

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16318

研究課題名(和文)食道癌における新規薬物治療のターゲットとしての酸化的DNA損傷修復因子の意義

研究課題名(英文)Significance of oxidative DNA damage repair factor as a target of novel drug treatment in esophageal cancer

研究代表者

久保 信英(KUBO, Nobuhide)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20811748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸化的DNA損傷修復因子のMutYHはTUNELとの蛍光2重染色で癌のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった。MutYHは癌部で高発現している症例が有意に多数を占めていた。細胞株における結果では様々な食道癌細胞株と線維芽細胞株でOGG1とMutYHの発現量に差がみられ、酸化ストレス下の細胞生存率は、siOGG1で低下し、siMutYHで上昇した。臨床検体を用いるとMutYH強発現群では腫瘍径が大きく予後不良であった。以上より、MutYHが癌のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった。治療対象探索(今研究目的)において分子標的候補であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌は悪性度が高く予後不良の消化器癌であり、手術療法は標準治療であるが極めて侵襲が大きく、薬物療法(抗癌剤)の役割は非常に大きい。しかし、食道癌治療の薬物療法は選択肢が少なく、新たな薬物療法の開発は急務である。食道癌は酸化的DNA損傷と関わりが深いことが推測されている。過度の8-oxoGのゲノム蓄積は細胞死を誘発し、結果として発癌頻度の低下をもたらすはずであるが、MutYHが酸化的DNA損傷の蓄積を排除することで癌の存続に寄与している可能性が報告されていた。本研究では同因子を抑制することなどで癌細胞の生存を抑制する結果を得たことで治療ターゲット因子としての可能性を示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：Our research results was consistent with the hypothesis that the oxidative DNA damage repair factor MutYH suppresses cancer apoptosis by fluorescent double staining with TUNEL. MutYH was significantly overexpressed in the cancerous part. The results of cell lines showed differences in the expression levels of OGG1 and MutYH among various esophageal cancer cell lines and fibroblast cell lines, and the cell viability under oxidative stress was decreased in siOGG1 and increased in siMutYH. When clinical specimens were used, the tumor size was large and the prognosis was poor in the MutYH strong expression group. These results are consistent with the hypothesis that MutYH suppresses cancer apoptosis. It was considered to be a molecular target candidate in the search for therapeutic targets (current research purpose).

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 酸化的DNA損傷 8oxoG OGG1 MutYH アポトーシス抑制 分子標的治療

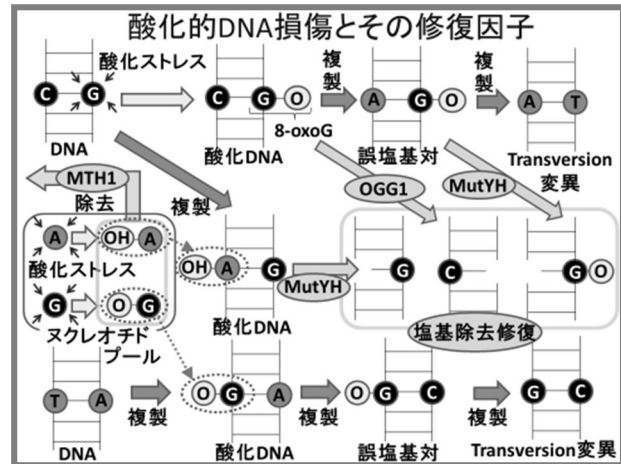
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は喫煙が食道発癌に関して酸化的 DNA 損傷を誘発することを報告したが、(Kubo N et al, Dis Esophagus. 2014;27(3):285-93) 喫煙などから発生した活性酸素(Reactive oxygen species: ROS) は酸化ストレスとなり DNA 損傷から発癌を誘発する。8-oxoG(8 オキソグアニン)はヌクレオチドであるグアニンの酸化体である。酸化されたグアニンは DNA 複製の過程でアデニンと誤った塩基対を形成することで、そのアデニンは次の複製でチミンと対を形成する。このような遺伝子変異はトランスポージョン変異と呼ばれ発癌の原因となる。

一方で、細胞内では酸化的 DNA 損傷を修復する機構があり、これが発癌を抑制する重要な役割を担っている。酸化的 DNA 損傷を受けたヌクレオチドを塩基除去修復する機構を備えており、OGG1, MutYH, MTH1 の 3 つの修復に関わる酵素が重要な役割を果たすことで遺伝子変異を抑制していることが分かっている。

(Hirano T et al, J. Radiat. Res 2008; 49: 329-340) (右図)



8-oxoG は OGG1 (8-oxoG DNA グリコシラーゼ) によって塩基除去修復される。生じた A : 8-oxoG ペアから 8-oxoG が除去されると変異が固定されるため、MutYH (アデニン DNA グリコシラーゼ) によりアデニンが除去される。MutYH は DNA に取り込まれたアデニンの酸化体である 2-OH-A (2 ヒドロキシアデニン) を除去する活性も有している。酸化プリンヌクレオシド三リン酸の分解酵素である MTH1 は、ヌクレオチドプール中の 8-oxo-G や 2-OH-A などの酸化体を効率よく分解し、DNA への取込みを回避している。(Nakabeppu Y et al, Environ Mutagen Res 2001; 23:183 - 195) 各修復因子欠損マウスの検討では、OGG1 の欠損マウスでは肺癌が増加し、MutYH の欠損マウスでは消化管癌やリンパ腫が増加し、(Iida T et al, Acta Neuropathol 2002; 103:20 - 25) MTH1 を欠損させたマウスでは肝臓癌、肺癌と胃癌が増加することが判明し報告された。(Tsuzuki T et al, Proc.Natl.Acad.Sci. 2001; 98:11456-11461)

OGG1 と MutYH の二重欠損マウスでは、より多くの腫瘍が発生すると予想されたが、予想に反して OGG1 単独欠損マウスで見られる肺癌の自然発生頻度が野生型マウスよりも低いことが報告された。OGG1 と MutYH の二重欠損マウスの臓器のゲノム中には野生型マウスの数倍以上の 8-oxoG が蓄積しており、過度の 8-oxoG のゲノム蓄積は細胞死を誘発し、結果として発癌頻度の低下をもたらし、MutYH は癌の存続に寄与していた可能性が報告された。(Tsuzuki T et al, Proc.Natl.Acad.Sci. 2001; 98:11456-11461) ヒト食道癌は酸化ストレス発癌と関わりが深いと考えられるが、OGG1 と MutYH がどのように関係しているかは不明である。

## 2. 研究の目的

我々は酸化的 DNA 損傷から誘発されるタイプのトランスポージョン変異が食道癌の p53 遺伝子変異型の頻度解析において最も多くみられる変異であり、他の癌腫に比較して多いことを発見し、(Egashira A et al, Cancer Sci 2007; 98 (8): -6) (Oki E et al, Digestion 2009; 79(Suppl 1): 33-9)、食道癌が酸化ストレス発癌との関わりが強い癌腫であることを初めて報告し発表した。(右図)

そこで我々はヒト食道癌検体において酸化的 DNA 損傷の指標である 8-oxoG と酸化的 DNA 損傷修復因子である OGG1 発現を免疫染色で評価したところ癌部では 8-oxoG が蓄積し、一方で OGG1 は低下していることを発見し報告した。(右下図)

動物実験の結果に基づけば、酸化的 DNA 損傷が蓄積すれば細胞死が誘導され、癌が存続することを抑制するはずであるが、食道癌のヒト臨床検体では酸化的 DNA 損傷を蓄積した癌組織が存続していた。そこで癌組織における MutYH の発現を調べることで、MutYH が癌のアポトーシスを抑制している可能性を検討し、MutYH が抑制することで癌を細胞死に導く新規薬剤のターゲット因子となり得るかを検討することが本研究の目的である。

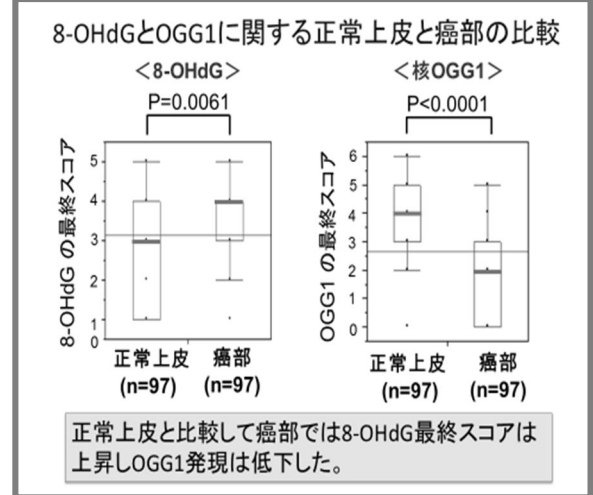
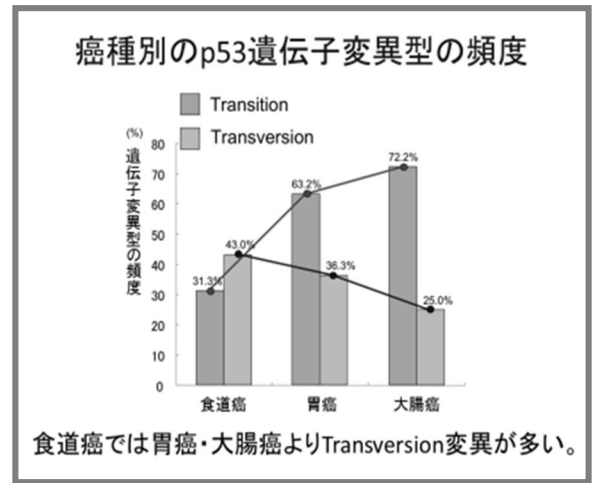
## 3. 研究の方法

ヒト食道癌の臨床検体（食道癌組織と食道正常組織のパラフィン包埋ブロック）から薄切プレパラートを作成し 8-oxoG、OGG1 と MutYH について、発現量やその強度を評価して臨床病理学的因子と比較検討することで OGG1 と MutYh の臨床的な表現型を探索する。

ヒト食道癌の臨床検体（食道癌組織と食道正常組織のパラフィン包埋ブロック）から薄切プレパラートを作成して OGG1 と MutYH について蛍光免疫染色を施行し、共発現しているかなどの局在を評価して臨床病理学的因子と比較検討することで、共発現している部位と共発現していない部位で、酸化的 DNA 損傷因子である 8-oxoG の蓄積量やアポトーシス因子の発現を調べ、癌組織の細胞死に関して OGG1 と MutYH の役割を推察する。

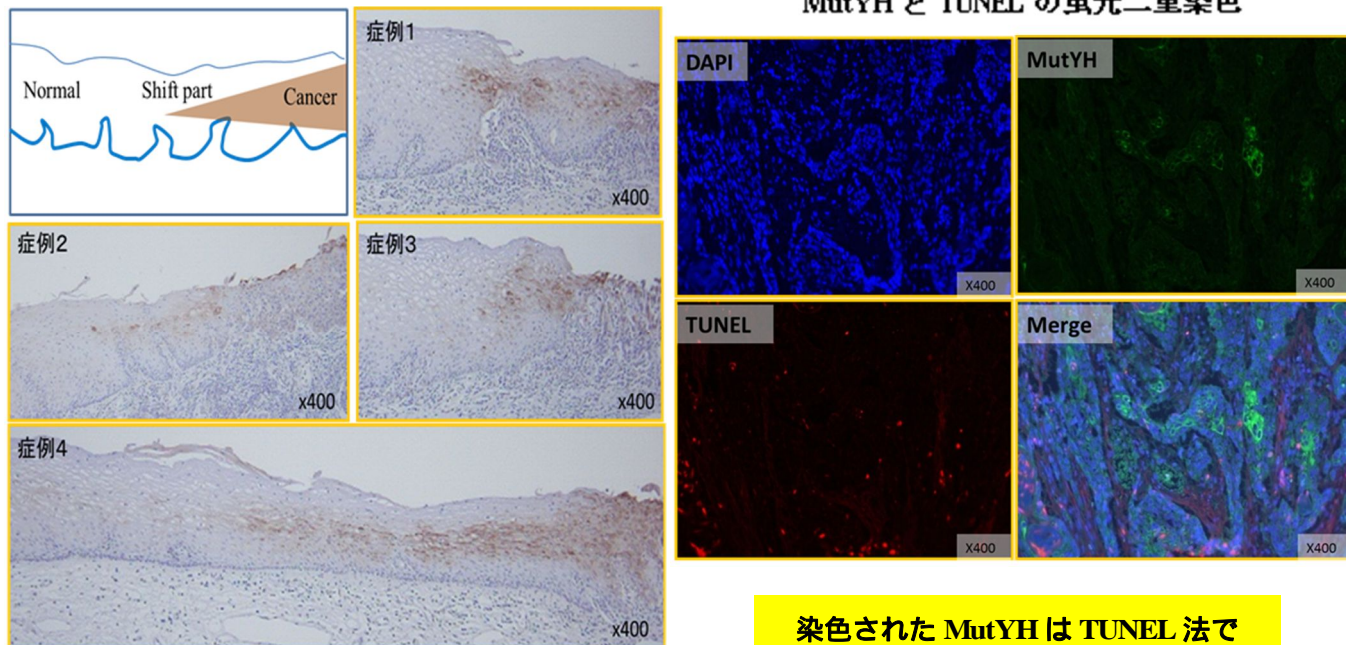
ヒト臨床検体で得られた結果を食道癌細胞株で確認するために OGG1 や MutYH の発現を免疫組織化学染色法や Western Blotting 法、qRT-PCR 法にて確認して裏付けを得る。

OGG1 や MutYH を単独あるいは組み合わせで Knockdown や Knockout した細胞株を作製して合成ビタミン K であり酸化ストレス剤であるメナジオンを投与する。それぞれの細胞株の生存率やアポトーシスの割合を MTT Assay や TUNNEL 法で評価し MutYH が癌細胞のアポトーシスを抑制していることを検討する。



#### 4. 研究成果

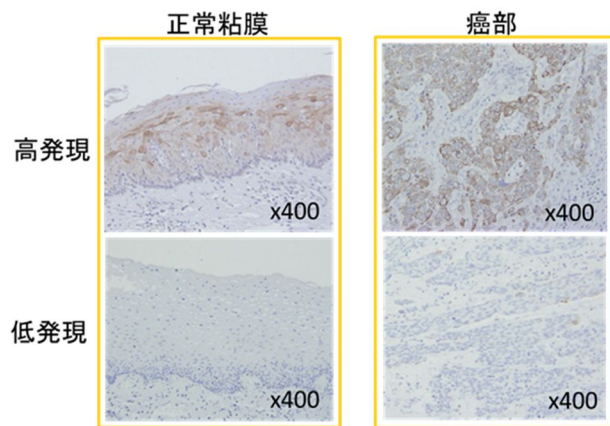
結果 : MutYHの免疫染色ではMutYHは癌部で高発現していた。MutYHとTUNELの蛍光2重染色ではMutYH発現癌細胞でTUNEL陰性でありMutYHが癌のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった。



MutYH はほとんどが癌の細胞質で発現し癌移行部でも発現を認め始める。

染色された MutYH は TUNEL 法で apoptosis と共発現していなかった。

結果 : 食道癌粘膜正常部と癌部におけるMutYH発現の割合について、MutYHは癌部で高発現している症例が有意に多数を占めていた。(P<0.01)

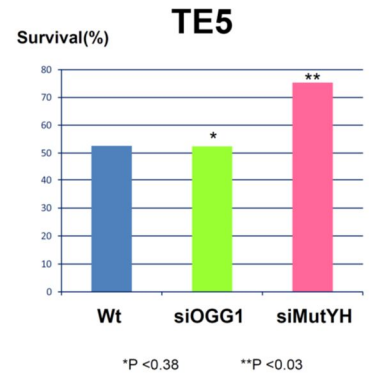
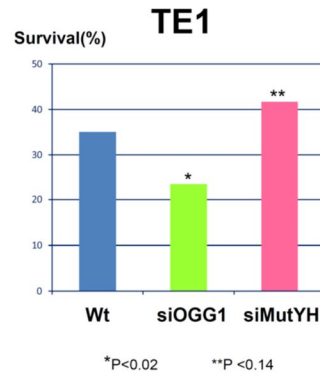
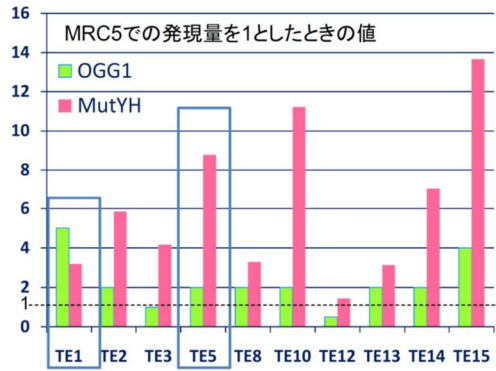


因子	MutYH		P-value
	正常粘膜 n=85(%)	癌部 n=97(%)	
発現強度			
高発現	16(19)	63(65)	P<0.01
低発現	69(81)	34(35)	

結果 : in vitro (細胞株)における結果では(1)様々な食道癌細胞株と線維芽細胞株でOGG1 と MutYH の発現量に差がみられた。(2)酸化ストレス下(メナジオン投与)の細胞生存率は、siOGG1で10%低下し(P<0.02)siMutYHで20%上昇(P<0.03)した。(食道癌細胞株TE1とTE5を使用)



## qRT-PCRによる OGG1 と MutYH の発現量の検討



結果：臨床検体を用いたIHC強度の検討でMutYH強発現群では、腫瘍径が大きく。(多変量解析:HR3.94 P<0.01)予後不良(5生:80% vs 45% P<0.01)であった。

## MutYH 発現と臨床病理学的因子の検討

factor	MutYH (癌部細胞質)		P-value
	低発現 n=34(%)	高発現 n=63(%)	
深達度			
M、SM	20(59)	27(43)	0.1326
MP、Deeper	14(41)	36(57)	
リンパ節転移			
陽性	17(50)	32(51)	0.9405
陰性	17(50)	31(49)	
リンパ管浸潤			
陽性	16(47)	33(52)	0.6169
陰性	18(53)	30(48)	
静脈侵襲			
陽性	10(29)	33(52)	0.0789
陰性	24(61)	30(48)	
p53 遺伝子変異			
野生型	4(33)	11(29)	0.7740
変異型	8(67)	27(71)	
腫瘍径			
大(>4.7cm)	9(31)	30(57)	0.0252*
小(≤4.7cm)	20(69)	23(43)	

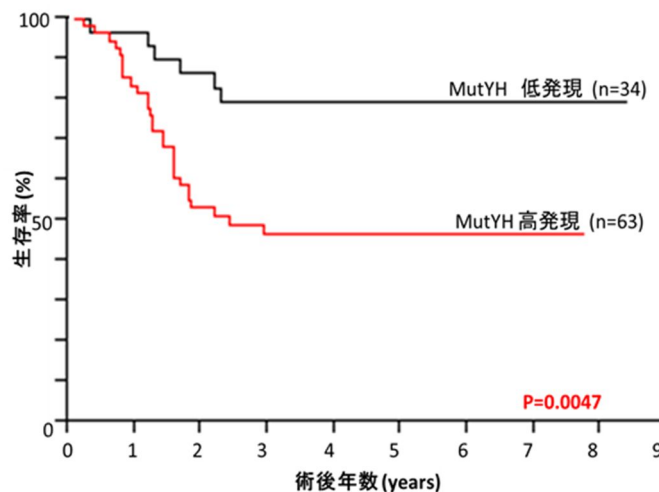
4.7cm: 腫瘍径平均 \*P<0.01

## MutYH 発現と予後に関する多変量解析

因子	HR	95% CI	P-value
<b>深達度</b> (MP, Deeper vs M, SM)	5.50	1.67~20.1	0.0048*
リンパ節転移 (陽性 vs 陰性)	0.82	0.34~2.10	0.6793
リンパ管浸潤 (陽性 vs 陰性)	2.31	0.88~6.47	0.0885
静脈侵襲 (陽性 vs 陰性)	1.61	0.55~4.89	0.3832
腫瘍径 (大 vs 小)	1.00	0.46~2.29	0.9978
<b>MutYH 発現</b> (高発現 vs 低発現)	3.94	1.52~12.3	0.0035*

MutYH 強発現は独立した予後規定因子であった。

## MutYH 発現別の予後



以上より、MutYHが癌のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった。治療対象の探索という今研究の目的において分子標的の候補であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----