

学 位 論 文 要 約

博士論文題目 Notch1 遺伝子を介した *Helicobacter pylori* 感染における胃粘膜萎縮と発癌機構の解明

.....東北大学大学院医学系研究科 医科学 専攻

.....内科病態学 講座 消化器病態学 分野

氏名.....金 笑奕.....

【背景・目的】 胃上皮において *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) 感染により慢性胃炎が惹起され、胃粘膜萎縮・腸上皮化生が進展し、この過程で分化型胃癌が生じると考えられている。Notch は膜貫通型受容体で幹細胞維持・分化の制御に重要な役割を果す。Notch 受容体(Full-length Notch) は ADAM17、さらに γ -secretase により 2 回切断を受け細胞内ドメイン(NICD)のみとなり、核内へ移行し細胞内シグナルを伝達する。Notch シグナル異常は腫瘍の発生進展に関わることが明らかになりつつあるが、胃粘膜萎縮を母地とした胃癌発生への関与は不明である。そこで、*H.pylori* 感染による胃粘膜萎縮進展過程における Notch1 の発現と関与、さらに胃癌発癌機序について *in vitro* 及び *in vivo* で検討することを目的とした。

【方法・結果】 Notch1 受容体は免疫組織化学的検討でヒト正常固有胃腺の壁細胞や主細胞に主に発現していた。次に *H.pylori* 長期感染(1年間)マウスモデルを作製し検討した。*H.pylori* 長期感染マウス群では、形態学的に胃粘膜萎縮を認め、固有胃腺の分化維持に関わる Sox2、壁細胞マーカーである Proton pump(H,K-ATPase) 及び Notch1 各々の mRNA レベルでの発現は、定量的 PCR(Q-PCR)を用いた検討で有意に低下していた。胃上皮培養細胞株 GSM06 及び AGS を用い *H.pylori* 刺激し Western blot 及び Q-PCR で解析した結果、*in vivo* と同様に Sox2、Proton pump 及び Notch1 の発現が有意に抑制された。このため、Notch1 と Sox2 との相互作用に関して、Sox2 あるいは Notch1 siRNA を遺伝子導入し RNA 干渉法を用いて解析を進めた。その結果、Sox2 発現抑制は Notch1 の発現に影響しなかった一方で、Notch1 発現抑制は Sox2 の発現を有意に低下させた。そこでヒト Sox2 プロモーター上に NICD が結合する motif (RBP-J κ)をコンピューター解析で同定後、クロマチン免疫沈降(ChIP)法を用いて、NICD が直接 Sox2 プロモーター上の RBP-J κ motif に結合することを確認した。以上より、*H.pylori* 感染による Notch1 発現抑制は、Sox2 の発現を抑制し、Proton pump の発現を低下させ、胃粘膜萎縮に関与することが示唆された。

一方、免疫組織化学での検討では、ヒト分化型胃癌(n=30)においては Notch1 受容体の発現を認めなかった。

(書式18) 課程博士

ヒト胃癌培養細胞株 AGS 及び NUGC-4 に対して Notch1 siRNA を用い Notch1 の発現を抑制したところ、MTS アッセイでは細胞増殖能の有意な亢進を認めた。このため、Notch1 受容体(Full-length Notch1)の発現維持が癌を抑制すると類推し、次に ADAM17 を阻害する Marimastat と γ -secretase 阻害剤 2 剤を用いて比較検討を行った。Marimastat 存在下でのみ、ヒト胃癌培養細胞株において Notch1 受容体(Full-length Notch1)の発現が回復し、細胞増殖能が抑制され、Spheroid アッセイによる検討では造腫瘍能も抑制された。また、Marimastat 存在下ではタンパク及び mRNA レベルで癌抑制遺伝子 p53 の発現が誘導された。つまり、Marimastat 存在下で Notch1 受容体(Full-length Notch1)の発現が回復維持すると、p53 の発現が誘導され、細胞増殖能と造腫瘍能が低下することが示唆された。

【結論】 *H.pylori* 感染は Notch1 受容体の発現を抑制することによって、Sox2 抑制を介して胃粘膜萎縮を誘導するとともに、癌抑制遺伝子 p53 による調節制御が逸脱し癌化に寄与することが示唆された。