

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号:82504

研究種目: 若手研究(B)

研究期間:2011~2012

課題番号:23790435

研究課題名(和文)

セントロメア低機能性マウスを用いた発がん機構の解明

研究課題名(英文)

The elucidation of carcinogenic mechanism by two-stage skin carcinogenesis in CENP-R null mice.

研究代表者

奥村 和弘 (OKUMURA KAZUHIRO)

千葉県がんセンター(研究所)・研究員

研究者番号:80584680

研究成果の概要(和文): 染色体機能とがん悪性化の関連性を明らかにするため、セントロメア低機能性マウス(CENP-R KO)を用いて化学皮膚発がん実験を行った結果、通常のマウスよりもCENP-R KOの方が悪性腫瘍の発生率が有意に低く、セントロメア関連蛋白質ががんの悪性化に関与することを初めて個体レベルで示すことに成功した。今後は腫瘍細胞におけるセントロメア蛋白質の機能的解析を実施することで、がんの悪性化における新たな機構の解明に繋がる。

研究成果の概要(英文): To reveal the function of CENP-R in skin carcinogenesis, we subjected 30 CENP-R knockout (CENP-R<sup>-/-</sup>) mice, 15 CENP-R<sup>+/+</sup> mice as control groups, to the DMBA/TPA chemical carcinogenesis protocol and monitored their tumor development for a period of 38 weeks. As a result, control mice had a higher incidence and earlier onset of squamous cell carcinoma compared to CENP-R<sup>-/-</sup> mice. Therefore, CENP-R is important factor for skin carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野: がん遺伝学

科研費の分科・細目: 基礎医学・実験病理学

キーワード: セントロメア, CENP-R, ノックアウトマウス, DMBA-TPA

## 1. 研究開始当初の背景

生物の生命維持には、ゲノム情報を包括する構造体である染色体が安定に保持・増殖されなければならない。染色体が分配される際に、何らかのエラーが生じると、染色体の異数化・がん化など細胞に対する悪影響が生じる。このようなゲノム不安定性を引き起こす染色体分配機能の異常は、がんの悪性化を推し進める原動力であり、これらの機構を明らかにすることはがん機構の理解に大いに貢献すると考えられる。

## 2. 研究の目的

これまでに染色体機能異常とがんの悪性化との間には密接な関係があると考えられてきた。しかしその関係性を個体レベルで解析した報告はほとんどない。その要因として生命維持に重要であるこれらの機構に関する生育可能な遺伝子改変動物の作製が困難であったことが挙げられる。そんな中

我々は最近、染色体分配機構に重要であるセントロメアの低機能性変異マウスの作製に成功した。そこで、本研究は染色体が不安定化しやすい状況下でのがん化過程の分子機構を明らかにするために、セントロメア構成タンパク質であるCENP-Rノックアウトマウスを用いて発がん実験を行うことで染色体機能異常と発がん機構との関連性を個体レベルで実証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究ではDMBA(dimethylbenz[a]anthracene)とTPA(tetradecanoyl-phorbol-acetate)による二種類の化学発がん剤を用いた多段階発がんモデルを用いた。CENP-RKO(CENP-R<sup>-/-</sup>)を30頭および野生型としてCENP-R<sup>+/-</sup>を8頭準備し、発がん実験に供試した。

(2)誘導した腫瘍を用いて組織切片を作製し、細胞増殖マーカーであるKi-67抗体による免疫染色法および、アポトーシス細胞をTUNEL法により可視化し各マウス間の腫瘍で比較した。

#### 4. 研究成果

(1)DMBA/TPA処理の結果、DMBA処理後20週目の平均良性腫瘍数はCENP-R<sup>-/-</sup>は27.53±12.62であったのに対し、CENP-R<sup>+/+</sup>は26.63±9.53であり、有意な差は認められなかった(図1)。

