

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04298

研究課題名(和文) 家族性腫瘍の原因である生殖細胞突然変異の発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of the mechanism of germline mutation occurrence that causes familial tumor

研究代表者

作見 邦彦 (SAKUMI, KUNIHICO)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：50211933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：「遺伝性腫瘍症候群の原因である生殖細胞突然変異の発生メカニズムの解明」を目指し、ミューテーターの性質を持つMth1/Ogg1/Mutyh triple KO (TOY-KO) mouse を用いて、このマウス家系に生じた家族性腫瘍の原因候補遺伝子を探索、決定した。また、新たなTOY-KO mouse家系を樹立し、凍結胚の保存を行った。樹立したTOY-KO mouse家系を用いて自然発がん実験を行い、家族性腫瘍モデルマウス系統のスクリーニングを行った(継続中)。これらのマウスでは核ゲノムへの突然変異の蓄積が観察されたがミトコンドリアゲノムへの突然変異の蓄積は観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of germline mutation occurrence that causes familial tumor, we analyzed Mth1/Ogg1/Mutyh triple KO (TOY-KO) mice, which feature a mutator phenotype. At first we screened the causative gene of familial tumor observed in the TOY-KO mouse pedigree by whole exome sequence analysis, and determined a candidate gene. We established and cryopreserved a new TOY-KO mouse line. In addition to the TOY-KO mouse, we established TO-, OY-, TY-, T-, O- and Y-KO mice in the same genetic background. Using new TOY-KO mice, spontaneous tumorigenesis experiment has performed (continues). In these mice, we observed accumulation of mutations in nuclear genome, but not in the mitochondrial genome.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：生殖細胞突然変異 がんと遺伝 ミューテーターマウス エクソーム解析 8-オキソグアニン MTH1 0
GG1 MUTYH

1. 研究開始当初の背景

遺伝性腫瘍症候群は、例えば大腸がんでは全体の5%程度に相当すると考えられている。遺伝性腫瘍症候群(以下、家族性腫瘍と略)は遺伝病であり遺伝カウンセリングの対象となる、当該患者と家族の双方にとって非常に深刻な疾患である。リンチ症候群や遺伝性乳がん・卵巣がん症候群のように一部の原因遺伝子が明らかな疾患が遺伝子診断の対象となる一方で、親族内にがん患者が複数いる状況から原因遺伝子が不明なまま「がん家系」と呼ばれて不安を抱える人が多数存在しているのが現状であり、さらなる原因遺伝子の発見が求められている。

家族性腫瘍の出現には新規生殖細胞突然変異(*de novo* germline mutation)の発生が必須である。ヒトにおいてその頻度は2012年のアイスランド人を対象にした大規模全ゲノムシーケンス解析によって 1.2×10^{-8} ntd/genome/generation(1世代あたり63個)と報告された。しかしこれらの生殖細胞突然変異がいつ、どこで、どのようにして発生するのか、そのメカニズムは不明なままであった。我々はMth1/Ogg1/MutYh triple KO (TOY-KO) マウスを用いてDNAの酸化体である8-オキシグアニン(8-oxoG)が新規生殖細胞突然変異発生の原因であることを明らかにし、2014年に報告した。

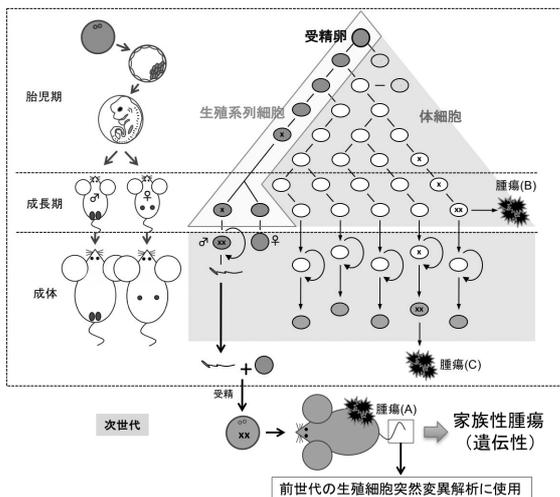


図1 生殖細胞突然変異と家族性腫瘍

(A) 生殖細胞系列に生じる変異と腫瘍: 受精卵から始まり内部細胞塊、始原生殖細胞を経て配偶子母細胞が形成されるまでの分裂で固定される(マウスの場合10.5 dpcまで、ヒトの場合、妊娠6ヶ月頃まで)。オスの場合はさらに出生後、精巣内における精原細胞、精母細胞の分裂によって加算される。生じた変異は次の世代で影響を發揮し、腫瘍の原因となる。子孫に遺伝する。

(B) 体細胞系列に生じる変異と腫瘍(発生・成長期): 始原生殖細胞と分化後、個体の形態形成、成長を経て成体となるまでに必要な体細胞分裂の過程(成体を構成する幹細胞の生産、配置のための必要な細胞分裂)で固定される。変異は主に幹細胞ゲノムに加算、蓄積し、小児がん、若年性発症腫瘍の原因になると考えられる。遺伝しない。

(C) 体細胞系列に生じる変異と腫瘍(成体完成後): 完成された成体を維持するために必要な細胞分裂(幹細胞、分化細胞の数的、質的な維持のための分裂)過程で固定される。変異は、成体を維持している幹細胞のゲノムに加算、蓄積する。その数は老化に伴い増加・蓄積、一般的な腫瘍の発生原因となる。遺伝しない。

この TOY-KO マウス家系では約4割の個体に何らかの腫瘍が自然発生し、その一部は遺伝性である。そこで、このマウス系統を解析することで家族性腫瘍の発生や抑制の機構に迫れるのではないかと考えた。

発がん突然変異の発生時期の関係を図1に示す。本研究では(A)生殖細胞系列に生じる変異と腫瘍を中心にその発生機構の解析を進めるが、同時に観察可能な(B)(C)の腫瘍も研究の対象とする。

2. 研究の目的

本研究は「遺伝性腫瘍症候群の原因である生殖細胞突然変異の発生メカニズムの解明」を目指し、ミューターの性質を持つMth1/Ogg1/MutYh triple KO (TOY-KO) マウスを用いて、(1)このマウス家系に生じた家族性腫瘍(涙腺腫瘍、皮膚腫瘍)の原因遺伝子を決定すること、(2)新たな家族性腫瘍モデルマウス系統を樹立すること、(3)生殖細胞突然変異の発生に対する性・老化の影響を評価すること、を目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) 研究の開始時点で保有していた TOY-KO マウス家系中に生じた涙腺腫瘍個体(親子兄弟)と皮膚腫瘍個体(姉妹)のサンプルを用いて全エクソーム解析を行い、その原因遺伝子を探索する。

(2) 新たに TOY-KO マウス家系を作製し、自然発がん実験を行うとともに、新規家族性腫瘍のモデル動物を樹立する。

(3) 樹立した TOY-KO マウス家系を用いて親の老化と性別が生殖細胞突然変異の発生に与える影響を解析する。

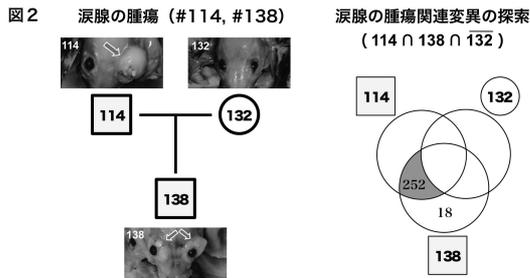
(4) 核ゲノムだけでなくミトコンドリアゲノムの変異解析を試みる。

(5) 精子保存による変異マウス系統の保存・樹立を行う。

4. 研究成果

(1) このマウス家系に生じた家族性の涙腺腫瘍に関して、担がん個体とコントロール個体及び細胞、計20サンプルのDNAを材料に

エクソーム解析を行った。この家系では少なくとも 11 匹のマウスで涙腺の腫瘍 (Harderian's gland tumor) が観察された。図 2 に解析に用いた親子の例を示す。この例では父(#114)と子(#138)に腫瘍が発生した。



両親と子供の尻尾の DNA を用いて全エクソーム解析を行い、各マウス約 7000 個の SNV (single nucleotide variation) を検出した。これらを相互に比較して腫瘍を発生したマウス (#114, #138) に共通で存在し、母 (#132) に存在しない SNV 252 個の中からタンパク質の構造に変化を与える変異 22 個を腫瘍責任遺伝子候補として選択した。これらの変異が他の腫瘍保有個体の DNA に保存しているかどうかをサンガー法で変異を確認したところ、Glyat13 遺伝子の変異が 11 個体中 8 個体で確認できた。この変異は Glyat13 遺伝子がコードする glycine-N-acyltransferase-like タンパク質の 120 番目のアラニンがグルタミン酸に変化するものである。残念ながらここで用いた家系のマウスは凍結保存されていないため、個体レベルでの再現実験と変異の確認はできていない。ノックインマウスの作成は可能だが、ここでは(2)の新しい TOY-KO マウス家系の作成を優先させた。皮膚腫瘍に関しては涙腺腫瘍と同様の方法で解析を行ったが、エクソーム解析では候補遺伝子が得られなかった。これは出現した皮膚腫瘍が 1 種類ではなく複数のタイプのミックスであり、原因遺伝子が異なる可能性、あるいはエクソン以外に原因となる変異が存在する可能性が考えられる。

(2) C57Bl/6J にバッククロスした Mth1-KO(N31), Ogg1-KO(N32) と Mutyh-KO(N36) を用いて 25 匹の Mth1(+/-), Ogg1(+/-), Mutyh(+/-) (TOY-トリプルヘテロ) マウスを作成、これらを親に用いて Mth1(-/-), Ogg1(-/-), Mutyh(-/-) (TOY-KO) マウス, Mth1(-/-), Ogg1(-/-) (TO-KO) マウス,

Ogg1(-/-), Mutyh(-/-) (OY-KO) マウス, Mth1(-/-), Mutyh(-/-) (TY-KO) マウス, および Mth1(-/-) (T-KO) マウス, Ogg1(-/-) (O-KO) マウス, Mutyh(-/-) (Y-KO) マウスの 7 種類の系統を作成した。このうち、TOY-KO マウスを用いて世代内交配と自然発がん実験を行っている。

また, Mth1, Ogg1, Mutyh 各遺伝子の突然変異抑制における貢献度を評価するため, 7 種類それぞれの系統でトリオ解析を行い, 生殖細胞突然変異頻度を計測する準備を終えた。

(3) 生殖細胞突然変異の発生に対する性・老化の影響を評価に関しては 2016 年にヒトのサンプルを用いた大規模解析 (Nature Genetics, vol48, p823-p824, p935-p939, 2016) が報告され, 我々の仮説がほぼ証明されたため実施を保留した。

(4) TOY-KO mouse 家系の親子 (親 2 匹, 子 2 匹) を用いてミトコンドリアゲノムの変異解析を行ったところ, 全ゲノム解析, 全エクソーム解析のいずれにおいてもミトコンドリアゲノムの変異は観察されなかった (同じ個体の核ゲノムではエクソーム解析で 18 個の変異が確認できている)。この結果から, <1>ミトコンドリアゲノムに生じる変異は個体の発生と生存にとって重篤な影響を与えるため, 変異発生個体が選択, 除去された可能性, あるいはミトコンドリアゲノムに 8-オキソグアニンに起因する変異を抑制する別の機構が備わっている可能性, <2>ミトコンドリアのゲノムサイズが小さいため, 変異を検出するためにはより多数のサンプルが必要である (depth は十分) 可能性, 等が考えられる。

(5) 自然発がん実験の解剖, 解析の際に, 同時にオスの精子保存 (変異マウス系統の保存) を行う計画であったが, 解剖の時期が 2018 年度にずれ込んだため, 現在準備中である。ただし Mth1(-/-), Ogg1(-/-), Mutyh(-/-) (TOY-KO) マウスだけは先行して 2 細胞胚の形で保存を行っている。

生殖細胞突然変異を検出するための全エクソーム解析の過程で, 生殖細胞突然変異だけでなく体細胞突然変異も同時に検出している可能性が高いことが明らかになった。変異アリアル (あるいはバリエーション) の検出頻度

の期待値は 100%, 50%あるいは 0%であり, ヒトやマウスの解析では通常これらに近似した結果が得られる。ところが TOY-K0 マウスの解析では 20~40%の出現頻度で現れる SNV が多発した。これは腫瘍の変異解析で観察される現象に類似しており, 体細胞突然変異頻度の上昇を表していると考えられる。

ENU ミュータジェネシスで得られる変異マウスライブラリーが精子レベルでの 1 回限りの変異導入であり, 単一遺伝子疾患の原因遺伝子探索に適しているのに対して, ミューターの性質を持つ TOY-K0 マウスは継続した変異導入が期待できる。この性質は自然発がん動物モデル, 家族性発がん, 多遺伝子因性疾患モデル動物のスクリーニング系としての有用性を示していると考えられる。なお, ミューターマウスの解析は我が国が中心となって行われており, 他国からの報告は (知る限りにおいては) まだない。

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 12 件)

1. 作見 邦彦 生殖細胞突然変異. *BIO Clinica*, 32, 90-96, 2017.
2. Castillo E, Leon J, Mazzei G, Abolhassani N, Haruyama N, Saito T, Saido T, Hokama M, Iwaki T, Ohara T, Ninomiya T, Kiyohara Y, Sakumi K, LaFerla FM, Nakabeppu Y. Comparative profiling of cortical gene expression in Alzheimer's disease patients and mouse models demonstrates a link between amyloidosis and neuroinflammation. *Sci Rep.*, 7, 17762, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-17999-3.
3. Li GH, Akatsuka S, Chew SH, Jiang L, Nishiyama T, Sakamoto A, Takahashi T, Futakuchi M, Suzuki H, Sakumi K, Nakabeppu Y, Toyokuni S. Fenton reaction-induced renal carcinogenesis in Mutyh-deficient mice exhibits less chromosomal aberrations than the rat model. *Pathol Int.*, 67, 564-574, 2017. doi: 10.1111/pin. 12598.
4. Seifermann M, Ulges A, Bopp T, Melcea S, Schäfer A, Oka S, Nakabeppu Y, Klungland A, Niehrs C, Epe B. Role of the DNA repair glycosylase OGG1 in the activation of murine splenocytes. *DNA Repair (Amst)*, 58, 13-20, 2017. doi: 10.1016/j.dnarep.2017.08.005.
5. Takemori C, Kunisada M, Yogiarti F, Oka S, Sakumi K, Ono R, Nakabeppu Y, Nishigori C. Co-regulation of Cxcl1 and versican in the inflammatory response to UVB induced reactive oxygen species in skin photo-tumorigenesis. *J Dermatol Sci.*, 85, 140-143, 2017. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.10.011.
6. Abolhassani N, Leon J, Sheng Z, Oka S, Hamasaki H, Iwaki T, Nakabeppu Y. Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mech Ageing Dev.*, 161(Pt A), 95-104, 2017. doi: 10.1016/j.mad.2016.05.005.
7. Oka S, Leon J, Sakumi K, Ide T, Kang D, LaFerla FM, Nakabeppu Y. Human mitochondrial transcriptional factor A breaks the mitochondria-mediated vicious cycle in Alzheimer's disease. *Sci Rep.*, 6, 37889, 2016. doi: 10.1038/srep37889.
8. Evans MD, Mistry V, Singh R, Gackowski D, Rózalski R, Siomek-Gorecka A, Phillips DH, Zuo J, Mullenders L, Pines A, Nakabeppu Y, Sakumi K, Sekiguchi M, Tsuzuki T, Bignami M, Oliński R, Cooke MS. Nucleotide excision repair of oxidised genomic DNA is not a source of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Free Radic Biol Med.*, 99, 385-391, 2016. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.018.
9. Yoneshima Y, Abolhassani N, Iyama T, Sakumi K, Shiomi N, Mori M, Shiomi T, Noda T, Tsuchimoto D, Nakabeppu Y. Deoxyinosine triphosphate induces MLH1/PMS2- and p53-dependent cell growth arrest and DNA instability in mammalian cells. *Sci Rep.*, 6, 32849, 2016. doi: 10.1038/srep32849.
10. Torisu K, Zhang X, Nonaka M, Kaji T, Tsuchimoto D, Kajitani K, Sakumi K, Torisu T, Chida K, Sueishi K, Kubo M, Hata J, Kitazono T, Kiyohara Y, Nakabeppu Y. PKC η deficiency improves lipid metabolism and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Genes Cells*, 21, 1030-1048, 2016. doi: 10.1111/gtc.12402.
11. Leon J, Sakumi K, Castillo E, Sheng Z, Oka S, Nakabeppu Y. 8-Oxoguanine

accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial dysfunction and impairs neurogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions. *Sci Rep.*, 6, 22086, 2016. doi: 10.1038/srep22086.

12. Kobayakawa Y, Sakumi K, Kajitani K, Kadoya T, Horie H, Kira J, Nakabeppu Y. Galectin-1 deficiency improves axonal swelling of motor neurones in SOD1 (G93A) transgenic mice. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 41, 227-244, 2015. doi: 10.1111/nan.12123.

〔学会発表〕(計 32 件中 22 件)

1. 作見 邦彦, 大野 みずき, 中別府 雄作. 遺伝性疾患自然発症モデル動物としての mutator mouse. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.
2. 春山 直樹, 作見 邦彦, 加藤木 敦央, 土本 大介, 中別府 雄作. 側坐核・カレハ島の新生GABAニューロンへの8-オキソグアニンの蓄積は加齢マウスの多動の原因となる. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.
3. Naoki Haruyama, Kunihiko Sakumi, Atsuhisa Katogi, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu. Accumulation of 8-oxoguanine in the nuclei of newly-generated GABAergic neurons in the nucleus accumbens and islands of Calleja contributes to locomotor hyperactivity in aged mice. The 27th Hot Spring Harbor International Symposium, 2017.
4. 大野 みずき, 鷹野 典子, 佐々木 史子, 作見 邦彦, 中別府 雄作, 中津 可道, 續輝久. 遺伝性大腸がんモデルマウスにおける酸化ストレス誘発がん体細胞突然変異の解析. 日本放射線影響学会 第60回大会, 2017.
5. 大野 みずき, 鷹野 典子, 高野 京子, 作見 邦彦, 中別府 雄作, 中津 可道, 續輝久. Somatic mutation analysis of oxidative stress-induced colon cancer model. 第76回日本癌学会学術総会, 2017.
6. 赤塚 慎也, 李 光華, 作見 邦彦, 中別府 雄作, 二口 充, 鈴木 拓, 豊國 伸哉. Ferric nitrilotriacetate induced renal tumorigenesis in MUTYH-deficient mice. 第76回日本癌学会学術総会, 2017.

7. Naoki Haruyama, Atsuhisa Katogi, Kunihiko Sakumi, Daisuke Tsuchimoto, Yusaku Nakabeppu. Nuclear accumulation of 8-oxoguanine in nucleus accumbens neurons contributes to age-related locomotor hyperactivity in Mth1/Ogg1-double knockout mice. 九州大学教育改革シンポジウム2017, 2017.
8. 土本 大介, 古賀 祐一郎, 米嶋 康臣, 浅田 真司, 作見 邦彦, 中別府 雄作. イノシン三リン酸分解酵素ITPA欠損症のモデルマウス作製と解析. 平成28年度「先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会」, 2017.
9. 岡 素雅子, 盛 子敬, フリオ レオン, 土本 大介, 作見 邦彦, 中別府 雄作. アルツハイマー病進展における核あるいはミトコンドリアDNA中に蓄積した8-oxoguanineの役割. 第39回日本分子生物学会年会, 2016.
10. Ohno Mizuki, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu. Regulation of base substitution mutagenesis and chromosome recombination induced by 8-oxoguanine accumulated in the genome. The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2016.
11. Sugako Oka, Nona Abolhassani, Julio Leon, Masaaki Hokama, Masahiro Shijo, Hideomi Hamasaki, Toru Iwaki, Yutaka Kiyohara, Tomomi Ide, Dongchon Kang, Yusaku Nakabeppu. Molecular pathophysiology of insulin depletion, mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease brain. The 11th International Symposium on Geriatrics and Gerontology, 2016.
12. Sugako Oka, Julio Leon, Atsuhisa Katogi, Kunihiko Sakumi, Dongchon Kang, Tomomi de, Yusaku Nakabeppu. Expression of human mitochondrial transcriptional factor A (hTFAM) breaks the vicious circle of oxidative stress and amyloid β accumulation in triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 第 38 回 日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会 合同大会 (BMB2015), 2015.
13. 作見 邦彦, 大野 みずき, 古市 正人, 續輝久, 中別府 雄作. 生殖細胞自然突然変異の新規発生と変異アレルの伝達. 第44回 日本環境変異学会, 2015.

14. 岡 素雅子, フリオ レオン, 土本 大介, 作見 邦彦, 中別府 雄作. MUTYH による塩基除去修復過程に依存して誘導される細胞死は p53 の発がん抑制機構の1つとして機能する. 第 44 回 日本環境変異学会, 2015.
15. Julio Leon, Kunihiko Sakumi, Sugako Oka, Erika Castillo, Yusaku Nakabeppu. 8-Oxoguanine accumulated in mitochondrial DNA disturbs neuritic regeneration of cultured adult mouse cortical neurons under conditions of oxidative stress. 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2015.
16. Kunihiko Sakumi, Mizuki Ohno, Masato Furuichi, Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu. 8-oxoguanine causes spontaneous *de novo* germline mutations in mice. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015.
17. 中別府 雄作, 岡 素雅子, 盛 子敬, 大野 みずき, 土本 大介, 作見 邦彦. 活性酸素による DNA 損傷が引起こすさまざまな生命現象: 突然変異から神経変性まで. 第 17 回 日本進化学会年大会, 2015.
18. Mizuki Ohno, Noriko Takano, Kunihiko Sakumi, Ryutaro Fukumura, Yuki Iwasaki, Toshimichi Ikemura, Yoichi Gondo, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki. The role of MUTYH in the oxidative stress-induced mutagenesis and tumorigenesis in the mouse intestine. The Zing conference on "Genomic Integrity", 2015.
19. Julio Jesusu Leon Incio, Kunihiko Sakumi, Sugako Oka, Erika Castillo, Yusaku Nakabeppu. Cortical neurons isolated from adult *Mth1/Ogg1*-double-knockout mouse exhibit impaired neurite regeneration under conditions of oxidative stress. The 38th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2015.
20. Sugako Oka, Julio Leon, Nona Abolhassani, Masaaki Hokama, Toru Iwaki, Yutaka Kiyohara, Dongchon Kang, Yusaku Nakabeppu. Oxidation of nucleic acids and control mechanisms of genetic diversity in mammals. The CRUK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology 2015 Seminar Series, 2015.
21. Yusaku Nakabeppu, Sugako Oka, Zijing Sheng, Kunihiko Sakumi. MUTYH-dependent programmed cell death triggered by 8-oxoguanine and its implication in tumor suppression and neurodegeneration. 15th International Congress of Radition Research: ICRR2015, 2015.
22. Sugako Oka, Ohno Mizuki, Daisuke Tsuchimoto, Kunihiko Sakumi, Yusaku Nakabeppu. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. BIT' 8th, Annual World Cancer Congress-2015, 2015.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/nfg/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

作見 邦彦 (SAKUMI, Kunihiko)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号: 50211933

(3)連携研究者

岡 素雅子 (OKA, Sugako)

九州大学・生体防御医学研究所・特任助教

(現: 福岡歯科大学・先端科学研究センター・准教授)

研究者番号: 80467894