

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592021

研究課題名(和文) 早期DNA損傷修復機構の評価法に基づく胆管癌における表層拡大進展形成機序の解明

研究課題名(英文) Early DNA damage response in residual carcinoma in situ at ductal stumps and local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

若井 俊文 (Wakai, Toshifumi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50372470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：胆管癌における胆管切離断端に遺残した上皮内癌の局所再発には、早期DNA損傷修復仲介因子p53-binding protein 1 (53BP1)の不活化およびアポトーシス減少と関連がある。一方、53BP1活性化を介した早期DNA損傷修復応答およびアポトーシス誘導は、胆管切離断端が上皮内癌陽性であっても局所再発せずに術後長期生存する分子生物学的機序の一つと考えられる。早期DNA損傷修復機構に着目した結果、「胆管癌の表層拡大進展の形成は、浸潤癌が上皮内進展して形成される場合が50%、field carcinogenesisの結果残存した上皮内癌部が表層拡大進展として形成される場合が50%であった。

研究成果の概要(英文)：Clinically evident local recurrence of residual carcinoma in situ at ductal stumps is closely associated with 53BP1 inactivation and decreased apoptosis. In contrast, apoptosis associated with early 53BP1-mediated DNA damage response is one of the molecular biological mechanisms that permit a small proportion of patients with residual carcinoma in situ at ductal stumps to survive in the long term with no evidence of local recurrence. Based on the Early DNA damage response, 50% of patients with formation of intraepithelial spread of invasive carcinoma, whereas 50% of patients with formation of field carcinogenesis. The formation of superficial intraepithelial spread results from both intraepithelial spread of invasive carcinoma and field carcinogenesis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：早期DNA損傷修復機構 胆管癌 表層拡大進展 p53-binding protein 1 field carcinogenesis

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、早期発癌過程における DNA 二重鎖切断(DSB)の重要性が報告されており、発癌過程では核内で DNA 損傷と DNA 損傷部の修復が起こっており、細胞の DNA 損傷が修復できない状態に陥ると癌化することが解明されている¹⁾。DNA 損傷部位に ATM が動員され活性化し、活性化された ATM はヒストン H2AX(Ser139)をリン酸化する(Ser139 がリン酸化されたヒストン H2AX は γ -H2AX と呼ばれる)。 γ -H2AX はリン酸化依存的なタンパク質相互作用により 53BP1 が DSB 部位周辺に動員され、Tudor ドメインを介してメチル化ヒストンに結合し DNA 損傷部の修復を行う。また、活性化された ATM によって Chk2 の 68 番目のスレオニン(Thr68)がリン酸化される。活性化された Chk2 は、p53 の Ser20 をリン酸化し p53 を安定化させることで、細胞周期の停止やアポトーシスを誘導することが解明されている。

(2) 胆管癌は表層拡大進展を伴うことがあり、術式選択を決定する際に胆管切離線の設定に苦慮することもある。実際に、表層拡大進展により術中迅速病理診断で胆管切離断端が癌陽性と診断されることもある。2005 年に申請者らは、胆管癌における胆管切離断端での癌遺残陽性例を“浸潤癌陽性例”と“上皮内癌陽性例”とに分けて生存解析を行い、浸潤癌陽性例は極めて予後不良であることを世界で初めて報告した²⁾。

さらに、上皮内癌陽性群の遠隔成績は比較的良好であるが、胆管切離断端に遺残した上皮内癌の局所再発には、53BP1 の不活化および apoptosis の減少が関与していることを報告した³⁾。術中の胆管切離断端における癌陽性という事態を打開するために術前に胆管上皮の組織生検を行い、表層拡大進展部の拡がりを精査した後に胆管切離線の設定を行っている。

しかし、胆管上皮の組織生検材料は非常に小さいことと、悪性閉塞性黄疸による炎症異型が加わると癌・非癌の病理組織診断が困難となる場合がある。

(3) 以前より胆道癌の発癌には field carcinogenesis の関与が示唆されているが、臨床で指摘される胆管癌の表層拡大進展は、浸潤癌が上皮内を進展して形成されるのか、field carcinogenesis の結果、field の一部が浸潤し残存した上皮内癌部が表層拡大進展として形成されるのかを説明できる科学的根拠は解明されていない。

過去の申請者らの研究成果^{2,3)}から表層拡大進展の形成機序には、DNA 損傷部に対する 53BP1 を介した修復機構に明確な相違点があることが推測される。申請者らは DNA 損傷と 53BP1 による DNA 損傷修復機構に着目し、胆管癌の表層拡大進展の形成は、浸潤癌が上皮

内進展して形成される場合と field carcinogenesis の結果残存した上皮内癌部が表層拡大進展として形成される場合とがあり、両者における表層拡大進展部では、DNA 損傷部に対する 53BP1 を介した DNA 修復機構に相違点がある」という仮説をたて、本研究を企画した。

参考文献：

1) Gorgoulis VG, et al. Nature 2005 ; 434 : 907-913.

2) Wakai T, et al. Cancer 2005 ; 103 : 1210-1216.

3) Wakai T, et al. International journal of Oncology 2011 ; 38 : 1227-1236.

(4) 申請者らは、p53-binding protein 1 (53BP1) による早期 DNA 損傷修復機構に着目し、「胆管癌の表層拡大進展の形成は、浸潤癌が上皮内進展して形成される場合と field carcinogenesis の結果残存した上皮内癌部が表層拡大進展として形成される場合とがあり、両者における表層拡大進展部では、DNA 損傷部に対する 53BP1 を介した DNA 修復機構に相違点がある」という仮説をたて、本研究を企画した。

2. 研究の目的

「胆管癌の浸潤部と表層拡大進展部における DNA 損傷部に対する 53BP1 を介した DNA 損傷修復機構の相違点を解明し、表層拡大進展形成機序を解明すること」である。

3. 研究の方法

胆管癌切除例を対象として、浸潤部と表層拡大進展部(上皮内癌)における DNA 損傷および DNA 損傷修復仲介因子 53BP1 の核内発現を二重蛍光免疫組織染色にて検出し、DNA 損傷部への 53BP1 共局在率を評価する。浸潤部と表層拡大進展部をマイクロダイセクションして p53 (exon5-8)および 53BP1 (exon21&22)のシークエンスにより p53 遺伝子変異と 53BP1 遺伝子変異を解析する。胆管癌の浸潤部と表層拡大進展部における DNA 損傷部に対する 53BP1 を介した早期 DNA 損傷修復機構の相違点を明らかにし、表層拡大進展の形成機序を解明する。

4. 研究成果

(1) 2007 年～2011 年の 5 年間に根治切除が施行された肝外胆管癌 43 例を対象とした。進展範囲に関して切除標本を再検鏡し、浸潤癌部と非浸潤癌部(CIS)を mapping し、病理学的記載は胆道癌取扱い規約第 6 版に準じた。表層拡大進展の定義は、浸潤部から > 20 mm 以上の水平方向への表層進展とした。後方視的に表層拡大進展部の画像評価を行った。

術後病理組織学的検査で 43 例中 8 例(18.6%)が表層拡大進展を伴う広範囲胆管癌であった。男女比は 5:3、年齢中央値は 77

歳(64~81歳)であった。術式の内訳は、胆道再建を伴う肝葉切除3例(門脈合切1例含む)、幽門輪温存膵頭十二指腸切除3例、胆嚢床切除+幽門輪温存膵頭十二指腸切除1例、肝外胆管切除1例であった。腫瘍径の中央値は64mm(53~78mm)であった。十二指腸側への表層進展長の中央値は29.5mm(8~69mm)、肝側への表層進展長の中央値は26.5mm(6~38mm)であった。8例。5例は十二指腸側に表層拡大進展(>20mm以上)を認め、5例は肝側に認め、うち2例では両側方向に表層拡大進展を認めた。術前画像診断で表層拡大進展を診断できたのは8例中5例であり、術前に表層拡大進展を診断できなかった3例における表層拡大進展部は病理学的に表面平坦型(Ib病変)であった。8例中6例は胆管切離断端癌陰性であったが、2例が胆管切離断端CIS陽性であった。

表層拡大進展を伴う広範囲胆管癌における表面平坦型病変を術前画像診断することは困難である。術中胆管断端CIS陽性に対する追加切除・拡大手術は、年齢、耐術性を考慮した上で慎重に判断するべきである。

(2) DNA損傷部の検出には γ -H2AXモノクローナル抗体による免疫組織化学染色、DNA損傷修復仲介因子53BP1の検出には蛍光免疫組織染色を行い共焦点レーザー走査顕微鏡にて53BP1の核内発現を検出した。 γ H2AXモノクローナル抗体と53BP1抗体による二重蛍光免疫組織染色を行い、両者の核内発現の局在も検討した。DNA損傷部の修復状態の検出にはp53、Ki67モノクローナル抗体による免疫組織化学染色、TUNEL法によりapoptosisを検出した。

胆管切離断端におけるCISと浸潤癌との間でp53標識率、Ki67標識率に差は認めなかったが、浸潤癌では γ -H2AX標識率($P=0.031$)は有意に高く、apoptosis標識率($P=0.004$)は有意に低かった。53BP1核内発現様式は、浸潤癌では全例びまん性集積であった。CISでは53BP1核内発現びまん性集積が10例、ドット状集積が4例であり、apoptosis標識率はびまん性集積が中央値1%に対しドット状集積では22%と有意に高かった($P=0.001$)。CIS群では、びまん性集積していた10例の累積10年局所再発率は100%であり、ドット状集積していた4例の0%と比較して有意に局所再発発生率が高かった($P=0.020$)。

(3) 胆管切離断端が上皮内癌陽性で局所再発により原病死亡した症例の組織像を呈示する(図1A-D)。53BP1核内発現様式は、びまん性集積しており(図1B,C)、Ki-67陽性細胞を全層性に認め、TUNEL法によるアポトーシス陽性細胞は認められない(図1D)。一方、胆管切離断端が上皮内癌陽性であったにもかかわらず長期無再発生存中の症例における組織像を呈示する(図1E-H)。53BP1核内発現様式はドット状集積であり(図1E,G)

基底膜側にKi-67陽性細胞を認め、表層部にはTUNEL法によるアポトーシス陽性細胞を認める(図1H)。

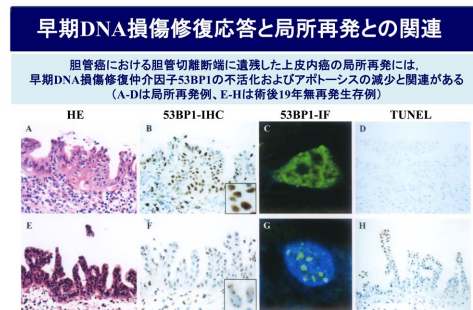


図1 早期DNA損傷修復応答と局所再発との関連

(4) γ H2AXおよび53BP1との二重蛍光免疫組織染色を行い、53BP1核内ドット状集積における両者の核内発現の局在を検討した結果(図2)上皮内癌CIS部に γ H2AX(図2C)、53BP1(図2D)の核内ドット状集積を認め、merge(図2E,F)では53BP1は優勢に γ H2AXに共局在していた。Mergeした拡大図(図2F)の赤線部分のintensity curvesをグラフ化(図2G)すると、53BP1のintensity curve(緑)の2つのピーク(矢印)は γ H2AXのintensity curve(赤)のピークと一致しており、共局在していることが明確に理解できる。

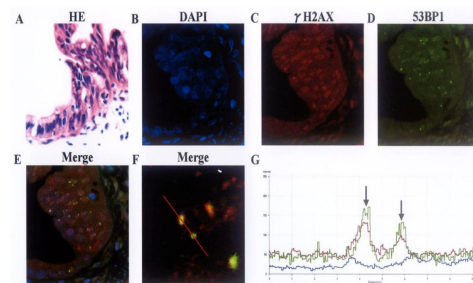


図2 53BP1核内ドット状集積における γ H2AXおよび53BP1との二重蛍光免疫組織染色

胆管癌における胆管切離断端に遺残した上皮内癌の局所再発には、早期DNA損傷修復仲介因子53BP1の不活化およびアポトーシス減少と関連がある。一方、53BP1活性化を介した早期DNA損傷修復応答およびアポトーシス誘導は、胆管切離断端が上皮内癌陽性であっても局所再発せずに術後長期生存する分子生物学的機序の一つと考えられる。

p53-binding protein 1(53BP1)による早期DNA損傷修復機構に着目した結果、「胆管癌の表層拡大進展の形成は、浸潤癌が上皮内進展して形成される場合が50%、field carcinogenesisの結果残存した上皮内癌部が表層拡大進展として形成される場合が50%であった。

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 4 件)

Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Korita PV, Ajioka Y, Hatakeyama K., Early DNA damage response in residual carcinoma in situ at ductal stumps and local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma、J Hepatobiliary Pancreat Sci.、査読有、20 巻、2013、362-369
DOI: 10.1007/s00534-012-0539-1

Ohashi T, Wakai T, Kubota M, Matsuda Y, Arai Y, Ohyama T, Nakaya K, Okuyama N, Sakata J, Shirai Y, Ajioka Y, Risk of subsequent biliary malignancy in patients undergoing cyst excision for congenital choledochal cysts、J Gastroenterol Hepatol.、査読有、28 巻、2013、243-247
DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07260.x

若井俊文、【総説】胆管癌に対する外科治療：早期 DNA 損傷修復応答と局所再発との関連、新潟県医師会報、査読無、第 759 号、2013、2-9

Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Maruyama T, Ohashi T, Korita PV, Ajioka Y, Hatakeyama K, Clinicopathological features of benign biliary strictures masquerading as biliary malignancy、American Surgeon、査読有、78 巻、2012、1388-1391
PMID: 23265129

〔学会発表〕(計 2 件)

Toshifumi Wakai, Jun Sakata, Yuki Hirose, Tomohiro Katada, Natsuru Sudo, Taku Ohashi, Kazuyasu Takizawa, Kabuto Takano, Takashi Kobayashi, Masahiro Minagawa, Early DNA damage response in residual carcinoma *in situ* at ductal stumps and local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma、11th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (Seoul, Korea) 2014.3.25

若井俊文, 堅田朋大, 須藤 翔, 齋藤敬太, 丸山智宏, 滝沢一泰, 坂田 純, 高野可赴, 小林 隆, 皆川昌広、企画関連口演 101 表層拡大進展を伴う広範囲胆管癌に対する術前評価と外科治療戦略、第 69 回日本消化器外科学会総会 ホテルハマツ(福島県、郡山市) 2014.7.18

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若井 俊文 (WAKAI, Toshifumi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：50372470

(2) 研究分担者

松田 康伸 (MATSUDA, Yasunobu)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：40334669

味岡 洋一 (AJIOKA, Yoichi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：80222610

小山 諭 (KOYAMA, Yu)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：10323966

永橋 昌幸 (NAGAHASHI, Masayuki)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：30743918

(3) 連携研究者

()

研究者番号：