

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461951

研究課題名(和文) 腸管傷害修復における幹細胞を介したソニックヘッジホッグ発現機序の解明

研究課題名(英文) The role of Sonic hedgehog in intestinal injury via stem cell

研究代表者

吉川 幸造 (YOSHIKAWA, Kozo)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：80448331

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)：本研究はSonic hedgehog (SHH)と腸管修復との関連について検討することを目的とした。5-FUを投与することでSHHの活性が抑制される事が示され、癌幹細胞を用いた検討ではSHHが活性化されており、阻害薬であるシクロパミンを投与することでSHHが抑制された。Shh pathwayを活性化させることで、腸管修復促進に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the relationship between the intestinal injury and Sonic hedgehog pathway. In intestinal injury models, Shh pathway was downregulated. HCT-116 sphere-derived cells showed significantly increased expression of stem cell markers, Shh downstream genes and epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers compared to parental cells grown in conventional culture. The expression of stemness markers, Shh downstream genes and EMT markers were higher in cancer spheres than the parental cell line and downregulated by cyclopamine treatment in a dose-dependent manner. Shh pathway is related with cancer stem cell and may have an important role in intestinal injury.

研究分野：消化器外科

キーワード：腸管修復 Sonic hedgehog 幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

科研費若手 B (平成 21-22 年) で BT の新たなメカニズムの解明に向けて研究を行い、Tight junction である Occludin-1 が BT で低下する事を証明した。また科研費若手 B (平成 23-24 年) では Bacterial translocation 制御因子としての Sonic Hedgehog 発現機序の解明に関する研究を行い絶食 BT モデルで SHH の発現上昇が認められた。炎症性腸疾患の場合には、幹細胞が失われ新しい上皮を作る事が出来ず、腸管が破綻する。癌幹細胞では SHH との関連を報告したことから、今回 BT 発症機序に腸管修復において重要な働きをしている腸管上皮幹細胞が関与しており SHH が制御していると仮説を立てて検討を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では SHH と腸管修復との関連について、幹細胞に注目し検討する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では SHH と腸管修復との関連について検討する事であり。腸管の Cell line を用いて SHH pathway の変化を検討し、幹細胞に関しては大腸癌の Cell line を用いて検討を行った。

#### (1) 腸管 Cell line での検討

ラット小腸粘膜細胞株である IEC-6 を用いて 5-FU 投与による腸管傷害モデルを作成し Cell viability、Shh pathway 関連因子を測定した。

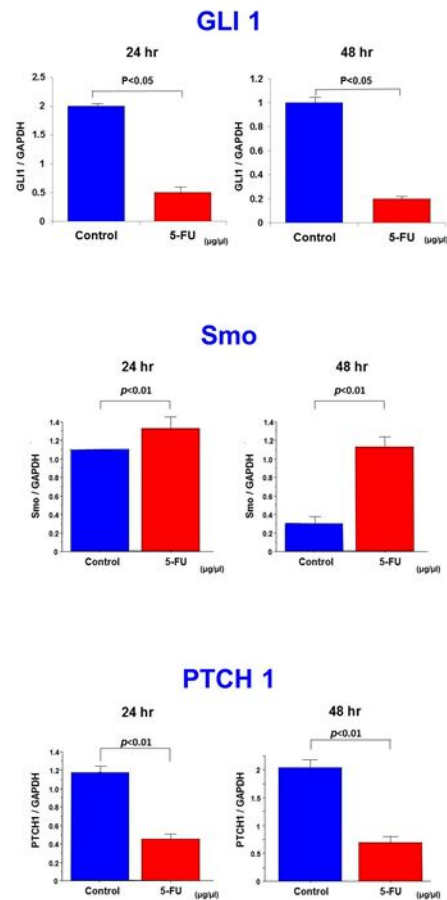
#### (2) CSCs における検討

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 を用いて検討を行った。Cancer sphere は growth factor を用いて 10-12 日間培養した。Shh signal の阻害はシクロパミンを用いて行った。大腸癌細胞 HCT-116 を無血清、浮遊培養により sphere を形成させ、cancer sphere、cell line における stemness genes、surface markers、Shh pathway、tight junction genes、EMT related genes 発現を RT-PCR で測定、sphere と cell line での発現を比較検討した。次に、Shh 経路の抑制因子である cyclopamine を用いて sphere を処理し、幹細胞マーカー、Shh 経路下流因子と EMT に関する遺伝子の発現変化を RT-PCR を用いて評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 腸管 Cell line を用いた検討。

