

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12605

研究課題名(和文) マイクロサテライト不安定性を惹起する環境・遺伝要因の探索

研究課題名(英文) Attempt to search for environmental and genetic factors that enhance microsatellite instability in mismatch repair deficient human cells

研究代表者

續 輝久 (TSUZUKI, Teruhisa)

福岡歯科大学・口腔歯学部・客員教授

研究者番号：40155429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ミスマッチ修復(MMR)遺伝子の欠損は大腸がんが多発する遺伝性疾患リンチ症候群の原因となり、患者ではマイクロサテライト配列の不安定性(MSI)が観察される。ヒト腫瘍で検出されるMSIには、1ないし数個のリピート単位の欠失・挿入が見られるAタイプと、新しいアレルが出現したかのような大きな変化を伴うBタイプの質的に異なる2つのモードが存在する。
AcGFPのORFとmCherryのORFをD13S175のCAリピート・停止コドンカセットを挿入し、BタイプのMSIが生じるとAcGFP-mCherry融合タンパク質が発現するベクターの構築を行い、MMR欠損ヒト細胞を用いてその有用性の検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：Using the CRISPR/Cas9 genome editing technique, we established HeLa clones carrying MSH2 variations; G674R, G674D and G674A, those were reported in Lynch syndrome (LS) patients. These clones showed hyper resistance to MNU, with a characteristic feature of MMR-deficiency. And the mutation frequencies observed at the HPRT locus were uniformly elevated in these clones. Another hallmark of MMR deficiency is microsatellite instability (MSI) that is known to widely and drastically undergo length changes in MMR-defective tumors. However, microsatellite alterations in these clones were generally modest. Alterations in dinucleotide microsatellites were rare and, in all cases, within 6-bp, which corresponds to Type A instability that we have previously reported in Msh2-deficient mice. Mononucleotide repeats were stable in the clones. Accordingly, molecular defects, not yet discerned, should underlie genomic instability observed in MSI+ human tumors including ones developed in LS patients.

研究分野：分子遺伝学・放射線生物学

キーワード：ゲノム不安定性 大腸がん ミスマッチ修復系

1. 研究開始当初の背景

マイクロサテライトは、1ないし数塩基対の最も小さな繰返し単位をもつリピート配列で、真核生物のゲノムに多数散在する特徴的な塩基配列である。一部のヒトがん細胞ではこれらのリピートの変化が頻繁に観察され、これらの変化は「マイクロサテライト不安定性 (MSI: *microsatellite instability*)」と呼ばれている。特に、大腸がんや子宮体がんが多発する遺伝性疾患リンチ症候群の大腸がん (HNPCC: *hereditary non-polyposis colorectal cancer*) では、マイクロサテライトの長さ (リピート数) が、正常組織に比べて高頻度に変化することが見出された。その後、リンチ症候群の原因遺伝子としてミスマッチ修復 (MMR: *mismatch repair*) 因子が同定され、MSI は DNA ポリメラーゼの複製エラーで生じたマイクロサテライト配列内での欠失・挿入が MMR の欠損により修復されずに残り、次の複製でリピート数の変化が固定されて生じるものと理解されている。これらのことから、MSI は HNPCC の hallmark とされて診断に用いられている。連携研究者の織田らは、高精度マイクロサテライト解析系を開発して精緻な解析を行うことにより、ヒト腫瘍で検出される MSI には、マイクロサテライトに1ないし数個のリピート単位の欠失・挿入がみられる Type A と、これとは明らかに異なり、新しいアレルが出現したかのような大きな変化を伴う Type B という、質的に異なる2つのモードが存在することを明らかにした (図1)。さらに MMR 因子の一つ *Msh2* 遺伝子の欠損マウスを用いた解析から、MMR 欠損細胞では Type A しか認められないことを明らかにしている。即ち、Type B MSI 陽性のヒトがん細胞は、MMR 欠損とは異なる要因で MSI が生じており、そのことが発がんの要因である可能性が考えられた。

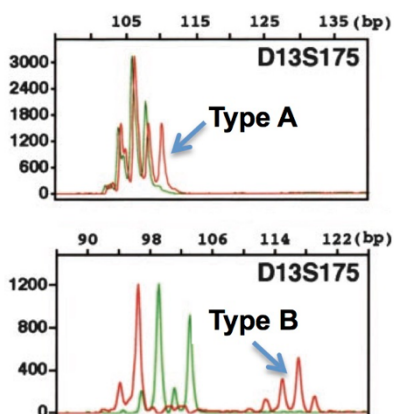


図1 ヒト腫瘍に見られる異なるモードのマイクロサテライト不安定性

2. 研究の目的

家族性大腸がんの解析からマイクロサテライト配列の不安定性にはミスマッチ修復異常が関連していることが明らかにされたが、

それ以外の要因も関わっていると考えられるデータがあるにもかかわらず、他の要因は明らかにはされていない。本研究では、マイクロサテライト配列の不安定性を簡便に検出する実験系を用いて、マイクロサテライト配列不安定性を引き起こす環境要因の探索および遺伝的要因の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) リンチ症候群で認められる MSH2 変異の導入とマイクロサテライト配列不安定性の解析

MMR を欠損したヒト細胞で MSI 解析を行うために、MSH2 完全欠損株に加えて、Type B MSI が報告されているリンチ症候群で認められる MSH2 G674R, G674D と G674A 変異を持つ HeLa 細胞を CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により作出した。当初の計画では、ヒト細胞で Type B MSI を効率よく検出するために、Type B MSI が生じると GFP/YFP 融合タンパク質が発現でき、Type A MSI が生じた場合は GFP は発現しても YFP は発現しない Type B ベクターを使用する予定であったが、構想通りに機能することの確認が困難だったために断念し、従来解析法を用いて MSI 解析を行った。

(2) マイクロサテライト配列不安定性を誘発する環境要因の検討

MSI を示す大腸がんが由来する大腸上皮細胞は、クリプトに存在する増殖能力の高い幹細胞に由来する。また以前私たちは、腸管は酸化ストレスの高い環境であることを示している。MSH2 完全欠損及び MSH2 G674R, G674D と G674A 変異を持つ HeLa 細胞にマイクロサテライト配列不安定性を誘発するために、10%FCS による増殖刺激存在下でシングルコロニーを 12 個単離して、2 塩基繰返し配列 D10S197 遺伝子座の MSI について解析を行った。また、酸化ストレスの効果を調べる目的で、*Msh2* 欠損マウス由来線維芽細胞を 10% FCS 存在下で、1 mM $KBrO_3$ (酸化剤) で週 2 回処理をし、DNA を抽出して D6mit59 遺伝子座の MSI 解析を行った。

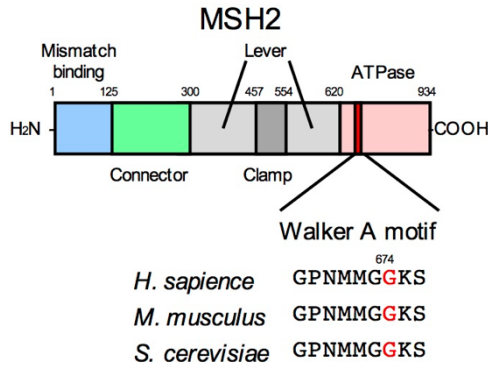
(3) マイクロサテライト配列不安定性を誘発する遺伝的要因の同定

これまでの解析で Type A MSI は DNA ポリメラーゼの複製エラーで生じたマイクロサテライト配列内での欠失・挿入が MMR の欠損により修復されずに残り、次の複製でリピート数の変化が固定されて生じると考えることができる。しかし Type B MSI は単純な複製エラーに起因するとは考えられないことから、複製ストレスや酸化ストレスによる DNA 二本鎖切断が修復の過程で生じるという仮説を立てた。そこで、DNA 二本鎖切断修復に関与している DNA 修復関連タンパク質の遺伝子に対する shRNA を導入して、MSI の解析を行った。

4. 研究成果

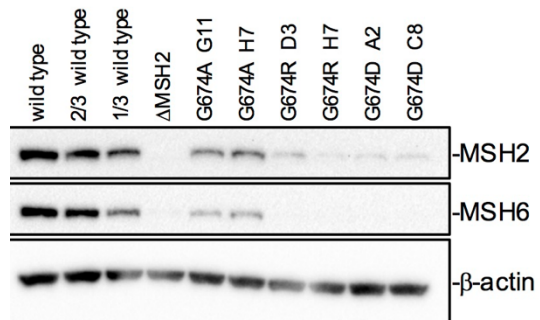
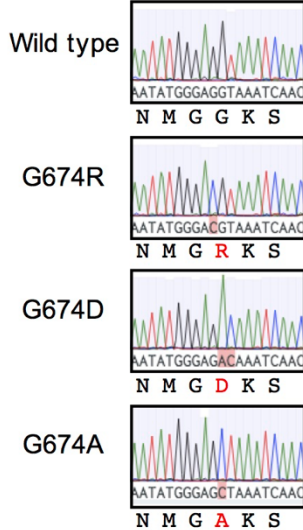
(1) リンチ症候群で認められる MSH2 変異の HeLa 細胞への導入とその解析

大腸がんや子宮内膜がんなど様々ながんを多発するリンチ症候群の患者では、ミスマッチ修復遺伝子 *MSH2* に生殖系列での変異が見ついている。その中に *MSH2* の Walker A motif 中の 674 番目のグリシン(下図)がアルギニン(G674R)あるいはアス

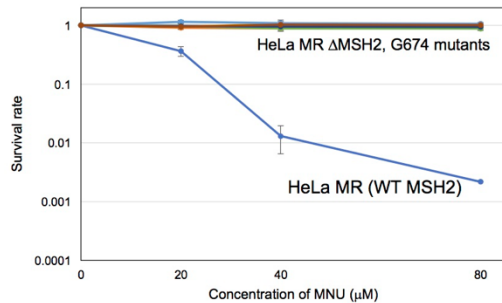


ギン酸(G674D)に置換する変異が見ついている。674 番目のグリシンをアラニン(G674A)に置換させたマウスでは、ミスマッチ修復能は欠損しているが、アポトーシス誘導能は正常であると報告されている。今回私たちは、CRISPR/Cas9 を利用し、*MSH2* の G674A 変異体に加えて、リンチ症候群の患者で検出されているアルギニン(G674R) 及びアスパラギン酸(G674D)に置換した変異体を作成し解析した(右図)。ウエスタンブロット解析の結果、*MSH2* の G674A 変異体は野生型とほぼ同等の安定性を示すが、*MSH2* の G674R および G674D 変異体は発現量が親株の 10%程度である

ことから、これらのリンチ症候群変異は *MSH2* の不安定化を引き起こす可能性が考えられた(右欄上図)。この結果は出芽酵母を用いた解析と異なった結果を示しており、出芽酵母を用いた解析でミスマッチ修復能が正常であると報告されているリンチ症候群の *MSH2* の変異体は、ヒト細胞内では非常に不安定になっている可能性が考えられた。*HPRT* 遺伝子座を用いた突然変異頻度解析の結果、これら 3 つの変異体はいずれも親株に比べて自然突然変異頻度が 8~10 倍上昇していたことから、ミスマッチ修復能が欠損していることを確認した。また、アル



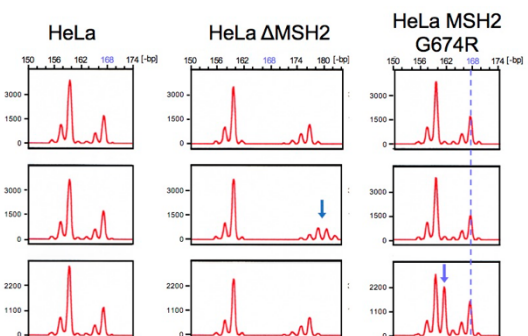
キル化剤 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) に対する感受性を、コロニー形成能を指標にして調べたところ、*MSH2* 完全欠損変異(Δ*MSH2*)と同様に、G674A 変異を含む全ての G674 変異体は MNU に抵抗性を示し、アポトーシス誘導能を欠損していることがわかった(下図)。



G674A 変異を持つマウス細胞は、アルキル化剤処理によるアポトーシス誘導は正常に起こることが報告されているが、HeLa *MSH2* G674A 変異体は全く MNU に感受性を示さない。この差異は、HeLa 細胞(ヒトがん細胞)と不死化させたマウス胎児線維芽細胞(MEF)の違いが反映している可能性があり、G674A 変異のヒトにおける機能解析は今後の課題である。

(2) マイクロサテライト配列不安定性を誘発する環境要因の検討

MSH2 完全欠損及び *MSH2* G674R, G674D と G674A 変異を持つ HeLa 細胞にマイクロサテライト配列不安定性を誘発するために、10% FCS による増殖刺激存在下でシングルコロニーを 12 個単離して MSI 解析を行った。その結果の一部を下図に示す。



正常な MSH2 を持つ HeLa 細胞では MSI は全く認められないが、 Δ MSH2 と G674 変異を持つ HeLa 細胞は、Type A MSI を示した。G674D 変異を持つ HeLa 細胞では他の細胞株に比べて MSI 発生頻度の上昇が認められた。しかし、Msh2 欠損マウス細胞と同様に Type B MSI は認められなかった。これらの結果は、複製ストレス存在下で増殖しているヒトがん細胞でも、ミスマッチ修復が欠損しただけでは Type B MSI は生じないことを示唆している。がん細胞を使用したことで、Type B MSI が見えなくなっている可能性が考えられるので、現在ゲノム編集により iPS 細胞由来の MSH2 欠損細胞を樹立して解析を進めている。酸化ストレスと Type B MSI との関連を調べるために、10%FCS 存在下で 1 mM KBrO₃ (酸化剤) で週 2 回処理した Msh2 欠損マウス由来線維芽細胞を用いて D6mit59 遺伝子座の MSI 解析を行ったが、未処理の細胞と同様に Type B MSI は観察されなかった。

