

令和元年6月18日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08708

研究課題名(和文)新規の胃分化型癌自然発症マウスモデルを用いたピロリ菌感染による胃癌の進展

研究課題名(英文) Progression of the gastric cancer using novel mouse spontaneously developed differentiated type adenocarcinoma

研究代表者

川久保 雅友 (Kawakubo, Masatomo)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：70397305

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)：胃癌化に至る前段階の分子メカニズムを解明することを目的に、胃腺癌の抑制因子の一つである胃粘液に含まれるGlcNAcを欠損したマウス(A4gnt KOマウス)に胃癌原因菌であるピロリ菌を感染させ、その組織系の変遷に伴ったmicroRNA発現量解析を中心とするエピジェネティックな変化について新たな知見を得た。ピロリ菌感染によりA4gnt KOマウスが持っている癌形質の明らかな進展は、組織学的、分子的いずれの側面からも認められなかったものの、胃腺粘液GlcNAcの欠損下でピロリ菌感染により好中球浸潤に起因したびらん性胃炎が形成されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A4gnt KOマウスにピロリ菌感染を生じさせることは、胃癌発生の要因となり得るヒトの体質のような、癌化リスクを基本要素として持つ基盤に、胃癌の主因であるピロリ菌感染をモデル化できると期待される実験系であり、ピロリ菌初感染から胃粘膜上皮細胞の不可逆的な変成をきたす過程を解明し、より効果的に癌化リスクを減らすピロリ菌除菌のタイミングを見いだせるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Infection with *Helicobacter pylori* is the major cause of gastric cancer. Mice deficient in GlcNAc contained in gastric mucin, which has tumor suppressor function in differentiated type adenocarcinoma, were infected with *H. pylori* to investigate the molecular mechanism of tumorigenesis prior to gastric cancer development. We obtained new findings on epigenetic changes mainly in microRNA expression analysis related with the pathological findings depending on *H. pylori* infection. Although the progression of differentiated type adenocarcinoma on A4gnt KO mice was not fully clear by pathological or molecular processes related to *H. pylori* infection in the lack of GlcNAc on gastric gland mucin, it was shown that severe gastric erosion occurred in A4gnt KO mice infected with *H. pylori* due to mucosal infiltration with neutrophils.

研究分野：実験病理学，糖鎖生物学，感染症

キーワード：A4gnt欠損マウス 胃癌 ピロリ菌 エピジェネティック

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌感染により胃癌が発生することは、広く知られている。すなわちピロリ菌感染歴がなければ、胃癌発生リスクは極めて低い。慢性的なピロリ菌感染により、胃上皮細胞に癌抑制遺伝子 p53 の変異の蓄積 (Matsumoto et al, *Nat Med* 13, 470-476, 2007), miR-210 発現量の減少によるエピジェネティックの変異の蓄積 (Kiga et al, *Nat Commun* 5, 4497, 2014) 等、不可逆的な異常が生じることが明らかとなり、ピロリ菌を除菌しても必ずしも、胃癌のリスクは減少しないことも最近では明らかとなってきている。しかしながらピロリ菌保菌者がすべて胃癌に進展するわけではなく、ヒト胃粘膜(宿主側)の何らかの要因により胃癌が発生すると考えられるものの、未だに詳細な機構は明らかになっていない。従来、多くのヒト由来検体あるいは実験動物、培養細胞系において、ピロリ菌による胃癌発生機構の研究が行われてきたが、ヒトにおいては経時的な変化が追えない、またスナネズミのようなモデルでは、ヒトの胃癌体質を再現できない等、ヒトの癌化に至る機構の解明に十分な環境があったわけではない。われわれの研究室では以前、腺粘液に含まれる特徴的な糖鎖構造である GlcNAc が、ピロリ菌感染より胃粘膜深部を防御していることを報告した (Kawakubo et al, *Science* 305, 1003-1006, 2004)。さらに最近、胃腺粘液の GlcNAc が欠損したマウス (*A4gnt* ノックアウトマウス) を作出し、このマウスでは、胃腺癌が自然発生することを見出した (Karasawa et al, *J Clin Invest* 122,923-934, 2012)。ピロリ菌をマウスに実験的に感染させても、胃癌は形成されないが、*A4gnt* ノックアウトマウス(*A4gnt* KO マウス)は、ピロリ菌の有無にかかわらず、5 週齢より慢性炎症をおこし、50 週齢で分化型腺癌を形成する。すなわち、*A4gnt* KO マウスは先天的に胃腺癌の発生形質を保有している。しかしながら、この腺癌はほとんどが粘膜内癌であり、粘液形質は胃型である。*A4gnt* KO マウスを用いてピロリ菌感染時から、遺伝子変異あるいはエピジェネティック変異の時間的変化および胃粘膜の腸上皮化生、粘膜下浸潤、転移などを調べることにより、詳細な胃発癌機構の知見が得られると考えられ、また遺伝子あるいはエピジェネティックの不可逆的変化の時系列的解析から、ピロリ菌除菌のターニングポイントを見いだせるものと期待された。

2. 研究の目的

ピロリ菌はヒトの胃癌発生に最も重要な因子であるが、保菌者がすべて胃癌を発生することなく、体質など他の胃癌を生じさせる因子も必要である。しかしながら、発癌に至る前の胃粘膜上皮の変異過程に関しては未だ十分に解明されていない。胃粘液に含まれる特徴的な糖鎖構造である GlcNAc を欠損したマウスでは、過形成、異形成を経て胃分化型腺癌が自然性に発生する。すなわち、GlcNAc は癌抑制因子であることを示唆している。本研究の目的は、癌抑制因子である GlcNAc 欠損マウスにピロリ菌の感染を生じさせ、本マウスが持っている癌形質の進展を詳細に解析することで、組織学的な癌化以前からの、分子的な癌化の機序を実験的に解明することである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウス

A4gnt KO マウスおよび野生型マウスを使用した。なお、本研究は信州大学動物実験委員会医学系動物小委員会および信州大学遺伝子組換え実験等安全委員会にて承認を受けた(承認番号: No.280048, No.16-021)。

(2) *A4gnt* KO マウスへのピロリ菌感染

ピロリ菌 SS1 株を 10%ウマ血清加ブルセラブロスにて培養し、生後 5 週齢の *A4gnt* KO マウスおよび野生型マウスに強制経口投与することで、ピロリ菌を感染させた。ピロリ菌投与マウスより新鮮糞便を採取し、便中 DNA を抽出して、ピロリ菌特異プライマーを用いて PCR により感染の成否を確認した。また頸椎脱臼で安楽死させた *A4gnt* KO マウスおよび野生型マウス(感染後 5 週: n=6)から摘出した胃を大弯側で開き、腺胃粘膜を剥離し-80℃にて凍結保存した。胃粘膜から抽出した全 DNA に含まれるピロリ菌ゲノム量を 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて定量した。プライマーとして別報 (Kawakubo et al, *Histochem Cell Biol* 148, 463-471, 2017)の配列を使用した。

(3) 胃組織の採取

頸椎脱臼で安楽死させた *A4gnt* KO マウスおよび野生型マウス(感染後 5-30 週: n=6)から摘出した胃を大弯側で開き、20%緩衝ホルマリンで 48 時間固定した後、パラフィン包埋ブロックを作製した。また両マウス(感染後 20 週: n=2)から摘出した胃を大弯側で開き、腺胃粘膜を全剥離し、RNA later を浸透させた後、-80℃保存した。

(4) 病理組織学的解析

作製したパラフィン包埋ブロックを薄切し、組織切片に対して、HE 染色、AB-PAS 染色を行った。また、一次抗体として GlcNAc に特異的な HIK1083 (関東化学)、ピロリ菌に特異的な Anti-*Helicobacter pylori* antibody (DAKO)、Ki-67 に特異的な B56 (BD Pharmingen)、内皮細胞 CD31 に特異的な SZ31 (Dianova)、好中球 Ly-6B.2 に特異的な Anti-Neutrophil antibody [7/4]

(Abcom), マクロファージ F4/80 に特異的な A3-1 (Novusbio), T細胞 CD3- に特異的な M-20 (Santa Cruz), B細胞 CD20 に特異的な Anti-CD20 Antibody (Thermo Fisher), 二次抗体として Hisotofine Mousestain Kit (Nichirei Bioscience)あるいは Hisotofine Rabbitstain Kit を用いた免疫染色を行った。

(5) microRNA 発現解析

20 週齢の *A4gnt* KO マウスおよび野生型マウスそれぞれ感染, 非感染の新鮮腺胃粘膜から調整した全 RNA について microRNA array (東レ 3D-Gene)を行った。得られた array データは野生型非感染マウスを基準に発現量の増減を解析した。

(6) AID 発現量解析

パラフィン包埋切片より抽出した RNA を逆転写した後, AID (Activation-induced cytidine deaminase) 遺伝子の発現量を 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて定量した。TaqMan プローブとして Mm01184115_ml (AID), Mm99999915_g1 (Gapdh)を使用した。

(7) 統計解析

統計解析は ystat2013 (医学図書出版)を用いて行い, P 値が 0.05 未満の場合に有意差有りと判定した。

4. 研究成果

(1) *A4gnt* KO マウスへのピロリ菌感染

ヒトの小児期を考慮し, 生後 5 週齢のマウスピロリ菌を感染させたところ, 新鮮糞便について感染が確認できた。感染後 5 週的全胃粘膜を対象としたピロリ菌 DNA の定量 PCR による感染ピロリ菌量では *A4gnt* KO マウスと野生型マウスのピロリ菌感染菌数に有意差が見られなかった。

(2) 病理組織学的解析

病理形態学的に *A4gnt* KO マウスの胃粘膜を解析した。このマウスではピロリ菌感染により幽門部に限局してびらんが生じ, この病変は軽度, 中等度, 高度に概ね分けることが可能であった(それぞれ $n=2/6$)。びらんはピロリ菌非感染下および野生型マウスでは全く見られず, ピロリ菌感染 *A4gnt* KO マウスに特徴的な所見であった。びらの程度に相関し, 異型度も上昇していた。さらに好中球浸潤が増加し, 高度びらんでは特徴的な好中球の分布が観察された(図 1)。内皮細胞 CD31 では *A4gnt* KO マウスの胃粘膜の肥厚に相関して増加し, Ki-67 陽性細胞も増加していた。マクロファージ F4/80, T細胞 CD3-, B細胞 CD20 はピロリ菌感染, GlcNac 欠損の有無, いずれの条件でも目立った相違は見られなかった。

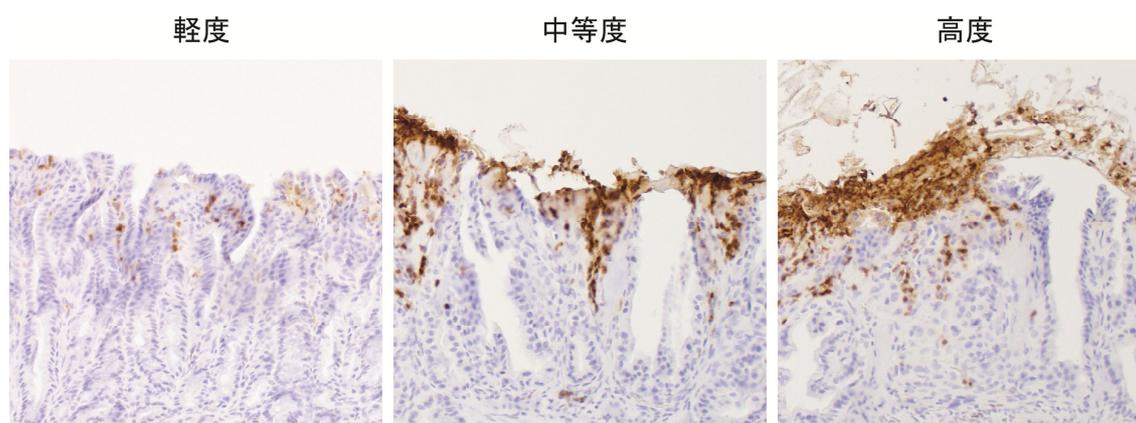


図 1 GlcNac 欠損胃粘膜にピロリ菌が感染した際に生じる胃粘膜好中球浸潤

(3) microRNA 発現解析

microRNA database (<http://www.mirbase.org/>)による解析から糖鎖構造, 微生物感染, 炎症に関連が見受けられた。発現量の変化が大きいものとして, *A4gnt* KO マウスのピロリ菌感染で miR-215-5p, miR-706, miR-3472, miR-5621-5p, miR-6378, miR-6944, miR-7654, miR-8110 において顕著に発現量の上昇がみられた。ピロリ菌感染で *A4gnt* KO に関係なく両マウスの miR-7059-5p 発現量の減少がみられた。また, *A4gnt* KO マウスではピロリ菌の有無に無関係に miR-203-3p 発現量が減少していた。

(4) AID 発現量解析

パラフィン包埋切片より抽出した RNA では, *A4gnt* KO マウスおよび野生型マウスいずれの標本でも AID 遺伝子の発現量は測定限界値以下であった。陽性対象として骨髄, 脾臓等では発

現が確認された。

胃腺粘液に特徴的に含まれる糖鎖構造である GlcNAc は、ピロリ菌感染から胃粘膜深部を防御しているため、GlcNAc 欠損によるピロリ菌による胃粘膜障害および癌化の促進が生じる可能性を検証することを目的に本研究を実施したが、予想に反してピロリ菌の感染量および胃癌化の進展に大きな変化は生じなかった。胃粘液の GlcNAc 欠損によりピロリ菌感染への抵抗性減弱されると、非常に強い好中球の反応が誘導され、ピロリ菌感染の胃粘膜深部への拡大が阻止されていると考えられた。しかしながら同時に過剰な好中球浸潤により組織の局所的な障害も亢進されている可能性が本研究結果から示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kawakubo M, Horiuchi K, Matsumoto T, Nakayama J, Akamatsu T, Katsuyama T, Ota H, Sagara J, Cholesterol- β -glucosyltransferase gene is present in most *Helicobacter* species including gastric non-*Helicobacter pylori* helicobacters obtained from Japanese patients, *Helicobacter*. 査読有, 23, 2018

doi: 10.1111/hel.12449

Kawakubo M, Horiuchi K, Komura H, Sato Y, Kato M, Ikeyama M, Fukushima M, Yamada S, Ishizone S, Matsumoto T, Ota H, Sagara J, Nakayama J, Cloning of *Helicobacter suis* cholesterol β -glucosyltransferase and production of an antibody capable of detecting it in formalin-fixed, paraffin-embedded gastric tissue sections, *Histochem Cell Biol*. 査読有, 148, 2017, 463-471

doi: 10.1007/s00418-017-1582-4

〔学会発表〕(計 3 件)

宮下聖基、川久保雅友、太田浩良、相良淳二、中山淳、*Helicobacter pylori* のコレステリルグリコシドの役割、第 19 回免疫サマースクール 2017、2017 年 7 月 (湘南)

川久保雅友、佐藤佳子、小村仁美、池山環、福島万奈、太田浩良、相良淳二、中山淳、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫染色に有用なハイルマーニ菌特異抗体の樹立、第 57 回日本組織細胞化学会総会、2016 年 9 月 (東京)

水谷泰嘉、春宮覚、川久保雅友、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、中山淳、堤寛、酵素抗原法によるピロリ菌感染スナネズミにおける抗ピロリ菌抗体産生細胞の局在証明、第 57 回日本組織細胞化学会総会、2016 年 9 月 (東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2byori/work.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中山 淳

ローマ字氏名：Jun Nakayama

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：10221459

(2)研究協力者

研究協力者氏名：有坂宣彦，宮下聖基

ローマ字氏名：Nobuhiko Arisaka , Masaki Miyashita

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。