

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460934

研究課題名(和文) 胃食道接合部癌の幹細胞の同定と応用による治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of cancer stem cell of esophagogastric junction

研究代表者

平田 喜裕 (Hirata, Yoshihiro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10529192

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)：胃食道接合部は扁平上皮細胞と円柱上皮細胞が境界部を形成し悪性腫瘍の発生頻度が高いが、発生機序については不明である。我々は胃食道接合部に特異的に発癌するモデルを作成し、胃食道接合部癌の起源と発癌機序を検討した。胃粘膜特異的にKRAS遺伝子とTGFβR2遺伝子に変異を導入すると、約6週で扁平上皮円柱上皮接合部(SCJ)に浸潤性の腫瘍が発生し、扁平上皮、腺上皮、幹細胞の形質を示した。腫瘍細胞株からオルガノイドを作成し、検討したところ、Wntリガンド、EGF、Nogginなどから独立した生存条件を示した。KRT19陽性、Lgr5陰性の細胞が接合部癌の起源となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Esophagogastric junction, like cervix of uterus, is composed of squamous and columnar cells, and known to be highly carcinogenic. However, the cause and mechanism of esophagogastric cancer is largely unsolved. In this study, we have examined the origin and mechanism of mouse gastric squamocolumnar junction (SCJ) tumor. KRAS and TGFβR2 mutation in KRT19+ cells led to invasive tumor specifically at gastric SCJ. This tumor showed columnar cell marker KRT7, squamous cell marker KRT14, and several stem cell markers, such as SOX9 and CD44. Organoid culture of SCJ tumor cells revealed these tumors can survive and grow independently of Wnt, EGF, or Noggin stimulation. In normal mouse, KRT19+ cells are observed in the deep lesion of gastric gland especially at SCJ, showing stem cell property in the lineage tracing experiment. In contrast, Lgr5+ cells did not make SCJ tumor upon KRAS and TGFβR2 mutation, suggesting KRT19+, Lgr5- SCJ gland cells can be the origin of SCJ tumor in our model.

研究分野：消化管疾患

キーワード：胃食道接合部 癌 幹細胞 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

食生活の変化や医療の進歩に伴い上部消化管の疾患構造が変化しており、胃十二指腸潰瘍は激減し、胃癌の死亡率も減少傾向となってきた。一方で逆流性食道炎や胃食道接合部癌は増加傾向である。胃食道接合部癌は胃癌よりもリンパ節転移をきたしやすく予後が不良であることが知られ、その早期発見や発癌機序の解明が急務である。

胃食道接合部は二種類の上皮細胞により構成される移行帯の一つであり、扁平上皮細胞と円柱上皮細胞が境界部(扁平上皮円柱上皮接合部; squamocolumnar junction, SCJ)を形成している。胃食道接合部と子宮頸部はともに悪性腫瘍の発生頻度が高いSCJとして知られており、扁平上皮癌と腺癌のどちらも発症し、組織学的に類似点も多い。一方で子宮頸部癌はパピローマウイルス感染という主な原因が同定され、発癌機序の解明も進んできているのに対し、胃食道接合部癌では、パピローマウイルスに相当するような原因は明らかになっておらず発癌機序については大部分が不明である。近年国内外からこの胃食道部接合部癌の起源についての研究が盛んになり、とくに酸逆流に起因すると考えられているバレット腺癌についてはさまざまな結果が報告されてきた。しかしいまだに接合部癌全体の起源や機序を俯瞰できるような結果は報告されていない。

我々は消化管の発癌モデルマウスの研究を行う過程で胃食道接合部に特異的に発癌するマウスの系統を開発した。本研究ではそのマウスの解析により胃食道接合部癌の起源と発癌機序の解明をめざす。

2. 研究の目的

遺伝子改変マウスモデルを用いて、胃食道部接合部癌を作成し、その分子生物学的特性を明らかにする。また癌の起源細胞となる幹細胞を同定する。この幹細胞を用いて生体外培養における分化誘導法を開発する。また、この腫瘍に導入する変異遺伝子を変えて、胃食道部癌悪性化に關与する遺伝子やその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)K19-cre;Kras G12D;TGFbR2 f/f マウスを樹立し、タモキシフェンを投与して胃食道接合部癌を作成する。病変を摘出し、腫瘍部の組織を免疫染色、また腫瘍からの RNA を用いた q-PCR で細胞形質マーカーであるサイトケラチンや細胞増殖マーカーである PCNA や cyclinD1 の発現を測定し、正常部と比較した。また幹細胞マーカーの発現や腺上皮、扁平上皮マーカーなどの発現も検討した。

(2)上記遺伝子改変マウスの接合部癌から細胞株を樹立し、マトリゲルを用いた三次元培養を行いオルガノイドを作成した。オルガノ

イド培養に分化阻害剤などを投与し、幹細胞マーカーや腺および扁平上皮マーカーなどの発現を検討した。

(3)上記発癌マウスに E-カドヘリン遺伝子のノックアウトマウスを交配し、接合部癌における E-カドヘリン遺伝子の機能について検討した。

(4)接合部における腫瘍細胞の起源となる細胞の検討のために、レポーター遺伝子導入マウス、また腺底部において遺伝子変異を惹起する Lgr5-cre マウスと腺上部で遺伝子組み換えをおこす TFF1-cre マウスを用いて、接合部癌の起源細胞について検討した。

4. 研究成果

(1)遺伝子改変マウスモデルにおける胃食道接合部腫瘍の特徴

K19-cre; KrasG12D; TGFbR2 f/f(KRT)マウスにタモキシフェンを投与し、6wk 後に胃を摘出し病理所見を検討した。典型例では図1に示すような腫瘍が、胃食道接合部(SCJ)特異的に発生した。25匹を解析し、病理所見で接合部腫瘍は88%で認めた。病理学的には、図2に示すように扁平上皮癌と腺癌を混在したような腺扁平上皮癌と考えられ、著明な粘膜下層への浸潤を認め、悪性化していると考えられた。

免疫染色および q-PCR で主要の形質マーカーや幹細胞マーカーの発現を検討したところ、扁平上皮マーカーである KRT1, KRT14 とともに腺上皮の形質マーカー KRT7, KRT8 の発現がみられ、さらに幹細胞のマーカーである SOX2, SOX9, CD44 などの分子の発現が増加していた。

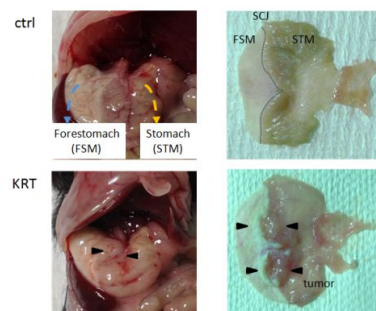


図1 胃食道接合部腫瘍のマクロ像

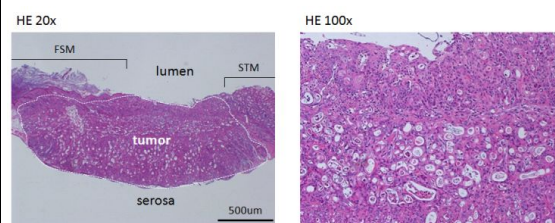


図2 胃食道接合部腫瘍の病理像

(2)接合部癌細胞株の樹立、オルガノイド作成と遺伝子発現の検討

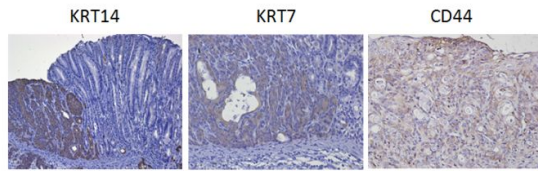


図3 各マーカーの免疫染色

KRT マウスの胃食道接合部腫瘍を摘出、上皮細胞を分離、培養し、二種類の独立した接合部腫瘍細胞株(mJT1, mJT4 細胞)を樹立した。これらの細胞を三次元培養すると、図4のように budding したオルガノイドを形成した。これらの二次元培養細胞と三次元培養オルガノイドより RNA を抽出して、扁平上皮マーカー、腺上皮マーカーの発現を検討したが、培養条件によった有意な遺伝子発現変化はみられなかった。さらに分化誘導因子についてこの培養細胞株を用いて検討した。Wnt シグナルリガンド、EGF、TGFb シグナルのリガンド、またそのアンタゴニストである Noggin などで刺激し、イムノプロットや q-PCR を施行したが、扁平上皮マーカー p63、腺上皮マーカー MUC4 とともに有意な発現変化は見られず、接合部癌の分化誘導因子はこれらのリガンド以外のものである可能性が示唆された。

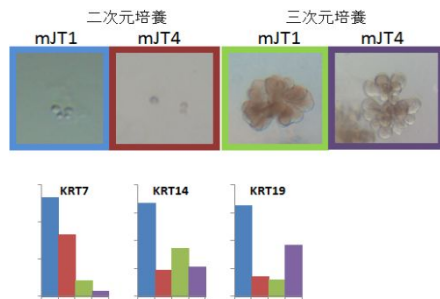


図4 細胞株とオルガノイド、マーカー発現

(3)接合部癌発生における E-cadherin の役割
KRT マウスに CDH1 f/f マウスを交配して K19-cre; KrasG12D; TGFbR2 f/f; CDH1 f/f(KRTC)マウスを作成し、タモキシフェンを投与して胃食道接合部腫瘍について検討した。KRTC マウスでも 3w 後にやはり接合部特異的に腫瘍が発生した。本腫瘍でも転移は認めず、組織型も同様であり、K19 陽性細胞由来の接合部癌における e-cadherin 遺伝子の影響は限定的であると考えられた(図5)。

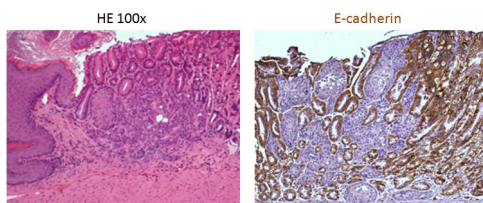


図5 KRTCマウスの胃食道接合部腫瘍の病理像、免疫染色

(4)接合部癌起源細胞の検討

KRT マウスに LacZ 遺伝子を導入して、K19-cre プロモーター下で遺伝子変異を引き

起こした細胞を染色によって追跡した。図6に示すように接合部に発生する腫瘍は LacZ 遺伝子産物によって染色されており、K19 陽性細胞が起源であることがわかった。一方 K19-cre; LacZ マウスは、おもに胃粘膜上皮と胃食道接合部で一過性の染色がみられるが、時間経過でほとんどは脱落し、K19 陽性細胞の大部分は正常幹細胞ではないと考えられた。しかし図6のように接合部深部腺管において 6w 後も染色されている細胞が残存し、K19 陽性細胞が接合部の一部腺管の幹細胞である可能性が示唆された。これらの細胞は CD44 や SOX9 などの幹細胞マーカーを強く発現しており、KRT マウスに発生する腫瘍との類似性が示唆された。さらに腸管や胃粘膜の幹細胞として報告されており、接合部近傍でも発現を認める Lgr5 陽性細胞に注目した。Lgr5-cre; KrasG12D; TGFbR2 f/f マウスを作成し、タモキシフェンによる遺伝子組み換えをおこなった。図7に示すように Lgr5 陽性細胞は接合部近傍の深部腺管の一部に存在していたが、KRAS と TGFb の遺伝子改変では腫瘍化をきたさなかった。すなわち K19 陽性かつ Lgr5 陰性細胞が起源になっている可能性が考えられた。

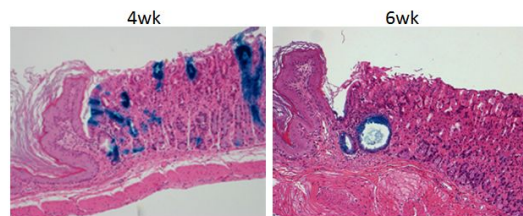


図6 K19-cre LacZマウスの系譜追跡

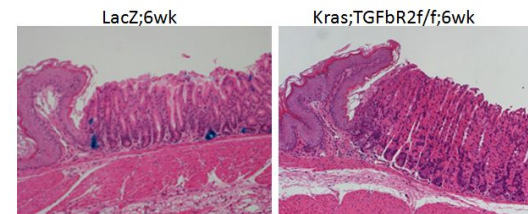


図7 Lgr5-creマウスの系譜追跡と発癌実験

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 5 件)

Hirata Y, Kinoshita H, Suzuki N, Analysis of cancer initiating cell of squamo-columnar junction、アジア環太平洋消化器病学会週間、2016 年 11 月 4 日、神戸コンベンションセンター(兵庫・神戸)

Hirata Y, Kinoshita H, Suzuki N, Role of CDH1, TGFbR2, KRAS mutations in the carcinogenesis of stomach、米国消化

器病学会週間、2015年5月17日、ワシントンDC、アメリカ

平田喜裕、鈴木伸三、小池和彦、胃食道接合部癌幹細胞の検討、日本消化器病学会週間、2014年10月23日、神戸コンベンションセンター（兵庫・神戸）

平田喜裕、鈴木伸三、小池和彦、マウスモデルを用いた胃食道接合部癌幹細胞の起源の検討、日本癌学会、2014年9月26日、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）

Hirata Y, Kinoshita H, Suzuki N, Analysis of the origin of squamo-columnar junction tumor in a mouse model、米国消化器病学会週間、2014年5月4日、シカゴ、アメリカ

東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80534932

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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

平田 喜裕 (HIRATA YOSHIHIRO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10529192

(2)研究分担者

鈴木 伸三 (SUZUKI NOBUMI)
公益財団法人朝日生命成人病研究所・消化器内科・部長
研究者番号：30723746

山田 篤生 (YAMADA ATSUO)