

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目: 特定領域研究

研究期間: 2008 ~ 2009

課題番号: 20012037

研究課題名(和文)酸化ストレス誘発がんの抑制に關与する分子機構の解明

研究課題名(英文)Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of various types of DNA repair-deficient mice

研究代表者

續 輝久(TSUZUKI TERUHISA)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 40155429

研究成果の概要(和文):酸化ストレスにより誘発される消化管がんの発生を抑制する細胞機能を明らかにするために、DNA 修復関連遺伝子欠損マウスを用いて酸化ストレス誘発消化管がん実験を行った。その結果、*Mth1*、*Ogg1* 遺伝子の酸化ストレス誘発消化管がん抑制における働きは限定的であるのに対し、*Mutyh* 遺伝子に加えて新たに *Msh2* および *Trp53* 遺伝子が酸化ストレス誘発消化管がんの抑制に顕著な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文):To elucidate the roles of DNA repair genes in the suppression of oxidative DNA damage-induced tumorigenesis, we performed KBrO<sub>3</sub>-induced tumorigenesis experiments using *Ogg1*-, *Mth1*-, *Msh2*- or *Trp53*-deficient mice. We observed an enhanced tumor-formation in the small intestines of *Msh2*- or *Trp53*-deficient mice, as compared with the wild type and heterozygous mice. These results indicate that in addition to *Mutyh*, *Msh2* and p53 are involved in the suppression of oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in mice. The number of tumors was marginally increased in *Ogg1*- or *Mth1*-deficient mice, in comparison to the wild-type mice, suggesting that *Ogg1* and *Mth1* may play a limited role in the suppression of intestinal tumorigenesis caused by oxidative stress.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,000,000	0	9,000,000
2009年度	9,000,000	0	9,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,000,000	0	18,000,000

研究分野: 遺伝情報システム異常と発がん(発がん)

科研費の分科・細目: A01 遺伝子変異導入の分子機構

キーワード: 遺伝子、核酸、癌、ゲノム、動物、活性酸素、突然変異、消化管

1. 研究開始当初の背景

酸化 DNA 損傷は生体において自然突然変異を引き起こし、自然発がんの主要な原因と考

えられている。グアニンの酸化体 8-オキシグアニン(8-oxoG) はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので、DNA 中の 8-oxoG は強い突然

変異原性を示し、G:C T:A 変異を引き起こす。8-oxoG等の酸化的損傷に起因する突然変異の抑制系である酵素群について、これまでに *Mth1*, *Ogg1*, *Mutyh*, *Msh2* 遺伝子欠損マウスを樹立し、自然突然変異およびがんの発生を抑制することを示してきた。また、酸化剤  $\text{KBrO}_3$  を飲水投与することで酸化ストレスを負荷された *Mutyh* 遺伝子欠損マウスでは、G:C T:A 変異および小腸発がんの頻度が劇的に上昇することを示し、生体では MUTYH が酸化ストレス誘発突然変異および発がんを効率良く防いでいることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

酸化的 DNA 損傷に起因する突然変異の抑制を行っていると考えられる *Mth1*, *Ogg1*, *Msh2* 遺伝子を欠損したマウスに、酸化ストレスの負荷を与えた条件下での突然変異並びに発がんの解析を行い、酸化的 DNA 損傷に起因する突然変異および発がん抑制におけるそれぞれの遺伝子機能の役割を明らかにすることを目的とする。さらに、DNA 損傷を持つ細胞のアポトーシス誘導および修復遺伝子の発現調節に関与する p53 を欠損したマウス系統についても同様な発がん解析を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

発がん抑制における酸化的 DNA 損傷の防止・修復系の役割を解明することを目的に、標的遺伝子組換えで樹立した各種 DNA 修復能欠損マウスを用いた下記の実験を計画した。

(1) *Mth1*, *Ogg1*, *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて、 $\text{KBrO}_3$  の飲水投与による消化管での酸化ストレスによって誘発される突然変異の解析を行う。

(2) *Mth1*, *Ogg1*, *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて、酸化ストレス条件下における消化管での発がん解析を行う。また、DNA 損傷誘発アポトーシス誘導に関与する *Trp53* 遺伝子欠損マウスを用いて酸化ストレス条件下における消化管での発がん解析を行う。

(3) 遺伝子欠損マウスで消化管腫瘍の発生が顕著に上昇していた場合は、酸化ストレス誘発消化管腫瘍の組織でのがん関連遺伝子の突然変異解析を行う。

(4) マウス個体で発生する突然変異を効率良く解析するために、改変型 *rpsL* 遺伝子トランスジェニックマウスを作製し、従来型の検出系との比較解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 酸化ストレス誘発突然変異

*Mth1*, *Ogg1*, *Msh2* 遺伝子欠損マウスに、0.2%  $\text{KBrO}_3$  を 4 週間飲水投与した後、小腸上皮において誘発される突然変異の解析を行った。*Ogg1* 遺伝子欠損マウスでは  $\text{KBrO}_3$  投与により、G:C T:A 変異が顕著に上昇していた。これらの結果は、OGG1 が 8-oxoG を DNA から取り除くことで酸化ストレスにより誘発される突然変異を抑制していることを示す。一方、 $\text{KBrO}_3$  を投与された *Mth1*, *Msh2* 遺伝子欠損マウスの小腸上皮では 1 塩基欠失変異が顕著に上昇していた。*Msh2* 遺伝子欠損マウスで誘発される 1 塩基欠失変異の生成機構を解明するために、*Msh2* 遺伝子欠損、*Msh2* 遺伝子欠損・MTH1 を用いた酸化ストレス誘発突然変異の解析を行った結果、*Msh2* 遺伝子欠損マウスで高頻度に誘発されていた 1 塩基欠失変異のうち、特定の配列で生じていた変異の頻度が *Msh2* 遺伝子欠損・MTH1 トランスジェニックマウスでは低くなっていたことから、この変異は酸化プリンスクレオチドの取り込みにより生じることが推測された。

### (2) 酸化ストレス誘発発がん

*Mth1*, *Ogg1*, *Msh2*, *Trp53* 遺伝子欠損マウスに、0.2%  $\text{KBrO}_3$  を 16 週間飲水投与した後、消化管に発生する腫瘍数の比較を行った。その結果、*Msh2*, *Trp53* 遺伝子欠損マウスでは消化管腫瘍の発生頻度が顕著に上昇していた。一方、*Mth1*, *Ogg1* 遺伝子欠損マウスでの消化管腫瘍の発生頻度は野生型マウスと比較して 2 倍程度上昇していることを認めた。これらの結果は、MSH2 および p53 が酸化ストレスで誘発される消化管腫瘍を効果的に抑制することを示している。また、酸化ストレス誘発突然変異の抑制に関与している MTH1 と OGG1 は、酸化ストレス誘発発がんの抑制には限定的な働きをしていることが明らかになった。MUTYH およびミスマッチ修復因子は酸化ストレス誘発細胞死に関与していることが報告されており、これらの知見と今回の実験結果とを合わせて考えると、酸化ストレス誘発消化管発がんの過程には、酸化的 DNA 損傷に起因する突然変異と細胞死制御が大きく関与していることが推測される(下図)。

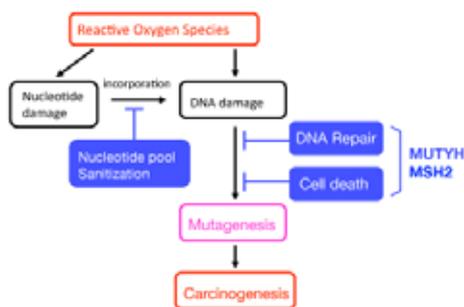
### (3) 酸化ストレス誘発消化管腫瘍のがん関連遺伝子の突然変異解析

*Msh2* 遺伝子欠損マウスにおいて顕著に発生が上昇していた酸化ストレス誘発消化管腫瘍の組織での *Cttnb1* 遺伝子の突然変異解析を行い、これまでに調べた 44 例のうち 15 例に塩基置換変異を認めた。また、*Trp53* 遺伝子欠損マウスで誘発された腫瘍 13 例の *Cttnb1* 遺伝子の突然変異解析を行い、3 例に塩基置換変異を認めた。

### (4) 改変型 *rpsL* 遺伝子トランスジェニックマウスの作製

マウス個体で発生する突然変異を効率良く解析するために、プラスミドの複製起点を変更し、マウスゲノム DNA を切断しない I-CeuI 認識部位を新たに付加した新規 *rpsL* 遺伝子プラスミド pSWAN2 を作製し、トランスジェニックマウスを作製した。これまでに得られたトランスジェニックマウス 3 匹はいずれもトランスジーンのコピー数が 10 コピー以下で、I-CeuI 認識部位の導入でマウスゲノムからプラスミド DNA の回収効率が改善されたものの、従来のトランスジェニックマウス (> 100 コピー) と比較して、マウスゲノム DNA 当りのプラスミド DNA 回収量が低く、実用化には更なる改良が必要である。現在、低コピー数のトランスジーンを濃縮・回収する新たな方法を開発し、新規 *rpsL* 遺伝子トランスジェニックマウス実用化にむけて研究を進めている。

The possible roles of MUTYH and MSH2 in the Avoiding Mechanisms for ROS-induced Carcinogenesis



##### 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 6 件)

T. Nakamura, S. Meshitsuka, S. Kitagawa, N. Abe, J. Yamada, T. Ishino, H. Nakano, T. Tsuzuki, T. Doi, Y. Kobayashi, S. Fujii, M. Sekiguchi vY. Yamagata, Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base., J. Biol. Chem., 285: 444-452, 2010. [査読有]

H. Kamiya M. Uchiyam, J.-S. Piao, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki and H. Harashima, Targeted sequence alteration of a chromosomal locus in mouse liver., Inter. J. Pharmaceutics : 180 183, 2010. [査読有]

K. Komori, Y. Takagi, M. Sanada, T.-H. Lim, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, M. Sekiguchi and M. Hidaka. A novel protein, MAPO1, that functions in apoptosis triggered by O<sup>6</sup>-methylguanine mispair in DNA. Oncogene, 28: 1142-1150, 2009. [査読有]

H. Tsuchiya, M. Uchiyama, K. Hara, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, H. Inoue, H. Harashima

and H. Kamiya. Improved gene correction efficiency with a tailed duplex DNA fragment. Biochemistry, 47: 8754-8759, 2008. [査読有]

H. Kamiya, M. Uchiyama, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki and H. Harashima. Effects of target sequence and sense versus anti-sense strands on gene correction with single-stranded DNA fragments. J. Biochem., 144: 431-436, 2008. [査読有]

Y. Maehara, A. Egashira, E. Oki, K. Kakeji and T. Tsuzuki, DNA repair dysfunction in gastrointestinal tract cancers. Cancer Sci., 99:451-458, 2008. [査読有]

(学会発表) (計 13 件)

T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "Cancer and DNA Repair", Tokyo, 2009.11.10.

續輝久, 酸化ストレス誘発発がんの抑制に關する分子機構の解明 *Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として, 第 51 回日本消化器病学会大会 シンポジウム: S9 炎症と消化器発癌, 京都, 2009.10.15.

松本戴恭, 朴晶淑, 中津可道, 前原喜彦, 續輝久, *Trp53* 欠損マウスを用いた KBrO<sub>3</sub> 投与による酸化ストレス誘発小腸腫瘍の解析, 第 68 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009.10.2.

中津可道, 松本戴恭, 朴晶淑, 續輝久, 酸化ストレス誘発消化管発癌抑制における癌関連遺伝子の働き, 日本遺伝学会第 81 回大会, 長野, 2009.9.16.

T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) Symposium: Cancer Models and Mechanisms, Italy, 2009.8.23.

T. Tsuzuki, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestine of various types of DNA repair-deficient mice, 3rd ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis, Canada, 2009.6.1.

朴晶淑, 磯田拓郎, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久, *Msh2* 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発小腸腫瘍の解析, 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.29.

藏忍, 中津可道, 中別府雄作, 續輝久, 哺乳動物細胞への 8-oxo-dGTP の導入は A:T

C:G 変異を引き起こす, 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.28.

T. Tsuzuki, Prevention of oxidative mutagenesis by MUTYH: Implication in human cancer, Environmental Mutagen Society 39th Annual Meeting, Puerto Rico, USA, 2008.10.21.

T. Tsuzuki, Significance of Error-avoiding Mechanism for Oxidative DNA Damage in Carcinogenesis, 9th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Poland, 2008.09.05.

續輝久, 酸化ストレス誘発発がんの抑制に関与する分子機構の解明 - Mutyh 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がんの解析を中心として, 第 14 回日本家族性腫瘍学会学術集会, 東京, 2008.06.20.

Y. Nakatsu, J. Piao, T. Isoda, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, T. Tsuzuki, Oxidative Stress-Induced Tumorigenesis in the Small Intestine of Various DNA Repair-Deficient Mice, 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA (IWRDD), 福島, 2008.06.08.

中津可道, 朴晶淑, 磯田拓郎, 續輝久, 作見邦彦, 中別府雄作, DNA 修復関連遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発消化管発がん, がん予防大会 2008 福岡 (第 9 回日本がん分子疫学研究会 / 第 15 回日本がん予防学会 / 第 31 回日本がん疫学研究会), 福岡, 2008.05.22.

(図書) (計 2 件)

T. Tsuzuki, T. Isoda, J. Piao, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of DNA repair-deficient mice, Proceeding: The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund "Cancer and DNA Repair" (in press)

T. Tsuzuki, T. Isoda, J. Piao, K. Yamauchi, A. Egashira, K. Sakamoto, S. Kura, K. Sakumi, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Significance of Error-avoiding Mechanisms for Oxidative DNA Damage in Carcinogenesis, International Proceeding: 9th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Ed. H. Kozlowski, Medimond, 2008.

[その他] ホームページ等

基礎放射線医学 (分子遺伝学) 分野の URL  
<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/biophys/>  
九州大学研究者情報の URL  
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>

研究代表者 : 續輝久

[<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002228/index.html>]

研究分担者 : 中津可道  
[<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K000504/index.html>]

研究分担者 : 大野みずき  
[<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003401/index.html>]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

續輝久 (TSUZUKI TERUHISA)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 40155429

(2) 研究分担者

中津可道 (NAKATSU YOSHIMICHI)  
九州大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 00207820  
大野みずき (OHNO MIZUKI)  
九州大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号: 70380524

(3) 連携研究者

八尾隆史 (YAO TAKASHI)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 20243933