

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19500361

研究課題名（和文）酸化ストレス誘発動物発癌モデルにおける染色体変化の解析

研究課題名（英文）Analysis of chromosomal alterations in an oxidative stress-induced animal carcinogenesis model

研究代表者

赤塚 慎也 (AKATSUKA SHINYA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40437223

研究成果の概要：

酸化ストレス発癌モデルとして認知されている鉄ニトリロ三酢酸誘発ラット腎癌は高い染色体不安定性（染色体レベルでの広範なゲノム変異）を示すことを、アレイ CGH 解析により明らかにした。各種のヒト散発性がんにも頻繁に見られる染色体不安定性を再現する動物モデルとして確立することができた。さらに、高頻度に染色体変化が見られる部位において、酸化ストレス発癌に関わる遺伝子をいくつか見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：病態モデル，染色体不安定性，酸化ストレス，発癌

1. 研究開始当初の背景

癌では、ゲノムの変化つまり遺伝子変異、染色体の構造および数の変化が多く見られる。しかも、これは単に選択による結果ではなく、1細胞周期あたりの突然変異の頻度が実際に亢進している。このような癌細胞におけるゲノムの不安定性は、「微小な遺伝子配列の変化」と「染色体の構造および数の変化」に大別される。前者の変化には NIN (NER-related instability) と MIN (microsatellite instability) という2つのタイプがあるとされ、後者は CIN

(chromosome instability) と呼ばれている。近年の研究により、悪性腫瘍一般で見ると塩基配列の不安定性を示す症例はむしろ少数で、塩基配列は比較的安定でありながら、染色体の数あるいは構造が著しく不安定なタイプの遺伝的不安定性を示す症例が非常に多いことが明らかとなった。例えば、散発性の大腸直腸癌では MIN と CIN を示す症例がそれぞれ約 15% と 85% に相当し、そのほかの上皮性悪性腫瘍では CIN の割合がさらに多いものと考えられている。したがって、一般的なヒト癌の発生過程を明らかにするためには、

CIN すなわち癌における染色体不安定性の動態を詳細に解析することが重要であると考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者の所属する研究室では、鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) 投与によるラット腎癌モデルの解析が長年にわたって続けられていた。腹腔内投与された Fe-NTA は、血流中へ吸収された後、腎臓において強度の酸化ストレスを引き起こす。すなわち、Fe-NTA 誘発ラット腎癌モデルは、酸化ストレスによる動物発癌モデルとして広く認知されている。本研究の目的は、Fe-NTA 誘発ラット腎癌における染色体変化の解析を基盤として、新規の酸化ストレス発癌関連遺伝子を同定し、また発癌過程における染色体不安定性誘導機構を解明するための動物モデルを確立することとした。

3. 研究の方法

(1) アレイ CGH によるラット腎癌における染色体コピー数変化の解析

アレイ CGH 法は全染色体を対象にゲノムコピー数変化を調べる方法であり、従来の CGH (comparative genomic hybridization : 比較ゲノムハイブリダイゼーション) 法を、マイクロアレイを用いたかたちで発展させたものである。今回は、CGH 解析用のマイクロアレイとして、Agilent Technologies 社製のオリゴ DNA アレイを採用した。このアレイには、ラットのゲノム上の位置を特定可能なオリゴ DNA プローブが 18 万 2 千本搭載されている。腫瘍サンプルは、研究代表者の所属する研究室においてそれまでに作成済みの鉄ニトリロ三酢酸 (Fe-NTA) 誘発ラット腎癌を用いた。13 例の腎癌から採取した腫瘍組織より、ゲノム DNA を調製し、アレイ CGH 解析に供した。さらに、同じラット腎癌を由来とする 2 系統の細胞株について、同様にアレイ CGH 解析を施行した。また、比較のために、遺伝性腎癌 (Eker ラット腎癌) 1 サンプルの解析も加えて実施した。

アレイ CGH により得られたデータの基本的な解析は、Agilent 社の提供する解析ソフトウェア CGH Analytics を用いて行った。また、染色体変化パターンの比較などの高度な解析を行うために、オープンソースのデータ解析環境である「R」のライブラリ群を組み合わせて使用した。

(2) 酸化ストレス発癌において重要な染色体変化および癌関連遺伝子の検索

まず、アレイ CGH を行ったサンプル間で高頻度に染色体変化が起きているゲノム領域を拾い出した。さらに、別途一部の同一サンプルを用いて行った発現アレイ解析の結果

を照合し、ゲノム変化および発現変化がともに頻度の高い遺伝子をいくつか見出した。

これらの遺伝子について、ゲノム変化の検証を定量的ゲノム PCR により実施した。mRNA レベルについても、定量的 RT-PCR により測定し、ゲノム変化と転写レベルとの相関性を調べた。実際に癌遺伝子または癌抑制遺伝子として機能しうることを証明するために、培養細胞を用いた系において検証を行った。癌遺伝子としての性質を確認する場合は、癌由来でないコントロール細胞での当該遺伝子の強制発現によって細胞増殖能力が上昇すること、または癌由来細胞での当該遺伝子の発現抑制によって細胞増殖能力が低下することを示した。癌抑制遺伝子の確認では、反対に、癌由来細胞での当該遺伝子の強制発現によって細胞増殖能力が低下することを示した。さらに、既報のデータから当該遺伝子の働いている細胞内経路がある程度予想される場合は、当該遺伝子の経路の下流への影響を検証した。

(3) FISH 法にもとづく染色体不安定性の発生過程の解析

ラット腎癌のアレイ CGH の結果では、いくつかの特定の染色体に関して、染色体のほぼ全域にわたるヘミ欠失が高頻度に起こっていた。発癌プロトコールにおいては、Fe-NTA の腹腔内投与を約 3 か月継続する。Fe-NTA は腎臓に対して強度の酸化ストレスを与えるが、ラットは反復投与の結果、1 週間以内に酸化ストレスに対する耐性を獲得する。耐性獲得以後の Fe-NTA の効果は、主にプロモーション作用であると考えられる。私は、染色体の欠失はこのプロモーション期間に発生しているのではないかという予測を立てた。Fe-NTA を 1~12 週間反復投与した後のラット腎組織を用いて、染色体異数性の発生状況を現在検討している。異数性発生の解析は 5 番染色体を中心に行っている。私たちは以前に 5 番染色体上の Cdkn2a 遺伝子座に対する FISH (fluorescence in situ hybridization) 解析を行っており、Fe-NTA の 1~3 週間投与によって Cdkn2a 遺伝子座の欠失を示す細胞が増加することを明らかにしたという経緯がある。今回は、ラット 5 番染色体にマップのされる複数の BAC クローンより作成したプローブを用いて FISH を行うことで、より広い範囲での異数性の発生を検証している。

4. 研究成果

(1) 顕著な染色体不安定性を示す動物化学発癌モデルの確立

13 例のラット腎癌について、全染色体にわたるコピー数変化の規模は総じて大きく、ヒトの癌で見出されてきた染色体不安定性に匹敵するものであった。図 1 に、その中で代

表的と考えられる3例のアレイ CGH プロファイル（検体ゲノム全体の平均コピー数に対する各染色体位置のコピー数の比を、対数変換してプロットしたもの）を示す。

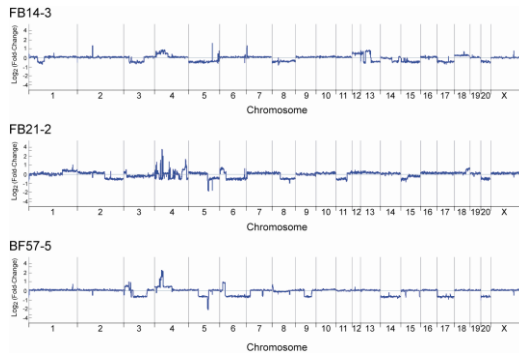


図1. Fe-NTA 誘発ラット腎癌に見られる染色体不安定性

腎癌由来細胞株（2系統）のアレイ CGH プロファイルにおいても、同様の染色体不安定性が保持されていることが確認された。Fe-NTA 誘発ラット腎癌が、このように広範な染色体変化を示すのに対し、対照として用いた遺伝性のラット腎癌においては染色体レベルのゲノム変化はほとんど見られなかった。実際、これまでにアレイ CGH を用いて調べられた動物の腫瘍に関して、遺伝子改変動物を用いた場合を除いては、今回の Fe-NTA 誘発ラット腎癌の結果ほどに高い染色体不安定性を示す報告例は見当たらない。散発性のヒト癌の多くが染色体不安定性の特徴を有することを考えると、今回得られた結果はヒトの発癌においても酸化ストレスが要因となっている割合が高いということを示唆している。よって、本発癌モデルは他の化学発癌モデルと比べて、一般的なヒト癌との共通性が高く、発癌研究のための動物モデルとして有用であると考えられる。

つづいて、Fe-NTA 誘発ラット腎癌の染色体変化の特徴を分析した。図2は、ゲノムの各

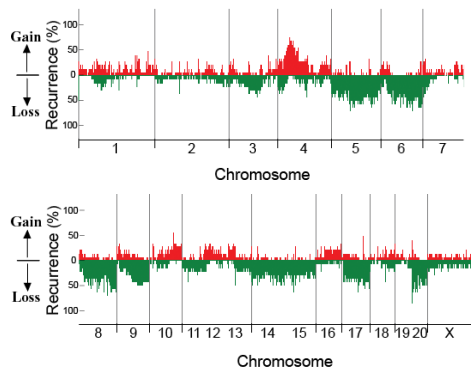


図2. Fe-NTA 誘発ラット腎癌（細胞株含む15例）のゲノムにおけるコピー数異常の頻度分布

部位で検出されたコピー数異常の頻度を、染色体に沿ってプロットしたものである。この図より、Fe-NTA 誘発ラット腎癌における染色体変化の全体的な特徴として、以下の2つが明らかとなった。

（特徴.1）4番染色体のセントロメア側に、長い範囲の高頻度増幅領域がある。

（特徴.2）5, 6, 8, 9, 14, 15, 17, 20番染色体については、染色体のほぼ全域にわたるヘミ欠失（いわゆるモノソミーの状態）が頻繁に見られた。

癌のゲノムにおける染色体変化のパターンを、異なるプラットフォームのゲノムアレイより得られたデータや異なる動物種の腫瘍のあいだで比較するために、アレイ CGH のデータを統計的推測にもとづいて染色体各部位のコピー数に変換する方法を考案した。基本的な計算原理は、腫瘍のゲノム全体での平均コピー数と正常細胞の試料への混入率を、シグナル測定値の誤差が最小となるように推定するというものである。図3は、そのようにして決定した染色体コピー数プロファイルにもとづいて腫瘍サンプルをクラスタリングしたものである。

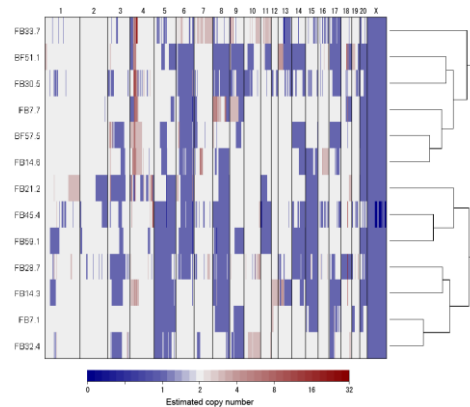


図3. 染色体コピー数プロファイルにもとづく Fe-NTA 誘発ラット腎癌 13 例の分類

ヒト腫瘍ゲノムの網羅的解析データは、既に相当量が蓄積されている。今回得られたラット腎癌のゲノム変化データをヒトのデータと比較するために、両種ゲノムのシntenニー関係にもとづきラットのアレイデータをヒトの染色体上にマップするプログラム（中核となる変換エンジンとして、UCSC ゲノムブラウザのユーティリティプログラムである liftOver を使用）を作成した。現在、異種動物の腫瘍間における染色体変化パターンの類似性の分析を進めている。

(2) 高頻度にコピー数変化の見られるゲノム領域に含まれる癌関連遺伝子の解析

①ゲノム増幅領域に含まれる遺伝子

4 番染色体のセントロメア側領域においては、10Mb から 50Mb にわたる長い範囲のゲノム増幅が、60%以上のサンプルで認められた。コピー数が 2 倍以上に増加している頻度が 30%を超えているのは、この領域だけであり、本領域内に Fe-NTA 誘発ラット腎癌に共通的に関与する癌遺伝子が含まれていることが強く示唆された。まず、ゲノム増幅の頻度が最も高い領域（長さ = 約 0.4Mb）には、癌遺伝子として知られている c-Met が含まれていた。c-Met 遺伝子コピー数の増幅は、定量的ゲノム PCR により確認した。発現については、mRNA を定量的 RT-PCR により測定した。ゲノムの増幅率と mRNA レベルは有意に関連していた。腫瘍の表現型とゲノム変化の関係を調べたところ、c-Met の増幅は転移の有無と有意に関連していることが分かった。

つぎに、発現アレイの結果との照合を行い、4 番染色体の増幅領域内に含まれており正常組織に対する発現増加が顕著な遺伝子を検索した。その条件に該当する遺伝子として、Ptpz1（チロシンホスファターゼの 1 種）が見つかった。さらにネットワーク解析の結果から、 β -カテニンが PTRZ1 の基質となっている可能性が考えられた。ラット腎癌組織においては、脱リン酸化された β -カテニンが細胞核に移行していることが免疫組織化学により確認された。また、ラット腎癌組織を用いた定量的 RT-PCR によって、 β -カテニンの標的遺伝子（cyclin D1, c-myc, c-jun, fra-1, CD44）の発現が正常組織に比して高まっていることが分かった。さらに、ラット腎癌由来の細胞株（2 系統）において、siRNA により Ptpz1 をノックダウンしたところ、核内の β -カテニン量の減少および β -カテニン標的遺伝子群の発現低下が見られるとともに、細胞の増殖が抑制された。反対に、コントロール細胞（形質転換していないラット腎細胞由来細胞株）に Ptpz1 を導入した場合は、 β -カテニンの核内への移行、標的遺伝子の発現上昇、細胞増殖率の亢進が確認された。したがって、Ptpz1 が本ラット腎癌において癌遺伝子として確かに機能していること、そしてそのメカニズムは β -カテニン経路の活性化によるものであることが示された。これは、動物発癌モデルにおいては、今回初めて確認された。

②ゲノム欠失領域に含まれる遺伝子

まず、5 番染色体では、3 分の 2 以上のサンプルで、50Mb 以上か染色体 1 本全体にわたるような大規模なヘミ欠失が見られた。さらに、そのヘミ欠失のケースのうちの半分では、Cdkn2a および Cdkn2b 癌抑制遺伝子の残りの 1 個のアレルも喪失しているという状態になっていた。相同染色体の両方で Cdkn2a/2b 遺伝子座の周辺のみが欠失している腫瘍は 1 例

もなかった。これは、染色体不安定性により癌抑制遺伝子がホモ欠失するメカニズムを考察する上で、重要な知見となるものである。

つぎに、発現アレイの結果との照合を行い、広範囲のヘミ欠失が頻繁に見られる染色体上にあり正常組織に対して発現低下が顕著な遺伝子を検索した。その条件に該当する遺伝子として、8q32 に座位する Acyl1（アミノアシラーゼ-1）が見つかった。ラット腎癌由来の細胞株（2 系統）に Acyl1 を導入したところ、細胞増殖率および軟寒天上でのコロニー形成率の抑制とアポトーシスの誘導が認められた。したがって、Acyl1 が本ラット腎癌において癌抑制遺伝子として確かに機能していることが示された。これは、動物発癌モデルにおいては、今回初めて確認された。

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 3 件）

①Zhong Y, Onuki J, Yamasaki T, Ogawa O, Akatsuka S, Toyokuni S. Genome-wide analysis identifies a tumor suppressor role for aminoacylase 1 in iron-induced rat renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* vol.30(2009) pp.158-164. 査読有り

②赤塚慎也, 豊國伸哉. 鉄・酸化ストレスによる発癌の分子機構を探る. *分子消化器病* vol.5(2008) pp.39-48. 査読無し

③Liu YT, Shang D, Akatsuka S, Ohara H, Dutta KK, Mizushima K, Naito Y, Yoshikawa T, Izumiya M, Abe K, Nakagama H, Noguchi N, Toyokuni S. Chronic oxidative stress causes amplification and overexpression of ptpz1 protein tyrosine phosphatase to activate beta-catenin pathway. *The American journal of pathology* vol.171(2007) pp.1978-88. 査読有り

〔学会発表〕（計 6 件）

①赤塚慎也. Analysis of chromosomal alterations in oxidative stress-induced rat renal cell carcinomas using array-based CGH. 第 67 回日本癌学会学術総会（2008 年 10 月 28-30 日、名古屋国際会議場）.

②Akatsuka S. Analysis of chromosomal alterations in oxidative stress-induced rat renal carcinomas using array-based CGH. The International Symposium on Lipid Peroxidation 2008（2008 年 10 月 15-17 日、軽井沢プリンスホテル）.

③赤塚慎也. アレイ CGH を用いた酸化ストレス誘発ラット腎癌における染色体変化の解

析. 第61回日本酸化ストレス学会学術集会
(2008年6月19-20日, 国立京都国際会館).

④Akatsuka S. Analysis of chromosomal alterations in oxidative stress-induced rat renal carcinomas using array-based CGH. 4th Joint Meeting of the Society for Free Radical Research Australasia and Japan (2007年12月1-5日, 京都大学国際交流ホール).

⑤赤塚慎也. Analysis of chromosomal alterations in oxidative stress-induced rat renal cell carcinomas using array-based CGH. 第66回日本癌学会学術総会 (2007年10月3-5日, パシフィコ横浜).

⑥赤塚慎也. Analysis of chromosomal alterations in oxidative stress-induced rat renal cell carcinomas using array-based CGH. 第8回文部科学省特定領域研究「がん」5領域若手研究者ワークショップ (2007年8月29日-9月1日, アートランドホテル蓼科).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤塚 慎也 (AKATSUKA SHINYA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40437223