

令和元年5月10日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06710

研究課題名(和文) 胃がん幹細胞の同定および制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of gastric cancer stem cells and regulatory mechanism.

研究代表者

寺門 侑美 (Terakado, Yumi)

金沢大学・がん進展制御研究所・博士研究員

研究者番号：00803339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Gan/ Lgr5-DTR-EGFPマウスにおいて、胃粘膜腫瘍の一部にLgr5陽性細胞が認められた。また、Lgr5陽性細胞の局在は、胃腺底部に特異的に存在する正常の胃組織幹細胞とは大きく異なり、胃がん組織全体に点在していた。この結果から、Lgr5により標識されるがん細胞が存在することが明らかとなった。胃がん組織に存在するLgr5陽性細胞の役割を検討するため、DTを1か月間投与し、腫瘍の形態的・組織学的検討を行ったところ、胃粘膜腫瘍の有意な退縮が認められた。この結果より、Lgr5陽性細胞が、がん幹細胞として胃がん組織維持やがん細胞増殖、分化に関与しているという重要な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、新規作製したマウス(Gan/ Lgr5-DTR-EGFP)において、胃粘膜腫瘍の一部の細胞で Wnt経路に重要な Lgr5遺伝子が発現し、Lgr5陽性細胞を欠損させると腫瘍が退縮するという興味深い結果を得た。この結果は、胃がんの発生にWnt経路が関与するという知見とも一致し、Lgr5陽性細胞が胃がん幹細胞として機能している可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)： We focus on a Wnt-target Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) gene which is epithelial stem cell marker in stomach. To elucidate the contribution of Lgr5 expression to inflammation-driven GC initiation, we crossed inflammation-driven GC a mouse model (Gan mouse) with mouse for visualization of Lgr5 expression and depletion of Lgr5 positive cells by Diphtheria toxin (DT) treatment (Lgr5-DTR-EGFP mouse). When Lgr5 positive cells were depleted by DT, polyps were suppressed in this mouse. Furthermore, when we stopped DT treatment, polyps were developed again. Those results indicate that there is a possibility that the expression of Lgr5 is important for the development of inflammation-driven GC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：幹細胞 胃がん マウスモデル

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

1. 研究開始当初の背景

我が国において、がんは死因の第一位を占めているが、特に胃がんは、がんによる死因の上位に位置している。治療法としては外科的切除が第一選択だが、切除不能な場合には抗がん剤を中心とした化学療法が試みられる。しかし、悪性化した胃がんに対する有効な抗腫瘍薬はいまだ乏しく、新規開発が望まれる。胃がん発生・悪性化の分子メカニズムの解明は、胃がん治療の研究開発に重要な知見となりうるが、現在まで完全な理解には至っていない。主要な未解決課題として、1) 胃がん発生に関わる原因遺伝子(ドライバー遺伝子)については不明であり、ヒト胃がん発生・悪性化の分子メカニズムを個体レベルで再現できるマウスモデルが存在しないこと、2) 進行した胃がんはしばしば薬剤耐性を示し、根治に至る有効な治療法が乏しいことがあげられる。近年、薬剤耐性の原因の一つとして、がん幹細胞の存在が示唆された。がん幹細胞は多分化能や自己複製能を持ち、化学療法により周囲のがん細胞が消失しても、残存してがん細胞を再び生み出すことで、がんを再発させるがん起源細胞として定義される。現在まで、胃がんではがん幹細胞の存在が証明されていないことから、胃がん治療に進展をもたらすには、胃がん幹細胞の特性を解明することが重要である。そのために、まず胃がんにおけるがん幹細胞を同定することが必要である。

上記の問題点に対して、ヒトの胃がんをマウスで再現するとともに、胃がん幹細胞の存在を評価できる新規マウスモデルを作製し、胃がん幹細胞の特定およびその制御機構を解明することにより胃がんの発生や悪性化の分子メカニズムに迫ることを目指した。ヒト胃がん発症のリスクファクターとして、ヘリコバクター・ピロリ菌感染による慢性炎症を原因とした萎縮性胃炎が知られている。このことから、慢性炎症は胃がん発生の分子メカニズムを解明するうえで重要な因子になる。所属研究者の大島正伸教授(金沢大学 がん進展制御研究所)らが炎症反応依存的に胃がんを発生するマウスモデル(Gan マウス)を樹立した(Oshima H *et al.*, *Gastroenterology*, 2006)。一方で、ヒト胃がんは、多くのがんの発生や進展に關与する Wnt 経路の活性化により細胞増殖が制御されていることが知られている(Nanki K *et al.*, *Cell*, 2018)。連携研究者の Nicholas Barker 教授(金沢大学 がん進展制御研究所リサーチプロフェッサー)は、Lgr5 陽性細胞を生体内で可視化または選択的に除去できるマウス(後述)を用い、Wnt 経路に重要な標的遺伝子のひとつとして知られている *Lucrene-rich orphan G-protein-coupled receptor* (Lgr5) が、正常胃上皮幹細胞において特異的に発現し、Lgr5 陽性細胞から胃がん前がん病変が生じることを報告した(Barker N *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2011)。そこで申請者は、これらのマウスを組み合わせた新規胃がんマウスモデルを作製することで、炎症依存的胃がん発症と Lgr5 陽性幹細胞の関係性を明らかにできるのではないかとこの発想を得た。

2. 研究の目的

ヒト胃がん発生を模倣した炎症反応依存的胃がん発生マウス(Gan マウス)を用いて、Lgr5 陽性細胞の胃がん発生における役割を検証した後、がん幹細胞として寄与した際の分子メカニズムを解明することで、Lgr5 が胃がん幹細胞の機能的マーカーになりうるかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

Lgr5 陽性細胞を可視化した胃がん発症マウスの作製と解析

大島教授(金沢大学)らが開発した Gan マウスに、Lgr5 陽性細胞を可視化または除去できるマウス(Lgr5-DTR-EGFP マウス)を交配し、炎症反応依存的胃がん発生マウス(Gan/Lgr5-DTR-EGFP マウス)を作製した。Lgr5-DTR-EGFP マウスは、緑色蛍光タンパク質(EGFP)とジフテリアトキシン受容体(DTR)の融合遺伝子が *Lgr5* プロモーターの下流に挿入されているため、Lgr5 陽性細胞を可視化し、ジフテリアトキシン(DT)の投与によって、Lgr5 陽性細胞を任意に枯渇させることが可能である。このマウスに DT を投与し、Lgr5 陽性細胞を除去させることで腫瘍部にどのような影響が及ぼされるか、形質的(腫瘍の大きさや数)また組織学的(染色による病理組織学的診断)変化を経時的に解析した。

4. 研究成果

(1) Gan/Lgr5-DTR-EGFP マウスの胃粘膜上皮における Lgr5 発現の検討

生後 8 か月の Gan/Lgr5-DTR-EGFP マウスにおける Lgr5 発現を GFP の免疫染色で評価したところ、胃粘膜腫瘍の一部に Lgr5 陽性細胞が認められた。また、Lgr5 陽性細胞の局在は、胃腺底部に特異的に存在する正常の胃組織幹細胞とは大きく異なり、胃がん組織全

体に点在していた。この結果から、炎症を伴う胃がんの発生過程において、Lgr5 により標識されるがん細胞が存在することと、その細胞が何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

(2) Lgr5 陽性細胞の胃がん維持における役割の検討

胃がん組織に存在する Lgr5 陽性細胞の役割を検討するため、生後 8 か月の Gan/Lgr5-DTR-EGFP マウスに DT を 1 か月間投与し、Lgr5 陽性細胞の除去が胃がん組織へ及ぼす影響を観察した。DT の投与 1 か月後にこれらのマウスにおける腫瘍の形態的・組織学的検討を行ったところ、DT を投与していないコントロールのマウスと比較して DT を投与した Gan/Lgr5-DTR-EGFP マウスでは胃粘膜腫瘍の有意な退縮が認められた。この結果より、Lgr5 陽性細胞が、がん幹細胞として胃がん組織維持やがん細胞増殖、分化に関与しているという重要な知見を得た。

これらの研究結果は、第 77 回日本癌学会学術総会において発表された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

特になし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：村上和弘, Nicholas Barker

ローマ字氏名：Murakami Kazuhiro, Nicholas Barker

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。