

## 4 1

助成番号 0041

## 塩類の消化管上皮異型化へ及ぼす影響の分子生物学的解析

助成研究者：醍醐 弥太郎 (山梨医科大学 医学部 内科学)  
共同研究者：藤野 雅之 (山梨医科大学 医学部 内科学)  
高山 一郎 (ネバタ大学 医学部 細胞生物学)

塩類は生体の恒常性維持に不可欠であるが、一方で疫学的研究から塩類の過剰摂取と上部消化管癌(食道癌、胃癌など)の発生率との相関が報告されている。しかしながら塩分摂取の消化管上皮への影響を発癌の観点から遺伝子レベルにさかのぼって詳細に解析した報告は皆無である。近年、癌は複数の遺伝子変異が蓄積することにより多段階に発生、進行していくことが明らかになっている。また胃粘膜へのピロリ菌感染が粘膜の環境変化を引き起こし、それに上記の環境要因が加わることで萎縮性胃炎、腸上皮化生と段階的な胃粘膜の組織変化を引き起こし最終的に発癌に到るとの仮説立てられている。そこで消化管癌の発生と塩類摂取との因果関係の有無を明らかにすることを目的として、塩類曝露がヒト消化管上皮に及ぼす影響を遺伝子レベルで解析する実験系を樹立した。

当初NaCl濃度各0.15M, 0.18M, 0.20Mの培養液中でヒト小腸上皮細胞株の培養を試みたところ0.20Mから明らかな細胞増殖阻止が認められたため、0.18Mを至適培養可能な塩類濃度とした。継代培養前(高塩類負荷直後)、継代培養1回、5回、10回、20回で高塩類負荷細胞の形態変化を観察したが継代回数が同数の通常条件下で培養したヒト小腸上皮細胞株と比較して明らかな形態変化を認めなかった。また通常条件下で培養したヒト小腸上皮細胞株と高塩類負荷条件下で培養した小腸上皮細胞(各 $1 \times 10^4$ 個)について(継代培養各20回)、培養開始後0、2、4、6日目にトリパンブルー染色法で生存細胞数を計測したが両者に有意な差を認めなかった。マイクロアレイ法を用いて癌関連遺伝子281種類について通常条件下で培養したヒト小腸上皮細胞株と高塩類負荷条件(0.18M)下で培養した同細胞株(各継代20回)との発現差を検討し、4種類の遺伝子に上下50%以上の発現量の差を認めた。内訳は塩類負荷で遺伝子発現の増加したものの3種類(Up-Regulated by Salt Exposure 1-3: URSE1-3)、減少したものの1種類(Down-Regulated by Salt Exposure 1: DRSE1)であった。これらはRT-PCR法により発現差に再現性があることが確認された。同定された遺伝子はすべてこれまでにヒトの癌関連遺伝子として報告されているものである。これらの遺伝子発現変化がいわゆるgeneticもしくはepigeneticな原因によるものかの検討は今後必要であるが、塩類負荷によるこれらの遺伝子発現量の変化が長期的に消化管上皮細胞の表現型に及ぼす影響をもたらすのか興味深い。これらの候補遺伝子群と癌発生との因果関係の有無の解明には細胞レベルでの機能相補試験に加え、細胞実験系(in vitro)データと萎縮性胃炎、腸上皮化生、および癌組織等の生体標本(in vivo)データの相互検証が必要と考えている。



## 6

助成番号 0041

## 塩類の消化管上皮異型化へ及ぼす影響の分子生物学的解析

助成研究者：醍醐 弥太郎 (山梨医科大学 医学部 内科学)

共同研究者：藤野 雅之 (山梨医科大学 医学部 内科学)

高山 一郎 (ネバタ大学 医学部 細胞生物学)

## 1. 研究目的

塩類は生体の恒常性維持に不可欠な成分であるが、一方で疫学的研究から塩類の過剰摂取は上部消化管癌(食道癌、胃癌など)の発生率と相関するとの報告がなされている<sup>1)</sup>。とりわけ胃癌は我国において主要な死亡原因のひとつであるが、その発生原因については主に疫学的解析から喫煙、飲酒、ピロリ菌感染、ビタミン欠乏、高塩分食などがその環境要因としてあげられている<sup>2-3)</sup>。しかしながら塩分摂取の消化管上皮への影響を発癌の観点から遺伝子レベルにさかのぼって詳細に解析した報告は皆無である。近年、癌は遺伝子の病気であることを証明する膨大な事実すなわち複数の遺伝子変異が蓄積することにより多段階に癌が発生、進行していくことが明らかになっている。また胃粘膜へのピロリ菌感染が粘膜の環境変化を引き起こし、それに上記の環境要因が加わることで萎縮性胃炎、腸上皮化生と段階的な胃粘膜の組織変化を引き起こし最終的に発癌に到るとの仮説立てられている<sup>4)</sup>。ゆえに発癌因子に基いた発症機構の解明は予防医学的観点からのみならず今後の臨床遺伝子診断技術の基盤情報として重要な役割を果たすものと思われる。そこで塩類の摂取が消化管上皮に及ぼす影響を遺伝子レベルで解析することにより、消化管癌の発生と塩類摂取との因果関係の有無を明らかにすることが本研究の目的である。

## 2. 研究方法

## 2.1 NaCl負荷濃度

ヒト小腸上皮細胞株(Intestine407)を10%ウシ胎児血清(FBS)を含む通常～高NaCl濃度培養液中で継代培養した。当初NaCl濃度が各0.15M, 0.18M, 0.20Mの培養液中でヒト小腸上皮細胞株の培養を試みたところ0.20Mから明らかな細胞増殖阻止が認められたため、0.18Mを至適培養可能濃度として以後の解析に用いた。

## 2.2 細胞形態、細胞増殖能の観察

細胞形態については継代培養前(高塩類負荷直後)、継代培養1回、5回、10回、20回で高塩類負荷細胞の病理組織学的形態変化を光学顕微鏡下に観察した。細胞増殖能の変化は継代培養前および継代培養20回の通常条件下で培養したヒト小腸上皮細胞株と高塩類負荷細胞(各 $1 \times 10^4$ 個)をそれぞれ使用し、6-well培養プレート上で培養開始後0、2、4、6日目にトリパンブルー染色法で生存細胞数を計測した。

### 2.3 マイクロアレイ法による候補塩類感受性遺伝子の検索

高塩類負荷（0.18M）および通常の条件下で培養したヒト小腸上皮細胞株からそれぞれ mRNA を抽出し、この RNA を鋳型に cDNA を合成する際に Cy5/Cy3 ラベルされた基質（Cy5-dCTP, Cy3-dCTP,）を取り込ませることにより蛍光標識プローブを作成し、この2種類のプローブを等量ずつ混合し癌関連遺伝子281個を網羅するcDNAマイクロアレイ（MICROMAX™ DIRECT SYSTEM, NEN Life Science Products Inc.）にハイブリダイズさせるマイクロアレイ法<sup>5)</sup>を行った。

### 2.4 RT-PCR法による候補塩類感受性遺伝子の同定

マイクロアレイ法で高塩類負荷細胞での遺伝子発現量の変化が通常条件下で培養した細胞と比較して上下50%以上（上限1.5倍以上、下限0.67倍以下）認められた遺伝子について、RT-PCR法で半定量的に遺伝子発現量を再検討した。

## 3. 研究結果

### 3.1 NaCl負荷塩濃度の決定

当初NaCl濃度各0.15M, 0.18M, 0.20Mの培養液中でヒト小腸上皮細胞株の培養を試みたところ0.20Mから明らかな細胞増殖阻止が認められたため、0.18Mを至適培養可能な塩類濃度とした。

### 3.2 細胞形態、細胞増殖能の観察

継代培養前（高塩類負荷直後）、継代培養1回、5回、10回、20回で高塩類負荷細胞の形態変化を観察したが継代回数が同数の通常条件下で培養したヒト小腸上皮細胞株と比較して明らかな形態変化を認めなかった。

一方、通常条件下で培養したヒト小腸上皮細胞株と高塩類負荷条件下で培養した小腸上皮細胞（各 $1 \times 10^4$ 個）について（継代培養各20回）、培養開始後0、2、4、6日目にトリパンブルー染色法で生存細胞数を計測したが両者に有意な差を認めなかった（Fig.1）。また継代培養前の細胞につき同様の検討を行ったが、塩類負荷の有無により生存細胞数に有意な差を認めなかった。

### 3.3 マイクロアレイ法による候補塩類感受性遺伝子の検索

マイクロアレイ法を用いて癌関連遺伝子281種類について通常条件下で培養したヒト小腸上皮細胞株と高塩類負荷条件（0.18M）下で培養した同細胞株（各継代20回）との発現差を検討した（Fig.2）。マイクロアレイ法で高塩類負荷細胞での遺伝子発現量の変化が通常条件下で培養した細胞と比較して上下50%以上認められた遺伝子は合計4種類であり、内訳は塩類負荷で遺伝子発現の増加したもの3種類（Up-Regulated by Salt Exposure 1-3: URSE1-3）、減少したものの1種類（Down-Regulated by Salt Exposure 1: DRSE1）であった。

### 3.4 RT-PCR法による候補塩類感受性遺伝子の同定

RT-PCR法によりURSE1、URSE2、URSE3遺伝子の高塩類負荷細胞での遺伝子発現量の増加を、DRSE1遺伝子の高塩類負荷細胞での遺伝子発現量減少を確認した (Fig.3)。

## 4. 考察

今回設定した負荷NaCl濃度と継代回数において高塩類負荷細胞と通常条件下培養細胞との間に細胞形態および細胞増殖能に明らかな変化を認めなかったが、遺伝子発現レベルの解析で281種類の癌関連遺伝子中4個の遺伝子が塩類の外的負荷によりヒト小腸上皮内で発現量に変化することが確認された。これらの遺伝子はすべてこれまでにヒトの癌関連遺伝子として報告されているものである。これらの変化がいわゆるgeneticもしくはepigeneticな原因によるものかの検討は今後必要であるが、塩類負荷によるこれらの遺伝子発現量の変化が長期的に消化管上皮細胞にいかなる影響をもたらすのか興味深い。

## 5. 今後の課題

今後は同定された4種類の候補塩類感受性遺伝子のヒト上部消化管上皮組織での発現量変化を正常胃粘膜、萎縮性胃炎、腸上皮化生、および癌組織等のRNAについて解析し、ヒトの上部消化管癌発生とこれらの遺伝子発現との相関を検討する必要がある。今回の検討により我々が設定した細胞実験系を用いて塩類負荷条件下の上皮細胞内の遺伝子発現変化を検出できることが確認されたが、長期的にはより多くの対象遺伝子を網羅したマイクロアレイによる包括的、体系的な塩類感受性遺伝子のリストアップが必要であると思われる。これらの候補遺伝子群と癌発生との因果関係の解明には今後も、細胞実験系 (in vitro) データと生体標本 (in vivo) データの相互検証という各個撃破的で地道な確認作業が必要と考えている。

## 6. 文献

1. MacGregor GA. Salt--more adverse effects. *Am J Hypertens* 10: 37S-41S (1997)
2. Palli D. Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence. *J Gastroenterol* 35 Suppl 12: 84-89 (2000)
3. La Vecchia C, Franceschi S. Nutrition and gastric cancer. *Can J Gastroenterol* 14 Suppl D: 51D-54D (2000)
4. Sipponen P, Hyvarinen H, Seppala K, Blaser MJ. Review article: Pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. *Aliment Pharmacol Ther* 12 Suppl 1: 61-71 (1998)
5. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet.*14: 367-370 (1996)

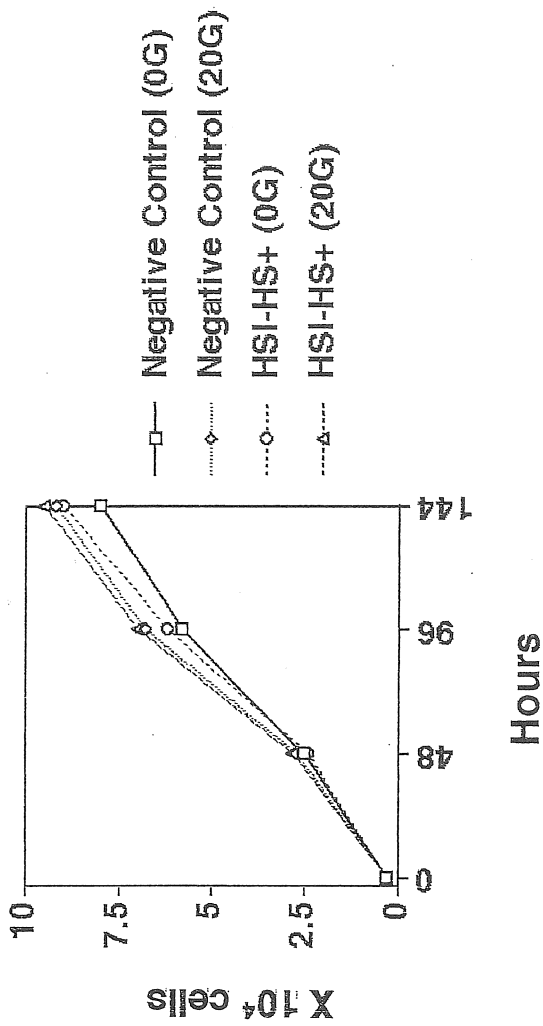


Fig. 1 Growth curve of human small intestine cells that were cultured in high salt (HSI-HS+) or normal condition (Negative Control). Mean cell numbers on days 0, 2, 4, and 6 after high salt exposure are plotted (three replicates). G indicates the number of cell passage (generations).

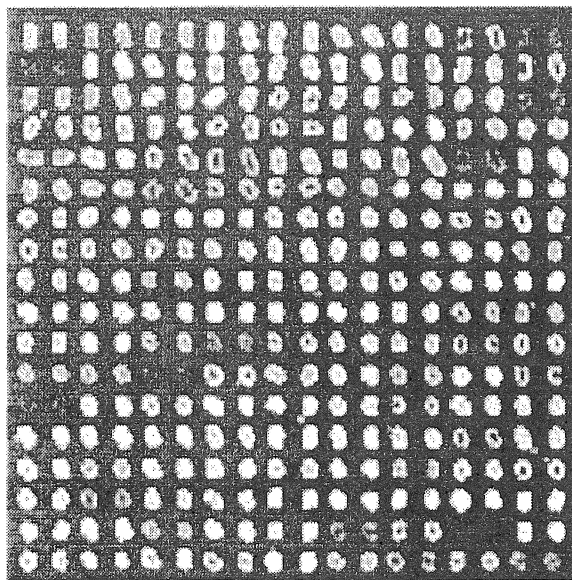


Fig. 2 Image of microarray hybridization. RNA from human small intestine cells that were cultured in high salt-concentration medium (HSI-HS+) was labeled in red and reference RNA from the cells cultured in normal condition (HSI-HS-) in green.

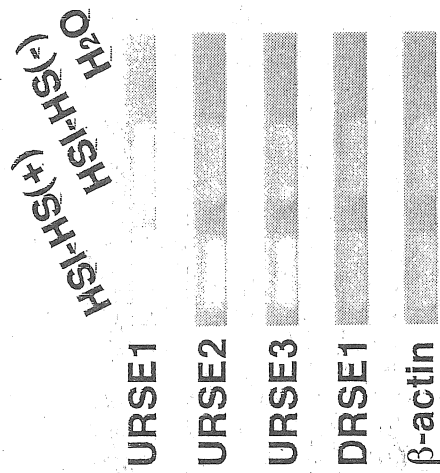


Fig. 3 Expression of four genes, using RT-PCR analysis, in human small intestine cells that were cultured in high salt (HSI-HS+) or normal condition (HSI-HS-). Beta-actin levels were measured as a control. Three of these genes, URSE1-3 (Up-regulated by salt exposure) showed an increase in expression in HSI-HS(+).s. Another gene, DRSE1 (Down-regulated by salt exposure) was suppressed in HSI-HS(+).



Isolation of salt exposure-sensitive genes in human small intestine cells: A new approach for the molecular evaluation of the role of salt exposure in upper gastrointestinal carcinogenesis in humans

Yataro Daigo<sup>1</sup>, Masayuki A Fujino<sup>1</sup>, Ichiro Takayama<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Yamanashi Medical University School of Medicine

<sup>2</sup>University of Nevada School of Medicine

#### Summary

Upper gastrointestinal cancer (UGIC) is one of the most common malignant tumors in Japan. A large number of studies have indicated that salted, smoked, pickled, and preserved foods (rich in salt, nitrite, and preformed N-nitroso compounds) and *Helicobacter pylori* infection are associated with an increased risk of UGIC. In contrast, strong evidence has been provided that high consumption of fresh fruit and raw vegetables and a high intake of antioxidants are associated with a reduced risk of UGIC. These factors may vary in effect between populations and individuals but, if active, may affect the cell genome which may further influence the course and progression of chronic inflammations, and can finally result in overt UGI neoplasia. The molecular biology of gastric cancer has revealed a spectrum of gene errors which vary in type and extent between different histological types of cancer, and between individual cases. There is evidence that the intestinal metaplasia or the gastric epithelium in atrophic gastritis reveal signs of abnormal expression of various regulatory genes well before the appearance of gastric neoplasia. It is possible that the mechanisms leading to genetic aberrations in epithelial cells are triggered very early in the gastritis cascade, and that atrophic gastritis and intestinal metaplasia result from these processes.

In the present study we hypothesized that there may be differential expression of genes in the UGI epithelial cells that are cultured in high salt-concentration and the cells cultured in a normal condition. Therefore RNA expression in human small intestine epithelial cells that were cultured in high salt medium (HSI-HS+) was studied using a cDNA microarray method. Four genes were differentially expressed: three were increased and another gene was suppressed in HIS-HS+. cDNA microarray will allow the isolation of salt-sensitive genes and may help develop a molecular profile of gastrointestinal disorders which have close relationship with salt exposure.