

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870150

研究課題名(和文) 胚細胞腫瘍及び肺がんと減数分裂特異的コヒーシンの関連についての研究

研究課題名(英文) Role of meiotic specific cohesin in germ cell tumor and lung cancer.

## 研究代表者

後藤 悌 (Goto, Yasushi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：20596374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)： 減数分裂特異的コヒーシンのSMC1 についての解析を進めた。SMC1 のがん細胞における役割は分かっていないが、cell lineでは発現しているものがある。ヒト検体を用いて解析を試みたが、現時点では特異性の高い抗体が存在しない。SMC1 の発現によっても染色体分離には影響を与えないという報告もあり、発現の有無、その役割、抗がん剤への応答などとの関わりについてはさらなる解析が必要である。

DNA修復に関わる遺伝子は多岐にわたる。特定のタンパクに注目しても生体の反応を予測できない。mRNAやliquid biopsyなど、各タンパクの抗体に依存しない網羅的な解析が必要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)： We analysed for the meiosis specific, cancer testis antigen SMC1beta in cancer tissues. Role of SMC1beta in cancer cells is unknown, and there is a report that it has no effect on chromosome segregation after the DNA damage. We tried to assess the expression level of SMC1beta by immune-staining. However, through fully experiment, we could not find the condition to progress for the analysis for the SMC1beta in human specimen.

Since many proteins are related to DNA repair, analysis of specific protein is not enough to predict the human response. We are looking to analyse the related protein more comprehensively,

研究分野：抗がん剤治療

キーワード：タンパク 抗体 減数分裂特異的コヒーシン DNA修復 DNA障害

### 1. 研究開始当初の背景

DNA の複製を阻害する白金製剤は、肺がん、胚細胞腫瘍など多くの悪性腫瘍の治療に使われている。DNA 修復に関わるタンパクが効果予測因子となることが予想される。

コヒーシンは、S 期に複製した染色分体(姉妹染色分体)をただちに解離することなく、互いに結合した状態にて保持する働きをもつ。さらに DNA 損傷の修復や転写制御にも関わる。コヒーシンは4つのサブユニットから構成される複合体であるが、体細胞型と減数分裂型の複合体の間にはサブユニット構成に違いがみられる。減数分裂特異的コヒーシンの SMC1 $\beta$ 、REC8、RAD21L、SA3 においては、体細胞では発現せず、精巣にのみ発現する。コヒーシンとその制御因子により生じる遺伝性疾患はコヒーシン病と称されている。多岐にわたる発生異常が特徴であるが、コヒーシンの染色体分配以外の転写制御の異常が原因と考えられている。

コヒーシンは DNA の二重鎖切断などの修復においても重要な役割を果たしている。がん細胞のゲノム不安定性にも寄与していると考えられており、発生早期からの変異や欠失が報告されている。また、DNA の複製を阻害する白金製剤や DNA 修復阻害にかかわる PARP 阻害薬のバイオマーカー(効果予測因子)として注目されている。

がん細胞には発現しているが、体細胞には発現せず、免疫系からは隔絶された精巣にのみ発現している抗原をがん精巣抗原と呼ぶ。免疫原性の高い抗原であること、精祖細胞は HLA class I を発現していないため、免疫反応の攻撃対象とならないことから、がん免疫療法の有望なターゲットと考えられており開発が進められている。

### 2. 研究の目的

減数分裂特異的コヒーシンの胚細胞腫瘍及び肺がんにおける発現、病理や臨床的特徴との相関、DNA 阻害剤を用いた化学療法の効果との相関を解析する。

### 3. 研究の方法

手術及び診断目的で生検された胚細胞腫瘍および肺がんの検体を用いて、減数分裂特異的コヒーシンの発現について免疫染色を用いて評価する。DNA を抽出して、体細胞型コヒーシンの遺伝子変異を評価する。これらの特徴を病理ならびに患者背景と照らし合わせ、治療効果の予測因子となるかも解析する。

### 4. 研究成果

減数分裂特異的コヒーシンのうち、基礎的な検討を自ら進めてきた SMC1 $\beta$  にて解析を始めた。抗 SMC1 $\beta$  抗体を用いて、FFPE 検体を使用して免疫染色をすべく、陽性コントロール(ヒト大腸がん由来 HCT116)と陰性コントロール(ヒト網膜細胞由来 RPE)にて検討

した。

図 1 :

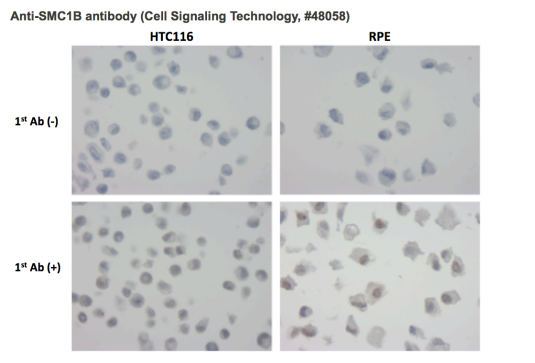
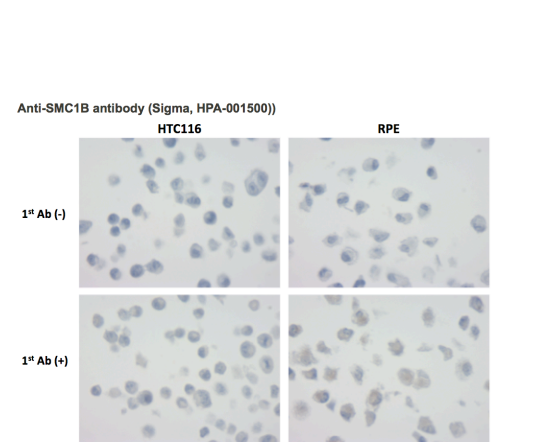


図 2 :



抗体は Human protein atlas を参考に Sigma HPA001500 と Cell Signal Technology #48058 を使用した (図 1・図 2)。評価系について各種検討をしても目視で区別できる条件を得られたなかった。外部委託(アリスエル®)にて条件検討を続けたものの、ヒト検体を使った検討するレベルに至らなかった。

あらためて RT-PCR (図 3) ならびにウェスタンブロット (図 4) にて評価した。ウェスタンブロットについては Genetex GTX111941 も使用した。

図 3 :

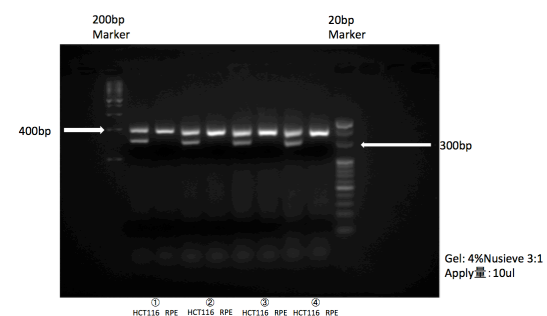
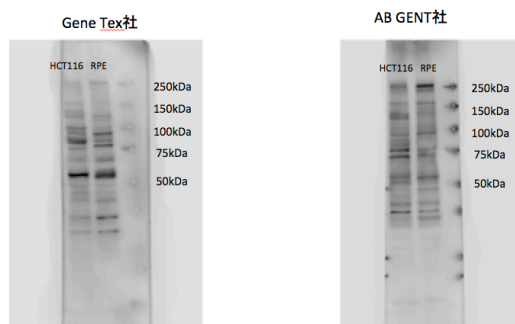


図 4 :



ウェスタンブロットからは抗体の特異性が低いことが確認され、各種条件にても調整することが出来なかった。市販抗体を利用してヒト検体を解析することは断念した

研究期間に、SMC1 $\beta$ についての他グループからの報告もあった(1)。SMC1 $\beta$ が減数分裂特異的ではないこと(マウスでは脳・心臓・脾臓、ヒトでは primary fibroblast)、発現によっても DNA 障害後の染色体分離への影響はない一方で、タンパク発現パターンに関わるというものであった。これらはいままでの自分の研究結果と大きく異なるものであり、強制発現や SiRNA による発現抑制を利用して SMC1 $\beta$  の機能についての再解析を行っている。

SMC1 $\beta$ をはじめとしたコヒーシンがタンパク発現に関わることを示唆する文献が相次いでいる(2, 3)。SMC1 $\beta$ の機能解析に主眼を置き、臨床検体での応用を試みていたが、その他の DNA 修復タンパク質にも注目する必要がある。網羅的解析にて各タンパクの総合的な効果を検討する必要があると考えており、mRNA などによって multiplex に評価することが妥当と考えている。nCounter®の使用について調査を進めている(4)。

Micke らはがん精巣抗原について肺がんでの発現を網羅的に検討した (personal communication)。国立がん研究センター中央病院・呼吸器内科の検体を利用して同じ解析方法にて、当初からの臨床的、病理学的特徴との相関、殺細胞薬を中心とした薬剤の効果との関連についての解析を共同研究で進める準備をしている。

#### <引用文献>

1. Mannini L, Cucco F, Quarantotti V, Amato C, Tinti M, Tana L, et al. SMC1B is present in mammalian somatic cells and interacts with mitotic cohesin proteins. *Sci Rep.* 2015;5:18472.
2. Uhlmann F. SMC complexes: from DNA to chromosomes. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2016.
3. Mazumdar C, Shen Y, Xavy S, Zhao F, Reinisch A, Li R, et al. Leukemia-Associated Cohesin Mutants Dominantly Enforce Stem Cell Programs and Impair Human Hematopoietic Progenitor Differentiation. *Cell Stem Cell.* 2015;17(6):675-88.
4. Sunami K, Furuta K, Tsuta K, Sasada S, Izumo T, Nakaoku T, et al. Multiplex Diagnosis of Oncogenic Fusion and MET Exon Skipping by Molecular Counting Using Formalin-Fixed Paraffin Embedded Lung Adenocarcinoma Tissues. *J Thorac Oncol.* 2016;11(2):203-12.

5. 主な発表論文等  
なし

〔雑誌論文〕(計1件)  
後藤 悧、DNA 損傷応答、遺伝子医学 MOOK29 号・がんバイオマーカー研究の最新動向、査読無、メディカルドゥ、2015

〔学会発表〕(計1件)  
後藤 悧、細胞増殖のためのシグナル伝達を阻害する、第74回日本医学放射線学会総会、2015年4月18日、パシフィコ横浜

〔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

後藤 悌 (GOTO, Yasushi)

国立がん研究センター中央病院・呼吸器内  
科・医員

研究者番号：20596374