

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18590346
 研究課題名 (和文) 間質微細環境変化からみた p53 非依存性炎症性発癌の解明及び
 発癌予測システムの構築
 研究課題名 (英文) Analysis of p53-independent inflammatory carcinogenesis in the
 view of stromal microenvironmental change.
 研究代表者
 吉田 功 (YOSHIDA TSUTOMU)
 北里大学・医学部・講師
 研究者番号：90316943

研究成果の概要：

潰瘍性大腸炎を代表とする慢性炎症性疾患は長期罹患により高頻度に悪性腫瘍を併発する。その機序を明らかにするために、炎症巣の間質微細環境変化を遺伝子発現プロファイルの差異から抽出を試みた。間質組織マイクロダイセクションからのマイクロアレイ解析は条件が整わなかったが、炎症巣の *in vitro* 再現系において潰瘍性大腸炎特異的発現を示す遺伝子 CITED2 を明らかにした。CITED2 は炎症巣において早期に発現し、CBP/p300 と協同して p53 をアセチル化を介した安定化をもたらし、その下流分子の発現誘導を導きアポトーシスを惹き起こすことを明らかにした。潰瘍性大腸炎炎症巣においてもその CITED2 発現は炎症の活動性と相関していた。潰瘍性大腸炎においては腸内細菌が産生する酪酸によって CITED2-p53 系が活性化して上皮細胞の細胞死・びらんを来し、その炎症のトリガーとなっている可能性が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：炎症性発癌、潰瘍性大腸炎

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症を背景にした発癌経路のうち、潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)関連癌について研究代表者らはこれまで詳

細な検索を行い、通常の孤発性大腸癌に比してその発癌過程に大きな差違が認められること、特に p53 変異が発癌の早期段階で重要であることを見出した。更に

p53-p53R2 系の破綻による DNA 修復系の異常がその腫瘍発生に関与している可能性を指摘した。しかし、欧米の報告に比べて我々が検索した UC 関連癌における p53 変異は 50%程度であり、欧米を含めて、「p53 非依存性 UC 関連癌」のカテゴリーが明らかに存在すると考えられる。我々は「p53 非依存性 UC 関連癌」においては特に p16^{INK4A} の発現が上昇することを明らかにしているが b-catenin - Wnt 系等の他の増殖シグナル系や DNA methylation 等 epigenetic な変化を含めてその発癌系の同定には至っていない。

一方、我々は発癌過程における間質微細環境の変化に着目し、孤発性大腸癌及び UC 関連癌の発生に際して間質微細環境の遺伝子不安定性が関与していることを明らかにし、UC 関連腫瘍においては非腫瘍・炎症部においても高頻度の遺伝子不安定性を示した。発癌リスクの蓄積という観点からは、我々は mild PAS 染色による UC 長期罹患症例検索により、罹病期間と相関して再生粘膜腺管に遺伝子変異が高頻度に生じることを示した。

以上から、「p53 非依存性 UC 関連癌」の発癌機構には間質微細環境の変化が関与している可能性がある。この間質微細環境の遺伝子変化を発癌リスクと捉えれば、発癌リスク予測システムを樹立することも可能と考えられる。

2. 研究の目的

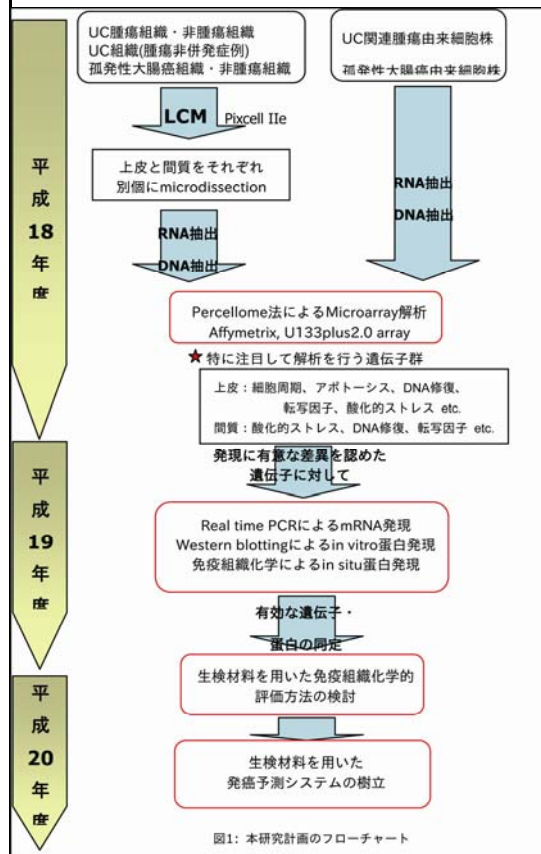
以上を背景に本研究においては、(a) 我々の研究室で樹立した UC 関連癌由来細胞株(p53 野生型及び変異型)及び孤発性大腸癌由来細胞株、及び(b)腫瘍併発及び非併発 UC 患者大腸から laser-capture microdissection (LCM)により別個に採取した上皮及び間質組織、を用いて、DNA microarray により特発性大腸癌との遺伝子発現プロファイルの差違を subtractive に網

羅的ゲノミクス解析し、これまで明らかにされてこなかった炎症性発癌に関わる未知の遺伝子群を同定し、「p53 非依存性 UC 関連癌」の発癌機構を分子レベルで明らかにすることを本研究課題の研究目的とした。

3. 研究の方法

研究材料:(患者組織の収集担当:岡安 勲)

- 潰瘍性大腸癌組織・同一患者の非腫瘍大腸組織 10 症例(OCT compound 包埋凍結保存)
- 潰瘍性大腸炎(腫瘍非併発)大腸組織 10 症例(OCT compound 包埋凍結保存)
- 孤発性大腸癌組織・同一患者の非腫瘍大腸組織 10 症例(OCT compound 包埋凍結保存)
- 潰瘍性大腸炎関連癌由来細胞株: UCCA21, UCCA22, UCCA23,UCCA24, UCCA25(以上 p53 野生型), UCCA3(p53 変異型)
- 孤発性大腸炎由来細胞株: KE-24, KE-43w, KE-43p (以上 p53 野生型), SW480 (p53 変異型)



研究方法: 全体の流れは図1 参照

- UC 症例上皮・間質組織からの DNA・RNA 抽出 (担当:吉田 功)

- ① 研究材料 a~c について、Arcturus 社 Pixcell IIe を用いて Laser Capture Microdissection (LCM)を行い、上皮組織及び間質組織を独立して採取。
- ② RNA, DNA の調製: QIAGEN 社 RNeasy Mini Kit を用いて採取した組織より RNA を抽出。また、percellome 法に用いるため、その過程において、細胞破碎液の一部から DNA を抽出。
- (2) 細胞株からの DNA・RNA 抽出 (担当: 吉田 功)
- ① 我々の過去の検討により、UC 患者大腸粘膜は酪酸の曝露を受けており(研究業績 #15)、p53 系を活性化していることが明らかになっている。従って、研究材料 d, e については酪酸刺激(2.5mM)の存在下、非存在下の双方で実験を進めた。
- ② RNA, DNA の調製: 1-2)と同様。

(3) Microarray 解析 (担当: 吉田 功)

① Microarray 解析

Affymetrix 社プロトコールに従い、cDNA 合成、cRNA 合成、ラベリング、ハイブリダイゼーション、スキャン等の Microarray 解析を行った(実施場所: 国立医薬品食品研究所・毒性部)。

Affymetrix 社 Two-Cycle Target Labeling and Control Reagents (IVT labeling kit, cDNA synthesis kit)

GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents

Two-Cycle cDNA Synthesis kit

GeneChip Cleanup Module

GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents for IVT Labeling

GeneChip Sample Cleanup Module

GeneChip: Human array U133 plus 2.0

② データ解析:

- a. 国立医薬品食品研究所・毒性部で開発した Percellome 法解析ソフトウェアにより genome DNA 量を基準とした細胞当たりの各 mRNA の定量を行った。それにより、**組織上皮・間質各々の群間及び細胞株間の遺伝子発現の絶対的比較検討が可能となる。**
- b. 解析は各遺伝子の gene annotation 参考に、特に、細胞周期、細胞増殖、アポトーシス、転写因子、DNA 修復、酸化ストレス等に関連した遺伝子群の発現解析を詳細に行った。
- c. **UC 関連癌(上皮/間質) vs 孤発性大腸癌(上皮/間質)**, UC 由来非腫瘍組織(上皮/間質) vs 孤発性大腸癌症例非腫瘍部組織(上皮/間質), **UC 由来非腫瘍組織(担癌)(上皮/間質) vs UC 由来非腫瘍組織(非担癌)(上皮/間質)** 等の遺伝子発現 subtractive に解析した。更に腫瘍群に関しては p53 変異の有無で亜分類し、

「p53 非依存性 UC 関連癌」特異的マーカーの同定を試みた。

(4) 候補遺伝子の分子生物学的解析 (担当: 吉田 功、岡安 勲)

① 材料: 新鮮凍結材料及びホルマリン固定パラフィン包埋組織

② 3. で候補となった遺伝子に対して以下の検討を行い、その characterization を行う。

a. 定量 PCR: Applied Biosystems 7500 Real time PCR system 及び各遺伝子特異的 TaqMan primer を用いて上記材料で定量 PCR をを行い、mRNA 発現の差異を確認した。

b. 蛋白発現(*in vitro*): 上記材料を用いて western blot 法により、蛋白発現を確認する。Microarray や定量 PCR との相関の有無により、転写・転写後発現調節機構を明らかにしてゆく。

c. 蛋白発現(*in situ*): ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて、市販抗体を用いて Envision 法(DAKO)による免疫組織化学染色を行い、組織内蛋白発現の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 組織採取と RNA 評価

OCT コンパウンド包埋凍結腫瘍組織から腫瘍細胞のみを LCM で採取し、RNA の抽出-増幅-gene chip hybridization をを行い、実験系の検討を行った。その結果、当初の想定よりも組織量が必要であり、また、得られた RNA のクオリティーについて Bioanalyzer (Agilent) で検討したところ、LCM 後の組織染色法によっては RNA の分解が著しいことが明らかとなった。マウス新鮮臓器組織を用いた検討によって、極力水系を避けることで RNA 分解を回避できることから、組織の核染色には LCM staining kit (Ambion) を用いることとした。これらの条件検討を経て LCM - RNA 増幅(2回) - Human array U133 plus 2.0 (Affymetrix) を用いて Percellome 法にて mRNA 発現プロファイルを解析する系を確立できた。UC 関連癌組織における上皮細胞と間質細胞について別個に LCM を行った場合、特に間質組織において十分な品質・量の RNA を得ることは困難であった。以上から、p53 変異の有無にかかわらず、UC において p53 系に負荷がかかっていることはこれまでに我々が明らかにしているもので、その負

荷を酪酸刺激により *in vitro* で再現させた系を用い、培養細胞系で酪酸刺激による遺伝子発現変化を percellome 法で網羅的に検索することとした。

(2) *in vitro* 潰瘍性大腸炎炎症再現系における解析

上記解析により、UC 関連癌由来細胞で共通に発現上昇を認める候補遺伝子を複数得た。それらの RNAi 解析により、p53 の上流に位置すると考えられる遺伝子を絞り込んだ。

定量 RT-PCR、ウェスタンブロッティング及び siRNA による抑制実験により、CITED2 (CBP/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2) が p53 系を活性化することを見出した。すなわち、①酪酸刺激により CITED2 発現が誘導される (図 2)、②酪酸刺激及び CITED2 強制発現により (a) p53 のアセチル化が認められ、p53 蛋白質の安定化が見られる (図 3)、(b) p53 下流分子の mRNA、蛋白質発現が誘導されること (図 4)、(c) p53 依存性アポトーシスを誘導すること (図 5)、が明らかとなった。また酪酸刺激による

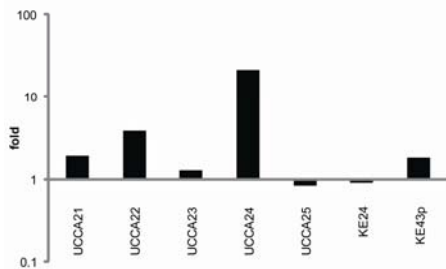


図 2

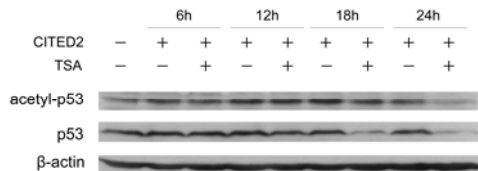


図 3

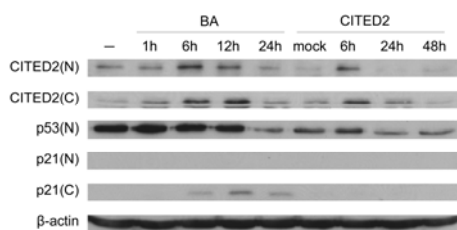
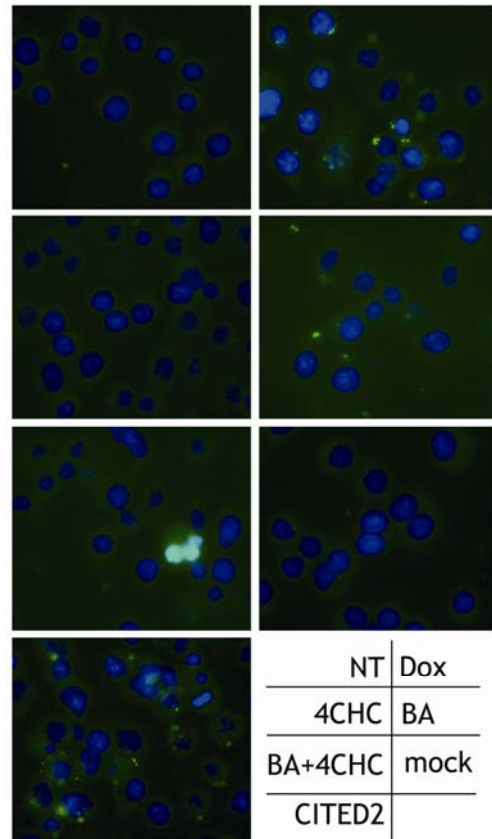


図 4



p53 依存性アポトーシスは酪酸の細胞内取り込みを担う MCT1 の阻害剤によって抑制された。CITED2 が CBP/p300 と酪酸刺激下で結合することを免疫沈降で確認した。以上の結果は酪酸刺激による p53 活性化に CITED2 が直接関わっていること示したものであり、UC 患者大腸炎組織において、その炎症・活動性と CITED2 の陰窩上層上皮における発現性が相関を示すことも新たに明らかにした (図 6, 7)。UC において腸内細菌に由来する局所の高濃度酪酸が陰窩上皮のびらんを誘導することの機序を明らかにしたと考えられる。このびらんにより細菌が間質に存在するマクロファージへ曝露され、炎症性サイトカインの誘導により好中球を遊走させることが UC の病態の一つと考えられる。これらの結果は UC 炎症機序に CITED2 が重要な役割を果たすことを示すものであり、UC 炎症に対する新たな治療標的にも成りうる貴重な成果である。この結果は現在学術誌に投稿中である。

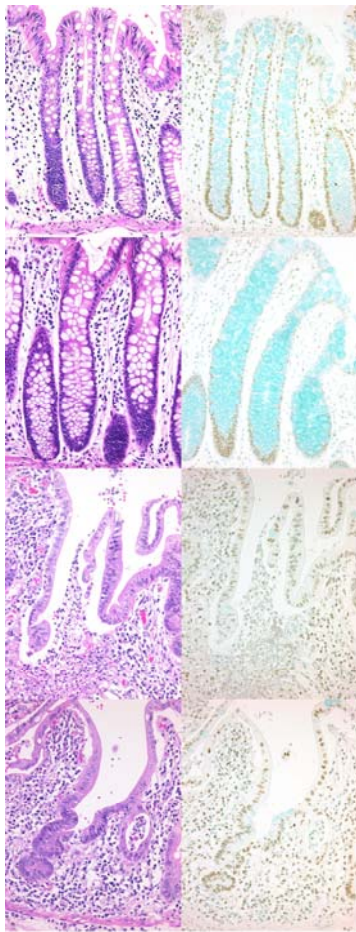


図 6

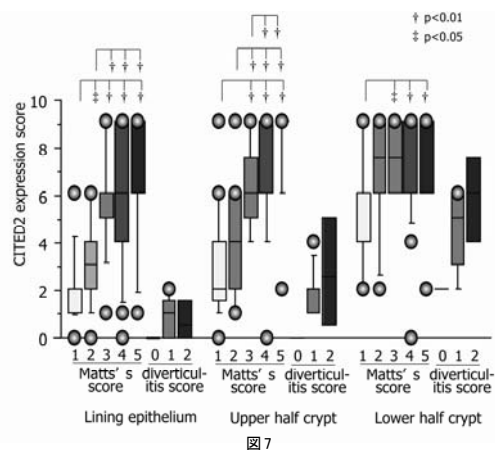


図 7

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 3 件)

1. Ogawa, T, Yoshida, T., Tsuruta, T., Tokuyama, W., Adachi, S., Kikuchi, M.,

Mikami, T., Saigenji, K., Okayasu, I. Tumor Budding Predicts Lymphatic Involvement and Lymph Node Metastasis in Submucosal Invasive Colorectal Adenocarcinomas and in Non-Polypoid compared with Polypoid Growth. *Scand J Gastroenterol*, **44**, 605-614, 2009. (査読有り)

2. Yagishita, H., Yoshida, T., Ishiguro, K., Numata, Y., Okayasu I. Epithelial and stromal genetic instability linked to tumor suppressor genes in ulcerative colitis-associated tumorigenesis. *Scand J Gastroenterol*, **43**(5), 559-566, 2008. (査読有り)

3. Ishibashi, T., Yoshida, T., Umezawa, A., Ohukusa, T., Okayasu I. Establishment of an identification system of bacteria localized in the colonic mucosae of ulcerative colitis patients: comprehensive analysis by sequencing of bacterial 16S rRNA gene from microdissected tissue sections. *Kitasato Med J*, **37**(2), 76-83, 2007. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1. 吉田 功、関根 司、相崎健一、宮前結加、沼田賀子、三上哲夫、菅野 純、岡安 勲: 潰瘍性大腸炎発症における CITED2-p53 系の役割 - 腸内細菌による新規粘膜上皮細胞 死誘導系の可能性. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 2, 京都.

2. 丸 善明、吉田 功、田原あづさ、梅沢敦子、大草敏史、岡安 勲: 大腸腸内細菌による粘膜上皮性サイトカイン

誘導—潰瘍性大腸炎・炎症機序との関連. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 2, 京都.

3. 竹之内一政、吉田 功、遠藤 仁、岡安 勲: 大腸癌における L 型アミノ酸トランスポーター発現亢進の証明. 第 98 回日本病理学会総会, 2009. 5. 2, 京都.
4. 桐生悠史、吉田 功、梅戸春江、岡安 勲: 大腸正常粘膜上皮における癌抑制遺伝メチル化と加齢との相関. 第 67 回日本癌学会総会, 2008. 10. 28, 名古屋.
5. 吉田 功、岡安 勲: がんの発生・進展における間質細胞のゲノム不安定性の関与. 第 97 回日本病理学会総会, シンポジウム招待講演. 2008. 5, 金沢.
6. 安達 滋、吉田 功、渋谷明隆、西元寺克禮、岡安 勲: C 型肝炎ウイルス感染からの肝発癌におけるゲノム不安定性の果たす役割: 背景肝病変による差異. 第 97 回日本病理学会総会. 2008. 5, 金沢.
7. 関根 司、吉田 功、相崎健一、桐生悠史、大草敏史、菅野 純、岡安 勲: 潰瘍性大腸炎 in vitro モデルにおける酪酸による p53 活性化機序の解明: CITED2 の関与. 第 97 回日本病理学会総会. 2008. 5, 金沢.
8. 坂本明良、吉田 功、大草敏史、岡安 勲: 潰瘍性大腸炎の原因菌探索—細菌 16S rRNA 遺伝子配列決定法を用いた網羅的解析—第 97 回日本病理学会総会. 2008. 5, 金沢.
9. 梅戸春江、吉田 功、岡安 勲: Occurrence of genomic instabilities

in noncancerous colorectal mucosae and its relation with aging and gender. 第 66 回日本癌学会総会, 2007. 10. 3, 横浜.

10. 荒木香代、三上哲夫、吉田 功、山下和也、大石正道、小寺義男、前田忠計、岡安 勲: Proteomics 解析による潰瘍性大腸炎関連癌細胞特異的タンパクの探索: Sporadic 型大腸癌細胞との比較. 第 96 回日本病理学会総会, 2007. 3, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 功 (YOSHIDA TSUTOMU)
北里大学・医学部・講師
研究者番号 90316943

(2) 研究分担者

岡安 勲 (OKAYASU ISAO)
北里大学・医学部・教授
研究者番号 20014342

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

菅野 純 (KANNO JUN)
国立医薬品食品研究所・毒性部・部長