

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460954

研究課題名(和文)炎症発癌に対する間葉系幹細胞のchemoprevention機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of chemopreventive mechanisms of mesenchymal stem cells for inflammatory carcinogenesis

研究代表者

本谷 雅代 (Motoya, Masayo)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60468080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：MSCは、DNA損傷を減らし、細胞周期を止め、細胞死を誘導した。これらは、発がん早期にタンデムに配列して作用する新しい発がん抑制メカニズムであった。前者はメチルグアニンメチル基転移酵素の活性化を介し、後者では、TGF-betaを介したパラクリン作用であった。炎症発がんモデルでは、MSCは、beta-カテニンをリン酸化し、その変異のスペクトラムを狭く偏らせた。さらに、Tgf-beta/Smadシグナルの活性を抑制した。これらは、古典的発がん経路を抑制する第三のメカニズムの存在を示唆した。

研究成果の概要(英文)：MSCs canceled AOM-induced tumor initiation. MSCs inhibited the acute apoptotic response of a genotoxic carcinogen (AARGC) in colonic epithelial cells because of the removal of O6-methylguanine adducts through O6-methylguanine-DNA methyltransferase (Mgmt) activation. However, MSCs did not induce epigenetic Mgmt reactivation. Furthermore, MSCs broadly affected the cell-cycle machinery, leading to G1 arrest. Coculture of IEC-6 intestinal cells with MSCs not only induced G1 arrest, but also apoptosis. The anti-carcinogenetic properties of MSCs required transforming growth factor (TGF)-beta signaling. MSCs inhibited AOM-induced tumor initiation by preventing the initiating cells from sustaining DNA insults and inducing G1 arrest in the initiated cells that escaped from the AARGC. Tumor initiation perturbed by MSCs might potentially dysregulate classical WNT and TGF-beta-Smad signaling pathways.

研究分野：消化器内科

キーワード：間葉系幹細胞 発癌 化学予防

1. 研究開始当初の背景

骨髄間葉系幹細胞 (Bone marrow-derived mesenchymal stem cell, MSC) は多分化能を有し、強力な免疫調整作用を有するのみならず抗原性、毒性が低く、単離培養が容易であるため、iPS 細胞や ES 細胞と並び再生医療や遺伝子治療において、現在、最も魅力的な研究対象である。MSC 移植は、細胞のソースとして血管、神経、心筋などを中心とした細胞移植治療に利用されるのみならず、その強力な免疫調整作用を応用した移植片対宿主病や自己免疫疾患への治療応用も試みられている。しかし、MSC は、再生医療や遺伝子治療の細胞源として期待される一方で、発がんに対するその作用は明らかではない。最近、大腸癌において、MSC が癌関連線維芽細胞の前駆細胞である可能性や (Henriksson, Am J Pathol 2011, Shinagawa, Int J Cancer 2010), MSC が IL-6, 血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) (Liu, JBC 2011), プロスタグランジン E2 (Li, 2012 Cancer Discovery), あるいは、transmembrane neuregulin 1 (tNRG1)などを分泌して腫瘍生存シグナルを活性化する (Tsai, 2011 Gastroenterol) など、大腸癌の増殖を促す報告がなされている。また、乳癌では、MSC が EMT (Martin et al, Breast Cancer Res Treat 2010) を介して転移を促進させることが報告されている。しかし、Khakoo ら (J Exp Med 2006;203:1235) や Karnoub ら (Nature 2007;449:557) による相反する報告もある。さらに、炎症発がんに対する MSC の作用の報告は皆無であり全く不明といわざるを得ない。

そこで本研究は、腸炎関連癌に対する MSC の化学予防作用の詳細を明らかとすることを目標とした。

最近、申請者らは、アゾキシメタン (azoxymethane, AOM) /デキストラン硫酸 (dextran sulfate sodium, DSS) 発がんモデルにおいて、AOM 15 mg/kg 腹腔内投与と同時に MSC を  $2 \times 10^4$  cells/g を尾静脈投与した Day0 群において、20 週後に形成された腫瘍数が有意に減少する一方、腫瘍のサイズには変化が認められないことを明らかにした。このことは、MSC が AOM/DSS モデルにおける腫瘍プロモーションには作用せずに、イニシエーションを抑制すること示唆する。そこで前癌病変とされる異型上皮巢 (Aberrant crypt foci, ACF) 形成に対する MSC の作用を検討した。MSC Day-1 (1 回目の AOM 投与一日前に MSC を投与した群) および MSC Day8 (2 回目の AOM 投与一日後に MSC を投与した群) 両群において、ACF 数の減少、とくに、1 aberrant crypt/focus から構成される ACF が有意に減少した。このことから、MSC は異形成性の ACF を減少させるというよりは、ACF の形成そのものを抑制することが示唆された。以上より、MSC による腫瘍

イニシエーションの抑制は、発癌過程のかなり早期に作用することが予想されたため、遺伝毒性発癌物質に対する急性アポトーシス反応 (acute apoptotic response of genotoxic carcinogen, AARGC) における MSC の効果を検討した。その結果、驚くべきことに AOM 投与 24 時間前に MSC を投与した群 (MSC-24h) において、AOM 投与後 8 時間における AARGC が有意に抑制されることを見出した。これまでに報告された化学予防物質は軒並みこの AARGC を促進することで、生体にかかる変異負荷を減じることから、MSC による化学予防には、これまでにない新しい機序が想定された。そこで、MSC-24h 群の摘出大腸組織における O<sup>6</sup>メチルグアニン (O<sup>6</sup>MeG) 付加体の免疫蛍光染色と G1 チェックポイント関連分子のウエスタンブロットにより解析した。その結果、MSC により O<sup>6</sup>MeG 付加体そのものが顕著に減少し、かつ Tgfβ/Smad 経路の活性化 p21 の発現上昇、Cdk4 およびリン酸化 Rb の減少が認められ、大腸上皮細胞が G1 期停止をきたしていることが推定された。さらに MSC による AARGC 抑制の機序を検討するため、in vitro において AOM 存在下でのラット小腸上皮細胞株 IEC-6 と MSC の共培養系における IEC-6 増殖について検討した。共培養 72 時間において、IEC-6 の Ki-67 ラベル率は、MSC 非存在下では 100%であったにもかかわらず、MSC 存在下では 40%まで低下し、一方、TUNEL 法によるアポトーシス係数は、MSC 非存在下では 0%、MSC 存在下で 4%と亢進した。MSC 共培養実験における IEC-6 増殖抑制作用は、MSC 細胞上清には認められず、かつ、抗 Tgfβ 中和抗体により消失した。

以上を要約すると、MSC による化学予防作用は、AOM の活性体であるメチルアゾキシメタン (methylazoxymethane, MAM) によりもたらされる DNA 損傷、すなわち O<sup>6</sup>MeG DNA 付加体そのものを減らすこと、AARGC を免れた細胞を G1 期停止やアポトーシスに導くこと、の 2 つの機序によりイニシエーションを抑制すると推定された。

本研究は、MSC の化学予防機構をさらに詳細に解明することを目標とする。MSC の化学予防作用の仮説における O<sup>6</sup>MeG DNA 付加体そのものを減らす具体的な機序、AARGC を免れた細胞を G1 期停止やアポトーシスに導く機序を解明する。

2. 研究の目的

本研究計画は、本研究は、腸炎関連癌に対する MSC の chemoprevention 作用の詳細を明らかとすることを目標とする。そのために、

AOM 関連発癌における MSC の役割  
AOM 関連発癌に対する MSC の化学予防機序

- 1) AARGC を免れた細胞を G1 期停止やアポトーシスに導く機序
- 2) O<sup>6</sup>MeG DNA 付加体そのものを減らす機序

Helicobacter hepaticus 感染モデルに対する MSC の作用の 3 つのテーマを重点的に研究する。

### 3. 研究の方法

3 つの AOM 関連発癌モデルにおける MSC の役割の解明

これまでの検討より, MSC は AOM 関連発癌において発生する腫瘍数を減少させ, AARGC を抑制することを見出した。しかし, 各モデルにおいて, MSC の生着, 分化および細胞運命と MSC の作用との関連や, MSC の作用機序として, 細胞接触あるいは MSC の産生する液性因子によるパラクライン作用のどちらが重要であるかについて解析の余地がある。そこで, とくに AARGC モデルと ACF モデルにおいて, 組織内における GFP 標識 MSC の局在とその細胞運命を各種分化マーカー (CD45, CD31,  $\alpha$ SMA, NG2, desmin, vimentin, CK など) による 2 重免疫蛍光法や FISH 法にて検討する。これらのモデルに対して MSC 投与と MSC 培養上清 (MSC-conditioned medium; MSC-CM) 投与の作用を比較検討する。

1) MSC 投与下に発生した AOM 関連癌の特徴

AOM 関連発癌には,  $\beta$ -カテニン-WNT, K-ras および Tgf $\beta$  Smad 経路が深く関与するとされる (Cancer Biology & Therapy 2009;14:1313)。これまでの検討によると, AOM/DSS 腫瘍では,  $\beta$ -カテニンタンパク発現に差は認められなかったが, リン酸化 $\beta$ -カテニンは MSC 非投与群に比べ MSC 投与群に有意に多く認められた ( $P=0.030$ )。興味深いことに 70%の $\beta$ -カテニンの遺伝子変異は両群で異なっていた。さらに, WNT PCR アレイ解析では, MSC 投与群において, MSC 非投与群に比較して, 89%におよぶ WNT 関連分子の発現低下が認められ, 両者における WNT 経路の活性化レベルが異なることが予想された。本研究では,  $\beta$ -カテニン遺伝子変異や WNT 活性化レベルに及ぼす MSC の作用やその生物学的な意味を明らかにする。さらには, ACF モデルにおける K-ras 経路や AOM 関連発癌における Tgf $\beta$  Smad 経路に及ぼす MSC の作用を検討することで, MSC 投与下に発生した AOM 関連癌の特徴を明らかにする。

AOM 関連発癌に対する MSC の chemoprevention 作用機序

1) AARGC を免れた細胞を G1 期停止やアポトーシスに導く機序の解明

申請者のこれまでの検討では, AOM 投与 24 時間前に MSC を投与した群 (MSC-24h) においてのみ, 8 時間目生じる AARGC が有意に抑制されていた。前述のごとく MSC により O<sup>6</sup>MeG 付加体そのものが顕著に減少し, かつ, 大腸上皮細胞が G1 期停止をきたした。AOM 存在下における IEC-6 と MSC の共培養実験では, MSC は IEC-6 の増殖を抑制しアポトーシスを促進した。この IEC-6 増殖抑

制作用は, in vitro における予備実験では, 細胞接触を伴う直接的な共培養および接触のない間接的共培養ともに認められたにもかかわらず, MSC 細胞上清には認められず, かつ, 抗 Tgf $\beta$  中和抗体により消失した。このことより, MSC による IEC-6 増殖抑制は, 腸管局所で産生される Tgf $\beta$  を介する作用が重要であることが示唆された。

そこで, 本研究では in vitro におけるこれらの結果が in vivo においても再現されるか否かを確認する。すなわち, in vivo においても, MSC が AARGC を免れた大腸上皮細胞を実際に G1 期停止やアポトーシスに導くか否か, より長期の経時的観察 (72-96 時間) において, 細胞周期解析や AARGC より晩期に起こるアポトーシスを確認する。また, 腸管組織の Tgf $\beta$  タンパク濃度測定し, その産生細胞を明らかにし, 抗 Tgf $\beta$  中和抗体投与により, MSC の作用がキャンセルされるか否か介入実験により確認する予定である。

2) O<sup>6</sup>MeG DNA 付加体そのものを減らす機序の解明

AOM は肝臓あるいは大腸局所の CYP2E1 によりその活性体であるメチルアゾキシメタン (methyl azoxymethane, MAM) に変換され O<sup>6</sup>MeG 付加体を形成する。一方, O<sup>6</sup>MeG 付加体は DNA 修復酵素である O<sup>6</sup>-methylguanin DNA methyltransferase (MGMT) により脱メチル化により修復される。CYP2E1 高活性アリルは大腸癌のハイリスクであり, さらに MGMT は, ヒト大腸癌 (J Natl Cancer Inst 2005;97:1330) およびマウス AOM 関連癌 (Mol Carcinog 2010;49:94) においてエピジェネティックに不活化されることが知られている。

そこで, 本研究では, MSC の Cyp2e1 および Mgmt に対する作用を in vivo (AARGC モデルの摘出肝臓および大腸組織) および in vitro (IEC-6-MSC 共培養実験における IEC-6 株) において検討する。すなわち, Cyp2e1 の遺伝子発現は quantitative RT-PCR (qPCR) により, タンパク発現は Western blot により定量的に検討し, Cyp2e1 活性はクロロゾキサゾン 6-水酸化活性測定 (HPLC 法) により測定する。これらの検討により, MSC が Cyp2e1 発現や活性を低下させるか否か明らかになる。一方, Mgmt の遺伝子発現は qPCR にて定量し, Mgmt プロモータのメチル化レベルの定量解析には bisulfite pyrosequencing 法を用いる。これらの結果より, MSC が Mgmt のエピジェネティック調節を負に制御するか否か明らかになる, 以上を総合して MSC による O<sup>6</sup>MeG 付加体除去の分子機構を推定する。

その他の炎症発癌モデルに対する MSC の作用。

本研究では, 腸炎関連癌に対する MSC の化学予防作用の詳細を明らかとすることを目標としている。したがって, AOM 関連発癌以外の腸炎関連癌モデルにおける MSC の

作用を検討する必要がある。そこで Erdemanらにより報告された *Helicobacter hepaticus* 感染による腸炎関連癌モデルに対する MSC の作用を検討する (Proc Natl Acad Sci USA 2009;106:1027)。このモデルは、Recombinase-activating gene-2-deficient (Rag2<sup>-/-</sup>) マウスに *Helicobacter hepaticus* を感染させ、その 6-8 か月後に高い再現性で腸炎関連癌を発生する。*H. hepaticus* (strain 3B1, no. 51449; American Type Culture Collection から購入) は  $2 \times 10^7$  個を隔日計 3 回経口感染させる。MSC は、*H. hepaticus* の感染前、2 回目投与と同時に、感染後の 3 群に分けて  $2 \times 10^4$  cells/g を尾静脈より 1 回投与する。Rag KO マウスは、経時的に屠殺し、腸炎の重症度、発生した腫瘍数、および、サイズを計測する。AOM 関連発癌モデルにおける MSC の役割の解明の際と同様に、MSC の動態を検討する。このモデルでは、CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>lo</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞移入により、腸炎および発癌が著明に抑制されるため、MSC の作用を比較検討したり、必要であれば、様々な条件下で CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>lo</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞移入を併用して検討する。

#### 4. 研究成果

本研究では、腸炎関連癌に対する MSC の化学予防作用を明らかとすることを目標とした。そのために、AOM 関連発癌における MSC の役割、AOM 関連発癌に対する MSC の化学予防の作用機序、1) AARGC を免れた細胞を G1 期停止やアポトーシスに導く機序、2) O<sup>6</sup>MeG DNA 付加体そのものを減らす機序、*Helicobacter hepaticus* 感染モデルに対する MSC の作用の 3 つのテーマを重点的に研究する計画であった。

1) に関して、AOM の活性代謝物であるメチルアゾキシメタン (MAM)、および MGMT 阻害剤である O<sup>6</sup>BG および AOM を適宜組み合わせることで、大腸上皮細胞に被る変異原性 (O<sup>6</sup>MeG の多寡) をコントロールして、MSC の作用を観察したところ、変異原性と MSC の増殖抑制作用の間に正の相関を見出した。

2) に関しては、MSC が大腸組織の粘膜分画における MGMT の遺伝子発現を誘導することを見出した。能動的な CpG アイランドの脱メチル化には、いくつかの酵素が関与するが、activation-induced deaminase (AID)、ten-eleven translocation (TET) に注目した。TET1-3 に関しては、合成 siRNA による一過性の KD 株を樹立した。次に TET 単独あるいは AID (KD 安定株) との組み合わせによるダブル KD (DKD)、トリプル KD (TKD) およびクアドラ KD (QKD) を樹立した。MGMT プロモータにおける DNA メチル化レベルを pyrosequencer により定量的に解析した。残念なことに TET/AID がこの系において MGMT 発現とは無関係であることが判明した。

また、に関しては、大腸にホーミングする MSC の絶対数が少ないため、GFP のみならず Y-FISH を併用したが、それ以上の検討は困難であった。そこで、当初の計画を変更し、AOM/DSS 炎症発がんモデルにおいて MSC 投与群に形成された腫瘍と MSC 非投与 (コントロール) 群を多数例で検討した。MSC 投与群では、リン酸化β-カテニンが有意に多く、β-カテニン遺伝子の変異のスペクトラムが狭く、偏りが認められた。さらに、Tgf-β/Smad シグナルの活性が抑制されていた。これらの結果は、MSC が大腸発がんにおいて重要とされる古典的 WNT および Tgf-β/Smad シグナルに作用して、発がんを抑制する第三のメカニズムの存在を示唆した。

に関しては、研究期間内に着手できず今後の課題となった。

これまで得られた成果を要約すると、MSC は、DNA 損傷 (O<sup>6</sup>メチルグアニン) そのものを減らした。また、DNA 損傷をもった細胞の細胞周期を止め、細胞死 (アポトーシス) を誘導した。これらは、発がんのごく早期の段階 (イニシエーション) において、別々ではなくタンデムに配列して作用する新しい発がん抑制メカニズムであった。前者は MGMT 活性化を介するが、MGMT 活性化機序が不明である。少なくとも MSC が MGMT のエピジェネティック調節関与しなかった。後者に関して、MSC の作用は TGF-β を介するが、その作用が共培養のペア細胞における DNA 損傷に比例して増強する機序は全く不明であり、研究期間内には、その謎に迫ることができず、今後の検討課題となった。

AOM/DSS 炎症発がんモデルでは、MSC 投与群に形成された腫瘍では、MSC 非投与 (コントロール) 群と比較すると、リン酸化β-カテニンが有意に多く、β-カテニン遺伝子の変異のスペクトラムが狭く、偏りが認められた。さらに、Tgf-β/Smad シグナルの活性が抑制されていた。これらの結果は、MSC が大腸発がんにおいて重要とされる古典的 WNT および Tgf-β/Smad シグナルに作用して、発がんを抑制する第三のメカニズムの存在が疑われ、この点も、今後の研究課題である。

#### 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 9 件)

1. 川上賢太郎, 永石和利, 有村佳昭, 間葉系幹細胞を用いた消化管再生医療. Medical Science Digest, 査読無, 2, 2016, 65-68.
2. Shimizu H, Arimura Y, Onodera K, Takahashi H, Okahara S, Kodaira J, Oohashi H, Isshiki H, Kawakami K, Yamashita K, Shinomura Y, Hosokawa M, Malignant potential of gastrointestinal cancers assessed by structural equation modeling, PLoS ONE, 査読有, 11, 2016,

e0149327.

1. Onodera K, **Arimura Y**, Isshiki H, Kawakami K, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto E, Niinuma T, **Naishiro Y**, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Low-frequency IL23R coding variant associated with Crohn's disease susceptibility in Japanese subjects identified by personal genomics analysis, PLoS ONE, 査読有, 10, 2015, e 0137801.
3. Nagaishi K, **Arimura Y**, Fujimiya M, Stem cell therapy for inflammatory bowel disease, J Gastroenterol, 査読有, 50, 2015, 280-286.
4. Nagaishi K, Ataka K, Echizen E, **Arimura Y**, Fujimiya M, Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic hepatocyte damage in mice by inhibiting infiltration of bone marrow-derived cells, Hepatology, 査読有, 59, 2014, 1816-1829.
5. Nasuno M, **Arimura Y**, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, **Naishiro Y**, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y, Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation, STEM CELLS, 査読有, 32, 2014, 913-925.
6. Watanabe S, **Arimura Y**, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nasuno M, Yamashita K, Idogawa M, **Naishiro Y**, Murata M, Adachi Y, Fujimiya M, Imai K, Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors, J Gastroenterol, 査読有, 49, 2013, 270-282.
7. Yamazaki K, Umeno J, Takahashi A, Hirano A, Johnson TA, Kumasaka N, Morizono T, Hosono N, Kawaguchi T, Takazoe M, Yamada T, Suzuki Y, Tanaka H, Motoya S, **Hosokawa M**, **Arimura Y**, Shinomura Y, Matsui T, Matsumoto T, Iida M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M, A Genome-Wide Association Study Identifies 2 Susceptibility Loci for Crohn's Disease in a Japanese Population, Gastroenterology, 査読有, 144, 2013, 781-788.
8. **Arimura Y**, Isshiki H, Onodera K, Nagaishi K, Yamashita K, Sonoda T, Matsumoto T, Takahashi A, Takazoe M, Yamazaki K, Kubo M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y, Characteristics of Japanese inflammatory bowel disease susceptibility loci, J Gastroenterol, 査読有, 49, 2014, 1217-1230.
9. **有村佳昭**, 小野寺 馨, 一色裕之, 川上賢太郎. 間葉系幹細胞による消化管再生医療. G.I. Research, 査読無, 22, 2014, 435-442.

〔学会発表〕(計3件)

1. **有村佳昭**. 日本人の IBD 感受性遺伝子. 第 154 回日本消化器内視鏡学会東北支部例会(ランチョンセミナー), 2015 年 2 月 6 日, 仙台国際センター(宮城県仙台市).
2. 一色裕之, **有村佳昭**, 永石歆和, **苗代康可**, 篠村恭久, 今井浩三. 骨髄間葉系幹細胞依存性の大腸癌細胞増殖の機序. JDDW2013, 2013 年 10 月 10 日, 品川プリンスホテル(東京都港区).
3. 一色裕之, **有村佳昭**, 小野寺馨, 永石歆和, **苗代康可**, 篠村恭久, 今井浩三. 骨髄間葉系幹細胞依存性大腸癌細胞増殖の機序. 第 50 回日本消化器免疫学会総会, 2013 年 8 月 2 日, ホテルグランドヒル市谷(東京都新宿区).

〔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:  
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  
本谷(細川) 雅代(Masayo Motoya)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60468080

(2)研究分担者  
有村 佳昭(Yoshiaki Arimura)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 80305218

(2)研究分担者  
苗代 康可(Yasuyoshi Naishiro)  
札幌医科大学・医療人育成センター・講師  
研究者番号: 80347161

