

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08960

研究課題名(和文) 胃底腺胃癌における原始主細胞の役割とリプログラミング機構の解明

研究課題名(英文) Development of fundic gland type adenocarcinomas; mechanism of carcinogenesis and role of eradication of *Helicobacter pylori*

研究代表者

塚本 徹哉 (Tsukamoto, Tetsuya)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：00236861

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)：Helicobacter pylori除菌によって、胃型腺管は消退したが、腸上皮化生に変化は乏しくその始まりである胃腸混合型腸上皮化生が不可逆的ポイントと考えられた。腫瘍部では、除菌後2カ月以内の早期に、腫瘍の消退と低異型上皮の被覆が観察された。マウス胃底腺、幽門腺では、成獣より幼若期でH19、insulin like growth factor 2が有意に高値であった。いずれも、胃がんの予後不良因子であり、腫瘍発生におけるそのメカニズムの解明が重要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori (Hp) represents an important factor in the development of intestinal metaplasia (IM) and gastric cancer. Eradication of Hp could control gastric foveolar hyperplasia but not proliferation of IM glands, suggesting the IM could represent a histological irreversible point with eradication. Elimination of the bacteria induced regression of the gastric adenocarcinomas by the replacement with less atypical or normal epithelia at the surface and the bottom as early as 2 months after eradication both in fundic and pyloric mucosa. Microarray analyses using 4 and 49-day-old mice stomach revealed that H19 and insulin like growth factor 2 were overexpressed in the younger age, when fundic glands have not been fully developed. Higher expression of these two genes in gastric cancers revealed worse prognosis using The Cancer Genome Atlas data. Gastric cancer may take advantage of their own growth regulatory mechanisms especially in fundic mucosa.

研究分野：病理学

キーワード：Stomach Fundic gland Pyloric gland Helicobacter pylori Intestinal metaplasia Eradication Development

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染は、慢性萎縮性胃炎や腸上皮化生、さらには胃癌発生に重要な役割を果たしている。ピロリ菌感染率の低下とともに胃癌発生率は低下傾向にあるが、依然、腸上皮化生あるいは胃癌の発生・進展に関する多くの問題が未解決のままである。

腸上皮化生は、胃固有腺上皮細胞の萎縮と腺窩上皮の過形成を背景に後者に胃上皮の形質発現の抑制と腸上皮化生の発生進展が起こり、それらが同時に徐々に進行していく過程である。残存する胃の分化形質に注目すると、ホメオボックス遺伝子や、転写因子の発現変化に基づく胃腸混合型腸上皮化生の段階を経て、さらに種々の腸型形質の発現の亢進によって腸単独型腸上皮化生に進展する (Tsukamoto, et al., Gastric Cancer, 2006)。

幽門腺領域では、胃から腸に変化して行く途中の過程(胃腸混合型腸上皮化生)で、表層腺窩上皮と腸型杯細胞や吸収上皮の混合と幽門腺の部分萎縮が見られる。さらに、幽門腺の高度な萎縮と腸型の表層上皮のみからなる腸単独型腸上皮化生に移行する。ヒト胃の分離腺管を用いた検討で、こういった細胞分化を規定する転写因子に目を向けると、腸上皮化生の進展とともに、正常では腺窩上皮に発現する転写因子である SOX2 の発現低下と腸型ホメオボックス遺伝子 CDX2 の異所性発現が明らかとなった (Tsukamoto et al, J Cancer Res Clin Oncol, 2004)。胃癌においても同様に、胃腺窩上皮型ムチンコアタンパク MUC5AC や幽門腺型ムチンコアタンパク MUC6 の発現と SOX2 の発現、腸杯細胞型 MUC2 や吸収上皮型 villin あるいは CD10 と CDX2 の発現が相関し、胃型、胃腸混合型から腸型への移行と共に対応する転写因子の発現が変化する事が示されてきている (Tsukamoto et al, Histopathol 2005)。

スナネズミを用いた研究により、*H. pylori* 感染によって、胃腸混合型腸上皮化生から腸単独型腸上皮化生へと段階的、経時的に腸上皮化生を促進すること (Nozaki, Tsukamoto, et al, JJCR 2002) が明らかになってきた。また、発がん物質のみ投与したスナネズミ胃癌は全例胃型であったのに対して、*H. pylori* 感染群では胃腸混合型あるいは腸型胃癌の発生が見られ、ピロリ菌感染は胃癌の腸型化にも必須の役割を果たしていることを証明された (Mizoshita, Tsukamoto, et al, Cancer Sci 2006; Tsukamoto et al, Sem Immunopathol, 2013)。

胃底腺に偽幽門腺化生が出現すると胃腸混合型腸上皮化生が発生するが、偽幽門腺化生をおこしていない場合、胃底腺領域の腸上皮化生は、胃上皮と腸上皮の部分的な混合や胃底腺の部分的な萎縮を介さず、突

然、腸単独型腸上皮化生が出現することが知られている。そのメカニズムは現在も不明なままであり、幽門腺と胃底腺の発生分化、*H. pylori* 感染による組織障害とその後の再生、さらには腸上皮化生や発がん機構の解明が課題であった。

本研究では、胃底腺、幽門腺部の除菌前後の非がん部およびがん部の形態および増殖能の変化、胃型・腸型形質の発現を検討し、さらに正常発生における胃底腺、幽門腺の発生、増殖における形態変化と遺伝子発現の変化の解明を試みた。

2. 研究の目的

(1) *H. pylori* 感染に伴った各腺管の異常所見は、胃底腺と幽門腺の腺の発生分化を考える上で重要な役割を果たすと考えられる。*H. pylori* 感染によって慢性萎縮性胃炎および腸上皮化生が徐々に同時に進展し、初期には胃型細胞の残存する胃腸混合型腸上皮化生として発症し、最終的には腸単独型腸上皮化生として認識される。胃底腺領域と幽門腺領域を比較すると、幽門腺領域では胃腸混合型腸上皮化生から腸単独型腸上皮化生となることが多いが、胃底腺領域では、直接腸単独型腸上皮化生となるか、偽幽門腺化生を介して胃腸混合型腸上皮化生となる。*H. pylori* 感染に伴う胃型腺管の増生や萎縮、発生した腸上皮化生腺管が、除菌とともにどの程度改善するのか、あるいは残存するのかを検討した。

(2) 胃癌は減少傾向にあるが、背景には、衛生環境の改善や *H. pylori* 除菌療法が重要な役割を果たしている。その中で、胃底腺型胃癌は増加傾向にあり、*H. pylori* 除菌の胃癌組織に対する経時的な形態や増殖能の変化は明らかにされていない。また、除菌によって異型の弱い腺管が表層を覆うという現象が報告されており、内視鏡的および病理組織学的な診断の妨げとなっている。正確な診断を期するためにもそのメカニズムの解明が喫緊の課題と考えられた。

(3) 胃底腺型胃癌は近年増加傾向のある胃癌である。しかし、その発生メカニズムは不明な点が多い。そこで、マウス胃底腺および幽門腺の発生段階における組織発生、分化、増殖機構を検討することにより、胃底腺増生の分子メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 胃底腺、幽門腺の違いを *H. pylori* 除菌によって胃粘膜がどの程度修復されるかによって検討した。2003 から 2013 年に *H. pylori* 除菌療法を受けた 38 症例の生検検体を対象とした。胃型細胞のみからなる腺管を胃型 (G)、腸型マーカーのみからなる IM を腸単独型 (I)、胃型と腸型細胞が混在している胃腸混合型 (GI) と分類した。腺管の形態学的特徴とともに、胃型マーカーとして、

MUC5AC、MUC6、腸型マーカーとして CDX2 の発現を検討した。また、細胞の増殖性を KI-67、細胞周期 M 期のマーカーである Histone H3, serine 28 phosphorylated (H3S28ph) について免疫組織学的に検討した。本研究は、藤田保健衛生大学医学研究倫理審査委員会の承認を受け遂行した (受付番号: HM14-274)。

(2) 2008 年から 2015 年に当院で内視鏡的粘膜下剥離術 (ESD) を施行された胃底腺領域 72 例、幽門腺領域 72 例に発生した、年齢および性に偏りのない除菌後胃癌 53 例と非除菌胃癌 91 例の臨床病理学的および免疫組織学的検討を行った。それらについて、*H. pylori* 感染非除菌群、*H. pylori* 陽性で診断直後に除菌を行い 2 カ月以内に ESD を行った群、*H. pylori* 除菌後 6-36 カ月に胃がんが発見された群、除菌後 36 カ月以上で胃がんが発見された群、除菌時期不明の群に分類し、腫瘍の肉眼的および組織学的形態、増殖帯の分布、胃型腸型マーカーの発現を検討した。本研究は、藤田保健衛生大学医学研究倫理審査委員会の承認を受け遂行した (受付番号: HM14-274)。

(3) 生後 4、11 日齢の幼若期から 49 日齢成獣 (Adult) までの C57BL/6J オスマウスから胃底腺領域と幽門腺領域を採取し、組織形態を検討した。また、total RNA を抽出して、cDNA microarray 解析を行った。本研究は、動物実験委員会の承認を受け遂行した (動物実験計画書承認番号: AP16131)。

4. 研究成果

(1) 除菌前後の胃腺管の変化を観察すると、胃型の腺窩上皮では、細胞の高さ、腺管の幅、Ki-67 陽性細胞からなる増殖帯の広がりには除菌によって有意に改善するが、胃腸混合型腸上皮化生、腸単独型腸上皮化生では、腺管の形態に有意な改善はなく、増殖帯の広がりも改善しなかった。一方で、増殖帯にはリン酸化 serine 28 Histone H3 (H3S28ph) 陽性の核分裂像が含まれるが、胃型細胞では除菌前後とも増加しておらず、胃腸混合型腸上皮化生、腸単独型腸上皮化生腺管では *H. pylori* 感染で有意に増加した H3S28ph 数は除菌によっても改善しなかった。胃底腺、幽門腺各領域で、腺窩上皮型 MUC5AC あるいは胃底腺副細胞型 / 幽門腺型 MUC6 の発現を検討したが発現の変化は明らかではなかった。胃腸混合型腸上皮化生が除菌による不可逆的ポイント (point of no return) と考えられた。今後、さらに腸上皮化生進展と除菌による胃底腺および幽門腺粘膜の再生像の解析が必要と考えられた。

(2) 非除菌胃癌と比較して、除菌後胃癌には以下の特徴がみられた。(1) 腫瘍発生部位には著変が見られなかった。(2) 腫瘍

の肉眼形態が隆起型から平坦陥凹型にシフトした。(3) 腫瘍のサイズが有意に縮小した。(4) 除菌前は腫瘍が開口部側に開くように増生していたが、除菌後は腫瘍辺縁で表層と基底層で非腫瘍性腺管の増生が優位で腫瘍は退縮傾向を示した。(5) 除菌後は、腫瘍表層には異型の乏しい再生上皮や軽度異型上皮が被覆していた。(6) 除菌とともに、腫瘍内の Ki-67 陽性細胞の分布が表層からより腺底部側に移動した。(7) 除菌前後で胃型・腸型形質に変化は見られなかった。(8) p53、HER2 遺伝子変異に有意な変化はなかった。また除菌から検体採取までの期間を分けて比較したところ、除菌後早期から変化が現れることが明らかとなった。以上より、*H. pylori* 除菌により腫瘍の増殖能の鈍化や腫瘍の退縮と腫瘍細胞の表層分化を来たし、非腫瘍腺管の再生が優位となることにより非腫瘍腺管の表層への被覆がおこることが示された。以上の変化は、除菌後 2 カ月までの早期におこり、その結果、腫瘍と非腫瘍腺管の境界が不明瞭となり、内視鏡的にも病理組織学的にも腫瘍の診断が困難になると考えられた。

(3) マウスの胃粘膜の検討では、組織学的に、幼若期は、腺窩上皮はほぼフラットで深部には胃底腺様細胞集塊が確認されたが、隣接する腺管同士の境界が不明瞭であった。Adult になると、胃腺管単位の構築や胃底腺の各細胞 (主細胞および壁細胞) がより明らかとなっていた。胃底腺領域で、幼若期に高値で、49 日齢で有意に低下する遺伝子の中で最もその差の大きいもののひとつとして H19、insulin like growth factor 2 (igf2) が挙げられた。H19 は 900 倍以上の低下が見られた。既知のヒト胃癌データベース (The Cancer Genome Atlas (TCGA)) を用いた検索では H19 高値の症例は有意に予後不良であった ($P < 0.05$)。また、IGF2 は 40 倍以上の低下を認め、同様のヒト症例において IGF2 高値は有意に予後不良であった ($P < 0.05$)。マウスでは、H19、igf2 遺伝子はいずれも 7 番染色体に位置し、インプリンティングの結果、H19 は母親由来のみで、igf2 は父親由来のみで発現することが知られているが、発生段階におけるこれらの遺伝子発現の制御は明らかにされていない。今後、胃底腺の発生、分化、増殖における H19 および igf2 陽性細胞の役割を検討し、胃底腺型胃癌発症機構の解明につなげたい。

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 13 件)

- (1) Yamamoto, M., Nomura, S., Hosoi, A., Nagaoka, K., Iino, T., Yasuda, T., Saito, T., Matsushita, H., Uchida, E., Seto, Y., Goldenring, J. R., Kakimi,

- K., Tatematsu, M., Tsukamoto, T. Established gastric cancer cell lines transplantable into C57BL/6 mice show fibroblast growth factor receptor 4 promotion of tumor growth. *Cancer Sci* 109: 1480-1492, 2018. DOI: 10.1111/cas.13569 [査読あり]
- (2) Sakurai, K., Tsukamoto, T. Unveiling the protein coding-independent function of the TET family in gastric cancer. *Non-coding RNA Investig* 2, 2018. DOI: 10.21037/ncr.2018.03.03 [査読あり]
- (3) Cao, D., Jiang, J., Zhao, D., Wu, M., Zhang, H., Zhou, T., Tsukamoto, T., Oshima, M., Wang, Q., Cao, X. The protective effects of 18 β -glycyrrhetic acid against inflammation microenvironment in gastric tumorigenesis targeting PGE2-EP2 receptor-mediated arachidonic acid pathway. *Eur J Inflammation* 16: 1-7, 2018. DOI: 10.1177/2058739218762993 [査読あり]
- (4) Tsukamoto, T., Nakagawa, M., Kiriya, Y., Toyoda, T., Cao, X. Prevention of Gastric Cancer: Eradication of Helicobacter Pylori and Beyond. *Int J Mol Sci* 18, 2017. DOI: 10.3390/ijms18081699 [査読あり]
- (5) Tahara, T., Takahama, K., Tahara, S., Yoshida, D., Horiguchi, N., Kawamura, T., Okubo, M., Nagasaka, M., Nakagawa, Y., Urano, M., Shibata, T., Tsukamoto, T., Ieda, H. O., Kuroda, M., Ohmiya, N. Endoscopic features of lymphoid follicles using blue laser imaging (BLI) endoscopy in the colorectum and its association with chronic bowel symptoms. *PLoS One* 12: e0182224, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0182224 [査読あり]
- (6) Tahara, S., Tahara, T., Tsukamoto, T., Horiguchi, N., Kawamura, T., Okubo, M., Ishizuka, T., Nagasaka, M., Nakagawa, Y., Shibata, T., Kuroda, M., Ohmiya, N. Morphologic characterization of residual DNA methylation in the gastric mucosa after Helicobacter pylori eradication. *Cancer Med* 6: 1730-1737, 2017. DOI: 10.1002/cam4.1082 [査読あり]
- (7) Toyoda, T., Shi, L., Takasu, S., Cho, Y. M., Kiriya, Y., Nishikawa, A., Ogawa, K., Tatematsu, M., Tsukamoto, T. Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on Helicobacter pylori-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* 21: 131-142, 2016. DOI: 10.1111/hel.12243 [査読あり]
- (8) Shimoda, M., Horiuchi, K., Sasaki, A., Tsukamoto, T., Okabayashi, K., Hasegawa, H., Kitagawa, Y., Okada, Y. Epithelial Cell-Derived a Disintegrin and Metalloproteinase-17 Confers Resistance to Colonic Inflammation Through EGFR Activation. *EBioMedicine* 5: 114-124, 2016. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.02.007 [査読あり]
- (9) Kiriya, Y., Tahara, T., Shibata, T., Okubo, M., Nakagawa, M., Okabe, A., Ohmiya, N., Kuroda, M., Sugioka, A., Ichinose, M., Tatematsu, M., Tsukamoto, T. Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia is irreversible point with eradication of Helicobacter pylori. *Open J Pathol* 6: 93-104, 2016. DOI: 10.4236/ojpathology.2016.62012 [査読あり]
- (10) Cao, D., Jiang, J., You, L., Jia, Z., Tsukamoto, T., Cai, H., Wang, S., Hou, Z., Suo, Y. E., Cao, X. The protective effects of 18 β -glycyrrhetic acid on Helicobacter pylori-infected gastric mucosa in Mongolian gerbils. *Biomed Res Int* 2016: 4943793, 2016. DOI: 10.1155/2016/4943793 [査読あり]
- (11) Cao, D., Jia, Z., You, L., Wu, Y., Hou, Z., Suo, Y., Zhang, H., Wen, S., Tsukamoto, T., Oshima, M., Jiang, J., Cao, X. 18 β -glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling. *Oncotarget* 7: 71960-71973, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.12443 [査読あり]
- (12) Tsukamoto, H., Mizoshita, T., Katano, T., Hayashi, N., Ozeki, K., Ebi, M., Shimura, T., Mori, Y., Tanida, S., Kataoka, H., Tsukamoto, T.

Tatematsu, M., Joh, T. Preventive effect of rebamipide on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Exp Toxicol Pathol* 67: 271-277, 2015. DOI: 10.1016/j.etp.2015.01.003 [査読あり]

- (13) Cao, D., Jiang, J., Tsukamoto, T., Liu, R., Ma, L., Jia, Z., Kong, F., Oshima, M., Cao, X. Canolol Inhibits Gastric Tumors Initiation and Progression through COX-2/PGE2 Pathway in K19-C2mE Transgenic Mice. *PLoS One* 10: e0120938, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0120938 [査読あり]

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 岡部麻子、桐山諭和、鈴木周五、櫻井浩平、高橋智、塚本徹哉, DNA 二重鎖切断マーカー- γ -H2AX を用いた胃発がん物質の短期同定, 日本毒性病理学会総会, 2018 年、那覇
- (2) 中川満、桐山諭和、岡部麻子、田原沙佑美、田原智満、堀口徳之、大宮直木、黒田誠、杉岡篤、塚本徹哉. *Helicobacter pylori* 除菌後ヒト胃癌の経時的な形態および増殖能の変化. 日本病理学会総会, 2017 年、東京
- (3) 中川満、塚本徹哉, ヘリコバクター・ピロリ菌除菌による胃腺癌退縮の経時的推移. 日本癌学会総会, 2017 年、横浜
- (4) Kiriya, Y., Toyoda, Y., Ogawa, K., Tsukamoto, T., Immunohistochemical study of gamma-H2AX and p53 in human gastric cancer. 第 75 回日本癌学会総会、2016 年、横浜
- (5) Kiriya, Y., Tsukamoto, T., Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia as an irreversible point with eradication of *Helicobacter pylori* in the human stomach. 10th AACR-JCA Conference, 2016, Lahaina, HI, USA
- (6) Kiriya, Y., Tsukamoto, T., Histological irreversible point with eradication of *H. pylori*: Comparison of gastric and intestinal-metaplastic glands, 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年、名古屋

〔図書〕(計 3 件)

- (1) Tsukamoto, T., Handbook of Foodborne Disease, Food Microbiology series, Taylor and Francis, CRC Press,

Oxfordshire, in press.

- (2) Tsukamoto, T., Kiriya, Y., Tatematsu, M. (Chapter 22, *Helicobacter*), Laboratory Models for Foodborne Infections, Ed: Liu, D., Taylor and Francis, CRC Press, Oxfordshire, 2017
- (3) 塚本徹哉, 基礎から学ぶ胃癌の病理: 胃粘膜の正常構造・分化に基づいた胃生検診断(Group 分類)へのアプローチ, 日本メディカルセンター、東京、2015 年

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 徹哉 (TSUKAMOTO, Tetsuya)
藤田保健衛生大学・医学部・准教授
研究者番号: 00236861