

氏 名	阿 部 郁
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 692 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	食道胃接合部癌において胃酸・胆汁酸逆流が誘導する染色体不安定性についての検討
論文審査委員	(委員長) 教授 武 藤 弘 行 (委 員) 准教授 三 瀬 名 丹 准教授 齋 藤 心

論文内容の要旨

1 研究目的

食道胃接合部腺癌は世界的に増大傾向であり、ヘリコバクター・ピロリ除菌の普及により胃癌罹患者数が減少している本邦においてもその割合は増加傾向である。近年固形がんに対するゲノム解析が進み、食道胃接合部癌については染色体不安定性（CIN）が多くを占めることが明らかとなった。一方で、食道胃接合部癌の前癌病変と考えられている Barrett 食道（BE）の形成に深く関与するとされる胃酸・胆汁酸と CIN との関連は検討されてきていない。

当科ではこれまで胃癌、大腸癌におけるメチル化の制御異常とゲノムの不安定性、そして癌化という一連の経路に着目し、ゲノム全域に渡って蓄積された遺伝子異常、遺伝子修飾異常を包括的に評価してきた。特に、脱メチル化異常（メチル化の低下）とゲノム不安定性の関係に着目し、セントロメア領域（染色体分裂の中心）の脱メチル化異常がセントロメア蛋白の過剰発現を誘導し、細胞分裂の際に数的異常を引き起こす事を見いだした。

本研究では、食道胃接合部腺癌の発癌メカニズムとして胃酸や胆汁酸が起因する炎症が誘導する脱メチル化異常や、脱メチル化異常によりセントロメア領域の non-coding RNA が担う siRNA 機構が破綻し、ゲノム不安定性が引き起こされる一連のプロセスを明らかにすることを目的とする。

2 研究方法

1. 臨床検体での検証：腫瘍組織は、自治医科大学附属さいたま医療センターで手術を施行し、同意が得られた Barrett 食道腺癌症例 14 例から採取した。同一患者における正常扁平上皮と Barrett 食道腺癌部の Satellite DNA の脱メチル化レベルを比較した。

2. 噴門部癌細胞株（OACP4C）、バレット上皮細胞株（CP-A）、バレット食道癌細胞株（OACM5.1C）において特定の強酸、胆汁酸曝露下において誘導される脱メチル化異常を介した染色体不安定性の誘導を検証した。胆汁酸として、DCA を用い、HCl で pH 調整を行った培地で 48 時間培養を行い、2 ないし 3 回これを繰り返した後、通常培地で十分に増殖した細胞を用い各アッセイに用いた。

① ゲノムワイドな脱メチル化レベルの定量には、メチル化特異的 PCR 法のひとつである

MethyLight 法を用いて、ゲノム全域に存在する反復配列 (LINE-1, Alu, Satellite DNA) の脱メチル化異常を測定することで評価した。

② 染色体のコピー数変化が生じた場合の標的染色体を確認するため、Array comparative genomic hybridization (CGH) 法を行った。また、CIN を示唆する形態学的変化をとらえるため、 α -Tubulin 抗体を用いた免疫細胞染色を行った。

③ CP-A において、酸および胆汁酸の曝露により遺伝子発現差が生じるかを確認するため、遺伝子発現解析を行った。また、得られた結果の解釈のため、RRBS 法を用いたメチル化解析を行った。

3 研究成果

1. Barrett 食道腺癌の臨床検体において、腫瘍に隣接する食道扁平上皮組織 (SE) および Barrett 食道腺癌組織 (BA) における Sata RDL を比較したところ、BA では SE に比べ、Sata RDL 値は有意に高かった (BA の Sata RDL : 0.3139, SE の Sata RDL : 0.06631、各中央値)。本結果から、Barrett 食道腺癌の発癌過程において、DNA 脱メチル化が関与している可能性があると考えられた。

2.

① CP-A では酸および胆汁酸の曝露 (以後、曝露群) により Satellite DNA の脱メチル化レベルが上昇し、Satellite α の転写産物である Satellite alpha transcripts (SAT) も増加を認めたが、LINE-1 の脱メチル化レベルに変化は認めなかった。癌細胞株では、曝露群において脱メチル化レベルの変化は認めなかった。

② CGH 解析では、Barrett 食道細胞株 CP-A の曝露群で、5q、7q、9p にコピー数減少を、18q に増加を認めた。Barrett 食道癌細胞株 OACM5.1 では酸および胆汁酸の曝露により明らかなコピー数変化を認めなかった。また、CP-A では micronuclei、multiple nuclei、abnormal segregation といった分裂異常を示唆する所見を認め、非曝露群 (コントロール) と比較して有意に異常細胞数が増加していた。

③ 全 Transcript Cluster 21448 のうち、1417 にコントロールと比較して 2 倍以上の発現差を認めた。このうち、発現増加は 573、発現低下は 844 であった。発現低下を認めた遺伝子について、Gene Annotation pathway 解析を行ったところ、細胞周期や細胞分裂に関わる遺伝子が多いことが明らかとなった。CGH 解析で Loss を認めた染色体上に存在する遺伝子のうち、遺伝子発現の低下を認めたいくつかは、転写開始点の CpG アイランドにメチル化を認めず、遺伝子発現の低下がメチル化によるものではなく、染色体の欠失によるものである可能性が考えられた。

4 考察

本研究において、酸及び胆汁酸の曝露は、Barrett 食道細胞株においてセントロメア領域の反復配列である Satellite α 特異的に脱メチル化変化を促進し、Satellite α から転写される Non-coding RNA である、Satellite α 転写産物の発現が増加すること、その結果、分裂異常を伴う染色体不安定性が誘導されることが明らかになった。一方、これらの変化は癌細胞株ではみられなかったことから、酸および胆汁酸の曝露は癌の進行よりも発生に寄与していると考えられた。

5 結論

Barrett 食道細胞株において、胃酸や胆汁酸による慢性刺激は、Sata 配列からなるセントロメアの低メチル化変化を促進させ CIN を誘導することから、酸および胆汁酸の曝露は Barrett 食道に由来する食道胃接合部癌の発生メカニズムに関与している可能性があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、初めに Barrett 食道癌患者の手術検体を用い、Barrett 食道の背景となる食道扁平上皮部と Barrett 食道腺癌部における Satellite α の脱メチル化レベルを比較検討した。その結果、Barrett 食道癌の患者では腺癌部が食道扁平上皮部よりも有意に Satellite α の脱メチル化レベルが上昇していることが明らかとなった。脱メチル化の機序を解明するため、食道胃接合部癌に関連する細胞株において、酸および胆汁酸の曝露前後の LINE-1 および Satellite α の脱メチル化レベルおよび SAT の発現を評価した。その結果、Barrett 食道細胞株において、酸および胆汁酸の曝露が Satellite α の脱メチル化を誘導し、SAT の発現が亢進していた。酸および胆汁酸曝露による染色体不安定性の誘導について検討したところ、SAT の発現亢進を認めた Barrett 食道細胞株において、数的、形態学的な染色体不安定性が認められた。以上から、酸および胆汁酸の曝露は Barrett 食道に由来する食道胃接合部癌の発癌過程に関与する可能性があることを明らかにした。

臨床検体を用いて Barrett 食道腺癌において Satellite α の脱メチル化レベルが有意に上昇していることが明らかとし、そのメカニズムを食道胃接合部癌に関連する細胞株において明らかにした。Scientific Reports に掲載されており学位論文として十分に値する論文である。

丁寧な実験結果に基づき結論を導き出しており学位論文としてふさわしい。

最終試験の結果の要旨

本研究では、初めに Barrett 食道癌患者の手術検体を用い、Barrett 食道の背景となる食道扁平上皮部と Barrett 食道腺癌部における Satellite α の脱メチル化レベルを比較検討した。その結果、Barrett 食道癌の患者では腺癌部が食道扁平上皮部よりも有意に Satellite α の脱メチル化レベルが上昇していることが明らかとなった。脱メチル化の機序を解明するため、食道胃接合部癌に関連する細胞株において、酸および胆汁酸の曝露前後の LINE-1 および Satellite α の脱メチル化レベルおよび SAT の発現を評価した。その結果、Barrett 食道細胞株において、酸および胆汁酸の曝露が Satellite α の脱メチル化を誘導し、SAT の発現が亢進していた。酸および胆汁酸曝露による染色体不安定性の誘導について検討したところ、SAT の発現亢進を認めた Barrett 食道細胞株において、数的、形態学的な染色体不安定性が認められた。以上から、酸および胆汁酸の曝露は Barrett 食道に由来する食道胃接合部癌の発癌過程に関与する可能性があることを明らかにした。

臨床検体を用いて Barrett 食道腺癌において Satellite α の脱メチル化レベルが有意に上昇していることが明らかとし、そのメカニズムを食道胃接合部癌に関連する細胞株において明らかにした。Scientific Reports に掲載されており学位論文として十分に値する論文である。

プレゼンテーションは臨床データの結果をもとに、機序を培養細胞で検討しており、結果に基づいて非常にわかりやすく説明していた。プレゼンテーション自体も綿密に組み立て練習したことが分かる素晴らしいものであった。質疑応答も十分であり、学位最終試験に合格と判断した。