

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590910

研究課題名(和文) Notch 遺伝子を介した腸上皮化生進展過程における特異な胃癌幹細胞誘導機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of Gastric Carcinogenesis in the progression to mucosal atrophy and intestinal metaplasia through Notch1 signaling

研究代表者

今谷 晃 (IMATANI, AKIRA)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30333876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000 円、(間接経費) 1,170,000 円

研究成果の概要(和文)：Helicobacter pylori(H.pylori)感染によって胃粘膜上皮は固有胃腺から胃粘膜萎縮・腸上皮化生が進展し、分化型胃癌の発癌につながる。本研究のin vitro およびin vivoの検討によって、幹細胞の分化・維持に関わる細胞膜受容体Notch1の発現は、H.pylori感染によって抑制され、Notch1細胞内シグナルを介して直接的に固有胃腺の分化を担うhomeobox遺伝子Sox2の発現を抑制し、胃粘膜萎縮を誘導していた。さらにNotch1細胞内シグナルの制御逸脱が胃癌幹細胞誘導による発癌機序に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：H.pylori infection causes the precancerous gastric mucosal atrophy. A transmembrane receptor Notch1 promotes differentiation and maintenance of stem cells. In vitro and in vivo analyses in this study revealed that H.pylori infection triggered Notch1 suppression, leading to the gastric mucosal atrophy through the down-regulation of Sox2. In addition, loss-of-function of Notch1 signaling may contribute to gastric carcinogenesis.

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：胃 Helicobacter pylori 癌抑制遺伝子 分化制御

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (*H. pylori*) が胃粘膜に感染すると、胃酸や消化酵素を分泌する固有胃腺が減少する胃粘膜萎縮が生じる。さらに、組織学的には腸粘膜に置き換わる腸上皮化生が進展する。この過程において分化型胃癌が生じると考えられている (Correa 仮説)。

固有胃腺から胃粘膜萎縮・腸上皮化生が進展するということは、分子生物学的には、胃幹細胞において可逆的な分化変更がなされ、幹細胞維持に重要な homeobox 遺伝子 Sox2 から Cdx2 の発現変更が起こるとも解釈できる。そして、Sox2 発現幹細胞から Cdx2 発現幹細胞への再プログラム化の turning point で、何らかの異常を伴うと癌幹細胞が出現誘導すると類推できる。homeobox 遺伝子 Sox2 は、iPS 細胞誘導に必須の遺伝子の 1 つとして有名であるが、脳、肺、食道、胃の分化維持にも重要な遺伝子であることが報告されている。本研究者は *H. pylori* 感染に対する免疫応答の結果惹起されるインターフェロン- γ が、STAT6 細胞内シグナルを阻害することによって Sox2 の発現を抑制し Cdx2 の発現を誘導することを既に見出している (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009)。

Notch1 は細胞膜貫通型受容体で多くの臓器において幹細胞の維持と分化に関与している。Notch1 の細胞内シグナルは、Delta1 などのリガンドが Notch 受容体 (Full-length Notch1) に結合すると、ADAM17 等の切断酵素により細胞膜外起始部より切断を受け、NTM (transmembrane/intracellular region) となり、次に γ -secretase により切断され NICD (Notch intracellular domain) となり核内移行し標的遺伝子を活性化する。そして NICD の過剰発現は、白血病、前立腺癌、乳癌の発癌および腫瘍維持に関与していることが明らかになっている。胃においても幹細胞の維持や固有胃腺の分化に関与し、胃において特異的に NICD を強制発現するマウスでは胃腫瘍を形成することが知られている (Kim et al, JEM 2011)。

このため、Notch1 遺伝子が Sox2 発現幹細胞から Cdx2 発現幹細胞への再プログラム化に影響を及ぼし、その発現調節異常が胃癌幹細胞を誘導するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

H. pylori 感染による胃粘膜萎縮・腸上皮化生進展過程における胃癌の分子生物学的発癌機構を解明する目的で、幹細胞維持に重要な細胞膜受容体 Notch1 遺伝子による発現制御に着目して、胃粘膜萎縮・腸上皮化生進展過程を Sox2 発現幹細胞から Cdx2 発現幹細胞への再プログラムとモデル化し、その過程の制御逸脱で胃癌幹細胞が出現すると類推し、*H. pylori* 感染が関わる胃癌幹細胞の出現誘導機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) Notch1 遺伝子発現抑制による Microarray 解析

RNA 干渉法により Notch1 遺伝子の発現を抑制する特異的な Notch1shRNA を同定した後、Doxycycline 存在下に発現誘導する vector を構築し、胃癌培養細胞株 KATOIII に遺伝子導入し、Notch1shRNA 誘導安定細胞株を樹立した。そして、Doxycycline 存在下で Notch1 発現抑制の有無別に独立した 3 組の RNA を抽出し、Agilent Expression Array を用いて網羅的に Microarray 解析を行った。

(2) RNA 干渉法を用いた Notch1 あるいは Sox2 発現抑制

Notch1 あるいは Sox2 siRNA をヒト胃上皮培養細胞株 AGS あるいはマウス胃上皮培養細胞株 GSM06 に一過性に遺伝子導入し、72 時間後、RNA あるいはタンパクを抽出した。Notch1、Sox2、壁細胞の発現程度の指標となる Proton pump (ATPase) の発現量を定量 PCR あるいは western blot で確認した。

(3) クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

胃上皮培養細胞株 AGS に NICD を遺伝子導入し強制発現させ、Notch1 に対する 1 次抗体で免疫沈降し、Sox2 プロモーター上の RBP-J κ の結合モチーフに対する primer を用いて PCR 増幅をおこなった。

(4) 細胞増殖回転

細胞増殖能は MTS アッセイ、アポトーシスは FITC 標識した AnnexinV を用いた FACS 解析で評価した。

(5) ヒトおよびマウス胃粘膜組織における免疫組織化学

ヒト正常胃粘膜および分化型胃癌 30 例のホルマリン固定パラフィンブロック標本を対象に、抗原賦活化後、抗 Notch1 抗体、抗 Sox2 抗体あるいは抗 Hes1 抗体を用いビオチン標識の酵素抗体法を行い DAB 発色し評価した。尚、本研究は東北大学医学部倫理委員会の審査・承認 (No. 2012-1-473) を得ている。同様に、*H. pylori* 感染マウス胃粘膜標本に対しても抗 Proton pump 抗体を用いて免疫組織化学を行った。

(6) 球状コロニーアッセイ

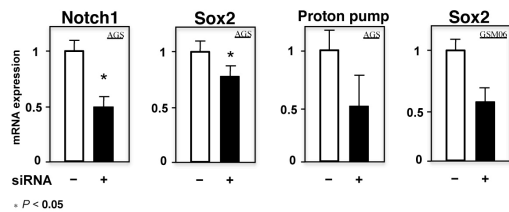
腫瘍細胞は足場非依存性に増殖可能であることを利用して、上皮細胞が接着しないようにコーティングされている 24 ウェルプレートを用い、Knockout DMEM/F12 (Invitrogen) 下でヒト上皮培養細胞株 AGS を 2 週間培養し、直径 200 μ m 以上の球状コロニー数をカウントした。

4. 研究成果

(1) Notch1 遺伝子発現抑制による胃幹細胞および胃癌幹細胞関連遺伝子の発現変動

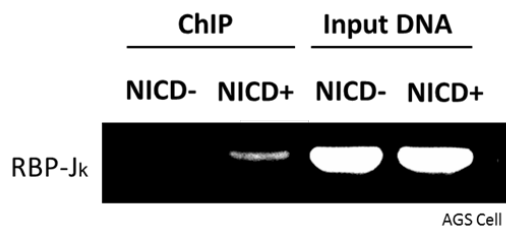
Agilent Expression Array による Microarray 解析により、Notch1 の発現を抑制した場合、2 倍以上発現増強がみられた遺伝子が 675 遺伝子、1/2 以下に発現減弱がみられた遺伝子が 699 遺伝子であった。この中に CD44、CD133、c-kit のリガンド等の幹細胞および癌幹細胞関連遺伝子を同定した。

さらに Notch1 siRNA による定量 PCR の検討により、Notch1 発現抑制した場合、ヒト胃上皮培養細胞 AGS およびマウス胃上皮培養細胞 GSM06 において Sox2 および Proton pump の発現が抑制を受けた。



Sox2 siRNA および Sox2 遺伝子抑制により制御される遺伝子群 (Microarray 解析で作成済) の検討により、逆に Sox2 は Notch1 の発現調節に関与していないことが判明した。

以上の結果を踏まえて、細胞内シグナル伝達機構を解明する目的で、まず、Sox2 遺伝子のプロモーター上に Notch1 NICD の結合部位である RBP-J κ の結合モチーフが -1137/-925 に存在することをコンピューター解析 (MatInspector) で同定した。次に、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて、Notch1 NICD が Sox2 遺伝子プロモーター上の RBP-J κ モチーフに結合することを明らかにした。(下図)



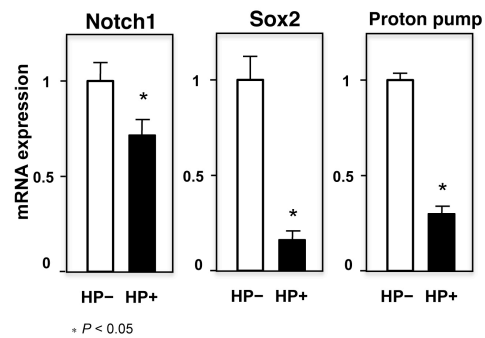
以上より、Notch1 遺伝子は細胞内シグナル伝達機構である RBP-J κ を介して直接的に胃幹細胞調節維持遺伝子である Sox2 発現を制御していることを明らかにし、固有胃腺の分化成熟に関与していることが示唆された。

(2) *H. pylori* 感染による Notch1 発現抑制

Notch1 が、胃幹細胞の分化維持に重要な Sox2 の発現を制御していることを明らかにしたため、*H. pylori* による発現変動を次に検討した。まずヒト胃上皮培養細胞 AGS およびマウス胃上皮培養細胞 GSM06 に対して *H. pylori* 刺激 4 時間後、RNA およびタンパクを抽出した。そして、Notch1、Sox2 および

Proton pump の発現を定量 PCR および western blot 法で検討した。その結果、Notch1、Sox2 および Proton pump (ATPase) のいずれも *H. pylori* 刺激により発現が抑制を受けていることが判明した。さらに Notch1 のリガンドである Delta1 や Notch1 細胞内シグナル下流にある転写因子 Hes1 の発現も低下していた。

次に C57BL/6J マウスに *H. pylori* を経口感染させ、1 年後に胃を摘出し、RNA 抽出と病理標本作製を行った。免疫組織化学的検討により *H. pylori* 感染胃粘膜では、非感染粘膜に比べて有意に壁細胞数が減少し、いわゆる胃粘膜萎縮状態にあることが判明した。また、定量 PCR による検討でも、*in vitro* の検討同様に、*H. pylori* 感染胃粘膜で Notch1、Sox2 および Proton pump (ATPase) の発現が低下していた。(下図)



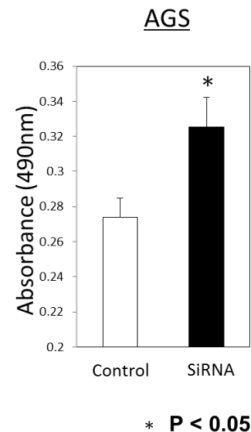
ヒト固有胃腺胃粘膜において Notch1 は、免疫組織化学的検討から、主に主細胞や壁細胞の細胞膜に発現を認め腺底部に向けて発現は増強していた。それに一致して Hes1 の発現も認めた。*H. pylori* が感染した結果、胃粘膜萎縮が進展するにつれて Notch1 および Hes1 の発現は低下していた。

以上より、*H. pylori* 感染は Notch1 の発現を抑制し、その結果、Sox2 発現が抑制を受け、発癌母地である胃粘膜萎縮を進展させる可能性が示唆された。

(3) Notch1 機能喪失による胃癌発癌機序

ヒト分化型胃癌 30 例において Notch1 の発現を免疫組織化学で検討したところ、いずれの胃癌組織に関しても Notch1 の発現は細胞膜あるいは核内に認めなかった。

ヒト胃癌培養細胞株において Notch1 siRNA を用いて Notch1 を抑制させたところ、MTS アッセイの検討により細胞増殖能は亢進した。(右図)



同様に AnnexinV を用いた FACS 解析よりアポトーシス誘導が阻害されていることが判明した。

上記の結果は、Notch1 NICD の過剰発現が癌化を誘導するといわれる周知の事実と異なり、近年の報告にある扁平上皮癌における Notch1 機能喪失による癌化、つまり、Notch1 遺伝子の癌抑制遺伝子的側面を支持するものである。

一方、各種胃癌培養細胞株においては、western blot の検討により、NICD ではなく NTM が過剰発現していることが判明した。このため、Full-length Notch1 を切断し NTM 誘導を阻害する ADAM 阻害剤と NTM を切断し NICD 誘導を阻害する γ -secretase 阻害剤を用いて検討を進めた。MTS アッセイにより、 γ -secretase 阻害剤では胃癌細胞株における細胞増殖能に変化を認めなかったものの、ADAM 阻害剤では有意に細胞増殖能は低下した。同様に、球状コロニーアッセイにより、 γ -secretase 阻害剤では胃癌細胞株における造腫瘍能に変化を認めなかったもの、ADAM 阻害剤では有意に造腫瘍能は抑制された。ADAM 阻害剤により FACS および蛍光免疫組織化学より、胃癌培養細胞株で Full-length Notch1 の発現が回復していることが確認できた。

以上より、胃癌培養細胞株においては Notch1 の発現抑制は増殖能や造腫瘍能を高めるが、逆に Full-length Notch1 の発現回復は増殖能や造腫瘍能を抑制することが判明した。

本研究により、Notch1 遺伝子は胃幹細胞関連遺伝子 Sox2、さらに胃癌幹細胞関連遺伝子 CD44 および CD133 の発現を制御しており、*H. pylori* 感染によって Notch1 遺伝子の発現が抑制を受けると、正常な Notch1 細胞内シグナルの逸脱によって、胃癌発癌が誘導される機構があることが明らかとなった。このため、ADAM 阻害剤のような Full-length Notch1 を維持する分子標的薬剤が抗がん剤やがん予防薬となりう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 2 件)

①Xiaoyi Jin, Naoki Asano, Akira Imatani, Jun Fushiya, Yutaka Kondo, Katsunori Iijima, Tomoyuki Koike, Tooru Shimosegawa, Loss of Notch1 function in *Helicobacter pylori* contributes to gastric mucosal atrophy and carcinogenesis.、Digestive Disease Week, 2014 年 5 月 4 日、アメリカ合衆国・シカゴ

②Xiaoyi Jin, Akira Imatani, Naoki Asano, Yutaka Kondo, Jun Fushiya, Nobuyuki Ara, Katsunori Iijima, Tomoyuki Koike, Tooru

Shimosegawa, *Helicobacter pylori* infection induces the atrophy of gastric mucosa through the down-regulation of Notch1 and Sox2.、NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, 2013 年 5 月 10 日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今谷 晃 (IMATANI AKIRA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30333876