

原 著

胃粘膜上皮細胞における trefoil factor family 1 (TFF1) 発現 に影響を与える因子に関する検討

獨協医科大学 内科学 (消化器)

藤井陽一朗 島田 忠人

要 旨 乳癌由来細胞株 MCF-7 でエストロゲン誘導遺伝子として見出された TFF1 は、生理的には胃粘膜に発現し重要な粘膜防御因子として機能している。本研究では、胃癌由来細胞株 MKN45 を用い、胃における TFF1 発現調節機構について検討した。MCF-7 では TFF1 発現はエストロゲン依存性であったが、MKN45 では TFF1 の発現はエストロゲン非感受性であり、TFF1 遺伝子プロモーター上のエストロゲン応答配列よりもさらに近位側の配列が、MKN45 における TFF1 発現に大きな影響を与えていた。MKN45 にもエストロゲン受容体 (ER α , ER β) の発現は認められたが、MCF-7 と比べると ER α の発現レベルが低く、ER α を強制的に発現させると MKN45 でも TFF1 発現がエストロゲン感受性となった。胃粘膜での TFF1 発現は粘膜損傷時に上昇することが知られているので、このような誘導性の TFF1 発現機構を検討する目的で phorbol ester (TPA), TNF- α の影響をみたところ、TPA は AP-1 を介して、TNF- α は NF- κ B を介して TFF1 の発現を上昇させることが示唆された。これらの結果より、胃粘膜上皮細胞では TFF1 発現はエストロゲン非依存性であり、また、AP-1 や NF- κ B が誘導性の発現調節に関与していると考えられた。

Key Words : 胃粘膜上皮細胞, TFF1, エストロゲン, AP-1, NF- κ B

緒 言

Trefoil factor family (TFF) は分子内に特徴的な三つ葉のクローバー様構造 (TFF domain) を有する一群のペプチドである¹⁾。TFF は消化管粘膜をはじめとして各種の粘液産生上皮に発現し、ムチンと共同して粘膜の恒常性の維持に重要な働きをになっている²⁾。ヒトにおいてはこれまでに TFF1 (pS2), TFF2 (spasmolytic polypeptide), TFF3 (intestinal trefoil factor) の3種の TFF ペプチドが同定されているが³⁾、消化管粘膜においては、TFF1, TFF2 は主に胃粘膜で高レベルに発現しており、TFF3 は下部消化管の杯細胞での発現レベルが高い⁴⁾。

TFF1 は当初、乳癌由来細胞株である MCF-7 で estrogen-inducible gene として発見されたものであり⁵⁾、MCF-7 では TFF1 の発現はエストロゲン依存性である⁶⁾。この

観察から予想されるように TFF1 遺伝子のプロモーター領域にはエストロゲン応答配列 (estrogen responsive element : ERE) が存在している⁷⁾。しかしながら、胃粘膜上皮細胞は生理的に高レベルの TFF1 を発現しているにもかかわらず、エストロゲンが胃粘膜で TFF1 発現に影響を与えていることを示す証拠はない⁸⁾。胃粘膜上皮にもエストロゲン受容体が発現しているという報告^{9, 10)}があることを考えると、これは不思議なことである。

現在のところ、消化管粘膜上皮特異的な TFF 発現機序は不明であるが、Gott ら¹¹⁾ は、TFF1, TFF2, TFF3 遺伝子のプロモーター領域に共通して認められる4ヶ所の相同配列 (Motif I, II, III, IV) が消化管粘膜上皮特異的な TFF 発現に関与している可能性を論じている。また、Al-azzeh ら¹²⁾ は、TFF1, TFF2 遺伝子のプロモーター上に何ヶ所も見られる GATA 結合サイトが、胃粘膜特異的な TFF1, TFF2 の発現に関連しているのではないかと報告しているが、これらの因子の重要性については必ずしも結論は出ていない。

一方、TFF1 は胃粘膜損傷時に傷害部位周辺でその発現レベルが上昇することが知られているが^{13, 14)}、この TFF1 発現誘導の機序についても詳細は不明である。

平成16年11月1日受付, 平成16年11月24日受理

別刷請求先: 藤井陽一朗

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 内科学 (消化器)

Nunezら¹⁵⁾はEREの他にphorbol esterやc-Ha-rasなどに応答するエンハンサー領域がTFF1遺伝子プロモーター上にあることを報告している。これらの因子がTFF1発現の誘導に関与していると思われるが、胃粘膜上皮由来細胞を用いた十分な解析は行われていない。また、炎症性サイトカイン等の刺激がTFF1発現に影響を与えるかどうかという問題など、TFF1遺伝子の発現調節については興味深い問題が残っている。

以上のような背景をもとに、本研究では正常胃粘膜上皮細胞と同様にTFF1を高発現しているヒト胃癌由来細胞株MKN45を用い、TFF1の基礎的な発現に影響を与える因子について検討を行なうとともに、エストロゲンの効果、phorbol esterや炎症性サイトカインがTFF1発現に与える影響などについて検討を行なった。また、比較のためにMCF-7細胞を用いた検討も並行して行なった。

方 法

1. 試薬および細胞培養

17 β -estradiol, phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA)はEMD Biosciences (La Jolla, CA)より購入した。Recombinant human tumor necrosis factor- α (TNF α)はR & D systems (Minneapolis, MN)より購入した。TPAは純エタノールにて溶解してストック溶液を作製した。実験時には最終的にエタノール濃度は0.1%以下であり、この濃度のエタノールは実験の結果に影響を与えなかった。ヒト胃癌由来細胞株であるMKN45細胞、およびヒト乳癌由来細胞株であるMCF-7細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク(大阪)より購入した。これらの細胞は10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA)を添加したHam's F-12 medium (Invitrogen)で、37°C, 5% CO₂存在下で培養した。TPAおよびTNF- α の効果を見る実験では、実験開始24時間前から0.1% FBS添加 Ham's F12 mediumに切り替えた。また、17 β -estradiolの効果を見る実験では、実験開始24時間前から、10% charcoal/dextran treated FBS (HyClone, Logan, UT)を添加したphenol red-free RPMI1640 medium (Invitrogen)に切り替えた。

2. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは既報のごとく行なった¹⁶⁾。細胞抽出液を10% SDS-polyacrylamide gelにて電気泳動し、PVDFメンブレン (Clear blot membrane, ATTO, 東京)に転写した。抗ER- α 抗体、抗ER- β 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)と反応させ、さら

表1 リアルタイム定量的RT-PCRのためのプライマー

Human TFF1 (GenBank No. NM_003225)
Sense 5'-CAATGGCCACCATGGAGAAC-3'
Antisense 5'-AACGGTGTCTCGTCAAACAGC-3'
PCR産物 188 bp
Human ER- α (GenBank No. X 03635)
Sense 5'-ACCCTCCATGATCAGCAC-3'
Antisense 5'-TGGTTCCTGTCCAAGAGCAAGT-3'
PCR産物 131 bp
Human ER- β (GenBank No. AF051427)
Sense 5'-TAACTTGAAGGTGGGCCTG-3'
Antisense 5'-AGGGACTCTTTTGAGGTTCCG-3'
PCR産物 131 bp
Human β -actin (GenBank No. NM_001101)
Sense 5'-TTCCTGGGCATGGAGTCCT-3'
Antisense 5'-AGGAGGAGCAATGATCTTGATC-3'
PCR産物 204 bp

にHRPを結合した二次抗体と反応させたあと、Lumigo GLO化学発光試薬 (New England Labs, Beverly, MA)により視覚化した。

3. リアルタイム定量的 reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

TRIZOL試薬 (Invitrogen)により培養細胞よりtotal RNAを抽出し、You-prime First Stand Beads (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)を用いてcDNAを作製した。リアルタイム定量的RT-PCRは、既報¹⁷⁾のごとく、SYBR Green PCR reagents (Applied Biosystem, Foster City, CA)を用いてABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)にて行った。 β -actinの発現量も同時に測定し、結果の標準化を行なった。表1に、本研究で用いたPCRプライマーを示す。

4. レポーター遺伝子アッセイ

MKN45細胞から抽出したDNAより、TFF1遺伝子のプロモーター領域(-953から+34)をPCR法にて増幅し(図1)、pGL3-basicベクター (Promega, Madison, WI)のルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入した(TFF1-Luc)。さらに、GeneEditor in vitro site-directed mutagenesis system (Promega)を用いて、5'側の配列を段階的に欠失させたレポーターを作製した(図2)。これらのレポーターベクターの挿入部の塩基配列はシーケンシングにより確認した。細胞は24穴プレートで培養

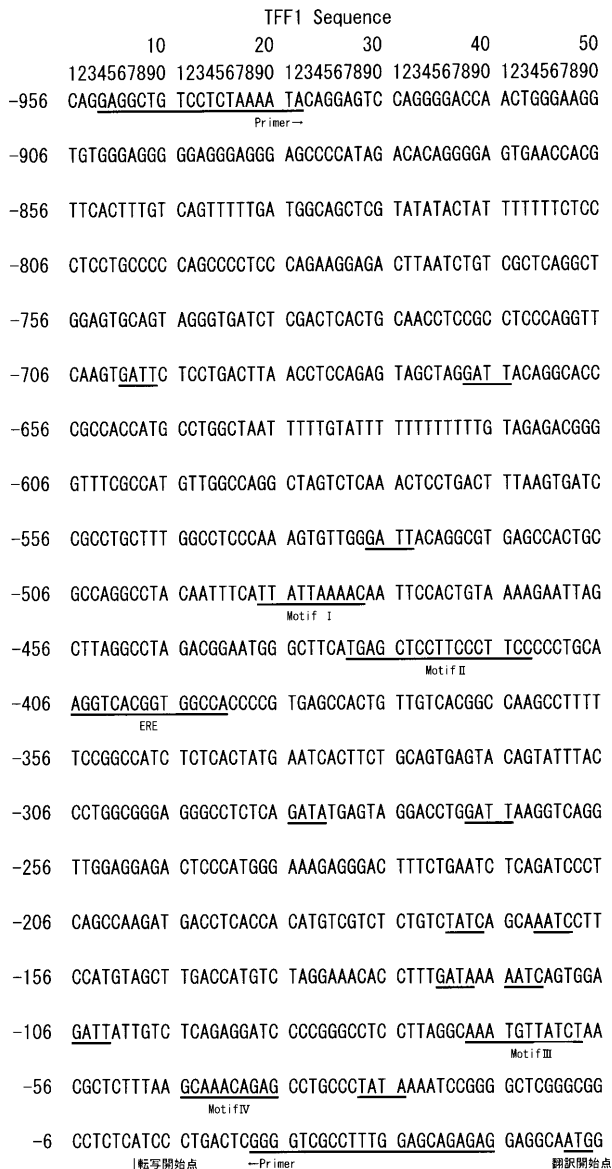


図1 ヒト TFF1 遺伝子プロモーター配列 (GenBank No. AB038162). プライマーで挟まれた領域をPCRで増幅してpGL3-basicベクターに挿入し、TFF1レポーター遺伝子 (TFF1-Luc) とした。図にはTATA box, Motif I, II, III, IV, GATA結合サイトを示す。

し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてレポーターベクターのトランスフェクションを行った。結果の標準化のためにphRL-TKベクター (Promega) のトランスフェクションも同時に行い、24時間後に細胞を回収・溶解して、Dual-luciferase assay (Promega) を行った。ER α 発現ベクターは、MCF-7細胞より作製したcDNAよりER α のコード領域全体をPCR法にて増幅し、pcDNA 3.1ベクター (Invitrogen) に挿入し作製した。

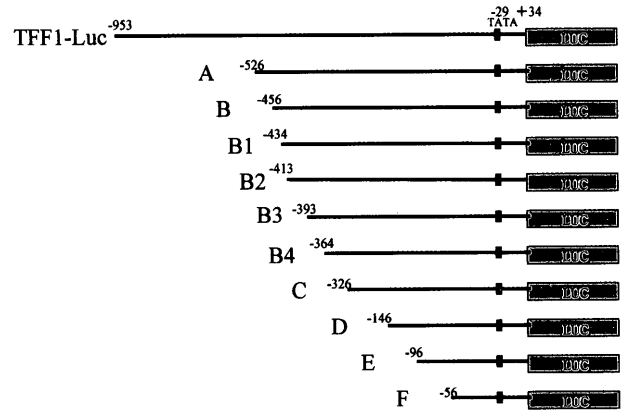


図2 TFF1-Lucの構造と5'側配列を段階的に欠失させたレポーター遺伝子 (A, B, B1, B2, B3, B4, C, D, E, F) の構造

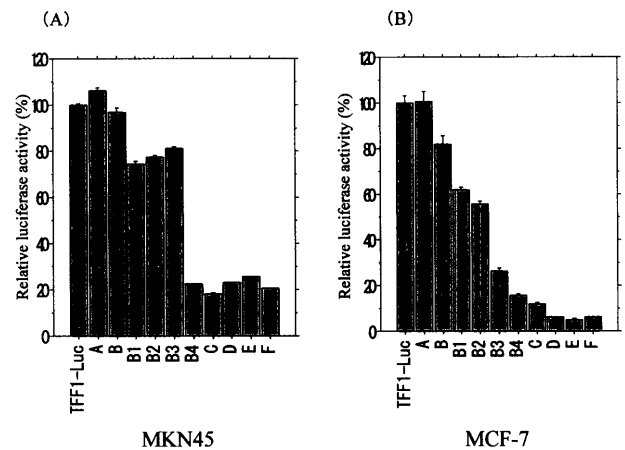


図3 各レポーター遺伝子の発現レベルの比較。(A) MKN45 (B) MCF-7, Mean \pm S.D. (n = 3)

結果

1. MKN45細胞, MCF-7細胞におけるTFF1発現調節の比較

図1にヒトTFF1遺伝子プロモーター領域の塩基配列と、Motif I~IV¹¹⁾, ERE⁷⁾, GATA結合サイト¹²⁾の位置を示す。PCRで増幅した配列 (-953から+34) をpGL3-basicベクターに挿入したTFF1-Lucをもとに、段階的に5'側の配列を欠失させた10種類のレポーターを作成した (図2)。これらのレポーター遺伝子をMKN45細胞とMCF-7細胞にトランスフェクトし、その発現レベルを比較検討した。図3に示すように、MCF-7細胞ではレポーターB, B1のところでは若干の発現レベルの低下が認められたが、特にレポーターB3での発現レベルの低下が目立った。レポーターB3は-406のEREを欠いているので、これはMCF-7細胞におけるTFF1の発現にEREが重要であることを示唆している。

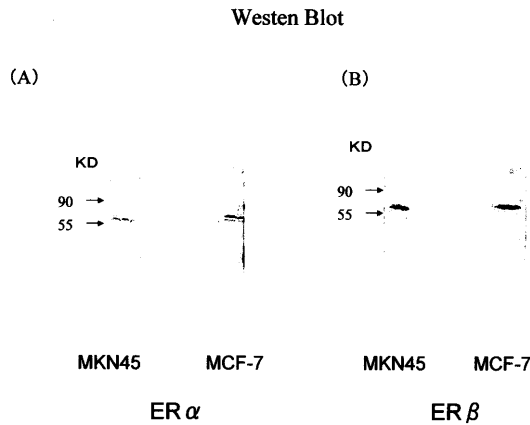


図4 エストロゲン受容体 (ER) 蛋白の発現 (ウエスタンブロットイング). (A) ER α , (B) ER β .

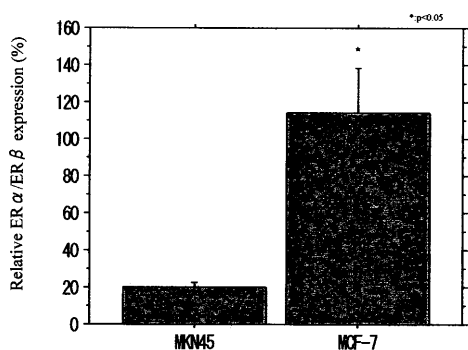


図5 リアルタイム定量的RT-PCR法によるER α とER β の発現比の検討. (A) MKN45, (B) MCF-7, Mean \pm S.D (n = 8), * p < 0.05 vs.MKN45 (t検定)

一方, MKN45細胞では, EREを欠くレポーターB3での発現レベル低下は認められず, レポーターB4において発現レベルの大幅な低下が認められた.

2. TFF1 発現に対するエストロゲンの影響

図3に示した検討では, MKN45細胞においてはEREがTFF1発現に有意な影響を与えていないように思われた. そこで, TFF1発現に対する17 β -estradiol (E_2)の影響について改めて検討を行なった. 図4に示すように, ウエスタンブロット法により蛋白レベルでのER α , ER β の発現を検討したところ, MCF-7細胞のみでなくMKN45細胞においても両方のエストロゲン受容体の発現が認められた. しかしながら, それぞれの細胞種におけるER α とER β の発現比をリアルタイム定量的RT-PCR法でみると, 図5に示すように, MCF-7細胞ではER α がER β と同程度に発現していたのに対し, MKN45細胞では, ER β の発現レベルに対してER α の発現レベルはかなり低いことが示唆された.

E_2 (10 nM) を24時間作用させた後のTFF1 mRNAの発現レベルをリアルタイム定量的RT-PCR法でみてみ

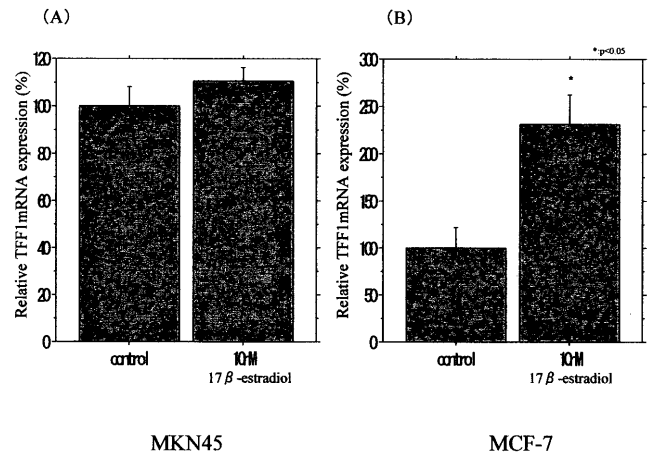


図6 内因性TFF1 mRNA発現に対する17 β -estradiol (10nM, 24時間インキュベーション)の影響. (A) MKN45, (B) MCF-7. Mean \pm S.D (n = 6), * p < 0.05 vs.Control (t検定)

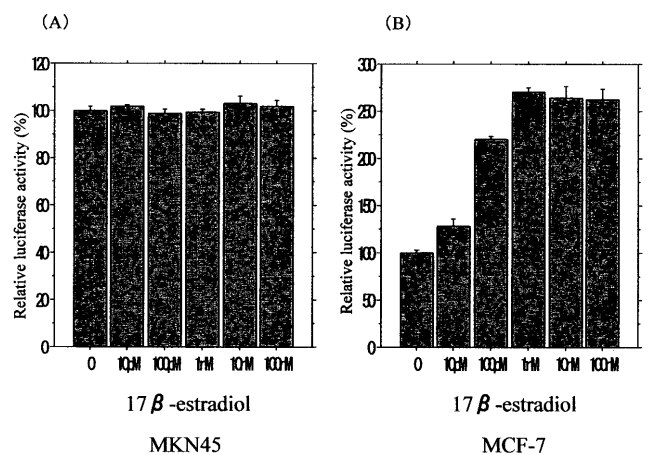


図7 TFF1-Luc発現に対する17 β -estradiol (10nM, 24時間インキュベーション)の影響. (A) MKN45, (B) MCF-7. Mean \pm S.D (n = 3)

ると, 図6に示すように, MCF-7細胞ではTFF1 mRNA発現が有意に上昇しているのに対し, MKN45細胞では変化が見られなかった. 図7にはTFF1-Lucによりレポーター遺伝子解析を行なった結果を示すが, MCF-7細胞で E_2 の濃度依存性にTFF1-Lucの発現が上昇しているのに対し, MKN45細胞では有意な上昇は認められなかった. 図8はER α 発現ベクターを細胞内導入し, 通常の培養条件下で24時間培養後のTFF1-Lucの発現レベルを示すが, この場合はMKN45細胞においてもTFF1-Lucの発現が有意に上昇することが認められた.

3. TFF1 発現に対する phorbol ester の影響

次に, TFF1の発現誘導に関与する因子として重要と考えられているTPAの作用をMKN45細胞とMCF-7細胞とで比較検討した. リアルタイム定量的RT-PCR法

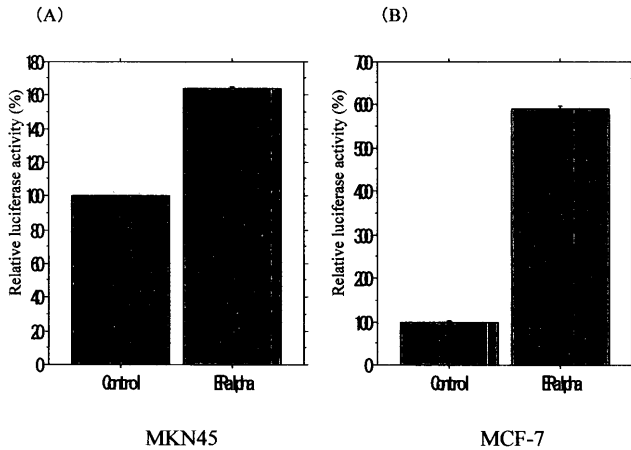


図8 TFF1-Luc発現に対するER α 強制発現の影響。TFF1-LucとともにER α 発現ベクター (0.4 μ g/well) あるいはコントロールとしてpcDNA3.1ベクター (0.4 μ g/well) をトランスフェクトし、F12 medium + 10% FBSの条件下で24時間培養後のTFF1-Luc発現レベルの比較を行った。(A) MKN45, (B) MCF-7. Mean \pm S.D (n = 3)

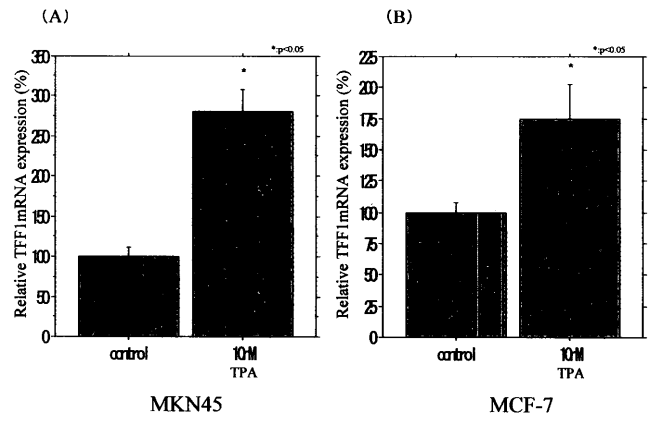


図9 内因性TFF1 mRNA発現に対するTPA (10 nM, 24時間インキュベーション)の影響。(A) MKN45, (B) MCF-7. Mean \pm S.D (n = 6), * p < 0.05 vs. Control (t検定)

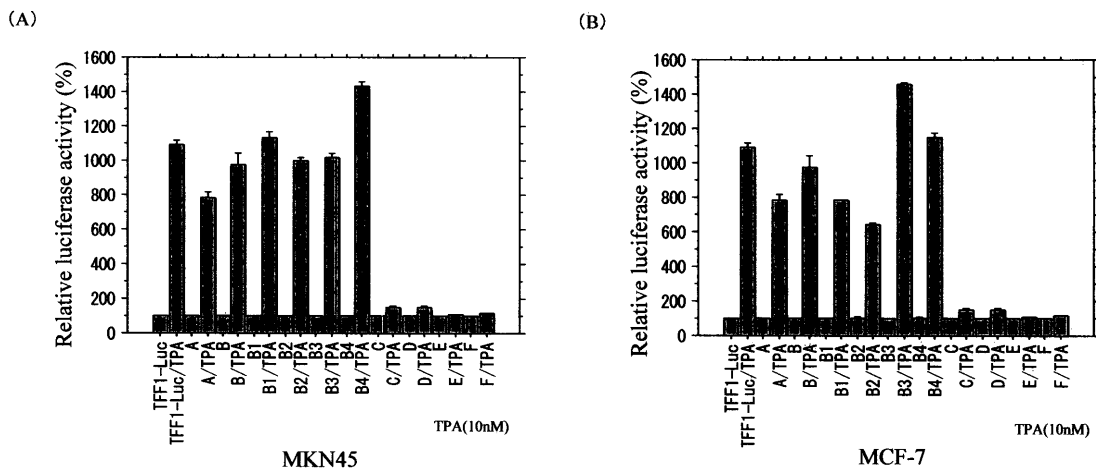


図10 各レポーター遺伝子の発現に対するTPA (10nM, 24時間インキュベーション)の影響(それぞれのレポーターのコントロール時の発現レベルを100%とした場合の相対的变化)。(A) MKN45, (B) MCF-7. Mean \pm S.D (n = 3)

で内因性TFF1 mRNA発現に対するTPAの影響を見てみると、図9に示すように、いずれの細胞種においても、10nM TPAによりTFF1 mRNAの発現レベルは有意に上昇した。レポーター遺伝子解析では、TPAの効果はさらに著明に認められた(図10)。各種のレポーターでTPAに対する反応性の差をみると、MKN45細胞においても、MCF-7細胞においてもレポーターCにおいてTPAに対する反応性がほとんど消失していることが明らかとなった。図11に示すように、レポーターCにおいては-338のAP-1結合サイトが欠失するので、TFF1プロモーター領域に存在するAP-1結合サイトの中で、この部分のAP-1結合サイトが最も重要な役割を果たし



図11 レポーターCで新たに欠失する部分の配列。下線はAP-1結合配列を示す。

ていると考えられた。

4. TFF1発現に対するTNF- α の影響

さらに、代表的な炎症性サイトカインであるTNF- α の作用を検討した。内因性TFF1 mRNAの発現に対するTNF- α の影響をリアルタイム定量的RT-PCR法で検討

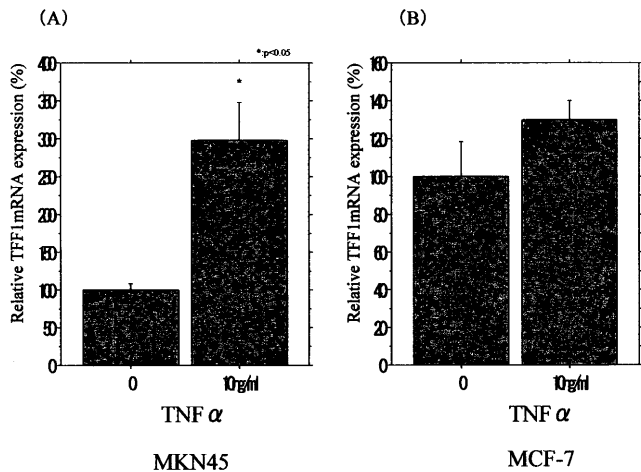


図12 内因性TFF1mRNA発現に対するTNF- α (10 ng/ml, 24時間インキュベーション)の影響。(A) MKN45, (B) MCF-7. Mean \pm S.D (n = 6), * p < 0.05 vs. Control (t検定)

すると、図12に示すように、MCF-7細胞ではTFF1 mRNAの発現はわずかに増大しただけであったが、MKN45細胞では有意な増加が認められた。そこで、MKN45細胞において各種レポーター遺伝子を用いてTNF- α 応答領域の検討を行なった。すると、図13に示すように、レポーターB4でTNF- α に対する反応性が低下し、レポーターDでは反応性が完全に消失することが認められた。レポーターDで欠失する配列を見ると(図14)、この部分にはNF- κ B結合サイトと考えられる配列が2ヶ所存在しており、これらのNF- κ B結合サイトの関与が示唆された。

考 察

TFFペプチドは消化管粘膜防御に関与している主要な因子の一つであり^{1,2)}、特にTFF1は胃粘膜において重要な役割を果たしている^{1,2)}。また、TFF1ノックアウトマウスでは胃前庭部に腫瘍が発生してくることも確認されているので¹⁸⁾、TFF1が癌抑制遺伝子として機能している可能性も考えられている。しかしながら、胃粘膜におけるTFF1の発現調節については不明な部分が多く残っている。ヒト正常胃粘膜を用いての実験はその継代培養が非常に困難であるため、本研究ではヒト胃粘膜のモデルとして胃癌由来細胞株のMKN45を用い、胃におけるMKN45細胞でのTFF1発現に影響を及ぼしている諸因子の検討を行なった。

各種のレポーター遺伝子を用いてTFF1の基礎的な発現機序を検討した実験では(図3)、MCF-7細胞におけるTFF1の発現には-406のEREの存在が重要であることが示唆された。しかしながら、MKN45ではEREの有無は発現レベルに影響を与えず、-365までを欠失させ

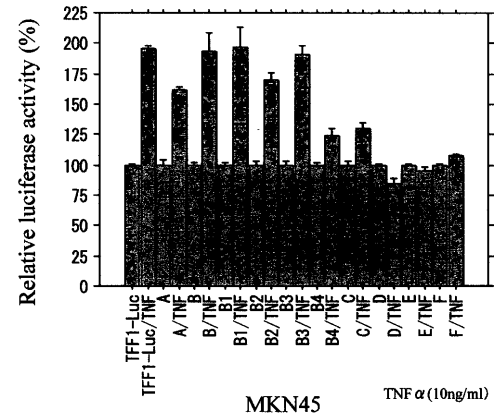


図13 MKN45において各レポーター遺伝子の発現に対するTNF- α (10 nM, 24時間インキュベーション)の影響(それぞれのレポーターのコントロール時の発現レベルを100%とした場合の相対的变化). Mean \pm S.D (n = 3)

-256

TTGGAGGAGA CTCCCATGGG
AAAGAGGGAC TTTCTGAATC

-216

図14 レポーターDで新たに欠失する配列中のNF- κ B結合配列(下線)を示す。

たレポーターB4で発現レベルが著明に低下した。レポーターB4で新たに欠失する領域(-393から-365)に作用する因子は特定できていないが、胃特異的な遺伝子発現に関与する重要な因子である可能性もあるので、現在解析を続けている。

Gottら¹¹⁾は、TFF1, TFF2, TFF3遺伝子のプロモーター領域に共通して見られる4ヶ所のモチーフ(Motif I~IV)が消化管粘膜上皮特異的なこれらのTFF発現と関連している可能性を論じているが、我々の今回の結果の範囲からは、Motif I~IIIについてはその欠失がTFF発現に大きな影響を与えているとは言えなかった。ただし、TATA boxの近傍にあるMotif IVについては、これを欠いたレポーターを今回の検討では試していないのでその意義は不明である。MCF-7細胞と比べると、MKN45細胞では、レポーターFまである程度の発現レベルを保っていることを考えると、Motif IVは何らかの役割を果たしているのかもしれない。胃粘膜上皮細胞にはGATA-6が発現しており¹⁹⁾、TFF1プロモーター上に散在しているGATA結合サイトがTFF1の胃粘膜特異的な発現に関与している可能性もあると考えられ、実際にAl-azzehら¹²⁾は、GATA-6の強制発現によりMKN45細胞でTFF1発現が上昇することを報告している。しかしながら図3の成績を見ると、大きく発現レベルに影響

を与えているGATA結合サイトを指摘することは困難であり、TFF1発現に対するGATAの意義についてはさらに検討を行う必要があるように思われる。

図4~7で示したように、MKN45細胞ではER α 、ER β が発現しているにもかかわらず、TFF1発現はE₂の影響を受けないことが確認された。胃粘膜上皮におけるエストロゲン受容体の発現はこれまでも報告されており^{9,10}、なぜ胃粘膜上皮でTFF1発現がE₂の影響を受けないのかは不思議であるが、今回のリアルタイム定量的RT-PCRによる検討では、MKN45細胞では相対的にER α の発現がER β に比べると低く、細胞内におけるこれら2種の受容体の発現比、あるいはER α の発現量が重要なかもしれない。Biecheら²⁰は、乳癌細胞におけるTFF1発現はER α の発現と相関があるが、ER β の発現とは相関がないという報告を行っており、ER β はTFF1の発現調節にあまり関与していない可能性もあると思われる。ER α を強制発現した場合には、図8に示したようにMKN45細胞においてもTFF1発現レベルが上昇することも、ER α とER β との役割の差を示唆していると考えられる。

胃粘膜障害部位では、TFF1は他のTFFペプチドとともにその発現レベルが上昇することが知られている^{13,14}。このようなTFF1の発現誘導の機序は必ずしも明らかとなっていないが、各種の炎症性刺激がTFF1発現に影響を与えている可能性が考えられるため、今回の研究ではTPAとTNF- α の効果をみた。TPAはTFF1の発現を著明に増大させたが、図10に示したようにレポーターCでその効果は消失することが、MKN45細胞でもMCF-7細胞でも同様に認められた。TPAの効果は主としてAP-1を介していると考えられるが、この結果から、TFF1プロモーター上に数ヶ所指摘できるAP-1結合サイトのうち、レポーターCで欠失する-338のAP-1結合サイトが最も重要な役割を果たしていることが推定される(図11)。この結果は、これまで他の細胞種で検討された結果と一致している²¹。また、TNF- α の作用は主としてNF- κ Bの活性化を介していると考えられるが、今回の検討ではTNF- α もMKN45細胞において有意にTFF1発現を増加することが認められた。MCF-7細胞でTNF- α の効果が認められなかった原因は不明であるが、MCF-7細胞におけるTNF- α 受容体の密度の問題かもしれない。レポーター遺伝子解析ではレポーターDでTNF- α の作用が完全に消失し、また、レポーターDで欠失する配列中にNF- κ B結合サイトと考えられる配列が2ヶ所含まれるので(図14)、TNF- α の作用は主としてこの部分を介したものであろうと考えられた。しかしながら、図13ではレポーターB4の段階でも

TNF- α に対する反応性が低下しているので、TNF- α の作用機序については、さらに検討を行なう必要があるように思われる。今回の検討ではTNF- α はTFF1発現レベルを上昇させるように作用しており、また我々は胃癌由来細胞株であるAGSを用いた検討でも同様の結果を得ているが(data not shown)、Dossingerら²²は、炎症性サイトカインはむしろTFF1発現レベルを低下させるという報告を行なっている。今回の成績との相違の原因は不明であり、今後さらに検討を行い詳細を明らかにする予定である。

TFFペプチドあるいはTFF発現を調節する因子などは、近い将来に消化管粘膜障害の予防・治療などに臨床応用される可能性が高く、そのためにも各TFFペプチドの作用機序、発現調節機序などに関する基礎的な検討を行うことが重要な課題となっている。今回の結果から、胃粘膜上皮細胞におけるTFF1発現がMCF-7細胞とは異なった機構で調節されていることが示唆され、また、AP-1やNF- κ Bを介するTFF1発現誘導についての知見が得られた。我々は今回の検討で未解決の問題について今後引き続き検討を行っていく予定であり、消化管粘膜におけるTFFの動態についてより詳細な知見を集積していきたいと考えている。

結 論

胃癌由来細胞株であるMKN45細胞を用いて、胃におけるTFF1発現に影響を与える因子について検討を行なった。1) MCF-7細胞ではEREの欠失により発現レベルが大幅に低下するのに対し、MKN45細胞では、EREよりもやや近位側の配列がTFF1発現レベルに大きな影響を与えていることが明らかとなった。2) E₂がTFF1発現に与える影響をMCF-7細胞とMKN45細胞とで比較すると、MCF-7細胞では内因性のTFF1 mRNA、TFF1-Lucの発現がともに増大したのに対し、MKN45細胞では有意な変化は認められなかった。3) ER α 、ER β の発現は両方の細胞種で認められたが、MKN45細胞ではER α の発現レベルがER β に比して低く、ER α を強制発現させるとMKN45細胞においてもTFF1発現が増大した。4) MKN45細胞ではTPAは著明にTFF1発現を増大させ、TNF- α もTFF1発現を有意に増大させることが認められた。各種レポーター遺伝子の検討では、これらのTPA、TNF- α の作用は、それぞれ、AP-1結合サイト、NF- κ B結合サイトと考えられる領域を欠失したレポーターで消失するので、AP-1やNF- κ Bがこのような誘導性のTFF1発現に関与している可能性が考えられた。

謝 辞 稿を終えるにあたり、ご助力を賜りました保坂久美さん（獨協医科大学消化器内科）、田部井恭子さん（獨協医科大学医学総合研究所）に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Thim L. : Trefoil peptides : from structure to function. *Cell Mol Life Sci.*, **53** : 888-903, 1997.
- 2) Hoffmann W, Jagla W. : Cell type specific expression of secretory TFF peptides : colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol.*, **213** : 147-181, 2002.
- 3) Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, et al : Rolling in the clover : trefoil factor family (TFF) - domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett.*, **408** : 121-123, 1997.
- 4) Podolsky DK, Lynch -Devaney K, Stow JL, et al : Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem.*, **268** : 12230, 1993.
- 5) Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, et al : Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res.*, **10** : 7895-7903, 1982.
- 6) Nunez AM, Jakowlev S, Briand JP, et al : Characterization of the estrogen-induced pS2 protein secreted by the human breast cancer cell line MCF-7. *Endocrinology.*, **121** : 1759-1765, 1987.
- 7) Berry M, Nunez AM, Chambon P. : Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86** : 1218-1222, 1989.
- 8) Rio MC, Bellocq JP, Daniel JY, et al : Breast cancer-associated pS2 protein : synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science.*, **241** : 705-708, 1988.
- 9) Takano N, Iizuka N, Hazama S, et al : Expression of estrogen receptor- α and- β mRNAs in human gastric cancer. *Cancer Lett.*, **176** : 129-135, 2002.
- 10) Matsuyama S, Ohkura Y, Eguchi H, et al : Estrogen receptor β is expressed in human stomach adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.*, **128** : 319-324, 2002.
- 11) Gott P, Beck S, Machado JC, et al : Human trefoil peptides : genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *Eur J Hum Genet.*, **4** : 308-315, 1996.
- 12) Al-azzeah ED, Fegert P, Blin N, et al : Transcription factor GATA-6 activates expression of gastroprotective trefoil genes TFF1 and TFF2. *Biochim Biophys Acta.*, **1490** : 324-332, 2000.
- 13) Rio MC, Chenard MP, Wolf C, et al : Induction of pS2 and hSP genes as markers of mucosal ulceration of the digestive tract. *Gastroenterology.*, **100** : 375-379, 1991.
- 14) Wright NA, Poulsom R, Stamp GW, et al : Epidermal growth factor (EGF/URO) induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. *J Pathol.*, **162** : 279-284, 1990.
- 15) Nunez AM, Berry M, Imler JL, et al : The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO J.*, **8** : 823-829, 1989.
- 16) Kojima K, Shimada T, Mitobe Y, et al : Effect of PPAR γ ligands on the viability of gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther.*, **16** : 67-73, 2002.
- 17) Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, et al : Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut.*, **50** : 658-664, 2002.
- 18) Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, et al : Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science.*, **274** : 259-262, 1996.
- 19) Yoshida T, Sato R, Mahmood S, et al : GATA-6 DNA binding protein expressed in human gastric adenocarcinoma MKN45 cells. *FEBS Lett.*, **414** : 333-337, 1997.
- 20) Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, et al : Quantification of estrogen receptor α and β expression in sporadic breast cancer. *Oncogene.*, **20** : 8109-8115, 2001.
- 21) Barkhem T, Haldosen LA, Gustafsson JA, et al : pS2 Gene expression in HepG2 cells : complex regulation through crosstalk between the estrogen receptor α , an estrogen-responsive element, and the activator protein 1 response element. *Mol Pharmacol.*, **61** : 1273-1283, 2002.
- 22) Dossinger V, Kayademir T, Blin N, et al : Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem.*, **12** : 197-206, 2002.

Factors Affecting TFF1 Expression in Gastric Epithelial Cells

Yoichiro Fujii and Tadahito Shimada

Department of Gastroenterology, Dokkyo University School of Medicine, Mibu Tochigi, 321 - 0293 Japan

Trefoil factor family 1 (TFF1) is a protease-resistant polypeptide expressed at a high level in gastric epithelial cells and plays a critical role in the defense and repair of gastric mucosa. In the present study, we examined the regulatory mechanisms of gastric TFF1 expression using a gastric cancer cell line, MKN45. Since TFF1 was originally discovered as an estrogen-inducible gene in a breast cancer cell line, MCF-7, MCF-7 was also examined for comparison. The promoter sequence of human TFF1 gene (-953 to +34) was cloned into pGL3 basic vector to make a TFF1 reporter gene and several deletion mutant reporters were also made. Endogenous TFF1 mRNA expression was analyzed by real-time quantitative RT-PCR. In MCF-7 cells, basal TFF1 expression was dependent on the presence of an estrogen-responsive element (ERE) (-406), while deletion of ERE had no significant effect on the reporter gene expression in MKN45 cells. In MKN45 cells, deletion of more proximal region (-393 to -365) significantly affected the reporter gene expression.

Compared to estrogen receptor β (ER β), the expression level of estrogen receptor α (ER α) was low in MKN45 cells and we found that TFF1 expression became estrogen-sensitive when ER α was overexpressed in MKN45 cells. Phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) up-regulated the expression of endogenous TFF1 mRNA and TFF1 reporter genes. A series of reporter gene experiments suggested that AP-1 site (-338) and NF- κ B sites (-251, -230) are involved in the action of TPA and TNF- α , respectively. These results suggest that, compared to MCF-7 cells, the basal TFF1 expression is differently regulated in gastric epithelial cells, and that up-regulation of TFF1 expression, which is often observed at the site of gastric mucosal lesions, may be mediated by AP-1 and/or NF- κ B.

Key Words : gastric epithelial cells, TFF1, estrogen, AP-1, NF- κ B