

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590921

研究課題名(和文) 胃幹細胞が腸型化するプロセスと分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) The analysis of the shift from gastric to intestinal phenotype of stem cell in the stomach mucosa

研究代表者

溝下 勤 (Mizoshita, Tsutomu)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40347414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々の開発したin vitroマウス胃腺管三次元培養系は、1)2か月以上の長期にわたり安定的に培養可能、2)胃の形質を保持したまま培養可能(腸の形質は発現しない)、以上の2点が特徴である。胃から腸への形質転換(腸上皮化生の出現)が観察されるヘリコバクターピロリ感染スナネズミモデルに、我々の開発した上記の三次元培養系を応用することで「胃幹細胞の腸型化」のメカニズムが明らかになると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established a long-term three-dimensional primary culture of mouse glandular stomach epithelial cells, being cultivated for more than 2 months and maintaining the gastric phenotype without intestinal one. We consider that the shift from gastric to intestinal phenotype of stem cell in the stomach mucosa may be clarified by applying the above-mentioned three-dimensional primary culture to the glandular stomach of Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbil model in which the intestinal metaplasia often occurs.

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：胃幹細胞 三次元培養系

1. 研究開始当初の背景

すべての消化器疾患(癌および潰瘍性大腸炎やクローン病のような炎症性腸疾患など)は、最終的に胃や腸に特異的な表現型を呈する。この事実は、特に消化器癌(胃癌、膵癌、大腸癌)で多くの検討がなされている。例えば、膵癌は発癌・進展の過程で膵管上皮の形質から、進化を遡った胃や腸の形質に変化する。さらに興味深いことに、近年、胃癌および膵癌では、腸型癌が胃型癌に比べ予後が良好であることが明らかになった。(J Cancer Res Clin Oncol, 129, 727-34, 2003.; Oncol Rep, 12, 1239-43, 2004.)。我々は、上記の事柄に注目し「癌を腸型化させる分化誘導療法」という新たな展開を思いつき、今回の研究を開始することとした。

上記の目的を達成させる上で最も重要なことは、「癌幹細胞の腸型化」のメカニズムを解明することである。しかし、癌幹細胞ではなく「幹細胞の腸型化」のメカニズムもまだまだ不明な点が多い現状を踏まえ、我々はまずヘリコバクターピロリ(*Helicobacter pylori*, 以下 Hp)感染スナネズミモデルに注目した。ヒトの胃粘膜では、Hp 感染に伴い腸上皮化生が出現すること(つまり胃粘膜の腸型化)が知られている。この Hp 感染スナネズミモデルにて我々は、胃が腸型化する腸上皮化生では胃腺管の組織幹細胞の腸型化が必要であること、同モデルに発生する胃癌も Hp 感染に伴い腸型化することを証明した(*Helicobacter*, 10, 97-106, 2005.; *Cancer Sci.*, 97, 38-44, 2006.)。さらに、胃粘膜を単一腺管に分解して(*Life Sci.*, 70, 867-76, 2002.)、腺管組織幹細胞の分子生物学的な解析を行ったが、胃や腸の形質を維持する安定した長期培養系が確立できないという最大の難点が解消できず、腸型化メカニズムの解明に肉薄できなかった。

以上の点を踏まえ、我々はまず「胃や腸の形質を安定的に維持する長期培養系の構築」を最大の目標として掲げ、これらの培養系を用いて、「腸型化」のメカニズムを解明する方向とした。

2. 研究の目的

前述の如く、今回我々は、「胃や腸の形質を安定的に維持する長期培養系の構築」を目標として掲げた。消化管、特に胃の初代培養系に関しては、種々の報告(*Gastroenterology*, 83, 1280-91, 1982.; *Dig Dis Sci.*, 28, 595-603, 1983.; *Am J Physiol.*, 245, G641-G646, 1983.; *In Vitro Cell Dev Biol.*, 21, 453-62, 1985.; *Annu Rev Physiol.*, 56, 445-61, 1994.; *Am J Pathol.*, 162, 1905-12, 2003)が存在するが、これらはすべて二次元の単層培養でありかつ培養可能な期間は長くて2週間程度が限界であった。我々は、生体内の組織構築に近い腸の三次元長期培養を可能にした Ootani らの論文(*Nat Med.*, 15, 701-6, 2009.)を参考とし

て、通常の単層の培養系ではなく、「安定的な胃の三次元長期培養系の構築」を最大の目標とした。同時に、Ootani らの論文(*Nat Med.*, 15, 701-6, 2009.)を参考として、より洗練された「安定的な腸(小腸、大腸)の三次元長期培養系の構築」も目指すこととした。

また、「研究開始当初の背景」の項で少し述べた Hp 感染スナネズミモデルでの検討も同時に進めることとした。「安定的な胃の三次元長期培養系の構築」が可能となった場合、この胃の三次元長期培養系を Hp 感染により胃から腸への形質転換が確認できるスナネズミモデルに応用すれば「幹細胞の腸型化」のメカニズム解明に近づけると考えたからである。

以上の点に主眼を置き、研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 長期三次元胃腺管培養系の確立

生後 1~2 日のマウス(C57BL/6J)から腺管を取り出し、1 mm未満の切片に分断してコラーゲンゲルに散布し、三次元培養を行った。

(2) 長期三次元腸(小腸、大腸)腺管培養系の確立

上記(1)と同様の方法で小腸および大腸の三次元培養を行った。

(3) 培養腺管の病理組織学的および粘液学的検索

コラーゲンゲル内の培養腺管を 10%ホルマリンで固定し薄切後、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色および periodic acid-Schiff (PAS) 染色を行い病理組織学的および粘液学的検索を行った。

(4) 免疫染色

上記(3)で薄切した切片に対して、胃型マーカーである MUC5AC、MUC6(共に、1:100, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK)と腸型マーカーである CD10(1:100, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK)および MUC2(1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、その他クロモグラニン A(1:1000, Yanaihar Institute Inc., Fujinomiya, Japan)、Proton Pump/H⁺,K⁺-ATPase(MBL Co., Ltd., Nagoya, Japan)、proliferating cell nuclear antigen(PCNA)(1:100, Dako, Glostrup, Denmark)、-smooth muscle antigen(SMA)(1:200, Epitomics, Burlingame, CA, USA)、サイトケラチン(Nichirei, Tokyo, Japan)、single-stranded(ss)DNA(1:400, IBL Co., Ltd., Fujioka, Japan)などに対する特異的抗体を用いて免疫染色を行った。

(5) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

コラーゲンゲル内培養腺管から mRNA を抽出し、以下の因子につき、特異的プライマー

を使用して RT-PCR を行った。

- ・胃型マーカー MUC5AC、MUC6
- ・腸型マーカー MUC2、CD10
- ・腸特異的遺伝子 *Caudal*-related homeobox gene (Cdx) 1、Cdx2

(6) スナネズミモデル

Hp 感染がスナネズミ腺胃粘膜に与える影響を内分泌細胞の動態の観点から検索するため、Hp とプロトンポンプインヒビター (PPI) であるランソプラゾール (lansoprazole) を組み合わせて投与し以下のような研究を行った。雄スナネズミ (n=23) をそれぞれコントロール群 (n=4)、Hp 群 (n=4)、5PPI 群 (ランソプラゾールを 5mg/kg/day 投与、n=3)、Hp+5PPI 群 (n=4)、25PPI 群 (ランソプラゾールを 25mg/kg/day 投与、n=4)、Hp+25PPI 群 (n=4) に分けて、実験開始後 50 週で屠殺した。同様に、雄スナネズミ (n=30) をそれぞれコントロール群 (n=5)、Hp 群 (n=5)、5PPI 群 (n=6)、Hp+5PPI 群 (n=5)、25PPI 群 (n=5)、Hp+25PPI 群 (n=4) に分けて、実験開始後 100 週で屠殺した。腺胃組織と血清を採取し、クロモグラニン A の免疫染色および Masson trichrome 染色を含めた病理学的解析・血清ガストリン値測定を行った。PPI は飼育粉末飼料 CE-2 に混じて経口投与した。

また、近年、日常臨床では PPI 投与により大腸に膠原線維性大腸炎 (collagenous colitis) が発生することが注目されており、上記スナネズミ屠殺時に大腸のサンプルも採取した。

4. 研究成果

(1) 長期 in vitro マウス胃腺管三次元培養

腺胃細胞はコラーゲンゲル内で外周を紡錘状の細胞に裏打ちされながら sphere を形成し、成長するのが観察された。HE 染色では、sphere 内腔は粘液を有する単層の円柱上皮によって構成されていた。免疫染色にてこれらの粘液を有する円柱細胞は MUC5AC 陽性であり、表層粘液細胞への分化が示された。また一部には内分泌細胞への分化を示すクロモグラニン A 陽性細胞も認めた。腸の形質のマーカーである MUC2、CD10 は陰性であった。Sphere の成長には -SMA 陽性の紡錘形の stem cell niche としての myofibroblast の裏打ちが必須で、2 か月以上にわたり胃腺管の培養が可能であった。また、上記の in vitro マウス腺胃三次元培養内の sphere につき、MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10、Cdx1、Cdx2 の RT-PCR を行ったが、胃型マーカーである MUC5AC、MUC6 の発現は陽性であり、腸型マーカー (MUC2、CD10) および腸特異的遺伝子 (Cdx1、Cdx2) の発現は陰性であった。

上記の三次元培養系がより安定的にかつ生体内に近い腺管構造を構築するには、線維芽細胞が重要であることも確認した。具体的には、あらかじめ分離培養した線維芽細胞を

加えて共培養した三次元培養系胃腺管の方が、加えない三次元培養系胃腺管より安定的にコラーゲンゲル内で生育し、かつ培養腺管内に幽門腺および腺頸部粘液細胞のマーカーである MUC6 陽性細胞 (通常の培養のみでは出現しない) が出現する現象である。

以上より、我々の長期 in vitro マウス腺胃三次元培養系では、胃の形質を保持したまま (腸の形質が出現することなく) 2 か月以上の胃腺管の培養が可能であった。また、胃腺管の培養ゲル内での発育には線維芽細胞の役割が重要であることも確認された。

(2) 長期 in vitro マウス腸腺管 (小腸、大腸) 三次元培養

上述の(1)と同様に、腸腺管細胞はコラーゲンゲル内で外周を紡錘状の細胞に裏打ちされながら sphere を形成し、成長するのが観察された。こちらの培養系でも、2 か月以上にわたり腸腺管の培養が可能であった。腸腺管でも、あらかじめ分離培養した線維芽細胞を加えて共培養した三次元培養系腸腺管の方が、加えない三次元培養系腸腺管より安定的にコラーゲンゲル内で生育した。また、上記の in vitro マウス腸腺管三次元培養内の sphere につき、MUC5AC、MUC6、MUC2、CD10、Cdx1、Cdx2 の RT-PCR を行ったが、胃型マーカーである MUC5AC、MUC6 の発現は陰性であり、腸型マーカー (MUC2、CD10) および腸特異的遺伝子 (Cdx1、Cdx2) の発現は陽性であった。

以上より、我々の長期 in vitro マウス腸腺管三次元培養系では、腸の形質を保持したまま (胃の形質が出現することなく) 2 か月以上の腸腺管の培養が可能であった。また、腸腺管の培養ゲル内での発育にも、胃腺管と同様に線維芽細胞の役割が重要であることが確認された。

(3) スナネズミモデルでの内分泌細胞系の動態

我々は、スナネズミモデルで Hp と PPI であるランソプラゾールを組み合わせて投与し以下の事柄を確認した。

・低用量のランソプラゾール (5mg/kg/day 投与) では胃内内分泌腫瘍および胃癌発生は促進されず、持続投与の安全性が確認された。

・しかし、高用量 (25mg/kg/day 投与) では胃内内分泌腫瘍発生が促進されたので注意が必要である。

・今回ランソプラゾールを投与した一部のスナネズミの大腸にヒトの膠原線維性大腸炎類似の腸炎 (大腸粘膜上皮直下に特徴的な collagen band の肥厚あり) が確認された。このため、スナネズミはランソプラゾールで誘発される膠原線維性大腸炎の解析モデルとして有用である可能性がある。

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 7 件)

Mizoshita, T., Tanida, S., Tsukamoto, H., Ozeki, K., Katano, T., Nishiwaki, H., Ebi, M., Mori, Y., Kubota, E., Kataoka, H., Kamiya, T., Joh, T. Adalimumab Treatment in Biologically Naïve Crohn's Disease: Relationship with Ectopic MUC5AC Expression and Endoscopic Improvement. *Gastroenterol Res Pract.*, 2014, 687257, 2014.、査読有
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/687257>

Mizoshita, T., Tanida, S., Tsukamoto, H., Ozeki, K., Katano, T., Ebi, M., Mori, Y., Kataoka, H., Kamiya, T., and Joh, T. Colon Mucosa Exhibits Loss of Ectopic MUC5AC Expression in Patients with Ulcerative Colitis Treated with Oral Tacrolimus. *ISRN Gastroenterol.*, 2013, 304894, 2013.、査読有
doi: 10.1155/2013/304894.

Mizoshita, T., Tanida, S., Tsukamoto, H., Ozeki, K., Katano, T., Ebi, M., Mori, Y., Kataoka, H., Kamiya, T., and Joh, T. Maintenance of the remission stage of Crohn's disease with adalimumab therapy during pregnancy. *Intern Med.*, 52, 1049-53, 2013.、査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/52/10/52_52.9466/_article

Katano, T., Ootani, A., Mizoshita, T., Tanida, S., Tsukamoto, H., Ozeki, K., Ebi, M., Mori, Y., Kataoka, H., Kamiya, T., Toda, S., Joh, T. Establishment of a long-term three-dimensional primary culture of mouse glandular stomach epithelial cells within the stem cell niche. *Biochem Biophys Res Commun.*, 432, 558-563, 2013.、査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.051.

Mizoshita, T., Tanida, S., Kusumoto, S., Ozeki, K., Tsukamoto, H., Ebi, M., Mori, Y., Kataoka, H., Kamiya, T., Joh, T. Adalimumab therapy following granulocyte and monocyte adsorptive apheresis in a patient with Crohn's disease accompanied by chronic myeloid leukemia. *Clin J Gastroenterol.*, 5, 302-306, 2012.、査読有
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12328-012-0314-5>

Mizushima, T., Mizoshita, T., Sasaki, M., Tanida, S., Tsukamoto, H., Shimura, T., Kanematsu, T., Kataoka, H., Kamiya,

T., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Joh, T. Lansoprazole induces collagenous colitis in the colon of Mongolian gerbils. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 12, 2759-62, 2011.、査読有

http://www.apocpcontrol.org/page/apjcp_issues_view.php?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:22320988&key=2011.12.10.2759

Tsukamoto, H., Mizoshita, T., Sasaki, M., Mizushima, T., Tanida, S., Ozeki, K., Hirata, Y., Shimura, T., Kataoka, H., Kamiya, T., Nojiri, S., Tsukamoto, T., Tatematsu, M., Joh, T. Long-term high-dose proton pump inhibitor administration to *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils enhances neuroendocrine tumor development in the glandular stomach. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 12, 1049-54, 2011.、査読有

http://www.apocpcontrol.org/page/apjcp_issues_view.php?sid=Entrez:PubMed&id=pmid:21790250&key=2011.12.4.1049

〔学会発表〕(計 9 件)

溝下 勤、谷田諭史、尾関啓司、塚本宏延、片野敬仁、林 則之、田中 守、濱野真吾、西脇裕高、海老正秀、澤田 武、森 義徳、久保田英嗣、片岡洋望、城 卓志、Adalimumab を投与した biologic naive Crohn's disease 症例の臨床的検討、第 10 回日本消化管学会総会学術集会、口演(一般演題、オーラルセッション 9)、2/14/2014、福島(コラッセふくしま)

Katano, T., Mizoshita, T., Joh, T. Long-term three-dimensional primary gastric culture under an air-liquid interface environment. 21th United European Gastroenterology Week, 10/14/2013, Germany (Berlin)

溝下 勤、谷田諭史、尾関啓司、塚本宏延、片野敬仁、林 則之、田中 守、濱野真吾、西脇裕高、海老正秀、森 義徳、久保田英嗣、片岡洋望、城 卓志、ムチンコア蛋白 MUC5AC は潰瘍性大腸炎の疾患活動性マーカーとして有用である -Tacrolimus を導入した中等症・重症例での検討-、第 55 回 日本消化器病学会大会(第 21 回 日本消化器関連学会週間) 示説{大腸(潰瘍性大腸炎 1)}、10/10/2013、東京(品川プリンスホテル)

溝下 勤、谷田諭史、尾関啓司、塚本宏延、城 卓志、当院での biologic naive Crohn's disease に対する adalimumab 治療、第 9 回日本消化管学会総会学術集会、口演(IBD 臨床 4 一般演題オーラルセッション 27、027-4)、1/26/2013、東京(京王プラザホテル)

溝下 勤、谷田諭史、尾関啓司、塚本宏延、城 卓志、Tacrolimus・顆粒球単球吸着（GMA）併用療法による中等症・重症潰瘍性大腸炎症例への寛解導入の試み -当院での検討-、第 54 回 日本消化器病学会大会（第 20 回 日本消化器関連学会週間）示説 {大腸（潰瘍性大腸炎）6}、10/11/2012、神戸（神戸国際展示場）

溝下 勤、塚本宏延、谷田諭史、尾関啓司、城 卓志、スナネズミは lansoprazole-associated collagenous colitis 解析モデルとして有用である、第 49 回日本消化器免疫学会総会、一般口演（一般演題、消化管 1）7/5/2012、鹿児島（城山観光ホテル）

溝下 勤、谷田諭史、塚本宏延、尾関啓司、水島隆史、城 卓志、Biologic naïve Crohn's disease に対する adalimumab 治療 -名古屋市立大学病院での検討-、第 8 回日本消化管学会総会学術集会、口演（ポスター、ポスターセッション 22 症例報告 13、P-22-3）2/10/2012、仙台（仙台国際センター）

溝下 勤、佐々木誠人、谷田諭史、志村貴也、森 義徳、片岡洋望、神谷 武、城 卓志、ランソプラゾール持続投与が胃腫瘍発生に与える影響 - スナネズミモデルでの検討 - 第 22 回日本消化器癌発生学会総会、一般口演、11/25/2011、佐賀（ホテルニューオータニ佐賀）

溝下 勤、谷田諭史、城 卓志、高齢者の潰瘍性大腸炎患者の治療 -名古屋市立大学病院の現状-（ワークショップ 13 高齢者における消化器疾患の診断と治療）、第 53 回 日本消化器病学会大会（第 19 回 日本消化器関連学会週間）ワークショップ、10/22/2011、福岡（福岡サンパレス パレスルーム）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝下 勤 (MIZOSHITA, Tsutomu)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40347414

(2) 研究分担者

谷田 諭史 (TANIDA, Satoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30528782

城 卓志 (JOH, Takashi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30231369