

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590928

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種における間葉系幹細胞のホーミング分子機構と i p s g e n e 発現の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms and ips genes in mesenchymal stem cells of the patients with advanced gastric cancer.

研究代表者

二神 生爾 (Futagami, Seiji)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50247011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌組織の分化程度とCD44陽性細胞との間には、比較的低分化の癌組織には、これらのCD44陽性細胞が発現していることが確認された。分化度の高い腸型胃癌においては、CD133陽性細胞もしくはCD44陽性細胞が、共に発現している割合は、極めて低かった。また、胃癌組織内において、両マーカーは、共発現していることが、確認された。さらに、胃癌の腹膜播種している患者の腹水の細胞を分離し、詳細に検討したところ、CD133およびCD44陽性細胞がある一定の割合で存在していることが判明した。ほぼ一定の割合で腹水中に癌幹細胞が存在していると推測された。

研究成果の概要(英文)：In our data, poorly differentiated gastric cancer was significantly associated with CD44 expression. In addition, CD44-positive and CD133-positive cells co localized in some gastric cancer tissues. Certain proportion of CD133-positive cells could be seen in as cites of the patients with advanced gastric cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃癌幹細胞 CD 133陽性細胞 CD 44陽性細胞 腹膜播種

## 1. 研究開始当初の背景

われわれは、胃癌患者の胃癌組織内における MCP-1 とそのレセプターである CCR2 の発現が、胃癌組織内の血管新生および胃癌の予後と有意な相関が認められることを報告してきた。そして、血管内皮細胞を用いた *in vitro* の検討でも、MCP-1 刺激により誘導された COX-2 由来 PG E<sub>2</sub> 依存性に CCR2 が発現していることをつきとめた (Futagami S, et al. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008, 78, 137)。これらの一連の研究結果から、我々は胃癌局所で産生される MCP-1 は、COX-2 の発現および粘膜内 T cell、 $\gamma\delta$  T cell などの粘膜免疫を介して、胃癌の増殖や進展に深く関与していると考えている。一方、最近の報告では、骨髄由来細胞が *H. felis* 感染マウスモデルの胃粘膜内の化生性粘膜である、SPEM (spasmolytic polypeptide expressing metaplasia) に多数ホーミングしていることが判明した (Houghton J, et al. *Science*, 2004, 306, 1568)。この SPEM から胃癌が発生してくることから、胃癌の一部は骨髄由来幹細胞から生じたものであると報告されている。われわれは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たて、*H. pylori* 感染胃癌モデルである、*H. pylori* 感染スナネズミを用い、骨髄由来幹細胞のマーカーの一つである、CD133 陽性細胞が *H. pylori* 感染胃粘膜や誘導された胃癌組織内に認められることを確認した (Futagami S, et al. *Digestion* 2010, 81, 193-203)。また、一方で、Takaishi らは胃癌の stem cell marker の一つとして CD44 を報告している (Takaishi S, et al. *Stem cells* 2009, 27, 1006)。われわれの以前の検討でも、胃癌組織中には、大量の MCP-1 が産生され、腫瘍血管新生および COX-2 産生と有意な相関を認めていたため、MCP-1 が CD44 および CD133 陽性幹細胞のホーミングにおける key molecule としての役割を果たしているか今回検証するものである。さらに、stem cell における ips gene の制御についても検討する。

## 2. 研究の目的

胃癌患者の腹水中と胃癌組織の双方において、CD133+/CD44+ 幹細胞がホーミングするメカニズムとホーミングに際し、活性化した CD133+/CD44+ 幹細胞における遺伝子発現プロファイルについて今回検証するものである。

## 3. 研究の方法

胃癌組織および進行胃癌患者の腹水中の CD133+/CD44+ 幹細胞の存在を免疫染色や FACSscan 法により確認後に、同部位より SP 細胞および CD133+/CD44+ 幹細胞の分離・培養を行う。また、informed consent をとった患者より得た骨髄液からも磁気ビーズ法、FACSscan 法を用いて CD133+/CD44+ 幹細胞を分離する。Transwell membrane を用いて、CD133+/CD44+ 幹細胞の遊走能を評価し、各種サイトカインに対する中和抗体を使用して、ホーミングに重要な役割を果たしている master cytokine を明らかにする。刺激下で活性化した CD133+/CD44+ 幹細胞の表面 marker と遺伝子発現プロファイル(特に ips gene)を FACSscan 法および real-time PCR 法をもちいて検証する。さらに、実際の間葉系幹細胞の腫瘍増殖に及ぼす役割を検討するため、nude mouse に腫瘍を接種した上で、各処理した CD133+/CD44+ 幹細胞の投与し腫瘍形成に与える影響を検討する。

