

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 6 月 15 日現在

機関番号：82504  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21590349  
 研究課題名（和文）ヒト腫瘍の原発巣と転移巣における mtDNA 変異の解析と転移との関連性の検討  
 研究課題名（英文）Comparison of the frequency of mtDNA mutation in primary and metastatic lesions of human malignant tumors  
 越川 信子（KOSHIKAWA NOBUKO）  
 千葉県がんセンター（研究所）・研究局・研究員  
 研究者番号：90260249

研究成果の概要（和文）：mtDNA の呼吸鎖複合体 I サブユニットをコードする遺伝子 (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4L*, *ND6*) の変異出現率についてヒト肺癌・大腸癌の原発巣と転移巣で比較検討したところ、過激なアミノ酸変異を伴い、疾患関連性変異として報告されている SNPs 或は新規変異の出現率が、転移巣で原発巣より大幅に高くなっていることを見いだした。このような mtDNA の SNPs や変異は、ある種のヒト癌において転移に寄与している可能性が考えられるが、症例数が少ない(原発巣 67 例・転移巣 47 例)ため、今後症例数を増やす必要がある。

研究成果の概要（英文）：We showed that ROS-generating pathogenic mutations in NADH dehydrogenase subunit 6 (*ND6*) gene of mitochondrial DNA (mtDNA), which is a subunit of complex I of the electron transport chain, can regulate tumor cell metastasis in mouse models. In this study, we compared the status of mutations and nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the genes encoding complex I subunits (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4L* and *ND6*) between primary and metastatic lesions of human lung and colon carcinomas. The combined frequency of appearance of nonsynonymous SNPs and mutations related to mtDNA base substitution disease such as LHON and novel mutations of Grantham value >50 in the genes encoding complex I was considerably higher in metastatic lesions than in primary lesions. It may be possible that such mtDNA SNPs and mutations contribute to metastasis in human cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 22 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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・病態医科学

キーワード：mtDNA 変異 肺癌 大腸癌 原発巣 転移巣 神経膠腫 髄液播種

1. 研究開始当初の背景 Lewis lung マウス肺癌細胞から分離した低転移細胞株 P29 と高転移細胞株 A11 について、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を完全に置換する cybrid 法を

用いてその性状の差を調べた。その結果、A11 mtDNA には P29 mtDNA にはない G13997A という NADH dehydrogenase subunit 6 (*ND6*) 遺伝子に生じた呼吸鎖複合体 I 活性低下の原

因となる病理性変異が認められた。また高転移性マウス fibrosarcoma の細胞株においても、*ND6* 遺伝子変異を生じる 13885insC を同定した。これら *ND6* 遺伝子変異を持つ細胞においては、呼吸鎖複合体 I の活性低下に伴い ATP 産生の低下、活性酸素種 (ROS) の過剰産生、また抗アポトーシス因子である *Mcl-1* の発現上昇が認められた。さらに、高転移性細胞株由来の mtDNA を持つことで ROS 産生が増加した細胞に抗酸化剤処理を行うことにより、*Mcl-1* の発現低下と転移能の抑制がおこることを明らかにした。

以上の結果は、mtDNA の突然変異ががん細胞の転移能を誘導しうることを、核にコードされた遺伝子の発現を制御しうることを初めて証明することとなった。さらに、mtDNA 突然変異に起因する転移能獲得には ROS の介在が重要で、ROS を除去することにより転移の抑制が可能であることも示した。これは、あるがん細胞が潜在的に転移能を獲得し易いか否か、また、悪性化しつつあるがん細胞の転移抑制にむけた治療法の開発に、mtDNA の検討が重要であることを示唆するものである。

2. 研究の目的 マウスモデルにおいて見いだしたように、呼吸鎖複合体のサブユニットをコードする特定の mtDNA 変異の出現率に、ヒト癌の原発巣と転移巣で差があるか否かを検討することを目的とした。そのため、術中に採取、冷凍保存されていた検体のうち、肺癌原発巣および肺癌脳転移巣、大腸癌原発巣および各種臓器転移巣を用いた。一方、神経膠腫では髄液播種を来す症例と来さない症例があり、予後に深く関与する。同疾患の播種の様式は、原発腫瘍巣細胞断端からの遊離・髄液中での生存・着床など、他の癌の転移様式と類似した点があげられる。そこで経過観察中早期に播種を来した原発巣と長期観察中播種を来さなかった原発巣について *ND1*, *ND3*, *ND4L*, *ND6* の塩基配列を肺癌・大腸癌と同様に解析した。

### 3. 研究の方法

#### I. ヒト手術検体からの DNA の抽出

手術によって摘出された凍結組織

肺癌原発巣 45 例 (非小細胞癌)

肺癌脳転移巣 36 例 (線癌 29 例・

扁平上皮癌 7 例)

大腸癌原発巣 22 例

大腸癌転移巣 11 例 (肝転移 8 例・肺転移 2

例・脳転移 1 例)

以上肺癌・大腸癌原発巣 計 67 例

転移巣 計 47 例

神経膠腫 易播種性原発巣 8 例

非播種性原発巣 9 例

これら凍結組織 131 検体からフェノール法により genome DNA を抽出した。

#### II. ホルマリン固定パラフィン包埋切片からの DNA 抽出

ホルマリン固定パラフィン包埋組織から切片を作製、スライドガラス状に貼付け、HE 染色標本と比較しながら、DEXPAT (TAKARA Bio Inc.) を用いて非癌部組織と癌部組織から DNA を抽出した。

#### III. Sequencing 解析

I, II で抽出した DNA を template として各々の遺伝子をそれぞれ網羅するプライマーを用いて PCR を行った。増幅した PCR 産物で Big Dye Terminator ver.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて direct sequencing を行った。Sequencing 結果は mtSNP 等の data base を用いて島根大学、千葉県がんセンターにおいて解析した。

4. 研究成果 ヒト肺癌及び大腸癌の原発巣と転移巣の凍結検体から抽出したゲノム DNA を用い、ミトコンドリア DNA (mtDNA) にコードされる呼吸鎖複合体 I 関連遺伝子 *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4L*, *ND6* の塩基配列解析と共に mtDNA にコードされる、他の呼吸鎖複合体 I, III, IV, V 関連遺伝子の塩基配列の検討も行った。その結果、*ND* 遺伝子にみられるアミノ酸変異指標・Grantham 値が 50 以上のミスセンス変異やミトコンドリア病との関連が報告されている変異、ナンセンス変異の総合的な出現頻度が、原発巣に比べ転移巣で有意に高い ( $p < 0.01$ ) ことを明らかにした (表 1)。更に大腸癌検体において mtDNA 変異の見られた症例のパラフィンブロックから DNA を抽出し、癌部と非癌部における *ND* 遺伝子変異の比較を行った。その結果、解析可能であった 6 例で、癌部において凍結検体と同様の変異を見出したが、非癌部では変異を認めなかった。即ち、凍結検体における *ND* 遺伝子の変異は癌部の体細胞 mtDNA 変異を反映しており、呼吸鎖複合体 I 活性の低下を引き起こす可能性のある *ND* 遺伝子の原発巣での変異が、ヒト癌で転移能に影響があることが更に強く示唆された。しかし検索検体数が原発巣 67 例、転移巣 47 例と少ないこと、原発巣と転移巣の同一患者からの検体の比較についても検索数が少ないことから、症例を増やしての検討が必要であると考えた。

神経膠腫では髄液播種を来す症例と来さない症例があり、予後に深く関与する。同疾患の播種の様式は、原発腫瘍巣細胞断端からの遊離・髄液中での生存・着床など、他の癌の転移様式と類似した点があげられる。そこで経過観察中早期に播種を来した 8 例と長期

観察中播種を来さなかった9例について *ND1, ND3, ND4L, ND6* の塩基配列を解析した。その結果、播種を来した8例中1例、播種を来さなかった9例中4例で Grantham 値 50 以上のミスセンス変異が認められた。以上の解析から、*ND* 遺伝子変異の神経膠腫における変異が播種性にいかなる影響を与えるかは、播種巣における DNA 解析が重要であると考えられる。

表 1 転移と関連する mtDNA 変異のクライテリア

Criteria	No. of patients with nonsynonymous SNP or somatic mutation in <i>ND1, ND2, ND3, ND4L</i> and/or <i>ND6</i> genes / total No. of patients with lung or colon cancer		Significance ( $\chi^2$ test)
	Primary (n=67)	Metastases (n=47)	
Frequency in Japanese population >1	25 (37.3)	24 (51.1)	0.144
Frequency in Japanese population <1	10 (14.9)	12 (25.5)	0.158
Frequency (cancer patient/Japanese population) >2	16 (23.9)	17 (36.2)	0.154
Frequency (cancer patient/Japanese population) <2	11 (16.4)	7 (14.9)	0.694
Conserved amino acid substitution	12 (17.9)	13 (27.7)	0.216
Grantham value >50	22 (32.8)	25 (53.2)	<b>0.030</b>
Grantham value <50	18 (26.9)	15 (31.9)	0.558
Novel mutation (Grantham value >50 + Frame shift)	5 (7.5)	4 (8.5)	0.455
mtDNA base substitution disease-associated	7 (10.4)	12 (25.5)	<b>0.033</b>
mtDNA base substitution disease associated (Grantham value >50)	6 (9.0)	11 (23.4)	<b>0.033</b>
mtDNA base substitution disease-associated + Novel mutation (Grantham value >50 + Frame shift)	9 (13.4)	16 (34.0)	<b>0.009</b>
mtDNA base substitution disease-associated (Grantham value >50) + Novel mutation (Grantham value >50 + Frame shift)	7 (10.4)	15 (31.9)	<b>0.004</b>

## 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2件)

Koshikawa N, Hayashi J, Nakagawara A, Takenaga K: Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1 alpha gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *Journal of Biological Chemistry* 284: 33185-33194, 2009 査読有り

Kojima S, Hyakutake A, Koshikawa N, Nakagawara A, Takenaga K: MCL-1V, a novel mouse antiapoptotic MCL-1 variant, generated by RNA splicing at a non-canonical splicing pair. *Biochem Biophys Res Commun* 391:492-497, 2009 査読有り

[学会発表] (計3件)

竹永啓三: 低酸素、ミトコンドリアとがんの転移 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月3日 横浜

越川信子、木村秀樹、飯笹俊彦、井内俊彦、滝口伸浩、秋元美穂、本間良夫、竹永啓三: ヒト肺がんおよび大腸がんの原発巣と転移巣における mtDNA 変異頻度の比較 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月3

日 横浜

越川信子、木村秀樹、飯笹俊彦、井内俊彦、滝口伸浩、竹永啓三、中川原 章: ヒト肺癌及び大腸癌の原発巣と転移巣における mtDNA 変異頻度 2010年6月30日 第19回日本癌病態治療研究会 東京

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

越川 信子 (KOSHIKAWA NOBUKO)

千葉県がんセンター(研究所)・研究局・研究員

研究者番号: 90260249

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

竹永 啓三 (TAKENAGA KEIZO)

島根大学医学部生命科学講座腫瘍生物学・准教授

研究者番号: 80260256

### (4) 研究協力者

林 純一 (HAYASHI JUN-ICHI)

筑波大学生命環境科学研究科(系)・教授  
研究者番号: 60142113

### (5) 研究協力者

大平 美紀 (OHIRA MIKI)

千葉県がんセンター(研究所)・研究局・研究員

研究者番号: 20311384

