

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460923

研究課題名(和文) ヒト培養バレット上皮のエピゲノム解析と幹細胞性の実証を基盤とした新規予防治療法

研究課題名(英文) Development of novel therapy based on epigenetic alterations in Barrett's esophagus

研究代表者

盛一 健太郎 (Moriichi, Kentaro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：70455715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：conditioning reprogramming法(CR法)を用いて継代可能なバレット食道癌の初代培養に成功した。この細胞に酸・胆汁酸暴露を行ったところCK5とp63のmRNAの低下を認め、酸・胆汁酸暴露は扁平上皮化を抑制する可能性が示唆された。抑制機構の解析としてp53同様翻訳後修飾を受けている可能性を想定して、酸・胆汁酸暴露後にp63、CK5を脱メチル化または脱アセチル化酵素処理をしたが、変化は認めず現在機構を探索中である。次に、バレット食道癌発生に関してepigeneticに制御されている新規関連分子の探索目的でtranscriptome解析を行い19個の遺伝子を抽出、解析中である。

研究成果の概要(英文)：We successfully established primary cell culture of patient-derived Barrett's esophageal cancer (BE ca) using conditioning reprogramming method. To investigate the carcinogenic mechanisms of BE ca, the primary cells were exposed to low pH bile acids. The exposures of low pH bile acid decreased mRNA expressions of p63 and CK5. It was speculated that the post-transcriptional regulations such as abnormal gene methylations or histone acetylations were involved in the altered expressions of these genes. However, treatments of demethylation or deacetylation did not change the expressions of these mRNA, indicating the other mechanisms are associated with the effects of the exposures of low pH bile acid. We are continuously analyzing the mechanisms. In parallel, our transcriptome analysis identified novel alterations of nine gene expressions which were epigenetically regulated in the process to develop BE ca. We are analyzing the roles of these gene alterations in the cancer development.

研究分野：消化器内科

キーワード：バレット食道

1. 研究開始当初の背景

バレット食道癌 (BA) は GERD と続発するバレット食道 (BE), すなわち円柱上皮化生や腸上皮化生を経て発生すると考えられている。しかしその発癌機構は未だ不明である。我々のこれまでの検討により, BE 粘膜は高頻度のゲノム不安定性, p16, APC, E-cadherin などの癌抑制遺伝子 (TSG) プロモーター領域の高度メチル化異常を有することを明らかにした。また H. pylori 感染がメチル化異常を促進すること, さらに除菌療法によりその異常が改善することを初めて報告した (①)。BE 患者を対象とした大規模な追跡調査では一般集団と比べた腺癌リスクは 11.3 倍と高いものの, 腺癌罹患率は年間 0.12% と当初の予想より低く (②), BA 発症リスク因子のさらなる絞り込みと, 発癌に必要な分子経路の特定が急務となった。発癌の過程をより正確に再現するためにヒト由来の初代培養細胞を用いることは, 発癌・進展機構を解明するうえで重要なツールとなる。feeder 培養法をベースとして開発された conditional reprogramming 法 (CR 法) (③) は不死化を行うことなく, 比較的容易に初代細胞を得ることを可能とした。これらの方法により, 従来では困難であった良性病変, すなわち浸潤・転移能を獲得する前段階の「naive な状態」にあるヒト腫瘍培養細胞を得て, 研究の resource とすることが可能となった。

2. 研究の目的

(1) ヒト由来の継代培養可能なバレット食道株を樹立

①バレット食道 (BE) 株の樹立

内視鏡で得られた組織材料を用い, feeder 細胞と ROCK 阻害剤を組み合わせた CR 法により BE 初代細胞を増幅し, 継代可能な細胞株を樹立する。この培養細胞を用いて, 粘液形質, 円柱上皮マーカーの発現等により BE 上皮としての特性を明らかにする。

②BE 細胞を用いた TSG 発現解析とエピゲノム解析, BE 幹細胞の同定

これまでに BE 生検組織を用いて明らかにしてきた, TSG のメチル化異常に伴う silencing が上記の培養細胞において再現されるかを確認し, 同時にヒストンアセチル化による TSG silencing という観点からも相関を検証する。これらのエピゲノム制御の特徴をもとに, TSG silencing の可逆性を検証する。また, 腸上皮化生に関連する Cdx1, Cdx2 などの homeobox gene 発現と幹細胞の分化・増殖を制御する Wnt, Notch および BMP 経路異常との関連を明らかにする。

SP 分画や CD133/CD44 陽性分画を「BE 幹細胞」としてソーティングし, これらのエピゲノムプロファイルを既存の BA 株 (OE19, OE33; ECACC より購入) から得た幹細胞分画と比較する。BE 幹細胞を用い, soft agar や非接着培養皿での tumor sphere 培養によるコロニー形成能を調べる。

(2) 酸・胆汁酸暴露による phenotype の変化
樹立した初代培養細胞を用いて酸および胆汁酸に暴露して qPCR 法で phenotype の変化を明らかにして評価する。

(3) 新規関連遺伝子の検索

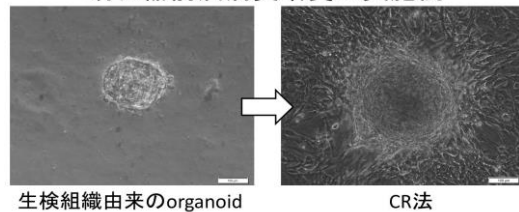
ヒト由来の初代培養細胞を用いて Transcriptome 解析を行い, 新規関連遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ①継代培養可能なバレット食道株の樹立

内視鏡的に食道扁平上皮粘膜, バレット食道粘膜, バレット食道癌粘膜から組織を採取して ROCK 阻害剤の存在下でのマウス胎児線維芽細胞との共培養による CR 法を試みる。初代バレット食道関連細胞を増幅して, 免疫細胞染色で評価する。

消化器前癌病変培養の実施例



生検組織由来のorganoid

CR法

②p16, APC, E-cadherin, MLH1, RUNX3, CRBP1 などの TSG に silencing が見られるかを RNA, タンパクレベルで検討する。メチル化異常についてもパイロシーケンシング法を用い解析を行う

(2)酸・胆汁酸負荷による分化マーカー, 幹細胞経路への影響の検討
既報 (④) のように, glycochenodeoxycholic acid (GCA), taurocholic acid (TCA), glycochenodeoxycholic acid (GCDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), glycodeoxycholic acid (GDCA), taurodeoxycholic acid (TDCA) を 20:3:15:3:6:1 で 400 μ M の bile mix を作成して, pH4 に調整して細胞に暴露する。負荷の有無で群分けして細胞を回収して, RNA を抽出して, phenotype の変化について mRNA で評価する。

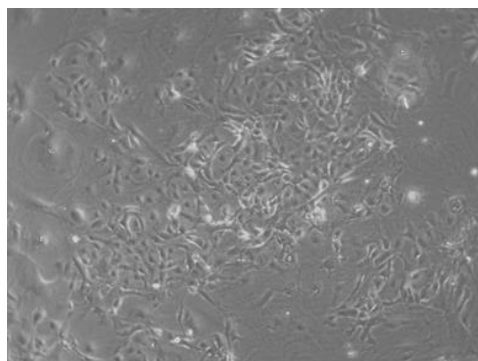
(3) Transcriptome 解析

回収した RNA を処理して Ion PI Chips を用いて次世代シーケンサーで解析を行った。対照群, 酸・胆汁酸曝露群, 脱メチル化酵素および脱アセチル化酵素処理群の各 3 群について分散分析法で解析した。

4. 研究成果

(1) 継代培養可能なバレット食道株の樹立
食道扁平上皮, バレット食道, バレット食道癌からそれぞれ組織を採取して, 組織は病理

学的に所見を確認して目的部位から組織を採取できているか確認した。サンプリングや条件を調整して CR 法を試みたところ、食道扁平上皮とバレット食道癌で継代可能な状況まで培養ができた（下図）。一方、検討した条件ではバレット食道から採取した組織からは培養が出来なかった。また、培養した細胞に対して細胞免疫染色を行い、上皮成分である E-cadherin の発現を認めた。



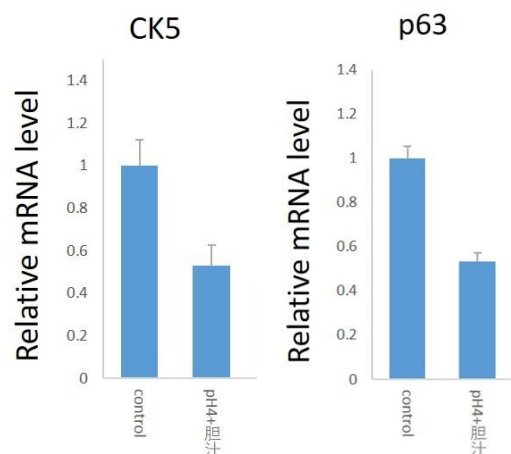
バレット食道癌由来
初代培養細胞

培養法の条件設定に時間を費やしたこと、および各初代培養細胞の増殖が緩徐であったため、当初の想定以上の時間を要することとなった。本検討が施行可能な細胞数に増殖させるためには組織採取から約 3~5 か月の期間を有した。このため当初の予定を一部省略して、以下の (2)、(3) の検討を行った。

(2) 酸・胆汁酸の暴露と phenotype の変化
既報 (Liu et al. Carcinogenesis, 2007, Bus et al. Cell Oncol, 2012) に従い pH4 に調整した胆汁酸暴露を食道扁平上皮およびバレット食道癌由来初代培養細胞に対して行い phenotype の変化について検討した。共培養のため、個々の細胞の形態的な評価は困難であるため、qPCR にて評価した。

①食道扁平上皮細胞由来の初代培養細胞は、酸・胆汁酸暴露により、ほとんどの細胞が細胞死を来して評価不能となった。一方バレット食道癌由来初代培養細胞は同様の条件でも培養可能であった。以降の検討ではバレット食道癌由来の初代培養細胞を用いている。

②pH4 に調整した胆汁酸に暴露する実験を 2 回繰り返したところ、再現性をもって Cytokeratin 5 (CK5) と p63 の低下を認めた（下図）。



この結果から、酸・胆汁酸暴露はバレット食道癌由来初代培養細胞の扁平上皮化を抑制する可能性が示唆された。抑制機構の解析について、p63 は p53 ファミリーの一つであること、p53 は翻訳後修飾を受けることから、p63 も同様に翻訳後修飾（メチル化、脱アセチル化）を受けている可能性を想定して、酸・胆汁酸暴露後に p63, CK5 を脱メチル化酵素およびアセチル化酵素で処理して発現の変化を qPCR で検討したが、有意な変化は認めなかった。現在メカニズムを探索中であり、継続課題となる。

(3) バレット食道発癌機構における新規関連分子の探索

バレット食道・癌発生に関する epigenetic に制御されている新規関連分子の探索目的で前述の検体を用いて transcriptome 解析を施行した。酸・胆汁酸暴露により発現が有意に変化している遺伝子で、さらに脱メチル化及び脱アセチル化処理を行い有意に発現が変化して暴露前と同等の発現レベルに変化したものを検索した。酸・胆汁酸暴露によりメチル化異常を来した可能性が示唆されるものは 49 遺伝子、同様にアセチル化との関連が示唆されるものは 86 遺伝子それぞれ抽出された。さらに酸・胆汁酸暴露を行った際に、メチル化及びアセチル化の検討の際にそれぞれの解析で有意に同じ変化を示す遺伝子を検索したところ 9 個の遺伝子が抽出され、現在各候補遺伝子に対して解析中である。

<引用文献>

- ① Moriichi K, Watari J, Fujiya M, et al. Effects of Helicobacter pylori infection on genetic instability, the aberrant CpG island methylation status and the cellular phenotype in Barrett's esophagus in a Japanese population, Int J Cancer, 124, 2009, 1263-9
- ② Hvid-Jensen F1, Pedersen L, Drewes AM, et al. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus, N Engl J Med, 365, 2011,

1375-83

- ③ Liu X, Ory V, Chapman S, et al. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells, *Am J Pathol*, 180, 2012, 599-607
- ④ Liu T, Zhang X, So CK, et al. Regulation of Cdx2 expression by promoter methylation, and effects of Cdx2 transfection on morphology and gene expression of human esophageal epithelial cells, *Carcinogenesis*, 28, 2007, 488-96

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10件)

- ① Konishi H, Fujiya M, Moriichi K, et al. Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis, *Nat Commun.* 7, 2016, 12365
- ② Moriichi K, Fujiya M, Okumura T. The efficacy of autofluorescence imaging in the diagnosis of colorectal diseases, *Clin J Gastroenterol.* 9, 2016, 175-83
- ③ Sakatani A, Fujiya M, Moriichi K, et al. Polyphosphate Derived from *Lactobacillus brevis* Inhibits Colon Cancer Progression Through Induction of Cell Apoptosis, *Anticancer Res.* 36, 2016, 591-8.
- ④ Tanaka K, Fujiya M, Moriichi K, et al. Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway, *Biochem Biophys Res Commun.* 467, 2015, 541-8.
- ⑤ Moriichi K, Fujiya M, Ijiri M, et al. Quantification of autofluorescence imaging can accurately and objectively assess the severity of ulcerative colitis, *Int J Colorectal Dis.* 30, 2015, 1639-43.
- ⑥ Ando K, Fujiya M, Moriichi K, et al. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 Improves the Intestinal Injury by Regulating Apoptosis Through Trefoil Factor 2 in Mice with Anti-CD3-induced Enteritis, *Inflamm Bowel Dis.* 21, 2015, 1541-52.
- ⑦ Kashima S, Fujiya M, Moriichi K, et al. Polyphosphate, an active molecule

derived from probiotic *Lactobacillus brevis*, improves the fibrosis in murine colitis, *Transl Res.* 166, 2015, 163-75.

- ⑧ Gala MK, Mizukami Y, Moriichi K, et al. Germline mutations in oncogene-induced senescence pathways are associated with multiple sessile serrated adenomas, *Gastroenterology*, 146, 2014, 520-9.
- ⑨ Fujiya M, Konishi H, Moriichi K, et al. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, *Oncogene*, 33, 2014, 4847-56.
- ⑩ Nomura Y, Moriichi K, Fujiya M, et al. Reduction of E-cadherin by human defensin-5 in esophageal squamous cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 439, 2013, 71-7.

[学会発表] (計1件)

内海 辰哉, 盛一健太郎, 藤谷幹浩, 他. パレット食道表在癌の臨床的検討 第22回日本消化器関連学会週間 (JDDW) 2014.10.24 神戸

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計1件)

特許, 抗腫瘍剤 (日本), 藤谷幹浩, 小西弘晃, 盛一健太郎
出願番号 (特願 2016-9224, 2016年01月), 旭川医科大学

[その他]

ホームページ等
<http://>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

盛一 健太郎 (MORIICHI, Kentaro)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70455715

(2) 研究分担者

水上 裕輔 (MIZUKAMI, Yusuke)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 30400089

藤谷 幹浩 (FUJIYA, Mikihiro)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 80322915