

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 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659072

研究課題名（和文） ヒト病理組織のアダクトーム解析

研究課題名（英文） adductome analysis of human tissues

研究代表者

梶村 春彦（SUGIMURA HARUHIKO）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00196742

研究成果の概要（和文）：

がん周囲組織にあるDNA付加体10種類（すでにannotation済み）の量と分布をhigh performance liquid chromatography と tandem mass spectrometryを使用することによって、明らかにし、腫瘍の種類、腫瘍におこる変異のパターン、生活習慣（喫煙歴、アルコール歴）などと比較を行い、病理学的意義を明らかにすることをおこなったが、とくに、環境要因の異なる地域中国と日本で発生した胃がんの非腫瘍胃粘膜22例について上記のうち下記の7種について解析を行った。Seven lipid peroxidation related DNA adducts, 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine (ϵ dA), butanone-etheno-2'-deoxycytidine (B ϵ dC), butanone-etheno-2'-deoxy-5-methylcytidine (B ϵ medC), butanone-etheno-2'-deoxyadenosine (B ϵ dA), heptanone-etheno-2'-deoxycytidine (H ϵ dC), heptanone-etheno-2'-deoxyadenosine (H ϵ dA), and heptanone-etheno-2'-deoxyguanosine (H ϵ dG) これらの7種の付加体レベルは0から3万個/10⁹塩基対の範囲でヒト胃粘膜に存在したが、そのprofileを判別解析することによって、日本と中国のoriginを判別することができた。上記の課程であきらかになった6個の主として脂質代謝の結果生じた修飾塩基を含む30merのオリゴヌクレオチドを合成し、大腸菌で精製した以下の修復酵素タンパクと混和し、修復活性のある組み合わせを同定し、gene-environmental interactionの生物学的基礎を調べたところ、TDG (Thymine DNA glycosylase) の関与が推定され、その機能的解析のために、制御発現システムを作成した。

研究成果の概要（英文）：

High performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry disclosed at least 10 lipid peroxidation related modified DNA bases in the DNAs extracted under anti-oxidation condition from human autopsy tissues. Among these 10 DNA adducts, 7 of them, 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine (ϵ dA), butanone-etheno-2'-deoxycytidine (B ϵ dC), butanone-etheno-2'-deoxy-5-methylcytidine (B ϵ medC), butanone-etheno-2'-deoxyadenosine (B ϵ dA), heptanone-etheno-2'-deoxycytidine (H ϵ dC), heptanone-etheno-2'-deoxyadenosine (H ϵ dA), and heptanone-etheno-2'-deoxyguanosine (H ϵ dG) were quantitated in gastric mucosa, resected for gastric cancer in Japan and China. The profiles of these DNA adducts identified the origin of the tissues (China or Japan), implying adductome profile may reflect environmental exposures of individual settings. We further tested the repair machinery against these modified bases and discovered TDG play s role in repairing some of these adducts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000

2011 年度	1, 100, 000	330, 000	1, 430, 000
年度			
年度			
年度			
総 計	2, 700, 000	330, 000	3, 030, 000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：実験病理

キーワード：DNA 付加体、adductome、炎症、脂質過酸化化物、胃がん、塩基除去修復 LC-MS、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

発がん理論とくに、環境中の発がん物質が動物やヒトにがんを作るといふ現象は、本邦の病理学者などの先駆的研究が有名であるが、発がん物質が DNA と付加体をつくり変異を起こすという定説についても、とくにヒトにおいてその証拠は、方法論的制約もあり、ほとんどなかった。

Leading model of lung carcinogenesis: Real?

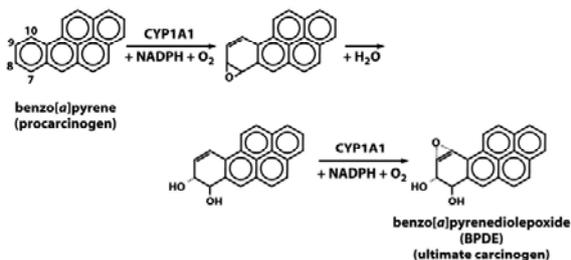


Figure 12.15b The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

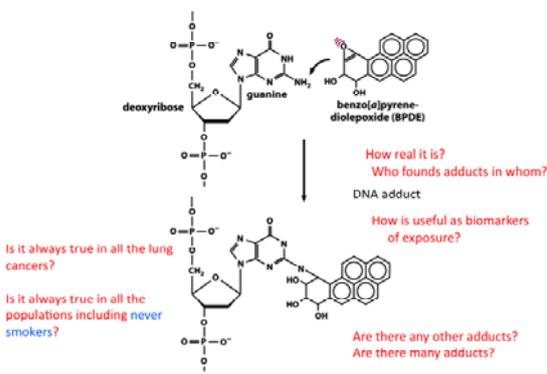


Figure 12.16 The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)

つまり、上の世界的に権威ある腫瘍の教科書にあるモデル（赤字が現在わかっていない疑問である）においても、ヒト組織内で証明されていない事実が多数あるということである。われわれは、数年前から、ヒト組織とくに喫煙や炎症といった内外の環境要因の情

報がある程度ある組織にある DNA 付加体を一網打尽に検出して、その意義とくに腫瘍発生における病理学的意義を見いだそうと努力してきた。幸いにも、高感度の LC-tandem mass spectrometry の機器が発達し、さらに、徐々にではあるが、修飾核酸の標準品の合成に成功してきて、少なくとも脂質酸化由来の DNA 付加体についてはかなり経験を積んできた。

2. 研究の目的

今回、DNA の修飾分子、かなりの部分は変異原性があると考えられるものを、いくつか、ヒト個体のなかに同定し、その意義を解析することが目的である。まず、同定した付加体が、ヒト種々の病理学的状態によりあるいは臓器組織別にどのように分布しているかを明らかにすること。さらに、われわれが長年あつかつてきた OGG1 や MYH といった塩基除去修復酵素（知られているだけでも 10 種以上ある）が、これらの修飾塩基にどのように対応しているかを調べることを目的とする。

3. 研究の方法

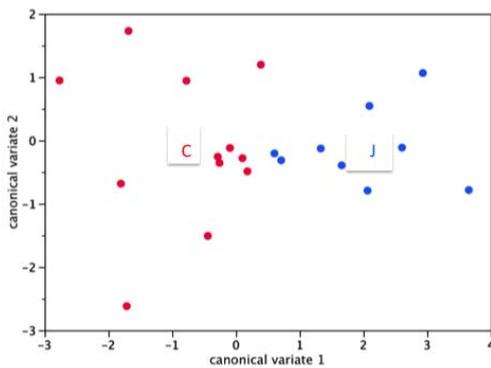
ヒト剖検例や手術例の組織から、酸化防止剤存在下で DNA を抽出し、LC-MSMS によって、その m/z と migration 距離によって、物質を同定する。そして、10 の 8 乗個塩基対あたりどのくらいの付加体が生じているか、さらにその付加体を repair する酵素群を既知の塩基除去修復酵素のなかから、gel shift assay によって明らかにする。そのため、10 種の塩基除去修復酵素を大腸菌によって活性をもったまま、合成、精製する。これには、MYH の変異体のタンパク精製の経験が生きた。

4. 研究成果

まず、ヒト体内から、DNA をとり、micrococcal nuclease 処理して、分子量と chromatography の泳動度を勘案して、どのように修飾塩基が表示されるかを示す。これは adductome map とわれわれが呼んでいるもので、縦軸には m/z (mass per charge), 横軸には泳動度を示す。

7種の付加体の内3種では、浜松の胃粘膜で有意に多くみられた。つまり10の8乗あたりの付加体の数では、浜松の胃粘膜のほうが多かった。実際の adductome map をみると、蘆江病院の胃粘膜のなかに未知の spot が多数あり、胃粘膜にたいしてのストレスが本邦のほうに多いとは一概に言えないが、とくに炎症関連付加体という点に限って言えば、本邦の胃粘膜は炎症を介して、蘆江病院の胃粘膜は、たとえば環境中の発がん物質などによる付加体を介して発がんに向かうのではないかと考えてもよいかもしい。後半については、その付加体の同定という作業がのこっているの、推定にすぎない。

しかし、7種の付加体レベルにより判別分析を行うと下のよう、どちらの胃粘膜がどうかかわかるという結果(下図)は報告者自身も驚いていて、さらに、上記の挑戦的課題を解決したい。



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件すべて査読あり)

1. Yamada, H., Shinmura, K., Ito, H., Kasami, M., Sasaki, N., Shima, H., Ikeda, M., Tao, H., Goto, M., Ozawa, T., Tsuneyoshi, T., Tanioka, F., and Sugimura, H., Germline alterations of the CDH1 gene in familial gastric cancer in the Japanese population. *Cancer Sci.* 103:1782-1788, 2011
2. Tamaki, Y., Honda, M., Muroi, Y., Arai, T., Sugimura, H., Matsubara, Y., Kanno, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., and Hiratsuka, M., Novel Single Nucleotide Polymorphism of the CYP2A13 gene in Japanese individuals. *Drug Metab Pharmacokin.* 2011. 26(5): 544-547.
3. Sugimura H et al. Genetic susceptibility to

lung cancer. *Front Biosci.* 3: 1463-1477, 2011

4. Chou, P.H., Kageyama, S., Matsuda, S., Kanemoto, K., Sasada, Y., Oka, M., Shinmura, K., Mori, H., Kawai, K., Kasai, H., Sugimura, H., and Matsuda, T., Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissues. *Chem Res Toxicol*, 2010. 23(9): 1442-8.

5. Goto, M., Shinmura, K., Nakabeppu, Y., Tao, H., Yamada, H., Tsuneyoshi, T., and Sugimura, H., Adenine DNA glycosylase activity of 14 Human MutY homolog (MUTYH) variant proteins found in patients with colorectal polyposis and cancer. *Hum Mutat*, 2010. 31: E1881-74.

6. Tao, H., Shinmura, K., Yamada, H., Maekawa, M., Osawa, S., Takayanagi, Y., Okamoto, K., Terai, T., Mori, H., Nakamura, T., and Sugimura, H., Identification of 5 novel germline APC mutations and characterization of clinical phenotypes in Japanese patients with classical and attenuated familial adenomatous polyposis. *BMC Res Notes*, 2010. 3(1): 305.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 梶村春彦 酸化的 DNA 損傷修復に関わる遺伝子多型とヒト発がん 日本環境変異学会

2011年11月21日

2. 梶村春彦 ヒトがんの原因について

北陸がんプロフェッショナルセミナー

2011年7月17日 金沢大学 (金沢)

3. 梶村春彦 ヒトの common ながんの遺伝的感受性について-病理の立場から

癌研セミナー2011年8月3日 癌研究会吉田講堂(東京)

〔図書〕(計 1件)

Sugimura H et al. Glioma: Glioblastoma part 2 in Tumors of Central Nervous System, ed by Hayat, Springer, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶村春彦 (SUGIMURA HARUHIKO)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00196742

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし