

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590724

研究課題名(和文) 食道扁平上皮の恒常性維持における Notch シグナルの役割と腺癌発症機構の解明

研究課題名(英文) Evaluation of the essential role of Notch signaling in the maintenance of squamous epithelium and the development of adenocarcinoma.

研究代表者

石村 典久 (ISHIMURA NORIHISA)

島根大学・医学部・講師

研究者番号：40346383

研究成果の概要(和文)：

バレット食道の形成における Notch シグナルの関連についてはこれまで明らかではなかった。今回の研究で、バレット食道の形成・進展において Notch の下流シグナルである Hath-1 の発現亢進が重要な役割を果たしていることが示された。Hath-1 は Hes-1 によって発現が抑制され、食道扁平上皮の恒常性が維持されているが、胆汁酸刺激によって Cdx2 が誘導されると、Hes-1 発現が抑制され Hath-1 が誘導されることによって杯細胞化生を伴うバレット食道の形成に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：

The roles of Notch signaling in the development of Barrett's esophagus remain obscure. In this study, we have demonstrated that Notch related molecule, Hath-1, played an important role in the development of Barrett's esophagus. In the esophageal squamous epithelium, Hes-1, a downstream target of Notch signaling, was upregulated and blocked Hath-1 expression to maintain homeostasis. However, Cdx2 induced by bile acid exposure to the lower esophagus, led to Hes-1 downregulation and Hath-1 upregulation. We have shown that Hath-1 was closely associated with goblet cell differentiation in the development of Barrett's esophagus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：シグナル伝達、癌、Notch、Cdx2、バレット食道

## 1. 研究開始当初の背景

個体の発生プロセスにおいて Notch シグナル伝達系は種々の器官のさまざまな段階で機能しており、Notch を介する細胞間相互作用は細胞の分化や組織のパターン形成で重要な働きをしている。Notch レセプターは隣接

する細胞が細胞膜上に表出するリガンド刺激によって  $\gamma$  セクレターゼなどの酵素により細胞膜貫通領域で段階的に切断され、細胞内ドメインが核内に移行し、標的遺伝子の転写を促進する。近年、この Notch シグナルの破綻が様々な疾患に関与していることが明

らかとなってきた。研究代表者らは、慢性炎症を契機とする胆管癌の発症に Notch シグナルの発現異常が重要な役割を果たしていることを明らかにし報告した (Ishimura N, et al. Gastroenterology 2005)。Notch シグナルの発現異常は腸管上皮細胞における分化異常にも深く関与していることが報告されているものの、食道扁平上皮の恒常性維持における Notch シグナルの機能解析に関する検討は行われていなかった。さらに、恒常性の破綻によって生じると考えられるバレット食道及びバレット食道癌の形成に及ぼす影響について検討された報告はなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 食道扁平上皮から杯細胞を伴う腸上皮化生 (goblet cell metaplasia) を生じるバレット食道の発生及びバレット食道腺癌の発生に関わる Notch シグナルの関与について明らかにする。

(2) Barrett 食道の発生に重要な役割を果たすことが示されている転写因子 Cdx2 と Notch シグナルのクロストークについて明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 食道扁平上皮およびバレット食道上皮における Notch シグナル発現状況の解析

① ヒト生検組織を用いて食道扁平上皮およびバレット食道における Notch シグナル関連蛋白 (Notch-1~4, Jagged1・2, Hes-1, Hath-1) の発現を免疫染色法にて解析を行った。さらに上記遺伝子の mRNA レベルでの発現を real-time PCR にて定量的に評価した。

② 不死化ヒト扁平上皮細胞株 (Het1A) およびバレット食道癌細胞株 (OE33, OE19) における上記 Notch シグナル関連因子の発現を Western blot および real time PCR にて解析し、それぞれの発現状況からバレット食道の進展に関連する因子について検討した。

(2) バレット食道の進展に関わる Notch シグナルと Cdx2 のクロストークに関する検討

① 胆汁酸刺激による Notch シグナルと Cdx2 の発現状況を検討するため、培養細胞株 (OE33) にデオキシコール酸を添加し、Notch-1, Hes-1, Hath-1, Cdx2, MUC2 の発現状況を real time PCR 及び Western blot にて解析を行った。

② Notch シグナル抑制による Cdx2 の発現変化を検討するため OE33 細胞に  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬 (DAPT) を添加して、Cdx2 及び MUC2 の発現を real time PCR 及び Western blot にて評価した。

③ Cdx2 発現変化による Notch シグナルの発現変化を検討するため、OE33 細胞に Cdx2 expression vector を導入し、Cdx2 を強発現するモデルを構築し、このモデルでの Notch-1, Hes-1, Hath-1 の発現変化を評価した。

④ Cdx2 発現抑制による変化を検討するため、Cdx2 siRNA を OE33 に導入し、Cdx2 発現抑制モデルを構築し、同様に Notch シグナル関連因子の発現変化を検討した。

(3) モデルラットを用いたバレット食道発生に関わる Notch シグナル関連因子の発現に関する検討

Levrat らの手法によるバレット食道形成モデル (食道空腸吻合) を作成し、経時的に下部食道を摘出し、Notch シグナル関連因子の発現を免疫染色および real time PCR にて評価した。

## 4. 研究成果

(1) 食道扁平上皮およびバレット食道上皮における Notch シグナル発現状況

Notch1, 2, 3 については食道扁平上皮の細胞質に発現を認めたが、Notch-4 については発現を認めなかった。また、Jagged1, 2 についても発現が認められた。一方、バレット食道・腺癌組織における発現についての検討では、Notch-1 の発現はバレット食道腺癌組織において強い発現を認めた。Notch 関連因子である Hes-1 と Hath-1 についての検討では、腸上皮化生 (goblet cell metaplasia) を伴うバレット食道において Hes-1 の著明な発現低下と Hath-1 の発現亢進を認めた。

(2) バレット食道の進展に関わる Notch シグナルと Cdx2 のクロストークに関する検討

① 胆汁酸刺激による Notch シグナルおよび Cdx2 の発現変化

OE33 細胞に胆汁酸 (デオキシコール酸) を添加すると、Notch の下流シグナルである Hes-1 の発現が著明に抑制され、Hath-1 の有意な増強を認めた。また、Cdx2 発現の増強及び、腸型ムチン形質のマーカーである MUC2 の発現にも亢進を認めた。

② Notch シグナル抑制による Cdx2 発現変化  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬 (DAPT) を OE33 細胞に添加すると、Notch の下流シグナルである Hes-1 が抑制され、Hath-1 の発現は亢進を認めた。これに伴い、Cdx2 の発現は著明に亢進し、同様に MUC2 の発現も亢進した。

③ Cdx2 発現亢進モデルによる Notch シグナルの発現変化

Cdx2 expression vector を導入した OE33 細胞においては有意な Hes-1 の発現低下と Hath-1 の発現亢進を認めた。

④ Cdx2 発現抑制モデルによる Notch シグナルの発現変化

Cdx2 siRNA を導入した OE33 細胞においては、上記と逆に Hath-1 の発現の抑制を認めた。また、この細胞に胆汁酸を添加しても、Hath-1 の発現亢進はみられず、胆汁酸添加による Hath-1 の発現には Cdx2 が関与していることが示唆された。

(3) モデルラットを用いたバレット食道発生

に関わる Notch シグナル関連因子の発現に関する検討

作成した胆汁酸逆流モデルラットにおいて既報のごとく、経時的にバレット食道の発生が確認された。扁平上皮からバレット食道の発生へ移行する部分において Hes-1 の発現の低下と Hath-1 の発現亢進が認められた。

【まとめ】

バレット食道の形成・進展において Notch の下流シグナルである Hath-1 の発現亢進が非常に重要な役割を果たしていることが示された。Hath-1 は Hes-1 によって発現が抑制され、食道上皮における恒常性が維持されているが、γセクレターゼ阻害または胆汁酸刺激によって Hes-1 発現が抑制されることによって誘導され、杯細胞化生を伴うバレット食道の形成に影響を与えていることが示唆された。また、これまでバレット食道の形成に重要な役割を果たしていることが報告されている Cdx2 の発現とも密接に関連し、クロストークによってお互いの作用に影響を与えていることが明らかとなった。この結果は食道扁平上皮の恒常性維持が胆汁酸刺激によって破綻し、Cdx2 の発現と共に、Hath-1 が誘導され、杯細胞化生から腸型ムチン形質をもつ発癌ポテンシャルの高いバレット食道への進展の解明に大きく寄与する結果と考えられる。

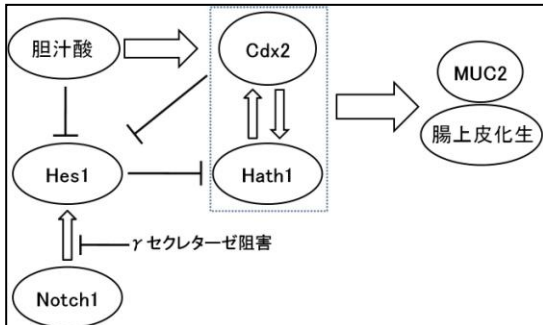


図 バレット食道形成過程における Notch シグナルと Cdx2 のクロストーク

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 15 件)

- ①Takahashi Y, Amano Y, Yuki T, Mishima Y, Tamagawa Y, Uno G, Ishimura N, Sato S, Ishihara S, Kinoshita Y. Impact of the composition of gastric reflux bile acids on Barrett's oesophagus. Dig Liver Dis (*in press*) 査読有
- ②Ishimura N, Amano Y, Sanchez-Siles AA, Fukuhara H, Takahashi Y, Uno G, Tamagawa

Y, Mishima Y, Yuki T, Ishihara S, Kinoshita Y. Fatty acid synthase expression in Barrett's esophagus: implications for carcinogenesis. J Clin Gastroenterol (*in press*) 査読有

③Mishima Y, Amano Y, Yuki T, Kusunoki R, Oka A, Uno G, Ishimura N, Hamaoka M, Ishikawa N, Ishihara S, Kinoshita Y: A rare case of Barrett's adenocarcinoma including squamous cell carcinoma component. Clin J Gastroenterol 4: 5-9, 2011. 査読有

④Oka A, Amano Y, Yuki T, Kusunoki R, Ishimura N, Ishihara S, Kinoshita Y: Ulcer in Barrett's esophagus probably related to severe kyphosis. Endoscopy 42 (Suppl 2): E286-7, 2010. 査読有

⑤Otani A, Amano Y, Koshino K, Takahashi Y, Mishima Y, Imaoka H, Moriyama I, Ishimura N, Ishihara S, Kinoshita Y: Is autofluorescence imaging endoscopy useful for determining the depth of invasion in gastric cancer? Digestion 81:96-103, 2010. 査読有

⑥Rahman FB, Ishihara S, Aziz MM, Mishima Y, Oshima N, Li YY, Sanchez-Siles AA, Otani A, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Ishimura N, Yuki T, Kazumori H, Amano Y, Sato S, Ansary MU, Kinoshita Y: Heparin-binding EGF-like factor augments esophageal epithelial cell proliferation, migration and inhibits TRAIL-mediated apoptosis via EGFR/MAPK signaling. Scand J Gastroenterol 45:1350-1359, 2010. 査読有

⑦石村典久、宇野吾一、天野祐二: Barrett 食道/腺癌の病態. 消化器の臨床 13: 386-391, 2010. 査読無

⑧天野祐二、結城崇史、石村典久: 食道胃接合部の診断-逆流性食道炎・Barrett 食道-臨床と研究 87: 378-383. 2010. 査読無

⑨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. Research 18:45-52, 2010. 査読無

⑩天野祐二、石村典久、越野健司、高橋芳子、三島優子、結城崇史、森山修行、石原俊治、木下芳一: 新たな定義に基づいた食道胃接合部の診断. 胃と腸 44: 1065-1074, 2009. 査読無

⑪ Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y: Endoscopic definition of esophagogastric junction for diagnosis of Barrett's esophagus: importance of systematic education and training. Dig Endosc 21:213-218, 2009. 査読有

⑫石村典久、天野祐二、木下芳一: 【バレット食道の取扱い】バレット食道内視鏡診断

は柵状血管で行われるべきか、胃壁で行われるべきか。消化器科 49: 18-24, 2009. 査読無

⑬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

⑭Moriyama 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:S210-215, 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 43:928-934, 2008. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

①宇野吾一、天野祐二、結城崇史、石村典久、石原俊治、木下芳一: 逆流性食道炎およびSSBEの発生部位と食道縦走襞との関連に関する検討。第7回日本消化管学会総会学術集会、2011年2月19日、京都。

②Ishimura N: Are different effect of PPI therapy to be expected in relation to the predominant phenotype of cellular proliferation in Barrett's epithelium? 10th OESO World Conference, Boston, USA, 2010年10月30日。

③Ishimura N: What is the most consistent landmark for the endoscopic diagnosis of BE? 10th OESO World Conference, 2010年10月29日、Boston, USA。

④石村典久、結城崇史、天野祐二: Barrett 食道内視鏡サーベイランスにおける胃内逆流胆汁酸分析の意義。第18回日本消化器関連学会週間(JDDW)、2010年10月15日、横浜。

⑤玉川祐司、石村典久、高橋芳子、伊藤聡子、結城崇史、数森秀章、石原俊治、天野祐二、木下芳一: Barrett 食道の発生過程におけるNotchシグナルの役割に関する検討。第52回日本消化器病学会大会、2010年10月13日、横浜。

⑥石村典久、天野祐二、高橋芳子、三島優子、結城崇史、石原俊治、木下芳一: Crystal violet 色素を用いた Barrett 食道の内視鏡サーベイランス法のコツ。第104回日本消化器内視鏡学会中国地方会、2010年6月27日、岡山。

⑦岡 明彦、天野祐二、花岡拓哉、大原俊二、谷村隆志、今岡 大、結城崇史、石村典久、石原俊治、木下芳一: 円背が誘引となった出血性 Barrett 潰瘍の1例。第79回日本消化

器内視鏡学会総会、2010年5月14日、東京。  
⑧石村典久、天野祐二、木下芳一: Crystal violet 色素内視鏡による pit pattern 分類の Barrett 食道 surveillance における意義。第79回日本消化器内視鏡学会総会、2010年5月13日、東京。

⑨ Ishimura N, Amano Y, Tamagawa Y, Takahashi Y, Sanchez-Siles AA, Ishihara S, Kinoshita Y: Bone Morphogenetic Protein-4 has an Important Role in the Transformation of Normal Esophageal Cells to Intestinal Phenotype in Barrett's Esophagus via a Cdx2-dependent Pathway. DDW 2010 American Gastroenterological Association, 2010年5月2日, New Orleans, USA.

⑩ Amano Y, Takahashi Y, Ishimura N, Tamagawa Y, Yuki T, Ishihara S, Kinoshita Y: Impact of the Composition of Gastric Reflux Bile Acids on Erosive Esophagitis and Barrett's Esophagus. DDW 2010 ASGE, 2010年5月2日, New Orleans, USA.

⑪Ishimura 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. The 3rd IGICS, 2010年2月20日, Fukuoka, Japan.

⑫結城崇史、天野祐二、高橋芳子、玉川祐司、石村典久、石原俊治、木下芳一: 当院におけるLSBEの現状。第6回日本消化管学会総会学術集会、2010年2月20日、福岡。

⑬石村典久、高橋芳子、三宅達也、佐藤秀一、石原俊治、天野祐二、木下芳一: 胃内逆流胆汁酸組成の Barrett 食道形成に及ぼす影響についての検討。第19回西日本臨床胆汁酸研究会、2009年7月25日、大阪。

⑭石村典久、高橋芳子、森山修行、天野祐二: Barrett 食道診療における食道胃接合部の内視鏡判定の問題点。第102回日本消化器内視鏡学会中国地方会、2009年7月5日、出雲。

⑮ Amano Y, Ishimura N, Takahashi Y, Mishima Y, Koshino K, Ishihara S, Kinoshita Y: What does a mucosal pit pattern mean in Barrett's esophagus? DDW 2009年6月3日, ASGE, Chicago, USA.

⑯Farzana RB, Kadowaki Y, Ishihara S, Tobita H, Imaoka H, Aziz MM, Ishimura N, Furuta K, Amano Y, Kinoshita Y: HB-EGF Secreted from Subepithelial Fibroblast Cells in Esophagitis Promotes CDx2 Expression in Adjacent Esophageal Squamous Cells via Epithelial-Stromal Crosstalk, Yielding Barrett's Esophagus. DDW 2009 American Gastroenterological Association, 2009年6月2日, Chicago, USA.

⑰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. 第95回日本消化器病学会総会、2009年5月7日、札幌.

⑱ Ishimura N, Amano Y, Takahashi Y, Sanchez-Siles AA, Aziz MM, Ishihara S, Kinoshita Y: Bone Morphogenetic Protein-4 has an Important Role in the Transformation of Normal Esophageal Cells to Intestinal Phenotype in Barrett's Esophagus via a CDX2-dependent Pathway. 13th Taishotoyama International Symposium on Gastroenterology, 2009年4月17日, Shimoda, Japan.

⑲ 高橋芳子、天野祐二、三島優子、越野健司、石村典久、森山修行、石原俊治、足立経一、木下芳一: 胃内逆流胆汁組成のGERD関連疾患に及ぼす影響についての検討. 第5回日本消化管学会総会学術集会、2009年2月13日、東京.

⑳ 石村典久、天野祐二、木下芳一: Barrett食道内視鏡診断は、柵状血管で行われるべきか、胃のヒダで行われるべきか? 第50回日本消化器病学会大会、2008年10月3日、東京.

[図書] (計3件)

① 石村典久、経鼻内視鏡のためのアトラス、南江堂、2011、p112-117.

② 石村典久、木下芳一: 「バレット食道」 図説臨床看護学 デジタル版、ディターシップ、2010.

③ 石村典久、ヴァン メディカル、これならわかるバレット食道、2008、p65-77.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石村 典久 (ISHIMURA NORIHISA)

島根大学・医学部・講師

研究者番号: 40346383

### (2) 研究協力者

玉川 祐司 (TAMAGAWA YUJI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 20609341