

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590716

研究課題名（和文） 腸上皮化生への分化変更点での胃食道幹細胞の再プログラム化と癌幹細胞誘導機序の解明

研究課題名（英文） Identification of novel genes related with stem cell and cancer stem cell in the transdifferentiation to gastric intestinal mataplasia.

研究代表者

今谷 晃（IMATANI AKIRA）

東北大学・病院・講師

研究者番号：30333876

研究成果の概要（和文）：

胃においては *H. pylori* 感染により腸上皮化生が進展し分化型胃癌が発生する。この分化変更の際、homeobox 遺伝子 Sox2 が抑制され Cdx2 が相補的に発現誘導する。本研究では Sox2 遺伝子抑制を安定的に制御できる *in vitro* での腸上皮化生進展モデルを樹立することができ、さらに胃における再プログラム化関連遺伝子の1つとして、Microarray 解析により Tribbles を同定した。この遺伝子は胃上皮細胞に対して増殖作用があり、ヒト胃癌組織で強発現していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The transdifferentiation to intestinal metaplasia is considered as a gastric carcinogenesis sequence in *H. pylori* infection. Down-regulation of a homeobox gene Sox2 might contribute to the gastric carcinogenesis in this manner. We established an *in vitro* model of this transdifferentiation by down-regulation of Sox2, and identified a pseudokinase gene Tribbles using Microarray analyses. This gene overexpressed in the human gastric cancer tissues and cell lines.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胃、分化制御、幹細胞、癌

1. 研究開始当初の背景

*H. pylori*感染により固有胃腺が、胃粘膜萎縮を経て腸上皮化生となり、その過程で不完全型腸上皮化生から分化型胃癌が生じる（Correaの仮説）。食道においても、胃酸・胆汁酸暴露により食道扁平上皮は、Barrett上皮となり、その過程でBarrett腺癌が生じ

る。この胃・食道の腸上皮化生への進展過程では、生理的には腸の分化に必要な不可欠なhomeobox遺伝子Cdx2の発現が誘導されることが国内外から多く報告されている（Silberg D et al: Gastroenterology, 2002）。本研究者もこれらに関連し、*H. pylori*感染胃粘膜の不完全型腸上皮化生領域で細胞増殖とapoptosisが亢進しており、細胞動態的

に不安定であることを報告している (Imatani A et al: J Pathol, 1996)。さらに *H. pylori* 自体が、NF κ Bシグナルを介してCdx2を誘導することを見出している。

一方、hemeobox遺伝子Sox2は、神経、肺、胃の分化維持に重要な役割を果たし、iPS細胞誘導に必須の遺伝子である。本研究者は、このSox2が胃では主に固有胃腺領域に発現しているが、腸上皮化生領域で発現しておらず、Cdx2と相補的に発現していることを免疫組織化学の検討で明らかにしている。そしてSox2の発現誘導が、胃上皮細胞ではIL-4によって制御され、*H. pylori*感染やIFN- γ によって抑制されること、Sox2siRNAを一過性に導入するとCdx2が誘導することを証明している (Asonuma S, Imatani A et al: Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009)。また、食道上皮培養細胞株においても、酸(pH4.5)や胆汁酸(DHCA)暴露でSox2遺伝子が抑制され、Cdx2遺伝子が誘導することを見出している。

臨床あるいは病理学的には、腸上皮化生進展途上にある不完全型腸上皮化生が分化型腺癌の発症に重要であると考えられ、本研究もこのことを示唆する所見(Imatani A et al: J Pathol, 1996)を得ている。また、*H. pylori*感染あるいは酸・胆汁酸暴露によるSox2遺伝子の発現抑制が、Cdx2遺伝子の発現も含め腸上皮化生進展に重要であることを本研究者は明らかにしてきている。しかしながら、Sox2およびCdx2遺伝子単独での発現異常が、発癌機序に関与しているとの報告はないため、この事実を考慮すると、免疫応答によりSox2遺伝子の発現が抑制され、Cdx2遺伝子の発現が誘導されるそのturning pointで、胃あるいは食道の幹細胞で分化変更の際の異常が発癌機序に考えうる。そこで、このturning point、つまり再プログラム化において発現誘導される遺伝子の異常が、発癌機序に関与すると仮説を立てた。

2. 研究の目的

Sox2遺伝子抑制を安定的に制御できる *in vitro*での腸上皮化生進展モデルを、RNA干渉法を用いて作成し、胃あるいは食道上皮細胞が腸上皮細胞への分化変更する際の、再プログラム化に関与する遺伝子(再プログラム化関連遺伝子)をMicroarray解析により同定する。つぎに、再プログラム化関連遺伝子の異常が、どのような機序でヒト食道および胃腺癌培養細胞株や、実際の分化型胃癌の発癌誘導に関与しているか明らかにする。最終的には、*H. pylori*感染に対する免疫応答による同定された再プログラム化関連遺伝子の制御調節について解明する。

3. 研究の方法

(1)

RNA干渉(RNAi)による腸上皮化生進展モデル細胞株の樹立と腸上皮化生進展過程における幹細胞の再プログラム化ポイントにおけるMicroarrayを用いた新規遺伝子同定
*H. pylori*感染による胃固有腺から腸上皮化生への進展の *in vitro*モデルとして、マウス胃不死化正常細胞GSM06を用いた。まず、選択的にSox2遺伝子の発現を抑制する特異的なSox2siRNAの塩基配列は、“ON-TARGET plus SMARTpool”中からwestern blotを用いて抽出した。Knockout Single Vector System for inducible RNAi (Clontech)のcloning siteのHindIIIとXhoIとの間に、抽出したSox2siRNAの塩基配列をライゲーションし、Sox2siRNA誘導システムを構築した。GSM06に遺伝子導入し、Doxycycline(Dox)の存在下で、Sox2siRNA誘導安定細胞株(Sox2KOGSM06)を樹立した。Sox2KOGSM06を72時間Dox存在下で培養し、Doxの有無でSox2の抑制がRT-PCRあるいはwestern blotレベルで確認できた独立したtotal RNA 3組を作製した。これらRNAに対してAgilent Expression Arrayを用いてMicroarray解析を行った。

(2)

再プログラム化関連遺伝子のヒト胃癌培養細胞および胃癌組織における発現異常と機能解析

① Microarray解析により新規に同定された再プログラム化関連遺伝子が、実際に既知の胃癌腺癌由来培養細胞株で過剰発現、または抑制されているか、RT-PCR法またはwestern blotを用いて検討した。

②再プログラム化関連遺伝子の過剰発現するベクターをマウス胃不死化正常細胞GSM06に遺伝子導入し、その遺伝子を強制発現する安定株を樹立した。そして、細胞増殖能の変化をMTT法で検討した。

③ヒト正常胃粘膜あるいは分化型胃癌における再プログラム化関連遺伝子の発現局在と程度について、免疫組織化学を用いて検討した。なお、本研究は東北大学医学部倫理委員会の審査・承認(No. 2003-149)を得ている。

(3)

再プログラム化関連遺伝子の異常制御による癌幹細胞誘導の可能性の検討

再プログラム化関連遺伝子を過剰発現するGSM06安定株のRNA発現プロファイルを、null vectorを導入したGSM06をコントロールとして、Agilent Expression Arrayを用いてMicroarray解析を行った。そして、癌

幹細胞マーカーに関連した遺伝子について検討した。

(4) 再プログラム化関連遺伝子の *H. pylori*による発現制御

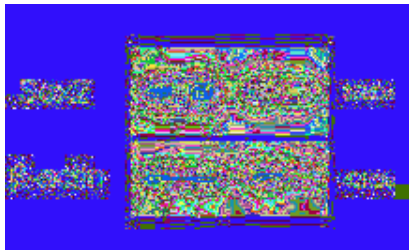
再プログラム化関連遺伝子発現が *H. pylori* 自体によって発現制御されているかどうかを検討するため、胃正常上皮培養細胞株 GSM06 に、*H. pylori* 感染させ、その遺伝子の発現制御を、RT-PCR 法と Western blots を用いて検討した。

4. 研究成果

(1)

RNA干渉 (RNAi) による腸上皮化生進展モデル細胞株の樹立と腸上皮化生進展過程における幹細胞の再プログラム化ポイントにおける Microarray を用いた新規遺伝子同定

Agilent Expression Array による Microarray 解析により、独立した total RNA 3組に共通してみられた Sox2 の発現抑制により発現が2倍以上増強を認めた遺伝子は129遺伝子、1/2以下に発現が減弱した遺伝子は69遺伝子であった。



これらの中から分化・発癌への関与が報告されている既知の複数遺伝子について Microarray 解析の結果の妥当性について、RT-PCR を用いスクリーニングを行った。スクリーニングを行った結果、Sox2 の発現抑制されることにより有意に発現に影響を受けている分化・発癌関連遺伝子として3遺伝子抽出可能であった。その3遺伝子の1つに Tribbles (Trib) が存在した。この Trib は pseudokinase であり、肝臓に強く発現しており、消化管や脾臓等にも発現を認めている。さらに Trib は標的遺伝子に対し ubiquitin 依存性の degradation を促進し、細胞周期、分化、代謝を調節しているとされている。また、肺癌や乳癌において高発現しているとの報告もある。

(2)

再プログラム化関連遺伝子のヒト胃癌培養細胞および胃癌組織における発現異常と機能解析

①抗 Trib 抗体を用いて胃癌由来培養細胞株 AGS、KATOIII、MKN28、MKN45、GCIY を対象に Trib の発現を RT-PCR 法あるいは western blot 検討したところ、MKN28、MKN45、GCIY で強発現が認められた。



② Trib の強発現を認めたヒト胃癌培養細胞株 MKN45 を TribsiRNA で knockdown し、増殖能の変化を確認するために MTT 法を行ったところ、有意に増殖能が抑制された (0.77 ± 0.025 倍)。さらに Trib を強制発現する GSM06 の安定株を用いて同様に増殖能を検討したところ、正常細胞である GSM06 でも Trib 強制発現により有意に増殖能が亢進していた (1.34 ± 0.14 倍)。

③ ヒト胃癌組織における Trib の発現を免疫組織化学で検討したところ、25 症例中 16 症例で癌細胞の細胞質に特異的に発現がみられた。

以上の検討から、Trib はヒト胃癌において発現を強く認め、ヒト胃癌発癌の際の増殖に関与していると考えられた。

(3)

再プログラム化関連遺伝子の異常制御による癌幹細胞誘導の可能性の検討

Trib を強制発現する GSM06 安定株の RNA 発現プロファイルを Agilent Expression Array を用いて Microarray 解析を行った。その結果、Trib を強制発現させた場合、発現が2倍以上増強を認めた遺伝子は1743遺伝子、1/2以下に発現が減弱した遺伝子は1088遺伝子であった。その中に、著名な癌幹細胞に関連した遺伝子の1つがあり、その発現が抑制されていることが判明した。このため、Trib は、癌幹細胞の誘導に関与していることが判明した。

(4)

再プログラム化関連遺伝子の *H. pylori*による発現制御

GSM06 に対して *H. pylori* で 24 時間刺激したところ、菌量依存性に Trib の発現上昇がみられた。

以上より、胃における腸上皮化生進展時に Sox2 の発現が抑制される過程で誘導される遺伝子の1つとして Trib が同定され、この Trib が誘導発現することにより、胃上皮細胞や癌細胞の増殖能が亢進するこ

とが明らかとなった。さらに、*H. pylori* 刺激により Trib の発現が誘導され、Trib を介した増殖能の亢進に協調的に関与していることが示唆された。

本研究により、Sox2 遺伝子抑制を安定的に制御できる *in vitro* での腸上皮化生進展モデルを樹立することができた。さらに胃における再プログラム化関連遺伝子の1つを同定でき、この遺伝子の解析は、胃における癌幹細胞の誘導や、分子生物学的な発癌機序の解明に寄与したと考えられる。そして、“日本人における胃癌のなりやすさ”や“癌治療薬のターゲット”の解明の基盤となり、臨床面での新しい診断や治療の基礎的資料となると思われる。

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)

[学会発表] (計2件)

1. 今谷 晃、阿曾沼 祥、浅野 直喜、近藤 穰、千葉 隆士、伏谷 淳、下瀬川 徹、「*H.pylori* 感染胃粘膜におけるHMGボックス遺伝子Sox2発現抑制による腸上皮化生進展の機序」、第9回消化器病フォーラム、2010年11月20日、東京

2. Yutaka Kondo, Akira Imatani, Sho Asonuma, Hidetomo Konishi, Takashi Chiba, Naoki Asano, Kaname Uno, Yasuhiko Abe, Katsunori Iijima, Tomoyuki Koike, Tooru Shimosegawa、「Downregulation of embryonic stem cell-related gene Sox2 induced transdifferentiation to intestinal metaplasia in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa」、第1回 International Topic Conference (日本消化器病学会)、2010年9月25日、鎌倉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今谷 晃 (IMATANI AKIRA)

東北大学・病院・講師

研究者番号：30333876

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：