

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07026

研究課題名(和文)炎症性腸疾患関連腫瘍の高悪性度に関わる炎症バイオマーカーOLMF4の役割の解明

研究課題名(英文)The role of inflammatory biomarker OLMF4 to the malignancy of inflammatory bowel disease related tumors

研究代表者

吉田 功 (Yoshida, Tsutomu)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90316943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患関連腫瘍が低分化で予後不良である一因を明らかにするため、特異的バイオマーカーであるOlfactomedin4(OLMF4)の関与を検索した。OLMF4はfrizzled7と結合してWNT/ β -cateninを抑制する可能性が示唆された。OLMF4はexosome分泌され、活性化型 β -cateninの発現低下、上皮間葉連関(EMT)マーカーの発現低下をきたすこと、UC関連腫瘍炎症巣におけるOLMF4発現が腫瘍化に従って低下し、腫瘍悪性度との因果関係が示唆された。exosomeを介したOLMF4がWNTを介してEMTを抑制することがUC関連腫瘍の悪性度特性に関与す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

潰瘍性大腸炎及びクローン病は若年発症の難病炎症性腸疾患(IBD)で、患者数は増加している。長期罹患により悪性腫瘍を多発発症すると共に、通常型大腸癌に比して低分化で悪性度が高いことが知られているが、その機序は明らかになっていない。今回の研究成果は、申請者がこれまでに明らかにしてきたIBD特異的バイオマーカーであるOLMF4(olfactomedin-4)が、IBD関連腫瘍の高悪性度特性に関わっていることを明らかにするもので、特にexosome型分泌が関与することを明らかにしたことは学術的にも新機軸である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the poorer differentiation and prognosis of inflammatory bowel disease related tumor, we analyzed the association of biomarker OLMF4. OLMF4 binds frizzled-7, which would lead the suppression of WNT/ β -catenin pathway. OLMF4 was secreted in exosome, and exosomal OLMF4 inhibited the expression of activated form of β -catenin and EMT markers. Expression of OLMF4 in inflammatory foci of UC-related tumors was reduce along with the tumorigenesis, which suggests the relationship with the malignancy of tumors. It is possible that suppression of EMT by OLMF4 secreted in exosome would be the cause of the malignant potential of IBD related tumor.

研究分野：人体病理学

キーワード：炎症性腸疾患 潰瘍性大腸炎 悪性腫瘍 Olfactomedin-4 OLMF4

1. 研究開始当初の背景

(1) 潰瘍性大腸炎の炎症バイオマーカーとしての OLFM4 の発見と解析

難治性疾患である炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)の原因同定及び悪性腫瘍併発リスクの軽減のため、申請者らは潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)で特異的発現上昇する olfactomedin 4(OLFM4)を同定し、UC における炎症バイオマーカーとしての役割を明らかにしてきた。IBD の一つであるクローン病(Crohn disease; CD)でも OLFM4 は高発現していたが、本年度迄の研究課題推進(平成27~29年度基盤研究C)により、UC における OLFM4 発現は NF- κ B を介して腸粘膜表層で発現するのに対して、CD では AP-1 を介した、陰窩深部増殖帯で発現が主体の異なる発現経路が明らかになった(図1;投稿中、2015年第104回日本病理学会総会発表)。またこれに基づいた UC, CD 生検材料を用いた解析で、活動性炎症を示す大腸生検材料で、「OLFM4 発現及びリン酸化 NF- κ B 発現 15%以上」は UC を CD から感度 93.6%、特異度 82.8%で判別し得た。OLFM4 は正常腸上皮細胞陰窩増殖帯における発現と stemness との関連が報告されており(VanDussen, *et al*, *Development* 2012)、AP-1 系依存性 OLFM4 発現との関連が示唆される。一方、OLFM4 欠損はマウスで APC 依存性発癌を促進し、OLFM4 は細胞外に分泌され Frizzled7 に結合・Wnt 系を阻害することにより、腫瘍発生を抑制する可能性が報告されている。

(2) 炎症性腸疾患関連癌の特異性

UC は長期罹患で高頻度に関連腫瘍(UC-associated carcinoma; UCAC)発生することは広く知られており(Kim, *et al*, *World J Gastroenterol*, 2014)、その組織型にも通常型孤発細胞癌(sporadic colorectal cancer; SCRC)と比して低分化・粘液産生が目立ち(Mikami, *et al. Diag Pathol*, 2011, Watanabe, *et al. Inflamm Bowel Dis*, 2011)、ひいては予後不良な結果をきたすと考えられる(Mikami, *et al. Diag Pathol*, 2011, Higashi, *et al. Anticancer Res* 2011)。CD も多発性の関連腫瘍を併発し、UCAC 同様に低分化あるいは浸潤性の高い症例を申請者は経験してきている。UCAC が SCRC に比して特異的な形態を示し、悪性度が高いことは慢性炎症を背景とした発癌の発症機構と併せて学術的興味を大いに駆り立てられるとともに IBD 治療の観点から医学的課題として捉えられる。

2. 研究の目的

上記、研究背景により、「IBD を背景とした慢性腸疾患からの発癌がなぜ悪性度が高いのか?」「UCAC の発症及び高悪性度は OLFM4 との因果関係があるか?」の問いが導かれる。本研究では、これを解明すべく、「炎症性腸疾患関連癌の病理学的特異性を潰瘍性大腸炎の炎症バイオマーカー OLFM4 機能の観点から分子病理学的に探索し、その発生機序と高悪性度機序を解明する」ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) OLFM4 の exosome 型分泌と EMT 抑制機能

UCAC 由来細胞株(UCCA24, UCCA25, UCCA3)及び SCRC 由来細胞株(HCT116)等を用いた *in vitro* 解析

- Western blotting, Dot blot, 免疫沈降法
- 細胞増殖能解析、遊走能解析(scratch assay)
- Exosome回収(Qiagen, Exo Easy Maxi Kit)とexosome処理

(2) UCAC 腫瘍巣及び非腫瘍部炎症巣における *in situ* 解析

- 免疫組織化学: OLFM4, beta-catenin, E-cadherin, Slug

(3) 潰瘍性大腸炎炎症活動性評価と OLFM4 発現

- Matts grade, Riley grade, Geboes score

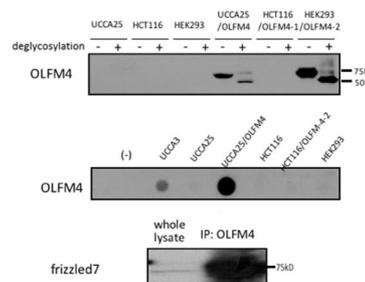


図1 培養上清中の OLFM4 発現. 上: western blot, 中: dot blot, 下: 免疫沈降

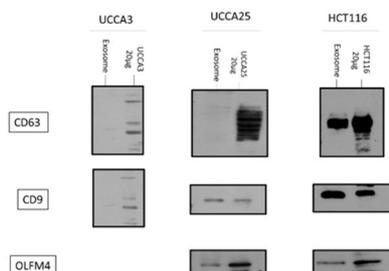


図2 exosome 中の OLFM4. blot, 下: 免疫沈降

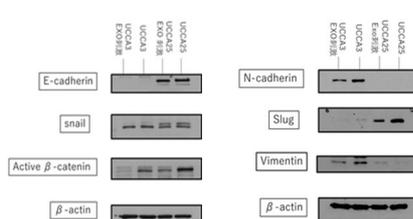


図3 UCCA25 由来 exosomes 処理後の UCCA3, UCCA25 における

4. 研究成果

我々はexosome型の分泌機構の可能性を培養細胞を用いたexosome内のOLFM4を同定することで示すことができた。UC関連大腸癌細胞株における培養上清中にOLFM4が分泌される(図1, 上, 中)とともに、免疫沈降法でOLFM4はfrizzled-7と結合していることが明らかとなった(図1, 下)。また、UC関連癌細胞株培養上清から回収したexosome中にOLFM4を確認した(図2, CD63, CD9はexosomeマーカー)。回収したexosomeを別の細胞株に処理すると、活性化型β-cateninの発現低下、上皮間葉連関(EMT)マーカーの発現低下をきたすことを確認した(図3)。さらに、exosome処理により、細胞増殖(図4)及び遊走能(図5)も低下した。

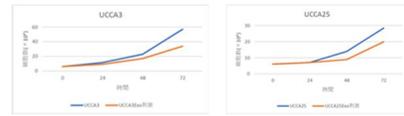


図4 exosomes 処理に伴う細胞増殖

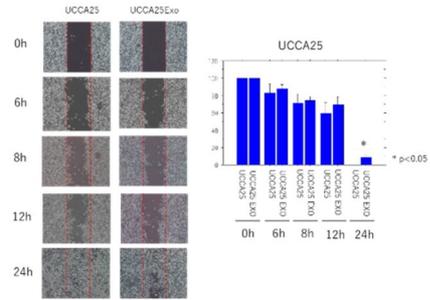


図5 exosomes 処理に伴う遊走能

免疫組織化学的解析によって、孤発性大腸癌(sCRC)におけるOLFM4発現とβ-catenin核内移行は逆相関することが示され(図6, 表1)、簇出も逆相関していた(図7)。UC関連腫瘍では炎症巣におけるOLFM4発現が腫瘍化に従って低下しており、UC関連腫瘍の悪性度との因果関係が示唆された。UC関連腫瘍先進部ではOLFM4発現低下とβ-catenin核内移行・E-cadherin発現低下が相関し、腫瘍先進部簇出とEMTマーカーの正相関、OLFM4発現との逆相関が認められた(図8、9)。生検炎症巣での評価では、OLFM4発現は古典的なMattsスコアと相関するが、Geboesスコアでは低スコア領域と特に相関することが明らかとなった(図10~図12)。

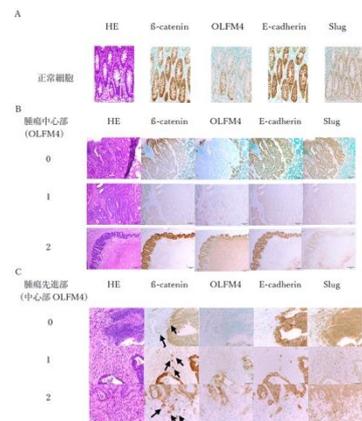


図6 sCRCにおけるOLFM4と各マーカー

	β-catenin 核内移行	OLFM4	Slug	E-Cadherin 発現減少
正常細胞	0%	0 (100%)	0%	0%
腫瘍先進部	100%	6%	85%	99%
腫瘍中心部	0%	0: 32% 1: 24% 2: 44%	0%	0%

表1 大腸癌各スポットにおける評価

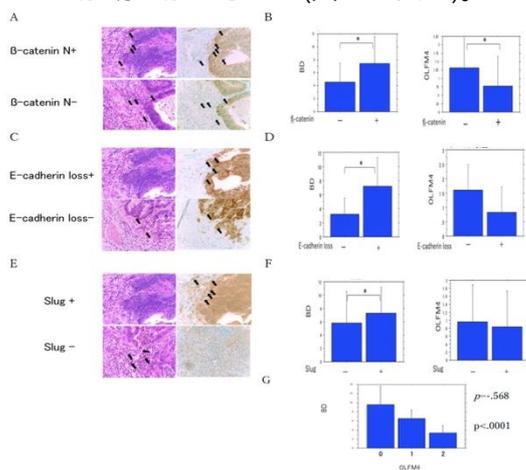


図7 大腸癌各スポットにおける評価

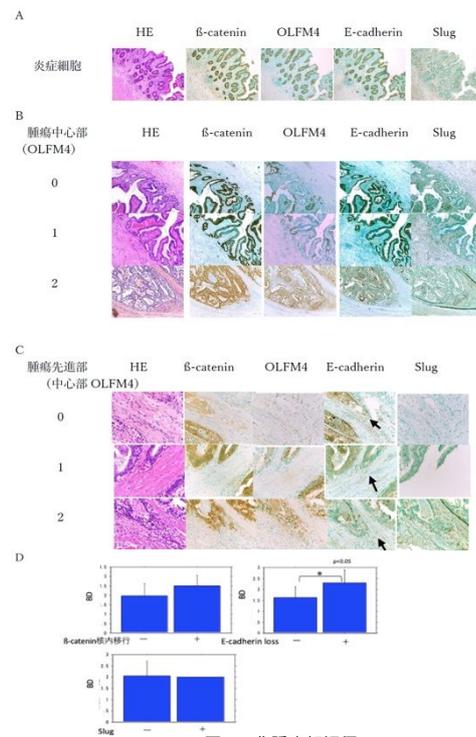


図8 非腫瘍部評価

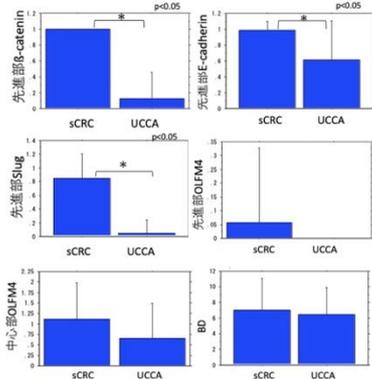
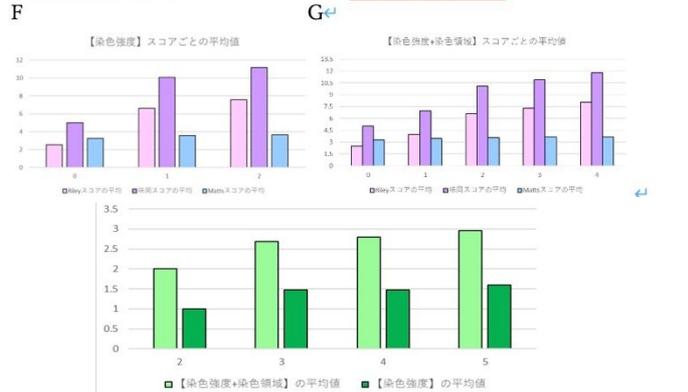
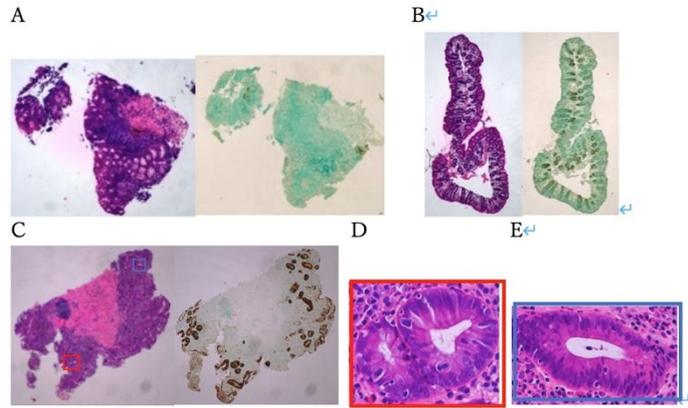


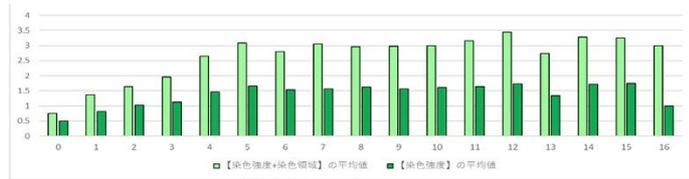
図9 孤発性大腸癌とUC 関連腫瘍

以上から、exosomeを介した OLMF4がWNTを介したEMTを抑制していることが考えられ、UC関連腫瘍の悪性度特性に關与する可能性があると共に、UCの異形成を含む早期病変の評価に寄与する可能性があると示された。



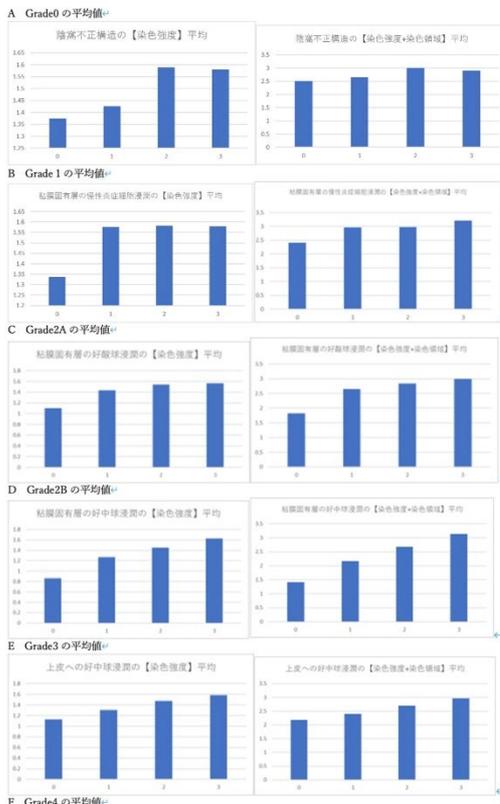
Matts スコア	ρ 値	同順位補正後の p 値
【染色強度】	.249	.0784
【染色強度+染色領域】	.202	.0229

図10 UC 炎症巣における Matts スコアと OLFM4 発現



Riley スコア	ρ 値	同順位補正後の p 値
【染色強度】	.341	<.0001
【染色強度+染色領域】	.377	<.0001

図11 Riley score と OLFM4 発現



Geboesスコア	ρ 値	同順位補正後の p 値
(A) 除高不正構造 【染色強度】	.250	.0028
【染色強度+染色領域】	.197	.0013
(B) 粘膜固有層の慢性炎症細胞浸潤 【染色強度】	.314	<.0001
【染色強度+染色領域】	.308	<.0001
(C) 粘膜固有層の好酸球浸潤 【染色強度】	.271	.0017
【染色強度+染色領域】	.248	<.0001
(D) 粘膜固有層の好中球浸潤 【染色強度】	.397	<.0001
【染色強度+染色領域】	.444	<.0001
(E) 上皮への好中球浸潤 【染色強度】	.322	<.0001
【染色強度+染色領域】	.279	<.0001
(F) 除高破壊 【染色強度】	.237	.1769
【染色強度+染色領域】	.166	.2011
(G) びらん・潰瘍 【染色強度】	.396	.8028
【染色強度+染色領域】	.319	.9693

