

博士論文

論文題目 CDX 陰性胃癌への CDX 導入による
胃癌抑制効果の実験的検討

氏名 中山 千恵美

目次

I. 要旨.....	3
II. 序文.....	4
III. 目的.....	12
IV. 方法.....	12
IV-1. 細胞の培養.....	12
IV-2 . Retrovirusの作成.....	13
IV-3. 細胞株へのウイルス感染.....	14
IV-4. CDX蛋白の検出(western blotting).....	15
IV-5. RT-PCRの施行.....	18
IV-6. MTTアッセイ.....	20
IV-7. Senescence-associated β -galactosidase 活性の検出.....	20
IV-8. アポトーシスの検出.....	21
IV-9. フローサイトメトリー.....	23
IV-10. 細胞周期タンパクのWestern blotting	23
IV-11. ヒト胃癌組織検体の選択	25
IV-12. ヒト胃癌組織検体でのHE染色.....	25
IV-13. ヒト胃癌組織検体でのCDX2、CDX1の免疫染色.....	26
IV-14. ヒト胃癌組織検体の腫瘍部における CDX2、CDX1 発現の評価.....	28

IV-15. ヒト胃癌組織検体の背景非腫瘍粘膜のCDX2、CDX1発現の評価.....	30
IV-16. 網羅的遺伝子発現解析.....	31
V.結果.....	32
V-1. CDX蛋白の産生.....	32
V-2. CDX下流遺伝子の発現.....	34
V-3. CDX遺伝子導入後の細胞形態変化と増殖停止.....	36
V-4. ApoptosisとSenescence-associated β -galactocidase活性.....	39
V-5. フローサイトメトリーによる細胞周期解析.....	44
V-6. 細胞周期タンパクの解析.....	45
V-7. 小括(1)	46
V-8. ヒト胃癌組織検体の腫瘍部におけるCDX2、CDX1の発現.....	47
V-9. ヒト胃癌組織検体の腫瘍部におけるCDX2、CDX1の発現傾向.....	52
V-10. ヒト胃癌組織検体の背景非腫瘍粘膜におけるCDX2、CDX1の発現.....	54
V-11. 網羅的遺伝子発現解析法によるCDX導入後の遺伝子発現.....	59
V-12. 小括 (2).....	69
VI. 考察.....	70
VII. 結論.....	76
VIII. 謝辞.....	77
IX. 参考文献.....	79

I. 要旨

胃癌は細胞分化の異常による発癌であるという仮説を検討するため、CDXを発現していない胃癌細胞株 MKN-7 および TMK-1 に *CDX2*・*CDX1* を導入した。CDX 導入後、腸分化マーカーが誘導されると共に、劇的な細胞の形態変化および G0-G1 arrest による細胞増殖停止を生じ、これは腸型形質を喪失した胃癌に腸分化を促すと癌の増殖抑制を生じる現象と考えられた。外科的切除胃癌検体では CDX 発現陰性例は 89 例中 45 例、CDX1 発現陰性例は 59 例、ともに陰性のものは 40 例あり、CDX 陰性胃癌は約半数を占めていることが判明した。CDX 発現陰性胃癌をターゲットとし、腸への分化誘導を介した胃癌治療の可能性が示唆された。

II. 序文

胃癌は日本をはじめ、東アジアで非常に多い悪性疾患である[1]。日本では1999年に肺癌に抜かれるまでは、胃癌は癌死亡数の第1位を占めており、現在も年間約50,000人が死亡している[2]。癌死亡数で2位となった今も、癌罹患率では胃癌は最多であり、癌全体の20%、つまり年間約10万人に胃癌が新たに発生し、男性では第1位、女性でも第2位を占めている[2]。胃癌のリスク要因として、古くから喫煙、高塩食が指摘されていたが[3,4]、1983年に *Helicobacter pylori* (以下 *H. pylori*) が発見されると[5]、1991年に報告された米国の Parsonnet らや Nomura らの疫学的研究から *H. pylori* と胃の発癌の間には強い相関関係が示され、1994年、WHOの癌研究部門(IARC)により胃癌の明確な発がん因子 definite carcinogen (group1)に認定された[6]。また2001年 Uemura らによる前向き研究[7]でも *H. pylori* 感染者は胃癌の発癌リスクが高いということが示された。検診や内視鏡診断技術の向上による胃癌の早期発見やピロリ菌感染率の低下により、胃癌の予後や罹患率は改善しつつあるが[8]、進行胃癌の予後はいまだ不良である。*H. pylori* が排除されずに胃内に定着し持続感染すると萎縮性胃炎へ進行することは判明しているが[9]、胃癌発症のメカニズムの詳細については解明されておらず、進行胃癌には有効な化学療法は少ないのが現状である[10]。

胃癌を発症している胃には腸上皮化生も多く観察されることから[11]、腸上皮化生は前癌病変[12,13]あるいは傍癌病変として注目されてきた[14,15,16]。腸上皮化生とは、胃粘膜上皮細胞が腸管粘膜上皮細胞に類似した細胞に変化することを指し、炎症粘膜の再生過程に生じると考えられている。腸上皮化生は形態学的、あるいは免疫組織学的にそれぞれ 2 種類に分類される。形態学的分類では、正常胃粘膜に存在しない杯細胞、吸収上皮細胞、パネート細胞および腸型内分泌細胞、これら 4 種類の細胞が揃って出現し小腸粘膜に類似する腸上皮化生を完全型腸上皮化生とし、その 4 種類の細胞のうちパネート細胞を欠いて大腸粘膜に類似する腸上皮化生を不完全型腸上皮化生とする[17]。免疫組織学的には細胞の産生する粘液ムチンの性質を利用し、胃腺窩上皮のマーカーである MUC5AC、杯細胞のマーカーである MUC2 の組み合わせにより腸型、胃腸混合型に分類される[18]。完全型腸上皮化生は腸型腸上皮化生と、不完全型腸上皮化生は胃腸混合型腸上皮化生とほぼ同義である。なおこの胃型マーカー MUC5AC および腸型マーカー MUC2 により免疫組織的に胃癌を分類すると、胃癌は胃型、胃腸混合型、腸型、無形質型の 4 つに分類される[19] (表 1-A)。

免疫組織学的手法は、胃癌の発生と背景粘膜との関連の解析に有用である。古くから Correa 仮説に代表されるように、胃癌、とくに分化型胃癌は、表層性胃炎→萎縮性胃炎→不完全型腸上皮化生→完全型腸上皮化生→異型上皮という経過をたどっ

て発生すると考えられてきたが[20,21,22,23,24]、免疫組織学的評価が一般的になり胃型や胃腸混合型を有する分化型胃癌の存在が判明したため、完全型腸上皮化生が胃癌の前癌病変であるとは断言し難くなってきている[25,26]。また、微小胃癌の背景粘膜に存在する化生は 80%が胃腸混合型腸上皮化生であり、しかも必ずしも周囲に腸上皮化生を伴っていなかったとの報告[25]は、腸型の腸上皮化生より胃腸混合型の腸上皮化生が発癌のリスクが高いこと、また腸上皮化生ではなく、腸上皮化生から残存した胃腺管細胞から癌が発生する可能性も示唆している。

本研究に先立ち、2005年～2011年に当院で施行された早期胃癌の内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)による切除検体で組織型が確認できた414例より、単一組織型の検体を選択し免疫組織学的な評価を行った。低分化腺癌(por)および粘液癌(muc)については単一の検体はなく、中分化管状腺癌(tub2)、乳頭腺癌(pap)、印環細胞癌(sig)は単一組織であるが少数であったため、全体の43%を占めるtub1についてはランダムに52例を選択し計77例の早期胃癌の腫瘍部および背景粘膜の形質を評価した。既報のとおり[25]、早期胃癌のうち7例(9.1%)に腸上皮化生を伴わず、背景粘膜は77例中44例(57.1%)が胃腸混合型であり、腸型の背景粘膜は15例にすぎなかった(表1-B)。一方、腫瘍部では胃腸混合型形質は77例中17例(22%)にとどまり、胃型および無形質型が比較的多くみられた(表1-C)。少なくとも早期胃癌では発癌に際し、背景粘膜にはみられていた腸形質がみられない傾向であった。我々は、慢

性的な炎症から腸形質が誘導された胃粘膜において分化の異常が生じ、そこから胃癌が発生している可能性に注目した。

胃の腸上皮化生に関与する重要な遺伝子としては、十二指腸以下でのみ発現している転写因子の *CDX2*、*CDX1* が知られている[27,28]。トランスジェニックマウスの研究では *CDX2*、*CDX1* を強制発現することにより胃に腸上皮化生を生じることも確認され、正常でも、化生という病的な状態でも、腸への分化に重要な因子であることがわかっている[29,30,31,32,33]。*CDX* はヒトの Caudal-type ホメオボックス転写因子で、ショウジョウバエにおけるホメオボックス遺伝子 *Caudal* に相当する。胎生期の胚の前後軸の後方の形成に必須であるが、腸管の発生や分化、維持にも重要な役割を担っている必要不可欠な遺伝子である。ヒトの *CDX* には *CDX2*・*CDX1*・*CDX4* の 3 つのオルソログがあり、胎児期にのみ発現するとされている *CDX4* についての理解は十分ではないが、*CDX2* や *CDX1* については、ノックアウトマウスの研究を通じその機能について多くのことがわかってきている。*CDX2* のホモのノックアウトマウスは胎盤不全のため胎生致死となるが、ヘテロでの検証から、椎骨、肋骨の前方化現象や肋骨の奇形、尻尾の異常や発育障害がみられるほか、腸に円柱上皮と扁平上皮の混在した粘膜からなる過誤腫性ポリープが複数形成されることから、腸管の正常な発生と器官維持に重要な役割を果たしていると考えられている[32,34,35]。*CDX1* のノックアウトマウスはホモも生存可

能で椎骨の前方化現象が起こるが、腸管には形態的な変化をほとんど生じなかった [36]。

また *CDX* は腸の発生分化に際し、多くの腸特異的な遺伝子の発現を制御している。下流の遺伝子は種々報告されているが *CDX2* により誘導される、腸特異的な遺伝子としては、*E-cadherin* [37]、*MUC2*[38,39]、*villin*[40]、*hephaestin*(HEPH) [41]、*sucrase isomaltase*[42]、*guanylyl cyclase C*[43]、*Kruppel-like factor 4* (*KLF4*) [44]、*cytokeratin20* (*KRT20*)[45]などがわかっており、*CDX* の重要性が窺える。

この、正常な腸分化に必須とされる *CDX* 遺伝子が、腸管において癌抑制効果をもつか否かには様々な報告がある。低分化型大腸癌では *CDX2* の発現抑制を認める一群があるとの報告や[46]、大腸癌で *CDX1* が発癌抑制因子である可能性が報告される一方で[47]、癌を抑制しないとの報告もある[48]。胃癌においても *CDX* の発癌抑制効果の有無について肯定的な論文[49,50]、および否定的な論文が散見される[51,52]。否定的な報告として Dang LH らは[51]、*CDX2* が発現している胃癌細胞株 MKN-45 の *CDX2* をノックアウトしたが、細胞培養効率には有意な差はなく、*CDX2* は MKN-45 において腫瘍を抑制しないと主張した。また *CDX2* トランスジェニックマウスでは長期の観察により完全型腸上皮化生を背景に腸型の胃癌が全例で生じたとの報告があり [53]、*CDX* の胃への発現は胃の発癌に寄与するという考えも根強い。

胃癌の組織像は発現形質、背景粘膜の性質からみても多彩であり、胃の発癌機序

について一元的に論じることは困難と考えられるが、われわれは先に述べたように胃癌が胃腸混合型腸上皮化生を背景に生じているとの報告[54,55,56]や、我々の仕事[56]の蓄積から、胃癌は細胞分化の異常から生じる、という仮説についての検討が必要と考えた。そのため胃癌状態であっても腸への分化を誘導すれば癌の増殖が抑えられるのではないかと考えた。

胃癌細胞株には **CDX** が発現していないものが数株あることが知られており[40,57] (表 1-D)、まずは **CDX** 遺伝子をそれらの細胞株に導入発現させることにより胃癌細胞株に腸形質を誘導することによって、細胞の性質変化が生じるかを解析してみることにした。**CDX** を発現していない胃癌細胞株 **TMK-1** に **CDX2** をトランスフェクションにて一過性に発現させ、細胞増殖速度が低下したと報告している論文もあり[58]、われわれは **CDX** 陰性胃癌細胞株にレトロウイルスベクターにより **CDX** を安定導入して持続発現させ、その後の中長期的な変化を解析することにした。

表 1-A:形質による胃癌の免疫組織学的分類

	MUC2 (+)	MUC2 (-)
MUC5AC (+)	胃腸混合型	胃型
MUC5AC (-)	腸型	無形質型

表 1-B:当院早期胃癌 ESD 検体 77 例の背景非腫瘍粘膜の形質

※7 例には化生を認めなかった。MUC5AC+・MUC2- 群に含まれている。

	MUC2 (+)	MUC2 (-)	計
MUC5AC (+)	44 (57.1%)	15 (19.5%)	59 (76.6%)
MUC5AC (-)	15 (19.5%)	3 (3.9%)	18 (23.4%)
計	59 (76.6%)	18 (23.4%)	77 (100%)

表 1-C:当院早期胃癌 ESD 検体 77 例の腫瘍部の形質

	MUC2 (+)	MUC2 (-)	計
MUC5AC (+)	17 (22.0%)	24 (31.2%)	41 (53.2%)
MUC5AC (-)	14 (18.2%)	22 (28.6%)	36 (46.8%)
計	31 (40.2%)	46 (59.7%)	77 (100%)

表 1-D :胃癌細胞株と CDX2、CDX1 の発現

既報での CDX2 および CDX1 の発現について RT-PCR および Western blotting の結果をまとめた。

	NUGC-4	AZ521	Kato-III	SH-10-TC	MKN-7	H-III-TC	MKN-1	MKN-45	MKN-74	TGBC11TKB	KE-39	KE-97	GCIY	HGC-27	HuGI-PI	HuGI-N	AGS	TMK-1	NCI-N87	ECC-10	ECC-12
CDX2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
CDX1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

Ⅲ. 目的

胃癌は細胞分化の異常による発癌であるという仮説を検討するため、CDX 発現のない胃癌細胞株に CDX 遺伝子を安定導入し、腸形質を誘導した際の変化を解析することを目的とした。

Ⅳ. 方法

Ⅳ-1. 細胞の培養

高分化型腺癌(tub1)より樹立されたヒト胃癌由来細胞株 MKN-7[59]、および低分化腺癌(por)より樹立されたヒト胃癌由来細胞株 TMK-1[59] (広島大学大学院医歯薬保健学研究員分子病理学研究所 安井弥先生・大上直秀先生より譲渡)、他、ヒト胃癌由来細胞株 MKN-45、ヒト大腸癌由来細胞株 SW480 は牛胎児血清(Fetal Bovine Serum: FBS)(Gibco by life technologies, Carlsbad, CA)を終濃度 10%、ペニシリン・ストレプトマイシン(Life technologies, Carlsbad, CA) を終濃度 1%になるように加えた Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)で、37°C、CO₂ 5%の環境で培養した。3-4 日毎に培養液を交換した。

IV-2. Retrovirus の作成

CDX2、CDX1 を発現するレトロウイルスベクター (Vesicular stomatitis virus G protein(VSV-G)-pseudotyped, MuLV-based retrovirus vector) を作成するため、MKN-45 胃癌細胞株の逆転写産物より、5'-accctcgccaccatgtacgtg-3' および 5'-tggaattgctctgccgctgca -3' をプライマーとして PCR を施行し CDX2cDNA インサートを、また SW480 大腸癌細胞株の逆転写産物より 5'-ggccaccatgtatgtgggctat -3' および 5'-catggggctatggcagaaactc -3' をプライマーとして PCR を施行し CDX1cDNA インサートを得た。pMXs-IRES-Puro (Cell Biolabs Inc. San Diego, CA) の EcoRI サイトに入れ込むことにより、pMXs-CDX2-IRES-Puro、pMXs-CDX1-IRES-Puro を得た。その後、このプラスミドを用いて、以下のようにウイルス産生を行った。まず、293T gag-pol 細胞 (PLAT-GP 細胞) を、 3×10^6 cells / 100mm プレートへ 1 ウイルスにつき 1 枚まき、その約 2 日後に、プラスミドを細胞に以下のようにトランスフェクションした。

あらかじめ、A 液として各 Vector Plasmid、OPTI-MEM-I (Gibco by life technologies, Carlsbad, CA)、Lipofectamine Plus (Invitrogen by life technologies, Carlsbad, CA)、pCAG-VSVG を混合後室温で 15 分放置し、B 液として OPTI-MEM-I、Lipofectamine Reagent (Invitrogen by life technologies, Carlsbad, CA) を混合した。さらに A 液と B 液を混合して室温で 15 分間放置した。この間に、メディアウムを OPTI-MEM I 5ml に置換した。その後、混合液をプレートに添加し 3 時間後に OPTI-MEM I 5ml with 20% FBS を

5ml 加えた。トランスフェクションの 24 時間後に、上清メディアを回収 (10ml) し 4°C で保存、DMEM(h)+10% FBS の 10ml の通常メディアに戻した。48 時間後にも上清メディアを回収し 4°C で保存、10ml の通常メディアに戻した。72 時間後上清メディアを回収後、すべての上清 30ml をまとめ 0.45 μ m のフィルター (Millipore, Bedford, MA) で濾過し、-80°C フリーザー保存とした。

IV-3. 細胞株へのウイルス感染

細胞株への *CDX2*、*CDX1* 導入はレトロウイルスである VSVG pMXs-*CDX2*-IRES-Puro / VSVG pMXs-*CDX1*-IRES-Puro / VSVG pMXs-IRES-Puro を用いて行った。あらかじめ、ポリブレン (シクアブレン) 原液 (S2667, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) をオートクレーブ済みの精製水に溶かして、10mg/ml に調整した。ポリブレンの使用法は、ポリブレン原液 7.2 μ l を Medium 1ml に希釈し、72 μ g/ml のプレミックスを作成した。これを最後に全メディアの 1/8 量を加えて、終濃度 8 μ g/ml とした。ピューロマイシン原液 (P8833-25MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) をオートクレーブ済み精製水に溶かして 10mg/ml の濃度にして保存した。ウイルス感染を施行する細胞株を 1×10^6 cells/plate の semi-confluent で、10cm large plate 4 枚に撒いた。10cm large plate 1 枚を total 9ml の系とした。作成した VSVG pMXs-*CDX2*-IRES-Puro • VSVG pMXs-*CDX1*-IRES-Puro • VSVG pMXs-IRES-Puro

(空ベクター)はそれぞれ MOI 0.05~0.3 で、1 細胞に 0-1 ウイルス粒子が導入する条件で感染を行い、ウイルスを添加しないコントロールを 1 枚用意した。ウイルス感染では P2 実験室を使用規則に基づいて使用し、ウイルス感染 72 時間経過後より、ピューロマイシン 1.0~1.5 μ g/ml で薬剤選択を開始した。適宜鏡検しながら、細胞の選択状況を確認し、1 日 1 回は培地の交換を行った。MKN-7 についてはウイルス感染の 6 日後、TMK-1 は 10 日後に細胞の形態を確認した上で、1 \times SDS Buffer を用いて蛋白を、ISOGEN(311-02501, NIPPON GENE, Tokyo, Japan)を用いて total RNA を抽出した。

IV-4. CDX 蛋白の検出(Western blotting)

RT-PCR の結果および既報にて CDX2 および CDX1 が発現していないと考えられる胃癌細胞株 TMK-1、MKN-7 の 2 株に IV-3 に示した方法で CDX2、CDX1 および空ベクターを導入した細胞からそれぞれ 10 日目、6 日目に、抽出した蛋白を用いて Western blotting を施行した。細胞は、1 \times SDS Buffer (61.2mM Tris-HCl (pH 6.8), 350mM β -mercaptoethanol, 9.8% glyceol, 2.0% SDS) に溶解し、96 $^{\circ}$ C 10 分で熱変性させた。各 20 μ g の細胞抽出物は、12% SDS ポリアクリルアミドゲルで、電気泳動によって分類し、ニトロセルロース膜 Hybond-ECL (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire HP7 9NA, England)に転写を行った。その後、anti-human CDX2 rabbit 抗体(A300-692A, BETHYL, Montgomery, TX)、anti-human CDX1 rabbit 抗体

(ab88148, Abcam, Cambridge, UK)、anti- β -actin[C4] 抗体 (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) を反応させた。2 次抗体として、CDX2、CDX1 の抗体に対して horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-rabbit IgG goat 抗体 (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、 β -actin に対して horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse IgG goat 抗体 (#A90-216P, BETHYL, Montgomery, TX) を用いた。CDX2、CDX1、 β -actin の特異的なバンドを、イムノスター Zeta (291-72401, Wako, Osaka, Japan) と LAS-4000 mini (Fuji Film, Tokyo, Japan) で検出した。使用抗体を表 2 に一覧にした。

表 2. Western blotting 使用抗体

protein	1 st antibody	Dilution ratio	2 nd antibody	Dilution ratio
CDX2	anti-CDX2(A300-692A,BETHYL)	1:2000	goat anti-rabbit IgG HRP (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology)	1:5,000
CDX1	anti-CDX1(ab88148,Abcam)	1:1000	同上	1:5,000
β -actin	anti-beta actin (c4) (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology)	1:1000	goat anti-mouse IgG HRP (#A90-216P ,BETHYL)	1:10,000

IV-5. RT-PCR の施行

細胞の total RNA は、RNA 分離試薬である ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて抽出した。*CDX2*、*CDX1* および、既報により *CDX2* の下流遺伝子といわれている *LI-cadherin(CDH-17)*、*Cytokeratin20(KRT20)*、*Desmocollin2(DSC2)*、*MUC2*、*Hephaestin (HEPH)*、*Runt-related transcription factor 3(RUNX3)*、*MDR-1(multi-drug resistance gene)*について内因性のコントロールである *GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)*とともに半定量的 RT-PCR で解析した。また後述する *leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5(LGR5)*、*doublecortin-like kinase-1(DCLK-1,or previously known under the symbol DCAMKL-1)*についても同様に RT-PCR を行った。RT-PCR に際しては SuperScript One-step RT-PCR system with Platinum® Taq DNA Polymerase (10928-042, invitrogen by life technologies, Carlsbad, CA)を使用した。プライマーの設計、Annealing 温度、回転数は表 3 の如くである。

表 3. RT-PCR プライマー

遺伝子	順方向(F)、逆方向(R) プライマーシーケンス	Annealing 温度(°C)	サイクル数
<i>CDX2</i>	F:5'-agccaagtgaaaaccaggac-3' R:5'-gctctgcggttctgaaacca-3'	56	35
<i>CDX1</i>	F: 5'-aggacaagtaccgcgtggtcta-3' R: 5'-catggggctatggcagaaactc-3'	62	35
<i>LI-cadherin</i>	F: 5'-tgaaggccaagaaccgagtc -3' R: 5'-ttttgatggggtgaggatcag -3'	58	35
<i>KRT20</i>	F: 5'-acgccagaacaacgaatacc -3' R: 5'-acgaccttgccatccactac -3'	56	31
<i>DSC2</i>	F: 5'-atcatctgcaaaccacca -3' R: 5'-cagcgtaaacaggatgcaaa-3'	56	28
<i>MUC2</i>	F: 5'-agccaccatggggctgccac-3' R: 5'-tctgcaggccgtttagtcg-3'	65	35
<i>HEPH</i>	F: 5'-cacaccatccactttcatgc-3' R: 5'-gatgacggtgagagggtta-3'	60	30
<i>RUNX3</i>	F: 5'-gggcatgctcagctgccttc -3' R: 5'-ccggccatcactggtcttg -3'	64	36
<i>MDR1</i>	F: 5'-gcaaagctggagatcctacca-3' R: 5'-caacatttcattcaacaactcctgc-3'	63	40
<i>LGR5</i>	F: 5'-agtgctgtgcatttgagtg -3' F: 5'-aaagctgcaaaagtgaacg -3'	56	35
<i>DCLK-1</i>	F: 5'-gaggagatggatgtgccaac -3' F: 5'-accagcttcagtgattgc -3'	58	35
<i>GAPDH</i>	F:5'-accacagtccatgccatcac-3' R:5'-tccaccacctgttgctgta-3'	58	24

IV-6. MTT アッセイ

96well plate に MKN-7 および TMK-1 を semi-confluent に撒き、total 225 μ l の系にそれぞれ MOI 0.05~0.3 でレトロウイルスベクターの感染を行い、*CDX2*、*CDX1*、空ベクターを導入した。感染 72 時間後より puromycin で選択を開始し MKN-7 は感染 5 日目までに選択を完了し、感染 6 日目以降 9 日目まで 24 時間 \pm 2 時間ごとに培養液の 1/10 量の Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)を添加しその 4 時間後にジメチルスルホキシド(DMSO)にて析出したフォルマザン結晶を溶解して OD535nm で BioMate3 Series Spectrophotometers (Thermo Scientific, Rockford, IL)により、吸光度を測定した。TMK-1 は感染 3 日目から 7 日目までに puromycin 選択を完了させ、8 日目以降 12 日目まで MKN-7 と同様の手順で MTT アッセイを施行した。結果は 5well 分の平均吸光度を計算し、各々 MTT アッセイ初日値との比にてグラフをプロットした。

IV-7. Senescence-associated β -galactosidase 活性の検出

24 well plate に MKN-7 および TMK-1 を semi-confluent に撒き、total 450 μ l の系で各レトロウイルスを MOI 0.05~0.3 で感染させ *CDX2*、*CDX1*、空ベクターを導入した。感染 72 時間後より puromycin 選択を行い、MKN-7 は感染 6 日後、TMK-1 は感染 10 日後に Phosphate Buffered Saline(PBS)にて洗浄後、4% paraformaldehyde (PFA)で固定し、Senescence Detection Kit(#K320-250, BioVision, Milpitas, CA)を用いて一晩 5-

ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド (X-Gal) で染色した。翌日 Senescence-associated β -galactosidase 活性の有無を位相差顕微鏡観察にて確認した。また陽性コントロールとして、増殖性が有限であるヒト胎児肺由来二倍体繊維芽細胞 WI-38 を 2 か月間継代培養し 30 回ほど分裂が生じた細胞を用いた。

IV-8. アポトーシスの検出

MKN-7 および TMK-1 を 10cm large plate に培養し前述のように total 10ml の系で、各レトロウイルスをそれぞれ MOI 0.05~0.3、1 細胞に 0-1 ウイルス粒子が導入する条件で感染させ *CDX2*、*CDX1*、空ベクターを導入した。72 時間経過後 puromycin による選択を開始し MKN-7 は感染 6 日、TMK-1 は感染 7 日までに選択終了した。MKN-7 は 6 日後、TMK-1 は 7 日後に 0.25%トリプシン/EDTA-PBS(-)で細胞を剥がして遠心回収し、10%ホルマリンで約 1 日間固定した。さらに遠心、上清を除去しアルギン酸ナトリウム法により固化し、パラフィン包埋セルブロックを作成後、2 μ m の薄切切片とした。

TaKaRa In situ Apoptosis Detection Kit (MK500, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) (陽性対照は付属のマウスの乳腺組織)を用いて TUNEL 法による apoptosis 細胞の染色を行った。こちらは染色が予測より微弱であったことを懸念し対比染色は施行しなかった。また、cleaved caspase-3 の免疫染色による apoptosis の評価も行った。Cleaved caspase-3 の免疫染色はパラフィン包埋のセルブロック薄切標本を脱パラフィン化し、

内因性のペルオキシダーゼ阻害を 0.3% H_2O_2 加メタノールに室温で 30 分間反応させた。流水水洗および PBS 浸漬後、抗原の賦活化のため pH6.0 の 10mM citrate buffer に浸して加熱加圧処理をした。冷却後に流水水洗、PBS に浸漬し、1 次抗体 cleaved caspase 3 rabbit-polyclonal(Cell signaling technology) を PBS with 1% bovine serum albumin (BSA)で 100 倍希釈したものを加えて一晩(約 16 時間)反応させた。PBS で 3 回水洗後、2 次抗体としてヒストファインシンプルステイン MAX-PO(MULTI) (424154, ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan) を室温 30 分間で反応させ、PBS で 3 回洗浄、20mg/ml ジアミノベンジジン (DAB) 溶液 150ml に 30% H_2O_2 水を 30 μ l 滴下し、5 分ほど反応させ顕微鏡で発色状態を確認し、流水水洗を行った。対比染色はマイヤーのヘマトキシリンを用いた。70%エタノールを1回、95%エタノールを 2 回、100%エタノールを4回、キシレンを4回順に浸して脱水を施行し、樹脂性封入剤エンテランニュー (KN3321676, メルク, Tokyo, Japan)で封入した。結果は 20 倍の対物レンズを用いてランダムに複数の視野を撮影し、コンピュータ画面上で計約 1000 個に達するまで数視野で、空ベクター群、CDX2 導入群、CDX1 導入群それぞれの染色陽性細胞数と染色陰性細胞数を計測した。apoptosis 細胞の割合を計算し有意差について、母比率の差の検定を行った。

IV-9. フローサイトメトリー

MKN-7 および TMK-1 細胞を 100mm プレート数枚に 1.0×10^6 cells/plate (semi-confluent)になるように準備し、前述IV-3と同様に 10cm large plate 1枚を total 9ml の系で各レトロウイルスをそれぞれ MOI 0.05~0.3 で、1細胞に 0-1 ウイルス粒子が導入する条件で感染させることにより *CDX2*、*CDX1*、空ベクターを導入した。解析のため各細胞数は 20000 個以上用意し 20000 個ずつ解析した。感染 72 時間後から puromycin 選択を開始し、MKN-7 は感染から 6 日目、TMK-1 は感染から 8 日目に回収し、BD CycleTEST plus DNA reagent kit (No.340242, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)を用いて PI 染色をした。その後 FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)を用いて sort した。細胞周期は ModFit LT version 3.0 (Verity Software house, Topsham, ME)により解析した。

IV-10. 細胞周期タンパクの Western blotting

Western blotting にて細胞周期タンパクの解析を行った。手法は前述IV-4と同様であり、使用した抗体については表 4 に一覧を示した。

表 4. 細胞周期タンパクの Western blotting で使用した抗体一覧

protein	1 st antibody	Dilution ratio	2 nd antibody	Dilution ratio
CDK4	anti CDK4 mouse mAb (#2906)	1:1000	goat anti-mouse IgG (BETHYL)	1:10,000 HRP
CDK2	anti CDK2 rabbit mAb (#2546)	1:1000	goat anti-rabbit IgG HRP(sc-2004)	1:5,000
Cyclin D3	anti CyclinD3 mAb (#2936)	1:1000	goat anti-mouse IgG (BETHYL)	1:10,000 HRP
Cyclin B1	anti Cyclin B1 Antibody (#4138)	1:1000	goat anti-rabbit IgG HRP (sc-2004)	1:5000
Cyclin E2	anti Cyclin E2 Antibody (#4132)	1:1000	goat anti-rabbit IgG HRP (sc-2004)	1:5000
Cyclin A2	anti Cyclin A2 mAb (#4656)	1:150	goat anti-mouse IgG (BETHYL)	1:10,000 HRP
p27	p27 Kip1 Antibody (#2552)	1:1000	goat anti-rabbit IgG HRP (sc-2004)	1:5000
p21	p21 Waf1/Cip1 mAb (#2947)	1:1000	goat anti-rabbit IgG HRP (sc-2004)	1:5,000

※1: 1 次抗体はすべて Cell Signaling Technology 社(CST, Danvers, MA) の Cell Cycle Regulation Antibody Sampler Kit #9932 および Cell Cycle Regulation Antibody Sampler Kit II #9870 内のものを使用した。

※2: mAb: monoclonal antibody

IV-11. ヒト胃癌組織検体の選択

検体は、共同研究先である藤田保健衛生大学第一病理学講座に保管されている、外科手術を施行された原発性胃癌よりランダムに選んだ 89 検体を、同大学の倫理委員会の承認を得た上で使用した（藤田保健衛生大学医学部附属病院倫理委員会 11-078）。使用した部位については、腫瘍部の評価には中央部近傍のブロックを選択した。またほとんどが進行胃癌であり腫瘍部の評価のため選択したブロックにはほとんど背景非腫瘍粘膜はなく、背景非腫瘍粘膜の評価には腫瘍部とは別の枝で、腫瘍に近い幽門側のブロックを 89 例で選定し、免疫染色に使用した。

IV-12. ヒト胃癌組織検体での HE 染色

胃癌外科切除検体の腫瘍部および背景非腫瘍粘膜のブロックはそれぞれ 2 μ m 幅で複数枚連続薄切した。プレパラートの脱パラフィン化はキシレン 4 回、100%のエタノールで 4 回、95%のエタノール、70%エタノールで1回ずつ施行し流水水洗した。次にマイヤーのヘマトキシリン液へ 3 分浸漬し、水洗後に PBS へ浸漬、さらに水洗を行った。95%エタノールへなじませ、エオジン液へ 4 分間浸漬、その後 100%エタノールを 6 回、キシレンへ 4 回、順に浸して脱水透徹した後に、樹脂性封入剤エンテランニューで封入した。

IV-13. ヒト胃癌組織検体での CDX2、CDX1 の免疫染色

胃癌外科切除検体の腫瘍部および背景非腫瘍粘膜のブロックはそれぞれ 2 μ m 幅で複数枚連続で薄切した。プレパラートの脱パラフィン化操作はキシレン 4 回、100%のエタノールで 4 回、95%のエタノールで1回にて施行した。次に内因性ペルオキシダーゼ阻止のため、0.3% H₂O₂加メタノールを用いて室温で 30 分間反応させた。流水水洗、PBS 浸漬後、抗原の賦活化のため pH8.0 の 1mM EDTA 溶液に浸して加熱加圧処理をした。十分な冷却後に流水水洗、PBS に浸漬し、1 次抗体を添加し一晚(約 16 時間)反応させた。一次抗体として CDX2 の検出に anti-human CDX2 mouse monoclonal 抗体 (CDX2-88, BioGenex, San Ramon, CA/ BioCare Medical LLC., Concord, CA)を PBS with 1% bovine serum albumin (BSA)で 50 倍希釈(1 μ g/mL 濃度)したものを用いた。CDX1 の検出には MBL 社にて藤田保健衛生大学稲田氏が作成した anti-human CDX1 rabbit 抗体を、PBS with 1% BSA で 300 倍希釈(1 μ g/mL)したものを添加して一晚反応させた。PBS で 3 回水洗後、2 次抗体としてヒストファインシンプレステイン MAX-PO(MULTI) を室温 1 時間反応させ、その後 PBS で 3 回洗浄した。発色は、20mg/ml ジアミノベンジジン (DAB) 溶液 150ml に 30% H₂O₂ 水を 30 μ l 滴下し、顕微鏡で発色状態を確認し、CDX1 は 7 分、CDX2 は 9 分を経たところで流水水洗を行った。対比染色はマイヤーのヘマトキシリンを用いた。脱水から封入は、70%エタノールを1回、95%エタノールを2回、100%エタノールを4回、キシレンを4回

で施行し、樹脂性封入剤エンテランニューでカバーした。免疫染色で使用した 1 次抗体を表 5 にまとめた。

表 5. 免疫染色で使用した抗体

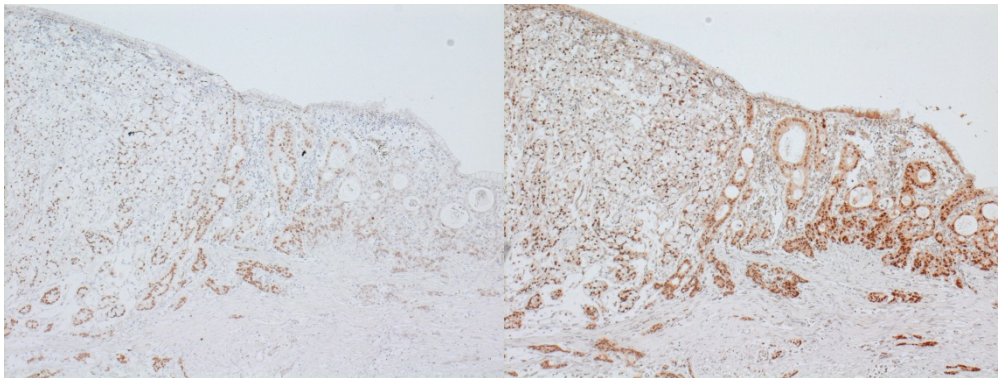
	Antibody	Dilution ratio
CDX2	anti-CDX2[CDX2-88](BioGenex/ BioCare Medical LLC.)	1:50
CDX1	anti-CDX1 rabbit polyclonal antibody(donated from Dr. Inada, Fujita Health University)	1:300

IV-14. ヒト胃癌組織検体の腫瘍部における CDX2、CDX1 発現の評価

胃癌外科切除検体の組織型は混在型が多く、同一病変内に混在している場合は、全体としての染色性を評価したうえで、優位型(一つの標本内で 60%以上)をその検体の組織型として解析を行った。CDX2、CDX1 は核に発現するタンパクであることから細胞質への染色は、非特異的な染色とした。CDX2、CDX1 の癌部における免疫染色の評価としては、癌病変内で染まっている細胞が癌病変全体の細胞に占める面積の割合を1人の病理専門医と2人の消化器内科医で独立して顕鏡して検討した。評価は5段階にわけて行った。強染、すなわち、染色されている面積割合が癌部で90%以上の標本を grade 5 とし、染色されている面積割合が10%以下の標本を grade 1 とした。その間の10%から90%の間の染色性は、10%から30%の染色性が得られたものを grade 2、30%-70%の染色性が得られたものを grade3、70%-90%の染色性が得られたものを grade 4 として評価した。これらの基準に関しては、組織検体の免疫染色の染色性につき概ね同様の検討を行っている、既報を参考にした[56,60]。各々読み終わった後に、討議の上で最終的な染色域の割合を数値化した。なお、次の図1に、数値化の定義と代表的な組織型の写真を示す。

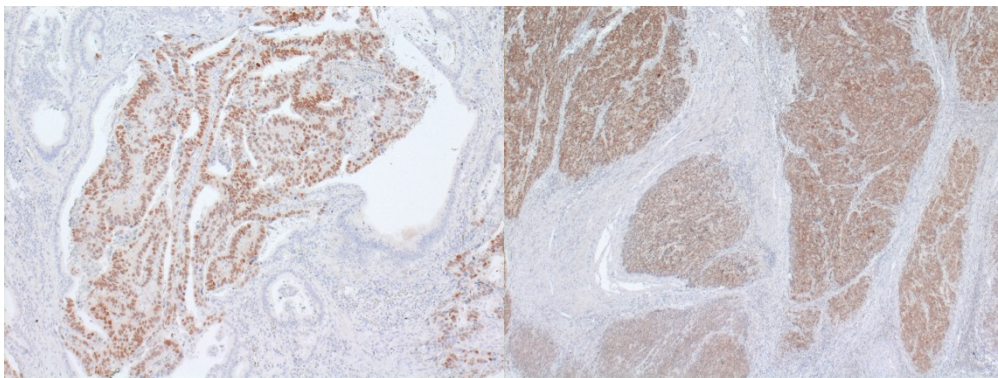
CDX2-grade5

CDX1-grade5



CDX2-grade3

CDX1-grade3



CDX2-grade1

CDX1-grade1

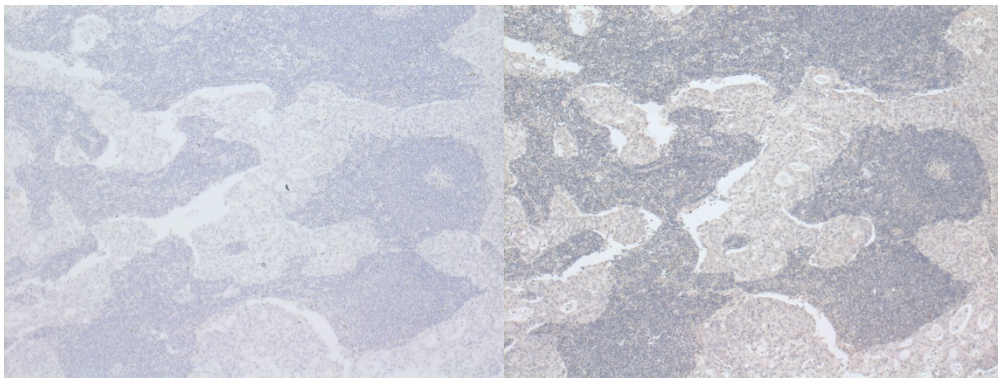


図 1. CDX2、CDX1 免疫染色の染色性評価における代表的な組織写真
CDX2、CDX1 の染色は下記のように分類した。染色 grade が 1・3・5 のものを各々提示する。

grade1: CDX2・CDX1 の免疫染色の染色性が評価面積の 10% 未満。

grade2: CDX2・CDX1 の免疫染色の染色性が評価面積の 10% 以上 30% 未満。

grade3: CDX2・CDX1 の免疫染色の染色性が評価面積の 30% 以上 70% 未満。

grade4: CDX2・CDX1 の免疫染色の染色性が評価面積の 70% 以上 90% 未満。

grade5: CDX2・CDX1 の免疫染色の染色性が評価面積の 90% 以上。

IV-15. ヒト胃癌組織検体の背景非腫瘍粘膜の CDX2、CDX1 発現の評価

背景粘膜についても連続切片による免疫染色にて CDX2 および CDX1 の発現評価を行った。まず HE 染色でプレパラートの非腫瘍部において腸上皮化生の割合を評価後に、CDX2 および CDX1 について腸上皮化生の中で染色されている細胞の割合を、1 人の病理専門医と 2 人の消化器内科医で独立して顕鏡して検討した。CDX2、CDX1 は核に発現するタンパクであることから腸上皮化生部以外の正常部でみられた内分泌細胞や胃底腺主細胞の細胞質への染色は、非特異的な染色とした。また薄い染色のものは CDX 陽性とせず、十二指腸部が含まれるものについては十二指腸部の CDX の染色性を参考にし、同等の染色を呈するものを CDX 陽性と判定した。プレパラート上の非癌部背景粘膜に占める腸上皮化生の割合と、その割合に CDX 陽性細胞の割合を積算したものを CDX index とし、腫瘍部の CDX の染色 grade と合わせて評価した。さらに腫瘍部の CDX 染色 grade が 1 のものを CDX 陰性、grade 2-5 のものを CDX 陽性、背景粘膜の CDX index が 0.1 以下のものを CDX 陰性、0.2 以上のものを CDX 陽性とし、腫瘍部と背景粘膜の CDX 発現パターンを①腫瘍部で CDX 陰性かつ背景粘膜で CDX 陽性のもの、②腫瘍部で CDX 陽性かつ背景粘膜で CDX 陰性のもの、③腫瘍部・背景粘膜ともに CDX を発現しているもの、④腫瘍部・背景粘膜ともに CDX を発現していないもの、と 4 つに分類した。

IV-16. 網羅的遺伝子発現解析

MKN-7 細胞を 100mm プレート数枚に 1.0×10^6 cells/plate (semi-confluent) になるように準備し、前述IV-3のようにレトロウイルスをそれぞれMOI 0.05~0.3で、1細胞に0-1ウイルス粒子が導入する条件で感染させ *CDX2*、*CDX1* および空ベクターを導入した。感染から 6 日目に PBS で洗浄後、RNeasy Plus mini kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands)を利用し細胞からRNAを抽出した。抽出したRNAをアガロースゲル泳動で確認し、濃度測定を行いそれぞれ 10-25 μ g 抽出できたことを確認した。そのRNAを GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affimetrix, Santa Clara, CA)を用いて東京大学先端科学研究センター油谷研究室にて解析した。また pathway 解析には KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway を使用した。

V. 結果

V-1. CDX 蛋白の産生

消化管分化の制御異常が胃癌の発生進展に関連しているという仮説に基づき、CDX の発現していない胃癌細胞株へレトロウイルスベクターを用いて *CDX2*、*CDX1* を導入した。導入された遺伝子の発現の有無の確認は Western blotting で行った。

Western blotting で MKN-7・TMK-1 の CDX 発現陰性と、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入によるタンパク発現を確認した (図 2)。なお TMK-1 は RT-PCR で *CDX2* および *CDX1* のバンドが検出されているが、stop codon などの変異が生じタンパク産生がされていないものと考えられる。また MKN-7 では Western blotting で *CDX1* の薄いバンドがあるように見えるが、RT-PCR では *CDX1* のバンドは検出されていないことからバンドは non-specific なものと考えた。*CDX2* 導入により *CDX1* の発現が得られることはなく、また逆も同様であった。

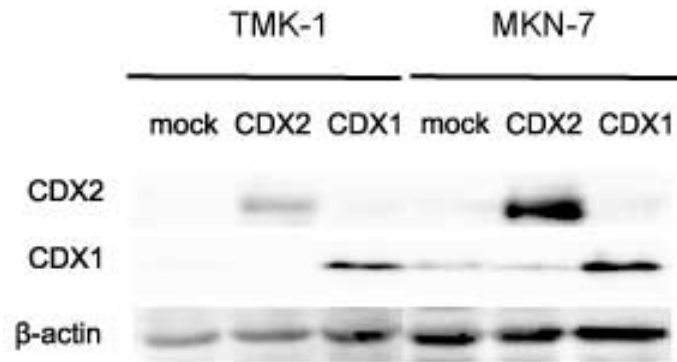


図 2: *CDX* 導入後の *CDX* 蛋白発現状況(Western blotting)

mock: 空ベクター pMXs-IRES-Puro を導入したもの、CDX2: pMXs-CDX2-IRES-Puro を導入したもの、CDX1: pMXs-CDX1-IRES-Puro を導入したものを意味する。MKN-7 は遺伝子導入後 6 日目、TMK-1 は 10 日目の細胞から抽出したタンパクを 20 μ g 使用した。

V-2. CDX 下流遺伝子の発現

CDX 導入後に CDX の下流遺伝子とされている *LI-Cadherin*[37,40]、*KRT20* などについて RT-PCR を施行した(図 3)。CDX 導入に伴い、*LI-cadherin*、*KRT20*、*DSC2* は両細胞に共通して発現が誘導されていた。*HEPH* は TMK-1 でのみ、*MDR-1* は MKN-7 でのみ誘導が確認された。癌抑制遺伝子とされる *RUNX3* は TMK-1 ではわずかに誘導されたが、MKN-7 では *CDX2* 導入により発現が抑制される結果であった。従来から *CDX2* の下流と言われている *MUC2* は今回 *CDX* 導入によって特に発現に差を生じなかった。以上の結果より、レトロウイルスベクターによる *CDX* の導入により外因性の *CDX* が機能し、腸分化マーカーである *LI-cadherin*、*KRT20*、*HEPH*、*DSC2* が誘導されていることが確認できた。すなわちこの *CDX* の強制発現系で胃癌細胞の腸分化促進が起きていることが示唆された。

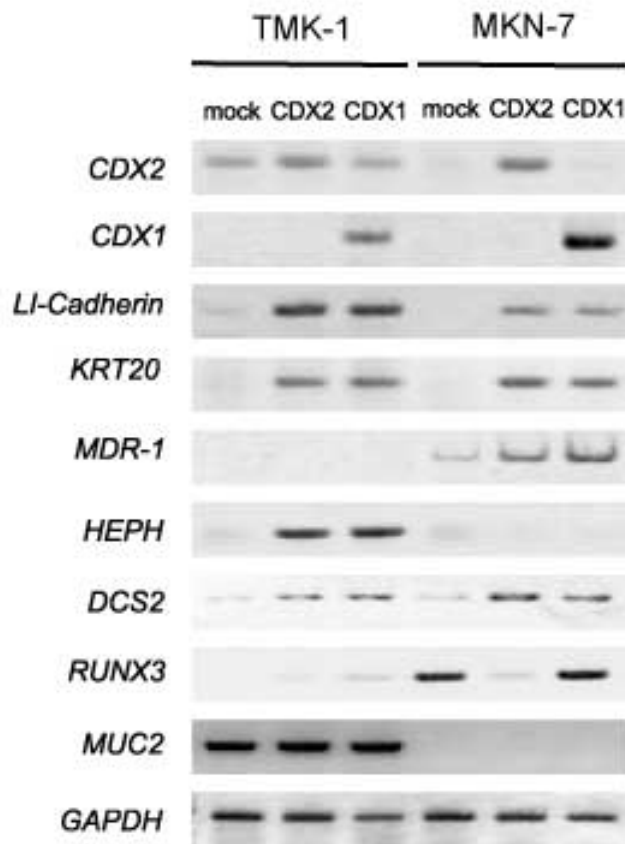


図 3: *CDX* 導入による下流遺伝子の誘導(RT-PCR)

mock は空ベクターを導入したものを指す。MKN-7 は遺伝子導入後 6 日目、TMK-1 は 10 日目の細胞から抽出した RNA を使用した。

V-3. *CDX* 遺伝子導入後の細胞形態変化と増殖停止

MKN-7、TMK-1 胃癌細胞株では *CDX* を導入して約 5 日後以降から、細胞の伸展、平板化が出現し顕著な形態変化が生じているのが観察された(図 4-A)。その際、細胞増殖は時間経過とともに、コントロール細胞に比較して明らかに低下し、増殖停止が生じているように見えた。なお、TMK-1 は MKN-7 に比較し形態変化が出現するタイミングは 2 日ほど遅かった。MKN-7 細胞は *CDX* 導入後 5-6 日目には多くの細胞に形態変化を生じ 8 日目を過ぎると残存している細胞はごくわずかとなっていた。TMK-1 は感染 6 日目頃より伸展化しはじめ、8 日目には形態変化が明らかとなった。TMK-1 においても細胞増殖速度が遅くなっているようにみえたため、両細胞に対し MTT アッセイを施行した。MTT アッセイ初日値との比をプロットしたグラフを図 4-B に示す。両細胞ともに MTT アッセイ開始日より増殖は得られておらず、*CDX* を導入した群で細胞の増殖が停止していることが判明した。形態変化を伴う *growth arrest* であり、不死化能を持っている胃癌細胞が *CDX* 導入による形質転換によって増殖能を失う現象を捉えることに成功したと考えた。

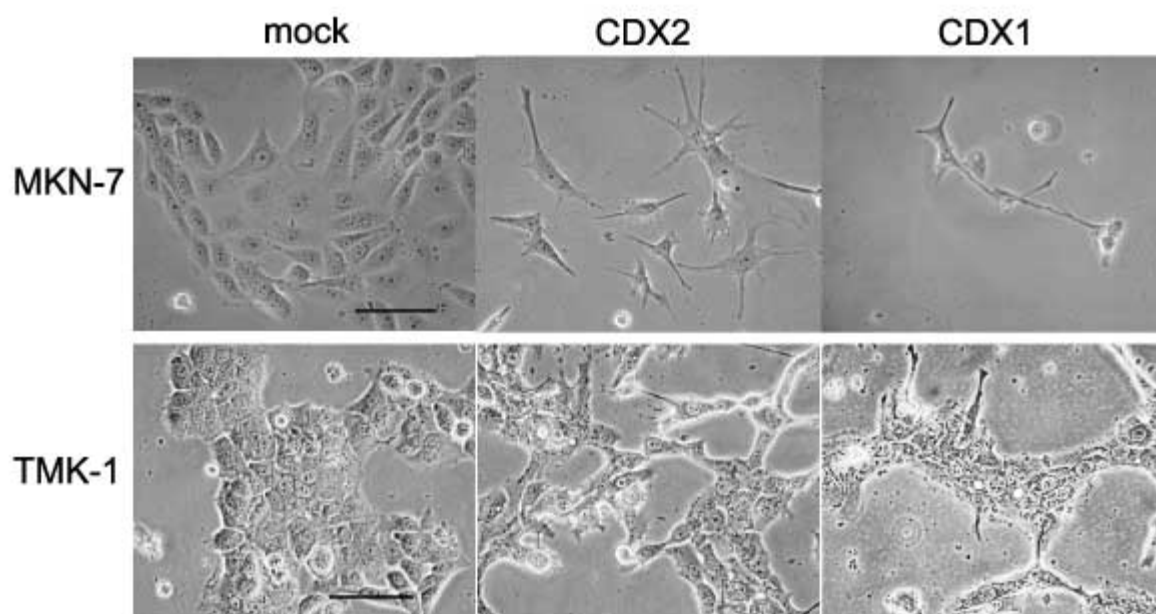


図 4-A: 細胞の形態変化

空ベクター導入細胞(mock)と *CDX2*・*CDX1* それぞれを導入した細胞の形態を示す。MKN-7 は感染 7 日後、TMK-1 は感染 9 日後に撮影した。いずれも mock と比較し伸展平板化している。図内の Bar は 100 μ m を示す。

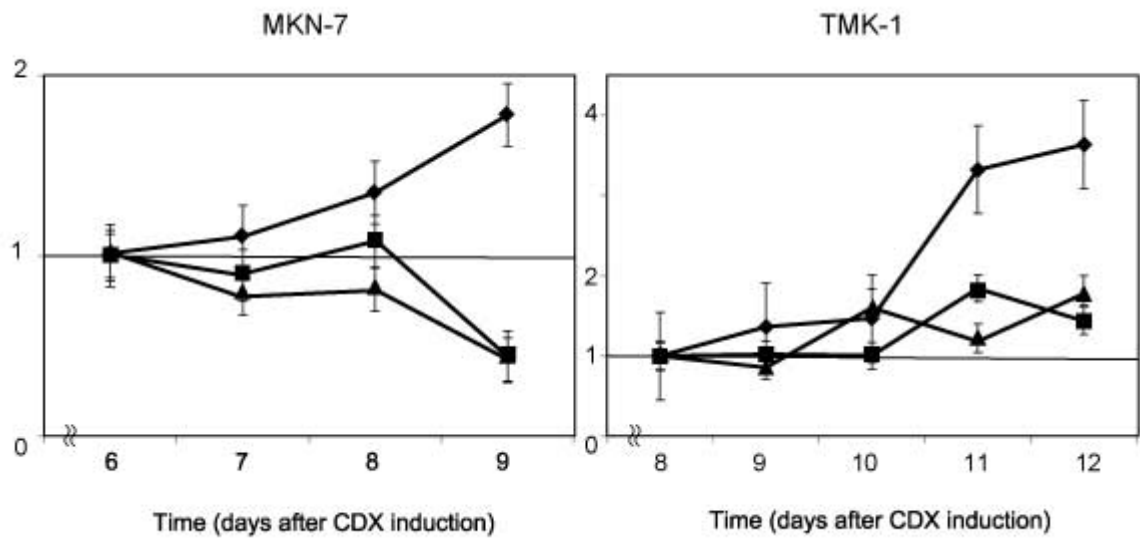


図 4-B: MTT アッセイ

●は pMXs-IRES-Puro、

■は pMXs-CDX2-IRES-Puro、

▲は pMXs-CDX1-IRES-Puro を導入した細胞の吸光度比を示している。

MKN-7 は感染 6 日後、TMK-1 は感染 8 日後より MTT アッセイを施行した。MTT アッセイ初日との吸光度比をプロットした。各 Bar は S.E.(standard error)を示す。MKN-7 は TMK-1 に比較しもともと増殖 speed の遅い細胞である。MKN-7 および TMK-1 のいずれにおいても CDX 導入により増殖停止が生じた。

V-4. Apoptosis と Senescence-associated β -galactocidase 活性

次に細胞死のメカニズムについての解析を施行した。Cleaved caspase-3 で染色した結果を図 5-A に、TUNEL 法で染色した結果を図 5-B に示す。陽性細胞のカウントの結果、cleaved caspase-3 においては TMK-1 で CDX 導入により有意差はなかったものの染色陽性細胞が増加する傾向にあり、MKN-7 では CDX 導入細胞と空ベクター導入細胞で有意差はなく、ほぼ同等の陽性率を示した(表 6-A, B)。TUNEL 法においては TMK-1 で CDX 導入により染色陽性となる細胞が有意に増加し、MKN-7 では CDX 導入による変動はみられなかった(表 6-A, B)。断片化した DNA を検出する TUNEL 法では壊死をはじめとして、偽陽性が出やすく、cleaved caspase 3 の結果が解釈には優先されると考えると、CDX 導入によってアポトーシスの誘導がコントロールより若干増える傾向にあるが増殖停止を起こす細胞のごく一部に過ぎず、アポトーシス経路の活性化は CDX 導入による細胞増殖停止の主要なメカニズムではない可能性が高い。また Senescence 検出実験では MKN-7 および TMK-1 ともに CDX 導入による SA- β -Gal 活性はみられず、急速な細胞の老化による増殖停止ではないと判断した(図 7)。

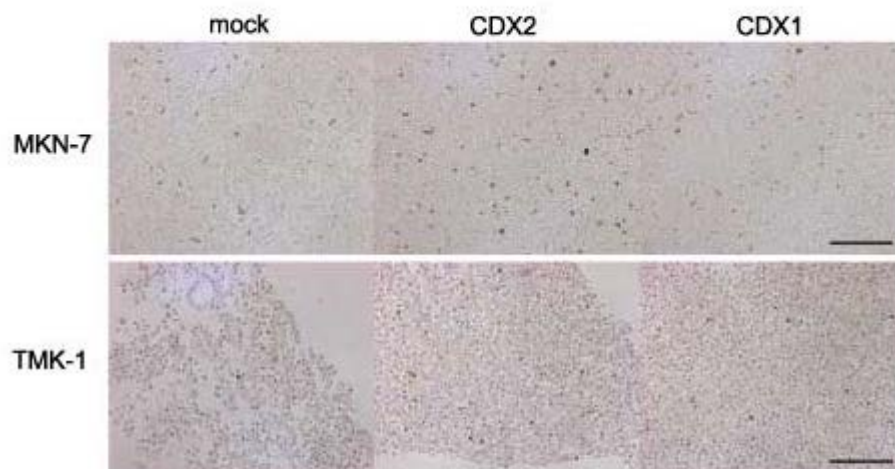


図 5-A : cleaved caspase-3 染色

10 倍の対物レンズで観察した写真を提示する。

カウントは 20 倍対物レンズで撮影した写真を用いて行った。

図内の Bar は 200 μ m を示している。mock は空ベクター導入細胞を指す。

発色は DAB を使用、茶褐色に細胞質が染色したものが
cleaved caspase-3 陽性細胞である。

対比染色はヘマトキシリンにて施行した。

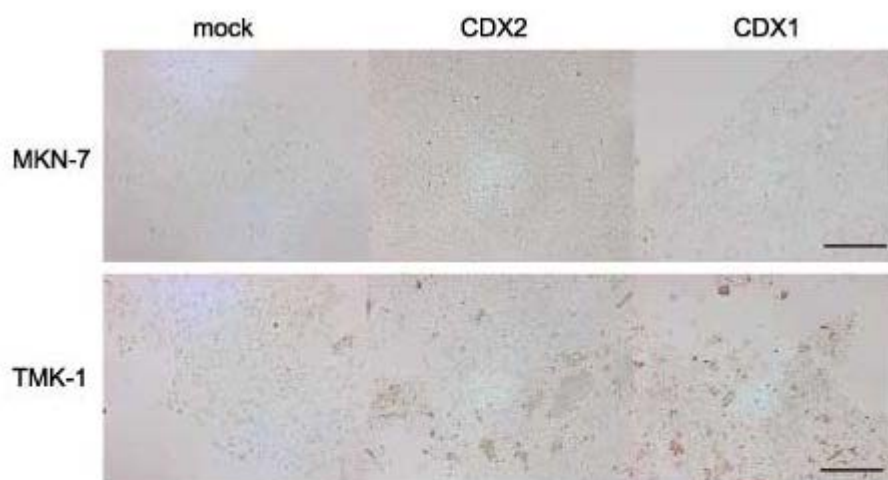


図5-B： TUNEL 法

10 倍の対物レンズで観察した写真を提示する。

カウントは 20 倍対物レンズで撮影した写真を用いて行った。

図内の Bar は 200 μ m を示している。

mock は空ベクター導入細胞である。

発色は DAB を使用、茶褐色に核が染色された細胞が TUNEL 陽性細胞である。

対比染色は施行しなかった。

表 6-A. MKN-7 細胞株における apoptosis 陽性細胞の割合

計約 1000 個カウントした細胞のうち、茶褐色に染色された細胞の割合を mock、CDX2、CDX1 導入細胞ごとに計算し、mock と比較した。MKN-7 では CDX 導入により apoptosis 細胞の明らかな増加はみられなかった。

	陽性細胞数	総細胞数	c-cas-3 陽性率 (%)	<i>P</i>	
MKN-7 mock	83	1266	6.56		
MKN-7-CDX2	67	1065	6.29	0.795	mock と有意差なし
MKN-7-CDX1	92	1323	6.95	0.687	mock と有意差なし

	陽性細胞数	総細胞数	TUNEL 陽性率 (%)	<i>P</i>	
MKN-7 mock	15	1182	1.27		
MKN-7-CDX2	16	1274	1.26	0.977	mock と有意差なし
MKN-7-CDX1	15	1259	1.19	0.862	mock と有意差なし

表 6-B. TMK-1 細胞株における apoptosis 陽性細胞の割合

計約 1000 個カウントした細胞のうち、茶褐色に染色された細胞の割合を mock、CDX2、CDX1 導入細胞ごとに計算し、mock と比較した。TMK-1 では CDX 導入により apoptosis 細胞の増加傾向がみられた。

	陽性細胞数	総細胞数	c-cas-3 陽性率 (%)	<i>P</i>	
TMK-1 mock	83	1266	3.27		
TMK-1-CDX2	67	1065	4.82	0.0675	mock と有意差なし
TMK-1-CDX1	92	1323	4.18	0.237	mock と有意差なし

	陽性細胞数	総細胞数	TUNEL 陽性率 (%)	<i>P</i>	
TMK-1 mock	15	1182	0.899		
TMK-1-CDX2	16	1274	2.915	0.0004 *	mock と有意差あり
TMK-1-CDX1	15	1259	2.52	0.0035 *	mock と有意差あり

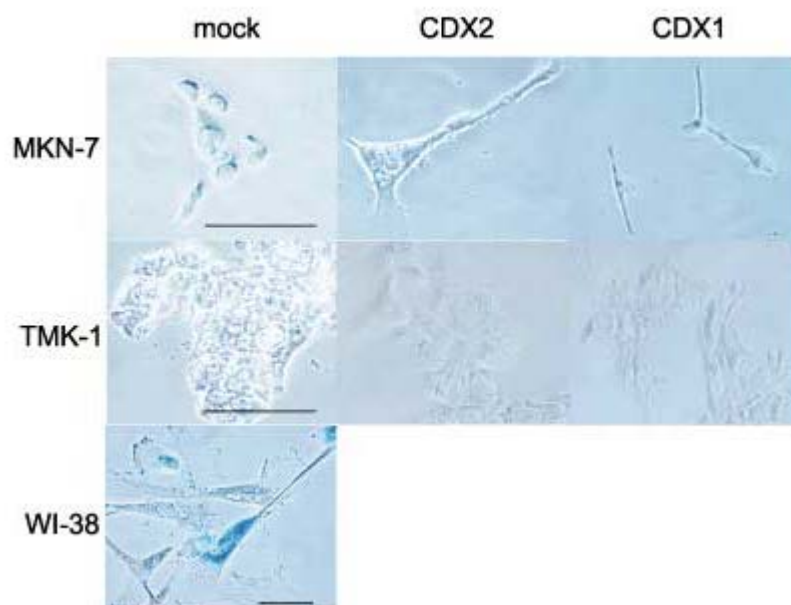


図7 : SA-β-Gal assay

有限増殖である正常線維芽細胞株 WI-38 を2か月間培養し、増殖が停止しうる30回を超す分裂を終えた状態にし、positive controlとして用いた。
図内の Bar は100μmを示す。

V-5. フローサイトメトリーによる細胞周期解析

増殖停止した細胞について細胞周期解析を行った。PI による核染色を行い、FACS Calibur にてフローサイトメトリーを施行した。空ベクターを導入した細胞と *CDX* 導入細胞について比較すると MKN-7、TMK-1 ともに *CDX* 導入群で G0/G1 期の細胞が増加し、S 期の細胞が減少していた。TMK-1 では G2/M 期の細胞も減少していた。apoptosis 細胞の存在はフローサイトメトリーでははっきりしなかった。*CDX* 導入により、主に G0-G1 arrest による増殖停止が生じたと考えられた(図 8)。

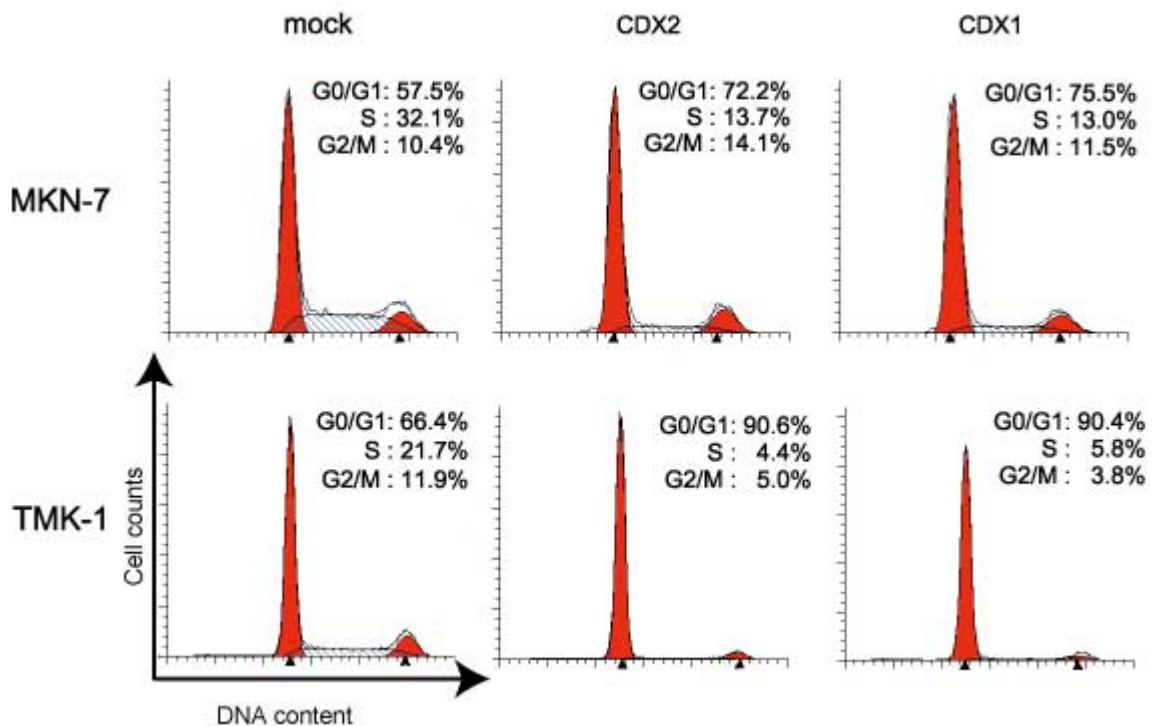


図 8: フローサイトメトリー法による細胞周期の分布
縦軸は細胞数、横軸は DNA 量を示す。MKN-7、TMK-1 ともに *CDX* 導入群で G0/G1 期の細胞が増加し、S 期の細胞が減少し G0-G1 arrest が示唆される。

V-6. 細胞周期タンパクの解析

細胞周期関連タンパクを Western blotting で詳細に調べると (図 9)、両細胞に共通して Cyclin E2・CDK4・p27 の発現が *CDX* の導入によって低下していた。いずれも G1→S 期チェックポイントの細胞周期タンパクであり、両細胞に *CDX* を導入して得られた細胞増殖停止がフローサイトメトリー実験により推測された G0-G1 arrest と矛盾しない結果であった。MKN-7 ではこの他に CDK2・Cyclin D3・p21 が、TMK-1 では Cyclin B1・Cyclin A2 の発現が低下していた。

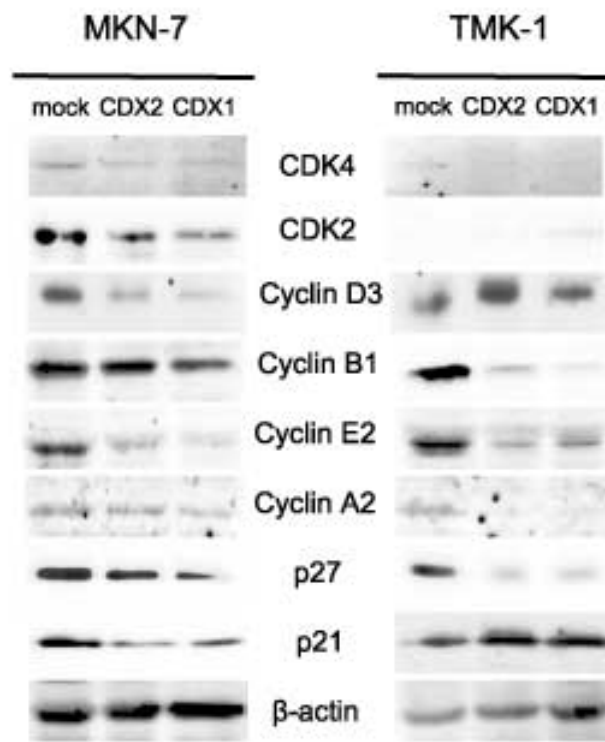


図 9: 細胞周期タンパクの Western blotting
mock は空ベクターを導入したものである。

V-7. 小括 (1)

CDX 発現のない胃癌細胞株 MKN-7、TMK-1 に CDX を導入すると形態変化および増殖停止を生じた。その際、腸分化マーカーの発現を伴っており、CDX による腸への分化誘導が生じている状態と考えた。

この形態変化と増殖停止においては、急速な細胞老化によるものではなく、また若干のアポトーシス誘導がみられるもののアポトーシス経路の明らかな活性化は見られなかった。フローサイトメトリー・細胞周期関連タンパクの Western blotting から主に G0-G1 arrest による増殖停止が、MKN-7 および TMK-1 両細胞株において生じたと考えられた。

V-8. ヒト胃癌組織検体の腫瘍部における CDX2、CDX1 の発現

細胞株では CDX 発現陰性の胃癌細胞株数は少ない[40]、(表 1-D)が、過去に先行した早期胃癌の免疫組織学的評価にて MUC2 陰性癌が 60%程度と多くみられたため、実際には CDX 発現陰性の胃癌が多く存在する可能性を考え、胃癌臨床検体で CDX2 および CDX1 の発現の状況について免疫染色で調べた。ランダムに選択した外科的切除胃癌の検体 89 例について、CDX2 と CDX1 の免疫染色を行った。CDX2 および CDX1 の染色が 10%未満のもの(grade1)を発現陰性癌とすると、CDX2・CDX1 の発現がない胃癌がそれぞれ CDX2 51.7% (45/89 例) と CDX1 68.5% (59/89 例)と半数以上であった。表 7 に全症例の CDX2、CDX1 免疫染色の結果を胃癌の組織型および性、年齢、病期と共に示す。また、Lauren 分類における腸型胃癌とびまん型胃癌において CDX の発現を比較するため、Lauren 分類による CDX2 および CDX1 の 5 段階の grade の分布を、表 8-A および表 8-B に示した。胃癌の組織型と CDX の発現との明らかな関連は見られなかった。

表 7: 全症例の組織型 (Lauren 分類・日本胃癌分類) と性別、年齢、進行度、および CDX の発現 grade についての詳細一覧を示す。

Number	組織型 Lauren 分類	組織型	癌部	癌部	Gender	age	Stage (日本)
		日本胃癌分類	CDX2	CDX1			
1	intestinal	tub1	2	1	M	77	II
2	intestinal	tub1	3	2	M	71	II
3	intestinal	tub2	4	3	M	48	IV
4	diffuse	por	1	1	M	81	IV
5	intestinal	tub2	1	1	M	71	IV
6	intestinal	tub1	1	1	M	85	IIIB
7	diffuse	por	1	1	F	78	IV
8	diffuse	por	2	2	F	69	IIIA
9	diffuse	por	2	2	F	92	II
10	intestinal	pap	1	1	M	71	IIIA
11	diffuse	por	2	1	M	90	Ib
12	intestinal	tub1	4	4	F	57	IIIA
13	intestinal	pap	4	1	M	65	Ib
14	diffuse	por	4	4	F	46	IV
15	intestinal	tub2	2	2	M	70	IIIB
16	diffuse	por	1	4	F	46	II
17	diffuse	por	1	1	F	48	IIIA
18	diffuse	por	1	1	M	73	IIIB
19	diffuse	por	1	1	F	53	II
20	diffuse	por	4	2	F	37	IIIA
21	diffuse	por	1	1	F	71	IIIA
22	intestinal	tub2	1	2	M	62	II
23	intestinal	tub1	4	4	M	73	IIIA
24	diffuse	por	1	1	F	65	IIIB
25	intestinal	pap	1	1	M	71	IV
26	intestinal	tub2	2	2	F	73	IIIB
27	intestinal	tub2	3	2	F	78	IIIA
28	diffuse	por	1	1	F	59	IV
29	diffuse	por	1	1	M	64	IV
30	intestinal	tub2	1	1	M	52	IIIB
31	diffuse	muc	5	5	M	60	IIIA
32	intestinal	tub2	2	1	M	55	Ib

33	intestinal	tub2	1	1	M	74	II
34	diffuse	muc	4	4	M	64	IV
35	diffuse	por	1	1	M	56	IV
36	diffuse	por	2	1	M	86	II
37	intestinal	tub1	1	1	M	36	IIIA
38	intestinal	pap	4	1	F	58	II
39	diffuse	sig	4	5	F	54	IIIA
40	intestinal	pap	1	1	M	83	IIIB
41	diffuse	por	1	1	M	67	IIIB
42	diffuse	por	2	1	M	79	IV
43	intestinal	pap	1	3	M	74	Ib
44	intestinal	pap	1	1	M	54	IV
45	intestinal	tub1	4	3	M	73	Ib
46	diffuse	por	1	1	F	82	IIIA
47	diffuse	por	1	1	M	65	IV
48	diffuse	sig	1	1	F	54	IIIB
49	intestinal	pap	4	4	M	67	IIIA
50	diffuse	sig	4	5	F	78	IIIA
51	diffuse	muc	4	4	M	69	IV
52	intestinal	tub1	1	1	M	67	IV
53	intestinal	tub2	2	1	M	58	IV
54	diffuse	por	1	1	M	62	IIIA
55	intestinal	tub2	1	1	F	80	IIIA
56	diffuse	por	1	1	M	62	IIIA
57	intestinal	tub2	1	1	M	71	II
58	diffuse	sig	1	3	M	54	IIIA
59	diffuse	sig	2	2	F	73	IV
60	intestinal	pap	3	1	F	70	IIIB
61	intestinal	tub2	1	1	M	73	IV
62	intestinal	tub1	1	1	F	65	IIIA
63	intestinal	pap	1	1	M	67	IIIB
64	intestinal	tub2	5	1	M	55	IIIA
65	intestinal	tub2	1	1	F	88	IIIA
66	diffuse	por	3	2	M	79	IV
67	intestinal	tub1	3	4	F	75	IIIA
68	intestinal	tub2	1	1	M	58	IIIB
69	diffuse	por	2	1	F	70	II

70	diffuse	por	1	1	M	62	IV
71	diffuse	por	1	1	F	70	IIIA
72	intestinal	tub2	3	1	M	77	IIIA
73	diffuse	por	4	3	M	59	IV
74	diffuse	por	2	1	F	44	IV
75	diffuse	por	3	2	M	71	IIIA
76	intestinal	tub2	5	3	M	68	IIIB
77	intestinal	tub1	2	1	M	59	IIIA
78	intestinal	tub1	3	1	M	66	IIIB
79	intestinal	tub2	2	1	M	66	IIIA
80	intestinal	tub2	3	1	M	53	II
81	diffuse	sig	1	3	F	71	IIIB
82	intestinal	tub1	2	1	M	71	IIIB
83	intestinal	tub2	1	1	M	70	Ib
84	diffuse	por	1	1	M	70	Ib
85	diffuse	por	4	1	M	77	IV
86	diffuse	por	1	1	M	72	IIIB
87	diffuse	muc	1	1	M	80	IIIB
88	diffuse	por	5	3	M	82	II
89	diffuse	por	1	1	M	61	IIIB

表 8-A. 組織型別の CDX2 の発現

CDX2 の染色 grade は IV-14 に示した方法で判定した。grade の分布は組織型によらなかった。

Histological Type of Gastric Cancer	Degree of CDX2 expression					total
	1	2	3	4	5	
Intestinal type	20 (45.5%)	8 (18.2%)	7 (15.9%)	7 (15.9%)	2 (4.5%)	44 (100%)
Diffuse type	25 (55.6%)	8 (17.8%)	2 (4.4%)	8 (17.8%)	2 (4.4%)	45 (100%)
Total	45 (50.6%)	16 (18.0%)	9 (10.1%)	15 (16.9%)	4 (4.5%)	89 (100%)

表 8-B. 組織型別の CDX1 の発現

CDX1 の染色 grade は IV-14 に示した方法で判定した。grade の分布は組織型によらなかった。

Histological Type of Gastric Cancer	Degree of CDX1 expression					total
	1	2	3	4	5	
Intestinal type	31 (68.9%)	5 (11.4%)	4 (9.1%)	4 (9.1%)	0 (0.0%)	44 (100%)
Diffuse type	28 (62.2%)	6 (13.3%)	4 (8.9%)	4 (8.9%)	3 (6.7%)	45 (100%)
Total	59 (66.3%)	11 (12.4%)	8 (9.0%)	8 (9.0%)	3 (3.4%)	89 (100%)

V-9. ヒト胃癌組織検体の腫瘍部における CDX2、CDX1 の発現傾向

既報のとおり[27]、我々の解析でも CDX2 と CDX1 は同時に発現する傾向（相関係数は 0.62、 P 値= 5.70×10^{-11})が有意に認められた。CDX 非発現の癌について Lauren 分類に従ってベン図に示したものが図 10 であり、このベン図の重なりからも CDX2 および CDX1 は同様の傾向を示していることがわかる。CDX2 および CDX1 がともに発現していない胃癌症例は 44.9%(40/89 例)であり、胃癌由来細胞株の大半で CDX2 が発現しているという結果とは発現傾向が異なっていた。この結果は、腸への分化誘導によって、抗癌活性が得られる可能性のある胃癌が臨床的には多く存在することを示唆するものと考えた。

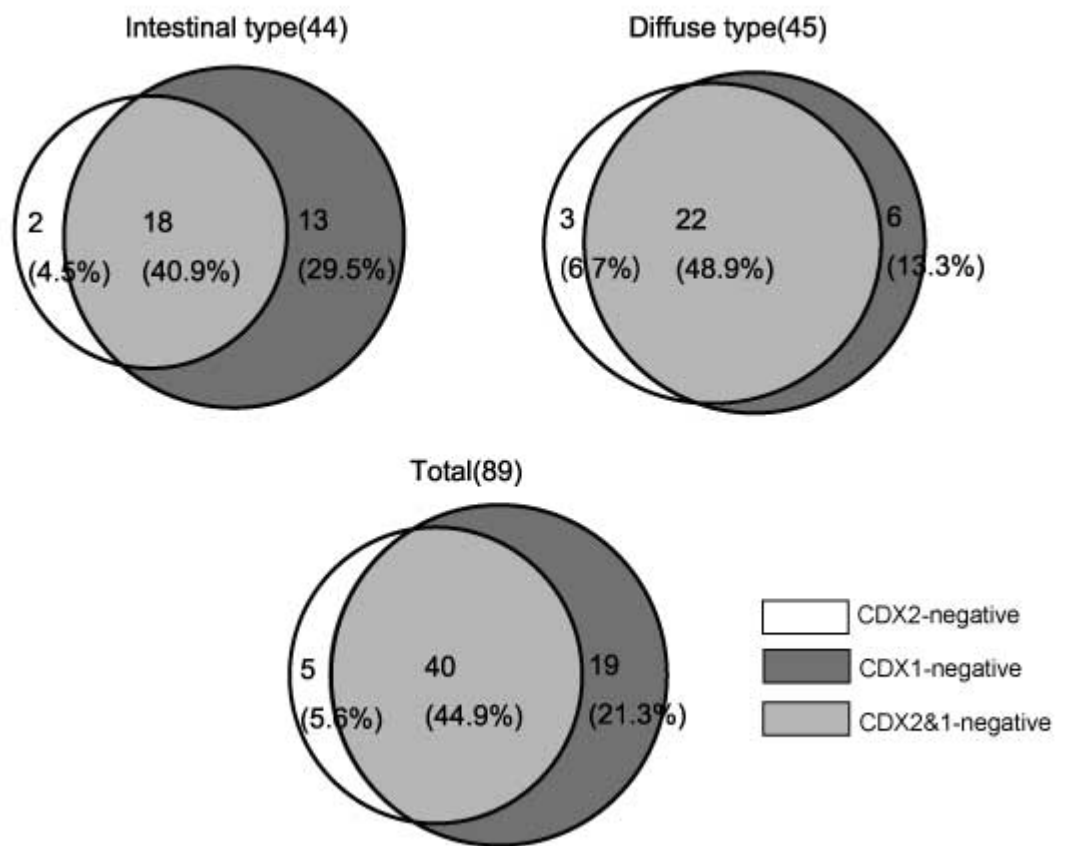


図 10: 胃癌外科切除 89 症例における組織型別の CDX2・CDX1 陰性の分布
 淡いグレーで示した中央の領域は CDX2・CDX1 とともに発現陰性の症例数を示す。

V-10. ヒト胃癌組織検体の背景非腫瘍粘膜における CDX2、CDX1 の発現

腸上皮化生には CDX が発現していることが予想されたが[29,30,31,32,33]、腫瘍背景粘膜では CDX 発現と腸上皮化生がかならずしも一致しない可能性があること、また非腸上皮化生粘膜(残存する胃腺窩上皮や幽門腺上皮)での CDX 発現の可能性を考え、背景粘膜でも CDX の発現を評価した。HE 染色ならびに CDX2、CDX1 染色した非癌部背景粘膜の 1 例として、同一症例同部位の写真を図 11 に提示した。CDX は化生部に発現していたが、すべての化生細胞に発現しているわけではなかった。CDX1 は化生細胞にほぼ 90-100% 合致して発現していたため CDX index は腸上皮化生の有無によるところが大きかった。CDX2 は腺底部と腺頸部で濃淡差があり、腺底部で濃く染色される傾向がみられた。全症例の、プレパラート上の非癌部背景粘膜に占める腸上皮化生の割合と、その割合に CDX 陽性細胞の割合を積算した CDX index を、腫瘍部の CDX の染色 grade と合わせて表 9 に示した。また、これを基に腫瘍部の CDX 染色 grade と背景粘膜の CDX 発現パターンを 4 つに分類した結果を表 10 に示した。4 パターンのうち、腫瘍・背景ともに陽性である③のパターンが最多であったが、4 つのパターンすべてが存在しており、腫瘍部の CDX の染色 grade と背景粘膜の CDX index との間には明らかな傾向性はみられなかった。



図 11. 胃腸背景粘膜の HE 染色と CDX2・CDX1 免疫染色

腸上皮化生部には CDX2 および CDX1 が染色されている。
 CDX2 は腺底部に強く染色しているが表層では弱い染色のみである。
 強い染色はほぼ十二指腸の染色性と合致し、このような強染色部の割合を
 鏡検にて評価した。

表 9. 外科的切除胃癌 89 例の腫瘍部および背景粘膜の CDX の発現

Number	組織型 Lauren 分類	組織型 日本胃癌分類	癌部 CDX2	癌部 CDX1	化生の 割合%	背景 CDX2 %	CDX2 index	背景 CDX1 %	CDX1 index
1	intestinal	tub1	2	1	100	70	0.7	100	1
2	intestinal	tub1	3	2	70	80-90	0.6	100	0.7
3	intestinal	tub2	4	3	20	100	0.2	100	0.2
4	diffuse	por	1	1	90-95	30-40	0.32	30-40	0.32
5	intestinal	tub2	1	1	40	60-70	0.26	100	0.4
6	intestinal	tub1	1	1	10	60-70	0.065	100	0.1
7	diffuse	por	1	1	60	60-70	0.39	*	*
8	diffuse	por	2	2	80-90	40	0.34	70-80	0.64
9	diffuse	por	2	2	80-90	5	0.043	100	0.85
10	intestinal	pap	1	1	100	70	0.7	100	1
11	diffuse	por	2	1	30	90	0.27	100	0.3
12	intestinal	tub1	4	4	5	90	0.045	100	0.05
13	intestinal	pap	4	1	90	60-70	0.59	80	0.72
14	diffuse	por	4	4	0	5	0	5	0
15	intestinal	tub2	2	2	90	30-40	0.32	100	0.9
16	diffuse	por	1	4	5-10	100	0.075	100	0.075
17	diffuse	por	1	1	0		0		0
18	diffuse	por	1	1	70	40-50	0.32	100	0.7
19	diffuse	por	1	1	20	100	0.2	100	0.2
20	diffuse	por	4	2	30	90-100	0.29	100	0.3
21	diffuse	por	1	1	60	10	0.06	100	0.6
22	intestinal	tub2	1	2	10	60-70	0.065	100	0.1
23	intestinal	tub1	4	4	90	50	0.45	90	0.86
24	diffuse	por	1	1	100	30-40	0.35	100	1
25	intestinal	pap	1	1	90	20	0.18	100	0.9
26	intestinal	tub2	2	2	80	10,20	0.12	90-100	0.76
27	intestinal	tub2	3	2	90-100	70	0.67	100	0.95
28	diffuse	por	1	1	5	0	0	0	0
29	diffuse	por	1	1	10	100	0.1	100	0.1
30	intestinal	tub2	1	1	0	0	0	0	0
31	diffuse	muc	5	5	90	60	0.54	100	0.9
32	intestinal	tub2	2	1	90	30	0.27	100	0.9

33	intestinal	tub2	1	1	30-40	40	0.14	90	0.32
34	diffuse	muc	4	4	40	100	0.4	90-100	0.38
35	diffuse	por	1	1	*	*	*		*
36	diffuse	por	2	1	10	100	0.1	100	0.1
37	intestinal	tub1	1	1	10	20	0.02	20	0.02
38	intestinal	pap	4	1	70	50	0.35	100	0.7
39	diffuse	sig	4	5	0	0	0	0	0
40	intestinal	pap	1	1	70-80	70-80	0.56	100	0.75
41	diffuse	por	1	1	60	40	0.24	75	0.45
42	diffuse	por	2	1	10	40	0.04	80	0.08
43	intestinal	pap	1	3	60-70	30-40	0.23	100	0.65
44	intestinal	pap	1	1	0	0	0	0	0
45	intestinal	tub1	4	3	70-80	90	0.68	100	0.75
46	diffuse	por	1	1	30-40	30	0.11	80	0.28
47	diffuse	por	1	1	90	30-40	0.32	100	0.9
48	diffuse	sig	1	1	1	0	0	100	0.01
49	intestinal	pap	4	4	10	100	0.1	100	0.1
50	diffuse	sig	4	5	90	30-40	0.32	100	0.9
51	diffuse	muc	4	4	70-80	60-70	0.49	100	0.75
52	intestinal	tub1	1	1	0	0	0	0	0
53	intestinal	tub2	2	1	10	90	0.09	100	0.1
54	diffuse	por	1	1	95	5	0.048	100	0.95
55	intestinal	tub2	1	1	50-60	30-40	0.19	100	0.55
56	diffuse	por	1	1	50	70	0.35	*	*
57	intestinal	tub2	1	1	90	15	0.14	100	0.9
58	diffuse	sig	1	3	0	0	0	0	0
59	diffuse	sig	2	2	90	10	0.09	*	*
60	intestinal	pap	3	1	80	25-30	0.22	100	0.8
61	intestinal	tub2	1	1	60	90	0.54	100	0.6
62	intestinal	tub1	1	1	60	40	0.24	100	0.6
63	intestinal	pap	1	1	70-80	10	0.075	100	0.75
64	intestinal	tub2	5	1	90	30	0.27	100	0.9
65	intestinal	tub2	1	1	90	60-70	0.59	100	0.9
66	diffuse	por	3	2	50	30-40	0.18	100	0.5
67	intestinal	tub1	3	4	50-60	80	0.44	100	0.55
68	intestinal	tub2	1	1	30	10	0.03	100	0.3
69	diffuse	por	2	1	10	0	0	100	0.1

70	diffuse	por	1	1	40-50	80	0.36	90	0.405
71	diffuse	por	1	1	50	40	0.2	100	0.5
72	intestinal	tub2	3	1	90	20-30	0.23	100	0.9
73	diffuse	por	4	3	60-70	80	0.52	100	0.65
74	diffuse	por	2	1	0	0	0	0	0
75	diffuse	por	3	2	0	0	0	0	0
76	intestinal	tub2	5	3	90	5	0.045	90	0.81
77	intestinal	tub1	2	1	60-70	60-70	0.42	70-80	0.4875
78	intestinal	tub1	3	1	10	70	0.07	90-100	0.095
79	intestinal	tub2	2	1	50-60	10,20	0.083	70	0.385
80	intestinal	tub2	3	1	0	0	0	0	0
81	diffuse	sig	1	3	60-70	20-30	0.16	100	0.65
82	intestinal	tub1	2	1	70-80	30-40	0.26	80	0.6
83	intestinal	tub2	1	1	5	95	0.048	100	0.05
84	diffuse	por	1	1	95	30-40	0.33	95	0.9025
85	diffuse	por	4	1	80	45	0.36	100	0.8
86	diffuse	por	1	1	20	15	0.03	100	0.2
87	diffuse	muc	1	1	90	80	0.72	100	0.9
88	diffuse	por	5	3	40	70	0.28	100	0.4
89	diffuse	por	1	1	100	10	0.1	90-100	0.95

*は染色不成功の症例であり、評価困難であった。

表 10. 外科的切除胃癌 89 例の腫瘍部と背景粘膜の CDX 染色パターン

CDX 染色パターン	症例数
①腫瘍部で CDX 陰性かつ背景粘膜で CDX 陽性のもの	27
②腫瘍部で CDX 陽性かつ背景粘膜では CDX 陰性のもの	15
③腫瘍部・背景粘膜ともに CDX を発現しているもの	33
④腫瘍部・背景粘膜ともに CDX を発現していないもの	10
染色不成功のため判定困難	4
計	89

V-11. 網羅的遺伝子発現解析法による *CDX* 導入後の遺伝子発現

細胞増殖停止が速やかに生じ *CDX* 導入による変化が著しい MKN-7 細胞に対しては *CDX2*・*CDX1* を導入後 6 日目に抽出した全 RNA を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を施行した。A260/A280 はいずれも 2.3-2.5 であった。まず MKN-7 と MKN-7 に空ベクターを導入したもので発現プロファイルが同じであることを確認し、その後に、MKN7-*CDX2*・MKN7-*CDX1* と MKN7-IP との発現量の比較を行った。Fold change が 2 倍より大きいものを発現上昇・低下の基準としたところ、873 の遺伝子が *CDX2* および *CDX1* の導入により共通して発現上昇し、381 の遺伝子が *CDX2*・*CDX1* 導入したものに共通し発現低下が生じていた。網羅的遺伝子発現解析(マイクロアレイ)の結果、明らかな coding gene について抽出し、表 11-A に MKN-7-IP と比べ発現が上昇していたもの、表 11-B に低下していたものを倍率で示した。いずれも *CDX2*、*CDX1* を導入した細胞群において IP(空ベクター)を導入した細胞群と比較した際の変化率の積が 800 倍以上のもののみ掲載した。

表 11-A:空ベクターとの比較で MKN-7-CDX2、MKN-7-CDX1 で発現が上昇した
 主な遺伝子
 CDX2、CDX1 において IP と比較した際の変化率の積が 800 倍以上のもののみ掲載
 した。

Gene Bank Representative Public ID	Gene Symbol	Expressio n in MKN-7 IP	Fold change in MKN-7-CDX 2	Fold change in MKN-7-CDX 1
NM_004616	TSPAN8	6.3	865.0317	801.7143
AI433463	MME	0.3	383	433.6667
AJ406931	KRTAP3-1 /// LOC644398	1.1	348.5455	290.7273
NM_020208	SLC6A20	0.2	276.5	238.5
AA833830	CCDC4	0.2	144	290
NM_021785	RAI2	0.4	214.25	141.25
AI732381	KRT20	3.3	177.3939	117.7576
NM_002421	MMP1	12.2	101.3443	186.8197
AI129626	DCAMKL1	11.2	112.3661	154.0804
BE881590	ETV1	0.2	63.5	228.5
AF019638	GDA	4.2	125.9286	114.1905
AA031832	LOC440934	0.2	174	67
NM_004734	DCAMKL1	1	95.6	98.8
NM_023037	FRY	0.4	80.5	114.75
AK023445	LOC253264	0.7	105.2857	86.14286
BF003134	CLCA2	0.2	47	182.5
AL137763	GRHL3	0.3	130.3333	56.66667
AW023227	MKX	0.3	64.66667	107
NM_002606	PDE9A	0.5	108.2	60.2
NM_001077	UGT2B17	2.5	38.8	163.8
R45446	PCDHB14	0.1	64	90
AI742686	RLF	0.1	47	114
NM_002425	MMP10	0.7	50	103.5714
BC032003	SPINK6	3.5	29.91429	163.8857
NM_005410	SEPP1	0.5	12.8	376.4
NM_018970	GPR85	0.1	63	74
AI167789	RASSF6	3	55.3	80.13333
NM_000072	CD36	0.3	82	49.33333

NM_138995	MYO3B	0.2	130	30.5
BE896267	HERC1	0.1	66	60
NM_002638	PI3	29.9	55.45485	64.20067
BC005008	CEACAM6	1.5	112.0667	31.06667
AI758950	SLC26A7	0.1	50	65
NM_005912	MC4R	8.1	51.22222	63.23457
AF272379	MLL	0.1	71	45
NM_153036	C6orf78	0.1	60	51
NM_017786	FLJ20366	9.7	68.89691	41.74227
AW961746	CC2D1B	0.3	44	63.66667
BC020687	CFHR3	0.5	58.6	47.8
AL047534	BMPR2	0.1	58	48
AI203293	LOC440455	1	57.4	46.1
NM_006536	CLCA2	0.3	53	49.33333
W86831	SYT1	0.1	50	52
NM_022135	POPDC2	0.2	39.5	64
AL390176	CUTL1	0.1	54	46
NM_002581	PAPPA	0.8	35.25	70.125
AI885178	MAPRE3	0.1	101	24
BE549838	PPP1R3C	0.2	63.5	38
BF436080	GRM3	0.1	42	57
NM_013249	ZNF214	0.1	68	35
AW772288	ZCSL3	0.1	53	44
AK025182	ARID1A	0.3	44.33333	50
AI084610	DDAH1	0.2	60.5	36.5
AW269746	COX8C	0.2	34	63.5
AI769104	TMEM77	0.3	36.66667	58
BC002642	CTSS	0.1	36	59
AI989477	SOX4	28.1	50.78292	41.20996
AF085995	PDE5A	0.2	40.5	51.5
AA019363	GRIA4	0.1	45	45
AV739182	GARNL1	0.3	37.66667	52
AB015228	ALDH1A2	0.4	37.5	51.75
AW341661	IGSF10	0.6	60.33333	31.66667
AB002384	C6orf32	0.4	64.25	29
L10343	PI3	44.5	38.33258	48.2809
AW268162	GPR39	0.1	53	34

AI127885	SLC8A2	0.4	45	39.75
AF086264	CNAP1	0.1	115	15
NM_002923	RGS2	73.6	46.35734	36.69565
AA748182	ENAM	0.1	56	30
AJ406947	KRTAP9-3	0.1	27	62
AF277624	ZNF479	0.2	38	43.5
AI524996	YTHDC1	0.1	27	60
AL122103	LOC374491 ///	0.4	38.25	41.5
	LOC642904 ///			
	LOC649370			
AW104813	ARHGEF12	0.2	51	31
BC006141	EPB41L3	0.6	33.16667	47.33333
AF208967	PEG3	0.1	43	34
AL832948	FHIT	0.1	29	50
AL137443	LOC221442	0.2	31	46.5
U79301	LOC644450	0.2	41	34.5
NM_014139	SCN11A	0.1	44	32
NM_006536	CLCA2	0.8	22.625	62
BF061375	LYPD6	0.5	32.2	43.4
AB024518	C9orf26	4.2	34.95238	39.2619
AU144136	KIFAP3	0.4	48.5	28.25
AK023635	LOC90246	0.1	47	29
AL035397	TTC28	0.2	31.5	43
AF090910	PHF14	0.1	53	25
T71269	RAPGEF2	0.7	41.57143	31.85714
BC020851	C9orf72	0.2	27	47.5
AW294092	RERG	0.8	48.5	26.125
BG528420	SOX4	150.5	37.23256	33.10432
AA702409	MCTP2	0.2	29.5	41.5
AF064842	NRXN1	0.2	30.5	39
AU147152	RNF152	0.3	59	20
NM_005256	GAS2	0.2	38	31
AL524520	LGR5	2	59.7	19.7
BF062575	TMEM45B	0.1	28	42
NM_007287	MME	1.1	29.36364	38.81818
AI887898	MAP9	0.1	28	40
NM_000809	GABRA4	0.4	34.25	32

AF332194	STK31	0.3	35.33333	31
NM_024114	TRIM48	0.2	31	35
AF493929	UPK1B /// RGS5	0.4	26.25	40
AV700059	OGN	3.3	11.69697	89.60606
D63412	AQP4	0.1	52	20
S80491	KITLG	0.1	22	47
NM_002196	INSM1	0.1	21	49
H58174	KIAA0240	0.1	22	46
NM_012390	SMR3A	0.1	48	21
NM_005335	HCLS1	0.3	38	26.33333
BF685808	SESN3	0.2	50	19.5
NM_016583	PLUNC	0.3	35	27.66667
BC040219	LOC646222	0.1	46	21
NM_018530	GSDML	0.7	37	26
D13665	POSTN	0.2	27	35.5
BC034777	FAM66C	0.2	33	29
AI701943	PAN3	0.2	51.5	18.5
NM_030763	NSBP1	0.2	27	35
AW364693	RP4-692D3.1	0.2	28	33.5
N32798	ZFP42	4.9	22.97959	40.77551
AU148006	GGPS1	0.2	24	39
AY014282	IQCH	0.2	36.5	25
BC013944	SOHLH2	0.1	38	24
AK000842	LOC400581	0.1	47	19
AA806845	FNBP1	0.2	24.5	35.5
NM_007115	TNFAIP6	0.2	23.5	37
AI467800	KIAA0256	0.3	30.33333	28.33333
BE049061	EVI1	0.2	35	24.5
AI148006	MAML2	0.5	31	27.6
NM_002172	IFNA14	0.3	35	24.33333
AF090916	ACSL4	0.1	29	29
BC032248	RP5-821D11.2	0.6	36	23.33333
NM_005906	MAK	1.5	25.46667	32.8
AY039237	DDX53	0.1	26	32
BC015007	EIF4EBP2	0.3	26	31.66667
BF107618	PAPPA	4.7	17.04255	48.2766
NM_003107	SOX4	45.6	30.82018	26.51316

AW771190	COBLL1	1.2	24.08333	33.83333
BE221817	CNTN3	0.1	54	15

表 11-B: 空ベクターと比較し MKN-7-CDX2、MKN-7-CDX1 で発現が低下した
主な遺伝子

Gene Bank Representative Public ID	Gene Symbol	Expression in MKN-7 IP	Fold change in MKN-7-CDX 2	Fold change in MKN-7-CDX 1
AI692880	GJA5	90.2	0.046563	0.005543
AC007228	ZNF470	5	0.04	0.02
BF692958	SOS2	5.2	0.057692	0.019231
AF339798	FARP1	4.2	0.02381	0.047619
BC040633	SCTR	4.2	0.047619	0.02381
AL833174	C1orf21	8.2	0.04878	0.02439
AU148256	HDHD1A	11	0.027273	0.045455

また、経路解析については KEGG pathway を施行した。結果を表 12-A および 12-B に示した。p53 経路・MAPK 経路・Jak-STAT 経路など、癌促進・癌抑制の双方の経路の活性化が認められ、解釈は難しい。また活性が低下するのは、細胞周期関連経路が主であった。詳細の解析については今後の研究課題である。

マイクロアレイの結果、われわれは腸分化マーカーである *KRT20* 以外に、消化管幹細胞マーカーである *LGR5*・*DCAMKLI*(以下 *DCLK-1*)の発現が上昇していることに注目した(表 11-A 内に赤字で示した)。*LGR5* は正常腸幹細胞のマーカー、*DCLK-1* は消化管癌幹細胞のマーカーとも言われている[61]。*LGR5* および *DCLK-1* に対し

RT-PCR を行う(図 12)と、MKN-7 においては確かに *LGR5* および *DCLK-1* の発現は *CDX* の導入により誘導されていることが確認できた。TMK-1 については RT-PCR にていずれも変動がなかった。MKN-7 と TMK-1 においては *CDX* による癌増殖抑制に関わるメカニズムが異なる可能性も考えられ、*CDX* 導入により MKN-7 で *LGR5* や *DCLK-1* が誘導されたことは、*CDX* 導入により分化誘導と同時に reprogramming が生じた可能性も示唆するものと思われる。

表 12-A. Gene Ontology analysis (David Bioinformatics, KEGG pathway)

CDXを導入した細胞で発現上昇がみられた遺伝子群

KEGG pathway (MKN7 CDX1 UP)	Count	Benjamini	Genes
MAPK signaling pathway	24	1.02E-01	FGF7, MRAS, TGFB3, HSPA1A, CACNB3, PPM1B, HSPA1B, BDNF, SOS2, MAP3K8, HSPA6, PAK1, BRAF, PLA2G10, DUSP5, RPS6KA5, MAP4K4, ARRB2, DUSP1, GADD45G, MAPK9, GADD45B, GADD45A, DUSP8, DUSP6
Colorectal cancer	11	1.76E-01	CCND1, BRAF, SOS2, TGFB3, FZD1, SMAD3, MAPK9, PIK3R3, FZD4, TCF7L2, APC
Acute myeloid leukemia	9	1.28E-01	CEBPA, JUP, CCND1, BRAF, STAT5A, STAT5B, SOS2, PIK3R3, TCF7L2
Ascorbate and aldarate metabolism	5	1.67E-01	UGT2B17, ALDH2, UGDH, UGT2B15, ALDH3A2
Pathways in cancer	25	1.41E-01	FGF7, PGF, STAT5A, STAT5B, TGFB3, TCF7L2, MMP1, LAMB3, ITGAV, SOS2, PIK3R3, APC, CEBPA, IL8, BRAF, FZD1, SMAD3, FZD4, JUP, CCND1, PIAS4, MAPK9, LAMC2, PIAS1, WNT9A
Jak-STAT signaling pathway	15	1.26E-01	SOCS2, STAT5A, STAT5B, LIFR, IL24, IL15, IL7R, CCND1, SPRY1, IL23A, PIAS4, SOS2, EPOR, PIAS1, PIK3R3
p53 signaling pathway	8	4.03E-01	TP53I3, CCND1, SERPINB5, GADD45G, PMAIP1, PERP, GADD45B, GADD45A
Bladder cancer	6	4.46E-01	RPS6KA5, CCND1, BRAF, IL8, PGF, MMP1
Neurotrophin signaling pathway	11	4.55E-01	RPS6KA5, IRS2, BDNF, PRDM4, BRAF, SOS2, CAMK2D, MAPK9, RIPK2, PIK3R3, IRS1
Chronic myeloid leukemia	8	4.42E-01	CCND1, BRAF, STAT5A, STAT5B, SOS2, TGFB3, SMAD3, PIK3R3

KEGG pathway (MKN7 CDX2 UP)	Count	Benjamini	Genes
Acute myeloid leukemia	13	2.71E-04	CEBPA, TCF7, BRAF, STAT5A, STAT5B, PIK3CD, PIM1, TCF7L2, JUP, CCND1, SOS2, RARA, PIK3R3
Colorectal cancer	13	6.92E-03	TCF7, BRAF, PIK3CD, TGFB3, SMAD3, TCF7L2, FZD4, RALGDS, CCND1, SOS2, MAPK9, PIK3R3, APC, FGFR3, STAT5A, STAT5B, EGLN3, TGFB3, TCF7L2, MMP1, ITGAV, SOS2, RARA, PIK3R3, APC, CEBPA, TCF7, IL8, BRAF, RXRB, PIK3CD, SMAD3, FZD4, RALGDS, JUP, CCND1, PLCG1, MAPK9, LAMC2, PIAS1, GSTP1
Pathways in cancer	28	8.82E-03	SOCS2, STAT5A, STAT5B, PIK3CD, PIM1, IL24, IL15, IL7R, CCND1, SPRY1, IL23A, SOS2, EPOR, PIAS1, PIK3R3, IFNGR2
Jak-STAT signaling pathway	16	3.83E-02	IRS2, BRAF, PIK3CD, KIDINS220, RPS6KA5, MAPK12, PRDM4, PLCG1, SOS2, CAMK2D, RIPK2, MAPK9, PIK3R3, RAPGEF1
Neurotrophin signaling pathway	14	3.16E-02	FGFR3, BRAF, PLA2G10, MRAS, TGFB3, CACNB3, PPM1B, FLNB, MAP4K3, RPS6KA5, MAPK12, DUSP1, GADD45G, SOS2, HSPA6, MAPK9, PAK1, GADD45B, RAPGEF2, DUSP8, GADD45A, DUSP6
MAPK signaling pathway	22	4.19E-02	TCF7, CCND1, BRAF, PIK3CD, SOS2, PIK3R3, TCF7L2, APC
Endometrial cancer	8	7.92E-02	TCF7, CCND1, BRAF, PIK3CD, SOS2, PIK3R3, TCF7L2, APC
p53 signaling pathway	9	8.61E-02	RFWD2, TP53I3, CCND1, SERPINB5, GADD45G, PMAIP1, PERP, GADD45B, GADD45A
Renal cell carcinoma	9	9.12E-02	BRAF, PIK3CD, SOS2, EGLN3, TGFB3, PAK1, PIK3R3, FLCN, RAPGEF1
ErbB signaling pathway	10	9.60E-02	PLCG1, BRAF, STAT5A, PIK3CD, STAT5B, SOS2, CAMK2D, MAPK9, PAK1, PIK3R3

表 12-B. Gene Ontology analysis (David Bioinformatics, KEGG pathway)

CDX を導入した細胞で、発現低下がみられた遺伝子群

KEGG pathway (MKN7 CDX1 DN)	Count	Benjamini	Genes
Cell cycle	17	9.39E-05	CDC7, CDC6, SKP2, PKMYT1, CDC20, MCM4, CDK2, CDC25A, MCM6, TGFB2, CCNB1, MAD2L1, PLK1, BUB1, BUB1B, CCNA2, TFDP1
DNA replication	6	2.36E-01	RFC5, POLE4, POLE2, POLD2, MCM4, MCM6
Progesterone-mediated oocyte maturatic	8	4.67E-01	CCNB1, MAD2L1, PLK1, BUB1, PKMYT1, CCNA2, CDC25A, CDK2
Oocyte meiosis	9	4.31E-01	CCNB1, MAD2L1, PLK1, BUB1, PKMYT1, FBXO5, CDC20, AURKA, CDK2
Base excision repair	5	4.13E-01	POLE4, POLE2, UNG, NEIL3, POLD2
Pyrimidine metabolism	8	4.06E-01	TYMS, POLE4, POLE2, CTPS, POLD2, DTYMK, DPYD, DUT
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	4	4.05E-01	PECR, PTPLA, ELOVL6, SCD5
Purine metabolism	10	4.87E-01	POLE4, POLE2, POLD2, PDE4B, PDE8A, HPRT1, PAICS, ADA, GART, PRPS1
Nucleotide excision repair	5	4.69E-01	RFC5, POLE4, POLE2, POLD2, GTF2H2
TGF-beta signaling pathway	7	4.62E-01	BMP4, INHBA, NOG, TGFB2, THBS1, TFDP1, TGFB2

KEGG pathway (MKN7 CDX2 DN)	Count	Benjamini	Genes
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	4	9.33E-01	PTPLB, PTPLA, ELOVL6, SCD5
ECM-receptor interaction	7	8.09E-01	ITGA6, HSPG2, ITGA3, LAMB1, THBS1, COL4A6, FN1
Glycosphingolipid biosynthesis	4	7.21E-01	GCNT2, ST3GAL4, B3GNT3, FUT1
TGF-beta signaling pathway	7	6.19E-01	INHBA, NOG, TGFB2, SMURF2, THBS1, TFDP1, TGFB2
Focal adhesion	11	6.85E-01	CAV2, CAV1, ARHGAP5, ITGA6, ACTN1, ITGA3, LAMB1, THBS1, COL4A6, PARVB, FN1
Citrate cycle (TCA cycle)	4	6.75E-01	SUCLG2, IDH2, PDHA1, SUCLA2
Propanoate metabolism	4	6.49E-01	SUCLG2, ALDH1B1, SUCLA2, PCCB
Small cell lung cancer	6	7.23E-01	ITGA6, SKP2, ITGA3, LAMB1, COL4A6, FN1

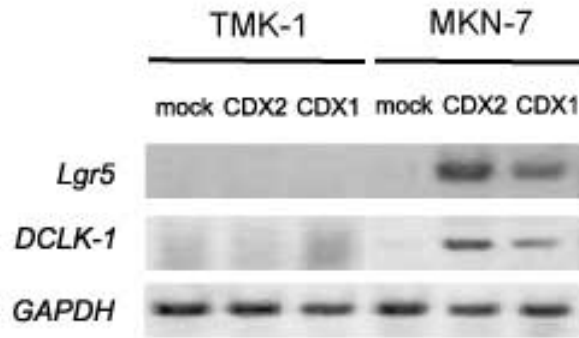


図 12: 腸幹細胞マーカー *LGR5*、*DCLK-1* の RT-PCR

TMK-1 では *CDX* 導入により *LGR5* および *DCLK-1* の発現誘導はみられないが、MKN-7 ではともに誘導されている。

V-12. 小括(2)

胃癌細胞株では CDX の発現しているものは少ないが、実際には外科切除胃癌症例の半数以上は CDX2・CDX1 を発現していなかった。背景粘膜の CDX 発現は腸上皮化生の有無と関連しており、CDX1 については腸上皮化生にほぼ 90-100% 発現していた。

MKN-7 への CDX 導入では、腸幹細胞マーカーとして知られている *LGR5* および *DLCK1* も誘導されていた。CDX 導入後には *E-cadherin* や *KRT20* の腸分化マーカーが誘導され腸への分化傾向を示すと同時に、腸幹細胞への reprogramming が生じた可能性がある。

VI. 考察

腸上皮化生は胃の病的状態において好発し、腸分化を制御する *CDX* (*CDX2*・*CDX1*) 遺伝子が胃上皮細胞に異所性に発現して生じると考えられている。胃癌やその周辺に高頻度に見られる腸上皮化生には本来の胃上皮にない腸への分化傾向が見られることから、腸上皮化生が前癌病変であるという説が以前より提唱されているが、一方で腸上皮化生は傍癌病変に過ぎないという説も有力で、決着は未だについていないのが現状である。今回我々は、胃癌および、その背景粘膜に腸型・胃型の形質が様々に混在すること、我々の先行研究で腸への分化制御の異常と胃癌の組織型・悪性度との関連が示唆されていること[40]などから、消化管分化の制御異常が胃癌の発症・進展に関連している可能性に着目した。

今回、報告した MKN-7・TMK-1 以外にも、我々はこれまでに *CDX* 発現の影響を調べるために、胃癌細胞株 NUGC-4・GCIY・AGS・AZ521、および大腸癌細胞株 SW480・WiDr・LOVO-T に *CDX2* 遺伝子を導入し解析したことがあったが、WiDr 以外の細胞株は *CDX* をもともと発現しており、*CDX2* をさらに外部から導入しても明らかな変化は生じなかった。*CDX* を発現していない WiDr 細胞に対する *CDX* の導入効果も既報と同様で、増殖停止は認められなかった[41]。他、*CDX* と増殖性を調べた既報としては、*CDX2* を発現している胃癌細胞株 MKN-45 で *CDX2* をノックアウトして解析した論文があるが、細胞増殖に有意な変化は生じなかったと報告されている[51]。また、

同グループは LOVO、SW48 といった大腸癌細胞株でも同様の CDX2 ノックアウト実験を行っているが、この場合も癌増殖能に影響がなかったと報告している[48]。

大腸癌細胞株と同様、胃癌細胞株として樹立されている株でも、CDX2 が発現しているものが大半である[62]が、今回、我々は CDX が発現していない胃癌細胞株に対する CDX 導入効果の検討が行われていないことに着目し、胃癌由来細胞株で CDX2・CDX1 が全く発現していない MKN-7 細胞[40]と TMK-1 細胞[58]にレトロウイルスベクターを用いて CDX2・CDX1 遺伝子を安定導入して解析を行った。結果に示したように、特に MKN-7 は著明な形態変化と急激な増殖停止が生じ、TMK-1 はやや遅れて形態変化と増殖停止が認められた。MKN-7 は胃の高分化型管状腺癌から樹立された細胞株[59]であり、既報から MUC5AC 陽性・MUC2 陰性の胃型の癌であると推測される[56,60]。一方、TMK-1 は胃の低分化腺癌から樹立されたものである[59]。すなわち高分化型腺癌でも低分化腺癌でも、胃癌細胞株において CDX 陰性胃癌で CDX の導入により癌の抑制効果がみられ CDX は胃癌の発生や増殖においても鍵となっていると考えられた。また、表 8 の結果より、組織型から CDX 発現を予測することが困難であったことを踏まえると、今後 *in vivo* でも CDX 導入による胃癌抑制効果が示され治療へ応用することになれば、癌部での CDX2・CDX1 の発現評価が重要になるだろう。

CDX 導入による CDX 非発現胃癌細胞の増殖停止は本研究結果からは主に

G0-G1 arrest によるものであると考えられ、同時に腸分化マーカーも誘導されていたことから、CDX が促進した腸への分化に伴う G0-G1 arrest と推測される。TMK-1 ではアポトーシス陽性細胞が CDX 発現により若干増加しており、細胞周期タンパクの解析で p21 の発現が CDX 導入群で維持されていたことから、アポトーシスの系の活性化の傾向が示唆されるが、全体としてアポトーシスの割合は少なく、CDX を導入した際の変化の大半は増殖停止によるもので、アポトーシス経路の活性はメインではないと考えられる。これらは分化促進による結果を示しているのではないだろうか。

今回の結果から、腸型への形質転換が十分にされておらず胃型形質が残存する胃上皮細胞から発症する胃癌が存在することや、胃型形質をもつ病変では「腸への分化をさらに促進する」ことによって胃癌の治療につながり得ること、が示唆されたと我々は考えている。臨床研究においても、「胃粘膜萎縮が進みきっておらず、腸上皮化生の出現が軽度である時期、すなわち、不完全型腸上皮化生が化生の多くを占める状態」において、未分化癌の発症リスクが高まることが、近年、報告されている[63]。これらの結果・報告から、胃粘膜の萎縮が進行し完全型腸上皮化生が化生の多くを占める状況は、「腸上皮化生の成熟」という観点からは進行した病態であるが、「癌の発症・進展という視点」では、不完全型腸上皮化生が大半を占める状態よりむしろ分化の状態として安定しており発癌のリスクが低い、という可能性を我々は考えている。CDX2 のトランスジェニックマウスの研究では長期間の観察で、完全型腸上皮化生を背景に全例

で胃癌が発生したと報告されている[33,53]が、この結果は実際には不完全型腸上皮化生を経て完全型腸上皮化生へ進展する間に発癌が生じてしまい、その後時間の経過とともに増大した状態をみている可能性も否めない。

実際に *CDX* 導入による分化誘導を治療へ応用を検討する上では、胃の背景非腫瘍粘膜や全身への影響も懸念項目になるかもしれない。しかし、全身への影響に関しては既報のトランスジェニックマウスの検討により、ないものと考えられる。また、われわれは過去に胃癌細胞株以外にも HeLa-S3(子宮頸癌細胞株)・WI-38(正常線維芽細胞株)・HEK293(ヒト胎児腎細胞)に *CDX* を導入した経験があるが、*CDX* 導入により形質が増悪したことはなかった(Data not shown)。そこでここでは、胃の背景粘膜への影響について今回の結果から考察する。そもそも *CDX* の発現は腸上皮化生の有無に依存しており、腫瘍部の発現状況とはあまり関連がないということが分かった。①腫瘍部で *CDX* 陰性かつ背景粘膜で *CDX* 陽性のもの、②腫瘍部で *CDX* 陽性かつ背景粘膜では *CDX* 陰性のもの、③ともに *CDX* を発現しているもの、④ともに *CDX* を発現していないもの、と腫瘍と背景粘膜の *CDX* の発現には、考えうる 4 パターン全てがあった。*CDX* 陰性胃癌において、発癌の際に *CDX* 陽性の細胞から *CDX* の発現が消失したのか、そもそも *CDX* 陰性細胞が癌化したのか、すなわち *CDX* 非発現が発癌の原因なのか結果なのかという点については、本研究で言及困難である。しかし発癌の初期においては単クローン増殖が原則であり、背景粘膜の状況と腫瘍細胞の性質が必ず

しも一致しないことは、この原則に矛盾しない。われわれは、CDX 導入による分化誘導の対象は CDX 陰性の切除不能進行胃癌と考えている（上記の①あるいは④のパターンが該当する）が、②のパターンが 89 例中 15 例と少ないが存在するため、CDX による発癌の可能性は全くないと断言はできないものの、CDX 導入による分化誘導の治療の対象は切除不能進行胃癌であり、トランスジェニックマウスの研究で示されているように CDX の発現から発癌までには長い期間を要することを理由に、新規に生じる背景粘膜の発癌には強い懸念を抱かなくてもよいのではないかと現時点では考えている。

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子解析では、腸への分化マーカー遺伝子が予想通り誘導されるだけでなく、同時に腸の幹細胞マーカー遺伝子である *Lgr5* や *DCLK-1* が誘導されたことは示唆に富む。TMK-1 では誘導されておらず、幹細胞マーカーの誘導についての解釈は難しいが、癌の正常化の過程で *reprogramming* が生じている可能性が考えられた。

本研究で MKN-7・TMK-1 で認められた現象は *in vitro* で生じたものであり、臨床応用に向けては *in vivo* での検証が必要である。ヘリコバクター・ピロリ菌により生じた慢性炎症が内在の *CDX2* を誘導することが報告されているが[64]、*CDX* 遺伝子の発現を制御する因子や機序については明らかにされていない。本研究で用いたレトロウイルス

スペクターによる外来 *CDX* 遺伝子の導入は *delivery* の点で臨床応用が難しい面が大きいことから、現在は、内在 *CDX* 遺伝子の発現を誘導することを視野に、様々な薬剤のスクリーニングに取り組んでいる。

今回の研究結果を踏まえた「腸分化誘導促進による胃癌治療の可能性」は、従来の胃癌治療とは全く異なる新たな着想であり、今後、より詳細な研究の積み重ねが必要であるが、新たな胃癌治療が切り開かれる可能性があると考えている。外科的切除胃癌において、*CDX2*・*CDX1* ともに発現していない症例が 45%、いずれか1つが発現していない症例をそれぞれ過半数に認めたことは、「*CDX* 非発現胃癌をターゲットとした腸分化誘導」による癌治療の可能性を期待させるものであり、今後、更なる研究を積み重ねていきたい。

VII. 結論

CDX 発現のない胃癌細胞株 MKN-7・TMK-1 に CDX を導入すると、形態変化および増殖停止を生じることを発見した。LI-cadherin や KRT20 などの腸分化マーカーの発現を伴う G0-G1 arrest による増殖停止であり、腸への分化誘導による癌の増殖抑制であると考えられた。

胃癌細胞株では CDX を発現しているものは少ないが、外科切除胃癌症例の半数以上は CDX2・CDX1 を発現しておらず、CDX 発現陰性胃癌をターゲットとした腸分化の誘導は、今後の胃癌治療に新たな可能性を示唆するものと考えられた。

VIII. 謝辞

今回の研究を遂行する機会および御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科消化器内科学 小池和彦教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行するにあたり、直接、終始懇切なるご指導を頂いた山道信毅先生に深く感謝いたします。また以下の先生方に、特に多大なるご協力および有意義な御助言を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

藤田保健衛生大学医学部第一病理学教室

稲田 健一 准教授、塩竈 和也 助教、堤 寛 教授

東京大学先端科学研究センター油谷研究室

永江 玄太先生、油谷 浩幸 教授

東京大学消化器内科

影山 夏子氏、高橋 悠先生、坂口賀基先生、平山 慈子先生、松田梨恵先生、辻陽介先生、望月 暁先生、新美 恵子先生、小野 敏嗣先生、小田島 慎也先生、藤城光弘先生

その他様々な点でご協力頂きました、東京大学消化器内科の先生方に感謝申し上げます。

IX. 引用文献

1. Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, Kim JJ, Yeoh KG, Goh KL, Wu KC, Wu DC, Sollano J, Kachintorn U, Gotoda T, Lin JT, You WC, Ng EK, Sung JJ Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice. *Lancet Oncol* 9: 279-287.2008
2. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2007: a study of 21 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol* 43: 328-336
3. Shikata K, Kiyohara Y, Kubo M, Yonemoto K, Ninomiya T, Shirota T, Tanizaki Y, Doi Y, Tanaka K, Oishi Y, Matsumoto T, Iida M A prospective study of dietary salt intake and gastric cancer incidence in a defined Japanese population: the Hisayama study. *Int J Cancer* 119: 196-201.2006
4. Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S Cigarette smoking, alcohol consumption and subsequent gastric cancer risk by subsite and histologic type. *Int J Cancer* 101: 560-566.2002
5. Marshall BJ, Warren JR Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.1984
6. Vainio H, Heseltine E, Wilbourn J Priorities for Future IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Environ Health Perspect* 102: 590-591.1994
7. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345: 784-789.2001
8. Thrumurthy SG, Chaudry MA, Hochhauser D, Mughal M The diagnosis and management of gastric cancer. *BMJ* 347: f6367
9. Morris A, Nicholson G Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol* 82: 192-199.1987
10. Koizumi W, Narahara H, Hara T, Takagane A, Akiya T, Takagi M, Miyashita K, Nishizaki T, Kobayashi O, Takiyama W, Toh Y, Nagaie T, Takagi S, Yamamura Y, Yanaoka K, Orita H, Takeuchi M S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. *Lancet Oncol* 9: 215-221.2008
11. Filipe MI, Munoz N, Matko I, Kato I, Pompe-Kirn V, Jutersek A, Teuchmann S, Benz M, Prijon T Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer* 57: 324-329.1994
12. Nakamura K, Sugano H, Takagi K Carcinoma of the stomach in incipient phase: its

- histogenesis and histological appearances. *Gann* 59: 251-258.1968
13. Correa P A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 48: 3554-3560.1988
 14. Matsukuma A, Mori M, Enjoji M Sulphomucin-secreting intestinal metaplasia in the human gastric mucosa. An association with intestinal-type gastric carcinoma. *Cancer* 66: 689-694.1990
 15. Antonioli DA Precursors of gastric carcinoma: a critical review with a brief description of early (curable) gastric cancer. *Hum Pathol* 25: 994-1005.1994
 16. Sasaki I, Yao T, Nawata H, Tsuneyoshi M Minute gastric carcinoma of differentiated type with special reference to the significance of intestinal metaplasia, proliferative zone, and p53 protein during tumor development. *Cancer* 85: 1719-1729.1999
 17. Correa P, Piazuelo MB, Wilson KT Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 105: 493-498.2010
 18. Inada K, Nakanishi H, Fujimitsu Y, Shimizu N, Ichinose M, Miki K, Nakamura S, Tatematsu M Gastric and intestinal mixed and solely intestinal types of intestinal metaplasia in the human stomach. *Pathol Int* 47: 831-841.1997
 19. Wakatsuki K, Yamada Y, Narikiyo M, Ueno M, Takayama T, Tamaki H, Miki K, Matsumoto S, Enomoto K, Yokotani T, Nakajima Y Clinicopathological and prognostic significance of mucin phenotype in gastric cancer. *J Surg Oncol* 98: 124-129.2008
 20. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 2: 58-60.1975
 21. Morson BC Carcinoma arising from areas of intestinal metaplasia in the gastric mucosa. *Br J Cancer* 9: 377-385.1955
 22. Correa P Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 52: 6735-6740.1992
 23. You WC, Chang YS Epidemiology of precancerous gastric lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 8: 375-382.1993
 24. You WC, Blot WJ, Li JY, Chang YS, Jin ML, Kneller R, Zhang L, Han ZX, Zeng XR, Liu WD, et al. Precancerous gastric lesions in a population at high risk of stomach cancer. *Cancer Res* 53: 1317-1321.1993
 25. Matsukura N, Suzuki K, Kawachi T, Aoyagi M, Sugimura T, Kitaoka H, Numajiri H, Shirota A, Itabashi M, Hirota T Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation to complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 65: 231-240.1980
 26. Kushima R, Hattori T Histogenesis and characteristics of gastric-type

- adenocarcinomas in the stomach. *J Cancer Res Clin Oncol* 120: 103-111.1993
27. Almeida R, Silva E, Santos-Silva F, Silberg DG, Wang J, De Bolos C, David L Expression of intestine-specific transcription factors, CDX1 and CDX2, in intestinal metaplasia and gastric carcinomas. *J Pathol* 199: 36-40.2003
 28. Silberg DG, Furth EE, Taylor JK, Schuck T, Chiou T, Traber PG CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology* 113: 478-486.1997
 29. Satoh K, Mutoh H, Eda A, Yanaka I, Osawa H, Honda S, Kawata H, Kihira K, Sugano K Aberrant expression of CDX2 in the gastric mucosa with and without intestinal metaplasia: effect of eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 7: 192-198.2002
 30. Eda A, Osawa H, Yanaka I, Satoh K, Mutoh H, Kihira K, Sugano K Expression of homeobox gene CDX2 precedes that of CDX1 during the progression of intestinal metaplasia. *J Gastroenterol* 37: 94-100.2002
 31. Silberg DG, Sullivan J, Kang E, Swain GP, Moffett J, Sund NJ, Sackett SD, Kaestner KH Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology* 122: 689-696.2002
 32. Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Kontgen F, Beck F Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386: 84-87.1997
 33. Mutoh H, Satoh K, Kita H, Sakamoto H, Hayakawa H, Yamamoto H, Isoda N, Tamada K, Ido K, Sugano K Cdx2 specifies the differentiation of morphological as well as functional absorptive enterocytes of the small intestine. *Int J Dev Biol* 49: 867-871.2005
 34. Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ, Furness JB Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7318-7323.1999
 35. Tamai Y, Nakajima R, Ishikawa T, Takaku K, Seldin MF, Taketo MM Colonic hamartoma development by anomalous duplication in Cdx2 knockout mice. *Cancer Res* 59: 2965-2970.1999
 36. Subramanian V, Meyer BI, Gruss P Disruption of the murine homeobox gene Cdx1 affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* 83: 641-653.1995
 37. Hinoi T, Lucas PC, Kuick R, Hanash S, Cho KR, Fearon ER CDX2 regulates liver intestine-cadherin expression in normal and malignant colon epithelium and intestinal metaplasia. *Gastroenterology* 123: 1565-1577.2002
 38. Yamamoto H, Bai YQ, Yuasa Y Homeodomain protein CDX2 regulates goblet-specific MUC2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 813-818.2003
 39. Mesquita P, Jonckheere N, Almeida R, Ducourouble MP, Serpa J, Silva E, Pigny P,

- Silva FS, Reis C, Silberg D, Van Seuning I, David L Human MUC2 mucin gene is transcriptionally regulated by Cdx homeodomain proteins in gastrointestinal carcinoma cell lines. *J Biol Chem* 278: 51549-51556.2003
40. Yamamichi N, Inada K, Furukawa C, Sakurai K, Tando T, Ishizaka A, Haraguchi T, Mizutani T, Fujishiro M, Shimomura R, Oka M, Ichinose M, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H Cdx2 and the Brm-type SWI/SNF complex cooperatively regulate villin expression in gastrointestinal cells. *Exp Cell Res* 315: 1779-1789.2009
 41. Hinoi T, Gesina G, Akyol A, Kuick R, Hanash S, Giordano TJ, Gruber SB, Fearon ER CDX2-regulated expression of iron transport protein hephaestin in intestinal and colonic epithelium. *Gastroenterology* 128: 946-961.2005
 42. Traber PG, Wu GD, Wang W Novel DNA-binding proteins regulate intestine-specific transcription of the sucrase-isomaltase gene. *Mol Cell Biol* 12: 3614-3627.1992
 43. Park J, Schulz S, Waldman SA Intestine-specific activity of the human guanylyl cyclase C promoter is regulated by Cdx2. *Gastroenterology* 119: 89-96.2000
 44. Dang DT, Mahatan CS, Dang LH, Agboola IA, Yang VW Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2. *Oncogene* 20: 4884-4890.2001
 45. Chan CW, Wong NA, Liu Y, Bicknell D, Turley H, Hollins L, Miller CJ, Wilding JL, Bodmer WF Gastrointestinal differentiation marker Cytokeratin 20 is regulated by homeobox gene CDX1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1936-1941.2009
 46. Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, Loda M, Appelman HD, Cho KR, Fearon ER Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 159: 2239-2248.2001
 47. Guo RJ, Huang E, Ezaki T, Patel N, Sinclair K, Wu J, Klein P, Suh ER, Lynch JP Cdx1 inhibits human colon cancer cell proliferation by reducing beta-catenin/T-cell factor transcriptional activity. *J Biol Chem* 279: 36865-36875.2004
 48. Dang LH, Chen F, Ying C, Chun SY, Knock SA, Appelman HD, Dang DT CDX2 has tumorigenic potential in the human colon cancer cell lines LOVO and SW48. *Oncogene* 25: 2264-2272.2006
 49. Mizoshita T, Tsukamoto T, Nakanishi H, Inada K, Ogasawara N, Joh T, Itoh M, Yamamura Y, Tatematsu M Expression of Cdx2 and the phenotype of advanced gastric cancers: relationship with prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 129: 727-734.2003
 50. Liu Q, Teh M, Ito K, Shah N, Ito Y, Yeoh KG CDX2 expression is progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer. *Mod Pathol* 20: 1286-1297.2007
 51. Dang LH, Chen F, Knock SA, Huang EH, Feng J, Appelman HD, Dang DT CDX2

- does not suppress tumorigenicity in the human gastric cancer cell line MKN45. *Oncogene* 25: 2048-2059.2006
52. Zhang JF, Zhang JG, Kuai XL, Zhang H, Jiang W, Ding WF, Li ZL, Zhu HJ, Mao ZB Reactivation of the homeotic tumor suppressor gene CDX2 by 5-aza-2'-deoxycytidine-induced demethylation inhibits cell proliferation and induces caspase-independent apoptosis in gastric cancer cells. *Exp Ther Med* 5: 735-741
 53. Mutoh H, Sakurai S, Satoh K, Tamada K, Kita H, Osawa H, Tomiyama T, Sato Y, Yamamoto H, Isoda N, Yoshida T, Ido K, Sugano K Development of gastric carcinoma from intestinal metaplasia in Cdx2-transgenic mice. *Cancer Res* 64: 7740-7747.2004
 54. Heilmann KL, Hopker WW Loss of differentiation in intestinal metaplasia in cancerous stomachs. A comparative morphologic study. *Pathol Res Pract* 164: 249-258.1979
 55. Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut* 32: 1110-1113.1991
 56. Konno-Shimizu M, Yamamichi N, Inada K, Kageyama-Yahara N, Shiogama K, Takahashi Y, Asada-Hirayama I, Yamamichi-Nishina M, Nakayama C, Ono S, Kodashima S, Fujishiro M, Tsutsumi Y, Ichinose M, Koike K Cathepsin E is a marker of gastric differentiation and signet-ring cell carcinoma of stomach: a novel suggestion on gastric tumorigenesis. *PLoS One* 8: e56766.2013
 57. Naito Y, Oue N, Hinoi T, Sakamoto N, Sentani K, Ohdan H, Yanagihara K, Sasaki H, Yasui W Reg IV is a direct target of intestinal transcriptional factor CDX2 in gastric cancer. *PLoS One* 7: e47545
 58. Satake S, Semba S, Matsuda Y, Usami Y, Chiba H, Sawada N, Kasuga M, Yokozaki H Cdx2 transcription factor regulates claudin-3 and claudin-4 expression during intestinal differentiation of gastric carcinoma. *Pathol Int* 58: 156-163.2008
 59. Yokozaki H Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. *Pathol Int* 50: 767-777.2000
 60. Yamamichi N, Inada K, Ichinose M, Yamamichi-Nishina M, Mizutani T, Watanabe H, Shiogama K, Fujishiro M, Okazaki T, Yahagi N, Haraguchi T, Fujita S, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H Frequent loss of Brm expression in gastric cancer correlates with histologic features and differentiation state. *Cancer Res* 67: 10727-10735.2007
 61. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T Dcl1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nat Genet* 45: 98-103
 62. Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, Haraguchi T, Ozaki Y, Fujita S,

- Mizutani T, Furukawa C, Fujishiro M, Ichinose M, Shiogama K, Tsutsumi Y, Omata M, Iba H Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. *Clin Cancer Res* 15: 4009-4016.2009
63. Watanabe M, Kato J, Inoue I, Yoshimura N, Yoshida T, Mukoubayashi C, Deguchi H, Enomoto S, Ueda K, Maekita T, Iguchi M, Tamai H, Utsunomiya H, Yamamichi N, Fujishiro M, Iwane M, Tekeshita T, Mohara O, Ushijima T, Ichinose M Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and *Helicobacter pylori* antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis. *Int J Cancer* 131: 2632-2642.2012
64. Camilo V, Barros R, Sousa S, Magalhaes AM, Lopes T, Mario Santos A, Pereira T, Figueiredo C, David L, Almeida R *Helicobacter pylori* and the BMP pathway regulate CDX2 and SOX2 expression in gastric cells. *Carcinogenesis* 33: 1985-1992