

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591964

研究課題名(和文) 大腸癌における細胞分裂期チェックポイント異常の系統的解明と分子標的治療への応用

研究課題名(英文) A systematic study of the disorders in the spindle assembly checkpoint genes in colorectal cancer and its application to molecular targeted therapy

研究代表者

鴻江 俊治 (Kohnoe, Shunji)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：30215199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌の発癌・増殖に関わる分子異常を明らかにする目的で、大腸癌細胞および癌切除組織において細胞分裂期に働くスピンドルチェックポイント機構の遺伝子群の発現状態を解析した。その結果、p53遺伝子変異(正常発現喪失)が上記遺伝子群であるBUBR1、Aurora-A、Aurora-B、PLK1にチェック機能低下を引き起こし、その結果、染色体不安定性(an euploidy)が出現する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the molecular abnormality in colorectal carcinogenesis, we investigate the disorders in the spindle assembly checkpoint genes by examining those expressions in colorectal cancer cell. Our data showed that p53 gene mutation (loss of normal function) might induce suppression of spindle assembly checkpoint genes, and might contribute to DNA aneuploidy and thereafter carcinogenesis.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：消化器外科学・小腸大腸肛門外科学

キーワード：大腸癌 ゲノム不安定性 染色体不安定性 スピンドルチェックポイント DNA aneuploidy

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 大腸癌の発生経路

ゲノム不安定性の形態のひとつである染色体異数性 (DNA aneuploidy) はいろいろな癌において古くから観察された現象であり、その現象が癌の生物学的悪性度あるいは臨床病理学的悪性因子や患者予後と関連していることをわれわれの研究室は以前より報告してきた (Korenaga D et al, Cancer 62:309-313, 1988; Korenaga D et al, Surgery 107:262-267, 1990)。

近年、ゲノム不安定性は単なる現象でなく、癌発生の原因と考えられている。特に大腸癌においては染色体不安定型 (CIN) とマイクロサテライト不安定型 (MIN) が主要な発生経路として知られている。CIN 型は大腸癌発生の大多数 (85 ~ 90%) を占める経路で、その発癌過程において DNA aneuploidy が認められることが多い。

### 2) DNA aneuploidy と細胞分裂期スピンドルチェックポイント

DNA aneuploidy が発生するメカニズムは十分に解明されていないが、その原因のひとつとして細胞分裂期における紡錘体形成のチェックポイント機構の異常が提唱されている。われわれの研究室は胃癌における DNA aneuploidy 発生要因として紡錘体形成チェックポイント蛋白のひとつである BUBR1 が機能していることを明らかにした (Ando K et al, Cancer Science 101:639-645, 2010)。

細胞分裂期スピンドルチェックポイントに関する蛋白は他に、Aurora A, Aurora B, MAD, Polo-like kinase 1 (Plk1) 等が知られており、それぞれの異常が大腸癌において確認され、発癌に関与していることが報告されている (Sheffer M et al, Proc Natl Acad Sci 106:7131-7136, 2009; Rimkus C et al, Int J Cancer 120:207-211, 2007; Takai N et al, Oncogene 24:287-291, 2005; Takahashi T et al, Cancer Sci 94:148-152, 2003)。

### 3) 新たな標的としての細胞分裂期スピンドルチェックポイント機構

スピンドルチェックポイント機構に属する蛋白が癌治療の新たな標的と考えられ、Aurora あるいは Plk1 の阻害剤による臨床試験が始まっている。

(<http://www.clinicaltrials.gov/>)

今後の臨床応用化のために、スピンドルチェックポイント機構を形成する各蛋白がどのように関連しながら大腸発癌に関与しているか、臨床検体を用いて系統的に解析し、その情報を把握することが必須である。

## 2. 研究の目的

Bevacizumab あるいは Cetuximab の分子標的薬の登場は大腸癌化学療法に新たな時代をもたらした。今後の進展は新たな分子標的薬の開発にかかっている。そのために大腸発癌の分子生物学的解明が重要である。そこで大腸癌治療における新たな分子標的を策定

