

平成22年 6月15日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890254
 研究課題名（和文） ras 遺伝子変異による発がん過程での活性窒素を介した DNA 損傷の役割とがん予防
 研究課題名（英文） The role of DNA damage by reactive nitrogen species in carcinogenic process caused by oncogenic K-ras mutation.
 研究代表者
 大西 志保 (OHNISHI SHIHO)
 鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手
 研究者番号：80511914

研究成果の概要（和文）：肺がんでは K-ras 遺伝子の変異が多いが、発がんまでには多段階を経るため、10以上の遺伝子に変異が起これと考えられる。本研究では、K-ras 変異による肺腫瘍形成において、炎症を介さないで DNA 損傷塩基(8-ニトログアニンなど)が生成・蓄積することを明らかにした。8-ニトログアニンは更なる変異に繋がるため、K-ras 変異による発がん・がん進行に重要な役割を果たすと考えられ、有効なバイオマーカーとなる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：K-ras mutations are frequently observed in human lung cancer. On the other hand, it is considered that carcinogenesis consists from multi-step process with mutations in more than 10 genes. In this study, 8-nitroguanine and 8-oxodG was apparently formed in lung adenocarcinoma caused by oncogenic K-ras, without inflammation. It is reported that 8-nitroguanine and 8-oxodG can cause mutations. These suggest that the accumulation of mutagenic 8-nitroguanine and 8-oxodG contributes to promotion of lung carcinogenesis initiated by K-ras mutation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：DNA 損傷、発がん機構、ras 遺伝子、8-ニトログアニン、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

我が国での悪性新生物による死亡数は依然増加しており、部位別では肺がんが男性で第1位、女性でも第3位である。ヒト腫瘍の約3割で ras がん原遺伝子の変異が見つかり、肺がんでは ras 遺伝子の中でも K-ras の変異が多い(N.E.Mills et al. *Cancer*

Res. 1995)。遺伝子改変マウスでは、K-ras 遺伝子のコドン 12 にアミノ酸置換型変異を入れた活性型 K-ras(G12)を発現させると、早期肺癌を引き起こす(L.Johnson et al. *Nature* 2001, R.Meuwissen et al. *Oncogene* 2001)。以上より、K-ras 遺伝子コドン 12 の変異が肺がん発生機構に大きく関与してい

ると考えられる。

一方、発がん機構の多段階説によれば単一遺伝子の変化ではがんの発生に不十分であり、**K-ras** 変異による腫瘍形成から発がんに至る過程で、何らかの要因による DNA 損傷が生成して更なる変異が蓄積し、腫瘍のプログレッションを促進して癌化すると予測できる。

一般に腫瘍形成部位では炎症をとまなうことから、炎症細胞から活性酸素や活性窒素が生成して DNA を損傷し、変異を蓄積すると考えられる。8-ニトログアニンは炎症部位で生成する活性窒素によって起こる DNA 損傷塩基で、突然変異を誘発する (X.Wu. Et al. *Cancer Res.* 2006)。また、胃がんの原因となるヘリコバクター・ピロリ菌の感染 (N.Ma et al. *BBRC* 2004)、胆管細胞がんの原因となるタイ寄生虫感染 (S.Pinlaor et al. *BBRC* 2003)などの患部で発がんに先駆けて生成しており、8-ニトログアニンの蓄積は発がんとも深い関連があると考えられる。

よって、**K-ras** 遺伝子の変異活性化により発生した肺腫瘍において、8-ニトログアニンの生成・蓄積とがん化との関連を解析することは、非常に興味深い。

2. 研究の目的

変異活性化型 **K-ras** 遺伝子の発現を起因とする肺腫瘍形成および発がん過程において、DNA 損傷の生成・蓄積がおこっていることを明らかにする。具体的には、炎症部位で生成する活性窒素によって起こる DNA 損傷塩基の 8-ニトログアニン、および酸化ストレス条件下で生成する DNA 損傷塩基の一つであり、酸化的 DNA 損傷のマーカーとして有名な 8-oxodG について、生成・蓄積の有無を明らかにする。また、これら DNA 損傷塩基の蓄積と **K-ras** 変異による肺がん発生との関連を明らかにする。

8-ニトログアニンおよび 8-oxodG の生成が腫瘍形成にもなう炎症によるものか、変異型 **K-ras** の発現に起因する下流シグナル誘導によるものかを明らかにし、**K-ras** 変異による発がん過程における DNA 損傷の生成機構を解明する。さらに多段階発がん説をふまえて DNA 損傷塩基の発がん過程における役割を明らかにし、バイオマーカーとしての有効性を検討する。

3. 研究の方法

発がんモデルとして活性変異型がん遺伝子 **K-ras(G12)** を任意の時期に発現できるコンディショナル・ターゲティングマウスを用いて解析を行った。このマウスは **Cre-loxP** 系を用いて、**Cre** リコンビナーゼにより変異型 **K-ras** を発現させることができるよう遺伝子改変してある。正常型 **K-ras** 遺伝子は生存

に必須であるため、正常型 **K-ras** を変異型 **K-ras** に置きかえたマウスは生育しないが、このマウスは通常は正常型 **K-ras** のみ発現しているため、普通に発育する。**Cre** リコンビナーゼ遺伝子を組込んだアデノウイルスを気管投与して呼吸器系に変異型 **K-ras(G12)** を発現させると、肺腫瘍を形成する。(研究協力者：三重大学 生命科学支援センター 動物機能ゲノミクス、鈴木昇 准教授、齋藤浩充 助教)。

変異型 **K-ras** 発現後、数週ごとにマウスを解剖し、肺組織をホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。コントロールとして **Cre** リコンビナーゼを作用させない遺伝子改変マウスと、野生型マウスの肺組織を用意し、パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E 染色) を行い、炎症細胞の分布およびがん進行度を解析した。変異型 **K-ras** 発現部位を **LacZ** による青色発色で確認した。

特異性の高い抗 8-ニトログアニン ウサギポリクローナル抗体を用意した。(研究協力者：鈴鹿医療科学大学 薬学部、川西正祐教授)。抗 8-ニトログアニン抗体、および市販の抗 8-oxodG 抗体を用いて免疫組織化学的に DNA 損傷塩基生成の解析を行った。誘導型一酸化窒素(NO)合成酵素(iNOS)、NF- κ B などの炎症関連因子、**RAF**、**IKK**、**I κ B** などの **K-ras** 下流因子についても、市販の抗体を用いて解析した。変異型 **K-ras** 発現、炎症、DNA 損傷塩基生成およびがん進行度の関連を解析した。

結果図は、代表的な像の写真を載せたが、各条件ともマウスは3匹ずつ解析して再現性を確認した。

4. 研究成果

変異型 **K-ras** を呼吸器系に発現させてから 3、6、9 週で解剖したマウスの肺組織を免疫組織化学的に解析した結果、変異型 **K-ras** の発現が増加して腫瘍形成が進むにつれて、DNA 損傷塩基 8-ニトログアニンの生成・蓄積が増加していることが明らかとなった (図 1)。とくに腫瘍形成部位において、8-ニトログアニンの生成が顕著にみられた。野生型コントロールマウスの肺、および遺伝子改変マウスで変異型 **K-ras** 遺伝子を発現させなかったコントロールマウスの肺では、8-ニトログアニンの生成は認めなかった。

酸化的 DNA 損傷塩基の 8-oxodG についても同様に解析した結果、変異型 **K-ras** 発現が増加して腫瘍形成が進むにつれて、生成・蓄積が増加していることが明らかとなった。局在は、おおむね 8-ニトログアニンと一致していた。コントロールマウスの肺では、生成は認めなかった。

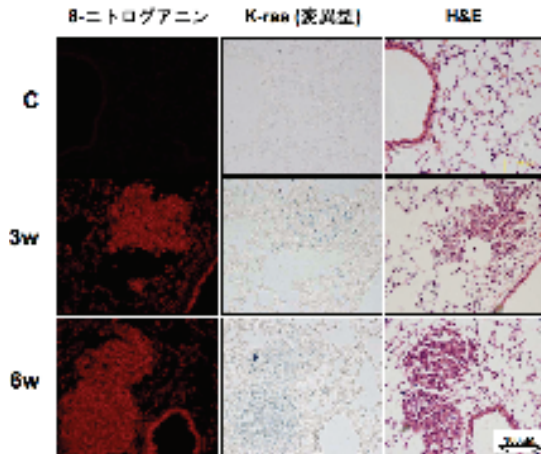


図1. 変異型 K-ras 発現マウス肺における腫瘍形成と 8-ニトログアニンの発現. C(上段): コントロールマウス肺, 3w(中段): 変異型 Kras 発現後 3 週のマウス肺, 6w(下段): 変異型 Kras 発現後 6 週のマウス肺. 8-ニトログアニンは Alexa594 赤色による染色、変異型 K-ras は LacZ 青色による染色.

腫瘍形成過程で蓄積する DNA 損傷塩基の生成機構を解明するため、さらに詳細に検討した結果、肺腫瘍部位では、炎症細胞浸潤などの炎症所見が認められなかったにもかかわらず、炎症関連因子の NF- κ B と iNOS が発現していた。(図2)

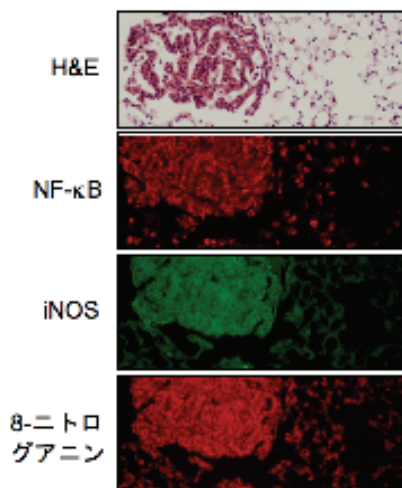


図2. 変異型 K-ras 発現後 6 週のマウス肺の腫瘍部位における NF- κ B, 誘導型 NO 合成酵素 iNOS, 8-ニトログアニンの発現.

変異型 K-ras により ERK が活性化した後 (Roberts PJ. et al. Oncogene 2007, Liu AMF and Wong YH. JBC 2005), NF- κ B が活性化して iNOS が発現誘導され、活性酸素や NO ラジカルなどの活性酸素が生成し、DNA 損傷塩基の 8-ニトログアニンおよび

8-oxodG が生成・蓄積したと考えられる。(図3)

一般に腫瘍形成部位では炎症をとめない、炎症によって生じる活性種が発がん・がん進行に寄与すると考えられる。しかし本研究では、変異型 K-ras による炎症を介さない iNOS 発現と DNA 損傷塩基の蓄積が明らかになったことは重要な成果である。

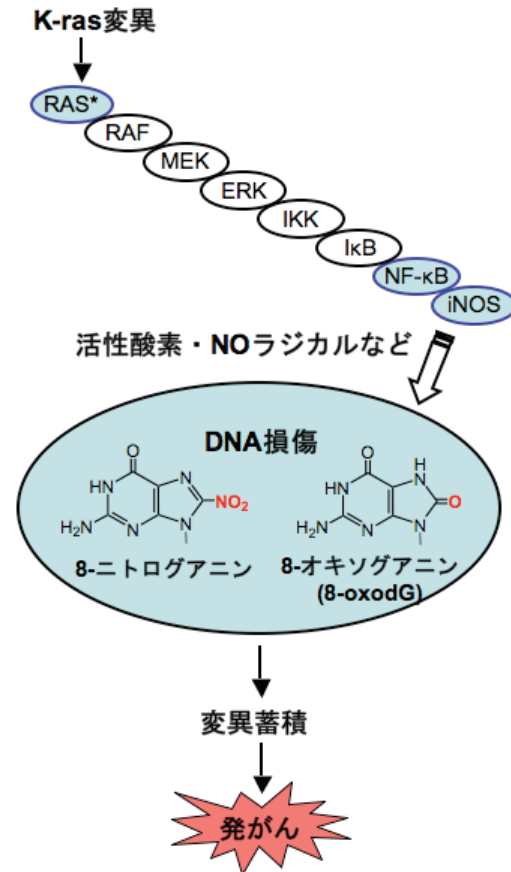


図3. 変異型 K-ras による DNA 損傷塩基の生成機構と発がん機構の推定図.

正常な K-ras 遺伝子は細胞増殖を調節する生存に必須の遺伝子であるが、変異活性型になると増殖シグナルが常に入ったままの状態になり、腫瘍形成にいたる。本研究では、K-ras 変異による肺腫瘍の形成過程において、変異型 K-ras が下流シグナルを誘導し、活性酸素を介して DNA 損傷を引き起こす可能性が示された。ここで確認された DNA 損傷塩基の 8-ニトログアニンと 8-oxodG は、いずれも変異誘発性であることから、更なる遺伝子変異につながり、多段階発がんに関与すると考えられ、非常に興味深い。K-ras 変異による発がん・がん進行過程においても、8-ニトログアニンが有効なバイオマーカーになると考えられ、今後さらに詳細な検討が必要である。

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)

[学会発表] (計5件)

- ①. 大西志保: マウスにおける K-ras がん遺伝子活性化によるニトロ化 DNA 損傷と質量分析装置による解析. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜市, 2009年10月1日
- ②. Ohnishi Shiho: NITRATIVE AND OXIDATIVE DNA DAMAGE BY K-RAS MUTATION IN MICE. 第10回国際環境変異原学会, イタリア国フィレンツェ市, 2009年8月22日
- ③. 大西志保: K-ras 遺伝子変異マウスにおけるニトロ化 DNA 損傷. 第9回日本NO学会学術集会, 静岡市, 2009年5月8日
- ④. 大西志保: Ras 遺伝子変異マウスにおける酸化およびニトロ化 DNA 損傷. 日本環境変異原学会第37回大会, 宜野湾市, 2008年12月4日
- ⑤. 大西志保: マウスにおける K-ras がん遺伝子活性化によるニトロ化および酸化的 DNA 損傷. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋市, 2008年10月28日

[図書] (計4件)

- ①. Kawanishi Shosuke, Ohnishi Shiho: Chapter IX, Oxidative DNA Damage and DNA Adducts Induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aromatic Amines, in DNA Adducts Formation, Detection and Mutagenesis (Editors: Emerson Alvarez, Roberto Cunha), Nova Science Pub Inc., 2010, p.169-181
- ②. 大西志保, 川西正祐: 第3章 発がん過程, 3.1 イニシエーションとプロモーション, 3.3 活性酸素、一酸化窒素による遺伝子損傷, 3.4 遺伝子変異・修復, 3.5 がん関連遺伝子、腫瘍薬学 (川西正祐, 中瀬一則, 大井一弥 編) 南山堂, 2010, p.33-35, p.41-53
- ③. Kawanishi Shosuke, Ohnishi Shiho: K-ras activation and oxidative DNA damage, in Free Radicals, Health and Lifestyle (Editors: Daniela Caporossi, Fabio Pigozzi, Stefania Sabatini), Medimond, 2009, p.75-78
- ④. 川西正祐, 大西志保: 第1章 炎症, C.2 炎症とがん、炎症・再生医学事典 (松島綱治, 西脇徹 編) 朝倉書店, 2009, p.328-331

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 志保 (OHNISHI SHIHO)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号: 80511914

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし