

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08945

研究課題名(和文) 食道潰瘍の創傷治癒から観た新たなバレット食道発生の機序について

研究課題名(英文) Impaired tissue contraction in wound healing promotes development of Barrett's esophagus

研究代表者

浅沼 清孝 (Kiyotaka, Asanuma)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10431553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食道腺癌(EAC)の主要リスクファクターであるバレット食道(BE)は胃食道逆流症(GERD)による食道潰瘍の治癒過程で発生する。我々はこれまで食道胃接合部(EGJ)で高濃度の一酸化窒素(NO)が発生しBA発生を促進することを報告してきた。本研究では不死化ヒト食道線維芽細胞を用いて、NOが創傷治癒における組織収縮を阻害し、さらに α -SMAの発現が低下し筋線維芽細胞への分化を抑制した。またラットBEモデルの間葉系組織では α -SMAの発現が低下した。傷害組織の正常な上皮再生・治癒過程の阻害がBE発生に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Barrett's Esophagus (BE) develops in the process that esophageal epithelium damaged by acid reflux heals. We have reported that development of BE is promoted by high levels of nitric oxide (NO) which arise in esophageal lumen by chemical reaction between acidified gastric juice and salivary nitrite. In the current study using immortalized human esophageal fibroblasts, we revealed that NO reduced tissue contraction ability in wound healing. Moreover, NO inhibited differentiation of myofibroblasts by decreasing expression in α -SMA in the cells. These findings suggest that impaired epithelial wound healing in esophagus could contribute to the development of BE, which is primary risk factor of esophageal adenocarcinoma.

研究分野：消化器内科

キーワード：Barrett's esophagus Nitric oxide Wound contraction RhoA fibroblast

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦において欧米と同様に食道腺癌が増加している。食道腺癌の発生源地であるバレット食道は胃食道逆流症 (GERD) により引き起こされることが明らかとなっている。本邦においてピロリ菌感染率の低下に伴いGERD患者の増加が顕著であることから、今後、更なる食道腺癌の増加が危惧されている。バレット食道はGERDによって扁平上皮細胞で構成される下部食道粘膜にびらん性食道炎が発生し、その後、円柱上皮細胞に置換され治癒した状態である。しかし全てのびらん性食道炎患者からバレット食道が発生することはなく、その発生機序が未だ不明であることから、異常治癒である円柱上皮化を未然に予見し防止することは临床上難しいのが現状である。そこで我々はバレット食道発生過程における下部食道粘膜の創傷治癒に着目した。バレット食道発症患者と非発症患者の間にはGERDによって傷害された粘膜が治癒する過程に違いがあり、バレット食道では治癒過程に異常が生じていると仮定した。創傷治癒は組織収縮による傷害面積の縮小と上皮再生に大別されるが、活性化線維芽細胞から分化した筋線維芽細胞による組織収縮が治癒を大きく左右する。組織収縮の抑制は創傷治癒を遅延し、また筋線維芽細胞への分化抑制は傷害組織におけるコラーゲン産生の低下を招き組織抵抗力の減弱から傷害物質の長期暴露と正常な上皮組織の再生を阻害する。この組織収縮において Ras homolog gene family member A (RhoA) が中心的役割を担っている。正常組織では RhoA は不活化体である GDP-RhoA として存在するが、傷害組織では活性型 RhoA である GTP-RhoA が、myosin light chain (MLC) をリン酸化し細胞収縮を引き起こす。近年、食道胃接合部で限局性に発生する高濃度一酸化窒素 (NO) が発生することが明

らかとなった。ヒトが緑黄色野菜など硝酸塩を多く含む食事を摂取すると、腸唾液再循環により唾液中における亜硝酸塩が高濃度に保たれる。唾液とともに嚥下されたこの亜硝酸塩がアスコルビン酸触媒下に胃酸と瞬時に化学反応し高濃度 NO が発生する。我々はこれまで GERD 患者では高濃度 NO が下部食道内腔で発生し、逆流性食道炎を増悪させ更にバレット食道発生を促進することを報告した。しかし、この NO がびらん性食道炎の創傷治癒にどのような影響を与えるか検討した研究はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食道内腔で発生する高濃度 NO が間葉系細胞の RhoA 発現に影響を及ぼし食道潰瘍創傷治癒における組織収縮を阻害することで治癒遅延を来し、バレット食道発生に寄与することを証明することである。

3. 研究の方法

不死化ヒト食道線維芽細胞 (BEF-hT) を用いた検討

BEF-hT を pH 5.5 400 μ M 酸性胆汁酸で 1 時間刺激し、リン酸緩衝液で洗浄後に i) 培養液のみ、ii) 250 μ M NOC-9 で 1 時間刺激した。

(1) 組織収縮能測定: 上記刺激を 3 回 6 時間施行し 1 時間ごとに collagen-base 組織収縮アッセイ (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を用いて収縮能を測定した。

(2) 活性化 RhoA (GTP-RhoA) 発現測定: i) 細胞を pH 5.5 400 μ M 酸性胆汁酸で刺激、ii) 酸性胆汁酸刺激 1 時間後に 250 μ M NOC-9 を投与し、投与前 (0 分)、5 分後、15 分後に細胞を回収し GTP-RhoA をブルダウン法 (Cytoskeleton, Denver, CO, USA) にて測定した。

(3) phospho-myosin light chain (pMLC) 発現測定: 1) 記述の細胞刺激を 3 回 6 時間

後と、同様の刺激を6日間施行後に細胞を回収し western blotting にて測定した。一次抗体は pMYL9 (Thr19, Ser19) (Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、2次抗体は抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた。

(4) α -SMA 発現と TGF- β の mRNA 発現測定: 細胞刺激を6日間施行後に RNeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherland) を用いて mRNA を抽出し SYBR Green I (PowerSYBR Green PCR Master Mix; Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) と StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた RT-PCR 法にて発現を測定した。primer は、 α -SMA; TAGCACCCAGCACCATGAAG (F), CTGCTGGAAGGTGGACAGAG (R)、TGF- β ; GAGCCCTGGACACCAACTAT (F), GACCTTGCTGTACTGCGTGT (R)、内因性コントロールとして GAPDH; TCGACAGTCAGCCGCATCT (F), AGTAAAAGCAGCCCTGGTGA (R) を用いた。各遺伝子発現は $\Delta\Delta$ CT 法で計測した。動物モデルを用いた検討

8週齢オス Wistar rat を用いたバレット食道モデル (Zhang., et al. 2007) に、水と食餌に亜硝酸塩とアスコルビン酸を8週間投与し食道内腔で NO を発生させた。このモデルで認められたバレット食道粘膜とその直下の間葉系組織における α -SMA と vimentin 発現を蛍光免疫染色にて測定した。パラフィン包埋切片に1次抗体として anti-mouse monoclonal α -SMA antibody (Abcam, Cambridge, UK) と anti-rabbit monoclonal vimentin antibody (Abcam)、2次抗体として Alexa Flour 488 標識 anti-mouse IgG (Cell signaling) と Alexa

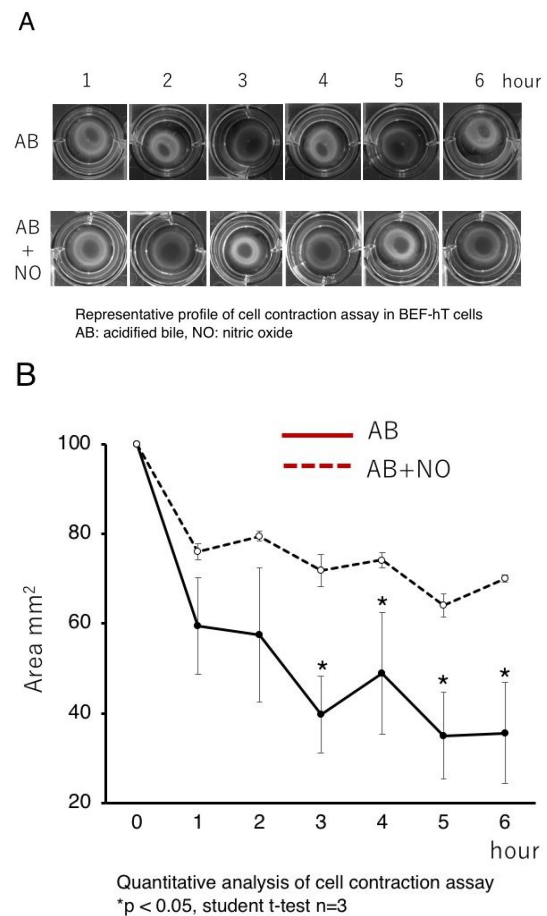
Flour 555 標識 anti-rabbit IgG (Cell signlaing) を用いた。

4. 研究成果

NO による組織収縮抑制

(1) NO 電極で培養液中 NO 濃度を測定し、250 μ M NOC-9 投与によって最大 14 μ M に達した (supplement 1A)。これはヒト食道内腔において観察される濃度と同程度であった。次に酸性胆汁酸 (acidified bile; AB) 刺激による細胞生存率は NOC-9 投与 (NO) の有無で有意差を認めなかった (supplement 1B)。AB 投与による細胞収縮は無刺激コントロール群と同程度に時間依存性に収縮を認めた (data not shown)。しかしこの細胞収縮は NOC-9 投与にて抑制された (Figure 1)。

Figure 1

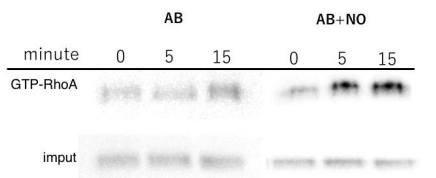


(2) 酸性胆汁酸と NO による RhoA 活性化 AB 刺激によって活性化 RhoA である GTP-RhoA 発現増加を認めた (Figure 2)。しかし引き続き NOC-9 投与によっても

GTP-RhoA 発現は増加した。

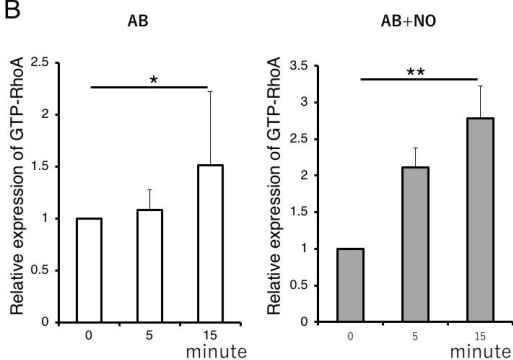
Figure 2

A



Representative profile of western blotting for GTP-RhoA expression using immunoprecipitation in BEF-hT cells

B

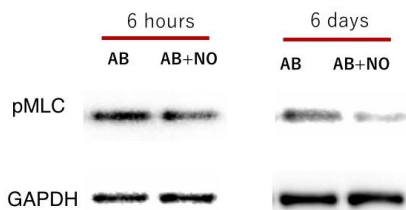


Quantitative analysis of expression levels of GTP-RhoA
The values were relative expression level to one at 0 time point.
*, **p < 0.05, student t-test, N=3

(3) NO による phospho-myosin light chain 発現低下

AB 投与による phospho-myosin light chain (pMLC) 発現増加は NO 投与によってその発現が抑制された (Figure 3)。さらに 6 日間長期投与でも NO 投与により pMLC 発現は低下が維持されていた。

Figure 3



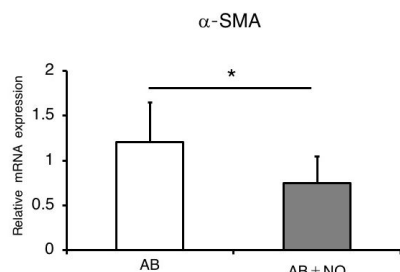
Representative profile of western blotting analysis in BEF-hT cells after 6-hour or 6-day treatment
pMLC: phospho-myosin light chain, AB: acidified bile, NO: nitric oxide

(4) 酸性胆汁酸と NO の長期投与による α -SMA ならびに TGF- β 発現低下

AB と NO の 6 日投与により筋線維芽細胞分化の指標である α -SMA は mRNA とタンパクレベル療法で低下した (Figure 4)。

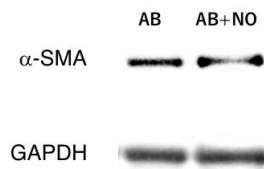
Figure 4

A



mRNA expression levels of α -SMA in BEF-hT cells after 6-day treatment, *p < 0.05, student t-test, N=3
AB: acidified bile, NO: nitric oxide

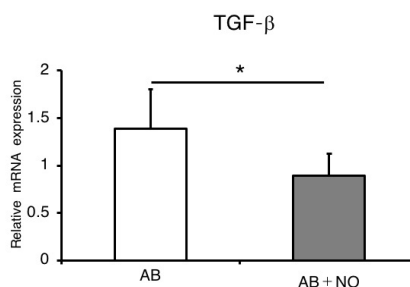
B



Representative profile of western blotting analysis for α -SMA expression in BEF-hT cells after 6-day treatment
AB: acidified bile, NO: nitric oxide

また TGF- β 発現も NO 投与によって mRNA の低下を認めた (Figure 5)。

Figure 5

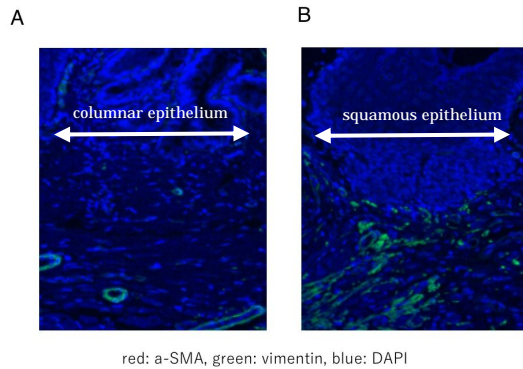


mRNA expression levels of TGF- β in BEF-hT cells after 6-day treatment, *p < 0.05, student t-test, N=3
AB: acidified bile, NO: nitric oxide

(5) 動物モデルにおけるバレット粘膜下の α -SMA 発現

バレット粘膜下の間葉系組織における α -SMA 発現は扁平上皮間葉系組織と比較し低下を認めた (Figure 6)。

Figure 6



考察

今回の study で NO は線維芽細胞の MLC のリン酸化を低下させ組織収縮を抑制した。さらに α -SMA 発現を抑制することで筋線維芽細胞分化を阻害し、TGF- β 発現を低下させることで創傷治癒遅延に關与した。BA 粘膜の間葉系組織での α -SMA 発現が認められたことから、食道内腔で発生する高濃度 NO は食道粘膜傷害の正常な治癒を遅延させることで、BA 発生に關与すると考えられた。

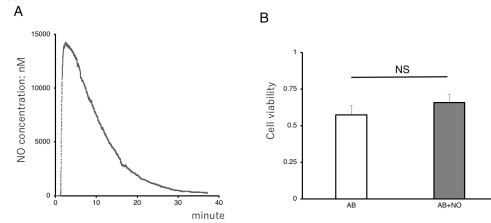
活性型 RhoA である GTP-RhoA は Rho-associated protein kinase (ROCK)活性化を介してミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (MLCP)をリン酸化することでその酵素活性を阻害し MLC のリン酸化を促進することで細胞収縮をおこす。NO は pMLC 発現を低下させ組織収縮を抑制したが、GTP-RhoA 発現を促進した。高濃度 NO は GTP-RhoA の活性化中心に存在する cystein 残基をニトロ化し活性を阻害することが報告されていることから、この機序が細胞収縮抑制に關与した可能性が考えられた。

TGF- β は活性化した線維芽細胞である筋線維芽細胞から分泌され創傷治癒を促進する因子として重要である。NO がこれらを抑制することで傷害された食道扁平上皮が正常に増殖し治癒することを阻害し、異常治癒である円柱上皮を促進することに繋がると考えられた。

現在、GST-RhoA ニトロ化の有無をピオチンスイッチアッセイにて検討中で、今年度中の

論文作成と学会発表を予定している。

Supplement 1



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0件)

[学会発表](計0件)

[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

浅沼 清孝 (ASANUMA, Kiyotaka)
 東北大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：10431553

(2) 研究分担者

飯島 克則 (IJIMA, Katsunori)
 秋田大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：60375003

(3) 研究協力者

藤谷 拓 (FUJIYA, Taku)
 東北大学・大学院医学系研究科・消化器病態学分野