

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10691

研究課題名(和文) 早期DNA損傷修復機構に基づく胆管生検試料における確証的な良悪性判定評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new methodology to distinguish between benign and malignant lesions in bile duct biopsy specimens based on an early repair mechanism for DNA double-strand breaks

研究代表者

石川 博補 (Ishikawa, Hirotsuke)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80769399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胆管上皮の組織生検材料は、サイズが非常に小さいことや、胆管炎による影響により、良悪性判定が困難となる場合がある。本研究では、胆管生検組織を用いた免疫組織化学において、focal staining patternを呈する核内 H2AX (DNA損傷マーカー) 発現は、胆管生検における癌・非癌を鑑別する有用なマーカーになる可能性が示唆された。また、胆管生検組織を用いた二重蛍光免疫組織染色により、H2AXおよび53BP1 (DNA損傷修復因子) の核内共同在率は、胆管生検試料の組織学的良・悪性鑑別に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆管上皮の組織生検材料は、サイズが非常に小さいことや、胆管炎による影響により、組織学的な良悪性判定が困難となる場合がある。我々は、胆管上皮の組織生検材料に対して免疫組織化学および二重蛍光免疫組織染色を行い、癌・非癌を鑑別するための新たな病理組織学的評価方法の一つを提示できたと考える。

研究成果の概要(英文)：It is sometimes difficult to distinguish between malignant and benign lesions in bile duct biopsy specimens because of the tiny sample size and the influence of inflammatory change. Here, we have shown that the labeling index of H2AX-positive cells with a focal staining by immunohistochemistry might be a useful biomarker to discriminate between benign and malignant lesions in bile duct biopsy specimens. In addition, we have revealed by double-label immunofluorescence that the percentage of tumor cells with H2AX-positive foci which colocalized with 53BP1 was useful to discriminate between malignant and benign lesions in bile duct biopsy specimens.

研究分野：消化器外科

キーワード：H2AX 53BP1 胆管癌 生検 診断 蛍光二重免疫染色 免疫組織化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。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。

我々は、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、胆管癌の上皮内癌と浸潤癌とでは、DNA 二重鎖切断部に対する p53-binding protein 1 (53BP1) による早期 DNA 損傷修復機構に相違点があることを解明してきた。胆管癌は表層拡大進展を伴うことがあり、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、癌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非癌・癌の良悪性判定が困難となる場合があることを報告してきた。これまでの研究成果を発展させて、早期 DNA 損傷修復機構に基づく術前胆管生検試料における確証的な良悪性判定評価法を確立し、臨床の現場にフィードバックすることで科学的根拠に基づいた術前の胆管切離線の設定を実現化し、胆管癌に対する新たな外科治療戦略を確立すること」ができると考え本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「早期 DNA 損傷修復機構に基づく術前胆管生検試料における確証的な良悪性判定評価法を確立し、臨床の現場にフィードバックすることで科学的根拠に基づいた術前の胆管切離線の設定を実現化し、胆管癌に対する新たな外科治療戦略を確立すること」である。

3. 研究の方法

過去に収集した術前胆管生検試料に対し、免疫組織化学および二重蛍光免疫組織染色を用いた DNA 損傷部への 53BP1 共局在を基盤とした両悪性判定評価法の確立

過去に収集された術前胆管生検試料である胆管癌組織 6 例、胆管炎上皮組織 7 例 (IgG4 関連硬化性胆管炎など)、正常胆管組織 5 例を対象として、DNA 損傷マーカーである H2AX、p53、Ki67 のモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学を施行した。H2AX の核内発現様式は、核内ドット状集積、核内びまん性集積の 2 つに分類した。各抗体の核内発現陽性細胞の labeling index を測定し、比較解析した。

過去に収集された術前胆管生検試料である胆管癌組織 6 例、胆管炎上皮組織 7 例 (IgG4 関連硬化性胆管炎など)、正常胆管組織 5 例を対象として、H2AX、53BP1 のモノクローナル抗体を用いて H2AX および 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 共局在率を評価した。

4. 研究成果

肝外胆管癌 6 例、胆管炎上皮 7 例、正常胆管組織 5 例の生検標本に対し、H2AX、Ki67、p53 抗体を用いた免疫組織化学を施行した。H2AX の核内発現様式は focal staining pattern、diffuse staining pattern の 2 つに分類し、各々の核内発現様式の labeling index(以下 LI)を測定した。また、Ki67、p53 陽性細胞の LI も測定した。統計解析は Kruskal-Wallis 検定を施行した。focal staining pattern を呈する H2AX 陽性細胞を全例で認めた。一方、diffuse staining pattern を呈する H2AX 陽性細胞は、正常上皮組織 1 例を除く全例で認めた。focal staining pattern の LI は、正常上皮・炎症上皮・癌組織において有意な差を認めた(LI 中央値、範囲：44.1%、20.5-70.3%；68.5%、18.5-79.5%；86.9%、71.1-96.3%； $P=0.008$)。これら 3 群中 2 群間の LI について post hoc test を行い、癌組織と正常上皮組織との間で有意な差を認めた($P<0.01$)。一方、diffuse staining pattern の LI は 3 群間で有意な差を認めなかった(LI 中央値、範囲：2.5%、0-50.5%；4.8%、2.5-18.0%；2.3%、1.5-9.0%； $P=0.263$)。p53 陽性細胞の LI も、3 群間で有意な差を認めなかった(LI 中央値、範囲：10.4%、2.8-59.0%；48.8%、2.8-86.7%；77.5%、8.9-96.3%； $P=0.338$)。Ki67 陽性細胞の LI は 3 群間で有意な差を認めたが(LI 中央値、範囲：5.9%、4.4-23.3%；37.9%、16.1-79.6%；43.8%、9.4-64.4%； $P=0.01$)、post hoc test では炎症上皮組織と正常上皮組織との間で有意な差を認めた($P=0.03$)。以上の結果から、免疫組織化学で focal staining pattern を呈する H2AX 発現は、胆管生検で採取した正常上皮・炎症上皮・癌組織の間で有意な差を認めており、癌・非癌を鑑別する有用なマーカーになる可能性が示唆された。

続いて、胆管上皮から採取した肝外胆管癌組織 6 例、胆管炎上皮 6 例、正常胆管上皮組織 5 例に対して、H2AX モノクローナル抗体と 53BP1 モノクローナル抗体を用いた蛍光二重免疫染色を施行した。H2AX と 53BP1 の両方が核内で発現する細胞のうち、H2AX と 53BP1 が共局在する細胞の割合(%) (以下、共局在率)を測定した。肝外胆管癌組織、胆管炎上皮組織、正常胆管上皮組織における H2AX と 53BP1 の共局在率を比較解析した。統計解析は Kruskal-Wallis 検定および Dunn 事後検定を用いて行った。H2AX と 53BP1 の共局在率は、肝外胆管癌組織、胆管炎上皮組織、正常胆管上皮組織において有意な差を認めた(共局在率中央値：各々 0%、35%、53%； $P=0.006$)。これら 3 群中 2 群間の共局在率について事後検定を行い、肝外胆管癌組織と正常胆管上皮組織との間では、肝外胆管癌組織の共局在率が有意に低値であった($P=0.006$)。肝外胆管癌組織と胆管炎症上皮組織の間では、肝外胆管癌組織の共局在率が低い傾向にあった($P=0.085$)。胆管炎上皮組織と正常胆管上皮組織の間では、共局在率に有意差を認めなかった($P=0.933$)。以上の結果から、H2AX と 53BP1 の二重蛍光免疫組織染色における核内共局在率は、胆管生検試料の組織学的良・悪性鑑別に有用である可能性が示唆された。

-本研究の限界-

本研究では、肝外胆管癌患者から生検で得られた癌組織および非胆管癌患者の非癌上皮組織(胆管炎上皮および正常胆管上皮)を用いて、免疫組織化学および二重蛍光免疫組織染色による H2AX、53BP1 等の発現を検証してきた。この場合、すでに病理組織学的に癌・非癌と診断された組織を用いて本技術を検証しており、コンタミネーションなどのサンプルエラーは理論上生じえない。

一方、実際の臨床現場において、一人の胆管癌患者から複数部位の胆管生検を行う場合、生検施行過程における組織のコンタミネーションが一定の確率で生じることは避けられない。そのため、今回検証した技術を駆使した生検試料の組織学的良悪性判定は正しくとも、得られた生検試料自体にコンタミネーションが生じている可能性があり、本技術を用いて得られた良悪性判

定が生検施行部位の良悪性を反映していない可能性がある。臨床現場では、生検施行部位の組織学的良悪性判定が、手術の術式決定や胆管切離線設定に影響を及ぼすため、生検試料の良悪性判定確度を上げることは喫緊の課題である。今回検証した技術は、得られた生検試料の組織学的良悪性鑑別の診断確度を上げるための補助となる技術と考えるが、生検施行部位の組織学的良悪性判定確度を上げるには、生検における組織のコンタミネーションを減らす方法の確立が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	石川 博補, 廣瀬 雄己, 永橋 昌幸, 坂田 純, 相馬 大輝, 安藤 拓也, 油座 築, 堅田 朋大, 三浦 宏平, 滝沢 一泰, 小林 隆, 田島 陽介, 市川 寛, 羽入 隆晃, 島田 能史, 亀山 仁史, 若井 俊文
2. 発表標題	胆管生検組織標本の良・悪性判定に H2AX発現が有用である
3. 学会等名	日本外科学会定期学術集会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	廣瀬 雄己, 坂田 純, 安藤 拓也, 油座 築, 堅田 朋大, 三浦 宏平, 滝沢 一泰, 永橋 昌幸, 小林 隆, 若井 俊文
2. 発表標題	胆管生検で採取した正常上皮・炎症上皮・癌組織におけるDNA二本鎖切断のマーカである H2AX発現の検討
3. 学会等名	日本消化器外科学会総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Yuki HIROSE, Masayuki NAGAHASHI, Hirosuke ISHIKAWA, Kizuki YUZA, Kohei MIURA, Hiroshi ICHIKAWA, Yoshifumi SHIMADA, Hitoshi KAMEYAMA, Jun SAKATA, Takashi KOBAYASHI, Toshifumi WAKAI
2. 発表標題	H2AX expression discriminates between benign and malignant biliary tract biopsy specimens
3. 学会等名	Annual Academic Surgical Congress (国際学会)
4. 発表年	2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

胆管生検試料に対する H2AXモノクローナル抗体と53BP1モノクローナル抗体を用いた蛍光二重免疫染色の結果については、2020年度の日本胆道学会総会にて発表予定である。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 隆 (Kobayashi Takashi) (40464010)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	若井 俊文 (Wakai Toshifumi) (50372470)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	坂田 純 (Sakata Jun) (70447605)	新潟大学・医歯学系・講師 (13101)	
研究協力者	滝沢 一泰 (Takizawa Kazuyasu)		
研究協力者	廣瀬 雄己 (Hirose Yuki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	相馬 大輝 (Soma Daiki)		
研究協力者	パンカジ プラスーン (Pankaj Prasoon)		