

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：32666
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590796
 研究課題名（和文） MCP-1 を介した間葉系幹細胞による胃癌組織へのホーミング分子機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of homing system for bone marrow derived cells into gastric cancer tissues through MCP-1 stimulation

研究代表者
 二神 生爾 (FUTAGAMI SEIJI)
 日本医科大学・医学部・助教
 研究者番号：50247011

研究成果の概要（和文）：

胃癌組織内において CD133, CD44 陽性細胞の局在を確認するとともに、CD133+/CD44+陽性細胞が胃癌組織内に遊走していることを確認した。また、ヒト胃癌患者の腹水中にも CD133+/CD44+陽性細胞が遊走しており、MCP-1 によって、遊走が制御されていることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We conformed that CD133-/CD44-positive cells were migrated into the gastric cancer tissues. In addition, we found that CD133-/CD44-positive cells infiltrated in the ascites of the patients with advanced gastric cancer tissues. MCP-1 significantly inhibited the migration of these cells using migration assay.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：Bone marrow derived cells, MCP-1, migration, CD133-/CD44-positive cell

1. 研究開始当初の背景

H. pylori 感染によって消化管上皮から C-Cケモカインである MCP-1 が産生され、この消化管上皮由来の MCP-1 によって粘膜内 Tcell 由来の COX-2 が誘導されることを見出した (Futagami S, et al. Gut, 2003, 52, 1257)。一方で、最近の報告では骨髄由来細胞が SPEM のような幽門腺化生様の化生性粘膜にホーミングするメカニズムは全く不

明である。我々は今回胃癌組織にも間葉系幹細胞がホーミングしているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

今回の検討では、①胃癌患者において、骨髄由来幹細胞は胃癌組織局所にホーミングするのかという点、さらには②骨髄由来間葉系細胞が胃癌組織へホーミングするメカニズムを解明すること、特に胃癌組織で産生され

ている MCP-1/CCR2 を介して骨髄由来間葉系幹細胞がホーミングするメカニズムを明らかにすること。③現在胃癌の幹細胞様性質を持つ集団として SP 細胞と呼ばれる細胞集団の腫瘍形成能が高いと報告されているが、胃癌 cell-line 由来 SP 細胞の培養上清と胃癌 cell-line 培養上清による間葉系幹細胞への刺激を比較し、両者の間葉系幹細胞への遊走能への比較検討することも、目的としている。

3. 研究の方法

胃癌組織内に間葉系幹細胞がホーミングしていることを免疫染色法を用いて確認する。胃癌組織から分離した胃癌細胞および胃癌組織由来の SP 細胞、胃癌の cell-line である MKN-28, MKN-45, KATO-III 細胞のそれぞれの培養上清を用いて、骨髄液から分離した間葉系幹細胞に対して遊走能があるのか、migration assay を用いて評価する。さらには、各種サイトカインに対する中和抗体を用いることで、migration に最も影響を及ぼしているマスターサイトカインを検討する。具体的には、胃癌組織からの胃癌細胞およびSP細胞の培養：

外科的に切除された胃癌組織を以下の方法に基づき分離、培養する。

- ① 切除した胃癌組織の一部を PBS で洗浄する。
 - ② 洗浄後の胃癌組織を 1mol/L dithiothreitol (Sigma)/RPMI で室温 15 分間インキュベーションする。
 - ③ PBS で 3 回洗浄したあと、3mg/mL の dispase/RPMI により 30 分間 37 度でインキュベーションする。
- さらに、Hoechst 33342 を 5 μ g/ml の濃度でラベルし、37 度で 70-90 分インキュベーションしたあと、胃癌組織由来の SP 細胞として FACS can によって分離する。

胃癌細胞の培養・継代：

ヒト胃癌細胞の cell-line である MKN-28, MKN45, KATO-III を培養する。

胃癌cell-line由来のSP細胞の分離：

ヒト胃癌細胞の cell-line である、MKN-28, MKN-45, KATO-III に対して Hoechst 33342 を 5 μ g/ml の濃度でラベルする。37 度で 70-90 分インキュベーションした後、FACSscan で分離する。

骨髄由来間葉系幹細胞の分離：

書面でインフォームド・コンセントを得た患者から骨髄穿刺を行う。骨髄液を既報に従い、12-14 日間培養を行い、非接着性細胞群を取り除いたうえで、percoll gradient で分離す

る。この細胞分画を Strol, CD105, CD90, HLA-ABC, CD44 陽性細胞を含み、CD45, HLA-DR, CD11b はいずれも陰性である細胞群を FACSscan を用いて分離し、培養を行う。

胃癌組織における間葉系幹細胞の確認：

胃癌組織を dispase などを用いて FACSscan を用いて上記同様の抗体を用いて、分離できることを確認する。活性化した間葉系幹細胞は抗 α -SMA 抗体、抗 FSP 抗体、抗 vimentin 抗体で強染色されるという報告を参考にする。

骨髄由来幹細胞遊走能の検討：

Transwell membrane (pore size 8 μ m) を用いて

上段の well には

- ① 非刺激の間葉系幹細胞 (2X10⁴) もしくは
- ② 刺激した間葉系幹細胞 (2X10⁴) を入れる。

下段の検討 well には

- ① ヒト胃癌細胞の培養上清
 - ② 胃癌の cell-line である MKN-28, MKN-45, KATO-III の培養上清
 - ③ ヒト胃癌組織由来 SP 細胞の培養上清
 - ④ 胃癌の cell-line (MKN-28, MKN-45, KATO-III) 由来 SP 細胞の培養上清
- をおき、18 時間のインキュベーション後に migration してきた間葉系幹細胞数をカウントし、評価する。

4. 研究成果

我々は幹細胞マーカーの一つである CD44 および CD133 陽性細胞の局在を検討してきた。我々の検討によれば、胃癌組織において両者の陽性細胞は多数認められ、また CD44 陽性、CD133 陽性細胞が胃癌組織中に存在していることも確認できた。

こうした、事実は胃癌組織内に癌幹細胞と考えられる細胞が確かに存在していることを裏付けるものである。同時に我々は、胃癌の増殖や血管新生と深く関わっている COX-2 の発現レベルと CD44, CD133 陽性細胞が相関していることも確認している。我々は H. pylori 感染 MNU 投与胃癌モデル (スナネズミモデル) を用いて、誘導された胃癌組織中に CD133 陽性細胞が存在していることを確認した (Futagami S, et al. Celecoxib inhibits CD133-positive cell migration via reduction of CCR2 in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils. Digestion, 2010, 81, 193-203) が、今回の知見は実験モデル同様に、ヒトにおいても、CD44+/CD133+ 細胞が胃癌の進展過程に関与している可能性を示すものと考えられる。我々はこうした癌幹細胞が胃癌進展に重要な役割を演じていると考えており、この幹

細胞のホーミングについても現在検討を続けている。我々の検討によれば、CD44+/CD133+細胞は種々のサイトカインIL-1 β 、VEGF、SDF等によって遊走が制御されているわけでないことがわかった。Transwell membraneを用いたmigration assayを行ったところ、これらの中和抗体によっても必ずしも抑制されないことが判明した。

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 10 件) 全て査読有

1. Futagami S, et al. Nizatidine improves clinical symptoms and gastric emptying in the patients with functional dyspepsia accompanying with impaired gastric emptying. *Digestion*, in press.
2. Shimpuku M, Futagami S, Kawagoe T, Nagoya H, Shindo T, Horie A, Kodaka Y, Itoh T, Sakamoto C. G-protein $\beta 3$ subunit 825CC genotype is associated with postprandial distress syndrome with impaired gastric emptying and with the feeling of hunger in Japanese. *Neurogastroenterol Motil*, 23, 2011, 1073-1080. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01781.x.
3. Futagami S, Shimpuku M, Yin Y, Shindo T, Kodaka Y, Nagoya H, Nakazawa S, Fujimoto M, Izumi N, Ohishi N, Kawagoe T, Horie A, Iwakiri K, Sakamoto C. Pathophysiology of functional dyspepsia. *J Nihon Med Sch*, 78, 2011, 9, 280-285. Doi: 10.1272/jnms.78.280
4. Kusunoki M, Miyake K, Shindo T, Ueki N, Kawagoe T, Gudis K, Futagami S, et al. The incidence of deep vein thrombosis in Japanese patients undergoing endoscopic submucosal dissection. *Gastrointest Endosc*, 74, 2011, 798-804. Doi: 10.1016/j.gie.2011.06.015
5. Iwakiri K, Kawami N, Sano H, Tanaka Y, Umezawa M, Futagami S, et al. The effects of nizatidine on transient lower esophageal sphincter relaxations (TLESRs) and acid reflux in healthy subjects. *J Smooth Muscle Res*, 47, 2011, 157-166. Doi:10.1540/jsmr.47.157
6. Iwakiri K, Sano H, Tanaka Y, Kawami N, Umezawa M, Futagami S, et al. Characteristics of symptomatic reflux episodes in patients with non-erosive reflux disease who have a positive symptom index on proton pump inhibitor therapy. *Digestion*. 2010. 82(3):156-61 DOI: 10.1159/000309483
7. Futagami S, Shindo T, Kawagoe T, Horie A, Shimpuku M, Gudakamoto C. Migration of eosinophils and CCR2-/CD68-double positive cells into the duodenal mucosa of patients with postinfectious functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol*, 105, 1835-1842, 2010. doi:10.1038/ajg.2010.151
8. Futagami S, Hamamoto T, Shimpuku M, Nagoya H, Kawagoe T, Horie A, Shindo T, Gudis K, Sakamoto C. Celecoxib inhibits CD133-positive cell migration via reduction of CCR2 in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Digestion*, 2010, 81, 193-203. DOI: 10.1159/000252790
9. Futagami S, Iwakiri K, Shindo T, Kawagoe T, Horie A, Shimpuku M, Tanaka Y, Kawami N, Gudis K, Sakamoto C. The prokinetic effect of mosapride citrate combined with omeprazole therapy improves clinical symptoms and gastric emptying in PPI-resistant NERD patients with delayed gastric emptying. *J Gastroenterol*, 45, 413-421, 2010. DOI: 10.1007/s00535-009-0173-0
10. 新福摩弓, 二神生爾, 北村忠弘, 坂本長逸 機能性ディスぺプシアの病態生理 胃排出能と遺伝子多型 日本臨床生理学会雑誌, 41, 87-93, 2011

[学会発表] (計 8 件)

1. 名児耶浩幸, 二神生爾、河越哲郎、小高康裕、新福摩弓、他 食道癌組織における Apurinic/aprimidinic endonuclease-1 発現意義の解析 第8回日本消化管学会総会 2012年2月10日、仙台
2. 二神生爾、新福摩弓、坂本長逸 機能性ディスぺプシア患者における空腹感スコアと ghrelin, preproghrelin の遺伝子多型との相関関係の解析 第8回日本消化管学会総会 2012年2月10日、仙台
3. Kodaka Y, Futagami S, et al. Celecoxib inhibits CD133-positive cell migration via reduction of CCR2 in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Digestive Disease Week*, 2011.5.7~5.10, Chicago, USA
4. Futagami S, Shimpuku M, Kodaka Y, et al.

Nizatidine administration improves clinical symptoms and gastric emptying of the patients with functional dyspepsia accompanying with impaired gastric emptying. Digestive Disease Week, 2011.5.7, Chicago, USA

5. Futagami S, Shimpuku M, Kawagoe T, Kusunoki M, et al. Migration of eosinophils and CCR2-/CD68-double positive cells into the duodenal mucosa of patients with post-infectious functional dyspepsia. Digestive Disease Week, 2011.5.7, Chicago, USA
6. 名児耶浩幸、二神生爾、河越哲郎、小高康裕、新福摩弓、他.
食道癌組織における apurinic/aprimidinic endonuclease-1(APE-1)発現の解析
第97回日本消化器病学会, 2011年5月14日、東京
7. 小高康裕、二神生爾、河越哲郎、名児耶浩幸、新福摩弓、他
H. pylori 陽性胃炎患者に対する COX-2 遺伝子多型を用いたハイリスク群の絞り込みの検討
第97回日本消化器病学会, 2011年5月14日、東京
8. 二神生爾、新福摩弓、坂本長逸
感染後 FD 患者における十二指腸粘膜局所の炎症細胞浸潤と胃排出能の解析
第97回日本消化器病学会, 2011年5月14日、東京
二神生爾、他. H. pylori胃癌モデルおよびヒト胃癌組織におけるCD133 陽性細胞発現の検討 第16回日本ヘリコバクター学会、京都、2010年、6月24日

〔図書〕(計 2件)

1. 新福摩弓、二神生爾、坂本長逸.
FD 診察 Q&A、25-32 ページ
日本医事新報社 2011年 160 ページ
編集：本郷道夫
2. 二神 生爾
症候群ハンドブック
腹腔動脈圧迫症候群： 277 ページ
Ladd 症候群： 285 ページ
中山書店 2011年.757 ページ
編集：井村裕夫

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二神 生爾 (FUTAGAMI SEIJI)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：50247011

(2) 研究分担者

坂本 長逸 (SAKAMOTO CHOITSU)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号：30196092