

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659161

研究課題名(和文) ヒト組織中の修飾核酸の病理学的意義

研究課題名(英文) Pathological Significance of modified nucleic acid base in human tissue.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胃粘膜の修飾核酸とくに脂質過酸化由来のexocyclic etheno DNA付加体のついて、胃癌の発症率の極めて高い中国の安徽省の手術検体と浜松の検体とでその量的な存在を検討結果では意外にも浜松の胃粘膜で量が多かった。さらにヒト胃粘膜中の小さな付加体である5'-hydroxymethyl deoxy cytidine (5-hmdC)をはじめとするcadC, fdCなどを定量的に測定し、5-hmdCの腫瘍部での減少、TET2発現との関連を見いだした。種々のヒト付加体の病理疫学的意義の初めての知見かと思われるが、胃癌の高い発症率の原因となる付加体についてさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Adductomics analysis of alkane substituted exocyclic etheno DNA adducts in human stomach mucosa having gastric cancer was performed for the cases from Lujiang County, Anhui, China, and from Hamamatsu, Japan. Discrimination analysis using quantitative value of 7 lipid per oxidation derived DNA adducts revealed that two regions showed distinctive adductome profile. 3 of 7 DNA adducts in this category were greater in Japanese gastric mucosa than Chinese gastric mucosa, which may suggest gastric carcinogenesis in Japan favor inflammatory or metabolic background. Furthermore, we quantitated 5'-hydroxymethyl deoxycytidine, and its derivatives carboxyl deoxycytidine, and formyl deoxycytidine in gastric cancer and adjacent non-tumor tissues and found the relationship between TET2 expression and 5hmdC. In this attempt we could not identify the adducts specifically high in endemic area of gastric cancer (Lujiang), thus further investigation is necessary.

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：DNA 付加体 修飾核酸 分子疫学 etheno DNA adduct demethylation

1. 研究開始当初の背景

ヒトがんの原因について多くの手がかりを与えているのは、ごく近年に限って言えば international consortium of cancer genome や the cancer genome atlas といった共同研究体によって、何千ものヒト腫瘍のゲノムの塩基配列を次世代シーケンサーによって決定し、その変異のパターンを詳細に分析することによって、たとえば喫煙であるとか紫外線であるといった原因(それぞれ、起こりやすい変異パターンというのが試験管内の実験などでも推定されている)を同定しようというものである。これは、現在は mutation signature といわれ、それによりヒト腫瘍を 20 数個のカテゴリーに分類している。

(Nature 500, 415-421

doi:10.1038/nature12477)

この考え方はすでに 10 年前に、p53 の変異のパターンから、mutation spectrum といわれる概念を提唱し、多くのヒト癌の原因と腫瘍における変異パターンの関連をしてきた米国 NCI の Curtis Harris 博士の一連の分子疫学の仕事に帰着される (N Engl J Med 1993; 329:1318-1327)

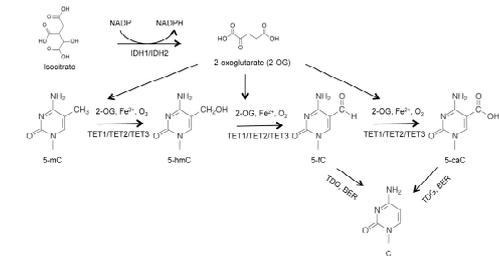
ところが、これらの変異の起こるヒト DNA その場でなにがおこっているかことについては、上記の二論文ともあまり具体的にはしめていない。つまり、モデルとしての実験的研究や、動物実験結果の解釈によるそれはそれで間接的な現象論を引用しているのみである。これは、その重要性を考えていないわけではなく、特にヒト組織のなかに変異のもととなるもの、つまり ultimate carcinogen たる化学物質が塩基と共有結合したものを同定することが困難だったことに他ならない。当時は p32 post labeling, いかにも特異性に問題のありそうな ELISA system, electron spray 法などを複数の方法を用いて、大量の発がん剤を投与した細胞や動物組織などでも同定作業がすすめられていた。ヒト検体の場合はいわゆる positive control もなかなか確固たるものはなく、不幸な事故で異常な暴露をしてしまった検体を大量に用いて (たとえば血液 300ml と云った具合) いた。とはいっても、DNA 付加体ができてそれが変異のもとになるという stepwise な scheme は Weinberg の教科書から、病理総論の医学生向き教科書まで腫瘍が何故起こるかについて、分子腫瘍学の定説となっている。にもかかわらず、ヒト組織での直接的証拠があまり発表されていない状況に、申請者をふくめたヒト発がん領域の研究者は隔靴搔痒の思いだったのである。

しかし、測定技術の進歩や、化学合成技樹の一般化によって、standard をきちんと用いると、なんとかヒト組織中で DNA 付加体が定量的に、一度に複数同定できるようになった。ただ、使用する DNA 量は、多くの分子生物学的実験に用いるよりも一桁多い(古典的な Southern blot のとき 10-20microgram

といわれたが、PCR 関連では 50 nanogram まで下がっているのは周知のとおりだが、adduct の場合 30-100microgram くらい用いる。

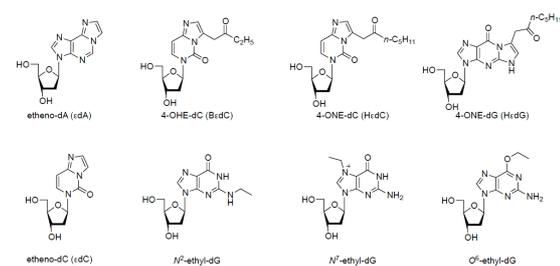
2. 研究の目的

ヒト組織のなかの種々の DNA 付加体を同定する。その種類と定量性、生活習慣や地理疫学的情報との関連付け、そもそもヒト組織の解剖学的部位に対応した DNA 付加体の分布、さらに腫瘍例の場合、その状況に生じた腫瘍における体細胞変異の spectrum との関連を明らかにすることであった。さらに、DNA 付加体の範疇のなかには、5mC, 5hmC, 8-OHG と略称されるような比較的小さな付加体がしられており、近年は、5hmC の代謝産物としてさらに caC(carboxy cytosine), fC(formyl cytosine)なども同定されるようになった。さらに、これらの変化は epigenetics の動的制御に関わる遺伝子群、TET1,2,3, IDH1,2; TDG などがかわることがわかった。これらの小さな DNA 付加体についても測定感度や測定法を樹立するとともに、その関連酵素の腫瘍における実態を明らかにすることも本研究の目的である。



3. 研究の方法

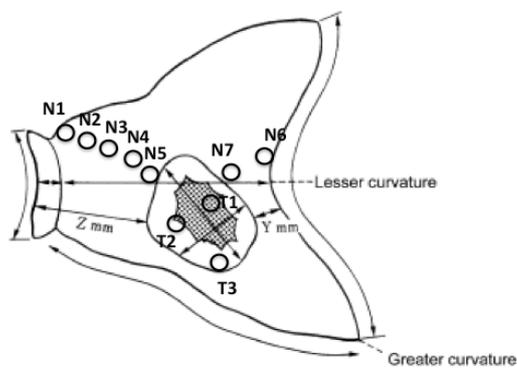
まず図のような化合物を購入あるいは合成を行い (東京農業大学松島芳隆教授との共同研究)



また組織の sampling はしかるべき IRB での審議承認のあと以下の図のごとく行う (これは手術で切除した胃癌および周辺粘膜の例である)。

LC-MS/MS に書ける前の DNA 抽出として、まず、0.01% Deferoxamine Mesylate 存在下の Lysis solution 中で凍結検体を homogenize し、Protease K, RNase A で処理後、Protein Precipitation Solution で除タンパクをおこない、20-100microgram 分の DNA を 50U の DNase I で処理をし、5 microgram の

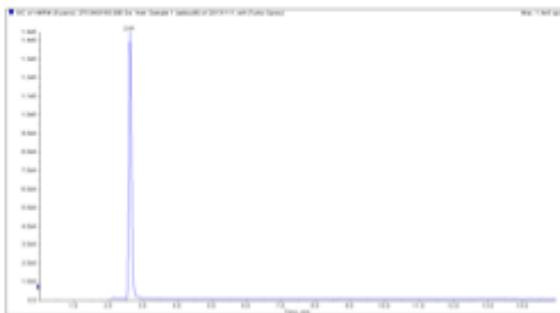
phosphodiesterase I と 10U の CIAP で処理をし、Nanosep 3K カラムでさらに除タンパクを行う。DNase I のかわりに、nuclease P1 を用いる方法も併用している。その際は最後の除タンパクは VIVASPIN500 カラム、また、DNaseI のかわりに Micrococcal Nuclease で処理する場合もある。



このあと、D 体や N15 体など、stable isotope を含んだ標準品とともに、LC-MS/MS (Applied Biosystems; 4000Q TRAP MS/MS system) に load する。

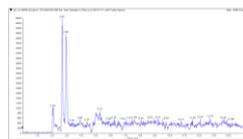
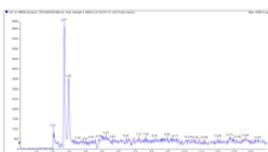
4. 研究成果

典型的な測定図を下に示す。標準品 etheno dA



非腫瘍部 pooled DNA

腫瘍部 pooled DNA



次のような結果がえられた。

a. エテノ系、アルキル系の adduct 評品と内部標準を 3 つの異なる方法で処理し、計測し、既報の如く、ethenodA が胃癌切除胃においても観察確認できた。量的には腫瘍部のほうが少ないことが、症例数をふやしても確認された。

b. 分子量の小さな修飾塩基 (mC, hmC, fC, caC) について解析をおこない、腫瘍部における hmC の減少や TET2 発現との関連を明らかにした。fC や caC についてはヒト胃粘膜ではじめて測定をこころみ、検出限界以下である

ことをあきらかにした。これは非神経組織でもこの修飾塩基の世界ではじめての測定である。また腫瘍部における hmC の減少は TET1 の発現減弱との関連がもっとも強かった。

c. 地理疫学的な adductome profile の差が、腫瘍の p53 の変異 spectrum と若干の関連を認めたが、解釈について考察中である。

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)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Harada M, Sugimura H et al. YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Genes Cells*. 2014 Apr 29. doi: 10.1111/gtc.12150. [査読有]
2. Suzuki S, Sugimura H et al. A rare Japanese case with a NUT midline carcinoma in the nasal cavity: A case report with immunohistochemical and genetic analyses. *Pathol Res Pract*. 2014 Jun;210(6):383-8. doi: 10.1016/j.prp.2014.01.013. [査読有]
3. Suzuki S, Sugimura H et al. An autopsy case of malignant pleural mesothelioma associated with nephrotic syndrome. *Intern Med*. 2014;53(3):243-6. (査読有)
4. Shinmura K, Sugimura H et al. A novel somatic FGFR3 mutation in primary lung cancer. *Oncol Rep*. 2014 Mar;31(3):1219-24. doi: 10.3892/or.2014.2984. (査読有)
5. Shinmura K, Sugimura H et al. TNK2 gene amplification is a novel predictor of a poor prognosis in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2014 Mar;109(3):189-97. doi: 10.1002/jso.23482. (査読有)
6. Kahyo T, Sugimura H Establishment and characterization of a mutagenized cell line exhibiting the 'cell-in-cell' phenotype at a high frequency. *Genes Cells*. 2013 Nov;18(11):1042-52. doi: 10.1111/gtc.12092. (査読有)
7. Matsuura S, Sugimura H et al. SGOL1 variant B induces abnormal mitosis and resistance to taxane in non-small cell lung cancers. *Sci Rep*. 2013 Oct 22;3:3012. doi: 10.1038/srep03012. (査読有)
8. Suzuki S, Sugimura H et al. Breakages at YWHAE, FAM22A, and FAM22B loci in uterine angiosarcoma: a case report with immunohistochemical and genetic analysis. *Pathol Res Pract*. 2014 Feb;210(2):130-4. doi: 10.1016/j.prp.2013.09.009. (査読有)
9. Matsuura S, Sugimura H et al. CD74-ROS1 fusion transcripts in resected non-small cell lung carcinoma. *Oncol*

- Rep. 2013 Oct;30(4):1675-80. doi: 10.3892/or.2013.2630. (査読有)
10. Kahyo T, Sugimura H et al. Identification and association study with lung cancer for novel insertion polymorphisms of human endogenous retrovirus. Carcinogenesis. 2013 Nov;34(11):2531-8. doi: 10.1093/carcin/bgt253. (査読有)
11. Kurabe N, Sugimura H et al. Accumulated phosphatidylcholine (16:0/16:1) in human colorectal cancer; possible involvement of LPCAT4. Cancer Sci. 2013 Oct;104(10):1295-302. doi: 10.1111/cas.12221.
12. Sugimoto S, Sugimura H et al. Early-onset diffuse gastric cancer associated with a de novo large genomic deletion of CDH1 gene. Gastric Cancer. 2013 Jun 29. [Epub ahead of print] [査読有]
13. Shimizu K, Sugimura H et al. D2-40-positive lymphatic vessel invasion is not a poor prognostic factor in stage I lung adenocarcinoma. Pathol Int. 2013 Apr;63(4):201-5. doi: 10.1111/pin.12048.
14. Kurabe N, Sugimura H. Visualization of phosphatidylcholine (16:0/16:0) in type II alveolar epithelial cells in the human lung using imaging mass spectrometry. Pathol Int. 2013 Apr;63(4):195-200. doi: 10.1111/pin.12050.
[学会発表] (計 5 件)
1. Du CP, Sugimura H: Quantitative Analysis of 5-hydroxymethylcytosine in Gastric Cancer by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. The 4th JCA-AACR joint conference. Dec 16-18, 2013, Tokyo bay Maihama Hotel Club Resort, Chiba, Japan.
2. Yamada H, Sugimura H et al. Germline CDH1 mutations and copy number alterations in hereditary and early onset diffuse gastric cancer. The 4th JCA-AACR joint conference. Dec 16-18, 2013, Tokyo bay Maihama Hotel Club Resort, Chiba, Japan.
3. Sakamoto H, Sugimura H et al. Towards the genetics and genomics of diffuse gastric cancer. The 4th JCA-AACR joint conference. Dec 16-18, 2013, Tokyo bay Maihama Hotel Club Resort, Chiba, Japan.
4. Sugimura H The origin of human cancer, a lesson from molecular epidemiology of gastric cancer. The 101st Indian Science Congress, Jammu, India

5. Sugimura H et al. DNA adductome: the most proximal exposome. AACR special conference: Post-GWAS Horizons in Molecular Epidemiology: Digging Deeper into the Environment. Nov.11-14, Hollywood, FL, USA
[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 (SUGIMURA HARUHIKO)
梶村春彦
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 00196742

(2) 研究分担者 ()
研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()
研究者番号 :