

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 5 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790676

研究課題名（和文）消化管粘膜における上皮幹細胞マーカーの同定、粘膜再生・発癌メカニズムの解析

研究課題名（英文）Identification of a biomarker of the epithelial stem cell and analysis of the regenerative and carcinogenic mechanisms of digestive tract

研究代表者

福井 寿朗 (FUKUI TOSHIRO)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60402905

研究成果の概要（和文）：消化管粘膜上皮（胃・小腸・大腸）における有用な新規組織幹細胞マーカーとしてリンカー一部スレオニンリン酸化 Smad2/3 蛋白 (pSmad2/3L-Thr) を同定することができた。消化管粘膜上皮幹細胞のうち、pSmad2/3L-Thr 陽性幹細胞は、slow-cycling stem cell の特徴に合致し、細胞周期 G0 の状態にあり、細胞増殖周期に入っていく直前の状態の幹細胞を捉えていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We have identified the significant expression of pSmad2/3L-Thr in specific epithelial cells of the murine stomach, small intestine, and colon. We have suggested these cells to be epithelial stem cells in the G0 phase of the cell cycle before active proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）、消化管上皮幹細胞

1. 研究開始当初の背景

消化管粘膜はその構造的・機能的恒常性を一定の正常状態に維持するため、比較的短期間にて規則正しく増殖と分化を繰り返している特殊な組織である。

胃粘膜には胃底腺・幽門腺粘膜があり、表層を構成する小窩(pit)と、これに連続し粘膜深層に位置する腺組織(gland)に大きく分類される。胃底腺粘膜は主に表層粘液細胞(pit cell)により構成される短い小窩と副細胞

(neck cell)、壁細胞(parieta cell)、主細胞(zymogenic cell)等により構成される長い胃底腺からなり、一方幽門腺粘膜は表層粘液細胞により構成される長い小窩と腺粘液細胞(glandmucus cell)により構成される短い幽門腺から成り立っている。胃小窩の深層で内腔が狭小化している部分は峡部(isthmus)とよばれ、固有胃腺(胃底腺・幽門腺)の上層は腺頸部(neck)、腺頸部の下層は腺体部(base)と呼ばれている。これらはマウスにおいてもヒトにおいても共通している組織学

的な特徴である。

胃底腺・幽門腺の両者において峽部に上皮幹細胞が存在し、この幹細胞から増殖した細胞は上下方の両極性に規則正しく移動しながら成熟した各構成細胞に分化し、胃底腺・幽門腺の継続的な再生を担っていると考えられている。しかしながら、上皮幹細胞の実用的なマーカーがいまだ存在しないため、この細胞の同定や、さらなる研究発展の妨げとなっている。

胃粘膜の恒常性は上皮細胞の脱落と再生のバランスにより保たれているが、胃粘膜に定着し、胃炎や胃癌などの病因とされるヘリコバクター属の感染により上皮細胞の増殖は亢進し、この過形成は腫瘍への進展の足がかりになると考えられている。その際増殖マーカーKi-67により標識される増殖細胞出現率が有意に高くなるが、このことは我々もヘリコバクター感染胃炎マウスモデルによりこれまでも経験し、解析してきた。

一方、幹細胞とは「多分化能を有する未分化な細胞」と定義され、通常の状態ではその細胞分裂は強く抑制され細胞周期上のG0期にあり免疫組織学的にKi-67陰性となる。しかし上記のヘリコバクター感染による上皮細胞の増殖亢進状態においては、上皮幹細胞は細胞分裂を起こす頻度が高くなると考えられる。さらに、この組織幹細胞に遺伝子変化が蓄積されることにより細胞周期が破綻し、癌化するという癌幹細胞という概念も提唱されている。

細胞周期はセリン/スレオニンキナーゼであるCDK(cyclin-dependent kinase)、CDKと結合し酵素活性を発現させるcyclin、CDKに結合してその活性を抑制するCDKI(CDKinhibitor)の組み合わせやバランスによって各位相への移行が正確に制御されている。その中でも活性化されたCDK4・cyclinD複合体は癌抑制遺伝子の一つで、細胞周期の進行や多くの癌発症に関与するRetinoblastoma(Rb)蛋白ファミリーをリン酸化しRb蛋白の細胞増殖抑制作用を抑制することにより細胞増殖・癌発症に関与している。またRb蛋白以外にもSmad3、Cdt1、Marcksをリン酸化し細胞周期の早期であるG1(G0)期からS期への進行に強く関与していることが分かっている。

これらの学術的背景より、粘膜上皮の増殖が亢進し、上皮幹細胞が数的に増加、または増殖亢進状態にあると予想されるヘリコバクター胃炎マウスモデルを足がかりにして、細胞周期の観点から上皮幹細胞(または前駆細胞)の有用なマーカーを同定し、胃および消化管粘膜の幹細胞研究をさらに進めることにより、ひいては粘膜再生、癌の病態解析および治療法の確立に応用することが出来ると考えている。

2. 研究の目的

消化管粘膜には上皮幹細胞が存在し、恒常性の維持、治癒機転としての再生、癌化のメカニズムに非常に重要な役割を担っている。本研究において最新の幹細胞、細胞周期研究の知見や我々がこれまで検討してきた各消化管疾患モデルマウスの知見を応用することにより、消化管粘膜上皮における有用な新規組織幹細胞マーカーを同定し動態を明らかにする。また各疾患モデルにおける上皮再生治癒のメカニズムや癌幹細胞の概念を念頭に置いた癌発症・進展のメカニズムを解析することにより、ヒトにおける消化管炎症性疾患や消化管癌における病態の解明、疾患の予防、悪性転化の阻止、新規治療法の確立等を目的とする実験が計画されており、基礎医学と実地臨床の橋渡しを念頭に置いたアプローチになっている。

3. 研究の方法

(1) ヘリコバクターフェリス(ATCC49179)を購入・培養し、生後8週目のC57BL/6マウスに一匹あたり 0.5×10^8 菌体をカテーテルにて経口投与する。菌体投与3ヶ月後に屠殺し、胃・血清等を採取し、胃炎モデルの完成を確認する。

(2) この胃切片を抗Ki-67抗体と以下のCDK4・cyclinD複合体関連蛋白(以下関連蛋白)に対する抗体を用いて、蛍光二重免疫染色法で免疫染色し、Ki-67陰性かつ関連蛋白強陽性の細胞を検出する。

<関連蛋白> 複合体の一部 CDK4, cyclinD(1, 2, 3); 複合体の基質(Rb蛋白ファミリー) pRb, p107, p130; 複合体のその他の基質 Cdt1, Marcks, Smad3; CDKI(CDK inhibitor) p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d, p27Kip1, p57Kip2, p21Cip1 (特に基質についてはリン酸化部位別にも検討する)
予備実験においてKi-67陰性かつ関連蛋白陽性の細胞を我々は既に見出している。

(pSmad2/3L-Thr)

(3) 上皮細胞や胃粘膜構成細胞の特異的なマーカーと関連蛋白の蛍光二重免疫染色法にて、この細胞が上皮由来の組織幹細胞であり、間質の細胞や分化した各種細胞とは異なることを確認する。(上皮細胞Cytokeratin 8抗体; 表層粘液細胞UEA-1; 副細胞GS II; 壁細胞抗H/KATPase抗体; 主細胞抗Pepsinogen抗体; 内分泌細胞抗ChromograninA抗体; 腺粘液細胞GS II)

(4) これまでに提唱されている消化管上皮幹細胞マーカーと関連蛋白の蛍光二重免疫染色法にて染色の陽・陰性の異同を比較する。(抗Bcl-2, Musashi-1, CD133, Lgr5, Bmi1抗体)

(5) 蛍光免疫染色後の切片をそのままHE染色することにより明視野にてこの細胞を確

認し、特徴を解析する。

(6)ヘリコバクター非感染マウスの胃粘膜(正常マウス胃粘膜)においても関連蛋白陽性細胞を検索し、胃炎モデルマウスと陽性細胞数の比較検討をする。

(7)正常マウス小腸・大腸粘膜やDSS起因性大腸炎モデル・IL-10ノックアウトマウス大腸癌モデルといった自験例のあるモデルを作製し、Ki-67とpSmad2/3L-Thrの蛍光二重免疫染色法にて同様に細胞を検出し、胃粘膜以外の組織上皮幹細胞や癌幹細胞のマーカーとしての適否を確認する。特に胃・腸炎モデルについてはpSmad2/3L-Thr発現細胞を経時的に確認することにより、病変の進行・粘膜再生治癒状況とpSmad2/3L-Thr陽性細胞の出現状況を比較し、疾患モデルの病態の解析や治療としての可能性(粘膜再生におけるpSmad2/3L-Thr特異的細胞周期促進刺激薬)を探求する足がかりとする。また大腸癌モデルにおいてはpSmad2/3L-Thr陽性細胞の分布を詳細に観察し、組織幹細胞と癌幹細胞の細胞増殖メカニズムの変化、発癌におけるpSmad2/3L-Thr発現の多寡の確認し、pSmad2/3L-Thr特異的細胞周期抑制剤投与による癌抑制効果の可能性を検討する。

(8)内視鏡的切除術時に採取・摘出された組織標本(正常消化管粘膜組織や各消化管癌組織)を利用して、同様にKi-67陰性かつpSmad2/3L-Thr強陽性の細胞を検出する。マウスにて確認された組織幹細胞としての性状や分布がヒト組織においても同様であることを確認する。

4. 研究成果

(1)ヘリコバクターフェリス菌を生後8週のC57BL/6マウスに経口投与。3ヶ月後に屠殺、胃炎モデルの完成を確認した。

(2)胃切片を抗Ki67抗体とリンカー一部スレオニンリン酸化Smad2/3蛋白に対する抗体(以下抗pSmad2/3L-Thr抗体)を用いて、蛍光二重免疫染色し、Ki-67陰性かつpSmad2/3L-Thr陽性の細胞を検出した。

(3)上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン8とpSmad2/3L-Thrの蛍光二重免疫染色法にて、この細胞が間質の細胞や浸潤した炎症細胞とは異なることを確認した。

(4)これまで提唱されている消化管上皮幹細胞マーカーDCAMKL-1とpSmad2/3L-Thrの蛍光二重免疫染色法を行い、両者の陽性細胞は非常に近接した、分化状態が近い細胞として認識された。

(5)蛍光免疫染色後の切片をそのままHE染色することにより明視野にてpSmad2/3L-Thr陽性細胞を確認した。この細胞は未熟な細胞の可能性が示唆され、胃底腺、幽門腺において幹細胞が存在するとされる胃腺峽部に確認された。

(6)ヘリコバクター感染/非感染マウスの胃粘膜において(2)-(5)をそれぞれ検索した。胃炎モデルマウスにおいて、粘膜の過形成とともにpSmad2/3L-Thr陽性細胞数、Ki67陽性細胞数、DCAMKL-1陽性細胞数が増加していた。pSmad2/3L-Thr陽性細胞は峽部のみで増加していたが、DCAMKL-1陽性細胞は胃粘膜全体に広がっていた。

(7)小腸・大腸においても抗Ki67抗体と抗pSmad2/3L-Thr抗体の蛍光二重免疫染色を施行、多くのpSmad2/3L-Thr陽性細胞が小腸はパネート細胞直上に、大腸は腺管底部に認められた。両者はこれまで幹細胞の存在が考えられた部位と合致した。

以上より胃粘膜上皮における有用な新規組織幹細胞マーカーとしてpSmad2/3L-Thrを同定し動態を明らかにすることが出来た。加えてその他の消化管上皮における検討と、各疾患モデルにおける上皮再生治癒のメカニズムを解析することにより、消化管粘膜障害における粘膜再生メカニズムの一部を解明することが出来た。

(8)正常マウスの小腸・大腸粘膜や、DSS起因性大腸炎モデルといった自験例のあるモデルを作製し、胃粘膜以外の組織上皮幹細胞としての適否を確認したところ、胃のみならず、小腸、大腸にても、これまで幹細胞が存在すると考えられて来た部位に特異的に当該細胞が検出された。これらの細胞は、幹細胞の性質の一つである、BrdU長期陽性細胞(LRC: Label Retaining Cells)であることが確認された。

(9)特に大腸炎モデルについてはpSmad2/3L-Thr発現細胞を病変部位的、経時的に確認することにより、病変の進行・粘膜再生治癒状況とpSmad2/3L-Thr陽性細胞の出現状況を比較したところ、粘膜壊死期には著減し、再生期になり著増していた。この所見も当該細胞が組織幹細胞であることを推測させる結果である。

(10)IL-10ノックアウトマウス大腸炎・大腸癌モデルを作製し、pSmad2/3L-ThrとKi-67の蛍光二重免疫染色法にて同様に組織幹細胞を検出し、組織上皮幹細胞のマーカーとして利用できることを確認した。IL-10ノックアウトマウス大腸炎・大腸癌モデルにおいてはpSmad2/3L-Thr強陽性細胞の分布を腸炎部、癌部にて観察したが、粘膜が過形成となる腸炎部ではpSmad2/3L-Thr強陽性細胞が著増していたが、癌部と思われた病変部ではpSmad2/3L-Thr強陽性細胞はほとんど発現していなかった。

(11)内視鏡的に摘出された組織標本(正常消化管粘膜組織や各消化管腫瘍組織)を利用して、同様にpSmad2/3L-Thr強陽性細胞を検出する実験を予備的に施行したところ、腫瘍部においてpSmad2/3L-Thr強陽性細胞が散在

性に認められた。

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1件)

① Fukui T, Kishimoto M, Nakajima A, Yamashina M, Nakayama S, Kusuda T, Sakaguchi Y, Yoshida K, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K.

The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in stomach; particularly increasing in mucosae of Helicobacter-associated gastritis. J Gastroenterol. 査読有 2011 Apr;46(4):456-68.

DOI: 10.1007/s00535-010-0364-8

[学会発表] (計4件)

①高橋悠、pSmad2/3L-Thr の消化管幹細胞マーカーとしての検討とその応用、第99回日本消化器病学会総会(シンポジウム14「消化器領域における幹細胞研究の進歩」)、2013年03月21日～2013年03月23日、鹿児島市

② Yu Takahashi、The specific linker phosphorylation of Smad2/3 indicates epithelial stem cells in oesophagus、20th United European Gastroenterology Week、2012年10月20日～2012年10月24日、Amsterdam (オランダ)

③ Yu Takahashi、The Specific Linker Phosphorylation of Smad2/3 Indicates Epithelial Stem Cells in Esophagus、Digestive Disease Week 2012、2012年05月19日～2012年05月22日、San Diego (アメリカ合衆国)

④ 高橋悠、消化管上皮におけるpSmad2/3L-Thr 陽性細胞の検討、第98回日本消化器病学会総会(シンポジウム2「消化管stem cellの新たな展開」)、2012年04月19日～2012年04月21日、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

福井 寿朗 (FUKUI TOSHIRO)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：60402905

(2)研究協力者

岸本 真房 (KISHIMOTO MASANOBU)

関西医科大学・医学部・大学院生

高橋 悠 (TKHASHI YU)

関西医科大学・医学部・大学院生

鈴木 亮 (SUZUKI RYO)

関西医科大学・医学部・大学院生

岡崎 和一 (OKAZAKI KAZUICHI)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：70145126

松崎 恒一 (MATSUZAKI KOICHI)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70278638

内田 一茂 (UCHIDA KAZUSHIGE)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：40411516