

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590926

研究課題名(和文) 胃腸上皮化生粘膜における腸粘膜上皮幹細胞の発現

研究課題名(英文) The expression of stem cell marker in intestinal metaplastic mucosa

研究代表者

横山 健介 (Kensuke, Yokoyama)

自治医科大学・医学部・臨床助教

研究者番号：40598926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃粘膜の分化異常である腸上皮化生粘膜には転写因子であるCdx2が発現しており、Cdx2を胃粘膜に特異的に発現させることにより腸上皮化生を誘導することができる。ヒトの腸上皮化生でもCdx2トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜でもLgr5、CD133、DCAMKL1が発現していることが確認された。CD133、Lgr5は癌幹細胞との関係が報告されている。Cdx2トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜からの分化型胃癌の発生における癌幹細胞マーカーとの関係も検討した。癌幹細胞の増殖・分化制御機構を解明し、再生医療への応用だけでなく新たな癌治療へと結び付けていく基礎になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor Cdx2 is expressed in the intestinal metaplastic mucosa. Cdx2 induces intestinal metaplasia in the stomach in the Cdx2 transgenic mice. Lgr5, CD133 and DCAMKL1 are expressed in the intestinal metaplasia of human and Cdx2 transgenic mouse stomach. CD133 and Lgr5 are reported to be related to the cancer stem cell. The relationships between the gastric carcinoma and cancer stem cell in the Cdx2-transgenic mice were examined. The mechanisms of the proliferation and differentiation of cancer stem cell were examined. The clarification of the stem cell marker in the intestinal metaplastic mucosa may be related to the regenerative medicine and cancer therapy.

研究分野：消化器内科

キーワード：Lgr5

1. 研究開始当初の背景

組織特異的な幹細胞マーカーによる幹細胞の同定が近年急速に進んでいる。胃粘膜の分化異常である腸上皮化生粘膜には転写因子である Cdx2 が発現しており、Cdx2 を胃粘膜に特異的に発現させることにより腸上皮化生を誘導することができる。腸粘膜上皮の幹細胞マーカーが Cdx2 によって誘導される腸上皮化生においてどのようになっているのかは興味深い。ヒトの腸上皮化生でも Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜でも腸管上皮幹細胞マーカー遺伝子である Lgr5、CD133、DCAMKL1 が発現していることが確認された。CD133 は癌幹細胞マーカーであることも明らかにされており、また、Lgr5 も癌幹細胞との関係が報告されている。これらを踏まえ、Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜からの分化型胃癌の発生における癌幹細胞マーカーとの関係を明らかにすることを試みた。このことにより、癌幹細胞の増殖・分化制御機構を解明し、再生医療への応用だけでなく新たな癌治療へと結び付けていく基礎になると考えられる。

2. 研究の目的

消化器臓器における幹細胞研究は近年急速に進展している領域であり、幹細胞特異的遺伝子の同定、増殖・分化制御の分子機構などが次々と明らかにされ、様々な疾患に於ける幹細胞制御の重要性も解明されつつある。このように組織特異的な幹細胞研究は再生医療の中で重要な位置を占めている。その中でも、腸粘膜上皮細胞の幹細胞研究が近年急速に進展してきている。ロイシンに富むオーファン G 蛋白質共役受容体である Lgr5/Gpr49 は多能性と自己複製能を有する陰窩底部の細胞を特異的にラベルすることが明らかになった (Lgr5 陽性 CBC 細胞)。一方、陰窩底部から平均 4 個目の細胞 (+4) が長い細胞周期をもち多能性を有することが

long-term label retention により明らかにされた (+4LRC 細胞)。現在提唱されているこれら 2 つの幹細胞の候補 (Lgr5 陽性 CBC 細胞と +4LRC 細胞) の関係は明らかになっていない。この 2 つの候補の他に腸粘膜上皮の幹細胞マーカー遺伝子として DCAMKL1 と CD133 がある。DCAMKL1 は +4LRC に発現し、CD133 は CBC 細胞に発現している。一方、胃粘膜の病的な分化異常に腸上皮化生がある。腸上皮化生はピロリ菌の感染の結果発生し、転写因子 Cdx2 が発現している。そして Cdx2 を胃粘膜に特異的に発現させることにより腸上皮化生粘膜が誘導されることは既に Cdx2 トランスジェニックマウスにより確認済みである。この腸上皮化生は分化型胃癌の前癌病変としても注目されている。一方、癌幹細胞の考え方が広がっている。癌組織においては無秩序な増殖と治療抵抗性の原因となる「癌幹細胞」の存在が明らかとなっている。従って幹細胞の増殖・分化制御機構を解明することは、再生医療への応用だけでなく新たな癌治療へと発展する可能性も同時に秘めている。Lgr5 や CD133 は癌幹細胞のマーカーともなりうる。

3. 研究の方法

当研究室で作製した Cdx2 トランスジェニックマウスを使用した。このマウスは、壁細胞に存在する H⁺-K⁺-ATPase の β サブユニットのプロモーターを用いて胃粘膜に転写因子 Cdx2 を特異的に発現させたマウスである。このマウスは腸上皮化生を引き起こし、H. pylori 等の感染なく分化型胃癌を発生するモデルマウスである。Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜とヒトの腸上皮化生粘膜において腸粘膜上皮細胞の幹細胞マーカーである Lgr5、CD133、DCAMKL1 の発現を RT-PCR と免疫組織染色で明らかにする。ヒトと Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜における幹細胞マーカーの詳細な発現部位を免疫組織染色で明

らかにする。さらにヒトとマウスの腫瘍におけるマーカーの発現の有無を明らかにする。そして、マーカー遺伝子を胃粘膜に特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製する。出来上がったマウスの胃粘膜の形態変化(腸型に変化するか否か)と粘膜の増殖の程度を明らかにするとともに、Cdx2 トランスジェニックマウスと交配することにより腸上皮化生粘膜における変化とともに腫瘍形成について詳細な解析を行う。

4. 研究成果

以上のことを踏まえて、第一に、腸上皮化生における4つの幹細胞マーカー(Lgr5、CD133、Bmi1、DCAMKL1)の発現の有無・分布を明らかにした。当研究室で作製した腸上皮化生のモデル動物であるCdx2トランスジェニックマウスとヒトの内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)によって得られる材料を使用した。腸上皮化生粘膜にはヒトでもマウスでも4つの幹細胞マーカー(Lgr5、CD133、Bmi1、DCAMKL1)がいずれも発現することが確認された。第二に、さらに腸上皮化生と関連する腸型の分化型胃癌における幹細胞マーカー遺伝子の発現の有無・分布をヒトとCdx2トランスジェニックマウスを用いて免疫組織染色で明らかにした。4つの幹細胞マーカー(Lgr5、CD133、Bmi1、DCAMKL1)とも、腸上皮化生における増殖帯ではなく化生粘膜全体に散在していることが確認された。第三に、4つの幹細胞マーカー候補の中からLgr5とDCAMKL1を胃粘膜に特異的に発現させるトランスジェニックマウスを作製した。DCAMKL1を胃粘膜に特異的に発現させることにより腸上皮化生を誘導することはできなかったが、DCAMKL1によりCyclooxygenase-1(Cox1)とCox2が誘導されてくることが明らかになり論文として掲載された。一方Lgr5を胃粘膜に特異的に発現させるトランスジェニックマウスでは変化がみられなかった。

Cox2は胃癌の発癌との関係が注目されている。DCAMKL1のトランスジェニックマウスでCox2が誘導されてくることが明らかになったため、Cdx2トランスジェニックマウスとの交配を行い、分化型胃癌の発生におけるCox2の役割を解明していく方針である。

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6件)

1. Mutoh, H., Sashikawa, M., Sakamoto, H., Tateno, T.: Cyclooxygenase 2 in gastric carcinoma is expressed in doublecortin- and CaM kinase-like-1-positive tuft cells. Gut Liver 8(5):508-18, 2014.[査読あり]
2. Wada, M., Lefor, A.T., Mutoh, H., Yano, T., Hayashi, Y., Sunada, K., Nishimura, N., Miura, Y., Sato, H., Shinhata, H., Yamamoto, H., Sugano, K. Endoscopic ultrasound with double-balloon endoscopy in the evaluation of small-bowel disease. Surg Endosc 28(8):2428-36, 2014[査読あり]
3. Sakamoto H, Mutoh H, Miura Y, Sashikawa M, Yamamoto H, Sugano K. SOX9 Is Highly Expressed in Nonampullary Duodenal Adenoma and Adenocarcinoma in Humans. Gut and Liver. 2013;7:513-518[査読あり]
4. Fujii Y, Yoshihashi K, Suzuki H, Tsutsumi S, Mutoh H, Maeda S, Yamagata Y, Seto Y, Aburatani H, Hatakeyama M. CDX1 confers intestinal phenotype on gastric epithelial cells via induction of stemness-associated reprogramming factors SALL4 and KLF5. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:20584-20589[査読あり]
5. 指川未歩, 武藤弘行: *H. pylori* と腸上皮化生の分子機序: 日本ヘリコバクター学会誌 13

巻2号 Page57-63(2012.01) [査読なし]

6. 武藤弘行, 指川未歩: 胃の腸上皮化生: 消化器医学 9 巻 Page83-89(2011.12) [査読なし]

[学会発表](計 2 件)

1. 永田博之, 武藤弘行, 坂本博次, 三浦義正, 宮田康史, 永山学, 高橋治夫, 北村絢, 井野裕治, 新畑博英, 竹澤敬人, 林芳和, 佐藤博之, 矢野智則, 砂田圭二郎, 大澤博之, 佐藤貴一, 山本博徳, 菅野健太郎. 内視鏡的切除標本による十二指腸球部上皮性腫瘍の免疫組織学的検討. 第 100 回日本消化器病学会総会, 東京, 2014 年 4 月 24 日.

2. 武藤弘行. ミニシンポジウム: 腸上皮化生をめぐる諸問題: 腸上皮化生のメカニズム. 第 98 回日本消化器病学会総会. 2012 年 4 月 19 日.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

横山健介 (よこやま けんすけ)
(YOKOYAMA Kensuke)
自治医科大学・医学部・臨床助教
研究者番号: 40598926

(2)研究分担者

武藤 弘行 (むとう ひろゆき)
(MUTOH Hiroyuki)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50322392

(3)連携研究者

()

研究者番号: