

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590911

研究課題名(和文) 器官形成因子制御機構を背景とした幹細胞ニッチ異常による胃発癌浸潤メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of FGF10 in the stem cell niche of gastric carcinogenesis

## 研究代表者

富田 弘之(TOMITA, HIROYUKI)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50509510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胃癌症例において、FGF10遺伝子発現の増加が胃癌、特に中分化腺癌で見られることがわかり、ヒト胃癌で一つの重要なファクターであること、治療への標的となる可能性を示唆することができた。FGF10遺伝子の機能的役割を解明する為に、遺伝子改変マウスを作製を行なった。FGF10強制発現遺伝子改変ES細胞及びマウスを作製した。胃においては、過形成変化がみられたが、腫瘍形成はみられなかった。しかし、胆管腫瘍の出現を見出した。

研究成果の概要(英文)：We have found that expression of FGF10 is associated with gastric cancer in humans. FGF10 expression has an important role in gastric carcinoma, which makes a small tubular shape. Further, we have made FGF10 inducible transgenic ES cells and mice. Interestingly, we have found that FGF10-inducible mice develop hyperplasia in the stomach but not tumors. However, continuous induction of Fgf10, in particular, at low level, is associated with the development of the intraepithelial papillary neoplasms of bile duct.

研究分野：腫瘍学

キーワード：増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞増殖因子ファミリーの一つである FGF10 は、『器官形成/分岐誘導因子』と呼ばれ、肺、消化管などの上皮管腔臓器の形成・維持に働く、必須の遺伝子(FGF10 ノックアウトマウスは胎生致死)である (*Nat Genet*, 1999)。間質間葉系細胞で発現し、上皮幹細胞に働き、上皮管腔形成を分化誘導しているといわれている (*Cell*, 2008)。右図は胎生期器官形成における FGF10 の役割を示す。

最近の知見では、FGF10 のさらに多彩な機能が分かってきた。

- ① FGF10 により ES 細胞や iPS 細胞は筋へ分化誘導される (*PLoS One*, 2010)。
- ② 間質の筋幹細胞(筋組織、線維芽細胞や内皮細胞の一部に存在)で Wnt/ $\beta$ -catenin 経路を介して、FGF10 は上皮幹細胞に働き、上皮を分化再生する (*J Clin Invest*, 2011)。
- ③ FGF10 の空間的な局在位置が決まり、その局在に向かって上皮の管が正確に「伸長、分岐、芽出(budding)」する (*Dev Dyn*, 2009)。数理モデル解析による。

これら発生学的な FGF10 の分化制御機構は発癌だけでなく、癌の間質への浸潤(invasion, budding)・増殖という新たな周囲環境創出の特徴に極めて類似している。

① FGF10 による分化制御機構異常により、器官形成の中心となる上皮幹細胞周囲環境(幹細胞ニッチ)の破綻が癌化につながることで、② 癌組織では、その再構築されたニッチの中で、異常な「伸長、分岐、芽出(budding)」つまり“いびつな器官形成とその再構築”が絶えず起きていることが示唆される。

しかし、今まで FGF10 の癌研究については癌細胞株など *in vitro* レベルによる研究は行われてきたが、細胞集団からなる組織/器官形成と維持の分子機構の理解は遅れ、生体レベルでの癌における FGF10 分化制御機構異常と器官形成の再構築における役割は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

**Fibroblast growth factor 10 (FGF10)は上皮管腔の分化を複雑に誘導・維持している器官形態形成・分岐誘導因子**である。

本研究では、ヒト胃臨床材料をはじめ、3次元細胞培養や遺伝子改変動物作製技術を駆使し、**FGF10 制御機構を背景とした幹細胞ニッチ(微小環境)異常と癌との接**

