

令和元年5月30日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08709

研究課題名(和文) 高い中心体数的異常を示すヒトがんの特徴とその要因・阻害剤感受性に関する研究

研究課題名(英文) Characteristics of human cancers showing high-level centrosome amplification and their sensitivity to drugs targeting centrosome amplification

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：中心体局在因子WDR62の高発現は肺腺癌で予後不良因子となり、そこにTPX2との共発現を介したAURKAの活性化による中心体過剰複製が関与する可能性が考えられた。また、Translesion DNA合成ポリメラーゼの一つであるPOLQは肺腺癌で高発現しており、病期進行、変異頻度増加、PLK4高発現(中心体過剰複製誘導)と関連性を示すことが示された。さらに、中心体局在因子STILの肺癌における高発現、および、その染色体コピー数異常がより起こりやすいことが示され、STIL高発現による中心体過剰複製を介した染色体数的異常誘導の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌における中心体過剰複製を起こす要因や機構、および、中心体過剰複製と関連する癌形質に関する理解が深まった。将来的な癌治療戦略に貢献でき、国民の福祉向上につながる可能性があるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The followings were revealed in this study: (1) Overexpression of WDR62, which is localized in centrosome and cytoplasm, is associated with a poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma (LAC) and concurrent overexpression of WDR62 and TPX2, a WDR62-interacting protein that is also overexpressed in LAC, induced centrosome amplification via AURKA activation in lung cells. (2) Overexpression of POLQ, one of translesion DNA synthesis polymerase, is associated with advanced pathologic stage, increased somatic mutation load, and PLK4 overexpression, the last inducing centrosome amplification, in LAC, suggesting that POLQ overexpression is involved in the pathogenesis of LAC. (3) Overexpression of centrosomal protein STIL in lung cancer is associated with high-level abnormality in chromosomal copy number, suggesting the induction of chromosomal numerical abnormality resulting from centrosome amplification due to STIL overexpression in lung cancer.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：中心体数的異常 中心体過剰複製 WDR62 POLQ DNA グリコシラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中心体は、ヒト細胞において、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、M期には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不安定性が誘導され、がんの発生と進展に関わることが考えられている。

現在がんにおける中心体数的異常(過剰複製)を標的とした治療法が開発されつつある。主なものとして中心体クラスタリング(複数の中心体がまとまり二極性紡錘体を形成する機構)を阻害することにより、多極化を介し、細胞死を誘導するものがある。こうした治療の対象となるものは、中心体過剰複製を起こしやすいがんと想起されるが、中心体過剰複製を示す率が低いものと高いものの区別がこれまでなされておらず、その高率ながんの特徴が明らかにされてこなかった。

2. 研究の目的

がんにおける中心体数的異常(過剰複製)を標的とした治療法が現在開発されつつある。しかしながら、その治療対象となるような中心体数的異常を示しやすいがんの特徴や要因は明らかではない。本研究の目的は、その数的異常レベルが高いがんの特徴(染色体異常性、生命予後、悪性細胞形質など)を明らかにし、がんにおけるどのような遺伝子異常の組み合わせがその要因となるのかを明らかにし、また、阻害剤の適応性を把握することである。

3. 研究の方法

目的遂行のために以下の柱で研究を進める。(1)各種がんでの、高い中心体数的異常を示すがんの特徴の同定:組織マイクロアレイで中心体を可視化して高中心体数的異常がんを判定し、その特徴を同定する。(2)各種がんでの、高い中心体数的異常を示すがんの原因の同定:組織マイクロアレイの系、細胞株の系で、中心体制御・DNA修復酵素遺伝子の異常の組み合わせによる高中心体数的異常誘導を検討する。(3)高い中心体数的異常を示すがんに対する治療法の検討:中心体クラスタリング阻害剤などの適応を検討する。(4)研究(1)(2)補完のための、各種がんでの中心体制御・DNA修復遺伝子異常の解析:各種がんでの頻度、異常を起こす機構等を検討する。

4. 研究成果

主な研究成果として、次の(1)-(6)を挙げる。

(1) WDR62 は中心体等に局在し、細胞周期の進行、紡錘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。我々は、頻度の高いヒト腫瘍である肺腺癌における WDR62 遺伝子異常の病理学的意義について検討している。これまでに肺腺癌で mRNA レベル、蛋白質レベルともに発現が上昇していることを明らかにしてきた。今回、予後との関係を調べると、肺腺癌患者で、WDR62 のより高発現を示す群は、Kaplan-Meier 法で予後不良を呈することが示された(log-rank $P=0.0378$)。また、多変量解析を行うと、進行 pT、リンパ節転移とともに、WDR62 高発現は独立した予後不良予測因子となることが示された(HR = 2.032 [1.071-3.777], $P=0.0305$)。WDR62 高発現の肺細胞における影響については、結合因子 TPX2 と強い発現レベルの相関が肺腺癌で認められたため(Spearman の順位相関係数=0.6824)、肺癌細胞株 H1299 で WDR62 と TPX2 を共発現させたところ、他の WDR62 結合因子である AURKA の活性化が示され、さらに中心体過剰複製が示された($P<0.001$)。両因子発現による中心体過剰複製は、非腫瘍性気管支上皮細胞でも認められた。また、TCGA データベース解析により、WDR62 と TPX2 の高発現および発現相関は他の 13 種の癌でも示され、多くの癌で共通の事象であることが示唆された。これらのことから、肺腺癌における WDR62 高発現は予後不良因子となり、そこに中心体過剰複製が関与する可能性が考えられた。

(2) 酸化的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、酸化的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。この MUTYH が前立腺癌で低発現を示し、その低発現はエクソーム解析による総体細胞変異数、G:C to T:A 変異数の上昇につながることを示した。MUTYH 低発現前立腺癌細胞株は、低 DNA 修復能を示したため、これが関与したと推測された。

(3) 中心体局在因子 STIL は、中心小体複製に関わる蛋白質として知られ、その過剰発現は中心体過剰複製につながることを報告されている。我々は、ヒト肺癌における STIL 発現を検討した。蛋白質レベルにおいて、非癌肺組織(n=105)に比べ肺腺癌(n=268)および肺扁平上皮癌(n=98)では、統計学的に有意($P<0.0001$)な発現上昇が認められた。STIL 高発現は TNM 病期の進展と有意な関連性を示した。癌ゲノムアトラスのデータ解析でも mRNA 発現の上昇が肺腺癌および扁平上皮癌で確認され、ヒト肺癌における STIL 高発現が示唆された。さらに、染色体コピー数異常の程度に基づき肺腺癌および扁平上皮癌を 2 群に分けると、高異常群では STIL 発現レベルが有意に高いことが示された。STIL 高発現による中心体過剰複製を介した染色体数的異常誘導の可

能性が示唆された。

(4) 酸化的損傷塩基の除去修復に関わる DNA グリコシラーゼ MUTYH は、OGG1 と double knockout させると、その細胞は、酸化的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。我々は、臭素化 DNA 付加体 8-bromoguanine (8BrG) のヒト細胞における変異原性および修復機構を検討し、変異形式としては G->T の頻度が最も高く、また、G->C、G->A、deIG も見られること、修復に関しては MUTYH の A:8BrG 修復活性、および TDG/SMUG1 の T:8BrG 修復活性を明らかにした。MUTYH は MUTYH 関連ポリポーシス(MAP)原因遺伝子であり、MAP 大腸腫瘍では G->T 変異が起こりやすいので、MUTYH 高発現ヒト細胞株を樹立し 8BrG 導入部位での GT 変異頻度を調べると、高発現株では対照株に比べその頻度が低下していた。MAP 腫瘍への 8BrG 修復異常の関与の可能性が示唆された。

