170　酸化的DNA損傷修復機構に基づいた新規食道癌治療の研究	久保　信英

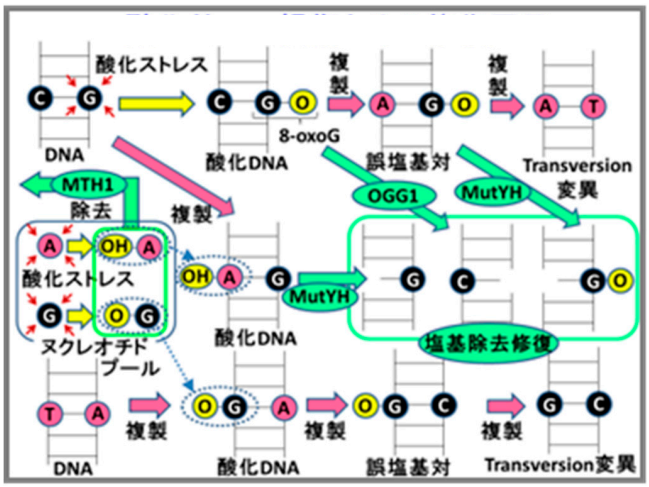
【目的】食道癌においては酸化的 DNA 損傷から誘発されるタイプのトランスバージョン変異が p53 遺伝子変異型の頻度解析において最も多くみられる変異であり、他の癌腫に比較して多いことを発見し、食道癌が酸化ストレス発癌との関わりが強い癌腫であることを初めて報告し発表した。

細胞内では酸化的 DNA 損傷を修復する機構があり、これが発癌を抑制する重要な役割を担っている。酸化的 DNA 損傷を受けたヌクレオチドを塩基除去修復する機構を備えており、OGG1、MutYH、MTH1 の 3 つの修復に関わる酵素が重要な役割を果たすことで遺伝子変異を抑制していることが分かっている（下図)。OGG1 と MutYH の二重欠損マウスでは、より多くの腫瘍が発生すると予想されたが、予想に反して OGG1 単独欠損マウスでみられる肺癌の自然発生頻度が野生型マウスよりも低いことが報告された。OGG1 と MutYH の二重欠損マウスの臓器のゲノム中には野生型マウスの数倍以上の 8-oxoG が蓄積しており、過度の 8-oxoG のゲノム蓄積は細胞死を誘発し、結果として発癌頻度の低下をもたらし、MutYH は癌の存続に寄与していた可能性が報告された。そこで癌組織における MutYH の発現を調べることで、MutYH が癌のアポトーシスを抑制している可能性を検討し、MutYH を抑制することで癌を細胞死に導く新規薬剤のターゲット因子となり得るかを検討することを本研究の目的とした。

【方法】1. ヒト食道癌組織の薄切プレパラートを作製し 8-oxoG、OGG1 と MutYH について、発現量やその強度を評価して臨床病理学的因子と比較検討することで OGG1 と MutYh の臨床的な表現型を探索する。2. 同様に OGG1 と MutYH について蛍光免疫染色を施行し、共発現しているかなどの局在を評価して臨床病理学的因子と比較検討することで、共発現している部位と共発現していない部位で、酸化的 DNA 損傷因子である 8-oxoG の蓄積量やアポトーシス因子の発現を調べ、癌組織の細胞死に関して OGG1 と MutYH の役割を推察する。3. 食道癌細胞株で OGG1 や MutYH の発現を免疫組織化学染色法や Western Blotting 法、qRT-PCR 法を行う。4. OGG1 や MutYH を単独あるいは組み合わせで Knockdown や Knockout した細胞株で生存率やアポトーシスの割合を MTT Assay や TUNNEL 法で評価し MutYH が癌細胞のアポトーシスを抑制していることを検討する。

【結果】MutYHの免疫染色ではMutYHは癌部で高発現していた。MutYHとTUNELの蛍光2重染色ではMutYH発現癌細胞でTUNEL陰性でありMutYHが癌のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった。MutYH強発現群では予後不良であり、こちらもMutYHが癌細胞のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった。

酸化的 DNA 損傷とその修復因子



170. 酸化的 DNA 損傷修復機構に基づいた新規食道癌治療の研究

久保　信英

*国立病院機構 別府医療センター 外科

Key words：食道扁平上皮癌，酸化ストレス，酸化的 DNA 損傷，MTH1，MutYH

緒　言

食道癌は悪性度が高く予後不良の消化器癌であり、手術療法は標準治療であるが極めて侵襲が大きく、薬物療法（抗癌剤）の役割は非常に大きい。これまで様々な抗癌剤が食道癌治療に用いられているが、特に重要な薬剤であるフッ化ピリミジン系代謝拮抗薬や白金製剤も一定の効果はもたらすものの、必ず耐性が獲得され効果を失ってしまう。セカンドライン治療としてのトポイソメラーゼ阻害薬であるイリノテカンやタキサン系薬のドセタキセルやパクリタキセルなどの奏効率は高くなく、食道癌治療の薬物療法は選択肢が少なく治療を継続できない理由の一つであり、新たな薬物療法の開発は急務である。しかし、新たな薬物療法開発のための発癌メカニズムや薬物治療の標的となる分子機序は解明されていない。

我々は喫煙が食道発癌に関して酸化的 DNA 損傷を誘発することを報告したが［1］、喫煙などから発生した活性酸素（Reactive oxygen species：ROS）は酸化ストレスとなり DNA 損傷から発癌を誘発する。8-oxoG（8 オキソグアニン）はヌクレオチドであるグアニンの酸化体である。酸化されたグアニンは DNA 複製の過程でアデニンと誤った塩基対を形成することで、そのアデニンは次の複製でチミンと対を形成する。このような遺伝子変異はトランスバージョン変異と呼ばれ発癌の原因となる。

一方で、細胞内では酸化的 DNA 損傷を修復する機構があり、これが発癌を抑制する重要な役割を担っている。酸化的 DNA 損傷を受けたヌクレオチドを塩基除去修復する機構を備えており、OGG1、MutYH、MTH1 の 3 つの修復に関わる酵素が重要な役割を果たすことで遺伝子変異を抑制していることが分かっている［2］。8-oxoG は OGG1（8-oxoG DNA グリコシラーゼ）によって塩基除去修復される。生じた A：8-oxoG ペアから 8-oxoG が除去されると変異が固定されるため、MutYH（アデニン DNA グリコシラーゼ）によりアデニンが除去される。MutYH は DNA に取り込まれたアデニンの酸化体である 2-OH-A（2 ヒドロキシアデニン）を除去する活性も有している。酸化プリンヌクレオシド三リン酸の分解酵素である MTH1 は、ヌクレオチドプール中の 8-oxo-G や 2-OH-A などの酸化体を効率よく分解し、DNA への取込みを回避している［3］。各修復因子欠損マウスの検討では、OGG1 の欠損マウスでは肺癌が増加し、MutYH の欠損マウスでは消化管癌やリンパ腫が増加し、MTH1 を欠損させたマウスでは肝臓癌、肺癌と胃癌が増加することが判明し報告された［4］。OGG1 と MutYH の二重欠損マウスでは、より多くの腫瘍が発生すると予想されたが、予想に反して OGG1 単独欠損マウスでみられる肺癌の自然発生頻度が野生型マウスよりも低いことが報告された。OGG1 と MutYH の二重欠損マウスの臓器のゲノム中には野生型マウスの数倍以上の 8-oxoG が蓄積しており、過度の 8-oxoG のゲノム蓄積は細胞死を誘発し、結果として発癌頻度の低下をもたらし、MutYH は癌の存続に寄与していた可能性が報告された［4］。ヒト食道癌は酸化ストレス発癌と関わりが深いと考えられるが、OGG1 と MutYH がどのように関係しているかは不明である。

我々は酸化的 DNA 損傷から誘発されるタイプのトランスバージョン変異が食道癌の p53 遺伝子変異型の頻度解析において最も多くみられる変異であり、他の癌腫に比較して多いことを発見し［5，6］、食道癌が酸化ストレス発癌との関わりが強い癌腫であることを初めて報告し発表した。そこで我々はヒト食道癌検体において酸化的 DNA 損傷の指標である 8-oxoG と酸化的 DNA 損傷修復因子である OGG1 発現を免疫染色で評価したところ癌部では 8-oxoG が蓄積し、一方で OGG1 は低下していることを発見し報告した［1］。動物実験の結果に基づけば、酸化的 DNA 損傷が蓄積すれば細胞死が誘導され、癌が存続することを抑制するはずであるが、食道癌のヒト臨床検体では酸化的 DNA 損傷を蓄積

*現在の所属：九州大学 大学院医学研究院 消化器・総合外科

した癌組織が存続していた。そこで癌組織における MutYH の発現を調べることで、MutYH が癌のアポトーシスを抑制している可能性を検討し、MutYH を抑制することで癌を細胞死に導く新規薬剤のターゲット因子となり得るかを検討することを本研究の目的とした。

方　法

1. ヒト食道癌の臨床検体（食道癌組織と食道正常組織のパラフィン包埋ブロック）から薄切プレパラートを作成し 8-oxoG、OGG1 と MutYH について、発現量やその強度を評価して臨床病理学的因子と比較検討することで OGG1 と MutYh の臨床的な表現型を探索する。2. ヒト食道癌の臨床検体（食道癌組織と食道正常組織のパラフィン包埋ブロック）から薄切プレパラートを作成し OGG1 と MutYH について蛍光免疫染色を施行し、共発現しているかなどの局在を評価して臨床病理学的因子と比較検討することで、共発現している部位と共発現していない部位で、酸化的 DNA 損傷因子である 8-oxoG の蓄積量やアポトーシス因子の発現を調べ、癌組織の細胞死に関して OGG1 と MutYH の役割を推察する。3. ヒト臨床検体で得られた結果を食道癌細胞株で確認するために OGG1 や MutYH の発現を免疫組織化学染色法や Western Blotting 法、qRT-PCR 法にて確認して裏付けを得る。4. OGG1 や MutYH を単独あるいは組み合わせで Knockdown や Knockout した細胞株を作製して合成ビタミン K であり酸化ストレス剤であるメナジオンを投与する。それぞれの細胞株の生存率やアポトーシスの割合を MTT Assay や TUNNEL 法で評価し MutYH が癌細胞のアポトーシスを抑制していることを検討する。

結果および考察

細胞内では酸化的 DNA 損傷を修復する機構があり、これが発癌を抑制する重要な役割を担っている。酸化的 DNA 損傷を受けたヌクレオチドを塩基除去修復する機構を備えており、OGG1、MutYH、MTH1 の 3 つの修復に関わる酵素が重要な役割を果たすことで遺伝子変異を抑制していることが分かっている（図 1）。

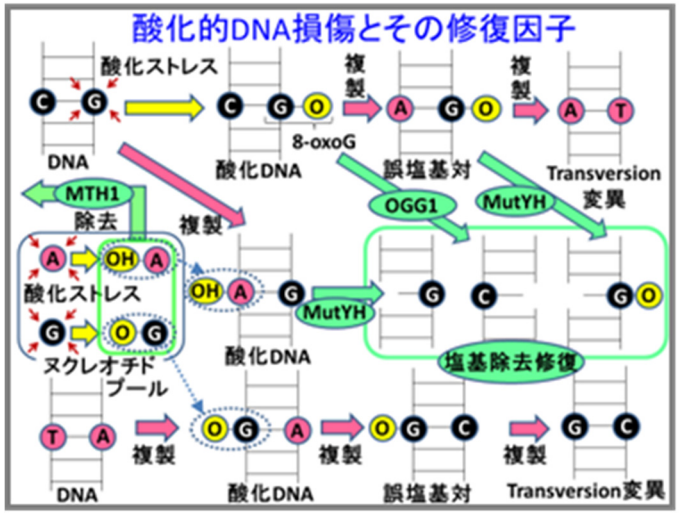


図 1. 酸化的 DNA 損傷とその修復因子
8-oxoG は OGG1 修復される。生じた A：8-oxoG ペアから 8-oxoG が除去されると変異が固定されるため、MutYH によりアデニンが除去される。MutYH は DNA に取り込まれたアデニンの酸化体である 2-OH-A を除去する活性も有している。MTH1 は、ヌクレオチドプール中の 8-oxo-G や 2-OH-A などの酸化体を分解し、DNA への取込みを回避している。

また、MutYH の免疫染色では MutYH は癌部で高発現していた。（図 2、表 1）MutYH と TUNEL の蛍光 2 重染色では MutYH 発現癌細胞で TUNEL 陰性であり MutYH が癌のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった（図 3）。

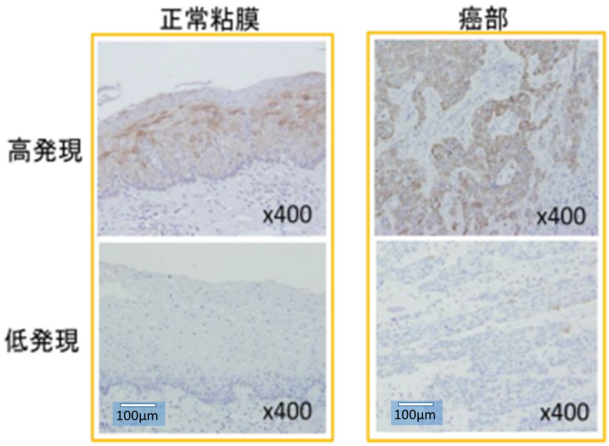


図 2. 食道癌組織における MutYH の発現（免疫染色）
左列に正常粘膜、右列に癌部、上段に高発現、下段に低発現の結果を提示した。
いずれも倍率は 400 倍。

正常部と癌部における MutYH 発現別の割合

因子	MutYH 正常粘膜 n=85(%)	MutYH 癌部 n=97(%)	P-value
発現強度			
高発現	16(19)	63(65)	P＜0.01
低発現	69(81)	34(35)	

表 1. 食道癌粘膜正常部と癌部における MutYH 発現の割合
MutYH は癌部で高発現している症例が有意（P＜0.01）に多数を占めていた。

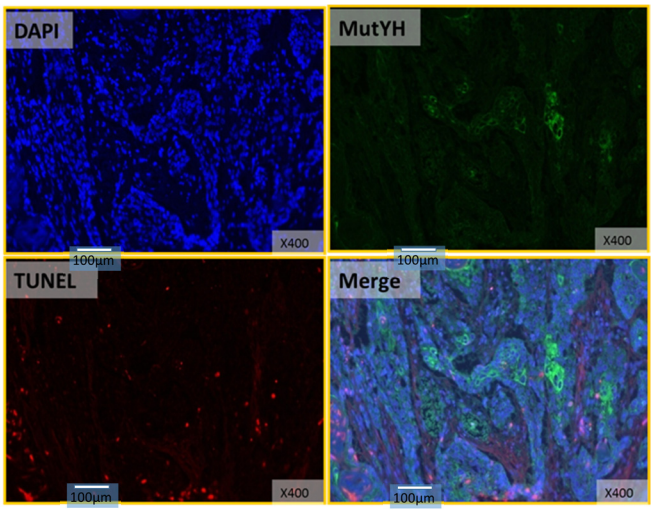


図 3. 食道癌組織における MutYH の TUNEL 法の発現（蛍光 2 重免疫染色）
左上に DAPI（核）、右上に MutYH、左下に TUNEL、右下に Merge の結果を提示した。
いずれも倍率は 400 倍

食道癌細胞株での OGG1 と MutYH の発現を qRT-PCR で確認し TE1 と TE5 を使用する準備ができている（図 4）。酸化ストレス下におけるこれらの細胞株の表現型を確認して、更に SiRNA でノックダウンした表現型も調べる予定である。MutYH 強発現群では予後不良であり、こちらも MutYH が癌細胞のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった（図 5）。

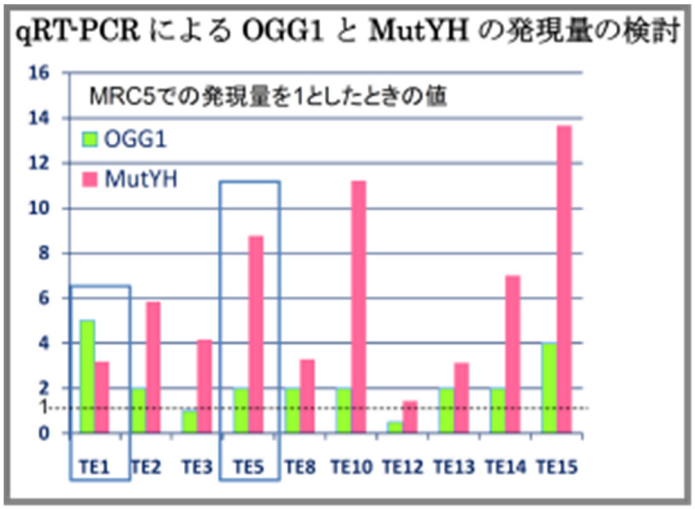


図 4. 食道癌細胞株における OGG1 と MutYH の発現（qRT-PCR）
OGG1 発現が高い細胞株（TE1）と、逆に MutYH 発現が高い細胞株（TE5）があった。

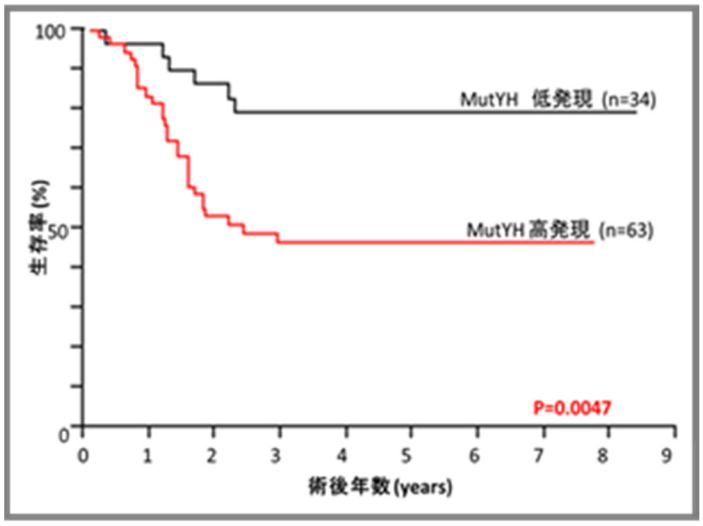


図 5. 食道癌患者における食道癌組織の MutYH 高発現と低発現の予後（カプラン・マイヤー）
MutYH 高発現の方が、MutYH 低発現に比較して有意（P = 0.0047）に予後不良であった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院消化器・総合外科研究室の沖英次、佐伯浩司と国立病院機構別府医療センター臨床研究部長・外科の川中博文である。

文　献

1) Kubo N, Morita M, Nakashima Y, Kitao H, Egashira A, Saeki H, Oki E, Kakeji Y, Oda Y, Maehara Y.Oxidative DNA damage in human esophageal cancer: clinicopathological analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and its repair enzyme.Dis Esophagus. 2014 Apr;27(3):285-93. Epub 2013 Aug 1.PMID:23902537 DOI:10.1111/dote.12107

2) Hirano T. Repair system of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis. J Radiat Res. 2008 Jul;49(4):329-40. Epub 2008 Jul 3. Review. PubMed PMID: 18596371.

3) Nakabeppu Y, Oka S, Sheng Z, Tsuchimoto D, Sakumi K. Programmed cell death triggered by nucleotide pool damage and its prevention by MutT homolog-1 (MTH1) with oxidized purine nucleoside triphosphatase. Mutat Res. 2010 Nov 28;703(1):51-8. Epub 2010 Jun 11. Review.PubMed PMID: 20542142. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.06.006.

4) Tsuzuki T, Egashira A, Igarashi H, Iwakuma T, Nakatsuru Y, Tominaga Y, Kawate H, Nakao K, Nakamura K, Ide F, Kura S, Nakabeppu Y, Katsuki M, Ishikawa T, Sekiguchi M. Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 25;98(20):11456-61.PubMed PMID: 11572992; PubMed Central PMCID: PMC58751. DOI:10.1073/pnas.191086798

5) Egashira A, Morita M, Kakeji Y, Sadanaga N, Oki E, Honbo T, Ohta M, Maehara Y.p53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma and their relevance to etiology and pathogenesis: results in Japan and comparisons with other countries.Cancer Sci. 2007 Aug;98(8):1152-6. Epub 2007 Jun 15. PubMed PMID: 17573896.DOI:10.1111/j.1349-7006.2007.00524.x

6) Oki E, Zhao Y, Yoshida R, Egashira A, Ohgaki K, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y.The difference in p53 mutations between cancers of the upper and lower gastrointestinal tract. Digestion. 2009;79 Suppl 1:33-9. Epub 2009 Jan 20. PubMed PMID: 19153488. DOI: 10.1159/000167864.