様 式 Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９ （共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年 　６ 月 １６ 日現在

機関番号：３２６６１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４５９０４２６

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎の炎症性粘膜における発癌と浸潤に関わる蛋白の解明：プロテオミクス解析

研究課題名（英文）Factors related with carcinogenesis and invasion of ulcerative colitis-associated cancer

研究代表者
三上　哲夫（MIKAMI, Tetuo）

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：９０２８６３５２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：発癌機構における重要な経路として、慢性臓器炎からの発癌が注目されており、潰瘍性大腸炎からの発癌はその代表的な疾患である。この発癌経路における細胞接着因子のCD44分子の動態を検討するとともに、プロテオミクス解析により潰瘍性大腸炎の粘膜に特異的に発現が増加ないし減少しているタンパクを同定することを試みた。
潰瘍性大腸炎関連の腫瘍病変では、CD44の発現の減少がみられ、タンパク分解酵素Adam17の発現と関連していると考えられた。また、潰瘍性大腸炎の粘膜で特異的に発現減少しているタンパクとしてCarbonic anhydrase 2が同定された。

研究成果の概要（英文）：Carcinogenic pathway from chronic inflammation is considered as an important pathway. Carcinogenesis
in ulcerative colitis is one of the important diseases. We analyzed a cell adhesion molecule, CD44, in ulcerative colitis-associated neoplastic
lesions, dysplasia and cancer. In addition, we searched for proteins which are specifically up- or down-regulated in ulcerative colitis mucosa. As a result, CD44 was down regulated in ulcerative colitis-associated lesions, and its expression was considered to be associated with Adam17 expression. Carbonic anhydrase 2 was identified as one of the proteins down-regulated in ulcerative colitis mucosa.

研究分野：人体病理学

キーワード：潰瘍性大腸炎　癌

１．研究開始当初の背景

発癌機構における重要な経路として、慢性臓器炎からの発癌が注目されている。これまで申請者らは、その一例として潰瘍性大腸炎（UC）を対象にその癌の性質を調べ、この経路が通常の adenoma-carcinoma sequence 大腸発癌経路と異なることを示してきた。我々の検討では UC 関連癌は通常の大腸癌と比べて、低分化になりやすく、予後が有意に不良であることが示されている。さらに、UC 関連癌では細胞接着因子 CD44 細胞外ドメインの発現が低下していることが示された（引用文献①）。

UC 関連癌の発癌経路は炎症性粘膜→異形成→癌という経路であり、この発癌経路における CD44 分子の動態や、他の因子を検討することで UC 関連発癌について重要な知見が得られることが期待された。

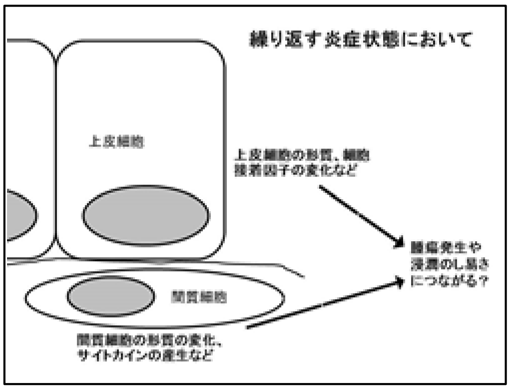
また、大腸の発癌においては、上皮側の因子のみならず、間質の因子も重要な役割を有していると考えられ、これまでも Hsp47 の発現に着目してきたが、他のタンパクの関与も予想された。

２．研究の目的

UC の炎症性粘膜や腫瘍性粘膜における CD44 の発現を検討し、その UC 関連発癌における意義を明らかにする。

Proteomics 解析により、炎症性粘膜において特異的に発現が増減しているタンパクを同定し、炎症性粘膜の上皮や間質における変化を明らかにする。

図１　Proteomics で想定した因子について



３．研究の方法

A 潰瘍性大腸炎関連軽度異形成 44 病変、高度異形成 49 病変、浸潤癌 52 病変と、大腸の通常の軽度異型腺腫、高度異型腺腫、癌を対象として、CD44 細胞外ドメインの免疫組織化学染色を行い、発現強度と面積から発現をスコア化して比較した。

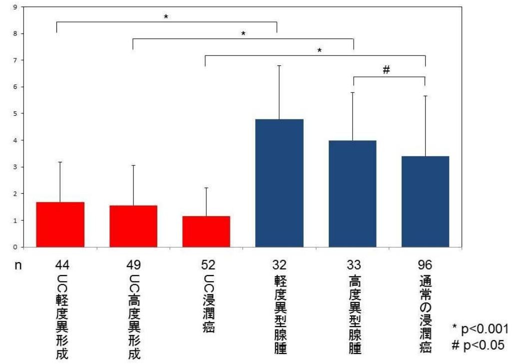
B UC の炎症性粘膜の凍結材料３例と健常者の粘膜３例を用いて、抽出タンパクを２次元電気泳動を行って分離し、UC の粘膜で有意に発現が増加ないし減少しているスポットを検索した。得られたスポットからゲルを切り出し、質量分析により同定した。

C さらに、同定した蛋白について、潰瘍性大腸炎の炎症性粘膜、憩室炎の粘膜などにおける発現を免疫組織化学により検討した。

４．研究成果

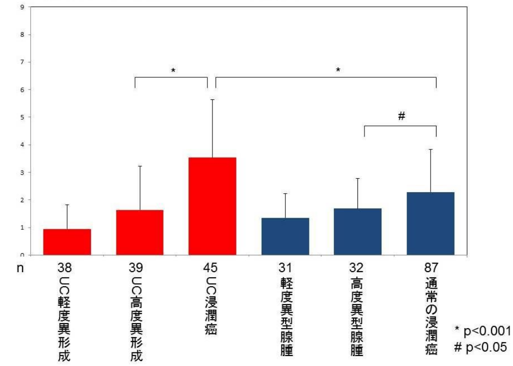
A UC 関連病変では CD44 の細胞外ドメインは、軽度異形成、高度異形成、浸潤癌において、それぞれ 1.7±1.5, 1.6±1.5, 1.2±1.1 の発現スコアであった。それに対して、通常の大腸腫瘍では、軽度異型腺腫、高度異型腺腫、癌においてそれぞれ 4.8±2.0, 4.0±1.8, 3.4±2.3 のスコアであり、UC 関連病変では対応する大腸腫瘍に比して有意に発現の減少がみられた。

図２　CD44 細胞外ドメインの発現



CD44 の細胞外ドメインを切断するタンパク分解酵素 Adam17 の異形成、癌細胞における発現を同様に免疫組織化学的に検討したところ、潰瘍性大腸炎関連病変で有意に発現が増加していた。

図３　Adam17 の発現



B　大腸粘膜凍結組織から行った Proteome 解析において、UC 粘膜で発現が減少している蛋白の１つとして Carbonic anhydrase 2 が同定された。

この Carbonic anhydrase 2 の発現を、正常粘膜、UC 粘膜、憩室炎粘膜において免疫

組織化学で検討したところ、Carbonic anhydrase 2 の発現は、正常粘膜、憩室炎粘膜に比して、有意に UC 粘膜で低下していることが示された。同じ活性を有する Carbonic anhydrase 9 では差は認められず、Carbonic anhydrase 2 に特異的な変化であることが示唆された。

図４　Carbonic anhydrase 2, 9 および HIF の UC 粘膜、憩室炎粘膜における発現

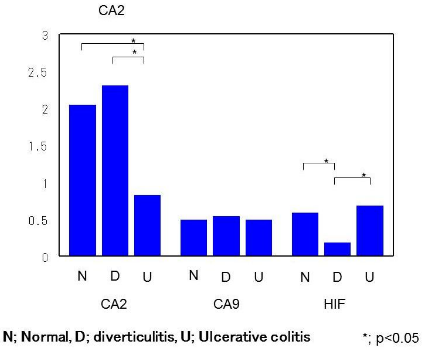
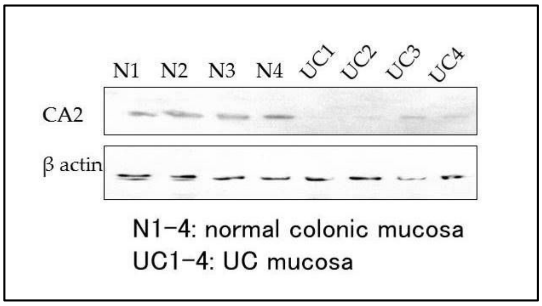


図５　Carbonic anhydrase 2 の発現



これらの結果から、①UC 関連の発癌において、CD44 の細胞外ドメインの切断による発現低下がその早期から認められ、腫瘍細胞における Adam17 の高発現と合わせて考えると、UC 関連発癌に特異的な変化であると思われた。UC 関連癌は低分化になりやすいなどの特徴的浸潤様式があり、CD44 の発現の変化が関係している可能性が示唆された。

また、潰瘍性大腸炎の粘膜では Carbonic anhydrase 2 が特異的に発現低下していた。Carbonic anhydrase は、二酸化炭素を重炭酸イオンに変換する酵素であり、大腸管腔内の pH の調整に寄与していることが考えられるが、UC の炎症粘膜では、憩室炎のような通常の炎症と異なり、粘膜の微小環境の調整が破綻している可能性が考えられる。

このように、UC の発癌系および炎症粘膜は、通常の発癌や炎症と明らかに異なる性質を有しており、今後、発癌予防や、抗炎症療法に対するターゲットを考える上で重要な所見と考えられる。

＜引用文献＞

①Mikami T, Yoshida T, Numata Y, et al. Invasive behavior of ulcerative colitis-associated carcinoma is related to reduced expression of CD44 extracellular domain: comparison with sporadic colon carcinoma Diagnostic Pathology 6:30, 2011

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　１　件）

① Xu CJ, Mikami T, Nakamura T, Tsuruta T, Nakada N, Yanagisawa N, Jiang SX, Okayasu I Tumor budding, myofibroblast proliferation, and fibrosis in obstructing colon carcinoma: the roles of Hsp47 and basic fibroblast growth factor. Pathology Research and Practice 209:69-74, 2013　査読有

〔学会発表〕（計　３　件）

① 仲田典広、三上哲夫、一戸昌明、柳澤信之、岡安勲、村雲芳樹　潰瘍性大腸炎粘膜および潰瘍性大腸炎関連癌における Carbonic anhydrase 2 発現の検討　第 73 回日本癌学会学術総会　2014 年 9 月 27 日　パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

② 仲田典広、三上哲夫、一戸昌明、柳澤信之、岡安勲、村雲芳樹　潰瘍性大腸炎粘膜および潰瘍性大腸炎関連癌における Carbonic anhydrase 2 発現の検討　第 103 回日本病理学会総会　2014 年 4 月 24 日　広島国際会議場（広島県広島市）

③ 三上哲夫、林宏之、沼田賀子、蒋世旭、仲田典広、一戸昌明、岡安勲、村雲芳樹　潰瘍性大腸炎関連腫瘍では早期から CD44 の発現が低下している　第 102 回日本病理学会総会　2013 年 6 月 7 日　ロイトン札幌（北海道札幌市）

〔図書〕（計　０　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０　件）

○取得状況（計　０　件）

〔その他〕

なし

６．研究組織

(1)研究代表者

三上　哲夫（MIKAMI, Tetuo）

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：９０２８６３５２

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
佐藤　雄一（SATO, Yuichi）
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号：　３０１７８７９３