## 4. 研究成果

胃癌組織内および腹膜転移を来した患者において、癌幹細胞のマーカーである CD44 陽性細胞、CD133 陽性細胞の発現状態を検証した。

まず、胃癌組織の分化程度と CD44 陽性細胞との相関関係を調べてみると、低分化度の胃癌組織内においては、CD44 陽性細胞が認められることがわかった。

また、逆に分化度の高い胃癌組織においては、CD44 陽性細胞、CD133 陽性細胞ともに発現している割合は極めて低かった。

また、胃癌組織内において、CD44 陽性、CD133 陽性細胞が共発現していることが確認できた。さらに、興味深いことに、胃癌の腹膜播種している患者の腹水を調べ、

腹水中の細胞を分離すると CD44、CD133 陽性細胞が一定の割合で存在していることが判明した。こうした、癌幹細胞のホーミング分子機構を調べるために、各種サイトカインによる刺激により、癌幹細胞の遊走能を検討したところ、ある一定のサイトカインに特異的に反応し、これら幹細胞が遊走することがわかった。我々は、サイトカインに対する中和抗体を用いた検証でも同じ結果を得ている。

## 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 7 件)

1. Nagoya H, Futagami S, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease-1 is associated with angiogenesis and VEGF

production via upregulation of COX-2 expression in esophageal cancer tissues. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014 Feb;306(3):G183-90.

2. Song J, Futagami S, et al. Apurinic/apurimidine endonuclease-1 (APE-1) is overexpressed via the activation of NF-κB-p65 in MCP-1-positive esophageal squamous cell carcinoma tissue. J Clin Biochem Nutr. 2013 Mar;52(2):112-9.

3. Yamawaki H, Futagami S, et al. Leu72Met408 polymorphism of the ghrelin gene is associated with early phase of gastric emptying in the patients with functional dyspepsia in Japan. J Neurogastroenterol Motil 2015, 21, 93-102.

4. Futagami S, et al. Systematic review with meta-analysis: post-infectious functional dyspepsia. Aliment Pharmacol Ther 2015, 41, 177-188.

5. Shimpuku M, Futagami S, et al. Impact of eating attitude and impairment of physical quality of life between tertiary clinic and primary clinic functional dyspepsia outpatients in Japan. J Neurogastroenterol Motil 2014, 20, 506-515.

6. Suzuki H, Kusunoki H, Kamiya T, Futagami S, Yamaguchi Y, Nishizawa T, et al. Effect of lansoprazole on the epigastric symptoms of functional dyspepsia (ELF study): A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. United European Gastroenterol J 2013, 1, 445-452.

7. Futagami S, Shimpuku M, Kawagoe T, et al. The preproghrelin 3056 TT genotype is associated with the feeling of hunger and low acylated ghrelin levels in Japanese patients with Helicobacter pylori-negative functional dyspepsia. Intern Med 2013, 52, 1155-1163.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 名児耶浩幸、二神生爾、佐藤ひとみ、新福摩弓、小高康裕、山脇博士、河越哲郎、坂本長逸  
Apurinic/apurimidine endonuclease-1 (APE-1)によるSTAT3を介した食道癌進展機構の解析。  
第100回 日本消化器病学会. 2014年4

月23日～4月26日、東京  
2. 小高康裕、二神生爾、佐藤ひとみ、山脇博士、名児耶浩幸、河越哲郎、坂本長逸  
H. pylori 陽性胃炎患者におけるCOX-2のSNPを用いた除菌後ハイリスク群の絞り込み。  
第100回 日本消化器病学会. 2014年4月23日～4月26日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔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・准教授  
研究者番号：50247011  
研究における役割  
細胞培養  
免疫染色  
FACS など

(2) 研究分担者  
坂本 長逸 (Sakamoto, Choitsu)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30196092  
研究における役割  
細胞培養  
免疫染色  
FACS など

(3)連携研究者 ( )  
研究者番号 :