

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19355

研究課題名(和文) 腸上皮化生と胃発癌におけるH.pylori誘導ホメオボックス遺伝子ISXの役割

研究課題名(英文) Role of Helicobacter pylori induced Intestine Specific Homeobox, ISX, for intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis

研究代表者

須江 聡一郎 (SUE, Soichiro)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：00738619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Intestine Specific Homeobox (ISX)は正常胃で発現せず、腸特異的に発現している転写因子で、Helicobacter感染によりNF- κ B経路を介して発現する。ISX発現胃粘膜を背景としてISX発現胃癌が発生し、マウス胃発癌モデルでISXをノックアウトすると胃発癌は抑制される。ISX発現胃癌においてISXをノックダウンすると腸上皮化生マーカー発現や胃癌の増殖は抑制される。ISXの発現増加はマウスとヒトのヘリコバクター感染胃粘膜由来の三次元オルガノイドで確認された。ISXは胃発癌と腫瘍増殖において重要な役割を果たし、有望な胃発癌・胃癌の治療ターゲットである。

研究成果の概要(英文)：Intestine-specific homeobox, ISX, is a homeobox gene and express intestine specific. ISX don't express in normal stomach and Helicobacter pylori infection induce ISX expression in stomach via NF- κ B signaling. ISX expressing gastric cancer generate in the ISX expressing gastric mucosa, and ISX knockout in gastric carcinogenesis mouse model suppressed gastric carcinogenesis. ISX knockdown in ISX expressing gastric cancer suppressed intestinal metaplasia marker and gastric cancer growth. ISX expression increased in organoids cultured from Helicobacter-infected mouse and human gastric mucosa. ISX plays an important role in gastric carcinogenesis and tumor growth, indicating that ISX may become a molecular target for gastric carcinogenesis and gastric cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ISX Helicobacter pylori 胃発癌 腸上皮化生

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ感染は慢性胃炎、腸上皮化生を引き起こし、胃発癌に至る主な原因である。腸上皮化生の存在は発癌のリスクを高めるが、腸上皮化生を有するすべての患者が発癌するわけではなく、腸上皮化生と胃発癌の関係は解明されていない (Review article: Soichiro Sue, BioMed Res Int, 2015)。申請者らは、*Helicobacter* 感染マウス由来の三次元オルガノイド培養を行い、正常マウス由来と比較し Intestine Specific Homeobox (ISX) の発現が上昇していることを発見した。ISX は正常状態では腸特異的に発現し胃には発現していない転写因子で、ISX ノックアウトマウスは正常発生すること (Choi, Development, 2006)、肝細胞癌において CyclinD1 発現を介して、腫瘍増殖や悪性化に関与するが (Hsu, Cancer Res, 2012)、ヘリコバクター感染胃で発現していることは報告されていなかった。研究代表者は本研究開始時までに ISX のヘリコバクター・ピロリ感染との関係、腸上皮化生と胃発癌における役割について以下の予備的な研究結果を得ていた。

(1) ヘリコバクター感染胃粘膜で ISX は発現亢進した (マウス, ヒト)

マウスとヒトの *Helicobacter* 感染胃で、ISX は有意に高発現していた。ヒトで CDX1/2、腸上皮マーカー: MUC2 も有意に高発現していた。

(2) ヘリコバクター・ピロリにより NF- κ B シグナルを介して ISX 発現が誘導された。

ISX 非発現胃癌細胞株とヘリコバクター・ピロリを共培養したところ、mRNA レベル・蛋白レベルでの ISX 発現を確認した。ヘリコバクター・ピロリは外来遺伝子群である cagPAI を持ち病原性を発揮しているが、cagPAI 欠損株に比べ保有株で強く ISX を発現した。NF- κ B シグナルの阻害薬である Nemo-binding peptide (NBD) の投与でヘリコバクター・ピロリによる ISX 発現は抑制された。

(3) ISX 発現は腸上皮化生と細胞増殖に関与した。

胃癌細胞株に ISX を恒常的に発現させたところ、CDX1/2、MUC2、細胞増殖マーカー: CyclinD1、幹細胞マーカー: CD44 の発現亢進と、胃細胞マーカー: MUC5AC の発現低下を認めた。

(4) ISX は細胞増殖能と腫瘍形成能を増加した。

ISX 恒常発現胃癌細胞株は異種移植片モデルで腫瘍の体積、重量がコントロールに比べ有意に増加し、Spheroid formation assay において有意に大きく多いコロニーを形成した。

2. 研究の目的

胃粘膜においてヘリコバクター・ピロリ菌感染により誘導される Intestine Specific Homeobox (ISX) の腸上皮化生と胃発癌における役割を解明すること。

研究代表者は ISX に関する予備的な研究結果から ISX は正常胃では発現していないがヘリコバクター感染に伴い発現し、腸上皮化生と胃発癌に関与することが示唆されたが、ISX のそのような関与は胃発癌や胃癌の治療ターゲットとなりうるようなものなのかという点を明らかとした。またその役割の解明においてヒトのヘリコバクター・ピロリ感染胃においても幹細胞レベルで発現増加しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ISX が胃の腸上皮化生に重要な役割を果たしていることを示すために、胃癌細胞株に siRNA を投与し ISX 発現のノックダウンを行い、また shISX ベクターを用いた ISX ノックダウン株の作成を行い解析した。
- (2) (1) で作成した ISX ノックダウン胃癌細胞株のマウス皮下への異種移植モデルで腫瘍増殖能を評価した。
- (3) ISX が胃発癌において重要な役割を果たしていることを示すために、MNU (methyl-nitroso-urea) を投与し 50 週後に胃前庭部での胃腫瘍を起こすモデルを ISX ノックアウトマウスとワイルドタイプマウスで行った。
- (4) ヒト胃癌と背景胃粘膜での ISX を免疫組織学的に評価した。
- (5) ヒト進行胃癌検体での mRNA 発現を解析した。
- (6) ヒト胃の三次元オルガノイド培養を行いヘリコバクター・ピロリ感染粘膜由来と正常胃由来のオルガノイドでの mRNA 発現を比較した。

4. 研究成果

(1) 胃癌細胞株の ISX ノックダウンの結果、腸上皮化生のキーファクターである CDX2 発現が mRNA・蛋白レベルで抑制された。

CDX2 のトランスジェニックマウスは腸上皮化生を来し腸上皮化生粘膜に胃発癌を来することが報告されている。予備的な研究での ISX 強制発現での CDX2 発現に加え、ISX ノックダウンで CDX2 発現抑制が確認できたことから、ISX は CDX2 を制御している分子の一つであることが示された。ISX のノックアウトマウスが正常発育することから、ISX を抑制する胃発癌抑制治療の可能性が示唆され、そのメカニズムの一つとして CDX2 発現を介した胃発癌の抑制が想定された。

(2) 異種移植モデルにおいて ISX ノックダウ

ン胃癌細胞株ではコントロールに比較し、有意に腫瘍増殖の抑制を認めた。

前述の胃発癌抑制だけでなく、ISX 発現胃癌に対する治療としての ISX 抑制は腫瘍増殖の抑制が期待できることが示唆された。

(3) MNU を用いたマウス胃腫瘍モデルで、コントロール群に比べ ISX ノックアウト群では有意に腫瘍数が減少することが判明した。両群の差を qRT-PCR、免疫組織学的に評価した結果、いずれの解析においても腫瘍形成幹細胞マーカーとして知られる DCLK1 の発現は ISX ノックアウトマウス群で有意に低下していた。

予備的な研究結果から ISX の胃発癌への関与は示唆されていたが、実際に胃発癌において ISX がどの程度重要な役割を果たしているかは明らかでなかった。(3)の結果により、少なくとも MNU 胃発癌モデルにおいて ISX は胃発癌に重要な役割を果たしていることが示された。予備的な研究結果(2)でヘリコバクター・ピロリによる ISX 発現は NF- κ B 経路を介していることが示唆されていたが、NF- κ B 経路を構成する IKK ノックアウトマウスでの MNU 胃発癌モデルでは本研究と類似した結果が報告されていた。つまりヘリコバクター・ピロリにより活性化される NF- κ B 経路の下流として ISX は重要な役割を果たしている可能性が示唆された。NF- κ B は幅広い遺伝子発現に関与するシグナル経路であり、治療ターゲットとしては副作用が問題となる。それに対して ISX は正常胃では発現していないため、胃発癌予防や治療ターゲットとして有望と考えられた。

