

平成 22 年 5 月 15 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013069

研究課題名（和文） RNA プライマーゼ GANP の発癌における機能の研究

研究課題名（英文） Role of the RNA-primase GANP in cancer development

研究代表者

阪口 薫雄（SAKAGUCHI NOBUO）

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70192086

研究成果の概要（和文）： ワクチンが有効に働く為には抗体遺伝子の体細胞突然変異が必須である。遺伝子変異はまた我々の体細胞にとってはがんを発症する危険因子となる。B 細胞には体細胞遺伝子変異を高率に誘導するとともにそれに対する安全性を確保する機能が必要である。本研究は、末梢リンパ組織の B 細胞で発現が上昇する GANP 分子が抗体の体細胞遺伝子変異を安全に行わせることを明らかにした。動物実験において GANP の機能破綻が、がん発症を来すことを証明し、また臨床検体によってもリンパ腫、脳腫瘍、メラノーマ、胆管がん、乳がん等のがん化と関連する可能性を示した。本成果は自然発がん、炎症発がんの診断、治療に寄与する。

研究成果の概要（英文）： Antibody response to T cell dependent antigens accompanies somatic hypermutation of immunoglobulin Variable region genes, which needs to be regulated precisely and safely. We studied the role of a molecule named GANP up-regulated in germinal center B cells in the peripheral lymphoid organs. GANP is essential for affinity maturation of the antigen specific B cells. Impairment of GANP function caused lymphomas and mammary gland tumors in mice. We showed that the GANP impairments are associated with tumor development in humans and provided the information regarding spontaneous cancer development during inflammation..

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	7,200,000	0	7,200,000
2006 年度	7,500,000	0	7,500,000
2007 年度	7,500,000	0	7,500,000
2008 年度	7,500,000	0	7,500,000
2009 年度	7,500,000	0	7,500,000
総計	37,200,000	0	37,200,000

研究分野：基礎医学・免疫学

科研費の分科・細目：

キーワード：発がん・老化・RNA 輸送・乳癌・プライマーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) がん抑制遺伝子の欠損、変異、及び癌遺伝子の異常発現が発がん原因となることが確定されているものの、依然、がん発症の80%以上を占めると言われ自然発がんのメカニズムに関しては未知であった。

(2) がん発症の原因は、長年の生活から来る炎症、細胞代謝産物、生体の反応等から蓄積される遺伝子異常、変異の集積によるものと考えられる

(3) 抗体遺伝子発現は生物学上の一つの重大な例外である。それは、体細胞、即ちリンパ細胞のクローンの分化過程で抗体遺伝子の遺伝子切断と修復を必須の条件とすることにある。抗原と接触したB細胞が末梢リンパ組織でV領域とS領域にAIDによるシチジンの脱アミノ化を行う。この脱アミノ化の制御、その遺伝子修復がどの様に行われるのかに関しては未知であった。

(4) B細胞の遺伝子修復機能を担うと予想される分子をGANPを同定し、その遺伝子改変マウスを作製したところ、抗体遺伝子変異誘導の制御を行うことが示唆された。

(5) GANPの機能が様々な細胞の遺伝子障害、修復と関連する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) GANPの機能と発がんの関連性の明示。
GANP過剰発現によってV領域遺伝子の点突然変異が大幅に上昇し、GANPトランスジェニック(Tg)マウスではBリンパ腫が発症する。GANPは転写レベルではubiquitousだが、遺伝子ホモ欠損マウスは胎生致死であり、B細胞

腫瘍のみならずその他の腫瘍発症とも関連すると予想される。実際、GANPヘテロ欠損マウスでは加齢に伴い乳癌を発症する。GANPの機能破綻による腫瘍が、どの臓器において起こるのかを検証し、その分子機序を解明する。がん予防、再発防止方策の基礎情報を提供する。

(2) 発がんにおけるGANPの分子作用の解析。
GANPは210-kDaの核内タンパク質であり、DNA複製originの結合分子群と関連しDNAヘリカーゼ活性を有するMCM複合体と結合するRNAプライマーゼである。中央部分は酵母のSAC3分子と相同でmRNAの核外輸送に関連することが示唆された。GANPはmRNAの特異的な輸送を担う可能性があり、どのmRNAの輸送障害が発がんに関連するかを明らかにすることは発がんの分子情報を提示する。

3. 研究の方法

(1) GANP-Tg由来のリンパ腫細胞株を樹立して解析する。他の臓器における腫瘍化を調べるため乳腺を含めた臓器特異的遺伝子欠損マウスを作製し、そのマウスにおける腫瘍発症を解析する。動物モデルでの腫瘍発症がヒト臨床検体でも認めるのかに関して解析する。

