

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 高林 広明  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 559 号  
学位授与の日付 平成 25 年 9 月 20 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 Alteration of the DNA damage response in colorectal tumor progression.  
(大腸腫瘍の発育過程における DNA 損傷応答の変化)

論文審査委員 主査 青柳 豊  
副査 味岡 洋一  
副査 西條 康夫

### 博士論文の要旨

【目的】 DNA2 重鎖切断は遺伝子不安定性を引き起こし、発癌へとつながる可能性のある危険な遺伝子傷害である。最近の研究では、癌の発育・進展過程において前癌病変の段階より DNA2 重鎖切断が生じ、DNA 損傷応答が活性化していることが示されている。すなわち、DNA2 重鎖切断に対する DNA 損傷応答は、発癌過程初期において癌の発生・進展へのバリアーの役割を担っており、この DNA 損傷応答が破綻することにより前癌病変から癌へと進行することが想定されている。H2AX はヒストン蛋白 H2A ファミリーのひとつで、DNA 修復において重要な役割を果たしている。電離放射線などにより細胞に DNA2 重鎖切断を引き起こすと、H2AX は速やかにセリン残基 139 がリン酸化され ( $\gamma$ H2AX)、DNA 修復に関与するさまざまなタンパク質と複合体を形成する。このため蛍光免疫組織化学によって、DNA2 重鎖切断は  $\gamma$ H2AX の核内点状発現として描出可能である。p53-binding protein 1 (53BP1) は細胞周期チェックポイントに関わる DNA 修復蛋白のひとつで、DNA2 重鎖切断部に動員され、前述の複合体形成に加わり、DNA の修復にあたる。ダブルラベル蛍光免疫組織化学では、DNA2 重鎖切断の修復過程において  $\gamma$ H2AX と 53BP1 の共局在として示される。これらの現象は大腸腫瘍のパラフィン包埋組織においては十分な検討がなされていない。本研究の目的は大腸腫瘍のパラフィン包埋組織を用い、大腸腫瘍の発育進展過程と DNA2 重鎖切断、および 53BP1 を介した DNA 損傷応答との関連を明らかにすることである。

【方法】 日本大腸癌取り扱い規約に従い、大腸腫瘍 152 病変を粘膜内腫瘍 96 病変 (低異型度腺腫 46 病変、高異型度腺腫 25 病変、および粘膜内癌 25 病変) と浸潤癌 56 病変とに分類した。DNA2 重鎖切断の鋭敏な指標である  $\gamma$ H2AX の発現を免疫組織化学で評価した。 $\gamma$ H2AX は核内発現を陽性とし、発現パターンを核内に点状にフォーカスを形成するもの (点状パターン) と、核辺縁が強く染色されるが核全体にび慢性に発現するもの (び慢性パターン) とに区別した。それぞれのパターンを呈する細胞が最も発現している領域で、それぞれのパターンごとに陽性細胞率を labeling index として算出した。また、DNA2 重鎖切断の修復過程を表す  $\gamma$ H2AX と 53BP1 の共局在は蛍光免疫組織化学を用いて評価した。

【結果】非腫瘍大腸粘膜では $\gamma$ H2AXの発現は点状パターン、び慢性パターンのいずれも labeling index は1.0%以下の発現であった。そこで申請者は $\gamma$ H2AXの過剰発現の定義を labeling index が1.0%を越えるものと定義した。点状パターンの $\gamma$ H2AX過剰発現を認めたものは、96病変の粘膜内腫瘍のうち16病変(16.7%)で、56例の浸潤癌のうち19病変(33.9%)であり、一方、び慢性パターンの $\gamma$ H2AX過剰発現を認めたものは、それぞれ24病変(25.0%)、37病変(66.1%)であった。本研究では特にDNA2重鎖切断を表す $\gamma$ H2AX点状発現に注目し、点状パターンの $\gamma$ H2AX過剰発現を認めた粘膜内腫瘍16病変および浸潤癌19病変に対し蛍光免疫組織化学を行い、53BP1の共局在の有無を評価した。その結果、粘膜内腫瘍では $\gamma$ H2AXが点状発現する腫瘍細胞のほとんどで53BP1の共局在を認めたのに対し、浸潤癌では53BP1の共局在を伴わない腫瘍細胞を多く認めた。すなわち、53BP1の共局在を伴う $\gamma$ H2AX点状発現を有する腫瘍細胞の割合は粘膜内腫瘍(88.5%)に比べ、浸潤癌(54.8%)で有意に低かった(P=0.001)。【考察・結論】過去のパラフィン標本を用いた研究では $\gamma$ H2AXの発現パターンを区別したものはなく、ほとんどがび慢性パターンのみを扱っている。び慢性パターンはDNA2重鎖切断と関連しないことを示唆する報告が多く、未だにその意義は確定されていない。そこで、本研究では $\gamma$ H2AXの発現パターンを厳密に区別し、とくにDNA2重鎖切断を表す $\gamma$ H2AX点状発現について53BP1との共局在の有無を評価した。結果、大腸粘膜内腫瘍および浸潤癌では、点状パターンおよびび慢性パターンのいずれにおいても $\gamma$ H2AXの発現が増加していた。さらに、大腸腫瘍の発育進展に伴い、 $\gamma$ H2AXと53BP1が共局在している細胞の割合が変化していた。以上より、大腸癌の発育進展においては粘膜内腫瘍の段階から腫瘍細胞にはDNA2重鎖切断が生じ、DNA損傷応答が活性化していることが証明された。また、粘膜内腫瘍から浸潤癌に進展する過程で $\gamma$ H2AXと53BP1が共局在している細胞が減少しているという結果は、大腸癌の浸潤過程において、少なくとも53BP1を介したDNA損傷応答が破綻していることを示唆している。

#### 審査結果の要旨

本研究では、大腸腫瘍の発育進展過程とDNA2重鎖切断、およびp53-binding protein 1(53BP1)を介したDNA損傷応答との関連を検討した。

大腸腫瘍152病変、粘膜内腫瘍96病変(低異型度腺腫46病変、高異型度腺腫25病変、および粘膜内癌25病変)と浸潤癌56病変を用いた。DNA2重鎖切断の有無については $\gamma$ H2AXの免疫組織化学発現にて評価し、核内に点状にフォーカスを形成するもの(点状パターン)について検討した。また、DNA2重鎖切断の修復過程を表す $\gamma$ H2AXと53BP1の共局在は蛍光免疫組織化学を用いて評価した。

点状パターンの $\gamma$ H2AX過剰発現を認めたものは、それぞれ、96病変の粘膜内腫瘍のうち16病変(16.7%)、56例の浸潤癌のうち19病変(33.9%)であった。点状パターンの $\gamma$ H2AX過剰発現を認めた粘膜内腫瘍16病変および浸潤癌19病変の53BP1の共局在を評価すると粘膜内腫瘍では $\gamma$ H2AXが点状発現する腫瘍細胞のほとんど(88.5%)で53BP1の共局在を認めたのに対し、浸潤癌では53BP1の共局在を伴わない腫瘍細胞を多く認めた(54.8%)。すなわち、粘膜内腫瘍に比べ、浸潤癌で有意に低かった(P=0.001)。

以上より、①大腸癌の発育進展においては粘膜内腫瘍の段階から腫瘍細胞にはDNA2重鎖切断が生じている事②粘膜内腫瘍から浸潤癌に進展する過程で $\gamma$ H2AXと53BP1が共局在する細胞が減少し、53BP1を介したDNA損傷応答が破綻している事などを示した物でこの点に学位としての価値を認めた。