

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18103

研究課題名(和文)大腸癌肝転移における癌関連線維芽細胞出現メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of cancer-related fibroblast appearance mechanism in colorectal cancer liver metastasis

研究代表者

門野 政義(MONNO, Masayoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：60837681

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)：線維化肝で大腸癌肝転移がより促進されることが報告されており、今回はこれに関連して大腸癌の癌幹細胞であるLgr5陽性細胞に注目しました。Lgr5高発現の大腸癌細胞株はLgr5低発現の細胞株と比較してより線維化肝で肝転移が促進されること、またLgr5のリガンドであるRspondinが線維化肝でより高発現であることを示しました。Lgr5高発現、低発現の細胞株にそれぞれRspondinを加えて培養したところ、Lgr5高発現の細胞株で細胞増殖が促進されるという結果が得られ、線維化肝のRspondinがLgr5陽性細胞に何らかの影響を与えることで肝転移が促進される可能性が考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Lgr5陽性細胞は大腸癌の癌幹細胞としての機能を有することが知られており、癌幹細胞として機能するための微小環境を形成するものの一つとしてRspondinが考えられました。大腸癌肝転移を抑制するための治療標的として期待できるとともに、肝転移メカニズムの解明の一助となる可能性が期待されます。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that fibrotic liver promotes liver metastasis of colorectal cancer, and this time, we focused on Lgr5-positive cells, which are cancer stem cells of colorectal cancer. Colorectal cancer cell lines with high Lgr5 expression promote liver metastasis in fibrotic liver more than cell lines with low Lgr5 expression, and Rspondin, a ligand for Lgr5, is more highly expressed in fibrotic liver. Was shown. When Rspondin was added to cell lines with high Lgr5 expression and cell lines with low expression of Lgr5 and cultured, cell proliferation was promoted in cell lines with high Lgr5 expression, and Rspondin in fibrotic liver had some effect on Lgr5-positive cells. It was considered that liver metastasis may be promoted by giving.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌幹細胞 ニッチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast: CAF) は癌細胞の増殖や転移を促進する重要な役割を果たしている。CAF の出現メカニズムの一つに、癌細胞による正常線維芽細胞への「教育」があると考えられているが、詳細には明らかにされていない。一方、多様な癌細胞の中において、腸管幹細胞マーカーLgr5 を高発現する癌幹細胞 (Cancer stem cell) は大腸癌発生のみならず肝転移成立にも必須な細胞であることがわかってきた。これら癌幹細胞は、肝臓に存在する線維芽細胞が持つ性質を、幹細胞性維持のための微小環境 (ニッチ) として利用して肝臓で生着・増殖すると考えられているが、こちらについて詳細なメカニズムは同定されていない。今回は、線維化肝で大腸癌肝転移がより促進されることに注目し、線維化肝がニッチとして重要な役割を果たしているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

Lgr5 陽性細胞が癌幹細胞として機能するためのメカニズムの同定を目的とする。今回は線維化肝で大腸癌肝転移がより促進されることに注目し、Lgr5+細胞をサポートする幹細胞ニッチとしての線維化肝の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスに対する四塩化炭素の腹腔内注射による肝線維化モデルマウス作成を行った。具体的には 25%CCl₄, 2 μl/gBW を週 2 回、6 週間投与を行った後に肝を取り出し観察した。これにより肝の線維化が惹起されていることを確認した。

(2) 肝線維化モデルマウスと対照マウスに対して、Lgr5 高発現のヒト大腸癌細胞株、低発現のヒト大腸癌細胞株をそれぞれ門脈注射することで肝転移マウスを作成した。先ほどと同様、四塩化炭素の 6 週間投与により肝線維化モデルマウスを作成、corn oil のみを 6 週間投与して対照マウスを作成し、その後ルシフェリンを導入したヒト大腸癌細胞株を門脈注射し、さらに 6 週間後にルシフェラーゼを尾静注し蛍光撮影により肝転移の定量化による評価を行った。これにより Lgr5 発現の高低に依存して線維化肝での肝転移が促進されることを示した。

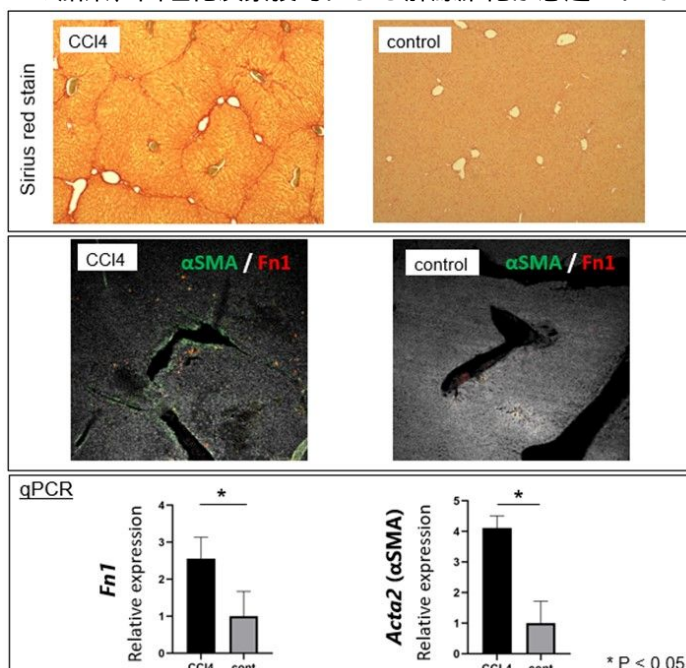
(3) これに関連するメカニズムとして Lgr5 のリガンドである Rspodin に注目した。Rspodin 1~4 のサブタイプに分類されるが、Lgr5 に結合する部分は共通であり、機能については同じであると考えられている。先の肝線維化モデルマウスの肝における Rspodin の発現を qPCR、FACS で評価するとともに、Lgr5 高発現のヒト大腸癌細胞株、低発現のヒト大腸癌細胞株をそれぞれ Rspodin と共培養することで、Rspodin の細胞増殖への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 肝線維化モデルマウス作成

四塩化炭素を投与した肝線維化モデルマウスと対照マウスの肝を Sirius red 染色により線維化の評価を行った (図 1 上段)。さらに Fn1, SMA の免疫染色 (図 1 中段)、またそれぞれについて qPCR により Fn1, SMA の発現の評価を行った (図 1 下段)。

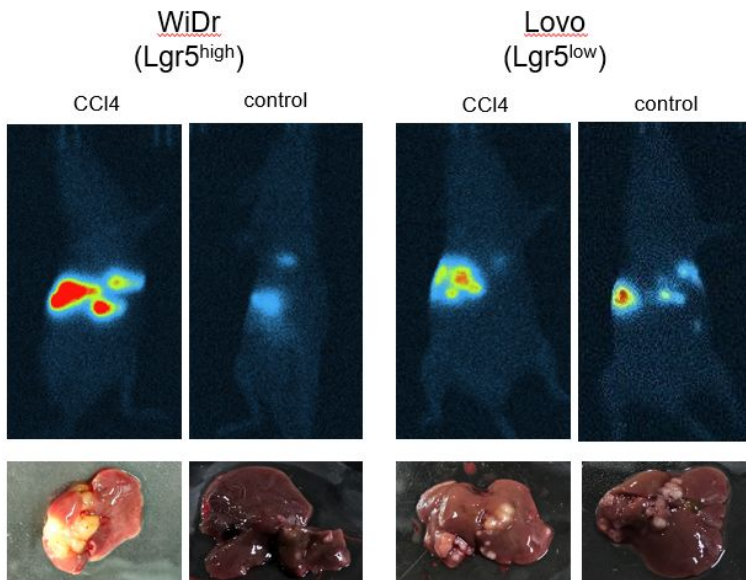
この結果、四塩化炭素投与による肝線維化が惹起されていることを示した。



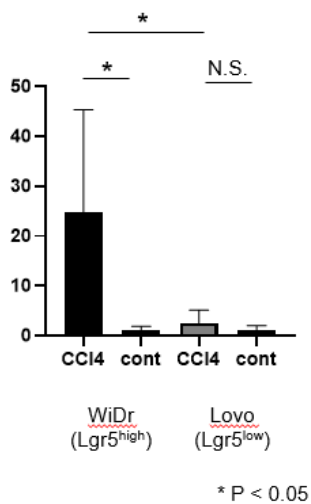
(図 1)

(2) 肝線維化モデルマウスでの門注肝転移

ルシフェリンを導入した Lgr5 高発現ヒト大腸癌細胞株 (WiDr) と低発現細胞株 (Lovo) をそれぞれ肝線維化モデルマウスと対照マウスに門脈注射し、6 週後に蛍光撮影し、肝転移の定量評価を行った (図 2, 図 3)。これにより Lgr5 高発現ヒト大腸癌細胞株は低発現細胞株と比較して、線維化肝で有意に肝転移が促進されることを示した。



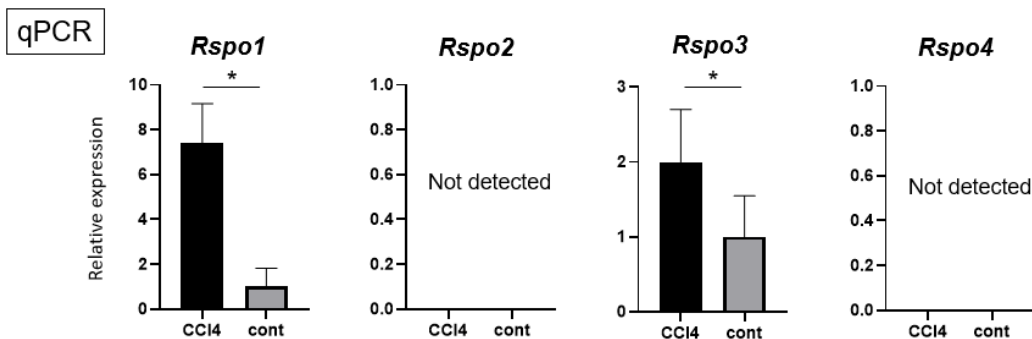
(図 2)



(図 3)

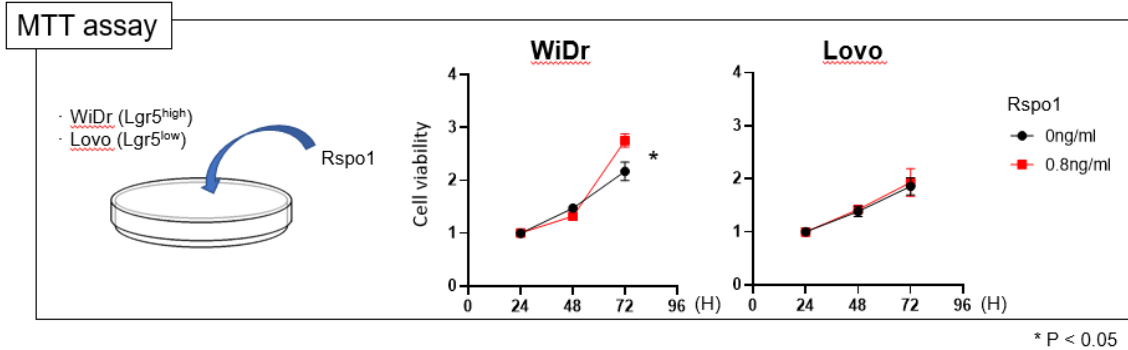
(3) Rspodin に関連したメカニズムの解明

まず先に作成した線維化肝モデルマウスで Rspodin1, 3 がより高発現であることを示した (図 4)。



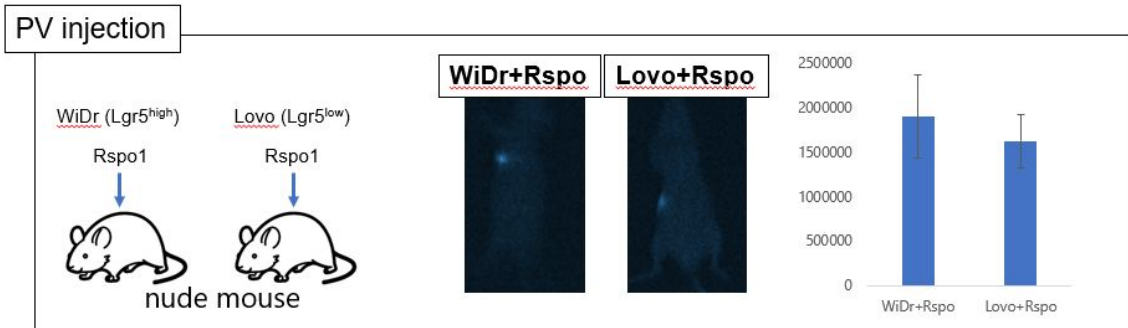
(図 4)

続いて MTT assay の手法を用いて、Lgr5 高発現ヒト大腸癌細胞株(WiDr)と低発現細胞株(Lovo)を Rspodin1 と共培養を行い、細胞増殖の評価を行った。これにより、in vitro で Rspodin 投与により Lgr5 高発現ヒト大腸癌細胞株(WiDr)は低発現細胞株(Lovo)と比較して細胞増殖が有意に促進されることを示した(図 5)。



(図 5)

これを in vivo で示すべく、Lgr5 高発現ヒト大腸癌細胞株(WiDr)と低発現細胞株(Lovo)にそれぞれ Rspodin1 を加えてヌードマウスへの門脈注射を行い、6 週後に蛍光評価を行った。こちらでは Rspodin1 による肝転移の促進を示すことはできなかった(図 6)。



(図 6)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------