

学位論文題名

転写因子 CDX1 による胃上皮細胞の腸上皮細胞様分化
形質転換に関する研究

学位論文内容の要旨

腸上皮化生は胃粘膜に腸の粘膜を作る細胞が現れる病変で、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の慢性感染が主な原因とされている。腸上皮化生の胃粘膜からは胃癌の大部分を占める腸型胃癌が高い頻度で発生することが知られるため、腸上皮化生は胃癌の予防の観点からも注目すべき胃粘膜病変の一つである。しかしながら、腸上皮細胞が胃粘膜に現れるメカニズムおよび胃発癌との関係については未だ詳細が明らかになっていない。*H. pylori* の中でも病原因子 CagA を産生できる菌の感染は、CagA 陰性菌の感染に比較して、腸上皮化生を含む胃粘膜病変の発症とより強く相関する。近年、胃上皮細胞内において、CagA が生理的には胃に存在しない腸上皮特異的転写因子 CDX1 を異所性に発現誘導することが明らかにされた。CDX1 は臨床学的にヒトの腸上皮化生胃粘膜に発現していることが知られており、逆に、動物実験の結果から CDX1 を異所性に発現させた胃粘膜では腸上皮化生が発生することが報告されている。したがって、CDX1 は腸上皮化生発症に重要な役割を果たすことが推察されるが、CDX1 が細胞・組織の分化スイッチングにどのように関わるのかについてはこれまでのところ不明であった。そこで本研究では、胃上皮細胞内において CDX1 が転写因子として発現制御する遺伝子をゲノム網羅的に探索し、腸上皮化生発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的にした。

第 1 章では、胃上皮細胞に異所性発現した CDX1 が転写標的にすると考えられる遺伝子を、発現マイクロアレイ解析ならびに ChIP-chip 解析を用いてゲノム網羅的に探索した。CDX1 発現依存的に mRNA 量が 2 倍以上増加した 958 遺伝子と CDX1 が近傍に結合した 1997 遺伝子の間で共通する 166 遺伝子を CDX1 の転写標的候補遺伝子として同定した。

さらに、発現マイクロアレイ解析の結果から、**CDX1**が発現した胃上皮細胞において腸上皮幹細胞マーカー**LGR5**の発現が異常に亢進していることを示した。

第2章では、**CDX1**が異所性発現した胃上皮細胞では消化管幹細胞様状態への部分的脱分化が起きるという予想のもとに、同定した**CDX1**転写標的候補遺伝子に含まれる幹細胞性に関わるリプログラミング因子**SALL4**ならびに**KLF5**が**CDX1**の転写標的であることを明らかにした。また、**CDX1**依存的な**SALL4**および**KLF5**転写活性化に重要なエンハンサー領域をそれぞれ同定した。さらに、ヒトおよびマウスの腸上皮化生領域において**CDX1**ならびに**SALL4/KLF5**が異常に発現していることを示した。

第3章では、胃上皮細胞株に**CDX1**を持続的に発現させ、その形質変化を各種細胞のマーカー遺伝子の発現をもとに経時的に解析した。**CDX1**が異所性発現すると、まず腸上皮幹細胞マーカー遺伝子が異常に発現し、それに続いて複数系統の腸上皮分化細胞マーカー遺伝子の発現が観察されることを明らかにした。また、**CDX1**によって転写活性化される幹細胞性リプログラミング因子**SALL4**ならびに**KLF5**の発現をノックダウンすると、**CDX1**依存的な腸上皮幹細胞マーカーおよび腸上皮分化細胞マーカーの発現が抑制されることを示した。さらに、*cagA*陽性 *H. pylori*感染によって胃上皮細胞内で**CDX1**ならびに**SALL4/KLF5/LGR5**の発現が異常に亢進することを明らかにした。

以上、本研究の結果から、転写因子**CDX1**が異所性にリプログラミング因子**SALL4**ならびに**KLF5**を発現誘導することにより、胃上皮細胞が消化管幹細胞様の状態に部分的に脱分化(dedifferentiation)し、続いて種々の腸上皮様細胞への異分化(transdifferentiation)が引き起こされることが示された。組織幹細胞と癌幹細胞は近い性質を持つことが知られており、限定的に異常脱分化した胃上皮細胞から腸型胃癌が発症するメカニズムの存在が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	坂口和靖
副査	教授	村上洋太
副査	教授	藤田恭之
副査	教授	佐田和己
副査	教授	畠山昌則（東京大学大学院医学系研究科）

学位論文題名

転写因子 CDX1 による胃上皮細胞の腸上皮細胞様分化 形質転換に関する研究

博士学位論文審査等の結果について（報告）

胃癌は組織学的に腸型と未分化型に大別されるが、その大部分を占める腸型胃癌は腸上皮化生胃粘膜から発生する。腸上皮化生は、胃粘膜が腸粘膜様に変化する病変で胃癌の予防の観点からも注目すべき胃粘膜病変の一つと考えられるが、腸上皮細胞が胃粘膜に現れるメカニズムおよび胃発癌との関係についての詳細は明らかになっていない。腸上皮化生の主な原因としてピロリ菌の慢性感染が挙げられるが、これまでに、ピロリ菌が持つ病原因子 CagA が胃上皮細胞に発現すると、生理的には胃に存在しない腸上皮特異的転写因子 CDX1 が異所性に発現誘導されることが示されていた。CDX1 は臨床学的にヒトの腸上皮化生胃粘膜に発現していることが報告されており、さらに動物実験の結果から CDX1 を異所性発現させた胃粘膜では腸上皮化生が発生することが証明されている。したがって、ピロリ菌感染を起点とした腸上皮化生の発症に CDX1 が重要な役割を果たすことが推察されるが、CDX1 が腸上皮化生を引き起こすメカニズムについてはこれまでのところ不明であった。

本研究は、転写因子 CDX1 の胃上皮細胞内転写標的遺伝子を網羅的に同定し、異所性 CDX1 による胃上皮細胞から腸上皮様細胞への分化形質転換の分子機構解析を通して腸上皮化生発症のメカニズムを明らかにすることを目的としており、筆者は上記目的を達する以下の有益な知見を得て、その研究成果を本学位論文として纏めている。

第1章では、発現マイクロアレイ解析ならびに ChIP-chip 解析により、胃上皮細胞に異所性発現させた CDX1 の転写標的遺伝子をゲノム網羅的に解析し、166 の候補遺伝子を同定した。さらに、

CDX1 発現により腸上皮幹細胞マーカー遺伝子の発現が顕著に増加したことから、筆者は胃上皮細胞が限定的に脱分化して未分化性を獲得することにより腸上皮様細胞への分化形質転換が起きるとの予想のもと、CDX1 転写標的候補遺伝子の中から幹細胞性のリプログラミング因子 SALL4 ならびに KLF5 に着目した。

第2章では、胃上皮細胞内で CDX1 が SALL4 ならびに KLF5 を転写標的とすることを明らかにした。CDX1 が発現した胃上皮細胞内では SALL4/KLF5 の発現が異常に亢進していることをタンパク質レベルで示し、さらに SALL4/KLF5 上流領域の段階的欠損変異レポータープラスミドを作成して CDX1 依存的な転写調節領域をそれぞれ同定した。また、実際の腸上皮化生領域においてこれらの幹細胞性リプログラミング因子が異常発現していることを、胃上皮特異的 Cdx1 トランスジェニックマウスおよび腸上皮化生のヒト胃生検サンプルを用いて示した。

第3章では、胃上皮細胞に CDX1 が異所性発現することで起こる分化形質変化を、各種細胞のマーカー遺伝子の発現をもとに解析した。第1章で示唆された様に、CDX1 が発現した胃上皮細胞は腸上皮幹/前駆細胞のマーカー遺伝子の発現が亢進するが、その発現は一過性であり、持続的な CDX1 発現によってそれまで観察されなかった複数系統の腸上皮分化細胞マーカー遺伝子の発現が観察されることを見出した。さらに CDX1 発現依存的な腸上皮幹/前駆細胞マーカーおよび腸上皮分化細胞マーカーの発現誘導が SALL4/KLF5 ノックダウンにより抑制されたことから、筆者は、CDX1 が異所性発現した胃上皮細胞は幹細胞性リプログラミング因子 SALL4/KLF5 の異常発現誘導を介して消化管幹細胞様状態になった後、複数系統の腸上皮分化細胞に異常に再分化していると結論付けた。最後に筆者は、胃上皮細胞に CDX1 の発現を異所性に誘起すると考えられる *cagA* 陽性ピロリ菌とコントロール *cagA* 陰性ピロリ菌をそれぞれ胃上皮細胞に感染させ、CagA 依存的に CDX1/SALL4/KLF5 および腸上皮幹細胞マーカー *LGR5* の発現増加が起こることを明らかにした。

これを要するに本論文は、ピロリ菌感染を起点とした腸上皮化生の発症において、転写因子 CDX1 が幹細胞性に関わるリプログラミング因子を異所性に転写活性化することにより胃上皮細胞の限定的な脱分化を引き起こすことを世界に先駆けて明らかにしたものである。未分化性を獲得した細胞は分化細胞に比べ容易に悪質形質転換を起こすことが推察されることから、筆者が本研究で示した胃上皮細胞の限定的リプログラミングによる腸上皮細胞様分化形質転換に関する新たな知見は、腸上皮化生のみならず胃癌さらには他の組織で見られる化生性変化を起源とした発癌機構解明・予防法開発に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。