図12 Geboes score と OLFM4 発現

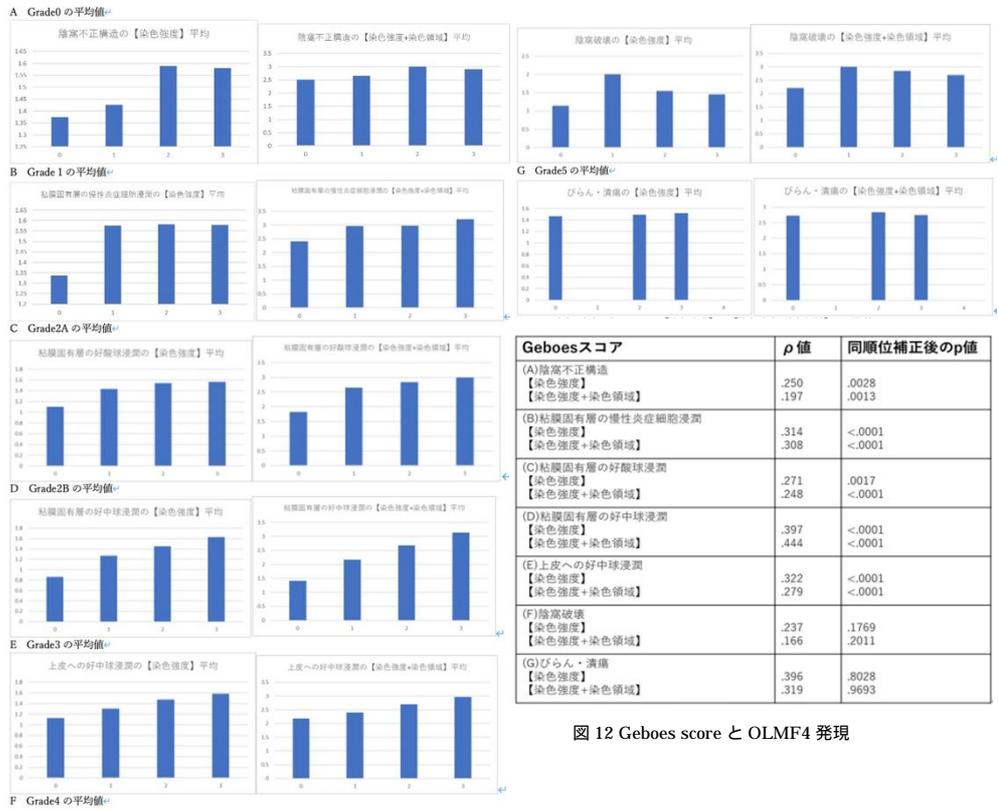


図 12 Geboes score と OLMF4 発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakada Norihiro, Mikami Tetuo, Horie Kayo, Nagashio Ryo, Sakurai Yasutaka, Sanoyama Itaru, Yoshida Tsutomu, Sada Miwa, Kobayashi Kiyonori, Sato Yuichi, Okayasu Isao, Murakumo Yoshiki	4. 巻 70
2. 論文標題 Expression of CA2 and CA9 carbonic anhydrases in ulcerative colitis and ulcerative colitis associated colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 523 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12949	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 Hiroshima K, Yoshizawa A, Takenaka A, Haba R, Kawahara K, Minami Y, Kakinuma H, Shibuki Y, Miyake Si, Kajio K, Miyamoto K, Nagatomo M, Nishimura S, Mano Mi, Matsubayashi J, Motoi N, Nagao T, Nakatsuka S, Yoshida T, Satoh Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytology Reporting System for Lung Cancer from the Japan Lung Cancer Society and Japanese Society of Clinical Cytology: An Interobserver Reproducibility Study and Risk of Malignancy Evaluation on Cytology Specimens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Cytologica	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000506431	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 Yukitoshi Satoh, Yukiko Matsuo, Tatsuru Kuba, Kazuya Yamashita, Mariko Sawano, Shusaku Tozaka, Hirotsugu Yamazaki, Dai Sonoda, Masashi Mikubo, Nasahiro Naito, Yoshio Matsui, Kazu Shiomi, Tsutomu Yoshida, Yoshiki Murakumo	4. 巻 -
2. 論文標題 EGFR mutation genotyping and ALK status determination in liquid-based cytology samples of non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virshows Archiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-019-02692-9	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 Chikatoshi Katada, Shouko Komori, Tsutomu Yoshida, Shogo Kawakami, Akinori Watanabe, Kenji Ishido, Mizutomo Azuma, Takuya Wada, Kei Hosoda, Keishi Yamashita, Naoki Hiki, Satoshi Tanabe, Hiromichi Ishiyama, Wasaburo Koizumi.	4. 巻 47
2. 論文標題 A retrospective study of definitive chemoradiotherapy in patients with resectable small cell neuroendocrine carcinoma of the esophagus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Esophagus	6. 最初と最後の頁 716 - 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10388-019-00686-9.	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 Mikubo Masashi, Maruyama Raito, Kakinuma Hirokuni, Yoshida Tsutomu, Satoh Yukitoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Ciliated muconodular papillary tumors of the lung: Cytologic features and diagnostic pitfalls in intraoperative examinations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diagnostic Cytopathology	6. 最初と最後の頁 716 ~ 719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dc.24169	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 Okuwaki Kosuke, Masutani Hironori, Imaizumi Hiroshi, Yoshida Tsutomu, Kida Mitsuhiro, Iwai Tomohisa, Yamauchi Hiroshi, Tadehara Masayoshi, Adachi Kai, Watanabe Masafumi, Kurosu Takahiro, Koizumi Wasaburo	4. 巻 19
2. 論文標題 Analysis of BRCAness with multiplex ligation-dependent probe amplification using formalin-fixed and paraffin-embedded pancreatic ductal adenocarcinoma tissue obtained via endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 419 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2019.02.010	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 Okayasu Isao, Ichinoe Masaaki, Yoshida Tsutomu	4. 巻 1
2. 論文標題 Proposal for an Organ-Specific Chronic Inflammation - Remodeling - Carcinoma Sequence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastrointestinal Disorders	6. 最初と最後の頁 341 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/gidisord1030028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Betto Tomohiro, Amano Hideki, Ito Yoshiya, Eshima Koji, Yoshida Tsutomu, Matsui Yoshio, Yamane Sakiko, Inoue Tomoyoshi, Otaka Fumisato, Kobayashi Kiyonori, Koizumi Wasaburo, Shibuya Masabumi, Majima Masataka	4. 巻 111
2. 論文標題 Vascular endothelial growth factor receptor 1 tyrosine kinase signaling facilitates healing of DSS-induced colitis by accumulation of Tregs in ulcer area	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 131 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2018.12.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo Yukiko, Yoshida Tsutomu, Yamashita Kazuya, Satoh Yukitoshi	4. 巻 126
2. 論文標題 Reducing DNA damage by formaldehyde in liquid based cytology preservation solutions to enable the molecular testing of lung cancer specimens	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Cytopathology	6. 最初と最後の頁 1011 ~ 1021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cncy.22069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo Yukiko, Shiomi Kazu, Sonoda Dai, Mikubo Masashi, Naito Masahito, Matsui Yoshio, Yoshida Tsutomu, Satoh Yukitoshi	4. 巻 144
2. 論文標題 Molecular alterations in a new cell line (KU-Lu-MPPt3) established from a human lung adenocarcinoma with a micropapillary pattern	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 75 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-017-2541-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horie Kayo, Mikami Tetuo, Yoshida Tsutomu, Sato Yuichi, Okayasu Isao	4. 巻 15
2. 論文標題 Peroxiredoxin 1 expression in active ulcerative colitis mucosa identified by proteome analysis and involvement of thioredoxin based on immunohistochemistry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2364 - 2372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.7549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 功、小倉豪、田辺美樹子、林大久生、大林千穂、東瑞智、國崎主税、赤澤陽一、小澤壯治、松本壮平、鈴木孝良、美登路昭、福永哲、清水晶子、藤本豪、八尾隆史
2. 発表標題 日本人胃癌におけるPD-L1発現、MSI status及びEBV陽性評価：多施設共同後方視的観察研究
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣島健三、佐藤之俊、吉田 功、柿沼廣邦、長尾俊孝、松林純、三宅真司、中塚伸一、眞能正幸、竹中明美、元井紀子、澁木康雄、南優子、吉澤明彦、羽場礼次、河原邦光
2. 発表標題 JSCC-JLCSによる新たな判定基準の提案.
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会春期大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 慧、吉田 功、橋村美紀、三枝 信
2. 発表標題 炎症性バイオマーカーOLF4からみた炎症性腸疾患関連腫瘍の特異性の解明.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 慧、吉田 功、橋村美紀、三枝 信.
2. 発表標題 Olfactomedin-4の炎症性腸疾患関連腫瘍発生における役割.
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学医学部病理学（三枝単位）
<https://www.kitasato-u.ac.jp/med/research/departments/medicine/byouri-s.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------