5-FU を投与し、SHH 関連因子を測定したところ GLI1、Patch1 は有意な低下を認めた。

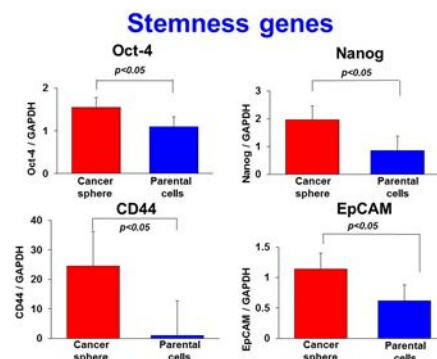


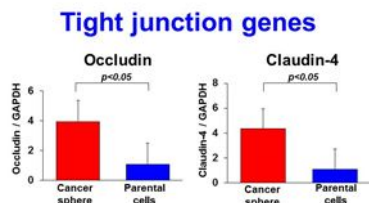
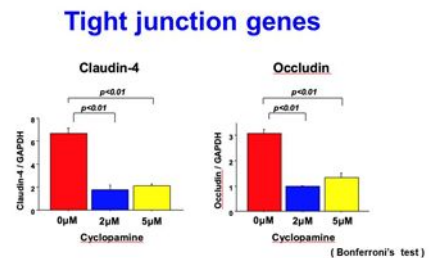
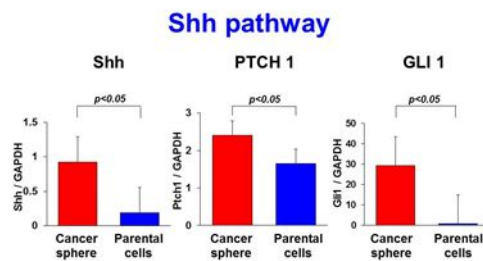
#### (2) CSCs における検討

##### 1. CSCs と Shh の関係

Stemness genes である Oct4 と Nanog が sphere で有意に高発現していた。Surface markers である CD44 と EpCAM も sphere で有意に高発現していた。Shh 経路である Shh、Ptch1、Gli1 が sphere で有意に高発現していた。

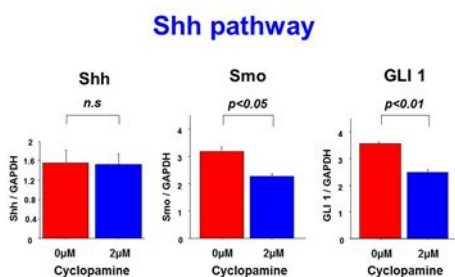
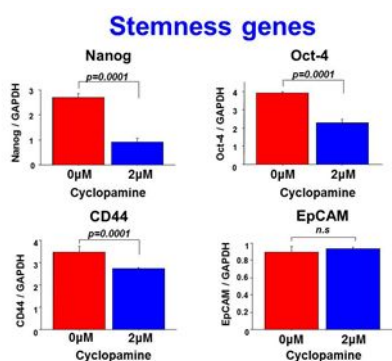
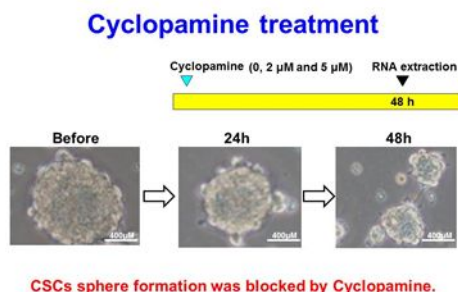
Tight junction である Occludin と Claudin-4 が sphere で有意に高発現していた。





### (3) シクロパミンによる影響

Cyclopamine 添加により sphere における Nanog, Oct-4, CD-44 発現が有意に抑制された。Occludin と Claudin-4 は有意に抑制され、E-Cadherin と Vimentin はそれぞれ用量依存性に有意に増強、抑制された。



### 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 20 件)

1. Yoshikawa K, Shimada M, Higashijima J, Nakao T, Nishi M, Takasu C, Kashihara H, Eto S. Combined liver mobilization and retraction: A novel technique to obtain the optimal surgical field during laparoscopic total gastrectomy. *Asian J Endosc Surg*. 2016 May;9(2):111-115. doi: 10.1111/ases.12271. 査読有
2. Eto S, Yoshikawa K, Nishi M, Higashijima J, Tokunaga T, Nakao T, Kashihara H, Takasu C, Iwata T, Shimada M. Programmed cell death protein 1 expression is an independent prognostic factor in gastric cancer after curative resection. *Gastric Cancer*. 2016 Apr;19(2):466-471. doi: 10.1007/s10120-015-0519-7. 査読有
3. Nakao T, Shimada M, Yoshikawa K, Higashijima J, Tokunaga T, Nishi M, Takasu C, Kashihara H, Suzuka I, Nishizaki T, Okitsu H, Yagi T, Miyake H, Miura M, Fukuyama M, Wada D, Bando Y. Propensity score-matched study of laparoscopic and open surgery for colorectal cancer in rural hospitals. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Feb 19. doi: 10.1111/jgh.13322. [Epub ahead of print] 査読有
4. Yoshikawa K, Shimada M, Higashijima J, Nakao T, Nishi M, Kashihara H, Takasu C. Limited lymph node dissection in elderly patients with gastric cancer. *J Med Invest*. 2016;63(1-2):91-95. doi: 10.2152/jmi.63.91. 査読有
5. Nakao T, Iwata T, Hotchi M, Yoshikawa K, Higashijima J, Nishi M, Takasu C, Eto S, Teraoku H, Shimada M. Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy and establishment of individualized therapy in advanced rectal cancer. *Oncol Rep*. 2015 Oct;34(4):1961-1967.

- doi: 10.3892/or.2015.4196. 査読有
6. Yoshikawa K, Shimada M, Wakabayashi G, Ishida K, Kaiho T, Kitagawa Y, Sakamoto J, Shiraishi N, Koeda K, Mochiki E, Saikawa Y, Yamaguchi K, Watanabe M, Morita S, Kitano S, Saji S, Kanematsu T, Kitajima M. Effect of Daikenchuto, a Traditional Japanese Herbal Medicine, after Total Gastrectomy for Gastric Cancer: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase II Trial. *J Am Coll Surg*. 2015 Aug;221(2):571-578. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2015.03.004. 査読有
  7. Kashihara H, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Sato H, Yoshikawa K, Miyatani T, Takasu C, Matsumoto N. Protein kinase C is a new prognostic factor in gastric cancer. *Surg Today*. 2015 Jun;45(6):759-764. doi: 10.1007/s00595-014-1010-5. 査読有
  8. Sato H, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Yoshikawa K, Higashijima J, Chikakiyo M, Kashihara H, Takasu C, Matsumoto N, Eto S. Phase I trial of neoadjuvant preoperative chemotherapy with S-1, oxaliplatin, and bevacizumab plus radiation in patients with locally advanced rectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 2015 Jun;20(3):543-548. doi: 10.1007/s10147-014-0733-z. 査読有
  9. Eto S, Yoshikawa K, Shimada M, Higashijima J, Tokunaga T, Nakao T, Nishi M, Takasu C, Sato H, Kurita N. The relationship of CD133, histone deacetylase 1 and thrombospondin-1 in gastric cancer. *Anticancer Res*. 2015 Apr;35(4):2071-2076. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=The+relationship+of+CD133%2C+histone+deacetylase+1+and+thrombospondin-1+in+gastric+cancer>. 査読有
  10. Kashihara H, Shimada M, Kurita N, Sato H, Yoshikawa K, Higashijima J, Chikakiyo M, Nishi M, Takasu C. Duodenal-jejunal bypass improves diabetes and liver steatosis via enhanced glucagon-like peptide-1 elicited by bile acids. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015 Feb;30(2):308-315. doi: 10.1111/jgh.12690. 査読有
  11. Higashijima J, Shimada M, Iwata T, Yoshikawa K, Nakao T, Nishi M, Kashihara H, Takasu C. New ports placement in laparoscopic central lymph nodes dissection with left colic artery preservation for sigmoid colon and rectal cancer. *J Med Invest*. 2015;62(3-4):223-227. doi: 10.2152/jmi.62.223. 査読有
  12. Batsaikhan BE, Yoshikawa K, Kurita N, Iwata T, Takasu C, Kashihara H, Shimada M. Cyclopamine decreased the expression of Sonic Hedgehog and its downstream genes in colon cancer stem cells. *Anticancer Res*. 2014 Nov;34(11):6339-6344. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cyclopamine+decreased+the+expression+of+Sonic+Hedgehog+and+its+downstream+genes+in+colon+cancer+stem+cells>. 査読有
  13. Kashihara H, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Sato H, Yoshikawa K, Higashijima J, Chikakiyo M, Nishi M, Matsumoto N. CD133 expression is correlated with poor prognosis in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2014 Sep;61(134):1563-1567. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25436343> 査読有
  14. Matsumoto N, Yoshikawa K, Shimada M, Kurita N, Sato H, Iwata T, Higashijima J, Chikakiyo M, Nishi M, Kashihara H, Takasu C, Eto S, Takahashi A, Akutagawa M, Emoto T. Effect of light irradiation by light emitting diode on colon cancer cells. *Anticancer Res*. 2014 Sep;34(9):4709-4716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Effect+of+light+irradiation+by+light+emitting+diode+on+colon+cancer+cells>. 査読有
  15. Yoshikawa K, Shimada M, Kurita N, Sato H, Iwata T, Higashijima J, Chikakiyo M, Nishi M, Kashihara H, Takasu C, Matsumoto N, Eto S. Hybrid technique for laparoscopic incisional ventral hernia repair combining laparoscopic primary closure and mesh repair. *Asian J Endosc Surg*. 2014 Aug;7(3):282-285. doi: 10.1111/ases.12113. 査読有
  16. Batsaikhan BE, Yoshikawa K, Kurita N, Iwata T, Takasu C, Kashihara H, Shimada M. Expression of Stathmin1 in gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2014 Aug;34(8):4217-4221.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Expression+of+Stathmin1+in+gastric+adenocarcinoma.+Anticancer+Res.> 査読有
17. Kashiwara H, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Sato H, Yoshikawa K, Miyatani T, Takasu C, Matsumoto N, Ishibashi H. Duodenal-jejunal Bypass Improves Insulin Resistance by Enhanced Glucagon-Like Peptide-1 Secretion Through Increase of Bile Acids. *Hepatogastroenterology*. 2014 Jun; 61(132):1049-1054.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Duodenal-Jejunal+Bypass+Improves+Insulin+Resistance+by+Enhanced+Glucagon-Like+Peptide-1+Secretion+Through+Increase+of+Bile+Acids.> 査読有
18. Yoshikawa K, Shimada M, Kurita N, Sato H, Iwata T, Higashijima J, Chikakiyo M, Nishi M, Kashiwara H, Takasu C, Matsumoto N, Eto S. Characteristics of internal hernia after gastrectomy with Roux-en-Y reconstruction for gastric cancer. *Surg Endosc*. 2014 Jun; 28(6):1774-1778. doi:10.1007/s00464-013-3384-7. 査読有
19. Kashiwara H, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Nishioka M, Morimoto S, Yoshikawa K, Miyatani T, Mikami C. Comparisons of inflammatory cytokines expressions in drain after laparoscopic versus open surgery. *Hepatogastroenterology*. 2014 Mar-Apr; 61(130):379-381.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Comparisons+of+inflammatory+cytokines+expressions+in+drain+after+laparoscopic+versus+open+surgery.> 査読有
20. Batsaikhan BE, Kurita N, Iwata T, Sato H, Yoshikawa K, Takasu C, Kashiwara H, Matsumoto N, Ishibashi H, Shimada M. The role of activation-induced cytidine deaminase expression in gastric adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2014 Feb; 34(2):995-1000.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511045> 査読有

〔学会発表〕(計1件)

1. がん幹細胞制御における Sonic Hedgehog signaling の役割 第101回消化器病学会総会 中尾 寿宏, 島田 光生, 吉川 幸造 2015年4月23-25日 仙

台国際センター (宮城県仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 幸造 (YOSHIKAWA, Kozo)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号: 80448331

(2) 研究分担者

坂東 良美 (BANDO, Yoshimi)  
徳島大学・病院・准教授  
研究者番号: 00238239

栗田 信浩 (KURITA, Nobuhiro)  
徳島大学・病院・特任教授  
研究者番号: 30335814

佐藤 宏彦 (SATO, Hirohiko)  
徳島大学・病院・特任助教  
研究者番号: 80609694