

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590338

研究課題名（和文） FANCIJ欠損によるゲノム不安定性と細胞癌化への関与

研究課題名（英文） Genomic instability in the absence of FANCIJ and its possible contribution to tumorigenesis

研究代表者

北尾 洋之（KITAO HIROYUKI）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：30368617

研究成果の概要（和文）：

FANCIJ はファンconi貧血の原因遺伝子であるだけでなく、BRCA1, MLH1 などのがん抑制遺伝子産物に結合し、機能する。申請者は、FANCIJ 欠損細胞において特徴的なゲノム不安定性が誘起されることを見いだした。さらに FANCIJ が大腸癌患者において抗がん剤 5-FU の抗腫瘍効果に影響を及ぼすことを示唆する結果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

FANCIJ is not only one of Fanconi anemia genes but also functions in cooperation with tumor suppressor gene products such as BRCA1 and MLH1. We found that (1) FANCIJ deficient cells displayed a characteristic genomic instability phenotype. Moreover, we obtained clinical data that suggest that FANCIJ affects anti-tumor effect of 5-FU in colorectal cancer patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
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：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

ファンconi貧血（Fanconi Anemia, FA）はまれな小児遺伝性疾患で、骨髄不全、骨格異常、高発がん性が主な臨床症状である。細胞レベルでは、マイトマイシン C（MMC）やシスプラチンなどの DNA 架橋剤にきわめて高感受性で、MMC 処理後多数の染色体断裂を認めることが特徴的である。2005 年に同定された FANCIJ は以前に家族性乳がん原因

遺伝子 BRCA1 と会合する DNA ヘリケースとして同定されていた BACH1/ BRIP1 と同一であった。また 2007 年に、FANCIJ は遺伝性非ポリポーシス大腸がん原因遺伝子 MLH1 とも会合していることが報告され、FANCIJ が FA 原因遺伝子であるだけでなく、家族性乳がん発症や家族性大腸がん、さらには他の散発性がん発症抑制にも深く関わっている可能性があった。また、FANCIJ ホモログを欠損した線虫では、複製などの時にゲ

ノム上に出現する G4 という 2 次構造を形成する領域を介したゲノム欠失が起こることが知られていた。さらに、2008 年にはヒト FANCI タンパク自体に、G4 構造を解消する Resolvase 活性があることが報告されており、ゲノム安定性維持、さらに癌抑制における寄与が示唆されていた。

2. 研究の目的

FANCI の癌抑制における細胞内での機能を基礎レベルで明らかにすること。また実際の癌における FANCI の発現や機能とゲノム不安定性に起因するゲノム異常、DNA 修復が関与する抗癌剤感受性との関連について検討すること。

3. 研究の方法

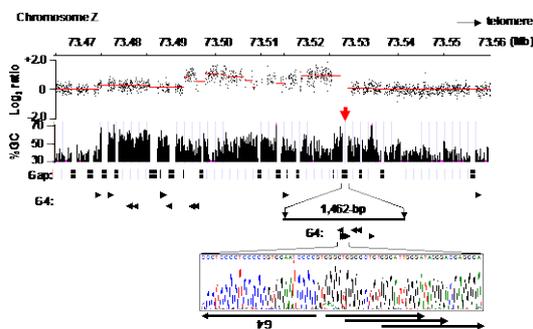
遺伝学的解析が可能なモデル細胞 DT40 を用いて、FANCI 欠損細胞を作製し、その表現型を解析した。

癌患者より提供された癌組織標本を用いて、組織免疫染色法を用いて FANCI 発現について検証し、その患者における臨床病理学的因子、予後、抗癌剤治療効果との関連について検討した。

4. 研究成果

FANCI 欠損 DT40 細胞では、以下のような特徴的なゲノム不安定性を示すことを見出した。

- 免疫グロブリン重鎖(IgH)遺伝子領域において、転写が活性化しているアレルでのみ高い頻度でゲノム上から欠失を起こした。
- 長期間細胞を維持すると、a の部位以外でもゲノム欠失や増幅が検出された。さらに、ゲノム増幅の境界部位の 1 カ所に G4 構造を形成する配列が高密度で存在していた (図)。

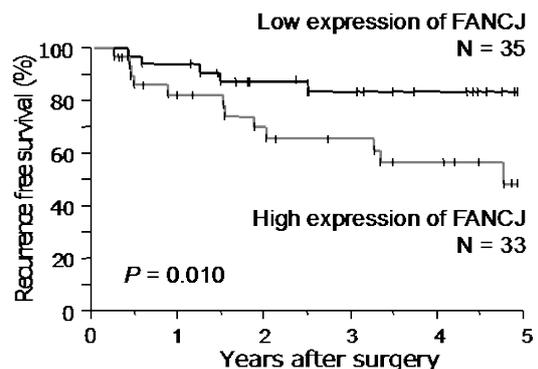


以上の結果から、高等真核生物においても

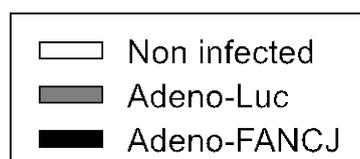
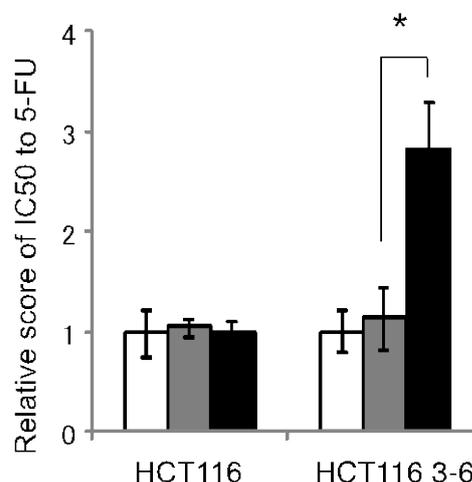
FANCI 欠損によってゲノム不安定性が引き起こされることが示唆された。ただ、線虫で見られるような G4 構造を形成する領域特異的な欠失のみが検出されたわけではなかったことから、この現象が FANCI の G4 Resolvase 活性にのみ起因するものではないことが示唆された。この知見を原著論文として 2011 年に報告した (5)。

九州大学消化器・総合外科で外科的手術を施行された 219 症例の大腸癌患者より提供を受けた標本を用い、組織免疫染色法により FANCI を染色した。染色強度と臨床病理学的因子等との関連を比較したところ、以下のような知見を見出すことができた。

- 癌部においては、非癌部に比べ、有意に FANCI 発現が亢進していた。
- 中でも FANCI 発現の高い群においては、5-FU を用いた術後化学療法の治療効果が少なかった (図は 5-FU を含む術後化学療法を施行した症例での、FANCI 発現量と再発頻度の比較)。



- MLH1 発現が正常な癌においては、b の関係が見られたが、MLH1 発現が見られない癌においては、FANCI 発現と 5-FU による治療効果との間に有意な相関が見られなかった。
- MLH1 を欠損した大腸癌細胞株 HCT116 と MLH1 発現を回復した HCT116 3-6



株に FANCF を過剰発現させたところ、HCT116 3-6 でのみ 5-FU に対し耐性を示した (図)。

以上の結果から、FANCF 過剰発現が MLH1 を介して癌細胞の 5-FU 耐性化を引き起こすことが原因で、FANCF 発現が高い症例で 5-FU を含む術後化学療法の治療効果が少なくなることを示唆された。この知見を原著論文として 2012 年に報告した (①)。

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 Nakanishi R, Kitao H, Fujinaka Y, Yamashita N, Iimori M, Tokunaga E, Yamashita N, Morita M, Takeji Y, Maehara Y. FANCF expression predicts the response to 5-fluorouracil-based chemotherapy in MLH1-proficient colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology* (2012) in press.
- ② Fujinaka Y, Matsuoka K, Iimori M, Tuul M, Sakasai R, Yoshinaga K, Saeki H, Morita M, Takeji Y, Gillespie DA, Yamamoto K, Takata M, Kitao H, Maehara Y. ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. *DNA Repair (Amst)*. (2012) 11(3):247-58.
- ③ Okada S, Tokunaga E, Kitao H, Akiyoshi S, Yamashita N, Saeki H, Oki E, Morita M, Takeji Y, Maehara Y. Loss of Heterozygosity at BRCA1 Locus Is Significantly Associated with Aggressiveness and Poor Prognosis in Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology* (2011) Dec. 17. [Epub ahead of print]
- ④ Kitao H, Hirano S, Takata M. Evaluation of homologous recombinational repair in chicken B lymphoma cell line, DT40. *Methods Mol Biol*. (2011) 745:293-309.
- ⑤ Kitao H, Nanda I, Sugino RP, Kinomura A, Yamazoe M, Arakawa H, Schmid M, Innan H, Hiom K, Takata M. FancJ/Brip1 helicase protects against genomic losses and gains in vertebrate cells. *Genes to Cells* (2011) 16(6):714-27.
- ⑥ Kitao H, Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *International Journal of Hematology*. (2011) 93(4):417-24.
- ⑦ Saeki H, Kitao H, Yoshinaga K, Nakanoko T, Kubo N, Takeji Y, Morita M, Maehara Y. Copy-neutral loss of heterozygosity at the p53 locus in carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinomas associated with p53 mutations. *Clinical Cancer Research*. (2011) 17(7):1731-40.
- ⑧ Tokunaga E, Okada S, Yamashita N, Akiyoshi S, Kitao H, Morita M, Takeji Y, Maehara Y. High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers. *Breast Cancer*. (2010) Nov 10. [Epub ahead of print]
- ⑨ Wu Y, Sommers JA, Suhasini AN, Leonard T, Deakynne JS, Mazin AV, Shin-Ya K, Kitao H, Brosh RM Jr. Fanconi anemia group J mutation abolishes its DNA repair function by uncoupling DNA translocation from helicase activity or disruption of protein-DNA complexes. *Blood*. (2010) 116(19):3780-91
- ⑩ Ando K, Takeji Y, Kitao H, Iimori M, Zhao Y, Yoshida R, Oki E, Yoshinaga K, Matumoto T, Morita M, Sakaguchi Y, Maehara Y. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Science*. (2010) 101(3): 639-45.
- ⑪ Tokunaga E, Okada S, Kitao H, Shiotani S, Saeki H, Endo K, Morita M, Takeji Y, Maehara Y. Low incidence of methylation of the promoter region of the FANCF gene in Japanese primary breast cancer. *Breast Cancer*. (2011) 18(2): 120-3.
- ⑫ Takata M, Ishiai M, Kitao H. The Fanconi anemia pathway: insights from somatic cell genetics using DT40 cell line. *Mutation Research*. (2009) 668(1-2): 92-102.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 北尾洋之、藤中良彦、飯森真人、ムンフボルド・ツール、中西良太、山下奈真、松岡和明、掛地吉弘、前原喜彦「5-FU により誘起される DNA 損傷に対する細胞応答機構」第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会 2011 年 6 月東京
- ② 北尾洋之、高田穰、前原喜彦「家族性乳がん遺伝子 FancJ/Brip1 へリカーゼ欠損によって起こる大規模ゲノム欠失・増幅」

第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月横浜

- ③ Kitao H, Fujinaka Y, Matsuoka K, Iimori M, Tuul M, Sakasai R, Yamamoto K, Takata M, Takeji Y, Maehara Y. 「Homologous recombinational repair and Chk1-mediated S phase arrest protect cells from 5-FU cytotoxicity.」第 34 回 日本分子生物学会年会 2011 年 12 月横浜
- ④ Kitao H, Nakanishi R, Iimori M, Fujinaka Y, Tuul M, Yamashita N, Takata M, Takeji Y, Maehara Y. 「Involvement of FancJ and Msh2 in the cellular response to 5-FU-induced DNA damages」23rd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium 2011 年 10 月スペイン・バルセロナ
- ⑤ 北尾洋之、藤中良彦、飯森真人、ムンフボルド・トール、中西良太、山下奈真、久保信英、吉永敬士、徳永えり子、森田勝、掛地吉弘、前原喜彦「5-FUによるファンコニ貧血経路活性化のメカニズム」第 14 回日本がん分子標的治療学会 2010 年 7 月東京
- ⑥ 北尾洋之、飯森真人、ムンフボルド・トール、藤中良彦、久保信英、中西良太、山下奈真、吉永敬士、徳永えり子、森田勝、掛地吉弘、前原喜彦「5-FUによるファンコニ貧血経路活性化における Chk1 の役割」第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月大阪
- ⑦ Kitao H, Nakanishi R, Iimori M, Fujinaka Y, Tuul M, Yamashita N, Takata M, Takeji Y, Maehara Y. 「A novel role of FancJ in the cellular response to 5-FU-induced DNA damages.」8th Joint Conference of the AACR and JCA 2010 年 2 月ハワイ
- ⑧ Kitao H, Nakanishi R, Iimori M, Fujinaka Y, Tuul M, Yamashita N, Takata M, Takeji Y, Maehara Y. 「Possible contribution of FancJ in the repair process of 5-FU-induced DNA damages」22nd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. 2010 年 10 月米国ミネアポリス
- ⑨ Kitao H, Nanda I, Takeji Y, Maehara Y, Takata M 「GENOME INSTABILITY PHENOTYPES INDUCED BY LOSS OF FANCJ/BRIP1 FUNCTION.」100th Annual Meeting American Association for Cancer Research. 2010 年 4 月米国デンバー
- ⑩ 北尾洋之、藤中良彦、久保信英、中ノ子智徳、茂地智子、吉永敬士、ムンフボルド・トール、佐伯浩司、徳永えり子、江見泰徳、森田勝、掛地吉弘、前原喜彦「5-FU

感受性規定因子としてのファンコニ貧血経路」第 13 回日本がん分子標的治療学会 徳島

- ⑪ 北尾洋之、藤中良彦、飯森真人、ムンフボルド・トール、久保信英、吉永敬士、中西良太、掛地吉弘、福島正和、高田穰、前原喜彦「5-FU 感受性規定因子としてのファンコニ貧血経路とその分子機序の解明」第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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

<http://www.kyudai2geka.com/html/kenkyu/kenkyu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北尾 洋之 (KITAO HIROYUKI)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：30368617

(2) 研究分担者

徳永 えり子 (TOKUNAGA ERIKO)
九州大学・大学病院・学術研究室
研究者番号：50325453

森田 勝 (MORITA MASARU)
九州がんセンター・消化器外科・医師
研究者番号：30294937

掛地 吉弘 (KAKEJI YOSHIHIRO)

九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80284488

(3) 連携研究者
()

研究者番号：