

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790381

研究課題名(和文) Wntシグナルによる胃上皮細胞の増殖・分化制御機構の解明

研究課題名(英文) The effects of activation of canonical Wnt signaling on the proliferation and differentiation of gastric epithelial cells

研究代表者

平田 暁大(Hirata, Akihiro)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：30397327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌組織において、Wnt/ β -cateninシグナルの活性化を示す β -cateninの蓄積が高率に認められるが、その活性化が胃癌の発生・進展にどのように寄与しているかについては詳細に検討されていない。

本研究では、 β -cateninの発現を誘導可能な遺伝子改変マウスを用いて、正常な胃上皮細胞において β -cateninを強制的に発現させることにより胃癌と同様の状態を作り出し、Wntシグナルの活性化が細胞増殖および分化に及ぼす影響を検討した。その結果、Wntシグナルの活性化は、胃上皮細胞の未分化状態を維持し、細胞増殖の促進へと導くことで胃癌発生に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Wnt/ β -catenin signaling is frequently activated in gastric cancers but it remains poorly understood how Wnt signaling contributes to the gastric carcinogenesis. In the present study, we investigated the effect of activation of Wnt signaling in gastric epithelial cells using doxycycline-inducible β -catenin mice. When we fed adult mice doxycycline for 5 days, cytoplasmic and nuclear β -catenin accumulation were observed in both fundic and pyloric glands of the stomach and the number of Ki-67-positive proliferating cells significantly increased in the isthmus and gastric pits with significant decrease in mucus production. Gene expression analysis revealed that β -catenin induction led to the up-regulations of gastric and intestinal epithelial stem cell markers. Our data indicate that Wnt activation maintains gastric epithelial cells in an undifferentiated and proliferative state.

研究分野：実験病理学

キーワード：胃癌 Wntシグナル 細胞増殖 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

ヒトの胃癌組織において、Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が高率に認められるが、その活性化が胃癌の発生・進展にどのように寄与しているかについては詳細には検討されていない。

2. 研究の目的

遺伝子改変マウスを用いて胃上皮細胞において β -catenin を強制的に発現させ、Wnt シグナルの活性化が細胞増殖および分化に及ぼす影響を解析し、Wnt シグナルの活性化が胃癌の発生・進展にどのように寄与しているか明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) β -catenin inducible マウスを用いた解析

ドキシサイクリンの投与によって (Tet-on システム) 安定型 β -catenin の発現を誘導可能な β -catenin inducible マウスを用いて (Hirata A et al., Development, vol.140(1), p. 66-75, 2013)、胃上皮細胞において β -catenin を強制的に発現させ、Wnt シグナルの活性化が細胞増殖および分化に及ぼす影響を解析した。5 から 7 週齢のマウスを使用し、0.2%ドキシサイクリンを 5 日間飲水投与した。

(1)-① 組織学的および免疫組織学的解析

胃を大弯に沿って切開し、伸展した後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定した。定法に従い、パラフィン包埋し、ヘマトキシリンエオジン染色 (H&E 染色) 標本を作製した。さらに、 β -catenin、Ki-67、Muc5AC に対する免疫染色およびアルシアンブルー-PAS 染色 (AB-PAS 染色) を行った。

(1)-② 遺伝子発現解析

胃を大弯に沿って切開し、伸展した後、胃底腺および幽門腺領域の胃粘膜を採取した。採取した胃粘膜は緩衝液で洗浄した後、30mM の ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含んだ Hanks' balanced salt solution でインキュベートし (37°C、15 分)、胃上皮細胞のみを分離し、採取した胃上皮細胞から total RNA を抽出した。リアルタイム PCR 解析には、胃底腺および幽門腺から抽出した RNA を用い、定法に従い cDNA を合成し、解析に用いた。マイクロアレイ解析では、幽門腺から抽出した RNA をサンプルとし、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affimetrix) を用いて解析した。

(2) 胃癌組織を用いた解析

β -catenin inducible マウスを用いた解析結果が胃癌組織に外挿出来るか検討するため、N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 投与により誘発したマウスの腺胃腫瘍およびヒトの早期胃癌を組織学的および免疫組織学的に解析した。H&E 染色に加えて、 β -catenin、Ki-67、Muc5AC に対する免疫染色および AB-PAS 染色を行った。

4. 研究成果

(1) β -catenin inducible マウスを用いた解析

(1)-① 組織学的および免疫組織学的解析

ドキシサイクリンを β -catenin inducible マウスに 5 日間投与したところ、壁細胞を除く胃底腺全域および幽門腺全域において β -catenin の核・細胞質内への蓄積が認められた (図 1)。 β -catenin を誘導した胃腺管では、峽部から胃小窩にかけて核/細胞質比の高い小型細胞が著明に増加した。同細胞は、細胞増殖マーカーである Ki-67 陽性であり (図 1)、胃底腺および幽門腺のいずれにおいても、 β -catenin の誘導により Ki-67 陽性細胞の数が有意に増加した (図 2)。

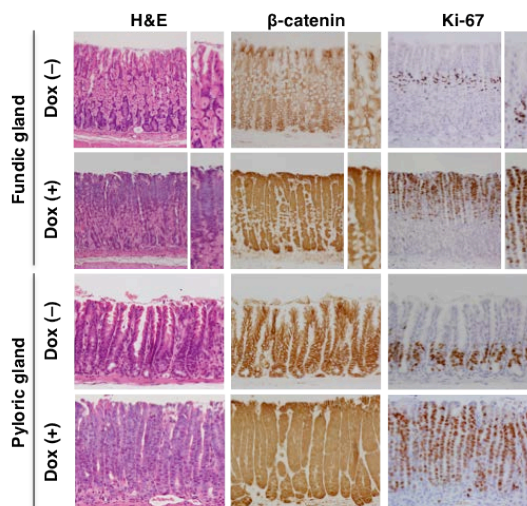


図 1 β -catenin inducible マウスの胃底腺 (上段) および幽門腺 (下段) における β -catenin 誘導による増殖細胞の増加。H&E 染色 (左列)、 β -catenin 免疫染色 (中央列)、Ki-67 免疫染色 (右列)。

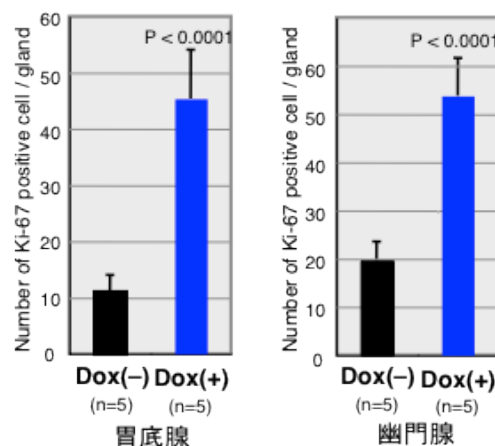


図 2 β -catenin inducible マウスの胃底腺 (左) および幽門腺 (右) における β -catenin 誘導による Ki-67 陽性細胞数の増加。

さらに、粘液を染める AB-PAS 染色を行ったところ、正常な胃底腺および幽門腺では胃小窩において PAS 陽性の豊富な粘液産生が認められたが、 β -catenin 誘導により胃小窩における粘液産生の著明な減少が認められ (図 3)、表層粘液細胞への分化を抑制している

ことが明らかとなった。また、胃型粘液（腺窩腺型粘液）のコアタンパク質である Muc5AC の免疫染色でも粘液産生の抑制が確認された。

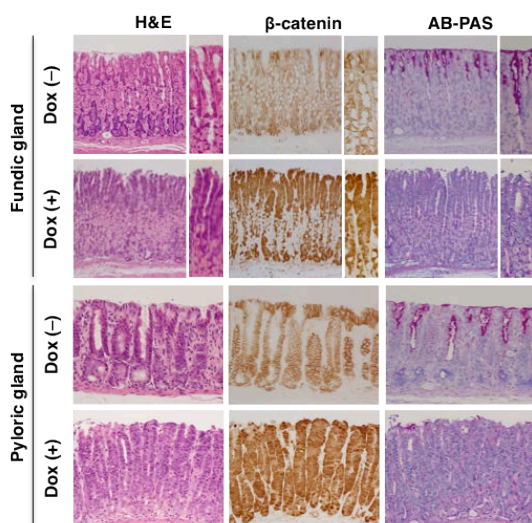


図3 β -catenin inducible マウスの胃底腺（上段）および幽門腺（下段）における β -catenin 誘導による粘液産生の抑制。H&E 染色（左列）、 β -catenin 免疫染色（中央列）、Ki-67 免疫染色（右列）。

以上の結果より、Wnt シグナルの活性化により、胃上皮細胞の未分化性が維持され、細胞増殖が促進されることが明らかとなった。

(1)-② 遺伝子発現解析

はじめに、 β -catenin inducible マウスの胃底腺および幽門腺において、ドキシサイクリンの投与により β -catenin および *Myc*、*Ccnd1*、*Sox9* といった Wnt 標的遺伝子の発現が亢進していることをリアルタイム PCR にて確認した。

さらに、マイクロアレイ解析では、 β -catenin を誘発した幽門腺では、Wnt 標的遺伝子に加えて、胃および腸管上皮幹細胞マーカー遺伝子 (*Lgr5*、*Sox2*、*Ascl2*、*Bmi1*、*Hopx*、*Llig1*、*Rnf43*、*Tnfrs19*、*Znf43*) がいずれも 2 倍以上発現亢進していた。同時に分化マーカー遺伝子の (*Muc5ac*) の発現抑制も認められた。また、発現量が 2 倍以上増加したプローブ 1972 個を抽出してパスウェイ解析を行ったところ、Hippo signaling pathway に加えて、PI3K-Akt signaling pathway、TGF- β signaling pathway および MAPK signaling pathway 等の他のシグナル経路に関連した遺伝子群が有意に変動していた。以上の結果より、Wnt シグナルが活性化すると、他のシグナル経路と協調して、胃上皮細胞の未分化状態を維持し、細胞増殖の促進へと導くことが明らかとなった。

(2) 胃癌組織を用いた解析

(2)-① マウス腺胃腫瘍の解析

MNU 投与により誘発したマウスの腺胃腫瘍の β -catenin 発現を免疫染色にて解析した

ところ、腫瘍内で核・細胞質内への β -catenin の蓄積が限局して認められた（図4）。

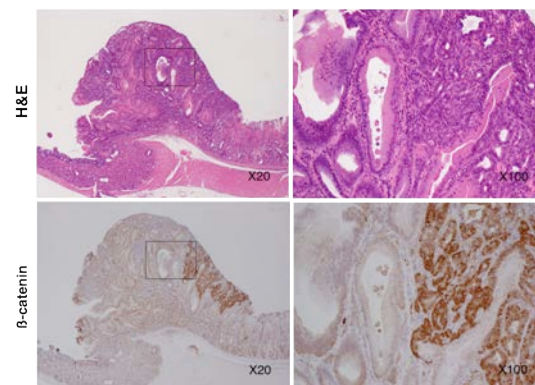


図4 MNU 投与により誘発されたマウス腺胃腫瘍における β -catenin の発現。H&E 染色（上段）、 β -catenin 免疫染色（下段）。腫瘍内に β -catenin の蓄積部位が限局して認められ、同部位は核/細胞質比が高い小型の細胞で構成される。

そこで、同一腫瘍内で β -catenin の蓄積している部位と蓄積していない（細胞膜に発現している）部位の比較を行った。 β -catenin の蓄積していない部位では、分化能が保たれており、粘液産生の乏しい細胞では増殖能が保たれている一方、豊富な粘液を有する細胞では増殖能が失われ、正常な胃腺管同様に分化に伴い増殖能が失われること明らかとなった（図5）。一方、 β -catenin の蓄積部位は、核/細胞質比が高い小型の細胞で構成され、同細胞では粘液産生の著明な減少し、細胞増殖能が維持されていた（図5）。

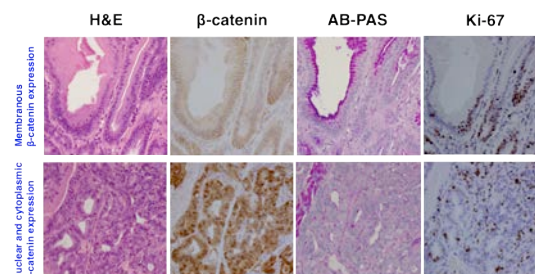


図5 MNU 投与により誘発されたマウス腺胃腫瘍内における β -catenin の蓄積部位（上段）と非蓄積部位（下段）の粘液産生能および細胞増殖能の比較。図4の腫瘍の一部拡大像。左から H&E 染色、 β -catenin 免疫染色、AB-PAS 染色、Ki-67 免疫染色。 β -catenin が細胞質・核に蓄積した部位では粘液産生の著明な減少し、細胞増殖能が維持されている。

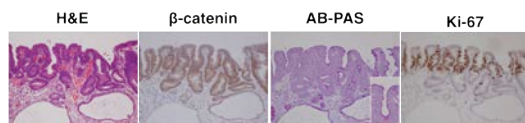
以上の結果より、 β -catenin inducible マウスの結果と一致して、マウスの腺胃腫瘍においても、Wnt シグナルの活性化により胃上皮細胞の未分化性が保たれ、細胞増殖能が維持されることが明らかとなった。

