

令和元年6月5日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19359

研究課題名(和文)筋線維芽細胞の消化管幹細胞制御機構の解明とニッチ因子による上皮分化誘導への応用

研究課題名(英文)Function of mesenchymal myofibroblast to sustain gastrointestinal stemness and niche factors for epithelial differentiation

研究代表者

片野 敬仁 (KATANO, Takahito)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50768372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞機能の維持に必要な周辺の微小環境のことをニッチといい、生体内の胃腸腺管上皮化には筋線維芽細胞が接着し、幹細胞ニッチとしての重要性が示唆されている。マウス腺胃・腸から間質筋線維芽細胞を単離培養し解析を行い、胃・腸それぞれに発現量の高い因子が同定され、間質筋線維芽細胞にも組織特異性が存在することが示唆された。早期側方発育型大腸腫瘍の臨床検体を用いた検討から、異所性の胃型・腸型形質発現、内分泌細胞分化、SOX2発現が肉眼型や組織異型度に関連して異なり、これらが悪性化・粘膜下層浸潤の予測マーカーとなり得ることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常状態のみならず発癌プロセスにおいて細胞外環境が消化管幹細胞の挙動に及ぼす影響や幹細胞の可塑性がどう媒介されるかは未解明な点が多い。本研究で胃腸腺管におけるニッチとしての筋線維芽細胞にも組織特異性の存在が示唆され、消化管上皮の組織恒常性維持機構、発癌のメカニズムの解明にもつながるものである。異所性の胃型・腸型形質発現、内分泌細胞分化、SOX2発現が側方発育型大腸腫瘍の早期の発癌・進展過程における悪性化・粘膜下層浸潤の予測マーカーとなり得ることを見出したが、癌幹細胞の胃型・腸型発現の制御機構には類似点が多いと考えられ、癌細胞における新たな治療戦略の礎になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Stem cells are influenced by a microenvironmental niche that includes mesenchymal cells. A gastric mesenchymal myofibroblast (GMF) and intestinal mesenchymal myofibroblast (IMF) cell line were established from mouse. Real-time quantitative RT-PCR showed that Gas1 expression was higher in GMFs, and Hoxc8, Notch1, and Sox10 expression was higher in IMFs. We analyzed 105 colorectal laterally spreading tumors (LSTs) resected by endoscopic submucosal dissection and investigated clinicopathological differences among LST subtypes to identify factors indicative of malignant transformation and invasion. Ectopic gastric and intestinal phenotypes, neuroendocrine cell differentiation, and SOX2 expression differ according to tumor grade in colorectal LSTs, and these markers are correlated with early tumor progression in each LST subtype.

研究分野：消化器内科

キーワード：幹細胞 mesenchymal cell 大腸腫瘍

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

1. 研究開始当初の背景

これまで正常胃腺管の長期間培養は困難であり、種々の動物、細胞での培養法が報告されていたがいずれも単層の培養であり、1週間程度の短期間の培養にとどまることから胃腺管の組織幹細胞からの分化・増殖過程を確認することが不可能であった。われわれは正常胃粘膜上皮腺管を2ヶ月以上にわたり安定的に培養できる3次元培養法(引用文献1)を樹立した。この培養法は、正常胃粘膜上皮腺管を *in vitro* 環境下に極性を保ちながら間質を含む形で再現可能であり、生体内と同様に上皮内に増殖帯・分化帯が存在することも確認している。正常胃腸腺管の分化増殖過程を模倣する *in vitro* 評価系としての3次元培養系を樹立したことで、胃腸形質発現に必要な遺伝子などを個別にそれぞれに確認することが可能となり、この培養法を応用することで、正常胃腸腺管の組織恒常性維持機構の解明、胃腸形質発現のメカニズムの解明に迫りたいと考え、本研究を立案した。

生体内の腸管上皮下には筋線維芽細胞が接着し、幹細胞ニッチとしての重要性が示唆されている。胃腸腺管においても同様に腺管の周囲に裏打ちする筋線維芽細胞が存在しており、われわれが樹立した *in vitro* 3次元培養においても上皮細胞の成長には先行する筋線維芽細胞の裏打ちが必須であることが示されている。腸管上皮下の筋線維芽細胞は Wnt シグナルや Lgr5 のリガンドを産生することから、胃腸腺管におけるニッチとしての筋線維芽細胞の機能を解析することは消化管上皮腺管の組織恒常性維持機構のみならず、腸上皮化生や発癌のメカニズムの解明にもつながるものである。

2. 研究の目的

上記の *in vitro* 3次元培養系を用いて、(1) 幹細胞と間質筋線維芽細胞のシグナル伝達機構の解明(Wnt シグナル、Notch シグナルなど)、(2) 幹細胞マーカーを含めた胃腸組織特異的因子の解析の2点に主眼を置き、種々の消化器疾患(癌、炎症)の病態メカニズムを主に幹細胞を含めた niche 機能の観点から解明することを目的とした。また臨床検体を用いて、(3) 早期大腸悪性腫瘍(特に側方発育型腫瘍)における悪性化・浸潤の予測因子を同定することも目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) 胃・腸の間質筋線維芽細胞株の樹立と組織特異的因子の同定

胃・小腸・大腸の間質筋線維芽細胞における組織特異的因子の同定に関して、C57BL/6J マウス腺胃、小腸、大腸それぞれから間質筋線維芽細胞を単離、培養し、各組織の筋線維芽細胞株を樹立した。total RNA を抽出し、逆転写反応にて cDNA に変換し、real-time RT-PCR にて遺伝子発現の検索を行い、間質筋線維芽細胞における組織特異的因子の検討をおこなった。検索では morphogenesis、hedgehog signaling pathway、bone morphogenetic proteins、fibroblast growth factors、Notch、homeobox genes、Wnt signaling に関連する 46 遺伝子をターゲットとして行った。

(2) *in vitro* 3次元培養系を用いた検討

胃、小腸、大腸それぞれから単離した間質筋線維芽細胞株とそれぞれの上皮の fragment を長期間3次元培養系にて共培養し、上皮間質相互作用における胃型腸型粘液形質発現の誘導能に関して検討した。生後2日齢のマウス(C57BL/6J)の腺胃、小腸、大腸を氷上で切り出し、ミンチした上で、すみやかにコラーゲンゲル内に包埋し、3次元培養を開始した。3cmのセルカルチャーインサート内で上皮及び間質筋線維芽細胞株をコラーゲンゲルに包埋し、6cmの培養皿内に培養液を添加し培養を行った。間質筋線維芽細胞の幹細胞機能維持・上皮分化に与える影響をみるために、上述のコラーゲンゲル内にすでに抽出した消化管筋線維芽細胞を共培養し、sphere 形成能、大きさの評価をし、培養された sphere を免疫組織化学染色で分化細胞の形質を確認した。幹細胞マーカーである leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5)の検索では RNAscope FFPE assay kit (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Hayward, CA, USA)を用い、RNA in situ hybridization (ISH) で評価した。RNA ISH では housekeeping gene である peptidylprolyl isomerase B を positive control とし、DapB gene を negative control とした。

(3) 大腸側方発育型腫瘍の臨床病理学的検討

臨床検体を用い、発癌過程における異所性胃型粘液形質、腸型粘液形質および幹細胞マーカーなどの発現の意義を検討した。内視鏡的粘膜下層剥離術で切除された大腸側方発育型腫瘍(LST) 105例を用いて臨床病理学的検討を行った。内視鏡での肉眼型から granular-type (G-LST) と non-granular-type (NG-LST) に分類した。内視鏡的粘膜下層剥離術で切除された検体は10%ホルマリン固定後にパラフィン包埋、薄切し、標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色で腫瘍の全体を評価し、組織異型度を World Health Organization classification guidelines に準じて、tubular/tubulovillous adenomas with low grade dysplasia を LA 群、tubular/tubulovillous adenomas with low grade dysplasia を HA 群、adenocarcinomas invading the submucosa を SM 群に分類した。この検討では intramucosal carcinoma and carcinoma in situ は HA 群に分類して検討を行った。胃型小腸型形質マーカーとして MUC5AC、MUC6、CD10 (1:100、

Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK) を用い、内分泌細胞分化としての chromogranin A (1:1000, Yanaihara Institute Inc., Fujinomiya, Japan), stem cell marker としての SOX2 (1:200, abcam, Tokyo, Japan) の免疫組織化学染色を行った。各マーカーの陽性基準については、MUC5AC と CD10 は腫瘍全体の 10% 以上が染色された場合を、MUC6 は low power field で腫瘍の 10% 以上が染色された場合を、chromogranin A と SOX2 では high power field で一視野の腫瘍内に 5 個以上の染色細胞を認めた場合に陽性と判断した。また腫瘍の局在においては、脾弯曲部よりも近位大腸を右側とし、脾弯曲部よりも遠位大腸を左側として、腫瘍の局在別での検討も行った。

4. 研究成果

(1) 胃・腸の間質筋線維芽細胞株の樹立と組織特異的因子の同定

生体内の腺管周囲間質には SMA 陽性の筋線維芽細胞が認められた。免疫組織化学的検討では単離培養した胃・腸の間質筋線維芽細胞ともに生体内の腺管周囲間質にみられる筋線維芽細胞と同様に SMA および vimentin 陽性を示した。また、樹立した筋線維芽細胞株では cytokeratin、MUC5AC、HGM、MUC6、HIK1083、MUC2、CD10、chromogranin A、pepsinogen などは上皮細胞のマーカーは陰性であることを確認した。real-time RT-PCR の結果から Gas1 の発現が胃の間質筋線維芽細胞で、Hoxc8 や Notch1 の発現が小腸の筋線維芽細胞で有意に高いことが確認された。これらの結果から、間質筋線維芽細胞にも組織特異性が存在することが示され、上皮間質相互作用が胃・腸それぞれへの分化に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。とくに胃においては hedgehog signal が組織特異的なニッチ因子のひとつと考えられた。

(2) in vitro 3次元培養系を用いた検討

胃・小腸・大腸それぞれから単離した間質筋線維芽細胞株とそれぞれの上皮の fragment を長期間 3次元培養系にて共培養し、上皮間質相互作用における胃型腸型粘液形質発現の誘導能に関して検討を行った。3次元培養内で上皮細胞を筋線維芽細胞と共培養した際に、胃腸上皮腺管が長期間安定的に培養可能となり、RAN-ISH で幹細胞マーカーである Lgr5 陽性細胞が 2ヶ月にわたり 3次元培養内で維持されていることを示した。単独で培養した胃の sphere と胃の間質筋線維芽細胞を組み合わせで培養した sphere において Muc5ac、Muc6、Pga5、PgC、Atp4a、Chga の発現を real-time RT-PCR で検討した。両群間に発現量に有意な差はみられず、胃上皮と胃筋線維芽細胞との共培養により特定の上皮細胞だけでなく多方向への分化誘導能を維持しながら安定的に培養可能となることが示された。異なる組織での上皮 fragment と筋線維芽細胞株の組み合わせでも検討を行ったが、間質筋線維芽細胞株を各組織でのコラーゲンゲル内での間質筋線維芽細胞の培養に差があり評価に難渋し、適切な培養条件とともに研究を継続する。

(3) 大腸側方発育型腫瘍の臨床病理学的検討

臨床検体を用い大腸 LST の病理学的検討を行った。内視鏡的粘膜下層剥離術で切除された大腸 LST のうち、G-LST は 60 例、NG-LST は 45 例であった。G-LST のうち 5 例は adenomas with low-grade dysplasia (LA)、45 例は adenomas with high-grade dysplasia (HA)、10 例は adenocarcinomas invading the submucosa (SM) であった。NG-LST は 8 例 LA、25 例 HA、12 例 SM であった。粘膜内癌は HA 群に分類した。組織異型度に関しては G-LST、NG-LST の両群間に差は認めなかったが、腫瘍サイズは G-LST が有意に大きかった。腫瘍の局在については G-LST は左側に、NG-LST は右側に多く見られた。

異所性胃型粘液形質発現：G-LST における MUC5AC 発現は 56.7% であり、NG-LST の 26.5% より有意に高かった ($p=0.002$)。LA 群での MUC5AC 発現は 8%、HA 群では 51%、SM 群では 41% であった。HA 群における MUC5AC 発現は LA 群より有意に高かった ($p<0.01$)。MUC5AC 発現については G-LST と NG-LST の間に組織異型度毎での差はみられなかった。MUC6 発現は LA 群では認められず、LST 全体で SM 群での発現は HA 群より有意に高く、とくに G-LST で、SM 群の MUC6 は HA 群より有意に高かった ($p<0.05$)。

CD10、chromogranin A、SOX2 発現：CD10 の発現は G-LST、NG-LST いずれにおいても LA 群では陰性であった。LST 全体では SM 群での CD10 発現は LA 群、HA 群より有意に高く、とくに NG-LST において SM 群の CD10 発現は HA 群 ($p<0.05$)、LA 群 ($p<0.01$) より有意に高かった。内分泌細胞分化マーカーの chromogranin A 発現は、NG-LST で、SM 群の HA 群より有意に高かった ($p<0.05$)。SOX2 発現：SOX2 発現は LA 群では認められなかった。LST 全体および G-LST で SM 群での SOX2 発現は HA 群より有意に高かった ($p<0.01$)。

腫瘍の存在部位別での検討：右側大腸での SM 群の SOX2 発現は G-LST、NG-LST のいずれでも HA 群より有意に高く ($p<0.05$)。右側大腸での G-LST での SM 群での chromogranin A 発現は HA 群より有意に高かった ($p<0.01$)。左側大腸では NG-LST における SM 群の CD10 発現が HA 群より有意に高かった ($p=0.027$)。

これらの結果から、大腸 LST における異所性の胃型・腸型形質発現、内分泌細胞分化、SOX2 発現は肉眼型および組織異型度に関連して異なり、MUC5AC、MUC6、CD10、chromogranin A、SOX2 を組み合わせることで、早期の発癌・進展過程における悪性化・粘膜下層浸潤の予測マーカーとなり得ることを見出した。癌幹細胞の胃型・腸型発現の制御機構には類似点が多いと予想され、本研究の結果は正常組織のみならず、癌細胞における胃型・腸型発現の制御による新たな治療

戦略の礎になるものと考えられる。

〔引用文献〕

(1)

Katano T, Ootani A, Mizoshita T, Tanida S, Tsukamoto H, Ozeki K, Ebi M, Mori Y, Kataoka H, Kamiya T, Toda S, Joh T.

Biochem Biophys Res Commun. 2013 Mar 22;432(4):558-63.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Katano T, Mizoshita T, Tsukamoto H, Nishie H, Inagaki Y, Hayashi N, Nomura S, Ozeki K, Okamoto Y, Shimura T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Kataoka H, Kuno T, Takahashi S, Joh T

Ectopic Gastric and Intestinal Phenotypes, Neuroendocrine Cell Differentiation, and SOX2 Expression Correlated With Early Tumor Progression in Colorectal Laterally Spreading Tumors

Clinical Colorectal Cancer, 2017 Jun;16(2):141-146. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

片野敬仁、西江裕忠、尾関啓司、岡本泰幸、溝下 勤、志村貴也、久保田英嗣、片岡洋望、城 卓志 . 大腸側方発育型腫瘍における悪性化・粘膜下層浸潤予測因子の臨床病理学的検討 . 第 2 5 回日本消化器関連学会週間 J D D W 2 0 1 7 . 福岡 (マリンメッセ福岡) 2017 年 10 月 13 日

Takahito Katano, Tsutomu Mizoshita, Joh T. Ectopic Gastric Phenotype, Neuroendocrine Cell Differentiation, and CD10 Expression Correlated With Early Tumor Progression in Colorectal Laterally Spreading Tumors. Digestive Disease Week 2016, San Diego (San Diego Convention Center), USA 2016 年 5 月 21 日

片野敬仁、溝下勤、塚本宏延、稲垣佑祐、林則之、野村智史、西江裕忠、西脇裕高、尾関啓司、森義徳、久保田英嗣、谷田諭史、片岡洋望、城卓志 . 大腸 LST における胃型粘液形質発現の臨床病理学的検討 . 第 12 回日本消化管学会総会学術集会 . 東京 (京王プラザホテル) 2016 年 2 月 26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

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。