

平成 31 年 4 月 6 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09330

研究課題名(和文) Smad2/3リンカー部リン酸化に着目した癌幹細胞・癌の発生・進展に関する検討

研究課題名(英文) Analysis of cancer stem cells and appearance, development and progression of cancer lesions focusing on phosphorylation of the linker region of Smad2/3

研究代表者

福井 寿朗 (FUKUI, Toshiro)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60402905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：短期モデルに微小腫瘍を、長期モデルに腫瘍深部浸潤と脈管内浸潤を確認した。短期モデルの検討にて、腫瘍性病変は粘膜再生部の組織幹細胞が腫瘍化し、腫瘍腺管が上下へ伸び、分枝・増大したものと考えられた。微小病変や粘膜下浸潤部、脈管侵襲部にもpSmad2/3L-Thr陽性細胞を確認した。長期モデルの主腫瘍部ではE-カドヘリン発現低下(EMT)を認めた。長期モデル腫瘍内のカテニン核陽性部に多くのpSmad2/3L-Thr陽性細胞を認めた。ヒト食道癌・大腸腺腫内癌にpSmad2/3L-Thr陽性細胞を認めた。腫瘍幹細胞の可能性を考えている。進展度、悪性度に比例し発現が増加する傾向があり解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(癌)幹細胞に関し現在も多方面から国内外で研究され成果は飛躍的に進歩している。癌幹細胞をターゲットとした治療法の開発も試みられ、消化器癌治療においても当該分野の研究開発は急務である。本研究では研究代表者が(癌)幹細胞と細胞周期に関する知見を応用し、独自に発見した抗pSmad2/3L-Thr抗体を用いての消化管(癌)幹細胞の同定法にて病変の形成・進行のメカニズムを解析するという非常に独創的なアプローチ方法となっている。(癌)幹細胞の動態を利用した同定法であるためマウスの他臓器での応用やヒト組織にもそのまま利用でき、多方面での臨床医学的な有用性も考えられ今後ブレークスルーとなる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：We confirmed intra-epithelial micro-neoplasias in the short-term model and invasive neoplasias over submucosa and with intra-vascular infiltration in the long-term model. In the short-term model, it was considered that the neoplasias arose from neoplastic transformation of tissue stem cells in the mucosal regeneration area, and the neoplastic duct extended and branched up and down. pSmad2/3L-Thr positive cells were confirmed in micro-neoplasias, submucosal invasions and vascular invasions. E-cadherin downregulation was observed in the main neoplastic area of the long-term model. Many pSmad2/3L-Thr positive cells were observed in the nuclear beta-catenin positive area of the long-term model. pSmad2/3L-Thr positive cells were found in human esophageal cancer and colon carcinoma in adenoma. We have been considering the possibility of cancer stem cells. The expression of pSmad2/3L-Thr tends to increase in proportion to the degree of progression and malignancy, and analysis is continued.

研究分野：消化器内科学(特に消化管)

キーワード：大腸腫瘍モデルマウス 腫瘍幹細胞 腫瘍化 深部浸潤 脈管侵襲 転移 ヒト大腸癌 ヒト食道癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管粘膜には上皮幹細胞が存在し定常状態を維持するための増殖・分化と粘膜障害時の再生の際に中心的な役割を果たし構造的・機能的恒常性を一定の状態に保っている。これまでの研究により、各組織における組織幹細胞は多分化能・自己複製能を持つ未分化な細胞で細胞の分裂サイクルはきわめて遅く、通常は細胞周期のG0期(静止期)にある細胞であると考えられてきた。しかし近年、腸管幹細胞マーカーとされるLgr5の発見などにより、細胞の分裂サイクルの速い組織幹細胞も存在することが提唱され組織幹細胞の概念は多分化能と自己複製能に限定され解釈されつつある(引用文献)。特に小腸ではPottenらを中心に以前より提唱されてきた細胞の分裂サイクルの遅い幹細胞(LRCs; label-retaining cells)の存在部位とされる陰窩底部パネート細胞直上の+4 positionの幹細胞マーカーであるBmi1と細胞の分裂サイクルが速くパネート細胞の間に存在するとされるCBC(crypt base columnar)細胞の幹細胞マーカーであるLgr5の両者が組織幹細胞マーカーとして提唱されている。両者とも多分化能を有し小腸の全ての細胞に分化するが、どちらがより上流の幹細胞であるかは明らかになっておらず両者は相補的な関係であることも提唱されている(引用文献)。

(2) 一方腫瘍組織においても構成細胞は一様でなく正常組織幹細胞と類似の性質を持った、特に未分化な少数の細胞集団が存在し悪性腫瘍の増殖・浸潤・転移・再発に重要な役割を果たすという癌幹細胞仮説が癌の進展に重要と考えられるようになった(引用文献)。腫瘍という分裂サイクルの早い細胞集団の中にあつて、癌幹細胞は分裂サイクルが特に遅く、しばしばG0期にあるため放射線や抗癌剤といった従来の治療法に対し抵抗性を示すと考えられ、この少数の細胞集団をターゲットとした治療が新たな癌治療と期待されている。大腸癌の癌幹細胞の起源に関しては不明なことが多く、正常組織幹細胞が癌幹細胞に転化するというbottom-up仮説と後期前駆細胞や早期分化細胞の脱分化から癌幹細胞が生じるとするtop-down仮説の二つの理論が提唱されている。腫瘍形成の早期において異型細胞は陰窩表層に認められることや、大腸癌モデルラットにおける前駆病変と考えられるAberrant crypt foci(ACF)と呼ばれる異型細胞集団は大腸粘膜表層に認められることから、組織学的な観点からは大腸癌においてtop-down仮説が支持されている(引用文献)。しかし、慢性炎症等により細胞が脱分化し幹細胞的特性を獲得すれば、正常組織幹細胞や分化した細胞のどちらにおいても腫瘍原性変異を起こし得るため両仮説は排他的なものではないとも考えられている(引用文献)。

(3) 細胞周期の移行はセリン/スレオニンキナーゼのCDK、CDKと結合し酵素活性を発現させるcyclin、CDK inhibitorにより制御されている。CDK4・cyclinD複合体は、癌抑制遺伝子の一つであるRb蛋白をリン酸化し細胞増殖抑制作用を抑制することにより細胞周期進行や癌化に関与している。一方Rb蛋白以外ではSmad3をリン酸化し、G0・G1期からS期への進行に関与している(引用文献)。さらにCDK4はG0期にあるCD34陽性の造血幹細胞中に複数存在するCDKの中で唯一認められG0期にある幹細胞が細胞分裂し始める際に重要な働きを持つとされている(引用文献)。

(4) Smad2およびSmad3(Smad2/3)はMH1・MH2のドメインと間を繋ぐリンカー部から構成される。TGF-受容体はSmad2/3のC末端をリン酸化し細胞増殖を抑制し、ERK・JNK等のMAPキナーゼやCDK4はSmad2/3のリンカー部のセリン・スレオニンをリン酸化して細胞増殖を促進する(引用文献)。

2. 研究の目的

CDK4にてリン酸化されSmad2/3の細胞増殖作用に最も影響するリンカー部スレオニンがリン酸化されたSmad2/3(pSmad2/3L-Thr)を認識する抗体を用いpSmad2/3L-Thrが分裂周期にre-entryしようとするG0期上皮幹細胞のマーカーになることを食道、胃、小腸・大腸においてこれまで報告した。さらには大腸炎症性発癌モデルマウスの腫瘍部にも上皮幹細胞と同様の性質を持つpSmad2/3L-Thr陽性細胞が存在し癌幹細胞マーカーになり得ることも報告した。本研究では、これまでの研究成果を発展させpSmad2/3L-Thrにて同定した正常組織幹細胞と癌幹細胞を抽出し両幹細胞の共通・相違点を明らかにする。また大腸炎症性発癌モデルマウスの各病期におけるpSmad2/3L-Thr陽性細胞を検討することにより癌幹細胞・浸潤・転移・上皮間葉移行(EMT)を念頭に置いた癌化・癌の進展メカニズムの解析が可能であると考えている。同様の手法によりヒト潰瘍性大腸炎・腸炎関連大腸癌・その他の消化管悪性腫瘍にてpSmad2/3L発現を中心に検討し病態解析や治療法確立に寄与することが出来ると考えている。

3. 研究の方法

(1) 5週齢の雄ICRマウスに10 mg/kgのAOMを腹腔内投与し、1週間後から2% DSSを7日間自由飲水させる。実験開始4~6週間後(短期モデル)と30週間後(長期モデル)に検体を採取する。解剖時は実体顕微鏡を用い、大腸腫瘍の肉眼所見(腫瘍のサイズ・個数・拡がり)により腫瘍の発生・浸潤や他臓器への転移病変の有無を評価する。

(2) HE 標本作製し、短期モデルでは前述の ACF・微小腫瘍性病変・粘膜内癌の形成を、長期モデルでは病変の粘膜下層以下深部への浸潤を確認する。ACF の粘膜内進展の観察により、このモデルにおける癌幹細胞の発生部位が推測できる。

(3) 無染標本作製し、切片をこれまでの手法同様 pSmad2/3L-Thr と Ki67 または CDK4 に対する抗体を用いて蛍光二重免疫染色を施行する。当研究では短期モデルの前駆・早期病変内に pSmad2/3L-Thr 陽性細胞が存在することを確認する。さらに蛍光免疫染色後の切片をそのまま HE 染色することにより明視野にて腫瘍内の pSmad2/3L-Thr 陽性細胞を確認し分布や特徴を解析する。

(4) 微小病変が腫瘍の前駆・早期病変であることを確認するため、病変部に Ki67・カテニン(核・細胞質)・cyclinD1・Sox9 陽性細胞がびまん性に存在することを免疫染色にて確認する。

(5) 病変内 pSmad2/3L-Thr 陽性細胞が腫瘍細胞で間質細胞や粘膜内浸潤した免疫細胞でないことを確認する。正常細胞では細胞膜に発現し、腫瘍細胞では核・細胞質に異常蓄積が観察される。カテニンと pSmad2/3L-Thr に対する抗体を用いて蛍光二重染色を施行し pSmad2/3L-Thr 陽性細胞は核・細胞質にカテニンが陽性となることを確認する。

(6) 長期モデルでは腫瘍のサイズ・個数は増大し脈管や深部への浸潤も進行すると考えられる。早期モデル同様 pSmad2/3L-Thr 陽性細胞による癌幹細胞の解析とともに、癌の増殖に加え深部浸潤や転移に関係するとされる EMT マーカー (E-カドヘリン発現低下・ビメンチン発現亢進) を免疫染色で確認する。

(7) pSmad2/3L-Thr 陽性細胞における各種蛋白・遺伝子発現 (特に細胞増殖、Smad 周辺のシグナル伝達関連) を炎症部 (非腫瘍部) 大腸粘膜と腫瘍部の差異に注意し特徴を明らかにする。

(8) 内視鏡的な腫瘍病変の治療時に採取・摘出された組織標本 (正常消化管組織と各消化管腫瘍組織) を利用し、免疫染色にて pSmad2/3L-Thr 陽性細胞を検出する。マウスにて確認された陽性細胞の性状や分布をヒト病変においても確認し病態解明や治療法開発の足がかりにする。

4. 研究成果

(1) 短期モデルでは早期の微小腫瘍性病変形成を確認した。長期モデルでは粘膜下層以下への深部腫瘍浸潤と脈管内 (血管・リンパ管) 腫瘍浸潤を確認した。10, 20 週のモデルに比べ、長期モデルでは有意にこれらの所見の頻度が増加していた。

(2) 短期では、多数の微小腫瘍性病変 (200 μ m 以下) が粘膜上方に存在することを確認した。この結果より腫瘍性病変の初期発生部位は正常腺管上方 (top-down) と考えていた。しかし、特に 1~3 腺管の mono, di, tri-cryptal neoplasia の観察にても、正常腺管と連続する腫瘍性病変は全く認められなかった。腫瘍の全体像を正確に把握するため 3 μ m の連続切片による詳細な検討を行ったところ、粘膜固有層内の炎症・線維化が強く炎症性粘膜の上皮再生部である上皮上方に正常腺管とは独立した腫瘍が出現しており、粘膜再生部の組織幹細胞が腫瘍化し、腫瘍腺管が上下へ伸び、分枝・増大すると考えられた。炎症の強い部位に腫瘍化が始まるという理論に合致した所見であった。

(3) 短期モデル微小病変や長期モデル粘膜下浸潤部、脈管侵襲部は Ki67・カテニン・cyclinD1・Sox9 が陽性の腫瘍性病変であることを確認した。微小病変、粘膜下浸潤部、脈管侵襲部にも Ki67 陰性、CDK4 強陽性の pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞を確認できた。この細胞はカテニン陽性の腫瘍細胞であり、以前の検討における 10~20 週の腫瘍病変内に認められ腫瘍幹細胞と考えた pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞と同様の細胞と考えられ、長期モデルでは腫瘍転移に関わると考えられた。

(4) 長期モデルでは、腫瘍部の E-カドヘリン発現低下、ビメンチン発現亢進を認め、EMT (上皮間葉転換) の所見であった。粘膜下浸潤部、脈管侵襲部では Ki67 発現が上皮内腫瘍部と比較し有意に低下していた。長期モデルではカテニン核陽性部が多数認められ、その中に多くの pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞が認められ、腫瘍幹細胞に合致する所見であった。

(5) 内視鏡的に切除されたヒト食道癌・大腸腺腫内癌を利用し、免疫染色にて pSmad2/3L-Thr 陽性細胞を検出した。マウスにて確認された陽性細胞とほぼ同様の性質を示しており、腫瘍幹細胞の可能性を考えている。また進展度、悪性度に比例して発現が増加する傾向があり、現在も解析を継続中である。

<引用文献>

Li L et al. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. Science. 2010;327:542-545.

Takeda N et al. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. Science. 2011;334:1420-1424.

Clarke MF et al. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res. 2006;66:9339-9344.

Shih IM et al. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:2640-2645.

Schwitala S et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. Cell 2013;152:25-38.

Matsuura I et al. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. Nature. 2004;430:226-231.

Furukawa Y et al. Lineage-specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoietic cell differentiation. Br J Haematol. 2000;110:663-673.

Matsuzaki K et al. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2007;46:48-57.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Suzuki Ryo、Fukui Toshiro、Okazaki Kazuichi、腸炎関連大腸癌モデルマウスにおける Smad2/3 リンカー部リン酸化の発癌との関連性についての検討、関西医科大学雑誌、査読無、68 巻、2017、17-22

DOI : 10.5361/jkmu.68.17

〔学会発表〕(計2件)

福井寿朗、特定のリンカー部スレオニンがリン酸化された Smad2/3 蛋白(pSmad2/3L-Thr)の消化管上皮幹細胞マーカーとしての検討と応用、第 53 回日本臨床分子医学会学術集会、2016

福井寿朗、腸炎関連大腸癌モデルマウスにおける Smad2/3 蛋白リンカー部リン酸化の発癌との関連性についての検討、第 7 回日本炎症性腸疾患学会、2016

6 . 研究組織

(1)研究協力者

宮本 早知 (MIYAMOTO, Sachi)

関西医科大学・医学部・大学院生

松本 泰司 (MATSUMOTO, Yasushi)

関西医科大学・医学部・大学院生

谷村 雄志 (TANIMURA, Yuji)

関西医科大学・医学部・大学院生

岡崎 和一 (OKAZAKI, Kazuichi)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号:70145126

西尾 彰功 (NISHIO, Akiyoshi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号:50362463

内田 一茂 (UCHIDA, Kazushige)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号:40411516

松崎 恒一 (MATSUZAKI, Koichi)

関西医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号:70278638

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。