

## 突然変異抑制と発癌に関する研究：アルキル化DNA 損傷の修復と発癌抑制

續, 輝久  
九州大学生体防御医学研究所生化学部門

河手, 久弥  
九州大学生体防御医学研究所生化学部門

岩熊, 智雄  
九州大学医学部整形外科

<https://hdl.handle.net/2324/7234599>

---

出版情報：福岡醫學雜誌. 89 (1), pp.1-10, 1998-01-25. Fukuoka Medical Association  
バージョン：  
権利関係：



---

---

## 解 説

---

---

### 突然変異抑制と発癌に関する研究： アルキル化 DNA 損傷の修復と発癌抑制

九州大学生体防御医学研究所生化学部門<sup>1)</sup>  
九州大学医学部第三内科<sup>2)</sup>・九州大学医学部整形外科<sup>3)</sup>  
續 輝久<sup>1)</sup>・河手久弥<sup>1,2)</sup>  
岩熊智雄<sup>3)</sup>

#### はじめに

遺伝情報を担う DNA は、電離放射線や環境変異原物質などの外的要因、ならびに細胞内代謝の過程で発生する活性酸素やアルキル基供与体などの様々な内的要因により絶えず損傷を受けている。それに対して生体は生じた DNA 損傷をモニタリングして、DNA 修復系で対処する一方、DNA の損傷度がひどい時は修復不能と判断してその細胞を積極的にアポトーシスにより排除していると考えられている。このような精緻な防御機構があるにもかかわらず、まれにこれら防御系を免れた DNA 損傷が突然変異として残存し、そのような突然変異が癌遺伝子や癌抑制遺伝子に生じると結果として癌の発生につながるということが知られている。

DNA 中に生じた損傷は DNA 修復系によって通常速やかに修復される。しかし何らかの異常により傷が修復されないと、結果として突然変異や癌を誘発する(図 1)。突然変異が生殖系の細胞で生じると遺伝性疾患の原因になり、また体細胞で生じると発癌の誘因となる。

#### アルキル化 DNA 損傷と修復酵素

N-ニトロソ化合物などのアルキル化剤は、細胞の DNA に様々な傷をつけ、その傷のあるものは細胞を癌化させる突然変異を誘起することが知られている。DNA 中のアルキル化損傷の中で、O<sup>6</sup>-メチルグアニンは本来の対合相手であるシトシン塩基のほかチミン塩基とも対合することから、O<sup>6</sup>-メチルグアニンが修復されずに複製過程に入ると、結果として G・C→A・T (トランジション) 変異を引き起こすことになる。このような突然変異原性のある DNA 付加体の O<sup>6</sup>-メチルグアニンは、DNA 修復酵素である O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) によって修復される<sup>3,4,6,10)</sup>。この酵素は、グアニンの O<sup>6</sup> 位のメチル基を自己分子内の活性部位にあるシステイン残基に転移することにより、一段階の反応で DNA 上の損傷を修復するが、この過程でメチル基を受け取った MGMT 分子は不可逆的に不活化される。したがって、この機構で O<sup>6</sup>-メチルグアニンを修復する能力は、細胞内の修復酵素の分子数に比例することになる(図 2)。これまでの研究から、癌由来の細胞株の約 2 割はこの酵素活性を持たないことが知られている。

---

Teruhisa TSUZUKI<sup>1)</sup>, Hisaya KAWATE<sup>1,2)</sup>, Tomoo IWAKUMA<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Biochemistry, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

<sup>2)</sup>Internal Medicine III, Faculty of Medicine, Kyushu University

<sup>3)</sup>Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine, Kyushu University

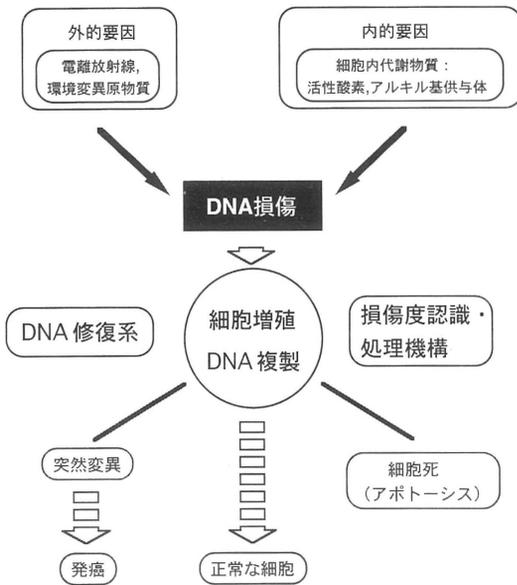


図 1 DNA 傷害と生体防御

O<sup>6</sup>-メチルグアニン → G:C to A:T トランジション

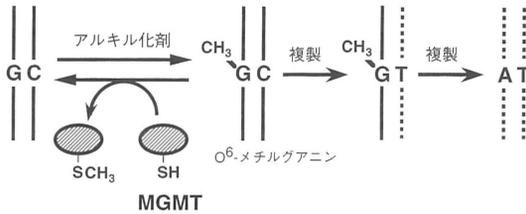


図 2 アルキル化塩基による突然変異の生起およびO<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) による変異の抑制

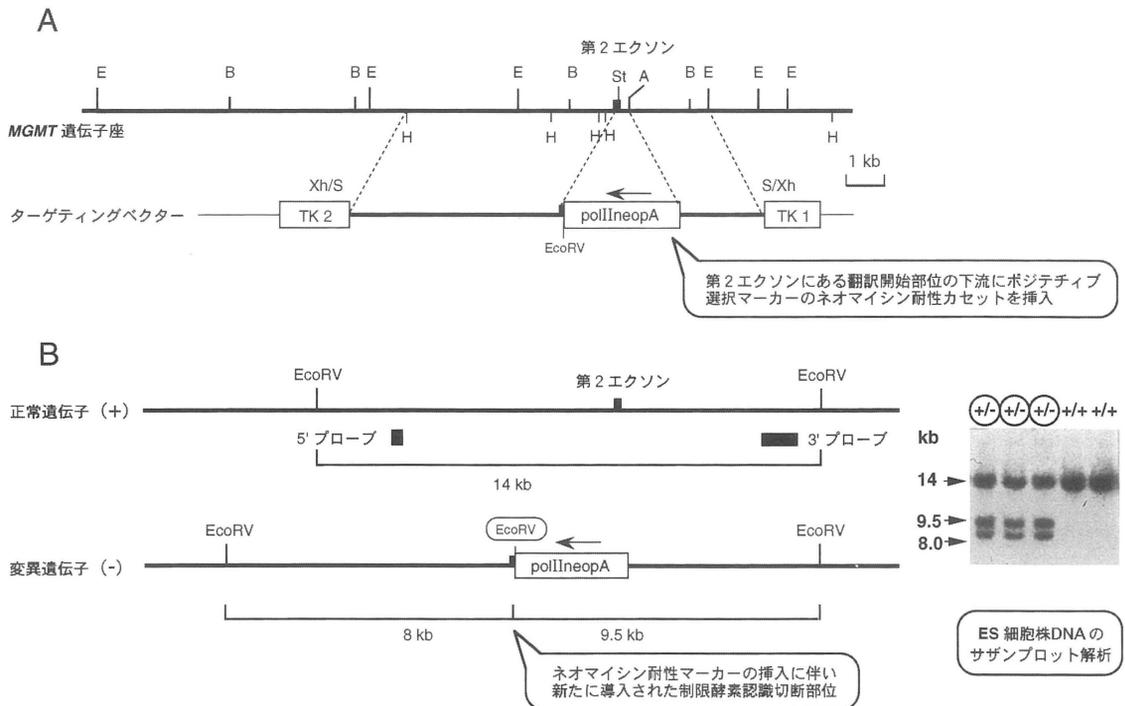


図 3 MGMT 遺伝子のターゲティング (A) ベクターの構造と (B) サザンプロット解析によるターゲティングの確認

## DNA 修復酵素の遺伝子ターゲティング

DNA 修復機構が発癌抑制に大きく関与していることは、紫外線に高感受性の色素性乾皮症 (XP) や遺伝性非腺腫性大腸癌 (HNPCC) などの遺伝性疾患において、DNA 修復機構の欠損が、発癌のリスクを上昇させていることが明らかになり、近年広く受け入れられるようになってきた。細胞ならびに個体レベルでの DNA 修復酵素の役割について、突然変異・発癌抑制の観点から解析することを目的に、標的遺伝子組換え (Gene Targeting) の手法<sup>8)</sup>により、遺伝子をノック・アウトして (欠損させて) 酵素活性の無い細胞ならびに個体を樹立し解析を行った。

遺伝子ライブラリーから DNA 染色体を単離して解析した結果、マウスの *MGMT* 遺伝子はその全長約 150 キロ塩基対と大きな遺伝子で、5つのエクソンから成っていること、また O<sup>6</sup>-メチルグアニンからメチル基を受け取るシステインを含む領域は、第5番目のエクソンに存在することが明らかとなった<sup>2)</sup>。

図3Aに *MGMT* 遺伝子の第2エクソン領域の染色体構造ならびにターゲティング・ベクターの構造を示した<sup>9)</sup>。コーディング領域内の制限酵素部位を使って、この部分にポジティブ・セレクション・マーカーの *pol II neo* カセットを転写と逆方向に挿入し、またベクターの両端にはネガティブ・セレクション用に HSV-TK カセットを配した。このベクターを線状化後、エレクトロ・ポレーション (電気穿孔) 法によりマウスの胚性幹 (ES) 細胞に導入し、ポジティブ (G418)・ネガティブ (GANC) 選別で生えてきたコロニーにつき、DNA を調製してサザン・プロット法で解析した。

図3Bにターゲティングのスクリーニングの結果を示した。ベクター DNA に含まれていない部分の DNA 断片をそれぞれ 5' および 3' フランキング (隣接)・プローブとして、制限酵素 *EcoRV* で消化した DNA を用いたサザン・プロットングにより解析した。図には両方のフランキング・プローブを混ぜて使用した結果を示している。両方のプローブとも本来の大きさである 14 kb のバンドとハイブリダイズするが、うまくターゲットできたものでは、本来の 14 kb のバンドに加えて、5' プローブとハイブリダイズする 8 kb および 3' プローブとハイブリダイズする 9.5 kb の2本のバンドが認められる。この時のターゲティングの頻度は約 20% と比較的効率が良かった。

この段階では細胞の片方の対立遺伝子は正常であるので、次にうまくターゲットできた細胞から、G418 の薬剤濃度を上げる (高濃度薬剤選択) で、*MGMT* 遺伝子の対立遺伝子の両方にホモゲネチゼーションにより変異を導入することを試みた (ダブル・ノックアウト細胞株の樹立)<sup>7)</sup> (図4)。図4Bに結果の一部を示しているが、左端は野生型 (+/+ ) の ES 細胞で、本来の *MGMT* 遺伝子に相当する 14 kb のバンドのみが検出されており、両方の遺伝子とも正常であることを示している。またその隣は、高濃度耐性細胞を単離するのに用いた細胞株で、本来の *MGMT* 遺伝子に相当する 14 kb のバンドに加え、3' プローブで 9.5 kb のバンドが検出できる片方の *MGMT* 遺伝子に欠損があるシングル・ノックアウト細胞 (+/-) である。今回単離した高濃度耐性細胞はすべてダブル・ノックアウト細胞 (-/-) であることが確認できた。そしてこれらダブル・ノックアウト細胞は ACNU などのアルキル化剤に対してきわめて高い感受性を示した。

図5は低濃度のアルキル化剤ニトロソグアニジン (MNNG) による誘発突然変異頻度を調べた結果を示している。本実験で用いた ES 細胞は雄由来であるため X 染色体を 1 本しかもっていないことから、X 染色体上の *hprt* 遺伝子座をターゲットとして、6-TG (6-チオグアニン) 耐性コロニーの出現頻度を指標に解析した。野生型細胞株に比べてダブル・ノックアウト細胞株では、アルキル化剤 MNNG (0.2 μM) 処理により 30 倍以上の突然変異頻度の上昇が観察された<sup>7)</sup>。

## *MGMT* 遺伝子欠損マウス系統の樹立と解析

うまくターゲットできた細胞の幾つかを選んで、近交系 C57BL/6 由来のマウスの胚盤胞にインジェクションし、キメラ・マウスを作製した<sup>9)</sup>。今回の実験では 3 系統のキメラマウスにおいて導入した変異のジャーム・ラインへのトランスマッションが確認でき、得られたヘテロ接合体同士の掛け合わせで生まれた 96 匹の F2 マウス (第2世代)

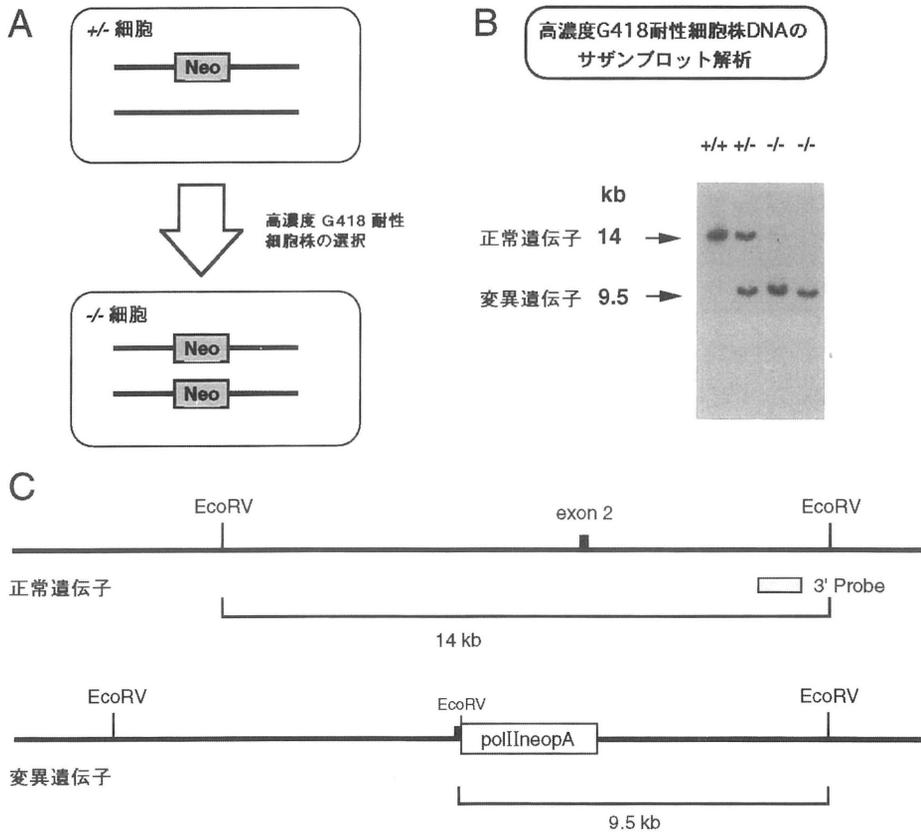


図 4 *MGMT* 遺伝子ダブルノックアウト細胞株の樹立

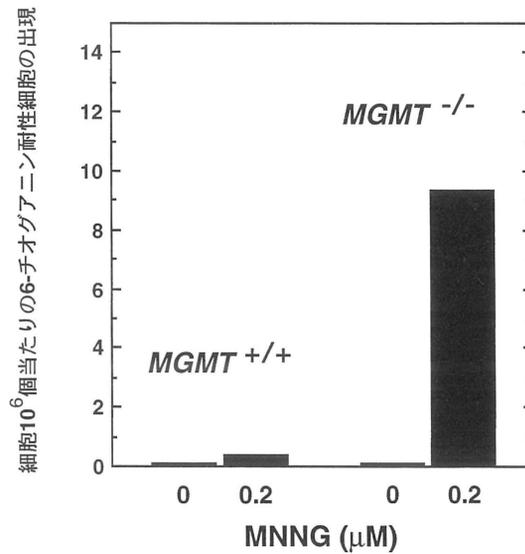


図 5 アルキル化剤誘導突然変異頻度の比較

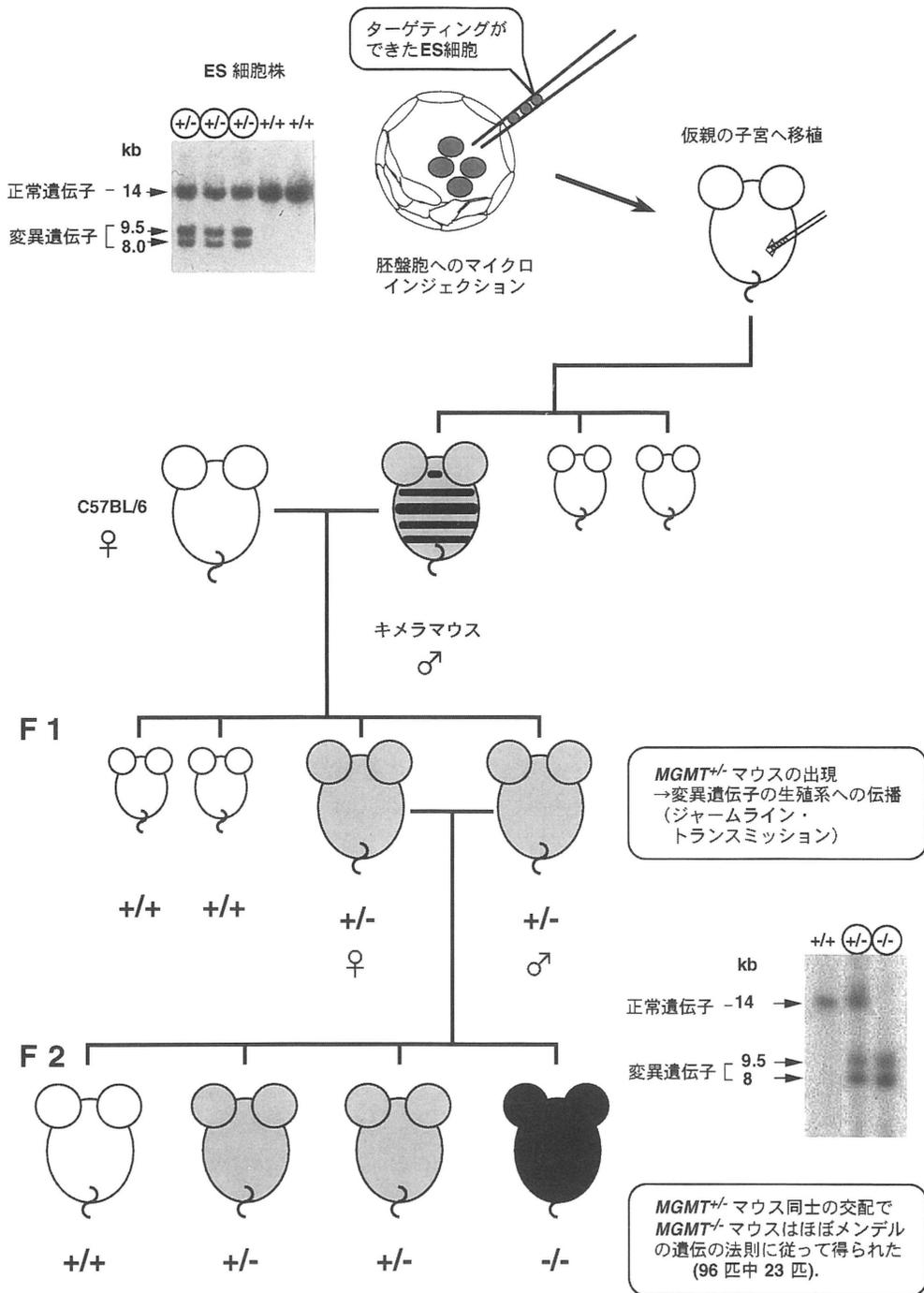


図 6 MGMT 遺伝子欠損マウスの樹立

のうち、ホモ接合体のマウスは 23 匹でこれはメンデルの遺伝形式に従っていた (図 6)。

アルキル化剤 MNU によって誘発される胸腺リンパ腫は、化学発癌のモデル系としてこれまでも広く解析がなされてきている。そこで樹立した MGMT 遺伝子欠損マウスにおける MNU に対する感受性を調べた。+/+,

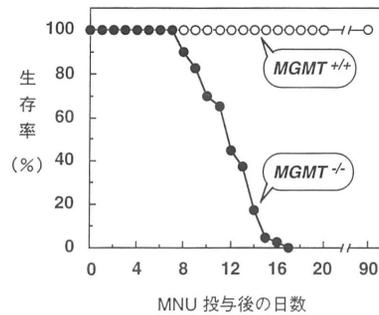


図7 MGMT 遺伝子欠損マウスのアルキル化剤 MNU に対する感受性

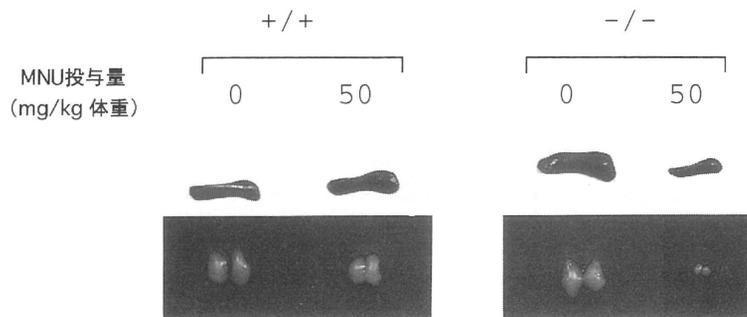


図8 MNU 投与後の脾臓と胸腺の変化

—/—それぞれ各グループ約 40 匹の 6 週齢のマウスに対して kg 体重当たり 50mg の MNU を腹腔内投与した。その結果図 7 に示すように、—/—個体は 7 日目から死に始め、17 日以内にすべてのマウスが死亡したが、コントロールとして PBS を投与したマウスや MNU を投与した +/+ マウスは観察した少なくとも 3 か月間は死亡することはない<sup>9)</sup>。このように MGMT 遺伝子欠損マウスがアルキル化剤 MNU に対して高感受性であることは、マウス個体がアルキル化剤によって引き起こされる DNA 傷害の除去に関して、如何にメチルトランスフェラーゼに依存しているかを示している。

図 8 は MNU 投与後 9 日目の脾臓・胸腺における変化で、—/—個体において、+/+ と比較してこれら 2 臓器の顕著な萎縮が認められる。100mg/kg とより高いドースの MNU を投与した +/+ マウスでもそれほどの萎縮は観察されなかった<sup>9)</sup>。

図 9 は MNU 投与後 5 日目の骨髄像で、MNU 投与後の —/— マウスにおいて、骨髄造血細胞の著名な減少が認められる。系統的な病理学的検証の結果、MNU 投与により —/— マウスの骨髄における haematopoietic cells の重度のサプレッションを認めた<sup>9)</sup>。このように、MNU を投与された —/— マウスにおいては血球系・免疫系の細胞を供給する幹細胞が傷害を受け、その結果脾臓・胸腺の萎縮に代表されるような「免疫」能の低下を来したことが個体の死の原因の一つになっていると考えることができる。この他 MNU 投与後数日以内に —/— マウス個体で著名な体重減少を認め (6 日目ですでに 25% 近い減少)、また小腸・大腸で MNU による粘膜の顕著な変化 (不規則な形態の腺窩膿瘍 [crypt abscess] や nuclear atypia [不定形の核]) が観察された。以上の病理解析の結果から、MNU による消化管粘膜の損傷で栄養不良の状態がもたらされ、このことと [免疫] 能の低下と相俟って個体の死につながっているのではないかと考察した。このような MNU 投与による —/— マウス臓器における変化は、急性の放射線障害にきわめて類似性の高い症状を示したことから、樹立した MGMT 遺伝子欠損マウスは、今後アルキル化抗癌剤のみならず放射線による骨髄抑制回避のプロトコール作成にも有用なモデル系となると考えられる。

*MGMT* 遺伝子欠損マウスが MNU に対してきわめて高い感受性を示すので、アルキル化剤誘導発癌については、ホモ(-/-)マウスが死なないような薬剤濃度が低い条件を選んで解析した<sup>5)</sup>。図 10A に MNU 2.5mg/kg の条件を用いて解析した時のプロトコールを示している。2 週齢の時点で MNU を 1 回腹腔内投与し、28 週間後の腫瘍発生につき解析した。ホモ(-/-)マウスにおいて、胸腺腫(thymic lymphoma)と肺の腺腫(adenoma)の発生頻度が有意に高いことが分かる。また個体当たりの肺の腺腫の数は、野生型(+/+ )とヘテロ(+/-)個体ではそれぞれ 1 個程度であるのに対して、ホモ(-/-)マウスでは数個認められた(図 10 B)。これと同様の結果は、アルキル化剤 DMNA 投与による肺と肝臓における腫瘍の発生でも認めている<sup>1)</sup>。

以上のことから DNA 修復酵素であるメチルトランスフェラーゼは、アルキル化剤によって DNA 中に生じた傷である O<sup>6</sup>-メチルグアニンを除去することにより発癌を抑制していることが明らかになった。

では *MGMT* 遺伝子欠損マウスでアルキル化剤による細胞死がよく起こるのは何故だろうか。もし O<sup>6</sup>-メチルグアニンの形成が突然変異の誘起だけを起すのであれば、そのような高率の細胞死は期待できない。これに関しては培養細胞の研究から一つの仮説が提唱されている(図 11)。O<sup>6</sup>-メチルグアニンはチミンとも誤対合する。ミスマッチ修復系はこのミスマッチを認識して O<sup>6</sup>-メチルグアニン(アルキル化塩基)の反対側の新生鎖を除去しようとする。しかしながら O<sup>6</sup>-メチルグアニン自体は鋳型鎖に残るので、この反応が繰り返されることになり、結果的に DNA 鎖が切断され細胞は死に至るというシナリオである。このような細胞が生き残るためには、ミスマッチ修復系を持たない方が都合が良いことになる。このことを検証するにはメチルトランスフェラーゼ欠損に加えてミスマッチ修復系の遺伝子を欠損したマウスを作出することが必要で、そのためにミスマッチ修復系の一つ *MSH2* 遺伝子

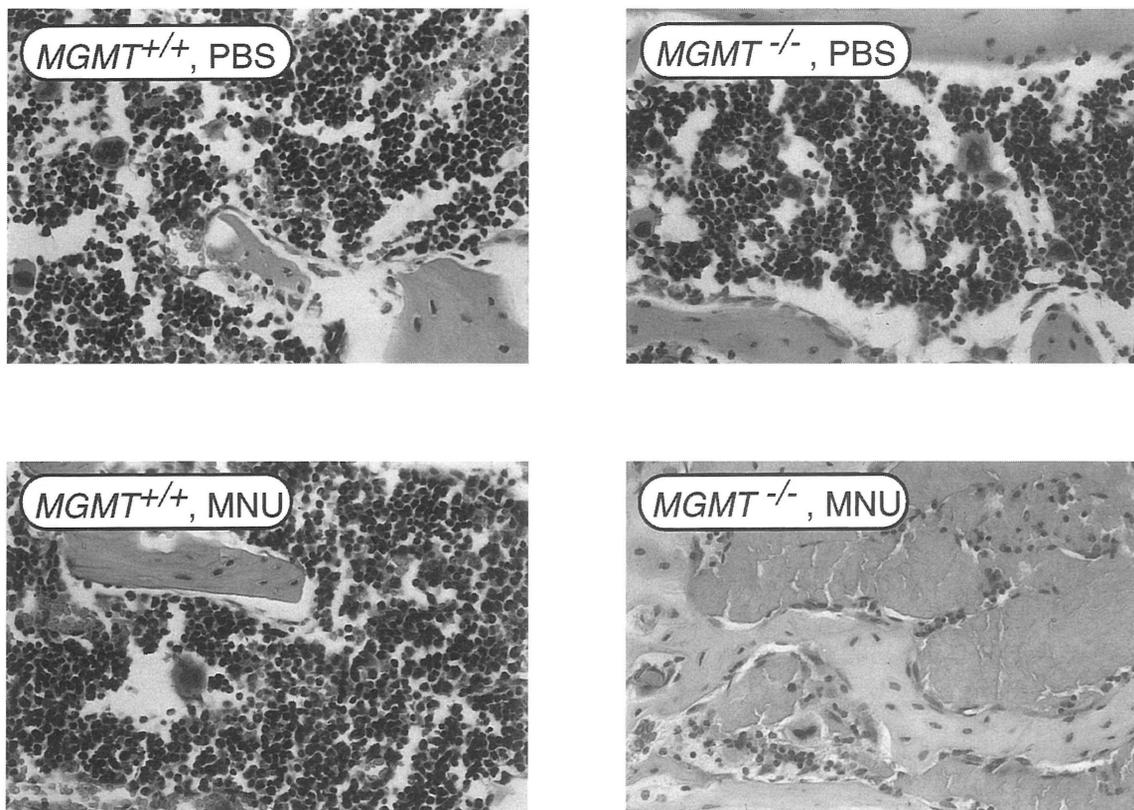
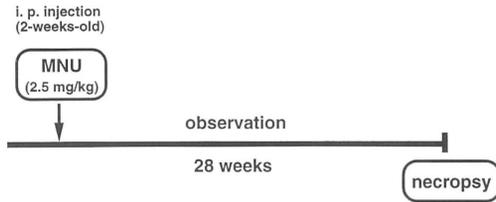


図 9 MNU 投与後の骨髄の変化

図 10 *MGMT* 遺伝子の異なる遺伝子型を有するマウスにおける MNU 誘発腫瘍発生の比較

## A Tumorigenesis Experiment



## B

<i>MGMT</i> 遺伝子型	性別	解析したマウス数	胸腺腫を有するマウス数	肺腫瘍を有するマウス数	マウス個体当たりの肺腫瘍の数
+ / +	♂	29	0	0	0
	♀	23	0	1 (4%)	<0.1
+ / -	♂	22	0	1 (5%)	<0.1
	♀	21	0	1 (5%)	<0.1
- / -	♂	25	2 (8%)	7 (28%)	0.5
	♀	27	5 (19%)	4 (15%)	0.1

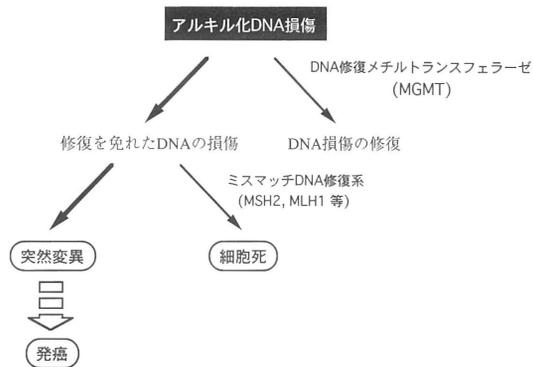


図 11 アルキル化DNA 損傷と DNA 修復酵素系

の欠損マウスを独自に樹立し、現在解析を行っている。まだ予備実験の段階であるが、二重遺伝子欠損マウスはアルキル化剤による致死作用に抵抗性を示し、しかも高い頻度で腫瘍の発生を認めるというきわめて興味深い結果を得ている。したがって、*MGMT* と *MSH2* 両方の遺伝子を欠損したマウスでは、DNA 中に生じた傷が修復や細胞死によって処理されずに大部分が突然変異として固定されてしまうので、発癌物質の効果を鋭敏に捉える系として今後大いに有用と考えられる。すなわち、ミスマッチ修復系との関連からもアルキル化抗癌剤の開発・投与について、*MGMT* 遺伝子欠損マウスを用いた研究の展開は臨床への還元が可能な段階に到達したと言えよう。

## おわりに

アルキル化DNA 損傷の修復に関わる酵素、 $O^6$ -メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼの欠損によって、細胞・個体ともにアルキル化剤に高い感受性を示し、さらに細胞を用いた実験から、アルキル化剤によって突然変異が誘発されること、また個体においては、アルキル化剤誘導発癌の上昇が認められた。ヒトにおけるこの酵

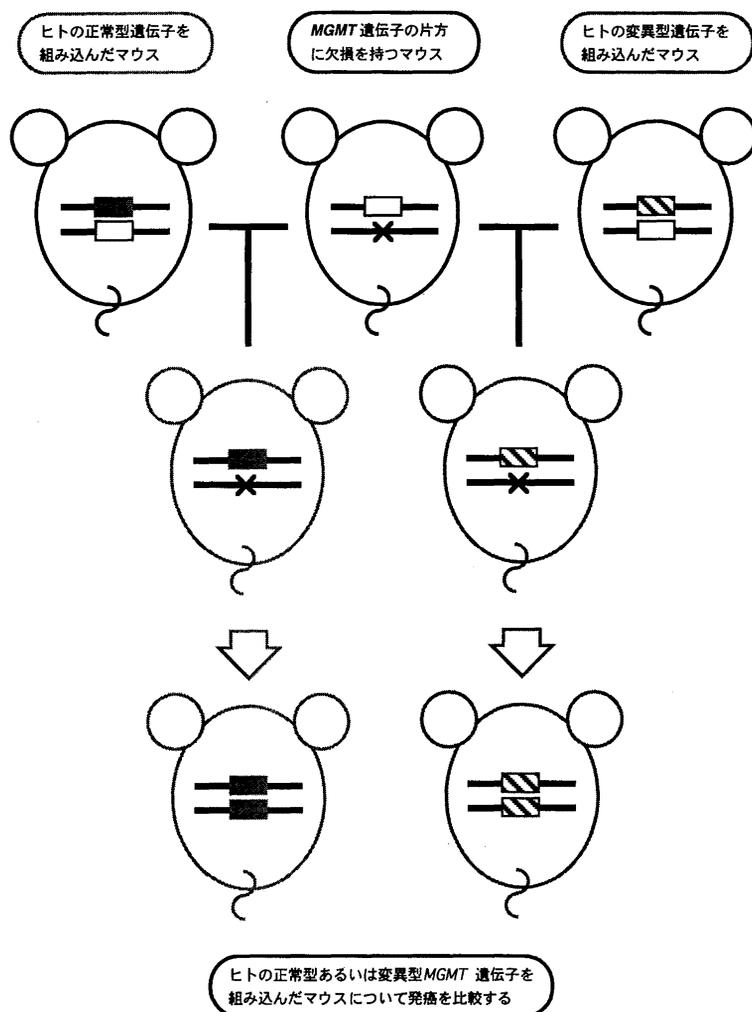


図 12 ヒトの変異型 MGMT 遺伝子と発癌リスク – 生体内評価実験 –

素の発現異常・欠損と発癌との関係についてはこれからの問題であり、ヒト集団中に酵素活性が幾分低下するような遺伝子多型（変異）はないのかを検索し、またそのような遺伝子多型（変異）と発癌について疫学的な解析を進める必要があると考える。

近年の分子生物学の展開は、ヒトの正常ならびに遺伝子多型（変異）を持つモデルマウスを、操作した遺伝子をノック・インする（注目している遺伝子についてマウスの遺伝子とヒト型のものを置換する）やり方で樹立し、実験的に検証することを可能にしている（図 12）。ヒトで検出した変異遺伝子を標的遺伝子組換えの手段を用いて導入することにより、各種遺伝性疾患のモデルマウスが構築できることから、今後遺伝子欠損・変異マウスを用いた研究成果が臨床の場に還元されることを期待している。

## 謝 辞

本研究は文部省科学研究費補助金による助成を受けて行われた。研究遂行にあたり、終始ご指導いただきました九州大学名誉教授（前九州大学生体防御医学研究所生化学部門教授）関口睦夫先生、マウス樹立に関してサポートをいただきました東京大学医科学研究所教授（前九州大学生体防御医学研究所細胞学部門教授）勝木元也先生、ならびに共同研究者である九州大学生体防御医学研究所生化学部門中別府雄作教授、作見邦彦博士、白石明子博士、富永洋平氏ほか研究室のスタッフ・多くの大学院生、東京大学医学部分子病理学石川隆俊教授ならびに研究室の皆様感謝いたします。

この総説は、去る平成9年10月13日九州大学医学部主催のセミナーにおいて「DNA 傷害と修復に関する分子制御-細胞から個体へ」というタイトルで續が行ったものの内容の一部に加筆してまとめたものである。

## 参 考 文 献

- 1) Iwakuma T, Sakumi K, Nakatsuru Y, Kawate H, Igarashi H, Shiraishi A, Tsuzuki T, Ishikawa T and Sekiguchi M: High incidence of nitrosamine-induced tumorigenesis in mice lacking DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis*, 18, 1631-1635, 1997.
- 2) Iwakuma T, Shiraishi A, Fukuhara M, Kawate H and Sekiguchi M: Organization and expression of the mouse gene for DNA repair methyltransferase. *DNA Cell Biol.*, 15, 863-872, 1996.
- 3) Kawate H, Ihara K, Kohda K, Sakumi K and Sekiguchi M: Mouse methyltransferase for repair of O<sup>6</sup>-methylguanine and O<sup>4</sup>-methylthymine in DNA. *Carcinogenesis*, 16, 1595-1602, 1995.
- 4) 河手久弥, 関口睦夫: ミスマッチ修復と細胞のアルキル化剤感受性. *実験医学* 13, 1741-1746, 1995.
- 5) Sakumi K, Shiraishi A, Shimizu S, Tsuzuki T, Ishikawa T and Sekiguchi M: Methylnitrosourea-induced tumorigenesis in *MGMT* gene-knockout mice. *Cancer Res.*, 57, 2415-2418, 1997.
- 6) Sekiguchi M, Nakabeppu Y, Sakumi K and Tsuzuki T: DNA-repair methyltransferase as a molecular device for preventing mutation and cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 122, 199-206, 1996.
- 7) Tominaga Y, Tsuzuki T, Shiraishi A, Kawate H and Sekiguchi M: Alkylation-induced apoptosis of embryonic stem cells in which the gene for DNA repair methyltransferase had been disrupted by gene targeting. *Carcinogenesis*, 18, 889-896, 1997.
- 8) 續 輝久: ジーンターゲット法による変異マウスの作製. *細胞工学* 10, 416-426, 1991.
- 9) Tsuzuki T, Sakumi K, Shiraishi A, Kawate H, Igarashi H, Iwakuma T, Tominaga Y, Zhang S, Shimizu S, Ishikawa T, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M and Sekiguchi M: Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis*, 17, 1215-1220, 1996.
- 10) 續 輝久, 富永洋平: ヒト突然変異抑制遺伝子のクローニングとその機能. *日本臨牀* 53, 1537-1547, 1995.