

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16553

研究課題名(和文) DSBとDDRに着目した、潰瘍性大腸炎サーベイランスのためのバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) acb

研究代表者

谷 優佑 (Tani, Yusuke)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：50835684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断(DSB)やDNA損傷応答(DDR)の破綻が、潰瘍性大腸炎の炎症性発癌のリスクを予測するバイオマーカーとなりうるかについて検討し、本研究にて炎症性発癌を伴う症例では伴わない症例よりもDSBが高頻度で発生していること、潰瘍性大腸炎の非腫瘍性粘膜では他の炎症性腸疾患と比較してDDRの破綻が高度にみられること、DDRの破綻は、罹患年数が長くなるにつれて高度となることを見出した。また、直腸では部位によるDDR破綻の程度にばらつきは少なく、直腸生検標本でのDDRの検討がバイオマーカーとして再現性のあるものであることを確認した。今後は、直腸生検標本のDSB、DDRを検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、潰瘍性大腸炎における炎症性発癌と、DNA二重鎖切断(DSB)やDNA損傷応答(DDR)の関連について調査した。DSBやDDRが発癌リスクを予測するバイオマーカーとして有用であるかについては、さらなる検討が必要であるが、有用であれば、学術的には炎症性発癌の分子メカニズムの解明に向けての基礎データとなり、社会的には潰瘍性大腸炎患者に行われるサーベイランスの効率化、患者の肉体的負担や、医療経済的負担の軽減に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether DNA double strand break (DSB) and DNA damage response (DDR) can be biomarkers predicting the risk of cancer or not. We revealed (1) In cancer-bearing cases, the frequency of DSB is higher than non-cancer-bearing cases, (2) In mucosa of ulcerative colitis, the activity of DDR is lower than that of other inflammatory bowel disease, (3) DDR correlates with disease duration of ulcerative colitis, (4) The activity of DDR have small variation related with location in rectum, then we considered that DDR have reproducibility as the biomarker predicting the risk of cancer. We are going to examine DSB and DDR with rectal biopsy specimen.

研究分野：人体病理学

キーワード：潰瘍性大腸炎 大腸癌 DNA二重鎖切断 DNA損傷応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 潰瘍性大腸炎の大腸癌発生リスクと発癌リスク予測バイオマーカーの必要性

潰瘍性大腸炎は、原因不明で慢性持続性の難治性炎症性腸疾患であり、長期経過例には大腸癌の発生リスクがある。こうした慢性持続性炎症を背景とした発癌は炎症性発癌と呼ばれるが、炎症性発癌の分子メカニズムの詳細は明らかにはなっていない。

長期経過(罹患年数が7年以上)の潰瘍性大腸炎に対しては、炎症性発癌早期発見のための内視鏡的サーベイランスが必要とされているが、潰瘍性大腸炎は本邦において近年急増しており、頻回な検査は患者にも医療経済的にも大きな負担となりつつある。また、炎症性発癌早期病変は内視鏡的発見が困難なこともあり、現行のサーベイランスは必ずしも効率的とは言えない。サーベイランス症例の効率的な選別のため、発癌リスクを予測するためのバイオマーカーの開発が期待されている。

(2) 発癌早期過程における DNA 二重鎖切断と DNA 損傷応答

近年、発癌早期過程における DNA 二重鎖切断(double strand breaks: DSB)とそれに対する DNA 損傷応答(DNA damage response: DDR)の破綻、の重要性が明らかになってきた。DSBが発生すると、それに対する DNA 損傷部の修復、細胞周期の停止、あるいはアポトーシスの誘導といった DDR が起こる。しかし、DDR の機能不全により細胞の DNA 損傷が未修復、不完全あるいは不正確な修復が行われることにより、癌化に至る重篤な遺伝子変異が蓄積されると考えられている。

(3) 潰瘍性大腸炎の発癌予測バイオマーカーとしての DDR と DSB の破綻

応募者の施設の研究から(Takabayashi H, et al. Human Pathology 2013;44:1038-1046)、DDR と DSB は、同部に動員される H2AX と 53BP1 に対する特異的抗体を用いた免疫染色で、組織標本上での可視化が可能である。また、H2AX と 53BP1 の共局在を二重蛍光免疫染色により観察することで、DSB の状態(維持または破綻)を解析することができる。応募者は、潰瘍性大腸炎外科切除材料に対してこれらの手法を用い、炎症粘膜には高頻度に DSB が発生していること、発癌早期病変の発生や進展には DDR の破綻が関与していること、を明らかにしてきた。

これらのことから、潰瘍性大腸炎の炎症粘膜では、発癌前段階で DSB や DDR の破綻が生じている可能性があり、サーベイランス生検組織の炎症粘膜における DSB と DDR の状態が有用な発癌リスク予測バイオマーカーになりうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

外科切除された大腸癌合併潰瘍性大腸炎症例(担癌例)と大腸癌非合併潰瘍性大腸炎(非担癌例)の術前内視鏡生検組織を対象として、担癌例と非担癌例の非腫瘍大腸粘膜における DSB および DDR の状態を検索し、DSB および DDR の状態が大腸癌発生のリスクを予測するためのバイオマーカーになりうるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) H2AX 免疫染色による DSB 発生頻度の評価: DSB 部位に出現する H2AX に対する免疫染色を施行し、上皮細胞の核における陽性率を算出し、DSB 発生頻度の指標とした。

(2) H2AX と 53BP1 の二重蛍光免疫染色による共局在の評価: DSB に対して DDR が機能している場合は、DSB 部位に H2AX により動員された 53BP1 が出現し、H2AX との結合体が形成される。一方、DDR が破綻している場合は H2AX と 53BP1 の結合体は形成されない。このことから、二重蛍光免疫染色で H2AX と 53BP1 の共局在率を算定し、DSB に対する DDR の状態(維持または破綻)を評価した。

4. 研究成果

(1) 潰瘍性大腸炎の非腫瘍性粘膜における DSB: 予備的検討として、潰瘍性大腸炎の外科切除症例を用い、非腫瘍粘膜における DSB を検討した。非担癌潰瘍性大腸炎症例(104例)と担癌潰瘍性大腸炎症例(16例)を比較したところ、担癌症例の方が、DSB 発生頻度が高い傾向にあり、特に炎症活動期においては有意に担癌症例にて高度な DSB 発生を認めた($P = 0.01$)。

(2) 潰瘍性大腸炎の非腫瘍性粘膜における DDR: 予備的検討として、潰瘍性大腸炎の外科切除症例を用い、非腫瘍性粘膜における DDR を検討した(図1)。潰瘍性大腸炎症例(46例)の非腫瘍性粘膜における DDR は、対象症例として用いたクローン病(11例)、急性虚血性病変(13例)と比較し有意に H2AX と 53BP1 の共局在率が低く($P < 0.05$)、潰瘍性大腸炎症例では非腫瘍粘膜においても DDR の破綻が発生していると推測された。また、潰瘍性大腸炎症例において DDR の破綻は罹患年数が長くなるにつれて高度となる傾向があり(相関係数 $RS = -0.396$, $P = 0.04$)、潰瘍性大腸炎では罹患年数が長くなるにつれて発癌率が上昇することと、関連している可能性が示唆された。

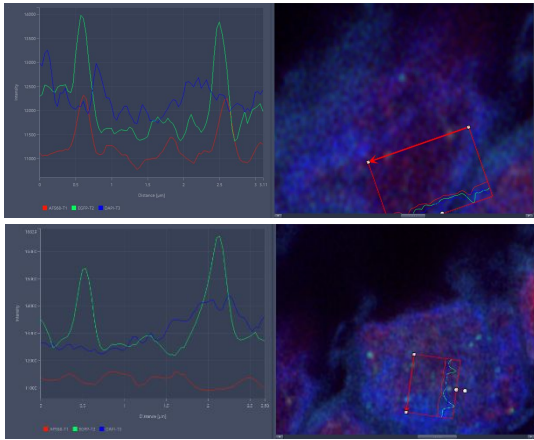


図1. H2AX と 53BP1 二重蛍光免疫染色を用いた DDR の検討

H2AX(緑のグラフおよびドット)と 53BP1(赤のグラフおよびドット)の二重蛍光免疫染色写真を図の右側に示し、写真中の赤線部の蛍光信号強度をそれぞれ左図に示す。

上段では緑の H2AX が高信号を示す部位に一致して赤の 53BP1 も高信号を示し、両者が共局在している、すなわち DDR が正常に起きていることが観察される。下段では H2AXが高信号を示している部分で53BP1は高信号を示しておらず、両者が共局在していない、すなわち DDR が破綻していることが観察される。

H2AX, 53BP1 共局在率 (%)

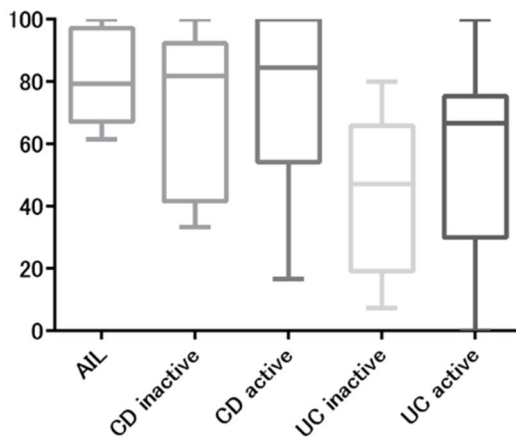
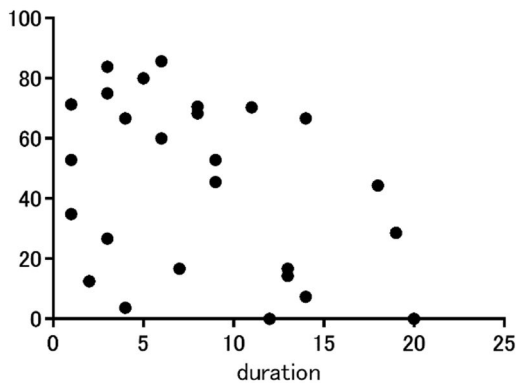


図2: 潰瘍性大腸炎の非腫瘍粘膜における DDR

上のグラフは、急性虚血性病変 (AIL)、クローン病 (CD)、潰瘍性大腸炎 (UC)における DDR の様子を表している。CD と UC については、組織標本上、炎症活動性が inactive なものと active なものに分けて検討を行った。UC では AIL や CD と比べ、有意に H2AX と 53BP1 の共局在率が低く、DDR が破綻していることが伺われた。

H2AX, 53BP1 共局在率 (%)



下のグラフは、縦軸は H2AX と 53BP1 の共局在率、横軸は UC の罹患年数で、非担癌 UC 症例の非腫瘍粘膜での値をプロットしたものである。Spearman's rank correlation coefficient にて検討したところ、相関係数 $RS = -0.396$, $P = 0.04$ であり、罹患年数が長くなるにつれて、共局在率が有意に低下しており、DDR の破綻が起きていることがわかった。

(3) 潰瘍性大腸炎の非腫瘍性粘膜における DSB および DDR の均一性：生検検体の DSB, DDR を発癌リスク予測のためのバイオマーカーとして用いるには、大腸内である程度 DSB, DDR 破綻が均等に起きている事を確認しなければならない。そのための予備的検討として、担癌潰瘍性大腸炎の外科切除症例 3 例について、複数個所の切片における DSB, DDR のばらつきを検討した。その結果、DSB は部位によってばらつきが大きかったが、DDR は直腸内ではあまりばらつきがみられず、均等であることが確認できた。これらの結果と、潰瘍性大腸炎における炎症性発癌の多くは直腸に発生することから、生検材料を用いた検討では直腸の DSB, DDR を比較することとした。

(4) 検討可能な潰瘍性大腸癌症例数：以上より、直腸から生検されたことのある潰瘍性大腸炎症例が今回の対象症例となる。当施設で病理診断された症例を検討したところ、担癌症例は 46 例、非担癌症例は 50 例以上収集することができた。

上記の通り複数の予備的検討を行ったところ、直腸生検標本での DDR, DSB を検討することで、バイオマーカーとして、より信頼性の高いものとなると予測された。今後は、直腸生検標本における DSB, DDR を検討し、これらが潰瘍性大腸炎における発癌を予測するバイオマーカーとなるか、引き続き検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yaegashi Ayaka, Yoshida Kensuke, Suzuki Naoto, Shimada Izumi, Tani Yusuke, Saijo Yasuo, Toyama Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 A case of severe hepatotoxicity induced by cisplatin and 5-fluorouracil	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal	6. 最初と最後の頁 24 ~ 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13691-019-00394-2	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 -
1. 著者名 Arao Yoshihisa, Kamimura Kenya, Ikemi Masatoshi, Hayashi Kazunao, Takaki Masayuki, Takahashi Shunsaku, Seino Satoshi, Abe Hiroyuki, Tsuboguchi Shintaro, Otsu Yutaka, Sanpei Kazuhiro, Kohisa Junji, Kondo Shuhei, Tani Yusuke, Ito Junko, Toyoshima Yasuko, Kakita Akiyoshi, Ajioka Yoichi, Terai Shuji	4. 巻 49
2. 論文標題 Rare Brain Metastasis From a Pancreatobiliary Subtype of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 e8 ~ e11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001450	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 -
1. 著者名 Morita Shinichi, Kamimura Kenya, Abe Hiroyuki, Watanabe-Mori Yukari, Oda Chiyumi, Kobayashi Takamasa, Arao Yoshihisa, Tani Yusuke, Ohashi Riuko, Ajioka Yoichi, Terai Shuji	4. 巻 25
2. 論文標題 Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy of hepatocellular carcinoma: A case report and review of literature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 6949 ~ 6958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v25.i48.6949	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 -
1. 著者名 味岡 洋一, 谷 優佑	4. 巻 54
2. 論文標題 【消化管疾患の分類2019-使い方,使われ方】小腸・大腸 潰瘍性大腸炎 潰瘍性大腸炎に出現する異型上皮の厚労省研究班分類	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 胃と腸	6. 最初と最後の頁 714 ~ 715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 谷優佑、味岡洋一	4. 巻 別冊
2. 論文標題 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸(下) 1. 腫瘍 (3) 大腸腫瘍 2) 悪性腫瘍 大腸未分化型癌(低分化・印環細胞・粘液癌)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 別冊 日本臨牀 消化管症候群(第3版) その他の消化肝疾患を含めて	6. 最初と最後の頁 1~417
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷 優佑, 味岡 洋一, 大橋 瑠子, 加藤 卓, 高村 佳緒里, 杉野 英明, 阿部 達也, 近藤 修平, 田口 貴博, 佐藤 航
2. 発表標題 多臓器転移と肺癌性リンパ管症を来した6mm大の胃原発小絨毛癌の1剖検例
3. 学会等名 日本病理学
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 八尾隆史、菅井 有	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 304
3. 書名 大腸癌	

〔産業財産権〕

〔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

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
---------	---------