



Cdx2 transcription factor regulates claudin-3 and claudin-4 expression during intestinal differentiation of gastric carcinoma

佐竹, 信哉

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4150

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004150>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	佐竹 信哉
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1894 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Cdx2 transcription factor regulates claudin-3 and claudin-4 expression during intestinal differentiation of gastric carcinoma(転写因子 Cdx2 は胃がんにおいて腸への分化を誘導し claudin-3 および claudin-4 の発現を上昇させる)

審 査 委 員

主 査	教 授	林 祥剛
	教 授	黒田 嘉和
	教 授	古瀬 幹夫

背景と目的

胃癌は世界的に最も多い悪性腫瘍のひとつであり、これまでに組織学的分類や粘液形質による分類が確立されている。クロードインは細胞間タイトジャンクションの重要な構成因子であり、細胞極性の保持、物質輸送、バリア機能等に関与しているが、申請者らのグループは、新たにクロードインの発現パターンによる胃癌の分類法を提唱し、この分類法に基づくと、胃型クロードイン (claudin-18) も腸型クロードイン (claudin-3, -4) も発現しない分類不能型胃癌がもっとも悪性度が高く、クロードインの消失はリンパ管侵襲やリンパ節転移の頻度を増加させひいては患者生命予後を低下させることを報告した。このことから胃癌細胞の分化と悪性度との間の関連性が示唆され、クロードイン発現は胃癌の分化傾向の指標となるのみならず、その悪性度の判定に有用と思われるが、胃粘膜病変における胃型、腸型への分化の調節機構はあまり知られていない。

ホメオボックス遺伝子 Cdx1、Cdx2 は小腸および大腸粘膜で発現しており、細胞増殖と分化制御に重要な役割を果たしている。興味深いことに、胃粘膜では慢性胃炎を伴った腺窩上皮で Cdx2 の発現が誘導され、腸上皮化生粘膜でも Cdx2 発現が観察されることより、Cdx2 が胃粘膜の腸上皮化生を引き起こす一因となる可能性がこれまでに報告されている。さらに、Cdx2 は胃癌においても発現が見られ、予後との関連があることが明らかとなっている。以上のことより、胃癌の悪性度が癌細胞の分化によって調節されている可能性が示唆される。

本研究では、胃癌先進部における Cdx2 発現を検討し、とクロードイン発現から見た胃癌の分化との関連を検討した。さらに、Cdx2 強制発現による胃癌細胞の分化誘導に及ぼす影響についても考察した。

材料と方法

症例

症例は 1995 年から 2003 までに神戸大学病院で外科的に切除された胃癌 94 例を対象とした。ホルマリン固定・パラフィン包埋された切除材料は免疫組織学的検討に用い、組織病理学的診断は胃癌取扱規約（日本胃癌学会）に準じて行った。

免疫組織化学および免疫蛍光染色

免疫組織化学的検討は LSAB キット (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) を用いてストレプトアビジン-ビオチン法にて行った。4 μ m 薄切標本を脱パラフィン、親水処理を行い、オートクレーブにて抗原賦活した。内在性ペルオキシダーゼを過酸化水素水にて処理した後、1 次抗体として claudin-3, -4, -18 (Zymed, South San Francisco, CA, USA), Cdx2 (BioGenex, San Ramon, CA, USA) 抗体を反応させ、DAB にて発色を行った。各タンパクの発現解析の結果は、腫瘍の浸潤先進部における、それぞれの染色性を判定し、ほとんどの細胞が染色性を示さないか 30% 未満の細胞にのみ軽度の染色を認めるものを陰性、30% 以上の細胞に強い染

色を認めるものを陽性とした。

免疫蛍光染色は各培養細胞を 4%ホルマリンにて固定した後各種抗体を用いて染色を行った。FITC 標識 2 次抗体により可視化し、核は DAPI により染色を行った。

クロードイン発現に基づいた胃癌の形質分類

胃癌のクロードイン形質は、免疫組織化学的に検討した claudin-3, claudin-4, claudin-18 の発現形式により、以下の如く判定を行った。claudin-18 は発現するが、claudin-3, -4 の発現のないものを胃型クロードイン (G-CLDN) 形質、claudin-3, -4 の両方、または一方の発現を認めるが、claudin-18 の発現が無いものを腸型クロードイン (I-CLDN) 形質、いずれのクロードインの発現も見られないものを分類不能型 (U-CLDN) とした。

細胞株および遺伝子導入

ヒト CDX2 遺伝子発現ベクター pCDX2 を作成し、これを Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、Cdx2 発現の無いヒト胃癌細胞株 TMK-1 に遺伝子導入した。

Western Blot 法

各培養細胞からタンパクを抽出し、通例に従い SDS-PAGE を用いて分離、転写し、各種一次抗体を用いた後、HRP 標識ヒツジ抗マウス抗体、HRP 標識ロバ抗ウサギ抗体を二次抗体として用いた。

