

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

胃を標的とした化学発がん物質の検出のため、F344 ラットに直接あるいは間接発がん物質を強制胃内投与し、胃粘膜の γ -H2AX の応答を免疫組織学的に検討し、h2afx、p21、幽門腺型 pepsinogen C (pgc)、胃底腺型 pepsinogen A (pga5) mRNA 発現変動を gapdh を内部標準に定量的に解析した。その結果、直接発がん物質である MNNG のみならず、間接発がん物質である PhIP でも胃粘膜増殖帯での γ -H2AX 陽性細胞の有意な増加が確認された。MNNG 投与群では、胃粘膜表層のアポトーシス細胞の有意な増加が見られた。また、MNNG、PhIP 投与群で h2afx mRNA の発現量の有意な低下、MNNG により p21 mRNA の有意な増加を認めた。これらの変化は、DNA 損傷応答と細胞周囲の停止反応によるものと考えられ、それを利用した統計学的解析により、被験化学物質の DNA 損傷性や発がん性を推測できるモデルを構築できる可能性が示唆された。

また、ヒトでは、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染による慢性萎縮性胃炎によって、腸上皮化生の発生の未だ見られない早期から、腸上皮化生の見られる時期まで、 γ -H2AX 陽性細胞数が有意に増加した。また、進行胃がんを Stage 別に検討すると、より進行した Stage III 症例で γ -H2AX の発現の低下した症例で予後不良である事を明らかにした。

A．研究目的

胃発がんにおいて *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染とそれに伴う慢性萎縮性胃炎は重要なリスクファクターである。活性酸素による DNA 損傷や異所性の activation-induced cytidine deaminase (AID) 等の発現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) が二重鎖切断点周囲に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 の免疫染色性と γ -H2AX あるいはその他の遺伝子の発現の変化を検討した。また、*H. pylori* 感染ヒト胃非がん部粘膜での γ -H2AX の発現および進行胃がんを用いて予後を検討した。

B．研究方法

【実験1：ラット】

平成28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、15 mg/kg 体重 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)、5 mg/kg 体重 N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)、10 mg/kg 体重 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)、5 mg/kg 体重 7,12-

dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)を週5回×4週間強制胃内投与した。MNNG は直接発がん物質であり、PhIP, BOP, DMBA 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: CTGCAAAGTTCCAGTTCAGAAGCCAGA), p21waf1 (forward: CACACAGGAGCAAAGTATGCCGTCGTC; reverse: TGGCGAAGTCAAAGTTCACCGTT),

pgc (forward: GTGCCACCACCGCCTTGACAG;
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 : ヒト胃での検討】

H. pylori 非感染および感染ヒト非がん部胃粘膜
について、炎症のない 10 例、炎症はあるが腸上皮化
生のない 8 例、炎症があり腸上皮化生のある症例の
腸上皮化生腺管 17 例と胃型腺管 12 例について 10
腺窩あたりの γ -H2AX 陽性細胞数をカウントした。

ヒト胃がん 137 例について、Stage 別に γ -H2AX
の発現と予後を検討した。 γ -H2AX は、腫瘍の 10%
以上が陽性の場合 : expressed (正常)、10%未満の
場合 : suppressed (異常 : 反応性低下) 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、
PhIP 群、BOP 群、MNNG 群、DMBA 群それぞれ
で、幽門腺領域では、 2.57 ± 0.48 、 3.86 ± 0.38 、
 2.73 ± 0.50 、 4.82 ± 0.55 、 3.33 ± 0.38 個/腺管 (AVE \pm SD)
と PhIP 群 ($P < 0.05$) 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、 2.18 ± 0.25 、
 4.12 ± 0.83 、 2.85 ± 0.44 、 3.28 ± 0.69 、 3.23 ± 0.42 個/腺
管 (AVE \pm SD) と、PhIP 群と MNNG 群 ($P < 0.05$) で
 γ -H2AX 陽性細胞数の有意な上昇が見られた。表層
のアポトーシス細胞は、それぞれ、 0.18 ± 0.12 、
 0.52 ± 0.50 、 0.23 ± 0.05 、 3.58 ± 1.30 、 0.28 ± 0.13 個と
MNNG 群で有意な増加が見られた ($P < 0.005$)。

各種遺伝子発現の検討では、Control 群を 1 とす
ると、PhIP ($\text{Log}_2 = -0.51 \pm 0.17$, $P < 0.01$)、BOP
(-0.71 ± 0.67 , NS)、MNNG (-0.65 ± 0.50 , $P < 0.05$)、
DMBA (-0.71 ± 0.23 , $P < 0.01$) 群で h2afx mRNA の発
現が有意に低下した。また、p21 mRNA の発現をみ
ると Control 群 1 に対して、それぞれ、
 $\text{Log}_2 = 0.18 \pm 0.48$ 、 0.39 ± 0.26 、 0.52 ± 0.26 、 0.13 ± 0.17
と MNNG 群での発現が有意に上昇した ($P < 0.05$)。
Pepsinogen C および A については、各群で有意な

変動は見られなかった。

【実験 2 : ヒト胃粘膜】

ヒト非がん部胃粘膜では、炎症のない症例、炎症
はあるが腸上皮化生のない症例、炎症があり腸上皮
化生のある症例の腸上皮化生腺管と胃型腺管の
 γ -H2AX 陽性細胞数は、それぞれ 2.03 ± 1.33 、
 6.01 ± 4.21 、 7.91 ± 4.80 、 8.44 ± 5.00 個/腺管であり、
H. pylori 感染による慢性萎縮性胃炎の発生ととも
に有意に増加することが明らかとなった ($P < 0.05$)。

予後の検討では、Stage III の症例では γ -H2AX
suppressed (反応性低下) の方が expressed より予
後が悪かった (Log rank test, $P < 0.05$)。一方、Stage
I, II では有意な差は見られなかった。

D . 考察

【実験 1 : ラット】

既知の胃発がん物質 MNNG (直接発がん物質) お
よび大腸あるいは乳腺発がん物質である PhIP によ
り胃腺管増殖帯で γ -H2AX 陽性細胞の増加が見られ
た。一方、胃発がん性の報告されていない BOP、
DMBA 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。胃発がん性の報告されて
いない PhIP で γ -H2AX 陽性細胞数増加が確認され
たことから、その胃発がん性の検討を要すると考え
られた。遺伝子発現の解析では、組織学的に γ -H2AX
陽性細胞数を定量的に計測することで、化学物質の
DNA 損傷性さらにその発がん性の推測が可能であ
り、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。

遺伝子発現の検討では、PhIP、MNNG、DMBA
群で h2afx mRNA の有意な低下が見られ、MNNG
群で p21 mRNA の有意な上昇が観察された。DNA
損傷に伴う細胞周囲の停止が関与している可能性が
示唆された。

【実験 2 : ヒト胃粘膜】

非がん部では、*H. pylori* 感染とそれによる慢性胃
炎の発症とともに γ -H2AX 陽性細胞が有意に増加
した。炎症に伴う活性酸素等の産生や AID の異所性
発現が DNA 損傷を誘発し、胃発がんに寄与する可
能性が示唆された。

一部の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や *H2afx* (-/-) マウスでは
DNA 二重鎖切断の修復に障害があるとの報告もあ
り、がん抑制遺伝子としての側面を持つと考えられ
る。今回の進行胃がんの検討においても、Stage III
などのより進行した症例で γ -H2AX 発現低下症例
の予後が悪い結果であり、発がん後期でのその重要
性が示唆された。

E . 結論

実験動物を用いた γ -H2AX の免疫組織学的定量的解析、h2afx および p21 mRNA 遺伝子発現変動を利用した統計学的解析を行う事で、被験化学物質の DNA 損傷性や発がん性を推測できるモデルが有用である可能性が示唆された。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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: 4943793, 2016.
- 2) Cao, D., Jia, Z., You, L., Wu, Y., Hou, Z., Suo, Y., Zhang, H., Wen, S., Tsukamoto, T., Oshima, M., Jiang, J., Cao, X. 18beta-glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling. Oncotarget 7: 71960-71973, 2016.
- 3) 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 9: 2479-2485, 2016.
- 4) Kiriyaama, 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 6: 93-104, 2016.
- 5) 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 5: 114-124, 2016.

- 6) Toyoda, T, Shi, L, Takasu, S, Cho, YM, Kiriyaama, 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 21: 131-142, 2016.
- 7) Tsukamoto, T, Kiriyaama, Y, Tatematsu, M. Chapter 22. Helicobacter. In: Liu, D, ed. Laboratory Models for Foodborne Infections. London, UK: Taylor and Francis, CRC Press, 2017 (in press).

2. 学会発表

- 1) Kiriyaama, Y., Tsukamoto, T. Gastric-and-intestinal mixed intestinal metaplasia as an irreversible point with eradication of Helicobacter pylori in the human stomach. 10th AACR-JCA Joint Conference, Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics (Maui, HI, USA) 10: 105, 2016.
- 2) 桐山諭和, 立松正衛, 塚本徹哉 H pylori除菌によってどのような病変が改善するのか 胃腺管単位での検討. 日本毒性病理学会講演要旨集 32回: 83, 2016.

H.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。