

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 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590356

研究課題名（和文） がん染色体不安定性の要因としての中心体サイクル制御機構異常に関する研究

研究課題名（英文） Study on the abnormal centrosome regulation, leading to the chromosome instability in cancer

研究代表者

新村 和也 (SHINMURA KAZUYA)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40321880

研究成果の概要（和文）：PLK4 が胃がんで高発現しており、中心体過剰複製、染色体不安定性を誘導すること、また、primary cilia 形成を抑制することを明らかにした。大腸がんにおいて、SGOL1 のエクソン 3 を欠いた新規バリエーション SGOL1-P1 が腫瘍部特異的に発現していること、また、その過剰発現が染色体の配列異常、早期染色体分離、M 期進行の遅延、中心体過剰複製、染色体不安定性を引き起こしていることを明らかにした。AID の中心体局在、肺がんでの過剰発現、突然変異誘発能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： It was revealed that PLK4 is overexpressed in a subset of gastric cancers and the overexpression of PLK4 induces centrosome amplification and chromosome instability. It was also revealed that PLK4 has activity to suppress primary cilia formation. A novel SGOL1 variant (SGOL1-P1), which is cancer-specific, was identified in colorectal cancer. Overexpression of the variant caused aberrant chromosome alignment, precociously separated chromatids, delayed mitotic progression, centrosome amplification, and chromosome instability. It was revealed that a part of AID is localized at the centrosomes, AID is aberrantly expressed in a subset of lung cancers, and the AID overexpression causes increased spontaneous mutation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：中心体、染色体不安定性、がん、中心体過剰複製、PLK4、SGOL1、AID、中心体サイクル、MUTYH

1. 研究開始当初の背景

中心体は、動物細胞において、直交する 2 つの中心小体とその周りのアモルファスな蛋白質集合体である中心小体周辺物質から構成され、微小管形成中心として機能する。一

つから二つ、そして二つから一つへと変わる中心体の複製サイクルは、細胞周期とリンクしており、一周中に一度だけ複製されるよう制御されている。この制御機構が崩れ 3 つ以上の中心体ができる (=中心体過剰複製)

と、染色体数の異常を引き起こし、がんの発生と進展に関わることが考えられ、多くの関心が寄せられているが、その機序はまだ十分には解明されていない。

中心体異常のがんとその関わりについての研究は、がん研究の歴史の中ではかなり新しい部類に属し、まだまだ分からない事が山積している状態である。そこで、科研費若手(B)での研究に引き続き、「がん染色体不安定性の要因としての中心体サイクル制御機構異常に関する研究」の課題名で研究を継続したいと考えている。

2. 研究の目的

中心体サイクル制御機構を解明し、そのがんにおける異常を同定し、その制御機構異常の染色体不安定性へのつながりを明らかにすることを目的とする。具体的には、(1)PLK4 キナーゼの中心体制御能の解析、(2)がん抑制遺伝子 NORE1A の役割解明、(3)染色体分離に関わる SGOL1 のがん特異的スプライス型の解析、(4)肺・胃・大腸がんにおける変異・遺伝子増幅・発現異常解析、を柱として研究を進める。

3. 研究の方法

(1)薬剤等の処理により中心体過剰複製を誘導し、免疫蛍光染色法によりこれを同定する。(2)免疫蛍光染色法、免疫電顕法、中心小体染色法により、過剰複製する中心体の性質を解析する。(3)中心体過剰複製の細胞周期との関連性を、FACS, Western blot 法, kinase アッセイ等で解析する。(4)中心体過剰複製誘導細胞が分裂期に示す挙動を time lapse イメージ解析により調べる。(5)染色体数を染色体 FISH 法により計測する。また、異常核を免疫蛍光染色法により調べる。(6)中心体過剰複製に影響を与える候補遺伝子因子を強制発現、siRNA 法によるノックダウン法により検討する。(7)ヒトがん臨床検体における、中心体過剰複製、中心体・紡錘体に局在する遺伝子の異常の有無を、免疫染色法、変異同定法、定量的 PCR 法、Western blot 法などにより検討する。(8)その他、一般的な分子遺伝学的手法および、生物学的統計解析法により、研究を進める。

4. 研究成果

主な研究成果として、次の(1)-(6)を挙げる。(1) 正確な染色体分離が行われる上で重要な役割を果たす分子であるヒトシュゴシン (SGOL1) について、これまでにその発現抑制により中心体過剰複製が誘導されることなどを報告してきたが、更に次の結果を得た。大腸がんにおいて腫瘍部特異的に、SGOL1 のエクソン3を欠いた新規バリエーション SGOL1-P1 が発現していた。SGOL1-P1 を大腸がん細胞株

HCT116 で過剰発現させると、染色体の配列異常、早期染色体分離、M 期進行の遅延、中心体過剰複製を示す細胞が増加し、染色体数の不安定性につながった。これらは、siRNA 法による SGOL1 発現低下でもみられた。また、SGOL1-P1 の過剰発現は、内在性 SGOL1 およびコヒーシサブユニット RAD21/SCC1 のセントロメア局在を阻害した。以上のことから、SGOL1-P1 は、大腸がん細胞において、内在性 SGOL1 の阻害因子としてはたらき、染色体不安定性を引き起こすことが示唆された。(2) B リンパ球に発現し抗体多様性に関わることが知られていた AID 遺伝子が、ヒト肺がん細胞株および原発性肺がんの一部で発現していることを明らかにした。AID を肺がん細胞株 H1299 で過剰発現させると、5.0-6.1 倍高い突然変異率を示した。また、129 例の原発性肺がん検体での解析で、AID 蛋白質発現レベルは、p53 変異の有無と関連性を示した。さらに、AID の一部は中心体に存在することを明らかにした。以上のことから、中心体にも存在する AID の発現は、その変異誘発能により一部の肺がんに関わることが示唆された。AID の中心体制御能については検討中である。(3) 中心体制御に関わることが示唆されている遺伝子を含む 10 遺伝子 EGFR, ERBB2, EPHB3, PIK3CA, MET, PTK7, ACK1, STK15, SRC, HCK (100 キナーゼ遺伝子の中から、これまでに胃/肺/大腸がん計 60 例での検索から抽出されたもの) について、原発性胃がん検体での遺伝子増幅率を明らかにし、臨床病理因子との関連性を示した。また、胃がんの予後予測規定因子となるかどうかについて検討した。(4) 8-ヒドロキシグアニン (8OHG) などの酸化損傷塩基の除去修復に関わる MUTYH は、OGG1 と double knockout させると、その細胞は、酸化ストレス誘導下で中心体過剰複製を起こしやすいことが知られている。この MUTYH の胃がんとの関連性について検討した。胃がんにおける MUTYH の mRNA および蛋白質発現レベルの低下が示された。また、がん部での発現レベルに応じて胃がんを 2 群化すると、MUTYH 低発現は独立した予後不良予測因子になることが多変量解析により示された。最後に、MUTYH 発現レベルの異なる AGS 胃がん細胞系を樹立・解析し、MUTYH 発現レベルが、(a)A:8OHG 塩基対に対する修復活性、(b)8OHG による *in vivo* 突然変異誘発に対する抑制活性、(c)細胞増殖抑制活性、を胃がん細胞内で規定していることを明らかにした。(5) 前述の MUTYH は、また、MUTYH 関連ポリポーシス (MAP) という遺伝性疾患の原因遺伝子でもある。この MUTYH の生殖細胞系列変異型の機能評価を行った。各変異型の発現誘導株を transposon vector システムを利用してヒト細胞株で樹立し、8OHG を含んだシャトルプラスミド pMY189 を用いて

突然変異抑制能を比較した。すると、野生型(2型)発現株で示された8OHGによる突然変異の抑制が、2型-R154H, M255V, L360P, P377Lでは認められなかった。これらのアレルは、MAP病源性アレルであることが示唆された。(6)中心体制御に関わることが示唆されているPLK4遺伝子について、各種ヒトがん細胞株での発現レベルを検討したところ、胃がん細胞株での過剰発現が示された。さらに、原発性胃がんでの検討でも過剰発現が示された。そこで、AGS胃がん細胞株でのPLK4発現誘導株を樹立したところ、PLK4発現誘導により、中心体過剰複製、染色体不安定性が誘導されることが示された。また、ヒト細胞株の解析で、PLK4過剰発現が、primary cilia形成を抑制することを明らかにした。以上のことから、PLK4過剰発現が胃がんの発生・進展に関わることが示唆された。

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9件)

- ① Shinmura K, Goto M, Tao H, Sugimura H: Role of base excision repair enzyme MUTYH in the repair of 8-hydroxyguanine and MUTYH-associated polyposis (MAP). *Hereditary Genet* 査読有 1:111, 2012. doi: 10.4172/2161-1041.1000111
- ② Shinmura K, Goto M, Tao H, Matsuura S, Matsuda T, Sugimura H: Impaired suppressive activities of human MUTYH variant proteins against oxidative mutagenesis. *World J Gastroenterol* 査読有 18: 6935-6942, 2012. doi: 10.3748/wjg.v18.i47.6935.
- ③ Kiyose S, Nagura K, Tao H, Igarashi H, Yamada H, Goto M, Maeda M, Kurabe N, Suzuki M, Tsuboi M, Kahyo T, Shinmura K, Hattori N, Sugimura H: Detection of kinase amplifications in gastric cancer archives using fluorescence *in situ* hybridization. *Pathol Int* 査読有 62: 477-484, 2012. doi: 10.1111/j.1440-1827.2012.02832.x
- ④ Shinmura K, Goto M, Suzuki M, Tao H, Yamada H, Igarashi H, Matsuura S, Maeda M, Konno H, Matsuda T, Sugimura H: Reduced expression of MUTYH with suppressive activity against mutations caused by 8-hydroxyguanine is a novel predictor of a poor prognosis in human gastric cancer. *J Pathol* 査読有 225:

414-423, 2011. doi: 10.1002/path.2953

- ⑤ Shinmura K, Tao H, Nagura K, Goto M, Matsuura S, Mochizuki T, Suzuki K, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Sugimura H: Suppression of hydroxyurea-induced centrosome amplification by NORE1A and down-regulation of NORE1A mRNA expression in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 査読有 71: 19-27, 2011. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.04.006
 - ⑥ Kahyo T, Iwaizumi M, Shinmura K, Matsuura S, Nakamura T, Watanabe Y, Yamada H, Sugimura H: A novel tumor-derived SGOL1 variant causes abnormal mitosis and unstable chromatid cohesion. *Oncogene* 査読有 30: 4453-4463, 2011. doi: 10.1038/onc.2011.152
 - ⑦ Shinmura K, Igarashi H, Goto M, Tao H, Yamada H, Matsuura S, Tajima M, Matsuda T, Yamane A, Funai K, Tanahashi M, Niwa H, Ogawa H, Sugimura H: Aberrant expression and mutation-inducing activity of AID in human lung cancer. *Ann Surg Oncol* 査読有 18: 2084-2092, 2011. doi: 10.1245/s10434-011-1568-8
 - ⑧ Goto M, Shinmura K, Nakabeppu Y, Tao H, Yamada H, Tsuneyoshi T, Sugimura H: Adenine DNA glycosylase activity of 14 Human MutY homolog (MUTYH) variant proteins found in patients with colorectal polyposis and cancer. *Hum Mutat* 査読有 31: E1861-1874, 2010. doi: 10.1002/humu.21363
 - ⑨ 岩泉守哉、新村和也、山田英孝、伊熊睦博、梶村春彦: 大腸癌においてシュゴシン(hSgo1)の低下は染色体不安定性を誘導する。 *INTESTINE* 査読無 14: 320-322, 2010.
- [学会発表] (計10件)
- ① 新村和也. 酸化的損傷塩基の除去修復因子であるDNAグリコシラーゼの活性の個体差・異常とがん化に関する研究. 第58回(平成24年度)日本病理学会秋期特別総会 2012年11月22-23日名古屋
 - ② 新村和也、後藤正憲、梶村春彦. 胃癌におけるMUTYHの8-hydroxyguanine誘発変異抑制活性とその発現レベルの予後予測に関する検討. 第65回日本酸化ストレス

ス学会学術集会 2012年6月7-8日 徳島

- ③ 新村和也、後藤正憲、鈴木雅也、陶弘、山田英孝、五十嵐久喜、松浦駿、前田松喜、今野弘之、松田知成、梶村春彦. 胃癌におけるMUTYHの8-hydroxyguanine誘発変異抑制活性とその発現レベルの予後予測に関する検討. 第101回日本病理学会総会 2012年4月26-28日 東京
- ④ 松浦駿, 新村和也, 華表友暁, 乾直輝, 須田隆文, 梶村春彦, 千田金吾. 非小細胞肺癌におけるSGOL1発現の臨床的意義. 第52回日本呼吸器学会学術講演会 2012年4月20-22日 神戸
- ⑤ Goto M, Shinmura K, Nakabeppu Y, Tao H, Yamada H, Tsuneyoshi T, Sugimura H: The activity and localization of 14 MUTYH variant proteins found in patients with colorectal polyposis and cancer. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 3-5, 2011 Nagoya
- ⑥ Shinmura K, Igarashi H, Goto M, Tao H, Yamada H, Matsuura S, Matsuda T, Ogawa H, Sugimura H: Aberrant expression and mutation-inducing activity of AID in human lung cancer. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Oct 3-5, 2011 Nagoya
- ⑦ 後藤正憲、新村和也、中別府雄作、陶弘、山田英孝、常吉俊宏、梶村春彦. 大腸ポリポーシスと大腸がんの患者で見つかった14種のMUTYH変異型タンパク質の活性と局在の評価. がん予防大会 2011 (第18回日本がん予防学会、第34回日本がん疫学分子疫学研究会) 2011年6月20-21日 京都
- ⑧ 新村和也、五十嵐久喜、後藤正憲、陶弘、山田英孝、松浦駿、小川博、梶村春彦. ヒト肺癌における脱アミノ化酵素 AID の異常発現と変異誘導能. 第100回日本病理学会総会 2011年4月28-30日 横浜
- ⑨ Kahyo T, Iwaizumi M, Yamada H, Shinmura K, Sugimura H: Analysis of a novel shugoshin-like 1 variant from colon cancer. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sep 22-24, 2010 Osaka
- ⑩ Goto M, Shinmura K, Konno H, Sugimura H: Altered expression and the missense

polymorphism of the human base excision repair gene NTH1 in gastric cancer. 101th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Apr. 17-21, 2010 Washington, DC.

〔図書〕(計1件)

- ① Shinmura K, Sugimura H: "Centrosome Abnormality and Human Lung Cancer" in Lung Diseases - Selected State of the Art Reviews, Irusen EM (Ed.) 2012, InTech, Rijeka, Croatia, pp.171-188.

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新村 和也 (SHINMURA KAZUYA)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40321880

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし