

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

慢性炎症によって誘導される初期遺伝子異常のマーカーとして γ -H2AX の有用性を検討した。N-methyl-N-nitrosourea を投与したマウスに、*Helicobacter pylori* を感染させると γ -H2AX の発現が上昇する傾向が見られた。ヒト胃癌症例では、その胃型・腸型形質発現と比較検討すると胃型形質の欠失とともに γ -H2AX の発現が上昇する傾向が見られた。持続する慢性炎症によって腸型化が進行し、同時に種々の遺伝子異常が蓄積する可能性が示唆された。

A. 研究目的

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になってきている。胃では、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*, ピロリ菌) 感染は胃発がんのリスクファクターであることが疫学的にも実験的にも証明されている。しかし、胃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明らかにされていない。近年、*H. pylori* 感染に伴って、本来、B リンパ球のクラススイッチに必要な activation-induced cytidine deaminase (AID) が異所性に発現し、遺伝子変異を誘発することが明らかになってきた。また、変異部位においては、AID とともに Ser139 がリン酸化されたヒストン H2AX (γ -H2AX) がフォーカスを形成し、*H. pylori* 感染による炎症に伴って発生する活性酸素による DNA 損傷でも γ -H2AX の発現が誘導される。本研究では、マウスおよびヒト胃癌において γ -H2AX の発現を検討し、初期遺伝子変異のマーカーとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

(1) マウス実験：

5 週齢オス C57BL/6 マウスに 120 ppm N-methyl-N-nitrosourea を飲水投与(MNU 群)し、*H. pylori* 感染(Hp)群、10%食塩食(NaCl)群、それらの複合群を設け実験第 40 週で屠殺した。MNU 群、MNU + Hp 群、MNU + NaCl 群、および MNU + Hp + NaCl 群において発生した腺癌を用いた。パラフィンブロックを 3 μ m で薄切し、脱パラフィンし、抗原賦活化後、rabbit polyclonal 抗ヒト γ -H2AX 抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)で反応後、Ventana 自動免疫染色装置(Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ)を用いて免疫染色を行った。 γ -H2AX の腫瘍内での発現の割合に応じて score 0~3 の 4 段階にスコアリングした (score 0=0-5%、score 1=6-33%、score 2=34-66%、score 3=67-100%)。Graphpad Prism ver. 6 (Graphpad Software, La Jolla, CA)を用いて統計的に解析し、 $P < 0.05$ を有意と判定した。

(2) ヒト実験：

ヒト胃腫瘍においても γ -H2AX の発現を評価し、胃型・腸型形質発現との関係を検討した。MUC5AC あるいは MUC6 陽性の腫瘍を胃型、MUC2 あるいは CD10 陽性のものを腸型、胃型および腸型マーカーのいずれもが陽性のものを胃腸混合型、いずれのマーカーも陰性のものをヌル型と判定した。マウス実験と同様に 4 段階にスコアリングし統計的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、動物の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議、2006 年)を遵守し遂行した。ヒト検体については、インフォームド・コンセントの得られた検体を用い、個人情報特定できないような配慮をした。

C. 研究結果

(1) マウス実験：

マウス腫瘍では、それぞれのスコアの平均値 \pm SE は、MNU 群 0.80 ± 0.20 に対して、MNU + Hp 群、MNU + NaCl 群、および MNU + Hp + NaCl 群では、それぞれ、 2.00 ± 0.71 、 1.80 ± 0.49 、 2.20 ± 0.37 といずれも上昇傾向にあった(Kruskal-Wallis test, $P=0.15$)。マウス胃癌では *H. pylori* 感染とそれによる炎症によって γ -H2AX 発現が増加する傾向が見られた。

(2) ヒト実験：

ヒト胃癌では、胃型 + 胃腸混合型では、 γ -H2AX の score 1+2、score 3 がそれぞれ 10 例、0 例に対して、腸型 + ヌル型では、それぞれ 10 例、5 例と、胃型を喪失した後の方で γ -H2AX 強発現症例が増加する傾向が見られた (Fisher's exact test, $P=0.06$)。ヒト胃では、*H. pylori* 長期感染によって徐々に胃型粘膜が腸型へ移行することが明らかになっている。本研究結果では、胃癌の進展に伴って胃型形質の欠失が起こり、同時に遺伝子変異の蓄積によって、 γ -H2AX 発現が増加することが示唆された。

D . 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

E . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Asada, K., Ando, T., Niwa, T., Nanjo, S., Watanabe, N., Okochi-Takada, E., Yoshida, T., Miyamoto, K., Enomoto, S., Ichinose, M., Tsukamoto, T., Ito, S., Tatematsu, M., Sugiyama, T., Ushijima, T. FHL1 on chromosome X is a single-hit gastrointestinal tumor-suppressor gene and contributes to the formation of an epigenetic field defect. *Oncogene* 32: 2140-2149, 2013.
- 2) Fang, J., Seki, T., Tsukamoto, T., Qin, H., Yin, H., Liao, L., Nakamura, H., Maeda, H. Protection from inflammatory bowel disease and colitis-associated carcinogenesis with 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) involves suppression of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Carcinogenesis* 34: 2833-2841, 2013.
- 3) Niwa, T., Toyoda, T., Tsukamoto, T., Mori, A., Tatematsu, M., Ushijima, T. Prevention of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancers in Gerbils by a DNA Demethylating Agent. *Cancer Prev Res (Phila)* 6: 263-270, 2013.
- 4) Nojiri, A., Toyoda, T., Tanaka, T., Yoshida, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T. Inflammation enhanced X-irradiation-induced colonic tumorigenesis in the Min mouse. *Asian Pac J Cancer Prev* 14: 4135-4139, 2013.
- 5) Toyoda, T., Tsukamoto, T. (equal contributors), Yamamoto, M., Ban, H., Saito, N., Takasu, S., Shi, L., Saito, A., Ito, S., Yamamura, Y., Nishikawa, A., Ogawa, K., Tanaka, T., Tatematsu, M. Gene expression analysis of a *Helicobacter pylori*-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model: identification of CD177 as a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 13: 122, 2013.
- 6) Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M. *Helicobacter pylori* infection and gastric

carcinogenesis in rodent models. *Semin Immunopathol* 35: 177-190, 2013.

- 7) Okochi-Takada, E., Hattori, N., Tsukamoto, T., Miyamoto, K., Ando, T., Ito, S., Yamamura, Y., Wakabayashi, M., Nobeyama, Y., Ushijima, T. ANGPTL4 is a secreted tumor suppressor that inhibits angiogenesis. *Oncogene* 33: 2273-2278, 2014.
- 8) Tsukamoto, T., Tatematsu, M. Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Neoplasia. *Curr Infect Dis Rep* 16: 402, 2014.

2 . 学会発表

- 1) Tsukamoto, T., Toyoda, T., Kiriya, Y., Tatematsu, T. Gene expression analysis of a *Helicobacter pylori*-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model: Identification of CD177 as a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. 4th JCA-AACR Special Joint Conference on The Latest Advances in Gastric Cancer Research. Dec., 2013. Maishima
- 2) 桐山諭和、豊田武士、山本昌美、立松正衛、塚本徹哉 . *N*-methyl-*N*-nitrosourea 誘発マウス腺胃発癌モデルにおける *Helicobacter pylori* 感染と高食塩食による遺伝子発現変動 . 平成 25 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ . 個体レベルからみた炎症とがん-がん発生・進展における個体内相互作用 . 2014 年 2 月 . 大津

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

F.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。