

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月25日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590703

研究課題名（和文）骨髄間葉系幹細胞移植による大腸がん予防と治療法の開発

研究課題名（英文）Development of chemoprevention and therapy against colorectal cancers by bone marrow mesenchymal stem cell transplantation

研究代表者

苗代 康可 (Yasuyoshi Naishiro)

札幌医科大学・医療人育成センター・講師

研究者番号：80347161

研究成果の概要（和文）：

骨髄間葉系幹細胞（MSC）は再生医療のソースとして期待される一方で、腫瘍に対する影響は明らかではない。MSCは、VEGF低発現の大腸癌に対してCXCL12/CXCR4 axisを介して腫瘍の生着を促進し、血管新生を介して増殖を促した。CXCL12発現機序は、DNAメチル化やmiRNA調節ではなく、今後の検討課題である。以上の成果は、MSC治療における発癌リスクに関する基礎データを提供し、重要である。

研究成果の概要（英文）：

MSC contributed to tumor engraftment via CXCL12/CXCR4 signaling and tumor progression through promoting angiogenesis. The mechanism of CXCL12 activation remains to be elucidated because it appears to be regulated by neither epigenetics nor miRNAs. These information concerning tumorigenic effects of MSC is necessity for clinical use of MSC therapy in the near future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000円	450,000円	1,950,000円
2011年度	1,100,000円	330,000円	1,430,000円
2012年度	800,000円	240,000円	1,040,000円
年度			
年度			
総計	3,400,000円	1,020,000円	4,420,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：骨髄間葉系幹細胞（MSC）、血管新生、CXCL12

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease, 以下IBD）は、未だ原因不明の難治性疾患である。若年層の罹患が多く、わが国での罹患率は増加の一途をたどっている。患者の"生活の質の低下"、"発がんのハイリスク"の観点から21世紀に残された克服すべき難病の一つである。IBDは遺伝的素因に加え環境因子とくに腸内細菌叢と宿主の免疫異常

が複雑に絡まる多因子疾患である。これまでのIBD研究は、Crohn病に対する抗TNF α 抗体の臨床応用に代表されるように華々しい成果をもたらした。しかし、医療費の患者負担の増大、重篤な副作用の存在などの問題点も明らかである。

骨髄移植後のgraft-versus-host disease (GVHD) 腸管組織におけるドナー由来骨髄細胞の存在が相次いで報告された。腸管上皮

(Nature Med.8:1011, 2002), pericryptal myofibroblast (Gut 50: 752, 2002),あるいは、血管内皮に認められたという報告(PNAS 101:16891,2004)など、その細胞運命に関し一定の見解は得られていない。また、骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, 以下 MSC) 移植による GVHD の著明な病態改善も報告されている (Lancet363: 1439,2004)。これらは、骨髄由来細胞が傷害腸管組織の回復過程において、抗炎症作用や何らかの治癒促進作用などの重要な役割を果たしていることを示唆している。しかしながら、現在まで、この骨髄由来細胞の起源は正確には同定されておらず (造血幹細胞, MSC あるいはその他の骨髄細胞), その機能 (抗炎症作用や修復・再生機転) やその運命 (組織内での分化) に関してはほとんど解明されていない。

MSC は多分化能を有し、強力な免疫調整作用を有するのみならず抗原性、毒性が低く、単離培養が容易であるため、iPS 細胞と並び再生医療や遺伝子治療において最も魅力的な研究対象である。MSC 移植は、細胞のソースとして血管、神経、心筋などを中心とした細胞移植治療に利用され、また、その強力な免疫調整作用を利用した GVHD や自己免疫疾患への治療応用も試みられている。疾患モデルでの検討は、bleomycin 暴露による肺線維症モデル (PNAS 100: 8407, 2003), 関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) モデルのコラーゲン誘導関節炎 (Arthritis Rheum 52: 1595, 2005), 多発性硬化症 (multiple sclerosis, MS) モデルの実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル (Blood 106: 1755, 2005), IBD モデルのデキストラン硫酸 (dextran sulfate sodium, DSS) 腸炎 (Gastroenterol 132: 944, 2007) など報告されているが、その治療効果に一定の傾向はなく、有効性機序の解析も十分とは言いがたい。

これまでのわれわれの検討では、busulfan (BU) 誘導骨髄不全モデル (Int J Exp Pathol 87: 149, 2006) に惹起した DSS 腸炎に対し、MSC 治療の有効性を報告した。さらに eGFP immunofluorescence/Y-FISH (fluorescence in situ hybridization of Y-chromosome) によるドナー MSC 由来細胞の大腸組織内での動態を検討した。その結果、骨髄不全下では、腸上皮バリア機能の著しい傷害により低濃度 DSS により重度の腸炎が惹起されるにもかかわらず、MSC は、腸上皮細胞に生着し、腸上皮細胞のアポトーシス抑制、細胞回転促進に加えてタイトジャンクション再構成によるバリア機能の回復に寄与し、腸炎を抑制するという MSC 移植による治療効果を確認した。(J Pathol)。さらに、AOM (azoxymethane)/DSS モデルを使用し腸炎関連発癌に対する MSC 移植の影響を検

討したところ、MSC は AOM による発癌の initiation を抑制するものの、DSS による promotion には変化をもたらさなかった。このことは MSC は、発癌の頻度を低減するものの、癌化した際には、MSC が腫瘍間質の形成に寄与し、癌の増殖を助けるものと考えられた。この際、MSC 移植により、CAC におけるタイトジャンクション分子の発現変化および β -catenin の発現が減少する非常に興味深い現象が明らかになった。さらに大腸癌細胞株と MSC の混合移植実験においては、MSC 混合移植群において有意に腫瘍形成能の増加を認めた。これまでの研究により MSC が β -catenin を含めた WNT シグナルやタイトジャンクションの発現を変化させ、癌の増殖へ影響していることが予想された。以上より、MSC が腸上皮細胞域に移植され、本来の MSC 機能を喪失し、新たに腸上皮幹細胞機能を獲得し腸上皮へ分化するという興味深い現象の解明が、炎症腸管の再生・修復および発がん過程における骨髄の役割の解明への手がかりを提供する重要な鍵と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、再生医学という観点から、炎症性腸疾患における傷害腸管粘膜の修復・再生における骨髄とくに間葉系幹細胞の役割を解明し、新規治療法の開発を目指す。腸管に対する「再生医療」は、未だ報告のない全く新しい研究分野であり、単独または従来の抗炎症治療との組み合わせは、合理的でその臨床的効果は有望と思われる。本研究では炎症と発がんにおける MSC、骨髄由来細胞およびがん幹細胞との関連性を追求し、MSC の臨床応用に際してその論理的基盤の確立をめざす。

3. 研究の方法

SCID マウスにヒト大腸癌細胞株 (COLO-320) とラット MSC を 1:1 (各々 1×10^6 個) で混合移植した異種移植 (xenograft) モデルを作成した。生着した MSC の動態を、蛍光免疫染色および種特異的プローブを用いた FISH 法にて解析した。また、血管新生関連分子発現を、Realtime PCR 法および Immuno-PCR 法にて検討した。さらに、腫瘍細胞を MSC と共培養し、MSC が腫瘍細胞の細胞周期、生存シグナルに及ぼす影響を検討した。腫瘍細胞における遺伝子発現の変化を、DNA マイクロアレイにて網羅的に解析した。

AID を高発現する大腸癌細胞株 COLO320 に siRNA を導入し、AID ノックアウト細胞株を樹立した。また、内因性 AID を発現しない大腸癌細胞株 DLD-1 においてヒト AID の強制発現株を樹立した。これらを用いて、

AID/CXCL12の発現変化をqPCR法にて評価した。さらにパイロシーケンス法により、CXCL12プロモーター領域のメチル化の変化を定量的に評価した。次に、AID高発現株COLO320を用いて、細胞株、xenograftにおける癌関連遺伝子の点突然変異をシーケンスにて解析した。対象遺伝子は、TP53, BIRC2, XIAP, CCND1, CCNE1, CTNNB1, MYC, CDKN2A, KRAS, APCであり、これらのC to T変異の頻度を明らかにし、AIDのmutatorとしての働きおよびその標的遺伝子を探索した。

4. 研究成果

GFP標識されたラットMSCはXenograftの間質に存在し、 α SMA陽性、CD31陰性で血管周皮細胞の形質を示した。MSCにより宿主のマウス由来細胞が腫瘍内に動員され、血管内皮様の形態を呈した。

MSCは、腫瘍細胞のアポトーシスを抑制した。さらにMSC混合Xenograftにおいて、Akt, p38のリン酸化が誘導され、生存シグナルが増強していた。

DNAマイクロアレイによるMSC混合/非混合移植腫瘍の発現遺伝子の比較解析から、有意な変動が見られた計7遺伝子をpick upした。このうちCXCL12の発現がMSC混合移植腫瘍にて非混合腫瘍に比較して約20倍増強していた。

以上より、MSCは、VEGF低発現の大腸癌に対して血管新生を介して腫瘍の生着を促進し、CXCL12/CXCR4 axisを介して増殖を促す可能性が示めされた。

AIDノックアウトあるいは強制発現安定株におけるAIDの発現レベルとCXCL12発現レベルに相関は認められなかった。CXCL12プロモーター領域のメチル化に変化は認められなかった。DNA脱メチル化酵素TET1-3 mRNAは、COLO320細胞株に選択的に高発現した。

MSCは、VEGF低発現の大腸癌に対して血管新生を介して腫瘍の生着を促進し、CXCL12/CXCR4 axisを介して増殖を促した。但し、AIDはこの系において脱メチル化酵素として作用せず、CXCL12発現調節に関してTET1-3が新規脱メチル化酵素として有力な候補と考えられた。

COLO320細胞株(AID高発現細胞株)における癌関連遺伝子C to T変異の頻度は、10,000塩基対あたり、TP53 12.6, BIRC2 7.8, CCNE1 5.3の順であり、これらは同時に複数のローカスに変異を認めた。

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6件)

1. Arimura Y, Nagaishi K, Hosokawa M, Dynamics of claudins expression in colitis and colitis-associated cancer in rat, Methods Mol Biol, 査読なし, 762, 2011, 409-425.
2. Ii M, Li H, Adachi Y, Yamamoto H, Ohashi H, Taniguchi H, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y, The efficacy of IGF-I receptor monoclonal antibody against human gastrointestinal carcinomas is independent of k-ras mutation status, Clin Cancer Res, 査読有, 17, 2011, 5048-5059.
3. Li H, Adachi Y, Yamamoto H, Min Y, Ohashi H, Ii M, Arimura Y, Endo T, Lee CT, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y, Insulin-like growth factor-I receptor blockade reduces tumor angiogenesis and enhances the effects of bevacizumab for a human gastric cancer cell line, MKN45. Cancer, 査読有, 117, 2011, 3135-47.
4. Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sasaki Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y, Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat, J Gastroenterol, 査読有, 46, 2011, 143-152.
5. Akutsu N, Yamamoto H, Sasaki S, Taniguchi H, Arimura Y, Imai K, Shinomura Y, Association of glypican-3 expression with growth signaling molecules in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol, 査読有, 16, 2010, 3521-3528.
6. Wang Y, Adachi Y, Imsumran A, Yamamoto H, Piao W, Li H, Ii M, Arimura Y, Park MY, Kim D, Lee CT, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y, Targeting for insulin-like growth factor-I receptor with short hairpin RNA for human digestive/gastrointestinal cancers. J Gastroenterol, 査読有, 45, 2010, 159-170.

[学会発表] (計12件)

1. 那須野正尚, 有村佳昭, 渡邊秀平, 中垣卓, 永石敏和, 苗代康可, 山下健太郎, 山本博幸, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞はazoxymethaneによる発癌のイニシエーションを一部解除する. JDDW2012, 2012年11月11日, 神戸.
2. Arimura Y. Genetic Characteristics of Japanese IBD. Asian IBD Symposium 2012/11/2, Seoul, Korea.
3. 那須野正尚, 有村佳昭, 渡邊秀平, 中垣卓, 永石敏和, 苗代康可, 山下健太郎,

- 山本博幸, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞は azoxymethane による発癌のイニシエーションを一部解除する. 第 49 回日本消化器免疫学会総会, 2012 年 7 月 6 日, 鹿児島.
4. Nagaishi K, Watanabe S, **Naishiro Y**, Yamashita K, **Arimura Y**, Fujimiya M, Shinomura Y. Pleiotropic Action of Gut Tropic Factors Derived from Conditioned Mesenchymal Stem Cells. DDW2012, 2012/5/19, San Diego, US.
 5. Nagaishi K, Watanabe S, **Naishiro Y**, Yamashita K, **Arimura Y**, Fujimiya M, Shinomura Y, Imai K, Pleiotropic Action of Gut Tropic Factors Derived from Conditioned Mesenchymal Stem Cells, 6th Japan-Korea IBD Symposium, 2012/1/28, Tokyo.
 6. 渡邊秀平, **有村佳昭**, 永石歆和, 那須野正尚, 篠村恭久, 骨髄間葉系幹細胞由来 Gut Trophic Factor はラット実験腸炎の回復を促進する, 第 53 回日本消化器病学会大会, 2011 年 10 月 20 日, 福岡.
 7. 永石歆和, 渡邊秀平, 那須野正尚, **苗代康可**, **有村佳昭**, 篠村恭久, MSC 由来 Gut trophic factor のラット DSS 腸炎における役割, 第 48 回日本消化器免疫学会総会, 2011 年 7 月 21 日, 金沢.
 8. Nagaishi K, **Arimura Y**, Nasuno M, Shinomura Y, Reciprocal relation between MSC-dependent angiogenesis and VEGF expression in colorectal cancer, DDW2011, 2011/5/10, Chicago, US.
 9. Nagaishi K, **Arimura Y**, Suzuki D, Ataka K, Shinomura Y, Fujimiya M, Reciprocal relation between tumor angiogenesis and MSC-dependent growth in colorectal cancer, 第 116 回日本解剖学会総会, 2011 年 3 月 30 日, 横浜.
 10. 中垣卓, **有村佳昭**, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞は大腸癌細胞の増殖を促進させる・腫瘍細胞の VEGF 発現と MSC 依存性増殖の関連-. JDDW2010, 2010 年 10 月 14 日, 横浜
 11. Nasuno M, **Arimura Y**, Nakagaki S, Watanabe S, Nagaishi K, **Naishiro Y**, Imai K, Shinomura Y, Reciprocal relation tumor angiogenesis with MSC-dependent growth in colorectal cancer cell lines xenograft, 5th Korea-Japan IBD Symposium, 2010/10/2, Seoul, Korea.
 12. Tanaka H, **Arimura Y**, Yabana T, Goto A, **Hosokawa M**, Nagaishi K, **Naishiro Y**, Yamashita K, Yamamoto H, Murata

M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y, Enhancing mucosal reparative response in rat DSS colitis by mesenchymal stem cell therapy, 4th Korea-Japan IBD Symposium, 2010/1/23, Tokyo.

〔図書〕 (計 4 件)

1. 渡邊秀平, **有村佳昭**, 今井浩三, 日本臨床社, 炎症性腸疾患 - 病因解明と診断・治療の最新知見 -, 炎症性腸疾患における発癌機序, 2012, 518-522.
2. 那須野正尚, **有村佳昭**, 今井浩三, メジカルビュー社, IBD (炎症性腸疾患) を究める, II. 炎症性腸疾患の病因・病態組織修復・再生, 2011, 51-55.
3. 渡邊修平, **有村佳昭**, **細川雅代**, 田中浩紀, 篠村恭久, 今井浩三, 日本内科学会, 日本内科学会雑誌, II. 炎症性腸疾患の病理・病態生理 3. 遺伝的背景, 2009, 18-24.
4. 中垣卓, **細川雅代**, **有村佳昭**, 日本メディアカルセンター, 大腸疾患 NOW 2009, 第二部 炎症性腸疾患をめぐる最近の話題 5. 炎症と発癌における骨髄の役割, 2009, 173-176.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 間葉系幹細胞 (MSC) の培養上清を含む腸炎の予防・治療剤。

発明者: 有村佳昭, 永石歆和, 渡邊秀平

権利者: 札幌医科大学

種類: 特許願

番号: 51101427046

出願年月日: 2011 年 7 月 13 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

苗代 康可 (Yasuyoshi Naishiro)

札幌医科大学・医療人育成センター・講師

研究者番号: 80347161

(2) 研究分担者

有村 佳昭 (Yoshiaki Arimura)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号: 80305218

本谷 (細川) 雅代 (Masayo Motoya-Hosokawa)

札幌医科大学・オホーツク医療環境研究講座・助教

研究者番号: 60468080

研究者番号: 60468080