(2) 腫瘍化機序をDNA修復の観点から解析を進め、二重鎖切断(DSB)、遺伝子再構成、遺伝子変異導入、細胞周期制御、染色体転座に関連して明らかにする。GANP変異マウスで発症する二種類のガン(リンパ腫と乳癌)における遺伝子解析、DSBの修復に関わる分子群との関連を明らかにする。

4. 研究の成果

(1) GANPの発現異常による癌発症
炎症性発がんにおけるシチジン脱アミノ化の

関与。ヒトにおける炎症性発がんのモデルとして顕著な症例に胆管がんがある。タイのチャオプラヤ川流域では川魚を生で食する習慣がある。その結果寄生虫感染を起こし、肝臓内胆道系の高度な炎症が長期間にわたる。この炎症が免疫系の抗体遺伝子の変異導入と類似したシチジン脱アミノ化反応を引き起こすかどうかを胆管がん症例 100 例において調べた。その結果、AID と GANP の発現が高く、そのことが胆管がんの悪性を増強していた（論文 3）。

ヒトメラノーマにおける GANP の発現異常。熊本医学部皮膚科の色素性母斑 14 例、原発性メラノーマ 36 例、転移性メラノーマ 9 例を解析し色素性母斑に比べてメラノーマでの GANP 発現が高いことを観察した（論文 7）。

ヒト脳腫瘍における GANP の発現。悪性グリオーマは原因不明の悪性の高いがんである。GANP の発現を熊本大学医学部脳外科の臨床検体 105 例において調べた。がんの悪性度進展に伴い GANP の発現低下が見られ、有為に相関した。悪性度進展には p53, Rb 等のがん抑制遺伝子の変異増加は見られなかったが、EGFR, 第 11 番染色体の転座を伴う著しい染色体不安定性がみられた（論文 2）。

ヒト乳がんにおける GANP の発現。

乳癌臨床検体（名市大乳腺内分泌外科の非遺伝性散発性乳癌 92 症例）を用いて解析した。GANP の発現はリンパ組織の胚中心で発現が上昇する事が明らかになっていたが、今回正常の乳腺組織で、GANP 発現が周辺の組織や細胞と比較して際立って亢進していた。乳がん発症とともにその発現が著しく低下し、その発現低下が乳癌の悪性度と相関することが確認された。ERα や PgR の発現が低下している症例、リンパ節転移を有する症例など悪性の高い症例では GANP 発現が低下してお

り、予後判定の指標となる事が明らかになった。

マウスモデルにおける GANP 欠損と発がんの関連性。実際に乳がん発症の基礎原因なのか、それとも発癌過程で生じる副次的変化であるのかを検証した。GANP ヘテロ欠損マウスを長期観察し、乳がんの自然発症が見られるのかを調べた。GANP ヘテロ欠損の C57BL/6 背景で約 30%という高頻度で乳がんを発症した。ヘテロ欠損マウスのゲノム遺伝子には変異や欠失は特に存在しなかったが、ヘテロ欠損において老齢化にともなって乳腺組織に高率にがんが発症した。WAP-Cre マウスによる乳腺特異的 GANP 欠損マウスもやはり高率に乳がんを引き起こすことから、このマウスにおける発がんは乳腺組織内因性の遺伝子異常によることが示された。しかもこのマウスは肺転移を高率に伴う高度に悪性の高い乳がんのモデルとなる。様々ながん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異を伴っていなかったが、ゲノム不安定性が高く、染色体転座、aneuploidy を高率に来していた。

（2）腫瘍化機序に関する DNA 修復の観点からの解析

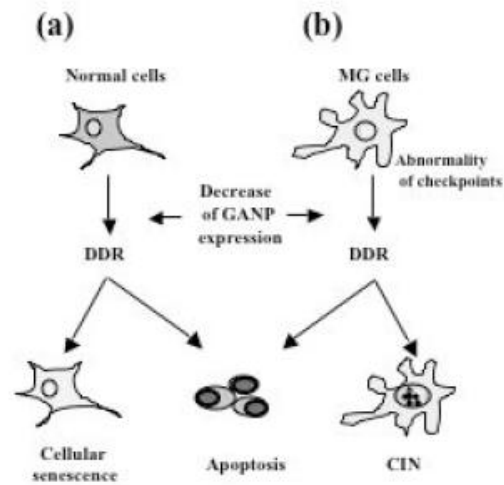
GANP の遺伝子修復における機能。GANP は核内タンパク質で N 末側に RNA プライマーゼドメイン、C 末側に MCM3 結合領域、HAT 活性領域、中央に酵母 SAC3 相同領域を有する。RNA プライマーゼドメインと MCM3 結合領域を有し、MCM の DNA helicase 活性が DNA 複製時の Lagging 側 DNA 伸長に必要であることから、GANP が DNA 複製に関連する事を示唆する。遺伝子修復機能に関して 1). 遺伝子相同組み換えにおける機能、2). 遺伝子突然変異導入における機能、3). gene conversion における機能に関して解析した。1). に関しては LacZ のタンデムコンストラクトによる測定で、有意に相同組み換えを抑制した。この活性は DNA 領域の転写が促進している際に必要で、酵母の SAC3 も同様である。GANP が RNA の維持、輸送、修飾に関連する事が示唆された（論文 6）。

GANP 欠損の遺伝子修復、細胞分裂に及ぼす影響。ganp siRNA によって細胞の分裂を解析した。

M 期における染色体の均等分配が障害された。そのメカニズムとして染色体を分裂後期まで赤道面に整列させる cohesin の機能を保持する Shugoshin 1 発現の低下が明らかになった。GANP は Shugoshin 1 mRNA の核外輸送を担うことが明らかになった。Shugoshin 1 の発現異常はゲノム保持に必須な機能と考えられ、この機能障害は広範な遺伝子障害を来し高い発がん性に関連する。GANP による mRNA の輸送は BCL-2 mRNA や cohesin, MAD2 などその他の細胞周期関連分子の mRNA の輸送には関連しない。ヒト細胞における mRNA 輸送の選択性は従来から想定されたことはあったが、実際に特異性を示した意義ある成果となった(論文1)。

GANP の細胞周期制御機能 様々なヒト腫瘍株を用いて GANP 欠損による細胞周期に及ぼす影響を調べた。GANP のノックダウンは直ちに DNA 障害反応を引き起こして細胞周期に影響を及ぼす。その影響は細胞の持つ細胞周期制御エンジン分子の異常程度によって異なる。P53 チェックポイントが機能している場合は GANP ノックダウンによる効果は細胞を分裂停止の状態にとどめ、いわゆる細胞老化の状態にとどめる。細胞老化の Rb p16 を介する経路により、核内 DNA 崩壊、SA-Gal 活性を示している。一方、p53 の機能障害を背景にする場合、細胞老化の状態にとどまらず、細胞分裂を繰り返し、ゲノム不安定性を顕著に polyploid 細胞が集積して行く。多核細胞が出現し、臨床検体、遺伝子欠損マウスで観察された、染色体異常を顕著に示すことが明らかになった。このような異常は正常組織ではほとんど見られず、癌細胞に高率に見られることから、発癌やその悪性転化の際に何らかの原因が関与して GANP の転写異常を引き起こし、その結果腫瘍化の進行を促しているものと考えられた。今後は RNA プライマーゼ活性、MCM 結合領域、HAT 活性が、

細胞分裂、細胞周期進行における遺伝子修復における機能の解析を行う必要がある。



5. 主な発表論文等

(研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Kazuhiko Maeda, Shailendra Kumar Singh, Kazufumi Eda, Masahiro Kitabatake, Phuong Pham, Myron F. Goodman, and Nobuo Sakaguchi (Corresponding author). GANP-mediated recruitment of activation-induced cytidine deaminase to cell nuclei and to immunoglobulin Variable region DNA. *J. Biol. Chem.* May 28, 2010, on line. (査読有り)
2. Nobukazu Okamoto, Kazuhiko Kuwahara, Kazutaka Ohta, Masahiro Kitabatake, Hideya Igarashi, Katsumasa Takagi, Hiroshi Mizuta, Eisaku Kondo, and Nobuo Sakaguchi. Germinal center-associated nuclear protein, a human homologue of SAC3, is necessary for centromere cohesion and sister-chromatid exchange during mitosis. (査読有り) *Genes to Cells* 15,471-483,2010
3. Kazutaka Ohta, Kazuhiko Kuwahara, Zhenhuan Zhang, Keishi Makino, Yoshihiro Komohara, Hideo Nakamura, Jun-Ichi Kuratsu, and Nobuo Sakaguchi. Decreased expression of germinal center-associated nuclear protein is

- involved in chromosomal instability in malignant gliomas. (査読有り) *Cancer Sci.* 100, 11, 2069-2076, 2009.
4. Waraporn Chan-On, Kazuhiko Kuwahara, Naoya Kobayashi, Kazutaka Ohta, Tatsuya Shimasaki, Banchob Sripa, Chanvit Leelayuwat, and Nobuo Sakaguchi. Cholangiocarcinomas associated with long-term inflammation express the activation-induced cytidine deaminase and germinal center-associated nuclear protein involved in immunoglobulin V-region diversification. (査読有り) *Int. J. Oncol.*, 35, 2, 287-295, 2009.
 5. Hideya Igarashi, Kazuhiko Kuwahara, Mikoto Yoshida, Yan Xing, Kazuhiko Maeda, Kouji Nakajima, and Nobuo Sakaguchi. GANP suppresses the arginine methyltransferase PRMT5 regulating IL-4-mediated STAT6-signaling to IgE production in B cells. (査読有り) *Mol. Immunol.* 46:1031-1041 (2009)
 6. Satoru Fujimura, Takeshi Matsui, Kazuhiko Kuwahara, Kazuhiko Maeda, and Nobuo Sakaguchi. Germinal center B-cell associated DNA hypomethylation at transcriptional regions of the AID gene. (査読有り) *Mol. Immunol.* 45:1712-1719, 2008.
 7. Mikoto Yoshida, Kazuhiko Kuwahara, Tatsuya Shimasaki, Naomi Nakagata, Masao Matsuoka, and Nobuo Sakaguchi. GANP suppresses DNA recombination, measured by direct-repeat *b-galactosidase* gene construct, but does not suppress the type of recombination applying to immunoglobulin genes in mammalian cells. (査読有り) *Genes Cells* 12:1205-1213, 2007.
 8. Toshiro Kageshita, Kazuhiko Kuwahara, Masahiro Oka, Donglai Ma, Tomomich Ono, and Nobuo Sakaguchi. Increased expression of germinal center-associated nuclear protein (GANP) is associated with malignant transformation of melanocytes. (査読有り) *J. Dermatol. Sci.* 42:55-63, 2006.
 9. Yousuke Kawatani, Hideya Igarashi, Takeshi Matsui, Kazuhiko Kuwahara, Satoru Fujimura, Nobukazu Okamoto, Katsumasa Takagi, and Nobuo Sakaguchi. Cutting Edge: Double-stranded DNA breaks in the *immunoglobulin V-region* gene were detected at lower frequency in affinity-maturation impeded GANP^{-/-} mice. (査読有り) *J. Immunol.* 175:5615-5618, 2005.
 10. Yan Xing, Hideya Igarashi, Xiaodang, Wang, and Nobuo Sakaguchi. Protein phosphatase subunit G5PR is needed for inhibition of BCR-induced apoptosis. (査読有り) *J. Exp. Med.* 202:707-719, 2005.
 11. Satoru Fujimura, Yan Xing, Motohiro Takeya, Yasuyuki Yamashita, Koichi Ohshima, Kazuhiko Kuwahara, and Nobuo Sakaguchi. Increased expression of GANP RNA-primase is associated with lymphomagenesis. (査読有り) *Cancer Res.* 65:5925-5934, 2005.
 12. Nobuo Sakaguchi, Tetsuya Kimura, Shuzo Matsushita, Satoru Fujimura, Junji Shibata, Masatake Araki, Tamami Sakamoto, Chiemi Minoda, and Kazuhiko Kuwahara. Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in *ganp* gene-transgenic mouse. (査読有り) *J. Immunol.* 174:4485-4494, 2005.

[学会発表] (計 93 件)

[産業財産権]

出願状況(計 6 件)

産業財産名:胆管がん特異的糖鎖エピト
ープを認識するモノクローナル抗体

発明者:阪口薫雄、桑原一彦、荒木令江、
坂本珠美

権利者:財)くまもとテクノ産業財団

産業財産権の種類:特許

番号:特願 2009-025607

出願年月日:2009 年 2 月 2 日

国内・国外の別:国内

産業財産名:GANP DNA(マウス)

発明者:阪口薫雄

権利者:財団法人くまもとテクノ産業財団

産業財産権の種類:特許

番号:特許 7,138,509

出願年月日:2006 年 11 月 21 日

国内・国外の別:国内

産業財産名:GANP による癌抑制遺伝子の活
性化方法

発明者:阪口薫雄

権利者:国立大学法人熊本大学

産業財産権の種類:特許

出願番号:特願 2006-189043

出願日:2006 年 7 月 10 日

国内・国外の別:国内

産業財産名:抗 GANP 抗体(マウス)

発明者:阪口薫雄

権利者:財団法人くまもとテクノ産業財団

産業財産権の種類:特許

番号:特許 6,943,237

出願年月日:2005 年 9 月 13 日

国内・国外の別:国内

「その他」

ホームページ等

<http://www.k-immu.jp/ja/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口薫雄(SAKAGUCHI NOBUO)

研究者番号:70192086