

23-C-10 発癌誘因ストレスに起因し、連動して誘発する
「ゲノム不安定性・変異・細胞形質転換」の分子機構研究

独立行政法人国立がん研究センター 研究所 ゲノム安定性研究分野 吉岡研一

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

癌はゲノム上に生じた異常（ゲノム不安定性や変異）に起因する疾患であるが、どのようにゲノムに不安定性や変異が生じ、発癌に至るのか、その分子機構には未だに不明な点が多い。本研究では、発癌の誘因となるストレス（過剰増殖刺激や癌遺伝子機能の亢進等）によって生じる一連の変化（ゲノム不安定性・変異・細胞形質転換）の分子機構解明を目指す。特に、殆どの癌が加齢に伴って発症リスクが上昇することから、細胞の老化に伴うゲノム状態の変化とその過程で誘発するゲノム不安定性と変異の誘導過程を解析する。癌では、多様なゲノム再編や変異が認められるが、特異的な転座に起因して若年で発症する小児白血病や肉腫とは異なり、大腸癌や乳癌等の比較的高齢で罹患する癌の多くは、ゲノム不安定性（染色体不安定性あるいはマイクロサテライト不安定性）とArf/p53経路等の変異を伴って発症する。重要なことに、これらの癌細胞で認められる特徴は、*in vitro*で正常細胞が老化過程を経て形質転換（不死化）した場合でも認められる。そこで本研究では、主に*in vitro*モデル系を用いて解析し、発癌誘因ストレスで誘発するゲノム異常の導入機構を解析する。

当該研究分野では、これまでに、癌細胞に生じているゲノム再編や不安定性の特徴が示されてきたが、これは癌細胞に結果的に蓄積した特徴であり、これらが、実際に「どのようにゲノム上に生じたのか」という、ゲノム上に生じる不安定性、再編、変異の導入過程の分子機構には不明な点が多い。そこで本研究では、最近我々が世界に先駆けて発表した染色体不安定性誘導の分子機構を基盤とし、ゲノム不安定性（特に、マイクロサテライト不安定性）の導入機構、ゲノム不安定性と変異導入の関係、ゲノム不安定性導入に伴う細胞形質転換機構を明確にすることを旨とする。

これまでに、“p53 による H2AX の負の制御”によって細胞が静止状態に陥り、この静止状態によって細胞が不死化から防御されていること、この静止した細胞の恒常性はゲノム安定性によって維持され、ゲノム不安定性導入によって Arf/p53 経路が変異して静止状態が破綻して不死化することを見出した。また、現在、ミスマッチ修復欠損の細胞において不死化過程を解析し、マイクロサテライト不安定性が誘導される分子機構と変異誘導の関係を解析している。今後さらに、マイクロサテライト不安定性の分子機構、変異導入機構、細胞形質転換機構の解析を実施する。

研究経費

2,500 千円

研究班の組織

吉岡研一	国立がん研究センター研究所ゲノム安定性 研究分野・主任研究員	研究の実施、統括
益谷美都子	国立がん研究センター研究所ゲノム安定性 研究分野・分野長	研究に関する助言等
中津可道	九州大学大学院医学研究院・准教授	MSH2欠損MEFの調製 研究に関する助言等

研究の目的と到達目標及び実績要点

癌はゲノム上に生じた異常（変異やゲノム再編等）に起因して発症する。これまでに、癌細胞におけるゲノム再編、ゲノム不安定性、変異等が広く報告されてきたが、発癌過程で「どのようにゲノム上に異常が生じるのか」は未だに不明である。最近の我々自身の成果を含む知見から、細胞形質転換の過程における主なゲノム再編（染色体不安定性）は、細胞の4倍体化に伴って生じていると考えられ、また、この4倍体化誘導に伴ってArf/p53経路が変異し、細胞が不死化すると考えられる。しかしながら、マイクロサテライト不安定性の誘導機構、ゲノム不安定性（マイクロサテライト不安定性あるいは染色体不安定性）に伴う変異誘導の機構、さらに、ゲノム不安定性や変異と細胞形質転換との関係は不明である。本研究では、これら「ゲノム不安定性・変異・細胞形質転換」の、それぞれの分子機構、それらの連動関係を明確にすることを旨とする。

全期間

（目的と到達目標）：

本研究では、我々自身の成果を主な研究基盤とし、『ゲノム不安定性・変異・細胞形質転換が、どのように制御され、連動して誘導されるのか』その過程の分子機構を*in vitro*モデルで解析する。本研究は3年間で実施し、特に、以下の3点を明確にすることを目的とする。

- 1、マイクロサテライト不安定性誘導機構と染色体不安定性との関係
- 2、染色体不安定性導入に伴う変異誘導機構
- 3、ゲノム不安定性導入に伴う細胞の形質転換機構

第1年次

（到達目標）

- 1 細胞の不死化過程におけるマイクロサテライト不安定性誘導タイミングとその誘因ストレスの解析
- 2 染色体不安定性導入に伴う「変異」誘導のタイミングとその相互関係の解析

（年次評価時点の実績要点）

- 1 これまでに、ミスマッチ修復因子 MSH2 を欠損したマウス胎仔線維芽細胞 (MSH2^{-/-}-MEF) を調製し (九州大学中津)、ミスマッチ修復欠損 MEF における細胞の不死化過程でのゲノム不安定性を解析した。まず予想された通り、染色体不安定性 (4倍体化等) は全く認められず、その代わりにマイクロサテライト不安定性の導入が認められた。重要なことに、その導入のタイミングは、野生型 MEF で認められた染色体不安定性 (4倍体化) の導入タイミングと一致していた。つまり、ミスマッチ修復欠損細胞では、DNA複製ストレスによって、細胞の4倍体化誘導の代わりにマイクロサテライト不安定性が誘導されていることが見出された。
- 2 野生型 MEF の不死化過程では細胞の4倍体化が誘導されるが、これに伴って Arf/p53 経路が変異していることが見出された。実際、ゲノム不安定性が保持されている状態では Arf/p53 経路が機能的で有り続けているのに対し、Arf/p53 経路が変異している不死化細胞は全て4倍体である。

研究成果と考察

第1年次評価時点

これまでに、ミスマッチ修復因子 MSH2 を欠損したマウス胎仔線維芽細胞 (MSH2^{-/-}-MEF) を調製し (九州大学中津)、ミスマッチ修復欠損 MEF における細胞の不死化過程でのゲノム不安定性を解析した。予想された通り、ミスマッチ修復欠損 MEF の不死化過程では、染色体不安定性 (4倍体化等) は全く認められず、その代わりにマイクロサテライト不安定性の導入が認められた。重要なことに、その導入のタイミングは、野生型 MEF で認められた染色体不安定性 (4倍体化) の導入タイミングと一致していた。このことは、ミスマッチ修復欠損細胞では、DNA複製ストレスによって、細胞の4倍体化の代わりにマイクロサテライト不安定性が誘導されていることを示している。これは、ミスマッチ修復因子の欠損の影響が、DNA複製中のエラーに対する修復能の欠陥に伴う影響ではなく、DNA複製ストレスに対する影響、即ち、DNA相同組換え修復における機能欠陥の影響に原因して、マイクロサテライト不安定性が誘導されていることを示唆している。

また、野生型 MEF の不死化過程では細胞の4倍体化が誘導されているが、これに伴って Arf/p53 経路が変異した不死化細胞が出現することが見出された。実際、ゲノム不安定性が保持されている状態では Arf/p53 経路が機能的で有り続けているのに対し、Arf/p53 経路が変異している不死化細胞は全て4倍体である。さらに、p53^{-/-}の MEF では2倍体状態

のまま不死化していたことを併せて考えると、野生型のMEFではArf/p53経路の変異が細胞の4倍体化過程において誘導されていることを強く示唆している。

倫理面への配慮

本研究では、遺伝子改変動物由来の細胞実験が含まれる。動物実験については、各研究機関の「動物実験に関する指針」を遵守する。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

H23年度

○Atsumi, Y., Fujimori, H., Fukuda, H., Inase, A., Shinohe, K., Yoshioka, Y., Shikanai, M., Ichijima, Y., Unno, J., Mizutani, S., Tsuchiya, N., Hippo, Y., Nakagama, H., Masutani, M., Teraoka, H., & Yoshioka K., Onset of Quiescence Following p53 Mediated Regulation of H2AX in Normal Cells. *PLoS One*, 6 (2011) e23432.

(学会発表)

H23年度

○吉岡研一、熱海 悠子、益谷美都子、四戸啓太郎、寺岡弘文 Genomic stability is maintained during transient H2AX expression in normal senescent cells. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜)
○熱海 悠子、藤森浩彰、益谷美都子、寺岡弘文、吉岡研一 Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜)