

氏 名	キン ショウイ 金 笑奕
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	2016 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学 専攻
学位論文題目	Notch1 遺伝子を介した <i>Helicobacter pylori</i> 感染 における胃粘膜萎縮と発癌機構の解明
論文審査委員	主査 教授 下瀬川 徹 教授 笹野 公伸 教授 福島 浩平

論 文 内 容 要 旨

【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たす。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与す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、

(書式12)

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-Jκ)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-Jκ 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。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。

審 査 結 果 の 要 旨

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

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 消化器病態学分野

氏名 金 笑楽

【研究の背景】

胃粘膜では *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) 感染により慢性胃炎が惹起され、壁細胞や主細胞の減少を伴う胃粘膜萎縮が進展し分化型胃癌が生じる。細胞の分化・維持に関与する膜貫通型受容体 Notch は固有胃腺の分化も担っている。更に Notch シグナル異常は発癌に関与す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発癌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検討することを目的とした。

【研究の方法・結果・考察】

ヒト正常固有胃腺に対する免疫組織化学的検討では、Notch1 受容体は壁細胞や主細胞に主に発現し固有胃腺の分化成熟に関与することが考えられた。そこで、*H.pylori* 長期感染(1 年間)マウスモデルを作製し検討を進めた。*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 及び Notch1 の mRNA 発現は有意に低下していた。次に胃上皮培養細胞株 GSM06 及び AGS を用い *H.pylori* 刺激し Western blot 及び Q-PCR で解析した結果でも、Sox2、Proton pump 及び Notch1 の発現は有意に抑制された。また、Notch1 siRNA による RNA 干渉の結果、Notch1 発現抑制によって Sox2 の発現は有意に低下した。ヒト Sox2 プロモーター上には Notch1 細胞内シグナルを担う細胞内ドメイン(NICD)が結合する RBP-J κ motif が存在し、クロマチン免疫沈降法を用いて、NICD が同 motif に結合することが判明した。

一方、ヒト分化型胃癌 30 例においては、免疫組織化学的に Notch1 受容体の発現はいずれも認めなかった。このため Notch1 受容体の発現維持が胃癌に対して抑制的に作用すると作業仮説を立て、まず 2 種類のヒト胃癌培養細胞株に対して Notch1 siRNA を用い Notch1 の発現を抑制したところ、MTS アッセイで細胞増殖能の有意な亢進を認めた。プロテアーゼ ADAM17 により Notch1 受容体は切断を受けるが、その阻害剤 Marimastat を用いて Notch1 受容体の発現を回復維持させたところ、逆に細胞増殖能が抑制され、Spheroid アッセイでも造腫瘍能が抑制され、この際癌抑制遺伝子 p53 の発現が誘導された。

以上により、*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、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。

第一次審査において指摘された不備が適切に修正されており、審査の結果、本論文内容が十分学位に値することが確認された。よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。