

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：72609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08708

研究課題名（和文）乳癌特異的ストレスシグナルとしてのDJ-1の構造解析

研究課題名（英文）DJ-1 protein structure specific for breast cancer

研究代表者

岩屋 啓一（Iwaya, Keiichi）

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・研究員（移行）

研究者番号：50312012

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：mRNA dj-1の発現亢進は、乳癌を含む癌に共通する現象であった。DJ-1蛋白質の発現様式は予後因子であり、薬剤感受性を予測する。予後を正確に予測するには、病理組織標本の質を維持する病理作業工程の厳密な管理が重要である。本研究期間は、日本におけるゲノム研究・医療の大変革期にあたり、up to dateに対応する研究・医療体制の社会的要求が生じた。DJ-1の臨床研究、そしてゲノム医療を推進するための基盤技術として、病理組織標本の質の向上を行った。そのひとつの成果としてクロスコンタミネーション防止対策を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレス応答を細胞内の高位レベルで制御するDJ-1は、長期間の酸化ストレス応答過剰亢進状態が続くと、応答システムに破たんを来して癌やパーキンソン病の性格を獲得していく。DJ-1の精密なモニタリングを行うことにより、mRNA dj-1の過剰亢進状態を適切に評価することが実現すれば、癌や痴呆の予防や健康寿命の延長に繋がる可能性がある。そのための社会基盤のひとつとして、病理組織標本作成過程に特殊なポケットを使用することを提唱した。詳細なプロトコルの公表が、DJ-1を含む臨床研究成果の再現性の向上やゲノム医療の確実な実践に繋がるヒントとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Increased expression of mRNA dj-1 has been a common phenomenon in cancers, including breast cancer. DJ-1 protein expression pattern is a prognostic factor and predicts drug sensitivity. To accurately predict prognosis, it is important to strictly control the work process in pathology laboratory to maintain the quality of histopathological specimens. In this study period, the quality of histopathological specimens was improved as a fundamental technology to promote clinical research on DJ-1 and precision medicine. As one of the results, we proposed protocols to prevent cross-contamination.

研究分野：病理学

キーワード：DJ-1 構造解析 オミックス ペプチドマップ 酸化 ゲノム医療 クロスコンタミネーション ナノテクノロジー

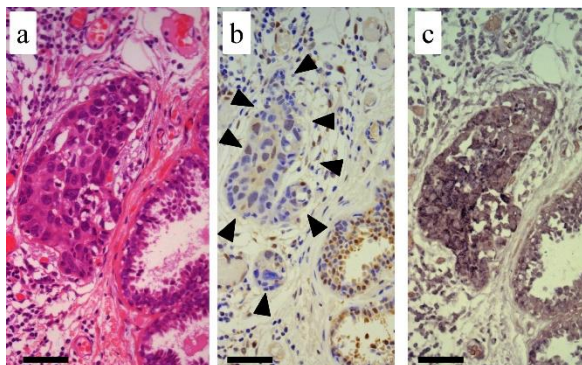
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳癌細胞における DJ-1 の発現とその臨床的意義

DJ-1 は、乳癌細胞においてほとんど全ての症例で mRNA の発現が亢進している。273 症例の乳癌を対象に免疫染色を行うと、蛋白質レベルでは、約半数の 146 症例で低下し、mRNA レベルとの乖離がみられた。(図 1)



273 症例の患者予後と DJ-1 蛋白質の低発現との関連を検討すると、乳癌細胞が DJ-1 蛋白質の低発現を示した症例では、健存率および生存率ともに有意に低く、予後不良であった。(下図 2 参照、Histopathology. 2012;61(1):69-77)

DJ-1 は酸化ストレス応答に係わりアポトーシスを制御するが、DJ-1 蛋白質レベルの低下が認められた乳癌症例では、予後不良である反面、複数の化学療法に反応し、術前化学療法にて pCR (癌細胞が消滅) が高頻度に誘導された。(Breast Cancer Res Treat. 2013;139(1):51-9)

