

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18405

研究課題名(和文)炎症性微小環境で活性化されるNox複合体/ROSによる胃がん発生機序の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of Noxo1/Nox1 complex in gastritis and inflammation-associated gastric tumor development

研究代表者

越前 佳奈恵 (Echizen, Kanae)

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：20743834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：H. pylori感染に起因する慢性炎症は胃がん発生の主な原因の一つである。本研究では、胃炎組織に浸潤してきた間質細胞から分泌されるTNF- $\alpha$ によってNox1複合体が活性化するメカニズムを明らかにし、これらが胃粘膜の過形成や化生の形成に関わる可能性を明らかにした。本研究で行った実験の結果は、胃炎組織で異常腺管が発生するメカニズムを解明する一端となる、新たな知見となった。またNox1複合体を阻害することによって、胃がん発生を予防する可能性について示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：H. pylori infection-associated gastritis is one of the main causes of stomach cancer. However, molecular mechanism of gastritis formation is still unrevealed. In previous studies, our group reported that bone marrow-derived cells (BMDCs)-derived TNF- $\alpha$  promotes gastric tumor development. In this study, we investigated the molecular and genetic functions of Noxo1, which is a target of TNF- $\alpha$ , in gastritis and its associated tumorigenesis by using gastric cancer cells, gastritis model mice (C2mE mice) and sporadic gastric tumor model mice (Gan mice). Administration of a Nox inhibitor suppressed proliferation of gastric cancer cells in vitro and further inhibited metaplasia/hyperplasia formation in C2mE mice. We also found that this inhibitor also suppressed proliferation of stem-like cells in the neck region of stomach glands. Accordingly, Noxo1 and the Nox1 complex are possible effective preventive or therapeutic targets for gastritis and gastric cancer.

研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：胃炎 胃がん Nox1

## 1. 研究開始当初の背景

(1) *H. pylori* 感染に起因する慢性炎症は、胃癌発生に関与すると考えられている。これら慢性炎症組織では、骨髄由来細胞が浸潤し、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを分泌することによって炎症性微小環境を形成している。研究代表者が所属する研究室では、TNF 遺伝子欠損マウスを用いた解析を行い、胃癌形成に TNF- $\alpha$  が重要な役割を果たすことを明らかにした。この中で、TNF- $\alpha$  依存的に誘導される発がん促進因子の候補として Noxo1 を同定した。

(2) NADPH オキシダーゼ (Nox) は、生体内において ROS の一種であるスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) 産生を担う主要な因子の一つである。Noxo1 は細胞膜に局在するアダプタータンパク質で、Nox 複合体が細胞膜上で酵素活性を維持するのに必須な因子である (1)。最近、Nox 複合体を構成する Rac1 の活性化依存的に産生される ROS が、腸管腫瘍発生に重要な役割を果たすことが報告されたが (2)、その下流の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

前述の学術的背景を踏まえて、本研究は Noxo1 の発現依存的に活性化する Nox 複合体/ROS 下流のシグナル伝達経路を解明し、これらの因子が炎症依存的な胃癌発生過程でどのように発がん促進に機能するかを明らかにすることを目的として実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) Noxo1 遺伝子欠損による表現型の解析

本研究では Noxo1 遺伝子コンディショナル欠損マウスを作製して Noxo1 の遺伝学的機能の解明を目指した。研究代表者の所属する研究室で所有する胃炎モデルマウス (C2mE) と、胃癌モデルマウス (Gan) を用いて胃癌発生における Nox1 複合体の役割の遺伝学的解明を目指した (3)。各種マーカーを用いた免疫組織学的解析により、がん細胞の増殖や生存および未分化性の維持における Noxo1 の役割を検証した。

### (2) Nox 複合体/ROS による発がん促進機構の解析 (*in vivo*, *in vitro* 実験)

Noxo1 を含む Nox 複合体によって産生される ROS が、下流のどのようなシグナル伝達経路を介してどのようながん細胞形質の維持に寄与するのかが未解明である。当研究室で所有する胃癌細胞株を用いて Noxo1 の発現阻害実験や Nox 複合体阻害剤を用いた薬理学的実験を行い、以下の2点について解明を目指した。がん細胞形質への寄与。増殖能・生

存能・コロニー形成能・浸潤能・運動能などのがん細胞形質にどのような影響があるかを解析した。Nox 複合体が産生する ROS 下流のシグナル伝達経路の解析。胃癌細胞から抽出した mRNA を用いたトランスクリプトーム解析により、Noxo1 依存的に発現変動する遺伝子及び関連するシグナル伝達経路を網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) Noxo1 は TNF- $\alpha$ 刺激後の ROS 産生に必要である

胃癌細胞株 (MKN45, SNU601, SNU719) の培養上清に TNF- $\alpha$  を添加すると、Noxo1 の mRNA の発現量が上昇した。また Noxo1 のプロモーターアッセイを行った結果、TNF- $\alpha$  添加後、NF- $\kappa$ B 依存的に Noxo1 mRNA の転写活性が上昇することが分かった。さらに、DHE 色素を用いた染色実験の結果、Noxo1 発現抑制によって TNF- $\alpha$  添加後の DHE 陽性細胞の数が減少したことから、TNF- $\alpha$  刺激後の ROS 産生に、Noxo1 が必要であることが明らかとなった。以上の結果から、TNF- $\alpha$  の下流で NF- $\kappa$ B が直接 Noxo1 の転写量を上昇させ、ROS 産生を活性化することが明らかになった。

### (2) Noxo1 コンディショナル欠損マウスを作製

Noxo1 遺伝子の第3-5エクソンを含む領域を CreER 存在下でタモキシフェン (Tmx) 投与依存的に欠失させることが出来るコンディショナル欠損マウスを作製した。Noxo1<sup>fllox/+</sup>/villin-CreERT2 マウスに Tmx 投与を行った結果、腸管組織細胞におけるたんぱく質発現量の低下と、目的の領域の欠損が確認できた。以上の結果からマウス生体内で Noxo1 遺伝子のコンディショナル欠損が可能なマウスの作製に成功したことが確認できた。現在は胃上皮細胞特異的に Noxo1 を欠失させることが出来る、Noxo1<sup>fllox/fllox</sup>/Cldn18-CreERT2 マウスを作製中である。今後は C2mE や Gan マウスと交配させることによって、胃炎・胃癌形成過程における遺伝学的な解析を行う予定である。

### (3) Noxo1 は胃炎・胃癌組織において増殖細胞に特異的に発現する

リアルタイム PCR 解析によって、mRNA 量を解析した結果、胃炎・胃癌組織において、Noxo1 の発現量が優位に上昇していることを明らかにした。さらに、各組織内でどの種類の細胞が Noxo1 を発現しているかを調べるため RNA-SCOPE を用いた *in situ hybridization* 解析を行った。その結果、いずれの組織においても、Ki67 陽性の増殖細胞特異的に Noxo1 が発現していた。以上の結果、炎症組織にお

いて、細胞分裂している上皮細胞特異的に Nox1 が発現していることが明らかとなった。

#### (4) Nox 複合体阻害剤 Apocynin 投与により C2mE マウス胃炎組織における過形成・化生が抑制される

胃炎形成における *in vivo*での Nox 複合体の機能の解析を行うため、C2mE マウスに、Nox 複合体の阻害剤である Apocynin を飲水にて投与した。5 週齢から投与を開始し、16 週齢にて胃組織切片を作製して、病理組織学的解析を行った。この結果、胃腺管の neck 領域に存在する Ki67 陽性の幹細胞様の細胞の増殖が抑制されただけでなく(図 1A) 胃炎組織に特徴的な、H+K+ATPase 陽性細胞の減少を特徴とする腸型の腺管の化生や、過形成が抑制された(図 1B,C)。

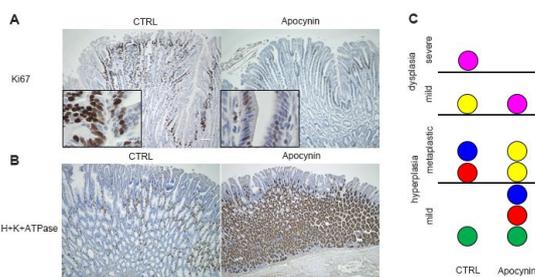


図 1. Apocynin 投与により胃炎が抑制される

#### (5) Apocynin 投与によって Gan マウスの腫瘍組織の増大が抑制される

炎症依存的な胃がん形成における Nox 複合体の機能解析を行うため、Gan マウスに Apocynin を投与する実験を行った。16 週齢から飲水にて投与を行い、CT 画像解析を行うことによって、胃における腫瘍の大きさを経時的に測定した。この結果、Apocynin 投与によって、腫瘍面積の増加が抑制されることが分かった(図 2)。

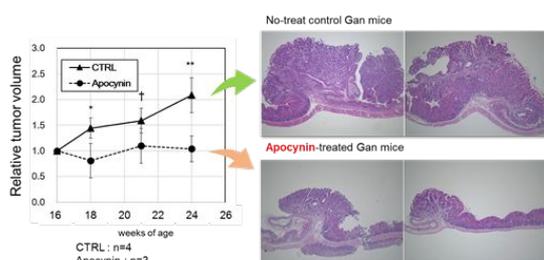


図 2. Apocynin 投与により胃がん組織の増大が抑制された

#### (6) Apocynin 添加によって非接着培養条件下において胃がん細胞の増殖が抑制される

Apocynin 添加によって、非接着培養を行った胃がん細胞株 MKN45 の増殖が抑制された。Nox 複合体下流のシグナル伝達経路を明らか

にするため、Apocynin 添加を行った MKN45 細胞から mRNA を抽出して mRNA シークエンス解析を行った。この結果、SPINK4 や TFF3 など腸型の化生に関わる遺伝子や、腸細胞の最終分化に関わると報告のある HNF1 のターゲット遺伝子の発現が低下していた(4)。

以上の解析により、本研究では、TNF- $\alpha$  によって Nox1 複合体が活性化するメカニズムを明らかにし、これらが胃炎組織において過形成や化生の形成に関わる可能性を明らかにした。また Nox1 複合体を阻害することによって、胃炎もしくは炎症に起因する胃がん発生を予防する可能性について示すことが出来た。

#### 引用文献

Cheng et al, NOX01, Regulation of Lipid Binding, Localization, and Activation of Nox1 by the Phox Homology (PX) Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, February 6, 2004, 279, 4737-4742.

ROS production and NF- $\kappa$ B activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. *Cell Stem Cell*. 2013 Jun 6;12(6):761-73.

Carcinogenesis in Mouse Stomach by Simultaneous Activation of the Wnt Signaling and Prostaglandin E2 Pathway. H Oshima et al, *Gastroenterology*, October 2006, Volume 131, Issue 4, Pages 1086-1095.

Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. D'Angelo A et al, *Development*. 2010 May;137(9):1573-82.

#### 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 2 件)

Kanae Echizen, Osamu Hirose, Yusuke Maeda and Masanobu Oshima, Inflammation in gastric cancer: Interplay of the Cox-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways, *Cancer Science*, 査読有、107, 2016, 391-397

DOI:10.1111/Cas.12901

Maeda Y, Echizen K, Oshima H, Yu L, Sakulsak N, Hirose O, Yamada Y, Taniguchi T, Jenkins BJ, Saya H, Oshima M, Myeloid Differentiation Factor 88 Signaling in

Bone Marrow-Derived Cells Promotes Gastric Tumorigenesis by Generation of Inflammatory Microenvironment, *Cancer prevention research*, 査読有、  
DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0315

〔学会発表〕(計 4 件)

Echizen K, Oshima H, Oshima M. Functional and genetic analysis of Noxo1/ROS in inflammation-associated gastric tumor development. 第 75 回日本癌学会学術総会, ((2016 年 10 月 6 日, 横浜)

越前佳奈恵, 大島浩子, 大島正伸. 炎症依存的な胃がん発生における Nox1 複合体/ROS の機能解析. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2016 年 8 月 30 日, 仙台) 青木やよい, 越前佳奈恵, 堀内契吾, 大島浩子, 大島正伸. NF-κB 依存的な Noxo1/ROS シグナルにおける胃がん発生促進. 平成 27 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ. (2016 年 2 月 4 日, 大津) 【最優秀ポスター賞】

Echizen K, Horiuchi K, Ishikawa T, Oshima H, Oshima M. Functional and genetical analysis of Noxo1 in carcinogenesis promoted by chronic inflammation. 第 74 回日本癌学会学術総会, (2015 年 10 月 8 日, 名古屋)

〔図書〕(計 3 件)

大島 浩子、越前 佳奈恵、大島 正伸 他、羊土社、実験医学、2016、138(37-42)  
越前 佳奈恵、大島正伸 他、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ、2016、126 (35-40)  
大島浩子、中山瑞穂、越前佳奈恵、大島正伸。炎症反応による消化器がん発生と悪性化の誘導機構。実験医学(羊土社)、33: 746-751, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://genetics.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
越前 佳奈恵 (ECHIZEN, Kanae)  
金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員  
研究者番号：20743834

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )