

平成22年 5月 25日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013042

研究課題名（和文） 突然変異誘導因子AIDによる発がん機構

研究課題名（英文） Carcinogenesis by a genome mutator AID

研究代表者

木下 和生 (KINOSHITA KAZUO)

滋賀県立成人病センター研究所・遺伝子研究部門・専門研究員

研究者番号：50293874

研究成果の概要（和文）：免疫に関わる抗体の遺伝子に変異を入れて多様な抗体を作る酵素 AID が偶発的に抗体以外の遺伝子に変異を導入することにより発がんに至るという仮説を支持する以下の結果が得られた。(1)肝炎ウイルスによる肝がんやピロリ菌による胃がん AID が存在している、(2)肝臓で AID が作られるマウスを遺伝子工学により作製すると肝臓がんが発症した。(3)AID のないマウスでは実験的皮膚がんが起りにくかった。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that mutations required for cancer development are created by an enzyme called AID, which induces mutations not only in antibody genes to diversify antibody repertoire but also in other tumor-related genes. In this study, we obtained three lines of evidence supporting our hypothesis: (1) AID exists in cancer of liver and stomach associated with hepatitis virus and *Helicobacter pylori* infection, respectively, (2) a mouse strain expressing AID in liver is prone to develop liver cancer, and (3) AID-deficient mice are resistant to experimental skin cancer induction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,700,000	0	9,700,000
2006年度	9,700,000	0	9,700,000
2007年度	9,700,000	0	9,700,000
2008年度	9,700,000	0	9,700,000
2009年度	9,700,000	0	9,700,000
総計	48,500,000	0	48,500,000

研究分野：がん、免疫学、分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：AID, 発がん, 感染, 慢性炎症, 突然変異, 肝臓がん, 皮膚がん

1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子の異常によって起こる病気であり、遺伝情報を変化させる突然変異が蓄積することにより発症する疾患である。がんにおける遺伝子の突然変異が生じる仕組みはよくわかっていない。とくに、感染症や慢性

炎症を背景に発症する胃がんや肝臓がんにおいて、炎症と突然変異を結びつける実体が何であるのかは大いなる謎であり、これを突き止める事はがんを予防し治療するために極めて重要であると考えられていた。一方、抗体遺伝子の研究から遺伝子を変化させる

作用（点突然変異や染色体転座を含む）を持つ酵素 AID を我々は発見した。AID は本来、抗体遺伝子に突然変異を高頻度に導入して多様な抗体を生み出すのに必要な酵素であるが、AID が本来の標的である抗体以外の遺伝子にも変異を導入し、がんを発症させる可能性があることを我々はマウスを用いた実験により明らかにした。

2. 研究の目的

(1) AID ががんを発症させるメカニズムの解明

がんの研究で古くから使われているマウス皮膚化学発がん実験モデルを用いて AID が発がんにおいてどのような役割を演じているのか調べる。この発がん実験モデルでは異なる働きをする 2 種類の薬剤が用いられる。まず、イニシエーター (initiator 開始するもの) と呼ばれる DNA に変異を導入する化学薬品が使われ、次に、プロモーター (promoter 促進するもの) と呼ばれる細胞の増殖を促進する化学薬品が使われる。実験ではイニシエーターを一回皮膚に塗布し、引き続いてプロモーターを継続的に週 2 回塗布すると、3 カ月ほどして皮膚にイボのような腫瘍が発生してくる。腫瘍形成にはイニシエーターとプロモーターの両方が必要でどちらか単独では腫瘍はほとんど発症しない。AID は変異を誘導するのでイニシエーターとして機能することが予想される。

(2) AID による発がんモデルマウスの作成

我々が作成した AID トランスジェニックマウスは高頻度に T 細胞リンパ腫を発症し、生後 1 年以内に死亡してしまうため、発症に 1 年以上の時間を要する肝臓や胃など他の臓器のがんのモデルには用いることができない。そこで、臓器特異的に AID を発現できるトランスジェニックマウスを作成し、B リンパ球、あるいは肝臓に AID を発現させることで、それぞれの腫瘍のモデルマウスを作成する。

(3) ヒトのがんにおける AID の発現

ヒトのがんに AID が関与するかどうかを検討するため、感染症を背景とするがんとして代表的なものである肝がん（肝炎ウイルスによる）と胃がん（ヘリコバクターピロリ菌）における AID の発現を調べる。また、肝臓や胃の細胞でどのような刺激により AID の発現が誘導されるのか細胞内シグナル伝達経路を含めて解析する。

3. 研究の方法

(1) AID を皮膚の基底層で発現する K14-AID トランスジェニックマウスを作製する。このマウスと野生型マウスの皮膚にイニシエーターである DMBA とプロモーターである TPA を塗布した場合の皮膚腫瘍発生個数を記録する。同時に TPA あるいは DMBA のみを投与

する実験も行い、腫瘍形成の DMBA 依存性あるいは TPA 依存性について 2 つの系統のマウス間で比較する。AID ノックアウトマウスに対しても同様の実験を行い、皮膚腫瘍の形成が内在性の AID 遺伝子発現に依存しているかどうか検討する。

(2) AID を臓器特異的に過剰発現できるコンディショナルトランスジェニックマウスを Cre-loxP 組換え系を用いて構築する。このマウスは特定の臓器で Cre を発現するマウスと交配させる事で、その臓器における AID 発現を誘導することができる。B 細胞特異的に Cre を発現する CD19-Cre マウスと交配させ、B リンパ腫が発症するか検討する。また、肝臓で Cre を発現する TNAP-Cre マウスと交配させ肝臓腫瘍が発症するか検討する。

(3) ヒト肝臓がんや胃がんにおける AID の発現を定量 RT-PCR、ウェスタンブロット、免疫染色法により検討する。ヒト肝臓がん、胃がん由来する細胞株を用いて、AID を誘導する分子機構に関して、TNF- α などの炎症性サイトカインとその主要シグナル伝達経路である NF- κ B 経路を中心に調べる。

4. 研究成果

(1) K14-AID トランスジェニックマウスは野生型と異なり、TPA あるいは DMBA 単独で皮膚腫瘍を発症する事が明らかとなった。このことは、AID がイニシエーターとしてのみならずプロモーターとしても機能しうる事を示している。プロモーターとしての TPA の作用には AID で代替可能な要素が含まれている可能性を示唆している。TPA により表皮角化細胞における AID の発現が誘導される事から、TPA のプロモーター活性には AID による変異誘導活性が含まれているのかもしれない。野生型マウスでは TPA 単独投与により低頻度の皮膚腫瘍が誘導されるが、この現象は AID ノックアウトマウスでは認められなかった。このことは内在性の AID 発現が皮膚化学発がんに関与している事を示唆する初めての知見である。

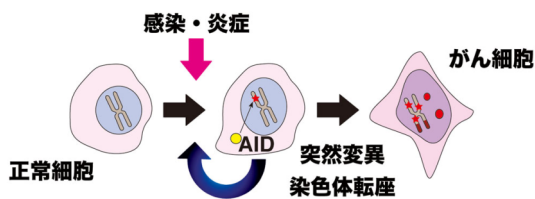
(2) B リンパ球特異的に AID を過剰発現するトランスジェニックマウスは予想に反して B リンパ球の腫瘍を発症することはなかった。生理的な AID の発現が認められる B リンパ球では腫瘍を阻止するために抗体遺伝子以外への過剰な AID の活性を抑制する機構が存在するのかもしれない。肝臓で AID を過剰発現するトランスジェニックマウスは 90 週齢の時点で 27% に肝臓腫瘍が認められた。組織学的にヒトの肝細胞癌に類似しており、ヒト腫瘍で報告されているのと同様の p53 遺伝子変異が検出された。肝臓がんのモデルマウスで p53 遺伝子の変異が検出されたものとしては初めてであり、肝臓がんの治療薬開発に有用なモデルマウスであると考えられる。

(3) C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルスによる慢性肝炎、肝硬変、および、肝細胞がんにおいてAIDの発現が認められた。ヒト肝細胞がん細胞株をもちいて検討したところTNF- α などの炎症性サイトカインにより、あるいは、C型肝炎ウイルスコアタンパクの遺伝子導入により、AIDの発現が肝細胞で誘導される事が明らかとなった。ヘリコバクターピロリ菌による慢性胃炎、胃がんにおいてAIDの発現が認められた。胃がん細胞株を用いた解析により炎症性サイトカインによりAIDの発現が胃粘膜上皮細胞に誘導された。これら肝臓や胃の上皮細胞におけるAIDの発現にはNF- κ Bのシグナル伝達経路が関与していた。

【展望】以上のことから感染や炎症を背景に発症するヒトのがんにおける遺伝子変異はAIDによって引き起こされている可能性があり、AIDの活性を阻止する事はがんの予防や治療につながるものと期待される(図1)。

図1

- 感染・炎症に伴う発がん機構にAIDが関与している可能性がある。
- AIDの発現抑制、活性阻害による発がん予防が可能になるかもしれない。



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. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. Takai, A, Toyoshima, T, Uemura, M, Kitawaki, Y, Marusawa, H, Hiai, H, Yamada, S, Okazaki, IM, Honjo, T, Chiba, T, and Kinoshita, K Oncogene, 査読有, 28, 2009, 469-478
- ②. Carboxy-terminal domain of AID required for its mRNA complex formation in vivo. Nonaka, T, Doi, T, Toyoshima, T, Muramatsu, M, Honjo, T, and Kinoshita, K. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 106, 2009, 2747-51
- ③. Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. Komori, J, Marusawa,

H, Machimoto, T, Endo, Y, Kinoshita, K, Kou, T, Haga, H, Ikai, I, Uemoto, S, and Chiba, T. Hepatology, 査読有, 47, 2008, 888-896

- ④. Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. Endo, Y, Marusawa, H, Kou, T, Nakase, H, Fujii, S, Fujimori, T, Kinoshita, K, Honjo, T, and Chiba, T. Gastroenterology, 査読有, 135, 2008, 889-98, 898 e1-3
- ⑤. Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. Matsumoto, Y, Marusawa, H, Kinoshita, K, Endo, Y, Kou, T, Morisawa, T, Azuma, T, Okazaki, IM, Honjo, T, and Chiba, T. Nat Med, 査読有, 13, 2007, 470-6
- ⑥. Ectopic expression of activation-induced cytidine deaminase in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. Kou, T, Marusawa, H, Endo, Y, Nakase, H, Fujii, S, Kinoshita, K, Fujimori, T, Honjo, T, and Chiba, T. Gastroenterology, 査読有, 132, 2007, A633-A633
- ⑦. Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. Kotani, A, Kakazu, N, Tsuruyama, T, Okazaki, IM, Muramatsu, M, Kinoshita, K, Nagaoka, H, Yabe, D, and Honjo, T. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 104, 2007, 1616-20
- ⑧. High expression of activation induced cytidine deaminase in human bile duct epithelium during cholangiocarcinogenesis. Komori, J, Marusawa, H, Machimoto, T, Endo, Y, Kinoshita, K, Kou, T, Haga, H, Ikai, I, Uemoto, S, Honjo, T, and Chiba, T. Gastroenterology, 査読有, 132, 2007, A730-A730
- ⑨. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF- κ B signaling. Endo, Y, Marusawa, H, Kinoshita, K, Morisawa, T, Sakurai, T, Okazaki, IM, Watashi, K, Shimotohno, K, Honjo, T, and Chiba, T. Oncogene, 査読有, 26, 2007, 5587-95
- ⑩. Negative regulation of activation-induced cytidine deaminase in B cells. Muto, T, Okazaki, IM, Yamada, S, Tanaka, Y, Kinoshita, K, Muramatsu, M, Nagaoka, H, and Honjo, T. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 103, 2006, 2752-2757
- ⑪. Expression of activation-induced

cytidine deaminase in human hepatocytes during hepatocarcinogenesis. Kou, T, Marusawa, H, Kinoshita, K., Endo, Y, Okazaki, IM, Ueda, Y, Kodama, Y, Haga, H, Ikai, I, and Chiba, T. Int J Cancer, 査読有, 120, 2006, 469-76

- ⑫. The dark side of activation-induced cytidine deaminase: relationship with leukemia and beyond. Kinoshita, K., and Nonaka, T. Int J Hematol, 査読有, 83, 2006, 201-7

[学会発表] (計6件)

- ①. Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Niwa Y, Marusawa H, Hiari H, Honjo T, Chiba T, Kinoshita K. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. 2009 8月; 上海, 中国
- ②. 遠藤容子、丸澤宏之、木下和生、本庶佑、千葉勉. 発癌過程における遺伝子異常生成への Activation-induced cytidine deaminase (AID)の関与. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008, 神戸
- ③. Endo Y, Marusawa H, Kinoshita K., Kou T, Fujii S, Fujimori T, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase serves as a link between inflammation to colitis-associated colorectal cancers. 第67回日本癌学会学術総会, 2008, 名古屋
- ④. 木下和生. 内在性変異原 AID による抗体とがん細胞の進化. 第80回日本遺伝学会大会, 2008 8月, 名古屋
- ⑤. Takai A, Marusawa H, Tabuchi Y, Ohtsuru S, Endo Y, Chiba T, Kinoshita K. A new mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by activation-induced cytidine deaminase expressed in hepatic stem cells. AACR Annual Meeting 2008 April 12, San Diego, U.S.A.
- ⑥. 木下和生, 野中太一郎. 突然変異誘導因子 AID による発がん. 第64回日本癌学会学術総会, 2005 9月, 札幌

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://homepage.mac.com/kkinoshi/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 和生 (KINOSHITA KAZUO)

滋賀県立成人病センター(研究所)・遺伝子

研究部門・専門研究員

研究者番号: 50293874

(2) 研究分担者

無

:

(3) 連携研究者

無