

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09364

研究課題名(和文) バレット食道におけるバレット腺癌リスクマーカーの検討

研究課題名(英文) High risk markers for cancer in Barrett's esophagus

研究代表者

村尾 高久 (Takahisa, Murao)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：40388971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：PDZK1過剰発現およびノックダウンプラスミドを構築し、食道腺癌細胞株(OE33)に空ベクターをトランスフェクトした細胞(NC)と、PDZK1を過剰発現させた細胞(PC)を作成した。両細胞で増殖速度に差を認めなかった。対象群に比べてPSI刺激群ではNCの有意なアポトーシスの増加を認められたが、PCではアポトーシスの増加抑制を認めた。アポトーシス実行蛋白をWestern Blottingで解析したところ、PCにおいてPSI刺激で増加したCleaved Caspase3の発現は、PCでは抑制されていた。PDZK1はEACにおいて抗アポトーシス作用を増強し癌の抵抗性を増加させる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、下部食道のバレット上皮から発生する食道腺癌は急激な増加を示し、海外において最も増加率が高い癌である。

我々は米国人と日本人の検体を用いて癌の合併率が高いバレット上皮においてPDZK1の発現が高いことを調べてきた。今回、PDZK1の役割を明らかにする目的で食道腺癌細胞株にPDZK1を過剰発現させた細胞を作成した。対照の細胞と比較すると細胞の増殖速度に差は認めなかったが、アポトーシス(細胞が構成している組織をより良い状態に保つため、細胞自体に組み込まれた細胞の自然死)刺激を行うと、アポトーシスの増加抑制を認めた。そのためPDZK1は食道腺癌において癌の抵抗性を増加させる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In a previous study, we found that PDZK1 expression is higher in long segment BE compared to that in short-segment BE. Human adenocarcinoma-derived OE33 cells were used as a parental cell line and transfected to generate PDZK1 overexpressed OE33 cells (PC cells) or transfected with empty vector as control cells (NC cells).

There were no significant differences in cell growth between NC and PC cells. PSI significantly increased apoptosis in NC cells, but not in PC cells. In response to PSI, increased levels of cleaved-caspase3 and decreased pro-caspase3 levels were found in NC cells, but not in PC cells. In NC cells, PSI significantly decreased Bcl-2 expression without affecting Bax levels. In contrast, high expression of both Bcl-2 and Bax was observed in PC cells.

Overexpression of PDZK1 protein induces an apoptosis-resistant phenotype in BE cells, which may be a potential therapeutic target.

研究分野：医歯薬学

キーワード：バレット食道腺癌 PDZK1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、下部食道のバレット上皮から発生する腺癌(EAC)の発生は急激な増加を示し、海外において最も増加率が高い癌である。EACの大部分は食道胃接合部口側の扁平上皮が円柱上皮、特殊腸上皮化生(SIM)へと変化し、前癌病変そして最終的に癌へと発展する多段階の過程を経て発生すると考えられている。円柱上皮における腸型形質が腫瘍性変化に及ぼす影響を含め、バレット食道(BE)発生および発癌の分子学的機序は十分に解明されていないが、Goblet metaplasiaを伴うSIMとEACとの関連性が指摘されている。また、バレット上皮の長さが全周性に3cmを超えるバレット食道(LSBE)は3cm未満のバレット食道(SSBE)と比較して癌の合併率が高いことが知られている。

(2) これまでに代表者らはEACリスクマーカーとなる遺伝子を同定する目的で、Narrow Band Imaging(NBI)拡大内視鏡観察下生検により検体を採取し、EAC少数例のpreliminaryな検討として網羅的遺伝子解析を行った。対照群と比較してEAC群のバレット上皮部および癌部でも同様に有意差を示す9遺伝子を特定した。本邦においてEACは食道癌の4.7%と頻度が低く症例の集積が困難であったため、EAC、LSBEの頻度が高い米国Mayo Clinicの協力により集積を行った検体で、さらに網羅的遺伝子解析を行った。両群のバレット上皮の遺伝子発現でp値0.0005以下の有意差を認めた14遺伝子を特定しvalidationを行った。EAC群とコントロール群のバレット上皮で有意差が得られたのはSERPINB7で、蛋白分解酵素阻害因子であるSERPINB7がバレットの伸展および発癌に関与している可能性が示唆された。次に日本人の検体を用いて定量解析を行い日本人でも同様に対照群LSBEにおけるSCNN1Bの発現低下およびSERPINB7、PDZK1、TRHDEの過剰発現を認めた。

2. 研究の目的

米国人のバレット腺癌のバレット粘膜を用いて網羅的遺伝子解析により特定した遺伝子について日本人の検体を用いて定量解析を行うことにより、日本において増加する可能性が高いと考えられるEACあるいはLSBEの分子マーカーを同定する。これまでの検討でLSBEとの関連性が認められたPDZK1に注目し、PDZK1を遺伝子導入した細胞株を用いて細胞形質および形態の変化や増殖・アポトーシスについて検討し、バレット上皮に発現しているPDZK1の役割について解明する。

3. 研究の方法

PDZK1過剰発現およびノックダウンプラスミドを構築し、食道腺癌細胞株(OE33)に空ベクターをトランスフェクトしたB5細胞(NC)と、PDZK1を過剰発現させたP5細胞(PC)を作成した。それぞれの細胞の増殖能と、Proteasome inhibitor (PSI)によるアポトーシス刺激に対するPDZK1の作用を、Annexin-V、ヨウ化プロピジウム(PI)による2重染色を行い、フローサイトメトリーで解析し調べた。

4. 研究成果

これまでの検討でLSBEとの関連性が認められたSERPINB7に注目し、SERPINB7の遺伝子を導入した強制発現株および対照株の樹立をバレット腺がんの細胞株OE19、OE33を使って試みたが、困難であった。そのため同様の傾向を示すPDZK1に注目して同様に発現株の作成を試みたところ、OE33で安定な発現株が得られた。

両細胞で増殖速度に差を認めなかった(図1)。

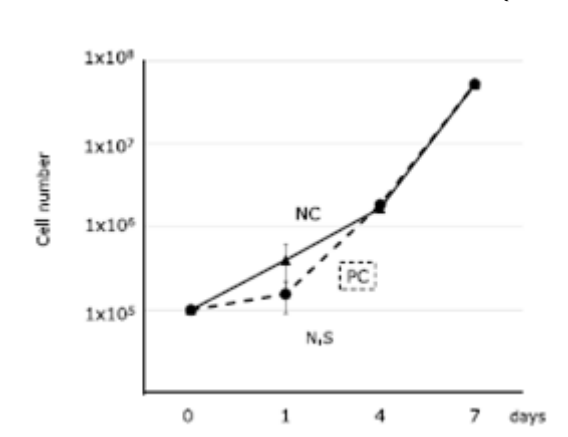


図1. PDZK-1発現が増殖に及ぼす影響

DMSOを添加した対象群に比べてPSI刺激群ではNCの有意なアポトーシスの増加を認めたが、PCはアポトーシスの増加抑制を認めた(図2)。また、ヘキスト33342とPIによる2重染色でアポトーシス小体を指標とした場合でも同様の結果を認めた。

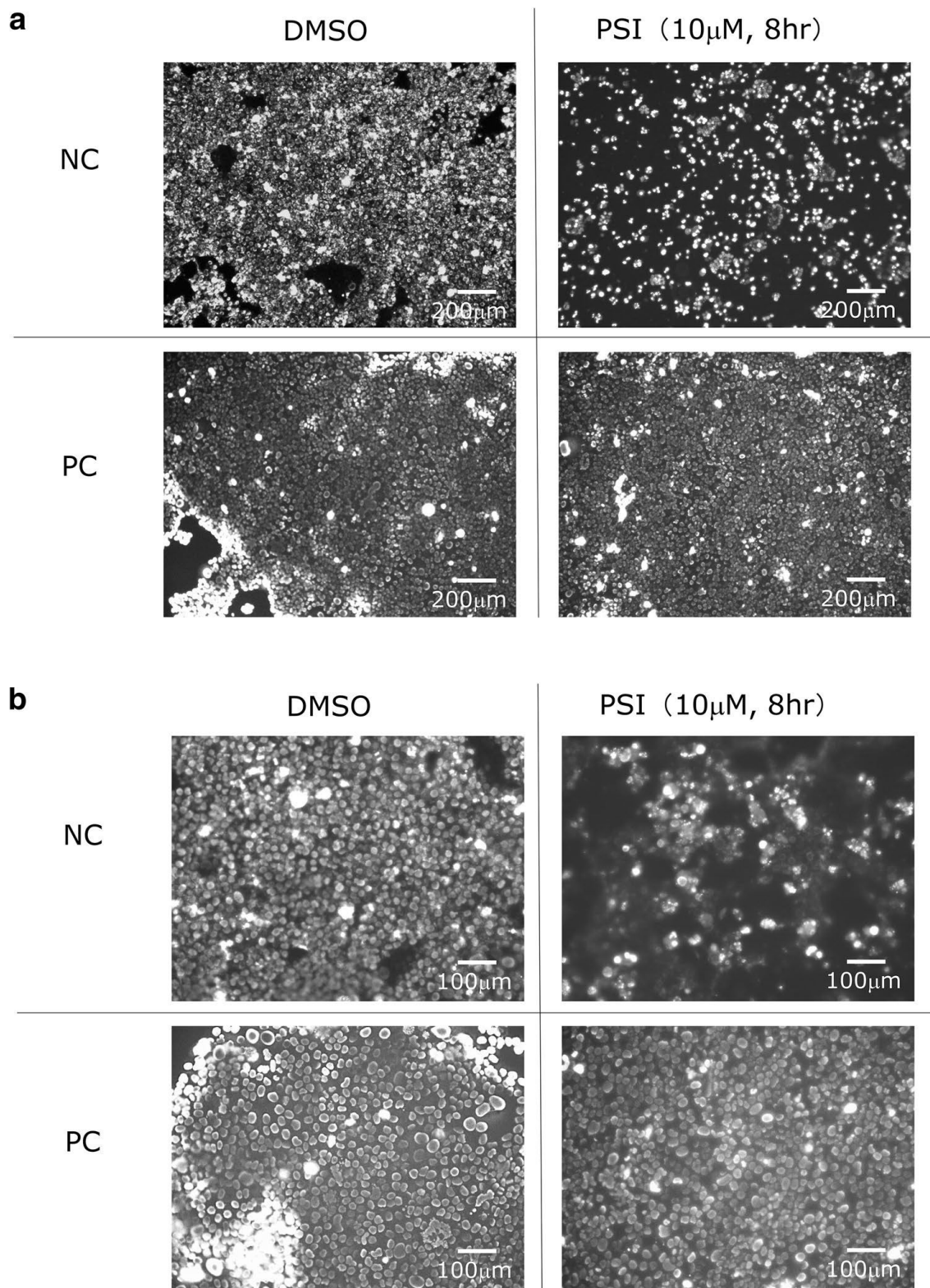


図2. アポトーシス刺激に対する反応性
(a \times 10 and b \times 20 objective lens.)

アポトーシス実行蛋白を Western Blotting で解析したところ、NC において PSI 刺激で増加した Cleaved Caspase3 の発現は、PC では抑制されていた (図3)。

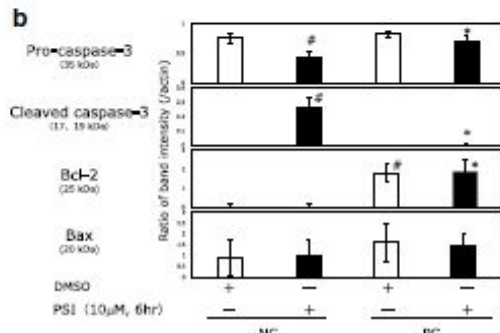
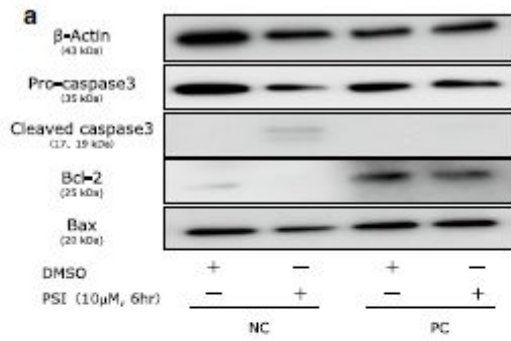


図3. アポトーシス刺激に対する反応性

#p < 0.05 vs. NC treated with DMSO, *p < 0.05 vs. NC treated with PSI

PDZK1 は EAC において抗アポトーシス作用を増強し癌の抵抗性を増加させる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Goda K, Murao T, Handa Y, Katsumata R, Fukushima S, Nakato R, Osawa M, Ishii M, Fujita M, Handa O, Matsumoto H, Fujita Y, Nishio K, Wallace TM, Gomez-Esquivel R, Berzosa M, Wolfsen HC, Wallace MB, Umegaki E, Shiotani A	4. 巻 18
2. 論文標題 Molecular biomarker identification for esophageal adenocarcinoma using endoscopic brushing and magnified endoscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Esophagus	6. 最初と最後の頁 306 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10388-020-00762-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Handa Osamu, Goda Kyousuke, Handa Yukiko, Fukushima Shinya, Osawa Motoyasu, Murao Takahisa, Matsumoto Hiroshi, Umegaki Eiji, Fujita Yoshihiko, Nishio Kazuto, Shiotani Akiko	4. 巻 18
2. 論文標題 PDZK1 induces resistance to apoptosis in esophageal adenocarcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Esophagus	6. 最初と最後の頁 655 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10388-021-00819-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 半田修, 半田有紀子, 合田杏佑, 福嶋真弥, 平松和恵, 萩原喜美子, 村尾高久, 藤田至彦, 塩谷昭子
2. 発表標題 バレット食道のバレット腺癌リスクマーカーPDZK1 の抗アポトーシス能増強作用
3. 学会等名 第38回Cytoprotection研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 合田 杏佑, 村尾 高久, 塩谷 昭子
2. 発表標題 内視鏡下ブラッシング法を用いたバレット食道に関連する分子バイオマーカーについての検討
3. 学会等名 第50回胃病態機能研究会 主題1-2 Young Investigator Session 『酸関連疾患をめぐる諸問題』
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyosuke Goda, Takahisa Murao, Akiko Shiotani
2. 発表標題 Molecular biomarkers of Barrett's esophagus using endoscopic brushing samples
3. 学会等名 第93回日本消化器内視鏡学会総会ワークショップ
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>川崎医科大学 消化管内科学教室H.P. https://m.kawasaki-m.ac.jp/classroom/course.php?id=404</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	塩谷 昭子 (Shiotani Akiko) (80275354)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	西尾 和人 (Nishio Kazuto)	近畿大学・医学部ゲノム生物学教室・教授	
研究協力者	藤田 至彦 (Fujita Yoshihiko)	近畿大学・医学部ゲノム生物学教室・医学部講師	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------