

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15941

研究課題名(和文) 消化管慢性炎症によるエピゲノム不安定性の誘発と化生発生における意義の解明

研究課題名(英文) Induction of epigenomic instability in chronic gastrointestinal inflammation and its significance in metaplasia

研究代表者

竹内 千尋 (Takeuchi, Chihro)

星薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：60836055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腸上皮化生(IM)は特有のメチル化プロファイルを有し、腫瘍抑制遺伝子を含む遺伝子のプロモーターCpGアイランドにおける広範なDNA過剰メチル化を認めた。IM特異的メチル化プロファイル、つまりエピジェネティックなフットプリントは、頻繁に胃癌に受け継がれた。またIMでは内因性のNOS2発現によるDNMT活性化からDNAメチル化異常が促進されており、エピジェネティックな不安定性を有した。IMにおける異常なNOS2発現のメカニズムとしてエンハンサー再プログラミングとプロモーター領域のオープンクロマチン化を認めた。さらに、細胞外細菌感染で分泌されるIL17AはNOS2発現をさらに誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は腸上皮化生においてエピゲノム異常が加速しているメカニズム、エピゲノム不安定性を明らかにし、また実際に腸上皮化生特異的なエピゲノムプロファイルが胃癌に受け継がれていることを示すことで、長年の疑問である「腸上皮化生は前がん病変か傍がん病変か」という問いに対して腸上皮化生の前癌性を示すことができた。特異的なエピゲノムプロファイルを用いる事により、除菌後胃がんなどの炎症の原因を治療した後の発がん予測を行うことができる。またエピゲノム不安定性の解明は将来のがん発生制御など臨床に還元し、また多臓器のがんについてもその有用性が期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Intestinal metaplasia (IM) were shown to have a distinct methylation profile, showing extensive DNA hypermethylation in promoter CpG islands, including those of tumor suppressor genes. Also, the IM-specific methylation profile, namely epigenetic footprint, was carried into gastric cancers (GC) more frequently than expected. Furthermore, IM cells suffer from accelerated induction of aberrant DNA methylation, namely epigenetic instability, potentially due to increased NOS2 expression and resultant increased DNMT activity. As for the mechanism of abnormal NOS2 expression, IM mucosa showed enhancer reprogramming involving NOS2 expression, and IM cells had open chromatin of NOS2. Moreover, IL-17A, a cytokine secreted by extracellular bacterial infection, up-regulated NOS2 expression. Thus, IM cells were considered to have a strong precancerous nature with an increased chance of converting into cancer cells and the accelerated methylation induction due to abnormal NOS2 expression.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腸上皮化生 DNAメチル化 エピゲノム不安定性 慢性炎症 シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

消化管における慢性炎症誘発モデルとしてピロリ菌感染が有名である。特にピロリ菌感染が引き起こす慢性炎症による DNA メチル化異常の蓄積が胃癌発生に重要であり（エピジェネティックな発がんの素地）、また胃癌リスク診断において有用であることが、これまでの解析により明らかになっている。また慢性炎症に長期曝露されることにより、バレット上皮・腸上皮化生等などの分化異常が出現することが知られている。

2. 研究の目的

慢性炎症が化生の基となる幹細胞に与えるエピゲノム異常は本来一様ではなく一細胞レベルで多様であると考えた。そこで腸への分化を示すエピゲノム異常が一細胞レベルで存在しており、そのメカニズムを明らかにすることで将来の発がん予測やがん発生制御など臨床に還元したいと考えた。

3. 研究の方法

(1)腸上皮化生細胞におけるエピゲノム異常の解析

国立がん研究センターにおいて、インフォームドコンセントを得て、胃切除術を受けた胃癌患者より胃粘膜を採取した。採取した胃粘膜から腺管分離を行い、アルシアンブルー染色を用いて腸上皮化生腺管と非化生腺管に正確に分離した。DNA を抽出後に網羅的メチル化解析を行い、腸上皮化生特異的なメチル化異常を明らかにするとともに、データベースから胃癌細胞のメチル化情報を取得、比較検討した。

(2)エピゲノム異誘発に関与する遺伝子の抽出

シングルセル解析を用いて腸上皮化生特異的に発現している遺伝子を抽出し、腸上皮化生オルガノイドを用いて発現の有無を確認した。

(3)*NOS2* 誘導によるエピゲノム不安定性誘発の証明

シングルセル RNA-seq の結果から、腸上皮化生細胞特異的に *NOS2* 遺伝子が発現していることから、DOX 誘導性細胞を樹立し、*NOS2* を誘導することで DNA メチル化異常が誘発されるか確認した。

(4)腸上皮化生における異常 *NOS2* 発現のメカニズムの解明

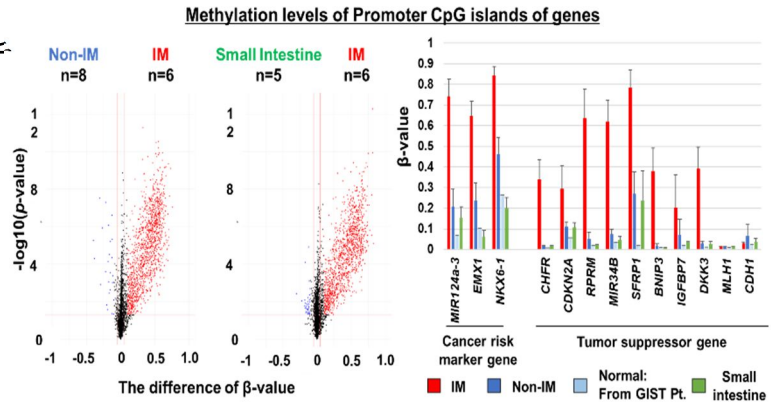
腸上皮化生粘膜を用いて H3K27ac に対する ChIP-seq を行い、腸上皮化生におけるエンハンサーリプログラミングと異常な *NOS2* 発現との関連について解析した。またシングルセル ATAC-seq によるオープンクロマチン領域の変化についても解析した。

(5)環境因子によるエピゲノム不安定性増大の探索

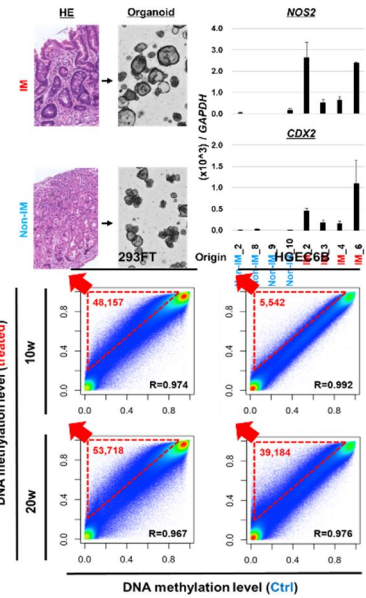
マウス・ヒトから樹立した消化管オルガノイドをサイトカインで処理し、*NOS2* 発現が誘導されるサイトカインを同定した。

4. 研究成果

(1) 腸上皮化生は特有のメチル化プロファイルを有し、腫瘍抑制遺伝子を含む遺伝子のプロモーターCpGアイランドにおける広範なDNA 過剰メチル化を認めた(右図)。またこのIM 特異的メチル化プロファイル、つまりエピジェネティックなフットプリントは、頻繁に胃癌に受け継がれていた。

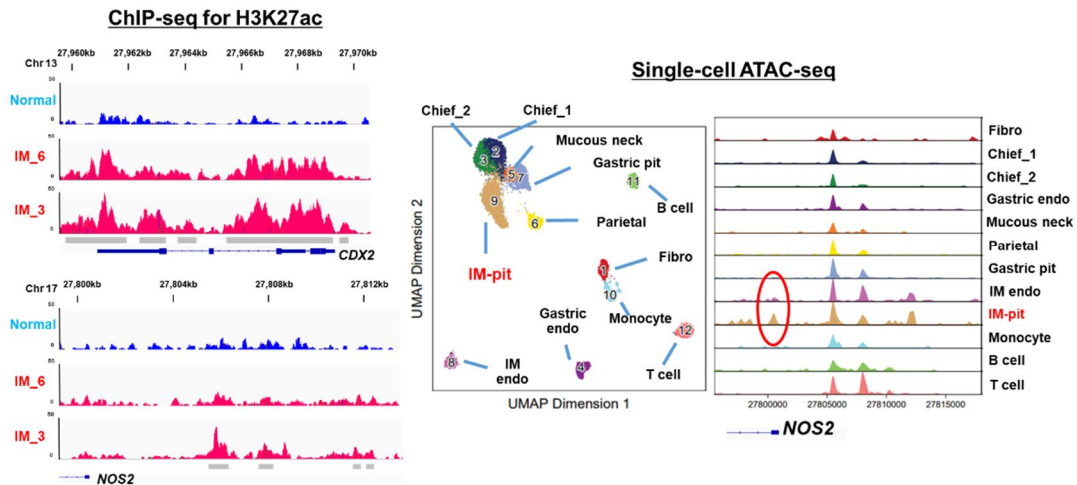


(2) 腸上皮化生粘膜を用いたシングルセル解析の結果から、腸上皮化生では内因性に *NOS2* 遺伝子が発現していた。腸上皮化生由来オルガノイドにおいて *NOS2* 遺伝子が異常発現していることが確かめられた(右図)。



(3) *NOS2* 遺伝子を誘導した細胞(293FT・HGEC6B 細胞)を樹立し、生理的なレベルで *NOS2* を発言させると DNMT の活性が上昇することが明らかになった。さらに *NOS2* を誘導し長期間培養するとに異常高メチル化が誘導されることが明らかになった(右図)。腸上皮化生では内因性の *NOS2* 発現による DNMT 活性化から DNA メチル化異常が促進されており、エピジェネティックな不安定性を有すること考えられた。

(4) 腸上皮化生においては、*NOS2* 遺伝子エンハンサー再プログラミング(下左図)とプロモーター領域のオープンクロマチン化(下右図)を認めた。腸上皮化生における異常な *NOS2* 発現のメカニズムとして化生変化に伴うエピゲノム変化が原因と考えられた。



(5) 細胞外細菌感染で分泌される IL17A により、小腸由来オルガノイドで *NOS2* 発現を誘導する一方で胃由来オルガノイドでは誘導しなかった。さらに腸上皮化生由来オル

ガノイドにおいて *NOS2* 発現をさらに誘導した。

本研究は腸上皮化生においてエピゲノム異常が加速しているメカニズム、エピゲノム不安定性を明らかにし、また実際に頂上上皮化生特異的なエピゲノムプロファイルが胃癌に受け継がれていることを示し腸上皮化生の前癌性を示すことができた。この腸上皮化生特異的なエピゲノムプロファイルを用いる事により、除菌後胃癌などの炎症の原因を治療した後の発がん予測を行うことができる。またエピゲノム不安定性の解明は将来のがん発生制御など臨床に還元し、また多臓器のがんについてもその有用性が期待できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chihiro Takeuchi
2. 発表標題 Precancerous nature of intestinal metaplasia with accelerated driver gene methylation
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chihiro Takeuchi
2. 発表標題 Precancerous nature of intestinal metaplasia with accelerated DNA methylation and enhancer reprogramming
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chihiro Takeuchi
2. 発表標題 Precancerous nature of intestinal metaplasia with accelerated DNA methylation along with altered epigenomic landscape
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chihiro Takeuchi
2. 発表標題 Precancerous nature of intestinal metaplasia with accelerated DNA methylation along with altered epigenomic landscape
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chihiro Takeuchi
2. 発表標題 Precancerous nature of intestinal metaplasia with increased NOS2 expression and accelerated DNA methylation induction
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------