

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590367

研究課題名 (和文) 53BP1 核内フォーカスの普遍的腫瘍組織マーカーとしての意義解析

研究課題名 (英文) The significance of 53BP1 nuclear foci as a universal tumor tissue marker

研究代表者

中島 正洋 (NAKASHIMA MASAHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50284683

研究成果の概要 (和文)：自然発症性 DNA 二重鎖切断 (DSBs) の存在はゲノム不安定性 (GIN) を特徴づける現象である。多くの腫瘍化過程には GIN が重要で、特に生物学的悪性度と関連する。本研究では、GIN の細胞生物学的指標としての P53-binding protein 1 (53BP1) 核内フォーカス (NF) 形成を蛍光免疫染色により解析し、普遍的腫瘍組織マーカーとしての意義を検討した。その結果、1) 甲状腺癌組織では 53BP1 NF 数の増加と異常発現がみられ、GIN の関与が示唆されること、2) 皮膚癌化過程では前がん病変から GIN の亢進がみられるが DNA 損傷応答 (DDR) は保たれていて、一方、浸潤癌では DDR が異常であること、3) 子宮頸部異形成／腫瘍の進展や HPV 発現と 53BP1 NF 数の増加や異常が有意に相関することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：The presence of sporadic DNA double strand breaks (DSBs) is considered as a characteristic feature of genomic instability (GIN). It has been proposed that GIN has a crucial role during several carcinogenesis, and is associated with malignant potential of neoplasms. The presence of 53BP1 nuclear foci (NF) can be a cytologic marker for endogenous DSBs reflecting GIN. This study analyzed the level of GIN, as detected with immuno fluorescence of 53BP1 expression, in a variety of resected tumors to evaluate the significance of 53BP1 expression as a universal tumor tissue marker. In results: 1) a number of 53BP1NF and abnormal type of 53BP1 expression were demonstrated in thyroid cancers, suggesting a high level of GIN; 2) during skin carcinogenesis, GIN seems to be induced at the precancerous stage with constitutive activation of DNA damage response (DDR). Furthermore, invasive cancers exhibited abnormal 53BP1 staining, reflecting a disruption of DDR; 3) The number of 53BP1NF in uterine cervical cells appeared to increase with progression during carcinogenesis and to be significantly associated with the expression of human papilloma virus (HPV) signals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：癌、53BP1、ゲノム不安定性、蛍光免疫染色

1. 研究開始当初の背景

我々は、放射線関連固形癌で癌原遺伝子の

増幅や LOH が高頻度に見られることを示した (Miura, et al, Cancer 2008, Nakashima, et

al, Hum Pathol 2007, Iwata, et al, Hum Pathol 2004)。一般的に癌原遺伝子の増幅や LOH は種々の固形癌でみられ、遺伝子不安定性 (GIN) に起因することが示唆されている。放射線関連腫瘍の発生過程では、放射線被曝により誘発された遺伝子損傷の結果として GIN の亢進状態にあり、遺伝子増幅や LOH の頻度、さらに悪性度が亢進するものと推察する。

環境因子でもある放射線は DNA 二重鎖切断 (DSBs) を惹起する。正常細胞では、DSBs に対し DNA 損傷応答 (DDR) 機構が活性化されゲノム構造の維持と安定化を図る。DSBs 修復異常は細胞内に GIN 亢進状態を誘導し、それに引き続く腫瘍原性の転座や遺伝子増幅の原因となる。p53 結合タンパク質として同定された P53-binding protein 1 (53BP1) は多くの細胞に存在する核内タンパクで、DDR 活性状態では、他の DNA 損傷センサー分子とともに DSBs 部位に速やかに集積し核内フォーカス (NF) を形成する性質を有す。すなわち、53BP1 NF 数は DSBs を反映する指標となる。

内因性/自然発症性 DSBs の存在は GIN を特徴づける現象である。p53 変異や ATM 変異などの DDR 分子の異常は細胞に GIN を惹起し、遺伝子変異が蓄積、結果として腫瘍化を促進する。本研究は、放射線関連腫瘍の分子病理学的研究で得られた腫瘍進展過程における GIN の亢進の重要性に着目し、腫瘍組織での 53BP1NF の GIN を推定する新規分子マーカーとしての意義を検討することにある。

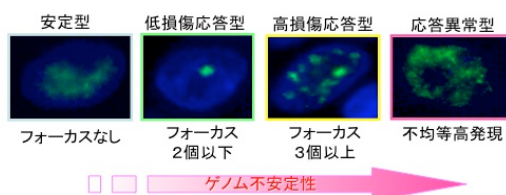
2. 研究の目的

腫瘍の悪性度を推定する普遍的指標は存在しない。多くの腫瘍化過程にはゲノム不安定性 GIN が関与し、特に生物学的悪性度と相関することが示唆されている。本研究の目的は、GIN の細胞学的指標としての 53BP1NF 形成を蛍光免疫染色により評価し、普遍的腫瘍組織マーカーとしての意義を検討することにある。

3. 研究の方法

53BP1 蛍光染色発現型は図 1 の 4 型に分類した

図 1. 53BP1 蛍光染色発現パターン



(1) 甲状腺腫瘍組織での 53BP1 発現

① 乳頭癌 PC の 53BP1 発現と BRAF 遺伝子変異の相関解析

② 濾胞癌 FC と濾胞腺腫 FA の鑑別における 53BP1 発現の有用性と GIN との関連解析: FA34 例、FC 微小浸潤型 (FCMI) 20 例、FC 広範浸潤型 (FCWI) 10 例の切除組織片を用い 53BP1 蛍光染色発現を解析。さらに、53BP1 発現パターンの違う症例を対象に、GIN の指標としての遺伝子 copy number aberration (CNA) をアレイ CGH 法により解析する

(2) 皮膚腫瘍進展過程での 53BP1 発現: 皮膚がん化過程、日光角化症 AK-Bowen 病 BD-扁平上皮癌 SCC は前癌病変-上皮内癌-浸潤癌として連続性的ものと認識されている。これらの組織に加え、良性腫瘍の脂漏性角化症 SK と浸潤癌の基底細胞癌 BCC 組織の 53BP1 発現を解析する。

(3) 子宮頸部腫瘍進展過程での 53BP1 発現:

- ① 軽度異形成、中等度異形成、高度異形成 SD、上皮内癌 CIS および浸潤癌 SCC を含む腫瘍組織を対象に、53BP1 発現を解析する
- ② high-risk HPV 感染を ISH で解析し 53BP1NF との関係を検討する
- ③ 53BP1-Ki67 蛍光二重染色による SD と CIS の鑑別

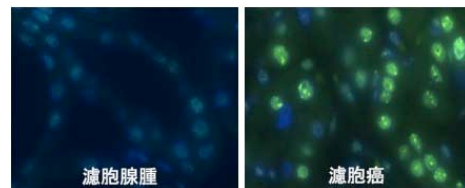
4. 研究成果

(1) 甲状腺腫瘍組織での 53BP1 発現

① PC23 例の BRAF 遺伝子変異は 14 例 (61%) が変異型、9 例 (39%) は野生型。53BP1 発現は変異型の 13 例 (93%)、野生型の 8 例 (89%) が高損傷応答 (HDDR) 型で有意差はなかった。微小乳頭癌 papillary microcarcinoma (PMC) 13 例中、BRAF は 6 例 (46%) が変異型、7 例 (54%) は野生型で、HDDR 型は変異型の全例でみられたが、野生型では 1 例 (14%) のみで、BRAF 変異と HDDR 型発現との有意な関係がみられた。BRAF 野生型/53BP1 安定型発現を示す PMC は、濾胞構造が優位で核異型も軽度であった。

② 正常濾胞上皮全例が安定型、FA35%が低損傷応答 (LDDR) 型、FCMI は 35%が HDDR 型、20%が異常型を示した (図 2)。FCWI は 20%が HDDR 型、40%が異常型を示した。CGH 法では FCWI の LDDR 型、HDDR 型、異常型と段階的に CNA の増加を認めた。53BP1 発現型は濾胞性腫瘍の GIN レベル、すなわち悪性度推定の指標となる。

図 2. 濾胞性腫瘍の 53BP1 発現型



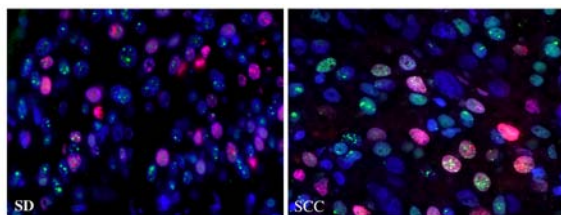
(2)皮膚腫瘍進展過程での53BP1発現:53BP1蛍光染色結果を表1に示す。正常表皮とSKの53BP1発現は安定型であり、かつp53は陰性であった。AKでは基底側の異型細胞の核に53BP1NFとp53との共発現がみられ、共発現細胞に増殖マーカーKi-67は陰性であった。一方、SCC、BCCでは異常型であり、かつp53は過剰発現がみられたが、両者は必ずしも共発現しなかった。さらに異常型発現はKi-67陽性細胞にも認めた。これらの結果は、皮膚がん化過程では前がん病変から内因性DDRはみられるが正常に機能していて、浸潤癌ではDDRが異常でありGIN状態を示唆する。

表1. 皮膚腫瘍組織での53BP1発現

	n	Stable	Low DDR	High DDR	Mixed DDR and abnormal	Abnormal
Epidermis						
non-exposed	14	13 (92.9%)	1 (7.1%)	0	0	0
sun-exposed	8	2 (25.0%)	5 (62.5%)	1 (12.5%)	0	0
SK						
non-exposed	10	10	0	0	0	0
sun-exposed	10	4 (40.0%)	6 (60.0%)	0	0	0
AK	8	1 (12.5%)	3 (37.5%)	4 (50.0%)	0	0
BD	9	1 (11.1%)	2 (22.2%)	4 (44.4%)	2 (22.2%)	0
SCC	9	0	0	0	4 (44.4%)	5 (55.6%)
BCC	10	0	0	0	1 (10.0%)	9 (90.0%)

(3)子宮頸部腫瘍進展過程での53BP1発現:

- ① HDDR型発現は、正常、軽度異形成、中等度異形成、SDおよびSCCでそれぞれ1.2、10.2、19.1、37.5および49.8%であり、腫瘍進展に伴いHDDR型発現が亢進する傾向には有意な関連がみられた。53BP1とKi-67の二重染色では、腫瘍進展に伴いHDDR型が増殖細胞で高率に観



察され(図3)、SCCではDNA修復機構の破綻があることが示唆された。

図3. 53BP1-Ki-67二重蛍光染色

- ② HPV ISH法では、腫瘍進展に伴いDNAの宿主ゲノムへの組み込みとHDDR型発現が亢進する傾向には有意な関連がみられ、GINの関与が示唆される。蛍光免疫染色による53BP1発現型解析は、子宮頸部腫瘍におけるゲノム不安定性レベルを推定する指標となり、新規腫瘍組織マーカーとしての可能性がある。

- ③ SDとCISは、可逆性と非可逆性という点で異なる病変である。DDRは細胞周期停止状態で機能する。53BP1 NF-Ki67共陽性細胞をDDR異常型と定義し、SD群とCIS群各々20例の生検組織で、DDR異常型核に発現するNF数と長径を群間比較した。SD群/CIS群の数と長径の平均値は $2.53 \pm 2.06 / 2.77 \pm 2.14$ 個 ($p < 0.001$)と $0.54 \pm 0.29 / 0.69 \pm 0.35 \mu m$ ($p < 0.001$)であった。1.0 μm 以上のNFを2個以上有する核が10個以上出現する症例のCISである確率は100%、相対危険度(95%CI)は7.7(2.7-22.0)であり、統計学的に有意な危険因子であった。この蛍光染色法はSDとCISの鑑別に有用である。

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〕(総数31件)

- ① Matsuda K, Nakashima M, et al (9名中9番目): Significance of p53-binding protein 1 nuclear foci in uterine cervical lesions: Endogenous DNA double strand breaks and genomic instability during carcinogenesis. *Histopathology* 査読有 in press
- ② Akilzhanova A, Nakashima M, et al (11名中4番目): Mutational screening of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer in Kazakhstan population. *Breast J* 査読有 in press
- ③ Matsuu-Matsuyama M, Nakashima M, et al (6名中5番目): Norepinephrine Enhances Radiosensitivity in Rat Ileal Epithelial Cells. *J Radiat Res* 査読有 in press
- ④ Suzuki K, Nakashima M, Yamashita S: Dynamics of ionizing radiation-induced DNA damage response in reconstituted three-dimensional human skin tissue. *Radiat Res* 査読有 174:415-423, 2010
- ⑤ Matsuu-Matsuyama M, Nakashima M, et al (6名中2番目): Basic fibroblast growth factor suppresses radiation-induced apoptosis and TP53 pathway in rat small intestine. *Radiat Res* 査読有 174:52-61, 2010
- ⑥ Naruke Y, Nakashima M, et al (6名中2番目): Genomic instability in the epidermis induced by atomic bomb (A-bomb) radiation: a long-lasting health effect in A-bomb survivors. *Cancer* 査読有 115:3782-3790 2009

- ⑦ Matsubayashi S, Nakashima M, et al (8名中2番目): Immunohistochemical analyses of beta-cyclin D1 expression in giant cell tumor of bone (GCTB): a possible role of wnt pathway in GCTB tumorigenesis. Pathol Res Pract 査読有 205:626-633 2009
- ⑧ Toyoda Y, Nakashima M, et al (12名中4番目): Earwax, osmidrosis, and breast cancer: why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter ABCC11 gene determine earwax type? FASEB J 査読有 23:2001-2013 2009
- ⑨ Miura S, Nakashima M, et al (9名中2番目): Significance of Her2 and C-MYC oncogene amplifications in breast cancer in atomic bomb survivors: associations with radiation exposure and histologic grade. Cancer 査読有 112:2143-2151 2008
- ⑩ Nakashima M, et al (11名中1番目): Foci formation of P53-binding protein 1 in thyroid tumors: activation of genomic instability during thyroid carcinogenesis. Int J Cancer 査読有 122:1082-1088 2008
- ⑪ Naruke Y, Nakashima M, et al (7名中2番目): Alteration of p53-binding protein 1 expression during skin carcinogenesis: Association with genomic instability. Cancer Sci 査読有 99:946-951 2008

[学会発表] (総数 24 件)

- ① 中島正洋: Acute DNA damage response and late carcinogenesis in rat thyroid glands after external irradiation. 第3回 GCOE 国際ワークショップ 2010. 11. 29-30 長崎
- ② Mussazhanova Z, Nakashima M, et al: Significance of 53BP1 expression in thyroid papillary microcarcinoma and correlation analysis between BRAF mutation and nodal metastasis. 14th International Thyroid Congress (ITC) 2010. 9. 11-16 Paris
- ③ Naruke Y, Nakashima M, et al: Immunofluorescence analysis of p53-binding protein 1 as a new molecular indicator for malignant potency and genomic instability in thyroid follicular neoplasms. 14th International Thyroid Congress (ITC) 2010. 9. 11-16 Paris
- ④ Mussazhanova Z, Nakashima M, et al: Significance of 53BP1 expression in thyroid papillary microcarcinoma:

correlation analysis between BRAF mutation and nodal metastasis. 第56回日本病理学会秋期特別総会 2010. 11. 25-26 北九州

- ⑤ 松山睦美, 中島正洋 他: 成熟甲状腺濾胞上皮の放射線誘発細胞死耐性の分子機構. 第53回日本甲状腺学会学術集会 2010. 11. 11-13 長崎
- ⑥ 蔵重智美, 中島正洋 他: 成熟ラット甲状腺濾胞上皮における放射線照射後の晩発性 DNA 損傷応答解析. 第53回日本甲状腺学会学術集会 2010. 11. 11-13 長崎
- ⑦ ムサジャノワ ジャンナ, 中島正洋 他: 甲状腺乳頭癌での 53BP1 発現の意義: BRAF 遺伝子変異とリンパ節転移との関連. 第53回日本甲状腺学会学術集会 2010. 11. 11-13 長崎
- ⑧ 蔵重智美, 中島正洋 他: ラット放射線誘発甲状腺癌と濾胞上皮の DNA 損傷応答解析. 第14回日本内分泌病理学会学術総会 2010. 10. 29-30 京都
- ⑨ 七條和子, 中島正洋 他: 長崎急性原爆被爆者の剖検・パラフィン標本を用いた遺伝子損傷について. 第53回日本放射線影響学会 2010. 10. 20-22 京都
- ⑩ 松山睦美, 中島正洋 他: 放射線照射ラット甲状腺組織での DNA 損傷応答分子発現解析. 第53回日本放射線影響学会 2010. 10. 20-22 京都
- ⑪ 蔵重智美, 中島正洋 他: 成熟ラット甲状腺濾胞上皮における放射線照射後 DNA 損傷応答の解析. 第51回日本組織細胞化学会総会学術集会 2010. 9. 4-5 東京
- ⑫ 三浦史郎, 中島正洋 他: 長崎被爆者腫瘍組織バンク構築に向けた生体試料収集の経過報告. 第51回長崎原子爆弾後障害研究会 2010. 6. 6 長崎
- ⑬ 松山睦美, 中島正洋 他: TP53 経路を介した bFGF の小腸における放射線誘発アポトーシス抑制効果. 第51回長崎原子爆弾後障害研究会 2010. 6. 6 長崎
- ⑭ 三浦史郎, 中島正洋 他: 長崎原爆被爆者腫瘍組織バンクの構築と臨床病理学的解析~第2報. 第99回日本病理学会総会 2010. 4. 27-29 東京
- ⑮ 蔵重智美, 中島正洋 他: 成熟ラット甲状腺濾胞上皮における放射線誘発晩発性 DNA 損傷の探索. 第99回日本病理学会総会 2010. 4. 27-29 東京
- ⑯ 松田勝也, 中島正洋 他: 子宮頸部腫瘍での 53BP1 と Ki67 蛍光二重免疫染色による DNA 損傷応答異常解析: 高度異形成と上皮内癌の鑑別. 第99回日本病理学会総会 2010. 4. 27-29 東京
- ⑰ ムサジャノワ ジャンナ, 中島正洋 他:

甲状腺微小乳頭癌での 53BP1 発現の意義: BRAF 遺伝子変異とリンパ節転移との関連. 第 99 回日本病理学会総会
2010. 4. 27-29 東京

[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:
取得年月日:
国内外の別:

[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

中島 正洋 (NAKASHIMA MASAHIRO)
長崎大学・大学院・医歯薬学総合研究科
研究者番号: 50284683

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: