

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08946

研究課題名(和文) Notch1遺伝子を介した胃上皮細胞老化機構逸脱による新たな胃癌発癌機序の解明

研究課題名(英文) Gastric carcinogenesis mechanism by impaired expression of Notch1 receptor through the deviation from cellular senescence

研究代表者

今谷 晃 (Imatani, Akira)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30333876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Helicobacter pylori (H.pylori)感染によって、加齢とともに胃粘膜萎縮が進展し分化型胃癌が生じる。幹細胞の分化維持を担う細胞膜受容体Notch1レセプターは胃癌発癌にも関与していることが報告されている。本研究の胃癌培養細胞株を用いた検討によって、Notch1レセプターは胃癌細胞においてエピジェネティックな変化で抑制を受けており、その発現が回復すると癌抑制遺伝子p53の発現を介して細胞老化が誘導され、造腫瘍能が抑制を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori infection causes the differentiated gastric cancer through mucosal atrophy with aging. It is well known that Notch1 receptor regulates the maintenance of stem cells and its abnormality leads to the gastric carcinogenesis. In vitro analyses showed that the expression of Notch1 receptor was down-regulated through DNA methylation in human gastric cancer cells. And also, this study showed that restoration of its expression induced cellular senescence through the expression of p53, leading to the suppression of gastric tumorigenesis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃癌 エピジェネティック Notch1 細胞老化

## 1. 研究開始当初の背景

*Helicobacter pylori* (*H.pylori*) が感染した胃粘膜では、加齢とともに、固有胃腺から胃粘膜萎縮を経て腸上皮化生が進展し、さらに分化型胃癌が生じるとされている (Correa 仮説)。この過程は、幹細胞の胃から腸への re-programming の際に癌が誘導されるとも言い換えられる。

homeobox 遺伝子 Sox2 は iPS 細胞を誘導するために必須遺伝子であることはよく知られているが、成体の脳、肺、食道、胃の分化維持に重要な遺伝子でもある。そして *H.pylori* 感染で胃粘膜萎縮が進展する際に Sox2 の発現が低下することを本研究グループは以前に明らかにしている (AJP, 2009)。

一方、Notch1 も幹細胞維持に関わる膜貫通型レセプターであり、その発現異常は胃癌発癌に関与していることが知られている。Notch1 レセプターにリガンドが結合すると、a disintegrin and metallopeptidase domain 17 (ADAM17) といった切断酵素によって Notch1 の細胞外ドメインが切断を受け、Notch intracellular region (NICD) となり核内に移行し標的遺伝子の発現を誘導している。そして本研究グループは、Sox2 プロモーター上の RBP-J $\kappa$  motif を介して NICD が直接 Sox2 の発現を調節していること、さらに *H.pylori* 感染によって Notch1 発現が低下すると Sox2 の発現が抑制を受け、その結果、壁細胞の形質を表現する proton pump (ATPase) の発現を抑制、つまり、胃粘膜萎縮に関与することを明らかにしている。

一方、細胞老化は、生理学的には癌化を防ぐために働く不可逆的な増殖停止状態とされ、p53-p21 あるいは p16<sup>INK4a</sup> を介し RB タンパク質が活性化し、細胞周期の G1 から S 期への進行を停止させ細胞老化は誘導されることが知られている。近年、乳癌や悪性黒色腫において Notch3 が p21 を介して細胞老化を誘導し癌抑制的に作用していることが報告されている。

このため、胃粘膜萎縮の過程で胃癌が生じる際に、Notch1 の発現異常による細胞老化が関与することが類推されるが、国内外を通じ解明されていない。

## 2. 研究の目的

*H.pylori* 感染によって胃粘膜萎縮が進展する過程において分化型胃癌が生じる分子生物学的機序を解明する目的で、細胞分化維持と細胞老化の両面で重要な Notch1 に着目して、*H.pylori* 感染胃癌細胞においてどのように Notch1 発現が影響を受けるか、エピジェネティックな変化である DNA メチル化の観点から、また、Notch1 シグナルの調節不全が分化型胃癌発癌機序に関与しているか細胞老化の観点から解明する。

## 3. 研究の方法

(1) DNA 脱メチル化剤 5-Aza-dc 添加における qPCR 法による Notch1 発現定量

最初にヒト *Notch1* 遺伝子のゲノムを対象に MethPrimer を利用して CpG island を検索したところ、ヒト *Notch1* のプロモーターを含む exon1 を中心とした領域に、2491bp の CpG island が存在することを確認した。このため、胃癌培養細胞株 AGS を 5 $\mu$ M 5-Aza-dc を添加 8 時間培養し、その後 1x10<sup>8</sup> CFU/ml の *H.pylori* (ATCC #43504) で 4 時間刺激した。TRIzol 試薬を用いて RNA を抽出し、cDNA を合成し、StepOnePlus Real-Time PCR system (ABI) を用いて Notch1 の mRNA の発現定量を行った。

(2) ADAM17 切断酵素阻害剤 Marimastat 添加によるフローサイトメトリー (FACS) を用いた Notch1 レセプター発現の確認

AGS 細胞に Marimastat (0 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) を添加し 48 時間培養した後、Notch1 細胞膜外ドメインを認識する抗 Notch1 extracellular 抗体で標識し、FACS Fortessa を用いて Notch1 細胞膜外ドメイン陽性細胞をカウントした。

(3) マトリゲル基底膜マトリックスを用いた Marimastat によるコロニー形成への影響

1 ウェル当たり AGS 細胞 1x10<sup>3</sup> 個をマトリゲルに混濁して、24 ウェルプレートに分配した。その後、培地に Marimastat (0 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) を添加し、5 日間培養し、倒立顕微鏡下でコロニーが形成されているかどうか観察した。

(4) Marimastat 添加における Western blot 法および q-PCR 法による p53 発現と RB 活性

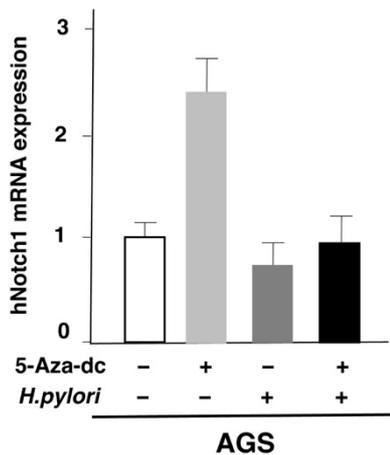
AGS 細胞に Marimastat (0 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) を添加し 48 時間培養した後、タンパクを抽出した。抗 p53 抗体あるいは抗リン酸化 Rb (Ser807/Ser811) 抗体を用いて Western blot を行った。また、p53 に関しては、同条件下で処理した AGS 細胞から RNA を抽出して qPCR 法を用いて p53 の発現を定量し確認した。

(5) 細胞老化関連性  $\beta$ -galactosidase 染色

Marimastat (0 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M) を AGS 細胞に添加し 48 時間培養した。細胞をパラホルムアルデヒドで固定化した後、細胞老化に関連しているとされている  $\beta$ -galactosidase 活性測定するため、X-gal 添加し 24 時間後、青色に染色した細胞を倒立顕微鏡下に観察した。

#### 4. 研究成果

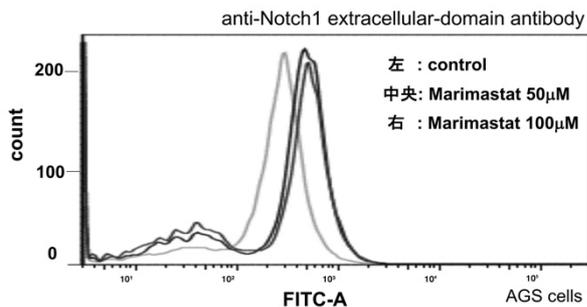
(1) DNA メチル化による Notch1 発現抑制  
 胃癌細胞株 AGS を脱 DNA メチル剤 5-Aza-dc で処理し、Notch1 の発現を qPCR 法で検討したところ、5-Aza-dc を添加することによって Notch1 の発現は 2.4 倍前後まで回復した。一方、*H. pylori* を感染させたところ、その発現は 0.7 倍前後まで抑制を受けたが、さらに 5-Aza-dc 添加によって発現回復傾向を認めた。(下図)



このため、AGS 細胞においてエピジェネティックな変化である DNA メチル化によって Notch1 レセプターの発現は抑制を受けていることが明らかとなった。

(2) Marimastat 添加による Notch1 レセプターの発現維持

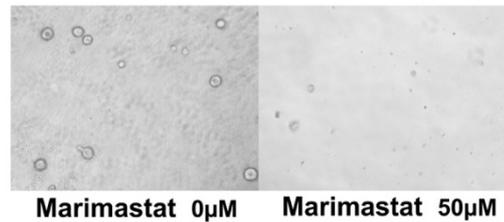
Marimastat 非添加に比べて、50 $\mu$ M および 100 $\mu$ M の Marimastat 添加によって Notch1 細胞膜外ドメイン陽性細胞数の増加を認めた。(下図)



このため、Marimastat 添加によって Notch1 レセプターの発現が維持されることが確認できた。

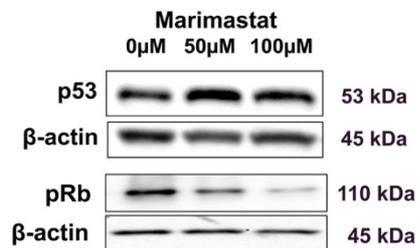
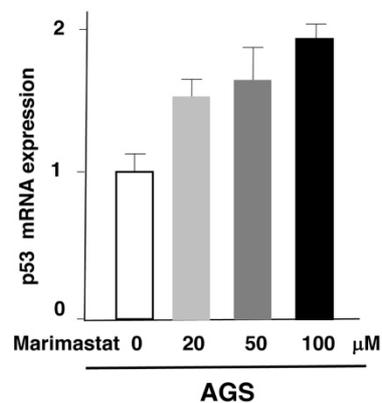
(3) Marimastat 添加によるマトリゲル内でのコロニー形成の抑制

AGS 細胞は Marimastat 添加によってマトリゲル内でのコロニー形成が著明に抑制された。このため、Marimastat 添加によって Notch1 レセプター発現が維持されると AGS 細胞において造腫瘍能が低下することが明らかとなった。(右上図)



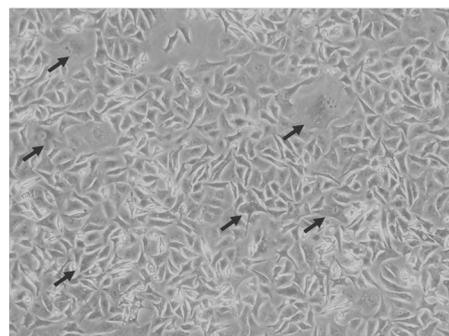
(4) Marimastat 添加による p53 の発現誘導と Rb の活性化

mRNA レベルでの p53 の発現量は Marimastat 添加により 20 $\mu$ M で 1.6 倍前後、50 $\mu$ M で 1.7 倍前後、100 $\mu$ M で 1.9 倍前後に濃度依存性に発現誘導を認め、タンパクレベルでも Marimastat を添加することによって増加傾向を認めた。また、Rb は Marimastat 添加によって低リン酸化が認められた。(下図)



このため、Marimastat 添加によって Notch1 レセプターの発現が維持されると、p53 の発現が誘導され、そのシグナル伝達の下流にある Rb の低リン酸化がおこることが示唆された。

(5) Marimastat 添加による細胞老化の誘導



(矢印は細胞質に染色性を認めた細胞を示す)

AGS 細胞は Marimastat 添加 48 時間後には、細胞老化に特徴的である扁平・肥大化した細胞がより多く散見された。そして、扁平・肥大化した細胞の多くで細胞老化に関連のあるとされている  $\beta$ -galactosidase 活性を示す X-gal の青色の染色性を認めた。(上図)

このため、Marimastat 添加によって AGS 細胞において細胞老化を誘導されていることが示唆された。

以上より、胃癌培養細胞では Notch1 レセプターは、プロモーター上のエピジェネティックな変化である DNA メチル化を受け、その発現が抑制を受けていることが明らかとなり、*H.pylori* 感染の影響も受けていることが示唆された。

Notch1 細胞膜外ドメインを切断する酵素である ADAM17 の阻害剤 Marimastat を用いると Notch1 レセプターの発現が回復することを検証した。Marimastat を添加することによって、マトリゲル内での造腫瘍能は抑制されることが判明した。そして、p53 が誘導し Rb が低リン酸化を受けており、細胞老化を誘導するシグナルが活性化していることが示唆された。実際に細胞老化関連性  $\beta$ -galactosidase 染色すると、細胞老化が誘導されていることが確認できた。これらより、胃癌細胞において Notch1 レセプターの発現が回復すると、細胞老化が誘導され、造腫瘍作用が抑制を受けることが示唆された。

つまり、胃癌発癌機序の 1 つとして、DNA メチル化というエピジェネティックな変化によって、Notch1 レセプターの発現が抑制を受けると、細胞老化誘導機能が低下し、細胞老化で排除されるべき異型細胞が細胞老化から逸脱して、発癌に結びつくこと類推できた。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Xiaoyi Jin, Naoki Asano, Yutaka Kondo, Akira Imatani, Tooru Shimosegawa  
Impaired Notch1 function due to *Helicobacter pylori* infection contributes to gastric mucosal atrophy and carcinogenesis.  
第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日, 名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今谷 晃 (IMATANI AKIRA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30333876