

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	野村好紀
<p>学位論文題目</p> <p>Reduction of E-cadherin by metaplastic Paneth cell-derived defensin in Barrett's esophagus (バレット食道における異所性パネート細胞由来ディフェンシンによる E-カドヘリンの減少)</p> <p>共著者名 盛一健太郎, 田邊裕貴, 藤谷幹浩, 高後 裕</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>食道バレット腺癌は、欧米で急速に増加し、本邦でも食の欧米化などにより増加が予想される。バレット食道は、病理学的に食道扁平上皮が腺上皮に置換される化生性の変化で前癌病変と考えられ、その診断と経過観察は重要性である。我々は、食道扁平上皮からバレット食道に発展する初期の段階からメチル化異常を介したE-カドヘリンの発現低下が見られることを報告した。食道腺癌のE-カドヘリンの発現低下は、食道腺癌の予後不良因子の一つで、発癌初期から進展までの広範囲に影響を及ぼす重要な分子と考えられている。</p> <p>更に、バレット食道では杯細胞化生が特徴で、時に異所性パネート細胞も認められ、これらの変化は、胃酸や胆汁酸の逆流により生じた炎症に起因すると考えられている。この異所性パネート細胞はヒト胃炎の化生性変化でも見られ、我々は、持続的なヘリコバクターピロリ感染の結果、慢性胃炎に生じたパネート細胞から抗菌ペプチドのヒトディフェンシン-5 (HD-5) が分泌されること、HD-5が胃内でのヘリコバクターピロリ菌の駆除に関わる可能性を示した。慢性胃炎の異所性パネート細胞にHD-5が発現することと同様に、胃食道接合部に生じた異所性パネート細胞においてもHD-5が発現することはShen Bらが報告しているが、その意義は全く検討されていない。本研究では、まず、食道胃接合部の臨床検体を用いて扁平上皮のE-カドヘリン蛋白発現と異所性パネート細胞におけるHD-5発現との関係を解析した。更に、食道扁平上皮細胞株を用いてE-カドヘリン発現を、<i>in vitro</i>で解析する系で、HD-5の影響を転写、翻訳、およ</p>			

び蛋白分解レベルで検討し、胃食道接合部において、異所性パネート細胞から分泌されるディフェンシンが扁平上皮におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 材 料 ・ 方 法

### 1. ヒト臨床検体を用いた検討

旭川医科大学病院で、胃または食道癌で外科手術を施行された症例から食道胃接合部の病理標本を選択し、更に食道胃接合部の切片に非癌部の扁平上皮と円柱上皮が含まれ、かつ病理組織学的な検討が可能であった15症例を用いた。E-カドヘリンの免疫染色は、薄切切片をクエン酸バッファー中で免疫賦活処理を行い、一次抗体にはNCL-E-Cadを使用し、DABで発色した。食道胃接合部の扁平上皮における発現量の増減は、近位食道扁平上皮と比較して判定した。HD-5免疫染色にはHD-5抗体8C8を一次抗体に用い、発現の有無と発現パターンを確認した。

### 2. 培養細胞株を用いた検討

食道扁平上皮細胞株Het1Aを、BEBM培地中、コラーゲンコートプレートで培養した。HD-5刺激には合成HD-5を培地に加えた。蛋白発現は、免疫蛍光染色を蛍光顕微鏡下で観察し、FACS解析で確認した。ウェスタンブロッティングの検出にはLAS2000を用いImage-Jソフトウェアで発現量を定量した。RNAはRNease mini kitを用いて抽出し、逆転写反応で得たcDNAを鋳型として、7300 realtime PCRシステムで定量化し、18S rRNAを内部標準として用いた。

## 成 績

### 1. ヒト臨床検体を用いた検討

臨床検体の病理組織像は、バレット食道が10例（67%）に陽性で、腸上皮化生は9例（60%）に陽性であった。食道胃接合部の扁平上皮におけるE-カドヘリンの発現は9例（60%）で低下し、6例（40%）で増加していた。それらの関係を見ると、バレット食道陽性10例のうち7例（70%）で、腸上皮化生陽性9例のうち7例（78%）でE-カドヘリン発現が低下していた。つまり、食道胃接合部に化生性変化を有する症例では、E-カドヘリン発現低下例が多くみられた。免疫組織学的に検討したHD-5発現は腸上皮化生腺管の底部に見られる異所性パネート細胞の細胞質内顆粒に特異的で、8例（53%）に認められた。そのうち、E-カドヘリンの発現が低下している症例は7例（88%）で、HD-5とE-カドヘリン発現には負の相関が見られた。

### 2. 培養細胞株を用いた検討

Het1Aを用いて*in vitro*の解析を加えた。E-カドヘリン蛍光染色では細胞骨格が染色され、

HD-5の添加でその発現は低下し、FACSでも同様の傾向が示された。ウエスタンブロッティングでは、120kDのE-カドヘリン蛋白が特異的に検出され、10  $\mu$ g/mlのHD-5添加培養で発現が低下した。E-カドヘリンRNAの発現は変化がなく、翻訳後修飾による発現低下が示唆された。そこで、細胞内の蛋白分解の影響を検討するため、プロテアーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、またはオートファジー阻害剤を添加し検討したが、HD-5によるE-カドヘリンの発現低下は、それらの阻害剤で回復しなかった。なお、カルシウム濃度を増加させるとE-カドヘリン発現低下が回復したことから、カルシウムによるE-カドヘリンの接着構造の維持が重要であった。

#### 考 案

ディフェンシンは主に小腸のパネート細胞から分泌される内因性抗菌ペプチドで、腸管粘膜からの細菌の侵入を防御して腸管恒常性の維持に貢献している。HD-5発現は小腸パネート細胞に加えて、大腸や胃、食道の慢性炎症の結果生じる異所性パネート細胞にも発現することが報告されている。本研究では、臨床検体を用いて、食道胃接合部の腸上皮化生で異所性パネート細胞特異的にHD-5が発現している症例で、細胞接着に重要なE-カドヘリンの発現が低下していることを示した。細胞株を用いた*in vitro*の検討では、扁平上皮細胞におけるE-カドヘリンの発現低下は蛋白レベルで生じ、翻訳レベル以降の調節を受けていた。カドヘリン蛋白の細胞内での分解機構には、プロテアーゼやユビキチン・プロテアソーム、オートファジーなどの多くの分解系が関わると考えられているが、いずれの機構の関与も否定され、それ以外の調節系の存在が推察された。カドヘリンはその名前が示すように、カルシウム依存性の接着分子 (adhesion molecule) で、分子間接着と構造維持に $\text{Ca}^{2+}$ を用いている。今回、カルシウムを増加させることでHD-5によるE-カドヘリンの発現低下が回復したことから、E-カドヘリンの構造がカルシウムにより安定化して蛋白分解から回避したものと考えられた。

#### 結 論

今回我々は、ヒト食道胃接合部において、異所性パネート細胞におけるHD-5発現が認められる症例で、E-カドヘリン蛋白が低下することを発見した。更に、食道扁平上皮細胞株を用いた*in vitro*の検討で、HD-5刺激によりE-カドヘリン蛋白が減少することを確認した。つまり、胃食道接合部において、異所性パネート細胞から分泌されるディフェンシンが扁平上皮のE-カドヘリンの発現を低下させることを証明した。本研究により、HD-5が扁平上皮からバレット食道への変化をさらに進展させる可能性が示された。




#### 引用文献

- 1) Moriichi K, Watari J, Das KM, 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*. 2009 124: 1263-9.
- 2) Shen B, Porter EM, Reynoso E, et al. Human defensin 5 expression in intestinal metaplasia of the upper gastrointestinal tract. *J Clin Pathol*. 2005 58: 687-694.
- 3) Tanabe H, Sato T, Watari J, et al. Functional role of metaplastic paneth cell defensins in Helicobacter pylori infected stomach. *Helicobacter*. 2008 13: 370-9.

#### 参考論文

- 1) Moriichi K, Fujiya M, Sato R, Nata T, Nomura Y, Ueno N, Ishikawa C, Inaba Y, Ito T, Okamoto K, Tanabe H, Mizukami Y, Watari J, Saitoh Y, Kohgo Y. Autofluorescence imaging and the quantitative intensity of fluorescence for evaluating the dysplastic grade of colonic neoplasms. *Int J Colorectal Dis*. 2012 27: 325-30.
- 2) Sato R, Fujiya M, Watari J, Ueno N, Moriichi K, Kashima S, Maeda S, Ando K, Kawabata H, Sugiyama R, Nomura Y, Nata T, Itabashi K, Inaba Y, Okamoto K, Mizukami Y, Saitoh Y, Kohgo Y. The diagnostic accuracy of high resolution endoscopy, autofluorescence imaging and narrow-band imaging for differentially diagnosing colon adenoma. *Endoscopy*. 2011 43: 862-8.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	野村 好紀
審査委員長 奥村 利勝  審査委員 古川 博之  審査委員 高後 裕 			
学 位 論 文 題 目  <b>Reduction of E-cadherin by metaplastic Paneth cell-derived defensin in Barrett's esophagus</b> (バレット食道における異所性パネート細胞由来ディフェンシンによる E-カドヘリンの減少)			
バレット食道は、胃食道逆流の結果、病理学的に食道扁平上皮が腺上皮に置換される化生性の変化で前癌病変と考えられている。バレット食道では胃食道接合部に生じた異所性パネート細胞において、内因性抗菌ペプチドディフェンシン(HD-5)が発現することが報告されているが、その意義は不明である。本研究では、異所性パネート細胞から分泌される HD-5 が食道扁平上皮にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。特に扁平上皮からバレット上皮への進展に深く関与することが知られている Eカドヘリンに注目した。食道胃接合部の臨床検体と食道扁平上皮細胞株を用いて研究を行った。胃または食道癌で外科手術を施行された 15 症例の食道胃接合部の臨床検体の検討では、バレット食道陽性 10 例のうち 7 例 (70%) で E-カドヘリン発現が低下し、食道胃接合部化生性変化症例では、E-カドヘリン発現低下が示唆された。HD-5 発現は腸上皮化生腺管の底部に見られる異所性パネート細胞の細胞質内顆粒に特異的で、15 例中 8 例 (53%) に認められた。			

そのうち、E-カドヘリンの発現が低下している症例は7例（88%）で、HD-5とE-カドヘリン発現には負の相関が見られた。次に食道扁平上皮細胞株 Het1Aによる *in vitro* の解析を行った。免疫染色、FACSやウエスタンブロットの検討では、HD-5の添加でE-カドヘリンの発現は低下した。しかしE-カドヘリン mRNAの発現はHD-5により影響を受けず、翻訳後修飾による発現低下が示唆された。そこで、細胞内の蛋白分解の影響を検討するため、プロテアーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、またはオートファジー阻害剤を添加し検討したが、HD-5によるE-カドヘリンの発現低下は、それらの阻害剤ではいずれも回復阻止できなかった。カルシウム濃度を増加させるとHD-5によるE-カドヘリン発現低下がブロックされたことから、カルシウムによるE-カドヘリンの接着構造の維持がHD-5によるE-カドヘリンの発現低下重要と考えた。以上より、バレット食道に発現するHD-5はカルシウム依存性にE-カドヘリンの発現を低下させることが示唆され、この現象がバレット食道の発症進展に重要である可能性が新たに提唱された。論文提出者は関連領域に関する質問にも十分な知識を背景に不足なく返答した。以上総合して、学位論文として必要十分と判断した。