

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462059

研究課題名(和文)細胞分裂期チェックポイント異常の解明と大腸癌分子標的治療への応用

研究課題名(英文)The analysis of the spindle checkpoint proteins and the application to the new molecular targeted therapy for colorectal cancer.

研究代表者

江見 泰徳(Emi, Yasunori)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50223673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌治療における新たな分子標的の策定を目標として、細胞分裂期のスピンドルチェックポイント機構に関わる因子の大腸癌における意義を解析した。臨床検体を用いてTP53遺伝子変異例でCINおよびマイクロサテライト不安定生(MSI)の頻度が有意に低いことを見出した。さらにスピンドルチェックポイント因子であるBUBR1の高発現症例でCINの頻度が高く、MSIの頻度が低かった。胃癌における検討であるが、同じくスピンドルチェックポイント因子であるPLK-1の過剰発現症例もCINの頻度が高かった。BUBR1やPLK-1の過剰発現は、紡錘体チェックポイント機構の異常を介してCINをもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the clinical significance of spindle checkpoint protein in colorectal cancer, and to find the new candidate for molecular targeted therapy, we analyzed the expression of the spindle checkpoint proteins in colorectal clinical samples. We investigated the interplay between BUBR1 and p53 and their association with genetic instability in colorectal cancer. In 139 colorectal cases, cases with high BUBR1 expression and TP53 mutation had profound aneuploidy phenotypes and less frequent MSI. On the other hand, high expression of PLK1 was also associated with DNA aneuploidy in clinical gastric cancer specimens. High expression of PLK1 could have detrimental effects in tumors with DNA aneuploidy. These findings indicate that spindle checkpoint proteins might contribute cooperatively to the DNA aneuploidy and the carcinogenesis.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 ゲム不安定性 細胞分裂期チェックポイント機構

1. 研究開始当初の背景

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、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)が主要な発癌経路として知られ(図1)、CIN型は大腸癌発癌の大多数(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。

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PIK1 の阻害剤による臨床試験が始まっているが、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、はわかっていない。

2. 研究の目的

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する。

3. 研究の方法

大腸癌細胞におけるゲノム不安定性と、その原因と考えられるスピンドルチェックポイント機構の異常を系統的に解析し、新たな分子標的の策定をめざす。

1) 大腸癌組織(切除標本)および細胞株におけるゲノム不安定性の系統的解析

2) 大腸癌組織(切除標本)および細胞株に

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系統的解析

3) 臨床試験グループとして、抗がん剤、分子標的治療薬(BevacizumabおよびCetuximab)を含む大腸癌症例の臨床病理学的因子(無増悪生存期間、全生存期間)、薬物療法感受性(奏効率)と細胞分裂期スピンドルチェックポイント機構の異常の関連の解析。

4. 研究成果

1) 染色体不安定性(DNA aneuploidy)とTP53 遺伝子変異の関係

TP53 遺伝子変異 49 例では MSI(+)は 1 例(2.0%)であり、野生型 90 例では MSI(+)は 21 例(2.0%)であり、TP53 遺伝子変異例で MSI(+) が有意に頻度が低かった(P=0.0005)。TP53 遺伝子変異 49 例では DNA aneuploidy 39 例(71.1%) ; 野生型 90 例では DNA aneuploidy 53 例(21.1%)であり、TP53 遺伝子野生型症例で DNA aneuploidy が有意に頻度が高かった(P=0.011)。BUBR1 高発現 90 症例で、TP53 loci LOH は 67 例(74.4%) ; 低発現 49 例で TP53 loci LOH は 28 例(57.1%)で BUBR1 高発現症例では TP53 loci LOH が多い傾向にあった(P=0.078)。

BUBR1 高発現 90 症例で、TP53 遺伝子変異は 38 例(42.2%)、低発現 49 症例では 11 例(22.4%)であった。BUBR1 高発現 90 症例のうち、わずか 9 例(10.0%)が MSI(+), 低発現 49 症例のうち 11 例(22.4%)が MSI(+)を示し、BUBR1 高発現症例に MSI(+)症例の頻度が高い傾向にあった(P=0.09)。BUBR1 高発現 90 症例のうち 49 例(52.1%)に P53 発現の異常を、低発現の 49 症例のうち 15 例(32.6%)のみが p53 発現異常を認めた。

2) BUBR1 の発現と MLH1, MSH2 の関係

BUBR1 低発現例で解析を行った。MLH1(-) は 11 例中 8 例(66.7%)、MLH1(+)は 127 例中 47 例(37.0%)であった。MSH2(-)は 7 例中 7 例(100%)、MSH2(+)は 125 例中 47 例

(37.6%)であった。BUBR1 低発現症例では MLH1 および MSH2 の発現がない症例が有意に多かった。

3) 胃癌における Pik-1 の発現解析

Pik-1 は細胞周期 M 期の紡錘体チェックポイントキナーゼであり、G2 期の DNA ダメージチェックポイントにも関与している。Pik-1 は分裂前期～後期では中心体 - 動原体に、後期には紡錘体溝に局在し、その機能は微小管を動原体に安定して接着するのに必要であると考えられている。Pik-1 の過剰発現は染色体不安定性を起こし、発癌の原因の一つであると考えられている。

1997 年から 2006 年までの当科で手術を行った原発性胃癌の 110 例を対象とした。1. 胃癌組織切片を用いて Pik-1 の免疫組織化学染色を行い、高発現群と低発現群に分けて、臨床病理学的因子との関連を解析した。染色体不安定性については Laser Scanning Cytometry を用いて各 DNA 量を測定し DNA ploidy を解析した。

症例 110 例のうち、Pik-1 高発現は 82 例 (74.5%)であったが、Pik-1 の発現レベルと腫瘍の深達度やリンパ節転移の有無など臨床病理学的因子との関連は明らかな相関性は認めなかった。Aneuploid 症例は 68 例 (61.8%) であり、Pik-1 の過剰発現は Aneuploidy とゆいに関連を示した ($P=0.018$)。胃癌において Pik-1 過剰発現は、紡錘体チェックポイント機構の異常に関与し、分裂した細胞の染色体が非対称となることで、Aneuploidy という染色体不安定性をもたらすと考えられた。

4) マイクロサテライト不安定の検討

ゲノム不安定性の指標として 470 症例の大腸癌についてマイクロサテライト不安定 (MSI) を解析し、その臨床病理学的因子との関係を検討した。MHS-H:MSI-L/MSS=84 (18.7%) : 366 (81.3%) であった。組織型は MSI-H 群において低分化型腺癌 27 例 (6.0%) が多く、有意差が認められ

た ($P<0.001$)。部位は MSI-H 群で右側結腸/左側結腸/直腸=31 例 (6.8%)・7 例 (1.5%)・3 例 (0.3%) であり、MSI-L/MSS 群で 90 例 (19.7%)/221 例 (48.4%)/104 例 (22.8%) であり、右側結腸に有意に多かった ($P<0.001$)。日本人における散発性大腸癌における MSI-H の特徴は、高/中分化型腺癌? に多く、右側結腸有意であり、リンパ節転移無し症例が多いことが示唆された。

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 15 件)

Zhao Y, Ando K, Oki E, et al.
Aberrations of BUBR1 and TP53 gene mutually associated with chromosomal instability in human colorectal cancer. *Anticancer Res.* 査読あり 2014 Oct;34(10):5421-7.

PMID:25275037

Ikeda K, Oki E, Saeki H, et al.
Intratumoral lymphangiogenesis and prognostic significance of VEGFC expression in gastric cancer. *Anticancer Res.* 査読あり 2014 Aug;34(8):3911-5

PMID:25075012

Kimura Y, Oki E, Yoshida A, et al.
Significance of accurate human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) evaluation as a new biomarker in gastric cancer. *Anticancer Res.* 査読あり 2014 Aug;34(8):4207-12.

PMID:25075048

Nakanoko T, Saeki H, Oki E, et al.
Rad51 expression is a useful predictive factor for the efficacy of neoadjuvant chemoradiotherapy in squamous cell

carcinoma of the esophagus. *Ann Surg Oncol*. 査読あり 2014 Feb;21(2):597-604.
doi: 0.1245/s10434-013-3220-2.
Okai E, Emi Y, Saeki H, et al. Phase II Trial of S-1 and Oxaliplatin Plus Cetuximab for Colorectal Cancer Patients with Initially Unresectable or Not Optimally Resectable Liver Metastases (KSCC1002). *Ann Surg Oncol*. 査読あり 2015 Dec;22 Suppl 3:S1067-74.
doi: 10.1245/s10434-015-4771-1.
Kubo N, Kitao H, Okai E, et al. clinicopathological analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and its repair enzyme. *Dis Esophagus*. 査読あり 2014 Apr;27(3):285-93.
doi: 10.1111/dote.12107.
Ando K, Okai E, Zhao Y, et al. Mortalin is a prognostic factor of gastric cancer with normal p53 function. *Gastric Cancer*. 査読あり 2014 Apr;17(2):255-62.
doi: 10.1007/s10120-013-0279-1

Imai K, Emi Y, Okai E, et al. Splenic volume may be a useful indicator of the protective effect of bevacizumab against oxaliplatin-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome. *Eur J Surg Oncol*. 査読あり May;40(5):559-66.
doi: 10.1016/j.ejso.2013.12.009.
Beppu T, Emi Y, Okai E, et al. Liver resectability of advanced liver-limited colorectal liver metastases following mFOLFOX6 with bevacizumab (KSCC0802 Study). *Anticancer Res*. 査読あり Nov;34(11):6655-62. PMID: 25368271

Emi Y, Okai E, Saeki H, Ando K, et al. Initial report of KSCC0803: feasibility study of capecitabine as adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer in Japanese patients. *Int J Clin Oncol*. 査読あり 2013 Apr;18(2):254-9
doi: 10.1007/s10147-011-0371-7
Saeki H, Okai E, Ando K, et al. Newly developed liver-retraction method for laparoscopic gastric surgery using a silicone disc: the -shaped technique. *J Am Coll Surg*. 査読あり 2013 May;216(5):e43-6
doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2013.02.005
. Morita M, Saeki H, Ando K, Okai E, et al. Advances in esophageal surgery in elderly patients with thoracic esophageal cancer. *Anticancer Res*. 査読あり 2013 Apr;33(4):1641-7
PMID: 23564809
Ida S, Ando K, Saeki H, Okai E, et al. Surgical resection of hypopharynx and cervical esophageal cancer with a history of esophagectomy for thoracic esophageal cancer. *Ann Surg Oncol*. 査読あり 2014 Apr;21(4):1175-81.
doi: 10.1245/s10434-013-3454-z
Saeki H, Morita M, Okai E, et al. Esophageal replacement by colon interposition with microvascular surgery for patients with thoracic esophageal cancer: the utility of superdrainage. *Dis Esophagus*. 査読あり 2013 Jan;26(1):50-6
doi: 10.1111/j.1442-2050.2012.01327.x
Saeki H, Ando K, Okai E, et al. Multimodal treatment strategy for

clinical T3 thoracic esophageal cancer. Ann Surg Oncol. 査読あり 2013 Dec;20(13):4267-73
doi: 10.1245/s10434-013-3192-2

〔学会発表〕(計 3 件)

Kimura Y, Okie E, Otsu H, et al. Significance and accurate of HER2 evaluation as a new biomarker in advanced gastric cancer. The 10th International Gastric Cancer Congress(IGCC2013) 2013 年 6 月 19 日 22 日 Verona, Italy

Emi Y, Kusumoto T, Matsuura H, et al. Phase II study of docetaxel(DTX) and S-1 as neoadjuvant chemotherapy for potentially R0 advanced gastric cancer. The 10th International Gastric Cancer Congress(IGCC2013) 2013 年 6 月 19 日 22 日 Verona, Italy

Emi Y, Okie E, Saeki H, et al. Analysis of KRAS/NRAS,PI3K3CA and BRAF mutations in the phase 2 KSCC0901 study of cetuximab +S-1 as 3rd-line treatment for metastatic colorectal cancer in Japanese patients. ASCO-GI 2014 年 1 月 16 日 18 日 San Francisco USA

〔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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

江見 泰徳 (EMI Yasunori)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号 : 50223673

(2) 研究分担者

森田 勝 (MORITA Masaru)
独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・その他
研究者番号 : 30294937

北尾 洋之 (KITA0 Hiroyuki)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号 : 30368617

沖 英次 (OKI Eiji)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号 : 70380392

佐伯 浩司 (SAEKI Hiroshi)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号 : 80325448

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし