

平成 22 年 4 月 13 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19790286

研究課題名（和文） がん染色体不安定性の要因としての中心体サイクル制御機構異常に関する研究

研究課題名（英文） Study on the abnormal centrosome regulation, leading to the chromosome instability in cancer

研究代表者

新村 和也 ( SHINMURA KAZUYA )

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40321880

研究成果の概要（和文）：

ベンゾピレン代謝産物 B[a]PDE は、中心体過剰複製誘導を介した染色体不安定性誘導により、肺がんに関わっていることを明らかにした。大腸がんにおいて、染色体分離に関わる hSgo1 遺伝子の発現が低下しており、これにより、中心体過剰複製、染色体不安定性が見られることを明らかにした。がん抑制遺伝子 p53 が転写活性非依存的中心体複製制御活性を有することを明らかにした。がん抑制遺伝子 NORE1A の中心体制御能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

B[a]PDE, the ultimate carcinogenic metabolite of benzo[a]pyrene, contributes to neoplasia by inducing centrosome amplification and consequent chromosome destabilization as well as its mutagenic activity. hSgo1 is down-regulated in colorectal cancers and hSgo1 down-regulation leads to centrosome amplification and chromosome instability in colorectal cancer cells. The centrosomally localized p53 participates in the regulation of centrosome duplication in a manner independent of its transactivation function in addition to its transactivation-dependent regulation of centrosome duplication. NORE1A has activity that suppresses the centrosome amplification induced by hydroxyurea and NORE1A mRNA down-regulation is one of the common gene abnormalities in non-small cell lung carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：中心体、染色体不安定性、がん、p53、NORE1A、ベンゾピレン、中心体過剰複製、hSgo1

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞における染色体不安定性の特徴として染色体異数性が挙げられる。染色体異数性を引き起こす要因として細胞周期チェックポイント制御の異常が指摘されてきたが、最近では、中心体の制御機構の異常も注目されている。中心体は、動物細胞において、直交する2つの中心小体とその周りのアモルファスな蛋白質集合体である中心小体周辺物質から構成され、微小管形成中心として機能する。一つの細胞が分裂して2つになると同じように、中心体も一細胞周期中に一度だけ複製されるよう、その中心体サイクル（複製→分離→微小管の形成・制御→分配→複製）は、厳密に管理されている。この中心体サイクルの制御機構が崩れ分裂期に3つ以上の中心体が存在すると、通常の正確な二極性紡錘体形成および染色体分配が行われず、結果として染色体異数性が生じてしまう場合がある。ところが、中心体サイクル制御機構、およびがんにおいてどのような遺伝子異常により中心体サイクル制御機構異常が起きているか、また、その染色体不安定性へのつながりは、未だ十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

中心体サイクル制御機構をより詳細に解明し、そのがんにおける異常を示し、その制御機構異常の染色体不安定性へのつながりを明らかにすることを目的とする。具体的には、(1) p53, NORE1A を中心としたがん抑制遺伝子の中心体サイクル制御能に関して、(2) 中心体におけるセパレーズの基質同定に関して、(3) 消化管がんにおける体系的な変異・発現異常解析に関して、研究を行うことにした。

## 3. 研究の方法

(1) 薬剤等の処理により中心体過剰複製を誘導し、免疫蛍光染色法によりこれを同定する。(2) 免疫蛍光染色法、免疫電顕法、中心小体染色法により、過剰複製する中心体の性質を解析する。(3) 中心体過剰複製の細胞周期との関連性を、FACS, Western blot 法, kinase アッセイ等で解析する。(4) 中心体過剰複製誘導細胞が分裂期に示す挙動を time lapse イメージ解析により調べる。(5) 染色体数を染色体 FISH 法により計測する。また、異常核を免疫蛍光染色法により調べる。(6) 中心体過剰複製に影響を与える候補遺伝子因子を強制発現、siRNA 法によるノックダウン法により検討する。(7) ヒトがん臨床検体における、中心体過剰複製、中心体・紡錘体に局

在する遺伝子の異常の有無を、免疫染色法、変異同定法、定量的 PCR 法、Western blot 法などにより検討する。(8) 目的遺伝子に中心体局在配列および TAP (tandem affinity 精製) タグ配列を付加させて発現させた後、中心体を抽出後、その結合蛋白質を TAP 法により精製し、質量分析法により同定する。(9) 抽出中心体を kinase と反応させ、その反応の前後での変化遺伝子を 2 次元電気泳動、質量分析法により同定する。(10) その他、一般的な分子遺伝学的手法および、生物学的統計解析法により、研究を進める。

## 4. 研究成果

主な研究成果として、下記の(1)-(6)を挙げる。これらは、項目5に示すように、原著論文として、査読のある雑誌に掲載された。これらの論文に基づく学術賞受賞、論文引用、に示されるように、本研究課題の国内外における評価は高い、と考えられる。

(1) ベンゾピレン代謝産物 B[a]PDE は、喫煙者肺がんにおいて、がん抑制遺伝子 p53 の体細胞変異誘導の原因の一つと考えられている。私達は、B[a]PDE の肺がんへの更なる関与の可能性を考え、p53 欠損肺がん細胞株 H1299 を用いて、中心体数、染色体数への影響を検討した。H1299 に B[a]PDE を処理すると、S 期停止が起これ、中心体過剰複製が誘導された。また、トランスリージョン DNA ポリメラーゼ POLK を過剰発現させると、B[a]PDE 誘発中心体過剰複製が抑制された。B[a]PDE 処理後数日後に染色体 FISH 解析を行うと、中心体過剰複製誘導を介したと考えられる染色体不安定性誘導が認められた。さらに、原発性肺がん検体での解析で、p53 が変異している場合に、B[a]PDE 蓄積と中心体過剰複製との間に関連性が認められた。以上のことから、B[a]PDE は、これまで報告されている遺伝子突然変異誘導のみならず、中心体過剰複製誘導を介した染色体不安定性誘導により、肺がんに関わっていることが示唆された。(2) 正確な染色体分離が行われる上で重要な役割を果たす分子として同定されたヒトシュゴシン (hSgo1) の大腸がんにおける関与を検討し、次の結果を得た。① 原発性大腸がん患者の腫瘍部の hSgo1 の発現は mRNA および蛋白質レベルで低下していた。② hSgo1 の mRNA 発現レベルの低い大腸がんは左側大腸に局在し、染色体 FISH 解析での観察で染色体数の変化に富んでいた。③ 大腸がん細胞株 HCT116 における hSgo1 の発現を siRNA 法で低下させたところ、G2/M 期停止、中心体過剰複製、染色体不安定性が誘導された。以上のことは消化器がんにおける hSgo1 の変化とそ

の関与についての初めての報告である。(3) がん抑制遺伝子NORE1Aは、核細胞質シャトル蛋白質であり、その一部は中心体に局在するが、その中心体上NORE1Aの役割は解明されていない。そこで、中心体制御、染色体数制御の点から、NORE1Aの機能解明を試みた。p53欠損肺癌細胞株H1299に、DNA合成阻害剤 hydroxyurea (HU) を処理すると、3個以上の中心体を有する細胞の割合が増加し、中心体過剰複製が生じることが蛍光免疫染色法で示された。NORE1Aを外来性に発現させると、その割合は部分的に抑制された。核外移行シグナル(NES)変異体は、中心体に局在せず、また、HU誘発中心体過剰複製の抑制活性を示さなかった。FISH解析で染色体2番と16番の染色体数を計測すると、HU処理によってみられる染色体数異常を、野性型NORE1Aは部分的に抑制したが、NES変異型は抑制しなかった。これらのことから、NORE1Aは、HU誘発中心体過剰複製の抑制活性、および、中心体過剰複製を介すると考えられるHU誘発染色体不安定性の抑制活性を有することが示唆された。さらに、非小細胞肺癌におけるNORE1Aの発現を定量的PCR法で調べたところ、細胞株で100%(12/12)、原発性がん検体で49%(25/51)がmRNAレベルでの低発現を示し、NORE1A発現低下は非小細胞肺癌における頻度の高い遺伝子異常の一つであることが示唆された。(4) 多くのがんでの不活化が示されているp53は、これまでに、p21によるCDK2/サイクリンEの活性調節を介した転写活性依存的中心体複製制御活性は知られていたが、転写活性非依存的な役割については、分かっていなかった。そこで、p53<sup>-/-</sup>マウス胎児線維芽細胞に細胞周期停止薬剤ミモシンを投与した中心体過剰複製アッセイにおいて、転写活性(+)中心体結合能(-)のp53変異体、転写活性(-)中心体結合能(+)のp53変異体、転写活性(-)中心体結合能(-)のp53変異体、および野性型p53の発現プラスミドを各々発現させ、中心体過剰複製をどの程度抑制できるかについて検討した。そして、その結果として、p53が転写活性非依存的中心体複製制御活性を有するという知見を得た。(5) 中心体サイクルにおいて重要な役割を果たすヌクレオフォスミンが、K230, K263においてSUMO化されることを明らかにした。そして、このヌクレオフォスミンのSUMO化が、ヌクレオフォスミンの細胞内局在、中心体複製、細胞増殖能、細胞生存活性を制御していることを明らかにした。(6) 細胞分裂期の紡錘体上に局在することが知られているEML4蛋白質が、ヒト非小細胞肺癌において、2.6%(2/77例)の頻度で、チロシンキナーゼ活性を有するALKと融合蛋白質を形成していることを明らかにした。血液系腫瘍の一部で認められるNPM<sup>-</sup>, TPM3<sup>-</sup>, CLTC<sup>-</sup>, ATIC<sup>-</sup>, TFG-ALK融合遺伝子は、77例の非小細胞肺癌には、認められな

った。また、別の免疫染色法を利用したスクリーニングにより、302例の非小細胞肺癌検体から、10例の、EML4-ALK転写産物を有する検体を明らかにした。そのうち、1例は、EML4のエクソン14が、ALKのエクソン20の53番目の塩基に、2塩基を介してつながる新規の型を有していた。これらのことから、一部の非小細胞肺癌発生へのEML4-ALKの関与が示唆され、また、ALK融合蛋白質探索における免疫染色法の有用性を示すことができた。

中心体上における結合蛋白質の同定に関しては、種々の発現ベクター、高発現細胞株を樹立したが、期間内に論文報告することができなかった。

## 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10件)

- ① Shinmura K, Tao H, Nagura K, Goto M, Matsuura S, Mochizuki T, Suzuki K, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Sugimura H: Suppression of hydroxyurea-induced centrosome amplification by NORE1A and down-regulation of NORE1A mRNA expression in non-small cell lung carcinoma. Lung Cancer 査読有, in press.
- ② Shinmura K, Kageyama S, Igarashi H, Kamo T, Mochizuki T, Suzuki K, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Sugimura H: EML4-ALK fusion transcripts in immunohistochemically ALK-positive non-small cell lung carcinomas. Exp Ther Med 査読有 1: 271-275, 2010.
- ③ Goto M, Shinmura K, Igarashi H, Kobayashi M, Konno H, Yamada H, Iwaizumi M, Kageyama S, Tsuneyoshi T, Tsugane S, Sugimura H: Altered expression of the human base excision repair gene *NTH1* in gastric cancer. Carcinogenesis 査読有 30: 1345-1352, 2009.
- ④ Shinmura K, Iwaizumi M, Igarashi H, Nagura K, Yamada H, Suzuki M, Fukasawa K, Sugimura H: Induction of centrosome amplification and chromosome instability in *p53*-deficient lung cancer cells exposed to benzo[a]pyrene diol epoxide (B[a]PDE). J Pathol 査読有 216: 365-374, 2008.
- ⑤ Iwaizumi M, Shinmura K, Mori H, Yamada H, Suzuki M, Kitayama Y, Igarashi H, Nakamura T, Suzuki H, Watanabe Y,

- Hishida A, Ikuma M, Sugimura H: Human Sgol downregulation leads to chromosomal instability in colorectal cancer. *Gut* 査読有 58: 249-260, 2009.
- ⑥ Tao H, Shinmura K, Suzuki M, Kono S, Mibu R, Tanaka M, Kakeji Y, Maehara Y, Okamura T, Ikejiri K, Futami K, Yasunami Y, Maekawa T, Takenaka K, Ichimiya H, Imaizumi N, Sugimura H: Association between genetic polymorphisms of the base excision repair gene *MUTYH* and increased colorectal cancer risk in a Japanese population. *Cancer Sci* 査読有 99: 355-360, 2008.
- ⑦ Shinmura K, Kageyama S, Tao H, Bunai T, Suzuki M, Kamo T, Takamochi K, Suzuki K, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Sugimura H: EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* 査読有 61:163-169, 2008.
- ⑧ Shinmura K, Bennett RA, Tarapore P, Fukasawa K: Direct evidence for the role of centrosomally localized p53 in the regulation of centrosome duplication. *Oncogene* 査読有 26: 2939-2944, 2007.
- ⑨ Liu X, Liu Z, Jang SW, Ma Z, Shinmura K, Kang S, Dong S, Chen J, Fukasawa, K, Ye K: Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 査読有 104: 9679-9684, 2007.
- ⑩ Yamada H, Shinmura K, Okudela K, Goto M, Suzuki M, Kuriki K, Tsuneyoshi T, Sugimura H: Identification and characterization of a novel germ line *p53* mutation in familial gastric cancer in the Japanese population. *Carcinogenesis* 査読有 28: 2013-2018, 2007.
- [学会発表] (計9件)
- ① Goto M, Shinmura K, Igarashi H, Kobayashi M, Konno H, Yamada H, Iwaizumi M, Kageyama S, Tsuneyoshi T, Tsugane S, Sugimura H: Altered expression of the human base excision repair gene *NTFI* in gastric cancer. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 1-3, 2009 Yokohama
- ② 岩泉守哉、新村和也、森弘樹、山田英孝、北山康彦、伊熊睦博、梶村春彦. 消化管癌におけるシュゴシン(hSgo1)の病理学的変化と染色体不安定性への関与. 第98回日本病理学会総会 2009年5月1-3日 京都
- ③ 新村和也、岩泉守哉、鈴木雅也、五十嵐久喜、山田英孝、梶村春彦. ベンゾピレン代謝産物B[a]PDEを処理したp53欠損肺癌細胞株における中心体過剰複製と染色体不安定性の誘導. 第98回日本病理学会総会 2009年5月1-3日 京都
- ④ Iwaizumi M, Shinmura K, Yamada H, Sugimura H: Production of a novel hSgol splicing product is a potential cause of down-regulation of wild type hSgol in colorectal cancer. 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Apr 18-22, 2009 Denver
- ⑤ 岩泉守哉、新村和也、伊熊睦博、梶村春彦. 大腸癌においてヒトSgolの低下は染色体不安定性を誘導する 第16回浜名湖シンポジウム 2008年12月20-21日 浜松
- ⑥ Iwaizumi M, Shinmura K, Mori H, Yamada H, Kitayama Y, Ikuma M, Sugimura H: Human Sgol down-regulation and chromosomal instability in colorectal cancer. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 28-30, 2008 Nagoya
- ⑦ Shinmura K, Iwaizumi M, Suzuki M, Sugimura H: Induction of centrosome amplification and chromosome instability in *p53*-deficient lung cancer cells exposed to B[a]PDE. 67th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 28-30, 2008 Nagoya
- ⑧ Yamada H, Shinmura K, Okudela K, Goto M, Suzuki M, Kuriki K, Tsuneyoshi T, Sugimura H: Identification and characterization of a novel germ line *p53* mutation in Japanese familial gastric cancer. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 3-5, 2007 Yokohama
- ⑨ Iwaizumi M, Shinmura K, Mori H, Yamada H, Ikuma M, Sugimura H: Human Sgol downregulation leads to chromosome instability in human colorectal cancer cells. 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 3-5,

2007 Yokohama

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新村 和也 ( SHINMURA KAZUYA )

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40321880

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし