

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590309

研究課題名(和文)

がんの発生と悪性化に関わるゲノム不安定性関連遺伝子の単離

研究課題名(英文)

Isolation of genomic instability genes that are associated with malignancy

研究代表者

鈴木 元 (SUZUKI MOTOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80236017

研究成果の概要(和文)：癌が突然変異によって発生することが報告されて以来、数多くの癌関連遺伝子がヒト癌において同定されてきた。我々は、肺癌組織 158 例の Microarray 解析の結果を用いて、ゲノムインテグリティ関連遺伝子の mRNA 発現プロファイルの検討を行った。その結果、本来癌で増加するはずのゲノムインテグリティ関連遺伝子の一つ *POLD4* が、極めて生物学的悪性度の高い小細胞癌で特異的発現低下を示すことを見出した。そこでこの遺伝子のノックダウンを行い、表現型を調べたところ、DNA 修復能の低下・細胞周期の遅延・染色体断裂の増加の 3 つの表現型を観察した。また、この遺伝子の過剰発現下でノックダウン実験を行い実験の特異性を調べたところ、全てについて相補を確認した。新たながんシグナル経路の発見に努めるべく、この遺伝子産物とともに免疫沈降する遺伝子産物を解析した。MS にて解析したところ ATM、CDC14 等のチェックポイントタンパク質を同定した。さらに、肺癌細胞株を中心に *POLD4* 遺伝子の新規 SNV を同定した。この SNV に対する他のタンパク質の結合性を yeast two hybrid assay で調べたところ、たいへん興味深いことに、*POLD4* が本来複合体を作るはずの DNA 複製タンパク質 *POLD1* との結合性が低下していることが明らかとなった。このことは今回発見した SNV が DNA 複製能を変化させることを通じて細胞の癌化を促進する機構の存在を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In examinations of 158 lung cancers and 5 mixtures of 10 normal lungs, cell cycle- and checkpoint-related genes generally showed mRNA expression increases in cancer, whereas *POLD4* showed reduced mRNA in small cell lung cancer (SCLC). In the absence of *POLD4*, we observed defect in DNA repair activity, delay in cell cycle, and increased frequency of chromosomal break induction. Overexpression of an engineered *POLD4* carrying silent mutations at the siRNA target site rescued these phenotypes, firmly establishing the role of *POLD4* in these effects. In order to identify gene products that interact with *POLD4*, we performed an MS analysis using the immunoprecipitated protein fractions with *POLD4*, where ATM, CDC14 and other cell cycle checkpoint/progression proteins were detected. We further identified novel single nucleotide variations (SNV) in lung cancer cell lines. One of the SNV reduced the physical interaction ability with the catalytic subunit of pol delta. These results suggest that the newly identified SNV could be involved in the carcinogenesis by modifying DNA replication ability of DNA polymerase delta.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
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：基礎医学・病態医化学

キーワード：DNA複製、ゲノムインスタビリティ、癌、DNA修復、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

癌が突然変異によって発生することが報告されて以来、数多くの癌関連遺伝子がヒト癌において同定されてきた。意外なことにこの中に DNA 複製・修復・チェックポイント・細胞分裂遺伝子等実際に遺伝子の複製や分配に関わる遺伝子は驚くほど少ない。

2. 研究の目的

我々は、肺癌組織 158 例の Microarray 解析の結果を用いて、ゲノムインテグリティ関連遺伝子の mRNA 発現プロファイルの検討を行った。その結果、本来癌で増加するはずの POLD4 遺伝子が、極めて生物学的悪性度の高い小細胞癌で特異的発現低下を示すことを見出した。POLD4 遺伝子発現低下は、DNA transaction 機能低下と染色体インスタビリティの発生を通じて発癌もしくは癌の悪性化に寄与している可能性がある。本研究はこの背景と知見を元に POLD4 が小細胞癌発生と悪性化に対してどのような貢献をしているかを明らかにし、さらに、microarray, MS, 酵母を用いたスクリーニングによって POLD4 発現低下と肺癌発生に関与するタンパク質をスクリーニングすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) POLD4 遺伝子を RNA 干渉法により DNA 修復能の低下・細胞周期の遅延・染色体断裂の増加の 3 つの表現型を観察する。
- (2) POLD4 遺伝子にサイレント変異を導入したベクターを用いて、stable clone 細胞株を作製する (m POLD4 株)。m POLD4 株株においてそれぞれの表現形が RNA 干渉に対して耐性であるか否か調べ、①で観察した表現型の信頼性を検証した。DNA 修復能については 4NQO 耐性能で検証した。細胞周期については Flow cytometry を用いて細胞周期の G1 および S 期の遅延が m CCILC1 株で起こらないことを確認した。また、western blotting 手法を用いてその際、ATM, CHK2, NBS タンパク質のリン酸化が抑制されていることをしめした。また、p21, p27 の活性化の有無についても明らかにした。染色体インスタビリティについては分裂中期染色体展開法を用いて、染色体断裂の発生に対する影響を調べた。

- (3) ヒト肺癌において、POLD4 遺伝子変異の有無につき調べた。これまでの検討では POLD4 遺伝子の発現低下を観察しているが、この遺伝子の変異が発がんに関与している可能性を明らかにするため、培養細胞および臨床検体を用いて遺伝子変異の有無を調べた。

- (4) POLD4 遺伝子産物結合たんぱく質を明らかにするため。これまで、293T 細胞を用いて POLD4 遺伝子産物強制発現系を確立し、免疫沈降法によって結合たんぱく質候補を同定した。

4. 研究成果

POLD4 遺伝子のノックダウンを行い、表現型を調べたところ、DNA 修復能の低下・細胞周期の遅延・染色体断裂の増加の 3 つの表現型を観察した。また、この遺伝子の過剰発現下でノックダウン実験を行い実験の特異性を調べたところ、全てについて相補を確認した。新たながんシグナル経路の発見に努めるべく、この遺伝子産物とともに免疫沈降する遺伝子産物を解析した。MS にて解析したところ ATM, CDC14 等のチェックポイントタンパク質を同定した。さらに、肺癌細胞株を中心に POLD4 遺伝子の新規 SNV を同定した。この SNV に対する他のタンパク質の結合性を yeast two hybrid assay で調べたところ、たいへん興味深いことに、POLD4 が本来複合体を作るはずの DNA 複製タンパク質 POLD1 との結合性が低下していることが明らかとなった。このことは今回発見した SNV が DNA 複製能を変化させることを通じて細胞の癌化を促進する機構の存在を示唆した。

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 22 件)

- ① Matsuyama Y, Suzuki M, Arima C, Huang Q, Tomida S, Takeuchi T, Sugiyama R, Itoh Y, Yatabe Y, Goto H, Takahashi T. Proteasomal Non-catalytic Subunit PSMD2 as a Potential Therapeutic Target in Association with Various Clinicopathologic Features in Lung Adenocarcinomas. Mol Carcinog. 2011 in press.

- ② 鈴木元、高橋隆 がんと microRNA 癌細胞イラストレーテッド 2011 印刷中
- ③ Ito H, Yoshida K, Murakami M, Hagiwara K, Sasaki N, Kobayashi M, Takagi A, Kojima T, Sobue S, Suzuki M, Tamiya-Koizumi K, Nakamura M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Heterogeneous sphingosine-1-phosphate lyase gene expression and its regulatory mechanism in human lung cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1811:119-128, 2011.
- ④ 鈴木元 遺伝的揺らぎと発癌機序解明にむけて メディカルバイオ 2010; 10 月別冊号; 86-90
- ⑤ 鈴木元、高橋隆 がんと microRNA 血液・腫瘍科 2010: 61; 621-626
- ⑥ Gao S, Ito H, Murakami M, Yoshida K, Tagawa Y, Hagiwara K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Banno Y, Ohguchi K, Nozawa Y, Murate T. Mechanism of increased PLD1 gene expression during early adipocyte differentiation process of mouse cell line 3T3-L1. *J Cell Biochem*. 109:375-382, 2010.
- ⑦ Huang QM, Akashi T, Masuda Y, Kamiya K, Takahashi T, Suzuki M. Roles of POLD4, smallest subunit of DNA polymerase delta, in nuclear structures and genomic stability of human cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 391:542-546, 2010.
- ⑧ Huang QM, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K, Kasahara TA, Osada H, Yatabe Y, Akashi T, Kamiya K, Takahashi T, Suzuki M. Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer. *Cancer Res*. 70:8407-8416, 2010.
- ⑨ Murakami M, Ito H, Hagiwara K, Yoshida K, Sobue S, Ichihara M, Takagi A, Kojima T, Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Kyogashima M, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. ATRA inhibits ceramide kinase transcription in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells: the role of COUP-TFI. *J Neurochem*. 112:511-520, 2010.
- ⑩ Tanaka S, Cao K, Niimi A, Limsirichaikul S, Miao HQ, Nakamura N, Murate T, Hasegawa Y, Takahashi T, Suzuki M. Functions of base selection step in human DNA polymerase alpha. *DNA Repair (Amst)*. 9:534-541, 2010.
- ⑪ 細野祥之, 鈴木元, 高橋隆 miRNA の異常と肺癌の分子病態 実験医学 2009; 27: 1218-1222
- ⑫ Ebi H, Sato T, Sugito N, Hosono Y, Yatabe Y, Matsuyama Y, Yamaguchi T, Osada H, Suzuki M, Takahashi T. Counterbalance between RB inactivation and miR-17-92 overexpression in reactive oxygen species and DNA damage induction in lung cancers. *Oncogene*. 28:3371-3379, 2009.
- ⑬ Furuhashi A, Kimura A, Shide K, Shimoda K, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Tagawa Y, Hagiwara K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Abe A, Naoe T, Murate T. p27 deregulation by Skp2 overexpression induced by the JAK2V617 mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 383:411-416, 2009.
- ⑭ Furuhashi A, Murakami M, Ito H, Gao S, Yoshida K, Sobue S, Kikuchi R, Iwasaki T, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Abe A, Naoe T, Murate T. GATA-1 and GATA-2 binding to 3' enhancer of WT1 gene is essential for its transcription in acute leukemia and solid tumor cell lines. *Leukemia*. 23:1270-1277, 2009.
- ⑮ Gao S, Murakami S, Ito S, Furuhashi A, Yoshida K, Tagawa Y, Hagiwara K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Banno Y, Nozawa K, Murate T. Mutated Ras induced PLD1 gene expression in human colon cancer cell lines and a mouse cell line of NIH3T3. *Nagoya J Med Sci*. 71:127-136, 2009.
- ⑯ Ito H, Murakami M, Furuhashi A, Gao S, Yoshida K, Sobue S, Hagiwara K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Banno Y, Tanaka K, Tamiya-Koizumi K, Kyogashima M, Nozawa Y, Murate T. Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 gene expression of a human breast cancer cell line, MCF-7, induced by the anti-cancer drug, daunorubicin. *Biochim Biophys Acta*. 1789:681-690, 2009.
- ⑰ Suzuki M, Niimi A, Limsirichaikul S, Tomida S, Huang Q, Izuta S, Usukura J, Itoh Y, Hishida T, Akashi T, Nakagawa Y, Kikuchi A, Pavlov Y, Murate T, Takahashi T. PCNA mono-ubiquitination and activation of translesion DNA polymerases by DNA polymerase alpha. *J Biochem*. 146:13-21, 2009.
- ⑱ Iwasaki T, Murakami M, Sugisaki C, Sobue S, Ohashi H, Asano H, Suzuki M, Nakamura S, Ito M, Murate T. Characterization of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia by immunostaining of p53 and hemoglobin F and karyotype analysis: differential diagnosis between refractory anemia and aplastic anemia. *Pathol Int*. 58:353-360,

- 2008.
- ⑱ Sobue S, Murakami M, Banno Y, Ito H, Kimura A, Gao S, Furuhashi A, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T. v-Src oncogene product increases sphingosine kinase 1 expression through mRNA stabilization: alteration of AU-rich element-binding proteins. *Oncogene*. 27:6023-6033, 2008.
- ⑳ Sobue S, Nemoto S, Murakami M, Ito H, Kimura A, Gao S, Furuhashi A, Takagi A, Kojima T, Nakamura M, Ito Y, Suzuki M, Banno Y, Nozawa Y, Murate T. Implications of sphingosine kinase 1 expression level for the cellular sphingolipid rheostat: relevance as a marker for daunorubicin sensitivity of leukemia cells. *Int J Hematol*. 87:266-275, 2008.
- 21 Takemura M, Sugimura K, Okumura K, Limsirichaikul S, Suzuki M, Yamada Y, Yoshida S. Hyper-phosphorylated retinoblastoma protein suppresses telomere elongation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 72:630-635, 2008.
- 22 Tokumaru S, Suzuki M, Yamada H, Nagino M, Takahashi T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis*. 29:2073-2077, 2008.

[学会発表] (計 15 件)

- ① ALTERATION OF LIPID CONSTITUENT IN CANCER CELL MEMBRANE INDUCED BY HYBRID LIPOSOME. Ke Cao, Keiko Tamiya-Koizumi, Kouji Tanaka, Mamoru Kyogashima, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiko Banno, Yuji Komizua, Ryuichi Ueoka, Motoshi Suzuki. 第4回ナノ・バイオメディスンシンポジウム、2011年2月、名古屋
- ② Suzuki M, AN APPROACH TO REVEAL THE FUNCTIONAL INTERACTION BETWEEN GENETIC FLUCTUATION AND LUNG CANCER. The 4th International Symposium on "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Otsu, Dec 2010
- ③ Cao K, Tamiya-Koizumi K, Tanaka K, Kyogashima M, Nakamura M, Banno Y, Komizu Y, Ueoka R and Suzuki M ALTERATION OF LIPID CONSTITUENT IN CANCER CELL MEMBRANE INDUCED BY HYBRID LIPOSOME. The 4th International Symposium on "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Otsu, Dec 2010
- ④ Huang QM, Tomida S, Masuda S, Arima C, Kasahara T, Osada H, Akashi T, Murate T,

Kamiya K, Takahashi T, and Suzuki M: Epigenetic reduction of POLD4/p12 and genomic instability induction in small cell lung cancer. International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010', Nagasaki, Feb 2010

- ⑤ Implications of POLD4 regulation and genomic instability in small cell lung cancer. Motoshi Suzuki, Shuta Tomida, Chinatsu Arima, Yuji Masuda, Kenji Kamiya, Hirotsuka Osada, Yasushi Yatabe, Qin Miao Huang, Takashi Takahashi. 第69回日本癌学会総会、2010年10月、大阪
- ⑥ Functions of base selection step in human DNA polymerase alpha. Shigeru Tanaka, Ke Cao, Huang Qin Miao, Noriko Nakamura, Yoshinori Hasegawa, Takashi Takahashi, Motoshi Suzuki. 第69回日本癌学会総会、2010年10月、大阪
- ⑦ Huang QM, Tomida S, Masuda S, Arima C, Kasahara T, Osada H, Akashi T, Murate T, Kamiya K, Takahashi T, and Suzuki M: Epigenetic reduction of POLD4/p12 and genomic instability induction in small cell lung cancer. The 3rd International Symposium on "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Nagoya, Dec 2009
- ⑧ Suzuki M: Gene profiling listed a genomic instability gene involved in lung cancer. the 25th RBC International Symposium, Kyoto, Nov 2009.
- ⑨ Huang QM, Tomida S, Masuda S, Arima C, Kasahara T, Osada H, Akashi T, Murate T, Kamiya K, Takahashi T, and Suzuki M: Epigenetic reduction of POLD4/p12 and genomic instability induction in small cell lung cancer. The 2nd International Symposium of Nagoya Univ GCOE, Nagoya, Nov 2009
- ⑩ Matsuyama M, Suzuki M, Arima C, Huang QM, Tomida S, Takeuchi T, Sugiyama R, Itoh Y, Yatabe Y, Goto H and Takahashi T: Elucidation of Proteasomal Non-catalytic Subunit PSMD2 as Potential Therapeutic Target and Its Co-upregulation with Proteasome Pathway Genes in Association with Various Clinicopathologic Features in Lung Adenocarcinomas. The 2nd International Symposium of Nagoya Univ GCOE, Nagoya, Nov 2009
- ⑪ Huang QM, Tomida S, Masuda S, Arima C, Kasahara T, Osada H, Akashi T, Murate T, Kamiya K, Takahashi T, and Suzuki M:

Epigenetic reduction of POLD4/p12 and genomic instability induction in small cell lung cancer. The 19th International Symposium of Hiroshima Cancer Seminar in conjugation with Three Universities' Consortium, Hiroshima, Nov 2009 (Best Poster Award)

- ⑫ Suzuki M, Tanaka S, Tomida S, Murate T and Takahashi T: Genomic instability and aberrant fork structures induced by DNA replication errors. 第 67 回日本癌学会学術総会、ワークショップ、名古屋、2008 年 10 月
- ⑬ let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop Shogo Tokumaru, Motoshi Suzuki, Hideki Yamada, Masato Nagino, and Takashi Takahashi, 第 6 7 回日本癌学会総会、2008 年 10 月、名古屋
- ⑭ Suzuki M: PCNA Mono-ubiquitination and Activation of Translesion DNA Polymerases Caused by DNA Replication Errors. The 5th Forum on Oxidative Stress and Aging. Ancona, Italy, Sep 2008.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : Thermostable polymerases having altered fidelity and method of identifying and using same

発明者 : Loeb LA, Hood L and Suzuki M

権利者 : Washington University School of Medicine

種類 : US patent application

番号 : 20090004656

出願年月日 : January 1, 2009

国内外の別 : 外国

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 元 (SUZUKI MOTOSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 80236017

(2) 研究分担者

村手 隆 (MURATE TAKASHI)

名古屋大学・医学部・教授

研究者番号 : 30239537

(3) 連携研究者

なし