

平成22年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790990

研究課題名 (和文) I 期原発性肺腺癌における DNA 損傷応答蛋白発現の臨床的意義

研究課題名 (英文) DNA damage response for early stage lung adenocarcinoma

研究代表者

田中俊樹 (TANAKA TOSIKI)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：50457305

研究成果の概要 (和文)：原発性肺腺癌の早期癌と考えられている気管支肺胞上皮癌での DNA 損傷応答タンパクの発現はほとんど見られず、進行癌において発現されていることが多いことが分かった。しかしながら、各種臨床学的、病理学的パラメーターとの有意な関連は指摘されなかった。また、ATM・Chk2 は陽性となるものの γ H2AX の発現はわずかであった。進行癌組織内における DNA 損傷応答蛋白の活性化が早期癌と比較し強く発現する傾向にあることが証明されたことから、発癌や癌の進行、悪性度に関連があると予想される。

研究成果の概要 (英文)：Lung adenocarcinoma tissue samples were obtained from the surgical resected specimen. The tissues were classified into 3 groups according to pathology: normal lung parenchyma, bronchiolo-alveolar carcinoma and adenocarcinoma. We evaluated DNA damage response (DDR) proteins, phosphorylated ataxia telangiectasia mutated (pATM), phosphorylated H2AX (γ H2AX) and Chk2 (pChk2) protein levels by immunohistochemistry. Immunostaining for pATM and pChk2 revealed that they tended to be expressed during tumor progression in advanced carcinoma although there were no significant differences. However, γ H2AX was little expressed and there was no correlation with tumor progression. There was no correlation between DDR and clinical factors.

ATM and Chk2 was activated during cancer progression, but little H2AX was detected. It is likely that activation of DDR was induced by stress signaling as a consequence of oxidative, replication and mechanical stresses occurring during growth and expansion of the lung adenocarcinoma. DDR may be related to cancer progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：胸部外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：癌、DNA 損傷、Biomarker

1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌は、日本における男性の癌死亡原因の1位、女性の3位を占め、罹患率、死亡率ともに依然増加傾向にある。治療は手術が最も有効であるが、stage IA肺癌の5年生存率は80-85%、stage IB肺癌では65-75%と、他の固形癌に比べて不良である。特にいわゆる野口分類のtype AまたはBの肺胞上皮癌を除く肺腺癌は、腫瘍径が小さくてもリンパ節転移、遠隔転移を起こす症例が少なくない。Stage I原発性肺腺癌において、腫瘍径に関わらず悪性度の高い腫瘍を鑑別することができれば、抗癌剤の投与などの補助療法の追加で更なる予後の改善が期待できる。

2. 研究の目的

DNA 損傷応答経路のなかで非常に重要な役割を担う蛋白である phosphorylated ATM (ataxia-telangiectasia mutated)、phosphorylated histone H2AX の発現が、早期癌に強く進行癌になると減弱することが報告された (Cell Cycle. 2005;4:838)。このタンパク質は、DNA 損傷を認識させ正常な DNA 修復を進めさせる役割を担っており、この経路が活性化される間は、細胞は発癌に関与する mutation を獲得する機会を抑制されているが、この経路が機能なくなると加速度的に mutation が発生・蓄積され (Nature. 2006;444:633)、発癌、または腫瘍が新たな性格を獲得すると考えられる。我々はこの経路において、ATM の下流に存在する癌抑制遺伝子の一つである p53 に mutation が起こると ATM・H2AX の発現が低下することを証明しており (Cell Prolif. 2006;39:313)、DNA 安定化を図る上でこの経路による DNA 修復が重要であることを示している (図)。一方で、結腸・直腸癌における DNA 損傷応答蛋白発現は、これまでの報告と相反して前癌病変ではほとんど発現を認めず、進行癌で最も高い発現であることを我々が報告した (Cancer Biol Ther. 2010)。これらのタンパク発現が発癌の barrier となっているのか、周囲環境からのストレスによる DNA 損傷=発癌や癌進行のリスクを示しているのかは、依然議論のあるところである。本研究では、DNA 損傷応答・修復に重要な役割を担う ATM・H2AX、そしてその下流にある Chk2 の発現が発癌や悪性度、癌の進行に

関与していると仮定し、これら蛋白発現と臨床的パラメーターとの関連を明らかにすることで、stage I 原発性肺腺癌の治療方針決定の指標となることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 対象症例

2003年から2007年の間に、当科で手術が行われた病理病期I期の原発性肺腺癌症例104例のうち、初発症例で肺葉切除+2群リンパ節郭清が行われ、かつfollow-upが当院で行われている33例を対象とした。

(2) 抗体

免疫染色には、以下の一次抗体を使用した。

Anti-phospho-histone H2AX (Ser-139) monoclonal antibody (mAb) (γ H2AX, Cell Signaling Technology, USA)

Anti-phospho-ATM (Ser-1981) mAb (pATM, Rockland, USA)

Anti-phospho-Chk2 (Thr-68) mAb (pChk2, Abcam, UK)

(3) 免疫染色

コントロールには、HL-60細胞を用いた。HL-60細胞に100 nM camptothecinを30分間投与し固定後パラフィン包埋したものをpositive controlとし、HL-60細胞にDMSOを30分間投与し固定後パラフィン包埋したものをnegative controlとした。

正常肺組織は、肺癌切片内に存在する正常肺組織部分を用いて検討した。

HL-60パラフィンプロックとホルマリン固定切除標本のパラフィンプロックから3 μ m厚の切片を作成した。脱パラフィン後にpH7.0の10 mMクエン酸バッファーを用いて98 $^{\circ}$ C、30分間の抗原賦活を行った。一次抗体は、それぞれpATM (1:400)、 γ H2AX (1:100)、pChk2 (1:100)で4 $^{\circ}$ C、overnightでのincubationとした。Chromogen reactionには0.2 mg/mlのdiaminobenzidineを用いて4分間incubationし、核染色にはMayer's hematoxylinを用いて20分間のincubationを行った。免疫染色結果と各種臨床パラメーター、病理学的因子との関連を検討した。

4. 研究成果

まず、preliminary studyとして、原発性非小細胞肺癌の主要組織型である腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌の切片を作成し、DNA損傷応答蛋白で染色したところ、腺癌切片でのみ陽性細胞を認めたことから、腺癌症例のみで検討を行うことが妥当であると判断した。免疫染色の結果は、正常肺組織と原発性肺腺癌のなかで、非浸潤癌や早期癌と考えられている気管支肺胞上皮癌においては、DNA損傷応答タンパクの発現はほとんど見られないことが判明した (Fig 1, Fig 2)。いわゆる肺腺癌 (papillary adenocarcinoma、adenocarcinoma with mixed subtypesなど) 組織切片においては、DNA損傷応答蛋白のなかでpATMとpChk2の発現が陽性となる症例が存在した (Fig 3)。しかしながら、症例間のばらつきが大きい (いわゆる adenocarcinoma症例でも全く染色されない症例も存在)、いわゆる腺癌症例において統計学的に有意差をもって高発現していることは証明できなかった。γH2AXの発現は、正常肺組織、気管支肺胞上皮癌においては全く発現を認めず、いわゆる腺癌においてもわずかに発現を認めるのみであった (Fig1, 2, 3)。また、各種臨床学的、病理学的パラメーターとの有意な関連は指摘されなかった。

Fig 1. 正常肺組織におけるDNA損傷応答蛋白発現

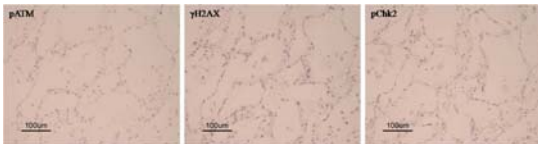


Fig 2. 気管支肺胞上皮癌におけるDNA損傷応答蛋白発現

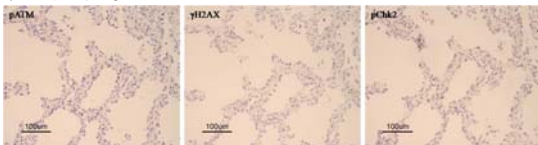
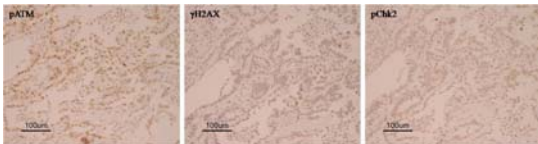


Fig 3. 進行肺癌におけDNA損傷応答蛋白発現



結腸直腸癌の切除標本を用いたDNA損傷応答蛋白発現を検討した我々の報告では、進行癌において有意にDNA損傷応答蛋白が高発現あることが証明されたが、今回の肺腺癌においては確かに進行癌で高発現の症例を認めたもの

の、統計学的有意差を認めなかった。また、ATM・Chk2は陽性となるもののγH2AXの発現はわずかであった。その意義については現在検討中であるが、1) γH2AXはDNAの double-strand break時に発現するため、周囲の環境因子により引き起こされるDNA障害リスク、すなわち酸化ストレスやpoint mutationの修復過程でおこるsingle-strand breakでは発現が非常に少ない、2) DNA損傷応答蛋白の発現には組織特異性があり、肺腺癌ではγH2AXが発現されにくい、3) ATM、Chk2がDNA損傷以外の理由で活性化されている、などが考えられる。

これまでの報告と異なり、結腸直腸癌でのDNA損傷応答蛋白発現と同様に、腫瘍が進行するにつれDNA損傷応答蛋白が高発現となることが示された。これは、DNA損傷応答蛋白が癌進行のbarrierの役割を果たしているのではなく、周囲環境下でのDNA損傷の程度を見ていると考えられる。すなわち、癌細胞の悪性度が増すにつれてDNA不安定性が強くなり、そのため腫瘍細胞のDNAが周囲環境因子により損傷を受ける頻度は進行癌においてより多く、その結果DNAのmutationが蓄積され更に新たな性質の獲得を促進している状況を反映している可能性が高い。

進行癌組織内におけるDNA損傷応答蛋白の活性化が早期癌と比較し強く発現する傾向にあることが証明されたことから、DNA損傷応答蛋白の発現は、発癌や癌の進行、悪性度に関連があると予想される。

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〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中俊樹 (TANAKA TOSHIKI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50457305

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし