

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591768

研究課題名（和文）胆管癌における 53BP1 を介した DNA 損傷修復機構の解明及びその臨床的意義

研究課題名（英文）Alteration of p53-binding protein 1 expression as a risk factor for local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

若井 俊文（WAKAI TOSHIFUMI）

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：50372470

研究成果の概要（和文）：

胆管癌の胆管切離断端に遺残した上皮内癌と浸潤癌における DNA 損傷部の 53BP1 を介した修復機構の研究を行った。胆管断端のみが独立した局所再発危険因子であった。累積 5 年局所再発率は陰性群 10%，上皮内癌群 40%，浸潤癌群 100%であった。上皮内癌では 53BP1 核内発現びまん性集積が 10 例，ドット状集積が 4 例であり，アポトーシス標識率はびまん性集積が中央値 1%に対しドット状集積では 22%と有意に高かった。上皮内癌では，びまん性集積していた 10 例の累積 10 年局所再発率は 100%であり，ドット状集積していた 4 例の 0%と比較して有意に局所再発発生率が高かった。胆管切離断端に遺残した上皮内癌の局所再発(浸潤癌への進展)は，DNA 損傷修復仲介因子 53BP1 の不活化およびアポトーシス減少と関連がある。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to clarify the early DNA damage response mediated by 53BP1 in tumor specimens of ductal resection margins and to elucidate its predictive value for clinically evident local recurrence at ductal stumps in 110 patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma. Ductal margin status was the only independent risk factor for local recurrence ($P=0.001$). The cumulative probability of local recurrence at 5 years was 10%, 40%, and 100% in patients with negative ductal margins, positive with carcinoma in situ, and positive with invasive carcinoma, respectively ($P<0.001$). Of the 14 tumor specimens of carcinoma in situ, 10 showed diffuse localization of 53BP1 in nuclei (53BP1 inactivation) and 4 showed discrete nuclear foci of 53BP1 (53BP1 activation). Apoptotic index was markedly decreased in tumor specimens with 53BP1 inactivation compared to those with 53BP1 activation (median index, 0% vs. 22%; $P<0.001$). Among 14 patients with residual carcinoma in situ, the cumulative probability of local recurrence was significantly higher in patients with 53BP1 inactivation than in patients with 53BP1 activation (60% vs. 0% at 5 years; $P=0.020$). In conclusion, after resection for extrahepatic cholangiocarcinoma, clinically evident local recurrence at ductal stumps is closely associated with 53BP1 inactivation and decreased apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			

年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：胆道外科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 2005年に申請者らは、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た。一方、上皮内癌陽性群の遠隔成績は比較的良好であり、胆管断端陰性群と比較して有意差はみられなかった。胆管切離断端が上皮内癌陽性であった11例中4例が再発死（初発再発部位は局所再発）していた。一方、胆管切離断端が上皮内癌陽性であったにもかかわらず11例中7例は無再發生存している事実を説明できる科学的根拠は未だ解明されていない。

(2) これら臨床成績から上皮内癌と浸潤癌との間には、DNA損傷部の53BP1を介する修復機構に明確な相違点があることが推測される。申請者らはDNA損傷と53BP1によるDNA損傷修復機構に着目し、「胆管癌の胆管切離断端に遺残した上皮内癌と浸潤癌とでは、DNA損傷部の53BP1を介する修復機構に相違点がある」という仮説をたて、本研究を企画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「胆管癌の胆管切離断端に遺残した上皮内癌と浸潤癌におけるDNA損傷部の53BP1を介する修復機構の相違点を解明し、その臨床的意義を明らかにすること」である。

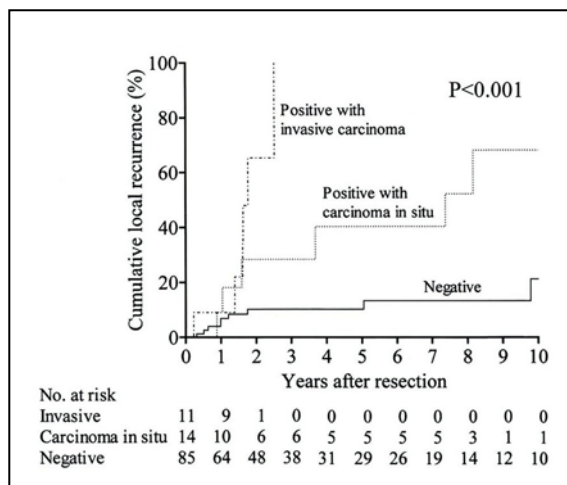
3. 研究の方法

(1) 肝外胆管癌にて根治術が施行された110例をretrospectiveに解析した。胆管切離断端陽性群は断端上皮内癌CIS陽性群（以下CIS群）と断端浸潤癌陽性群（以下浸潤癌群）の2群に分類した。

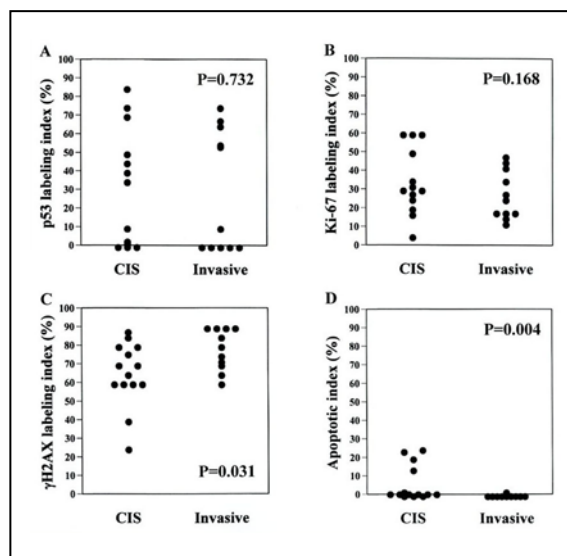
(2) DNA損傷部の検出には γ -H2AXモノクローナル抗体による免疫組織化学染色、DNA損傷修復仲介因子53BP1の検出には蛍光免疫組織染色を行い共焦点レーザー走査顕微鏡にて53BP1の核内発現を検出した。DNA損傷部の修復状態の検出にはp53、Ki67モノクローナル抗体による免疫組織化学染色、TUNEL法によりapoptosisを検出した。胆管癌で通常解析されている16種類の臨床病理学的因子と局所再発との関連を検討した。

4. 研究成果

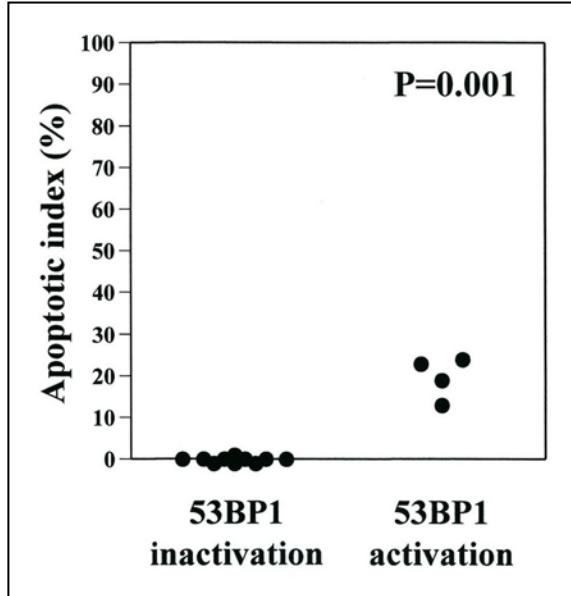
(1) 陰性群85例、CIS群14例、浸潤癌群11例であった。多変量解析では胆管断端(P = 0.001)のみが独立した局所再発危険因子であった。累積5年局所再発率は陰性群10%、CIS群40%、浸潤癌群100%であった(P < 0.0001)。



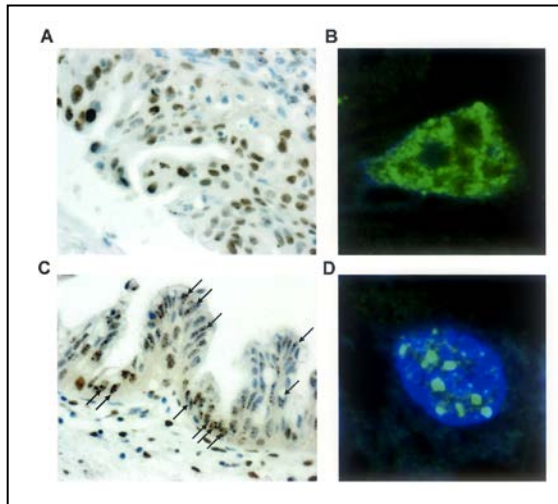
(2) 胆管切離断端におけるCISと浸潤癌との間でp53標識率、Ki67標識率に差は認めなかったが、浸潤癌では γ -H2AX標識率(P = 0.031)は有意に高く、apoptosis標識率(P = 0.004)は有意に低かった。



(3) 53BP1 核内発現様式は、浸潤癌では全例びまん性集積であった。CIS では 53BP1 核内発現びまん性集積が 10 例、ドット状集積が 4 例であり、apoptosis 標識率はびまん性集積が中央値 1%に対しドット状集積では 22%と有意に高かった(P = 0.001)。



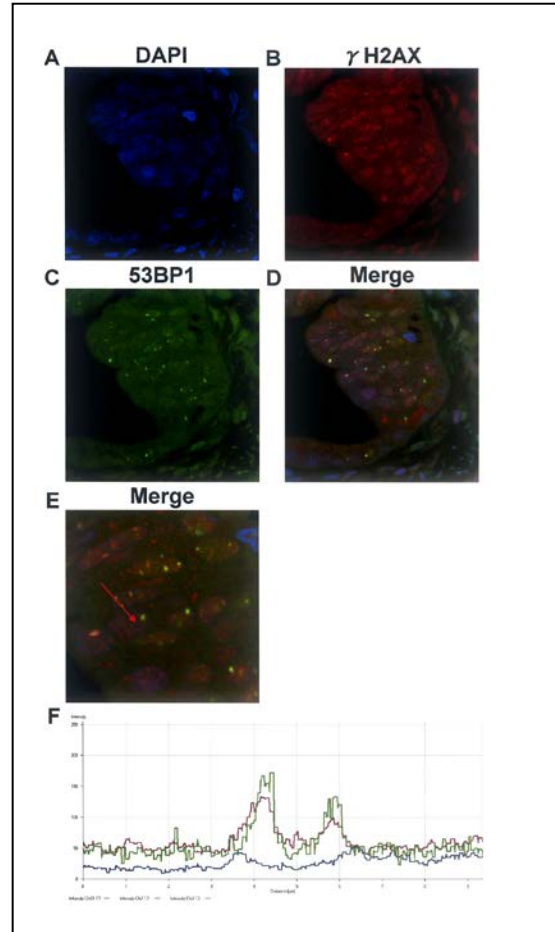
(4) 上皮内癌部における 53BP1 核内発現様式: A, B では 53BP1 核内発現は、びまん性集積している (A, 免疫組織化学; B, 蛍光免疫組織染色). C, D では 53BP1 核内発現は、ドット状集積している (C, 免疫組織化学; D, 蛍光免疫組織染色).



(5) 53BP1 核内ドット状集積における γ H2AX および 53BP1 との二重蛍光免疫組織染色を行い、53BP1 核内ドット状集積における両者の核内発現の局在を検討した結果、上皮内癌部に γ H2AX, 53BP1 の核内ドット状集積を認め、merge では、53BP1 は優勢に γ H2AX に

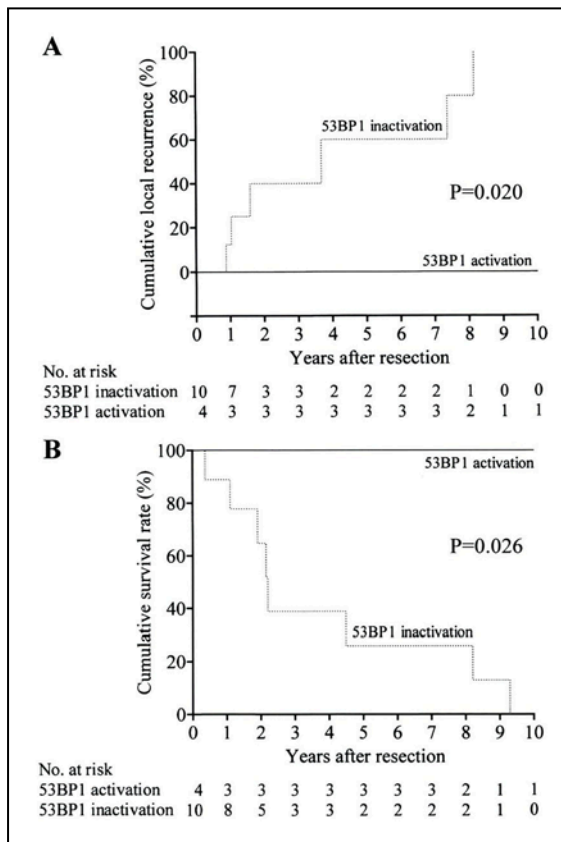
共局在していた。

Merge した拡大図の赤線部分の intensity curves をグラフ化すると、53BP1 の intensity curve (緑) の 2 つのピークは γ H2AX の intensity curve (赤) のピークと一致しており、共局在していることが明確に理解できる。



53BP1 核内ドット状集積における γ H2AX および 53BP1 との二重蛍光免疫組織染色. A, DAPI (青); B, γ H2AX (赤); C, 53BP1 (緑); D, merge; E, merge の拡大図と intensity curves.

(7) CIS 群では、びまん性集積していた 10 例の累積 10 年局所再発率は 100%であり、ドット状集積していた 4 例の 0%と比較して有意に局所再発発生率が高かった(P = 0.020)。



(8) 結論：胆管切離断端に遺残した CIS の局所再発(浸潤癌への進展)は、DNA 損傷修復仲介因子 53BP1 の不活化および apoptosis 減少と関連がある。

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] (計 2 件)

1) Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Korita PV, Matsuda Y, Takamura M, Ohashi R, Nagahashi M, Ajioka Y, Hatakeyama K. Alteration of p53-binding protein 1 expression as a risk factor for local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* 査読有り、2011;38(5):1227-1236.

2) 若井俊文, 白井良夫, 坂田 純, Korita V, Pavel, 味岡洋一, 畠山勝義. 胆管癌根治切除後の胆管切離断端に遺残した上皮内癌における早期 DNA 損傷修復応答と局所再発との関連. *胆道* 査読有り、2010;24(5):667-674.

[学会発表] (計 6 件)

1) Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Korita PV, Nagahashi M, Ajioka Y, Hatakeyama K. Alteration of p53-binding protein 1 expression as a risk factor for local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma. INTERNATIONAL SURGICAL WEEK 2011 2011 年 9 月 1 日 Yokohama

2) Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Korita PV, Nagahashi M, Hatakeyama K. Early DNA Damage Response and Local Recurrence at Ductal Resection Margins in Patients Undergoing Resection for Extrahepatic Cholangiocarcinoma. 96 th Annual Clinical Congress, American College of Surgeons 2010 年 10 月 5 日 Washington, DC

3) 若井俊文, 白井良夫, 坂田 純, 永橋昌幸, 井上 真, 畠山勝義. <ワークショップ> 肝門部胆管癌術後の胆管切離断端部遺残腫瘍における DNA damage response と予後との関連. 第 65 回日本消化器外科学会総会 2010 年 7 月 15 日 下関

4) 若井俊文, 白井良夫, 松田康伸, 坂田 純, 味岡洋一, 畠山勝義. 胆管癌における 53BP1 を介した DNA 損傷修復機構の解明及びその臨床的意義. 第 17 回日本消化器関連学会週間 JDDW 2009 2009 年 10 月 16 日 京都

5) 若井俊文, 白井良夫, 坂田 純, 金子和弘, 永橋昌幸, 畠山勝義. 胆管癌根治切除後の胆管切離断端部遺残腫瘍における DNA damage response と局所再発との関連. 第 45 回日本胆道学会学術集会 2009 年 9 月 18 日 千葉

6) 若井俊文, 白井良夫, 坂田 純, 金子和弘, 永橋昌幸, 畠山勝義. 胆管断端における癌遺残が肝外胆管癌根治術後の遠隔成績に与える影響. 第 64 回日本消化器外科学会総会 2009 年 7 月 16 日 大阪

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若井 俊文 (WAKAI TOSHIFUMI)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：50372470

(2) 研究分担者

白井 良夫 (SHIRAI YOSHIO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：50216173

(3) 連携研究者

()

研究者番号：