

氏 名	革島 悟史
(ふりがな)	(かわしま さとし)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙博医第2号
学位審査年月日	令和3年7月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	γ -H2AX as a potential indicator of radiosensitivity in colorectal cancer cells (γ -H2AX は大腸直腸癌細胞における放射線感受性の指標となりうる)
論文審査委員	(主) 教授 二瓶 圭二 教授 樋口 和秀 教授 中村 志郎

学位論文内容の要旨

《研究目的》

進行直腸癌に対する術前の化学放射線療法 (CRT) は、海外では標準治療とされ、本邦においても効果が期待できる治療法の1つとして位置づけられており、肛門温存・局所再発の減少、術前の down-staging にその有用性が認められている。しかし、CRT の効果は個人差があり、適応の選択基準となる予測因子の解明が期待されているが、いまだ確立されていない。

染色体のコアヒストン蛋白の1つである H2AX は、DNA 二重鎖損傷 (DSB) の初期に C 末端のセリンがリン酸化され γ -H2AX となる。DSB は、放射線被曝や発癌状態の修復欠損などの要因で引き起こされる。正常細胞であれば DNA 修復やクロマチン再構成が行われるが、腫瘍細胞は遺伝子が不安定であり DNA 修復機構の破綻が起こると考えられてい

る。大腸癌は進行度が高くなるにつれ、 γ -H2AX の発現が増加することが示されており、様々な癌細胞株に対する放射線照射で、 γ -H2AX の発現がその感受性の評価に有用であることが示されている。そこで本研究では、 γ -H2AX の発現が進行直腸癌において放射線の感受性予測因子となりうるかについて検証した。

《対象と方法》

1. データセット (Oncomine™) を用いて様々な大腸癌における H2AX の発現を調べるため、H2AX の mRNA 値をコホート解析した。また、マイクロサテライト不安定 (MSI) 陽性群と陰性群で H2AX の mRNA 値を比較した。
2. 2013 年から 2015 年にかけて大阪医科大学附属病院一般・消化器外科で手術切除された大腸癌の内、術前治療を行わなかった 6 例について、 γ -H2AX 発現を免疫組織化学染色および Western Blot (WB) 法で評価した。
3. 大腸癌細胞株 WiDr と DLD-1 を用い、放射線照射前後の γ -H2AX 発現の変化を WB 法で評価した。また、MTT アッセイを用いて、細胞生存能力を経時的に評価した。さらに、H2AX 遺伝子を H2AX siRNA を用いてノックダウンした際の、放射線感受性の変化を評価した。
4. 2 と同様の期間で手術切除した進行直腸癌の内、術前 CRT を施行した 11 例について、治療前に採取した標本を用いて γ -H2AX 発現を WB 法で評価し、手術切除後の組織学的効果判定基準の Grade 毎に分けて評価した。

《結 果》

1. 5 つのコホート解析の内 1 つを除いては、正常組織と比較し大腸癌群で H2AX mRNA 値が有意に上昇していた。初期に遠隔転移を伴う大腸癌群や肝転移を伴った大腸癌群でも、遠隔転移を伴わない大腸癌群と比べ H2AX mRNA 値が有意に上昇していた。また、MSI 陽性群では、陰性群と比較して H2AX mRNA 値の上昇を認めた。
2. γ -H2AX の免疫組織化学的検討では、術前治療を行わなかった大腸癌の細胞核内に

γ -H2AX 発現を強く認めた。同様に、WB 解析でも術前治療を行わなかった大腸癌で γ -H2AX 発現を強く認め、6 症例を定量化すると有意差をもって正常大腸粘膜よりも上昇していた。

3. WiDr と DLD-1 共にどの時点においても放射線照射 (10Gy) を行った群が、非照射群よりも有意に細胞数が減少していた。また、WB 解析では放射線照射により時間経過と共に γ -H2AX の発現が増加していた。H2AX 遺伝子をノックダウンするとコントロール群よりも細胞数は減少した。H2AX 遺伝子をノックダウンし、放射線を照射すると細胞数の抑制効果が増強した。その際、 γ -H2AX 発現は非照射群より増加していた。

4. γ -H2AX の WB 解析において CRT 後組織学的効果判定 Grade1a/1b であった症例では、治療前採取した癌組織で γ -H2AX 発現が強く認められた。Grade1a+1b、Grade2、Grade3 の 3 群間の比較では、各々の治療前採取した癌組織の γ -H2AX 発現に比して、Grade1a+1b 群が他の 2 群より有意に高値であった。

《考 察》

本研究では、大腸癌で H2AX mRNA や γ -H2AX 発現の増加を認めた。 γ -H2AX 発現は、乳癌・膀胱癌・卵巣癌などの癌で診断および予後の指標に有用であることが報告されている。リン酸化されていない H2AX も癌細胞から多く認められたことに加え、近年、大腸癌で注目されている MSI 陽性例でも H2AX の上昇が認められた。H2AX と MSI との関係性についての詳細は本研究からは示せておらず、今後の検討課題である。

また、本研究の結果から、 γ -H2AX 発現は術前放射線療法の効果予測因子となりうる可能性が示唆された。実験に用いた大腸癌細胞株の内、 γ -H2AX 発現を抑制し放射線照射を実施することで、更なる細胞増殖抑制効果が認められた。この結果から、 γ -H2AX 発現が少ない細胞では放射線の感受性が増強することが示唆された。臨床試料を用いた結果からも、 γ -H2AX を発現した癌細胞では CRT 効果が弱く癌細胞が遺残するのに対して、 γ -H2AX の発現が少ない癌細胞では CRT 効果が強く癌細胞が広範囲で死滅したと考えられた。

本研究で大腸癌細胞における γ -H2AX の発現と放射線感受性との間で負の相関が示唆されたが、その詳細な機序については、明らかにすることはできなかった。アポトーシス、

DNA 損傷に関与する PARP や micro RNA を含めたエピジェネティックな調節機構との関与性などが想定される。また、本研究の limitation として、臨床検体数が少ないこともあり、今後、症例数を増やした多数例での検証や、化学療法単独例での γ -H2AX 発現と治療反応性との関係や、動物モデルを用いた研究などについても検討する必要性が示唆される。

《結 論》

本研究から大腸癌細胞の γ -H2AX 発現と放射線感受性との間で負の相関があることが示唆された。今後さらにその機序を解明することにより、直腸癌の治療成績の向上に寄与できるものと考えられた。

論文審査結果の要旨

進行直腸癌における放射線化学療法において CRT は代表的な治療の 1 つであるが、完全奏功する症例は 15-20%であり、効果予測因子は明確には解明されていない。一方で、DNA 二重鎖損傷が起こった際にヒストン蛋白の 1 つである H2AX がリン酸化され発現する γ -H2AX が、進行直腸癌で多く発現することや、18 種の癌細胞株で γ -H2AX の増加が放射線感受性と関連している報告がある。このような背景から、本研究では進行直腸癌に対する放射線照射に γ -H2AX 発現がどのように関与するかを検討している。

データベースを用いた解析では、正常大腸粘膜と比較し、大腸癌で H2AX mRNA 値の上昇を認め、5 つのデータセットの内、4 つで有意差を認めた。また初期段階で遠隔転移を認めた症例や肝転移症例のデータセットでも遠隔転移のない症例と比較して H2AX mRNA 値の上昇を認めた。さらに、MSI に関する検討では、MSI 陽性症例で H2AX mRNA 値の上昇を認めた。

当院で切除された大腸癌 6 例の標本で γ -H2AX 発現を組織免疫化学的染色法、Western Blot 法で確認したところ、強発現および発現上昇を認め、腫瘍の進展により γ -H2AX 発現が増強することが示唆された。

大腸癌細胞株 WiDr や DLD-1 に対して放射線照射を行ったところ、経時的な細胞生存の減少を認めると共に γ -H2AX の発現が亢進していた。H2AX 遺伝子のノックダウンを行うと、各細胞株で γ -H2AX の発現低下を認め、ノックダウンと放射線照射を併用すると、細胞生存のさらなる低下を認めた。この結果から、大腸癌細胞の γ -H2AX 発現が放射線感受性を低下させる可能性が示唆された。

臨床で術前 CRT を施行した進行直腸癌に関して、CRT 前（生検時）、CRT 後（手術切除検体）の組織を用いて、病理診断による治療効果判定別に γ -H2AX 発現を調査したところ、Grade2 および Grade3 の症例で γ -H2AX の発現が Grade1 に対して有意に低かった。これらのことから、 γ -H2AX の発現が低い症例で CRT の効果が高いことが示唆された。

本研究により進行直腸癌における γ -H2AX 発現が放射線感受性の治療効果予測因子となる可能性が示唆され、今後の局所進行直腸癌の治療選択における有用性に寄与することが

期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 14 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Oncology Letters

20(3): 2331-2337, 2020 Sep

doi: 10.3892/ol.2020.11788