

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460948

研究課題名(和文)腸上皮化生粘膜におけるLgr5陽性細胞の解析

研究課題名(英文)Analysis of Lgr5-positive cells in the intestinal metaplasia

研究代表者

廣澤 拓也(Hirosawa, Takuya)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50570660

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)：胃粘膜の病的な分化異常である腸上皮化生は分化型胃癌の前癌病変である。胃粘膜の腸上皮化生粘膜、分化型胃癌において腸管粘膜の幹細胞マーカーであるLgr5が発現しているかを検討した。Cdx2トランスジェニックマウスとLgr5-EGFP-ires-CreERT2マウスを交配することにより腸上皮化生粘膜においてLgr5が発現していることを確認した。

3種類のマウス(Lgr5-EGFP-ires-CreERT2マウス、ROSA26-Loxp-stop-Loxp-LacZマウス、Cdx2トランスジェニックマウス)を交配し、Cdx2によってLgr5が誘導される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intestinal metaplasia is precancerous lesion of the stomach. We investigated the expression of Lgr5 in intestinal metaplasia and gastric carcinoma. By crossbreeding Cdx2-transgenic mouse and Lgr5-EGFP-ires-CreERT2 mouse, Lgr5-expression in intestinal metaplasia and gastric carcinoma was identified. By crossbreeding Lgr5-EGFP-ires-CreERT2-mouse, ROSA26-Loxp-stop-Loxp-LacZ-mouse, Cdx2-transgenic mouse, it was suggested that Lgr5 is induced by Cdx2.

研究分野：消化管

キーワード：Lgr5

1. 研究開始当初の背景

消化器臓器における幹細胞研究は近年急速に進展している領域であり、幹細胞特異的遺伝子の同定、増殖・分化制御の分子機構などが次々と明らかにされ、様々な疾患に於ける幹細胞制御の重要性も解明されつつある。このように組織特異的な幹細胞研究は再生医療の中で重要な位置を占めている。その中でも、腸粘膜上皮細胞の幹細胞研究が近年急速に進展してきている。ロイシンに富むオープンファン G 蛋白質共役受容体である Lgr5/Gpr49 は多能性と自己複製能を有する小腸陰窩底部の細胞を特異的にラベルする (Lgr5 陽性 CBC 細胞)。一方、胃粘膜の病的な分化異常に腸上皮化生がある。腸上皮化生はピロリ菌の感染の結果発生し、分化型胃癌の前癌病変であり、転写因子 Cdx2 が発現している。そして Cdx2 を胃粘膜に特異的に発現させることにより腸上皮化生粘膜が誘導されることは既に我々が作製した Cdx2 トランスジェニックマウスにより確認済みである。この腸上皮化生は分化型胃癌の前癌病変としても注目されている。一方、癌幹細胞の考え方が広がっている。癌組織においては無秩序な増殖と治療抵抗性の原因となる「癌幹細胞」の存在が明らかとなっている。従って幹細胞の増殖・分化制御機構を解明することは、再生医療への応用だけでなく新たな癌治療へと発展する可能性も同時に秘めている。以上のことを踏まえて、胃粘膜の腸上皮化生粘膜には腸管粘膜の幹細胞マーカーである Lgr5 が発現しているか、腸上皮化生粘膜を背景に発生する分化型胃癌と Lgr5 との関係がどのようになっているのかは非常に興味がある。

2. 研究の目的

以下の 2 つの基礎データ、つまり Cdx2 による腸上皮化生粘膜には Lgr5 陽性細胞が発現しており tracing により幹細胞であることが確認されたこと、さらに Lgr5 を胃粘膜に特異的に発現させるトランスジェニックマウスを作製することに成功したことをもとに、今回の研究目的は Cdx2 と Lgr5 との関係を明らかにすることである。さらに、Lgr5 は大腸癌との関係も報告されている。Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜からの分化型胃癌の発生における Lgr5 の関与も明らかにしていきたい。以上の目的のため、われわれの研究室で作製した Cdx2 トランスジェニックマウス、既にジャクソンから購入した Lgr5-EGFP-ires-CreERT2 マウスと ROSA26-Loxp-stop-Loxp-LacZ マウスを使用してこの研究期間内に Cdx2 と Lgr5 との関係を明らかにすることである。さらに、Lgr5 は大腸癌との関係も報告されている(文献 1,2)。Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜からの分化型胃癌の発生における Lgr5 の関与も明らかにしていきたい。以上の目的のため、われわれの

研究室で作製した Cdx2 トランスジェニックマウス、既にジャクソンから購入した Lgr5-EGFP-ires-CreERT2 マウスと ROSA26-Loxp-stop-Loxp-LacZ マウスを使用してこの研究期間内に Cdx2 と Lgr5 との関係を明らかにしていきたい。

3. 研究の方法

胃癌の前癌病変である腸上皮化生粘膜において腸幹細胞マーカー Lgr5 が発現しているという予備的データを得ているので、詳細な発現部位を明らかにする。さらに腸上皮化生粘膜の Lgr5 陽性の単一細胞から類器官 (organoids) が形成されるか否かを検討し腸上皮化生においても幹細胞であるか否かを明らかにする。次に胃粘膜に特異的に Lgr5 を発現する Lgr5 トランスジェニックマウスを作製し、胃粘膜の分化、増殖、発癌との関係を検討する。Cdx2 と Lgr5 のダブルトランスジェニックマウスを交配により作製し、腸上皮化生を基にする分化型胃癌の発生に対する Lgr5 の関与を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 腸上皮化生粘膜の上皮細胞には転写因子 Cdx2 が発現している

転写因子 Cdx2 は、本来は正常の腸管粘膜上皮に発現しており、正常腸管粘膜上皮細胞の発生や分化において重要な役割を演じている。ヒトの胃の腸上皮化生粘膜には、転写因子である Cdx2 が発現していることがわれわれを含め報告されている 1,2。

(2) 胃粘膜に Cdx2 を発現するトランスジェニックマウスは腸上皮化生を起こす

そこで、われわれは壁細胞に存在する H⁺/K⁺ ATPase の β subunit のプロモータを用いて胃粘膜に特異的に Cdx2 を発現させるトランスジェニックマウスを作成し、腸上皮化生を引き起こすことに成功した 3。

(3) 腸上皮化生粘膜では Shh の発現が抑制されている

腸上皮化生粘膜の誘導に転写因子 Cdx2 が主役を演じているが、腸上皮化生粘膜の発生におけるもう一つの疑問は、何故胃型の細胞が消失するのかであり、このことは腸上皮化生を考える上で極めて重要である。ヒトの腸上皮化生粘膜では胃の壁細胞の分化に関与する morphogen である Shh (sonic hedgehog) の発現が低下していることが報告されている 4。そこで Cdx2 トランスジェニックマウスの胃粘膜における Shh の発現を定量的 PCR で検討したところ Shh の発現は完全に抑制されていた。RNA レベルのみならず免疫組織染色においても正常胃粘膜の壁細胞に発現している Shh が、腸上皮化生粘膜では完全に消失していた。一方、Ihh (indian hedgehog) は正常胃粘膜と同様に発現がみられることから、この Shh の発現消失は正常胃粘膜上皮細胞が失われたためではないことがわかる。この Shh の発現低下の機序は Shh のプロモータ領域のメチル化によるものではなく、転写因子である Cdx2 が

Shh のプロモータ領域に存在するシスエレメントに結合することにより Shh の発現を低下させていることが確かめられた 5。

(4)腸上皮化生粘膜では Sox2 の発現には変化がない

胃粘膜上皮細胞の分化に Sox2 も関与している。ヒトの *H. pylori* 感染胃粘膜では *Cdx2* の上昇とともに Sox2 が低下し、除菌により *Cdx2* の低下と Sox2 の増加が報告されている。そこで、*Cdx2* トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜での Sox2 の発現を検討したところ、Sox2 の発現は低下していなかった 6。しかし、胃型の上皮細胞の粘液である Muc5Ac の発現は完全に抑制されていた。一方、腸粘膜上皮細胞に発現している alkaline phosphatase の発現が腸上皮化生粘膜で認められた。Sox2 により転写の制御を受けている Muc5Ac の転写活性を検討したところ、Sox2 により転写活性は増加したが *Cdx2* により転写活性が抑制されることがわかった。このことより、胃型上皮細胞の粘液である Muc5Ac の発現抑制は Sox2 の発現の低下によるのではなく *Cdx2* による転写の抑制であることが明らかになった。

(5)*Cdx2* トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜から分化型胃癌が発生する

胃癌、とくに分化型胃癌の背景粘膜に腸上皮化生を伴う萎縮性胃炎が高率に認められることから、萎縮性胃炎が分化型胃癌の発生源地であると考えられてきた。しかし、分化型胃癌が腸上皮化生粘膜から直接発生したと断定することは従来の疫学的研究や病理学的な研究からはむずかしいと考えられる。さらに、慢性萎縮性胃炎の原因として *H. pylori* を念頭におくとき、腸上皮化生を示す粘膜には *H. pylori* 感染を認めないという事実は、腸上皮化生の発生には *H. pylori* は極めて重要な役割を演じているが、腸上皮化生からの発癌は *H. pylori* とは直接関係なく、腸上皮化生粘膜自体が高分化型胃癌の前癌病変である可能性を強く示唆している。そこで、我々の作成した *Cdx2* トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜から胃癌が発生するか否かを検討した 17。従来の動物を用いた発癌実験では

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) といった発癌剤や *H. pylori* を用いており、腸上皮化生からの発癌を直接証明することは不可能である。そこで *Cdx2* トランスジェニックマウスを MNNG も *H. pylori* も用いることなく 100 週齢まで観察したところ、肉眼的に認められるポリープが発生した。組織学的に、このポリープは固有筋層に浸潤する進行癌であり、高分化型腺癌であることが確認された。*Cdx2* トランスジェニックマウスからの発癌は腸上皮化生粘膜自体が胃の高分化型腺癌の発生源地であることを証明している。

(6)腸上皮化生粘膜と胃癌における *Lgr5* の発現

消化器臓器における幹細胞研究は近年急速に進展している領域であり、幹細胞特異的遺伝子の同定、増殖・分化制御の分子機構などが次々と明らかにされ、様々な疾患に於ける幹細胞制御の重要性も解明されつつある。このように組織特異的な幹細胞研究は再生医療の中で重要な位置を占めている。その中でも、腸粘膜上皮細胞の幹細胞研究が近年急速に進展してきている。ロイシンに富むオフファン G 蛋白質共役受容体である

Lgr5/Gpr49 は多能性と自己複製能を有する小腸陰窩底部の細胞を特異的にラベルする (*Lgr5* 陽性 CBC 細胞)。一方、胃粘膜の病的な分化異常である腸上皮化生はピロリ菌の感染の結果発生し、分化型胃癌の前癌病変である。一方、癌幹細胞の考え方が広がっている。癌組織においては無秩序な増殖と治療抵抗性の原因となる「癌幹細胞」の存在が明らかとなっている。従って幹細胞の増殖・分化制御機構を解明することは、再生医療への応用だけでなく新たな癌治療へと発展する可能性も同時に秘めている。以上のことを踏まえて、胃粘膜の腸上皮化生粘膜には腸管粘膜の幹細胞マーカーである *Lgr5* が発現しているか、腸上皮化生粘膜を背景に発生する分化型胃癌と *Lgr5* との関係がどのようになっているのかを検討した。*Cdx2* トランスジェニックマウスと *Lgr5*-EGFP-ires-CreERT2 マウスを交配することにより、*Cdx2* トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜において腸管上皮幹細胞マーカー遺伝子である *Lgr5* が発現していることを EGFP 陽性細胞として確認した。つまり腸粘膜上皮細胞の幹細胞マーカーである *Lgr5* が *Cdx2* により形成された腸上皮化生粘膜に発現していることになる。

(7)*Cdx2* と *Lgr5* の関係

3 種類のマウス (*Lgr5*-EGFP-ires-CreERT2 マウス、ROSA26-Loxp-stop-Loxp-LacZ マウス、*Cdx2* トランスジェニックマウス) を交配し、tamoxifen の誘導により *Lgr5* 陽性細胞に LacZ を発現させ tracing を行ったところ、tamoxifen 投与 2 週間後には LacZ 陽性細胞が腸上皮化生粘膜の腺管に確認された。従来、腸粘膜上皮細胞では *Lgr5* 陽性幹細胞が存在し、*Cdx2* により腸粘膜への分化が誘導されると考えられてきた。しかし、*Cdx2* によって誘導される腸上皮化生粘膜における *Lgr5* の発現と tracing の実験の結果は、*Cdx2* によって幹細胞マーカーである *Lgr5* が誘導される可能性を示唆している。あるいは、従来、腸幹細胞マーカーと言われてきた *Lgr5* が幹細胞に極めて近い細胞のマーカーであるが幹細胞マーカーではない可能性も存在する。

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 5 件)

Sakamoto H, Asahara T, Chonan O,

Yuki N, Mutoh H, Hayashi S, Yamamoto H, Sugano K. Comparative analysis of gastrointestinal microbiota between normal and caudal-related homeobox 2 (cdx2) transgenic mice. *Intest Res.* 2015;13:39-49.

Mutoh H, Sashikawa M, Sakamoto H, Tateno T. Cyclooxygenase 2 in gastric carcinoma is expressed in doublecortin and CaM kinase-like-1-positive tuft cells. *Gut Liver.* 2014;8:508-18.

Wada M, Lefor AT, Mutoh H, Yano T, Hayashi Y, Sunada K, Nishimura N, Miura Y, Sato H, Shinhata H, Yamamoto H, Sugano K. Endoscopic ultrasound with double-balloon endoscopy in the evaluation of small-bowel disease. *Surg Endosc.* 2014;28:2428-36.

Sakamoto H, Mutoh H, Miura Y, Sashikawa M, Yamamoto H, Sugano K. SOX9 Is Highly Expressed in Nonampullary Duodenal Adenoma and Adenocarcinoma in Humans. *Gut Liver.* 2013;7:513-8.

Fujii Y, Yoshihashi K, Suzuki H, Tsutsumi S, Mutoh H, Maeda S, Yamagata Y, Seto Y, Aburatani H, Hatakeyama M. CDX1 confers intestinal phenotype on gastric epithelial cells via induction of stemness-associated reprogramming factors SALL4 and KLF5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:20584-9.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣澤拓也 (Takuya Hirosawa)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50570660

(2)研究分担者

武藤弘行 (Hiroyuki Mutou)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50322392

坂本博次 (Hirotougu Sakamoto)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50536175