

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590391

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎の炎症性発癌におけるDNA損傷修復応答の意義

研究課題名(英文)Significance of DNA damage response in cancerization in ulcerative colitis

研究代表者

味岡 洋一 (AJIOKA, Yoichi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80222610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎の慢性持続性炎症粘膜では正常粘膜に比べ高頻度にDNA損傷(DNA二重鎖切断)が起きており、DNA損傷を背景に大腸癌が発生すると考えられる。潰瘍性大腸炎に発生した癌はDNA損傷に対する修復応答の破綻により進行する。こうした炎症性発癌過程におけるDNA損傷に対する修復応答の破綻は、通常の大腸腫瘍に比べより早期に起きていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory mucosa in ulcerative colitis showed elevated level of DNA damages (DNA double strand breaks) and cancerization in UC may be prepared in such DNA damaged mucosa. Invasive carcinoma in ulcerative colitis showed significantly low level of DNA damage response than early phase of cancerization process. In comparison with sporadic tumors, invasive carcinoma in ulcerative colitis showed significantly low level of DNA damage response. By these data, it is speculated that DNA damages and early failure of DNA damage response may occurred during inflammatory cancerization process in UC.

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：炎症性発癌 潰瘍性大腸炎 大腸癌 DNA二重鎖切断 DNA損傷応答 免疫組織化学 dysplasia

1. 研究開始当初の背景

近年、早期発癌過程における DNA 二重鎖切断(DSB)の重要性が報告されており、発癌過程では核内で DNA 損傷と DNA 損傷部の修復が起こっており、細胞の DNA 損傷が修復できない状態に陥ると癌化することが解明されている (Gorgoulis VG, et al. Nature, 2005)。DNA 損傷部位に ATM が動員され活性化し、活性化された ATM はヒストン H2AX(Ser139)をリン酸化する(Ser139 がリン酸化されたヒストン H2AX は γ -H2AX と呼ばれる)。 γ -H2AX はリン酸化依存的なタンパク質相互作用により 53BP1 が DSB 部位周辺に動員され、Tudor ドメインを介してメチル化ヒストンに結合し DNA 損傷部の修復を行う (Schultz LB, et al. J Cell Biol. 2000)。また、活性化された ATM によって Chk2 の 68 番目のスレオニン(Thr68)がリン酸化される。活性化された Chk2 は、p53 の Ser20 をリン酸化し p53 を安定化させることで、細胞周期の停止やアポトーシスを誘導することが解明されつつあり、DNA 二重鎖切断 (double strand breaks: DSB) とそれに対する DNA 損傷修復応答 (DNA damage response: DDR) の破綻が、ヒト癌の発生に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

潰瘍性大腸炎の慢性持続性炎症粘膜には高頻度で大腸癌が発生することが知られており、炎症性発癌と呼ばれている。炎症性発癌では dysplasia と呼ばれる粘膜内腫瘍を発癌早期病変として、dysplasia の発生には高率に p53 遺伝子異常が関与しているとされているが、その他の炎症性発癌に関わる分子メカニズムは十分に解明されていない。他方、長期罹患潰瘍性大腸炎の大腸上皮細胞では、DSB の指標である H2AX の発現が増加していることが報告されており、DSB とそれに対する DDR の破綻が炎症性発癌過程に関与している可能性が想定されるが、これまでホルマリン固定材料を用いた多数例による系統的検討はなされていない。

2. 研究の目的

潰瘍性大腸炎の炎症性発癌過程において、「DNA 損傷」とそれに対する「DNA 損傷応答」の破綻が重要な役割を果たしていることを明らかにする。

3. 研究の方法

DNA 二重鎖切断の指標として H2AX 発現、DNA 損傷修復応答の指標として H2AS と 53BP1 の共局在を用いた。H2AX の発現についてはモノクローナル抗体による免疫染色を行い、H2AX と 53BP1 の共局在については二重蛍光免疫染色を行った。

はじめに、ホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いた H2AX 発現 (DSBs の指標) と H2AX と 53BP1 の共局在 (DDR の指標) の検討が可能かどうかについてについて、ホルマ

リン固定外科切除大腸の腺腫 63 病変、粘膜内癌 12 病変、浸潤癌 56 病変を対象とした予備的検討を行った。

予備的検討の後、正常大腸 50 例、潰瘍性大腸炎 (UC) 117 例、炎症性腸疾患などを合併しない大腸に発生した散発性腫瘍 128 例 (腺腫 63、粘膜内癌 12、浸潤癌 13)、UC に発生した大腸腫瘍 38 例 (dysplasia 11、粘膜内癌 14、浸潤癌 13) を対象として、炎症性発癌における DSBs と DDR について検討した。UC の炎症時相は、寛解期、慢性活動期、活動期に分類した。

免疫染色の評価法は以下の通りとした。
H2AX 発現率: 正常粘膜および粘膜内病変に関しては総陰窩 (腺管) 数に占める H2AX 陽性細胞が 1 個以上ある陰窩 (腺管) の比率 (%)。浸潤癌に関しては、H2AX 陽性細胞が出現する hot spot における総細胞数に対する H2AX 陽性細胞の比率 (%)。H2AX と 53BP1 の共局在率: H2AX 陽性細胞に占める 53BP1 との共局在細胞の比率 (%)。

4. 研究成果

予備的検討の結果: ホルマリン固定パラフィン包埋切片でも、免疫染色による H2AX 発現と、二重蛍光免疫染色による H2AX と 53BP1 の共局在の検出が可能であった。

H2AX の発現には、核内点状と核内びまん性の 2 つのパターンがあった。正常大腸粘膜では H2AX の発現はなく、腺腫および粘膜内癌の粘膜内腫瘍では核内点状発現が 14%、びまん性発現が 16% に、浸潤癌では核内点状発現が 37%、びまん性発現が 27% にみられた。二重蛍光免疫染色では、核内に点状に発現する H2AX は 53BP1 との共局在が確認されたが、びまん性発現では共局在は観察されなかった。

UC 粘膜を用いた DSB の検討では、(1) UC 大腸は正常大腸に比べ H2AX 陽性陰窩の頻度が有意に高かった ($p < 0.001$)、(2) UC 大腸の炎症時相別の比較では、活動期の H2AX 陽性陰窩の頻度が寛解期に比べ有意に高かった ($p < 0.001$)、(3) UC 罹患年数と H2AX 陽性陰窩との間に有意な相関は見られなかった。(4) dysplasia ではいずれも寛解期 UC 粘膜に比べ H2AX 陽性陰窩頻度は有意に高かった ($p = 0.015$)、(5) 炎症性発癌病変の DSB および DDR の検討では、浸潤癌は dysplasia に比べ、

H2AX と 53BP1 の共局在率が有意に低かった ($p = 0.015$)。粘膜内癌と dysplasia との間には有意差は無かった。(6) UC に発生した腫瘍と散発性腫瘍との比較では、UC の浸潤癌は通常の浸潤癌に比べ H2AX と 53BP1 の共局在率が有意に低く ($p = 0.002$)、UC の粘膜内癌は通常の粘膜内癌に比べ共局在率が低い傾向があった ($p = 0.089$)。UC の dysplasia と腺腫との間には有意差はなかった。

以上のことから、ホルマリン固定パラフィン包埋材料でも DNA 損傷とそれに対する修復応答の検討が可能であり、同材料を用いた多数例の検討から、UC 粘膜では通常の大腸粘膜

に比べ高頻度に DSB が生じており、炎症の活動性が高いほど DSB の頻度も高いこと、UC に発生した腫瘍性粘膜でも同様に高い DSB が生じており、炎症性発癌の背景には慢性持続性炎症による DNA 損傷があること、DSB に対する DDR は粘膜内腫瘍に比べ浸潤癌で有意に低く、炎症性発癌の進行には DDR の破綻が関与していること、そして炎症性発癌における DDR の破綻は通常の大腸癌の発育進展に比べより早期に起きていること、が明らかとなった。炎症性発癌早期における高頻度の DSB は、潰瘍性大腸炎に発生する癌の早期発見のためのバイオマーカーの一つとしても期待される。

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6件)

Takabayashi H, Wakai T, Ajioka Y, Korita PV, Yamaguchi N. Alteration of the DNA damage response in colorectal tumor progression. *Human Pathology*, 査読有、44: 1038-1046, 2013.

DOI: 10.1016/j.humpath.2012.09.006

味岡洋一, 佐野知江. 潰瘍性大腸炎における大腸癌の病理組織学的特徴と生検診断. *日本消化器病学会雑誌*, 査読有、110: 379-384, 2013.

DOI: 10.11405/nisshoshi.110.379

味岡洋一, 渡辺 玄, 加藤 卓. 潰瘍性大腸炎腫瘍 診療と研究の最前線 潰瘍性大腸炎関連腫瘍の病理 炎症性発癌と通常型大腸腫瘍との差異を中心に . *IBD Research*, 査読無、7,2: 85-89, 2013. http://www.sentan.com/cgi-bin/db_n.cgi?mode=view_backno&no=963

Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Korita PV, Ajioka Y, Hatakeyama K. Early DNA damage response in residual carcinoma in situ at ductal stumps and local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 査読有、11: 2012.

DOI: 10.1007/s00534-012-0539-1

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. *International Journal of Oncology*, 査読有、38: 1227-1236, 2011.

DOI: 10.3892/ijio.2011.959

Watanabe T, Kobunai T, Ikeuchi H, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Imura H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H. RUNX3 copy number predicts the development of UC-associated colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 査読有、38: 201-2077, 2011.

DOI: 10.3892/ijio_00000839

[学会発表](計6件)

谷 優佑, 味岡洋一, 渡辺佳緒里, 若井俊文, 山口尚之, 高林広明, 小林和恵. 潰瘍性大腸炎の炎症性発癌過程における DNA 損傷応答. 第 102 回日本病理学会総会. 2013.6.7 札幌

渡辺佳緒里, 味岡洋一, 谷 優佑, 小林和恵. 潰瘍性大腸炎における胃型粘液発現の検討. 第 102 回日本病理学会総会. 2013.6.7 札幌

味岡洋一. 特別発言: パネルディスカッション 3 Colitic cancer の診断と治療における up to date. 第 67 回日本大腸肛門病学会学術総会. 2012.11.21 福岡

味岡洋一. コンポジウム 2 炎症性腸疾患: colitic cancer の診断と治療の進歩. 第 8 回日本消化管学会総会学術集会. 2012.2.11 仙台

味岡洋一. 内視鏡医のための病理セッション 炎症性発癌の病理診断. 第 82 回日本消化器内視鏡学会総会. 2011.10.22 福岡

高林広明, 味岡洋一, 若井俊文. 大腸腫瘍の発育進展における、53BP1 を介した DNA 損傷修復応答の変化. 第 70 回日本癌学会学術総会. 2011.10.5 名古屋

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

味岡 洋一 (AJIOKA, Yoichi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：80222610

(2) 研究分担者

若井 俊文 (WAKAI, Toshifumi)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：50372470

(3) 連携研究者

()

研究者番号：