

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591736

研究課題名（和文） 大腸癌における低酸素誘導ゲノム不安定性の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of hypoxia-induced genome instability in human colorectal cancer

研究代表者

逸見 仁道（HEMMI HIROMICHI）

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：90165514

研究成果の概要（和文）：

hMSH3欠損により起こるゲノム不安定性の一つであるEMASTの本邦での頻度を調べたところ、米国と同様約60%であった。ヒト由来細胞株での低酸素によるhMSH3発現抑制を調べたところ、3つの型（迅速型、中間型、無反応型）が見られ、中間型はp53変異細胞で起こっていた。臨床検体においても低酸素はhMSH3発現を抑制していた。EMAST腫瘍発生には一過性の低酸素条件のみでは不十分であり、低酸素と再酸素供給を繰り返すことによりEMASTが誘導されると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Frequency of EMAST, a phenotype of genetic instability, in Japan was approximately 60%, which is similar to USA. Down-regulation of hMSH3 by hypoxia was studied in human cell lines derived from different origins including colon. Three patterns: rapid, moderate, and none responses were observed. Moderate type was observed in cells having mutant p53. Histochemical staining of clinical samples supports that down-regulation of hMSH3 is induced by hypoxia. Transient hypoxia is not enough for generation of EMAST tumor. Repeated states of hypoxia-reoxygenation may require for induction of EMAST.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：遺伝子，大腸がん，ゲノム不安定性，EMAST，発現制御，低酸素，DNA修復

1. 研究開始当初の背景

多くの固形腫瘍では hypoxia (低酸素)状態にある細胞塊が混在し、放射線や化学療法に抵抗性を示すことが知られている。低酸素腫瘍には慢性的部位と一時的部位とがあり、それ

ぞれ細胞内代謝経路が異なると云われている。低酸素状態ではいくつかのDNA修復関連遺伝子の発現が抑制され、その結果、ゲノム不安定性、即ち、DNA変異速度の上昇を招き、悪性度の増悪を招いていると考えられてい

る。低酸素状態で発現が変化する遺伝子が数多く報告されているが、その意義や分子機構は必ずしも明確になっている訳ではない。

2. 研究の目的

本研究では一過性の低酸素状態でのゲノム不安定性誘導の分子機構を明らかにすることを目的として、DNA ミスマッチ修復 (MMR) 遺伝子発現制御機構に焦点を絞った研究を行う。

3. 研究の方法

低酸素でのDNA修復関連遺伝子の発現抑制機構の解明のための試験管内細胞株モデルの構築と病理切片を用いて関連遺伝子の発現状態の把握を行う。試験管内モデルの構築には主としてヒト大腸がん由来細胞株を用いる。発現抑制機構解明の対象遺伝子としてDNA ミスマッチ修復 (MMR) 遺伝子のうちMSH3に焦点を当て、発現の有無や程度を検討する。更に、大腸がん患者の臨床検体を対象に免疫組織染色を行い、MSH3欠損の有無を検討する。

4. 研究成果

ゲノム不安定性の1表現型であるEMAST誘発の分子機構を明らかにすることを主目的として、低酸素状態でのDNAミスマッチ修復遺伝子hMSH3を中心とした発現制御機構の解析を行った。即ち、ヒト樹立細胞株を用いたin vitroモデル系を確立し、hMSH3, hMSH2, hMLH1遺伝子の発現抑制機構の解明ならびに大腸がん臨床検体での病理組織学的検討を行った。

(1) 本邦でのEMAST発生頻度

我々の研究グループは米国での大腸がんにおけるEMAST発生頻度を調べ、おおよそ50-60%であると報告した。そこで、本邦における頻度を90検体を対象に同様の手法で調べたところ、ほぼ同等であることが分かった。

(2) 低酸素によるMSH3発現抑制

大腸がん由来樹立細胞株を含むヒト腫瘍由来細胞株10株について、低酸素によるhMSH3発現抑制を検討したところ3つのパターンが観察された。①発現が2-3日程度で抑制される迅速な細胞株 (迅速型) ②発現抑制がプラトーに達するのに6日間程度必要とする緩慢な細胞株 (中間型)。③全く抑制が見られない細胞

株 (無反応型)。中間型を示す細胞株に共通しているのはp53変異であり、正常p53により抑制速度が早まることから、迅速な抑制にはp53分子が関わっていることが示唆された。次に、転写抑制へのHIF-1 α の関与を検討したところ、早期にプロモーター領域に存在する2ヶ所のHREを介して関わっていることが明らかとなった。更に、HIF-1 α ノックダウン実験から、HIF-1 α は発現抑制の引き金とはなっていないことが示唆された。

(3) 臨床検体を用いた病理組織学的検討

EMAST陽性及び陰性腫瘍での低酸素マーカーであるGLUT1過剰発現とhMSH3発現抑制との関連を病理組織切片で検討した。EMAST陽性腫瘍ではGLUT1過剰発現とhMSH3発現抑制との間に関連が見られた。このことから臨床検体においても低酸素によりhMSH3発現抑制が引き起こされていることが示唆された。

(4) EMAST腫瘍発生機構の検討

低酸素によるEMAST腫瘍発生機構を細胞株を用いて検討した。hMSH3はhMSH2とhMutS β と呼ばれるheterodimerを形成し、hMSH6はhMSH2とhMutS α を形成する。p53異常細胞株ではhMSH2の発現抑制がほとんど見られないことから、hMutS α 経路が機能し、hMutS β 経路が機能しない状況が生じると考えられた。このことはEMASTがp53変異細胞で起こることを意味する。しかしながら、hMutS α やhMutS β 経路に共通な下流のhMLH1はp53機能に関係なく低酸素で抑制されることから、一過性の低酸素状態のみではEMAST発生を説明しきれない。低酸素—再酸素供給により、EMASTを含むゲノム不安定性が誘導されると考えられた。

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5件)

1. Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Koike J, Hemmi H, Balaguer F, Nagasaka T, Koi M, Boland CR, Goel A. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition

- (EMT) in human colorectal cancer metastasis. GUT 査読有 in press, 2012
2. Li J, Koike J, Kugoh H, Arita M, Ohhira T, Kikuchi Y, Funahashi K, Takamatsu K, Boland CR, Koi M, Hemmi H. Downregulation of MutS homolog 3 by hypoxia in human colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 査読有 2012 Apr;1823(4):889-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.017>
 3. Yamada K, Kanazawa S, Koike J, Sugiyama H, Xu C, Funahashi K, Boland CR, Koi M, Hemmi H: Microsatellite instability at tetranucleotide repeats in sporadic colorectal cancer in Japan. *Oncol Rep*. 査読有 2010 Feb;23(2):551-61
 4. Han Z, Dimas K, Tian X, Wang Y, Hemmi H, Yamada K, Kato N, Pantazis P, Ramanujam RJ, Anant S, Wyche JH, Houchen CW. 14-3-3 σ -dependent resistance to cisplatin. *Anticancer Res*. 査読有 Jun;29(6):2009-2014, 2009.
 5. Koike J, Funahashi K, Saito N, Shirasaka K, Hemmi H, Kaneko S, Teramoto T: FOLFOX therapy for advanced metastatic rectal cancer with Gibert syndrome. *J Toho Med Soc* 査読有 56(1), 27-32, 2009.
- [学会発表] (計 11 件)
1. 有田通恒, 李傑, 菅野新一郎, 菊池由宣, 安井 明, 近藤元就, 逸見仁道: 低酸素によるhMLH1発現抑制時の転写因子 CXXC5, SYF2 およびhnRPH1の関与. 第 3 4 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12
 2. 李傑, 有田通恒, 柴田祐充子, 岩崎維和夫, 黒岩実, 近藤元就, 逸見仁道: N-myc非増幅神経芽腫細胞におけるN-mycの役割. 第 5 3 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋. 2011.11
 3. 有田通恒, 李傑, 安井明, 近藤元就, 逸見仁道: 低酸素によるhMLH1発現抑制におけるSYF2およびhnRPH1の役割. The 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, 2011. 9
 4. Garcia M, Choi C, Kim H, Koike J, Hemmi H, Li J, Nagasaka T, Boland CR, Koi M : Identification of gene loci with microsatellite repeats frequently altered in liver metastasis exhibiting moderate levels of microsatellite instability from primary CRC. *Digestive Disease Week 2011*, May 17, 2011, Chicago, IL.
 5. Goel A, Hemmi H, Koi M, Boland CR, et al., MicroRNA-200c/141 cluster as a control switch between epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in human colorectal cancer metastasis. *Digestive Disease Week 2011*, May 17, 2011, Chicago, IL.
 6. 李傑, 有田通恒, 児井稔, 逸見仁道: 大腸がん由来細胞株におけるhMSH3転写制御機構. 第 3 3 回日本分子生物学会・第 8 3 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12
 7. 有田通恒, 李傑, 菅野新一郎, 安井 明, 逸見仁道: CXXC5とSYF/p29によるhMLH1転写制御, a zinc finger protein. 第 3 3 回日本分子生物学会・第 8 3 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010.12
 8. Li J, Arita M, Koike J, Hemmi H. Regulation of MMR genes and stem cell markers in hypoxia in colorectal cancer cells. (English workshop) The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka, 2010.9
 9. Arita M, Li J, Yasui A, Hemmi H. A novel transcriptional regulator, CXXC5 zinc finger protein, for a DNA mismatch repair gene, hMLH1. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka, 2010.9
 10. 有田通恒, 李傑, 菅野新一郎, 安井 明, 逸見仁道. Transcriptional regulation of the hMLH1 gene by CXXC5, a zinc finger protein. The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Yokohama, 2009, 12
 11. Li J, Min Z, Arita M, Koi M, Hemmi H: A study in regulatory mechanism of the MSH3 gene expression. The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Yokohama, 2009, 12

6. 研究組織

(1) 研究代表者

逸見 仁道 (HEMMI HIROMICHI)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：90165514

(2) 研究分担者

渋谷 和俊 (SHIBUYA KAZUTOSHI)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20196447

有田 通恒 (ARITA MICHITSUNE)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80307719

小池 淳一 (KOIKE JUNICHI)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：30339155

(3) 連携研究者

金澤 真作 (KANAZAWA SHINSAKU)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：00408767

(4) 研究協力者

李 傑 (LI JIE)

東邦大学・医学部・大学院生

山田 かなえ (YAMADA KANAE)

東邦大学・医学部・研究生