

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

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染による慢性炎症は、様々な遺伝子異常や発現異常を誘発し、胃発がんに至る。本研究では、【実験1】ラットに種々の発がん物質を暴露し、胃粘膜の γ -H2AX の応答を短期的に検討した。その結果、幽門腺、胃底腺とも、Control 群に対して、既知の胃発がん物質である N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 投与群で有意に γ -H2AX 発現細胞の増加があったが、間接発がん物質であり胃発がん性の報告がない 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) においても胃底腺領域で γ -H2AX 発現細胞数の上昇が見られ、DMAB の胃発がん性の検討が必要と考えられた。【実験2】ヒト胃癌における γ -H2AX 発現の検討では、p53 が正常(low)のものでは γ -H2AX low (反応性低下) が多く、p53 が異常のものでは γ -H2AX high (反応性良好) が多く ($P < 0.001$, Fisher's exact test)、 γ -H2AX と p53 の異常は比較的独立的に発生していると考えられた。さらに、両者に変異や発現異常が生じると単独の異常よりも予後が悪化するというデータが得られた。以上のことから、(1) γ -H2AX の DNA 損傷刺激に対する短期の応答は臓器特異的な発がん性のスクリーニングに有用である可能性があること、(2) γ -H2AX には p53 と同様ながん抑制遺伝子としての役割があり、その両者の異常によって発がんに促進的に働くことが示唆された。

A . 研究目的

Helicobacter pylori (*H. pylori*) 感染は胃発がんの重要なリスクファクターであり、慢性炎症に伴う活性酸素による DNA 損傷、遺伝子のメチル化等による発現異常等が重要な要因と考えられている。DNA 損傷によって、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するが、発がん初期応答から発がんに至る過程における γ -H2AX の役割は十分解明されていない。本研究では種々の発がん物質を暴露したラット胃粘膜上皮での γ -H2AX の発現を検討した。また、ヒト胃癌を用いて γ -H2AX とがん抑制遺伝子 p53 の発現と予後を検討した。

B . 研究方法

【実験1：ラット】

平成27年度吉見班多施設共同研究において名古屋市立大学・鈴木周五博士がラットで行った実験の胃組織を用いて胃発がん性の検討を行った。すなわち、6週齢オス F344 ラットに、5 mg/kg 体重 N-methyl-N-nitrosourea (MNU)、5 mg/kg 体重 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)、2 mg/kg 体重 dimethylnitrosamine (DMN)、5 mg/kg 体重 1,2-dimethylhydrazine (DMH) を週5回×4週間強制胃内投与した。MNU は直接発がん物質であり、DMAB、DMN、DMH は間接発がん物質である。また、対照群には水を投与した。実験第28日に屠殺し、胃組織を採取し、胃体部前庭部境界部の一部よ

り total RNA を抽出し、残りをホルマリン固定し、パラフィン切片を作製した。Hematoxylin eosin (HE) 染色および γ -H2AX (抗 rabbit polyclonal 抗体、Cell Signaling Technology) 免疫染色を施行し、胃底腺、幽門腺領域に関して、腺管あたりの γ -H2AX 陽性細胞数をカウントした。また、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) を内部標準にヒストン H2AX (h2afx)、p53 に応答する分子として p21waf1、幽門腺領域の pepsinogen として pepsinogen c (pgc)、胃底腺領域の pepsinogen として pepsinogen a5 (pga5) の遺伝子発現の変化を SYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kits, QIAGEN) を用いて定量的 RT-PCR 法により検討した。PCR primer の配列は以下の通りである。gapdh (forward: CTACTGGCGTCTTCACCACCAT; reverse: TTGTCATATTTCTCGTGGTTCACACCCAT)、h2afx (forward: GGGCCTAGCTATCCCTCTCCCT; reverse: CTGCAAAAGTTCCAGTTCAGAAGCCAGA)、p21waf1 (forward: CACACAGGAGCAAAGTATGCCGTCGTC; reverse: TGGCGAAGTCAAAGTTCACCGTT)、pgc (forward: GTGCCACCACCGCCTTGCCAG; reverse: TGCCCACCGTTAGACCCCTG)、pga5 (forward: ACCTACCCAGTGCCAGCCAGT; reverse: ATCAAACACGGTGAAGTACAGCCTCAGGA)。数

値は Kruskal-Wallis test および Dunn's multiple comparisons test により統計学的に解析した。P<0.05 を有意と判断した。

【実験 2：ヒト胃がん】

ヒト胃がん 160 例について、胃がんブロックより直径 8mm のパンチ生検用器具を用いがん部分を採取し、合計 18 個の 5x2 組織アレイを作製した。臨床病理学的因子、術前化学療法 (neoadjuvant chemotherapy, NAC) の有無、胃型・腸型形質発現、 γ -H2AX、p53、Ki-67 の免疫組織学的発現との関係を検討した。 γ -H2AX は、腫瘍の 10%以上が陽性の場合：high (正常) 10%未満の場合：low (異常：反応性低下) と判定した。p53 は、正常組織と同様程度で増殖細胞で弱陽性のもの (腫瘍の 5%未満) を score 0、腫瘍の 33%以下で陽性のものを score 1、34-66%を score 2、67%以上を score 3A とした。Ki-67 値が高く強い増殖性を示すが p53 染色性が見られないものは nonsense mutation や homozygous deletion を考え score 3N とした。Score 0, 1 を p53low (正常) score 2, 3A, 3N を p53high (異常：蓄積あるいは欠失) とした。Ki-67 は、腫瘍の 50%以上が陽性の場合：high、50%未満の場合：low と判定した。胃型腸型マーカーとして、MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10、CDX2 の発現を検討した。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(G) および腸型(I)マーカーのいずれもが陽性のものを胃腸混合型(GI)、いずれのマーカーも陰性のものをヌル型(N)と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、藤田保健衛生大学医学部倫理審査委員会の承認を得、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。

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) 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

【実験 1：ラット】

ラット胃底腺、幽門腺の増殖帯における 1 腺管あたりの γ -H2AX 陽性細胞数を計測した。Control 群、DMAB 群、MNU 群、DMN 群、DMH 群それぞれで、幽門腺領域では、 1.10 ± 0.52 、 1.66 ± 0.53 、 2.54 ± 0.33 、 1.42 ± 0.34 、 1.26 ± 0.35 個/腺管 (AVE \pm SD) と MNU 群 (P<0.01) で γ -H2AX 陽性細胞数の有意な上昇があった。胃底腺領域では、 1.37 ± 0.55 、 2.98 ± 0.94 、 3.26 ± 1.05 、 2.02 ± 0.50 、 2.06 ± 0.69 個/腺管 (AVE \pm SD) と、MNU 群 (P<0.01) のみならず DMAB 群 (P<0.01) でも γ -H2AX 陽性細胞数の有意な上昇が見られた。

各種遺伝子発現の検討では、各群間で有意な差は得られなかった。

【実験 2：ヒト胃がん】

症例の年齢は 31 から 86 才 (中央値 67 才)。男女比 111:49 例。早期がん 23 例、進行がん 137 例。組織像は、分化型 89 例、未分化型 71 例。胃・腸型形質は、胃型 31 例、腸型 47 例、胃腸混合型 59 例、ヌル型 23 例。術前化学療法施行例 56 例、未施行例 104 例であった。

ヒト胃がんにおける γ -H2AX と他の因子の発現の比較の検討では、 γ -H2AX の発現と p53 の染色性を比較すると、p53 が正常(low)のものでは γ -H2AX low (反応性低下) が多く、p53 が異常のものでは γ -H2AX high が比較的多かった (P<0.001, Fisher's exact test)。 γ -H2AX と p53 の異常は比較的独立的に発生していると考えられた。

術前化学療法 (neoadjuvant chemotherapy, NAC) の有無と γ -H2AX 発現を比較した結果では有意な変化は確認できなかった。

細胞増殖との関係では、Ki-67 陽性所見と γ -H2AX の発現傾向は、Ki-67 高値の症例で γ -H2AX high である傾向が見られた。

予後の検討では、 γ -H2AX low (反応性低下) と p53 high (異常：蓄積あるいは欠失) の組み合わせが最も予後が悪かった (Log rank test, P<0.05)。

D . 考察

【実験 1：ラット】

既知の胃発がん物質 MNU (直接発がん物質) により幽門腺、胃底腺領域とも、胃腺管増殖帯で γ -H2AX 陽性細胞の増加が見られ、胃発がん性の報告されていない DMN、DMH では γ -H2AX 陽性細胞の有意な増加はなく予想通りの結果であった。一方、胃発がん性の報告されていない DMAB で γ -H2AX 陽性細胞数増加が確認されたことから、DMAB の胃発がん性の検討を要すると考えられた。

以上の如く、組織学的に γ -H2AX 陽性細胞数を定量的に解析することで、化学物質の発がん性、DNA 損傷性を推測することが可能であった。また、短期アッセイおよび γ -H2AX 陽性細胞数の定量的解析によって、未知の胃発がん性物質のスクリーニングが可能となることが示唆された。

【実験 2：ヒト胃がん】

腫瘍における γ -H2AX 発現の報告では、肝前がん病変からがんに進展するに従って、その発現が増加するとの報告がある一方で、白血病や頭頸部扁平上皮がん H2AX 遺伝子 (*H2AFX*) の存在する染色体 11q23 領域の変異や欠失が起こるとの報告もある。また、*H2afx*(-/-)マウスでは、DNA 二重鎖切断の修復に障害が発生するとの報告もあり、がん抑制遺伝子としての側面を持つと考えられている。

本研究において解析を行った胃がんでは、

γ -H2AX と p53 の異常は比較的独立的に発生しており、両者に変異や発現異常が生じると単独の異常よりも予後が悪化するというデータが得られたことから、初期の DNA 損傷について、 γ -H2AX と p53 経路の両者を検討することが重要であると考えられた。

E . 結論

以上の結果より、(1) γ -H2AX の DNA 損傷刺激に対する短期の応答は臓器特異的な発がん性のスクリーニングに有用である可能性があること。(2) γ -H2AX には p53 と同様ながん抑制遺伝子としての役割があり、それらの異常によって発がんに促進的に働くことが示唆された。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cao D, Jiang J, Tsukamoto T, Liu R, Ma L, Jia Z, Kong F, Oshima M, Cao X. Canolol Inhibits Gastric Tumors Initiation and Progression through COX-2/PGE2 Pathway in K19-C2mE Transgenic Mice. *PLoS One* 2015; **10**: e0120938.
- 2) Tsukamoto H, Mizoshita T, Katano T, Hayashi N, Ozeki K, Ebi M, Shimura T, Mori Y, Tanida S, Kataoka H, Tsukamoto T, Tatematsu M, Joh T. Preventive effect of rebamipide on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2015; **67**: 271-7.
- 3) Cao D, Jiang J, You L, Jia Z, Tsukamoto T, Cai H, Wang S, Hou Z, Suo YE, Cao X. The Protective Effects of 18beta-Glycyrrhetic Acid on Helicobacter pylori-Infected Gastric Mucosa in Mongolian Gerbils. *Biomed Res Int* 2016; **2016**: 4943793.
- 4) Jiang J, Cao D, Jia Z, You L, Tsukamoto T, Hou Z, Suo Y, Wang S, Cao X. The green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate effectively inhibits Helicobacter pylori-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Int J Clin Exp Med* 2016; **9**: 2479-85.
- 5) Kiriya Y, Tahara T, Shibata T, Okubo M, Nakagawa M, Okabe A, Ohmiya N, Kuroda M, Sugioka A, Ichinose M, Tatematsu M, Tsukamoto T. Gastric-and-Intestinal Mixed Intestinal Metaplasia is Irreversible Point with Eradication of Helicobacter Pylori. *Open J Pathol* 2016; **6**, 93-104.
- 6) Toyoda T, Shi L, Takasu S, Cho YM, Kiriya Y, Nishikawa A, Ogawa K, Tatematsu M, Tsukamoto T.

Anti-Inflammatory Effects of Capsaicin and Piperine on Helicobacter pylori-Induced Chronic Gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* 2016; **21**: 131-42.

- 7) Shimoda M, Horiuchi K, Sasaki A, Tsukamoto T, Okabayashi K, Hasegawa H, Kitagawa Y, Okada Y. Epithelial cell-derived a disintegrin and metalloproteinase-17 confers resistance to colonic inflammation through EGFR activation. *EBioMedicine* 2016; in press.
- 8) Tsukamoto T, Kiriya Y, Tatematsu M. Chapter 22 Helicobacter, Laboratory Models for Foodborne Infections, Ed. Liu D, Taylor and Francis, CRC Press, London, UK, 2016, in press.
- 9) 塚本徹哉, 基礎から学ぶ胃がんの病理: 胃粘膜の正常構造・分化に基づいた胃生検診断 (Group分類) へのアプローチ, 日本メディカルセンター, 東京, 2015
- 10) 塚本徹哉, 桐山諭和, 立松正衛, 10. 胃がんと萎縮性胃炎, 腸上皮化生 . I. 胃がん診療に必要な基礎知識 . 特集: 胃がんの診療. 臨牀消化器内科 30, 787-93, 2015

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) 塚本徹哉, 桐山諭和, ヒト胃発がん過程における形質変化と DNA 損傷マーカーの発現. 第 104 回日本病理学会総会, 2015 年, 名古屋
- 2) Kiriya Y and Tsukamoto T, Histological irreversible point with eradication of *H. pylori*: Comparison of gastric and intestinal-metaplastic glands. 第 74 回日本癌学会総会, 2015 年, 名古屋
- 3) Kiriya Y and Tsukamoto T, Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia as an irreversible point with eradication of *Helicobacter pylori* in the human stomach, AACR-JCA 10th Joint Conference, 2016, Lahaina, Hawaii, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし