

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09114

研究課題名(和文) 接着性浸潤性大腸菌(AIEC)関連分子による炎症誘導大腸癌発症メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of inflammation-induced colon cancer development mechanism by adhesive invasive Escherichia coli (AIEC) related molecule

研究代表者

衣笠 哲史 (KINUGASA, TETSUSHI)

国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・教授

研究者番号：90279266

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)：複数の癌合併潰瘍性大腸炎患者の正常部、炎症部、癌部の切除標本由来のcDNAマイクロアレイ解析で、接着性侵入性大腸菌(Adherent Invasive E. coli: AIEC)に關与するCEACAM6、CH3L1、CLND2の遺伝子がColitis-Associated Cancerと關連することを世界で初めて報告した。(Kinugasa T. et al: Anticancer Research, 42 4119-4127; 2022) これらの発現がUC患者におけるCAC発生機序に強く關与している可能性があることから、革新的な診断・治療法など臨床応用への展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

潰瘍性大腸炎(UC)患者の切除組織を用いた今回の検討で抽出された CEACAM6、CH3L1、CLND2 なども接着性侵襲性大腸菌(AIEC)の活動に關わっていることが分かった。AIECはクローン病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、CH3L1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)：We have demonstrated that CEACAM6, CH3L1, and CLND2 genes, which involved Adherent Invasive E. coli (AIEC), were identified by cDNA microarray analysis derived from resected specimens of normal, inflamed, and cancerous lesions of multiple cancer-complicated ulcerative colitis (UC) patients. For the first time in the world, we reported the relationship between these genes and Colitis-Associated Cancer (CAC). (Kinugasa T. et al: Anticancer Research, 42 4119-4127; 2022)

It is possible that these expressions are strongly involved in the mechanism of CAC development in UC patients, and development of clinical applications such as innovative diagnostic and therapeutic methods is expected.

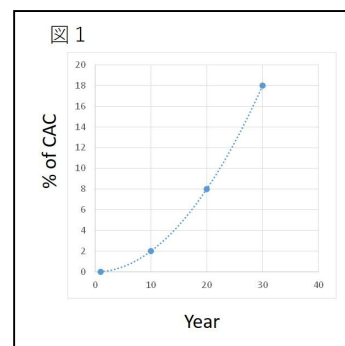
研究分野：炎症性腸疾患における基礎的解析

キーワード：潰瘍性大腸炎 癌化 CEACAM6 CH3L1 CLND2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎 (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 29 年度には約 21 万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。しかし、癌化のメカニズムに関しては不明な点が多く、臨床の場において UC 患者に対する大腸癌サーベイランスの重要性も高くなっている。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検討されたが、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。



一方で、発癌の機序は sporadic な大腸癌とは異なることが報告されているが、詳細については解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

これまでの基盤研究において、我々はこの指数関数的な癌化には Positive Feedback 因子が関与するのではないかと仮定し、UC 患者に発生する癌合併潰瘍性大腸炎 (以下 CAC) について発癌過程に関与している関連因子の検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) 患者および組織サンプル。

2001 年 1 月から 2010 年 12 月までに久留米大学病院で外科的治療を受けた合計 42 人の UC 患者が研究対象となった。(久留米大学倫理委員会承認番号: 09315)

すべての患者から書面によるインフォームド コンセントを行った。UC 42 例中 CAC 3 例と sporadic 大腸癌 (以下 CRC) 1 例の手術標本を用いて本研究を行った。CRC 患者の切除標本から 正常大腸粘膜組織、大腸癌組織を、CAC 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 など手術標本を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行った。

2) total RNA の分離

TRIzol 試薬を使用して個々の患者の組織から total RNA を抽出した。

3) 遺伝子発現マイクロアレイ

cDNA を増幅し、標識したのち 60K Agilent 60-mer oligomicroarray にハイブリダイズさせ Agilent スキャナーでスキャンした。相対ハイブリダイゼーション強度とバックグラウンドハイブリダイゼーション値は、Agilent Feature Extraction ソフトウェア (9.5.1.1) を使用して計算した。正常組織で観察されたそれぞれの GEV によって、腫瘍または炎症領域で観察された遺伝子発現値 (GEV) を正規化し、腫瘍性および炎症領域からの正規化された GEV を統計的に比較した。これらの標本から RNA 抽出後、cDNA マイクロアレイ解析を行った。解析方法は、同一患者より得られた腫瘍部と正常部におけるシグナル比の平均値をとり、t-test にて有意差をもってシグナル比に違いのある分子を抽出した。

4) 遺伝子オントロジー (GO) 分析

遺伝子オントロジー (GO) 用語の濃縮は、生物学的プロセス、分子機能、および細胞成分を含む Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) を用いて分析した。

5) 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は、Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6

(CEACAM6)、Chitinase 3-like 1 (CHI3L1) (Bioss Antibodies Inc. Woburn, MA, USA)、Claudin 2 (CLND2)、およびリポ多糖 (LPS) (Abcam, Cambridge, UK) に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて行った。

4. 研究成果

1) 遺伝子発現マイクロアレイとGO分析

CAC に関連する遺伝子を決定するために、遺伝子発現マイクロアレイを施行した。腫瘍または炎症における GEV を正規化した後、上記と比較し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、CLND2、CEACAM6、CHI3L1 などが抽出された。CLND2、CHI3L1、および CEACAM6 遺伝子発現レベルは、それぞれ 333 倍、120 倍、および 4.9 倍 up-regulate されていた。さらに GO 分析により、選択された遺伝子が炎症反応、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、炎症反応の調節、創傷反応、およびタンパク質リン酸化の調節に関与していることが明らかになり、CAC における腫瘍周辺の微小環境が免疫介在反応と密接に関連していることが示唆された。

2) 免疫組織化学的染色

マイクロアレイ分析の結果を確認するために (検出された各遺伝子のタンパク質発現レベルを確認するために)、CHI3L1、CEACAM6、および CLND2 の免疫組織化学分析を実行した。上記のすべてのタンパク質は、CAC 組織で明確に発現されていることが確認された (図 2)。正常大腸粘膜では CEACAM6 と CLND2 は細胞膜に発現していたが、CAC では細胞膜だけでなく細胞質にも発現が確認された。CHI3L1 は正常な結腸粘膜では発現なく、CAC では、CHI3L1 も拡散して細胞質に発現していることが確認できた (図 2)。同時に、CEACAM6 (AIEC の受容体) および LPS (AIEC を含むグラム陰性菌の外膜の主成分) の発現は、CAC 組織においてほぼ共局在していることも確認でき、AIEC と CEACAM6 の相互の関与が強く示唆された (図 3)。

図 2 CAC 患者の切除標本 (癌組織) における免疫組織学的染色

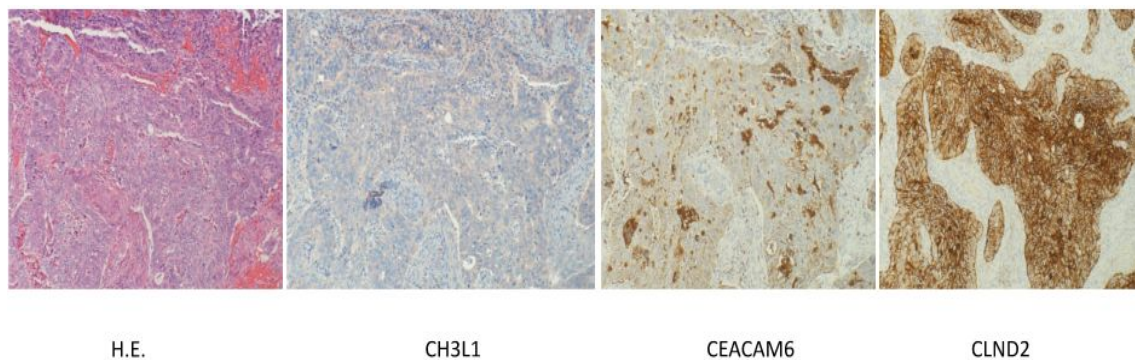
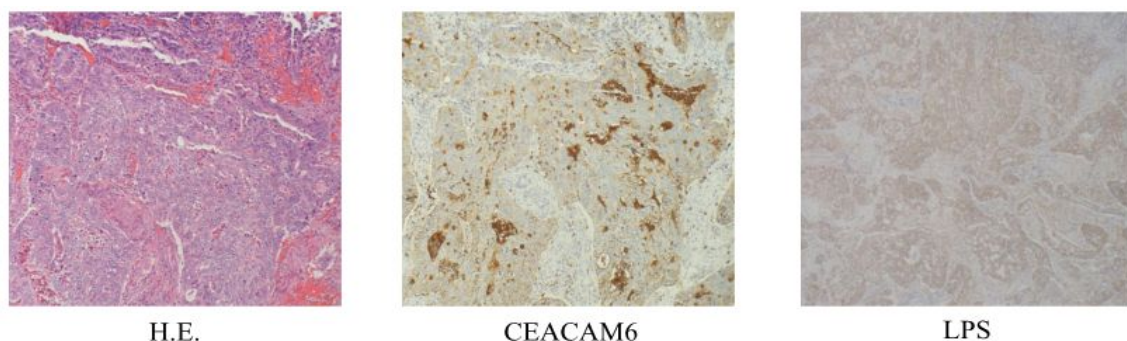


図 3 CAC 組織における AIEC に関する蛋白質発現の検討



考察

IBD 患者の半数以上で腸管内に AIEC の増加が認められ、原因菌として考えられるものの一つである。AIEC はクローン病 (CD) の回腸で炎症状態が悪化した状態にて認められ、CD における AIEC の役割についてはいくつかの分子生物学的、培養学的研究によって裏付けられているが、UC の CAC 病因における AIEC の役割については議論されていなかった。なぜ UC の CAC 病変 (局所) で AIEC に関与する分子が認められるのかを解明することには意義がある。これらの因子は 1) AIEC バリアとしての Tight junction, 2) AIEC 活性化、3) AIEC に対する局所免疫応答等に関連する分子であり、AIEC を中心とした癌化の促進機構が存在することが示唆された。さらに大腸癌においては変異 KRAS のシグナルも重要な役割を果たしており、Claudin2 などは変異 KRAS シグナルにより発現が制御される分子でもある。注目すべきことに、CHI3L1 は、結腸や肺などのいくつかの腫瘍形成プロセスに関与する重要なタンパク質として実証されており、さらに CEACAM6 についても細胞接着、細胞内および細胞間シグナル伝達、および癌の進行、炎症、血管新生、転移などの複雑な生物学的プロセスにおいて多様な機能を持っている。

まとめ

CAC 患者および CRC 患者からの外科的切除された標本から、正常、炎症、および癌の組織を用いて cDNA マイクロアレイ分析を行った。CAC 関連遺伝子として私たちは CHI3L1、CEACAM6、および CLND2 を特定し、これら 3 つの遺伝子のタンパク質発現レベルが CAC の組織でも特異的に up-regulate されていることを確認した。これら 3 遺伝子はすべて AIEC に関連している報告があり、これらの遺伝子発現は腸管での AIEC 感染に関与している可能性があることが示唆された。UC 患者における CAC 過程において、これらの遺伝子が重要な役割を担っていることを示した最初のレポートとなり、以下の論文にて発表した。Kinugasa T, et al. Chitinase 3-like 1, Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6, and Ectopic Claudin-2 in the Carcinogenic Processes of Ulcerative Colitis. *Anticancer Res.* 42, 4119-4127. 2022

今後、CAC 発症に関連しているこれらの分子が癌化の過程にどのように関与しているのか検討を継続していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shigaki Takahiro, Fujiyoshi Kenji, Sudo Tomoya, Kawahara Akihiro, Nakane Hiroyuki, Yomoda Takato, Nagasu Sachiko, Kinugasa Tetsushi, Akiba Jun, Fujita Fumihiko, Akagi Yoshito	4. 巻 24
2. 論文標題 Mismatch repair proteins expression and tumor-infiltrating T cells in colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13516	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 KINUGASA TETSUSHI, MITSUYAMA KEIICHI, MUROTANI KENTA, MIZOBE TOMOAKI, OCHI TAKAFUMI, YOSHIMURA TETSUHIRO, KUWAKI KOUTAROU, ISOBE TARO, AKAGI YOSHITO	4. 巻 67
2. 論文標題 Non-invasive Monitoring of Pouchitis After Total Proctocolectomy Using Fecal Calprotectin Levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Kurume Medical Journal	6. 最初と最後の頁 57～63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2739/kurumemedj.MS6723005	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 Shinto Eiji, Ike Hideyuki, Ito Masaaki, Takahashi Keiichi, Ohue Masayuki, Kanemitsu Yukihide, Suto Takeshi, Kinugasa Tetsushi, Watanabe Jun, Hida Jin-ichi, Itabashi Michio, Ozawa Heita, Nozawa Hiroaki, Kobayashi Hiroto, Hashiguchi Yojiro, Hase Kazuo, Sugihara Kenichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Optimizing nodal and staging classification in low rectal cancers with lateral node metastasis: multicentre retrospective cohort study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BJS Open	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bjsopen/zrac006	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 KINUGASA TETSUSHI, TSUNODA TOSHIYUKI, MIZOGUCHI EMIKO, OKADA TOSHIYUKI, SUDO TOMOYA, KAWAHARA AKIHIKO, AKIBA JUN, AKAGI YOSHITO	4. 巻 42
2. 論文標題 Chitinase 3-like 1, Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 6, and Ectopic Claudin-2 in the Carcinogenic Processes of Ulcerative Colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4119～4127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.15910	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 Nishi K, Ishikura S, Umebayashi M, Morisaki T, Inozume T, Kinugasa T, Aoki M, Nimura S, Swain A, Yoshida Y, Hasegawa S, Nabeshima K, Sakata T, Shirasawa S, Tsunoda T.	4. 巻 40(8)
2. 論文標題 Mutant KRAS Promotes NKG2D+;T Cell Infiltration and CD155 Dependent Immune Evasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4663-4674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14465.	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 該当する

1. 著者名 Kinugasa T, Nagasu S, Murotani K, Mizobe T, Ochi T, Isobe T, Fujita F, Akagi Y.	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 Analysis of risk factors for anastomotic leakage after lower rectal Cancer resection, including drain type: a retrospective single-center study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-020-01462-1.	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 溝部智亮、藤田文彦、四方田隆任、大地貴文、衣笠哲史、赤木由人	4. 巻 43 (6)
2. 論文標題 大量下血	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 消化器外科	6. 最初と最後の頁 981-989
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 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 -

1. 著者名 島村智、藤田文彦、四方田隆任、吉田直裕、大地貴文、溝部智亮、衣笠哲史、加来秀彰、日野東洋、磯辺太郎、森直樹、的野吾、村上直孝、赤木由人	4. 巻 83 (7-9)
2. 論文標題 胃癌に対する胃全摘術およびRoux-en-Y再建後 6年目に発症した内ヘルニアの1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 久留米医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 205-210
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 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13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、主藤 朝也、赤木由人
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎診療合併大腸癌に発現増強されている遺伝子同定と臨床応用
3. 学会等名 第77回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 衣笠哲史、矢永勝彦
2. 発表標題 Work life balanceを改善して外科医を増やそう
3. 学会等名 第84回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 衣笠哲史
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎患者における左側結腸狭窄の術式選択についての考察
3. 学会等名 第19回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 衣笠 哲史
2. 発表標題 医学生や初期研修医の意見から考える外科医の働き方改革
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 衣笠 哲史
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎術後患者におけるQOL評価方法の検討
3. 学会等名 第117回日本消化器病学会 九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 衣笠 哲史
2. 発表標題 異所性Claudin2発現やCEACAM6の発現は潰瘍性大腸炎発癌過程に関与しているか？
3. 学会等名 第76回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 衣笠 哲史
2. 発表標題 若年者で右下腹部痛を主訴とした上行結腸憩室炎による腸間膜内穿通の1例
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 衣笠 哲史
2. 発表標題 患者と外科医を守る医療安全管理制度は何か？
3. 学会等名 第83回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 衣笠 哲史
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設立・活動
3. 学会等名 第118回日本消化器病学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 衣笠 哲史
2. 発表標題 内科医と外科医との情報共有がクローン病に対する治療に必要である
3. 学会等名 第18回日本消化管学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 衣笠 哲史
2. 発表標題 無過失損害補償制度が外科医の妥当な医療行為を推進する
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 衣笠 哲史
2. 発表標題 小児クローン病患者の肛門病変に対する外科的アプローチ
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 衣笠 哲史
2. 発表標題 クローン病患者における適切な手術適応とタイミング
3. 学会等名 第75回日本大腸肛門病学会学術集会
4. 発表年 2020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	溝口 恵美子 (Mizoguchi Emiko) (40782157)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
研究分担者	角田 俊之 (Tsunoda Toshiyuki) (70444817)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	

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