

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 菅野 伸洋

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻 外科治療学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 分子病理学教授 藤井 誠志

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 分子生物学教授 高橋 秀尚

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 消化器・腫瘍外科学准教授 松山 隆生

博士の学位論文審査結果の要旨

MDM2 gene amplification in colorectal cancer is associated with disease progression at the primary site, but inversely correlated with distant metastasis.

(大腸癌におけるMDM2遺伝子増幅は原発部位での進行に関与するが、遠隔転移とは逆相関している)

大腸癌の罹患数および死亡数は男女共に年々増加しており、罹患数は 2017 年全がん種の中で 1 位、死亡数は 2018 年 2 位となった。 *TP53* 遺伝子とは、癌抑制遺伝子の 1 つであり、細胞周期停止、アポトーシス、DNA 修復に関係し、遺伝的安定性を維持する中心的な役割を担っており、大腸癌のおよそ半分は *TP53* 遺伝子に変異が生じている。 *MDM2* 遺伝子は p53 により誘導される遺伝子の一つであるが、MDM2 は p53 の活性を抑制的に調節する。MDM2 の過剰発現により、*TP53* 遺伝子の変異に依存せず p53 機能が不活化され、癌化に結びつく可能性が報告されており、日本人大腸癌における *MDM2* 遺伝子増幅の重要性をさらに明確にするために本研究を立案した。

手術で得た 211 例の大腸癌組織を用いて、定量的リアルタイム PCR および Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) を用いて MDM2 遺伝子増幅を評価した。p53 変異の有無や臨床病理学的特徴と予後との相関を分析した。次に *MDM2* 遺伝子の SNP309 多型を解析し、健常ボランティアとの比較、予後との相関を分析した。

MDM2 遺伝子増幅は腫瘍の 8% (16/211) で観察された。Dukes 分類病期 A と B を組み合わせた群と、病期 C 群とを比較した場合、疾患進行に伴って *MDM2* 遺伝子増幅の発生率が有意に増加した ($p=0.025$)。しかし病期 D 群の患者には *MDM2* 遺伝子増幅症例は認められず、統計的に有意差が認められた ($p=0.043$)。それ以外の臨床病理学的特徴との関連や、予後との相関は認めなかった。*MDM2* 遺伝子 SNP309 多型の頻度は、健常者との間で有意な差はなく、予後との相関も認めなかった。

上記論文の研究内容説明に続き、以下のような質疑応答がなされた。

まず、松山副査から以下の質問があり、下記の回答がなされた。

1. コピー数 4.0 以上を 遺伝子増幅陽性とした根拠は。

4.0 とした根拠は、乳がんの *HER2* の FISH 解析では、FDA 承認時は *HER2* 遺伝子コピー数の平均が 1 細胞あたり 4 コピー以上を陽性としていたもので、それを採用した。定量 PCR による数値化も誤差を考慮する必要があるため 4 コピー以上を増幅ありとした。

2. 既報の陽性率と同等で再現性は高そうだが、基準を 4.0 ではなくて 2.0 に下げて検討すると結果は変わってくるのか、そういう検討はしたか.

2.0 で区切った検討は行っていない。Monirath らの報告では、FISH のみで *MDM2* 遺伝子増幅の評価あり、2 倍で陽性としていた。陽性率は 18%であったので、今回の検討および先行研究のほぼ倍の陽性率であった。

3. DukesD で増幅がないことへの考察は

機序まではわからないが *MDM2* 遺伝子増幅が遠隔転移に関しては抑制的に関与しているか、もしくは遠隔転移獲得に関しては *MDM2* 増幅よりもより強力な因子が作用している可能性を考える。*MDM2* 以外のより強力な因子の候補としては、*miR-34a* 遺伝子の関与が考えられる。*miR-34a* 遺伝子は p53 の直接の標的遺伝子であることが知られており (Shi et al. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology. 2020;10(2);391-418.), *miR-34a* 遺伝子は結腸直腸がんでは一般的に抑制されている。p53 / *miR-34a* は受容体型チロシンキナーゼを介して大腸癌を抑制すると考えられているが、大腸がんの原発巣では受容体型チロシンキナーゼの発現が腫瘍浸潤に関与していること、そして、*miR-34a* 遺伝子のプロモーターの CpG メチル化および遠隔転移との関連が指摘されており、今回の結果を説明できる可能性があると考えている。また p53 に関わらない因子としては、胎児の発達期に働いていることが知られている上皮細胞極性調節因子 Crumbs3 (Crb3) タンパク質が、成人の大腸がんの浸潤・転移に深く関与しているという報告があり (Iioka et al. Int J Cancer . 145: 2740-2753. 2019), Crb3 は、がん細胞の運動能を促進する線維芽細胞増殖因子受容体の活性化を通じて転移のきっかけとなるとされている。

4. 本研究の遠隔転移には、肝転移以外の転移も入っているのか.

考察の引用文献 (Kondo I, et al. Dis Colon Rectum. 51: 1395-402. 2008) の肝転移が抑制されたのと同様の機序を考えるのか.

本研究の遠隔転移には、肝転移以外の遠隔転移もすべて入っている。Forslund らの報告 (Mol Cancer Res. 2008 Feb;6(2):205-11.) では、遠隔転移を伴う DukesD で *MDM2* 遺伝子増幅は有意をもって多く認めたが、本研究では Kondo らの肝転移に対する報告と同様に遠隔転移で抑制された。Kondo らの報告も日本人大腸癌の集団を対象にした研究であり、Forslund らの報告との違いは人種による違いなども検討内容に入ると考える。

5. 学位論文中の table3 にて、健常ボランティアと MDM2 増幅症例を比べると MDM2 増幅症例で野生型(T/T)が多い傾向がある (P=0.087) . また、遺伝子多型別の生存曲線を見ると、野生型の予後が悪そうであるが、それに関する考察は

SNP309 多型 (G 変異) が様々な癌種、人種において、癌の発症や、進行に関与する報告は多数ある。今回の事象は予測していた結果と真逆であり、改めて文献的考察を行ったが説明する根拠となる文献は得られなかった。ただし、Riscal ら (Mol Cell. 2016 Jun 16;62(6):890-902.) は、MDM2 は特定のクロマチン領域に結合し、p53 とは無関係にセリン代謝とレドックス恒常性を調節し腫瘍形成能に影響をあたえると報告しており、MDM2 の標的遺伝子を全ゲノムレベルで同定することにより、ATF3 / 4 転写因子が酸化ストレスおよびセリン/グリシン欠乏の際に MDM2 とクロマチン領域との結合に重要な役割を担うとしている。MDM2 腫瘍性タンパク質自身の発癌活性が、MDM2 により発現が調節される p53 による腫瘍抑制効果を超えている事が示されており、野生型でも同様の結果になった可能性があると考ええる。

次に、高橋副査 から以下の論評、質問があり、下記の回答がなされた。

1. 実際に作用しているのは、遺伝子ではなくタンパク質と思うが MDM2 の組織学的免疫染色はしたのか。組織でタンパク質の定量などの評価はしたのか。

本研究は当初、免疫染色でタンパク質発現を評価して臨床病理学的特徴との関連をみる研究を企画した。しかし、当時 MDM2 の免疫染色を評価するに十分な抗体が存在しなかった。使用した抗体では、自分、共同研究者、研究所のスタッフの複数人で染色を行った際にその免疫染色結果に再現性がなかった。免疫染色を行う条件によってバックが強くなり染色の度合いが異なり、評価が割れた。この条件下ではタンパク質発現の評価は不可能との判断に至り、qPCR による遺伝子増幅で検討する研究に変更した。よってタンパク質の評価は行っていない。

2. p53 に関する免疫染色でも、差はなかったのか。

TP53 遺伝子変異のある症例では p53 が染色され、TP53 遺伝子変異のない症例では p53 は染色されず、MDM2 の遺伝子増殖の有無で差はなかった。

3. MDM2 遺伝子増幅自体が、関与していなかった可能性があるのではないか.

MDM2 遺伝子増幅は多くの臨床病理学的因子との関連がなかったため、MDM2 遺伝子増幅は p53 機能抑制に必須ではない可能性がある。MDM2 の作用をコントロールする p14ARF の不活性化がより強く関与した可能性があると考えた。

4. TP53 遺伝子のどの領域が変異していたのか. MDM2 が結合する領域ではなく、DNA に結合するドメインが変異しているタイプが多かったのか.

今回の検討では TP53 遺伝子変異の領域までは評価していないため、TP53 の DNA に結合するドメインが不活化するタイプが多いかは不明である。

5. MDM2 が関与していないのであれば、大腸癌で p53 を分解する他のユビキチンリガーゼなどの報告はあるか.

大腸癌に関して p53 とユビキチンキナーゼについては以下の報告がなされている。

Tan らの報告 (Molecular and cellular biochemistry. 2019 Apr;454(1-2):1-9.) では小胞体に存在する E3 リガーゼである HRD1 は腫瘍抑制因子 p53 のユビキチン化と分解を増加させるが、HRD1 の発現はヒト大腸癌組織で有意に増加し、その過剰発現は TNM 病期、腫瘍分化、腫瘍浸潤深度、および遠隔転移に関連しているとされている。

また、Liu らの報告 (Journal of biomedical science. 2013 Oct 07;20:74.) では、ユビキチンリガーゼ A20 は、ヒト結腸上皮細胞の p53 タンパク質を調節すること、ヒト結腸癌組織、腺腫ポリープおよび過形成性ポリープの上皮は、高レベルの A20 を示し、これは結腸ポリープの癌性傾向と正の相関を示すこと、A20 の過剰発現は、HEK293 細胞の p53 タンパク質レベルを抑制し、癌化の傾向を高めるとされている。

Wang らの報告では (Cancer research. 2019 08 15;79(16):4086-4098.) 三者モチーフ (TRIM) ファミリータンパク質の一つ TRIM67 は、p53 の C 末端と直接相互作用し、ユビキチンリガーゼ MDM2 による p53 の分解を阻害する。TRIM67 は p53 の転写標的でもあり、細胞ストレスにより、p53 は TRIM67 遺伝子のプロモーターに結合し、TRIM67 は有意に活性化することが示されている。それによって、p53 が誘導する細胞増殖阻害とアポトーシスを促進する TRIM67 / p53 自己増幅ループを形成されるとしている。TRIM67 ノックアウトでは、結腸直腸腫瘍の発生率、多様性、および負担を増加させ、TRIM67 の再活性化により、p53 の活性化が回復し、結腸直腸癌細胞が in vitro および in vivo で化学療法に感作されたとしている。結果として TRIM67 は p53 を活性化して、結腸直腸癌の発生と進行を抑制するとされている。

6. 具体的に大腸癌では *p14ARF* にどんな変異があるのか.

大腸癌において *p14ARF* のプロモーター領域であるエクソン 1β の 5 ‘CpG アイランド’ のメチル化により *p14ARF* 遺伝子の発現が抑制され、MDM2 の高発現と p53 の抑制と有意に相関したという Nyiraneza らの報告がある (Clin epigenetics. 2012 Jun 15;4(1):9) .

7. *Ink4A* 遺伝子領域への変異についてはどう考えているか.

p16(Ink4A) は、*p14ARF* と同じ染色体 9p21 部位にコードされるが ARF とは相同性を示さない *Ink4A* タンパク質を作る。p16 は p53 とは別のがん抑制遺伝子産物 Rb の上流に位置し、この活性化に関わる。結腸直腸癌における *p16* 遺伝子の CpG アイランドのメチル化のパターンを評価した Toyota らの報告 (Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jul 20;96(15):8681-6.) では、結腸癌では p16, THBS1 メチル化も高く、hMLH1 のメチル化に関する MSI-H 結腸癌の多くの原因となる可能性が示唆されている。

また、大腸癌における *p16* 遺伝子のメチル化の詳細を検討した Ye らの報告 (BMC Cancer. 2018 Oct 22;18(1):1023) では、*p16* 遺伝子の二つの CpG アイランドは大腸癌組織で著しく高メチル化されており、p16 タンパク質の発現と癌の臨床病理学的病期分類に関連していたとされている。p16 のエクソン 1 の高メチル化は N /デュークス病期分類と関連していた。

最後に藤井主査から以下の質問、論評があり、下記の回答がなされた。

1. 論文は 2010 年のものである。学位申請が 10 年後になった何か事情はあるのか.

事情は特になく、途中国内留学などを行ったため準備に時間を要してしまった。

2. 本研究で対象とした母集団の分布の確からしさを、DukesA-D で生存曲線を書いて事前に検討しているのか

対象期間の一部の症例を選別してのではなく連続する全症例を対象にした。改めて生存曲線を書き母集団の分布が特異的ではないことを確認した。

その他、いくつかの質問がなされ、追加の考察を求めた結果、いずれに対しても適切な回答がなされ、申請者がこの領域において深く正確に理解していることが伺えた。本研究成果は、大腸癌における *MDM2* 遺伝子増幅と局所浸潤や遠隔転移との関連を世に先駆けて検討した学術的価値の高い研究と判断された。以上より申請者は医学博士を授与されるにあたり相当であると判定した。