(4)臨床検体を用いた検討では胃癌の約 42% に ISX が発現し、背景胃粘膜での ISX 発現と強い相関を認めた。

Cancer Genome Atlas (Nature, 2014)の結果から胃癌の多様性が明らかとなっており、既存の分子標的 Her2 と比較しても、約 42% と幅広い対象で効果が期待できる治療は有望である。背景胃粘膜と胃癌での発現の強い相関は、ISX 発現胃粘膜が癌化していることを示唆している。

(5)ヒト進行胃癌での mRNA 発現解析では、約 55%の症例で ISX の強い発現を認め、ISX の高発現群では有意に CyclinD1 や CDX2 の高発現を認めた。

予備的な研究結果(3)で ISX 発現に伴う CyclinD1 や CDX2 の発現が確認されていたが、ISX による CyclinD1 や CDX2 の制御は実際の胃癌でも重要な位置を占めていることが示唆された。

(6)ヒト胃の三次元オルガノイド培養解析で、感染胃粘膜由来オルガノイドでは ISX・CDX2・MUC2 は高発現で、MUC5AC は低発現であった。

マウス胃の三次元オルガノイドでヘリコバクター感染胃由来での ISX 発現に加え、ヒト胃の三次元オルガノイドにおいてもヘリコバクター感染胃由来で ISX 発現が増加していたことから、ISX の発現は胃の幹細胞レベルで起きている現象であることが示唆された。

(1)~(6)の成果のまとめ

ヘリコバクター感染に伴い胃で発現する ISX は、胃の幹細胞レベルで発現し、腸上皮化生と胃発癌に重要な役割を果たしており、ISX は胃発癌や胃癌の治療ターゲットとなる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Soichiro Sue, Wataru Shibata, Eri Kameta, Takeshi Sato, Yasuaki Ishii, Hiroaki Kaneko, Haruo Miwa, Tomohiko Sasaki, Tomohide Tamura, Masaaki Kondo, Shin Maeda. Intestine-specific homeobox (ISX) induces intestinal metaplasia and cell proliferation to contribute to gastric carcinogenesis. *Journal of Gastroenterology*. 2016; 51(10): 949-60. (査読あり)

Shibata W, Sue S, Tsumura S, Ishii Y, Sato T, Kameta E, Sugimori M, Yamada H, Kaneko H, Sasaki T, Ishii T, Tamura T, Kondo M, Maeda S. Helicobacter-induced gastric inflammation alters the properties of gastric tissue. *BMC Gastroenterol*. 2017; 17(1): 145. (査読あり)

[学会発表](計5件)

Soichiro Sue, Wataru Shibata, Makoto Sugimori, Takeshi Sato, Eri Kameta, Shin Maeda. INTESTINE-SPECIFIC HOMEBOX (ISX) IS AN IMPORTANT REGULATOR FOR GASTRIC CARCINOGENESIS WITH POTENTIAL FOR MOLECULAR TARGET. *Digestive Disease Week 2017 Research Forum (Oral presentation)*. 2017. Chicago, IL, USA.

Soichiro Sue. Intestine-specific homeobox (ISX) regulates gastric tumorigenesis in MNU model. 第 89 回日本胃癌学会総会. 2017. 広島, 日本.

須江 聡一郎、芝田 渉、前田 慎. Helicobacter pylori により誘導される Intestine-specific homeobox (ISX) はヒト胃前駆細胞レベルで発現増加し、胃発癌と癌進行に関与する. *JDDW シンポジウム (Oral presentation)*. 2017.

須江 聡一郎. Intestine-specific

homeobox (ISX)は腸上皮化生と胃発癌の重要な因子で、胃癌の治療標的候補である。第3回 G-PLUS (oral presentation). 2017.

須江聡一郎, 芝田渉, 中嶋景, 杉森慎, 神野正智, 金田義弘, 佐藤健, 前田慎.
胃癌における Intestine-specific homeobox (ISX)標的薬の探索. 第76回日本癌学会学術総会. 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

須江 聡一郎 (SUE Soichiro)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：00738619

(2)研究協力者

前田 慎 (MAEDA Shin)

芝田 渉 (SHIBATA Wataru)