

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 26 日現在

機関番号：17301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790406
研究課題名（和文） 53BP1 核内フォーカスを用いた食道上皮内腫瘍における遺伝子不安定性の特徴解析
研究課題名（英文） Feature analysis of genomic instability using a level of 53BP1 nuclear focus in esophageal intraepithelial neoplasm
研究代表者 三浦 史郎（MIURA SHIRO） 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教 研究者番号：80513316

研究成果の概要（和文）：

多くの腫瘍化過程にはゲノム不安定性（GIN）が関与し、悪性度と相関する。食道がん化過程における GIN の発現意義について解析した。GIN の指標として、53BP1 という DNA 二重鎖切断部位に集簇する蛋白を用いた。扁平上皮内腫瘍の異型度が増すにつれ、53BP1 の発現が増加していた。食道扁平上皮がん化過程では GIN の関与があり、癌化に伴い DNA 損傷応答の破綻が示唆された。蛍光免疫染色における 53BP1 の発現は、食道上皮内病変における悪性度の推定指標となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Genomic instability (GIN) is generally considered to be a central aspect of any carcinogenic process and is correlated with malignant potential. We have examined significance of GIN in esophageal carcinogenesis. We use a protein of 53BP1 localized at the sites of DNA double strand breaks and forms discrete nuclear foci to detect GIN. In this study, grade of esophageal dysplasia increases, expression of 53BP1 was increased. This suggested a constitutive activation of DNA damage response in esophageal tumors and increased GIN with progression of cancer. The detection of 53BP1 expression by immunofluorescence can be a useful histological marker to estimate the malignant potential of human esophageal intraepithelial neoplasm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：食道上皮内腫瘍、扁平上皮異形成、ゲノム不安定性、53BP1、DNA 損傷応答

1. 研究開始当初の背景

（1）食道癌は、消化管癌の中でも胃癌や大腸癌と比較して予後が不良であり、早期発見、早期治療が望まれる代表的癌の 1 つである。最近では早期食道癌、特に上皮内癌（carcinoma in situ: CIS）において、患者の負担が軽く、QOL が良好な内視鏡的粘膜切除といった低侵襲治療が施行されるようになった。

（2）食道の上皮内腫瘍性病変は、低異型度上皮内腫瘍（low grade intraepithelial neoplasia: LG-IN）、高異型度上皮内腫瘍（high grade intraepithelial neoplasia: HG-IN）に分類され、CIS は HG-IN に含まれるようになったが、それらの用語の定義や CIS と IN の病理学的解釈について混乱が生じている。その 1 つの原因としては組織異型度の評価基準の病理医間の見方の相違にあると考えられ、CIS と IN の鑑別に役立つ悪性度の

指標となる新たな因子と組織学的異型度との関連を解明することが今後重要と becoming.

(3) 我々は、原爆被爆者に発生した固形癌と原爆放射線被曝との関連を分子疫学的に検討し、被爆者固形癌の発症に関与する分子異常とその機構を明らかにすることを目標に研究を行っているが、その過程でGINと細胞の癌化の関連を見出してきた。腫瘍抑制遺伝子 p53 結合タンパク質として同定された 53BP1 (P53-binding protein 1) は多種多様の細胞に存在する核内タンパクで、DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) 活性状態では、DNA 二重鎖切断 (DNA double strand breaks: DSBs) 部位に速やかに集積し核内フォーカスを形成する分子生物学的性質を有する。放射線関連腫瘍の分子病理学的研究過程で得られた tumorigenesis 進展におけるGINの亢進の重要性に着目し、放射線関連以外の腫瘍組織においても、組織パラフィン切片上での蛍光免疫染色を用いた 53BP1 核内フォーカス形成とGINとの関連、及び悪性化の指標としての意義を見出した。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、GINの細胞学的指標としての P53-binding protein 1 (53BP1) 核内フォーカス形成を蛍光免疫染色により評価し、食道上皮内腫瘍の(癌化過程におけるGINの意義と新規腫瘍組織マーカーとしての可能性を検討することにある。

(2) 特に上皮内癌の診断に苦慮する食道上皮内腫瘍におけるGINの意義と組織学的異型度との関連を検討する。

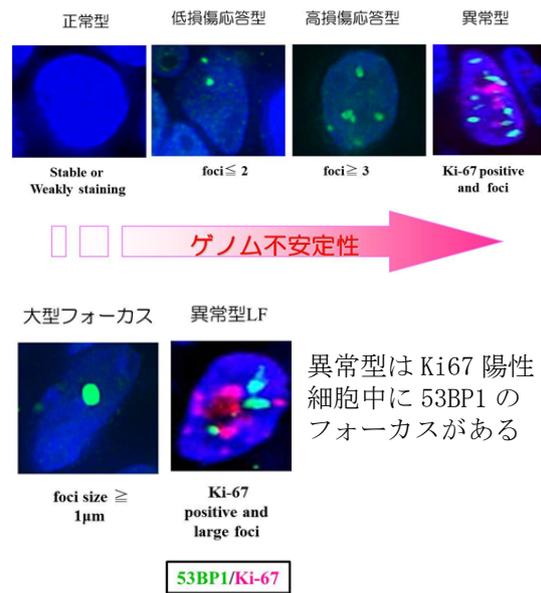
3. 研究の方法

(1) 対象は、食道癌手術症例 22 例を用い、その中から以下の部位を選択し、評価した。
①正常扁平上皮 (15 部位)、②LG-IN (10 部位)、③HG-IN (10 部位)、④CIS (12 部位)、⑤浸潤部 (18 部位)。

(2) 抗 53BP1 抗体 および 抗 Ki-67 (MIB-1) 抗体による蛍光二重免疫組織化学染色を行い、対物レンズ 100 倍・5 視野における 53BP1-NF の発現型を解析した。

(3) 発現パターンを以下のように分類した。
①53BP1-NF 発現型の分類: 正常型 (0 個)、低損傷応答型 (1~2 個)、高損傷応答型 (≥ 3 個)、大型フォーカス(LF) (≥ 1.0 μm)。
②DNA 損傷応答の分類: DNA 損傷応答型 (Ki-67 陰性細胞での 53BP1-NF 発現)、DNA 損傷応答異常型 (Ki-67 陽性細胞での

53BP1-NF 発現)。



異常型は Ki67 陽性細胞中に 53BP1 のフォーカスがある

4. 研究成果

(1) 食道上皮がん化過程における 53BP1 の発現率 (表 1): 53BP1 の発現率は、正常扁平上皮 (23%)、LG-IN (34.7%)、HG-IN (34.3%)、CIS (35%)、SCC 表層部 (38.8%) と異型度が増すにつれ、発現率の上昇が見られた。また、SCC 深層 (浸潤深部) では、24.6% と発現率が低下していた。

表 1: 食道上皮がん化過程における 53BP1 の発現率

	n	細胞数	53BP-1 NF 発現率
Normal	15	6172	23.0%
LG-IN	10	5984	34.7%
HG-IN	10	7571	34.3%
CIS	12	9038	35.0%
SCC(表層)	8	4519	38.8%
SCC(深層)	10	6832	24.6%

p-value (Joncheere-Terpstra test) 0.0026*¹

(2) 食道上皮がん化過程における 53BP1/Ki67 の発現パターンとの関連 (表 2): 53BP1 発現型では、低損傷応答型、異常型、LF、異常型 LF において、異型度が増すにつれ、各割合が増加する傾向が見られ、腫瘍進

展過程におけるゲノム不安定性と悪性度との相関をよく表しているものと思われる。発現型の LF と異常型 LF では、LG-IN 以下と HG-IN 以上との間に差が見られ、鑑別因子として有用である可能性が示唆される。また、正常上皮～SCC(表層)までの腫瘍進展過程においては、53BP1 の発現パターンによる各群の相関が確認できたが、SCC (深層)における 53BP1 の発現率は高度に低下していた。これは、浸潤癌細胞におけるゲノム修復過程の異常を意味しているのかもしれない。

表 2 : 食道上皮がん化過程における 53BP1/Ki67 の発現パターンとの関連

	発現型					
	正常型	低損傷応答型	高損傷応答型	異常型	LF	異常型LF
Normal	77.0%	13.2%	9.8%	6.4%	1.6%	0.7%
LG-IN	65.3%	23.2%	11.5%	11.9%	2.5%	0.6%
HG-IN	65.1%	24.5% ^{x2}	9.8%	11.8%	9.9% ^{x3}	3.7% ^{x4}
CIS	65.0%	26.0%	9.0%	16.1%	9.9%	4.3%
SCC(表層)	61.2%	22.3%	16.5%	17.4%	11.0%	4.6%
SCC(深層)	75.4%	16.7%	7.9%	9.2%	3.0%	1.0%
p-value (Jonchere-Terpstra test)		0.0015 ^{x2}	0.0586	0.0015 ^{x3}	<0.0001 ^{x4}	<0.0001 ^{x5}

(3) まとめ: 蛍光免疫染色による 53BP1 核内フォーカスパターンの解析は、増殖マーカーの ki67 との発現を組み合わせることで、食道上皮内腫瘍のゲノム不安定性レベルを推定する指標となり、悪性度と相関する。LG-IN 以下と HG-IN 以上では、ゲノム不安定性レベルに違いがあることから、組織学的鑑別が重要と考えられる。53BP1 は食道上皮内腫瘍の組織学的鑑別診断に有用な新規腫瘍マーカーとなることが示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Oikawa M, Yoshiura k, Kondo H, Miura S (4 番目: 他 2 名) Significance of Genomic Instability in Breast Cancer in Atomic Bomb Survivors: Analysis of Microarray-Comparative Genomic Hybrization Radiation Oncology 2011;6:168-177 (査読有)
DOI: 10.1186/1748-717X-6-168.

(2) Matsuda K, Miura S (2 番目: 他 7 名) Significance of p53-binding protein 1 nuclear foci in uterine cervical lesions: Endogenous DNA double strand breaks and genomic instability during carcinogenesis.

Histopathology 2011;59:441-451 (査読有) DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03963.x.

[学会発表] (計 14 件)

(1) 三浦史郎 (他 6 名): 食道扁平上皮がん化過程でのゲノム不安定性と 53BP1 核内フォーカス形成; 第 101 回日本病理学会 2012. 4. 26-28 東京

(2) Sichijo K, M Matsuyama, Ihara M, Miura S (他 2 名): Evidence for Latent Precursor (Gamma-H2AX Signature) That May Precede Colitis-Associated Cancer; DDW 2012 (Digestive Disease Week) 2012. 5. 19-21 San Diego, CA

(3) 松山睦美, 七條和子, 蔵重智美, 岡山協生, 三浦史郎 (他 2 名): ラット甲状腺濾胞上皮の放射線応答に対する年齢影響の分子病理学的解析; 第 16 回 日本内分泌病理学会学術集会 2012. 10. 11 - 12 仙台

(4) 中島正洋, 三浦史郎 (他 8 名): 原爆被爆者腫瘍組織バンクと分子病理学的研究の現状; 日本放射線影響学会 第 55 回大会 2012. 9. 6 仙台

(5) 七條和子, 高辻俊宏, 福本学, 松山睦美, ムサジヤノワジャンナ, 三浦史郎 (他 2 名): 内部被曝と外部被曝における遺伝子損傷とオートファジーについて; 日本放射線影響学会 第 55 回大会 2012. 9. 7 仙台

(6) 中島正洋, 蔵重智美, 松山睦美, 七條和子, 三浦史郎 (他 2 名): ラット甲状腺濾胞上皮の放射線 DNA 損傷応答と発がん; 第 101 回日本病理学会 2012. 4. 26-28 東京

(7) 松山睦美, 七條和子, 蔵重智美, 三浦史郎 (他 2 名): ラット甲状腺濾胞上皮の放射線誘導オートファジーと年齢依存性解析; 第 101 回日本病理学会 2012. 4. 26-28 東京

(8) 蔵重智美, 松山睦美, 七條和子, 三浦史郎 (他 5 名): 成熟ラット甲状腺濾胞元費の放射線誘発晩発性 DNA 損傷応答と発がん; 第 101 回日本病理学会 2012. 4. 26-28 東京

(9) 七條和子, 高辻俊宏, 福本学, 松山睦

美, ムサジャノヴァジャンナ, 三浦史郎 (他3名): 被爆者の剖検・パラフィン標本を用いた遺伝子損傷とオートファジー機構について; 第101回日本病理学会 2012.4.26-28 東京

(10) 三浦史郎: 放射線治療後にみられた Calcitonin 陰性甲状腺神経内分泌癌の1例: PTEN 遺伝子異常の関与; 第15回日本内分泌病理学会学術総会 2011.11.23-25 東京

(11) 松田勝也, 三浦史郎 (他5名): 53BP1-Ki67 蛍光二重染色法による子宮頸部高度異型成と上皮内癌の鑑別 第7回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス 2011.6.4 広島

(12) 三浦史郎 (他5名): 長崎原爆被害者腫瘍組織バンクの経過報告 第7回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス 2011.6.4 広島

(13) 松田勝也, 三浦史郎 (他6名): 53BP1-Ki67 蛍光二重染色法による子宮頸部高度異型性と上皮内癌の鑑別 第100回日本病理学会総会 2011.4.28-30 横浜

(14) 三浦史郎 (他4名): 甲状腺にみられた放射線治療関連神経内分泌癌の1症例 第100回日本病理学会総会 2011.4.28-30 横浜

[図書] (計1件)

(1) 薬学生・薬剤師のための臨床検査・最新病態検査: 病理・細胞診、遺伝子検査; 岸川正大, 穴見正信, 三浦史郎 自然科学社 Page305-307 (2011.06)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)
該当なし

○取得状況 (計0件)
該当なし

[その他]

ホームページ等

[http://users.tls-style.jp/nagasaki-u/pa
thology/](http://users.tls-style.jp/nagasaki-u/pa
thology/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 史郎 (MIURA SHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

助教

研究者番号: 80513316

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし