

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09213

研究課題名(和文)CAC発癌における間葉系幹細胞の役割の解明

研究課題名(英文)Role of mesenchymal stem cells in CAC development

研究代表者

山本 真義 (Yamamoto, Masayoshi)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70397420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：RNAシーケンス解析結果から、BMPsとその受容体ACVR1、下流の遺伝子(id1, 3)など、腸管粘膜の向上性維持に關する遺伝子の発現が亢進しており、CAC発癌への関与が示唆された。そこでBMP5とBMP6の発現を免疫組織化学染色にて解析したところ、Dysplasiaの陰窩底周囲の間質組織でのBMP1,5,8蛋白の発現亢進を確認した。BMPsはSmad経路を介したid1, id3などの発現に關与していることが知られており、腫瘍粘膜下間質組織でのid3蛋白の発現亢進もIHCにて確認した。これらの結果から、間質細胞におけるBMP-id経路の活性化がCAC発癌に關与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌間質には線維芽細胞の他にも免疫担当細胞や内皮細胞など様々な細胞が存在し、それらの中には間葉系幹細胞から分化したものが多く含まれている。CAC発癌は通常発癌よりも間質細胞の関与が極めて大きいと考えられているが、間質細胞の中でもっとも癌の進展に關与していると言われる間葉系幹細胞に着目した研究はこれまでにない。本研究の成果は、周囲の微小環境を標的としたCACの発癌予防の新しい治療戦略に発展する可能性がある。近年増え続ける潰瘍性大腸炎患者の予後延長につながり、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：RNA sequence analysis revealed the expression of genes involved in the improvement maintenance of the intestinal mucosa, such as BMPs and their receptors ACVR1 and downstream target genes (id1, 3), was increased, suggesting their involvement in CAC development. Therefore, we assessed the expression of BMP5 and BMP6 by immunohistochemical staining. The expression of BMP1,5,8 protein was enhanced in the stromal tissue around the crypt at dysplasia. BMPs are known to be involved in the expression of id1 and id3 via the Smad pathway. We confirmed the upregulation of id3 protein in the submucosal stromal tissue of the tumor by IHC. These results suggest that activation of the BMP-id pathway in stromal cells is involved in CAC carcinogenesis.

研究分野：消化器外科

キーワード：炎症性腸疾患 炎症性発癌 間葉系幹細胞 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病を代表とした炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease : IBD) の患者数は、本邦において増加の一途をたどっており、今後もさらに増えることが予想されている。Colitis-Associated Cancer (CAC) は、IBD 患者に発生する炎症性発癌であり、IBD 患者の予後を規定する重要な因子であるが、未だ確立された予防法はない。我々はこれまでに、間質に存在する線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblast : CAF) から分泌される Tanascin-C が CAC 発癌に強く関与していることを示した。さらに Tanascin-C と integrin $\alpha v \beta 3$ との結合を阻害することにより CAC 発癌を抑制することに成功した (Inflammatory Bowel Disease 誌に投稿中, Minor revision にて修正中)。この研究成果から、間質系細胞を標的とする CAC 予防戦略は極めて有効であることが示唆される。

2. 研究の目的

癌間質には線維芽細胞の他にも免疫担当細胞や内皮細胞など様々な細胞が存在し、それらの中には間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) から分化したものが多く含まれている。通常発癌における MSC の役割はこれまで数多く示されているが、CAC 発癌への関与についてはこれまで報告がない。そこで本研究では、炎症性発癌における MSC の役割に着目し、発癌や進展への関与を明らかにし、MSC の時間的空間的な分布と、遺伝子発現変化を明らかにすることで、至適時期の標的因子を同定し、CAC 予防戦略を構築することを目的とし、IBD 患者の予後向上を目指した臨床応用へと発展させることを目的とする。

CAC 研究の多くは癌細胞自身についての解析であり、周囲間質細胞に着目したものはほとんどない。CAC 発癌は間質細胞の関与が極めて大きいと考えられているが、間質細胞の中でもっとも癌の進展に関与していると言われる MSC に着目した研究はこれまでになく、本研究により周囲の微小環境を標的とした CAC の発癌予防に対する新しい治療戦略を構築することが可能となれば、IBD 患者の予後向上に大きく寄与できる。

3. 研究の方法

1) 炎症性発癌モデルにおける大腸炎および発癌の組織学的評価

本研究では現在 CAC モデルマウスとして最も頻用されている AOM/DSS モデルマウスを使用する。炎症のみの Inflammation モデル、Dysplasia モデル、CAC モデルの各段階において大腸サンプルを採取し、肉眼的、組織学的評価と、p53, Ki-67 などによる免疫染色を行う。

2) 大腸内間葉系幹細胞の分離、培養と多分化能の確認

上記 1) の実験にて採取した各段階における大腸組織から間葉系幹細胞を分離する。間葉系幹細胞を含んだ細胞混濁液をコラゲナーゼやディスパーゼなどの酵素法にて細胞分散する。組織より分散された細胞は viable な状態で評価を行うため、分散後直ちにフローサイトメトリーにかける。CD105, CD73, CD90 陽性、CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-ClassII(DR)陰性の細胞集団を間葉系幹細胞として分離する。分離された間葉系幹細胞の骨、脂肪、軟骨への分化能を検証する。

3) 次世代シーケンス法 (RNA-seq) を用いた間葉系幹細胞の遺伝子発現変動解析

上記 2) の実験プロトコールにて採取された間葉系幹細胞から total RNA を抽出。高速シーケンス解析用アダプター配列を付加した断片化 cDNA を用いて増幅、精製を行い、次世代シ

ーケンサーによる配列取得を行う。

4) CAC マウスモデルを用いた CAC 発癌予防実験

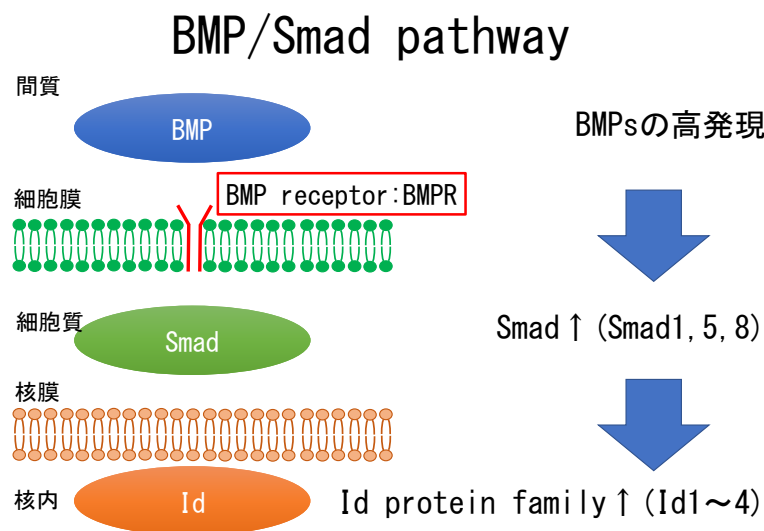
上記1)～3)の実験にて、間葉系幹細胞において特異的に発現変化がみられた因子の中から標的となりうる因子を抽出する。標的物質もしくは標的シグナル経路の阻害剤を入手し、動物モデルにおける CAC 発癌予防実験を行う。

5) CAC 臨床検体を用いた遺伝子発現解析

当科における約 25 例の CAC 手術検体の FFPE 標本から RNA を抽出し、次世代シーケンスを用いた RNA-seq 法により遺伝子発現解析を行う。対照は炎症を伴わない通常型発癌症例とし、遺伝子発現の相違を比較、マウスモデルによる実験との整合性を検討する。さらに臨床病理学的因子、予後などとの相関について解析する。

4. 研究成果

RNA シーケンス解析結果から、BMPs (BMP2, 4, 5, 6, 7), その受容体 ACVR1, 下流の遺伝子(id1, 3)など、腸管粘膜の向上性維持に関与する遺伝子の発現が亢進しており、CAC 発生への関与が示唆された。BMPs はその濃度勾配によって陰窩の形成に寄与している。通常、BMPs の発現は陰窩底部では乏しく、頂部で亢進している。また、BMP やその下流の Smad 経路が炎症や発癌に関与する報告があるが、腫瘍進展に対して抑制・促進のいずれに働くかはまだ分かっていない。BMPs の経路は炎症に関連した Cyclooxygenase や Estrogen receptor 経路の下流に存在しており、大腸癌の発癌経路として世界的に注目されている。そこで BMP5 と BMP6 の発現を免疫組織化学染色(IHC: Immunohistochemistry)にて解析したところ、Dysplasia の陰窩底周囲の間質組織での BMP1,5,8 蛋白の発現亢進を確認した。BMPs は Smad 経路を介した id1, id3 などの発現に関与していることが知られており、腫瘍粘膜下間質組織での id3 蛋白の発現亢進も IHC にて確認した。これらの結果から、間質細胞における BMP-id 経路の活性化が CAC 発癌に関与していることが示唆された。

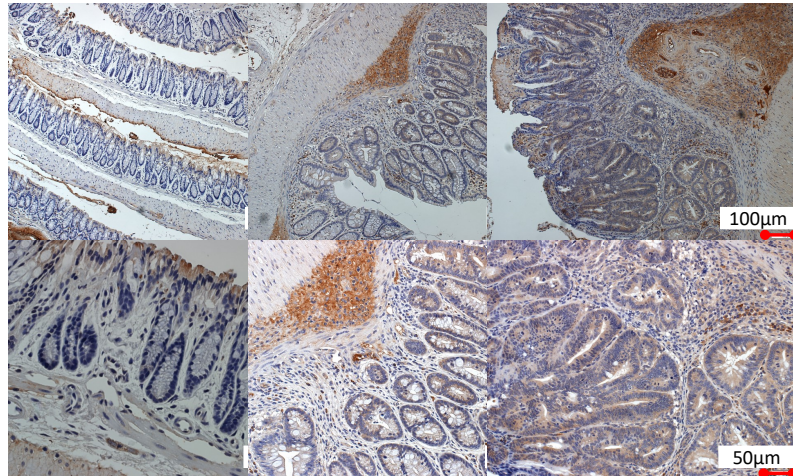


Smad1

Control

Dysplasia

Carcinoma

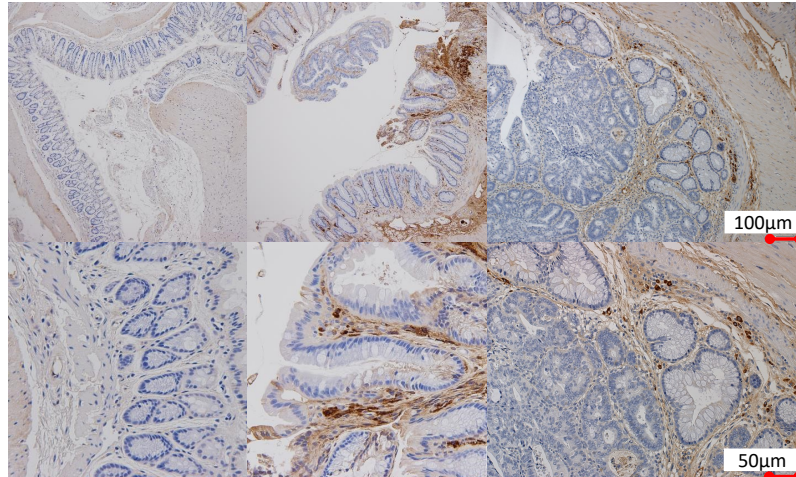


BMP5

Control

Dysplasia

Carcinoma

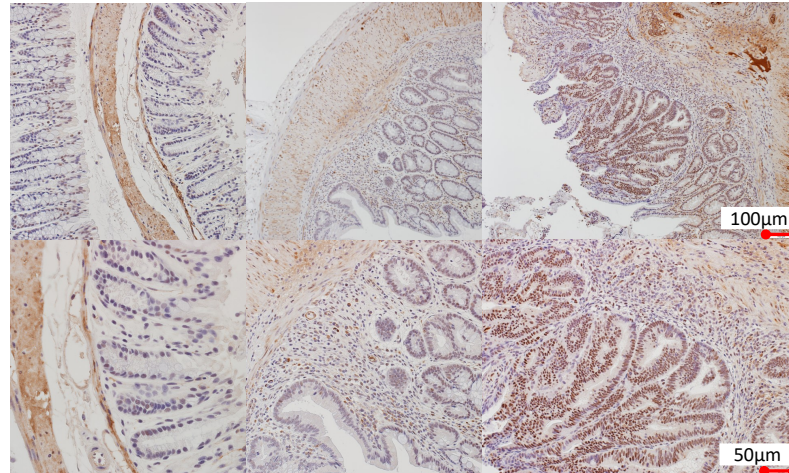


Id3

Control

Dysplasia

Carcinoma



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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹内 裕也 (Takeuchi Hiroya) (20265838)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	倉地 清隆 (Kurachi Kiyotaka) (20397384)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関