図 1 乳癌における DJ-1 の発現

a: 乳癌細胞がほぼ中央にみられる。右下に非癌乳腺組織がみられる。(H & E) **b:** a と同じ標本における DJ-1 の免疫染色では、非癌乳腺細胞に比べて乳癌細胞で DJ-1 蛋白質の発現が減弱している。 **c:** In situ hybridization では、乳癌細胞における DJ-1 mRNA の発現が亢進している。

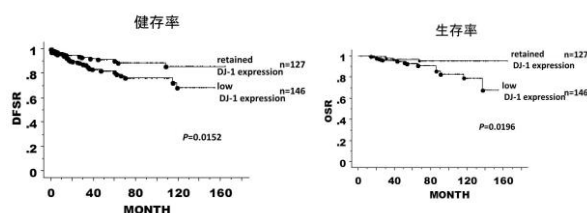


図 2 DJ-1 蛋白質の発現低下と予後

(2) 乳癌細胞における DJ-1 蛋白質の分泌

乳癌細胞株を用いて、DJ-1 蛋白質の分泌について検討し、培養液中に DJ-1 蛋白質を検出した。次に、乳癌患者の生体内において癌細胞が DJ-1 を分泌することを調べるために、分泌液の集合体である乳頭分泌液を検討した。非乳癌患者の分泌液に比べて、乳癌患者の乳頭分泌液中では DJ-1 蛋白質の濃度が有意に高いことが確認され、in vivo においても乳癌細胞が DJ-1 蛋白質を分泌することが間接的に証明された。(Cancer Sci. 2012;103(6):1172-6) 高濃度の DJ-1 蛋白質は、約 600 例を対象にした乳癌血清を用いた検討でも検出された。血中 DJ-1 濃度と乳癌組織との対比では、乳癌細胞において DJ-1 蛋白質レベルが低い症例において、高濃度の DJ-1 蛋白質を分泌液中そして血清中に認めた。DJ-1 蛋白質が細胞外に分泌され、細胞内の DJ-1 レベルが低下した可能性も考慮された。(Cancer Sci. 2015;106(7):938-43, Cancer Sci. 2012;103(6):1172-6)

多様化して利便性に富む生活環境では、内分泌かく乱物質や酸化ストレスの長時間暴露を余儀なくされ、感受性の高い乳腺細胞、内分泌細胞、生殖細胞、そして神経細胞などにダメージを与えて、乳癌、糖尿病、不妊症、精神障害・痴呆などを誘発する。酸化ストレスを感知した細胞は、ストレスセンサーの役割を担う DJ-1 を介して、個々の細胞レベルにおいて応答状況を決定する。同時に、DJ-1 自身を細胞外に放出して、酸化ストレスから生体を防御する。乳癌細胞も DJ-1 を分泌して高 DJ-1 血症が起す現象を我々は見出し、乳癌細胞が分泌した DJ-1 isoform が非癌状態と異なることを報告した。

2. 研究の目的

dj-1 遺伝子は、有賀寛芳・有賀 (井口) 早苗教授夫妻により 1997 年に新規癌遺伝子として同定され、後に家族性パーキンソン病の原因遺伝子であることが判明した。乳癌において認められた DJ-1 蛋白質の発現様式が、その他の部位から発生する癌に共通の現象である可能性を調べた。検討が進むにつれて、蛋白質発現様式の定量性を担保し核酸の質を確保することがこの方面の研究データの再現性を高め、研究を推進するにあたり重要であることが再認識された。加えて、

本研究期間中には、ゲノム研究・医療の変革期に遭遇し、up to date に対応する研究・医療体制の社会的な必要性が生じた。研究後半は、DJ-1 の研究、およびゲノム医療を推進するための基盤技術として、クロスコンタミネーション防止対策の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) DJ-1 の発現と臨床的意義

