

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10659

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎を起点とする炎症促進性因子を介した造腫瘍機械の解明と臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation and clinical application of tumorigenic machinery mediated by proinflammatory factors originating from ulcerative colitis

研究代表者

衣笠 哲史(KINUGASA, TETSUSHI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：90279266

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)：潰瘍性大腸炎(UC)患者に対する癌化ハイリスク症例の選別のためにUC癌合併症例でその癌病変が同一症例の正常粘膜よりも発現が増強し、sporadic大腸癌患者では発現が増加していないものを検索するためcDNAマイクロアレイ解析を行った。Claudin 2、CEACAM6、PDE4などが抽出され、UCの癌組織ではCEACAM6とE.coli由来のLipopolysaccharideが同じ部位に発現していることを確認した。PDE4阻害剤より3次元培養変異KRAS陽性細胞塊の内腔のアポトーシスを誘導し、PDE4が癌化において重要な変異KRASシグナルであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織を用いた今回の検討で抽出されたClaudin 2、CEACAM6、PDE4などは、接着性侵襲性大腸菌の活動に関わっていることが分かった。接着性侵襲性大腸菌はCD患者の炎症が悪化した腸管の環境下に発現が増強する蛋白質である。また、PDE4はTNF やINF などの炎症性サイトカインを誘導するため、ポジティブフィードバック因子の可能性が示唆された。以上のことから、これらの発現はUC患者に対するColitic Associated Cancerの早期診断・治療など臨床応用への展開できることが期待される。

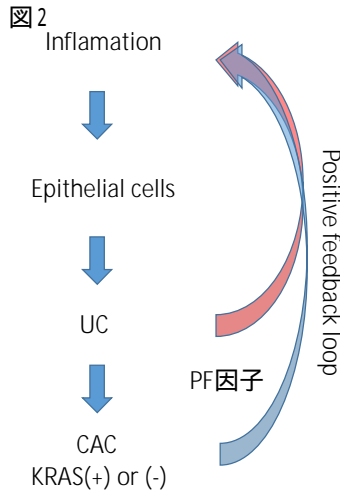
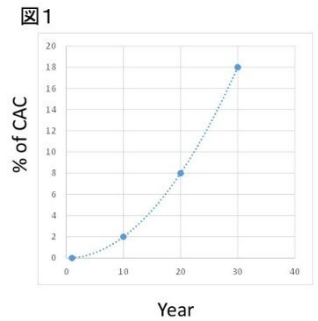
研究成果の概要(英文)：In order to select high-risk cases of cancer for patients with ulcerative colitis (UC), the expression of the cancer lesions in UC cancer-combined cases was higher than that of normal mucosa in the same cases and which was not increased in sporadic colorectal cancer patients. A cDNA microarray analysis was performed to search for those that did not exist. Claudin 2, CEACAM6, and PDE4 were extracted, and it was confirmed that CEACAM6 and E. coli-derived Lipopolysaccharide were expressed at the same site in UC cancer tissues. It was shown that PDE4 inhibitor induces apoptosis of the lumen of three-dimensional cultured mutant KRAS-positive cell mass, and that PDE4 is an important mutant KRAS signal in carcinogenesis.

研究分野：炎症性腸疾患の癌化

キーワード：潰瘍性大腸炎 癌化 ポジティブフィードバック因子 癌化ハイリスク症例の選別

## 1. 研究開始当初の背景

UC 患者数の推移を特定疾患医療受給者証交付件数からみると、平成 25 年度には 166,060 人が登録されており、毎年増加の一途を辿っている。UC における累積癌化率は上記のごとく 10 年で 2%、20 年で 8%、30 年で 18% と報告されており(図 1)、罹病期間が長いほど癌化のリスクは高くなると報告されている(Gut, 2001)。UC 患者に対する大腸癌サーベイランスの重要性は認識されており、その



効率化を目標に通常内視鏡検査に加え拡大内視鏡検査や遺伝子マーカーによる癌化ハイリスク症例の選別なども試みられているが、実臨床に導入される段階には至っておらず、臨床に直結した検査は未だ確立されていないのが現状である(kinugasa et al. 2016)。近年我々は、UC における Claudin-1 (CL-1)の発現のような変異 KRAS シグナルの増強や、変異 KRAS 陽性細胞株における phosphodiesterase-4 (PDE4) などの炎症性サイトカイン誘導因子の発現などを明らかにすることにより、UC と CAC に共通する炎症誘導性因子の存在が示唆された。そこで今回我々は、UC に発生する癌の診断・治療に有用な可能性のある因子を同定するために、UC、CAC 検体標本解析を中心に CAC 発症の PF 因子を明らかにするための基盤研究を行う。計画を進めていくうえで、申請者は次のような予備的な研究結果を得

ている。

1)潰瘍性大腸炎に発生した大腸癌では、CL-1 の発現は増強している:潰瘍性大腸炎の診断にて大腸全摘術を受けた 39 症例のうち大腸癌合併 6 例の癌合併病変の CL-1 発現を検討した。癌組織では正常粘膜に比べ明らかにその発現は増強し、かつ、KRAS 制御分子である  $\beta$ -catenin の強い発現は癌病変の細胞質や核に認められた。CL-1 は潰瘍性大腸炎の病態や形態に根本的な部分で関与し、その病変が癌化する過程での早い時期に関与している可能性が示唆された(kinugasa et al. 2010-1)。

2)UC の手術症例の解析 - 樹形モデルによる癌合併危険因子の検討 -:当科での UC 手術症例について樹形モデルを含めた解析を行ったところ、UC の罹病期間が 133 カ月を超えた場合は癌合併の疑いが強まり、白血球除去療法が癌合併である割合を減らすことより、炎症環境が CAC 進展に重要であることが示唆され、樹形モデルの結果は手術時期を決める一つの指標になりえる可能性が示唆された(kinugasa et al. 2010-2)。

3)変異 KRAS 陽性大腸がん細胞株では PDE4B の発現が上昇している。PDE4 は TNF や INF などの炎症性サイトカインを誘導する。PDE4 阻害剤や shRNA により 3 次元培養変異 KRAS 陽性細胞塊の内腔のアポトーシスを誘導することに成功し、PDE4 が癌化において重要な変異 KRAS シグナルであることが示唆された。実際臨床検体において PDE4 の高発現はステージや予後と相関しており(Tsunoda et al, 2012)、変異 KRAS シグナルの活性化が炎症促進に重要であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は潰瘍性大腸炎(UC)患者に対する癌化ハイリスク症例の選別のための 診断・治療に有用だと考えられる変異 KRAS 制御シグナルとオーバーラップする ポジティブフィードバック (PF)因子を同定することにより Colitic Associated Cancer (CAC)の早期診断・治療など臨床応用へと展開するための研究基盤を確立 することを目的とした。

### 3. 研究の方法

1) CAC が発生している UC 手術症例より、UC の部位と CAC 部、正常部の組織を同一患者より採取する。採取された組織はパラフィン包埋し、病理組織学的診断を行うと同時に、凍結保存し、種々の解析にもちいる(現在 10 例)

2) 凍結標本を用いて、mRNA,miRNA マイクロアレイ施行する。具体的には Affymetrix 社の、GeneChip,Human Exon 1.0 ST Array 及び miRNA Array を行い、各患者における Common PF 因子同定し、さらに患者間で共通する因子を PF 因子候補とする。

3) PF 因子候補の特異的抗体を用いて、正常部と UC 部および CAC 部より精製した蛋白を用いてウェスタンブロットを施行する。また同部位のパラフィン切片を用いた免疫染色も施行し、発現パターンを解析することにより PF 因子を同定する。

4) 申請者らの以前の研究では、HCT116 細胞と変異 KRAS のみを欠失したクローン HKe3 を用いて、3 次元浮遊培養法にシステムを構築した。mRNA 発現アレイを用いた解析にて 3 次元特異的な分子の存在のなかに PDE4 を含む免疫関連分子が多数存在することが判明した。丸底 96 ウェル非接着性プレート (Ultra-low attachment plate, Costar) を用い 3 次元浮遊培養を行い、細胞塊より total RNA を回収し、RNA-seq を施行して、新たな標的分子の探索を行う。RNA-seq を施行することにより、microRNA, non-coding RNA、選択的スプライシング等の RNA 情報を網羅的に取得できる。具体的には、イルミナ TruSeq RNA-seq preparation kit によるライブラリー作製、及び、HiSeq2500 によるシーケンス解析を行う。得られたシーケンスデータをリファレンス遺伝子配列へマッピングし、サンプル間 (HKe3-wtKRAS vs HKe3-mtKRAS) での比較解析を行う。得られた情報は検体で得られた UC - PF 因子、CAC-PF 因子と比較解析し、共通する因子は変異 KRAS 制御 PF 因子として解析する。

### 4. 研究成果

今回の科研費研究にて、手術標本から cDNA マイクロアレイ解析を行った。sporadic 大腸癌患者の切除標本から 正常大腸粘膜組織、大腸癌組織、癒合併潰瘍性 大腸炎患者の切除標本から 肉眼的な正常粘膜組織、炎症部位組織、癌組織 を用いた。と比較してにて発現が増強しているが、にくらべ で発現が増強していない物質を検討したところ、Claudin 2、Carcinoembryonic Antigen Related Cell Adhesion Molecule 6 (CEACAM6)、Phosphodiesterase 4 (PDE4) などが抽出された。これらは、接着性侵襲性大腸菌の活動に関わり CD の炎症悪化した腸管の環境下に発現が増強する蛋白質である。申請者らは、UC 上記 の組織において、CEACAM6 と E.coli 由来の Lipopolysaccharide(LPS)が同じ部位に発現していることを確認した。(図 4)

図3 研究方法概要

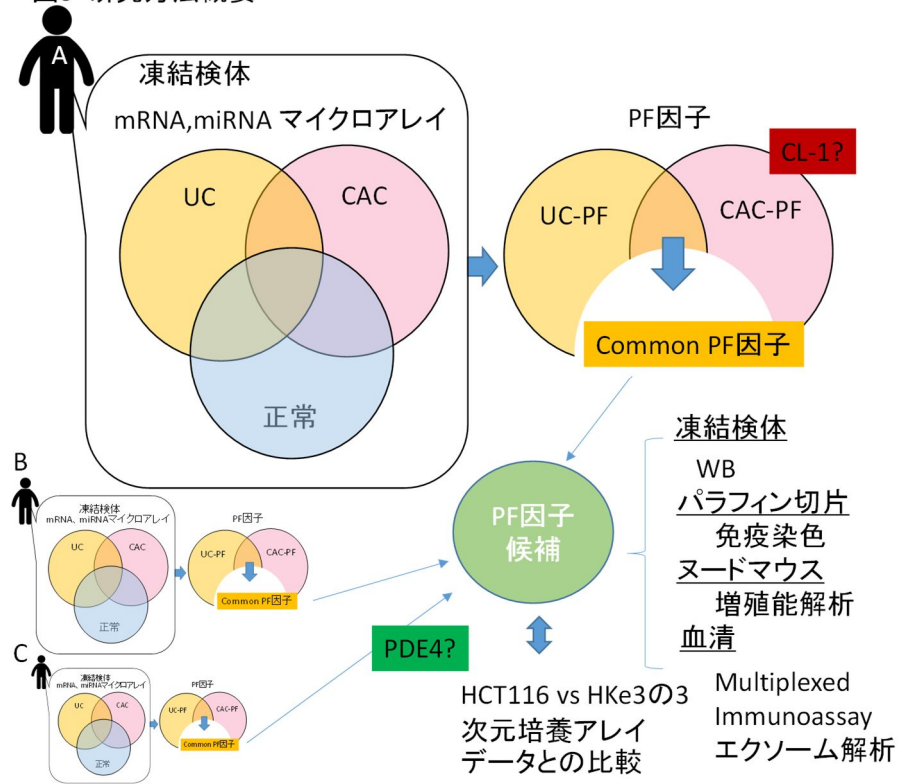
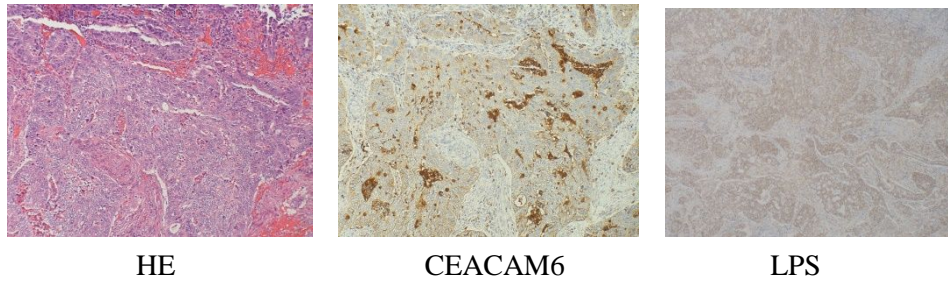


図 4



PDE4 は TNF や INF などの炎症性サイトカインを誘導する。PDE4 阻害剤や shRNA により 3 次元培養変異 KRAS 陽性細胞塊の内腔のアポトーシスを誘導し、PDE4 が癌化において重要な変異 KRAS シグナルであることが示され、PDE4 は TNF $\alpha$  や INF $\gamma$  などの炎症性サイトカインを誘導するため、ポジティブフィードバック因子の可能性が示唆された。臨床検体において PDE4 の高発現はステージや予後と関連しており、変異 KRAS シグナルの活性化が炎症促進に重要であることが示唆された。PDE4 が癌化において重要な変異 KRAS シグナルであることが示された。

以上のことから、これらの発現は UC 患者に対する CAC の早期診断・治療など臨床応用への展開できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 衣笠哲史	4. 巻 81
2. 論文標題 潰瘍性大腸炎における癌化機序に対する診断・治療の研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 久留米医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 衣笠哲史
2. 発表標題 外科医減少からみた働き方改革の提言
3. 学会等名 第119回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 衣笠哲史、溝部智亮、大地貴史、吉田直裕、四方田隆任、仕垣隆浩、緒方傑、主藤朝也、藤田文彦、赤木由人
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎患者における術後QOLと術後内視鏡検査の意義
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安土健一、衣笠哲史、大地貴史、溝部智亮、藤田文彦、赤木由人
2. 発表標題 クローン病に癌を合併した3例
3. 学会等名 第44回日本大腸肛門病学会 九州地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 衣笠哲史、大地貴史、溝部智亮、緒方傑、仕垣隆浩、四方田隆任、吉田直裕、主藤朝也、山口圭三、藤田文彦、光山慶一、赤木由人
2. 発表標題 高齢者潰瘍性大腸炎患者の手術適応と術後QOLの検討
3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 衣笠哲史、山崎博、石原潤、水落建輝、溝口充志、秋葉純、田中美穂、南小百合、高木孝実、鳥越優子、石橋幹雄、多賀百合、今井徹朗、光山慶一、赤木由人
2. 発表標題 IBD患者に対するTotal careを目的とした多職種サポートチームの活動
3. 学会等名 第10回日本炎症性腸疾患学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 衣笠哲史
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎に対する大腸全摘術の変遷
3. 学会等名 第38回福岡大腸手術手技研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角田俊之、西憲祐、石倉周平、梅林雅代、森崎隆、猪爪隆史、衣笠哲史、青木光希子、二村聡、スウェイン アンソニー、吉田陽一郎、長谷川傑、鍋島一樹、坂田俊文、白澤専二
2. 発表標題 変異KRASはTNK細胞の腫瘍内浸潤とCD155依存的な免疫逃避を誘導する
3. 学会等名 第23回バイオ治療研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉原利枝、衣笠哲史、藤田文彦、赤木由人
2. 発表標題 急性腹症の治療後、クローン病と診断された1例
3. 学会等名 第16回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	角田 俊之  (TSUNODA TOSHIYUKI)  (70444817)	福岡大学・医学部・准教授    (37111)	