

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19304

研究課題名(和文) バレット食道癌の発生母地の差異に基づく発癌機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The analysis of carcinogenesis and the development of a novel therapy for Barrett's esophageal cancer based on two different precursor lesions

研究代表者

野村 好紀(Nomura, Yoshiki)

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：70533280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト食道扁平上皮細胞株(Het1A)に対して、胃酸および胆汁酸を暴露し、Phenotypeの変化をqPCRで評価した。酸の暴露はKeratin5の低下およびMUC2の増加を来した。酸、胆汁酸の同時暴露ではさらにCD10の発現低下を認め、不完全型腸上皮化生の形成を強く促進することが示唆された。メチル化阻害剤を胆汁酸、酸に併用したところ、有意にCDX2が増加し、バレット食道癌の発生にメチル化異常が大きくかかわっていることが示唆された。現在、メチル化以外の新規発癌機構の探索を行うため、バレット食道癌患者から樹立した初代細胞培養株を用いてtranscriptome解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：The phenotypic alteration of the human esophageal squamous cell line (Het 1A) was evaluated by qPCR before and after exposure to bile acid cocktail and/or acid (pH 4). The exposure of Het 1A cells to acid alone resulted in the decreased expression of Keratin5 and the increased expression of MUC2. When the cells were exposed to bile acid cocktail and acid, the expression of CD10 was also decreased, suggesting that the differentiation to incomplete intestinal metaplasia had occurred. In addition to bile acid cocktail and acid, exposure to 5-AZA-dc, which is known to be a demethylating agent, significantly increased the expression of CDX2 in Het 1A cells. This result suggests that the abnormal methylation of CDX2 is deeply associated with the development of Barrett's esophageal cancer. We are performing a transcriptome analysis of primary cell cultures established from Barrett's esophageal cancer patients to explore novel mechanisms of carcinogenesis other than abnormal methylation.

研究分野：消化器

キーワード：バレット食道

1. 研究開始当初の背景

バレット食道癌 (BA) は、逆流性食道炎 (GERD) により正常扁平上皮が円柱上皮化生 (CLE) となり、さらに特殊腸上皮化生 (SIM) を経て発生すると考えられている。本邦でも GERD やバレット食道の増加が指摘され、BA の増加が懸念されるが、前癌病変とされるバレット食道や BA の分子生物学的な発生機序には不明な点が多く、有効な治療法も確立されていない。我々は日本人の SIM を対象としたエピゲノム、ゲノムの解析を行い、前癌病変でありながら、すでにゲノム不安定性 (GIN) を高頻度に認めること、p16, APC, E-cadherin などの遺伝子が異常メチル化を来していること (①) や、特殊腸上皮化生から異所性に分泌される human defensin-5 (HD-5) が食道扁平上皮における E-cadherin を低下させバレット食道への進展を促進させることを明らかにしてきた (②)。これまで BA の発癌経路は SIM を経るものと考えられ、SIM は前癌病変と認識されている。しかし、BA の内視鏡的切除例の半数以上の症例で SIM ではなく CLE を背景粘膜として認めること (③)、自験例でも表在型 BA の 30.8% は CLE を背景として発生していたことから、CLE を背景とした発癌経路の存在が想定され、SIM から発生する BA とは発癌機構や生物学的特性が異なる可能性がある。このような、BA の発生母地の差異は不明な点が多く、それらに基づく発癌機構の解明と治療法の開発が重要である。

2. 研究の目的

(1) 胃酸および胆汁酸が食道扁平上皮に及ぼす phenotype の検討。

バレット食道の発生には GERD が重要であるが、胃酸のみの逆流だけでなく、特に胆汁酸逆流が重要とされている。そのため胃酸および胆汁酸の扁平上皮に及ぼす影響を qPCR 法で検討する。

(2) メチル化に関する検討。

バレット食道において、メチル化異常があることを我々が既に報告していることから、メチル化阻害剤 5-AZA-2dc を胆汁酸、酸に併用し、phenotype の変化を qPCR 法で検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト食道扁平上皮細胞株である Het1A に対して、胃酸および胆汁酸を暴露した。胃酸は培養液を HCL で pH4 に調節し、胆汁酸は既報 (④) のように、glycochenodeoxycholic acid (GCA), taurocholic acid (TCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), glycodeoxycholic acid (GDCA), taurodeoxycholic acid (TDCA) を 20:3:15:3:6:1 で 400 μ M の bile mix を作成

した。酸・胆汁酸暴露は、①胆汁酸のみの暴露、②酸 (pH4) のみの暴露、③胆汁酸、酸 (pH4) 同時暴露の 3 群とし、胆汁酸の暴露時間は 24 時間持続投与で day1-5 の 5 日間、pH4 は 15 分間暴露を 12 時間ごとに day1-3 の 3 日間行った。

その後細胞を回収し、RNA を抽出、Phenotype の変化について qPCR で評価した。Phenotype 評価項目は CDX2, E-cadherin, Keratin5, MUC2, MUC5AC, MUC6, CD10, vimentin の項目を検討した。

(2) メチル化阻害剤 5-AZA-2dc を使用し、胆汁酸、酸同時暴露群に併用して検討した。投与時間は 24 時間持続投与を day1-5 の 5 日間でを行い、細胞を回収し、RNA を抽出。先ほど同様の phenotype の変化を qPCR で検討した。

(3) メチル化以外の発癌メカニズムの検討のため、バレット食道癌症例から作成した初代培養細胞株を用いて、胆汁酸と酸の同時暴露を行う。回収した RNA を用いて transcriptome 解析を行い暴露により有意に変化している遺伝子を抽出する。

4. 研究成果

(1) ①胆汁酸のみの暴露ではヒト食道扁平上皮細胞の qPCR では有意な変化は見られなかった。

②酸のみの暴露では有意に Keratin5 が低下し、MUC2 が増加した。

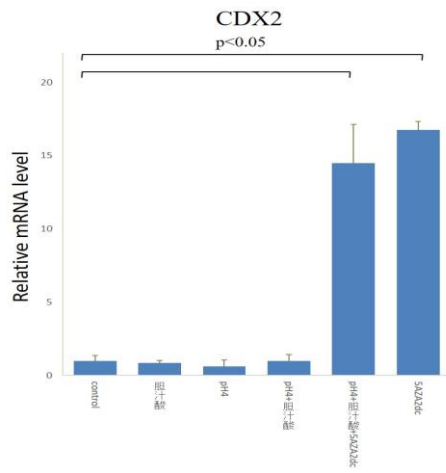
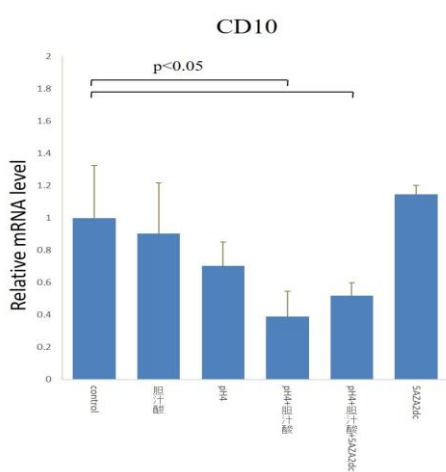
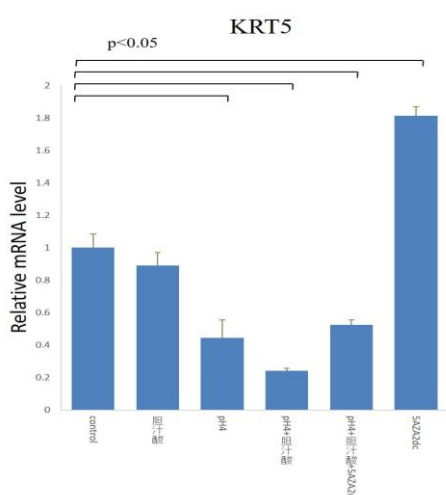
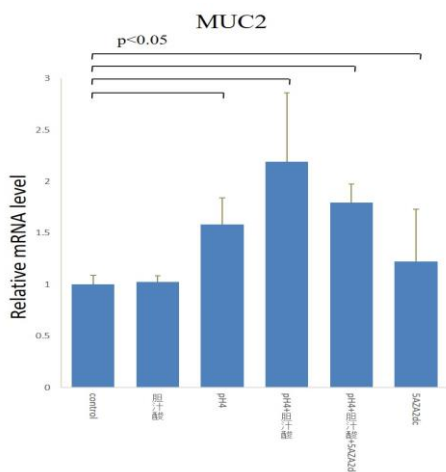
③胆汁酸と酸の同時暴露でも Keratin5 低下、MUC2 増加を認め、酸のみの時よりも顕著であった。さらにこの群のみ CD10 が有意に低下した。

CDX2, E-cadherin, vimentin はどの群も有意差は認めず、MUC5AC, MUC6 は検出されなかった。

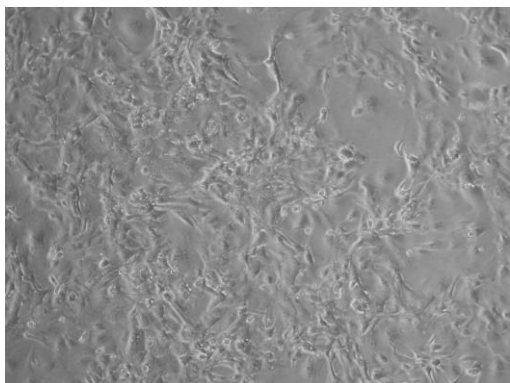
以上より食道扁平上皮に対する酸及び胆汁酸は食道扁平上皮の構造蛋白である Keratin5 の低下および腸上皮化生に特徴的な MUC2 の増加を来した。また、酸のみの暴露に比べ、胆汁酸の同時暴露では MUC2 の発現は増加し、かつ完全腸上皮化生マーカーである CD10 の発現低下を認めたことから、酸と胆汁酸の同時暴露は不完全型腸上皮化生の形成を強く促進することが示唆された。しかし、バレット食道で認められる CDX2 の発現亢進はどの群も認めなかった。

(2) メチル化阻害剤 5-AZA-2dc を胆汁酸、酸に併用して検討を行ったところ、qPCR にて有意に CDX2 が増加した。CDX2 の発現は酸や胆汁酸のない環境下で 5-AZA-2dc 処理をしても発現が亢進しており、正常扁平上皮では遺伝子メチル化によって抑制されている CDX2 発現が、5-AZA-2dc の脱メチル化によって過剰発現しバレット食道に変化していく可能性が示唆された。

以上から pH4 と胆汁酸の暴露では、扁平上皮細胞であっても、腺上皮のマーカーの上昇を認める。さらに脱メチル化処理により、CDX2 が著明に上昇することから、腸上皮化生を経由して発癌する古典的なバレット食道癌では、扁平上皮から SIM を発現するためにはメチル化異常が大きくかかわっていることが示唆された。



しかし、自験例では CLE を背景とした発癌が 30.8% に上ること、CLE の 7 割が CDX2 陰性であったことから、メチル化以外の新規の発癌機構の探索を行うため、transcriptome 解析を行い DAVID でのクラスター解析を施行した。本検討には、CLE 由来と考えられたバレット食道癌患者から樹立した初代細胞培養株を用いた。



バレット食道癌症例から樹立した初代培養細胞

解析の結果、1342 遺伝子の発現変化が認められた。このうち、Bonferoni 補正で $p<0.05/1342=3.72 \times 10^{-6}$ を満たす候補は 25 遺伝子であった。現在、これらの候補遺伝子の発現抑制系を用いて、さらに検討を行っている。

<引用文献>

① Moriichi K, Watari J et al. Effects of Helicobacter pylori infection on genetic instability, the aberrant CpG island methylation status and the cellular phenotype in Barrett's esophagus in a Japanese population. Int J Cancer, 2009 Mar 15;124(6):1263-9.

- ② Nomura Y, Tanabe H, et al. Reduction of E-cadherin by human defensin-5 in esophageal squamous cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013 Sep 13; 439 (1):71-7.
- ③ Takubo K, Aida J et al. Cardiac rather than intestinal-type background in endoscopic resection specimens of minute Barrett adenocarcinoma. *Hum pathol*, 2009 Jan ;40 (1) :65-74.
- ④ Liu T, Zhang X, So CK, et al. Regulation of Cdx2 expression by promoter methylation, and effects of Cdx2 transfection on morphology and gene expression of human esophageal epithelial cells, *Carcinogenesis*, 28, 2007, 488-96

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Tanaka K, Fujiya M, Nomura Y, et al. A Case of Alpha-Fetoprotein-Producing Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction in which Long-Term Survival Was Achieved by Means of Individualized Multidisciplinary Therapy. *J Gastrointest Cancer*. 2018 Feb 19.
- ② Goto T, Fujiya M, Nomura Y, et al. An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker. *BMC Cancer*. 2018 Jan 31;18(1):116.
- ③ Tanaka K, Fujiya M, Nomura Y, et al. Second-line therapy for *Helicobacter pylori* eradication causing antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017 Aug 14;16(1):54.
- ④ Nomura Y, Moriichi K, et al. The endoscopic findings of the upper gastrointestinal tract in patients with Crohn's disease. *Clin J Gastroenterol*. 2017 Aug;10(4):289-296.
- ⑤ Tanabe H, Ando K, Nomura Y, et al. Efficacy of Vonoprazan-Based Triple Therapy for *Helicobacter pylori* Eradication: A Multicenter Study and a Review of the Literature. *Dig Dis Sci*. 2017 Nov;62(11):3069-3076.
- ⑥ Tanabe H, Ito T, Nomura Y, et al. Pilot study of endoscopic retrograde 3-dimensional - computed tomography enteroclysis for the assessment of

Crohn's disease. *Eur J Radiol Open*. 2017 May 5;4:58-62.

- ⑦ Fujiya M, Sato H, Nomura Y, et al. Efficacy and adverse events of cold vs hot polypectomy: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2016 Jun 21;22(23):5436-44.
- ⑧ Iwama T, Sakatani A, Nomura Y, et al. Increased dosage of infliximab is a potential cause of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Gut Pathog*. 2016 Feb 2;8:2.
- ⑨ Moriichi K, Fujiya M, Nomura Y, et al. Quantification of autofluorescence imaging can accurately and objectively assess the severity of ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis*. 2015 Dec;30(12):1639-43.
- ⑩ Utsumi T, Sasajima J, Nomura Y, et al. The Detection of Pancreatic and Retroperitoneal Plasmacytoma Helped to Diagnose Multiple Myeloma: A Case Report. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Jul;94(27):e914.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 野村 好紀, 白色光, 拡大観察, AFI による潰瘍性大腸炎の活動性評価, 日本内視鏡学会, 2016 年 5 月 14 日, 東京都

[図書] (計 1 件)

- ① 野村 好紀 他, 医学書院 胃と腸, 炎症性腸疾患の拡大内視鏡診断—炎症, 2016, 683-689 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 好紀 (NOMURA, Yoshiki)
 旭川医科大学・医学部・特任助教
 研究者番号: 70533280