乳管癌、肺非小細胞癌、膵管腺癌、尿路移行細胞癌、婦人科癌など様々なヒト癌組織を用いて、抗 DJ-1 抗体を用いた免疫染色、および in situ hybridization を行った。

(2) バイオマテリアルの質の確保 — クロスコンタミネーション防止対策の開発

細胞の透過を防止しかつ各種溶媒を通す病理組織検体梱包素材を開発するために、897 のシートを対象に、病理組織検体梱包素材に必要な特性を以下の 6 項目（JAS 規格、あるいは ISO15189 に準じる）を評価した。1) 目開き；2) 厚さ；3) 薬品耐性（キシレン耐性）；4) 透水性（透水係数）；5) 保水性（保水率）；6) 細胞通過試験。最終的に梱包加工して標本作製を行った。

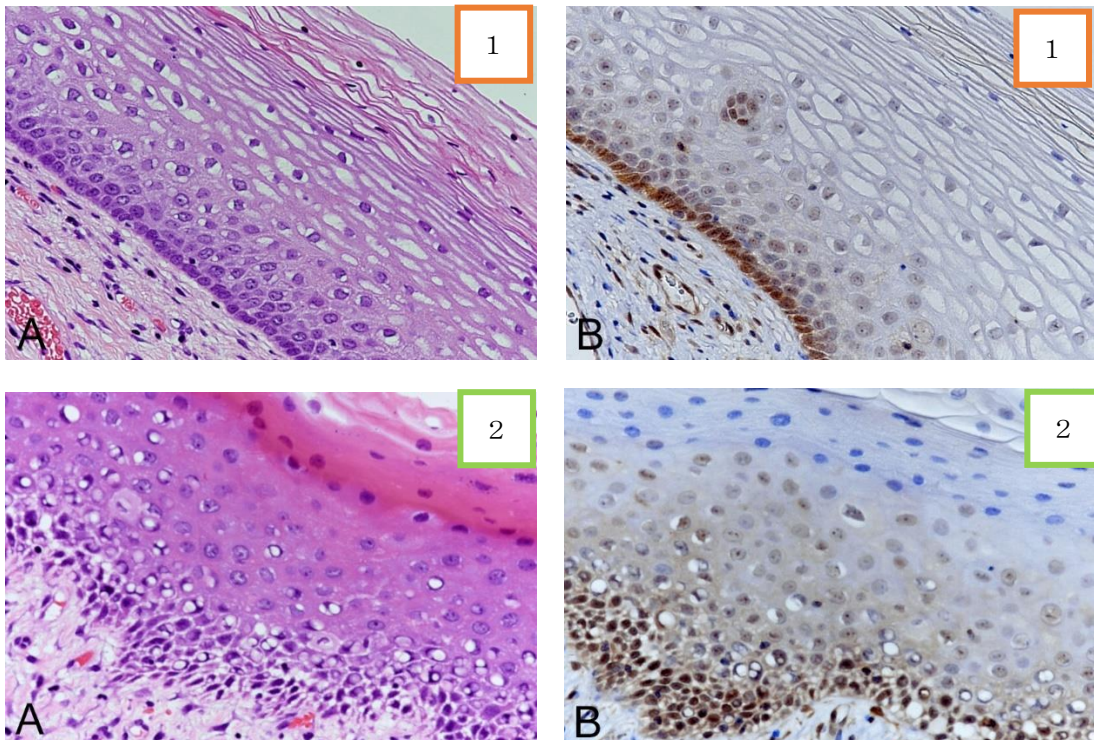
(3) DJ-1 蛋白質の構造解析

リコンビナントの DJ-1 蛋白質を用いてトリプシン消化の至適条件決定を行った。消化物をサンプルに質量分析器による解析を行った。

4. 研究成果

(1) DJ-1 の発現と臨床的意義

乳癌、肺非小細胞癌、膵管癌、尿路移行細胞癌、婦人科癌など様々なヒト癌では、DJ-1 mRNA が非癌細胞に比べて明らかな発現の増加がみられた。一方、DJ-1 のタンパク質レベルは、癌のサブタイプによって異なった。DJ-1 は予後因子であるが、DJ-1 発現の可視化により、異なる DJ-1 発現パターンが癌の進行、分化、形態に関与していることが示唆された。



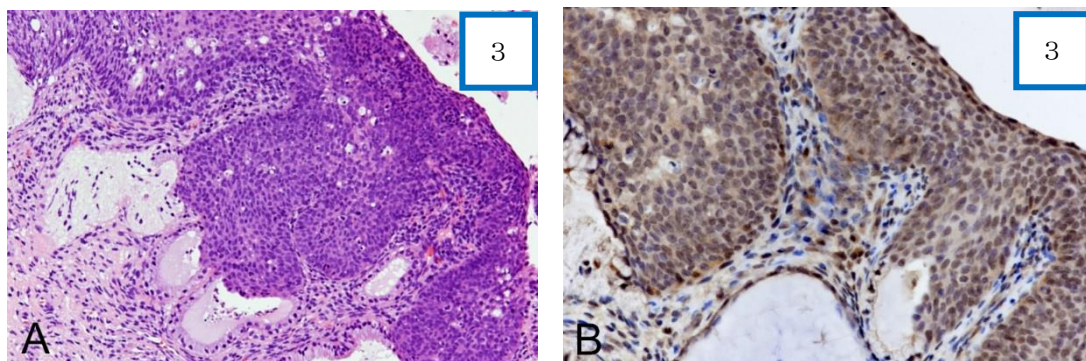


図1 正常子宮頸部における DJ-1 発現

(A) 正常な重層扁平上皮細胞 (H & E 染色、400 倍) (B) 基底細胞の核に DJ-1 タンパク質が局在している。(免疫染色、400 倍)

図2 低悪性度扁平上皮内病変における DJ-1 タンパク質の発現

(A) 扁平上皮の基底層付近に異型上皮細胞が認められる。(H & E 染色、400 倍) (B) 異型上皮細胞の細胞質内に DJ-1 タンパク質の弱い染色性がみられる。(免疫染色、400 倍)

図3 高悪性度扁平上皮内病変における DJ-1 タンパク質の発現

(A) 扁平上皮の全層に異型上皮細胞が認められる。(H & E 染色、400 倍) (B) 異型上皮細胞の細胞質内に DJ-1 タンパク質の発現が明瞭にみられる。(免疫染色、400 倍)

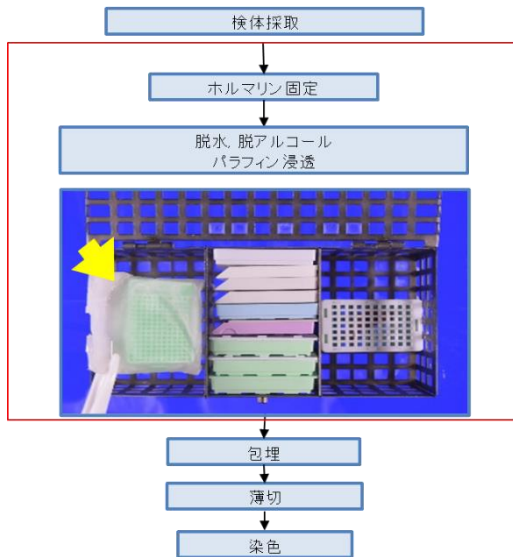
薬剤感受性に関しては、DJ-1 mRNA の高発現は、様々な癌において作用機序の異なる薬剤に関係なく薬剤耐性の予測因子であった。DJ-1 が複数のアポトーシス経路を制御する機能を有することから、がん治療のターゲットとして有望な候補のひとつと考えられた。

DJ-1 は、様々な癌の化学療法中の予測マーカーとなる可能性がある。がん細胞は DJ-1 を細胞外に分泌している。DJ-1 は、血液、分泌液、腹水、胸水などから早期から検出できる腫瘍マーカーとして機能する可能性がある。非がん細胞もストレス条件下で DJ-1 を分泌し、がん細胞から分泌される DJ-1 タンパク質ががん特異的な役割や機能を持つかどうかを明らかにすることは、今後の臨床研究の重要であると考えられた。また、正確な予後判定には DJ-1 の発現量の差異が重要である。定量性を追求するにあたり、バイオマテリアルの質を確保する加工工程の確立が望まれた。

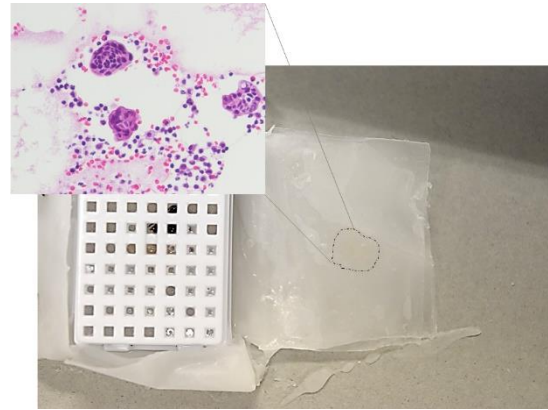
(2) バイオマテリアルの質の確保 — クロスコンタミネーション防止対策の開発

ゲノム医療は、今まで診断や治療方法がなかった難病、あるいは難治癌に対応した遺伝子異常を見つけ出し、ひとりひとりの患者さんに見合った最適な治療法を選択する。病理検査室は、患者さんから採取した組織を、従来の検査業務に加えて遺伝子検査に用いるための厳密な加工を行う。従来の病理検査室の加工工程では、微量の核酸が混入することにより、遺伝子診断の精度に大きな影響を及ぼしかねない。その結果、患者さんはゲノム医療を受けられない場合があり、患者さんの経済的損失は十数万円、社会全体では年間少なくとも見積もっても数億円と試算される。本研究では、遺伝子診断に繋がる病理作業工程において、特殊なポケットを使用することにより、ひとつの解決法を見出した。

要件を満たしたシートの素材を用いて袋状にしてカセットを梱包する技術 (μ SP) を用いて細胞レベルの混入を 100 %防止し、核酸の混入を防止した。なお、梱包の有無による H & E 標本の染色性の差は認められなかった。



作業工程における梱包技術の使用例



漏れ出た細胞の通過を梱包材が阻止

(3) DJ-1 蛋白質の構造解析

トリプシン消化による DJ-1 のペプチドマップでは、癌と非癌を比較すると異なっていた。ところが、消化切断出来ない部分が生じ、また疎水性ペプチドの多くが検出されなかった。そこで、アミノ酸シーケンスのカバー効率を改善するための条件設定（酵素消化条件、消化物ペプチドの分画など）を再検討した。

DJ-1 蛋白質の全長のうち、マッピングされたペプチドは検討前では約半分であったが、検討後、疎水性ペプチドを含む DJ-1 の大部分をカバーするペプチドがマッピングされた。DJ-1 蛋白質は酸化されやすい性質を有し、常温にて自然に酸化される。DJ-1 蛋白質の至適条件下のペプチドに 2 種類のプローブを用いてシステイン残基にひとつ (SOH)、あるいは 2 つの酸素が結合する酸化修飾の状態 (SO₂H) を検出する試みを継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Iwaya Keiichi, Arai Hisae, Takatou Nanao, Morita Yuka, Ozeki Rinko, Nakaoka Hirofumi, Sakamoto Masaru, Kouno Tsutomu, Soma Masayoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 A sheet pocket to prevent cross-contamination of formalin-fixed paraffin-embedded block for application in next generation sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0266947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Harano Naomi, Sakamoto Masaru, Fukushima Souta, Iwai Shinnosuke, Koike Yuki, Horikawa Shingo, Suzuki Kayo, Narui Chikage, Matsuoka Kazuko, Ozeki Rinko, Iwaya Keiichi, Umayahara Kenji, Tanaka Tadao, Okamoto Aikou	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical Study of Sentinel Lymph Node Detection Using Photodynamic Eye for Abdominal Radical Trachelectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Oncology	6. 最初と最後の頁 4709 ~ 4720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/curroncol28060397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Masakazu, Miyajima Kuniharu, Ishikawa Rinako, Yamada Yuki, Kono Takafumi, Okunaka Tetuya, Iwaya Keiichi, Ikeda Norihiko	4. 巻 33
2. 論文標題 Photodynamic therapy for pulmonary mucoepidermoid carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine Case Reports	6. 最初と最後の頁 101431 ~ 101431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rmcr.2021.101431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mori Wakako, Yuzu Keisuke, Lobsiger Nadine, Nishioka Hideo, Sato Hisako, Nagase Terumasa, Iwaya Keiichi, Lindgren Mikael, Zako Tamotsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Degradation of insulin amyloid by antibiotic minocycline and formation of toxic intermediates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86001-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mori Wakako, Yuzu Keisuke, Lobsiger Nadine, Nishioka Hideo, Sato Hisako, Nagase Terumasa, Iwaya Keiichi, Lindgren Mikael, Zako Tamotsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Degradation of insulin amyloid by antibiotic minocycline and formation of toxic intermediates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86001-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagase Terumasa, Iwaya Keiichi, Kogure Koichiro, Zako Tamotsu, Misumi Yohei, Kikuchi Minoru, Matsumoto Koichi, Noritake Masayuki, Kawachi Yasuhiro, Kobayashi Masaki, Ando Yukio, Katsura Yoshiya	4. 巻 11
2. 論文標題 Insulin derived amyloidosis without a palpable mass at the insulin injection site: A report of two cases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1002 ~ 1005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Keisuke Yuzu, Mikael Lindgren, Sofie Nystrom, Jun Zhang, Wakako Mori, Risako Kunitomi, Terumasa Nagase, Keiichi Iwaya, Per Hammarstrom, Tamotsu Zako	4. 巻 10
2. 論文標題 Insulin amyloid polymorphs: implications for iatrogenic cytotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Adv	6. 最初と最後の頁 37721-37727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.10.1039/D0RA07742A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永瀬晃正、岩屋啓一、座古保、菊池実、桂善也
2. 発表標題 インスリン由来アミロイドーシス (インスリンボール) とインスリン療法の皮膚合併症
3. 学会等名 第95回日本薬理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kawate T, Tsuchiya B, Iwaya K	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 15
3. 書名 DJ-1/PARK7 Protein; Expression of DJ-1 in Cancer Cells	

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 病理組織検体梱包素材及び組織切片のコンタミネーション防止用袋	発明者 岩屋啓一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、WO 2020/122149	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 病理組織検体梱包素材及びコンタミネーション防止用袋	発明者 岩屋啓一	権利者 佐々木研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PTC/JP2019/048574	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 組織切片のコンタミネーション防止用袋	発明者 岩屋啓一	権利者 佐々木研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2018-231806	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 病理組織検体梱包素材	発明者 岩屋啓一	権利者 佐々木研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2019-026443	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河手 敬彦 (KAWATE TAKAHIKO) (30532303)	東京医科大学・医学部・助教 (32645)	
研究分担者	田辺 真彦 (TANABE MASAHIKO) (30572333)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河野 勤 (KOUNO TSUTOMU) (80506064)	公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・研究員（移行） (72609)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スイス	Institute for Chem and Bio			
ノルウェー	Norwegian University			
スウェーデン	Linkoping University			