

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590919

研究課題名(和文)ヘリコバクター感染胃癌マウスにおける骨髄由来細胞とインターロイキン17の役割

研究課題名(英文)The role of bone marrow-derived cells and interleukin-17 in the mouse model of Helicobacter-infected gastric cancer

研究代表者

高石 繁生 (Takaishi, Shigeo)

九州大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：20596829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ガストリン/CCK2受容体は、マウス胃前庭部に存在する胃粘膜上皮幹細胞のマーカーであることが判明し、この幹細胞は主に基底部から4番目に位置しており、基底部に存在することが既に報告されているLgr5陽性幹細胞とは異なる細胞集団である。

ガストリン前駆体であるプロガストリンは、Lgr5陰性細胞を陽性細胞へ変換することにより、発癌物質メチルニトロソウレア投与にて生じるマウス胃前庭部発癌に寄与しており、このシグナルを阻害することにより胃前庭部発癌を抑制できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found that gastrin/CCK2-receptor (CCK2R) defines antral stem cells at position +4, which overlapped with an Lgr5 negative or low cell population but was distinct from typical antral Lgr5 high stem cells. Treatment with progastrin interconverts Lgr5 negative or low, CCK2R positive cells into Lgr5 high cells, increases CCK2R positive cell numbers and promotes gland fission and carcinogenesis in response to the chemical carcinogen MNU. Pharmacological inhibition or genetic ablation of CCK2R attenuated progastrin-dependent stem cell expansion and carcinogenesis.

In summary, CCK2R labels +4 antral stem cells that can be activated and expanded by progastrin, thus identifying one hormonal trigger for gastric stem cell interconversion and a potential target for gastric cancer chemoprevention and therapy.

研究分野：消化器病態学(消化器癌の発癌機構)

キーワード：胃発癌マウス 胃前庭部上皮幹細胞 Lgr5陽性細胞 ガストリン/CCK2受容体 プロガストリン ヘリコバクター菌感染 発癌物質メチルニトロソウレア CCK2受容体阻害薬YF476

1. 研究開始当初の背景

ヒト胃癌の70%はヘリコバクターピロリ菌感染が原因と推測されており、最近の研究により、ピロリ菌による胃発癌や腸炎由来の大腸癌などのように、慢性炎症に由来する発癌において、各種の炎症性サイトカインや消化管ホルモンが発癌に寄与していることを示唆する結果が相次いで報告されるようになったが、それらの発癌に関わる詳細な分子機構は依然として解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ピロリ菌感染などの慢性炎症に由来する胃発癌において、消化管ホルモンで細胞成長因子の役割を持つガストリンと、胃粘膜上皮幹細胞の相互作用を詳細に解析することにより、胃発癌におけるガストリンの役割の具体的な分子メカニズムを解明すること、およびその結果に基づいて、より効果的な新規治療法を開発することである。

3. 研究の方法

各種の遺伝子改変マウス(詳細は4.研究成果を参照)に、ヘリコバクターフェリス菌を感染、あるいは、発癌物質メチルニトロソウレアを飲用させることにより、胃粘膜上皮細胞を癌化させて、発癌に伴う各種の遺伝子発現の変化を時系列的に解析する。加えて、ガストリン受容体阻害薬をこれらのマウスに投与することにより、発癌が抑制されるかどうかを検証する。

4. 研究成果

1) ガストリン/CCK2 受容体は、マウス胃前庭部に存在する胃粘膜上皮幹細胞のマーカ―である

ガストリン/CCK2 受容体(以下 CCK2 受容体と略称)を発現する細胞が、マウス胃前庭部の胃粘膜上皮細胞の幹細胞であるかどうかを検証するため、CCK2 受容体プロモーター下に CreERT 組み換え酵素を発現するトランス

ジェニックマウス(以下 CCK2R-CreERT マウスと略称)を用いた。このマウスを、レポーターマウス(Rosa26 プロモーター下に loxP -STOP -loxP 配列と赤色蛍光色素遺伝子 TdTomato を組み込んだトランスジェニックマウス、以下 Rosa26 -TdTomato マウスと略称)と掛け合わせて、その複合マウスの胃前庭部において CCK2 受容体を発現する細胞の系譜追跡(lineage trace)実験を施行した。

上記の2種類のマウスを交配させ、タモキシフェン投与10日後および6か月・12か月後にマウス胃前庭部を観察したところ、胃前庭部のすべての胃粘膜上皮細胞が赤色蛍光色素を発現していた。(図1参照) これらの細胞の中には、ピット細胞(TFF1 陽性)、G細胞(ガストリン陽性)、D細胞(ソマトスタチン陽性)、タフト細胞(Dclk-1 陽性)など、すべての種類の胃粘膜上皮細胞が含まれており CCK2 受容体陽性細胞から発生・分化したことが示された。すなわち CCK2 受容体は胃粘膜上皮幹細胞のマーカ―であることが証明された。

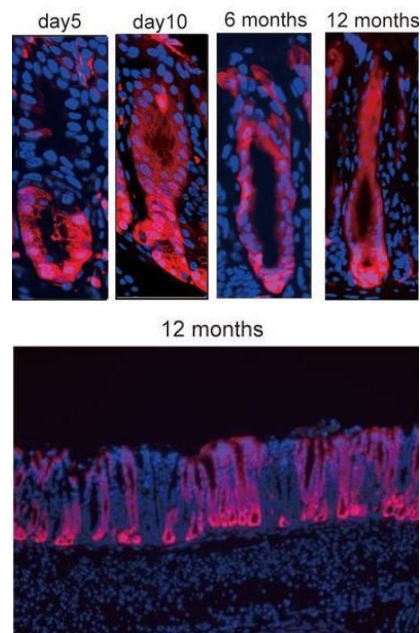


図1: CCK2 受容体陽性細胞の系譜追跡(lineage trace)実験。マウス胃前庭部において、胃粘膜上皮細胞のほぼ全部が赤色蛍光色素を発現

4. 研究成果 (続き)

2) 上記の幹細胞は底部から上に4番目の位置を中心に存在し、既に報告されている Lgr5 陽性幹細胞とは異なる細胞集団である

Lgr5 陽性細胞は、マウス胃前庭部の胃粘膜上皮幹細胞であることが既に報告されている。そこで、1)において得られた CCK2 受容体陽性幹細胞との関係を調べるために、Lgr5 プロモーター下に緑色蛍光色素 GFP を発現するトランスジェニックマウス (以下、Lgr5-GFP マウスと略称) の胃前庭部を解析した。その結果、Lgr5 陽性幹細胞は、既知のとおり、主として胃底腺の底部に存在するのに対して、CCK2 受容体陽性幹細胞は主として、底部から上に4番目の位置を中心に存在することが判明し、両者は重複せず異なる細胞集団であることが判明した。(図2参照)

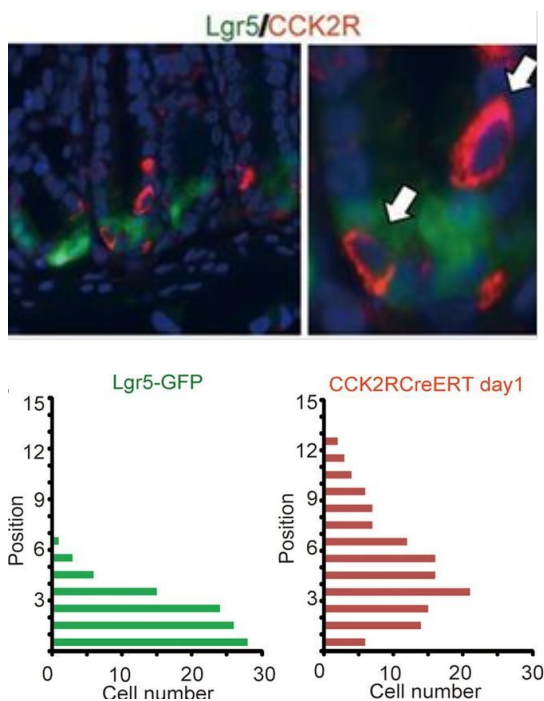


図2: Lgr5 陽性幹細胞と CCK2 受容体陽性幹細胞は、胃底腺の異なる位置に存在しており、別々の細胞集団である。

3) CCK2 受容体陽性幹細胞を、ガストリン前駆体であるプロガストリンにより刺激すると、Lgr5 陰性幹細胞が Lgr5 陽性幹細胞へ変換される

マウスの体内 (in vivo) で、ガストリン前駆体であるプロガストリンにより CCK2 受容体陽性幹細胞を刺激したときに起こる変化を解析するために、プロガストリン高発現トランスジェニックマウス (以下 hGAS マウスと略称) を Lgr5-GFP マウスと交配させて、胃前庭部を解析した。その結果、CCK2 受容体陽性 (= Lgr5 陰性) 幹細胞が Lgr5 陽性となり、Lgr5 陽性幹細胞の集団が拡大することが判明した。(図3参照)

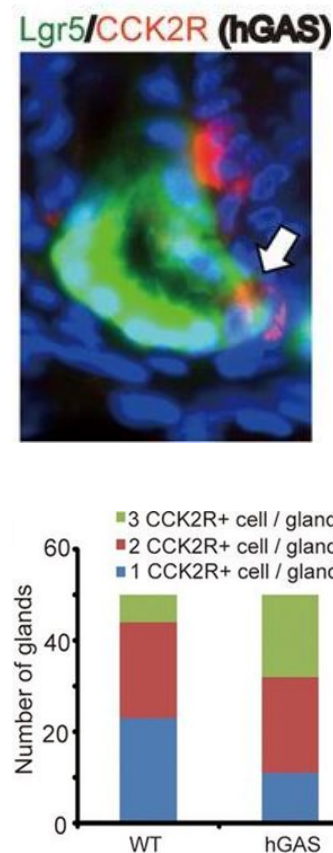


図3: プロガストリンにより CCK2 受容体陽性幹細胞を刺激すると、CCK2 受容体陽性 (= Lgr5 陰性) 幹細胞が Lgr5 陽性となり、Lgr5 陽性幹細胞の集団が拡大する。

4. 研究成果 (続き)

4) 発癌物質メチルニトロソウレア投与にて生じるマウス胃前庭部の胃底腺の融合は、プロガストリン刺激により増大する

マウス胃前庭部の発癌において、プロガストリン刺激が及ぼす影響を解析するため、Lgr5-GFP マウスおよび Lgr5-GFP x hGAS 複合マウスに発癌物質メチルニトロソウレア (MNU) を投与し、3 か月後にそれぞれの胃前庭部を解析した。その結果、Lgr5-GFP x hGAS 複合マウスの胃前庭部には胃底腺の融合がより高率に生じることが判明した。(図 4 参照)

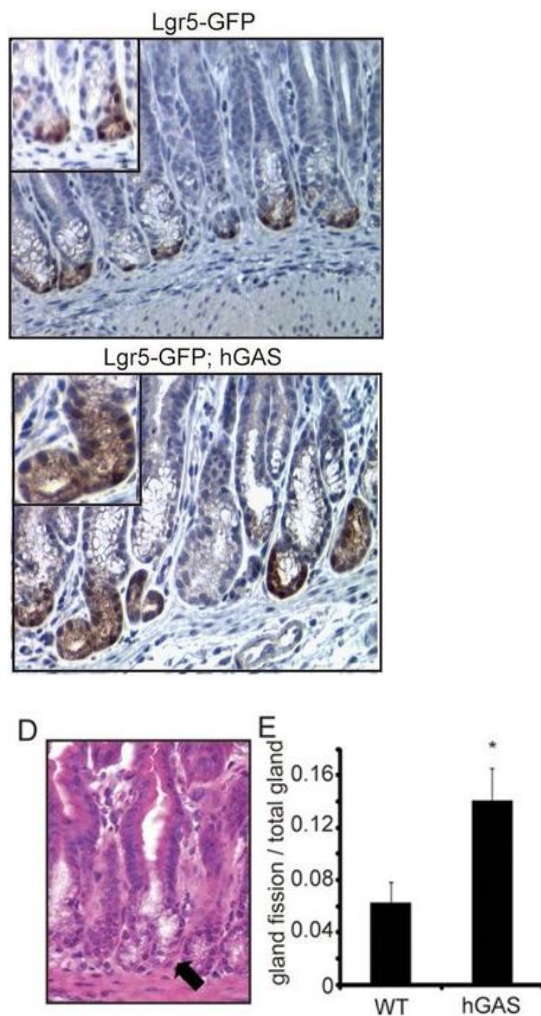


図 4 :Lgr5-GFP マウスおよび Lgr5-GFP x hGAS 複合マウスに発癌物質メチルニトロソウレア (MNU) を投与し、3 か月後にそれぞれの胃前庭部を解析したところ、Lgr5-GFP x hGAS 複合マウスの胃前庭部には胃底腺の融合がより高率に生じた。

5) プロガストリン-CCK2 受容体のシグナルを阻害することにより、マウス胃前庭部に生じる胃底腺の融合を抑制することが可能である

プロガストリン-CCK2 受容体のシグナルを阻害することにより、胃底腺の融合が抑制されるかどうかを検証するために、Lgr5-GFP マウスおよび Lgr5-GFP x hGAS 複合マウスを、それぞれ CCK2 受容体ノックアウトマウスと交配させて MNU を投与した。3 か月後にそれぞれの胃前庭部を解析したところ、胃底腺の融合が抑制されることが判明した。(図 5 参照)

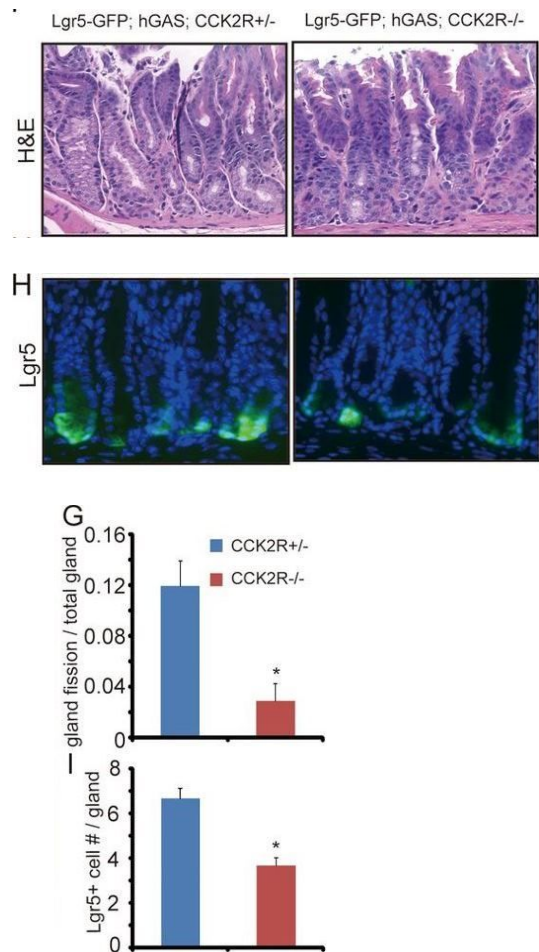


図 5 : CCK2 受容体ノックアウトマウスと交配させて MNU を投与すると、胃前庭部に生じる胃底腺の融合が抑制された。

4. 研究成果 (続き)

6) プロガストリンはマウス胃前庭部の発癌を促進させるが、CCK2 受容体阻害薬を投与することにより発癌を抑制することが可能である

Lgr5-GFP マウスおよび Lgr5-GFP x hGAS 複合マウスに、ヘリコバクターフェリス菌を感染させ、かつ MNU を投与して 36 週間後に胃前庭部を解析したところ、共に胃前庭部に癌が生じたが、Lgr5-GFP x hGAS 複合マウスの胃前庭部には、より多くの、そしてより大きい腫瘍が形成された。

これらのマウスに、CCK2 受容体阻害薬である YF476 を投与したところ、腫瘍の数およびサイズが共に減少した。(図 6 参照)

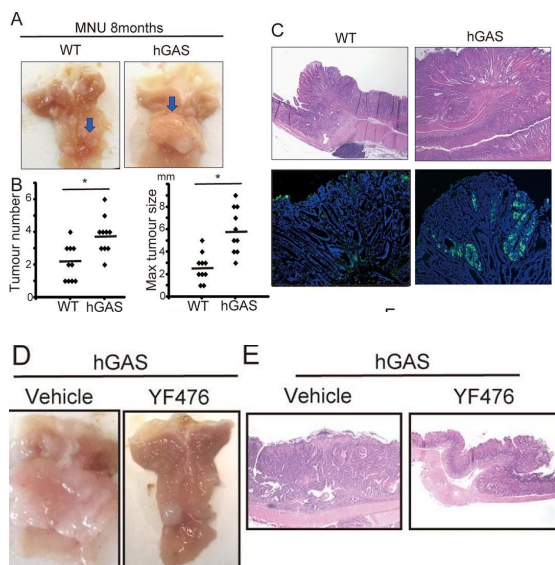


図 6: Lgr5-GFP マウスおよび Lgr5-GFP x hGAS 複合マウスに、ヘリコバクターフェリス菌を感染させ、かつ MNU を投与したところ、36 週間後にどちらのマウスの胃前庭部にも癌が生じたが、腫瘍の数とサイズは後者のマウスでより高値であった。これらのマウスに CCK2 受容体阻害薬 YF476 を投与したところ、腫瘍の数およびサイズが共に減少した。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7 件、すべて査読あり)

1. Hayakawa Y, Jin G, Wang H, Chen X, Westphalen CB, Asfaha S, Renz BW, Ariyama H, Dubeykovskaya ZA, Takemoto Y, Lee Y, Muley A, Tailor Y, Chen D, Muthupalani S, Fox JG, Shulkes A, Worthley DL, Takaishi S, Wang TC. CCK2R identifies and regulates gastric antral stem cell states and carcinogenesis. *Gut*. 2015 Apr; 64(4), p544-553. doi:10.1136/gutjnl-2014-307190.

2. Baird M, Woon Ang P, Clark I, Bishop D, Oshima M, Cook MC, Hemmings C, Takaishi S, Worthley D, Boussioutas A, Wang TC, Taupin D. The unfolded protein response is activated in Helicobacter-induced gastric carcinogenesis in a non-cell autonomous manner. *Lab Invest*. 2013;93(1):112-122. doi: 10.1038/labinvest.2012.131.

3. Ramanathan V, Jin G, Westphalen CB, Whelan A, Dubeykovskiy A, Takaishi S, Wang TC. P53 gene mutation increases progastrin dependent colonic proliferation and colon cancer formation in mice. *Cancer Invest*. 2012;30(4):p275-286. doi:10.3109/07357907.2012.657814.

4. Tu SP, Quante M, Bhagat G, Takaishi S, Cui G, Yang XD, Muthuplani S, Shibata W, Fox JG, Pritchard DM, Wang TC. IFN- γ inhibits gastric carcinogenesis by inducing epithelial cell autophagy and T-cell apoptosis. *Cancer Res*. 2011, 71(12):4247-59. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4009.

5. Tomita H, Takaishi S, Menheniott TR, Yang X, Shibata W, Jin G, Betz KS, Kawakami K, Minamoto T, Tomasetto C, Rio MC, Lerkowit N, Varro A, Giraud AS, Wang TC. Inhibition of Gastric Carcinogenesis by the Hormone Gastrin Is Mediated by Suppression of TFF1 Epigenetic Silencing. *Gastroenterology*. 2011. 140(3):p879-891 doi: 10.1053/j.gastro.2010.11.037.

6. Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takaishi S, Baik GH, Shibata W, Diprete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, Tycko B, Wang TC. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 2011; 19(2) :p257-272 doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.020.

7. Takaishi S, Shibata W, Tomita H, Jin G, Yang X, Ericksen R, Dubeykovskaya Z, Asfaha S, Quante M, Betz KS, Shulkes A, Wang TC. In vivo analysis of mouse gastrin gene regulation in enhanced GFP-BAC transgenic mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011, 300(2):G334-344. doi: 10.1152/ajpgi.00134.2010.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Y Hayakawa, S Takaishi, G Jin, H Ariyama, CB Westphalen, S Asfaha, YH Taylor, W Shibata, X Yang, D Chen, MT Whary, S Muthupalani, JG Fox, A Shulkes, TC. Wang, Progastrin Promotes Antral Carcinogenesis and Gastric Stem Cell Function, Digestive Disease Week, 2013年5月8日、Orange County Convention Center, 米国フロリダ州オーランド市

2. S Takaishi, Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth, 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月3日, 名古屋国際会議場, 愛知県名古屋市

〔図書〕(計 3 件)

1 高石繁生、赤司浩一「癌幹細胞」
西村書店、最新内科学、2012年, P267-269

2 高石繁生「胃癌・大腸癌幹細胞」
先端医学社、G.I. Research 第20巻1号,
2012年, P37-42

3 高石繁生「胃・大腸癌幹細胞の最新知見」
ニューサイエンス社、細胞 第43巻8号,
2011年, P12-16

* 産業財産権はなし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高石 繁生(Shigeo Takaishi)
九州大学先端医療イノベーションセンター
先進細胞治療学研究部門
研究者番号: 20596829

(2)研究協力者(海外)

コロンビア大学医学部消化器内科
Timothy C. Wang 教授、
早河 翼(Yoku Hayakawa)主任研究員

* 研究分担者、連携研究者はなし