

令和元年5月10日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05255

研究課題名(和文)炎症関連発がんにおける幹細胞のがん化機構の解明とその予防法の探索

研究課題名(英文)Carcinogenic mechanisms of stem cells in inflammation-related cancer and its prevention

研究代表者

村田 真理子(Murata, Mariko)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10171141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症関連発がんにおいては、炎症条件下で産生される活性酸素/窒素種によるDNA損傷・突然変異の蓄積やエピゲノム異常が、傷害された組織の修復に出現する幹細胞に生じ、がん進展に寄与すると想定される。我々はインジウム化合物がHMGB1-RAGE経路を介して肺上皮細胞に8-nitroguanineを生成することを明らかにした。上咽頭癌組織では、幹細胞マーカーCD44v6およびALDH1A1の陽性率が有意に高く、ニトロ化DNA損傷を確認した。タイ肝吸虫感染胆管癌組織において、がん幹細胞マーカーCD44v9と炎症関連分子COX2およびS100Pの高発現を示した。炎症が幹細胞がん化に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症および慢性炎症が全世界の発がん要因の約25%を占めると推定されている。本研究の成果として、炎症が幹細胞がん化に寄与する可能性が示されたことは、抗炎症物質ががん予防に有効である疫学研究結果を支持するものであり、学術的意義は高い。また、炎症を促進する経路のリガンドとしてHMGB1やS100Pの寄与を明らかにしており、これらを標的とする創薬がなされれば、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Under chronic inflammation, reactive oxygen / nitrogen species are produced from both inflammatory cells and epithelial cells. Inflammation-related cancers are characterized by mutagenic DNA lesions, such as 8-nitroguanine, accumulation of mutation, and epigenetic alteration. Tissue injury may activate stem cells for tissue regeneration under inflammatory microenvironment. We demonstrated that indium compounds induced inflammation-specific 8-nitroguanine formation in lung epithelial cells via HMGB1-RAGE pathway. We found the formation of 8-nitroguanine in stem cell marker CD44v6 and ALDH1A1-positive cancer cells. Liker fluke-infested cholangiocarcinoma (CCA) exhibited a higher level of CD44v9 expression than in sporadic CCA tissues, and no CD44v9 staining in the normal bile duct cells. We observed significantly higher expression of inflammation-related markers, S100P and COX-2, in liker fluke-infested CCA tissues. It is suggested that inflammation may associate cancer stem cells.

研究分野：環境腫瘍学

キーワード：がん 炎症 幹細胞 8-ニトログアニン エピゲノム異常

1. 研究開始当初の背景

わが国においては1981年以来現在に至るまで国民の死亡原因の第1位を悪性新生物が占めてきた。感染症および慢性炎症が全世界の発がん要因の約25%を占めると推定されており、炎症は重要なリスク要因である。炎症関連発がんにおいては、慢性炎症条件下で炎症細胞および上皮細胞より産生される活性酸素/窒素種によるDNA損傷が重要である。炎症関連発がんにおいて傷害された組織の修復に際し、幹細胞が活性化され、炎症局所に出現すると考えられる。炎症由来の活性酸素や活性窒素種により幹細胞のDNAが損傷されて、突然変異の蓄積やエピゲノム異常が生じ、発がんに至ると想定される。炎症の増強に関わる因子として、終末糖化産物受容体(receptor of advanced glycation end-product: RAGE)とそのリガンドによる活性化が重要であることが明らかになりつつある。代表的なリガンドとして核内タンパク HMGB1(high mobility group box 1)やヒストン、断片化したDNA、S100タンパクなどがある。この経路によりNF- κ Bやインターフェロン調節因子が活性化されると、IL-6などの炎症性サイトカイン分泌が増強され、炎症細胞の組織への遊走など慢性炎症性微小環境が成立する。これらを背景として、炎症関連発がんにおける幹細胞のがん化機構におけるこれらの炎症関連分子の寄与を検討する

2. 研究の目的

本研究は、慢性炎症とがんの進展を結ぶ機構としてリガンドによるRAGE経路の活性化に注目するとともに、発がん過程における幹細胞のがん化と、それに関わる分子を解析することにより、がん化機構を解明することを目指し、がん予防および治療に資する方策を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

インジウム化合物等で処理したヒト培養細胞あるいは患者標本を免疫化学染色法を用いて、DNA損傷塩基(8-ニトログアニン, 等)、炎症関連分子(HMGB1, S100P, 等)、幹細胞マーカー(CD44v6, CD44v9, ALDH1A1, 等)を解析した。また、培養細胞・患者試料よりRNAおよびDNAを抽出し、cDNAおよびバイサルファイト処理DNAを得た。リアルタイムPCRを用いて遺伝子発現およびmicroRNA発現を解析し、また、メチル化感受性/依存自性制限酵素処理したDNAによりDNAメチル化定量解析を行った。癌細胞株に遺伝子発現ベクターあるいはsiRNAをトランスフェクションし、候補遺伝子の機能解析を行った。また、ヌードマウス皮下への癌細胞移植によりin vivo解析を行った。

4. 研究成果

(1)インジウム化合物

フラットパネルディスプレイなどの製造に使用されるインジウム化合物は間質性肺炎や肺癌などの健康障害が懸念されている。マクロファージ培養細胞であるRAW 264.7を酸化インジウム(酸化インジウムスズ(ITO)の9割を占める)で処理したところ、一酸化窒素(NO)合成酵素の発現上昇とNOの生成が認められた(J Occup Health. 2018)。また、肺上皮細胞A549をインジウム化合物(ITO, 酸化インジウム, 塩化インジウム)で処理し、炎症関連DNA損傷とその機序を検討した。インジウム化合物は低濃度においても8-nitroguanineを生成し、その生成にRAGEおよびHMGB1が関与することを明らかにした。HMGB1は幹細胞の遊走と増殖を誘導することが知られており、炎症が幹細胞をがん化する可能性が示唆された(第89回日本衛生学会総会、2019年2月)。

(2)Epstein-Barrウイルス感染上咽頭癌

炎症により特異的に生じるニトロ化DNA損傷に注目し、Epstein-Barrウイルス感染上咽頭癌組織における幹細胞マーカー陽性細胞での局在について検討した。その結果、がん組織では非がん組織に比べ、ニトロ化DNA損傷塩基、幹細胞マーカーCD44v6およびALDH1A1陽性率が有意に高く、幹細胞マーカー陽性細胞でのニトロ化DNA損傷が確認された。さらに、上咽頭癌由来細胞株では上咽頭不死化細胞に比べ、CD44v6およびALDH1A1のタンパク発現レベルが高く、フローサイトメーターによりダブルポジティブ細胞の割合が有意に高いことが確認された(Mediators Inflamm, 2016)。

(3)頭頸部腫瘍

炎症因子である喫煙や飲酒、ウイルス感染が発がんリスクと考えられる頭頸部扁平上皮癌におけるmicroRNAの役割について検討した。がん組織において有意に発現が低下しているlet-7cを頭頸部扁平上皮癌細胞株に安定導入したところ、コントロールベクター導入細胞に比べ、細胞増殖、コロニー形成および細胞遊走が有意に抑制された。また、同細胞をヌードマウス皮下移植し、腫瘍塊形成、および浸潤能が抑制されることを確認した。let-7cがinsulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)やhigh mobility group AT-hook 2 (HMGA2)の発現を低下させることでがん抑制作用を示すことを明らかにした(Oncotarget, 2018)。

(4)タイ肝吸虫感染胆管癌

タイ肝吸虫感染は国際がん研究機関 IARC により、「ヒトに対し発がん性あり」(Group 1)と評価されている。タイ東北部では川魚を生食する習慣があり、タイ肝吸虫感染が寄生する魚の摂食が繰り返し起こり、慢性炎症となることが、発がんに大きく寄与することを示してきた。また、繰り返す炎症により組織損傷と幹細胞の活性化が胆管癌の進展に重要であることを明らかにしてきた。

我々はタイ肝吸虫感染胆管癌においてがん抑制遺伝子 Early B cell factor 1 (EBF1)の発現が有意に低く、さらに 8-oxodG 高値かつ EBF1 が低発現の群では予後が不良であることを見いだした。また、正常胆管細胞株に比べ、過酸化水素耐性株および胆管癌細胞株で EBF1 発現が有意に低かった。興味深いことに、正常胆管細胞株において EBF1 をノックアウトすると、幹細胞マーカーである CD133 および Oct3/4 の発現が上昇し、また、細胞遊走能が高まった。すなわち、慢性的な酸化ストレスが EBF1 発現を低下させ、幹細胞のがん化に繋がる可能性が示唆された (Redox Biol, 2018)。

タイ肝吸虫感染胆管癌組織において、がん幹細胞マーカー CD44v9 および炎症関連分子を免疫組織染色法により検出した。CD44v9 は正常胆管細胞では染色されなかったが、胆管癌組織においては散発性胆管癌、タイ肝吸虫感染胆管癌ともに陽性であった。さらに、タイ肝吸虫感染胆管癌は散発性に比べ有意に高い CD44v9 の発現を確認した。炎症を促進する RAGE (receptor for advanced glycation end product) のリガンドのひとつである S100P および炎症などで誘導され、プロスタグランジンを合成して炎症を促進する COX-2 との関連を調べた。その結果、両者とも CD44v9 の発現と有意な正の相関が認められた。すなわち、CD44v9 は胆管癌の新規のがん幹細胞マーカー候補であり、炎症が重要な因子であることが示唆された (Mediators Inflamm, 2018)。

ヒト胆管癌由来培養細胞は、正常胆管細胞株に比べ、CD44v9 および抗酸化酵素遺伝子の発現が有意に高いことを見出した。CD44v9 の siRNA による発現抑制を行ったところ、細胞増殖が低下し、CD44v9 が胆管癌進展に寄与することを明らかにした(第 89 回日本衛生学会総会、2019 年 2 月)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 23 件)

Suwannakul N, Ma N, Thanan R, Pinlaor S, Ungarreevittaya P, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Kawanishi S, Murata M. Overexpression of CD44 variant 9: a novel cancer stem cell marker in human cholangiocarcinoma in relation to inflammation. *Mediators Inflamm*, 4867234, 査読有, 2018.

DOI: 10.1155/2018/4867234

He F, Ma N, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Zhang Z, Huang G, Takeuchi K, Murata M. Taurine exhibits an apoptosis-inducing effect on human nasopharyngeal carcinoma cells through PTEN/Akt pathways in vitro. *Amino Acids*, 50(12):1749-1758, 査読有, 2018.

DOI: 10.1007/s00726-018-2651-2

Murata M. Inflammation and cancer. *Environ Health Prev Med*. 23(1):50. 査読有, 2018.

DOI: 10.1186/s12199-018-0740-1

Hou B, Ishinaga H, Midorikawa K, Nakamura S, Hiraku Y, Oikawa S, Ma N, Takeuchi K, Murata M. Let-7c inhibits migration and epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma by targeting IGF1R and HMGA2. *Oncotarget*, 9(10):8927-8940. 査読有, 2018.

DOI: 10.18632/oncotarget.23826

Afroz T, Hiraku Y, Ma N, Ahmed S, Oikawa S, Kawanishi S, Murata M. Nitrate DNA damage in cultured macrophages exposed to indium oxide. *J Occup Health*, 60(2):148-155, 査読有, 2018.

DOI: 10.1539/joh.17-0146-OA

Armarmuntree N, Murata M, Techasen A, Yongvanit P, Loilome W, Namwat N, Pairojkul C, Sakonsinsiri C, Pinlaor S, Thanan R. Prolonged oxidative stress down-regulates Early B cell factor 1 with inhibition of its tumor suppressive function against cholangiocarcinoma genesis. *Redox Biol*, 14:637-644, 査読有, 2018.

DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.011.

Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Murata M. Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in the Multiple Steps of Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 18(8). 査読有, 2017.

DOI: 10.3390/ijms18081808

Zhao W, Ma N, Wang S, Mo Y, Zhang Z, Huang G, Midorikawa K, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M, Takeuchi K. RERG suppresses cell proliferation, migration and angiogenesis through ERK/NF- κ B signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 36, 88, 査読有, 2017.

DOI: 10.1186/s13046-017-0554-9

Zhao W, Mo Y, Wang S, Midorikawa K, Ma N, Hiraku Y, Oikawa S, Huang G, Zhang Z, Murata M, Takeuchi K. Quantitation of DNA methylation in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma by bisulfite amplicon sequencing. *BMC Cancer* 17, 489, 査読有, 2017.

DOI: 10.1186/s12885-017-3482-3

Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Oikawa S, Murata M. Nitrate and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells. *Genes Environ.* 38:26, 査読有, 2017.

DOI: 10.1186/s41021-016-0055-7

Wang S, Ma N, Zhao W, Midorikawa K, Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S, Zhang Z, Huang G, Murata M. Inflammation-Related DNA Damage and Cancer Stem Cell Markers in Nasopharyngeal Carcinoma. *Mediators Inflamm.*, 2016:9343460. 査読有, 2016.

DOI: 10.1155/2016/9343460

He F, Wei L, Luo W, Liao Z, Li B, Zhou X, Xiao X, You J, Chen Y, Zheng S, Li P, Murata M, Huang G, Zhang Z. Glutaredoxin 3 promotes nasopharyngeal carcinoma growth and metastasis via EGFR/Akt pathway and independent of ROS. *Oncotarget.* 7(24) 査読有, 2016.

DOI: 10.18632/oncotarget.9454

[学会発表](計72件)

Yifei Xu, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. RERG hypermethylation in circulating cell-free DNA of nasopharyngeal carcinoma: a potential hematological marker for screening. 第89回日本衛生学会学術総会 2019.

Nattawan Suwannakul, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata. Predominant expression levels of CD44 variants in cholangiocarcinoma cell line. 第89回日本衛生学会総会 2019.

Feng He, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. Taurine exhibits an anti-proliferation effect on human nasopharyngeal carcinoma cells in vivo. 第89回日本衛生学会学術総会 2019.

Sharif Ahmed, Tahmina Afroz, 馬寧, 川西正祐, 村田真理子, 平工雄介. Nitrate DNA damage in lung epithelial cells exposed to particulate and soluble indium compounds. 第89回日本衛生学会学術総会 2019.

村田真理子, 炎症関連発がん機構の解明とその予防. 日本産業衛生学会 東海地方会 産業衛生技術部会 第10回講演会 2018.

Feng He, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Zhe Zhang, Guangwu Huang, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. GDF10 is a candidate tumor suppressor gene inactivated by promoter hypermethylation in human nasopharyngeal carcinoma. 第77回日本癌学会学術総会 2018.

Nattawan Suwannakul, Ning Ma, Raynoo Thanan, Somchai Pinlaor, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata. A novel cancer stem cell biomarker CD44v9 in liver fluke-related cholangiocarcinoma. 第77回日本癌学会学術総会 2018.

Yifei Xu, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Zhe Zhang, Guangwu Huang, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. DNA methylation in circulating cell-free DNA of nasopharyngeal carcinoma. 第77回日本癌学会学術総会 2018.

Feng He, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. Taurine induces Apoptosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells through PTEN-mediated inhibition of Akt pathway in Vitro. The 21st International Taurine Meeting, 瀋陽・大連, 2018.

村田真理子, 炎症関連発がん機構の解明とその予防. 日本衛生学会学会賞受賞講演. 第88回日本衛生学会総会 2018.

Feng He, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Taurine inhibits proliferation and colony formation in nasopharyngeal carcinoma cells. 第88回日本衛生学会総会 2018.

Yifei Xu, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Novel epigenetic markers for Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma. 第88回日本衛生学会総会 2018.

Nattawan Suwannakul, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Shosuke Kawanishi, Mariko Murata. Expression of a novel cancer stem cell biomarker, CD44 variant 9, in human cholangiocarcinoma. 第88回日本衛生学会総会 2018.

Weilin Zhao, Ning Ma, Kaoru Midorikawa, Yingxi Mo, Zhe Zhang, Guangwu Huang, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. RERG suppresses cell proliferation and angiogenesis by inhibiting the ERK/NF- κ B/MMPs signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. 第76回日本癌学会学術総会 2017.

Feng He, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. Inhibitory effects of taurine on the proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. 第76回日本癌学会学術総会 2017.

Bo Hou, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma, Mariko Murata. Let-7c inhibits migration and epithelial-mesenchymal transition by targeting IGF1R and HMGA2 in head

and neck cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017.

Weilin Zhao, Kaoru Midorikawa, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Quantitative comparison of DNA methylation for biomarker in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma. 第 87 回 日本衛生学会学術総会 2017.

Feng He, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma, Mariko Murata. Increased expression of Glutaredoxin 3 promotes the proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma. 第 87 回日本衛生学会学術総会 2017.

Weilin Zhao, Shumin Wang, Kaoru Midorikawa, Zhe Zhang, Yingxi Mo, Guangwu Huang, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. PRKCB, a tumor suppressor, is epigenetically inactivated in nasopharyngeal carcinoma 第 75 回日本癌学会学術総会 2016.

Bo Hou, Kaoru Midorikawa, Hajime Ishinaga, Ning Ma, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata. Let-7c functions as a tumor suppressor by targeting HMGA2 in head and neck cancer. 第 75 回日本癌学会総会 2016.

②① Weilin Zhao, Shumin Wang, Kaoru Midorikawa, Ning Ma, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Mariko Murata. Hypermethylation of RERG promoter in nasopharyngeal carcinoma. 第 86 回日本衛生学会学術総会 2016.

②② Bo Hou, Kaoru Midorikawa, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma, Mariko Murata. Let-7c functions as a tumor suppressor by targeting IGF1R in head and neck cancer. 第 86 回日本衛生学会学術総会 2016.

②③ Bo Hou, Hajime Ishinaga, Kaoru Midorikawa, Ning Ma, Weilin Zhao, Shinji Oikawa, Yusuke Hiraku, Kazuhiko Takeuchi, Mariko Murata Tumor suppressing roles of let-7c in head and neck cancer. The 7th EMBO meeting 2016, Congress Center Rosengarten Ma Nnheim, Ger Ma Ny. 2016.

②④ 村田真理子, 発がんにおける DNA 損傷とエピゲノム異常の役割: 上咽頭癌での検討. 日本耳鼻咽喉科学会中部地方会連合会 2016.

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.medic.mie-u.ac.jp/eiseigaku/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 及川 伸二

ローマ字氏名: (OIKAWA, shinji)

所属研究機関名: 三重大学

部局名: 大学院医学系研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10277006

研究分担者氏名：平工 雄介

ローマ字氏名：(HIRAKU, yusuke)

所属研究機関名：福井大学

部局名：学術研究院医学系部門

職名：教授

研究者番号（8桁）：30324510

研究分担者氏名：翠川 薫

ローマ字氏名：(MIDORIKAWA, kaoru)

所属研究機関名：三重大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：リサーチアソシエイト

研究者番号（8桁）：20393366

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。