

機関番号：11301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790647
 研究課題名（和文） TGF- β ・Notch 協調による腸上皮化生進展および胃食道癌幹細胞誘導機序の解明
 研究課題名（英文） Cooperation of TGF- β and Notch in the induction of intestinal metaplasia and cancer stem cells of the esophagus and stomach
 研究代表者
 浅野 直喜（ASANO NAOKI）
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：20526454

研究成果の概要（和文）：

ヒト胃癌組織に対する免疫組織化学により、幹細胞マーカーCD133は低分化型胃癌でのみ発現していることが判明した。胃癌培養細胞株でも同様の傾向を認め、doxycycline存在下でNotch1 siRNAを発現するCD133陽性KATOIII株を作製した。この細胞を用いてNotch1とCD133の関係に関して検討したところ、Notch1がRBP-Jkを介して直接CD133の発現・SP細胞分画を制御していること、増殖能・造腫瘍能を制御していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Immunohistochemistry of human gastric cancer specimens revealed that only poorly differentiated gastric cancer cells express the stem cell marker CD133. The same tendency was observed in gastric cancer cell lines. We established a CD133 expressing gastric cancer cell line KATOIII that stably express doxycycline inducible Notch1 siRNA vector. Analysis using this and other cell line revealed that CD133 is directly regulated by Notch1 through RBP-Jk. We also found out that Notch1 regulates proliferation and tumorigenesis in these cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）

1. 研究開始当初の背景

胃癌は、日本においては罹患率で全がん中最も高く、肺癌に続いて2番目に死亡率の高い癌である。そして世界全体においても部位別罹患率は4番目と多い。胃癌は病理組織学的にintestinal type(分化型)とdiffuse type(低分化型)に分類される。臨床的特徴として、低分化型胃癌は分化型胃癌に比べ、進

展が早く転移浸潤しやすいため一般的に予後不良である。胃癌発生のメカニズムに関しては、分化型胃癌では*H. pylori*感染により慢性活動性胃炎が惹起され、胃粘膜萎縮や腸上皮化生が進展し、異型上皮を経て発生するsequenceが解明されつつある。一方、低分化型胃癌では分化型胃癌と異なり、一般的には*H. pylori*感染による胃粘膜萎縮や腸上皮化

生を発生母地としないため、その発生メカニズムについては未だ不明点が多い。病理組織学的には低分化型胃癌の初期像として、癌細胞が胃固有腺管の腺頸部に存在する増殖細胞帯周囲に分布していることが以前より指摘されているため、この増殖細胞帯に存在する幹細胞の異常が発癌機序と考えられている。

近年、幹細胞の維持・分化制御の分子生物学的解明が急速に進む中で、その中心的な役割をしている遺伝子の1つに Notch があるが、Notch シグナルの活性化は、まず隣接細胞の表面に存在するリガンドである Jagged や Delta と Notch 細胞膜外ドメインが結合すると、 γ -secretase 活性により NICD が細胞膜から切り離され、核移行シグナルによって核内に移行することにより起こる。核内に移行した NICD は単独で標的遺伝子の転写活性領域の DNA には結合できず、このため1つのシグナル経路として、DNA 結合タンパク質である C promoter Binding Factor-1 (CBF1)/Recombination signal Binding Protein-J kappa (RBP-J κ) と NICD の RAM ドメインとが結合し複合体を形成することによって、標的遺伝子の転写を活性化する。多くの分化制御遺伝子が Notch シグナルにより制御されているものと類推されているが、現在までに神経や腸管の分化制御に関与する Hes や、炎症・免疫に深く関与している NF κ B などが報告されている。また in vivo においては、Notch シグナルは杯細胞を中心とした腸管の分化に関与するのみならず、腺腫の発生にも関与している。

ところで、TGF- β も Notch と同様、種を越えて保存されている分子である。TGF- β は Notch と異なり、分泌型のタンパクであるが、本応募者の以前の研究により TGF- β のシグナルと Notch1 のシグナルは協調することが判明している。胃粘膜上皮における分化・発癌においてもこれら二種のシグナルが協調して関与している可能性が考えられる。

一方、普遍的に幹細胞と定義できる単独で特異なタンパクは現在のところ同定されていないものの、多くのタンパクが幹細胞マーカーとして報告されているが、そのうちの一つとして CD133 がある。CD133 は造血系および脳神経系の幹細胞マーカーとして同定された。その後の研究により多くの臓器で発現を認め、膵臓や小腸の幹細胞マーカーであることも報告されている。また、Side population (SP) 細胞は、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの高発現により DNA 結合色素である Hoechst33342 を細胞外に排出しうる能力のある少数の細胞集団とされ、幹細胞の性質を持つことが知られている。ところで、1997年に白血病細胞には正常の血球分化と同じように階層化され、造

血幹細胞と類似した性質を有する少数の細胞集団が存在することを明らかとなり、このため癌幹細胞という概念が提唱された。現在に至る多岐にわたる研究成果より、このような事象が肝癌や大腸癌を含めた多くの癌でおこっていることが検証されている。そしてこれらの研究過程で、癌細胞のうち幹細胞マーカーである CD133 陽性細胞あるいは SP 細胞は、CD133 陰性細胞や non-SP 細胞に比べて、より増殖能や造腫瘍能を有し悪性度が高いという報告がなされている。

このため、分化型胃癌に比べて悪性度が高いとされている低分化型胃癌の発癌メカニズムに、胃幹細胞における変異が関与し Notch シグナルが寄与していることが推察されるが、詳細については未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では幹細胞由来と考えられる低分化型胃癌の発生メカニズムを解明するために、幹細胞維持を制御する Notch シグナルが低分化型胃癌の発生に関与しているかどうか、幹細胞マーカー CD133 の観点より、そのシグナル経路を含め検討することを目的とした。また、TGF- β ・Notch が腸上皮化生に及ぼす影響についても検討することも目的とした。

3. 研究の方法

・ヒト胃癌組織における CD133 の発現

2008年8月から2009年1月に、東北大学病院消化器内科にて上部消化管内視鏡下生検で低分化型胃癌と診断された37症例と、同時期において分化型胃癌と診断された症例より37症例を抽出し対象とした。これらの症例より内視鏡下生検で得られた癌部の胃粘膜標本を用いて、CD133に対する面延期組織化学を行った。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。

・ヒト胃癌培養細胞株における CD133・Notch1 の発現

ヒト胃癌培養細胞株 GCIY、NUGC-4、KATOIII、MKN28、MKN45、Ocum-1、AGS における CD133、Notch1 の発現をウェスタンブロットおよび RT-PCR にて検討した。

・TGF- β ・Notch によるヒト胃癌培養細胞株における Cdx2 の誘導

GCIY 細胞に TGF- β を加え、腸上皮化生関連遺伝子である Cdx2 の発現についてウェスタンブロットおよび RT-PCR にて検討した。また、活性化型 Notch1 を GCIY 細胞に遺伝子導入し、Cdx2 の発現について同様に検討した。

・ Doxycycline (Dox) 誘導性 Notch1 knockout KATOIII 細胞の樹立

Notch1 に関しては“ON-TARGET plus SMARTpool”中の塩基配列が異なる4種類のsiRNAを別々にKATOIII細胞に遺伝子導入し、ウェスタンブロット法を用いてNotch1発現を最も強く抑制するsiRNAを決定し、このsiRNAの塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをpSingle-tTS-shRNA vector上のHindIIIとXhoI制限酵素認識部位間にライゲーションクローニングした。安定発現細胞株の樹立のために、このNotch1 siRNA発現ベクターをKATOIII細胞に遺伝子導入し、Geneticinを添加し選択した。導入7週間後、選択されたKATOIII細胞にDoxを添加し、Notch1 siRNAが発現誘導することをウェスタンブロット法で評価し、Dox添加によりNotch1タンパク発現が $28.6 \pm 0.1\%$ まで有意に抑制するKATOIII細胞を選ぶことによって、Dox誘導性Notch1 knockout KATOIII安定細胞株(NIKOK3)を樹立した。

・ フローサイトメトリー (FACS) 解析

NIKOK3をDox存在下に72時間培養後、PE標識された抗ヒトCD133抗体にて染色し、フローサイト目とリー解析を行った。

・ クロマチン免疫沈降法

KATOIII細胞に活性化型Notch1を強制発現させ、Notch1に対する抗体で免疫沈降し、CD133プロモーター領域のRBP-J・recognition siteに対するプライマーでPCRを施行した。

・ Side Population 解析

NIKOK3にHoechst 33342を加え、verapamilの存在下で37°C、90分間インキュベーションした。propidium iodideで死細胞を染色後、450nm(Hoechst blue)、675nm(Hoechst red)の二重波長解析を用いて解析した。propidium iodideで染色されない細胞のうち、両波長の蛍光励起が弱く、かつverapamil処理により両波長の蛍光励起が消失した細胞をSP細胞として判定した。

・ MTT アッセイ

細胞の増殖能測定のため、NIKOK3細胞を用いてMTTアッセイをおこった。

・ Soft agar アッセイ

足場非依存性の増殖能を検討するために、濃度の異なる2層の寒天培地を作成しsoft agarアッセイを行った。上層の寒天培地にNIKOK3およびMockが均等に入るよう調整し、それぞれDox存在下で培養した。培養4週間後、形成されたコロニーを実体顕微鏡下に観察し、可視できる直径100 μ m以上のコロニー

をカウントし、1ウェルあたりのコロニー数を算出して比較検討した。

・ 統計処理

実験結果の比較検定にはstudent's t-testを用いた。

4. 研究成果

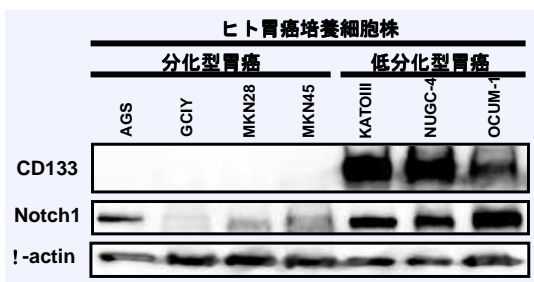
・ ヒト胃癌組織におけるCD133の発現

低分化型胃癌組織において、癌細胞の細胞膜を主体にCD133の強い染色性を示した。一方、分化型胃癌組織においては、CD133の染色性は認めなかった。そしてヒト胃癌組織74症例で検討したところ、低分化型胃癌37症例中19症例(51.35%)でCD133の強発現を認め、一方、分化型胃癌37症例においては発現を認めなかった。

CD133タンパク発現	陽性 (%)	陰性 (%)	計
分化型胃癌	0 (0)	37 (100)	37
低分化型胃癌	19 (51.4)	18 (48.6)	37

・ ヒト胃癌培養細胞株におけるCD133およびNotch1の発現

7種類の胃癌培養細胞株におけるCD133およびNotch1の発現について、ウェスタンブロットを施行したところ、付着性に増殖し上皮様形態をとる比較的分化傾向を認めるAGS、GCIY、MKN28およびMKN45(分化型胃癌培養細胞株)においては、CD133の発現は認めなかったが、浮遊性に増殖し球状の形態をとり分化度の低いKATOIII、NUGC-4およびOCUM-1(低分化型胃癌培養細胞株)においては、CD133の強い発現を認めた。Notch1の発現に関しては、7種類の胃癌培養細胞株すべてで発現を認めているものの、AGS、GCIY、MKN28およびMKN45に比較して、CD133の強発現を認めたKATOIII、NUGC-4およびOCUM-1で強い発現を認めた。胃癌培養細胞株を用いた検討でも、CD133が低分化型胃癌に発現していることが確認された。



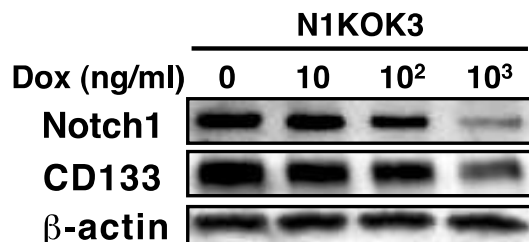
・ TGF- β ・NotchによるCdx2の誘導

GCIY 細胞に TGF- β を加えることにより、微弱ながら Cdx2 が発現することが RT-PCR にて確認された。しかしながら、この発現はウェスタンブロットでは確認できないほどのレベルだった。

同細胞に活性化型 Notch1 を強制発現させても Cdx2 の発現は認められず、また Cdx2 を発現している細胞に Notch シグナル阻害剤である γ -secretase inhibitor を加えた検討でも Cdx2 の発現に変化は認められなかった。

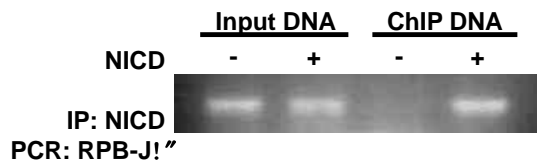
・Notch1 タンパク発現阻害による CD133 の発現抑制

樹立した Dox 存在下で Notch1 の siRNA を発現する N1KOK3 細胞を用いて、Notch1 をノックダウンした際の CD133 の発現を検討したところ、Notch1 のノックダウンにより、CD133 の発現が低下することが確認された。この結果より、Notch1 が CD133 の発現を制御していることが示唆された。



・RBP-J を介した Notch1 シグナルによる CD133 発現制御

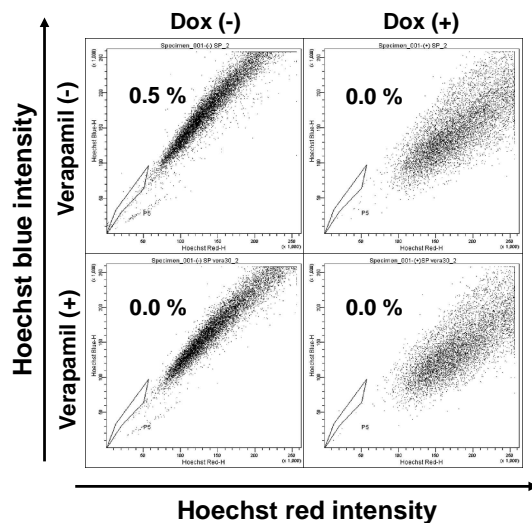
ヒト CD133 のプロモーター領域を検索したところ、RBP-J 認識部位の存在が確認された。そこで、KATOIII 細胞において、RBP-J を介した Notch1 シグナルが直接 CD133 の発現を制御しているかどうかを検討するため、クロマチン免疫沈降を行ったところ、Notch1 がこの部位に結合することが判明した。さらに、RBP-J を siRNA でノックダウンすることにより、CD133 の発現が減弱することが確認された。これらの結果より、Notch1 は RBP-J を介して、直接 CD133 の発現を制御していることが判明した。



・Notch1 タンパク発現阻害による Side Population 細胞分画の消失

幹細胞マーカーである CD133 が Notch1 シグナルにより発現制御されていることが判明した。そこで、Notch1 シグナル抑制により幹細胞の指標である SP 細胞分画が減少するか検討したところ、NOTCH1 を抑制することにより、0.5%存在していた SP 細胞分画が消失することが確認された。この結果より、Notch1 が CD133 の発現のみならず、SP 細胞分画をも制御していることが判明した。

より、0.5%存在していた SP 細胞分画が消失することが確認された。この結果より、Notch1 が CD133 の発現のみならず、SP 細胞分画をも制御していることが判明した。

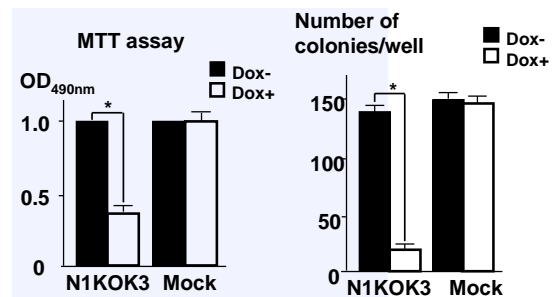


・Notch1 シグナル阻害による細胞増殖能および造腫瘍能の低下

Notch1 シグナルが細胞増殖能に影響を及ぼしているか否かを検討するために N1KOK3 細胞を用いて MTT アッセイを施行した。Notch1 を抑制することにより、細胞増殖能は 0.43 倍にまで低下した。また、KATOIII 細胞において、RBP-J を一過性にノックダウンすることでも、細胞増殖能の有意な低下が認められた。

一方、Notch1 の抑制が、足場非依存性の細胞増殖能におよぼす影響を soft agar アッセイで検討したところ、1 ウェルあたり 142.5 個のコロニーを認めていたのが、8.3 個まで有意に減少していた。

これらの結果から、Notch1 が細胞増殖能・造腫瘍能を制御していることが示唆された。



以上の結果より、Notch1 が低分化型胃癌における幹細胞マーカー CD133 の発現および細胞増殖能・造腫瘍能に重要な役割を果たしていることが判明した。CD133 陽性低分化型胃癌には Notch1 シグナルをターゲットとした化学療法が有効である可能性が示唆された。

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4件)

1. 浅野直喜、小西秀知、今谷晃、木村修、近藤穰、千葉隆士、宇野要、阿部靖彦、飯島克則、小池智幸、下瀬川徹、RBP-J κ dependent Notch1 signaling is required for the maintenance of stem-like cells in diffuse type gastric cancers、1st JSGE International Topic Conference、2010年9月25日、鎌倉

2. 浅野直喜、今谷晃、下瀬川徹、RBP-J κ dependent Notch1 signaling regulates proliferation, tumorigenesis and CD133 in diffuse type gastric cancers 第69回日本癌学会総会、2010年9月22日、大阪

3. 浅野直喜、小西秀知、今谷晃、近藤穰、下瀬川徹、低分化型胃癌における RBP-J κ を介した Notch シグナルによる幹細胞マーカー CD133 発現機構、第17回浜名湖シンポジウム、2009年12月22日、浜松

4. 小西秀知、浅野直喜、今谷晃、近藤穰、小池智幸、飯島克則、下瀬川徹、ヒト低分化型胃癌における Notch シグナルを介した幹細胞マーカー CD133 発現と発癌誘導機構、JDDW 2009、2009年10月15日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 直喜 (ASANO NAOKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20526454

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：