

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460415

研究課題名(和文)大腸癌の発生におけるDNA損傷修復応答の意義

研究課題名(英文)Significance of DNA damage response in histogenesis of colorectal carcinoma

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌の組織発生経路は多彩であり、de novo発癌(正常粘膜からの発癌)、腺腫の癌化、過形成性ポリープやそれに類似したSSA/Pからの癌化、潰瘍性大腸炎などの炎症粘膜からの癌化(炎症性発癌)がある。本研究では、これらの発癌経路に「DNA損傷」とそれに対する「DNA修復応答の破綻」が起きているのかどうかを検討した。その結果、では非腫瘍性炎症粘膜から、では前癌病変からDNA損傷が起きており、その蓄積により癌が発生し、DNA修復応答の破綻により浸潤癌へ生長することが推定された。

研究成果の概要(英文)：Colorectal carcinogenesis occurs through various pathways; de novo cancerization (carcinogenesis in normal mucosa), adenoma-carcinoma sequence, cancerization from hyperplastic polyp or SSA/P, inflammatory carcinogenesis occurs in inflammatory mucosa such as ulcerative colitis. This study investigated whether or not DNA damage and DNA damage response play a role in these carcinogenetic pathways. As the result, it was speculated that accumulation of DNA damage play a role in cancerization in non-neoplastic inflammatory mucosa in pathway-, and in precancerous lesions in pathway-. DNA damage response failure may play a role in development of invasive carcinoma.

研究分野：人体病理学

キーワード：大腸癌の発生 腺腫の癌化 鋸歯状病変 炎症性発癌 DNA二重鎖切断 DNA損傷修復応答

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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。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  $\gamma$ -H2AX と呼ばれる)。 $\gamma$ -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。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。

(2) 大腸癌の発生には、腺腫の癌化、de novo 発癌(正常粘膜から直接癌が発生)、過形成性ポリープや SSA/P (sessile serrated adenoma/polyp)からの癌化(serrated polyp neoplasia pathway)、潰瘍性大腸炎(UC)等の炎症性粘膜からの癌化(炎症性発癌)の4つの経路が知られている。申請者らの先行研究では、前癌病変である腺腫では DSB は生じているものの DDR は保持されており、浸潤癌では DDR の破綻がみられること、炎症性発癌早期病変である dysplasia およびその背景の炎症性粘膜では高頻度に DSB がおきていること(未発表データ)を明らかにしており、大腸癌の発生にも DNA 損傷応答の破綻が関与していることが推測されるが、DSB、DDR に関して大腸癌の発癌経路全体を網羅した系統的研究はなされていない。

## 2. 研究の目的

多彩な組織発生経路を介して発生する大腸癌の発生に共通して「DNA 損傷」とそれに対する「DNA 損傷応答の破綻」がおきているのか、おきているとすれば組織発生のどの段階か、を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) ホルマリン固定パラフィン包埋内視鏡摘除例もしくは外科切除された、正常大腸 50 例、管状腺腫 71 例、腺腫併存早期癌 60 例、SSA/P 併存癌 24 例、癌を合併しない UC20 例、UC 粘膜に発生した炎症性発癌早期粘膜内病変(dysplasia)14 病変、同粘膜内癌 9 病変、同浸潤癌 9 病変を対象とした。

(2) DSB の指標として、DSB 部に動員されるリン酸化 H2AX( H2AX)発現頻度をモノク

ローナル抗体を用いて免疫組織学的に検討した。H2AX 発現頻度は、高発現部位を対照 40 倍視野で 500 個以上の細胞をカウントし、全細胞中の H2AX 陽性細胞数(%)で評価した。

(3) DDR の指標として、H2AX と 53BP1 に対する蛍光モノクローナル免疫染色を行い、両者の共局在率を検討した。DSB 部位には H2AX と 53BP1 が動員され、両者が複合体を形成して DSB の修復が行われる。従って蛍光二重免疫染色で両者の共局在が認められるものは DDR が正常に機能し、一方共局在が認められないものは DDR の破綻が起きていると推定することができる。共局在率は、H2AX 陽性細胞に占める 53BP1 との共局在細胞比率(%)で評価した。

## 4. 研究成果

(1) 大腸癌発生経路における前癌病変：腺腫、SSA/P、dysplasia とともに正常粘膜に比べ H2AX 発現頻度が有意に高く ( $p < 0.001$ )、更に UC では非腫瘍性粘膜でも正常粘膜に比べ H2AX 発現頻度が有意に高かった ( $p < 0.001$ )。以上のことから、腺腫の癌化経路、SNP では前癌病変の状態から、炎症性発癌では非腫瘍性炎症性粘膜から DSB が起きていることがわかった。また、炎症性粘膜でも、炎症活動期では寛解期に比べ H2AX 発現頻度が高く、活動性炎症により DSB が生じていることが推定された。

(2) 腺腫の癌化経路：粘膜内癌は腺腫に比べ H2AX 発現頻度が有意に高く ( $p = 0.02$ )、浸潤癌は粘膜内癌部に比べ H2AX と 53BP1 の共局在率(以下共局在率)が有意に低かった ( $p < 0.01$ )。以上のことから、腺腫の癌化経路では DSB により癌化が生じ、DDR の破綻により癌の浸潤が起きると考えられた。

(3) SSA/P からの癌化経路：SSA/P 内癌部は SSA/P に比べ H2AX 発現頻度が有意に高かった ( $p < 0.01$ )。共局在率については検討できなかった。SSA/P からの癌化経路では、DSB により癌化が生じていると考えられた。

(4) 炎症性発癌：dysplasia は炎症性粘膜に比べ、粘膜内癌は dysplasia に比べ、それぞれ H2AX 発現頻度が有意に高かった ( $p = 0.015$ ,  $p = 0.04$ )。また、浸潤癌は dysplasia に比べ共局在率が有意に低かった ( $p = 0.007$ )。以上のことから、炎症性発癌では炎症性粘膜に生じた DSB が蓄積されることにより腫瘍化と癌化が生じ、DDR の破綻により癌の浸潤が起きると考えられた。

(5) 腺腫の癌化経路と SSA/P からの癌化経路の比較：同じ前癌病変でも腺腫は SSA/P に比べ H2AX 発現頻度が有意に高かった ( $p = 0.036$ )が、SSA/P 併存癌部と腺腫内癌部では H2AX 発現頻度に有意差は無かった。このことから、前癌病変が異なっても癌化には同程度の DSB の蓄積が関与していると考えられた。

(6) 炎症性発癌と腺腫の癌化経路の比較：

dysplasiaは腺腫に比べ H2AX 発現頻度が有意に高く (p=0.041)、UC 粘膜内癌は腺腫内癌に比べ H2AX 発現頻度が高い傾向があった (p=0.052)。また、UC の粘膜内癌では腺腫内癌に比べ共局在率が有意に高かった (p=0.007)

本研究結果から大腸癌の発生 (de novo 発癌を除く) には共通して DSB が関与し、DDR の破綻により浸潤癌に生長することが推定されたが、DSB や DDR の破綻が生じる時期は癌発生経路により違いがあった。すなわち、DSB は炎症性発癌、腺腫の癌化、SSA/P からの癌化の順により早期に生じており、炎症性発癌では非腫瘍性炎症性粘膜の状態から DSB が生じていた。このことから、炎症性発癌を早期に発見するためには、発癌病変形成前の炎症粘膜における DSB を捉えることが有用と考えられ、DSB は UC に発生する癌の早期発見のためのバイオマーカーとして期待されると考えられた。他方、DDR の破綻も、炎症性発癌では腺腫の癌化にくらべより早期の段階から生じており、このことが UC に発生した大腸癌が、通常の大腸癌に比べ悪性度が高いこととも関連していると考えられた。大腸癌の発生経路について DSB と DDR を網羅的に検討した研究は国内外で他にはなく、大腸癌の発生に関して新たな視点からの理解と早期発見に寄与するものと考えられる。

#### 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1件)

味岡 洋一、渡辺佳緒里、谷 優佑、渡辺玄、加藤 卓、炎症性発癌の病理学的特徴、INTESTINE、査読有、19巻、2015、336-341  
<http://www.nmckk.jp//thesisDetail.php?category=ECCA&vol=19&no=4&d1=1&d2=2&d3=0&lang=ja>

味岡 洋一、谷 優佑、dysplasia-associated lesion or mass DALM、胃と腸、査読なし、52巻、2017、701  
DOI: 10.11477/mf.1403201044

味岡 洋一、渡辺佳緒里、潰瘍性大腸炎における異型上皮の厚労省分類、胃と腸、査読なし、52巻、2017、743  
DOI: 10.11477/mf.1403201071

[学会発表](計9件)

味岡 洋一、大腸の炎症性発癌 (潰瘍性大腸炎関連大腸癌) 日本消化器病学会甲信越支部教育講演会、2014.5.24、新潟県・新潟市

味岡 洋一、Pathological diagnosis of colorectal neoplasia in ulcerative colitis、第14回信濃川・浜名湖国際病理セ

ミナー、2015.10.3、新潟県・長岡市

味岡 洋一、役に立つ IBD の病理、平成27年度日本炎症性腸疾患研究会教育セミナー、2015.11.3、京都府・京都市

味岡 洋一、潰瘍性大腸炎の癌化サーベイランス、第210回大腸疾患研究会、2015.11.20、大阪府・大阪市

味岡 洋一、IBD 関連消化管癌に対する内視鏡診療の課題と将来展望、第91回日本消化器内視鏡学会総会、2016.5.10、東京都・港区

味岡 洋一、大腸鋸歯状病変の癌化と分子異常、第105回日本病理学会総会、2016.5.13、宮城県・仙台市

味岡 洋一、炎症性腸疾患の病理診断と UC 関連腫瘍の診断の問題点、第32回北河内炎症性腸疾患カンファレンス、2016.8.20、大阪府・大阪市

味岡 洋一、症例検討セッション - 下部消化管、第13回日本消化管学会総会学術集会、2017.2.17、愛知県・名古屋市

谷 優佑、味岡 洋一、潰瘍性大腸炎 (UC) 以外の炎症性腸疾患における DNA 損傷・修復応答、第106回日本病理学会総会、2017.4.28、東京都・新宿区

[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：

(4)研究協力者

( )