

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590396

研究課題名(和文) mitotic catastropheの新規マーカー：リン酸化caspase-9

研究課題名(英文) Is phosphorylated caspase 9 a new marker of mitotic catastrophe?

研究代表者

新谷 路子(田中路子)(SHINTANI, MICHIKO)

神戸大学・保健学研究科・助教

研究者番号：40207147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸化caspase 9がmitotic catastropheのマーカーであることを証明することは困難であった。そこで、胃癌および大腸癌を用いて、アポトーシス阻害活性をもつサバイビンと、サバイビン活性を抑制するSmac/DIABLOの発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、胃癌と大腸癌ではサバイビンによる細胞死抵抗性のメカニズムに違いがあり、大腸癌は胃癌と比較するとサバイビンだけではなくSmac/DIABLOも高発現しており、大腸癌においてSmac/DIABLOは、サバイビンの抗アポトーシス作用を抑制するために発現増加されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Initially, we examined whether phosphorylated caspase 9 is a new marker of mitotic catastrophe. However, this was difficult to prove. Next, we investigated the expression rates of survivin and Smac/DIABLO in gastric and colorectal carcinomas by immunohistochemistry. We observed that gastric and colorectal carcinomas differ in their levels of survivin and Smac/DIABLO expression; both expressions were significantly higher in colorectal carcinoma than in gastric carcinoma. Additionally, we showed that there is a correlation between the expression of Smac/DIABLO and survivin in well-to-moderately differentiated colorectal adenocarcinomas. On the basis of these results, we consider that the expression of Smac/DIABLO in colorectal carcinoma may be upregulated to suppress the anti-apoptotic effect of survivin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・消化器・唾液腺

キーワード：胃癌 大腸癌 リン酸化カスパーゼ9 サバイビン Smac/DIABLO 細胞死 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂の異常により染色体分離ができないために、G₂/M 期から直接導かれる細胞死を mitotic catastrophe という。この状態にある細胞は大型化し、その核内には cyclin B1・cdc2 (cdk1) 複合体が異常蓄積していると考えられているが、現在のところ、電子顕微鏡で nuclear envelope および multiple micronuclei が確認された場合に mitotic catastrophe と判断されている。すなわち、光顕レベルでの信頼できる mitotic catastrophe 証明法はいまだ確立されていない。

我々は、胃・大腸癌を対象として、ミトコンドリア経路アポトーシスの進行に重要なプロテアーゼ、caspase-9 のリン酸化型を免疫組織化学的に検出したところ、その陽性細胞は円形かつ大型で、核は分断されており、mitotic catastrophe を示唆する形態学的特徴を有していることが明らかとなった。この結果から、リン酸化 caspase-9 免疫組織化学染色が、ホルマリン固定パラフィン切片に使用可能な mitotic catastrophe 証明法となりうることを期待された。

2. 研究の目的

申請時における本研究の目的は、リン酸化 caspase-9 免疫組織化学染色が優れた mitotic catastrophe 証明法であることを実証することであり、リン酸化 caspase-9 陽性細胞が cyclin B1・cdc2 (cdk1) 複合体の異常蓄積、14-3-3 発現の欠如、電顕レベルでの微細構造 (nuclear envelope および multiple micronuclei) を呈することを確認することであった。

しかしながら、proximity ligation assay (PLA 法) による cyclin B1・cdc2 複合体の検出を、蛍光色素標識法 (Red) および酵素標識法 (NovaRED) の 2 種の検出法を用いて試みたが、陽性シグナルが弱く、cyclin B1・cdc2 複合体を安定して検出することは困難であった。

我々の研究室では、免疫組織化学染色による細胞死経路の解析を研究テーマの一つとしており、活性型 caspase-8 (レセプター経路アポトーシスのマーカー)、活性型 caspase-9 (ミトコンドリア経路アポトーシスのマーカー)、apoptosis-inducing factor (AIF; caspase 非依存性アポトーシスのマーカー)、LC3 および p62 (オートファジーのマーカー) に対する特異的抗体を用いて、胃癌、大腸癌において誘導されている細胞死経路の特徴を明らかにしてきた。そこで上記のマーカーに加え、G₂/M 期に発現するタンパク質でありアポトーシス阻害活性をもつサバイピンの発現と、サバイピン活性を抑制する Smac/DIABLO の発現を明らかにし、胃癌および大腸癌における細胞死経路の解明を多面

的に行うことを本研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) リン酸化 caspase-9 免疫組織化学染色が優れた mitotic catastrophe 証明法であることの証明

リン酸化 caspase-9 抗体の特異性の確認; アルカリフォスファターゼを用いた脱リン酸化処理により、抗体の特異性の確認を行った。

PLA 法による cyclin B1・cdc2 複合体の検出: PLA 法は、抗原タンパクと 1 次抗体との反応・proximity ligation assay・シグナルの検出、の各ステップから構成される。そこで、PLA 法実施に先行し免疫組織化学染色による cyclin B1・cdc2 二重免疫染色の至適条件を設定し、最適条件下で PLA 法により cyclin B1・cdc2 複合体の検出を、蛍光色素標識法 (Red) および酵素標識法 (NovaRED) の 2 種の検出法を用いて試みた。

(2) サバイピンの胃癌および大腸癌における細胞内局在に関する検討

進行胃癌 72 例 (高-中分化型、36 例; 低分化型、36 例) および大腸癌 78 例 (高-中分化型、68 例; 低分化型、10 例) のホルマリン固定・パラフィン切片を対象とし、腫瘍部におけるサバイピン陽性細胞の割合を、核および細胞質ごとに算出した。陽性細胞率の中央値から、核は 30% 以上、細胞質は 15% 以上の症例を陽性とし、サバイピン陽性率を分化度別に表した。臨床病理学的パラメーター (年齢、性別、原発部位、深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲、p ステージ) ごとに陽性率を算出し、有意差の有無を解析した。核と細胞質におけるサバイピン発現の相関についても解析した。

(3) 胃癌および大腸癌におけるアポトーシス促進蛋白 Smac/DIABLO の発現に関する検討

進行胃癌 72 例 (高-中分化型、36 例; 低分化型、36 例) および大腸癌 78 例 (高-中分化型、68 例; 低分化型、10 例) のホルマリン固定・パラフィン切片を対象とし、腫瘍細胞の細胞質における Smac/DIABLO の発現を、染色強度と陽性細胞数の割合から 0-6 のスコアで表わした。スコアの中央値より cut off 値を設定し、スコアが 5 以上の症例を高発現例とした。胃癌および大腸癌における Smac/DIABLO の発現に関し、分化度別での有意差の有無、臨床病理学的パラメーターとの関連性について明らかにした。さらに、Smac/DIABLO とサバイピンの発現との相関についても解析した。

4. 研究成果

(1) リン酸化 caspase-9 免疫組織化学染色が

優れた mitotic catastrophe 証明法であること
の証明

リン酸化 caspase-9 抗体の特異性の確認
一次抗体であるリン酸化 caspase-9 液に、
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (400
U/ml) を混和し、37 で2時間反応させるこ
とにより染色結果は陰性化した。

PLA 法による cyclin B1・cdc2 複合体の
検出：免疫組織化学染色による cyclin B1・
cdc2 二重染色は cyclin B1 抗体を20倍希釈、
cdc2 抗体を200倍希釈することにより最適
な染色結果が得られた。次に PLA 法におい
て、反応温度・時間、洗浄方法等の条件を
変化させ検討した。発色方法についても、
蛍光色素標識法 (Red) と酵素標識法 (Nova
RED) の2種の検出法を用いて染色したと
ころ、陽性シグナルは弱く結果は不安定で
信頼性の高い結果は得られなかった。

(2) サバイピンの胃癌および大腸癌にお ける細胞内局在に関する検討

サバイピン陽性症例の割合は、胃癌 (核、
49%; 細胞質、35%)、大腸癌 (核、72%; 細胞
質、56%) であった。分化度別では、高-中
分化型胃癌における核陽性症例は61%で
あり、低分化型 (36%) と比較して有意に
高かった ($P < 0.05$)。大腸癌では、
分化度による有意差は見られなかった。

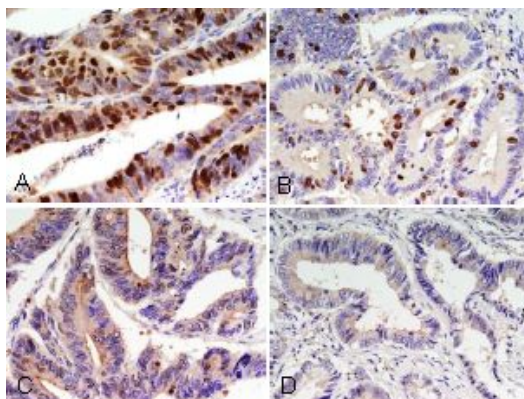


図1 サバイピン免疫組織化学染色

A, 核および細胞質陽性 (結腸); B, 核陽
性症例 (胃); C, 細胞質陽性症例 (結腸);
D, 陰性症例 (直腸)

臨床病理学的パラメーターとの関連性は、
胃癌における核サバイピンの発現は、60歳
以上の症例において有意に高値を示した ($P < 0.01$)。また、胃癌において、細胞質サバイ
ピンの発現は、リンパ管侵襲のない群は、あ
る群と比較して有意に高値を示した ($P < 0.05$)。大腸癌における核サバイピンの発現
は、女性において有意に高値を示した ($P < 0.05$)。大腸癌において、核サバイピン陽性
率は、深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、
静脈侵襲、p-ステージが進行するに従って低
値を示したが、有意差は認められなかった。

核と細胞質におけるサバイピン発現の相
関を解析したところ、胃癌においてのみ相関
がみられた ($r = 0.42, P < 0.001$)。また、
胃癌の陽性率は核、細胞質ともに大腸癌よ
りも有意に低値を示した ($P < 0.01$)。大腸癌
では、核と細胞質の発現に相関はなく、核サ
バイピンの発現は細胞質サバイピンの発現
に対し有意に高値であった ($P < 0.05$)。

以上の結果から、大腸癌においてサバイ
ピンは核優位に発現していると考えられ、胃
癌と大腸癌では、サバイピンの細胞内分布に
違いがあり、サバイピンの作用機序が異なる
ことが示唆された。

我々は、以前の報告で、大腸癌ではオー
トファジーが Caspase 依存性アポトーシス
を代償するために機能している可能性を推
測した。本研究結果から、サバイピンが大腸
癌で高発現を示したことから、大腸癌ではサ
バイピンによるアポトーシスの抑制がより
強く働いていると考えられた。腫瘍により、
サバイピンによる細胞死抵抗性のメカニズ
ムに違いがある可能性が示唆された。

(3) 胃癌および大腸癌におけるアポトーシ ス促進蛋白 Smac/DIABLO の発現に関する検討

Smac/DIABLO の発現は、細胞質 (ときに核)
に見られ、陽性症例の割合は、胃癌、46%;
大腸癌、69% であり、胃癌よりも大腸癌が有
意に高値を示した ($P < 0.01$)。これまでの
報告によると、胃癌での陽性率は13-70%、大
腸癌では66-90% であり、判定方法に違いはあ
るが、我々の結果からも、胃癌と大腸癌を比
較すると大腸癌の方が Smac/DIABLO をより
高発現している可能性が示唆された。

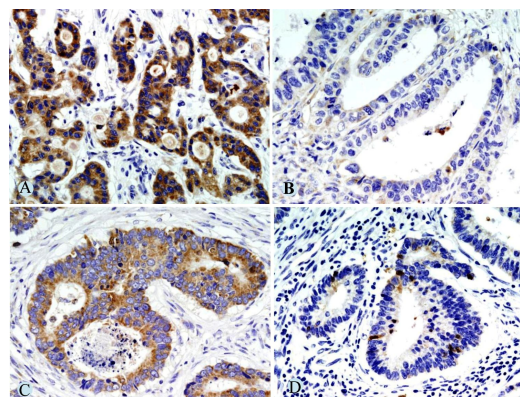


図2 Smac/DIABLO 免疫組織化学染色

A, 高発現症例 (胃癌); B, 低発現症例 (胃
癌); C, 高発現症例 (直腸癌); D, 低発現
症例 (直腸癌)

分化度別では、胃癌・大腸癌ともに低分化
型と比較し、高-中分化型における陽性率が
高い傾向にあったが、有意差は見られなかつ
た。胃癌における Smac/DIABLO の発現と腫瘍
の分化度の関連性に関しては、種々の報告が
あり一致していない。本研究結果から、胃
癌・大腸癌における Smac/DIABLO 発現レベル

と分化度には関連性はないと考えられた。

臨床病理学的パラメーター別にみると、胃癌・大腸癌ともに p-stage の上昇につれて Smac/DIABLO の陽性率は低くなる傾向を示したが、有意差は認められなかった。

Smac/DIABLO とサバイピンの発現との相関について解析したところ、高-中分化型大腸癌において、Smac/DIABLO と核サバイピン陽性率に、弱い相関が見られた ($r = 0.245$, $P < 0.05$)。

以上の結果から、大腸癌は胃癌と比較すると、サバイピンだけではなく Smac/DIABLO も高発現していることが明らかとなった。大腸癌における Smac/DIABLO の発現は、サバイピンの抗アポトーシス作用を抑制するために upregulate されている可能性が示唆された。

本研究により、胃癌および大腸癌の細胞死経路について、サバイピンによるアポトーシス抑制作用に違いがあることが示唆された。種々の腫瘍において、サバイピンおよび Smac/DIABLO の発現を明らかにすることは、癌の治療効果予測に威力を発揮し、個別化治療に貢献すると考えられる。

現在は、さらにサバイピンの核外輸送を担う CRM1 の発現や、サバイピンと同じく染色体パッセンジャー複合体の一つであり、腫瘍において過剰発現が示唆されている Aurora B の発現等を加えた検討を進めている。大腸癌に関しては、進行再発大腸癌を対象とし、サバイピンおよび Smac/DIABLO の発現と再発率や生存期間との関連について、今後明らかにして行く予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Shintani M, Sangawa A, Yamao N and Kamoshida S: Smac/DIABLO expression in human gastrointestinal carcinoma: association with clinicopathological parameters and survivin expression. *Oncology Letters* 査読有 (in press)

Sangawa A, Shintani M, Yamao N and Kamoshida S: Phosphorylation status of Akt and caspase-9 in gastric and colorectal carcinomas. *Int J Clin Exp Pathol* 査読有 Vol.7, No.6, 2014 (in press)

Shintani M, Sangawa A, Yamao N and Kamoshida S: Immunohistochemical expression of nuclear and cytoplasmic survivin in gastrointestinal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 査読有 Vol.6, No. 12, 2013, pp.2919-27, <http://www.ijcep.com/files/ijcep1310020.pdf>

〔学会発表〕(計 2 件)

新谷路子、胃癌および大腸癌におけるアポトーシス促進蛋白 Smac/DIABLO の発現に関

する検討 第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、平成 25 年 9 月 27 日、航空会館(東京都)

新谷 路子、胃癌および大腸癌における survivin の細胞内局在に関する検討 第 102 回日本病理学会総会、平成 25 年 6 月 6 日、ロイトン札幌(北海道)

〔図書〕(計 1 件)

Michiko Shintani *et al.* InTech Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death? Chapter 10 「Role of Autophagy in Cancer」2013, 217-234

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新谷(田中) 路子 (SHINTANI (TANAKA), Michiko)

神戸大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号：40207147

(2)研究分担者

鴨志田 伸吾 (KAMOSHIDA, Shingo)

神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：70351020

(3)連携研究者

松岡 宏 (MATSUOKA, Hiroshi)

藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：40367719

(4)研究協力者

寒川 彰子 (SANGAWA, Akiko)

大阪赤十字病院・病理部・臨床検査技師