**点を示し、胃発癌・浸潤転移における器官形成因子異常の意義を明らかにし、治療の標的とすることを目的とする。**

## 3. 研究の方法

(1) ヒト胃癌症例における FGF10、幹細胞マーカー、線維芽細胞の解析

### (A) 局在・発現：病理組織学的な詳細な解析

ヒト生検・手術標本の正常/胃炎/腸上皮化生粘膜/早期癌/浸潤癌/転移組織で、FGF10 抗体による免疫組織化学染色を行う。同時に、幹細胞マーカーとして上皮幹細胞を DCAMKL1、癌幹細胞を CD44、また筋線維芽細胞を  $\alpha$ SMA/Vimentin で染色する。これらの局在・発現の特徴を解析する。

予備実験では、胃癌の浸潤部辺縁部分、つまり間質との接触部癌細胞で FGF10 の強発現がみられ、形態も線維芽細胞様(間葉系への分化を示す)へと変化していた(右図:矢印)。いわゆる上皮-間葉系転換(EMT)との関連も示唆された。

### (B) 再発・予後との相関：臨床情報をもとにした臨床的な詳細な解析

予後・再発のわかっているヒト外科手術症例 135 例の胃癌を上記(A)と同様に免疫染色を行う。染色後、FGF10/幹細胞マーカー/ $\alpha$ SMA+線維芽細胞の発現レベルと臨床データとの比較統計解析する。これにより、治療への応用が可能かという点、つまり FGF10 の発現は胃癌の予後、転移、QOL にどこに関連しているのか?を明らかとする。

## (2) FGF10 遺伝子改変マウスの作製・解析

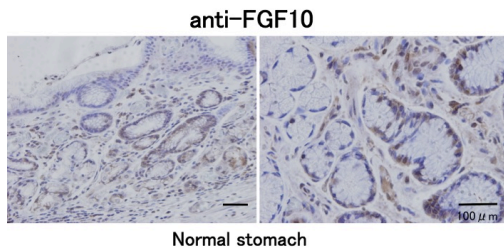
### i) 発現誘導可能マウス：発現上昇(誘導可能)

このマウスにより、成体で FGF10 発現が上昇した場合、上皮や間質にどのような影響が出るか、時間的・空間的に観察可能である。ドキシサイクリン投与量調節により、FGF10 の転写発現レベルを調節できる。さらに、FGF10 の下流に赤色蛍光色素が光るようにしてあり、FGF10 発現細胞を可視化でき、フローサイトメーターで目的細胞を分離することが可能である。

## 4. 研究成果

(1) ヒト臨床検体での胃癌発生進展における FGF10/FGFR2 シグナルの発現と局在の検討を行なった。

## FGF10 expression in the human stomach



(上図) FGF10 免疫組織化学染色

当院胃癌症例 135 例において免疫染色を  
進めた。

## FGF10 expression in human gastric cancer

性	Male	87	64.4%
Female	48	35.6%	
年齢(mean:66.49)	<50	11	8.1%
51-70	74	54.8%	
70<	50	37.0%	
組織型	tub	47	34.8%
pap	2	1.5%	
muc	4	3.0%	
por	66	48.9%	
sig	8	5.9%	
その他	8	5.9%	
深達度(UICC)	T2以下	40	29.6%
T3以上	95	70.4%	
リンパ節(UICC)	negative	18	13.3%
positive	117	86.7%	
遠隔転移	なし	107	79.3%
あり	28	20.7%	
UICC Stage	II	30	22.2%
III	78	57.8%	
IIIA	26	19.3%	
IIIB	23	17.0%	
IIIC	29	21.5%	
IV	27	20.0%	

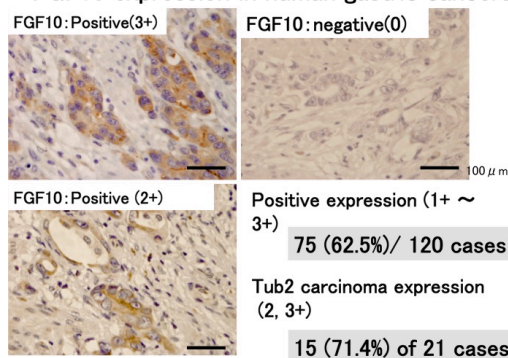
対象: Gastric cancer specimens in 2000~2008 in Gifu University Hospital, UICC StageII~IV (N=120)

※No chemoradiotherapy

(上図) 症例の特徴

FGFR2 は半数以上の胃癌に発現し、  
FGF10 は小型の腺管を形成する中分化腺  
癌で特に、自らも発現していることを見  
だした。(下図)

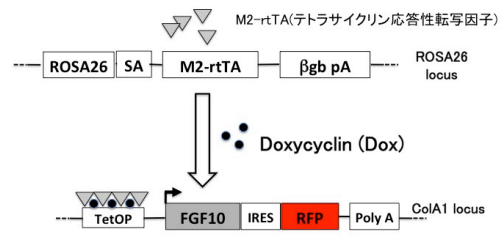
## FGF10 expression in human gastric cancers



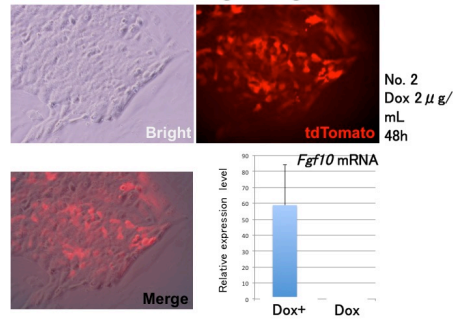
(2) Tet-on system を用いて、  
Doxycyclin(Dox)の濃度依存性に Fgf10 発  
現を制御しうる遺伝子改変マウス (Fgf10  
Dox-inducible transgenic mice) を作製し、  
Dox 投与を行った。

(図) FGF10 inducible mouse のコンストラ  
クト

## Doxycyclin(Dox) inducible Fgf10 Tg mouse

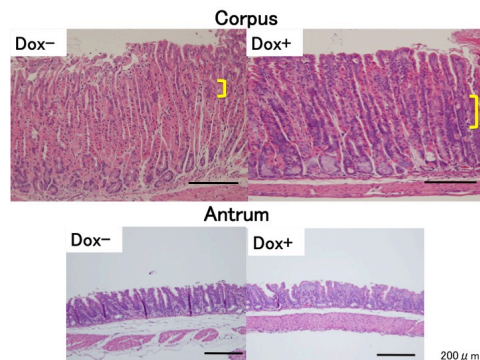


## Dox-inducible Fgf10 Tg ES cells



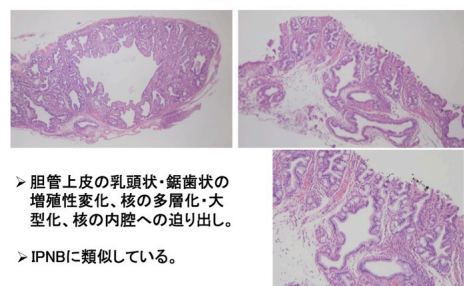
ES 細胞を受精卵にインジェクションし、キメ  
ラマウスを作製し、生殖系列に組み込まれた  
ことを確認した。

そこで、DOX を飲水投与すると、7 日後には、  
胃の過形成変化が認められた。しかし、その  
後、長期投与、高濃度投与を行ったが、腫瘍  
形成は認めなかった。(下図)



しかし、胆管内には乳頭状の腫瘍性病変を認  
め、今後の研究に活かせることが示唆された。

## Development of IPNB-like lesion



- > 胆管上皮の乳頭状・鋸歯状の増殖性変化、核の多層化・大型化、核の内腔への迫り出し。
- > IPNBに類似している。

(上図) FGF10-inducible mouse に発生した胆管内乳頭状腫瘍

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 富田 弘之 (代表)、 **Expression and roles of FGF10 in the progression of gastric cancer**、第72回日本癌学会、平成24年9月19日、ホテルロイトン札幌など (北海道・札幌市)

② 富田 弘之 (代表)、 **Fgf10 持続強制発現による pancreatic and biliary intraepithelial neoplasia の発生**、第24回日本消化器癌発生学会、平成25年9月6日、石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)

[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

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~patho1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 弘之 (TOMITA HIROYUKI)

岐阜大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 50509510

(2) 研究分担者

該当なし

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
該当なし

( )

研究者番号: