

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07442

研究課題名(和文) DNA傷害からみた癌幹細胞性維持機構の違い。glioblastomaをモデルに

研究課題名(英文) Vulnerability to DNA damage and cancer stemness; analysis in glioblastoma

研究代表者

黒瀬 顕 (Akira, Kurose)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：70244910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNA傷害抑制機構が働くと幹細胞性が維持され悪性度が高いと考えられるが、DNA傷害抑制機構は核形態を均一に保つことにも関わるため、核の形態とDNA傷害抑制機構、さらに腫瘍の悪性度の関連を確かめることを課題とした。そのための核の形態計測と数値の標準偏差を用いた比較法を確立した。そしてglioblastomaでは核形態の均一性とDNA傷害との相関が明らかとなり幾つかの幹細胞性マーカーとの相関が認められた。他の癌腫での検討では、胆管癌においてTP53遺伝子変異のないものはあるものと比べて有意に核面積の均一性が高かった。今後も癌において核形態の均一性から幹細胞性や悪性化に繋がる要素を検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病理診断や細胞診断は特に腫瘍医学の上で診断上極めて重要な役割を果たしているが、形態診断に最も重要な核異型に関してはその生じる原因が全く解明されていない。本課題は単に核の異型(正常からの隔たり)ではなく、核の均一性がDNA保護と強く関わっている事を想定してそれを証明し、さらにDNA保護作用は幹細胞性とも強く係ることから、核の均一性と腫瘍悪性度に注目してその解明を試み、glioblastomaではその一部を証明し、さらに他の癌腫においてもDNA保護作用を持つとされるTP53遺伝子変異の有無と核形態の均一性を証明した。診断に欠かせない核形態が腫瘍の生物学的態度との相関を指摘したことは意義深い。

研究成果の概要(英文)：Prevention from DNA damage is considered to correlate with morphological homogeneity of nuclei as well as with stemness and malignancy; correlation of nuclear shape with protection of DNA and malignancy was subjected. A method to compare homogeneity of nuclear shape was established and it correlated significantly with prevention from DNA damage and expression of some stemness markers in glioblastomas. In cholangiocarcinomas, cases with wildtype TP53 showed significant uniformity of nuclear area compared to those with mutant TP53; the former had a tendency showing uniformity of shortest and longest nuclear axes, nuclear perimeter and nuclear shape compared to the latter. These results convince that important correlation between homogeneity of nuclear shape and biological behavior of tumor cells. Homogeneity of nuclear shape can be induced by protection of DNA and represents stemness.

研究分野：病理学

キーワード：glioblastoma 核異型 幹細胞性 DNA傷害 carcinoma H2AX 二本鎖断裂 病理診断

1. 研究開始当初の背景

DNA 傷害抑制機構が癌幹細胞性維持に重要である事を glioblastoma の核異型をモデルに、その他幾つかの癌腫で調べる事を目的とした。これは申請者が先行研究で、大型核や多形性の強い核よりなる腫瘍では DNA 二本鎖断裂が高頻度に生じているにも係わらず、核が小型でよく揃っている腫瘍では DNA 二本鎖断裂が少ないことを見出したことによる。このことから、DNA 傷害の多寡は核の形態的均一性と大きく係わり、更に DNA 傷害の生じやすさは幹細胞性と強く係わると考えられることから、核形態の均一性、DNA 傷害の生じやすさ、幹細胞性との関連を調べる事が重要と考えるに至った。ことに病理組織診断や細胞診断では、がん医療において、核の異型性が重要な形態学的指標であるにも拘わらず、核異型が生じる原因は全く解明されていないことも背景にあげられる。

2. 研究の目的

glioblastoma をはじめ幾つかの癌腫で、核形態の均一性、DNA 二本鎖断裂の程度、幹細胞性やひいては悪性度に係わるとされるマーカーの発現を調べ、これらの相関性を示すことにより、DNA 二本鎖断裂と個々の核形態や核形態の均一性との関係、核形態の均一性と腫瘍の生物学的態度との関係の一部を明らかにし、核の形態的均一性から癌化のや悪性化のメカニズムを探るとともに、病理診断で最も重視される核異型の成因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

glioblastoma の培養細胞株を用いて、テモゾロミド添加により DNA 二本鎖断裂を生じやすい細胞株と生じにくい細胞株とでその原因を調べるために種々の DNA 保護作用のあるタンパク質発現を調べた。さらに DNA 二本鎖断裂の生じやすい細胞株での核形態の変化を調べた。

glioblastoma をはじめ、数種類の癌腫の病理組織標本を用いて核形態を数値化し、核の均一性を数値化することを試みた。最初に glioblastoma の病理組織標本を用いて予備実験を行った。すなわちキーエンス BZ-X710 を用いて対物レンズ 40 倍で腫瘍組織を撮影して核を認識させ、核形態の指標として核面積、短径、長径、核周長、形状係数、変異係数を求めた。そして核の均一性を表すための手技を確立した。そして分子生物学的指標として TP53 遺伝子変異の有無、tumor mutation burden の数値、copy number variation 有無を採り上げた。これらは遺伝子変異の蓄積との強い関与がしてきされているからである。

その手技を用いて、核の均一性と種々の遺伝子変異との関連、幾つかの幹細胞性マーカーとの関連を調べた。

4. 研究成果

核の均一性を数値化するには種々の測定値の標準偏差を用いればよいことが解った。そしてそれぞれの症例で最低 100 個の核を計測すれば更に多数の核を計測した場合と結果が変わらないことを証明した。このことにより、それぞれの症例で 200 個の核について種々の計測値を求めその標準偏差で核形態の均一性を比較する方法を確立した。

glioblastoma の病理組織検体では上記の計測によって、核形態が均一な症例の方が、有意に DNA 二本鎖断裂が少なく、かつ幹細胞性に係わる olig2 の発現が高く、またテロメア伸長にかかわる TERT プロモーター変異があることが分かった。glioblastoma ではこれらの点で核形態が生物学的マーカーと相関していることが証明された。また培養細胞では DNA 二本鎖断裂を生じやすい細胞株は、DNA 二本鎖断裂を生じた後に DNA が倍数体となり、さらに細胞老化に陥って増殖を停止することが分かった。このことは glioblastoma の一部で大型核や奇異核が生じる原因と係わっていると考えられた。

大腸癌、膵癌、胆管癌を用いてこれらの遺伝子変異と核形態の均一性について検討を行った。これらのうち、胆管癌は、TP53 遺伝子変異のあるものの方が無いものに比べて核面積の標準偏差が有意に大きかった。核周長、長径、短径、形状係数、変異係数は、TP53 変異のあるものの方が大きい傾向にあった。copy number variation のあるものは無いものに比べ、核面積、周囲長、長径、短径の標準偏差が大きい傾向にあった。この傾向は膵癌、大腸癌においても同様であった。さらに有意差は得られなかったが、TP53 変異のあるもの、copy number variation のあるもの、tumor mutation burden 値は無いものにくらべ高い傾向がみられた。

以上より、本課題では、核形態の均一性からみた核形態と、DNA 二本鎖断裂、さらに TP53 な

どの幾つかのバイオマーカーとの関連が明らかとなり、核異型とバイオマーカーとの関連を一部ではあるが明らかにしたことは意義深い。

病理診断や細胞診断では、特にがん医療において、従来核異型は重要な形態的指標でありながら、核異型が生じる原因は全く解明されていない。本課題ではその一端が明らかになったことは大きな成果と言える。

なお、tumor mutation burden の値と核の形態的均一性は相関が予測されたが、今回の検討では有意な相関は得られなかった。今回の課題により核の形態的均一性の測定法は確立したので、今後更に別の角度からの tumor mutation burden 値との関連や、さらなるバイオマーカーとの関連を検討することにより、核の形態的均一性の点から癌化、悪性化のメカニズムに迫っていけると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamakawa K, Mukai Y, Ye J, Muto-Ishizuka M, Ito M, Tanimoto M, Suizu F, Asano K, Kurose A, Matsuda Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Telomere length was associated with grade and pathological features of meningioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10157-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Asano K, Yamashita Y, Ono T, Natsumeda M, Beppu T, Matsuda K, Ichikawa M, Kanamori M, Matsuzaka M, Kurose A, Fumoto T, Saito K, Sonoda Y, Ogasawara K, Fujii Y, Shimizu H, Ohkuma H, Kitanaka C, Kayama T, Tominaga T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinicopathological risk factors for a poor prognosis of primary central nervous system lymphoma in elderly patients in the Tohoku and Niigata area: a multicenter, retrospective, cohort study of the Tohoku Brain Tumor Study Group	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10014-022-00427-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Asano K, Yamashita Y, Ono T, Natsumeda M, Beppu T, Matsuda K, Ichikawa M, Kanamori M, Matsuzaka M, Kurose A, Saito K, Sonoda Y, Ogasawara K, Fujii Y, Shimizu H, Ohkuma H, Kitanaka C, Kayama T, Tominaga T.	4. 巻 27
2. 論文標題 The Real-World status and risk factors for a poor prognosis in elderly patients with primary central nervous system malignant lymphomas: a multicenter, retrospective cohort study of the Tohoku Brain Tumor Study Group	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 77-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-021-02042-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Asano K, Fumoto T, Matsuzaka M, Hasegawa S, Suzuki N, Akasaka K, Katayama K, Kamataki A, Kurose A, Ohkuma H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Combination chemoradiotherapy with temozolomide, vincristine, and interferon- might improve outcomes regardless of O6-methyl-guanine-DNA-methyltransferase (MGMT) promoter methylation status in newly glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-021-08592-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 4件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒瀬顕
2. 発表標題 Giant cell glioblastoma is a distinctive subtype of glioma characterized by vulnerability to DNA damage
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍病理学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒瀬顕
2. 発表標題 脳腫瘍診断
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会秋期大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒瀬顕
2. 発表標題 DNA傷害と核異型 (ワークショップ: ゲノム時代における形態学の新たな展開)
3. 学会等名 第52回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒瀬 顕
2. 発表標題 高悪性度グリオーマの病理とゲノム異常
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	小川 薫 (Ogawa Kaoru) (10815799)	弘前大学・医学部附属病院・助教 (11101)	
研究分担者	鎌滝 章央 (Kamatagi Akihisa) (60360004)	弘前大学・医学研究科・助教 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------