

平成 22 年 4 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590723

研究課題名（和文）

Stem cell biology に立脚したバレット腺癌の成因の解明

研究課題名（英文）

Study on the pathogenesis of Barrett' s esophagus based on stem cell biopsy

研究代表者

木下 芳一（KINOSHITA YOSHIKAZU）

島根大学・医学部・教授

研究者番号：30243306

研究成果の概要（和文）：食道腺癌の前癌病変であるバレット食道の形成機序を明らかとするためにバレット上皮の細胞起源とその分化異常に注目しつつ検討を行った。食道の fibroblast に胃酸が接触すると HB-EGF が産生され、この HB-EGF が扁平上皮細胞に腸型円柱上皮の形質の発現をおこさせること、さらに扁平上皮細胞に胆汁酸が接触すると Cdx1、Cdx2 の相互作用を介して腸型円柱上皮への分化異常が進行することが示された。

研究成果の概要（英文）：We have investigated the pathogenesis of Barrett' s esophagus focusing on the cellular origin and abnormal differentiation of the original cells. Esophageal fibroblasts, when exposed to acidic gastric contents, secrete various growth factors and cytokines. Especially HB-EGF produced by these acid exposed fibroblasts induced abnormal differentiation of immature esophageal squamous cells to intestinal type columnar cells by inducing Cdx2 expression. Furthermore squamous epithelial cells exposed to bile acids started to differentiate to columnar epithelial cells by the mutual interaction of Cdx1 and Cdx2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：バレット食道、胃食道逆流症、幹細胞、分化、腸上皮化生

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の食生活の欧米化と *Helicobacter pylori* 感染率の減少に伴って、高い胃酸分泌能を有する日本人が増加し、人口の約 20% 前後に胃食道逆流症（GERD）がみられるよう

になってきた。GERD を有する例はバレット食道の発症リスクを有しており GERD 例の 10% 程度にバレット食道がみられる。バレット食道を有する例は欧米においては年間 0.5% 程度の食道腺癌の発症リスクを有する

ことが知られている。バレット食道は食道腺癌の前癌病変であり、バレット食道の形成を予防することは食道腺癌の発症を抑制しリスク低減につながると考えられる。バレット食道の発生機序は明らかになっておらず、食道扁平上皮未分化幹細胞の分化異常や **bone marrow derived stem cell** の円柱上皮への分化等が成因であると考えられている。

バレット食道の形成機序が明らかとなれば、バレット食道の発生を抑制し、GERD 例の合併症としての食道腺癌の発生を少なくすることができる可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、バレット食道を形成する円柱上皮の産生に、食道扁平上皮の未分化幹細胞が関与しているのか、または **bone marrow derived stem cell** が関与しているのかを明らかにする。

食道の粘膜内で産生されている増殖因子が、バレット食道の形成に関与しているか否か、また関与している場合にはどのような細胞内情報伝達系を介して情報を伝達しているかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 島根大学医学部の倫理委員会で認められた様式を用いて参加者から同意を得た後に、GERD 例と非 GERD 例の食道の粘膜病変部と非病変部から内視鏡生検材料を得た。これを用いて免疫染色をおこない粘膜上皮下の fibroblast が有する増殖因子の種類について検討し、粘膜病変の存在が増殖因子の発現亢進と関わっているか否かについて解析をおこなった。

(2) ラットとマウスに食道と空腸を吻合することによってバレット食道形成モデルを作成した。空腸・食道吻合を作成後1年間に渡って一定の期間ごとに動物を屠殺し食道内の粘膜の組織学的な検索をおこなった。円柱上皮のマーカーとして Cdx1, Cdx2, villin, Ck7 の発現を免疫染色によって検討するとともに BrdU 取り込み細胞についての検討もおこなった。

(3) ヒトの fibroblast である OUMS 細胞を用いて、この OUMS 細胞にパルス状に種々の pH の塩酸あるいは胆汁酸を添加して、fibroblast が産生する増殖因子、サイトカインの変化を DNA マイクロアレイ解析をおこなうことで検討した。DNA マイクロアレイ解析の結果注目した増殖因子、サイトカインについては定量化 PCR と EIA を用いて mRNA および蛋白としての産生量の変化を確認した。

(4) ヒトの食道の正常上皮細胞の培養細胞モデルとして HET1A 細胞を用いて検討をおこなった。HET1A 培養細胞に fibroblast が産生する因子を添加し、Cdx1, Cdx2, villin, CK7 をマーカーとして HET1A 細胞に腸型の円柱上皮の形質の発現がみられるか否かの検討をおこなった。さらにこれらに変化をおこした増殖因子、サイトカインがどのようなタイプの受容体を介したどのような細胞内情報伝達系を介して HET1A に円柱上皮の形質を発現させるにいたるかについての検討をおこなった。

(5) ヒトの食道のバレット腺癌の細胞のモデルとして OE33 細胞を用いて検討をおこなった。OE33 細胞には発現ベクターを用いた遺伝子の組み込みをおこなうことが比較的容易であるため Cdx1 と Cdx2 の相互作用をそれぞれの遺伝子導入をおこなうことで検討した。

(6) マウスの骨髄細胞はマウスの長幹骨の骨髄より得た。これを短期培養した後に fibroblast が酸あるいは胆汁酸に対して産生することが明らかとなっている増殖因子、サイトカインを添加し、上皮細胞としての形質発現がおこるか否かについて検討をおこなった。

## 4. 研究成果

(1) fibroblast に短時間 pH5.0 の酸を処理すると fibroblast はその生存や増殖には変化をおこさないが、多種のタンパクの発現に大きな変化をおこす。この中で heparin binding epithelial growth factor (HB-EGF) は最もその産生量が大きく増加する分泌型の増殖因子であり、かつヒトの食道粘膜に病変を有する GERD 例の上皮下の fibroblast で高発現しているが、健常粘膜下の fibroblast では強い発現は認められなかった。このため GERD 例で胃酸の刺激によって上皮が損傷を受けた場合に上皮下の fibroblast が胃酸にさらされると HB-EGF が産生されることを明らかにすることができた。

(2) HB-EGF は食道の扁平上皮細胞に作用させると Cdx2, villin, CK7 等の腸型上皮のマーカーとなりうる遺伝子の発現を亢進させた。一方、骨髄由来細胞においては HB-EGF を作用させてもこのような変化は認められなかった。HB-EGF が Cdx2, villin, CK7 の発現を亢進させる機序は EGF-R のリン酸化を介し、NF- $\kappa$ B と AP-1 を介したものであることも HET1A 細胞を用いた解析から明らかにすることができた。

(3) ラットを用いた検討からは胆汁の逆流

に伴って食道の扁平上皮の腸型円柱上皮への化生が生じるが、このときにまだ円柱上皮化生を起こしていない扁平上皮細胞の核に Cdx1 の存在が確認された。さらに Cdx1 は Cdx2 の発現を亢進させることも OE33 細胞を用いて明らかとなった。Cdx2 は villin や CK7 等の腸型の円柱上皮のマーカー遺伝子を発現させ腸への分化を決定づける転写因子であるが、この Cdx2 の発現を亢進させる Cdx1 の発現が扁平上皮において胆汁の逆流にともなって早朝から観察されたことは、バレット食道の起源が扁平上皮の未分化幹細胞にある可能性を強く示していると考えられた。

#### 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 20 件)

①Fukuhara H, Kadowaki Y, Ose T, Aziz MM, Ishihara S, Takasawa S, Kinoshita Y. In vivo evidence for the role of Reg I in gastric regeneration: transgenic overexpression of Reg I accelerates the healing of experimental gastric ulcers. Lab Invest, in press (査読有)

②Rahman F, Kadowaki Y, Ishihara S, Tobita H, Imaoka H, Fukuhara H, Aziz M, Furuta K, Amano Y, Kinoshita Y. Fibroblast derived HB-EGF promotes Cdx2 expression in esophageal squamous cells. Lab Invest, in press (査読有)

③Ishimura N, Amano Y, Yuki T, Takahashi Y, Kinoshita Y. Effectiveness of crystal violet chromoendoscopy with mucosal pit pattern diagnosis for surveillance of Barrett's esophagus. Digestion, in press (査読有)

④木下芳一、数森秀章、石村典久：前癌病変としての Barrett 食道. G. I. Reseach ; 18 : 45-52, 2010 (査読無)

⑤Kazumori H, Ishihara S, Kinoshita Y. Roles of caudal-related homeobox gene Cdx1 in oesophageal epithelial cells in Barrett's epithelium development. Gut. 58(5): 620-628, 2009 (査読有)

⑥Kusunoki H, Kusaka M, Kido S, Yamauchi R, Fujimura Y, Watanabe Y, Kobori M, Miwa H, Tomita T, Kin Y, Hori K, Tano N, Sugimoto K, Nakamura Y, Fujimoto K, Oza N, Matsunobu A, Ono N, Fuyuno S, Kinoshita Y, Adachi K, Yuki M, Fujisawa T, Haruma K. Comparison of the effects of omeprazole and famotidine in treatment of upper abdominal symptoms in patients with reflux esophagitis. J Gastroenterol. 44(4): 261-270, 2009 (査読有)

⑦Mishiro T, Ishihara K, Hino S, Tsutsumi S, Aburatani H, Shirahige K, Kinoshita Y, Nakao M. Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster. EMBO J. 28(9): 1234-1245, 2009 (査読有)

⑧Adachi K, Furuta K, Morita T, Nakata S, Ohara S, Tanimura T, Koshino K, Miki M, Ishimura N, Inoue Y, Ryuko K, Umegae N, Ohhata S, Katoh S, Yamamoto K, Nariai Y, Hashimoto Y, Sumi A, Kawaguchi M, Kinoshita Y. Half-solidification of nutrient does not decrease gastro-esophageal reflux events in patients fed via percutaneous endoscopic gastrostomy. Clin Nutr. 28: 648-651, 2009 (査読有)

⑨Kinoshita Y, Furuta K, Adachi K, Amano Y. Asymmetrical circumferential distribution of esophagogastric junctional lesions: anatomical and physiological considerations. J Gastroenterol. 44: 812-818, 2009 (査読有)

⑩Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y. Endoscopic definition of esophagogastric junction for diagnosis of Barrett's esophagus: importance of systematic

education and training. Digestive Endoscopy. 21: 213-218, 2009 (査読有)

⑪Fujiwara Y, Takahashi S, Arakawa T, Sollano JD, Zhu Q, Kachintorn U, Rani AA, Hahm KB, Joh T, Kinoshita Y, Matsumoto T, Naito Y, Takeuchi K, Terano A, and IGICS study group. A questionnaire-based survey of GERD and related diseases by physicians in East Asian countries in 2008. Digestion. 80: 119-128, 2009 (査読有)

⑫石村典久、天野祐二、木下芳一 : Barrett 食道癌予防を目的とした本邦独自のサーベイランス法の確立およびPPI 投与による発癌予防効果についての検討. The GI Forefront ; 5 : 114-117, 2009 (査読無)

⑬Chinuki D, Amano Y, Ishihara S, Moriyama N, Ishimura N, Kazumori H, Kadowaki Y, Takasawa S, Okamoto H, Kinoshita Y. REG1  $\alpha$  protein expression in Barrett' s esophagus. J. Gastroenterol Hepatol. 23: 296-302, 2008. (査読有)

⑭Aziz MM, Ihishra S, Rumi MAK, Mishima Y, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Yong-Yu Li, Farzana Binte Rahman, Otani A, Oka A, Ishimura N, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y. Prolactin induces MFG-E8 production in macrophages via transcription factor C/EBP  $\beta$ -dependent pathway. Apoptosis. 13: 609-620, 2008 (査読有)

⑮Okita K, Amano Y, Takahashi Y, Mishima Y, Moriyama N, Ishimura N, Ishihara S, Kinoshita Y. Barrett' s esophagus in Japanese patients: its prevalence, form, and elongation. J Gastroenterol. 43(12): 928-934, 2008 (査読有)

⑯Azumi T, Adachi K, Furuta K, Nakata S, Ohara S, Koshino K, Miki M, Morita T, Tanimura T, Ashizawa N, Kinoshita Y.

Esophageal epithelial surface in patients with gastroesophageal reflux disease: an electron microscopic study. World J Gastroenterol. 14(37): 5712-5716, 2008 (査読有)

⑰Kinoshita Y, Ishihara S. Causes and therapeutic approaches for PPI-resistant GERD in Asia. Therapeutic Advances in Gastroenterology. 1: 191-199, 2008 (査読有)

⑱Moriyama N, Amano Y, Mishima Y, Okita K, Takahashi Y, Yuki T, Ishimura N, Ishihara S, Kinoshita Y. What is the clinical significance of stromal angiogenesis in Barrett' s esophagus? J Gastroenterol Hepatol. 23(Suppl 2): S210-S215, 2008 (査読有)

⑲天野祐二、木下芳一 : バレット食道および食道腺癌の診断. 治療 ; 90 : 1950-1955, 2008 (査読無)

⑳数森秀章、木下芳一 : Barrett 食道の発生機序における胆汁酸の役割. 日本消化器病学会雑誌 ; 104 : 10-16, 2007 (査読有)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木下 芳一 (KINOSHITA YOSIKAZU)

島根大学・医学部・教授

研究者番号 : 30243306