

厚生労働科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業
H12-ゲノム-029

腸上皮化生をモデルとしたマスター遺伝子制御
による組織分化の研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 牛島 俊和

平成15（2002）年4月

目 次

I 総括研究報告	
腸上皮化生をモデルとしたマスター遺伝子制御による組織分化の研究	
牛島 俊和	2
II 分担研究報告	
胃粘膜からの腺管分離	
立松 正衛	7
III 研究成果の刊行に関する一覧表	9
IV 研究成果の刊行物・別刷	10

腸上皮化生をモデルとしたマスター遺伝子制御による組織分化の研究

主任研究者 牛島 俊和 国立がんセンター研究所発がん研究部長

Methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)法により、腸上皮化生の有無または幽門腺と胃底腺の違いに関連してメチル化が変化する DNA 断片を、ゲノム網羅的に分離した。現在までに、腸上皮化生発生に相関してメチル化される CpG アイランドを、2 個同定した。一方、腸形質発現のためのマスター遺伝子 *CDX1* 及び *CDX2* が、正常な胃では発現しない機構として、プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化が関与する可能性は低いことを示した。また、胃形質のマスター遺伝子候補として、ニワトリの上部消化管で発現することか知られるホメオボックス遺伝子 *SOX2* が、正常な胃粘膜では発現、正常な腸では発現せず、胃の腸上皮化生に伴い発現がほぼ消失することを見出した。腸上皮化生発生に伴い、エクソン 1 の CpG アイランドはメチル化されたが、プロモーター領域 CpG アイランドはされなかった。多クローン性の病態である腸上皮化生においても、多くの幹細胞の同一の CpG アイランドにメチル化の変化が生じることが明らかになった。

分担研究者	所属施設	職名
牛島 俊和	国立がんセンター研究所	部長
立松 正衛	愛知がんセンター研究所	副所長

A 研究目的

ゲノムの CpG メチル化は、DNA メチル基転移酵素の働きにより、DNA 複製前後で同じ状態が保存される。また、遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化は、遺伝子発現を抑制する。①DNA メチル化は安定に娘細胞に受け継がれること、②培養細胞を脱メチル化剤により処理すると、心筋や軟骨などに分化すること、③個体発生過程において CpG メチル化は緻密な制御を受けること、④DNA メチル基転移酵素のノックアウトは、胎生致死であることなどから、DNA メチル化は組織分化に重要な役割を果たすであろうと予測されてきた。

発現調節に重要とされる遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドは、すべて、体細胞では脱メチル化されているとされてきた。しかし、*Oct-3/4* 遺伝子、癌抗原遺伝子、*Maspin* 遺伝子、*Irf-3-3σ* 遺伝子など、最近、正常な体細胞でもメチル化されている遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドが見出されてきた。これらの CpG アイランドは、多くのまたは一部の体細胞ではメチル化されることで組織特異的に遺伝子発現を抑制している。これらの CpG アイランド以外にも、機能は不明なから、正常体細胞でメチル化されたものが多数見つかってきている。

胃の腸上皮化生は、胃粘膜が腸粘膜への異常な分化を示す病態である。幽門部を中心に、腸の

形質をもつ腺管が多クローナル性に出現し、胃底部へと広がることが多い。生化学的に消化吸収酵素が出現したり、粘膜のムチンの種類がスイッチしたりするか、これらは mRNA の発現により簡易に検出出来る。腸上皮化生の多クローナルな出現様式から、その発生に重要な遺伝子スイッチの異常は、独立の出来事として、多くの腺管で生じていると考えられる。その機構としては、突然変異よりもエピジェネティックな機構が考えやすい。

異常な DNA メチル化が、がん抑制遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドに誘発されると、その遺伝子を不活化する。がん抑制遺伝子が不活化された細胞は、増殖優位性を獲得し、最終的にはがんの集塊を形成する。単クローン性の疾患では、まれな DNA メチル化異常でも、それをもつ細胞が増殖することにより、明かな CpG アイランドのメチル化異常を示すようになる。一方、多クローン性の疾患では、同一の CpG アイランドでのメチル化異常が、複数の幹細胞で誘発されないと、異常としては検出されない。

本研究では、腸上皮化生をモデルとして、① DNA メチル化異常が分化の異常を主徴とする多クローン性の疾患に関与するか否かを明らかにすること、さらには、②ゲノム網羅的なメチル化異常の解析方法である methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA) 法によりメチル化が変化した CpG アイランド検索、分化異常のマスター遺伝子を同定することを目的とした。

B 研究方法

(1) 材料

ヒト胃の手術材料から、幽門部と胃体部をそれぞれ切除、EDTA 含有 buffer 中で振盪することにより、上皮のみを分離 収集した。また、腸上皮化生のある腺管とない腺管とを区別するため、エタノール固定後、アルカリホスファターゼ染色及び Alcian-blue 染色を行った。また、腺管分離に用いた近傍の粘膜を固定し、HE 染色を行った。

(2) MS-RDA 法

ゲノム DNA をメチル化感受性の制限酵素 *HpaII* で消化する。消化した DNA にユニバーサルなアダプターを接着し、PCR 法により増幅する。この操作で、メチル化されていない CpG に富むゲノム領域由来の DNA 断片が濃縮されたライブラリー（アンフリコン）を得ることが出来る。アンフリコンを精製後、アダプターを制限酵素により切断、ゲル濾過法により除去する。テスターDNA にのみ、新しいアダプターを接着する。

少量のテスターDNA を大過剰のドライハー DNA と混合し、変性 再会合、PCR 法を行うことで、テスターDNA 中にのみ存在する DNA 断片を選択的に増幅できる。この変性 再会合と PCR 法による選択的増幅を 2 回繰り返すことにより、ドライハーDNA に比べて、テスターDNA で低メチル化状態である DNA 断片を濃縮する。

得られた DNA 断片をベクターにクローン化し、96-384 個のクローンについて塩基配列を決定する。決定された塩基配列により、独立なクローンを検索し、GenBank でデータベースサーチを行う。周辺の CpG アイランド及び遺伝子の有無を検討する。

(3) Bisulfite 処理によるメチル化状態の解析

DNA を制限酵素により切断した後、31 M の bisulfite と反応させた。ゲル濾過カラムにより精製後、アルカリで脱スルホン化した。

Bisulfite シークエンス法には、CpG 部位を含まないプライマーにより、メチル化された DNA 及び脱メチル化された DNA を増幅した。PCR 産物をクローニング、10-12 クローンについて、塩基配列を決定した。

Methylation-specific PCR (MSP)には、最適な DNA 鎖 (top strand または bottom strand)、最適なプライマー部位、プライマー長、Mg 濃度、アニール温度を検討し、メチル化された DNA またはメチル化されない DNA を高感度、かつ、特異性が高く増幅できる条件を決定した。

(4) 定量的 RT-PCR 法

イントロンを挟むプライマーを設計し、定量的 RT-PCR 法を行った。バイオラド社の iCycler iQ real time PCR 装置を用いて PCR を行い、 10^1 - 10^7 個の標準 cDNA と増幅効率を比較、検体中の cDNA 分子数を算出した。更に、*GAPDH* ま

たは β -actin 分子数に対する目的遺伝子の分子数の比率を算出、RNA の品質について標準化を行った。

(5) 倫理面への配慮

本研究は、材料採取施設（愛知がんセンター）の倫理委員会の承認を得た。サンプルは、臨床病理診断の妨げにならない部位のみを採取した。全ての施設で、個人情報、全て匿名化し、フライハシーの保護 人権擁護に努めた。本研究では、生殖細胞系列の遺伝子変異解析は行なわなかった。

C 研究結果と考察

(1) 新規の MS-RDA

昨年度までの MS-RDA 法による解析では、プロモーター領域 CpG アイランドは分離されなかった。以下の改良を MS-RDA に加えるべきであると考えられ、改良法により、MS-RDA を行った。

①幽門腺と胃底腺とで、かなりメチル化状態が異なる。従って、同一症例由来の材料であることよりも、同じ部位由来の材料であることを重視する。②プロモーター領域の CpG アイランドを同定する必要がある。*SIM2* 遺伝子の場合、イントロンの CpG アイランドであったので、原因としての変化である保証がなかった。③プロモーター領域の CpG アイランドを同定するためには、MS-RDA 法を改良する必要がある。使用する制限酵素の種類を増やし、PCR に際して G+C 含量が多い領域が増えるよう betaine を添加する。

現在、得られたクローンのうち 16 個の解析が終了した。うち 7 個が CpG アイランドに由来し、メチル化状態を検討した 2 個の CpG アイランドについては、両方とも、腸上皮化生の出現に伴い、特異的にメチル化されていた (図 1)。

(2) *CDX1* 及び *CDX2* のメチル化解析

ホメオボックス遺伝子 *CDX1* 及び *CDX2* は、正常な胃では発現しないが、腸上皮化生をもつ胃粘膜では発現誘導が認められる。*Cdx2* トランスヒ

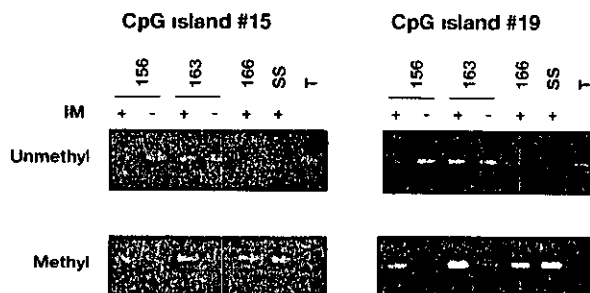


図 1 新たな MS-RDA 法により同定された CpG アイランド #15 と #19 遺伝子 5' 領域ではないため 遺伝子発現への直接的な影響はないと考えられるが 腸上皮化生の出現に伴い メチル化されていることが確認された

ェニックマウスで胃の腸上皮化生が認められることから、腸形質発現のためのマスター遺伝子であると考えられている。

今回、腸上皮化生をもたない正常胃粘膜と、腸上皮化生が強い胃粘膜とを用いて、*CDX1* のプロモーター領域 CpG アイランド、及び、*CDX2* の 5' 上流域のメチル化を解析した。Bisulfite 法により、各 CpG 部位のメチル化を検討したか、両遺伝子が発現していない正常な胃特異的なメチル化は、全く認められなかった (data not shown)。

(3) *SOX2* 遺伝子の発現低下とメチル化

SOX2 遺伝子は、ニワトリで上部消化管での発現が知られるホメオボックス遺伝子である。ヒト正常消化管での発現を検討し、胃では発現し、小腸、大腸では発現しないことを見出した。

次に、腸上皮化生での *SOX2* 遺伝子発現を、定量的 RT-PCR により検討した。同一個体から腺管分離法により得られた腸上皮化生を示す幽門部腺管 (腸上皮化生腺管) と腸上皮化生を示さない幽門部腺管 (非腸上皮化生腺管) を、10 組準備した。腸上皮化生腺管では、非腸上皮化生腺管に比べ、明らかに *SOX2* 遺伝子の発現が低下していた (図 2)。

更に、*SOX2* 遺伝子の発現低下における DNA メチル化の関与を検討するため、*SOX2* のエクソン 1 の CpG アイランドのメチル化状態を解析した。

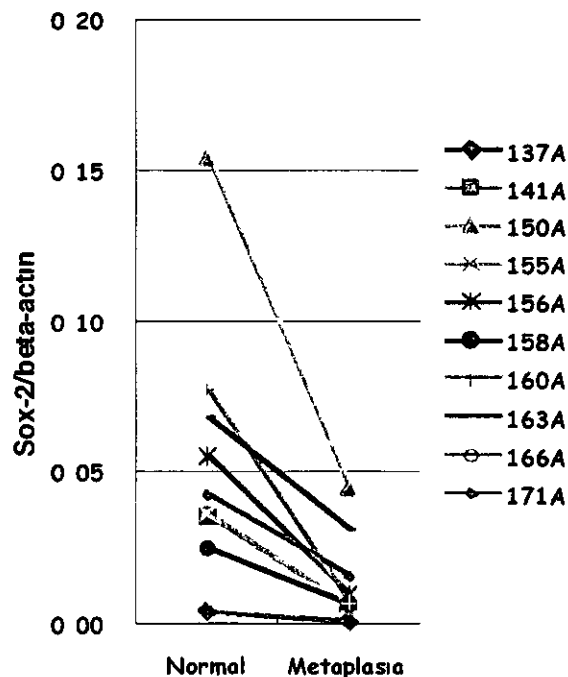


図 2 幽門部での腸上皮化生の発生に伴う *SOX2* の発現低下 10 症例について、幽門部の腺管を腸上皮化生があるものとないものに分離し それぞれについて、*SOX2* の発現量を検討した 全ての症例で 腸上皮化生の発生に伴い *SOX2* の発現が低下していた

一つの腸上皮化生腺管の中にも、胃型の形質をもつ細胞も残存するため、定量的 methylation-specific PCR により、メチル化された DNA 分子の割合を定量した。その結果、腸上皮化生の発生に伴い、*SOX2* 遺伝子のメチル化が出現することが確認された (図 3)。さらに、その後明らかになったプロモーター領域と思われる CpG アイランドについても、メチル化解析を行ったが、こちらにはメチル化は認めなかった。

D 考察

(1) 多クローナルな疾患でのメチル化異常

本研究により、腸上皮化生の様な多クローナルな疾患でも、CpG アイランドのメチル化の変化が存在することが明らかになった。以前に見出した *SIM2* のイントロン 2 領域の CpG アイランド、今回見出した CpG アイランド #15 #19、*SOX2* のエクソン 1 の CpG アイランドなどが相当する。従って、複数の幹細胞において、同一の CpG アイランドのメチル化状態が変化していると考えられた。

しかし、これらの CpG アイランドは遺伝子プロモーター領域には由来せず、遺伝子発現をサイ

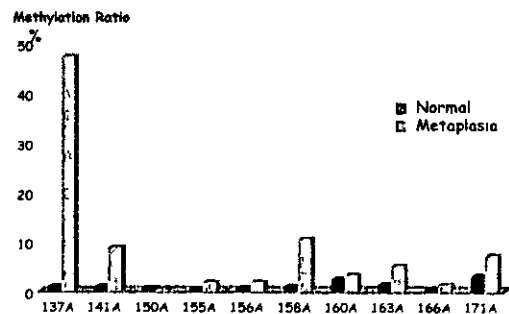


図 3 幽門部での腸上皮化生に伴う *SOX2* エクソン 1 のメチル化。図 3 に示した検体について 定量的 MSP 法により エクソン 1 の CpG アイランドがメチル化された DNA と メチル化されていない DNA の分子数を算出、メチル化された DNA 分子の割合を示した エクソン 1 の CpG アイランドは 腸上皮化生の出現に伴いメチル化されていた

レンシングの原因となるメチル化変化とは考えにくかった。*SIM2* の場合、むしろ遺伝子発現は上昇していた。文献的に、遺伝子発現上昇に伴い、下流の CpG アイランドがメチル化される例が知られており、これらの変化も二次的な変化ではないかと推測された。

プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化の変化は、遺伝子発現変化の原因となると考えられ、複数の幹細胞で同時に誘発されることは、頻度が少ない出来事と考えられる。しかし、第二回目の MS-RDA 法は、3 年間の研究の蓄積にもとずき、第一回目実施時よりも、ヒトゲノム配列が利用可能である点、使用する制限酵素が増えてい

る点、G+C-rich な配列を増幅する点、クローン解析の手順が確立している点など、多くの改良がなされている。今後、プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化状態の変化が見出され、それがマスター遺伝子のスイッチに関連することも、十分に期待される。

(2) SOX2 のマスター遺伝子としての可能性

ニワトリの上部消化管で発現しているホメオボックス遺伝子として、SOX2 に着目した。生理的な発現分布は、ヒトでもニワトリと類似し、上部消化管に限局していた。更に、胃の腸上皮化生で、発現が低下していることを見出した。この発現低下が、胃形質の消失につながるか否かについては、SOX2 を発現し、かつ、胃形質を保持する細胞でのノックダウンの実験、または、マウスのコンディショナルなノックアウトの実験が必要と思われる。

SOX2 の発現低下が胃形質の消失に重要な役割をもつと仮定した場合、その原因にメチル化が関与している可能性を検討した。一般に、加齢や慢性炎症により DNA メチル化が進行することが知られる。腸上皮化生の発生には、*H. pylori* 等による慢性炎症が関与しているとされ、SOX2 のプロモーター領域 CpG アイランドがメチル化され、サイレンシングされている可能性を考えた。しかし、エクソン 1 の CpG アイランドは、発現低下に伴いメチル化されたものの、プロモーター領域の CpG アイランドはメチル化されなかった。従って、メチル化が原因で、SOX2 の発現が低下しているとは考えにくかった。

(3) 本研究費による目的と達成度

MS-RDA 法により、メチル化異常を探索し、メチル化異常を手がかりにマスター遺伝子を同定する目的は、途中で終わり、大変、残念に思っている。しかし、その間、MS-RDA 法に関する多くの技術的改良が行われ、同じ研究室で進行中のがんに関する解析が大いに促進された。その成果には、本研究費も貢献しており、謝辞に記載してある。第二回の MS-RDA 法が終了したところであり、今後、初期の目的を達成できるように努力を継続する。

メチル化異常が分化の異常に関与するか否かに関しては、「多クローナル病変でも共通して生じるメチル化異常がある」ということを、*SIAT2* 遺伝子のイントロン 2 領域、及び、*SOX2* 遺伝子の 5 領域について示すことができた。

正常の分化とメチル化とという視点では、生理的に隣接する幽門腺と胃底腺とでも、メチル化の違いが数多く存在し、DNA メチル化が組織の正常な分化に重要であることの新たな証左を得ることができた。

更に 本研究の過程で、DNA メチル化模様が娘細胞に伝達される安定性に関しても研究が行わ

れ、定量的には知られていなかった安定性を測定することが出来た。ゲノムの領域ごとに安定性が異なるという画期的な知見につながった(論文発表#24)。

(4) 研究成果の学術的 国際的 社会的意義

多クローナル病変でも共通するメチル化異常が存在するということが証明された。今後、それらの異常のうち一部は、原因として多クローナルな疾患へ関与することが証明されれば、前立腺肥大、子宮内膜症、変性疾患など、多くの疾患での研究を促進することとなり、学術的な波及効果は大きい。

(5) 今後の展望

第二回目の MS-RDA 産物を解析する。がんでの経験からすると、これまでの技術的な改良により、プロモーター領域の CpG アイランドが分離される可能性が高くなっている。プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化の変化は、二次的变化として起こることは少なく、重要な変化を見出しうることを期待している。

SOX2 に関しては、発現が胃の形質を維持するためのマスター遺伝子となっているか否かを検討する。具体的には、SOX2 発現を消失し、胃の形質を失っている胃癌細胞株に SOX2 遺伝子を導入、胃及び腸の形質を解析する。

E 結論

MS-RDA 法により、多クローナルな分化異常である腸上皮化生で、複数の腺管に同一のメチル化異常が生じていることを示した。現在のところ、遺伝子発現変化の原因となるものは見出されていないが、改良した MS-RDA 法により、今後見出される可能性が高いと考えている。

一方、既知遺伝子として解析したホメオボックス遺伝子 *SOX2* については、腸上皮化生の発生と関連した発現低下、及び、エクソン 1 の CpG アイランドのメチル化を認めた。*SOX2* 遺伝子にマスター遺伝子としての機能があるか否か、今後、検討を進める。

F 健康危険情報

特に該当しない。

G 研究発表

(1) 論文発表

- 1 塚本徹哉、野崎浩二、立松正衛 スナネスミ感染モデルを用いた *Helicobacter pylori* 感染胃粘膜病変の解析。Helicobacter Research 6 31-36 2002
- 2 Kaneda A Kamimushi, M Sugimura T

- and Ushuima, T Reduced expression of the *Insulin-induced protein 1* and *p11 ARP2/3 complex* genes in human gastric cancers *Int J Cancer* 100 57-62 (2002)
- 3 Kaneda, A , Kamimishi, M , Yanagihara, K , Sugimura, T and Ushuima, T Identification of silencing of nine genes in human gastric cancers *Cancer Res* ,62 6645-6650 (2002)
 - 4 Yamashita S , Furumoto, K , Nobukiy o A Kamohara, M , Ushuima, T and Furukawa, T Mapping of a gene responsible for cataract formation and its modifier in the UPL rat IOVS, 43, 3153-3159 (2002)
 - 5 Abe, M , Okochi E Kuramoto T Kaneda, A , Takato, T , Sugimura, T and Ushuima, T Cloning of the 5' upstream region of the rat *p16* gene and its role in silencing *Jpn J Cancer Res* , 93 1100-1106 (2002)
 - 6 Yuasa, H , Inada K , Watanabe, H and Tatematsu, M A phenotypic shift from gastric-intestinal to solely intestinal cell types in intestinal metaplasia in rat stomach following treatment with X-rays *J Toxicol Pathol*, 15 85-93 (2002)
 - 7 塚本徹哉、野崎浩二、立松正衛 *H pylori* 感染動物モデルにおける胃癌発生メカニズム。日本臨床 61 56-60, 2003
 - 8 Miyamoto, K Asada, K Fukutomi, T , Okochi, E Yagi Y , Hasegawa, T Asahara, T Sugimura T and Ushuima, T Methylation-associated silencing of *heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2)* in human breast, colon lung and pancreatic cancers *Oncogene*, 22 274-280 (2003)
 - 9 Tatematsu, M Tsukamoto, T , and Inada K Stem cells and gastric cancer - role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia *Cancer Sci* 94, 135-141 (2003)
 - 10 Kaneda A , Takai D , Okochi E Kamimishi M and Ushuima, T Methylation-sensitive-representational difference analysis and its application to cancer research *Ann N Y Acad Sci* in press
 - 11 Ushuima, T Watanabe N Okochi E Kaneda A , Sugimura, T and Miyamoto, K Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome *Genome Res* in press
- (2) 学会発表
- 1 立松正衛 胃癌の発生 進展 修飾要因。第 91 回日本病理学会総会、2002 年 3 月、横浜。
 - 2 田中晴就、稲田健一、溝下勤、塚本徹哉、池原譲、中村栄男、立松正衛 腸上皮化生における胃 腸分化マーカー遺伝子の発現。第 91 回日本病理学会総会、2002 年 3 月、横浜
 - 3 稲田健一、溝下勤、塚本徹哉、中西速夫 小笠原尚高、山村義孝、城卓志、伊藤誠、立松正衛 胃癌の形質発現におけるホメオボックス遺伝子 *Cdx2* の関与-免疫組織学的検討。第 61 回日本癌学会総会、2002 年 10 月 東京。
 - 4 後藤満雄、稲田健一、塚本徹哉、田中晴就、山村義孝、中村栄男、河合俊彦、下郷和雄、立松正衛 胃癌の形質発現におけるハネート細胞への分化。第 61 回日本癌学会総会、2002 年 10 月、東京。
 - 5 小笠原尚高、塚本徹哉、稲田健一、田中晴就、中西速夫、松本学也、立松恵子、徳増幸子、山村義孝、立松正衛 ヒト胃分離腸上皮化生腺管における *Sox2*、*Cdx1*、*Cdx2* の発現。第 61 回日本癌学会総会、2002 年 10 月、東京。
 - 6 田中晴就、稲田健一、溝下勤、塚本徹哉、池原譲、中西速夫、伊藤誠二、山村義孝、中村栄男、立松正衛 胃型 腸型分化マーカーの発現からみた腸上皮化生。第 61 回日本癌学会総会、2002 年 10 月、東京。
 - 7 Ushuima, T A Genome-wide picture of aberrant methylations in human cancers NIH conference "Epigenetics and human diseases" Bethesda May, 2002
 - 8 Ushuima, T High incidence of OST silencing in human breast cancers and its application to cancer diagnosis using plasma DNA Gordon Research Conference Ventura January, 2003
- B 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

腸上皮化生をモデルとしたマスター遺伝子制御による組織分化の研究

分担研究者 立松 正衛 愛知県がんセンター研究所部長

ヒト胃粘膜に多く見られる腸上皮化生は、従来から胃がんの発生母地になり得ると考えられてきた。近年ではその発生が、ヘリコバクターピロリ菌により惹起されることもわかってきた。しかしその発生のメカニズムは未だ不明であり、どのような遺伝子群が関与しているのかについても良くわかっていない。

A 研究目的

腸上皮化生の発生に、ヒト腸管上皮の発生・分化に関わっている転写因子 Cdx1 および Cdx2 が関与する可能性について検索する目的で、腺管分離法により分離した幽門部腺管を対象に、両者の mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法により検討した。合わせて胃型、腸型のマーカー遺伝子の発現についても調べ、化生の程度と亜型との相関を調べた。

腸上皮化生粘膜での Cdx1 および Cdx2 の発現についてはすでに報告されているが、化生の亜型との関連や、Cdx1 と Cdx2 の発現量の違いに関する詳細な報告は未だない。さらに、胃型、腸型のマーカー遺伝子の発現について同時に調べた報告もこれまでのところ見当たらない。

B 研究方法

本年度は、小腸・大腸粘膜上皮細胞の分化誘導因子である Cdx1 および Cdx2 と、それらにより発現制御を受けているとされる複数の遺伝子に焦点を絞って解析した。

1) 胃癌のため外科的切除されたヒト新鮮胃粘膜より、非腫瘍部幽門部粘膜を採取し、腺管分離法により胃粘膜腺管を単離した。

2) 単離腺管を 95%エタノールで固定し、アルシアンブルー染色を施行後、位相差顕微鏡下で化生の有無と亜型によって腺管を選別した。

3) サンプルより mRNA を抽出後 cDNA を合成し、上記の種々の遺伝子に対する特異的プライマーを用いた半定量的 RT-PCR 法により、遺伝子発現の変化を解析した。

C 研究結果

アルシアンブルー染色に陽性を示す杯細胞と幽門腺を指標にして、胃型、胃腸混合型、腸単独型の腺管により分け、各々に対し定量的 RT-PCR 法により胃型、腸型の分化マーカー遺伝子の発現と Cdx1, Cdx2 遺伝子の発現を比較検討した。胃型マーカー遺伝子としては、MUC5AC, pepsinogen II, histamine H2 receptor を、腸型マーカー遺伝子としては MUC2, villin 2, sucrase-isomaltase, carbonic anhydrase 1, defensin 6 を対象とした。

胃型マーカー遺伝子は、化生の程度が進むにつれて発現が減少し、逆に腸型マーカー遺伝子は増大した。さらに、腺管における腸型細胞の割り合いが増すにつれて、Cdx1, 2 ともに発現の増加が観察された。

D 考察

ヒト胃粘膜における腸上皮化生の発生に、Cdx1, 2 遺伝子の発現が関与している可能性が示唆された。sucrase-isomaltase 遺伝子は小腸特異的に、carbonic anhydrase 1 は大腸特異的に発現すると言われているが、腸上皮化生においてはそのどちらの発現も強く、化生腺管が小腸、大腸のいずれに近いものかは判定できなかった。このことは腸上皮化生を、小腸や大腸といった個々の臓器との類似性に限定するのではなく、正常の発生・分化において Cdx1, 2 遺伝子が支配する領域のあらゆる遺伝子発現か、胃粘膜において異常に起こる現象、と大きく捉えることの重要性を物語っていると思われる。

来年度は、Cdx1 および Cdx2 遺伝子がこれまで検索してきた胃型、腸型マーカー遺伝

子のいずれの発現を制御しているかを明らかにする予定である。また、化生の進行に伴う胃型マーカー遺伝子の発現低下が、いかなるメカニズムによるものかを検索する

E 結論

腸上皮化生の発生における Cdx1 および Cdx2 の関与が明らかとなったが、両者により制御を受けるとされる複数の遺伝子 (villin 2, sucrase-isomaltase, carbonic anhydrase 1) も同時に変化していたことから、より上位に位置すると考えられる未知の分化のマスター遺伝子の存在と関与が推測される。次年度は、それらに直接的に迫る解析が期待される

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Inada, K, Tanaka, H, Nakanishi, H, Tsukamoto, T, Ikehara, Y, Tatematsu, K, Nakamura, S, Porter, E M, and Tatematsu, M. Identification of Paneth cells in pyloric glands associated with gastric and intestinal mixed type intestinal metaplasia of the human stomach, *Virchows Arch*, 439 14-20, 2,001
- 2 Mizoshita, T, Inada, K, Tsukamoto, T, Kodera, Y, Yamamura, Y, Hirai, T, Kato, T, Ioh T, Itoh, M, and Tatematsu, M. Expression of Cdx1 and Cdx2 mRNAs and its relevance to differentiation in the human gastrointestinal mucosa – special emphasis on participation in intestinal metaplasia of the human stomach *Gastric Cancer* 4 185-191, 2,001

2 学会発表

- 1 田中晴就, 稲田健一, 塚本徹哉, 溝下勤, 田中あつさ, 小寺泰弘, 山村義孝, 中村栄男, 立松正衛 腸上皮化生におけるホメオボックス遺伝子 Cdx1, Cdx2 の発現, 第 59 回日本癌学会総会, 2,000 年 9 月, 横浜
- 2 溝下勤, 稲田健一, 田中晴就, 山村義孝, 小寺泰弘, 立松恵子, 城卓志, 伊藤誠, 立松正衛 腸型ヒト胃癌におけるホメオボックス遺伝子 Cdx1, Cdx2 の発現, 第

59 回日本癌学会総会, 2,000 年 9 月, 横浜

- 3 Inada, K, Tanaka, H, Nakanishi, H, Tsukamoto, T, Ikehara, Y, Tatematsu, K, Nakamura, S, Porter, E M, and Tatematsu, M. Identification of Paneth cells in pyloric glands associated with gastric and intestinal mixed type intestinal metaplasia of the human stomach, *International Academy of Pathology*, Nagoya, 2,000 年 10 月, 名古屋

H 知的所有権の取得状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
塚本徹哉、野崎浩二、立松正衛	スナオズミ感染モデルを用いた <i>Helicobacter pylori</i> 感染胃粘膜病変の解析	Helicobacter Research	6	31-36	2002
Kaneda, A, Kamunishi M, Sugimura, T and Ushijima T	Reduced expression of the <i>Insulin-induced protein 1</i> and <i>p41 ARP2/3 complex</i> genes in human gastric cancers	Int J Cancer	100	57-62	2002
Kaneda, A, Kamunishi, M, Yanagihara, K, Sugimura, T and Ushijima, T	Identification of silencing of nine genes in human gastric cancers	Cancer Res	62	6645-6650	2002
Yamashita, S, Furumoto, K, Nobukiyo, A, Kamohara, M, Ushijima, T and Furukawa, T	Mapping of a gene responsible for cataract formation and its modifier in the UPL rat	Invest Ophthalmol Vis Sci	43	3153-3159	2002
Abe, M, Okochi, E, Kuramoto, T, Kaneda, A, Takato, T, Sugimura, T and Ushijima, T	Cloning of the 5' upstream region of the rat <i>p16</i> gene and its role in silencing	Jpn J Cancer Res	93	1100-1106	2002
Cao, X, Tsukamoto, T, Nozaki, K, Tanaka, H, Shimizu, N, Kamunishi, M, Kumagai, T and Tatematsu, M	Earlier <i>Helicobacter pylori</i> infection increases the risk for the <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in <i>Mongolian Gerbils</i>	Jpn J Cancer Res	93	1293-1298	2002
Yuasa, H, Inada, K, Watanabe, H, and Tatematsu, M	A phenotypic shift from gastric-intestinal to solely intestinal cell types in intestinal metaplasia in rat stomach following treatment with X-rays	J Toxicol Pathol	15	85-93	2002
塚本徹哉、野崎浩二、立松正衛	<i>H. pylori</i> 感染動物モデルにおける胃癌発生メカニズム	日本臨床	61	56-60	2003
Miyamoto, K, Asada, K, Fukutomi, T, Okochi, E, Yagi, Y, Hasegawa, T, Asahara, T, Sugimura, T and Ushijima, T	Methylation-associated silencing of <i>heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2)</i> in human breast, colon, lung and pancreatic cancers	Oncogene	22	274-280	2003
Tatematsu, M, Tsukamoto, T, and Inada, K	Stem cells and gastric cancer - role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia	Cancer Sci	94	135-141	2003
Kaneda, A, Takai, D, Okochi, E, Kamunishi, M and Ushijima, T	Methylation-sensitive-representational difference analysis and its application to cancer research	Ann N Y Acad Sci		in press	
Ushijima, T, Watanabe, N, Okochi, E, Kaneda, A, Sugimura, T and Miyamoto, K	Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome	Genome Res		in press	

20020443

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P9の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。