

## 胃を標的とする中・短期発がんモデルの開発

研究分担者 塚本徹哉 藤田保健衛生大学医学部病理診断科 准教授

### 研究要旨

マウスに X 線照射後、大腸分離腺管を用いて、2次元電気泳動法および質量分析計により、発現変動を示すタンパクの同定を試みた。その結果、HMGB1の経時的減少とERMの発現上昇が認められた。ERMは消化管上皮細胞の核に集積した。今後、化学物質による遺伝子損傷刺激後の胃および大腸消化管上皮細胞における反応を、幹細胞領域と分化した腺開口部領域に分けて解析する必要があると考えられた。

### A. 研究目的

*Helicobacter pylori* (ピロリ菌)感染率の低下や治療法の進歩と共に胃がんは減少の一途をたどっている。その一方で、食事の欧米化とともに大腸がんは増加傾向にある。慢性炎症は、種々の臓器で発がんの重要なリスクファクターであることが知られており、活性酸素によるDNA損傷、遺伝子のメチル化等による発現異常が重要な因子であることが明らかとなってきている。しかし、胃あるいは大腸発がん初期過程における遺伝子変異あるいは遺伝子発現異常、さらにはそれに伴う形態変化は未だ明らかではない。そこで、遺伝子障害のごく初期のマーカーを同定するため、遺伝子損傷刺激に対して大きな変動を示すタンパクの同定を試みた。

### B. 研究方法

12日齢および7週齢の正常雌雄マウスに X 線照射し、照射後 6、24、72 時間後の小腸および大腸陰窩における遺伝子発現変化を検討した。大腸陰窩を 30mM EDTA in Hanks' Balance solution にて腺管分離を行い、PAXgene Tissue container (QIAGEN)を用いて、分離腺管の固定を行った。大腸分離腺管から蛋白質を抽出し、得られた可溶性蛋白質を二次元電気泳動法により分離した。蛍光色素で染色後、イメージスキャナーで得られたゲル内の全スポットを非照射群(0 hr)と照射群(6 hr)、あるいは照射後 24hr と 72 hr で比較した。発現量に差異のあるスポットから蛋白質成分を抽出・酵素 (Lys-K) 処理後、MALDI-TOF/TOF タンデム質量分析計によって解析し、ProteinPilot Software 3.0 を用いたデータベースサーチにより、X 線照射によって発現量の増加あるいは減少するタンパクの同定を試みた。

同定されたタンパクの検証のために Western blot を行った。1 次抗体として、rabbit anti-high mobility group protein B1 antibody (Sigma)、rabbit anti-Ezrin/Radixin/Moesin polyclonal Antibody (Cell Signaling Technology)、rabbit anti-Phospho-Ezrin (Thr567)/Radixin (Thr564)/Moesin (Thr558) (41A3) mAb (Cell Signaling Technology)を用いた。2 次抗体およびシグナルの同定には、Amersham ECL Plus

Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Life Science)を用いた。得られたシグナルは、densitometer で計測後、GAPDH 発現量を内部標準として定量的に判定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月文部科学省告示)及び藤田保健衛生大学動物実験取扱規定を遵守し、同大学動物実験委員会の承認のもとに遂行した。

### C. 研究結果

12日齢雌雄大腸分離腺管を用いた検討では、0時間と6時間で比較して変動するものとして、spectrin, elongatin factor 2, catenin delta-2, chloride intracellular channel protein 1, high mobility group protein B1, carbonic anhydrase 1, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1が得られた。また、24時間と72時間で比較した場合は、spectrin, elongatin factor 2, chloride intracellular channel protein 1, high mobility group protein B1, carbonic anhydrase 1, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1, ezrin /radixin/moesin (ERM)が大きな変動をしめした。0, 6, 24, 72時間と経時的には、catenin delta-2, spectrin, ERM, carbonic anhydrase 1の増加、chloride intracellular channel protein 1, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1の減少が窺われた。また、HMGB1は、発現量が低下あるいは脱リン酸化されていると判断された。

更に、経時的な発現変動をWestern blottingにて、検討した。12日齢マウスの大腸分離腺管におけるHMGB1の相対値は0時間を $1.00 \pm 0.18$  (Ave $\pm$ SE)とすると、6, 24, 72時間では、 $0.52 \pm 0.21$ ,  $0.22 \pm 0.07$ ,  $0.28 \pm 0.07$ と、経時的に減少することが証明された(0 vs. 24 hr, 0 vs. 72hr,  $P < 0.05$ , One Way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)。一方、増加するものとして、抗ERM抗体が利用でき、大腸陰窩では、0時間を $1.00 \pm 0.91$ とすると、6, 24, 72時間では、 $0.00 \pm 0.00$ ,  $0.41 \pm 0.19$ ,  $14.92 \pm 6.12$  (0 vs. 72hr,  $P < 0.05$ , One Way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)と増

加が見られた。また、小腸上皮においても、0時間を1.00±0.14とすると、6, 24, 72時間では、0.00±0.00、1.99±0.47、7.05±2.14と上昇した(0 vs. 72hr,  $P < 0.05$ , One Way ANOVA with Tukey's multiple comparison test)。

ERM抗体を用いて免疫組織学的に検討すると、X線照射6時間後には、ERMの大腸および小腸陰窩および絨毛上皮細胞の核への集積が見られた。

## D. 考察

大腸陰窩腺底部のいわゆる幹細胞領域では、恒常的にp53 mRNAが発現しており、X線照射によって、p53タンパクの発現誘導と、同部でのp21 mRNAの発現誘導がおこることを明らかにしてきた。通常の病理検体を用いて検索する場合、タンパク量の大きな変動が同定できれば、免疫組織学的に容易に検索が可能である。また、タンパクの解析により、翻訳後修飾の変化も同定できる。そこで、大腸分離腺管からタンパクを抽出し、2次元電気泳動を行って、X線照射によって誘導されるタンパク発現量の変動を検討した。経時的に減少するタンパクとしてHMGB1が、増加するタンパクとしてERM (ezrin/radixin/moesin)ファミリーが同定された。

HMGB1は、核内に存在しDNAに結合する転写制御因子であり、p53やNF- $\kappa$ Bなどの転写因子の機能発現に重要な役割を果たしている。一方、活性化した樹状細胞や壊死細胞から細胞外に放出されて他の細胞のToll-like receptorにリガンドとして作用することも知られている。今回のデータでは、HMGB1がX線照射によって減少するが、遺伝子障害に対するHMGB1の役割の更なる解明が必要と考えられた。

ERMファミリータンパクは、細胞膜直下に存在して、リン酸化を受けることにより、helical domainがはずれて、N末のFERMというドメインを介して、ICAM, CD44等の接着分子に結合し、細胞外刺激をアクチンフィラメント伝達する働きをしている。ヒト骨肉腫細胞を用いた解析では、非リン酸化ezrinは細胞質に存在するが、Tyr354がリン酸化されると細胞質および核に移行し、Thr567がリン酸化されると細胞質から細胞膜に移行することが知られており、ezrinが高発現する腫瘍では予後不良であると報告されている。X線照射に対する反応については、不明な点が多いが、本研究では、核への強い集積が見られており、遺伝子障害に対する応答とERMの核移行について、更なる検討が必要であると考えられた。

## E. 結論

マウス大腸分離腺管を用いて、遺伝子障害刺激に対する応答を検出できるマーカーとして、HMGB1とERMが同定できた。今後、化学物質による遺伝子損傷刺激後の胃および大腸消化管上皮細胞における反応を、幹細胞領域と分化した腺開口部領域に分けて解析する必要があると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsubara, S., Takasu, S., Tsukamoto, T., Mutoh, M., Masuda, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y. Induction of glandular stomach cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int J Cancer* 130: 259-266, 2012.
- 2) Jiang, J., Cao, D., Tsukamoto, T., Wang, G., Jia, Z., Suo, J., Cao, X. Anticancer effects of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) against SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *Oncol Lett* 5: 1562-1566, 2013.
- 3) Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M. Helicobacter pylori infection and gastric carcinogenesis in rodent models. *Semin Immunopathol* 35: 177-190, 2013.

## 2. 学会発表

- 1) 塚本徹哉, 水谷泰嘉, 下條尚志, 広川佳史, 熊澤文久, 桐山諭和, 浦野誠, 叶春霖, 黒田誠. 放射線照射によるマウス大腸陰窩幹細胞領域特異的な遺伝子発現変動. 第101回病理学会総会. 2012年4月. 東京.
- 2) 塚本徹哉. 放射線照射によるマウス大腸陰窩幹細胞領域特異的な遺伝子発現変動. 第31回分子病理学研究会. 2012年7月. 恵那市.
- 3) 塚本徹哉, 下條尚志. 遺伝子損傷刺激に対するマウス大腸陰窩上皮の応答: X線照射に対する反応. 第27回発癌病理研究会. 2012年8月. 伊豆市.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし。