

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09018

研究課題名（和文）食道胃接合部癌発癌におけるゲノムワイドなエピジェネティック異常の網羅的解析

研究課題名（英文）Analysis of the genome wide epigenetic aberration in the esophagogastric junction cancer carcinogenesis

研究代表者

斉藤 正昭 (Saito, Masaaki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00382911

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）：本研究では、Barrett食道腺癌の発癌過程で、胃酸・胆汁酸の曝露による慢性炎症がエピゲノム異常の一つである脱メチル化異常を引き起こし、染色体不安定性を誘導するという仮説を設定した。Barrett食道癌の患者では腺癌部が背景粘膜よりも有意にSatellite（SAT）の脱メチル化レベルが上昇していることが明らかとなった。また、酸および胆汁酸曝露による染色体不安定性の誘導について検討したところ、SATの発現亢進を認めたBarrett食道細胞株において染色体不安定性が認められた。以上から、酸および胆汁酸の曝露はBarrett食道腺癌の発癌過程に関与する可能性があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胃酸および胆汁酸への曝露が、Barrett上皮細胞株においてセントロメア領域でのDNA脱メチル化を促進し、染色体不安定性を引き起こすことを初めて報告した。本研究は、バレット食道に由来する食道胃接合部癌の発生メカニズムに解明するうえで重要と考えられる。また、セントロメア領域でのDNA脱メチル化とバレット食道との関連の検討は新たなバイオマーカーとしての活用やBarrett食道患者でのサーベイランス間隔の決定への一助となる可能性があり、今後の研究課題となりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we hypothesized that chronic inflammation caused by exposure to gastric acid and bile acid induces demethylation, one of the epigenome abnormalities, and induces chromosomal instability during the carcinogenesis process of Barrett's esophageal adenocarcinoma. In patients with Barrett's esophageal carcinoma, demethylation levels of Satellite alpha (SAT) were found to be significantly higher in the adenocarcinoma than in the background mucosa. In addition, when we examined the induction of chromosomal instability by acid and bile acid exposure, chromosomal instability was observed in the Barrett esophageal cell line, which showed upregulation of SAT. From the above, we clarified that acid and bile acid exposure may be involved in the carcinogenesis process of Barrett's esophageal adenocarcinoma.

研究分野：消化器癌発癌

キーワード：食道胃接合部癌 エピジェネティック異常 H. Pylori陰性胃癌

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (HP) 感染は胃癌において重要なリスク因子の一つと考えられており、HP 除菌を行うことで、発癌のリスクが減少することが報告されて以降、本邦では、保険適応が拡大し HP 除菌が普及したこと、また衛生環境が改善したことから、60 代以上では HP 感染率が 60%以上であるのに対し 10 代では 5%未満と若年層を中心としてピロリ菌感染率は急激に減少した。それに伴い、過去 30 年間で胃がんの年齢調整罹患率は 40 から 15(人口 10 万対)、死亡率も 85 から 55(人口 10 万対)といずれも減少している。

食道胃接合部癌の前癌病変として広く知られている Barrett 食道 (BE) は、胃酸や胆汁酸を含む胃食道逆流による慢性炎症によって正常な扁平上皮が特殊円柱上皮に置き換わることにより形成され、異形成を経て癌へと進行することが報告されている。生体における逆流成分の検討では、GERD や Barrett 食道を有する患者では有意に胆汁酸が多く、また、 $\text{pH} < 4$ の強酸環境である事が示され、BE の発生には強酸と胆汁酸が重要な因子であると考えられている。胃酸・胆汁酸と BE・食道腺癌 (EAC) の発癌との関連については、これらの曝露が、酸化ストレスによる DNA 損傷を引き起こすことや、炎症性メディエーターの産生が増加することが報告されている。実際、動物モデルにおいても胃酸や胆汁酸に長期間さらされることで腫瘍が形成されることを報告した論文がこれまで数多く報告されてきた。これらの慢性炎症によりエピゲノム異常が誘導される。エピゲノム異常は DNA 配列の変化を伴わない遺伝子の変化で、発癌との関連がこれまで多く報告されている。

特に DNA メチル化異常は多くの癌腫で発癌に関与することが示されてきた。DNA メチル化異常は局所の高メチル化異常とゲノム全体における低メチル化異常に分類される。局所の高メチル化異常は遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドが過剰にメチル化されるもので、癌抑制遺伝子の転写不活化をもたらす。BE および EAC においてもこれまで多くの高メチル化異常が報告されており、多段階発癌に深く関与していることが明らかとなった。一方、ゲノム全体の脱メチル化は通常メチル化されている繰り返し配列に脱メチル化が起こることで染色体不安定性 (CIN) をもたらす。我々がこれまで注目してきた Satellite alpha (Satellite) はセントロメア領域に存在する 171 bp の繰り返し配列であり、ここから転写される Satellite alpha transcripts (SAT) により染色体の凝集が起こることでキネトコアが形成され、正確な染色体分離が可能になる。ゲノム全体の脱メチル化によりセントロメア領域の Satellite に脱メチル化異常が生じると、RNA 転写が亢進し、RNA transcripts の産生が増加する。これにより、正常のキネトコア形成が阻害され、CIN が惹起されると考えられている。実際、様々な癌腫において SAT の発現が亢進しており、自治医科大学附属さいたま医療センター一般・消化器外科からの報告でも、HP 感染を介した胃癌の発癌過程においては、段階的にメチル化異常が進むこと、それに伴う SAT の過剰発現が深く関与する事が示された。

CIN は、細胞分裂中に染色体の分配異常が起こることで生じる癌の特徴の一つである。マウスモデルを用いた研究で、CIN はゲノムワイドな脱メチル化により誘発され、その結果発癌に至ることが示され、CIN と発癌との関連が示唆された。BE に由来する Barrett 食道癌では、臨床検体においてヘテロ接合性の消失 (LOH) や染色体コピー数変化など、CIN との関連が報告されている。さらに、The Cancer Genome Atlas (TCGA) から報告された大規模なゲノム解析の結果から、EGJ 領域に存在する癌は CIN を特徴としていること、EGJ 癌の中でも食道腺癌 (EAC) は、胃癌の CIN サブタイプに染色体コピー数変化のパターンが類似しており、食道扁平上皮癌とは異なるゲノム異常を示すことが報告された。加えて、BE においても、異型度が上昇するにつれ染色体不安定性が増す事が報告されている。しかしながら、BE を背景とした Barrett 食道癌における CIN と酸曝露との直接的な関連性を示す報告は今までない。

2. 研究の目的

本研究では食道胃接合部癌、特に Barrett 食道腺癌の発癌過程で、胃酸・胆汁酸の曝露による慢性炎症がエピゲノム異常の一つである脱メチル化異常を引き起こし、染色体不安定性を誘導するという仮説を明らかにすることである。

3. 研究の方法

臨床検体

2014 年 1 月から 2021 年 2 月までに自治医科大学附属さいたま医療センターで Barrett 食道腺癌に対して胃切除術 (食道合併切除を含む) を施行した症例のうち、遺伝子解析研究の同意が得られた 14 例を臨床検体の対象症例とした。本検討では、病理専門医により Barrett 食道腺癌

であることを病理組織学的に証明し、癌部および扁平上皮粘膜組織をホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織標本からマクロダイセクション法で回収した。MethyLight 法による DNA メチル化レベルの定量を行った。

細胞培養と酸・胆汁酸への曝露

検討に用いた細胞は以下 3 種類：ヒト噴門部腺癌細胞株 OACP4C (ATCC, Manassas, Virginia, USA)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) を安定的に導入して不死化した Barrett 食道細胞株 CP-A (ECACC, Salisbury, UK) およびヒト Barrett 食道腺癌 OACM5.1C (ECACC)。OACP4C、OACM5.1C はいずれも、10% FBS を添加した RPMI-1640 培地を用い、37℃、5%CO₂ 下で培養を行った。また、CP-A も同様に、37℃、5%CO₂ 下で、MCDB-153 培地 (5% FBS, 20 ng/mL 組み換えヒト成長因子 (EGF)、140 µg/mL ウシ下垂体抽出物 (BPE)、0.4 µg/mL ヒドロコルチゾン、20 mg/L アデニン、1x ITS Supplement、4 mM グルタミン、8.4 µg/mL コレラトキシンを含む) を用いて培養を行った。本研究では胆汁酸として DCA を細胞に作用させることとした。

Array CGH 解析による染色体コピー数変化の測定

Array comparative genomic hybridization (CGH) 法とは、ゲノム DNA の増幅や欠損を、全染色体レベルで検出する方法である。異なる蛍光分子で標識したゲノム DNA をマイクロアレイ上で競合的にハイブリダイゼーションさせ、そのシグナル強度を比較解析することで、目的のゲノム DNA のコピー数変化を詳細に解析することができる。

今回の検討では、SureTag DNA Labeling kit, Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization kit および SurePrint G3 Human CGH Microarray kit 8x 60k (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) を用い、プロトコール (Protocol v8.0) に従って行った。Agilent Cytogenomics ソフトウェアプログラム (v.5.1) を用いてデータを解析した。

免疫細胞染色

各細胞に酸および DCA を曝露させたのち、通常培地で培養を行い、サブコンフルエントになったことを確認し回収、24 ウェルマルチプレートに設置したカルチャーカバーガラス上で再度培養した。培養開始から 24 時間後、細胞が十分に増殖しカバーガラス上に接着していることを確認したうえで、細胞周期を同調させるためノコダゾール (300 ng/mL) を含む培地に交換、さらに 24 時間培養を行った。ノコダゾール処理後、通常培地への交換を行い (OACP4C では 60 分間、CP-A では 40 分間)、室温で 15 分間 4% パラホルムアルデヒドに浸すことによって細胞を固定した。作成したプレパラートは Keyence BZ-X700 蛍光顕微鏡を使用して観察・撮影した。

遺伝子発現解析

CP-A におけるコントロール群と pH 6.4 および DCA 曝露群の遺伝子発現の違いを比較するために、mRNA の遺伝子発現アレイを行った。遺伝子のリストは Transcriptome Analysis Console (TAC) を用いて解析した。なお、これら一連の処理と Microarray 解析は、GeneticLab Co. (Hokkaido, Japan) にて行った。

DNA メチル化解析

Ovation RRBS Methyl-Seq System のプロトコールに従い、ライブラリーの増幅を行った。Agilent 2200 TapeStation System を用いてライブラリーを測定し、KAPA Library Quant Kit ABI Prism qPCR Mix (Roche KK4835) を用いて定量を行った。ライブラリーは SE75 の NextSeq 550 で塩基配列を決定した。なお、これら一連の工程は、Active Motif (CA, USA) にて行ない、解析は Integrative Genomics Viewer (IGV) を用いて行った。

4. 研究成果

臨床検体における非腫瘍および腫瘍組織における Satellite の脱メチル化レベルの検討

Barrett 食道腺癌の臨床検体において、腫瘍に隣接する食道扁平上皮組織 (SE) および Barrett 食道腺癌組織 (BA) における Sat RDL を比較したところ、BA では SE に比べ、Sat RDL 値は有意に高かった (BA の Sat RDL : 0.3139, SE の Sat RDL : 0.06631, 各中央値、図 1)。以上より、Barrett 食道腺癌の発癌過程において、DNA 脱メチル化が関与している可能性があると考えられ

た。

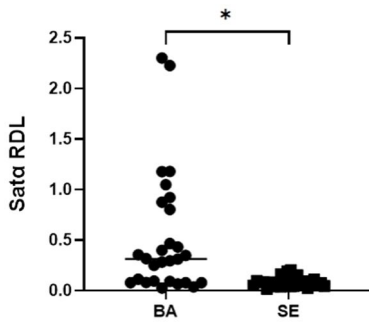


図1 Barrett 食道腺癌患者の手術検体から採取した Barrett 食道腺癌部 (BA) および正常扁平上皮粘膜 (SE) における Sat RDL 値を比較した。BA では SE と比較し、有意に Sat RDL 値が高値であった。

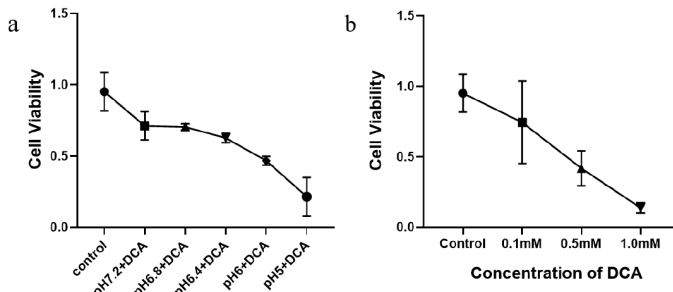


図2 OACP4C における酸および DCA の曝露による細胞生存率
100 μ M の DCA を添加し pH を変化させた培地 (a) および 0.1-1.0 mM の DCA のみ添加した培地 (b) で 1 時間培養した OACP4C 細胞の細胞生存率。データは 3 回の独立した実験の結果で、平均 \pm 標準偏差 (SD) で表している。

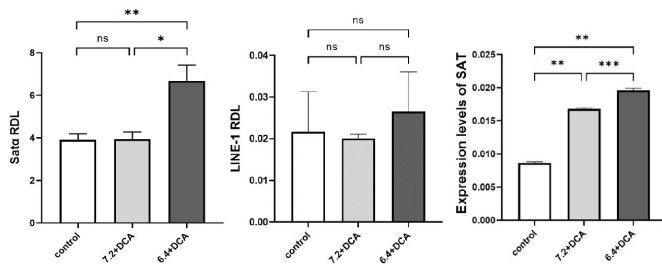


図3 CP-A における Sat および LINE-1 RDL と SAT 発現量
CP-A では、酸および DCA の曝露 (6.4 + DCA) により、LINE-1 RDL に変化を認めない一方、Sat RDL は有意に上昇した。SAT の発現量は、酸および DCA の曝露により有意に増加した。データは 3 回の独立した実験の結果で、平均 \pm SD で表している。

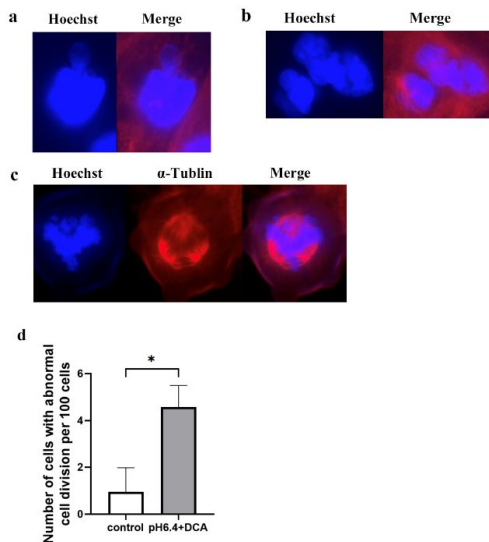


図4 酸およびDCAに曝露したCP-Aで観察された分裂異常を示唆する所見および細胞数の比較
 CP-Aで観察された micronuclei (a) multiple nuclei (b) abnormal segregation (c) などの有糸分裂異常を示唆する所見を示す。酸および胆汁酸 (pH 6.4 + DCA) に曝露した細胞は、非曝露細胞 (コントロール) と比較し有糸分裂異常を示す細胞が有意に増加した (d)。分裂異常細胞の観察は、1視野あたり100細胞、計6視野の平均で評価した。*p < 0.05

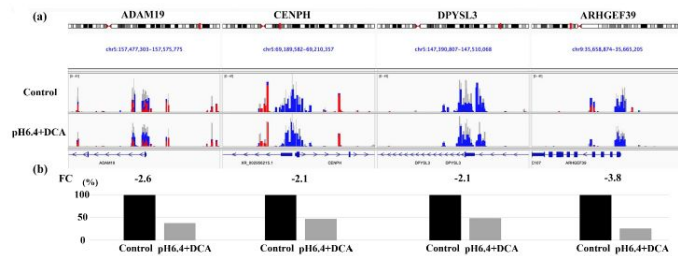


図5 CP-Aにおいて発現の低下した遺伝子の転写開始点のCpGアイランドにおけるDNAメチル化の変化

(a) 各遺伝子の転写開始点のCpGアイランドにおいて、DNAメチル化を赤で、脱メチル化を青で示す。転写開始点近傍に存在するCpGアイランドを中心とする約5kbのゲノム領域を、遺伝子名の上の青い枠で示す。(b) pH6.4 + DCAに曝露したCP-A細胞では、コントロールと比較して遺伝子発現の低下を認めた (コントロールにおける遺伝子発現の割合を100%として算出)。FC; fold-change

研究では、初めに Barrett 食道癌患者の手術検体を用い、Barrett 食道の背景となる食道扁平上皮部と Barrett 食道腺癌部における Satellite の脱メチル化レベルを比較検討した。その結果、Barrett 食道癌の患者では腺癌部が食道扁平上皮部よりも有意に Satellite の脱メチル化レベルが上昇していることが明らかとなった。脱メチル化の機序を解明するため、食道胃接合部癌に関連する細胞株において、酸および胆汁酸の曝露前後の LINE-1 および Satellite の脱メチル化レベルおよび SAT の発現を評価した。その結果、Barrett 食道細胞株において、酸および胆汁酸の曝露が Satellite の脱メチル化を誘導し、SAT の発現が亢進していた。酸および胆汁酸曝露による染色体不安定性の誘導について検討したところ、SAT の発現亢進を認めた Barrett 食道細胞株において、数的、形態学的な染色体不安定性が認められた。以上から、酸および胆汁酸の曝露は Barrett 食道に由来する食道胃接合部癌の発癌過程に関与する可能性があることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Abe Iku, Suzuki Koichi, Kimura Yasuaki, Tamaki Sawako, Endo Yuhei, Ichida Kosuke, Muto Yuta, Watanabe Fumiaki, Saito Masaaki, Konishi Fumio, Rikiyama Toshiki	4. 巻 12
2. 論文標題 Enhancement of DNA hypomethylation alterations by gastric and bile acids promotes chromosomal instability in Barrett's epithelial cell line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-25279-y	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 Tamaki Sawako, Suzuki Koichi, Abe Iku, Endo Yuhei, Kakizawa Nao, Watanabe Fumiaki, Saito Masaaki, Tsujinaka Shingo, Miyakura Yasuyuki, Ohta Satoshi, Tago Kenji, Yanagisawa Ken, Konishi Fumio, Rikiyama Toshiki	4. 巻 12
2. 論文標題 Overexpression of satellite RNAs in heterochromatin induces chromosomal instability and reflects drug sensitivity in mouse cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-022-15071-3	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 Endo Yuhei, Suzuki Koichi, Kimura Yasuaki, Tamaki Sawako, Aizawa Hidetoshi, Abe Iku, Watanabe Fumiaki, Kato Takaharu, Saito Masaaki, Futsuhara Kazushige, Noda Hiroshi, Konishi Fumio, Rikiyama Toshiki	4. 巻 60
2. 論文標題 Genome-wide DNA hypomethylation drives a more invasive pancreatic cancer phenotype and has predictive occult distant metastasis and prognosis potential	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	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) 10.3892/ijo.2022.5351	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市田 晃佑, 齊藤 正昭, 武藤 雄太, 阿部 郁, 力山 敏樹
2. 発表標題 胃癌患者における予後因子としてのCentromere Protein A発現の評価
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 浩一, 木村 恭彰, 田巻 佐和子, 阿部 郁, 遠藤 裕平, 市田 晃佑, 武藤 雄太, 渡部 文昭, 齊藤 正昭, 力山 敏樹
2. 発表標題 転移性胃癌患者における循環腫瘍細胞を用いた血液モニタリングシステムの臨床応用
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠藤 裕平, 鈴木 浩一, 木村 恭彰, 田巻 佐和子, 阿部 郁, 渡部 文昭, 加藤 高晴, 齊藤 正昭, 野田 弘志, 力山 敏樹
2. 発表標題 ゲノム全域のDNA異常低メチル化は染色体不安定性を介して膵癌の浸潤能を増加させ潜在性転移及び予後を予測する
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部 郁, 鈴木 浩一, 田巻 佐和子, 遠藤 裕平, 渡部 文昭, 齊藤 正昭, 力山 敏樹
2. 発表標題 食道胃接合部癌細胞における胃酸胆汁酸によりもたらされるメチル化異常と染色体不安定性について
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2022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	鈴木 浩一 (Suzuki Koichi) (70332369)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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	力山 敏樹 (Rikiyama Toshiko) (80343060)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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