

## 論文の内容の要旨

論文題目 胃粘膜萎縮マウスモデルとヒト胃癌検体を用いた  
胃における Hepatocyte Growth Factor 関連分子の検討

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 17 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 山形 幸徳

### 研究の背景と目的

Hepatocyte Growth Factor (HGF) は肝細胞の再生、増殖を促す生理活性物質として発見された。HGF は間葉系細胞から非活性型蛋白として分泌され、セリンプロテアーゼによる限定分解を受けて活性化型になる。活性化型 HGF は受容体の c-Met を介して種々の細胞に Mitogen、Motogen、Morphogen として作用し、消化管粘膜上皮の再生、修復にも大きな役割を果たしている。HGF 系は腫瘍新生や浸潤、分化、血管新生に重要な役割を果たしており、胃癌でも HGF、c-Met の過剰発現の報告がある。HGF を活性化するプロテアーゼは複数報告されているが、発現形式・場所から、胃での HGF 活性化には HGFA と Matriptase が重要と考えられる。HGFA は第 VII 因子類似セリンプロテアーゼで、非活性型分泌蛋白として主に肝で産生され、循環血液中に放出される。消化管粘膜障害後初期の上皮再生でも循環血液中の HGFA が関与し、障害局所でトロンビンにより活性化され、HGF を活性化する。Matriptase は II 型膜結合タンパクで、肝臓以外の消化管の細胞膜上に発現し、HGF の活性化に深く関与する。Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) は Kunitz 型セリンプロテアーゼインヒビターで上皮系細胞に発現し、HGFA、Matriptase と複合体を形成、インヒビターとして作用する。

*Helicobacter pylori* 感染は胃粘膜萎縮を惹起し、胃粘膜萎縮は胃癌発生の母地たりうる。胃底腺領域の萎縮粘膜では、壁細胞減少と腺窩上皮過形成、TFF2 (Spasmolytic Polypeptide) 高発現を伴う化生が生じる。我々は TFF2 に着目し、この化生を Spasmolytic Polypeptide Expressing

Metaplasia (SPEM) と命名し、前癌病変の可能性を示唆してきた。ヒト胃底腺領域胃癌とその周囲には高率に SPEM が存在し、SPEM は胃癌発生と関係が深いと考えている。SPEM モデルの一つに、急性に SPEM が生成する DMP777 投与マウスモデルがある。DMP777 は壁細胞の選択的破壊作用を有し、マウスに連日経口投与すると、投薬中は壁細胞が破壊され SPEM が生じ、休薬後は SPEM が消失する。壁細胞からは種々の成長因子が分泌されており、これを消失させることにより、胃底腺構成細胞の分化に異常が生じるためと考えている。ガストリン欠損マウスの DMP777 投与実験では SPEM の早期出現と回復遅延が確認され、ガストリンが SPEM 形成を抑制することが示された。

今回の実験では HGF の SPEM 発生への関与を検討することとした。HGF 欠損マウスは致死的であり、現存しないため、その活性化因子である HGFA 欠損マウスに DMP777 を投与し、壁細胞消失による胃底腺粘膜変化を観察した(実験 1)。さらに、その結果に基づき、ヒト胃癌組織及び周囲非癌組織中の HGF 系の物質の発現と、胃癌患者及び非胃癌患者の血清 HGF 及び HGFA 濃度を測定し、HGF 系の胃癌への関与を検討した(実験2)。

## 実験 1 HGFA 欠損マウスにおける胃粘膜萎縮の検討

### 対象と方法

胃底腺管は主に、壁細胞、主細胞、頸部粘液細胞、表層粘液細胞から構成されている。HGFA 欠損マウス(KO)と Wild type マウス(W)に DMP777 を 14 日間投与し、投与中(D1-D14)と投与中止後 28 日間(DR1-DR28)の胃底腺構成細胞の数の変化を観察した。

### 結果

#### 1) 壁細胞

壁細胞のマーカーとして H/K-ATPase を使用した。1 腺管あたりの H/K-ATPase 陽性細胞数は KO, W 両群とも DMP777 投与中には H/K-ATPase 陽性細胞の減少を認めた。W, KO とも壁細胞は DMP777 の曝露で破壊され、投与終了に伴い壁細胞数は回復した。D7-14 において、KO で W に比し、壁細胞数は若干多かったが、両群において DMP777 の壁細胞破壊効果は認められた。

#### 2) 表層粘液細胞

表層粘液細胞のマーカーとして DR-PAS 染色を使用した。W では D3 以降著明な DR-PAS 陽性細胞の増加を認めたが、KO では表層粘液細胞数の変化はごく軽度であった。

#### 3) S 期細胞

胃腺管は細胞の分裂増殖のユニットである。通常の胃底腺管では腺頸部に分裂増殖帯があり、ここで分裂増殖した細胞が腺管の上下方向に移動しつつ分化する。両群とも D3 以降に BrdU 陽性細胞数は有意に増加したが、DR7 には D0 のレベルに回復した。全ての time point で KO では W に比し、BrdU 陽性細胞数が低値であり、細胞分裂増殖能の低下が観察された。この差は DMP777 投与中の急性粘膜傷害下で顕著であった。

#### 4) 頸部粘液細胞、SPEM

頸部粘液細胞、SPEM のマーカーとして TFF2 を使用した。TFF2 は正常胃底腺では、腺管中央に位置する頸部粘液細胞で発現している。1 腺管あたりの TFF2 陽性細胞数を観察した。DMP777 投与期間中においては、KO と W は全く同様に TFF2 発現細胞数が推移し、SPEM の発生が観察された。DR7、DR14 においては KO が W に比し、TFF2 陽性細胞数が有意に高値を示し、KO で SPEM から正常胃底腺への回復が遅延していることが確認された。DR28 では KO も TFF2 陽性細胞数は Day 0 と同じレベルに回復した。

#### 5) 主細胞

主細胞のマーカーとして Intrinsic Factor (IF) を使用した。D3-10 では両群で IF 陽性細胞数の減少傾向を認めたが、回復期には原状に復した。D0、D3 においては KO で W に比し、IF 陽性細胞数の減少を認めた。

#### 6) 血清ガストリン値

高ガストリン血症は腺窩上皮過形成を惹起する。表層粘液細胞数の推移が両群間で異なっていたため血清ガストリン値を測定した。血清ガストリン値は両群間で大きな差はなく、両群とも DMP-777 投与開始直後から血清ガストリン値の上昇を認め、DR7 には Day 0 のレベルに復した。

#### 考 察(1)

HGFA 欠損マウスでは DMP777 投与に伴う腺窩上皮過形成を認めず、腺窩上皮過形成は HGF により惹起されている可能性が示唆された。かつて共同研究者らは腺窩上皮過形成がガストリンによって惹起されていると報告したが、今回、両群の血清ガストリン値の推移に差はなく、ともに DMP777 投与により血清ガストリン値の上昇が認められた。このことより、ガストリン刺激から腺窩上皮過形成が惹起される pathway に HGF 系が作用している可能性が示唆された。

DMP777 投与前から HGFA 欠損マウスでは BrdU 陽性細胞数が Wild type に比べ少なく、HGF は正常状態でも細胞回転を促進していると考えられた。また、その差は DMP777 投与時により強く現れ、急性胃粘膜障害時には HGF が細胞回転を促進すると考えられた。

正常胃底腺では頸部粘液細胞が腺底部へと移動するのに伴って主細胞に分化してゆくことが知られている。共同研究者らは SPEM の起源として、一旦主細胞に分化した細胞が TFF2 発現細胞に脱分化するという、主細胞の transdifferentiation を提唱してきた。DMP777 を HGFA 欠損マウスに投与した結果、BrdU 陽性細胞の増加は Wild type に比し緩徐であるにもかかわらず、SPEM 形成、TFF2 陽性細胞数の変化は Wild type と同等であった。このことより、SPEM の発生には SPEM を構成する細胞が新たに産生されるのではなく、少なくとも一部は transdifferentiation により生じることが確認された。

DMP777 投与終了後、HGFA 欠損マウスでは SPEM から正常腺管への回復遅延が観察された。HGFA、HGF は SPEM の正常粘膜への回復に寄与すると考えられた。当初は胃底腺の急性傷害時の SPEM 発生に HGF が何らかの役割を担っていると仮定し、今回の研究を行ったが、結果は予想に反していた。すなわち、HGF は粘膜急性傷害時には細胞分裂を促進し、もとより細胞回転が速い腺窩上皮の過形成を惹起することにより急性傷害を回避するのに働いていると考えられた。

SPEM の形成には HGF は関与しておらず、粘膜障害回復期には HGF が SPEM から正常腺管への回復を促進し、HGF は正常腺管構成細胞を分化誘導している可能性が考えられた。

## 実験 2 ヒト胃癌における HGF とその関連分子の発現の検討

実験1において、HGF 系は SPEM の形成には関与していないことがわかったが、胃癌では HGF の発現が亢進しているという報告がある。HGF に関する報告はあるものの、HGFA を含めたその関連分子の検討を総合的に行った報告はない。そのため、実際にヒト胃癌において、HGF とその関連分子の発現の検討を行った。

### 対象と方法

24 名のヘルシーボランティアと、'04-'07 年に東京大学医学部附属病院胃食道外科で胃癌に対し治療を受けた 154 人の患者を対象とし、胃癌患者 106 名 (R) の検体に対し、癌部、非癌部における HGF、HGFA、Matriptase、c-Met、HAI-1 の mRNA の発現を比較した。ヘルシーボランティア 24 名 (H)、患者 62 名 (P) に対し血清の活性化型 HGF 値、総 HGF 値と活性化型 HGFA 値、総 HGFA 値を ELISA 法で測定し、比較した。手術症例 18 検体について免疫染色を行い、胃癌組織中の c-Met と HAI-1 の発現をタンパクレベルで検討した。

### 結果

#### 1) 定量 RT-PCR

胃癌組織と非癌部との比較では HGF、局所の HGF 活性化因子である Matriptase、c-Met の mRNA 発現量には差がなかった。HGFA は今までの報告同様に局所の産生レベルは極めて低く、肝臓など他臓器から分泌されているものと考えられた。胃癌組織で HAI-1 の発現が低下していた ( $p < 0.0001$ )。

胃癌組織での発現量を、年齢、性別、深達度、分化度、リンパ節転移、リンパ管浸潤、静脈浸潤の項目で比較したところ、60 歳以下の群と未分化群で HGF が高発現していた。

#### 2) ELISA

H 群と P 群の血清 HGF 値は総 HGF 値も活性化型 HGF 値も両群間に有意差を認めなかった。血清総 HGFA 値は P 群で H 群より高値であった ( $p = 0.0065$ )。血清活性化型 HGFA 値は H 群で P 群より高値であった ( $p = 0.0073$ )。血清総 HGFA 濃度は血清活性化型 HGFA 濃度の数百～数千倍であった。

P 群での血清値を、年齢、性別、深達度、分化度、リンパ節転移、リンパ管浸潤、静脈浸潤、*Helicobacter pylori* 感染の項目について検討したところ、HGF は総 HGF も活性化型 HGF も進行癌で高値を示した ( $p = 0.0422$ ,  $p = 0.0194$ )。総 HGFA は女性で高値を示した ( $p = 0.0063$ )。

#### 3) 免疫染色

c-Met の胃癌組織での発現は非癌部に比べ亢進していた。HAI-1 の胃癌組織での発現は非癌部に比べ低下していた。

### 考察(2)

胃癌患者における血清 HGF 高値や胃癌組織における HGF 発現亢進の報告が散見されるが、今回の結果では、胃癌全般に関してはどちらも認められなかった。進行癌においては早期癌に比し、血清総 HGF 値、活性化型 HGF 値高値が認められ、胃癌組織からの HGF の放出が示唆されたが、mRNA の発現亢進は認めず、乖離があった。

血清総 HGFA 値が P 群で高値であった。HGFA は肝臓で産生され、血清中に放出され、HGF を必要とする局所にて活性化され、さらに HGF を活性化すると報告されている。このことから類推すると、胃癌患者での血清 HGFA 値高値は肝臓からの HGFA 分泌の亢進を意味しており、胃癌担癌状態においては肝臓での HGFA 分泌を亢進させるようなシグナルが胃癌から肝臓へむけて発せられている可能性があると考えられた。血清活性化型 HGFA の胃癌患者での低値は、HGFA が HGF を活性化した後どのような経過をたどるのか未だ解明されていないため、明確な説明はできないが、HGFA が局所で活性化されて働く分子である以上、局所以外には活性化したまま放出される可能性は低いと考えられる。そのため、胃癌患者における血清活性化型 HGFA 低値は胃癌局所での消費を反映している可能性がある。

タンパクレベルでの胃癌組織における c-Met の発現亢進、HAI-1 の発現低下はいずれも胃癌組織における HGF 系経路の活性化を意味しており、シグナルという意味では今までの報告同様、HGF 系は胃癌の増殖、進展に関与しているものと推測された。実験1の SPEM の形成には HGF 系は関与していないという結果と、進行癌で血清総 HGF 値、活性化型 HGF 値高値が認められたという結果から、HGF は胃癌の増殖、進展に関与しているものと考えられた。

## 結語

HGF は胃癌に対し、発癌よりもむしろ増殖、進展に関与しているものと考えられた。その経路の活性化は HGF そのものの産生によるというよりも、肝臓由来の HGFA の放出亢進、胃癌における c-Met の発現亢進、HAI-1 の発現低下によるものであると考えられた。