していることが示された。MMR は DNA ポリメラーゼが複製の際にゲノム上でおかした誤り、すなわち「複製エラー」を修復するシステムであるが、塩基ミスマッチに加え、ポリメラーゼの「滑り」によるリピート配列部の鋳型鎖-新生鎖ミスアラインメントをも修復する。MMR 異常をもつ細胞ではこのミスアラインメントが放置されてリピートコピー数の変化につながる。これが、MMR 遺伝子に変異をもつ HNPCC でみられた MSI の原因であると考えられた。

MSI は多様なヒト腫瘍で研究が行われた。申請者は多蛍光標識した PCR プライマーと自動シーケンサーを用いた高精度な解析システムを確立し (Oda S *et al.*, *Nucleic Acids Res* 25: 3415-20, 1997)、この解析系を用いて様々な腫瘍を解析した。その結果、興味深いことに、ヒト腫瘍で観察される MSI には、変化が 6-bp 以内と比較的小さなもの (A タイプ) と、しばしば数十-bp にも及び、あたかも新しいアレルが出現したかのような変化を呈するもの (B タイプ) の 2 つのモードが存在することが見出された (Maehara Y *et al.*, *Mutation Res (DNA Repair)*, 461: 249-63, 2001 他)。さらに、研究代表者らのグループは、MMR 遺伝子に既知の欠損をもつヒト株化培養細胞 (Oki E *et al.*, *Oncogene* 18: 2143-47, 1999)、MMR 遺伝子ノックアウトマウスに生じた腫瘍 (Oda S *et al.*, *Nucleic Acids Res* 33: 1628-36, 2005) などを用いて詳細な解析を行った結果、A タイプが MMR 異常に直接起因する MSI であることを明らかにした。これまで観察されてきた MSI の多くは、HNPCC で観察されるものを含めて、B タイプであることが文献から見てとれる。B タイプ MSI においては、MMR 異常は十分条件ではない。MMR 異常以外の分子機序がこのモードのリピート不安定性の基礎となっている可能性が強く示唆された。このよ

うに、MMR 異常と MSI の関係は、これまで考えられて来たように単純ではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト癌でみられるリピート不安定性の分子機序について、ミスマッチ修復異常以外の機序、とくに 2 重鎖切断修復異常等の可能性を検討することで、そのようなカテゴリーのリピート不安定性の存在の有無を明らかにし、ひいては、その発がんにおける意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

リピート不安定性の原因は、大腸菌や酵母を用いた研究から、(A) DNA ポリメラーゼの校正機能、(B) DNA ミスマッチ修復、(C) Okazaki フラグメントのプロセッシング、(D) 組換えを用いた 2 重鎖切断修復どの異常が考えられている。従って、本研究が取り扱う具体的課題は以下のように整理された (役割分担を氏名で表記)。各課題で用いた方法を以下に併記した。

## A. 臨床検体を用いた研究 (織田)

- マイクロサテライト不安定性とミスマッチ修復異常との正確な関係: MSI 解析 (DNA フラグメント解析)、DNA シーケンシング、免疫組織化学
- マイクロサテライト不安定性とポリメラーゼ校正機能異常: DNA シーケンシング、免疫組織化学
- マイクロサテライト不安定性とフラップ・プロセッシングの異常: DNA シーケンシング、免疫組織化学
- マイクロサテライト不安定性を呈する腫瘍における 2 重鎖切断修復異常: DNA シーケンシング、免疫組織化学
- 着目した分子異常のみられる腫瘍の characterisation: 組織病理学 (免疫組織化学含む)

B. 細胞株を用いた *in vitro* の遺伝学的アプローチ (倉岡)

- 人工的に 2 重鎖切断を導入した様々な遺伝子型ノックアウトマウス細胞における解析: 細胞培養、MSI 解析
- 変異蛋白質を導入した細胞株における解析: 細胞培養、トランスジーン導入、マイクロインジェクション、MSI 解析

#### 4. 研究成果

本研究では、ヒト癌でみられるリピート不安定性の分子機序について、ミスマッチ修復 (DNA mismatch repair, MMR)異常を含めた多様な生成機序の可能性を検討することで、それぞれのカテゴリのリピート不安定性の存在の有無を明らかにし、ひいては、各々のリピート不安定性の発がんにおける意義を明らかにすることを目的とした。

初年度はまず、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) と MMR 異常との正確な関係を明らかにするために、腫瘍組織標品について、高精度解析系を用いた MSI 解析を行い、同時に免疫染色などによる MMR 遺伝子の epigenetic silencing の有無、シーケンシングによる構造遺伝子変異の有無について解析し、MSI を呈する集団の中で、MMR 異常をもつフラクションがどのように存在するかを明らかにすることを目的とした。その結果、大腸癌においては、これまで主たるマイクロサテライト配列変化とみられていた MSI-H(B タイプ)を呈する集団には、MMR 遺伝子変異をもつものと、そうでないものとの間に特徴的な分子背景の違いがみられた。興味深いことに、前者はこれまで先天的変異(すなわち非ポリポーシス遺伝性大腸癌(HNPCC))と考えられていたが、後天的変異や HNPCC でないものもみつかった(Zhao Y *et al.* *Gene* 423: 188-193, 2008)。また後者には、MMR 遺伝子構造(プロモーターのメチル化も含む)やタンパク質発現にまったく異常のみられないものも見出され、MMR 異常と MSI の関係がこれまで考えられてきた以上に複雑であることが明らかとなった。

次年度は、MSI と MMR 異常との正確な関係を明らかにする目的で、MSI が生じる生物学的条件についてさらなる検討をおこなった。MSI は一般に、MMR 異常をもつ細胞でみとめられるとされるが、リピート上で滑りにより合成を誤る DNA ポリメラーゼの性質から、マイクロサテライト配列変化が長短二方向性に生じるため、実際に変化が固定され、可視化するには、独立した且つ十分に長い複製の歴史を必要とする。このことを、MMR 遺伝子に既知の欠損をもつヒト大腸癌細胞株 HCT116 を用いた人口組織において、少数の細胞塊をレーザーマイクロディセクションにより回収することで明らかにした(Fujii K *et al.*, *Cancer Genet Cytogenet* 189: 5-14, 2009)。現在、実際には潜在的に変化しにくいこのマイクロサテライトの性質を、2 塩基繰り返しのものから 1 塩基繰り返しのマイクロサテライトにまで拡張して、検証をおこなっている。MMR 異常以外の機序としては、DNA ポリメラーゼの校正機能の

異常を考慮し、現在、ヒト大腸がん症例パネルにおいて、*POLD1* 遺伝子および *POLE* 遺伝子の変異解析を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

(\*は責任著者)

①Fujii K, Miyashita K, Yamada Y, Eguchi T, Taguchi K, Oda Y, Oda S\*, Yoshida MA, Tanaka M, Tsuneyoshi M: Simulation-based analyses reveal stable microsatellite sequences in human pancreatic cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 189: 5-14, 2009(査読：有)

②Miyashita K, Fujii K, Yamada Y, Hattori H, Taguchi K, Yamanaka T, Yoshida MA, Okamura J, Oda S\*, Muta K, Nawata H, Takayanagi R, Uike N: Frequent microsatellite instability in non-Hodgkin lymphomas irresponsive to chemotherapy. *Leukemia Res* 32: 1183-95, 2008(査読：有)

③Zhao Y, Miyashita K, Ando T, Kakeji Y, Yamanaka T, Taguchi K, Ushijima T, Oda S\*, Maehara Y: Exclusive *KRAS* mutation in microsatellite-unstable human colorectal carcinomas with sequence alterations in the DNA mismatch repair gene, *MLH1*. *Gene* 423: 188-93, 2008(査読：有)

④Segawa Y, Oda Y, Yamamoto H, Uryu H, Shiratsuchi H, Hirakawa N, Tomita K, Yamamoto T, Oda S, Yamada T, Komune S, Tsuneyoshi M: Overexpression of inducible nitric oxide synthase and accumulation of 8-OHdG in nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology* 52: 213-23, 2008(査読：有)

⑤Kuraoka I, Ito S, Wada T, Hayashida M, Lee L, Saijo M, Nakatsu Y, Matsumoto M, Matsunaga T, Handa H, Qin J, Nakatani Y, Tanaka K: Isolation of XAB2 Complex Involved in Pre-mRNA Splicing, Transcription, and Transcription-coupled Repair. *J Biol Chem* 283:940-950, 2008(査読：有)

⑥Kuraoka I\*: Effects of DNA lesions on transcription elongation by RNA

polymerases. *Genes Environ* 30: 63-70, 2008(査読：有)

⑦Sakurai M, Zhao Y, Oki E, Kakeji Y, Oda S\*, Maehara Y: High resolution fluorescent analysis of microsatellite instability in gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19: 701-9, 2007(査読：有)

