

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790715

研究課題名(和文) 胃癌幹細胞同定のための3次元培養法の確立と、発癌機序解明及び分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Establishment of 3D organotypic culture to identify the gastric stem cells, and to apply for the elucidation of mechanism of gastric cancer and for the novel therapy to gastric cancer

研究代表者

芝田 渉 (SHIBATA, Wataru)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00435819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の発癌機序解明や有効な治療法の開発に役立てることを目的として今回の研究を行った。3次元胃上皮細胞培養実験を用いて一正常細胞が進行癌に至る過程を幹細胞の遺伝子発現変化や腫瘍形成能に着目し解析を行った。その結果、胃3次元培養オルガノイドの確立と、胃発癌候補遺伝子の抽出、さらにオルガノイドを用いた幹細胞の腫瘍化能の評価が可能となった。現在、抽出した遺伝子の発癌への関与をin vitroや遺伝子改変マウスで解析を継続中である。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze the novel mechanism of gastric carcinogenesis, and to invent the novel therapy to gastric cancer, we performed the following experiments; 1) to establish the 3D-organotypic culture by using gastric epithelial cell, 2) to analyze the gene expression profile, and 3) to verify the tumorigenic property of gastric organoid.

As a results, we could establish the gastric organoid from primary gastric cells, and isolated many novel genes associated with intestinal metaplasia/carcinogenesis. We could also clarify the tumorigenic property of organoid, which would contribute to gastric cancer.

研究分野：内科臨床系医学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：胃癌 幹細胞 オルガノイド Helicobacter

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter 感染をはじめ細菌、ウイルス感染が慢性炎症を惹起し、組織障害、炎症細胞浸潤を経て発癌に至るいわゆる「炎症発癌」においては、慢性炎症の収束が発癌や癌進展において一定の効果があり、炎症の及ぼす発癌への関与はゆるぎないものとなっている (Maeda, Cell 2005, Shibata, Gastroenterol 2010)。 *Helicobacter pylori* 除菌は有効な潰瘍、発癌予防法として一般化しているが (Uemura, NEJM 2001)、その感染率の高さに比した発癌率の低さから、全 *H. pylori* 感染者を対象にした除菌治療は医療経済的に保険適応には至っていない。長期 *H. pylori* 感染は、胃粘膜壁細胞の減少を特徴とする萎縮性胃炎、腸上皮化生を経て発癌に至ると考えられているが、どの正常細胞がどの段階で癌化しそれらが増殖・進展していくかについては不明な点が多い (Fox JG, JCI 2007)。胃癌においては、*Helicobacter* 感染による炎症が様々な遺伝子発現変化や修飾を引き起こし、Cytokeratin-19 発現細胞などに代表される上皮細胞特異的に発現する癌遺伝子が発癌に促進的に働くことも示唆されている (Okumura, Cancer Res 2010, Oshima, Gastro 2006)。一方で *Helicobacter* 除菌後も発癌する症例は後を絶たず、炎症消失後も発癌リスクの高い状態が維持される、いわゆる「Field cancerization」の概念もきわめて重要となっている (Ushijima, Int J Can 2009)。

腫瘍幹細胞の概念は、1994 年、John E Dick らが白血病細胞において CD34 陽性 CD38 陰性分画が白血病形成能を有することを初めて報告し、その後乳癌などの固形腫瘍においてもその存在が明らかとなってきている (Lapidot, Nature 1994, Al Hajj, PNAS 2003)。腫瘍の heterogeneity (多様性) については古くから知られており、それが治療抵抗性獲得の理由であると考えられてきたが、

最近では幹細胞には階層構造があり、分裂静止状態にある幹細胞は抗癌剤、放射線治療にきわめて感受性であり、この幹細胞に変異が蓄積し腫瘍再発を来していると考えられている。胃癌では細胞表面マーカー CD44 陽性細胞が高い腫瘍形成能を有し、CD44 が ROS 抵抗性を発揮することから (Takaishi Stem Cells 2009, Ishimoto Cancer Cell 2011)、これらを軸とした腫瘍幹細胞研究が展開している。正常臓器幹細胞と腫瘍幹細胞には、自己複製能力や分化細胞の生成などの共通機能を有することから、腫瘍幹細胞の候補として、正常幹細胞がその標的として注目されている (Dick JE Blood 2008)。2007 年、Clevers らのグループにより Lgr5 で標識される crypt base columnar (CBC) cell が同定され (Barker, Nature 2007)、それまでの +4 position に存在するとされていた腸管上皮幹細胞の概念が一変された。Barker らは Lgr5-EGFP-ires-CreERT2/Rosa26RlacZ マウスモデルにより細胞系譜解析を行い、Lgr5 陽性細胞が腸管幹細胞であることを in vivo、in vitro において示した (Barker, Cell Stem Cell 2010)。更に大腸癌モデルマウスを用いて、Lgr5 陽性細胞の腫瘍化が腸発癌の本態である可能性を示唆した。さらに Lgr5 陽性細胞は胃底腺細胞を標識し、同様に細胞系譜解析により胃底腺を形成する胃幹細胞の可能性も示したが (Barker, Nature 2010)、胃体部幹細胞を標識するには至っていない。従って胃においては、Lgr5 陽性細胞が腫瘍幹細胞かどうかの検定もまだされていない。

これまで我々は *Helicobacter* 感染や MNU 誘導性胃発癌モデルを用いて、NF- κ B や JNK, ASK1 などの分子が、胃発癌に関与することを報告してきた (Cancer Res 2009, Gastroenterol 2010, PNAS 2011)。そこでは「炎症」に焦点をあてその多寡が、癌の発育・進展などの表現型を規定するとの結論に至っていたが、臓器幹細胞や腫瘍幹細胞につ

いては詳細に検討されていなかった。

2. 研究の目的

正常細胞が進行癌に至る過程を、腫瘍幹細胞という観点から分子レベルで明らかにし、今後の胃癌早期発見や新規治療法開発に役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

胃癌を正常臓器幹細胞、腫瘍幹細胞の観点から明らかにするため、マトリジェルを用いた *in vitro* 胃 3 次元培養法を構築し、まず免疫染色法により種々の幹細胞候補分子マーカーの同定を行った。さらに 3 次元培養細胞から mRNA を抽出し網羅的遺伝子発現解析を行い、幹細胞候補遺伝子を絞り込む。幹細胞における発癌との関連を、幹細胞特異的癌関連遺伝子発現などを行い検証する。確立した *in vitro* 上皮培養系を、さらにヒト胃粘膜検体やマウス胃癌モデルにも応用し、候補幹細胞マーカーの分布、遺伝子変異、メチル化などの解析を行い、長期培養の可否や、抗癌剤感受性について検討する。以上の実験から最終的に抽出した幹細胞マーカーの局在や多寡を、ヒト胃癌組織において検討し、*Helicobacter* 感染から発癌に至る過程での幹細胞マーカーの変化を追跡することにより、発癌高リスク群の絞り込みや新規治療における標的細胞の絞り込みに役立てる。

4. 研究成果

胃癌の発癌機序解明や有効な治療法の開発に役立てることを目的として、従来の遺伝子改変マウスを用いた発癌モデルなど *in vivo* の実験系に加えて、3 次元胃上皮細胞培養実験を組み合わせることにより、一正常細胞が進行癌に至る過程を分子レベルで明らかにし、今後の胃癌早期発見や新規治療法開発研究を行った。

まずマトリジェルを用いた *in vitro* 胃 3 次元培養法いわゆるオルガノイド形成に着

手した。Sato, Barker らの手法 (Nature 2009,2010) を参考とし、まず野生型マウス胃から胃上皮細胞を単離、培養し *in vitro* における 3 次元胃上皮細胞培養系の確立を成功させた (図 1)。その後 *Helicobacter* 感染マウス胃や MNU 刺激後の胃からも 3 次元培養に成功した。得られた 3 次元培養

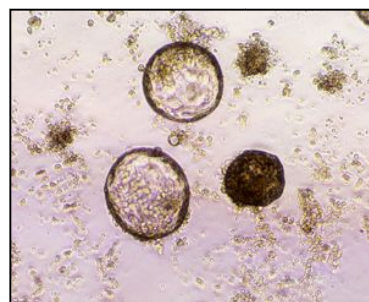


図 1. *In vitro* 胃 3 次元培養により確立したオルガノイド

胃組織において幹細胞候補タンパクを免疫染色にて解析したところ、*Dclk1* は *Helicobacter* 感染オルガノイドにおいて陽性細胞数が増加している傾向が見られた (図 2)。

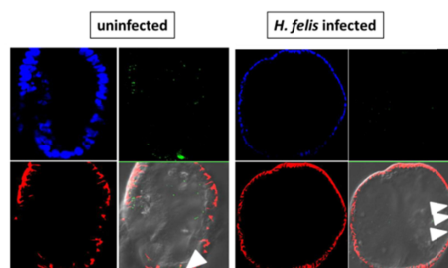
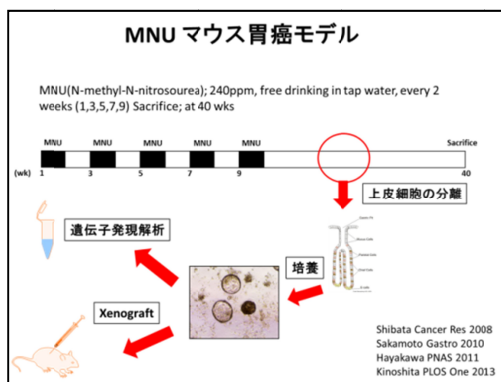


図 2. 免疫組織化学的染色。3D オルガノイド細胞を、*in vitro* で免疫染色を行った。左) 非感染マウス由来のオルガノイド。右) *H. felis* 感染マウス由来のオルガノイド。

しかしながらこれらの炎症オルガノイドのヌードマウス移植実験では腫瘍形成能を認めなかったことから、慢性炎症のみで幹細胞におこる変化では腫瘍形成能獲得は困難であることが示唆された (図 3)。

感染後のマウス胃から作製した 3 次元培養オルガノイド細胞から mRNA を抽出し



Background	Tumorigenesis
Wt mice	No (0/4)
Infected with <i>H. felis</i>	No (0/4)
Treated with MNU	Yes (2/4)

図 3. 3D オルガノイド培養細胞を用いた xenograft モデル。

網羅的遺伝子発現解析を行い幹細胞候補遺伝子の絞り込みを行った(図 4.)。その結果 Isx などの新規腸管特異的分子の高発現を見出した。Isx については更に胃発癌と

Intestinal genes		Gastric genes	
Padoplanin	4.01	Pepsinogen C	-2.86
ISX	2.66	GIF	-2.65
Vil1	1.08		
Muc4	2.17	Others	
Muc16	2.36	IL-1a	2.89
DPP4	2.48	RGS17	2.76
CDX1	-0.23	Gastrin	2.39
CDX2	-0.05		
			(Log2 ratio)

図 4. 有意な発現上昇・低下を示した遺伝子群

の関連を *in vitro* やヒト胃癌組織においても解析を進めている。

以上の結果から、胃 3 次元培養オルガノイドの確立と、胃発癌候補遺伝子の抽出、さらにオルガノイドを用いた幹細胞の腫瘍化能の評価が可能となった。今後は抽出した遺伝子の発癌への関与を *in vitro* や遺伝子改変マウスで解析し、さらに胃発癌機序の解明を行っていく予定である。

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)
なし

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

芝田 渉、須江聡一郎、前田 慎 ヘリコバクター感染による幹細胞マーカー遺伝子発現変化と腫瘍形成能の検討 第 100 回日本消化器病学会総会、2014 年 4 月 24 日東京

芝田 渉、前田 慎 Helicobacter infection promotes mouse gastric organoid growth, and altered the property of gastric stem/progenitor cells. Digestive disease week (米国). 2013 年 5 月 19 日

[その他]

特記すべきことなし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝田 渉 (SHIBATA, Wataru)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：00435819

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし