

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 14 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790729

研究課題名(和文) バレット食道の病態・癌化に関わるエピゲノム異常の解析

研究課題名(英文) Epigenomic analysis for Barrette's esophagus and carcinomas

研究代表者

大坪 武史 (Otsubo, Takeshi)

独立行政法人国立国際医療研究センター・消化器疾患研究部・特任研究員

研究者番号：00623034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食道癌発症機構の解明を目指し、バレット腺癌及び食道扁平上皮癌におけるエピジェネティックな遺伝子発現異常の解析を行った。まず、バレット食道における糖鎖発現を検討した結果、正常腸で発現が認められるSda糖鎖が、バレット食道の一部で異所的発現し、バレット食道腺癌ではDNA高メチル化を伴い発現低下することを明らかにした。食道扁平上皮癌を用いた網羅的DNAメチル化解析及び発現解析の結果、細胞増殖抑制及び細胞接着等に関わる遺伝子群がDNAメチル化を介して発現低下していることを明らかにし、バレット食道癌及び食道扁平上皮癌にエピジェネティック異常が密接に関わる事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to identify the epigenetic alterations underlying Barrett's esophagus (BE) and esophageal squamous cell carcinomas (ESCCs). First, we assessed the abnormal glycosylation in human esophageal specimens, and found that cell surface expression of Sd(a) were ectopically induced in BE, whereas down-regulated in BE adenocarcinomas (BEAs) with promoter DNA hypermethylation. Second, we performed methylome and transcriptome analyses with ESCC tissues, and found that some promoter DNA hypermethylated genes were functionally related to cell proliferation and adhesion of ESCC cell lines. Thus, we demonstrated that the aberrant epigenetic alterations positively contribute to BEAs and ESCCs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学(食道、胃、十二指腸) エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

バレット食道は、胃食道逆流症による傷害からの修復過程で生じる異常分化上皮であり、腺癌発症の母地となるため臨床的に重要視されている。本邦でもバレット腺癌の発生率は急速に増加しているが、バレット食道からの腺癌発生の分子機構の詳細は不明であり、サーベイランス、精密診断および治療法の開発のためにはその解明が急務である。申請者らのグループは、消化管の慢性炎症性疾患である潰瘍性大腸炎、及びそれに伴う炎症発癌過程において、正常型 Sda 糖鎖の合成酵素遺伝子群の発現がエピジェネティック機構により転写抑制されていることを見出し、消化管の炎症・発癌にエピゲノム変化が密接に関与していることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、胃食道逆流症による食道の障害と、続く修復過程における糖鎖発現変化をバレット食道組織を用いて詳細に検討し、見出される糖鎖発現異常と関連するエピゲノム変化を網羅的に解析することで腺癌発生に至る病態の解明を目指す。さらに、アジアでは発症率がバレット食道腺癌よりも高く、喫煙・飲酒により誘発されるエピゲノム異常が発癌に密接に関わっている食道扁平上皮癌を対象としても網羅的エピゲノム異常解析を行い、その発症メカニズムをバレット食道腺癌と比較する。

3. 研究の方法

バレット食道組織を用いた Sda 糖鎖発現解析は抗 Sda 糖鎖抗体 KM694 を用いた免疫組織染色により行い、同時に抗ムチン抗体 (MUC2、MUC5AC、ないし MUC6) との多重染色を行うことで胃型、腸型の分類を行った。Sda 糖鎖合成酵素遺伝子のメチル化状態は bisulfite pyrosequence 法を用いて評価した。網羅的 DNA メチル化解析はメチル化 DNA 免疫沈降シーケンシング法 (MeDIP-seq 法) を、網羅的遺伝

子発現解析は serial analysis of gene expression (SAGE)-seq 法を施行し、次世代シーケンサーを用いて解析した。

4. 研究成果

バレット食道症例の生検検体を対象として免疫組織染色を行い、その糖鎖発現を検討した。正常胃および小腸・大腸で発現が認められる Sda 糖鎖は、正常食道扁平上皮細胞には発現していなかった。バレット食道検体の一部では Sda 糖鎖の異所的発現が見られたが、ムチン発現による胃型 (MUC5AC、MUC6) ないし腸型 (MUC2) との関連は認められなかった。Sda 糖鎖合成遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態を bisulfite pyrosequence 法により定量した結果、正常食道では低メチル化状態であったのに対し、バレット食道生検およびバレット食道腺癌ではメチル化レベルは著しく高かった。また、Sda 糖鎖陽性バレット食道生検と比較して、Sda 糖鎖陰性バレット食道生検では Sda 糖鎖合成遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化レベルは有意に高かった。以上より、バレット食道に Sda 糖鎖が異所的に発現すること、バレット食道腺癌に至る過程で、Sda 糖鎖合成遺伝子のプロモーター領域に DNA メチル化異常が生じることにより再び Sda 糖鎖が消失することが明らかとなった。従って、バレット食道に異所的に発現する Sda 糖鎖はバレット食道腺癌に至る過程で生じる DNA メチル化異常を反映する指標となり得ることが示唆された。

続いて、食道扁平上皮癌及び同一症例の正常食道粘膜組織より抽出した DNA 及び RNA を用い、MeDIP-seq 法によるメチローム解析、SAGE-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行った。正常食道粘膜と比較した場合、食道扁平上皮癌においては、159 個の遺伝子が発現低下しており、その内 56 個の遺伝子においては、その転写開始点近傍 (-10kb--+2kb) に DNA 高メチル化が認められた。また、食道扁平上皮癌細胞株を用いた

DNA 脱メチル化剤 5-Aza-2'-deoxycytidine 処理により、これらの遺伝子の発現回復を確認した。Sda 糖鎖合成酵素遺伝子は、これらの食道扁平上皮癌において DNA 高メチル化により発現抑制される遺伝子に含まれていなかったことから、胃食道逆流症からバレット食道腺癌に至る過程で生じる DNA メチル化異常と、喫煙・飲酒により誘発されるメチル化異常を背景として生じる食道扁平上皮癌の発症に関するエピゲノム異常は異なることが示された。さらに、食道癌細胞株を用いて、食道扁平上皮癌において DNA 高メチル化により発現抑制される遺伝子の機能解析を行った。これらの遺伝子の中には、in vitro およびヌードマウスの皮下移植時に細胞増殖抑制的機能を有する遺伝子、及び、細胞外基質との接着や上皮細胞の重層等の上皮細胞の分化に関わる遺伝子が含まれていることを新たに見出した。

これらの解析より見出されたエピゲノム変化は、食道扁平上皮癌、バレット食道腺癌の新たな診断マーカーに成り得る可能性が考えられる。

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 2 件)

1. Obata, Y., Furusawa, Y., Endo, T. A., Sharif, J., Takahashi, D., Atarasho, K., Nakayama, M., Onawa, S., Fujimura, Y., Takahashi, M., Ikawa, T., Otsubo, T., Kawamura, Y. I., Dohi, T., Tajima, S., Masumoto, H., Ohara, O., Honda, K., Hori, S., Ohno, H., Koseki, H., Hase, K. The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol*, **15(6)**: 571-579, 2014
2. Inagaki-Ohara, K., Mayuzumi, H., Kato, S., Minokoshi, Y., Otsubo, T., Kawamura,

Y. I., Dohi, T., Matsuzaki, G., Yoshimura, A. Enhancement of leptin receptor signaling by SOCS3 deficiency induces development of gastric tumors in mice. *Oncogene*, **33(1)**: 74-84, 2014

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 大坪 武史、Genome-Wide Epigenomic Analysis of Lamina Propria Mononuclear Cells of Inflammatory Bowel Disease、Digestive Disease Week、San Diego, CA, USA、2012 年 05 月 22 日
2. 河村 由紀、Genome-wide Epigenomic Analysis of Lamina Propria Mononuclear Cells Isolated from Patients with Inflammatory Bowel Disease、*The 6th Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology*、東京、日本、2012 年 11 月 15 日
3. 大坪 武史、潰瘍性大腸炎粘膜固有層における少数の T 細胞及びマクロファージ/樹状細胞を用いたエピゲノム解析、第 85 回日本生化学会大会、福岡、日本、2012 年 12 月 16 日
4. 萩原輝記、バレット食道および食道腺癌細胞におけるエピゲノム解析、第 85 回日本生化学会大会、福岡、日本、2012 年 12 月 16 日
5. 土肥多恵子、DNA methylation in cell regeneration and cancer in ulcerative colitis、*The 2nd JSGE International Topic Conference-Inflammation and Carcinogenesis of Digestive Organs*、鹿児島、日本、2013 年 3 月 23 日
6. 萩原輝記、バレット食道および食道腺癌細胞における DNA メチル化異常、第 86 回日本生化学会大会、横浜、日本、2013 年 9 月 13 日
7. 大坪 武史、Cell type-specific, genome-wide epigenetic analysis for lamina propria cells isolated from the

colon with ulcerative colitis、第42回日本免疫学会学術総会、幕張、千葉、日本、2013年12月11日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 武史 (OTSUBO, Takeshi)

国立国際医療研究センター・消化器疾患研究部・特任研究員

研究者番号：00623034

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：