(3) マイクロサテライト配列不安定性を誘発する遺伝的要因の同定

これまでに行った遺伝子工学やゲノム編集を用いてミスマッチ修復遺伝子のみを欠損させたマウスおよびヒト細胞の解析では、Type A MSI は MMR の欠損だけで生じることが明らかになった。すなわち、MMR 欠損細胞では DNA ポリメラーゼの複製エラーで生じたマイクロサテライト配列内での欠失・挿入が修復されないで残り、次の複製でリピート数の変化が固定されて生じる。しかし Type B MSI は、これらの細胞では観察されないことから、複製ストレスや酸化ストレスによる DNA 二本鎖切断が修復される過程で生じるという仮説を立てた。MLH1 欠損がん細胞に DNA 二本鎖切断修復に関与している DNA 修復関連タンパク質の X 遺伝子に対する shRNA を導入して、D2S123 遺伝子座の MSI 解析を行った結果、MSI が観察されなくなった。この結果は、遺伝子 X が MMR 欠損による MSI 誘導に必須であることを示唆している。遺伝子 X と MMR との関係、MSI 誘導における役割の解明は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Matsuda, D., Matsumoto, T., Honma, K., Ikawa-Yoshida, A., Onimaru, M., Furuyama, T., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Maehara, Y.: BUBR1 insufficiency in mice increases their sensitivity to oxidative stress. *in vivo*, **30**, 769-776 (2016)

Ikawa-Yoshida, A., Matsumoto, T., Okano, S., Aoyagi, Y., Matsubara, Y., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Ohkusa, T., Nomura, M., Onimaru, M., Furuyama, T., Maehara, Y.: BubR1 insufficiency impairs liver regeneration in aged mice after hepatectomy through intercalated disc

abnormality. *Scientific Reports*, **6**, 32399 DOI: 10.1038/srep32399 (2016)

Evans, M. D., Misty, V., Singh, R., Gackowski, D., Róžalski, R., Siomek, A., Phillips, D. H., Zuo, J., Mullenders, L., Pines, A., Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sekiguchi, M., Tsuzuki, T., Bignami, M., Farmer, P. B., Oliński, R., Cooke, M. S.: 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 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.018 (2016)

Egashira, I., Takahashi-Yanaga, F., Nishida, R., Arioka, M., Igawa, K., Tomooka, K., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Nakabeppu, Y., Kitazono, T., Sasaguri, T.: Celecoxib and 2,5-dimethylcelecoxib inhibit intestinal cancer growth by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Sci.*, **108**, 108-115 (2017)

〔学会発表〕(計 21 件)

林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、釣本敏樹、續輝久: CRISPR/Cas9 を用いたヒト細胞のミスマッチ修復因子への変異導入、日本遺伝学会第 88 回大会、2016

鷹野典子、大野みずき、佐々木史子、中津可道、續輝久: ミスマッチ DNA 修復系が体細胞および生殖細胞ゲノムにおよぼす影響、日本遺伝学会第 88 回大会、2016

大野みずき、鷹野典子、中津可道、中別府雄作、續輝久: 酸化ストレスによる消化管腫瘍発生頻度上昇と特異的体細胞変異シグニチャー: Mutyh 欠損マウスを用いた解析、日本癌学会第 75 回学術総会、2016

林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、續輝久: ヒト細胞を用いたミスマッチ修復因子 MSH2 の変異体の解析、日本癌学会第 75 回学術総会、2016

林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、釣本敏樹、續輝久: Characterization of mismatch repair factor MSH2 variants found in Lynch syndrome, 日本放射線影響学会第 59 回大会、2016

Hayashida, G., Nakatsu, Y., Hidaka, K., Fujikane, R., Hidaka, M., Tsurimoto, T., Tsuzuki, T.: Development of assay systems to characterize the variants of mismatch repair factor MSH2 found in Lynch syndrome, The 10th International 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium, 2016

大野みずき、鷹野典子、佐々木史子、中津可道、續輝久：ミスマッチ修復欠損マウスを用いた新規生殖細胞変異の検出，日本環境変異原学会第45回大会，2016

鷹野典子、大野みずき、中津可道、中別府雄作、續輝久：*Mut*h欠損マウスにおける酸化ストレスによる消化管腫瘍発生頻度上昇と特異的体細胞変異シグニチャーの解析，日本分子生物学会第39回年会，2016

林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、釣本敏樹、續輝久：ヒト細胞由来ミスマッチ修復遺伝子変異体の作製とその解析，日本分子生物学会第39回年会，2016

宋穎霞、日高京子、中津可道、織田信弥、林田元気、藤兼亮輔、日高真純、續輝久：CRISPR/Cas9を用いたDNAポリメラーゼ δ R506H突然変異のMSH2-null HeLa MR細胞への導入，日本分子生物学会第39回年会，2016

Tsuzuki, T., Ohno, M., Takano, N., Taguchi, K., Nakabeppu, Y., Aoki, Y., Nohmi, T., Nakatsu, Y. Oxidative stress-induced intestinal tumors in *Mut*h-deficient mice treated with low doses of potassium bromate, 6th US-Japan DNA Repair Meeting, 2017

Hayashida, G., Nakatsu, Y., Hidaka, K., Fujikane, R., Hidaka, M., Oda, S., Tsuzuki, T. : MSH2 ATPase domain mutants found in Lynch syndrome patients show a marked instability in human cells, 日本癌学会第76回学術総会, 2017

Takano, N., Ohno, M., Hidaka, K., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T. : Oxidative stress-induced mutagenesis in *Msh2*-deficient mice, 日本癌学会第76回学術総会, 2017

大野みずき、鷹野典子、日高京子、作見邦彦、中別府雄作、中津可道、續輝久：大腸癌モデルマウスを用いた酸化ストレス誘発発がん体細胞突然変異の解析，日本癌学会第76回学術総会「環境発がん研究とゲノム解析の統合：大規模ゲノムデータから発がん要因を紐解く（環境-ゲノムネットワーク）」，2017

Tsuzuki, T., Ohno, M., Takano, N., Taguchi, K., Nakabeppu, Y., Nakatsu, Y. : Oxidative stress-induced tumorigenesis: Lesson from the experiments with DNA repair-deficient mice, 4th Transgenic Technology Meeting, 2017

大野みずき、鷹野典子、中津可道、佐々木史子、作見邦彦、中別府雄作、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 シンポジウム「発がんの変異シグネチャー」，2017

大野みずき、鷹野典子、中津可道、石原弘、中島裕夫、續輝久：セシウム137の低線量内部被ばくによる生物影響：*Msh2*欠損マウ

スを用いた体細胞突然変異解析の試み，日本環境変異原学会第46回大会，2017

續輝久：遺伝子改変マウスを用いた酸化DNA損傷に起因する発がん機序の解明，日本環境変異原学会第46回大会 日本環境変異原学会賞受賞講演，2017

Tsuzuki, T., Ohno, M., Takano, N., Taguchi, K., Nakabeppu, Y., Nakatsu, Y. : DNA repair system as a constituent of mechanism underlying practical threshold of oxidative stress-induced tumorigenesis, The 12th International Conference and the 5th Asian Congress on Environmental Mutagens, Symposium 6: Molecular Mechanisms Underlying Thresholds of Genotoxic Carcinogens, 2017

林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、織田信弥、釣本敏樹、續輝久：リンチ症候群患者に見出された変異型MSH2を持つヒト細胞株の樹立と解析，2017年度生命科学系学会合同年次大会 [日本分子生物学会第40回年会/日本生化学会第90回大会]，2017

Tsuzuki, T., Ohno, M., Takano, N., Taguchi, K., Nakabeppu, Y., Nakatsu, Y. : DNA repair system as a constituent of mechanism underlying practical threshold of oxidative stress-induced tumorigenesis, 2017年度生命科学系学会合同年次大会 [日本分子生物学会第40回年会/日本生化学会第90回大会] シンポジウム「放射線発がんの分子生物学」，2017

[図書] (計1件)

Nohmi, T., Tsuzuki, T. : Possible mechanisms underlining genotoxic thresholds: DNA repair and translesion DNA synthesis (Chapter 4), Thresholds of Genotoxic Carcinogens - From Mechanisms to Regulation, pp. 49-66, Eds. Nohmi, T., Fukushima, S., Academic Press (2016).

[産業財産権]
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

續輝久 (TSUZUKI, Teruhisa)
福岡歯科大学口腔歯学部 客員教授
九州大学大学院医学研究院 教授 (平成28年度まで)
研究者番号：40155429

(2) 研究分担者

中津可道 (NAKATSU, Yoshimichi)
九州大学大学院医学研究院 准教授
研究者番号：00207820

(3)連携研究者

織田信弥(ODA, Shinya)

九州がんセンター臨床研究センター 室長

研究者番号： 40333372