リアルタイム RT-PCR

TMK-1 細胞に pCDX2 を導入したものの、ベクターのみ導入したものより RNA を抽出し、QuantiTect SYBR Green RT-PCR キットと ABI PRISM 7700 Sequence Detection System を用いて、各種クロードインの mRNA 発現を検討した。 β -actin 発現量に基づき、各クロードイン mRNA 発現量の補正を行った。

統計解析

フィッシャー有意差検定、カイ二乗検定、カプラン-マイヤー法、ログランク検定を使用し、P 値 0.05 未満を、統計学的有意差があるものと判定した。全ての統計解析は、Statview 5.0 ソフトウェア (SAS Institute, Inc, Cary, NC, USA) を使用して行った。

結果

胃癌における Cdx2 発現と I-CLDN 形質との関係

Cdx2 の発現は腸上皮化生を伴う腺管で発現しており、腸型クロードイン (claudin-3, claudin-4) 発現と一致して認められたが、逆に胃型クロードイン (claudin-18) は腸上皮化生の部位に一致して発現が低下していた。非腫瘍性胃粘膜において、Cdx2 と腸型クロードインの間には密接な関連が認められた。

次に、胃癌での Cdx2 発現を検討したところ、浸潤先進部において 94 例中 28 例 (30%) に発現が認められた。浸潤先進部において Cdx2 発現を伴う症例は、発現の低下したものに比べて腫瘍径が有意に小さく、Cdx2 発現陰性例と比較して、有意に予後良好であることが明らかになった。また、Cdx2 発現とクロードイン形質との間には胃癌組織においても密接に関連しており、Cdx2 発現陽性例ではそのほとんどが I-CLDN 形質を示し、G-CLDN 形質は 1 例も認め

られなかった。

胃癌細胞株 TMK-1 における Cdx2 の腸型クローデインの発現誘導

Cdx2 の claudin-3, claudin-4 の発現上昇に対する影響を検討するため、Cdx2 発現陰性胃癌細胞株 TMK-1 に、*CDX2* 遺伝子を導入した。リアルタイム RT-PCR 法を用いて種々のクローデインの mRNA レベルでの発現の変化を検討したところ、*CLDN3* (3.9 倍) と *CLDN4* (2.8 倍) に明らかな発現上昇が認められた。タンパクレベルにおいても claudin-3 (8.6 倍) と claudin-4 (9.8 倍) の発現は明らかに上昇していたが、このような変化は他のクローデイン (claudin-1, -7, -12, -15, -18) には認められず、claudin-3, -4 に特異的な変化であった。さらに *CDX2* 遺伝子導入することにより TMK-1 細胞の細胞周期は G₀/G₁ 期に停止し、細胞増殖が抑えられることが確認された。

考察

これまでの疫学的、分子学的解析により、腸上皮化生は胃癌の発生頻度を上げることが報告されている。つまり腸上皮化生は胃の多段階発癌において重要な前癌病変と考えられる。Cdx2 は十二指腸から大腸までの腸管正常粘膜に特異的に発現する転写因子であるが、胃粘膜において Cdx2 が腸上皮化生を引き起こす分子機構を解明することは、胃癌の診断、治療の進歩に大変有用であると考えられる。今回の検討でも Cdx2 発現は非腫瘍胃粘膜において、粘液形質から見た腸型胃粘膜への分化のみならずクローデイン形質からみた腸型胃粘膜への分化にも深く関わっていることが確認された。このことより Cdx2 は非腫瘍胃粘膜の腸上皮化生を調節する重要な因子であると考えられる。

これまでに、腸型粘液である *MUC2* の遺伝子転写を Cdx2 が誘導していることが報告されているが、今回の結果は claudin-3, -4 についても Cdx2 が直接的・間接的に発現上昇を促している可能性を強く示唆するものであった。本研究は Cdx2 による胃粘膜及び胃癌の腸への分化をクローデイン発現の観点から検証した最初の報告であり、TMK-1 細胞を用いた実験では Cdx2 が胃癌細胞の分化を調節する重要な因子であることを示した。ただし、Cdx2 による特異的な claudin-3, -4 発現誘導が直接的な機構によるものかどうかは更なる検討が必要である。

病理組織学的分類は進行胃癌の予後を反映するものではないが、*MUC2* 発現胃癌症例の予後は良いことも報告されており、腸上皮のマーカーは胃癌患者の良好予後予測因子となりえると考えられる。また溝下らの報告と同様、本研究においても、Cdx2 陽性胃癌症例は陰性症例と比較して有意に予後良好という結果が得られたことは、胃癌の腸型分化を促進する Cdx2 が、その浸潤能・転移能を制御する可能性を支持するものであると考えられた。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1898号	氏 名	佐竹 信哉
論文題目	Cdx2 transcription factor regulates claudin-3 and claudin-4 expression during intestinal differentiation of gastric carcinoma 転写因子 Cdx2 は胃がんにおいて腸への分化を誘導し claudin-3 および claudin-4 の発現を上昇させる		
審査委員	主 査 林 祥剛 副 査 黒田嘉和 副 査 古瀬 幹夫		
審査終了日	平成 20 年 1 月 16 日		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

要旨

クローディンは細胞間タイトジャンクションの重要な構成因子であり、細胞極性の保持、物質輸送、バリア機能等に関与している。ホメオボックス遺伝子 *Cdx1*、*Cdx2* は小腸および大腸粘膜で発現しており、細胞増殖と分化制御に重要な役割を果たしている。胃粘膜では慢性胃炎を伴った腺窩上皮で *Cdx2* の発現が誘導され、腸上皮化生粘膜でも *Cdx2* 発現が観察されることより、*Cdx2* が胃粘膜の腸上皮化生を引き起こす一因となる可能性がこれまでに報告されている。さらに、*Cdx2* は胃癌においても発現が見られ、予後との関連があることが明らかになっている。本研究では、胃癌先進部における *Cdx2* 発現を検討し、クローディン発現から見た胃癌の分化との関連を検討した。さらに、*Cdx2* 強制発現による胃癌細胞の分化誘導に及ぼす影響についても考察した。*Cdx2* の発現は腸上皮化生を伴う腺管で発現しており、腸型クローディン (*claudin-3*, *claudin-4*) 発現と一致して認められたが、逆に胃型クローディン (*claudin-18*) は腸上皮化生の部位に一致して発現が低下していた。非腫瘍性胃粘膜において、*Cdx2* と腸型クローディンの間には密接な関連が認められた。胃癌での *Cdx2* 発現を検討したところ、浸潤先進部において 94 例中 28 例 (30%) に発現が認められた。浸潤先進部において *Cdx2* 発現を伴う症例は、発現の低下したものに比べて腫瘍径が有意に小さく、*Cdx2* 発現陰性例と比較して、有意に予後良好であることが明らかになった。また、*Cdx2* 発現とクローディン形質との間には胃癌組織においても密接に関連しており、*Cdx2* 発現陽性例ではそのほとんどが *I-CLDN* 形質を示し、*G-CLDN* 形質は 1 例も認められなかった。*Cdx2* の *claudin-3*, *claudin-4* の発現上昇に対する影響を検討するため、*Cdx2* 発現陰性胃癌細胞株 *TMK-1* に、*CDX2* 遺伝子を導入した。リアルタイム RT-PCR 法を用いて種々のクローディンの mRNA レベルでの発現の変化を検討したところ、*CLDN3* (3.9 倍) と *CLDN4* (2.8 倍) に明らかな発現上昇が認められた。タンパクレベルにおいても *claudin-3* (8.6 倍) と *claudin-4* (9.8 倍) の発現は明らかに上昇していたが、このような変化は他のクローディン (*claudin-1*, -7, -12, -15, -18) には認められず、*claudin-3*, -4 に特異的な変化であった。さらに *CDX2* 遺伝子導入することにより *TMK-1* 細胞の細胞周期は G_0/G_1 期に停止し、細胞増殖が抑えられることが確認された。これまでの疫学的、分子学的解析により、腸上皮化生は胃癌の発生頻度を上げることが報告されている。つまり腸上皮化生は胃の多段階発癌において重要な前癌病変と考えられる。*Cdx2* は十二指腸から大腸までの腸管正常粘膜に特異的に発現する転写因子であるが、胃粘膜において *Cdx2* が腸上皮化生を引き起こす分子機構を解明することは、胃癌の診断、治療の進歩に大変有用であると考えられる。本研究でも *Cdx2* 発現は非腫瘍胃粘膜において、粘液形質から見た腸型胃粘膜への分化のみならずクローディン形質からみた腸型胃粘膜への分化にも深く関わっていることが確認された。このことより *Cdx2*

は非腫瘍胃粘膜の腸上皮化生を調節する重要な因子であると考えられる。

これまでに、腸型粘液である *MUC2* の遺伝子転写を *Cdx2* が誘導していることが報告されているが、今回の結果は *claudin-3*, -4 についても *Cdx2* が直接的・間接的に発現上昇を促している可能性を強く示唆するものであった。本研究は *Cdx2* による胃粘膜及び胃癌の腸への分化をクローディン発現の観点から検証した最初の報告であり、*TMK-1* 細胞を用いた実験では *Cdx2* が胃癌細胞の分化を調節する重要な因子であることを示した。ただし、*Cdx2* による特異的な *claudin-3*, -4 発現誘導が直接的な機構によるものかどうかは更なる検討が必要である。

本研究は、胃癌についての *Cdx2* 発現を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったクローディン発現から見た胃癌の分化との関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。