(5) Translesion DNA 合成(TLS)や DNA 二本鎖切断(DSB)の誤りがち修復に関わる POLQ の、ヒト肺腺癌での異常や癌化への役割について検討した。癌ゲノムアトラスデータおよび大学附属病院検体の解析で、POLQ は肺腺癌において mRNA および蛋白質レベルで高発現を示した(いずれも $P < 0.0001$)。臨床病理学的因子では、POLQ 蛋白質高発現はリンパ節転移、高臨床病期と関連した(それぞれ $P = 0.0012$, $P = 0.0008$)。また、POLQ mRNA 高発現群では体細胞変異数が有意に高値を示した($P < 0.0001$)。肺癌細胞株で誘導性 POLQ 高発現株を樹立し検討すると、POLQ 高発現株では、DSB 誘発剤に対して耐性を示し(50 microM エトポシドで平均 4.6 倍の差)、また、UV 照射した、あるいはチミングリコールを含んだシャトルプラスミドを用いた supF アッセイで高い変異頻度を示した(いずれも $P < 0.01$)。さらに、POLQ 高発現肺腺癌では中心体に局在を示す PLK4 が有意に高発現していたため(Spearman の順位相関係数は mRNA レベルで 0.8439, 蛋白質レベルで 0.7468)、POLQ および PLK4 を高発現させた肺癌細胞株を観察すると中心体過剰複製が認められた($P < 0.01$)。10 個の TLS ポリメラーゼ中では POLQ のみが高発現と変異数上昇との関連性が高かった。以上より、POLQ 高発現は肺腺癌に関与しており、そこに中心体過剰複製も関わることを考えられた。

(6) 中心体に局在したり、中心体数的制御に関わるものがある DNA グリコシラーゼ群の多種の蛋白質を精製し、酸化的損傷塩基 5-ヒドロキシウラシル(5OHU)に対する活性を検討した。すると、NTHL1 等の DNA グリコシラーゼが 5OHU:G 基質に対し修復活性を示した。NTHL1 は大腸に多発腺腫/癌を起こす遺伝性疾患である NTHL1 関連ポリポーシス(NAP)の原因遺伝子であることから、その variant 型の修復機能評価を行った。すると、Q90X, Y130X, R153X, Q287X は DNA 切断アッセイで低活性を示し、かつ supF アッセイで 5OHU 誘発変異の抑制能を示さず、NAP の病原性アレルである可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Igarashi H, Inoue Y, Yoshimura K, Nakamura S, Fujita H, Funai K, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Sugimura H. WDR62 overexpression is associated with a poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Mol Carcinog* 査読有り Vol. 56, No. 8, 2017, pp. 1984-1991.

DOI: 10.1002/mc.22647.

Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Yoshimura K, Igarashi H, Goto M, Tao H, Inoue Y, Sugiyama T, Furuse H, Ozono S, Sugimura H. Reduced expression of the DNA glycosylase gene MUTYH is associated with an increased number of somatic mutations via a reduction in the DNA repair capacity in prostate adenocarcinoma. *Mol Carcinog* 査読有り Vol. 56, No.2, 2017, pp. 781-788.

DOI: 10.1002/mc.22509.

Shinmura K, Kato H, Goto M, Tao H, Inoue Y, Nakamura S, Yoshida H, Tsuzaki E, Sugimura H. Mutation Spectrum Induced by 8-Bromoguanine, a Base Damaged by Reactive Brominating Species, in Human Cells. *Oxid Med Cell Longev* 査読有り Vol. 2017, 2017, pp. 7308501.

DOI: 10.1155/2017/7308501.

Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Goto M, Tao H, Yoshimura K, Nakamura S, Misawa K, Sugimura H: Defective repair capacity of variant proteins of the DNA glycosylase NTHL1 for 5-hydroxyuracil, an oxidation product of cytosine. *Free Radic Biol Med* 査読有り Vol. 131, 2019, pp. 264-273.

DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.010.

Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Yoshimura K, Tsuchiya K, Takahara Y, Hosokawa S, Kawase A, Funai K, Sugimura H: POLQ Overexpression Is Associated with an Increased Somatic Mutation Load and PLK4 Overexpression in Lung Adenocarcinoma. *Cancers* 査読有り Vol. 11, 2019, pp. 722.

DOI: 10.3390/cancers.11050722.

〔学会発表〕(計 1件)

新村 和也, 加藤 寿美, 川西 祐一, 五十嵐 久喜, 井上 裕介, 船井 和仁, 棚橋 雅幸, 丹羽 宏, 小川 博, 梶村 春彦、WDR62 過剰発現は肺腺癌患者の予後不良因子となり、また、肺癌細胞の悪性度を増す、日本病理学会総会、2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。