

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08457

研究課題名(和文)食道扁平上皮特異的な細胞増殖・分化に関わる新規分子の機能解析

研究課題名(英文)Molecular functions of a novel gene exclusively expressed in esophageal basal cells

研究代表者

河村 由紀 (Kawamura, Yuki I.)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：10392391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃や腸では幹細胞マーカーとしてLgr5、Bmi1等が同定されているが、食道では特異的な分子マーカーは未同定であり、幹細胞の詳細も明らかにされていない。本研究では、食道の幹細胞に相当すると考えられている基底細胞に限局して発現する分子群のうち、グルタチオンS-転移酵素 クラスに属するGSTO2に着目した。これまでヒト食道基底細胞は増殖マーカーKi67陽性の均一な集団と考えられていたが、GSTO2発現細胞はKi67陰性を示すことから、ヘテロな集団であることが明らかとなった。機能的にもGSTO2は上皮細胞の増殖と分化を抑制することから、幹細胞において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管粘膜は、幹細胞から上皮細胞が新しく供給されることで恒常性が保たれている。本研究により、食道にも胃や腸のように、細胞回転速度の異なるヘテロな細胞集団が存在することが明らかとなった。より細胞回転の遅い、所謂 "dormant" 幹細胞集団を見分けるマーカーの同定は、食道幹細胞研究に対する学術的貢献度が高いと考えられる。幹細胞の理解は、組織傷害に対する幹細胞を用いた治療法の開発にも繋がると期待され、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：No useful markers to identify stem cells in esophageal mucosa have been reported, whereas Lgr5 and Bmi1 were well-known as stem cell markers of stomach and intestine. In addition, previous reports revealed that all esophageal basal cells divide at a similar rate, suggesting that there are no slow-cycling stem cells in murine esophagus. In this study, we examined molecular functions of glutathione S-transferase omega 2 (GSTO2), because its expression was confined to basal cells in human esophageal mucosa. We found that basal cells in the human esophagus comprise heterogeneous cell populations, such as proliferative cell marker Ki67+ and Ki67- cells, with the latter expressing GSTO2. We also illustrated the function of GSTO2 in regulating cell growth as well as differentiation. These results suggest that GSTO2 plays an important role in maintaining the homeostasis of esophageal epithelia along with its significance as a novel marker for esophageal stem cells.

研究分野：消化器病態生理学

キーワード：食道扁平上皮 / 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 消化管は食物や細菌などによる侵襲を常に受けており、その内腔を覆う粘膜では細胞回転による上皮細胞の更新が恒常的に行われている。細胞回転においては「組織幹細胞」をヒエラルキーの頂点とし、増殖細胞から供給された多数の細胞が種々の機能細胞へと分化することで、臓器としての構造および機能が維持されている。胃・腸においては、Lgr5、Bmi1等の組織幹細胞特異的に発現する分子マーカーが同定されており、これらのマーカーを発現する単一の細胞から粘膜を構成する全ての分化細胞が生じることが既に示されている。また、組織幹細胞の中にはヒエラルキーがあり、殆ど分裂をしない"dormant"幹細胞、一定の頻度で分裂して transient amplifying cells と呼ばれる増殖細胞を供給する"active"幹細胞等が存在すること、"dormant"幹細胞と"active"幹細胞は分化系譜において単純な上下関係にあるのではなく、互いに変換可能であり、炎症や粘膜傷害からの再生の際には、増殖細胞や分化細胞からも幹細胞への脱分化が起こることが示されている。消化管粘膜の構造は食道と胃の接合部を境界として著しく異なり、食道内腔は非角化型重層扁平上皮に覆われている。基底層に存在する基底細胞が食道幹細胞として機能すると考えられているが、食道にも胃や腸で同定されているような所謂"dormant"幹細胞が存在するのか、"dormant"幹細胞-"active"幹細胞-transient amplifying cells のような幹細胞ヒエラルキー構造が存在するのかについては解明されていない。
- (2) 食道扁平上皮癌の発症には喫煙・飲酒がリスク因子として関与しているが、加齢性変化を含めたこれらのリスク因子は遺伝子変異に加えて、DNAメチル化等のエピジェネティック修飾変化を惹起する。恒常的細胞回転により数日で全ての上皮細胞が入れ替わる消化管粘膜においては、これらのジェネティック・エピジェネティックな異常は幹細胞/増殖細胞へ蓄積され、発癌に至ると考えられており、食道扁平上皮癌の発癌・進行のメカニズム解明においても、組織幹細胞の同定並びに生理学的機能の理解が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、食道幹細胞が存在する基底層の細胞に局限して発現する分子に着目して、食道幹細胞のマーカーとしての有用性を検証すると共に、これらの分子が幹細胞機能に関与しているかについて詳細な分子機能解明を試みる。

3. 研究の方法

- (1) これまでに食道扁平上皮癌手術検体を対象として、網羅的遺伝子発現解析およびDNAメチル化統合解析を施行して見出した、DNAメチル化異常を受ける遺伝子のうち、ヒト基底細胞に局限して発現する分子を対象として組織学的検討を行い、発現細胞集団の詳細を明らかにする。
- (2) ヒト基底細胞に局限して発現する分子をヒト食道扁平上皮癌細胞株に強制発現させたトランスフェクタントを作製し、細胞増殖や分化など幹細胞機能に関わる現象にどの様に関与しているか、分子メカニズムを明らかにする。
- (3) 当該分子を発現する細胞が病的状態でどのような影響を受けるか、逆流食道炎モデルや、高脂肪食摂取による肥満マウスモデル等を用いて検討する。

4. 研究成果

- (1) これまでに食道扁平上皮癌手術検体を対象として、網羅的遺伝子発現解析およびDNAメチル化統合解析を施行して見出した、DNAメチル化異常を受ける遺伝子のうち、ヒト基底細胞に局限して発現するグルタチオンS-転移酵素クラスに属するGSTO2に着目した。組織学的検討により、GSTO2陽性細胞は増殖マーカーであるKi67を発現しておらず、Ki67陽性基底細胞の下層に位置することを見出した。すなわち、ヒト食道基底細胞はKi67陽性GSTO2陰性の増殖細胞と、Ki67陰性GSTO2陽性の所謂dormant幹細胞が混在する、ヘテロな集団であることを明らかにした。
- (2) ヒト扁平上皮細胞株KYSE30並びにKYSE70細胞株にGSTO2を強制発現させたトランスフェクタントを作製し、細胞機能に及ぼす影響を評価した。GSTO2発現は*in vitro*での細胞増殖能、コロニーフォーメーション能、*in vivo*での造腫瘍能・増殖能を有意に抑制した。加

えて、GSTO2 発現は上皮細胞分化マーカーである E-カドヘリンの発現を抑制した。GSTO2 が E-カドヘリン発現を制御する分子メカニズムとして、mesenchymal-epithelial transformation (EMT)を誘導する Snail や Slug を介して E-カドヘリンの転写を抑制しているのではなく、E-カドヘリンの裏打ちタンパク質である β -カテニンの発現を p38 リン酸化を介して post-transcriptional に抑制することで、E-カドヘリンの膜への局在を制御していることが明らかになった。さらに組織学的検討により、ヒト食道組織においても GSTO2 と E-カドヘリン/ β -カテニン発現は逆相関の関係にあることを確認した。以上より、GSTO2 が幹細胞機能維持に重要な上皮細胞の分化を抑制するメカニズムとして、p38 リン酸化を介した post-transcriptional な β -カテニン制御機構を明らかにした。

- (3) 正常食道粘膜において GSTO2 は、Ki67 増殖マーカー陽性基底細胞の直下に位置する、Ki67 陰性の基底細胞に限局して発現するが、高脂肪食摂餌肥満マウスモデルを用いた検討により、食道-胃接合部に出現する異形成上皮において GSTO2 陽性細胞が増加することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kataoka, A, Yamada K, Hagiwara T, Terayama M, Sugimoto T, Nohara K, Igari T, Yokoi C, Kawamura YI.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Expression status of serine protease 27: A prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma treated with preoperative chemotherapy/chemoradiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09550-y	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 Kozono T, Sato H, Okumura W, Jogano C, Tamura-Nakano M, Kawamura YI, Rohrer J, Tonozuka, T, Nishikawa A.	4. 巻 11
2. 論文標題 The N-terminal region of Jaw1 has a role to inhibit the formation of organized smooth endoplasmic reticulum as an intrinsically disordered region	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80258-5	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 該当する
1. 著者名 Terayama M, Yamada K, Hagiwara T, Inazuka F, Sezaki T, Igari T, Yokoi C, Nohara K, Soma D, Dohi T, Kawamura YI.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Glutathione S-transferase Omega 2 Regulates Cell Growth and the Expression of E-cadherin via Post-Transcriptional Downregulation of -Catenin in Human Esophageal Squamous Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgz189	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 Sumiya Ryusuke, Terayama Masayoshi, Hagiwara Teruki, Nakata Kazuaki, Sekihara Keigo, Nagasaka Satoshi, Miyazaki Hideki, Igari Toru, Yamada Kazuhiko, Kawamura Yuki I.	4. 巻 113
2. 論文標題 Loss of GSTO2 contributes to cell growth and mitochondria function via the p38 signaling in lung squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 195 ~ 204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/CAS.15189	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Terayama M, Yamada K, Hagiwara T, Dohi T, Kokudo N, Kawamura YI.
2. 発表標題 Glutathione S-transferase omega 2 (GSTO2) suppresses cell growth and membrane localization of E-cadherin via p38MAPK signaling pathway in human esophageal squamous cells
3. 学会等名 Digestive Disease Week Annual Meeting (米国消化器病週間学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sumiya R, Terayama M, Hagiwara T, Sekihara K, Nagasaka S, Yamada K, Kokudo N, Kawamura YI.
2. 発表標題 Glutathione S-transferase omega 2 (GSTO2) is a novel tumor suppressor gene of human lung squamous cell carcinoma
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (米国癌学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺山 仁祥、山田 和彦、國土 典宏、河村 由紀.
2. 発表標題 食道扁平上皮癌における新規癌抑制遺伝子GSTO2は細胞内代謝を制御することで増殖を制御する
3. 学会等名 日本癌学会總會
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Terayama M, Yamada K, Hagiwara T, Inazuka F, Dohi T, Kokudo N, Kawamura YI.
2. 発表標題 The characterization of the function of glutathione S-transferase omega 2 (GSTO2) indicated the presence of putative quiescent stem cells in human esophagus
3. 学会等名 Digestive Disease Week Annual Meeting (米国消化器病週間学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koda H, Yamada K, Terayama M, Sumiya R, Nohara K, Enomoto N, Kataoka A, Mita H, Takemura N, Kiyomatsu T, Kokudo N, Kawamura YI.
2. 発表標題 E-cadherin expression correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma
3. 学会等名 The Annual Meeting of the European Society for Diseases of the Esophagus (欧州食道会議) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺山 仁祥、山田 和彦、國土 典宏、河村 由紀.
2. 発表標題 食道扁平上皮癌における新規癌抑制遺伝子GST02はE-カドヘリンの発現を抑制する
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住谷 龍輔、寺山 仁祥、山田 和彦、國土 典宏、河村 由紀.
2. 発表標題 Glutathione S-Transferase omega 2 (GST02) regulates cell growth and mitochondrial oxidative phosphorylation in lung squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sumiya R, Hagiwara T, Nagasaka S, Kawamura YI.
2. 発表標題 DNA hypermethylation and silencing of glutathione S-transferase omega 2 (GST02) in non-small cell lung cancer.
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (APSR) (国際学会)
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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