

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670187

研究課題名(和文)DNA付加体のヒト組織内分布と病理学的意義

研究課題名(英文)Distribution of DNA adducts in human tissues and its pathological significance

研究代表者

梶村 春彦(Sugimura, Haruhiko)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00196742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非喫煙者と喫煙者に起きた肺がん例についてその非腫瘍部の肺組織中にあるDNA付加体の種類は異なっていた。また同じく喫煙者に生じた腺がんと扁平上皮がん例においても、腺がんと扁平上皮がんでは、その非腫瘍部に存在する付加体の様相は異なっていた。また、ex-smoker(過去喫煙者)の胃がん例の非腫瘍部の胃粘膜/肺がん例の非腫瘍部の付加体の様相では、胃粘膜の場合は非喫煙者の場合に近く、肺組織の場合は喫煙者の状況に近かった。また、胃粘膜では、食品加熱などに関連した付加体が検出され、脂質酸化・酸化ストレスやアルコール関連の付加体もみられた。また、胃生検のようなちいさな検体でも、付加体の様相がほぼわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, mass/charge value and liquid chromatography retention time of known 174 DNA adducts were incorporated into LC-MS/MS machine (4000-QTRAP; Thermo). Using this adductome approach, three to 10 sites/case of gastric mucosa (31 cases) were investigated for DNA adducts measurements. Considerable numbers of known DNA adducts were present in human gastric mucosa in different quantities. Among them, tobacco-related adducts, lipid-peroxidation-induced DNA adducts, oxidative stress and alcohol related adducts, PhIP adduct was also noted. Tobacco-related adducts of current-smokers obviously increased as compared with that of non-smoker, but that of ex-smokers do not increase. It is assumed that tobacco-related adducts of ex-smoker diminish by epithelial cell turnover of the stomach. In the lung, adductome profile was different between smokers' and never smokers' lung; between lungs having adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of smokers.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：DNA 付加体 アダクトミクス ゲノミクス 発がん 環境発がん リスク 暴露評価 分子病理疫学

#### 1. 研究開始当初の背景

環境中の発がん物質が、ヒトを含む動物にがんをおこすというのは、本邦の病理学者の成し遂げた画期的な報告であるが、以後、大過剰量の発がん物質を用いた、動物や細胞における知見は、発がんの根本概念を大変進歩させ、また、がんにかかる遺伝子変化についても概ね整合性のあるものであった。しかし、実際のヒトのがんの原因がどのような過程でおこるのかについては、前述の動物実験を単純に外挿できないことは明らかであった。DNA に傷がつき (DNA 付加体) その、複製エラーにより突然変異が起こってがんが生じるというドグマは、多くの教科書に記述されているが、ヒト体内でこの各段階が明示されている事例は少ない。一方、ヒトがんの DNA 変化については、近年の次世代シーケンズなどにより広汎な知見が集積しつつあり、mutation signature という概念で、腫瘍の変異が、ある程度内因、外因によりカテゴリー分けできるという主張が存在する。

#### 2. 研究の目的

本研究は、このヒト腫瘍の mutation signature をおこしている原因はなにかという本質的な問いについて、ヒト体内の DNA 付加体を組織別、疾患別、あるいは生活習慣情報を加味したかたちで明らかにしようという挑戦である。最終的には、この網羅的 DNA 付加体 (adductome) 像と、ゲノム signature の関係性を明確にし、また、暴露指標や、予防指標として実用的な biomarker になりうるか という点まで念頭において研究の基礎を創ろうというものである。

#### 3. 研究の方法

ヒト剖検例、肺がん、胃がん、大腸がんなど、手術でとられた病理残余検体から、DNA 採取のために凍結保存をする。生前、あるいは術前の生活習慣とくに、喫煙歴、アルコール歴、感染歴 (胃の場合は helicobacter pylori など) を付帯情報として記録する。採取は、臓器ごとに部位べつに行う。たとえば、肺の上中下葉、腸管の場合は十二指腸、空腸、回腸、肝門部や膵管周囲組織、耳鼻科手術でとられた扁桃腺および周辺粘膜などである。また手術例の場合は、非腫瘍部を複数箇所、とくに腫瘍からの距離により 4-10 箇所くらい採取し、field cancerization を念頭において解析を行う。また胃の上部、中部、下部など、腫瘍存在部によっても重点採取部位を変える。DNA は micrococcal nuclease で処理後、LC-tandem mass spectrometry で m/z と retention time に応じた物質の分離を行った。174 種類の既知の m/z と retention time を持った DNA 付加体の情報を基盤にして、それぞれの付加体の同定を行った。

#### 4. 研究成果

never smoker と smoker に起きた肺がん例について非腫瘍部の肺組織中にある DNA 付加体の種類は異なっていた。また smoker に生じた腺がん と扁平上皮がん例においても、その

非腫瘍部に存在する付加体の様相は異なっていた。

また、ex-smoker (過去喫煙者) の胃がん例の非腫瘍部の胃粘膜/肺がん例の非腫瘍部の付加体の様相では、胃粘膜の場合は never smoker の場合に近く、肺組織の場合は smoker の状況に近かった。また、胃粘膜では、食品加熱などに関連して、動物実験では有名であった付加体が検出され、アルコール関連の付加体もよくみられた。また、胃生検のようなちいさな検体でも、付加体の様相がほぼわかった。アダクトーム解析が、暴露指標、ひいてはヒト腫瘍におこる変化との関連が見られることを示した。

#### 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 34 件)

1. Shinmura K, Kato H, Goto M, Yamada H, Tao H, Nakamura S, Sugimura H: Functional Evaluation of Nine Missense-Type Variants of the Human DNA Glycosylase Enzyme MUTYH in the Japanese Population. Hum Mutat, 37, 350-353, 2016.
2. Inoue Y, Matsuura S, Kurabe N, Kahyo T, Mori H, Kawase A, Karayama M, Inui N, Funai K, Shinmura K, Suda T, Sugimura H: Clinicopathological and survival analysis of Japanese patients with resected non-small-cell lung cancer harboring NKX2-1, SETDB1, MET, HER2, SOX2, FGFR1, or PIK3CA gene amplification. J Thorac Oncol, 10,1590-1600, 2015.
3. Nakamura S, Kahyo T, Tao H, shibata K, Kurabe N, Yamada H, Shinmura K, Ohnishi K, Sugimura H: Novel roles for LIX1L in promoting cancer cell proliferation through ROS1-mediated LIX1L phosphorylation. Sci Rep, 5, 13474, 2015.
4. Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Goto M, Tao H, Inoue Y, Nakamura S, Sugimura H: NEIL1 p.Gln282Stop variant is predominantly localized in the cytoplasm and exhibits reduced activity in suppressing mutations. Gene, 571, 1, 33-42, 2015.
5. Shinmura K, Igarashi H, Kato H, Koda K, Ogawa H, Takahashi S, Otsuki Y, Yoneda T, Kawanishi Y, Takayama T, Ozono S, Sugimura H: BSND and ATP6V1G3: novel immunohistochemical markers for chromophobe renal cell carcinoma, Medicine (Baltimore), 94, 24, e989, 2015.
6. Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Nagura K, kamo T, Okubo Y, Inoue Y, Kurabe N, Du C, Iwaizumi M, Kurachi K, Nakamura T, Sugimura H: SASS6 overexpression is associated with mitotic chromosomal abnormalities and a poor prognosis in

- patients with colorectal cancer, *Oncol Rep*, 34, 727-738, 2015.
7. Shinmura K, Kato H, Igarashi H, Inoue Y, Nakamura S, Du C, Kurachi K, Nakamura T, Ogawa H, Tanahashi M, Niwa H, Sugimura H: CD44-SLC1A2 fusion transcripts in primary colorectal cancer, *Pathol Oncol Res*, 21, 759-764, 2015.
  8. Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Igarashi H, Goto M, Tao H, Inoue Y, Nakamura S, Misawa K, Mineta H, Sugimura H: Abnormal Expressions of DNA Glycosylase Genes NEIL1, NEIL2, and NEIL3 Are Associated with Somatic Mutation Loads in Human Cancer. *Oxid Med Cell Longev*, 1546392, 2016.
  - 9 Iwaizumi M, Tao H, Yamaguchi K, Yamada H, Shinmura K, Kahyo T, Yamanaka Y, Kurachi K, Sugimoto K, Furukawa Y, Sugimura H: A novel APC mosaicism in a patient with familial adenomatous polyposis. *Hum Genome Var*.2, 15057, 2015.
  10. Fujita H, Takayama T, Takaoka N, Tan C, Igarashi H, Sugimura H, Ozono S: Validity of tissue microarray by immunohistochemistry, *Clin Lab*, 61, 569-574, 2015.
  11. Kumondai M, Hosono H, Orikasa K, Arai Y, Arai T, Sugimura H, Ozono S, Sugiyama T, Takayama T, Sasaki T, Hirasawa N, Hiratsuka M: Genetic polymorphisms of CYP2A6 in a case-control Study on bladder cancer in Japanese smokers. *Biol Pharm Bull*, 39, 1, 84-89, 2016.
  12. Kadar Z, Jung I, Orłowska J, Szentirmay Z, Sugimura H, Turdean S, Simona G: Geographic particularities in incidence and etiopathogenesis of sporadic gastric cancer, 66, 3, 254-259, 2015.
  13. Bara TJ, Gurzu S, Jung I, Kadar Z, Sugimura H, Bara T: Single skip metastasis in sentinel lymph node: in an early gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 21, 33, 9803-9807, 2015.
  14. Liu Y, Guo S, Wang L, Suzuki S, Sugimura H, Li Y: Uterine angiosarcoma: a case report and literature review. *Int J Gynecol Pathol*, 35, 3, 264-268, 7, 2015.
  15. Nishizawa D, Kasai S, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Ujiike H, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Yamada M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara-Aoyama K, Itokawa M, Ohi K, Hashimoto R, Tanisawa K, Arai T, Mori S, Sawabe M, Naka-Mieno M, Yamada Y, Yamada M, Sato N, Muramatsu M, Tanaka M, Irukayama-Tomobe Y, Saito YC, Sakurai T, Hayashida M, Sugimura H, Ikeda K: Associations between the orexin (hypocretin) receptor 2 gene polymorphism Val308Ile and nicotine dependence in genome-wide and subsequent association studies. *Mol Brain*, 8, 50, 2015.
  16. Hosono H, Kumondai M, Arai T, Sugimura H, Sasaki T, Hirakawa N, Hiratsuka M: CYP2A6 genetic polymorphism is associated with decreased susceptibility to squamous cell lung cancer in Japanese smokers. *Drug Metab Pharmacokinet*, 30, 4, 263-268, 2015.
  17. Gurzu S, Kadar Z, Sugimura H, Orłowska J, Bara T, Bara TJ, Szederjesi J, Jung I: Maspin-related orchestration of aggressiveness of gastric cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, Epub ahead of print, 2015.
  18. Kuroda S, Suzuki S, Kurita A, Muraki M, Aoyama Y, Tanioka F, Sugimura H: Cytological features of a variant NUT midline carcinoma of the lung harboring the NSD3-NUT fusion gene: a case report and literature review. *Case Rep Pathol*, 572951, 2015.
  19. Suzuki S, Kurabe N, Ohnishi I, Yasuda K, Aoyama Y, Naito M, Tanioka F, Sugimura H: NSD-NUT-expressing midline carcinoma of the lung: first characterization of primary cancer tissue, *Pathol Res Pract*, 211, 404-408, 2015.
  20. Tanno Y, Susumu H, Kawamura M, Sugimura H, Honda T, Watanabe Y: The inner centromere-shugoshin network prevents chromosomal instability. *Science*, 349, 6253, 1237-1240, 2015.
  21. Gurzu S, Jung I, Orłowska J, Sugimura H, Kadar Z, Turdean S, Bara TJ: Hereditary diffuse gastric cancer - an overview. *Pathol Res Pract*, 211, 9, 629-632, 2015.
  22. Hayakawa Y, Kawada M, Nishikawa H, Ochiya T, Saya H, Seimiya H, Yao R, Hayashi M, Kai C, Matsuda A, Naoe T, Ohtsu A, Okazaki T, Saji H, Sata M, Sugimura H, Sugiyama Y, Toi M, Irimura T: Report on the use of non-clinical studies in the regulatory evaluation of oncology drugs. *Cancer Sci*, 107, 2, 189-202, 2016 .
  23. Gurzu S, Sugimura H, Orłowska J, Szentirmay Z, Jung I: New insights in histogenetic pathways of gastric cancer. *Medicine (Baltimore)*, 94, 42, e1810, 2015.
  24. Shinmura K, Kahyo T, Kato H, Igarashi H, Matsuura S, Nakamura S, Kurachi K, Nakamura T, Ogawa H, Funai K, Tanahashi M, Niwa H, Sugimura H: RSP0 fusion transcripts in colorectal cancer in Japanese population. *Mol Biol Rep*, 41, 5375-5384, 2014.
  25. Shinmura K, Kurabe N, Goto M,

Yamada H, Natsume H, Konno H, Sugimura H: PLK4 overexpression and its effect on centrosome regulation and chromosome stability in human gastric cancer. *Mol Biol Rep*, 41, 6635-6644, 2014.

26. Shinmura K, Kato H, Goto M, Du C, Inoue Y, Nakamura S, Sugimura H: In silico evaluation of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in the TDG gene, which is involved in base excision repair. *Ann Clin Pathol*, 2, 1014, 2014.

27. Shinmura K, Igarashi H, Kato H, Kawanishi Y, Inoue Y, Nakamura S, Ogawa H, Yamashita T, Kawase A, Funai K, Sugimura H: CLCA2 as a novel immunohistochemical marker for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *Dis Markers* 2014, 619273, 2014.

28. Du C\*, Kurabe N\*, Matsushima Y, Suzuki M, Kahyo T, Ohnishi I, Tanioka F, Tajima S, Goto M, Yamada H, Tao H, Shinmura K, Konno H, Sugimura H: Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2014

29. Harada M, Kotake Y, Ohhata T, Kitagawa K, Niida H, Matsuura S, Funai K, Sugimura H, Suda T, Kitagawa M: YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers. *Genes Cells*. 19(6):504-16, 2014.

30. Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Ogai Y, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Sugimura H, Hayashida M, Ikeda K: Association between KCNJ6 (GIRK2) gene polymorphism rs2835859 and post-operative analgesia, pain sensitivity, and nicotine dependence. *J Pharmacol Sci.*, 126(3), 253-63, 2014.

31. Goto M, Shinmura K, Matsushima Y, Ishino K, Yamada H, Totsuka Y, Matsuda T, Nakagama H, Sugimura H: Human DNA glycosylase enzyme TDG repairs thymine mispaired with exocyclic etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med*, 76, 136-46, 2014.

32. Tajima S, Kurabe N, Okudela K, Yajima K, Takahashi T, Neyatani H, Sugimura H, Koda K. Extensive goblet cell metaplasia of the peripheral lung may harbor precancerous molecular changes: comparison of two cases. *Pathol Int*, 64, 533-538, 2014.

33. Suzuki S, Kurabe N, Ohnishi I, Yasuda K, Aoshima Y, Naito M, Tanioka F, Sugimura H. NSD3-NUT-expressing midline carcinoma of the lung: First characterization of primary cancer tissue.

*Pathol Res Pract*, 211, 404-408. 2015.

34. Gurzu S, Kadar Z, Sugimura H, Bara T, Bara T Jr, Halmaciu I, Jung I: Gastric cancer in young vs old Romanian patients: immunoprofile with emphasis on maspin and mena protein reactivity, *APMIS*, 123(3), 223-233, 2015.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 106<sup>th</sup> AACR Annual meeting: DNA adductome analyses at multiple sites of human gastric mucosa, resected for gastric cancer. Nobuya Kurabe, Ippei Ohnishi, Masako Suzuki, Yusuke Inoue, Tomoaki Kahyo, Moriya Iwaizumi, Yoshitaka Matsuhima, Yukari, Totsuka, Hitoshi Nakagama, Masako Kasami, Hideto Ochiai, Keigo Matsumoto, Shioto Suzuki, Shohachi Suzuki, Tanioka Fuminiko, Sugimura Haruhiko. 2015.4.20, Pennsylvania Convention Center Philadelphia, PA, USA
2. AACR-JAC Joint Conference: Screening of smoking-related DNA adducts in human lung and gastric tissues using adductome analysis. Nobuya Kurabe, Ippei Ohnishi, Masako Suzuki, Takashi Yamashita, Yusuke Inoue, Tomoaki Kahyo, Yukari Totsuka, Hitoshi Nakagama, Masako Kasami, Shioto Suzuki, Kazuhito Funai, Fumihiko Tanioka, Makoto Nagashima, Sugimura Haruhiko. 2016.2.20, Hyatt Renency Maui, Maui, Hawaii, USA
3. 倉部誠也、榎村春彦 Detection of smoking-related DNA adduct in human tissues, 日本肺癌学会、2015年11月127日、パシフィコ横浜
4. Sugimura H: DNA adductomics in human tissue: a clue toward the origin of human cancer? 4th Asian Conference on Environmental Mutagens(India), Dec.12, 2014, Kolkata, India.

〔図書〕(計 2 件)

1. Sato N, Sato T, Sugimura H: Genetic Aspects of Smoking Behavior in the Japanese Population in Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse, Volume 2. (Chapter96)
2. Tomonori Matsuda, Pei-Hsin Chou, Haruhiko Sugimura: Level of Inflammation-related DNA adducts in human tissues. In *Cancer and Inflammation Mechanisms, chemical, biological, and clinical aspects* 75-81 (chapter 6) edited by Yusuke Hiraku, Shosuke Kawanishi, Hiroshi Oshima John Wiley and Sons, 2014:

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：染色バスケット  
発明者：梶村春彦、加茂隆春、門畑一久  
権利者：浜松医科大学  
種類：G01N 1/00  
番号：特願 2014-157406  
出願年月日：2014 年 8 月 1 日  
国内外の別： 国内

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：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梶村 春彦 (SUGIMURA, haruhiko)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00196742