

## 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 24日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591815

研究課題名（和文） クロム酸塩に暴露したヒト肺癌におけるDNA二本鎖切断を修復する遺伝子の異常の検討

研究課題名（英文） The abnormality of some genes which repair DNA double strand break in lung cancer of the workers with chromate exposure.

研究代表者

近藤 和也 (KONDO KAZUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10263815

研究成果の概要（和文）：ヒトクロム肺癌のDNA修復遺伝子MRE11のpoly(T)11領域の遺伝子異常の有無を検索した。キャピラリーDNAシーケンサーを用いて、fragment解析した。クロム肺癌では、7/28（25%）にpoly(T)11の欠損を認め、非クロム肺癌では、1/25（4%）に欠損を認めた（ $p=0.033$ ）。クロム肺癌のMRE11の異常は、7例全て1個の欠損であった。microsatellite instability 症例4/18（22%）に欠損を認めた。一方、microsatellite stable 症例3/10（30%）に欠損を認め、両者間に頻度の差を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：We examined abnormality of the poly(T) region of the DNA repair gene, MRE11 in lung cancers with chromate exposure or without exposure. We performed fragment analysis using capillary DNA sequencer. The deletion of MRE11 gene of chromate lung cancers was significantly higher than that of non-chromate lung cancer (7 (25%) versus 1 (4%),  $p=0.033$ ). In chromate lung cancer, microsatellite instability case had 4 (22%) deletion, and microsatellite stable case had 3 (30%) deletion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：クロム肺癌、microsatellite instability、DNA修復、MRE11遺伝子、mononucleotide repeat、扁平上皮癌、職業性肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

最近、ヒトのDNA修復経路についても明らかになってきた。DNA損傷のタイプに基づいて、①直接的損傷逆転、②ミスマッチ修復(mismatch repair)、③塩基除去修復(base excision repair)、④ヌクレオタイド除去修復(nucleotide excision repair)、⑤2本鎖

DNA切断の相同修復(homologous recombination)と非同相修復(nonhomologous end joining)に分けられる(The basic science of oncology, 4<sup>th</sup> ed, Tannock et al)。

特に、蛍光顕微鏡の進歩によって、二本鎖DNAの切断(DNA double strand break)時の

修復の機構が明らかになってきた。二本鎖 DNA が切断されると、速やかに高次クロマチン構造ヒストン構成蛋白 gamma-H2A.X が生成され、NBS1/MRE11/RAD50 複合体を補充し、また DNA 損傷シグナルに関与する DNA-PK, ATM, BRCA1 および 53BP1 蛋白を補充する。ATM キナーゼの補充により p53, CHK2, SMC-1 が続いてリン酸化され、細胞周期の G1 期, S 期, G2 期のチェックポイントを制御し、DNA の修復を行う時間を稼いだり、あるいは細胞死に導く (Genes Dev 14: 927-, 2000, J Cell Biol 153:613-, 2001)。

私たちは、今までにクロム酸塩に暴露したクロム工場労働者に発生した肺癌 (ヒトクロム肺癌) の遺伝子異常について研究してきた。クロム肺癌では、通常の肺癌に多く認められる癌抑制遺伝子 p53、癌遺伝子 Ki-ras, Ha-ras の遺伝子異常の頻度は少なく (Biochem Biophys Res Commun 239: 95-, 1997, Am J Ind Med 40:92-, 2001)、第 3 染色体短腕 3p の LOH は同程度であった (Mol Carcinogenesis 33:172-, 2002)。

しかし、MSI は高頻度で、MSI の頻度とクロム暴露歴の間に相関を認めた (Mol Carcinogenesis 33:172-, 2002)。MSI と DNA 修復遺伝子 hMLH 蛋白の発現の低下との間に相関を認めた (Mol Carcinog 42:150-, 2005)。さらに、hMLH 蛋白の発現の低下が hMLH1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化に由来していることを示した (現在論文作成中)。

クロムの発癌においては、DNA 修復遺伝子 hMLH 遺伝子のメチル化→蛋白の発現の低下→MSI の増強→癌関連遺伝子の異常、という pathway (hereditary nonpolyposis colon cancer: HNPCC や散発性の大腸癌の約 15% の発癌過程) が示唆された。

最近、MSI を示す大腸癌や胃癌で、二本鎖 DNA の切断 (DNA double strand break) 時の修復の機構の中心的役割を示す各遺伝子の異常が高頻度で認められている。MRE11 には、イントロン 4 の poly(T)11 (チミンが 11 個並ぶ) 領域があり、RAD50 には、エクソン 13 に (A)9 (アデニンが 9 個並ぶ) 領域があり、NBS1 には、(A)7 領域がある。

MSI を示す癌では、hMLH, hMSH などの DNA mismatch repair の遺伝子に異常があり、mononucleotide repeat (同じ塩基が連続する領域) の異常 (insertion や deletion) を起こしやすい。こうした領域の異常により

frame shift や splicing 異常が出現し、完全な蛋白が作成されなくなり、DNA 修復の機能が阻害される (European Journal of Human Genetics 15, 922-, 2007)。二本鎖 DNA の切断時の修復の機構の破綻は、染色体不安定性を生じ、癌化の原因となる。

クロム肺癌では高頻度に MSI が認められるため、DNA 修復遺伝子 NBS1、MRE11、RAD50 mononucleotide repeat 領域の異常を生じ、その蛋白の発現が低下し、DNA double strand break の DNA 修復の機能に破綻をきたしている可能性がある。

## 2. 研究の目的

クロム酸塩は、有名な吸入発癌物質であり、様々な染色体異常や single や double strand break、DNA 付加体などの DNA 損傷を生じることが知られている。私たちは、今までに、クロム肺癌における DNA 修復遺伝子 hMLH 遺伝子のメチル化→蛋白の発現の低下→MSI の増強→癌関連遺伝子の異常、という発癌過程を示してきた。

今回、MSI の増強→二本鎖 DNA 切断の修復遺伝子 NBS1、MRE11、RAD50 の mononucleotide repeat の異常→修復遺伝子 NBS1、MRE11、RAD50 蛋白発現の低下→二本鎖 DNA 切断の修復の破綻→染色体不安定性 という発癌過程を推測している。クロム肺癌において、MRE11 遺伝子のイントロン 4 の poly(T)11 領域、RAD50 遺伝子のエクソン 13 の (A)9 領域、NBS1 遺伝子の (A)7 領域の異常について検討し (平成 21 年)、さらに、クロム肺癌における NBS1、MRE11、RAD50 蛋白発現について免疫組織学的に検討する (平成 22 年)。

肺癌の 70-80% が染色体異数性を呈し、発癌過程に CIN が大きく関わっていることが示唆される。この染色体不安定性の原因として、DNA double strand break の修復機構

(homologous recombination と nonhomologous end joining) と紡錘糸集合チェックポイント機構の破綻が強く関連していることが報告されている (oncogene 21: 6884-, 2002)。DNA double strand break の修復機構において、NBS1/MRE11/RAD50 複合体は中心的な働きをしているが、各遺伝子の異常に関しては詳細には報告されていなかった。

最近、これらの遺伝子の中に mononucleotide repeat 領域があり、

DNA mismatch repair機構に異常がある腫瘍で、mononucleotide repeat領域に異常を高頻度に認めた。さらに、その蛋白の発現にも異常を認めた(Cancer Res 61:36-2001, Carcinogenesis 25: 2337-, 2004, Oncogene 8: 2640-, 2004)。

これらの報告は、MSIの増強→二本鎖DNA切断の修復遺伝子NBS1、MRE11、RAD50のmononucleotide repeatの異常→修復遺伝子NBS1、MRE11、RAD50蛋白発現の低下→二本鎖DNA切断の修復の破綻→染色体不安定性という発癌過程を示唆する。

### 3. 研究の方法

A) クロム肺癌において、MRE11遺伝子のイントロン4のpoly(T)11領域の異常について検討する。

#### 1) 材料

私たちはクロム肺癌28例38病変についてMSI(microsatellite instability)を検討した。

MSIが2個以上ある症例をRER(replication error)陽性とする、38例中30例がRER症例であった。この38病変のDNAに対して検討する。

コントロールとして、クロム酸塩に暴露していない扁平上皮肺癌26例26病変について同様にMSIを検討し、26例中4例(15%)にRERを認めた。この26病変について検討する。

#### 2) 方法

i) MRE11遺伝子のペアのprimerを作製する。5'側のprimerには、6-FAMの蛍光標識をしておく。

MRE11 - F 5' -TGGAGGAGAATCTTAGGAAAA-3'

MRE11 - R 5' -AATTGAAATGTTGAGGTGCC-3'

ii) MRE11遺伝子に特異的なprimerを使用し、PCRを行う。

Denature	94°C	30 s
Annealing	52-55°C	30 s
Extension	72°C	1 m
40cycles		

iii) PCR productをpolyacrylamide gelにて電気泳動し、GeneScan Analysisソフトウェア(Applied Biosystem, USA)にて、fragment解析する。

A) 4つの遺伝子のfragment解析で以上があったサンプルに対して、シーケンサーにて塩基配列を決定し、insertionやdeletionを確認する。

B) クロム肺癌において、以前に検索したmicrosatellite instabilityの有無およびパターン(type A: 6塩基以下のinsertionまたはdeletion、type B: 8塩基以上のinsertionまたはdeletion)とMRE11遺伝子のmononucleotide repeatの異常の関連を検討する。

### 4. 研究成果

私たちは、クロム酸塩に暴露したクロム工場労働者に発生した肺癌(ヒトクロム肺癌)では、microsatellite instability(MSI)は高頻度であることを報告し、DNA double strand breakのDNA修復蛋白MRE11には、イントロン4のpoly(T)11(チミンが11個並ぶ)領域があるので、この領域の遺伝子異常の有無を検索した。

H21年度は、MRE11遺伝子のイントロン4 poly(T)11(チミンが11個並ぶ)領域を特異的なprimerを使用し、PCRにて増幅した。ホルマリン固定パラフィン包埋材料から抽出したDNAなので、増幅効率が悪い、nested PCR法に改良した。First PCRのPCR productを100倍希釈し、2<sup>nd</sup> PCRを行い、この領域を増幅した。増幅したこの領域をdirect sequencing法にて塩基配列を検討した。クロム肺癌において、3例には異常を認めなかったが、2例はpoly(T)が10、9個と短縮していた。

H22年度は、症例数が多いため、キャピラリーDNAシーケンサー(ABIプリズム3100のgene scan)を用いて、fragment解析にて、poly(T)の欠損を検討した。クロム肺癌において、28例中7例(25%)にpoly(T)11の欠損を認めた。

H23年度は、非クロム肺癌(クロム酸塩に暴露していない肺癌)について、poly(T)の欠損を検討した。25例中1例(4%)にpoly(T)11の欠損を認めた。

クロム肺癌が、MRE11のpoly(T)11領域の遺伝子異常を有意に多く認めた(p=0.033, カイ2乗検定)。クロム肺癌のMRE11の異常は、7例全てpoly(T)1個の欠損であり、2個以上の欠損を認める症例は認めなかつ

た。MSI 症例 18 例中 4 例(22%)に poly(T)の欠損を認めた。一方、Microsatellite stable 症例 10 例中 3 例(30%)に poly(T)の欠損を認め、両者間に poly(T)欠損の頻度の差を認めなかった。クロム肺癌で、この領域の異常は非クロム肺癌より有意に多いが、MRE11 蛋白の発現が低下し、DNA double strand break の DNA 修復の機能に破綻をきたしているかどうか、検討するため、MRE11 の蛋白発現を免疫染色にて検討している。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①白石 真理子, 近藤 和也, 岩佐 裕介, 藤田 結衣, 大岩 由香里, 高井 チカ子, 滝沢 宏光, 中川 靖士, 鳥羽 博明, 川上 行奎, 梶浦 耕一郎, 監崎 孝一郎, 先山 正二, 丹黒 章、クロム酸塩に暴露したヒト肺癌における dsDNA の切断を修復する DNA 修復遺伝子の異常の検討、2011. 11. 3、第 52 回日本肺癌学会総会、大阪国際会議場 (大阪市)

②岩佐裕介、藤田結衣、名村寿章 仙波義貴、大岩由香理、近藤和也、Abdellah Hamed KhallAli、クロム酸塩に暴露したヒト肺癌における dsDNA の切断を修復する DNA 修復遺伝子の異常の検討、2010. 12. 12、第 34 回徳島県医学検査学会、徳島大学 (徳島市)

③奥田安範 志水俊夫 張真弓 浅田知世 名村寿章 仙波義貴、近藤和也、Abdellah Hamed KhallAli、クロム酸塩に暴露したヒト肺癌における dsDNA の切断を修復する DNA 修復遺伝子の異常の検討、2009. 12. 13、第 33 回徳島県医学検査学会、アスティとくしま (徳島市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

近藤 和也 (KONDO KAZUYA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

##### (2) 研究分担者

滝沢 宏光 (TAKIZAWA HIROMITSU)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：90332816

中川 靖士 (NAKAGAWA YASUSHI)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：80380103

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：