⑧Yohena T, Yoshino I, Takenaka T, Ohba T, Kouso H, Osoegawa A, Hamatake M, Oda S, Kuniyoshi Y, Maehara Y: Relationship between the loss of heterozygosity and tobacco smoking in pulmonary adenocarcinoma. *Oncol Res* 16: 333-9, 2007(査読：有)

⑨Ikura T, Tashiro S, Kakino A, Shima H, Jacob N, Amunugama R, Yoder K, Izumi S, Kuraoka I, Tanaka K, Kimura H, Ikura M, Nishikubo S, Ito T, Muto A, Miyagawa K, Takeda S, Fishel R, Igarashi K, Kamiya K: DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol* 27:7028-7040, 2007(査読：有)

⑩Ito S, Kuraoka I, Chymkowitch P, Compe E, Takedachi A, Ishigami C, Coin F, Egly JM, Tanaka K: XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol Cell* 26:231-243, 2007(査読：有)

⑪若狭健太郎、織田信弥\*、瀬戸貴司、一瀬幸人、前原喜彦：フッ化ピリミジンとチミジル酸合成酵素。 *Mebio Oncol* 6: 46-63, 2009(査読：無)

⑫織田信弥\*：マイクロサテライト不安定性。 *BIO Clinica* 23: 39-46, 2008(査読：無)

⑬織田信弥\*、倉岡功、前原喜彦：DNA修復と抗癌剤感受性。 *癌と化学療法* 34: 347-357, 2007(査読：無)

[学会発表] (計 1 1 件)

①Kuraoka I: Effects of methyl DNA lesions on transcription elongation by RNA polymerase II. Gordon Research Conferences (Mutagenesis)(2008/7/20-25,

Oxford)

②Kuraoka I: Nucleotide excision repair mechanisms in human cells. 第1回アジア環境変異学会(2007年11月29-30日、北九州)

③倉岡功、田中亀代次：ヒト RNA ポリメラーゼ II 転写反応におけるメチル化 DNA 損傷の影響。第37回日本変異原学会(2008年12月4-6日、宜野湾)

④倉岡功、田中亀代次：転写およびスプライシングに関する修復蛋白質 XAB2 複合体の単離。第51回日本放射線影響学会(2008年11月19-22、北九州)

⑤倉岡功、田中亀代次：メチル化による DNA 損傷が RNAPII の転写伸長に与える影響。第30回日本分子生物学会(2007年12月11-15日、横浜)

⑥倉岡功、伊藤伸介、竹立新人、石上智愛、田中亀代次：色素性乾皮症 G 群蛋白質は基本転写因子 TFIIH と複合体を形成する。第36回日本環境変異原学会(2007年11月29-30日、北九州)

⑦倉岡功、伊藤伸介、竹立新人、石上智愛、田中亀代次：色素性乾皮症 G 群蛋白質は基本転写因子 TFIIH 複合体の安定化する。第50回日本放射線影響学会(2007年11月14-17日、千葉)

⑧倉岡功、田中亀代次：RNA ポリメラーゼ II 転写伸長反応における DNA 塩基損傷の影響。第66回日本癌学術総会(2007年10月3-5日、横浜)

⑨倉岡功、伊藤伸介、竹立新人、田中亀代次：色素性乾皮症 G 群蛋白質による基本転写因子 TFIIH 複合体の安定化。変異機構研究会第20回夏の学校(2007年7月28-29日、名古屋)

⑩倉岡功、伊藤伸介、竹立新人、田中亀代次：色素性乾皮症 G 群蛋白質は基本転写因子 TFIIH と複合体を形成する。第13回日本家族性腫瘍学会学術集会(2007年6月15-16日、高知)

⑪織田信弥、趙岩、掛地吉弘、前原喜彦：K-ras 遺伝子変異からみたマイクロサテライト不安定性陽性大腸癌の分子背景の多様性。第13回日本家族性腫瘍学会学術集会(2007年6月15-16日、高知)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

<http://www.ia-nkcc.jp/rinsho/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

織田 信弥 (ODA SHINYA)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター

一臨床研究部腫瘍遺伝学研究室・室長

研究者番号：40333372

### (2)研究分担者(H19年度)

倉岡 功 (KURAOKA ISAO)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター

一臨床研究部腫瘍生化学研究室・室長

研究者番号：60335396

### (3)連携研究者(H20年度)

倉岡 功 (KURAOKA ISAO)

大阪大学大学院 基礎工学研究科・準教授

研究者番号：60335396