

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590926

研究課題名(和文) 胃腸上皮化生粘膜と胃癌におけるmicroRNAの発現

研究課題名(英文) The expression of microRNA in the intestinal metaplasia and gastric carcinoma

研究代表者

武藤 弘行 (Mutoh, Hiroyuki)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50322392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌抑制遺伝子や癌遺伝子の転写後発現調節にmicroRNAの関与が報告されている。分化型胃癌とその前癌病変である腸上皮化生粘膜におけるmicroRNAの発現の変化を明らかにすることは発癌メカニズムの解明に加え、診断・治療においても重要な意義をもつ。我々が作製した腸上皮化生のモデル動物であるCdx2トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜と胃癌におけるmicroRNA-21、microRNA-137、microRNA-145を研究した。microRNA-21はPTEN、microRNA-137はMusashi1、microRNA-145はOct3/4、Sox2、KLF4の発現を抑制した。

研究成果の概要(英文)：Cdx2-transgenic mouse is the model mouse of the intestinal metaplasia related to gastric carcinoma. The expressions of microRNA in the intestinal metaplasia of Cdx2-transgenic mouse stomach were analyzed. microRNA-21, microRNA-137, and microRNA-145 were elevated in the intestinal metaplasia and gastric carcinoma of Cdx2-transgenic mouse stomach. microRNA-21 downregulated the expression of PTEN, microRNA-137 downregulated the expression of Musashi1. microRNA-145 downregulated the expression of Oct3/4, Sox2, and KLF4.

研究分野：消化器内科

キーワード：microRNA intestinal metaplasia Cdx2

1. 研究開始当初の背景

細胞内に存在する長さ 17~24 塩基の 1 本鎖 RNA である microRNA は、翻訳レベルで他の遺伝子の発現を抑制する。microRNA は特定の遺伝子のメッセンジャーRNA(大抵は 3'側非翻訳領域)に相補的な配列を有し、このメッセンジャーRNA と microRNA との結合により、翻訳が阻害される。それぞれの microRNA は複数の遺伝子を制御していると考えられており、ヒトの全ての遺伝子の 1/3 以上が microRNA 分子に制御されているという予測がある。microRNA は真核生物で高度に保存されており、ある遺伝子の発現はそのタンパク質をコードしているメッセンジャーRNA の発現レベルよりも、その遺伝子を制御している microRNA のレベルに依存している可能性があると考えられている(文献 1)。

胃癌の発癌のメカニズムとして、遺伝子異常やメチル化をはじめとするエピジェネティックな異常が指摘されてきた。近年 microRNA による遺伝子の翻訳レベルでの発現調節が注目されている。癌においても増殖に関与する遺伝子や癌抑制遺伝子の翻訳レベルでの発現調節に microRNA が関与している。

腸上皮化生粘膜は分化型胃癌の前癌病変である。この腸上皮化生粘膜のモデル動物である Cdx2 トランスジェニックマウス(当研究室で作成)の腸上皮化生粘膜とそこから発生する胃癌における microRNA の発現プロファイリングをマイクロアレイ解析で既に行い、腸上皮化生粘膜と胃癌において増加・減少する microRNA の候補遺伝子の情報を得ている。この中から細胞の増殖や幹細胞マーカー遺伝子の発現抑制に関与する microRNA で腸上皮化生粘膜と胃癌において正常胃粘膜と比較して減少している microRNA、癌抑制遺伝子の発現抑制に関与する microRNA で腸上皮化生粘膜と胃癌において正常胃に比較して増加している microRNA を検討した。候補遺伝子として microRNA-21、microRNA-137、microRNA-145 の 3 つの microRNA を今回の研究対象とする。microRNA-21 は PTEN、microRNA-137 は Musashi1、microRNA-145 は Oct3/4、Sox2、KLF4 の発現を抑制することが報告されている。腸上皮化生粘膜と胃癌において microRNA-21 の減少、microRNA-137 と microRNA-145 の増加を確認している。この結果をもとに microRNA と胃癌、その前癌病変である腸上皮化生粘膜との関係を解明する。

2. 研究の目的

microRNA による転写後の遺伝子発現制御が注目されている。癌抑制遺伝子や癌遺伝子の転写後発現調節にも microRNA の関与が報告されている。分化型胃癌とその前癌病変である腸上皮化生粘膜における microRNA

の発現の変化を明らかにすることは発癌メカニズムの解明に加え、診断・治療においても重要な意義を持つ。われわれが作製した腸上皮化生のモデル動物である Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜と胃癌における microRNA の発現プロファイリングをマイクロアレイ解析で既に行い、有意に増減している microRNA を明らかにしている。増減の明らかになった microRNA の観点から、腸上皮化生から発癌への関係を明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

この研究の開始に先立ち予備実験として Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜と胃癌における microRNA の発現プロファイリングをマイクロアレイ解析で既に行っている。このマイクロアレイの結果をもとに発癌との関係のある microRNA-21、microRNA-137、microRNA-145 に着目した。ヒトと Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜と腫瘍における microRNA-21、microRNA-137、microRNA-145 の増減を定量的 PCR で明らかにする。そして、それぞれの microRNA の標的遺伝子と考えられている PTEN、Musashi1、Oct3/4、Sox2、KLF4 の発現および microRNA の gain-of-function と loss-of-function の影響を明らかにする。胃細胞株を用い microRNA の増減による遺伝子変化をマイクロアレイにより網羅的に解析する。その結果をもとに microRNA を増減することにより特異的メッセンジャーRNA を繰ることによる進行胃癌の治療へと結びつけていく。

4. 研究成果

(1)腸上皮化生粘膜の上皮細胞には転写因子 Cdx2 が発現している

転写因子 Cdx2 は、本来は正常の腸管粘膜上皮に発現しており、正常腸管粘膜上皮細胞の発生や分化において重要な役割を演じている。ヒトの胃の腸上皮化生粘膜には、転写因子である Cdx2 が発現していることがわれわれを含め報告されている。

(2)胃粘膜に Cdx2 を発現するトランスジェニックマウスは腸上皮化生を起こす

そこで、われわれは壁細胞に存在する H⁺/K⁺ ATPase の β subunit のプロモータを用いて胃粘膜に特異的に Cdx2 を発現させるトランスジェニックマウスを作成し、腸上皮化生を引き起こすことに成功した。

(3)腸上皮化生粘膜では Shh の発現が抑制されている

腸上皮化生粘膜の誘導に転写因子 Cdx2 が主役を演じているが、腸上皮化生粘膜の発生におけるもう一つの疑問は、何故胃型の細胞が消失するのかであり、このことは腸上皮化生を考える上で極めて重要である。ヒトの腸上皮化生粘膜では胃の壁細胞の分化に関与する morphogen である Shh (sonic

hedgehog)の発現が低下していることが報告されている。そこで Cdx2 トランスジェニックマウスの胃粘膜における Shh の発現を定量的 PCR で検討したところ Shh の発現は完全に抑制されていた。RNA レベルのみならず免疫組織染色においても正常胃粘膜の壁細胞に発現している Shh が、腸上皮化生粘膜では完全に消失していた。一方、Ihh (indian hedgehog)は正常胃粘膜と同様に発現がみられることから、この Shh の発現消失は正常胃粘膜上皮細胞が失われたためではないことがわかる。この Shh の発現低下の機序は Shh のプロモータ領域のメチル化によるものではなく、転写因子である Cdx2 が Shh のプロモータ領域に存在するシスエレメントに結合することにより Shh の発現を低下させていることが確かめられた。

(4)腸上皮化生粘膜では Sox2 の発現には変化がない

胃粘膜上皮細胞の分化に Sox2 も関与している。ヒトの *H. pylori* 感染胃粘膜では Cdx2 の上昇とともに Sox2 が低下し、除菌により Cdx2 の低下と Sox2 の増加が報告されている。そこで、Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜での Sox2 の発現を検討したところ、Sox2 の発現は低下していなかった。しかし、胃型の上皮細胞の粘液である Muc5Ac の発現は完全に抑制されていた。一方、腸粘膜上皮細胞に発現している alkaline phosphatase の発現が腸上皮化生粘膜で認められた。Sox2 により転写の制御を受けている Muc5Ac の転写活性を検討したところ、Sox2 により転写活性は増加したが Cdx2 により転写活性が抑制されることがわかった。このことより、胃型上皮細胞の粘液である Muc5Ac の発現抑制は Sox2 の発現の低下によるのではなく Cdx2 による転写の抑制であることが明らかになった。

(5)Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜から分化型胃癌が発生する

胃癌、とくに分化型胃癌の背景粘膜に腸上皮化生を伴う萎縮性胃炎が高率に認められることから、萎縮性胃炎が分化型胃癌の発生源地であると考えられてきた。しかし、分化型胃癌が腸上皮化生粘膜から直接発生したと断定することは従来の疫学的研究や病理学的な研究からはむずかしいと考えられる。さらに、慢性萎縮性胃炎の原因として *H. pylori* を念頭におくとき、腸上皮化生を示す粘膜には *H. pylori* 感染を認めないという事実は、腸上皮化生の発生には *H. pylori* は極めて重要な役割を演じているが、腸上皮化生からの発癌は *H. pylori* とは直接関係なく、腸上皮化生粘膜自体が高分化型胃癌の前癌病変である可能性を強く示唆している。そこで、我々の作成した Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜から胃癌が発生するか否かを検討した。従来の動物を用いた発癌実験では N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)といった発癌剤

や *H. pylori* を用いており、腸上皮化生からの発癌を直接証明することは不可能である。そこで Cdx2 トランスジェニックマウスを MNNG も *H. pylori* も用いることなく100週齢まで観察したところ、肉眼的に認められるポリープが発生した。組織学的に、このポリープは固有筋層に浸潤する進行癌であり、高分化型腺癌であることが確認された。Cdx2 トランスジェニックマウスからの発癌は腸上皮化生粘膜自体が胃の高分化型腺癌の発生源地であることを証明している。

(6)腸上皮化生粘膜と胃癌における microRNA の発現

ヒトの腸上皮化生粘膜と胃癌においては種々の microRNA の発現が確認されている。

腸上皮化生粘膜は分化型胃癌の前癌病変である。この腸上皮化生粘膜のモデル動物である Cdx2 トランスジェニックマウス(当研究室で作成)の腸上皮化生粘膜とそこから発生する胃癌における microRNA の発現プロファイリングをマイクロアレイ解析で既に行い、腸上皮化生粘膜と胃癌において増加・減少する microRNA を明らかにした。この中から細胞の増殖や幹細胞マーカー遺伝子の発現抑制に関与する microRNA で腸上皮化生粘膜と胃癌において正常胃粘膜に比較して減少している microRNA、癌抑制遺伝子の発現抑制に関与する microRNA で腸上皮化生粘膜と胃癌において正常胃に比較して増加している microRNA を検討した。

microRNA-21、microRNA-137、microRNA-145 の3つの microRNA を研究対象とした。microRNA-21 は PTEN、microRNA-137 は Musashi1、microRNA-145 は Oct3/4、Sox2、KLF4 の発現を抑制した。腸上皮化生粘膜と胃癌において microRNA-21 の減少、microRNA-137 と microRNA-145 の増加を確認した。この結果をもとに microRNA と胃癌、その前癌病変である腸上皮化生粘膜との関係を明らかにしつつある。

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5件)

Sakamoto H, Asahara T, Chonan O, Yuki N, Mutoh H, Hayashi S, Yamamoto H, Sugano K. Comparative analysis of gastrointestinal microbiota between normal and caudal-related homeobox 2 (cdx2) transgenic mice. *Intest Res.* 2015;13:39-49.

Mutoh H, Sashikawa M, Sakamoto H, Tateno T. Cyclooxygenase 2 in gastric carcinoma is expressed in doublecortin and CaM kinase-like-1-positive tuft cells. *Gut Liver.* 2014;8:508-18.

Wada M, Lefor AT, Mutoh H, Yano T, Hayashi Y, Sunada K, Nishimura N, Miura

Y, Sato H, Shinhata H, Yamamoto H, Sugano K. Endoscopic ultrasound with double-balloon endoscopy in the evaluation of small-bowel disease. Surg Endosc. 2014;28:2428-36.

Sakamoto H, Mutoh H, Miura Y, Sashikawa M, Yamamoto H, Sugano K. SOX9 Is Highly Expressed in Nonampullary Duodenal Adenoma and Adenocarcinoma in Humans. Gut Liver. 2013;7:513-8.

Fujii Y, Yoshihashi K, Suzuki H, Tsutsumi S, Mutoh H, Maeda S, Yamagata Y, Seto Y, Aburatani H, Hatakeyama M. CDX1 confers intestinal phenotype on gastric epithelial cells via induction of stemness-associated reprogramming factors SALL4 and KLF5. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:20584-9.

〔学会発表〕(計0件)

〔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

武藤弘行 (Hiroyuki Mutoh)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50322392