

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460476

研究課題名(和文)がんDNA修復酵素遺伝子異常に起因する中心体過剰複製誘導機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism underlying the centrosome amplification induced by DNA repair abnormality in cancer

研究代表者

新村 和也 (Shinmura, Kazuya)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40321880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：一部のDNA修復酵素遺伝子の異常(発現量低下など)が、中心体過剰複製を引き起こすことが分かった。大腸がんにおいて、SASS6高発現が、中心体過剰複製、M期異常、染色体数的変化を誘導することと、患者予後不良因子となることが示された。非小細胞肺癌において、SGOL1遺伝子のスプライスバリエントSGOL1-Bは高発現しており、M期異常、中心体過剰複製を誘導し、抗がん剤であるタキサンに対する耐性と関連性を示した。中心体制御因子であるSTK15遺伝子の過剰増幅が胃がんの予後予測規定因子となることを明らかにした。がんにおけるNEIL1-3発現異常が体細胞変異数と関連性を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The followings were revealed in this study: (1) Abnormality of a part of DNA repair gene is associated with centrosome amplification. (2) SASS6 overexpression is associated with centrosome amplification, mitotic chromosomal abnormalities, chromosome instability, and a poor prognosis in patients with colorectal cancer. (3) Overexpression of a SGOL1 splicing variant type B (SGOL1-B) is associated with centrosome amplification, abnormal mitosis, and resistance to taxane in non-small cell lung cancer. (4) Amplification of STK15 (AURAK) gene which is involved in the centrosome regulation is a predictor of a poor prognosis in patients with gastric cancer. (5) Abnormal expressions of DNA glycosylase genes NEIL1, NEIL2, and NEIL3 are associated with somatic mutation loads in human cancer.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：Centrosome amplification DNA repair SASS6 SGOL1 NEIL MUTYH STK15

1. 研究開始当初の背景

中心体は、動物細胞において、直交する2つの中心小体とその周りのアモルファスな蛋白質集合体である中心小体周辺物質から構成され、微小管形成中心として機能する。中心体の複製サイクルは、細胞周期とリンクしており、一周中に一度だけ複製されるよう制御されているが、この制御機構が崩れ3つ以上の中心体ができる(= 中心体過剰複製)と、メロテリック結合などの機序を経て染色体数の異常を引き起こし、がんの発生と進展に関わることが考えられている。しかしながら、中心体過剰複製誘導機構については、まだ十分には解明されていない。

DNA 修復酵素遺伝子異常は、DNA 塩基配列の異常が起きやすい状態であるためがんの発生・進展過程に関わることが考えられるが、申請者は別経路として、中心体過剰複製を介するものを今回考えた。すなわち、DNA 修復酵素活性の低い状態が中心体過剰複製、そして引き続き染色体不安定性を起しやす、という仮説を立て、本研究では、がんにおけるコモンな中心体過剰複製誘導機構を明らかにしたい。実際には、遺伝性乳がん・卵巣がんの原因遺伝子である BRCA1 は、DNA 修復酵素の一つであると同時に、その異常は中心体過剰複製を起しやす、ということが既に知られるが、その他はほとんど分かっていない。こうした遺伝子異常は、変異誘導と同時に染色体レベルでの異常を誘導するため、がんの発生と進展により大きな影響を与えられ、このような経路を明らかにしていくことは、今後の対がん戦略において重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DNA 修復酵素遺伝子異常ががんの発生・進展過程に関わる機構として、変異誘発の他に、中心体過剰複製を介した染色体不安定性誘導があるのではないかと考え、がんにおけるコモンな中心体過剰複製を引き起こす DNA 修復酵素遺伝子異常を明らかにすることである。そのために、(1) 中心体過剰複製につながる DNA 修復酵素遺伝子異常のスクリーニング、(2) DNA 付加体生成物質を用いた中心体過剰複製誘導を利用したスクリーニング、(3) 肺・胃・大腸がんにおける DNA 修復・中心体制御遺伝子異常の解析、の柱で研究を進める。得られる知見は、将来的ながん治療法の確立につながる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

既知の DNA 修復系に異常のない細胞株、また、各種 DNA 修復系(ミスマッチ修復系、塩基除去修復系など)の異常を有している細胞株を用い、中心小体を安定蛍光標識した株を樹立する。これを用い、(1) siRNA knock-down 法により、(2) DNA 付加体生成物質投与により、中心体過剰複製(3個以上の中心体を有

する細胞の割合の増加)を蛍光顕微鏡を用いて中心体数を計測することによりスクリーニングする。抽出遺伝子は、レスキュー実験による確認後、中心体過剰複製・染色体不安定性誘導機構を各種分子生物学的手法を用いて詳細に検討する。また、肺・胃・大腸がんを中心として DNA 修復・中心体制御遺伝子の変異、遺伝子増幅、発現異常を検索し、がんにおける中心体過剰複製を起こすコモンな機構を明らかにする。

4. 研究成果

主な研究成果として、次の(1)-(7)を挙げる。(1) 一部の DNA 修復酵素遺伝子の異常(発現量低下など)が、中心体過剰複製を引き起こすことが分かった。(2) 正確な染色体分離が行われる上で重要な役割を果たす分子であるヒトシュゴシン(SGOL1)のスプライズ variant である B 型が原発性非小細胞肺がんの多くで高発現していた。また、B 型を非小細胞肺がん細胞株で高発現させる実験により、B 型高発現が、染色体の誤った分離、早期染色体分離、M 期進行の遅延、中心体過剰複製、抗がん剤であるタキサンに対する耐性と関連性を示した。これらの結果は、非小細胞肺がんにおいて、SGOL1 の B 型が M 期異常とタキサン耐性を誘導することを示唆している。(3) 中心体制御因子である STK15 (AURAK) セリン/スレオニンキナーゼ遺伝子の過剰増幅が、非受容体型チロシンキナーゼ TNK2(ACK1)とともに原発性胃がんの予後予測規定因子となることを明らかにした。後者は、さらに独立した予後予測規定因子となること、その高発現が遊走能/足場非依存性増殖能の増加を示し、特定のパスウェイの活性化につながることを明らかにした。(4) SASS6 は中心体制御に関わる遺伝子であるが、癌における遺伝子異常はこれまで報告されていなかった。我々は、今回、原発性大腸癌の6割程度において SASS6 の mRNA 発現および蛋白質発現が上昇していることを明らかにした。また、DLD-1 大腸癌細胞株の SASS6 の安定発現誘導株を用い、SASS6 高発現が、中心体過剰複製、M 期異常(染色体不整整列、ラギング染色体)、染色体数的変化を誘導することを示した。がんゲノムアトラス(TCGA)のデータを用いても、大腸癌での SASS6 mRNA 高発現が示され、またその高発現は患者予後不良因子となることが示された。さらに、多くの癌の種類(8/11種)で SASS6 は mRNA レベルでの高発現を示し、淡明細胞型腎細胞癌と肺腺癌では予後不良因子になることも示された。以上より、SASS6 高発現は大腸癌に関わり、その予後不良因子となることが示唆された。また、SASS6 高発現は多くの癌で共通する遺伝子異常である可能性が示唆された。(5) WD Repeat Domain 62 (WDR62) は中心体等に局在し、細胞周期の進行、中心体制御等において重要な役割を果たすことが報告されている。また、WDR62 遺伝子の生殖細胞系

列変異保有者では、小頭症が誘導されることが報告されている。しかし、頻度の高いヒト腫瘍である肺腺癌における WDR62 遺伝子異常についてはこれまでに報告がないため、本研究ではその発現異常の有無の点から WDR62 を調べた。WDR62 は肺腺癌部で有意に発現が上昇しており、また、2 以上の T/N 比を示す症例は全体の 48.4%も認められた。また、病期 Stage III/IV 群は I/II 群に比べて有意に発現が高かった。また、免疫組織化学染色による WDR62 蛋白質発現レベルの検討の結果、WDR62 が蛋白質レベルにおいても過剰発現していることが示された。これらのことから、肺腺癌では WDR62 が高発現していることが示唆された。(6) 8-ヒドロキシグアニンなどの酸化損傷塩基の除去修復に関わる MUTYH は、OGG1 と double knockout させると、その細胞は、酸化ストレス誘導下で中心体過剰複製を起こしやすいことが知られている。また、MUTYH 関連ポリポーシス(MAP)の原因遺伝子でもある。この MUTYH および OGG1 の日本人若年発症大腸癌患者 34 名における塩基配列異常を調べた。2 つの病原性アレルを有する症例は見られなかったが、MUTYH の p.R19*および p.R109W を検出した。両者の非日本人 MAP 症例での報告例、今回の DNA 切断分析および supF 前突然変異分析で示された低修復/低突然変異抑制活性から、両者が日本人 MAP 病原性アレル候補であることが考えられた。また、さらに、MUTYH の日本人由来の 9 つのミスセンス型塩基 variant について機能解析 (DNA 切断分析および supF 前突然変異分析) を行い、p.N238S と p.R247G が野性型と比べて活性が低いことから、MAP 病原性アレル候補であることが示唆された。(7) DNA グリコシラーゼ NEIL1, NEIL2, NEIL3 遺伝子のヒトの各種癌における発現異常が癌ゲノムアトラスのデータを用いた解析により、体細胞変異数と関連性を示すことが明らかになった。

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 8 件)

Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Igarashi H, Goto M, Tao H, Inoue Y, Nakamura S, Misawa K, Mineta H, Sugimura H. Abnormal Expressions of DNA Glycosylase Genes NEIL1, NEIL2, and NEIL3 Are Associated with Somatic Mutation Loads in Human Cancer. *Oxid Med Cell Longev* 査読有 2016: 1546392, 2016. DOI: 10.1155/2016/1546392.

Shinmura K, Kato H, Goto M, Yamada H, Tao H, Nakamura S, Sugimura H. Functional Evaluation of 9 Missense-Type Variants of the Human DNA Glycosylase Enzyme MUTYH in the Japanese Population. *Hum Mutat* 査読有

37: 350-353, 2016. DOI: 10.1002/humu.22949.

Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Nagura K, Kamo T, Okubo Y, Inoue Y, Kurabe N, Du C, Iwaizumi M, Kurachi K, Nakamura T, Sugimura H: SASS6 overexpression is associated with mitotic chromosomal abnormalities and a poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep* 査読有 34: 727-738, 2015. DOI: 10.3892/or.2015.4014.

Goto M, Shinmura K, Matsushima Y, Ishino K, Yamada H, Totsuka Y, Matsuda T, Nakagama H, Sugimura H: Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with exocyclic etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med* 査読有 76: 136-46, 2014. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.044

Shinmura K, Kurabe N, Goto M, Yamada H, Natsume H, Konno H, Sugimura H: PLK4 overexpression and its effect on centrosome regulation and chromosome stability in human gastric cancer. *Mol Biol Rep* 査読有 41: 6635-6644, 2014. DOI: 10.1007/s11033-014-3546-2.

Shinmura K, Kiyose S, Nagura K, Igarashi H, Inoue Y, Nakamura S, Maeda M, Baba M, Konno H, Sugimura H: TNK2 gene amplification is a novel predictor of a poor prognosis in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol* 査読有 109: 189-197, 2014. DOI: 10.1002/jso.23482.

Shinmura K, Goto M, Tao H, Kato H, Suzuki R, Nakamura S, Matsuda T, Yin G, Morita M, Kono S, Sugimura H: Impaired 8-hydroxyguanine repair activity of MUTYH variant p.Arg109Trp found in a Japanese patient with early-onset colorectal cancer. *Oxid Med Cell Longev* 査読有 2014: 627351, 2014. DOI: 10.1155/2014/617351.

Matsuura S, Kahyo T, Shinmura K, Iwaizumi M, Yamada H, Funai K, Kobayashi J, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Takahashi T, Inui N, Suda T, Chida K, Watanabe Y, Sugimura H: SGOL1 variant B induces abnormal mitosis and resistance to taxane in non-small cell lung cancers. *Sci Rep* 査読有 3: 3012, 2013. DOI: 10.1038/srep03012.

[学会発表](計 6 件)

新村和也, 後藤正憲, 松島芳隆, 石野孔祐, 戸塚ゆ加里, 松田知成, 中釜齊, 榎村春彦. ヒト DNA グリコシラーゼ TDG はエテノ DNA 付加体と誤対合するチミン

の除去修復に関わる. 第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会 2015 年 6 月 11-12 日 鹿児島

新村和也, 加藤寿美, 川西祐一, 加茂隆春, 井上裕介, 倉部誠也, 杜春平, 倉地清隆, 中村利夫, 梶村春彦. SASS6 高発現は大腸癌の M 期染色体異常と患者予後不良と関連性を示す. 第 104 回日本病理学会総会 2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日 名古屋

Matsuura S, Kahyo T, Shinmura K, Iwaizumi M, Yamada H, Funai K, Niwa H, Takahashi T, Suda T, Watanabe Y, Sugimura H: SGOL1 variant B induces abnormal mitosis and resistance to taxane in non-small cell lung cancers. 73th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sep 25-27, 2014 Yokohama

新村和也, 後藤正憲, 陶弘, 加藤寿美, 中村悟己, 松田知成, 梶村春彦. 日本人若年発症大腸がん患者で見つけられた低 8-hydroxyguanine 修復・突然変異制御活性を示す MUTYH variant. 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会 2014 年 9 月 4-5 日 京都

新村和也, 後藤正憲, 陶弘, 加藤寿美, 中村悟己, 松田知成, 梶村春彦. 日本人若年発症大腸がん患者で見つけられた低 8-hydroxyguanine 修復・突然変異制御活性を示す MUTYH variant. 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 24-26 日 広島

Goto M, Shinmura K, Matsushima Y, Ishino K, Totsuka Y, Nakagama H, Sugimura H. The repair mechanism of human base excision repair enzyme TDG on etheno-DNA adducts. 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 3-5, 2013 Yokohama

〔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

新村 和也 (SHINMURA KAZUYA)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40321880

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：