

松田勝也 論文内容の要旨

主 論 文

Significance of p53-binding protein 1 nuclear foci in uterine cervical lesions: endogenous DNA double strand breaks and genomic instability during carcinogenesis

子宮頸部病変における p53 結合タンパク 1 核内フォーカスの意義：
がん化過程での内因性 DNA 二重鎖切断とゲノム不安定性との関係

Katsuya Matsuda, Shiro Miura, Tomomi Kurashige, Keiji Suzuki, Hisayoshi Kondo,
Makoto Ihara, Hisayoshi Nakajima, Hideaki Masuzaki, Masahiro Nakashima
松田勝也, 三浦史郎, 蔵重智美, 鈴木啓司, 近藤久義,
井原誠, 中島久良, 増崎英明, 中島正洋

(Histopathology ・ 59 巻 441-451 2011 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 放射線医療科学専攻
(主任指導教員：中島正洋 教授)

緒 言

多くの腫瘍化過程にはゲノム不安定性 (GIN) が関与し、特に生物学的悪性度と相関することが示唆されている。放射線やウイルス感染など、様々ながん原因因子は、DNA 損傷による GIN を惹起し、それを背景に変異が蓄積することで腫瘍の発生・進展を促進する。正常細胞は環境因子により惹起された遺伝子損傷に対し、DNA 損傷応答 (DDR) によるゲノムの維持と安定化を図る。損傷修復異常は細胞内に GIN を誘導し、腫瘍原性変異の原因となる。p53 binding protein 1 (53BP1) は広く細胞に存在する核内タンパクで、DDR 活性状態では DNA 二重鎖切断 (DSBs) 部位に速やかに集積し核内フォーカス (NF) を形成する分子生物学的性質を有す。内因性 DSBs の存在は GIN を特徴づける現象である。我々は甲状腺や皮膚腫瘍において、蛍光免疫染色法による 53BP1 NF が、がん化に関連した GIN や悪性度を推定する分子マーカーとなることを報告した。

子宮頸部扁平上皮がん (SCC) の発生は多段階発がんとして理解されている。がんへの進展には high risk-human papillomavirus (HR-HPV) の持続感染が重要であり、発がん因子として知られる。即ち、HR-HPV の宿主ゲノムへの組込みが viral oncogene E6、E7 の発現誘導を促進し、p53 分解促進による細胞死抑制と pRB (retinoblastoma protein) 結合による S 期進行を介して、がん化を促進する。本研究は、多段階発がん過程での内因性 DSBs を、蛍光免疫染色法による 53BP1 NF を指標として解析し、腫瘍進展過程での 53BP1 の新規腫瘍マーカーとしての汎用性を検討した。

対 象

子宮頸部組織 80 例を対象とした。内訳は正常上皮 (NE) 11 例、子宮頸部上皮内腫瘍 (cervical intraepithelial neoplasia : CIN) 1 16 例、CIN2 15 例、CIN3 24 例、SCC 14 例。

方法と結果

- 1) HR-HPV 発現解析: *In situ* hybridization 法を用いた。陰性、episomal type の Diffuse、組込み型の Punctate と Mixed の 4 型に分類した。NE は全例陰性、Punctate/Mixed 型は CIN1、2、3、SCC で各々 25%、60%、83%、93% であり、腫瘍化進展により組込み型が有意に ($P < 0.0001$, Jonckheere–Terpstra test) 高率であった。
- 2) 53BP1 発現解析: 蛍光免疫染色法を用いた。i) 核内に弱染する安定型、ii) NF2 個以下の低 DDR 型、iii) NF3 個以上の高 DDR 型、iv) 1.0 μ m 以上の NF を発現する large focus (LF) 型の 4 型に分類した。NE、CIN1、2、3、SCC 各々合計 4,877、10,483、9,976、14,953、7,979 個の核を観察した結果、高 DDR または LF 型の発現頻度は各々 1.2、11.6、22.6、45.3、66.0% であり、腫瘍化進展により NF 形成が有意に ($P < 0.0001$) 高率であった。
- 3) HR-HPV 感染と 53BP1 発現型の関連: 陰性、Diffuse、Mixed、Punctate 型での高 DDR/LF 型の発現頻度は各々 8.9、26.8、40.4、46.5% であり、ゲノム組込み型発現の増加により NF 形成が有意に ($P < 0.0001$) 高率であった。さらに二重蛍光標識法により、Punctate 型シグナルと NF の組織内分布は、異型細胞の増殖分布と共に、相同であった。
- 4) 53BP1 NF と p16^{INK4a} 過剰発現の関連: サイクリン依存性キナーゼ抑制因子 p16^{INK4a} は、CIN での E7 発現による pRB 不活化を介した S 期進行にともない過剰発現することが知られていて、HPV 感染の病原活性を反映する。同一症例での 53BP1 NF と p16^{INK4a} 過剰発現の組織内分布は、異型細胞の増殖分布と共に、相同であった。
- 5) 53BP1 と細胞増殖マーカー Ki-67 の蛍光二重免疫染色解析: 正常 DDR は細胞増殖停止状態で機能する。CIN1 と 2 では NF 発現細胞は Ki-67 陰性であるのに対し、SCC では多数の共陽性細胞を認めた。

考 察

子宮頸部では NE-CIN1-2-3-SCC の多段階発がん過程で、53BP1 NF 発現が有意に亢進する。DDR 分子の NF 発現は内因性/自然発症性 DSBs を示唆している。さらに、53BP1 NF の組織内分布は、HR-HPV の Punctate 型シグナルや p16^{INK4a} 過剰発現と、異型細胞の増殖分布と共に相同であった。このことは、HR-HPV の宿主ゲノム組込みによる頸部上皮の増殖ストレスと関連して DSBs が誘導されることを示唆していて、53BP1 NF は腫瘍進展に伴う GIN レベルや悪性度を推察する指標となりうる。53BP1 と Ki-67 の蛍光標識二重染色の結果は、異形成病変では DSBs が惹起されるものの正常 DDR が保たれていて、浸潤がんでは DDR 機構が破綻していることを示唆している。異形成は前がん病変であり、その段階より GIN は誘導されているが可逆性で、DDR の破綻によるイベントが加わることで不可逆性の浸潤がんとなるものと推察する。

53BP1 発現の蛍光免疫染色による解析は、腫瘍の GIN レベルおよび進展段階を推定する指標となる。