

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15400

研究課題名(和文)炎症性腸疾患からの発癌におけるAhRの役割と新規がんマーカーとしての有用性

研究課題名(英文)The Role of AhR in carcinogenesis from inflammatory bowel disease and its usefulness as a novel tumor marker.

研究代表者

的場 久典(Matoba, Hisanori)

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：10849277

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): Colitis associated dysplasia (CAD)およびcolitis associated carcinoma (CAC)に対するAhRの免疫染色では、CAD19例中16例、CAC4例中4例で陽性所見を認めた。また、SATB2の発現低下はCAD19例中9例、CAC4例中4例で認め、p53の陽性所見はCAD19例中5例、CAC4例中3例で認めた。GS-11レクチン染色では、CAD19例中15例、CAC4例中4例で陽性所見を認めた。メチル化全ゲノムシーケンス解析では、AhR陰性例を含むCAC・CADの8例で、AhRプロモーター領域のメチル化は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、AhRがCAD、CACに対する感度の高い診断マーカーとなることが示された。また、GS-11レクチン染色により染色される糖鎖であるterminal GlcNAcの増加が、sessile serrated lesion(SSL)およびmicrovesicular hyperplastic polyp(MVHP)とCAD、CACに共通に見られる特徴であることも示された。これらの結果は、CAD、CACに対する正確な診断を可能とし、CAD、CACに対する診療に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文): Immunostaining of AhR for colitis-associated dysplasia (CAD) and colitis-associated carcinoma (CAC) showed positivity in 16 of 19 CAD cases and 4 of 4 CAC cases. SATB2 downregulation was observed in 9 of 19 CAD cases and 4 of 4 CAC cases, and p53 positivity was observed in 5 of 19 CAD cases and 3 of 4 CAC cases. GS-11 lectin staining was positive in 15 of 19 CAD cases and 4 of 4 CAC cases. Methylation whole genome sequencing analysis showed no methylation of the AhR promoter region in 8 CAC and CAD cases including AhR-negative cases.

研究分野：病理学

キーワード：AhR CAD CAC p53 Ki-67 SATB2 DNAメチル化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) AhR ノックアウトマウスにおける腫瘍発生

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)は、ダイオキシン類などの芳香族炭化水素の受容体として働き、核内に移行して転写因子として機能する分子である。近年、AhR ノックアウト(KO)マウスに、大腸炎を伴いながら回盲部に腫瘍が自然発生することが報告された(Kawajiri K., et al. PNAS (2009) 106 13481-13486)。本研究者は、AhR KO マウスの腫瘍発生について形態学的手法を用いて解析し、1) ヒトの腸管の serrated lesion に類似した過形成性の病変を経て腫瘍が発生すること、2) 病変部に特異的に炎症反応および MAPK 経路の活性化を伴うこと、などを明らかにした(Matoba H., et al., Am J Pathol (2020) 190 453-468)。

#### (2) ヒトの散発性大腸癌および CAD, CAC における AhR の発現

本研究者は、さらに、ヒトの散発性大腸癌における AhR の発現について免疫染色により解析し、1) 非腫瘍性大腸粘膜の上皮に陽性所見は見られないこと、2) adenoma-carcinoma sequence および serrated pathway のほぼ全例において前駆病変から大腸癌へと進展するにつれて上皮細胞における AhR の発現が段階的に亢進すること、を明らかにした(Matoba H., et al., Am J Pathol (2020) 190 453-468)。これらの結果から、AhR KO マウスと異なり、ヒトの散発性大腸癌においては病変の発生・進展の結果として AhR の発現が亢進することが明らかとなった。

ヒトの大腸癌の発癌には、上記の主たる経路の他に、炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease:IBD)を背景として、前癌病変である colitis associated dysplasia (CAD)から colitis associated carcinoma (CAC)へと至る発癌経路が存在する。本研究者は、予備的検討として IBD の病理検体を用いて CAD, CAC に対する AhR の免疫染色を行い、1) IBD でも非腫瘍性大腸粘膜の上皮に AhR の陽性所見はほとんど見られないこと、2) 散発性大腸癌と同様に CAD, CAC の多くの例では AhR の発現が亢進すること、を明らかにした。

これらの知見と成果を背景として、AhR の発現上昇が CAD, CAC の診断マーカーとなりうるのか、また特に CAD, CAC のうち AhR の発現上昇を伴わない例について、AhR KO マウスの回盲部の病変とこれらの例が腫瘍発生の機序や形態学的な特徴などを共有しているのか、を明らかにするために本研究計画を樹立した。

### 2. 研究の目的

本研究では、主にヒトの IBD(潰瘍性大腸炎および Crohn 病)の病理検体を用いて、CAD, CAC における AhR 陽性例・陰性例のそれぞれの形態学的・分子生物学的な特徴を明らかにすることを目的とした。当初は CAD, CAC のうちの AhR 陰性例について詳細に解析する予定であったが、想定よりも症例数が少なく解析が困難と考えられたため、最終的には以下の 2 点に焦点を当てて解析を行った。

(1) CAD, CAC に対する AhR の免疫染色および既知の診断マーカーである SATB2, p53 などの免疫染色による、AhR の CAD, CAC に対する診断マーカーとしての意義の確立

(2) AhR のプロモーター領域のメチル化解析による、CAD, CAC のうちの AhR 陰性例におけるその発現低下の機序の解明

### 3. 研究の方法

本研究では、CAD, CAC の病理検体を用いて、AhR, SATB2, p53 などの免疫染色を行い、結果を比較することにより、AhR の CAD, CAC に対する診断マーカーとしての感度・特異度や、マーカーとしての有用性について解析した。また、研究過程において、GS-II レクチン染色により認識される糖鎖である terminal GlcNAc の増加が、Sessile serrated lesion (SSL)および microvesicular hyperplastic polyp (MVHP)において見られるだけでなく、CAD, CAC にも共通に見られる特徴であることが判明したため、CAD, CAC におけるこの糖鎖の発現についても解析した。当初は CAC, CAD のうちの AhR 陰性例に対するエクソーム解析を行う予定だったが、想定したよりも症例数が少なく包括的な解析が困難と考えられたため、中止した。AhR のプロモーター領域のメチル化解析については、当初はバイサルファイトシーケンス法により解析する予定であったが、DNA の質・量などの問題でこの方法では解析が困難だったため、NGS を用いたメチル化全ゲノムシーケンス法による解析を行った。

### 4. 研究成果

AhR の免疫染色では、染色方法を改良し診断基準についても吟味した後に、最終的には CAD19 例中 16 例(84%)、CAC4 例中 4 例(100%)で陽性所見を認めた。CAD のうちいわゆる conventional dysplasia では 13 例中 11 例(85%)、non-conventional dysplasia では 6 例中 5 例(83%)で陽性所見を認めた(表 1, 図 1)。

SATB2 の発現低下は CAD19 例中 9 例(47%)、CAC4 例中 4 例(100%)で認め、CAD のうち conventional dysplasia では 13 例中 5 例(38%)、non-conventional dysplasia では 6 例中 4 例(67%)で発現低下を認めた。p53 の陽性所見は CAD19 例中 5 例(26%)、CAC4 例中 3 例(75%)で

認め、CADのうち conventional dysplasia では13例中3例(23%)、non-conventional dysplasia では6例中2例(33%)で陽性所見を認めた(表1, 図1)。

GS-II レクチン染色では、CAD19例中15例(79%)、CAC4例中4例(100%)で陽性所見を認めた。HIK1083の免疫染色では全例で陽性所見を認めなかった。GS-II レクチン染色は terminal / GlcNAc を認識し、HIK1083の免疫染色は terminal GlcNAc を認識するため、これらの結果から、CAD, CACの多くの例において terminal GlcNAc の増加を伴うことが示された。しかし、GS-II レクチン染色の陽性所見は、CAD, CACの多くの例において、限局的とはいえず背景粘膜の一部にも認められた。

メチル化全ゲノムシーケンス解析では、AhR 陰性例を含む CAC・CADの8例で、AhR プロモーター領域のメチル化は認めなかった。

これらの結果からは、AhRが、CAD, CACに対する感度の高い診断マーカーとなりうることを示された。しかし、AhRはCAD, CACだけでなく散発性大腸癌に対しても陽性となり、この意味においては特異度の高い診断マーカーとはいえないため、CAD, CACに対する特異度の高い SATB2 などの診断マーカーを併用することで、より正確な診断が可能になるものと考えられた。また、CAD, CACのうちの AhR 陰性例については、想定したよりも症例数が少なく、AhR のプロモーター領域のメチル化も認めないため、今回検索した範囲では、その形態学的・分子生物学的な特徴を包括的に明らかにすることは困難と考えられた。

	AhR (positive, n (%))	SATB2 (Loss, n (%))	p53 (positive, n (%))
CAD	16/19 (84)	9/19 (47)	5/19 (26)
conventional dysplasia	11/13 (85)	5/13 (38)	3/13 (23)
non-conventional dysplasia	5/6 (83)	4/6 (67)	2/6 (33)
CAC	4/4 (100)	4/4 (100)	3/4 (75)
total	20/23 (87)	13/23 (57)	8/23 (35)