することを目標として、大腸発癌経路の大多数 (85 ~ 90%) を占める染色体不安定型 (CIN) 発癌過程において認められる細胞分裂期のスピンドル (紡錘体) チェックポイント機構の異常を BUBR1 を中心に系統的に解析した。

## 3. 研究の方法

1) 大腸癌切除標本 140 例を用いて、染色体不安定性の形質として DNA ploidy を Laser Scanning Cytometry を使用し、解析した。

2) マイクロサテライト不安定性の形質として microsatellite instability (MSI) を高分解能蛍光マイクロサテライト解析法により評価した。

3) 上記大腸癌切除標本組織における細胞分裂期スピンドルチェックポイント因子の発現の解析として、BUBR1, Aurora A, Aurora B, Plk1 のモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色により蛋白発現レベルを解析した。さらに関連遺伝子として p53 発現異常および TP53 遺伝子変異を解析した。

## 4. 研究成果

1) 大腸癌切除標本組織における細胞分裂期スピンドルチェックポイント因子 BUBR1 の発現

大腸癌切除標本 140 例のうち、94 症例が BUBR1 高発現であった。そのうち、68 例 (72.3%) が DNA aneuploidy であった。それに対して、BUBR1 低発現 46 症例のうち、24 例 (52.2%) のみが DNA aneuploidy と、有意に低い頻度であった。

BUBR1 高発現 94 症例のうち、わずか 9 例 (9.6%) が MSI を示した。それに対して、BUBR1 低発現 46 症例のうち、12 例 (26.1%) が MSI を示し、有意に高い頻度であった。

	BUBR1 (%)		P
	Low	High	
<b>MSI</b>			
(-)	34 (73.9)	85 (90.4)	0.010
(+)	12 (26.1)	9 (9.6)	
<b>DNA ploidy</b>			
Diploidy	22 (47.8)	26 (27.7)	0.019
Aneuploidy	24 (52.2)	68 (72.3)	
Total	46	94	

BUBR1 高発現 94 症例のうち、49 例 (52.1%) に p53 発現異常を認めた。それに対して、BUBR1 低発現 46 症例のうち、15 例 (32.6%) のみが p53 発現異常を示した。さらに関連して、TP53 遺伝子変異は BUBR1 高発現症例で 38 例 (40.4%) と、BUBR1 低発現症例での 10 例 (21.7%) と比較して高頻度であった。

	BUBR1 (%)		P
	Low	High	
<b>p53 expression</b>			
Negative	31(67.4)	45 (47.9)	0.029
Positive	15 (32.6)	49 (52.1)	
<b>TP53 gene</b>			
Wild type	36 (78.3)	56 (59.5)	0.025
Mutation	10 (21.7)	38 (40.4)	
Total	46	94	

2) 予備的研究；胃癌における BUBR1 以外の細胞分裂期スピンドルチェックポイント因子の発現

胃癌組織において Aurora-B の過剰発現と DNA aneuploidy さらに TP53 遺伝子変異が優位に相関していた。

	Aurora B		P
	低発現 (n=53)	高発現 (n=57)	
<b>DNA ploidy</b>			
Euploidy	26(49%)	16(28%)	0.023
Aneuploidy	27(51%)	41(72%)	
<b>TP53 変異</b>			
(-)	34(87%)	25(63%)	0.01
(+)	5(13%)	15(37%)	

PLK1 の過剰発現は DNA aneuploidy と優位に相関していた。

DNA ploidy	PLK1 expression		P
	Low	High	
Diploidy	51(61%)	32(30%)	0.001
Aneuploidy	49(39%)	75(70%)	

diploid cell に対し KBrO3 による酸化ストレスは p53 の活性化とそれに引き続く BUBR1 の抑制をもたらすが、p53 ノックアウト細胞に対し、酸化ストレスは BUBR1 過剰発現から DNA aneuploidy 化をもたらした。

以上より、大腸癌発癌において、p53 遺伝子変異（正常発現喪失）がスピンドルチェックポイント機構の遺伝子群である BUBR1、Aurora-B、Aurora-B、PLK1 にチェック機能低

下を引き起こし、その結果、CIN 型に認められる aneuploidy が出現した可能性が示唆された。

## 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 12 件)

Ando K, Oki E, Zhao Y, Yoshida A, Kitao H, Saeki H, Kimura Y, Ida S, Morita M, Kusumoto T, Maehara Y. Mortalin is a prognostic factor of gastric cancer with normal p53 function. *Gastric Cancer*, 17(2); 255-262, 2014

Honma K, Nakanishi R, Nakanoko T, Ando K, Saeki H, Oki E, Iimori M, Kitao H, Takeji Y, Maehara Y. Contribution of Aurora-A and -B expression to DNA aneuploidy in gastric cancer. *Surg. Today*, 44(3);454-461, 2014

Ikawa-Yoshida A, Ando K, Oki E, Saeki H, Kumashiro R, Taketani K, Ida S, Tokunaga E, Kitao H, Morita M, Maehara Y. Contribution of BubR1 to oxidative stress-induced aneuploidy in p53-deficient cells. *Cancer Medicine*, 2(4);447-456, 2013

沖英次、佐伯浩司、安藤幸滋、井田智、木村和恵、森田勝、楠本哲也、前原喜彦 分子標的薬に対する期待と課題、臨床と研究 90;68-72, 2013

Fujinaka Y, Matsuoka K, Iimori M, Tuul M, Sakasai R, Yoshinaga K, Saeki H, Morita M, Takeji Y, Gillespie DA, Yamamoto K, Takata M, Kitao H, Maehara Y. ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. *DNA Repair*, 11(3); 247-258, 2012

Nakanishi R, Kitao H, Fujinaka Y, Yamashita N, Iimori M, Tokunaga E, Yamashita N, Morita M, Takeji Y, Maehara Y. FANCD1 Expression Predicts the Response to 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy in MLH1-Proficient Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 19(11); 3627-3635, 2012

Oki E, Hisamatsu Y, Ando K, Saeki H, Takeji Y, Maehara Y. Clinical aspect and molecular mechanism of DNA aneuploidy in gastric cancers. *J Gastroenterol* 47(4);351-358, 2012

Sakasai R, Sakai A, Iimori M, Kiyonari S, Matsuoka K, Takeji Y, Kitao H, Maehara Y. CtIP- and ATR-dependent FANCD1 phosphorylation in response to DNA strand breaks mediated by DNA replication. *Genes Cells* 17(12);

962-970, 2012

Sakai A, Sakasai R, Takeji Y, Kitao H, Maehara Y. PARP and CSB modulate the processing of transcription-mediated DNA strand breaks. *Genes Genetic Systems* 87(4); 265-272, 2012

Nakanishi R, Harada J, Tuul M, Zhao Y, Ando K, Saeki H, Oki E, Ohga T, Kitao H, Takeji Y, Maehara Y. Prognostic relevance of KRAS and BRAF mutations in Japanese patients with colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*, 18(6); 1042-1048, 2013

安藤幸滋、北尾洋之、飯森真人、沖英次、佐伯浩司、大賀丈史、掛地吉弘、辻谷俊二、鴻江俊治、前原喜彦、胃癌における紡錘体形成チェックポイントタンパク質の発現異常と DNA aneuploidy、*胃がん perspective*, 5(1); 24-32, 2012

安藤幸滋、趙岩、沖英次、北尾洋之、佐伯浩司、掛地吉弘、木村和恵、井田智、森田勝、楠本哲也、前原喜彦、消化器癌における DNA aneuploidy の意義、*CYTOMETRY RESEARCH*, 22(2); 15-20

〔学会発表〕(計 9 件)

大津甫、笠木勇太、財津瑛子、日高元、津田康雄、河野浩幸、安藤幸滋、井田智、木村和恵、佐伯浩司、沖英次、森田勝、楠本哲也、前原喜彦、胃癌における細胞周期の制御因子 PIk1 過剰発現と染色体不安定性の関連、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11-13 日、福岡市

Zaitu Y, Oki E, Tanaka K, Yukaya T, Kasagi Y, Tsuda Y, Hidaka G, Otsu H, Kawano H, Ando K, Ida S, Kimura Y, Saeki K, Morita M, Kusumoto T, Maehara Y. Loss of heterozygosity of encoding phosphate and tensin homolog as a prognostic factor in for gastric cancer, and it's relationship with p53. The 10th International Gastric Cancer Congress(IGCC 2013)、2013 年 6 月 19 - 22 日、ヴェローナ(イタリア)

武谷憲二、安藤幸滋、井田智、木村和恵、佐伯浩司、沖英次、森田勝、楠本哲也、北嶋繁孝、前原喜彦、ヒト大腸がん細胞の TRAIL シグナルにおけるストレス応答遺伝子 ATF3 と p53 と協調作用、第 24 回日本消化器癌発生学会、2013 年 9 月 5-6 日、金沢市

Ando K, Oki E, Yan Z, Kitao H, Saeki H, Ohga T, Takeji Y, Tujitani S, Kohnoe S, Maehara Y. Significance of mortalin expression in gastric cancer with normal p53. ASCO GI 2012、2012 年 1 月 19-21 日、サンフランシスコ

Oki E, Nakanishi R, Ando K, Saeki H, Ohga T, Takeji Y, Tujitani S, Kohnoe S,

Maehara Y. Prognostic role of KRAS and BRAF mutations in Japanese patients with colorectal cancer. ASCO、2012 年 6 月 1-5 日、シカゴ

Nakanishi R, Kitao H, Fujinaka Y, Yamashita N, Iimori M, Tokunaga E, Yamashita N, Morita M, Takeji Y, Maehara Y. The 8th International Symposium on Cancer Research and Therapy、2012 年 11 月 9-10 日、東京  
中西良太、北尾洋之、藤中良彦、安藤幸滋、佐伯浩司、大賀丈史、徳永えり子、沖英次、掛地吉弘、辻谷俊二、鴻江俊治、前原喜彦、大腸癌における DNA 修復因子 FANCD1 発現と 5-FU 感受性、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12-14 日、千葉市

安藤幸滋、掛地吉弘、中西良太、久松雄一、北尾洋之、佐伯浩司、沖英次、大賀丈史、辻谷俊二、鴻江俊治、前原喜彦、胃癌における DNA ploidy と紡錘体形成チェックポイントタンパク質 BUBR1 の発現、第 21 回日本癌転移学会学術集会総会、2012 年 7 月 12-13 日、広島市

中西良太、趙岩、北尾洋之、安藤幸滋、佐伯浩司、大賀丈史、沖英次、掛地吉弘、辻谷俊二、鴻江俊治、前原喜彦、大腸癌における KRAS, BRAF 変異とマイクロサテライト不安定性、第 45 回制癌剤適応研究会、2012 年 3 月 2 日、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://www.kyudai2geka.com/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

鴻江俊治 (KOHNOE, Shunji)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：30215199

(2)研究分担者

辻谷俊一 (TSUJITANI, Shunichi)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：30188544

掛地吉弘 (KAKEJI, Yoshihiro)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号：80284488

森田勝 (MORITA, Masaru)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：30294937

大賀丈史 (OHGA, Takefumi)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：60335958

江頭明典 (EGASHIRA, Akinori)  
九州大学・大学病院・特任助教  
研究者番号：00419524

園田英人 (SONODA, Hideto)  
九州大学・大学病院・特任助教  
研究者番号：00465725

北尾洋之 (KITAO, Hiroyuki)  
研究者番号：30368617  
九州大学・医学研究院・准教授

(3)連携研究者

なし