

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390271

研究課題名(和文) DNA損傷応答機構を中心とした発がん制御機構の解析と、その応用による治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic approach targeting DNA damage check point

研究代表者

水谷 修紀 (Shuki, Mizutani)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60126175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷応答機構による発がん制御のメカニズムの解明を行い、その機構を理解することによりATMを中心としたDNA損傷応答を標的としたがん治療法開発のための基礎研究を行った。神経芽腫ではATMの機能喪失がみられ、またATM依存にmicroRNAがMYCNの発現を制御することが知られているが、ATM依存のmicroRNAを見出した。また慢性骨髄性白血病の急性転化にATMが抑制的に働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Development of therapeutic approach targeting DNA damage check point was investigated. loss of function of ATM was identified in neuroblastoma. It is known that ATM regulated microRNA and contributes down regulation of MYCN. We have identified several microRNAs regulated by ATM. Contribution of loss of ATM function in blastic crisis in chronic myelogenous leukemia was elucidated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児血液学 DNA損傷応答

## 1. 研究開始当初の背景

A-T は常染色体劣性遺伝病であり、その発生頻度は欧米の調査によると約 30 万人に 1 人とされ、保因者は人口の 0.5-1%を占めるとされている。また一塩基多型(SNPs)に富んだ遺伝子で約 5%のアレル頻度で比較的まれな SNPs を有することが知られており、我々は機能的に障害のある SNPs が乳児白血病 (Blood2003)やホジキン病(Blood 2004)の発症リスクを上げることが明らかにしている。こういった視点からも ATM の遺伝子多型が発がんのリスクとどのようにかかわっているか、腫瘍での ATM の変異がどの程度認められ発がんに関連しているのか明らかにしていく必要がある。

神経芽腫は小児の悪性腫瘍の中でも難治性で、治療法の開発が強く望まれる疾患である。特に N-Myc の増幅例は予後不良であることが知られている。近年 11 q22-23 部位の欠失例も予後が不良であることが報告された。11q22 には ATM 遺伝子が位置し ATM が神経芽腫においてもがん抑制遺伝子として働いている可能性が示唆された。近年、神経芽腫では N-myc 依存的に microRNA (miRNA)421 が誘導され ATM の発現量を低下させていることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

毛細血管拡張性運動失調症(A-T)は 20-30%に悪性腫瘍を発生し、また A-T 責任遺伝子 ATM の変異が T 細胞型前リンパ球性白血病 (T-PLL)、慢性リンパ性白血病 (CLL) をはじめ多くの腫瘍で認められ、ATM はがん抑制遺伝子として機能していると考えられている。また近年の報告から ATM のみならず ATM を中心とした DNA 損傷応答機構が発がんを防ぐためのチェックポイントとして機能していることが明らかとなってきた。本研究では DNA 損傷応答機構による発がん制御のメカニズムの解明を行い、その機構を理解することに

より ATM を中心とした DNA 損傷応答を標的としたがん治療法開発のための基礎研究を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経芽腫発症における ATM の役割の解明

ATM は一塩基多型(SNPs)に富む遺伝子で、人口の約 1-5%に何らかの意味を持つ SNPs を持つ個人が存在する。神経芽腫に同定された SNPs の腫瘍化への関与を明らかにするため、SNPs を持つ ATM 遺伝子をサブクローニングし、発現ベクターに組み込み ATM 欠損細胞に導入したのち放射線感受性を検討することにより、SNPs の ATM の機能に与える影響について検討する。神経芽腫病理標本をもちいて免疫染色法、FISH 法を用いて ATM の活性化状態、ゲノムの状態を検討する。

神経芽腫を発症した患者において ATM の変異、ゲノムの欠失が見つかった例と ATM が正常な例を比較し、生存率を検討することにより、ATM の機能の失活が予後に与える影響を観察する。

### (2) ATM 欠損によって影響を受ける miRNA の検討

ATM 欠損によって影響を受ける miRNA の存在を証明している。この miRNA によって制御される遺伝子を明らかにするため野生型と ATM 欠損細胞で発現に差のある miRNA の結合配列のある RNA を target scan や miRDB を用いて検索する。現在発がんや細胞分化、ゲノム安定性に関与することが推測される遺伝子、生体内酸化還元に関与する遺伝子を有力候補として見いだしているため、その発現量を野生型と ATM 欠損細胞をもちいてウェスタンブロット法で検討する。

この結果、野生型と ATM 欠損細胞で発現に差のあるタンパク質が同定されればその遺伝子の 3' UTR をルシフェラーゼ発現ベクターの 3' にクローニングし、ルシフェラーゼ

の発現を検討することにより miRNA による翻訳制御が本当に起こっているか検討する。

ターゲットとなる遺伝子が同定されるようであれば、miRNA に対する干渉 RNA を用いてその機能を障害し、標的遺伝子に対する影響を観察する。miRNA の標的とする遺伝子の多様性が A-T 患者の臨床症状の多様性に関係するのではないかと想定している。

### (3) ATM 欠損の慢性骨髄性白血病発症・進展における関与の解析

慢性骨髄性白血病は融合遺伝子 p210BCR/ABL により発症する造血器悪性腫瘍である。臨床的には、分化傾向を有する顆粒球系細胞が徐々に増加する慢性期を数年経過した後、不可避的に幼稚芽球が急激に増加する急性白血病に似た病態に移行する（急性転化）。この共同研究では、受入研究者が作製した慢性骨髄性白血病を発症する p210BCR/ABL トランスジェニックマウスに、DNA の修復や細胞周期の制御に関わる ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) の欠損マウスを掛け合わせるにより、慢性骨髄性白血病の発症や急性転化における ATM の役割について検討した。

### (4) リンパ球分化における ATM の機能に関する研究

A-T 患者では T 細胞、B 細胞数は顕著な低下が見られる。T 細胞の分化は胸腺内で進むため、ヒトでの検討は、分化した末梢血リンパ球の解析にとどまっている。そのため、末梢に出る前の胸腺内での T 細胞分化の検討として、ATM 欠損マウスモデルが使用されてきた。マウスにおける研究から胸腺内の T 細胞は、CD4、CD8 陰性の Double Negative (DN) 期、この DN 期はさらに CD25 と CD117 の発現により細かく DN1,2,3,4 と分類され、続いて CD8 が弱陽性となる immature single positive (ISP)、CD4、CD8 両者の発現が見られ

る Double Positive (DP) 期を経てから、CD4 (single positive; SP) T 細胞、CD8 (single positive; SP) T 細胞へと分化することが明らかにされている。ATM 欠損マウスの解析では DP から SP への分化が障害されており、その理由を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 神経芽腫発症における ATM の役割の解明

現在まで神経芽腫 80 例の解析を行い ATM 遺伝子の片側アレルの欠損を 10 例、胚細胞レベルの SNPs を 7 例、腫瘍細胞のみの体細胞変異を 1 例認めた。こういった ATM の機能的障害が神経芽腫の発症要因としてあるのか、または悪性度に関連しているのか検討を行っていきたい。

### (2) ATM 欠損によって影響を受ける miRNA の検討

野生型 MEF 及び ATM 欠損 MEF を用いて網羅的に miRNA 発現解析を行い、発現量に差が見られた mmu-miR-A・B・D・E・F を候補とし、詳細な検討を行った。定量 PCR を用いた脂肪細胞分化前後における miRNA の発現量解析、ウェスタンブロット法を用いた脂肪細胞に必須の転写因子 C/EBP の発現量解析、Oil Red O 染色による細胞分化の可視化により各 miRNA と脂肪細胞分化との関わりを検討した。解析の結果、ATM 欠損 MEF において高発現している mmu-miR-B を野生型 MEF に過剰発現させたところ、脂肪細胞分化の抑制が認められ、また分化誘導に伴う C/EBP の発現が低下していた。mmu-miR-B の予測される 1679 個の標的 mRNA と脂肪細胞分化に関連する 81 個の遺伝子を比較したところ、6 つの遺伝子が一致し、その一つが C/EBP であった。この解析からも mmu-miR-B が ATM 依存的に C/EBP の発現量の調節を行い、脂肪細胞分化制御に関与している可能性が強く支

持された。今後の検討を進めることにより、mmu-miR-BによるC/EBPの翻訳制御、ATMによるmmu-miR-Bの発現制御、脂肪分化制御に至る詳細なメカニズムが明らかとなることが期待される。

#### (3) ATM欠損の慢性骨髄性白血病発症・進展における関与の解析

p210BCR/ABLトランスジェニックATMヘテロ欠損マウスで急性転化までの期間が短縮されることが明らかとなった。この研究により疫学的に推測されている毛細血管拡張性運動失調症ATの保因者における高発がん性が、細胞生物学的にも立証できた。

#### (4) リンパ球分化におけるATMの機能に関する研究

ATにおけるT細胞分化異常はT細胞分化に必要なT細胞レセプター(TCR)の再構成で、特に鎖の再構成異常があるためとされてきた。しかし我々のこれまでの研究でATM欠損マウスではDN期のDN2、DN3aからDN3aの移行にも大きな障害があることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Takagi M, Sato M, Piao J, Miyamoto S, Isoda T, Kitagawa M, Honda H, Mizutani S. ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in Chronic Myelogenous Leukemia. DNA Repair. 査読有. 2013;12 (7) 500-507. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.022.

Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, Morio T, Teraoka H, Mizutani S. Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. Cancer Sci. 査読有. 2013; 104(6):703-710.

doi: 10.1111/cas.12144.

Tamaichi H, Sato M, Porter AC, Shimizu T, Mizutani S, Takagi M. Ataxia telangiectasia mutated-dependent regulation of topoisomerase II alpha expression and sensitivity to topoisomerase II inhibitor. Cancer Sci. 査読有. 2013; 104(2):178-184. doi:10.1111/cas.12067.

Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. Blood. 査読有. 2012; 120(4):789-799. doi:10.1182/blood-2012-02-413195.

〔学会発表〕(計12件)

Takagi M, Mizutani S. ATM-dependent DNA damage-response pathway as a determinant in Chronic Myelogenous Leukemia. ATW2013, Jul.28-31, 2013 Birmingham, UK.

Sato M, Takagi M, Piao J, Isoda T, Honda H, Yasuda A, Mizutani S. ATM and haploinsufficiency acceleration of cancer development. International symposium 50th Anniversary of RIRBM, Hiroshima University. Feb.20-21, 2012 Hiroshima.

Isoda T, Takagi M, Piao J, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. Visualization of chromosomal translocation and early T-cell development failure in ATM deficiency. 14th International workshop on Ataxia Telangiectasia. Feb.7-11, 2012 Delhi, India.

Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S,

Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. T-Cell Development Failure At  $\beta$ -Selection Checkpoint and TCR  $\beta$  Locus Break Formation Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. 53<sup>rd</sup> American society of hematology, annual meeting. Dec.10-13, 2011 San Diego.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

水谷 修紀 (MIZUTANI, Shuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号 : 60126175

### (2)研究分担者

高木 正稔 (TAKAGI, Masatoshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号 : 10406267