

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590793

研究課題名（和文）Shh の腸上皮化生粘膜における低下の原因

研究課題名（英文）To clarify the mechanism of the decrease of Shh in intestinal metaplastic mucosa

研究代表者

武藤 弘行（MUTOH HIROYUKI）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50322392

研究成果の概要（和文）：

Cdx2 トランスジェニックマウスの胃粘膜における Shh の発現を定量的 PCR で検討したところ Shh の発現は完全に抑制されていた。RNA レベルのみならず免疫組織染色においても正常胃粘膜の壁細胞に発現している Shh が、腸上皮化生粘膜では完全に消失していた。この Shh の発現低下の機序は Shh のプロモータ領域のメチル化によるものではなく、転写因子である Cdx2 が Shh のプロモータ領域に存在するシスエレメントに結合することにより Shh の発現を低下させていることが確かめられた。

研究成果の概要（英文）：

Shh (Sonic Hedgehog) is a morphogen involved in gastric fundic gland differentiation in the adult. Shh expression is reduced in Helicobacter pylori-associated intestinal metaplastic change of the gastric epithelium and mice that lack Shh show intestinal transformation of the gastric mucosa. Similarly, in the stomach of Cdx2 (caudal-type homeobox 2)-transgenic mice, the gastric mucosa is replaced by intestinal metaplastic mucosa. The aim of the present study was to use Cdx2-transgenic mice to investigate: (i) Shh expression in the intestinal metaplastic mucosa of the Cdx2-transgenic mouse stomach; and (ii) the relationship between Shh and Cdx2. We determined that Shh mRNA levels were dramatically reduced in the intestinal metaplastic mucosa of the Cdx2-transgenic mouse stomach compared with the normal (wild-type) mouse stomach. This was not due to hypermethylation of the Shh promoter, but instead we showed that Cdx2 directly bound to the TATA box region of the Shh promoter. Cdx2 also down-regulated transcription of the Shh gene in the human gastric carcinoma cell lines AGS, MKN45 and MKN74. In conclusion, Cdx2 reduced Shh expression by binding to the unmethylated Shh promoter in the intestinal metaplastic mucosa of Cdx2-transgenic mouse stomach.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

1. 研究開始当初の背景

Sonic hedgehog (Shh) は、消化管では胃底腺のみに強い発現を認め、胃の壁細胞に最も強い発現がみられ、腺底部に近い壁細胞ほど発現が弱い。そして Hh の作用の阻害剤であるシクロパミンをマウスに投与すると、胃小窩細胞では変化がみられないが壁細胞および主細胞系の増殖の亢進を認め、Shh の標的遺伝子である BMP4 の発現の減少も認められる。食道や Meckel 憩室における異所性胃粘膜で Shh の発現が増加しており、Shh の発現と胃底腺分化に強い関連があることがわかる。一方、胃粘膜の病的な状態であり、分化型胃癌の前癌病変と考えられている腸上皮化生粘膜では、Shh の発現が低下することが報告されている (Am J Gastroenterol 2005;100:581-7)。これらの結果は Shh が胃粘膜の分化に必要なことを示唆している。また、この腸上皮化生粘膜には小腸の上皮細胞の分化に関与する転写因子である Cdx2 が発現している (J Gastroenterol 2002;37:94-100, Helicobacter 2002;7:192-8)。Cdx2 を胃粘膜に特異的に発現させた Cdx2 トランスジェニックマウス(当研究室で作成)の胃粘膜は完全に腸上皮化生粘膜によって置換され、Cdx2 が腸上皮化生の原因遺伝子であることが確認された (Biochem Biophys Res Commun 2002;294:470-9, Int J Dev Biol 2005;49:867-71)。そこで、この Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜における Shh の発現を RT-PCR で検討したところ、ヒトの腸上皮化生粘膜と同様に明らかな低下がみられた。胃粘膜に転写因子 Cdx2 を特異的に発現させることで、なぜ、腸粘膜を構成する上皮細胞である吸収上皮細胞、杯細胞、腸管内分泌細胞が出現する腸上皮化生になるのかに大きな疑問を抱いた。腸粘膜上皮細胞の分化に関与する転写因子である Cdx2 の発現により腸粘膜上皮細胞の形質が発現することは理解しやすい。しかし、Cdx2 が発現することでなぜ、胃粘膜の形質の発現が消失するのかを Shh と Cdx2 の関係から明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

Sonic hedgehog (Shh) は、消化管では胃底腺のみに強い発現を認め、胃の壁細胞に最も強い発現がみられる。食道や Meckel 憩室における異所性胃粘膜で Shh の発現が増加しており、Shh の発現と胃底腺分化に強い関連があることがわかる。一方、胃粘膜の病的な状態であり、分化型胃癌の前癌病変と考えられている腸上皮化生粘膜では、Shh の発現が低下することが報告されている。Cdx2 を

胃粘膜に特異的に発現させた Cdx2 トランスジェニックマウス(当研究室で作成)の胃粘膜は完全に腸上皮化生粘膜によって置換され、Cdx2 が腸上皮化生の原因遺伝子であることが確認された (Biochem Biophys Res Commun 2002;294:470-9, Int J Dev Biol 2005;49:867-71)。そこで、この Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜における Shh の発現を RT-PCR で検討したところ、ヒトの腸上皮化生粘膜と同様に明らかな低下がみられた。Cdx2 が発現することでなぜ、胃粘膜の形質の発現が消失するのかを Shh と Cdx2 の関係から明らかにすることが今回の研究目的である。

3. 研究の方法

まず、私はこの研究の開始に先立ち予備実験として Cdx2 トランスジェニックマウスの胃粘膜では Shh の発現が著しく低下していることを RT-PCR で既に確認している。そこで、この研究期間内に以下の点を明らかにする。

1. RT-PCR にて Cdx2 を発現している Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜で Shh の発現の明らかな低下を確認しているの、まず、蛋白レベルで発現が低下しているのかを Western blotting で確認する。さらに Shh の発現低下が、Cdx2 を発現している腸上皮化生粘膜の上皮細胞で起きていることを免疫組織染色で明らかにする。
2. Shh の発現が Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜で低下しているという RT-PCR の予備実験の結果は、ヒトの腸上皮化生粘膜で明らかにされた結果と完全に一致する (J Biol Chem 1999;274:34310-6)。Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜での Shh の低下という結果をさらに確実なものとするために Shh のシグナルの下流に存在する BMP4 の発現を RT-PCR、Western blotting、免疫組織染色で確認する。また、Shh の下流にはない BMP2 の発現も RT-PCR、Western blotting、免疫組織染色で確認することにより、BMP4 が Shh の低下により特異的に低下しているのか否かを明らかにする。BMP4 の発現は上皮の間質細胞であることが文献的に示されているので、上皮で発現する Shh と間質で発現する

- BMP4 との上皮間質関係を免疫組織染色で明らかにする。
3. Shh は胃癌の前癌病変である腸上皮化生との関係においてのみならず、胃底腺上皮細胞の分化にも関与していることが報告されている。そこで、腸上皮化生粘膜に変化することにより胃粘膜上皮細胞の性質が消失することと Shh の発現低下が関与する可能性がある。近年、胃癌の発生における癌抑制遺伝子の発現低下にエピジェネティックな変化が注目されている。正常胃粘膜で発現している Shh が腸上皮化生粘膜になると発現が低下してしまう原因として Shh の promoter 領域のメチル化も原因の一つとして考えられる。そこで、正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜、正常小腸粘膜における Shh の promoter 領域のメチル化の有無を検討する。正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜、正常小腸粘膜の粘膜面をスパーテルで削り取った組織から DNA を抽出し、bisulfite 処理を行い、メチル化されていない DNA 塩基であるシトシン(C)をチミン(T)に変換する。CpG を含まない領域で primer を作成し、PCR を行い、産物を TOPO ベクターに入れて、sequence を行うことにより CpG アイランドのメチル化の有無を明らかにする。正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜、正常小腸粘膜における Shh の発現と Shh の promoter 領域の CpG アイランドのメチル化との関係を明らかにする。
 4. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) を正常胃粘膜、正常小腸粘膜、Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜で行い、in vivo の状態で Cdx2 が Shh の promoter 領域に結合することを確認する。正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜、正常小腸粘膜の粘膜面をスパーテルで削り取った組織をホルムアルデヒドで固定することでタンパク質と DNA を架橋する。その後、クロマチンを断片化し 500bp くらいになるように sonication を行う。そして、DNA/タンパク質複合体を Cdx2 に対する抗体を用いて免疫沈降を行う。免疫沈降された DNA・タンパク複合体を脱架橋後、proteinase K で処理し、DNA のみを抽出する。抽出された DNA を template にして Cdx2 の結合が予想される部位を挟む primer を作成し、PCR を行うことにより、Shh の promoter 領域に実際に Cdx2 が結合しているか否かを明らかに

することができると考えられる。

5. Shh の promoter 領域を用いた Luciferase assay により転写活性を検討する。マウスのゲノムを template にして、Shh の promoter 領域を PCR を用いてクローニングする。PCR 産物をプロメガから市販されている luciferase vector である pGL4.10 の multi-cloning site に入れる。Cdx2 が結合する cis-element は AT-rich モチーフであり、典型的な配列は C/TATAAAT/G である (Nucleic Acids Res 1993;21:4915-22)。また、小腸上皮細胞に発現している遺伝子である calbindin-D9 gene (Eur J Biochem 1996;236:778-88), clusterin gene (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;280:G149-56) glucose-6-phosphatase gene (Nucleic Acids Res 2003;31:5238-46)はいずれも TATA box に Cdx2 が結合し、転写を活性化することが明らかにされている。そこで、Shh の promoter の TATA box を中心に解析を進めていく方針である。transfection を行う細胞としては Cdx2 を発現していることを既に確認している胃癌の細胞株である AGS、MKN45、MKN74 を用いる。そして、deletion により、Cdx2 の結合部位が決まったら、その部位に mutation を入れることにより詳細に検討する方針である。
 6. Shh を発現している胃癌細胞株を用いて Cdx2 の transfection により Shh の発現の変化を観察する。同時に胃粘膜上皮細胞の形質の発現がどのように変化するか、腸粘膜上皮細胞の形質の発現の変化を、Shh の発現量および Cdx2 の発現量との関係において検討する。
- 以上の方針により、腸上皮化生粘膜における Shh の発現低下のメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

腸上皮化生粘膜の誘導に転写因子 Cdx2 が主役を演じているが、腸上皮化生粘膜の発生におけるもう一つの疑問は、何故胃型の細胞が消失するのかであり、このことは腸上皮化生を考える上で極めて重要である。ヒトの腸上皮化生粘膜では胃の壁細胞の分化に関与する morphogen である Shh (sonic hedgehog) の発現が低下していることが報告されている (Am J Gastroenterol 2005;100:581-7)。そこで Cdx2 トランスジェニックマウスの胃粘膜における Shh の発現を定量的 PCR で検討したところ Shh の発現

は完全に抑制されていた。RNA レベルのみならず免疫組織染色においても正常胃粘膜の壁細胞に発現している Shh が、腸上皮化生粘膜では完全に消失していた。一方、Ihh (indian hedgehog)は正常胃粘膜と同様に発現がみられることから、この Shh の発現消失は正常胃粘膜上皮細胞が失われたためではないことがわかる。この Shh の発現低下の機序は Shh のプロモータ領域のメチル化によるものではなく、転写因子である Cdx2 が Shh のプロモータ領域に存在するシスエレメントに結合することにより Shh の発現を低下させていることが確かめられた(Mutoh et al. Biochem J. 2010;427:423-34)。

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 8 件)

- ① Mutoh H, Sashikawa M, Sugano K. Sox2 expression is maintained while gastric phenotype is completely lost in Cdx2-induced intestinal metaplastic mucosa. *Differentiation*. 2011;81:92-8.
- ② Sakamoto H, Mutoh H, Hayakawa H, Sashikawa M, Sugano K. Cell lineage dynamics in the process leading to intestinal metaplasia. *J Gastroenterol*. 2011;46:620-8.
- ③ Sashikawa Kimura M, Mutoh H, Sugano K. SOX9 is expressed in normal stomach, intestinal metaplasia, and gastric carcinoma in humans. *J Gastroenterol*. 2011;46:1292-1299
- ④ Mutoh H, Hayakawa H, Sashikawa M, Sakamoto H, Sugano K. Direct repression of Sonic Hedgehog expression in the stomach by Cdx2 leads to intestinal transformation. *Biochem J*. 2010;427:423-34.
- ⑤ Mutoh H, Sashikawa M, Hayakawa H, Sugano K. Monocyte chemoattractant protein-1 is generated via TGF-beta by myofibroblasts in gastric intestinal metaplasia and carcinoma without H. pylori infection. *Cancer Sci*. 2010;101:1783-9.
- ⑥ Sakamoto H, Mutoh H, Sugano K. Expression of Claudin-2 in intestinal metaplastic mucosa of Cdx2-transgenic mouse stomach. *Scand J Gastroenterol*. 2010;45:1273-80.
- ⑦ Mutoh H, Hayakawa H, Sakamoto H, Sashikawa M, Sugano K: Transgenic Cdx2 induces endogenous Cdx1 in intestinal metaplasia of Cdx2-transgenic mouse stomach. *FEBS J*. 2009;276:5821-31.
- ⑧ Sakamoto H, Mutoh H, Ido K, Satoh S, Kumagai M, Hayakawa H, Tamada K,

Sugano K: Intestinal metaplasia in gallbladder correlates with high amylase levels in bile in patients with a morphologically normal pancreaticobiliary duct. *Hum Pathol*. 2009;40:1762-7.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 弘行 (MUTOH HIROYUKI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50322392

(2) 研究分担者：なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者：なし
()

研究者番号：