表1:CAD, CACに対する免疫染色の結果

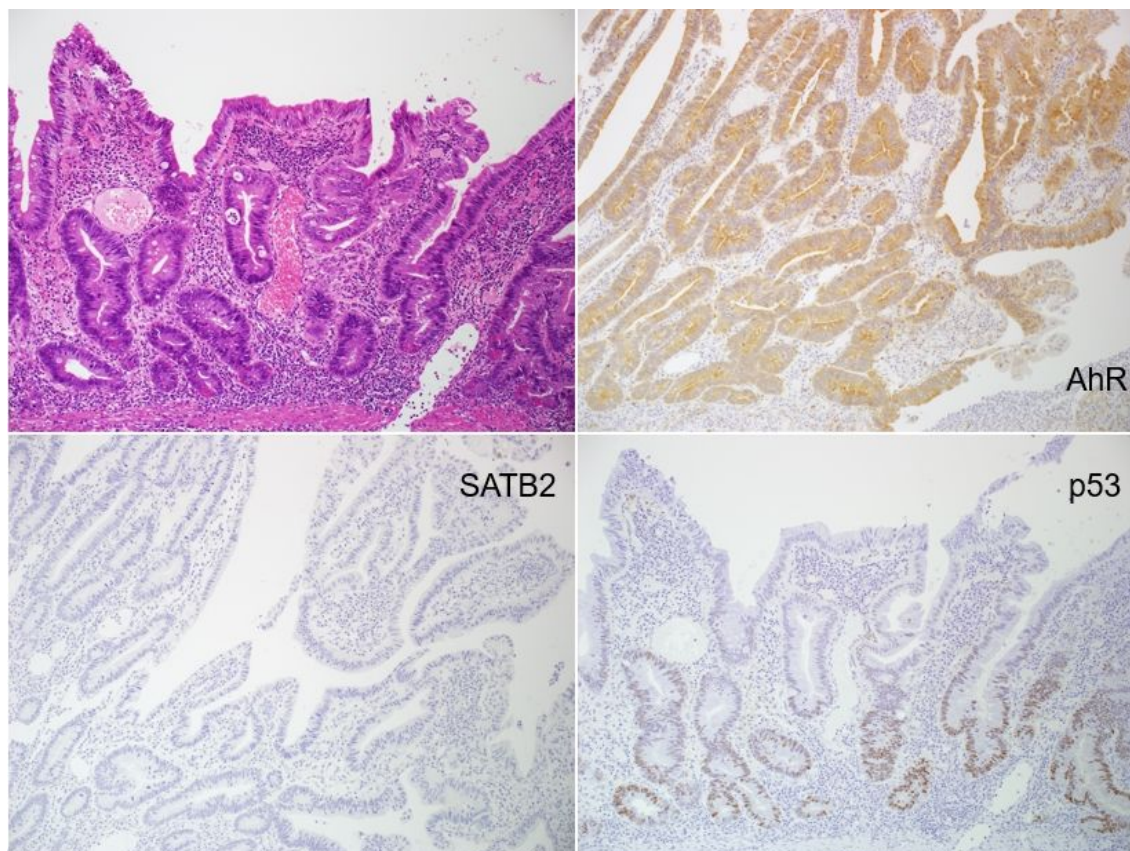


図1: AhRの発現上昇、SATB2の発現低下、p53の陽性所見を伴うCADの1例

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hisanori Matoba, Chifumi Fujii, Kazuaki Maruyama, Masatomo Kawakubo, Masanobu Momose, Kenji Sano, Hitomi Imamura, Hiroki Kurihara, Jun Nakayama	4. 巻 165
2. 論文標題 Sirt3 regulates proliferation and progesterone production in Leydig cells via suppression of reactive oxygen species.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqae017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/endo/bqae017	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 Hisanori Matoba, Mai Iwaya, Chifumi Fujii, Jun Nakayama	4. 巻 72
2. 論文標題 Identification of Terminal GlcNAc on Brachyspira Species in Human Intestinal Spirochetosis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 71-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/00221554231222963	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 Hisanori Matoba, Mai Iwaya, Yoshiko Sato, Noriyasu Kobayashi, Haruka Takemura, Yusuke Kouno, Ayumi Karasawa, Jun Nakayama	4. 巻 73
2. 論文標題 Increased GS II lectin binding and SATB2 downregulation are biological features for sessile serrated lesions and microvesicular hyperplastic polyps	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 246-254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13321	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 Hisanori Matoba, Meguru Ikeyama, Noriyasu Kobayashi, Haruka Takemura, Takaomi Hanaoka, Yoshiko Sato, Jun Nakayama	4. 巻 72
2. 論文標題 Mucin distribution in bronchiolar adenoma/ciliated muconodular papillary tumor reveals organoid differentiation simulating the normal lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 300-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13220	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 的場久典、岩谷舞、中山淳
2. 発表標題 AhR is a novel diagnostic marker for colitis-associated dysplasia and carcinoma
3. 学会等名 第113回日本病理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 的場久典、岩谷舞、中山淳
2. 発表標題 Increased expression of terminal GlcNAc in Brachyspira sp. in human intestinal spirochetosis
3. 学会等名 第112回日本病理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 的場久典、岩谷舞、中山淳
2. 発表標題 Increase of terminal GlcNAc and downregulation of SATB2 are biomarkers for sessile serrated lesion
3. 学会等名 第111回日本病理学会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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