

平成 21 年 12 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790318  
 研究課題名（和文） ヘリコバクター・ピロリ感染胃粘膜の腸型化における転写因子発現と  
 上皮間充織相互作用  
 研究課題名（英文） Expression of transcription factors and epithelial-mesenchymal  
 interaction in intestinal metaplasia of *Helicobacter pylori*-  
 infected gastric mucosa  
 研究代表者  
 豊田 武士（TOYODA TAKESHI）  
 愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍病理学部・研究員  
 研究者番号：50443453

研究成果の概要（和文）：ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）感染は慢性胃炎/胃癌の発生に深く関与する。本研究ではスナネズミにピロリ菌を感染させ、胃粘膜に与える影響とそのメカニズムについて解析を行った。1年間の経過観察後、病理標本の詳細な観察に基づき胃癌の発生した個体、あるいは典型的な慢性胃炎を示す個体を抽出した。また、炎症に関与する種々の遺伝子の変化を調べ、ピロリ菌感染胃粘膜における背景データを得た。今後、胃粘膜を上皮と間質に分けて解析し、病変の進行（特に腸型化）に影響する因子について検討を加える予定である。

研究成果の概要（英文）：*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is known to be associated with chronic gastritis and stomach carcinogenesis. In this study, we investigated the influences and mechanisms of *H. pylori*-infected and chemical carcinogen-treated gastric mucosa in Mongolian gerbil model. After 52 weeks, samples with gastric adenocarcinoma, intestinal metaplasia, or typical chronic gastritis were selected by detailed histological analysis. In addition, mRNA expression of several inflammatory factors in gastric mucosa was analyzed by real-time RT-PCR analysis. Further examinations are planned to extract RNA from frozen gastric tissue and investigate expression of transcription factors involved intestinal metaplasia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ、スナネズミ、胃癌

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌は日本で最も発生頻度の高い癌の一

つで、国内における癌死の原因の上位を占めている。多くの疫学的知見と実験動物学的研

究により、その発癌過程には *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) による慢性胃炎が重要な役割を持つことが明らかになっている。しかし、胃癌の起源となる細胞、すなわち萎縮性胃炎や腸上皮化生を生じた胃粘膜のどの細胞から胃癌が発生するかという問題は、未解決のまま残されている。これまで多くの研究者によって、*H. pylori* に誘発される腸上皮化生が胃癌の前癌病変と考えられてきた。しかし、腸上皮化生の形質発現に関わる遺伝子の評価、さらには形質発現から見た胃癌発生の機序については、いずれも限定的な報告に留まっている。

胃・腸管の上皮細胞がそれぞれ特徴的な形態・機能を発現し、高度な分化を遂げる過程において、周囲の間質結合織からの特異的なシグナリングが重要な役割を果たすとみられている（上皮間充織相互作用；epithelial-mesenchymal interaction）（Fukuda and Yasugi, *Dev Growth Differ*, 2005）。胃粘膜の腸型化においても、上皮細胞を取り囲む間充織の転写因子発現が何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。これまでに、腸型化した上皮細胞では腸特異的転写因子である *Cdx2* の発現が上昇する一方、胃特異的転写因子 *Sox2* の発現は低下することが知られている。腸上皮化生や胃癌の腸型化には、これらホメオボックス遺伝子を含む転写遺伝子群が上皮細胞側の因子として関与していると考えられる。しかし、間質特異的な転写因子発現に着目した研究は、過去に例が無い。さらに、近年のマウス胎子を用いた大規模遺伝子解析により、胃と腸の発生・分化の違いに関与する転写因子群の候補が多数報告されている（Choi et al., *Development*, 2006）。これらの中には従来知られてきた *Cdx2*, *Sox2* 以外にも多数の転写因子（含ホメオボックス）が含まれ、胃癌の発生・腸型化のメカニズムにおける個々の転写因子の重要性を今後明らかにしてゆく必要があると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*H. pylori* 感染に伴い胃粘膜が腸型化する過程で、上皮細胞と周囲の間質との間にどのような相互作用が存在するかを、特に転写因子発現の解析を通じて明らかにすることである。具体的には、*H. pylori* 感染スナネズミ慢性胃炎/胃発癌モデルを用いて、腸上皮化生・腸型胃癌を採材する。これらの腸型化した胃粘膜の上皮細胞・周囲間質結合織を、マイクロダイセクション法を用いて別々に採取し、胃と腸の異なる発生・分化に重要とされる 100 種類余りの転写因子群（胃で高発現：*Sox15*, *HoxB6*, *Pax9* など；腸で高発現：*HoxC8*, *Elk1*, *Psx* など。Choi et al., *Development*, 2006）の mRNA 発現をリ

アルタイム RT-PCR 法により解析する。上皮・間質で有意な発現の差が見られた転写因子については、スナネズミあるいはヒトの胃組織を用いたウエスタンブロット法・免疫組織化学的検索を行い、その局在についても検討を加える。得られたデータを元に、胃粘膜の腸型化において上皮間充織相互作用の果たす役割を総合的に検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 6 週齢、雄の SPF スナネズミ (MGS/Sea) 60 匹に *H. pylori* を胃内接種し、感染後 2 週目より化学発癌物質である

*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を 10ppm の濃度で 20 週飲水投与した。対照群として、*H. pylori* 非感染・MNU 非投与群 (10 匹) を用意した。

(2) 実験開始から 52 週の経過観察後、*H. pylori* + MNU 群 (中途死亡例等を除く 54 匹) および対照群を解剖し、腺胃の一部から凍結材料を採材した。残る腺胃組織から病理標本を作製し、胃癌の発生頻度を検索した。また、各個体の慢性胃炎の指標として、好中球浸潤・単核細胞浸潤・異所性増殖性腺管および腸上皮化生の程度について、0-3 の 4 段階で評価を行った。

(3) スナネズミの腺胃の一部から RNA を抽出し、*H. pylori* 誘発胃炎に関与することが知られる種々の炎症関連因子 mRNA の発現レベルの動態を検索した。

## 4. 研究成果

(1) 52 週間の動物実験の結果、*H. pylori* + MNU 群では 54 匹中 29 匹 (53.7%) に胃癌の発生が認められ、うち 24 例が高分化型腺癌、5 例が低分化型腺癌であった (図 1)。対照群 (10 匹) に胃癌の発生は認められなかった。

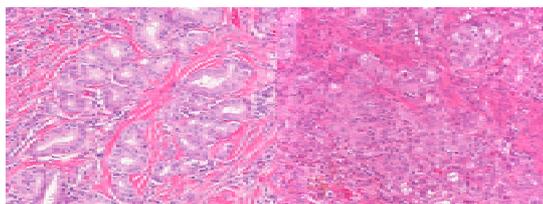


図 1. スナネズミに認められた高分化型腺癌 (左) および低分化型腺癌 (右)

(2) 凍結標本から上皮・間質成分を効率よく分離するため、典型的な慢性胃炎および胃癌を有する個体を選別する必要があると考えられた。そのため、各個体における慢性胃炎の強弱の程度について詳細な病理組織学的検討を行った。慢性胃炎の指標として、幽門腺と胃底腺それぞれにおける好中球浸潤・単核細胞浸潤・腺管の異所性増殖・腸上皮化生の程度について検索したところ、*H.*

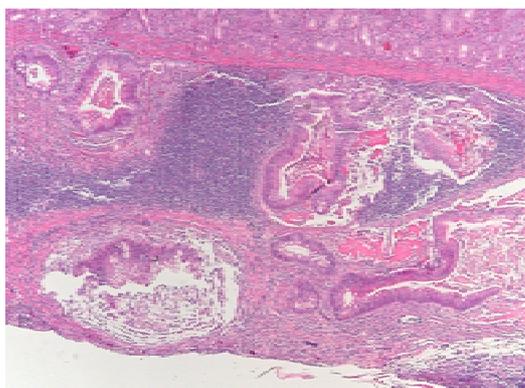


図2 .H. pylori感染による高度な慢性胃炎。顕著な腸上皮化生を伴う、粘膜下の異所性増殖性腺管

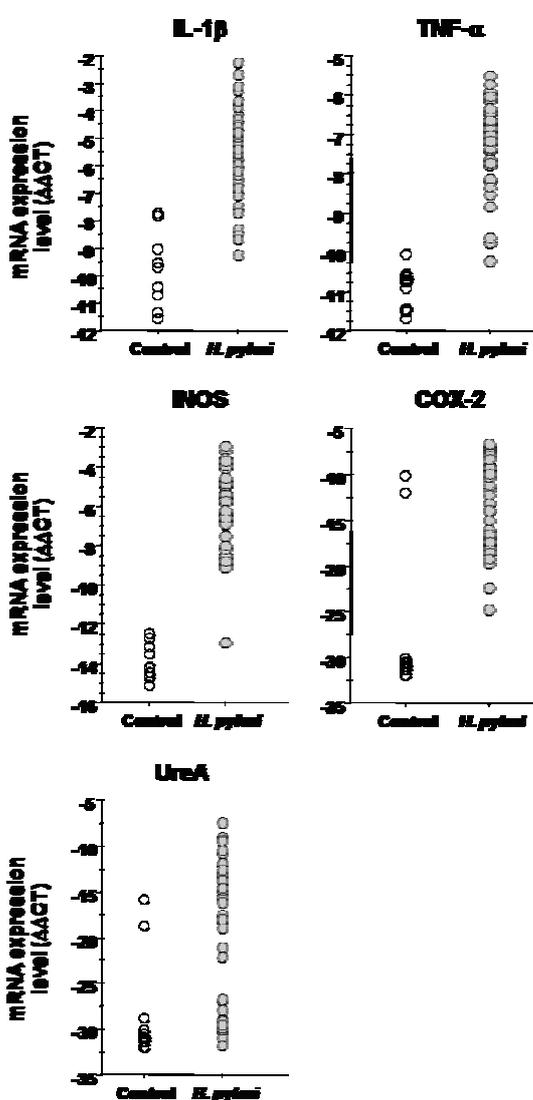


図3. 相対定量リアルタイム RT-PCR 法によるスナネズミ胃粘膜（幽門腺）における炎症関連因子および H. pylori UreA 酵素の mRNA 発現

pylori+MNU 群は対照群と比較して全ての項目で有意な上昇がみられた（図2）。

(3) さらに、炎症関連因子発現の変化を調べるため、胃粘膜から RNA を抽出し、相対定量リアルタイム RT-PCR 法による mRNA 発現の検索を行った。その結果、H. pylori 感染に関与することが知られる代表的な炎症関連因子（IL-1、TNF- $\alpha$ 、iNOS、COX-2）および H. pylori 関連酵素 UreA の幽門腺における mRNA 発現は、H. pylori+MNU 群でいずれも有意に上昇した（図3）。胃底腺においては、COX-2 の発現上昇が統計学的に有意ではなかった（ $P=0.055$ ）ことを除き、ほぼ同様の結果であった。

(4) 以上の実験結果を踏まえ、胃癌に加えて高度な腸上皮化生を有するもの、あるいは典型的な慢性胃炎像を呈する個体を抽出した。今回の実験で用いたスナネズミ胃癌モデルは研究代表者の所属する研究機関で開発されたもの（Tatematsu et al., *Jpn J Cancer Res*, 1998）であり、同研究グループは H. pylori 関連胃癌に関してこれまでに数多くの知見を報告している。今後、本研究で得られたスナネズミの凍結標本から、マイクロダイセクション法を用いて上皮・間質ごとに RNA を抽出し、慢性胃炎や胃癌ならびに腸上皮化生の程度に対応した転写因子発現レベルの差異を解析することで、胃疾患の発生機構解明に繋げてゆく予定である。

#### 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）

〔雑誌論文〕（計8件）

1. Niwa T, Toyoda T (3番目), et al. (他7名) Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res*, 査読有り, 70: 1430-1440, 2010
2. Toyoda T (1番目), et al. (他8名) Pitavastatin fails to lower serum lipid levels or inhibit gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected rodent models. *Cancer Prev Res*, 査読有り, 2: 751-758, 2009
3. Toyoda T (1番目), et al. (他7名) Anti-inflammatory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor, on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Cancer*, 査読有り, 125: 1786-1795, 2009

4. Toyoda T (1 番目), et al. (他 7 名) Synergistic upregulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric mucosa of Mongolian gerbils by a high-salt diet and *Helicobacter pylori* infection. *Histol Histopathol*, 査読有り, 23: 593-599, 2008
5. Cao L, Toyoda T (5 番目), et al. (他 7 名) Development of carcinoid tumors of the glandular stomach and effects of eradication in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Asian Pac J Cancer Prev*, 査読有り, 9: 25-30, 2008
6. Cao X, Toyoda T (9 番目), et al. (他 9 名) 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (Canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. *Int J Cancer*, 査読有り, 122: 1445-1454, 2008

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 豊田武士, 他 .NF- B 阻害剤 caffeic acid phenethyl ester (CAPE) の *Helicobacter pylori* 感染スナネズミにおける慢性胃炎・胃発癌抑制効果. 第 26 回日本毒性病理学会, 石川県立音楽堂 (石川県), 2010 年 2 月 4 日
2. 豊田武士, 他 .NF- B 阻害剤 caffeic acid phenethyl ester (CAPE) による *Helicobacter pylori* 感染スナネズミ胃発癌の抑制効果. 第 68 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2009 年 10 月 3 日
3. 丹羽透, 豊田武士, 他. *Helicobacter pylori* は炎症により胃粘膜に DNA メチル化異常を誘発する. 第 68 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2009 年 10 月 1 日
4. 豊田武士, 他. ヘリコバクター・ピロリ感染スナネズミ胃癌に対する NF- B 阻害剤 (CAPE) およびアスピリンの抑制効果. がん予防大会 2009 愛知、愛知県がんセンター (愛知県), 2009 年 6 月 16 日
5. 豊田武士, 他. *Helicobacter pylori* 感染動物モデルにおけるピタバスタチンの胃発癌および血清脂質動態への影響. 第 25 回日本毒性病理学会、アクトシティ浜松 (静岡県), 2009 年 1 月 27 日

〔図書〕(計 6 件)

1. 塚本徹哉, 豊田武士, 溝下勤, 立松正衛 動物感染モデルを用いたピロリ菌発癌機構解析. *細胞工学*, 29: 549-553, 2010.

2. Toyoda T, Cao X, Takasu S, Mizoshita T, Shi L, Tatematsu M, Tsukamoto T. Chemoprevention of gastric cancer: lessons from an animal model. In: *Current Research in Cancer 3*. Research Media, India, pp.89-97, 2009
3. 豊田武士, 高須伸二, 塚本徹哉, 立松正衛. *H. pylori* 除菌後の胃癌再発予防動物モデル. *Helicobacter Research*, 13: 374-378, 2009.
4. 豊田武士, 塚本徹哉, 立松正衛. 動物実験の立場からみた *Helicobacter pylori* 感染と胃癌. *胃と腸*, 44: 1441-1445, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 武士 (TOYODA TAKESHI)  
愛知県がんセンター (研究所)  
腫瘍病理学部・研究員  
研究者番号: 5 0 4 4 3 4 5 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし