

## 論文の内容の要旨

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

### 【背景・目的】

腸上皮化生は胃癌の発生母地であるピロリ菌感染を伴う慢性胃炎に好発することが古くから知られており、腸分化を制御する CDX 遺伝子 (CDX2・CDX1) が胃上皮細胞に異所性に発現することによって誘導されると考えられている。Correa は胃炎から腸上皮化生を経由し胃癌を発症するというモデルを提唱したが、免疫組織学的評価が一般的になると、胃型や胃腸混合型を有する胃癌の存在が判明してきた。また、微小胃癌の背景粘膜に必ずしも腸上皮化生を伴わないこと、微小胃癌の背景粘膜の化生は 80% が胃腸混合型腸上皮化生であることが報告され、腸型の腸上皮化生より胃腸混合型の腸上皮化生で発癌リスクが高いということが示唆されるなど、Correa 仮説と必ずしも合致しない実験結果が報告されるようになった。

本研究を開始するにあたり、われわれは当院で内視鏡治療切除された 77 例の早期胃癌検体の癌部および背景粘膜を評価したところ、既報通り化生を伴わない症例を 9.1% (7 例) にみとめ、癌の背景粘膜は胃腸混合型形質が 44 例 (57.1%) と多かったが、癌部で胃腸混合型を示す病変は 17 例 (22%)、腸型も 14 例 (18.2%) に過ぎず、胃型および無形質型が比較的多くみられ、背景粘膜の腸形質とは癌部の形質が合致しない傾向がしばしば見られた。このように胃癌の背景粘膜は腸上皮化生が高頻度に随伴し腸型・胃型の形質が様々に混在するものの、背景粘膜の化生の進展自体が胃癌の悪性化につながるとは必ずしも言い切れない状況であった。我々は多くの癌は分化の異常を背景に発症することも踏まえ、胃癌もまた消化管分化の制御異常が発症・進展に関連している可能性に着目し、胃癌に腸への分化を誘導すれば癌の増殖が抑制できるのではないかと仮説を立てた。その仮説を検討するため胃癌細胞株に腸上皮化生・腸分化のマスター遺伝子である CDX を導入して形質転換を起こすことにより、胃癌の形質に影響するかを解析した。

### 【方法】

#### A: CDX 遺伝子の導入

ウイルスベクタープラスミド pMXs-IRES-puro に CDX2・CDX1 cDNA をそれぞれ挿入した後、エンベロープとなる VSVG 発現プラスミドと共にパッケージング細胞である PLAT-GP 細胞にトランスフェクションすることによって、CDX2・CDX1 発現レトロウイルスを産生した。これをヒト胃癌由来細胞株 MKN-7・TMK-1 へと感染させ puromycin による薬剤選択を行った後に、Western blotting による CDX タンパクの

発現解析、CDX 下流遺伝子群の RT-PCR による発現解析を行った。また CDX 導入後の胃癌細胞株の増殖速度についても同様に、puromycin 選択後に MTT アッセイで評価した。

#### B: CDX 導入後の増殖停止メカニズムの検討

CDX による細胞増殖停止メカニズムを調べるため、MKN-7・TMK-1 に CDX2・CDX1 を導入・薬剤選択後に、セルブロックを作成し、活性型 caspase-3 の免疫染色および TUNEL 法により、アポトーシスの評価を行った。また CDX 導入・薬剤選択後の細胞で老化関連  $\beta$ -galactosidase 反応実験、フローサイトメトリーによる細胞周期解析、抽出タンパクを用いた Western blotting による細胞周期関連タンパクの発現解析を行った。また、MKN-7 については CDX2・CDX1 導入・薬剤選択後に網羅的遺伝子発現解析を行った。

#### C: 外科切除胃癌検体における CDX2・CDX1 の発現検討

外科切除胃癌検体を用いて腫瘍部および背景粘膜における CDX2 および CDX1 の発現を、免疫染色を施行して評価した。

### **【結果】**

#### A: CDX 遺伝子の導入

胃癌細胞に対する CDX 転写因子の効果を評価するため、CDX2 と CDX1 をそれぞれレトロウイルスベクターを用いて CDX の発現がない胃癌細胞株 MKN-7 および TMK-1 に導入した。すると、両細胞ともに 5 日後以降、伸展・平板化を伴う形態変化が生じ、MTT アッセイでは 7~9 日後には増殖が停止することがわかった。MKN-7 では著明な形態変化と完全な増殖停止を認め、TMK-1 は MKN-7 と比べると変化はやや穏やかであるものの、同様の傾向を示した。CDX を導入した細胞から抽出したタンパクを用いて Western blotting を行うと、CDX2・CDX1 の導入により確実に CDX2、CDX1 各々のタンパクは発現していた。また、抽出した RNA において RT-PCR を施行すると、腸分化マーカーである *LI-Cadherin* や *KRT20* (*cytokeratin 20*) が誘導され、導入した CDX2、CDX1 が正常に機能し、腸分化が誘導された状態であることが確認できた。これらの結果から、CDX 非発現胃癌細胞株 MKN-7・TMK-1 に CDX を導入することにより、「腸への分化誘導を伴う形態変化と増殖停止」という形質転換が引き起こされることがわかった。

#### B: CDX 導入後の増殖停止メカニズムの検討

活性型 caspase-3 の免疫染色および TUNEL アッセイを施行したが、MKN-7 ではいずれの方法においても CDX 導入によりアポトーシス細胞の割合増加はみられなかった。TMK-1 では CDX の導入で TUNEL 法では有意に、活性型 caspase-3 では有意差はなかったが若干のアポトーシス細胞の増加傾向がみられた。老化関連 (Senescence-associated)  $\beta$ -galactosidase 活性反応は空ベクター導入細胞、CDX 導入細胞のそれぞれで陰性であり、急激な老化による増殖停止ではないと考えられた。そこでフローサイトメトリーによる細胞周期解析を施行したところ、CDX を導入した両細胞で G0-G1 期の分布が増

加し、S 期が減少し、TMK-1 では G2/M 期も減少しており G0-G1 arrest が主に生じている状態であると考えられた。Western blotting による細胞周期関連、タンパクの解析では、G1→S 期のチェックポイントに関係する Cyclin E2 や CDK4 の発現が、両細胞株において CDX を導入した細胞に共通して発現が低下しており、G0-G1 arrest として矛盾しない結果であった。つまり、CDX を発現していない MKN-7 および TMK-1 に CDX を導入した際に生じた形態変化と増殖停止は、分化促進により G0-G1 arrest が主に誘導され、アポトーシスも一部で伴った結果であるということが分かった。

CDX 導入により劇的な形態変化と急速な増殖停止が生じた MKN-7 を用いて、網羅的遺伝子発現解析および KEGG pathway 解析を施行したところ、種々の転写因子の発現活性が確認された。Pathway 解析では p53 経路・MAPK 経路・Jak-STAT 経路など癌促進・癌抑制の双方の活性化が認められ、解釈が難しく今後の課題と考えた。我々は発現が上昇している遺伝子の中で特に消化管幹細胞マーカーとして知られている、LGR5 と DCLK-1 の上昇に注目した。この結果は RT-PCR でも確認され、CDX の導入は、LI-cadherin や KRT20 の腸分化マーカーの誘導を伴う腸への分化傾向を示すと同時に、癌増殖抑制の背景には腸幹細胞への reprogramming を生じている可能性も示唆された。

#### C: 外科切除胃癌検体における CDX2・CDX1 の発現検討

外科的に切除された胃癌検体をランダムに 89 症例選択し、免疫染色で CDX2・CDX1 の染色性を評価した。CDX の発現が 10%未満である CDX2 陰性胃癌が 45 例(51.7%)、CDX1 陰性胃癌が 59 例(68.5%)に認められた。CDX2・CDX1 の発現は有意に相関し(相関係数: 0.62)、CDX2・CDX1 とともに発現しない胃癌は 40 例(44.9%)認められた。背景粘膜では CDX の発現は腸上皮化生に限られ、CDX1 はほぼ 90-100%腸上皮化生腺管粘膜に発現している一方、CDX2 は腸上皮化生の腺底部に強く発現が認められ、発現のない腸上皮化生もあった。腫瘍と背景粘膜の CDX の発現には明らかな傾向性はなく、①腫瘍部で CDX 陰性かつ背景粘膜で CDX 陽性の症例が 27 例、②腫瘍部で CDX 陽性かつ背景粘膜では CDX 陰性の症例が 15 例、③ともに CDX を発現している症例が 33 例、④ともに CDX を発現していない症例が 10 例、と腫瘍と背景粘膜の CDX の発現には、考えうる 4 パターン全てが存在し、明らかな傾向性はみられなかった。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、本研究で言及困難と考えた。

#### **【結語】**

本研究では、CDX を発現していない胃癌細胞株に CDX2・CDX1 を発現させ腸への分化を誘導すると、G0-G1 arrest が起こり、癌の増殖抑制を生じることを発見した。また、外科切除胃癌検体による検討では CDX 陰性胃癌は臨床には多く存在することが判明し、CDX 導入による抗癌活性が期待できる症例が実際の胃癌には多く存在していると考えた。

CDX を発現していない胃癌をターゲットとした腸分化誘導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、今後、胃癌治療になりうるため、胃癌治療を視野に、CDX の発現を制御するメカニズムや *in vivo* での検証のため CDX 発現を誘導する薬剤のスクリーニングについて更なる解析が必要と考えた。