

論文の内容の要旨

論文題目 胃癌発生母地である SPEM 生成過程における

EGF 受容体シグナル伝達系の関与について

-DMP-777 による急性壁細胞喪失モデルによる検討-

指導教員 瀬戸 泰之 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

小川 雅子

背景

胃癌の組織型は分化型と未（低）分化型とに分類される。胃粘膜から分化型胃癌が発生する病理組織学的変化として、壁細胞の喪失による萎縮性胃炎から胃粘膜化生へ、さらに *dysplasia* を経て胃癌が発生するという Correa の仮説が知られている（図 1）。この仮説では胃粘膜の化生性変化が癌の発生母地とされており、化生腺管の形成や維持に関与する因子を理解することは癌化機構を解明する上で重要である。これまで慢性萎縮性胃炎や化生を起こす外的因子として、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の感染が知られているが、種々の内的因子の関与については不明な点が多い。

近年、Schmidt らは SP/TFF2 を高発現する化生を spasmolytic polypeptide/trefoil factor family 2 (SP/TFF2) expressing metaplasia (SPEM) として報告した。正常胃

底腺領域の腺管が、表層粘液細胞からなる胃小窩と壁細胞、頸部粘液細胞、主細胞、内分泌細胞からなる腺管構造をとるのに対し、SPEM においては腺管の底部が SP/TFF2 を分泌する異常な粘液細胞におきかわり、幽門腺に類似した形態となる（図 2）。胃癌切除標本の検索で、癌周囲に高頻度に SPEM がみられたことから、SPEM を前癌病変とみなす考えも提出されている。SPEM はいわゆる偽幽門腺化生に類似するが、著者と共同研究者は SPEM という概念のもとで発現する分子に着目して解析を行ってきているので、本研究では SPEM という呼称を用いる。

SP/TFF2 は SPEM 構成細胞で高発現するペプチドで、trefoil factor family に属し、粘膜修復への関与が報告されている。本研究では SP/TFF2 欠損マウスを用いることにより、SP/TFF2 の SPEM 発生、維持に関する役割を検討した。

また、壁細胞の喪失から SPEM に至る過程には、壁細胞から分泌される epidermal growth factor (EGF) 受容体リガンド (transforming growth factor-alpha (TGF- α))、アンフィレギュリン、heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) などの関与が想定される。そこで、突然変異により EGF 受容体の機能が著しく低下した *waved-2* マウスを用いて SPEM 発生における EGF 受容体系の関与を検討した。

本研究では DMP-777 による急性壁細胞喪失実験系を用いて SPEM 形成に関与する因子を検討した。DMP-777 を動物に投与すると、胃底腺領域で壁細胞が減少し表層粘液細胞の増加と SPEM が発生する。これらは *H. pylori* による慢性萎縮性胃炎でしばしばみられる変化であるが、DMP-777 モデルでは DMP-777 に好中球エラスターゼ阻害活性があるため炎症反応が起こらない。したがって、炎症反応の修飾なく壁細胞喪失後の胃底腺領域の粘膜変化について検討できると

いう点で、本モデルは内的因子の検索に適していると考えられる。Goldenring らの単離壁細胞を用いた実験結果によれば、DMP-777 は分泌されたプロトンを管腔から細胞内に逆流させるプロトノフォア作用によって細胞を傷害する。本研究の第一章では DMP-777 の壁細胞特異性および作用機序を生体内で検証するため、ラットにプロトンポンプ阻害剤のオメプラゾールを投与して壁細胞の酸分泌活動を抑制し、DMP-777 の作用への影響について検討した。

結果

第一章：DMP-777 の壁細胞傷害作用における胃酸分泌阻害の影響

DMP-777 にオメプラゾールを併用してプロトンの動きを阻害した場合、DMP-777 単独投与時と比較して壁細胞数の減少、ならびに表層粘液細胞と増殖細胞の増加はいずれも軽度であった（図 3、4）。

第二章：化生における SP/TFF2 と EGF 受容体シグナル伝達系の関与（図 5）

SP/TFF2 欠損マウス及び wild type (WT) 対照マウスに DMP-777 を 0、1、3、7、14 日間投与し、壁細胞喪失後の腺構築の変化を比較検討した。また、0、1、3 日間投与群では血漿ガストリン濃度を測定した。SP/TFF2 欠損マウスで表層粘液細胞数の立ち上がりはやや緩徐であった以外は、WT 対照マウスと SP/TFF2 欠損マウスで DMP-777 投与後の腺構築の変化及び血漿ガストリン濃度に大きな差異は認めなかった（図 9）。SP/TFF2 欠損マウスでも WT マウスと同様、DMP-777 を 7 日間及び 14 日間投与した群では MUC6 陽性の粘液細胞化生を認めた（図 6、9）。

EGF 受容体シグナル伝達系に障害を持つ *waved-2* マウス及び *waved-2* ヘテロ

対照マウスに DMP-777 を 0、1、3、7、14 日間投与した。さらに薬剤を 14 日間投与し、14 日間休薬後に屠殺する群 (R14) を設けた。waved-2 ヘテロ、ホモマウスとも DMP-777 の 1 日投与により 70%以上の壁細胞を喪失した。ヘテロマウスでは DMP-777 を 1 日投与した群で表層粘液細胞が著増したが、waved-2 マウスでは 3 日間投与した群で初めて有意に増加した (図 7)。一方 SPEM は、ヘテロマウスでは DMP-777 を 7 日間投与した群で出現したのに対し、waved-2 マウスでは 3 日間投与後に発生した (図 8)。血漿ガストリン濃度は、ヘテロ対照マウスでは、DMP-777 を 1 日投与した群で急激に上昇したが、waved-2 マウスでは、1 日投与群の立ち上がりは緩やかで、3 日間投与した群でヘテロ対照マウスと同程度に上昇した。いずれのマウスにおいても壁細胞の減少、表層粘液細胞増加、SPEM は可逆的であった (図 9)。

考察

第一章では、DMP-777 の壁細胞特異性および作用機序を生体内で検証した。ラットに DMP-777 を投与する際にオメプラゾールを併用してプロトンの動きを阻害すると、壁細胞の減少、表層粘液細胞と増殖細胞の増加はいずれも DMP-777 単独投与時に比べ軽減した (図 4)。以上のように、プロトンの動きを封じた結果 DMP-777 の細胞傷害作用が軽減したことから、DMP-777 の細胞傷害作用にプロトンが重要な役割を果たすことが示唆される。これは DMP-777 が壁細胞特異的なプロトノフォアとして作用するという単離壁細胞での実験結果を支持するものと考えられた。

第二章では、SP/TFF2 分子、あるいは EGF 受容体シグナル伝達系が SPEM や表層粘液細胞増加にどのように関与するか、DMP-777 による急性壁細胞喪失実

験系を用いて検討した。SPEM は SP/TFF2 が胃底腺の底部で発現することによって特徴づけられる。SP/TFF2 が SPEM の発生過程でオートクリン、パラクリン的に働く可能性について、SP/TFF2 欠損マウスを用いて検討した。SP/TFF2 欠損マウスでも WT マウスと同様、DMP-777 投与後に SPEM に相当する粘液細胞化生が発生した。したがって SP/TFF2 は SPEM のマーカーではあるが、その形成には必須ではないと考えられる。

胃底腺領域では表層粘液細胞、壁細胞、主細胞に EGF 受容体を発現していることから、壁細胞が分泌する EGF 受容体リガンドがこれらの細胞に働きかけることによって腺構築が維持されている可能性がある。そこで *waved-2* マウスを用いて化生の形成や維持の過程で EGF 受容体シグナル伝達系が果たす役割を検討した。*waved-2* マウスでは EGF 受容体の突然変異により受容体機能が著しく低下している。*waved-2* マウスでは対照のヘテロマウスに比べ DMP-777 投与後の表層粘液細胞の増加は緩徐に起こる一方、SPEM の発生は急速であった。Nomura らによるガストリン欠損マウスを用いた実験では、DMP-777 投与後表層粘液細胞数の増加はみられず、一方 SPEM はわずか 1 日の投与で発生した。これらの結果よりガストリンは表層粘液細胞の増加に必須であること、ガストリンの欠損が SPEM の形成を促進することがわかった。*waved-2* マウスの DMP-777 に対する反応はガストリン欠損マウスのそれと類似している。EGF 受容体シグナル伝達系はガストリンの遺伝子発現を促進することが知られている。DMP-777 投与後は壁細胞の喪失による胃内酸度の低下のため高ガストリン血症を呈するが、実際 *waved-2* マウスでは、DMP-777 を 1 日投与した後の血漿ガストリン濃度がヘテロ対照マウスに比し有意に低かった。*waved-2* マウスにおける表層粘液細胞増加の遅れはこれを反映するものと考えられる。その一方で *waved-2* マウスでも

DMP-777 を 3 日間投与した群はヘテロマウスと同程度の高ガストリン血症を呈したにも拘わらず、対照マウスよりも急速に SPEM を生じた。したがってこの化生性変化の加速にはガストリン低下ではなく、*waved-2* マウスに内在している EGF 受容体シグナル伝達系の障害が関与していると考えられる。

結論

SP/TFF2 は SPEM のマーカーではあるがその形成には必須ではない。EGF 受容体シグナル伝達系は壁細胞喪失後の化生の発生に抑制的に働くと考えられる。

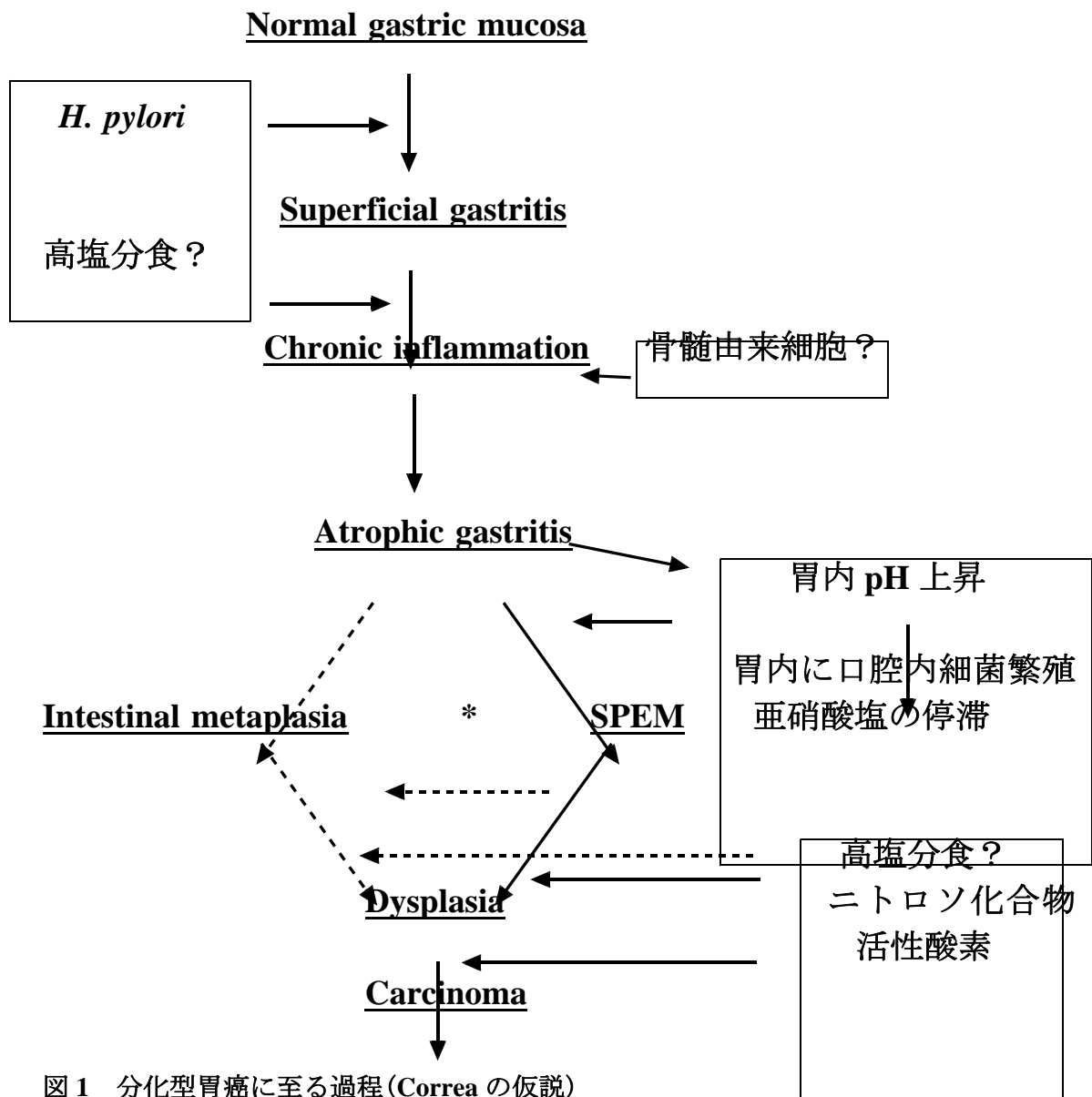


図1 分化型胃癌に至る過程(Correaの仮説)

* Yoshizawaらは、SPEMから腸上皮化生に進展しうることを報告した

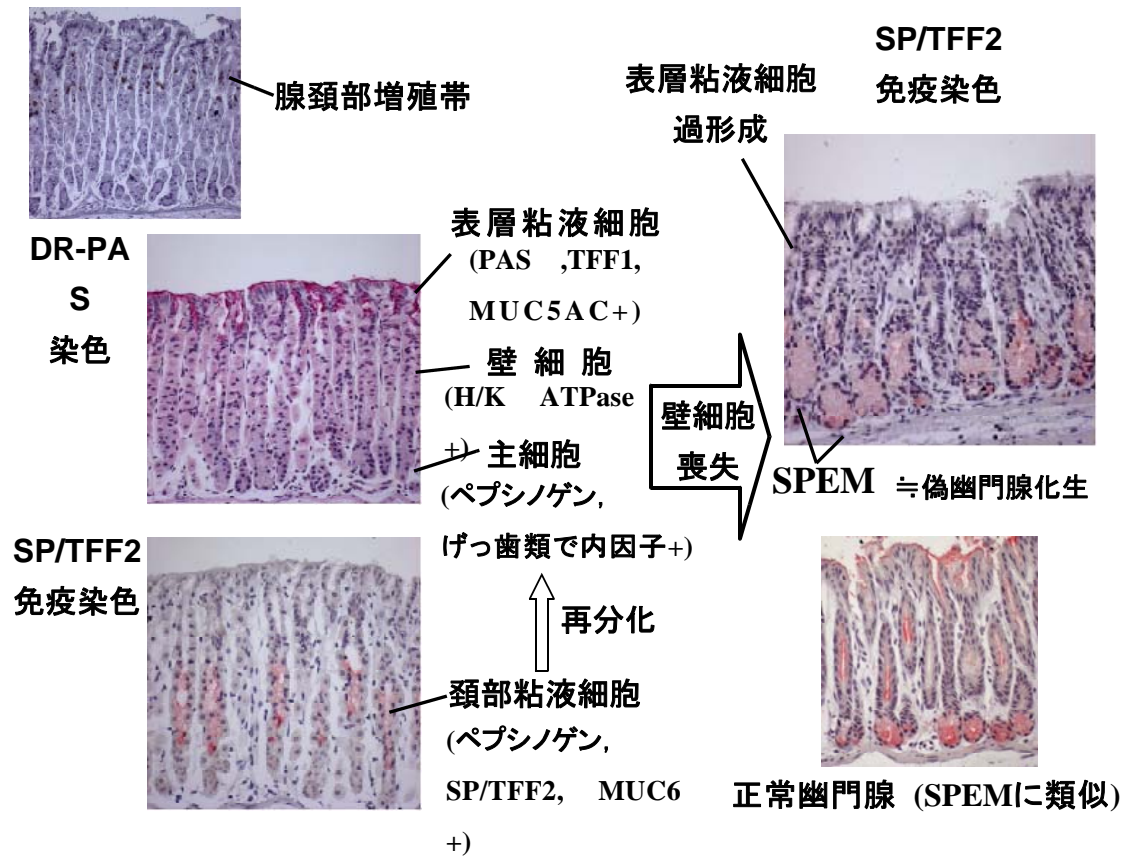


図2 マウスの正常胃底腺構造と壁細胞の喪失による構造変化

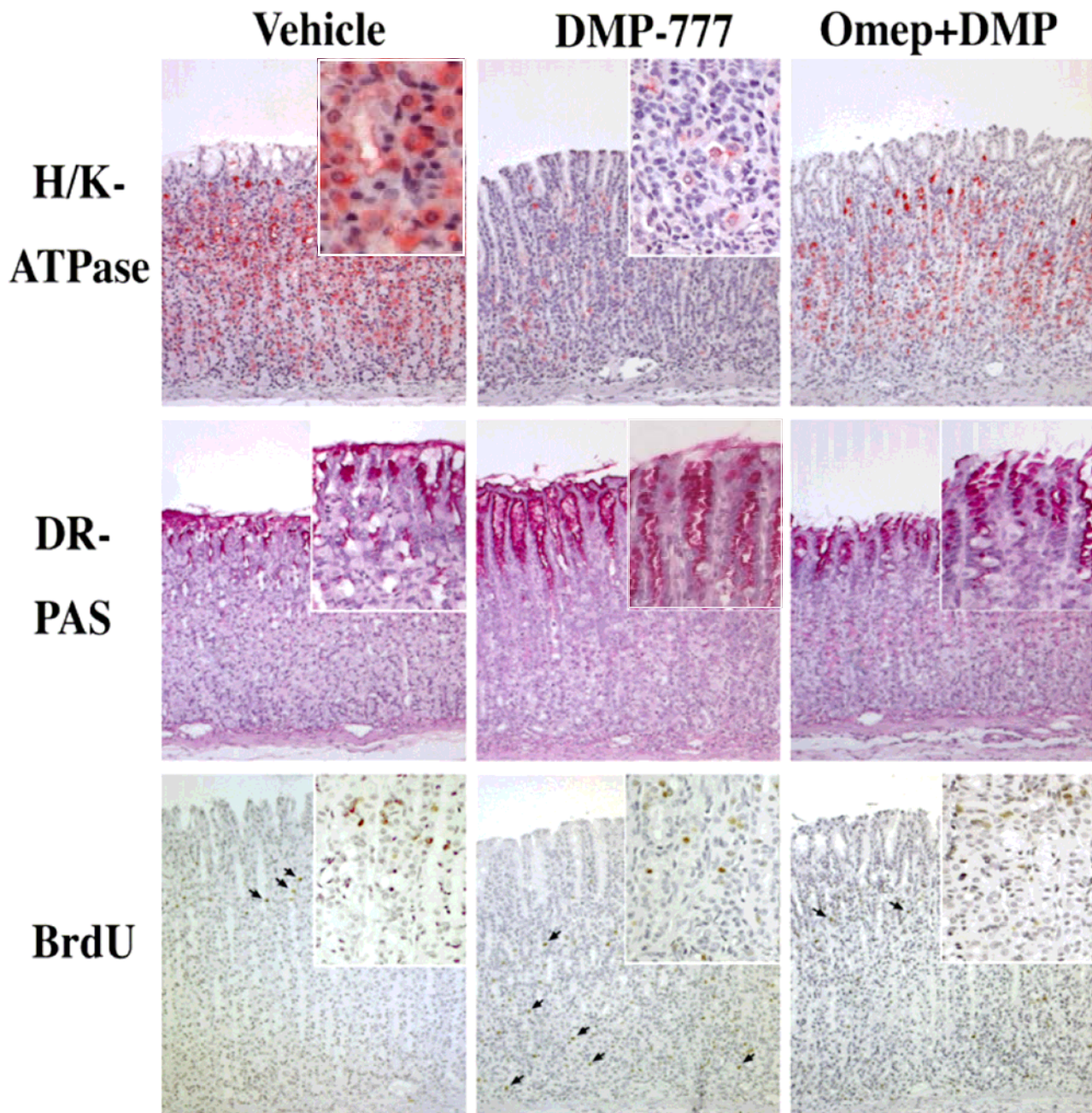


図3 DMP-777 及びオメプラゾール投与による胃底腺構築の変化 (X100)

左は対照溶液のみ4日間投与した1B群、中央はDMP-777を2日間+対照溶液を投与した2B群、右はオメプラゾールを2日間投与後、DMP-777とオメプラゾールを2日間投与した4B群。

上段：抗H/K-ATPase抗体による免疫染色。囲みは壁細胞の強拡大像。DMP-777単独投与群では壁細胞は空胞化する。

中段：DR-PAS染色像。表層部分の拡大像を囲みで示す。

下段：抗 BrdU 抗体による染色。矢印は BrdU 陽性細胞を示す。囲みは BrdU 陽性細胞の散らばりを強拡大で示したもの。

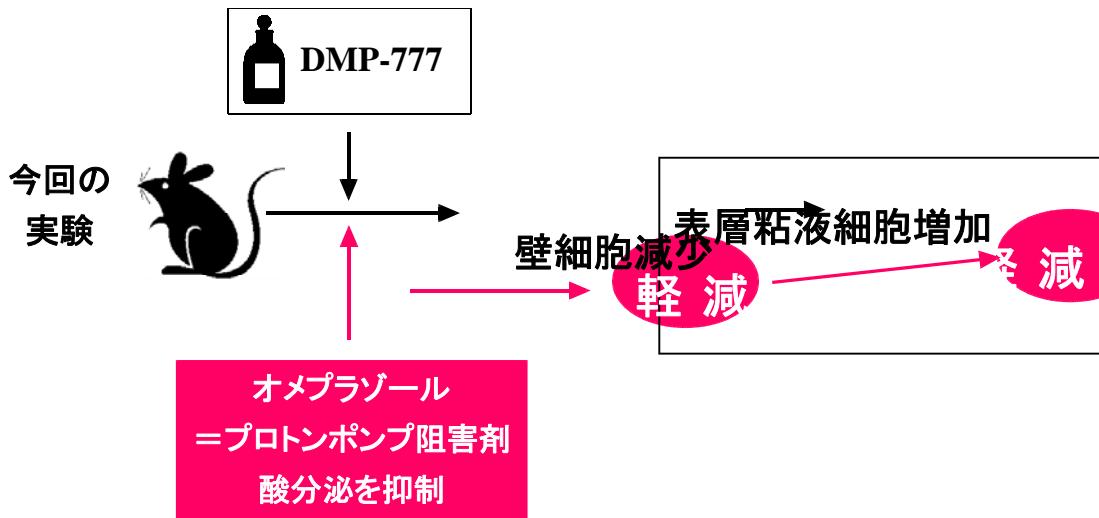
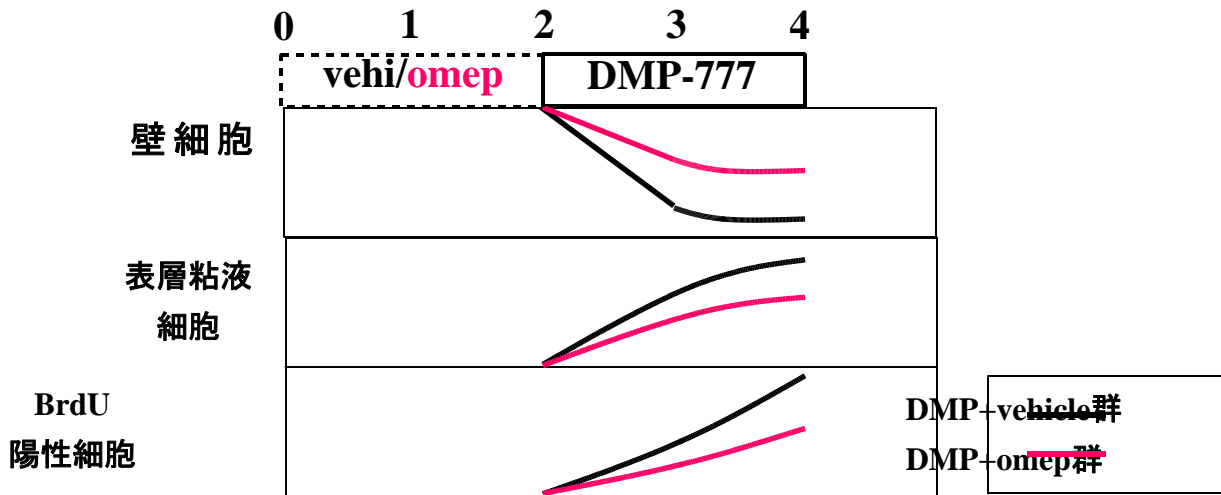


図4 第一章の結果のまとめ

DMP-777 投与の際にオメプラゾールを併用して酸分泌を抑制すると、壁細胞の減少、表層粘液細胞と増殖細胞の増加はいずれも DMP-777 単独投与時に比べ軽減した。DMP-777 の壁細胞傷害作用にプロトンが重要な役割を果たすことが示唆され、これは単離壁細胞での結果（プロトノフォア作用）を支持している。

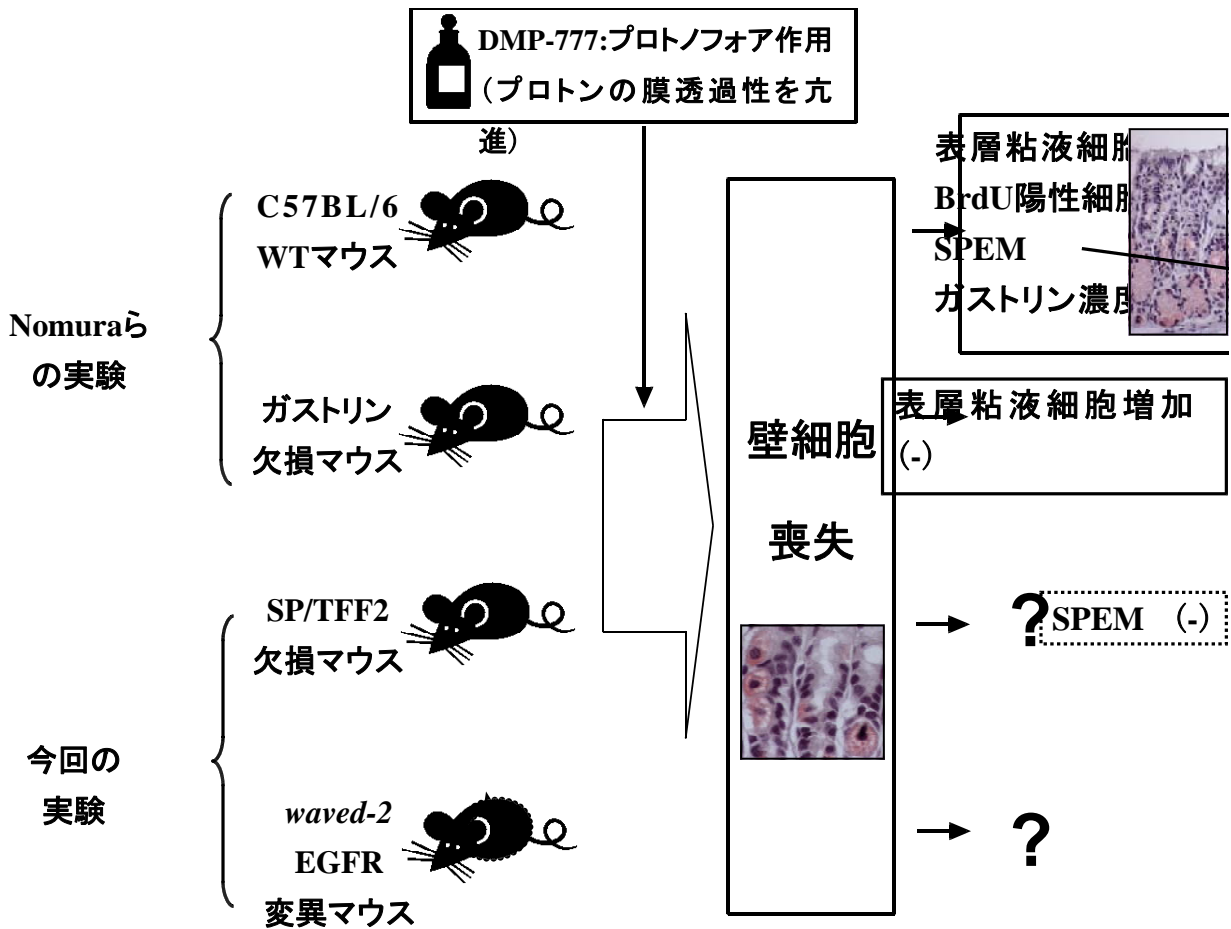
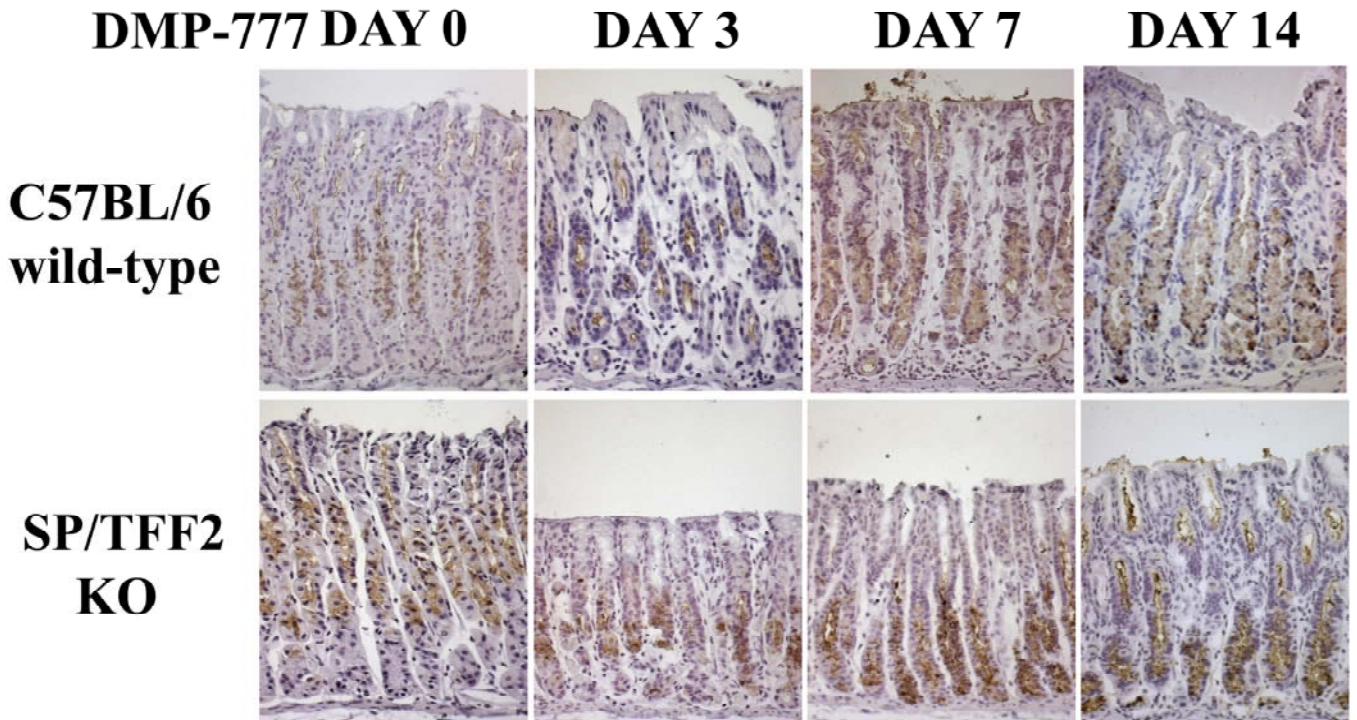


図5 DMP-777投与後の腺構築の変化における内的因子の関与

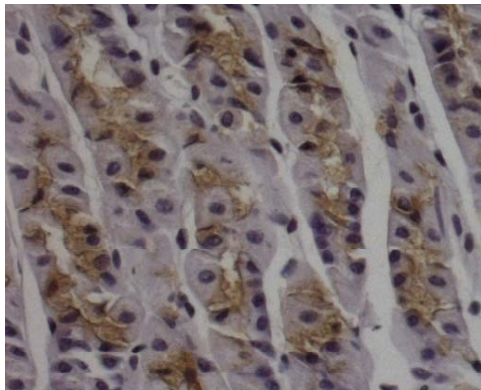
Nomuraらは、ガストリン欠損マウスを用いてSPEM形成におけるガストリンの関与を検討した{Nomura, 2005 #9}。本研究の第二章-1ではSP/TFF2の関与についてSP/TFF2欠損マウスを用いて検討する。第二章-2ではEGF受容体シグナル伝達系の関与についてEGF受容体変異waved-2マウスを用いて検討する。

A

MUC6 免疫染色像



B



C

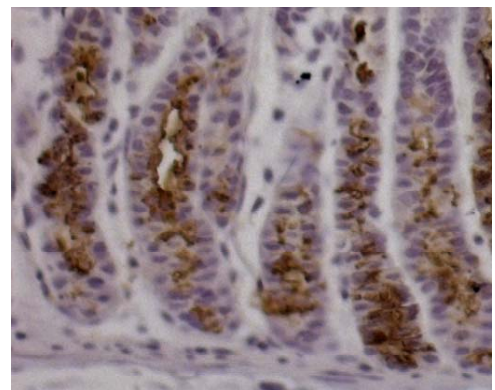


図 6 DMP-777 投与後の MUC6 陽性細胞系統の変化 (X200)

A: WT マウス (上段) と SP/TFF2 欠損マウス (下段) の DMP-777 非投与群 (DAY 0)、3 日間、7 日間、14 日間投与群 (DAY 3、7、14) における MUC6 の免疫染色像。

WT マウス及び SP/TFF2 欠損マウスいずれにおいても、DMP-777 を 7 日間及び 14 日間投与した群では MUC6 陽性細胞が胃底腺底部に分布する SPEM 類似腺管がみられた。

B: SP/TFF2 欠損マウス DAY 0 の強拡大像。MUC6 陽性頸部粘液細胞は壁細胞の間に圧排さ

A

れるようにして存在する。

DR-PAS 染色像

C: SP/TFE3 欠損マウス DAY 7 腺底部の強拡大像 SP/TFE3 類似腺管がみられる。

DAY 0

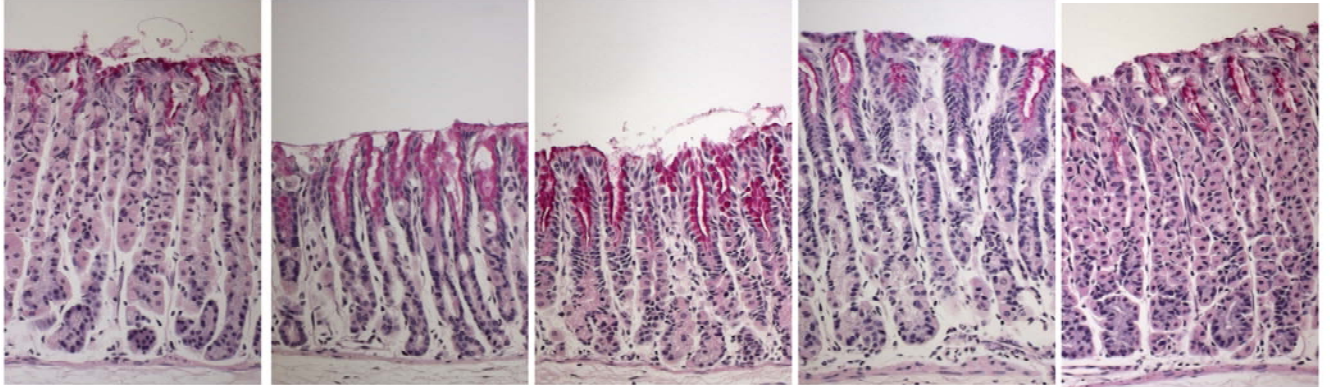
DAY 3

DAY 7

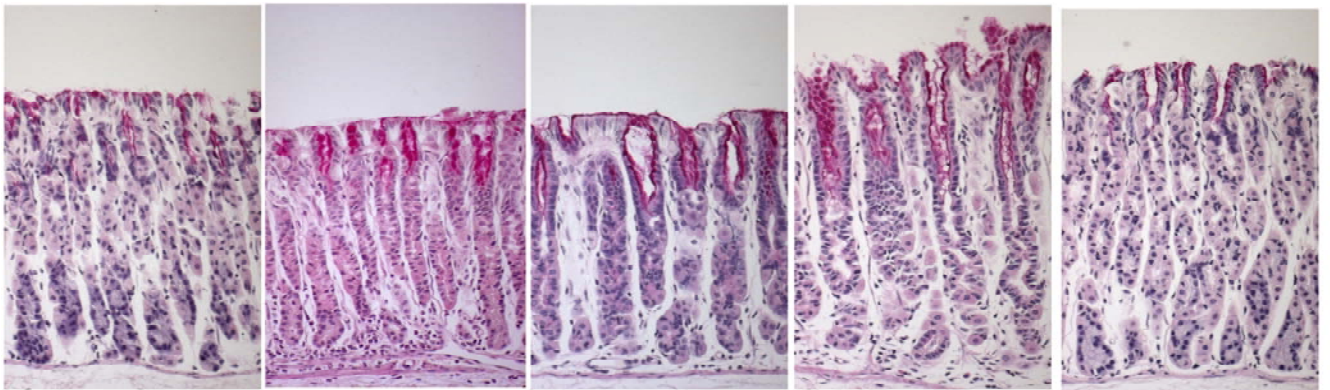
DAY 14

DAY R14

waved-2
hetero



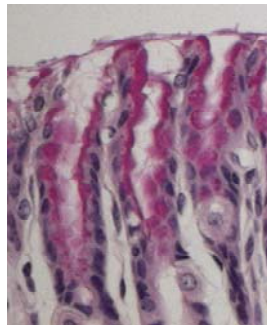
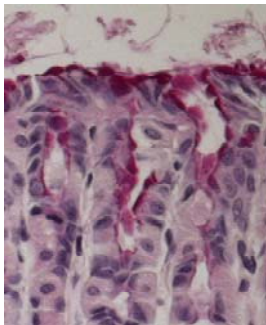
waved-2
homo



waved-2 hetero

DAY 0

DAY 3



waved-2 homo

DAY 0

DAY 3

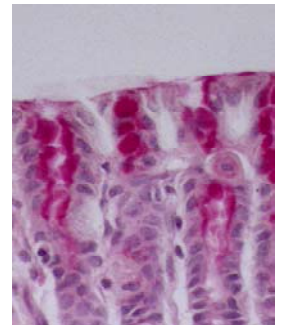
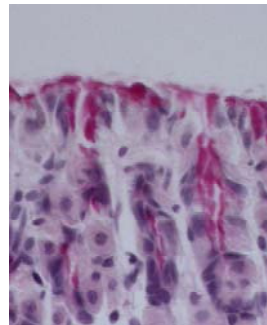


図7 *waved-2* ヘテロ対照マウス及び *waved-2* マウスにおける DR-PAS 染色像

A: *waved-2* ヘテロ対照マウス (上段) と *waved-2* マウス (下段) で、DMP-777 非投与群 (DAY 0)、3日、7日、14日投与群 (DAY 3、7、14)、14日間投与し14日間の休薬後に

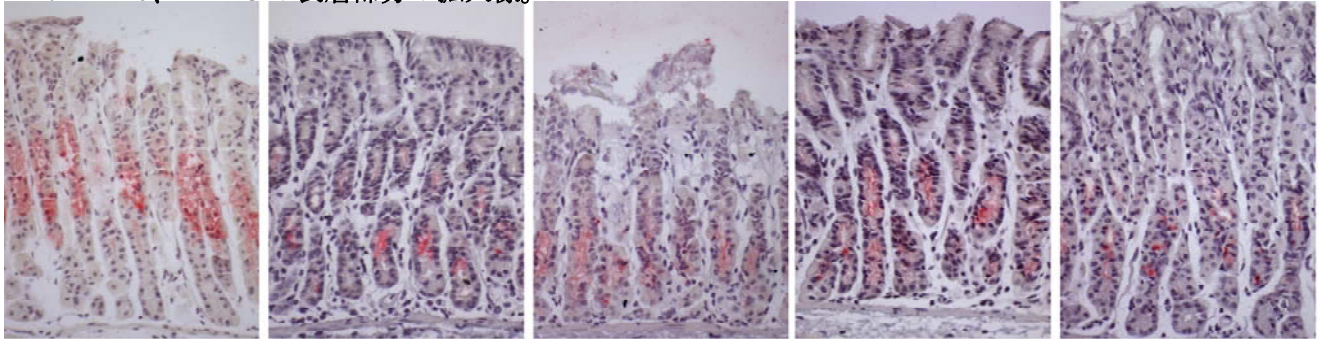
屠殺した群 (DAY R14) の DR-PAS 染色像を示す (X200)。ヘテロ対照マウスでは DAY 3 で明らかな表層粘液細胞過形成を認めるが、*waved-2* マウスでは表層粘液細胞数の増加は目立たない。DAY 7 では両マウスの表層粘液細胞過形成は同程度となる。

SP/TFE2 免疫染色像

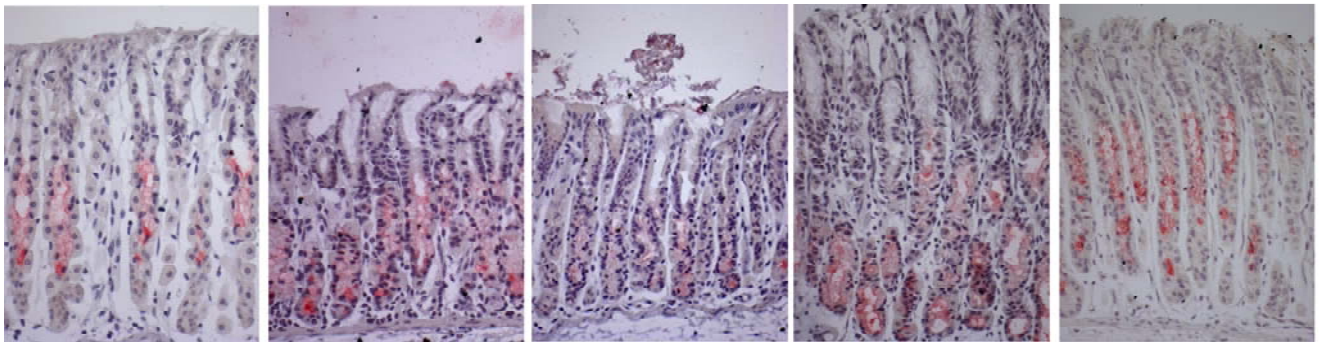
A

B: DAY 0、DAY 3 の表層部分の拡大像。

waved-2
hetero



waved-2
homo



B

waved-2 homo

DAY 0

DAY

DAY R14

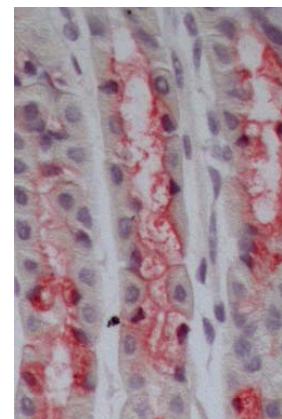
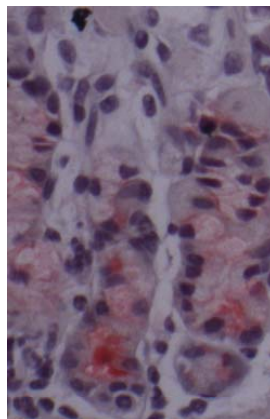
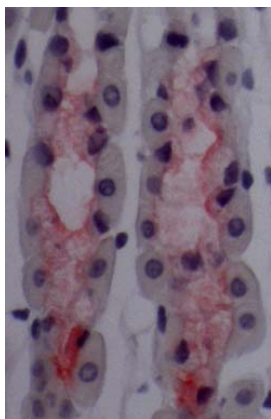


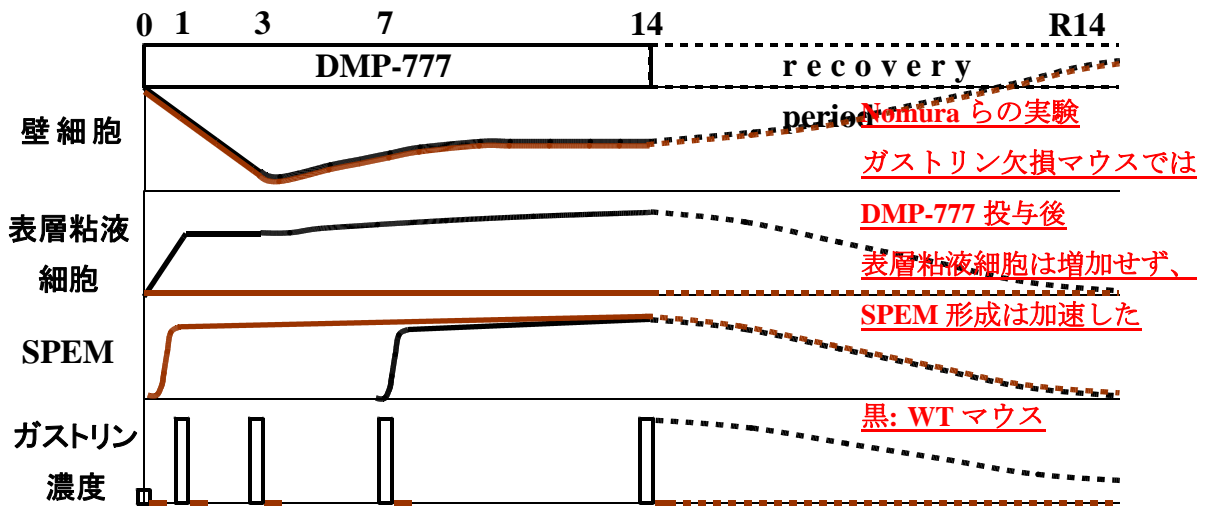
図 8 *waved-2* ヘテロ対照マウスと *waved-2* マウスにおける SPEM の評価

A: *waved-2* ヘテロ対照マウスと *waved-2* マウスの、DMP-777 非投与群 (DAY 0)、3日、7

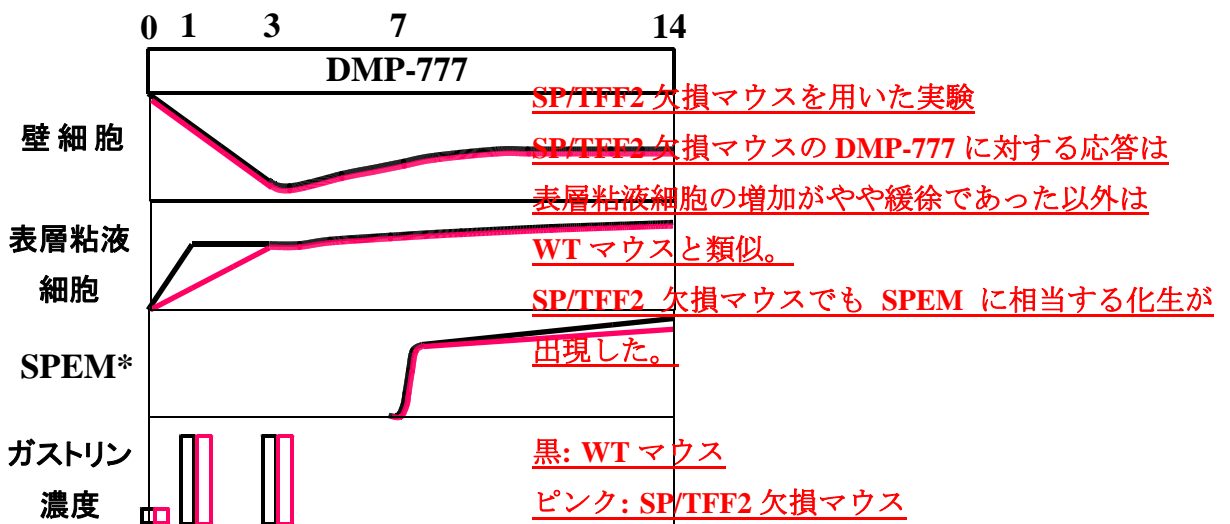
日、14日投与群（DAY 3、7、14）、14日間投与し14日間の休薬後に屠殺した群（DAY R14）の、SP/TFF2に対する免疫染色像（X200）。ヘテロマウスではDAY7でSPEMを生じたのに対し、*waved-2*マウスではDAY3からSPEMを認めた。

B: *waved-2*マウスにおけるSP/TFF2陽性部分の拡大像。DAY 0では、SP/TFF2は頸部粘液細胞で発現している。DAY 3では腺底部にSP/TFF2陽性細胞が分布する（SPEM）。DAY R14では、SP/TFF2は再び頸部粘液細胞で発現する。

ガストリン欠損マウス vs WT マウス



SP/TFF2 欠損マウス vs WT マウス



waved-2 マウス vs ヘテロ対照マウス

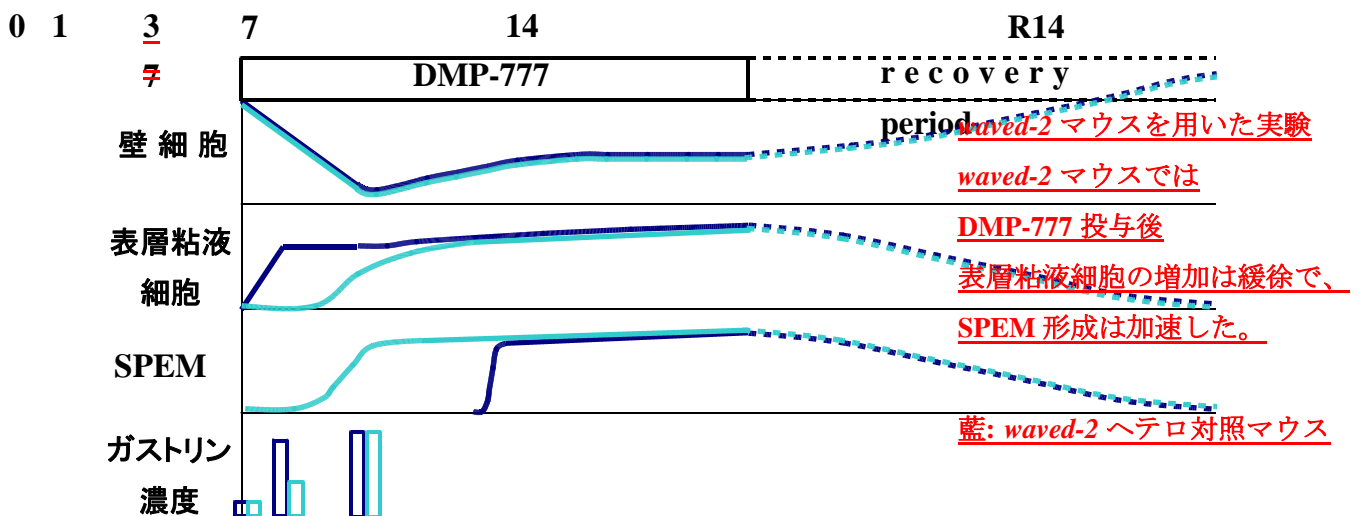


図9 第二章の結果のまとめ