

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790955

研究課題名（和文） 「胃癌幹細胞システム」への骨髄由来細胞の関与

研究課題名（英文） Bone marrow derived cells may play an important role in “gastric cancer stem cell system”.

研究代表者

熊谷 厚志（KUMAGAI KOSHI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40383848

研究成果の概要：

われわれは、胃癌発生における骨髄由来細胞の関与について、胃腫瘍を自然発生するトランスジェニックマウスを用いて検証を行った。本研究では、骨髄由来細胞である間葉系幹細胞(MSC; GFP マウス骨髄由来)及び造血幹細胞(HSC; RFP マウス骨髄由来)を用いた混合移植を行った。結果として、胃癌の発生において、骨髄由来細胞である MSC 及び HSC の明確な関与は示唆されなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌、間葉系幹細胞、造血幹細胞、癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

従来、癌は各臓器において成熟分化した細胞の遺伝子変異により生じると考えられてきた。一方、昨今の幹細胞研究により各臓器固有の幹細胞の存在が証明されつつある。炎症、潰瘍、癌などの病的状態においては、自己複製能と多分化能を合わせ持つ単一もしくは少数の幹細胞が量的・質的に変動して組織修復や病変の進行に関与していると考えられている。さらに、これらの幹細胞は胎生期に各臓器に生着し生き続けてきたものではなく、各臓器での需要に応じて骨髄からの供給を受けている可能性が指摘

されている。

2. 研究の目的

癌の発生あるいは増殖において骨髄由来細胞が腫瘍そのものを形成するのか、間質の形成に関与するだけなのか、未だ結論が得られていない。本研究では、胃腫瘍を自然発生するトランスジェニックマウス(K19-Wnt/C2mE トランスジェニックマウス)をレシピエントとして、GFP トランスジェニックマウス由来 MSC および RFP トランスジェニックマウス由来 HSC を生後早期に骨髄

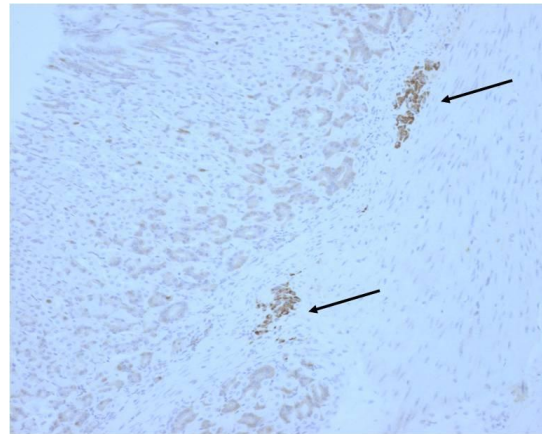
移植し、約 1 年後に形成される胃腫瘍を評価することにより骨髄由来細胞の胃腫瘍形成への関与を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

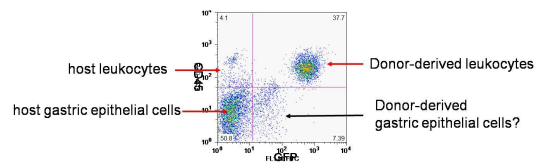
胃粘膜上皮の化生と過形成を生じる COX-2 遺伝子と mPGES1 (microsomal prostaglandin E synthase) 遺伝子を Cytokeratin19 遺伝子(K19) 下流に導入した K19-C2mE トランスジェニックマウス、および胃において未分化な前駆細胞が増加する K19-Wnt1 トランスジェニックマウスを用い、この 2 種のマウスを交配することによりダブルトランスジェニックマウスを作成した。K19-Wnt/C2mE トランスジェニックマウスでは 20 週齢で巨大な胃腫瘍が形成され、すべてのマウスにおいて 50 週齢で筋層への腫瘍の浸潤が認められることが報告されている。フローサイトメーターを用い、C57BL/6 GFP トランスジェニックマウスの骨髄から MSC を、C57BL/6 RFP トランスジェニックマウスの骨髄から HSC を分離した。10.5Gy の放射線照射を行い骨髄不全状態とした K19-Wnt/C2mE トランスジェニックマウスの眼底静脈叢から MSC 1×10^4 個、HSC 1×10^2 個、およびレスキューとして C57BL/6 野生株マウスの全骨髄細胞(whole bone marrow; WBM) 2×10^5 個を移植した。また、コントロールとして C57BL/6 GFP トランスジェニックマウスの WBM を移植した C57BL/6 野生株マウスの胃を評価した。

4. 研究成果

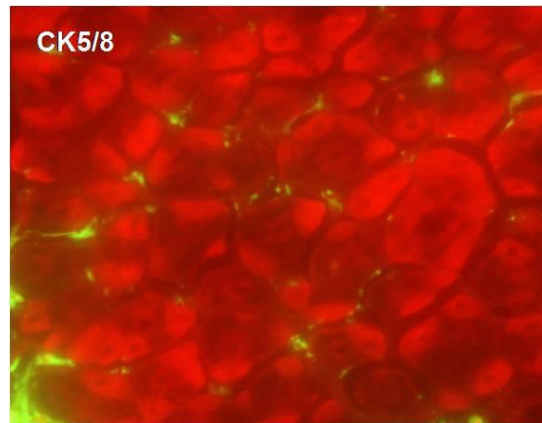
C57BL/6 GFP トランスジェニックマウスの WBM を移植した C57BL/6 野生株マウスの胃では腫瘍は形成されなかった。胃切片の免疫染色では、GFP 陽性細胞の存在が示唆された(図 1 黒矢印の細胞集団)。CD45 との二重染色により、GFP 陽性かつ非血球系細胞の存在も示唆された。また、フローサイトメーターを用いた解析でも、GFP 陽性かつ CD45 陰性の population の存在が示唆された(図 2 黒矢印の細胞集団)。しかしながら、Cytokeratin および SMA との二重染色から、GFP 陽性細胞は腺上皮そのものではなく、むしろ間質に存在する SMA 陽性細胞と類似の分布を示した(図 3, 4)。



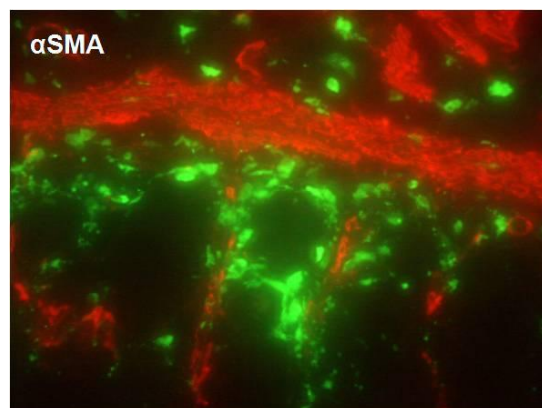
(図 1)



(図 2)

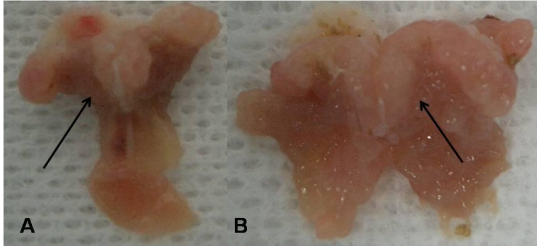


(図 3 赤; CK5/8 陽性細胞、緑; GFP 陽性細胞)



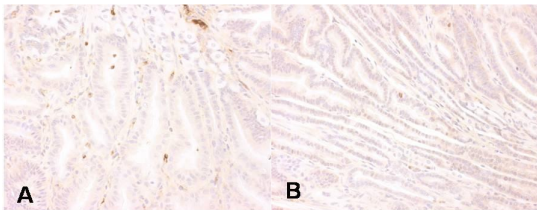
(図 4 赤; SMA 陽性細胞、緑; GFP 陽性細胞)

骨髄移植をされていない K19-Wnt/C2mE トランスジェニックマウス(図 5A)、GFP トランスジェニックマウス由来 MSC と RFP トランスジェニックマウス由来 HSC を移植された K19-Wnt/C2mE トランスジェニックマウス(図 5B)のいずれにおいても、生後約 1 年で肉眼的に明らかな胃腫瘍が形成されていた(図 5 黒矢印)



(図 5)

形成された胃腫瘍における GFP 陽性細胞の存在を免疫染色で検証したが、GFP 陽性細胞の存在は明らかでなかった(図 6A; 骨髄移植をされていない K19-Wnt/C2mE トランスジェニックマウス胃、B; GFP トランスジェニックマウス由来 MSC と RFP トランスジェニックマウス由来 HSC を移植された K19-Wnt/C2mE トランスジェニックマウス)。



(図 6)

胃腫瘍の形成に骨髄細胞が関与しているという仮説が正しいならば、本研究においてそれを証明できなかった原因として以下の2つが考えられる。1 つは骨髄移植の時期が遅すぎてドナーの骨髄細胞が腫瘍形成に関与できなかったということである。致死量の放射線照射に耐えうるとされる週齢を迎えてから骨髄移植を行っており、その時点ではすでにレシピエントである K19-Wnt/C2mE トランスジェニックマウスでは腫瘍発生は進んでいると考えられる。もう 1 つの可能性は、移植のプロトコールの問題によりレシピエントの骨髄が十分ドナー由来の骨髄細胞に置換されていなかったということである。

これまでのところ、胃癌発生に骨髄由来細胞が関与しているか否かの結論は得られていない。今後、GFP 染色条件の検討や RFP 陽性細胞の検索、またレシピエントの骨髄切片でのキメリズム評価等を今回の実験系で進めつつ、骨髄移植を行った後に Helicobacter 感染などによって胃腫瘍を形成させる系にも期待したい。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[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)

取得状況(計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

熊谷 厚志 (KUMAGAI KOSHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：40383848

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

才川 義朗 (SAIKAWA YOSHIRO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：00225682

福田 和正 (FUKUDA KAZUMASA)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：50348786

岡野 栄之 (OKANO HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60160694

松崎 有未 (MATSUZAKI YUMI)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：50338183

大島 正伸 (OSHIMA MASANOBU)
金沢大学・がん研究所・教授
研究者番号：40324610