(2)-② ヒトの早期胃癌の解析

ヒトの早期胃癌について β -catenin 発現を免疫染色にて解析したところ、 β -catenin が細

胞膜のみに発現している腫瘍と、 β -catenin が細胞質・核に蓄積している腫瘍が認められた (図6)。そこで、その両者を比較したところ、 β -catenin が細胞膜のみに発現している腫瘍では乏しいながら PAS 陽性の粘液の産生が認められ、Ki-67 免疫染色により増殖帯が維持されていることが明らかとなった (図6)。一方、 β -catenin が細胞質・核に蓄積している腫瘍は、核/細胞質比が高い小型の細胞で構成され、腺管構造を構成しているものの、粘液産生は認められず、Ki-67 陽性の増殖細胞は不規則に配置し (図6)、全ての細胞で細胞増殖能が維持されていると推察された。

Membranous and cytoplasmic β -catenin expression



Nuclear and cytoplasmic β -catenin expression

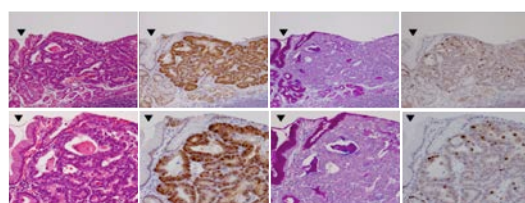


図6 ヒト早期胃癌における β -cateninの蓄積病変 (上段) と非蓄積病変 (下段) の粘液産生能および細胞増殖能の比較。左から H&E 染色、 β -catenin 免疫染色、AB-PAS 染色、Ki-67 免疫染色。 β -catenin が蓄積した腫瘍では粘液産生は認められず、細胞増殖能が維持されている。下段矢頭は隣接する正常胃腺管を示す。

以上の結果より、 β -catenin inducible マウスの結果と一致して、ヒトの早期胃癌において、Wnt シグナルの活性化により、胃上皮細胞の未分化性が保たれ、細胞増殖能が維持されることが明らかとなった。

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)

[雑誌論文] (計 1 1 件)

- ① Takamatsu M, Hirata A, Ohtaki H, Hoshi M, Ando T, Ito H, Hatano Y, Tomita H, Kuno T, Saito K, Seishima M, Hara A. Inhibition of Indoleamin-2,3-dioxygenase 1 exacerbates inflammatory responses in mouse colon tumor microenvironment. *Cancer Science*. 査読有り. in press
- ② Hatano Y, Semi K, Hashimoto K, Lee M, Hirata A, Tomita H, Kuno T, Takamatsu M, Yamashita S, Aoki K, Taketo MM, Kim YJ, Hara A, Yamada Y. Reducing DNA methylation suppresses colon carcinogenesis by inducing tumor cell differentiation. *Carcinogenesis*. 査読有り. in press
- ③ Arioka Y, Ito H, Ando T, Ogiso H, Hirata A, Hara A, Seishima M. Pre-stimulated Mice with Carbon Tetrachloride Accelerate Early Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Digestive Disease and Sciences*. 査読有り. in press
- ④ Abdo W, Hirata A, Shukry M, Kamal T, Abdelsattar E, Mahrous E, Yanai T. Protective effects of *Calligonum comsum* extract against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in Wister rats. *Oncology Letters*. 査読有り. in press
- ⑤ Binh NH, Aoki H, Takamatsu M, Hatano Y, Hirata A, Tomita H, and Hara A. Time-sensitive effects of hypoxia on differentiation of neural stem cells derived from mouse embryonic stem cells in vitro. *Neurological Research*. 査読有り. Vol. 36(9), 2014, pp. 804-13.
- ⑥ Kato Y, Hirata A, Kashiwagi E, Mauno K, Fujisawa K, Matsushima S, Takasu N. Ectopic tissue consisting of glandular stomachic, intestinal, and exocrine pancreatic tissue in the forestomach of a rat. *Jouranl of Toxicologic Pathology*. 査読有り. Vol. 27(1), 2014, pp. 87-90.
- ⑦ Takamatsu M, Hirata A, Hoshi M, Ohtaki H, Hatano Y, Tomita H, Kuno T, Saito K, and Hara A. IDO1 plays an immunosuppressive role in 2,4,6-Trinitrobenzene sulfate-induced colitis in mice. *Journal of Immunology*. 査読有り. Vol. 191(6), 2013, pp. 3057-64.
- ⑧ Abdo W, Hirata A, Sakai H, Ahmed ES, Nikami H, Yanai T. Combined effects of organochlorine pesticides heptachlor and hexachlorobenzene on the promotion stage of hepatocarcinogenesis in rat. *Food and Chemical Toxicology*. 査読有り. Vol. 55, 2013, pp. 578-85.
- ⑨ Kuno T, Hatano Y, Tomita H, Hara A, Hirose Y, Hirata A, Mori H, Terasaki M, and Tanaka T. Organo-Magnesium Suppresses Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis in Male Crj: CD-1 Mice. *Carcinogenesis*. 査読有り. Vol. 34(2), 2013, pp. 361-9.
- ⑩ Binh NH, Satoh K, Kobayashi K, Takamatsu M, Hatano Y, Hirata A, Tomita H, Kuno T and Hara A. Galectin-3 in preneoplastic lesions of glioma. *Journal of Neuro-Oncology*. 査読有り. Vol. 111(2),

2013, pp. 123-32.

- ⑪ Hirata A, Utikal JS, Yamashita S, Aoki H, Watanabe A, Okano H, Bardeesy N, Kunisada H, Ushijima T, Hara A, Jaenisch R, Hochedlinger K and Yamada Y. Dose-dependent roles for canonical Wnt signalling in *de novo* crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. *Development*. 査読有り. Vol. 140(1), 2013, pp. 66-75.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 平田 暁大、山田 泰広、富田 弘之、塚本 徹哉、原 明、Wntシグナル活性化による胃上皮細胞の分化・増殖制御機構の破綻：胃癌の発生・進展機構の解析、第31回日本毒性病理学会、2015年1月29日、東京都
- ② 村井 厚子、平田 暁大、柳井 徳磨、原 明、大腸粘膜修復過程で生じる再生陰窩における大腸上皮幹細胞、増殖細胞、分化細胞の動態、第31回日本毒性病理学会、2015年1月30日、東京都
- ③ 平田 暁大、山田 泰広、富田 弘之、波多野裕一郎、原 明、マウス胃上皮細胞におけるβ-カテニン強制発現による遺伝子発現変化の解析、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日、神奈川県・横浜市
- ④ 平田 暁大、久野 壽也、高松 学、波多野裕一郎、富田 弘之、原 明、*Apc*^{Min/+}マウスの大腸腫瘍性病変における腸管上皮幹細胞マーカーLgr5発現細胞の機能解析、第30回日本毒性病理学会、2014年1月30日、徳島県・徳島市
- ⑤ 平田 暁大、高松 学、富田 弘之、波多野裕一郎、久野 壽也、原 明、*Apc*^{Min/+}マウスの大腸腫瘍性病変におけるLgr5発現細胞の機能解析、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、神奈川県・横浜市
- ⑥ 高松 学、平田 暁大、波多野 裕一郎、富田 弘之、久野 壽也、原 明、Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) 欠損の大腸腫瘍に与える影響、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、神奈川県・横浜市
- ⑦ 平田 暁大、山田 泰広、富田 弘之、塚本 徹哉、山本 昌美、二上 英樹、原 明、Wntシグナルによる胃上皮細胞および胃癌細胞の分化・増殖制御、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月7日、岐阜県・岐阜市

- ⑧ 平田 暁大、久野 壽也、高松 学、波多野裕一郎、富田 弘之、原 明、*Apc*^{Min/+}マウスの大腸腫瘍性病変における腸管上皮幹細胞マーカーLgr5発現細胞の役割、第20回がん予防学会、2013年7月5日、東京都

- ⑨ 平田 暁大、山田 泰広、富田 弘之、久野 壽也、村井 厚子、塚本 徹哉、山本 昌美、原 明、Wntシグナルによる胃上皮細胞および胃癌細胞の分化・増殖制御に関する研究、第29回日本毒性病理学会、2013年2月1日、茨城県・筑波市

- ⑩ 村井 厚子、平田 暁大、高松 学、久野 壽也、柳井 徳磨、原 明、Dextran sulfate sodium (DSS) 誘発性大腸炎の粘膜修復過程における腸管上皮幹細胞の役割、第29回日本毒性病理学会、2013年2月1日、茨城県・筑波市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

学会賞
第 30 回日本毒性病理学会年会長賞（優秀賞）、受賞演題「*Apc*^{Min/+}マウスの大腸腫瘍性病変における腸管上皮幹細胞マーカーLgr5 発現細胞の機能解析」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 暁大 (HIRATA, Akihiro)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：30397327