

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16445

研究課題名（和文）高齢者の食道癌を悪性化させるメチルマロン酸のメカニズム～治療応用へ～

研究課題名（英文）The mechanisms of malignant esophageal cancer in the elderly via Methylmalonic acid

研究代表者

松浦 記大（Matsuura, Norihiro）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90804477

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：65歳未満と65歳以上で比較すると、65歳以上の食道癌は、浸潤度は深く、リンパ節転移が多く、病理学的ステージが進行していた。また免疫組織化学染色では、高齢者の食道癌において、上皮間葉転換（EMT）を誘導するMusashi2-Notchシグナルが働くことによって、癌の進行度がより高くなる、ということが示唆された。またEMTが誘導されるメカニズムについて、ミトコンドリア機能低下とEMTの関連が示唆された。さらに、高齢者食道癌においてDNAのメチル化によるエピジェネティック制御がEMTを誘導していることが示唆され、DNAメチル化の阻害がEMTを抑制することも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌は予後の悪い癌の一つであるが、高齢者の食道癌は、若年者の食道癌よりも、食道のより深いところへ浸潤したり、食道にとどまらずに別の臓器へ転移する傾向があることが分かった。そこで今回の研究ではなぜそうなるのかということの研究をした。それは、細胞の中にあるミトコンドリアの機能障害が原因の一つであると考えられ、このミトコンドリアの機能障害が遺伝子を制御することで、癌をより浸潤や転移しやすくすることが原因である可能性が考えられた。そしてこの遺伝子制御を抑えることで浸潤や転移を抑えることができる可能性も考えられ、今後治療へのきっかけになればと考えている。

研究成果の概要（英文）：Esophageal cancer in the elderly more than 65 years old showed deeper invasion, more lymph node metastasis, and more advanced stage. Immunohistochemistry showed that Musashi2-Notch signaling induced epithelial mesenchymal transition (EMT) to esophageal cancer in the elderly, which got the cancer more malignant. On another note, there were the relationship between mitochondrial dysfunction and EMT. We found that EMT might be epigenetically controlled via DNA methylation in the elderly, and that the inhibition of DNA methylation suppressed the induction of EMT.

研究分野：消化器癌

キーワード：食道癌 高齢者 上皮間葉転換

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は固形癌の中でも悪性度の高い癌の一つである。化学療法、手術、放射線療法を用いた集学的治療が進歩しつつあるが、依然として予後は不良である。原因として、周囲臓器への浸潤や高い転移再発率が挙げられるが、上皮系の癌が間葉系の性質を獲得することで癌細胞が転移や浸潤を来す上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition : EMT) がそのメカニズムのひとつとされている。さて近年、高齢者で特徴的に血中濃度の高い有機酸のメチルマロン酸 (Methylmalonic acid : MMA) が EMT を誘導するという報告が他癌でされた。そのなかで MMA が転写因子である SOX4 を介して EMT を誘導するメカニズムが報告された。高齢化が進む日本において食道癌に罹患する高齢者の数は年々増えており、高齢者に焦点を当てた食道癌のメカニズムの解明は重要である。

### 2. 研究の目的

他癌ではあるが高齢者で血中濃度が高い MMA が EMT を誘導するメカニズムが報告されたように、高齢者における食道癌の EMT のメカニズムを追求することが研究の目的である。高齢者癌治療の重要性が高まっている背景のもと、高齢者に特徴的な分子をターゲットとすることで、高齢者の癌診療に大きなメッセージとなり得るような研究を遂行できればと考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫組織化学染色を用いた評価

術前未治療症例 135 例を対象に、65 歳以上の高齢症例と 65 歳未満の症例で、癌の進達度やリンパ節転移の数、遠隔転移など、癌の浸潤や遊走について比較検討した。さらに食道切除サンプルを用いて EMT に関連する分子による免疫組織化学染色を行い、65 歳以上の高齢症例と 65 歳未満の症例で比較検討した。

#### (2) 詳細なメカニズムの検討

高齢者で特徴的に血中濃度が高い MMA の蓄積はミトコンドリア機能障害によって起こっていることが知られている。高齢であることと EMT の関連について、ミトコンドリアの機能障害がそのメカニズムとして考えられないかどうかを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)

食道癌の術前化学療法を行っていない手術症例 135 例を対象に、65 歳以上か 65 歳未満かで病理学的な食道癌の進行度 (進達度、リンパ節転移、遠隔転移) を比較したところ、65 歳以上の方が、進達度は深く、リンパ節転移が多く、病理学的ステージが進行しているという結果であった (表 1)。遠隔転移も統計学的な有意差は認めなかったが、高齢ほど遠隔転移も多い傾向を認めた。

続いて、免疫組織化学染色を臨床サンプルを用いて行なった。

EMT と高齢との関連を検討するため、EMT マーカーの一つとされている Vimentin での免疫組織化学染色をおこなったところ、

表1: 高齢者と食道癌の進行度について

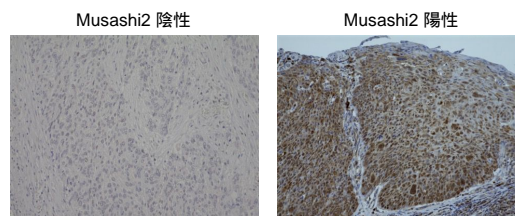
		65歳未満	65歳以上	p値
pT	0-2 / 3, 4	42 / 15	44 / 34	0.04
pN	0-2 / 3	56 / 1	70 / 8	0.03
pM	0 / 1	56 / 1	71 / 7	0.06
pStage	I / II / III / IV	29 / 17 / 11 / 0	29 / 16 / 26 / 7	0.01

術前化学療法をおこなった症例において、Vimentin の発現と進行度との関連を認めた。しかしながら Vimentin と高齢との関連は認めなかった。

そこで、過去の報告やパブリックデータベースをもとに、食道扁平上皮癌のドライバー遺伝子に TP53, CDKN2A, PIK3CA, NFE2L2, NOTCH1 が挙げられること、食道扁平上皮癌の遺伝子変異の上位には TP53 に加えて NOTCH1 が挙げられることを考慮し、EMT と関連のある NOTCH1 に着目した。Notch シグナルを担う代表的な分子である NOTCH1 は食道癌において EMT を誘導することは知られているが、今回さらにその上流の Notch シグナルを制御する Musashi2 というタンパクに着目し免疫組織化学染色を行った。その結果、65 歳以上では食道癌細胞において Musashi2 の発現が有意に多いことが分かった (図 1)。

以上より、高齢者の食道癌において、Musashi2-Notch シグナルにより制御される EMT が誘導され、その結果癌の進行度がより高くなる、ということが示唆された。

図1: 免疫組織化学染色



Musashi2		65歳未満	65歳以上	p値
Musashi2	陰性 / 陽性	34 / 23	33 / 45	0.046

(2)

一般的に、ミトコンドリア機能低下は、メチルマロニル CoA の代謝異常をきたし、高齢者で特徴的に血中濃度が高いとされている MMA の増加につながる。また高齢者では、吸収障害など様々な理由で VitB12 低下をきたしており、メチルマロニル CoA の代謝異常をさらに助長する可能性があり、VitB12 不足になった場合は、本来はミトコンドリア DNA ( mtDNA ) コピー数の増加により代償機構が働くが、高齢者では mtDNA コピー数が減少しており、代償機構が十分に機能しない。これらの事実から、高齢と食道癌の EMT との関連について、ミトコンドリア機能障害に着目してメカニズムの検討を行った。

食道癌の細胞株 ( TE8、TE11 ) に対して mtDNA コピー数の減少によりミトコンドリアの機能を低下させた、tfam-sh TE8、TE11 では、いずれも EMT マーカーの一つである Vimentin の増加が認められ、浸潤能や遊走能の亢進を認めたことから、ミトコンドリア機能低下と EMT の関連が示唆された ( 図 2 )。

上述にもあるように、高齢になると、mtDNA 変異の割合は増加し、mtDNA コピー数減少を介してミトコンドリア機能低下が生じることから、高齢者食道癌で EMT が誘導されているメカニズムとして、細胞内のミトコンドリア機能障害によるメカニズムが考えられた。

さらに、EMT が誘導されている tfam-sh 株では DNA のメチル化の割合が増加していることが分かった ( 図 3 ) が、パブリックデータベースでは、DNA メチル化酵素のひとつである DNMT3A が Vimentin の塩基配列の近傍に強力に結合することから、EMT のエピゲノム制御を担っていることが予想された。DNMT3A は分化に関連する遺伝子を標的として DNA をメチル化することが知られているが、tfam-sh 株ではリアルタイム PCR 法により DNMT3A の mRNA レベルでの増加を認めた ( 図 4 )。つまり高齢者の食道癌において、ミトコンドリア機能が低下し、DNA のメチル化によるエピジェネティックな制御が EMT を誘導していることが考えられ、高齢者食道癌の EMT を説明するメカニズムであることが示唆された。加えて、DNMT の阻害薬を用いると tfam-sh 株では EMT が抑制されることも確認され、今後の治療応用につながるきっかけとなる可能性も示唆された。

今回、高齢者において、ミトコンドリア機能低下とエピジェネティックな制御による EMT が、高齢者食道癌の進行度の悪化を説明できるメカニズムである、ということが示唆され、今後の高齢者食道癌に焦点を当てた治療のきっかけになる可能性があるかもしれない。

図2: 浸潤能の評価

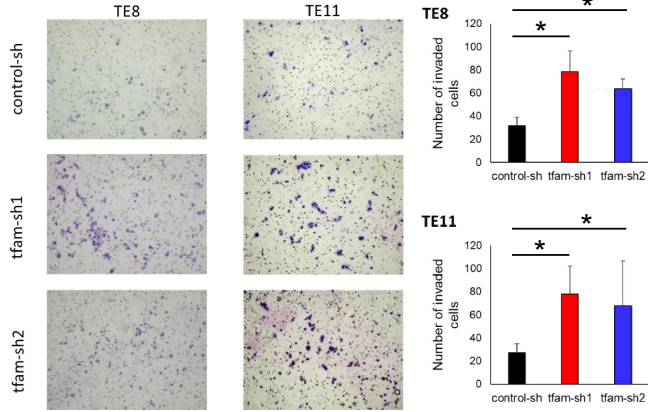


図3: DNAのメチル化について

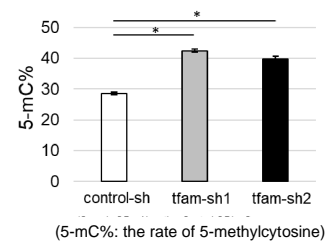
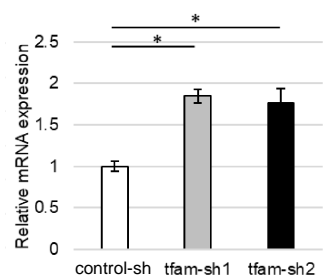


図4: DNMT3AのmRNAの発現について



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------