

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590916

研究課題名(和文) 胃炎からの炎症性発癌過程における幹細胞の役割

研究課題名(英文) Role of gastric epithelial stem cell in gastritis-associated tumorigenesis

研究代表者

上尾 太郎(ueo, taro)

天理医療大学・医療学部・研究員

研究者番号：30569611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌は慢性炎症により組織構成が変化した胃粘膜に出現してくる。胃上皮幹細胞の候補としてLgr5陽性幹細胞が報告されている。炎症により変化した組織においてもLgr5陽性幹細胞が生理状態と同様に恒常性維持に関与しているのか、また腫瘍組織にも関与しているのか不明である。ヘリコバクター菌を胃に感染させたマウスや自然に胃炎を発症し腫瘍形成に至るマウスを用いて、炎症における組織変化や腫瘍形成におけるLgr5陽性幹細胞の関与をリネージトレーシングの方法を用い検討した。胃上皮幹細胞が、生理的状态、慢性胃炎、胃癌等において、一貫して胃上皮組織構築に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Gastric cancer (GC) has been one of the deadliest of all cancers in Japan. Even after the emergence of new targeted agents, the prognosis of patients with advanced GC has not improved. Helicobacter pylori infection induced histological change of stomach and DNA mutation into gastric epithelial stem cell (GESC), therefore is the main risk factor for GC. Cancer stem cells (CSCs) are believed to be responsible for tumor initiation, progression and metastasis, leading to focus on understanding the role of Gastric CSCs. By the lineage tracing method, we clarified the influence of Helicobacter infection on GESC in mice and investigated the involvement of GESC on inflammation-induced tumor in transgenic mice. Similar to the normal gastric homeostasis, Lgr5-positive stem cell are important player both in Helicobacter-induced histological change and inflammation-induced tumorigenesis, which show the possibility that the therapeutic intervention on stem cells is new option for the GC.

研究分野：消化器病学

キーワード：胃炎 幹細胞 胃癌

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は日本人の死因の第1位であり、そのなかでも胃癌は癌死の第2位を占める。胃癌の原因となるヘリコバクター・ピロリ菌の予防的除菌療法や、胃癌に対する手術、化学療法、放射線療法が発達しているにもかかわらず、進行胃癌の予後は依然として不良のままである。そのため、胃癌の病態をさらに深く解明し、新規治療法の開発を目指した研究が急務である。

癌の再発の原因としては、従来から自己複製能と様々な分化段階の子孫癌細胞を供給する能力を有する癌幹細胞の存在が提唱されており、1994年のDickらによる白血病幹細胞の報告を皮切りに、固形癌においても癌幹細胞の存在を示す報告が相次いだ。胃癌においてはCD44が癌幹細胞マーカーとして報告され、主に fluorescence activated cell sorting (FACS: ソーティング) を用いた研究が進められてきた。現在、癌幹細胞を標的とする癌治療実現へ向けた精力的な取り組みが世界中で行われているものの、胃癌幹細胞をターゲットとした、癌幹細胞治療実現への道のりはいまだに遠い。その理由として、胃ではCD44以外の癌幹細胞マーカーの報告が少ないこと、ソーティングを用いた幹細胞の同定法では正常組織の幹細胞マーカーを見いだすことが手法的に難しいことなども一因と考えられる。正常組織幹細胞の同定に有用な手法であるリニージェ・トレーシングでは、Lgr5が胃前庭部における正常幹細胞マーカーと報告されているが、それらの幹細胞が、生理的状態、またヘリコバクター・ピロリ菌感染による経時的变化(急性胃炎、慢性胃炎、萎縮性胃炎、腸上皮化生)のなかでどのように推移していくのか、さらに最終的に発癌過程においてどのような役割を示しているのか、未知の部分が非常に多い。

そのようななかで、研究代表者らは、胃の正常幹細胞の存在を検討するために、リニエ

ージ・トレーシングの手法が有用であると考えた。研究代表者の研究室では、Lgr5、Dcl1など種々の幹細胞マーカーCreマウスを保有していたため、胃の正常組織、炎症組織、癌組織においてリニージェ・トレーシングを行うことが可能である。すなわち、幹細胞が、生理的状態、ヘリコバクター・ピロリ菌感染による経時的变化(急性胃炎、慢性胃炎、萎縮性胃炎、腸上皮化生)のなかでどのように推移していくのか、さらに最終的に発癌過程においてどのような役割を示しているのかを、経時的に可視化できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、胃粘膜上皮において終生行われている、上皮幹細胞の増殖、分化、運命決定が胃の恒常性維持において果たす役割を検討する。胃の病的状態、すなわちヘリコバクター感染によって生じる腸上皮化生、組織形態の変化、癌の発生などの一連の過程に上皮幹細胞がどのように関与するかも検討する。これらの検討過程を通じて、学術的に胃上皮幹細胞の動態を解明し、同時に胃炎、胃癌など様々な病態において、胃上皮幹細胞への介入による新しい治療法開発へむけた基礎的知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

正常、および病的状態の生体胃における胃上皮幹細胞の動態と子孫細胞の変化を追跡するために、代表的な正常胃上皮幹細胞マーカーであるLgr5のプロモータ下流にCreERT2コンストラクトを組み込んだ、Lgr5-EGFP-ires-CreERT2; ROSA-LacZマウスなど、幹細胞レポーターマウスを使用する。それらのマウスに対して、ヘリコバクター・フェリス(H.felis)感染による胃炎、およびK19-Wnt1; C2mEマウスとの交配による胃炎、胃癌を発症させ、リニージェ・トレーシングを含めた、組織学的な検討を行う。

#### 4. 研究成果

本研究においては、次のような研究成果を得た。

(1) *H.felis* 感染早期における胃組織の変化：

*H.pylori* 感染後の慢性胃炎により、胃の組織に生じる変化の過程で、胃粘膜上皮幹細胞がどのように振る舞うかを検討した。そのため、まず胃粘膜上皮幹細胞を追跡することができ、*Lgr5-EGFP-ires-CreERT2; ROSA-LacZ* マウスを作成した。生理的な状態では、*Lgr5* 陽性幹細胞からの子孫細胞供給は、胃の前庭部、体部小弯の一部、口側小腸、口側大腸で確認された。引き続いて、慢性胃炎における *Lgr5* 陽性幹細胞からの細胞系譜解析を試みた。同マウスには *H.pylori* が感染しないため、マウス実験で良く用いられる *H.felis* を感染させた。過去の報告と同様に、*H.felis* 感染早期(感染後4から6か月)には、胃前庭部粘膜は過形成を呈し、一方で胃体部においては壁細胞および主細胞が減少し、前庭部様の化成 (antralization) が出現することが確認された。さらに、これらマウスの *H.felis* 感染早期において除菌治療を行うと、上記の病理学的変化も改善することを確認した。*H.felis* 感染早期の *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2; ROSA-LacZ* マウスの胃を用いて、GFP に対する免疫染色を行い、炎症による幹細胞の数や位置の変化を検討したところ、有意な変化を認めなかった。引き続いて、タモキシフェン投与後の *Lgr5* 陽性幹細胞からのリニージェ・トレーシングを行い、*H.felis* 感染早期の炎症時に *Lgr5* 陽性幹細胞による上皮細胞供給動態を検討したところ、*Lgr5* 陽性幹細胞からの子孫細胞供給は認めたものの、*Lgr5* 陽性幹細胞の絶対数自体には有意な差を認めなかったために、正常胃との差が見られなかった。このように、*Lgr5* 陽性幹細胞は、生理的な状態と胃炎発症早期の双方で、同様に

子孫細胞を供給し、胃の恒常性維持に寄与していることが明らかとなった。

(2) *H.felis* 感染後期における胃組織の変化：

*H.felis* 感染後期(感染12か月から18か月目)の胃における幹細胞制御に関する検討も行った。この時期には、胃前庭部の腺管底部に粘液産生細胞が出現し、さらに核異型も認められ、ディスプラジアと呼ばれる組織変化を呈することがわかった。なお、この時期に除菌をしても、この組織変化は改善しない。さらに、研究を補強するために、胃炎モデルとして用いられる *K19-C2mE* マウスの使用も試みた。同マウスにおいては、長期間にわたって胃の炎症性刺激が持続し、胃の前癌病変と考えられる *SPEM* (spasmolytic polypeptide expressing metaplasia) が形成されることも知られている。これらの疾患モデルを *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2/ROSA-LacZ* マウスに適用し、炎症による *Lgr5* 陽性幹細胞の数や位置の変化を検討したところ、やはり有意な変化を認めず、同様にリニージェ・トレーシングによって子孫細胞を供給する可能性が示された。そのため、*Lgr5* 陽性幹細胞は、胃炎発症後期においても、生理的な状態に置かれた場合と同様に、子孫細胞を供給し、胃の恒常性維持に寄与していることが明らかとなった。

(3) マウス胃癌モデルの検討

*H.felis* 感染後期(感染12か月から18か月目)の胃における、胃癌発症と幹細胞制御に関する検討も行った。この時期には、胃前庭部の腺管底部に粘液産生細胞が出現し、さらに核異型も認められ、ディスプラジアと呼ばれる組織変化を呈する。この時期に除菌をしても、上記の組織学的変化は改善しない。また、*K19-Wnt1; C2mE; Lgr5-EGFP-ires-CreERT2; ROSA-LacZ* マウスは、生後8か月をすぎると、長期の炎症

刺激にて、胃にディスプラジアが出現し、生後 10 か月目には腫瘍が出現してくることが知られており、胃癌モデルマウスとして用いられている。そこで両マウスにおける炎症後期の非可逆的な組織変化やそれに引き続いておこる腫瘍形成において、胃正常組織幹細胞マーカーを用いたりニエージ・トレーシングを行った。すると、正常組織と同様の幹細胞マーカーから K19-Wnt1; C2mE マウスの胃腫瘍の一部にも腫瘍細胞が供給されていることがわかった。

以上の検討により、胃上皮幹細胞が、生理的状态、慢性胃炎、胃癌等において、一貫して胃上皮組織構築に寄与していることが明らかとなった。これらをもとにして、将来的に胃炎、胃癌など、胃の様々な病態において、胃上皮幹細胞への介入による新しい治療法開発への発展が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

本研究期間中に、以下の発表等を行った。  
〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 妹尾浩、上尾太郎、中西祐貴、千葉勉: 大腸がん幹細胞に特異的な因子がもつ可能性が分子標的治療。査読無、2014 12: 52-56.
2. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T: Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. Nat Genet. 査読有、2013 Jan;45(1):98-103. doi: 10.1038/ng.2481.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 中西祐貴、上尾太郎、妹尾浩: 腸腫瘍幹細胞特異的マーカー Dclk1 の同定 International Sessions がん幹細胞 第 72 回日本癌学会総会 2013.10.04 横浜 パシフィコ横浜
2. 中西祐貴、上尾太郎、妹尾浩: 腫瘍幹細胞

による腫瘍組織構築機構の検討 第 50 回日本臨床分子医学会 2013.04.12 東京 東京国際フォーラム

3. 中西祐貴、妹尾浩、上尾太郎: 正常腸管および腸腫瘍における Dclk1/Lgr5 陽性細胞の役割 第 99 回日本消化器病学会総会 2013.03.23 鹿児島 かごしま県民交流センター

4. Nakanishi Y, Seno H, Ueo T, Chiba T: The role of Dclk1-positive cells in the intestinal homeostasis. 2012 James W. Freston Single Topic Conference: Gastrointestinal Stem Cell Biology and Pathobiology. August 27-28, 2012, Chicago, USA, Intercontinental Hotel Chicago

5. 中西祐貴、上尾太郎、妹尾浩: 腸腫瘍幹細胞特異的マーカー Dcamk1 の同定 第 98 回日本消化器病学会総会 2012.04.20 東京 京王プラザホテル

6. 上尾太郎、妹尾浩、仲瀬裕志: Hes1 は大腸上皮細胞の位置を規定し、ニッチ由来の Wnt や BMP シグナルによる分化制御に関与する 第 98 回日本消化器病学会総会 2012.04.19 東京 京王プラザホテル

〔図書〕(計 1 件)

妹尾浩、上尾太郎、中西祐貴、千葉勉: Hes1 と Dclk1 を標的とする大腸がん幹細胞治療の可能性 がん基盤生物学-革新的シーズ育成に向けて- 南山堂 52-57, 2013

〔産業財産権〕  
該当なし

〔その他〕  
該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

上尾 太郎 (UEO, Taro)  
京都大学・医学研究科・助教

天理よろづ相談所病院・消化器科・医長  
研究者番号: 30569611

(2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者  
該当なし