

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462024

研究課題名(和文) 難治性消化管癌の染色体ダイナミクス解析と革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Chromosomal dynamics and development of novel therapy in gastrointestinal tract cancer

研究代表者

佐伯 浩司 (Saeki, Hiroshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80325448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：EB2が細胞分裂期において特異的に微小管上から消失すること、リン酸化酵素によってリン酸化修飾されることを見出した。さらに、EB2が細胞分裂期において特異的にリン酸化されることで、紡錘系との結合性を低下させることが示された。EB2のリン酸化部位を決定した後、非リン酸化型EB2をもつ細胞を作製して観察したところ、非リン酸化型EB2は細胞分裂期において微小管に強く結合することで微小管の過剰な安定化を促し、細胞分裂期の進行遅延を誘導した。さらに、非リン酸化型EB2をもつ正常細胞を一定期間培養したところ不均等な染色体分配が誘導され、染色体数が維持できずに異数性を示す細胞が観察された。

研究成果の概要(英文)：Temporal regulation of microtubule dynamics is essential for proper progression of mitosis and control of microtubule plus-end tracking proteins by phosphorylation is an essential component of this regulation. Aurora B and CDK1 phosphorylate microtubule end-binding protein 2 (EB2) at multiple sites within the amino terminus and a cluster of serine/threonine residues in the linker connecting the calponin homology and end-binding homology domains. EB2 phosphorylation, which is strictly associated with mitotic entry and progression, reduces the binding affinity of EB2 for microtubules. Expression of non-phosphorylatable EB2 induces stable kinetochore microtubule dynamics and delays formation of bipolar metaphase plates in a microtubule binding-dependent manner, and leads to aneuploidy even in unperturbed mitosis. Aurora B and CDK1 temporally regulate the binding affinity of EB2 for microtubules, ensuring kinetochore microtubule dynamics, proper mitotic progression and genome stability.

研究分野：消化管外科

キーワード：染色体不安定性 集学的治療 消化管癌

1. 研究開始当初の背景

癌の治療成績向上のためには手術療法に加え、化学療法・放射線療法を含めた集学的治療のさらなる発展が望まれる。特に化学療法、放射線療法感受性の分子機構の解明は、実臨床へのフィードバックの観点からも急務である。

治療効果予測因子研究の一環として、術前温熱・化学・照射療法を行った食道癌症例を対象に、治療前の生検材料を用いて検討したところ、p21 蛋白低発現例で有意に組織学的治療効果が低く、また p53、p21 の組み合わせで解析したところ、p53 変異かつ p21 低発現例で有意に組織学的治療効果が低いという結果であった (Ishida, Saeki et al. *Anticancer Res* 2007)。このように、ある症例においては p53、p21 が治療効果予測因子として有用であると言えるが、これらの因子だけでは予測困難な症例が存在することも事実であり、更なる研究が望まれる。

SNP-CGH の進歩に伴い DNA コピー数の異常など染色体ダイナミクスが詳細にとらえられるようになり、これまでは検出不能であった染色体異常の実態が解明されはじめた。血液腫瘍では、濾胞性リンパ腫において多数の染色体でコピーニュートラル LOH が存在することが報告された (Ross CW et al. *Clin Cancer Res* 2007)。その後骨髄性白血病においても同様の報告がなされ (Tuna M et al. *Trends Mol Med* 2009, O'Keefe C et al. *Blood* 2010)、血液腫瘍の発生過程において重要な役割を果たすことが示唆された。さらに固形癌においても、乳癌、大腸癌、肺癌などにおいてもこの現象を多く認めることが報告され (Murthy SK et al. *Mod Pathol* 2002, Andersen CL et al. *Carcinogenesis* 2007, Ogiwara H et al. *Oncogene* 2008)。固形癌の発癌過程における意義について現在注目が集まっている。

我々は、食道癌において解析を行い、p53 遺

伝子変異を伴う食道癌では染色体不安定性に伴って起こる p53 遺伝子座のコピーニュートラル LOH が癌発生の重要なメカニズムであることが明らかとした。その結果をもとに、食道癌の染色体異常の特徴と発癌メカニズムに関して新たな知見を提唱した (Saeki et al. *Clin Cancer Res* 2011)。一方、これまで染色体異常が癌治療感受性に影響することに関しては報告がある (Weiss MB et al. *Oncogene* 2010) ため、本研究では癌集学的治療のオーダーメイド化に関して新しい知見が得られることが予測され、臨床での治療戦略構築への応用が期待される。

2. 研究の目的

進行消化管癌症例に対する外科治療単独での治療成績は十分とは言えない。そのような難治性固形癌の治療成績向上のためには、手術療法に加え、化学療法・放射線療法を含めた集学的治療のさらなる発展が望まれる。そのためには、まず癌の病態を分子レベルで詳細にとらえ、治療にフィードバックすることが強く求められる。一方、近年の SNP-CGH の開発によりゲノムコピー数の変化をアレル特異的に検出することが可能となった。我々は、このゲノム解析技術を用いて食道癌の染色体異常の特徴と発癌メカニズムに関して新たな知見を提唱した (Saeki et al. *Clin Cancer Res* 2011)。本研究では、難治性消化管癌 (食道癌、胃癌、大腸癌) における染色体ダイナミクスをアレル特異的に詳細に解析することで染色体異常の特徴を明らかにし、新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) “染色体不安定性” という用語の定義に関しては、文献によりさまざまな見解がある。我々は、これまでの研究成果から、図 3 に示すように、染色体不安定性には DNA コピー数

の増加を伴うものと、DNA コピー数が不変であるものが存在すると考えている。両者を区別して評価するには、複数の解析系による検証が必要であるため、以下のように順次解析をすすめる。

2) 対象は、食道癌、胃癌、大腸癌の細胞株、切除標本とする。まずは、laser scanning cytometry による DNA ploidy 解析と SNP-CGH によるアレル特異的なゲノム変化 (コピーニュートラル LOH を含む) の解析を行い、DNA コピー数の変化に着目して染色体不安定性の成因別に大別する。さらに、マイクロサテライトマーカーによる LOH 解析、CGH、FISH などを行い、これまで蓄積された遺伝子解析データと対比することで、臓器ごとにゲノムデータベースを作成する。

3) 上記の結果が得られた後は、データベースを基にさまざまな臨床病理学的因子と対比し、さらに化学療法や放射線療法の感受性を実際の症例の治療経過をもとに解析することが可能である。これまで染色体異常と薬剤感受性の相関に関しては報告がある (Weiss MB et al. *Oncogene* 2010) ため、特徴的な結果が得られることが期待され、それらの結果を臨床での治療戦略構築へと応用していく。

4) 最終的に、得られた臨床検体のデータを基に細胞株を用いた実験的検証へ展開する。予備実験にていくつかの細胞株の characterize はすでに行っているため、適した細胞株をピックアップして演繹的な手法により 2) 3) の事象を検証する。例えば、コピーニュートラル LOH のメカニズムのひとつの可能性として、DNA2 重鎖切断修復経路の異常が考えられる。この DNA2 重鎖切断修復には BRCA2、Rad51 をはじめとして多くの因子が関わっており、その経路が巧妙に制御されることが知られている。研究代表者は、哺乳類細胞において I-SceI と GFP 遺伝子レポーターを用いた系を用いた機能解析を行い、

BRCA2 の機能ドメインについて先駆的な成果を発表してきた (Saeki et al. *PNAS*, 2006)。よって、DNA 2 重鎖切断修復関連蛋白質の機能ドメインの解析など、感受性規定因子の分子レベルでの解析も可能である。

4. 研究成果

1) LINE-1 はゲノム全体に渡って存在する転移因子であり、そのメチル化はゲノム全体のメチル化の指標である。一方、染色体不安定性と癌の悪性度の関連が種々の癌で報告されている。食道扁平上皮癌における LINE-1 メチル化異常および染色体不安定性の生物学的意義について明らかにすることに検討した。術前無治療で手術を行った食道扁平上皮癌 105 例を対象とした。癌部と非癌部の DNA を用いて、パイロシーケンス法にて LINE-1 メチル化解析を行った。対象を高メチル化群と低メチル化群とに分類し、臨床病理学的因子との関連を検討した。p53 の exon2 - 10 の遺伝子変異解析を direct sequence 法にて行った。代表的な症例にて SNP-CGH を行い、染色体異常を検討した。癌部では非癌部に比して LINE-1 メチル化レベルが有意に低下していた ($p < 0.0001$)。非癌部におけるメチル化レベルと喫煙、飲酒量は有意な逆相関を認めた。癌部における LINE-1 低メチル化は、脈管侵襲、リンパ節転移、病期進行、p53 変異陽性と関連を認めた。高・低メチル化群の 5 年生存率はそれぞれ 61%、33% であり、低メチル化群で有意に予後不良であった ($p = 0.0026$)。癌部の低メチル化と染色体不安定性との間には有意な相関を認め、低メチル化症例では癌の発生・進展に関わる複数の遺伝子領域で染色体異常を認めた。食道癌においてゲノム全体の低メチル化により染色体不安定性が生じ、癌の発生と進展の両者に関与する可能性がある。

2) プロテインキナーゼには、癌の分化や増殖に関連しているものがある。p21-activated kinases (PAKs) はセリン/ト

レオニンキナーゼであり、グループ (PAK1、PAK2、PAK3) とグループ (PAK4、PAK5、PAK6) の2つのサブグループに分類されている。近年、PAKの過剰発現および遺伝子変異による活性化が癌の発育に関与している、との報告がある。消化管癌(食道癌、胃癌、大腸癌)におけるPAK1およびPAK4の遺伝子異常を解析し、癌の発育・進展における意義について明らかにすることを目的に検討した。術前無治療で切除を行った食道癌13例、胃癌8例、大腸癌22例を対象に、それぞれの癌部からDNAを抽出しSNP-CGH解析を行った。PAK1とPAK4遺伝子の増幅、欠失、copy-neutral LOH (CNLOH)、その他のコピー数異常(CNA)を解析した。*p53*変異はダイレクトシーケンシング法にて解析し、SNP-CGHのデータをもとに染色体不安定性をゲノム全体に対するコピー数異常の部位の割合(% defect)で評価した。食道癌においてはPAK1に8例(CNA7例、欠失1例)、PAK4に9例(増幅3例、欠失2例、CNLOH1例、CNA3例)、胃癌においてはPAK1に3例(増幅2例、CNA1例)、PAK4に2例(増幅1例、CNA1例)、大腸癌においてはPAK1に1例(欠失)、PAK4に3例(増幅2例、CNLOH1例)遺伝子異常を認めた。特に食道癌においては、PAK1または4に遺伝子異常を認めた症例は13例中11例(85%)であり、その全例で% defectが高く、*p53*遺伝子変異を10例に認めた。消化管癌においてPAKの遺伝子異常が、癌の発育・進展に関与している可能性がある。特に食道癌においては、染色体不安定性と*p53*遺伝子変異がPAK遺伝子異常と関連していた。

3) これまでに染色体の数を維持するための研究報告は、染色体自身の動態や中心体の制御に関して数多くされてきたが、紡錘糸の制御メカニズムに関しては、いまだ未知の部分が多く残されている。微小管結合性のEBファミリータンパク質は、*MAPRE*遺伝子にコードされたEB1、EB2およびEB3からなる。ま

たEBファミリータンパク質のうち、EB2のみが転写開始点の異なることにより分子量の異なる2つのフォームが存在する。

我々は、紡錘糸の構成成分である微小管の結合タンパク質として知られるEB2が細胞分裂期において特異的に微小管上から消失すること、Aurora BおよびCDK1と呼ばれるリン酸化酵素によってリン酸化修飾されることを見出した。さらに、EB2はリン酸化されると微小管への結合強度が低下することがわかり、EB2が細胞分裂期において特異的にリン酸化されることで、紡錘糸との結合性を低下させることが重要である可能性が示された。そこで、EB2が細胞分裂期において特異的にリン酸化されることの重要性を明らかにするため、EB2のリン酸化部位を決定した後、非リン酸化型EB2をもつ細胞を作製して観察したところ、非リン酸化型EB2は細胞分裂期において微小管に強く結合することで微小管の過剰な安定化を促し、細胞分裂期の進行遅延を誘導した。さらに、非リン酸化型EB2をもつ正常細胞を一定期間培養したところ不均等な染色体分配が誘導され、染色体数が維持できずに異数性を示す細胞が観察された。以上の研究結果より、微小管結合タンパク質のEB2が細胞分裂期においてリン酸化修飾されて紡錘糸への結合性を負に制御されることが、正常な細胞分裂期の進行および染色体数の維持を保証するのに重要であることが明らかとなった。

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 8 件)

Saeki H, Nakashima Y, Zaitzu Y, Tsuda Y, Kasagi Y, Ando K, Imamura Y, Ohgaki K, Ito S, Kimura Y, Egashira A, Oki E, Morita M, Maehara Y: Current status of and

perspectives regarding neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery Today*, 46:261-7, 2016

Saeki H, Tsutsumi S, Yukaya T, Tajiri H, Tsutsumi R, Nishimura S, Nakaji Y, Kudou K, Akiyama S, Kasagi Y, Nakashima Y, Sugiyama M, Sonoda H, Ohgaki K, Oki E, Yasumatsu R, Nakashima T, Morita M, Maehara Y: Clinicopathological Features of Cervical Esophageal Cancer: Retrospective Analysis of 63 Consecutive Patients Who Underwent Surgical Resection. *Annals of Surgery*. 2016 Jan 7. [Epub ahead of print]

Saeki H, Tsutsumi S, Tajiri H, Yukaya T, Tsutsumi R, Nishimura S, Nakaji Y, Kudou K, Akiyama S, Kasagi Y, Nakanishi R, Nakashima Y, Sugiyama M, Ohgaki K, Sonoda H, Oki E, Maehara Y: Prognostic Significance of Postoperative Complications after Curative Resection for Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Annals of Surgery*. 2016 Mar 7. [Epub ahead of print]

Iimori M, Watanabe S, Kiyonari S, Matsuoka K, Sakasai R, Saeki H, Oki E, Kitao H, Maehara Y: Phosphorylation of EB2 by Aurora B and CDK1 ensures mitotic progression and genome stability. *Nature Communications*. 2016 Mar 31;7:11117. doi: 10.1038/ncomms11117.

Kitao H, Morodomi Y, Niimi S, Kiniwa M, Shigeno K, Matsuoka K, Kataoka Y, Iimori M, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y: The antibodies against

5-bromo-2'-deoxyuridine specifically recognize trifluridine incorporated into DNA. *Scientific Reports*. 2016 May 3;6:25286. doi: 10.1038/srep25286.

Saeki H, Watanabe M, Mine S, Shigaki H, Oya S, Ishiyama A, Tsuchida T, Fujisaki J, Baba H, Maehara Y, Sano T: Esophagectomy for superficial esophageal cancer after non-curative endoscopic resection. *Journal of Gastroenterology*, 50:406-13, 2015

Matsuoka K, Iimori M, Niimi S, Tsukihara H, Watanabe S, Kiyonari S, Kiniwa M, Ando K, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Kitao H: Trifluridine induces p53-dependent sustained G2 phase arrest with its massive misincorporation into DNA and few DNA strand breaks. *Molecular Cancer Therapeutics* 14:1004-13, 2015

Kiyonari S, Iimori M, Matsuoka K, Watanabe S, Morikawa-Ichinose T, Miura D, Niimi S, Saeki H, Tokunaga E, Oki E, Morita M, Kadomatsu K, Maehara Y, Kitao H: The 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand in oxaliplatin induces p53-dependent transcriptional repression of factors involved in thymidylate biosynthesis. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015 Jul 24. pii: molcanther.0748.2014. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 5 件)

第 115 回日本外科学会定期学術集会

(2015 年 4 月 16 日、名古屋)

パネルディスカッション

cT3/nearly T4 食道癌に対する集学的治療戦略 - 治療効果と安全性の両立を目指して -

佐伯浩司、工藤健介、堤 亮介、中司 悠、西村 章、秋山真吾、田尻裕匡、堤 智崇、由茅隆文、笠木勇太、財津瑛子、津田康雄、安藤幸滋、中島雄一郎、今村 裕、大垣吉平、沖 英次、前原喜彦

第 70 回日本消化器外科学会総会
(2015 年 7 月 15 日、浜松)

cT 因子からみた cStageII/III 食道扁平上皮癌に対する術前化学放射線療法の意義と治療効果予測バイオマーカー

佐伯浩司、財津瑛子、津田康雄、笠木勇太、中島雄一郎、安藤幸滋、今村 裕、大垣吉平、沖 英次、前原喜彦

第 23 回日本消化器関連学会週間(JDDW 2015)
(2015 年 10 月 9 日、東京)

局所進行食道癌に対する集学的治療の成績と個別化治療への展開

佐伯浩司、中島雄一郎、堤 亮介、工藤健介、中司 悠、西村 章、秋山真吾、田尻裕匡、堤 智崇、由茅隆文、笠木勇太、財津瑛子、津田康雄、安藤幸滋、今村 裕、大垣吉平、沖 英次、前原喜彦

第 53 回日本癌治療学会
(2015 年 10 月 29 日、京都)

食道癌に対する術前治療の効果予測バイオマーカーとしての Rad51 発現の意義

佐伯浩司、中ノ子智徳、堤 亮介、西村 章、中司 悠、田尻裕匡、堤 智崇、由茅隆文、笠木勇太、杉山雅彦、中島雄一郎、園田英人、大垣吉平、沖 英次、前原喜彦

第 26 回日本消化器癌発生学会総会
(2015 年 11 月 20 日、米子)

食道扁平上皮癌における MTH1 発現のバイオマーカーとしての意義

佐伯浩司、秋山真吾、北尾洋之、西村 章、工藤健介、中司 悠、田尻裕匡、堤 智崇、

由茅隆文、笠木勇太、杉山雅彦、中島雄一郎、大垣吉平、園田英人、沖 英次、前原喜彦

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 浩司 (SAEKI HIROSHI)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80325448

(2) 研究分担者

森田 勝 (MORITA MASARU)
独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・統括診療部長
研究者番号：30294937

北尾 洋之 (KITA0 HIROYUKI)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：30368617

沖 英次 (OKI EIJI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：70380392

(3) 連携研究者

なし