しかしながら、その発がんスペクトラムは全く異なっており、CENP-R<sup>-/-</sup>は7から17週目にかけてはCENP-R<sup>+/+</sup>よりも良性腫瘍数が有意に高く、12週目においてはCENP-R<sup>-/-</sup>が19.66±9.92であるのに対しCENP-R<sup>+/+</sup>は9.06±3.47であった(図1)。

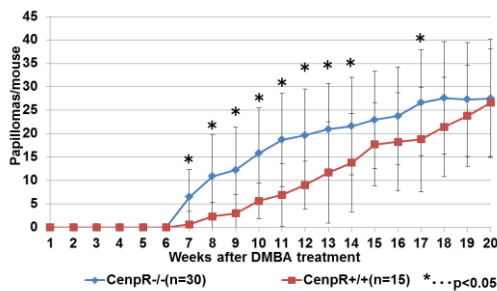


図1. CENP-Rノックアウトマウスを用いたDMBA/TPA多段階皮膚発がんによる良性腫瘍数の推移。

腫瘍サイズの直径別(<2mm、2-6mmおよび>6mm)に解析を行った結果、8および16週目においてCENP-R<sup>-/-</sup>は<2mmの腫瘍が有意に多く、20週目以降では2mm以上のサイズの腫瘍では野生型のCENP-R<sup>+/+</sup>と差がなかった(図2A)。さらに、>6mmの腫瘍においては20週以降でCENP-R<sup>+/+</sup>の方がCENP-R<sup>-/-</sup>より多い傾向を示した(図2B)。

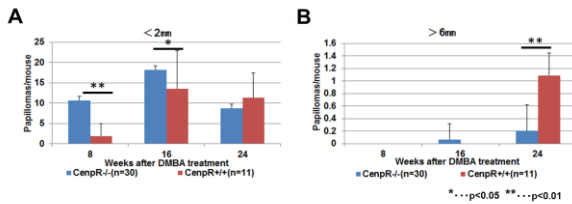


図2. CENP-Rノックアウトマウスの腫瘍サイズの比較. A: 2mm以下、B: 6mm以上の良性腫瘍平均数。

>6mmつまり後期の良性腫瘍数と関連して扁平上皮がんの発生率においては38週目においてCENP-R<sup>-/-</sup>が10.0%であったのに対し、CENP-R<sup>+/+</sup>が46.6%と有意に高かった(図3)。

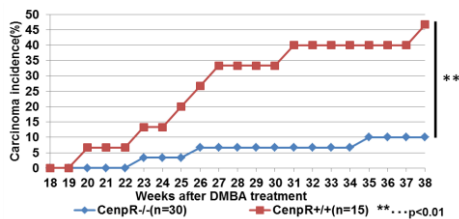


図3. CENP-Rノックアウトマウスを用いたDMBA/TPA多段階皮膚発がんによる扁平上皮がんの発生率の推移。

(2)発がん実験の結果から、CENP-R<sup>-/-</sup>マウスにおいて良性腫瘍の早期と後期で直径サイズの拡大がほぼ観察できないことから何らかの変化が起きている可能性が示唆された(図4)。

そこで、これらマウスの良性腫瘍の組織切片を作製し、TUNEL法およびKi-67抗体による免疫染色を行った結果、アポトーシス細胞数はほぼ変化はなかったが、増殖細胞数はCENP-R<sup>-/-</sup>の方がCENP-R<sup>+/+</sup>よりも増殖細胞が減少していた(図5)。

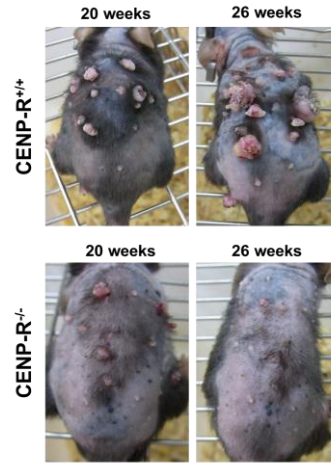


図4. DMBA/TPAによる皮膚発がん実験時のCENP-R<sup>+/+</sup>の良性腫瘍の変化。

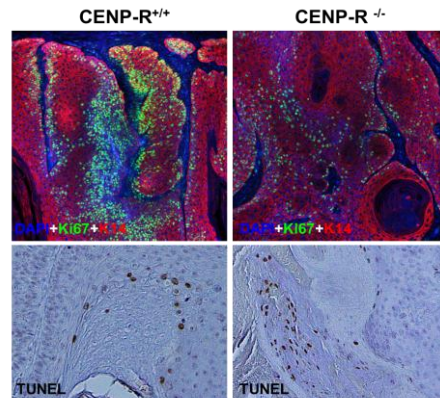


図5. CENP-R<sup>-/-</sup>の良性腫瘍(25週)の免疫組織化学的解析。

これらのことから、CENP-Rは良性腫瘍の発生初期においてはがん抑制的に機能し、後期良性腫瘍から悪性腫瘍においては、その機構ががん促進的に機能することが示唆された。このようなスペクトラムは、Tgfβなどの分子と類似した傾向であり、セントロメア蛋白質が、がんの発生機構に関連することを個体レベルで証明することができた。今後は他のセントロメア蛋白質の解析とともに、良性腫瘍および悪性腫瘍におけるCENP-Rの機能解析を行うことが重要である。

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1件)

Kazuhiro Okumura, Miho Sato, Megumi Saito, Ikuo Miura, Shigeharu Wakana, Jian-Hua Mao, Yuki Miyasaka, Ryo Kominami, Yuichi Wakabayashi  
Independent genetic control of early and late stages of chemically induced skin tumors in a cross of a Japanese wild derived inbred mouse strain, MSM/Ms.  
*Carcinogenesis*. 査読有, 33(11): 2260-2268  
doi: 10.1093/carcin/bgs250.

[学会発表] (計5件)

①Kazuhiro Okumura, Miho Sato, Megumi Saito, Mitsujiro Osawa, Astushi Iwama, Satoshi Hirose, Ryo Kominami, Ryo Goitsuka, Takuro Nakamura and Yuichi Wakabayashi  
Targeted disruption of Meis1 demonstrated a role for epidermal stem cells in skin carcinogenesis.  
第71回日本癌学会学術総会、要旨集、P246、2012、札幌、口頭発表

②奥村和弘  
皮膚正常/がん幹細胞におけるMeis1の機能解析、  
第26回モロシヌス研究会、プログラム・抄録集、P23、2012、東京、口頭発表

③奥村和弘、佐藤美穂、廣瀬哲史、後飯塚 僚、中村卓郎、若林雄一  
マウス表皮幹細胞におけるMeis1の役割、  
第59回日本実験動物学会年会、講演要旨集、P162  
大分、2012、口頭発表

④Kazuhiro Okumura, Miho Sato, Satoshi Hirose, Ryo Goitsuka, Takuro Nakamura and Yuichi Wakabayashi  
Functional Analysis of Meis1 in Mouse Epidermal Stem Cell.  
平成23年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、プログラム・抄録集、P75、  
滋賀、2012、ポスター発表

⑤奥村和弘、佐藤美穂、廣瀬哲史、後飯塚 僚、中村卓郎、若林雄一  
マウス皮膚正常幹細胞におけるMeis1の機能解析  
第34回日本分子生物学会年会、講演要旨集、横浜  
2011、ポスター発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
奥村 和弘 (OKUMURA KAZUHIRO)  
千葉県がんセンター研究所・発がん研究グループ・実験動物研究室・研究員  
研究者番号：80584680

(2) 研究分担者  
( )

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者  
若林 雄一 (YUICHI WAKABAYASHI)  
千葉県がんセンター研究所・発がん研究グループ・実験動物研究室・室長  
研究者番号：40303119