

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590472

研究課題名(和文) DNA損傷修復マーカーを用いた膠芽腫における抗癌剤作用機序と悪性化の解明

研究課題名(英文) Mechanism of anticancer agents and carcinogenesis in glioblastoma detected with markers for DNA damage

研究代表者

黒瀬 顕 (Kurose, Akira)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70244910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はDNA傷害の際 H2AXが陽性になることを利用し実験を行ってきた。当該研究ではグリオーマ細胞株により抗癌剤への反応性が異なりアポトーシス誘導よりも細胞増殖停止や細胞老化への移行が顕著にみられることがわかった。また H2AXを用いてDNA損傷応答をグリオーマ臨床検体で調べた結果、悪性度が増すに従い H2AX検出細胞割合が低下した。よってグリオーマ悪性化にDNA損傷応答障害が関わる可能性が示唆された。グリオーマでは多形性の顕著な核ではDNA傷害が顕著でかつ増殖マーカー陽性細胞が多くみられ、核多形性にはDNA傷害が関わることで、核の多形性は直接的な悪性度の指標ではないことがわかった。

研究成果の概要(英文)：gamma-H2AX is a useful marker for DNA double strand breaks. Present study revealed that effects of anti-cancer drugs in glioma depend on cell lines, and cell cycle arrest and/or senescence play major roles in the effects. Progression of malignancy in glioma might be associated with inhibition of cell responses for DNA damages, since pathological specimens of glioma showed increasing positivity for gamma-H2AX as the grade of the glioma increased. In glioma, lots of nuclei with significant pleomorphism demonstrated both severe DNA damage and positivity for a cell-proliferating marker. These results implies severe DNA damage induces nuclear pleomorphism and nuclear pleomorphism is not necessarily a direct evidence for malignancy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：DNA損傷 DNA修復 脳腫瘍 核異型 多形性 増殖能

## 1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の中でグリオーマは比較的頻度が高く、なかでも悪性度の高い glioblastoma (GB) はグリオーマの多くを占める。用いられる抗癌剤は一次的または二次的に DNA を標的とするにもかかわらず DNA 傷害の詳細は殆ど解明されていない。その一つの要因として DNA 傷害 (DNA 断裂) を検出する有効な方法がなかったことが挙げられる。特に現在標準的に用いられるテモゾロミド (TMZ) はミスマッチ (MM) 修復が徒労に終わることが DNA 二本鎖断裂 (DSB) ともたらすとされるが詳細は不明である。近年 DSB の際には ataxia telangiectasia mutated protein (ATM) が活性化し、活性化 ATM が DSB 周辺の DNA コアヒストンを形成するヒストン H2AX の特定部位をリン酸化することが判明した。このリン酸化ヒストン H2AX は H2AX と呼ばれ DNA 修復に係わると想定されている。活性化 ATM は同時に Chk2, p53 など細胞周期関連タンパクを活性化し細胞周期を停止させる作用も有する。すなわち DSB の際の ATM からのカスケードは薬剤や放射線などによって惹起された DNA 傷害の際に細胞周期を停止させて DNA 修復を行う極めて重要な機構である。DSB の際には DSB 周囲のメガベースレベルの領域のヒストン H2AX がリン酸化されるため、H2AX の特異抗体を用いれば個々の DSB を可視化することができ、また H2AX 量を測定することで DSB を定量化できる。

本研究ではこのことに着目し、GB 培養細胞に TMZ をはじめ各種抗癌剤を加えて培養した後、H2AX と DNA を蛍光二重染色によりフローサイトメトリー (FCM) で同時測定し、DNA 量を指標にした細胞周期の上から DSB を検出することで抗癌剤の作用機序を解明することを第一の目的とする。図 2 に本方法を用いた予備的実験結果を示す。この実験ではトポイソメラーゼ阻害剤により S 期細胞のみに特異的に DSB が生じている。4 時間後には薬剤によって生じた一次的 DSB の検出量を遙かに超えた量の H2AX を有する細胞集団がみられる。これらの細胞集団がアポトーシスであることは今までの実験で証明している (Huang X ら Cell Prolif 2005)。

このように本方法は DNA 傷害因子によってもたらされる一次的 DSB はもとより、アポトーシスによる DSB も検出でき、両者は H2AX 検出量の違いによって明確に区別される。すなわち細胞周期のどの時期に DSB が生じアポトーシスになるのか、DNA 傷害を主たる作用効果とする抗癌剤の作用機序解明に欠かせない細胞周期、DSB、およびアポトーシスの三者を解析できる優れた方法である。細胞間で抗癌剤効果に違いがあった場合はその原因を細胞周期関連蛋白、DNA 損傷修復蛋白発

現や、MM 修復機構の違いから検討する。培養細胞を用いて基礎的実験を行った後は、摘出腫瘍からの初代培養を行い本方法を用い個別治療への応用を検討する。一方で低悪性度 astrocytoma, 高悪性度 astrocytoma そして GB の一連の腫瘍の病理組織切片において、

H2AX や MM 修復蛋白をはじめ DNA 損傷修復に係わる因子の発現を調べ、これらの因子と悪性化との関係を調べる。

## 2. 研究の目的

DNA 損傷マーカー H2AX を用いて GB における抗癌剤作用機序を解析し、またその結果をもとに DNA 損傷修復応答機構からみた glioma の悪性化メカニズムを解析することを目的とする。申請者は DNA 損傷検出の画期的マーカーである H2AX を用いた実験に長年携わってきた。これを用いた作用機序が不明の点が多い抗癌剤効果を GB において調べるとともに、殆ど研究がされていない DNA 損傷応答機構から glioma の悪性化メカニズムを調べる。

(1) 抗癌剤テモゾロミド (TMZ) の作用機序を DSB に焦点を置き細胞周期との関連において解析する。H2AX の特異抗体を用いて細胞周期の上から DSB およびアポトーシスを検出する本方法は DNA 傷害性を有する抗癌剤の細胞効果を解析する上で画期的である。本研究では、TMZ を中心に、抗癌剤を培養細胞に加え、H2AX 量と DNA 量を FCM を用いて検出し、抗癌剤による DSB やアポトーシス誘導を細胞周期の上から調べ抗癌剤の作用機序に迫る。

(2) 病理組織切片での DNA 損傷修復因子の免疫組織学的染色を行い、これらの因子の発現の有無と悪性化との相関を調べる。

GB は低悪性度 astrocytoma が悪性度が上昇して生じるものと、de novo で生じるものがある。低悪性度 astrocytoma から GB のそれぞれ、および de novo 発生の GB において、DNA 損傷修復関連因子 (H2AX, ATM, ATR, Chk1, Chk2 など) および MM 修復機構にかかわる因子 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) の発現を免疫組織学的検討し、悪性化とこれらの因子発現の有無との相関を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 培養細胞に抗癌剤を臨床応用可能な濃度に加えて培養する。抗癌剤濃度と作用時間はそれぞれの抗癌剤で予備実験を行いつつ決定する。経時的に細胞を採取した後、固定し (1% formaldehyde で 15 分間 4 度で固定後、80% ethanol で固定するのが適する事は既に判明している。Kurose ら Cytometry A 2005)、抗ヒト H2AX マウス抗体を 1 次抗体に用い、蛍光標識 2 次抗体 (FITC 標識抗マウ

ス免疫グロブリン)と反応させる。細胞核 DNA 量測定のために細胞を propidium iodide (PI) と反応させる。RNase で処理した後、FCM を用いて FITC と PI の蛍光量を同時測定する。10000 個の細胞を測定し付属のソフトで PI による DNA ヒストグラムと、FITC と PI の二次元サイトグラムを描く。PI 量すなわち DNA 量で細胞周期を評価し、FITC で  $\gamma$ H2AX、すなわち DSB やアポトーシスを評価する。

(2) 細胞間で抗癌剤効果が異なる機序を DNA 損傷応答の点から調べる。

前述の実験によって細胞間での抗癌剤効果の違いが見られた場合、p53 等の癌抑制遺伝子の欠失や、細胞周期関連蛋白、DNA 損傷修復関連因子および MM 修復因子の発現の相違が抗癌剤応答の違いになって表れる可能性が考えられ、これらの蛋白の発現を調べることで抗癌剤の作用機序に迫る。

(3) 細胞増殖停止がアポトーシスか senescence によるものかを調べる。1 の結果、アポトーシスによらない細胞周期停止が見られた場合、senescence の可能性がある。そこで senescence のマーカーである p16 や senescence -galactosidase の発現を細胞化学的に調べる。

(4) 病理組織切片での DNA 損傷修復因子の免疫組織学的染色を行い、これらの因子の発現の有無と悪性化との相関を調べる。低悪性度 astrocytoma, 高悪性度 astrocytoma, GB のパラフィン包埋病理組織切片を用い DNA 損傷修復関連因子 (H2AX, ATM, ATR, Chk1, Chk2 など), MM 修復因子 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) の発現を免疫組織学的に調べる。低悪性度 astrocytoma から発生する GB では一連の腫瘍においては DNA 損傷修復関連因子の発現と悪性化の相関を調べる。またこれら二次的 GB と de novo 発生の GB での DNA 損傷修復関連因子の発現の違いを調べ、悪性化や発生の機構を検討する。

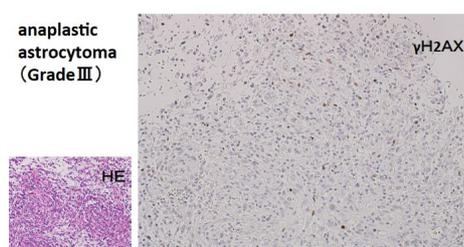
#### 4. 研究成果

(1) 現在標準的 GB の治療薬である TMZ を用いて、GB 培養細胞株 4 種類、および対象として用いた正常ヒトアストロサイトの DNA 傷害、アポトーシス誘導、細胞周期を調べた。いずれの細胞にも顕著なアポトーシスは誘導されず、DNA 傷害を生じるがそれが回復するもの、DNA 傷害を生じそれが回復されず senescence に陥るもの、細胞周期がとまるものがみられ、その反応はそれぞれの細胞株によって異なっていた。したがって、現在 GB の治療に標準的に用いられている TMZ の作用効果は個々の症例によって大きく異なると

言え、その作用機序の一部は今回の実験で明なになったが、どのような細胞反応が最も TMZ の効果が大きいのか、また作用機序が違う原因は何なのかを探ることが今後重要になってくるであろう。今回の実験ではそこまでの解明には至らなかったが、個々の細胞株による反応の際の原因が解明されればより効果的な抗癌剤投与ができると考えられる。

(2) GB は発生時から GB の所見を示すものもあるが、一般にはより悪性度の低いグリオーマから段階的に悪性度が増して最終的に GB になるものが多数を占める。当施設および関連施設に保管されていた多数の GB 症例の病理組織切片を用いて H2AX と細胞増殖マーカーである MIB-1 の免疫染色を行った。その結果、悪性度の増加と、腫瘍細胞のうち H2AX 陽性を示すものの割合は逆相関した。つまり悪性度が増すと H2AX 陽性を示す細胞が減少する結果となった。当然、悪性度が増すと細胞増殖能のマーカーである MIB-1 陽性率は上昇する。したがって悪性度が増すとより細胞増殖が活発化し DNA 損傷を受ける機会も増すと想定され、脳腫瘍以外のいくつかの腫瘍、肺癌や子宮癌等では悪性度の増加と H2AX 陽性率の増加の比例関係が報告されているが、脳腫瘍では逆の結果となった(結果)。このことは GB においては DNA 損傷に対する正常応答の欠如が悪性化に関与する可能性を示すものである。また GB の重要な病理所見の一つである核の多形性について、多形性の顕著な核の多くは H2AX 陽性であった。すなわち DNA 損傷の蓄積が正常な核分裂を阻害し核の多形性に繋がっていることを示唆している。また H2AX 強陽性を示し、もはや増殖能はないと考えられる多形性核においても MIB-1 陽性を示すものが多数みられたが、このような核は最早正常の増殖能は失っていると考えられる。脳腫瘍の病理診断において MIB-1 陽性率の評価や核の多形性の評価は極めて重要であるが、MIB-1 陽性核が必ずしも増殖能を有する核であるとは限らない事が分かり、MIB-1 陽性核に対する認識を変える必要がある。さらに核の多形性は DNA 損傷蓄積の結果と推測され核の多形性自体が直接的な悪性度の指標にならないことも重要な知見である。

#### 結果②





部門研修会 2012.6.17 青森県黒石市

黒瀬顕 . 髄膜腫 , 血管周皮腫の病理 . 教育  
セミナー . 第 30 回日本脳腫瘍病理学会  
2012.5.25 名古屋

黒瀬顕 . サイトメトリーの細胞動態解析と  
臨床病理への応用 . 特別講演 第 28 回北日  
本病理研究会 2011.6.10 弘前

黒瀬顕 , 刀稱亀代志 , 小島啓子 . 細胞核 DNA  
傷害を可視化・定量化する . シンポジウム 3  
「細胞診におけるクロマチンの意義」 第 52  
回日本臨床細胞学会総会 2011.5.22 福岡

黒瀬顕 . アストロサイト系腫瘍の病理診断  
とピットフォール . 臓器別診断講習会 第  
100 回日本病理学会総会 2011.4.28 横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~anatomol/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

黒瀬 顕 (KUROSE, Akira)  
弘前大学大学院医学研究科・教授  
研究者番号 : 70244910