

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 ( 共通 )

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 2 7 年 6 月 1 0 日現在

機関番号 : 1 5 2 0 1

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2012 ~ 2014

課題番号 : 2 4 7 9 0 6 9 7

研究課題名 ( 和文 ) 腸管上皮の再生および炎症性発癌の過程における L g r 5 陽性上皮幹細胞の機能解明

研究課題名 ( 英文 ) Functional analysis of Lgr5-positive epithelial stem cells in the process of intestinal epithelium regeneration and inflammation carcinogenesis.

研究代表者

結城 崇史 ( YUKI, TAKAFUMI )

島根大学・医学部・助教

研究者番号 : 3 0 3 9 7 8 5 6

交付決定額 ( 研究期間全体 ) : ( 直接経費 ) 3,300,000 円

研究成果の概要 ( 和文 ) : 大腸炎症性発癌モデルを作成した。方法としては6~8週齢の雄マウスにAzoxymethane 10mg/kgを腹腔内投与後に、2.5%デキストラン硫酸ナトリウムを2週間自由飲水させ、開始から18週後に検討した。評価は、大腸腫瘍の数や大きさで行った。腫瘍発生はマウスを解剖し、実態顕微鏡や組織学的に観察した。その結果、腫瘍発生が確認され、モデル作成に成功した。本モデルを用いて、炎症性発癌過程における上皮細胞のアポトーシス、再生、増殖機構などについては検討可能であった。しかし、炎症性発癌の過程において、Lgr5陽性細胞が癌幹細胞として機能するのかを十分解明するに至らず、今後の検討課題と考えている。

研究成果の概要 ( 英文 ) : We have created the inflammation carcinogenesis model. As a method, 6-8-week-old male mice were injected with Azoxymethane (10 mg / kg) in an intraperitoneal manner, followed by a single cycle of Dextran Sulfate Sodium Salt (2.0%, 7 days) in drinking water and euthanized at 18 weeks. The study was done to evaluate by measuring the number and size of the tumor in colon. Mice were dissected, and we observed large intestine by stereomicroscope and histology. Using this model, we were able to study apoptosis, regeneration and growth mechanism of epithelial cells in inflammatory carcinogenesis processes. However, we did not lead to elucidate Lgr5 positive cells whether to act as a cancer stem cell in inflammatory carcinogenesis process. We think requires further study.

研究分野 : 医歯薬学

キーワード : GERD TRP

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（IBD）であるクローン病と潰瘍性大腸炎は、本邦において近年急速に患者数が増加しており、それとともに難治化、重症化する症例が増えてきている。また IBD の長期罹患例が増加することは慢性炎症にともなう“発癌リスク”が懸念され、発癌予防という観点からも IBD は早急に克服されるべき消化器疾患といえる。IBD の病態には宿主の過剰な免疫応答が深く関与し、制御できない炎症性メディエーターの活性化によって、腸管に慢性炎症が惹起されことから、現在おこなわれているほとんどの治療が、免疫抑制によって病勢を鎮静化する薬物に依存したものである。しかし、薬物治療で症状が軽快しても腸管の粘膜治癒が十分に得られず、再発を繰り返す症例が少なからず存在し、このような症例では発癌リスクが高くなる。したがって、腸管粘膜の再生や炎症性発癌の分子メカニズムを解明することは、IBD の新規治療法の開発において重要な研究課題である。

以前より私共は、消化管における炎症や粘膜修復について、免疫担当細胞の機能や増殖因子の役割などの観点から検討をおこなってきた（*J Immunol.* 2009, *Clin Vaccine Immunol.* 2006, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006, *Am J Gastroenterol.* 2005, *Aliment Pharmacol Ther.* 2003）。しかし、近年、腸管粘膜の維持や再生に関して上皮幹細胞の機能の重要性が指摘されてきており、IBD の病態解明や治療法開発においても幹細胞研究は不可欠といえる。一般に、幹細胞は様々な細胞に分化する多分化能と、細胞分裂後でも多分化能を維持できる自己複製能を有する細胞と定義されている。腸管上皮幹細胞は、小腸では吸収上皮細胞、杯細胞、腸管内分泌細胞、Paneth 細胞に分化し、陰窩と絨毛からなる構造を形成している。大腸では絨

毛構造がなく、生理的な状態では Paneth 細胞がないなど、小腸とは異なるが、基本的なシステムは類似すると考えられている。ヒト生体内で腸管上皮は最も細胞回転が速いが、粘膜傷害がおこった時には、さらなる細胞増殖が要求されるため、増殖や分化を迅速に正確に行うには、腸管上皮の再生を支える幹細胞の高度なシステムが重要である。近年、腸管上皮細胞の発育や再生に関して重要な働きをもつ Wnt シグナルの標的分子である

leucine-rich-repeat-containing

G-protein-coupled receptor 5 (Lgr 5) 陽性細胞が、腸管上皮では陰窩底部細胞に局限して認められることが報告された（Baker N. *Nature.* 2007）。さらに Lgr5 陽性細胞は自己複製能を持ち、60 日以上生存しすべての腸上皮細胞系へ分化が可能で、放射線照射に抵抗性があるなど、幹細胞の特徴を有していることが示された（Baker N.

*Gastroenterology.* 2010）。幹細胞は各臓器の形成や組織再生に重要な役割を担い、損傷治癒にも深く関与していることが推測されるが、腸炎などの粘膜傷害が起こった際に、Lgr5 陽性上皮幹細胞がどのような機序で再生に関与するのかは十分に明らかにされていない。

さらに先述したように、IBD の大きな臨床的な問題点として経過観察中の発癌がある。近年、“癌組織を構成する細胞は等しく腫瘍形成能を有するのではなく、腫瘍形成能を有する癌幹細胞と腫瘍形成能を有しない細胞に区別できる”という考え方が提唱されている。すなわち、癌組織中にも正常組織幹細胞と類似した役割を担う癌幹細胞が存在するという考え方であり、最近では、大腸癌発生における上皮幹細胞の関与が注目されている（Baker N. *Nature.* 2009）。しかし、IBD に発生する colitic cancer において Lgr5 陽性細胞が癌幹細胞になりうるのかは不明である。

## 2. 研究の目的

Lgr5 陽性幹細胞が上皮の再生に重要な役割を果たし、慢性炎症粘膜では幹細胞の遺伝子発現変化が癌化に影響を与える可能性が推測される。今回の申請課題では、これらの点を明らかにし、IBD の粘膜治癒を目的とした治療法の開発や、炎症性発癌の癌幹細胞の同定につながる研究成果を目指す。

## 3. 研究の方法

研究期間を通じて散発性大腸発癌モデルと炎症性発癌モデルを樹立することで消化管上皮における癌幹細胞の同定を試みた。

### (1) マウス大腸癌モデルの作成

アゾキシメタン(AOM)の投与により散発性大腸癌モデルを作成し野生型マウスと比較した。AOM 10mg/kg 腹腔内投与を 6 回行ったあとに、31 週後に解剖して、大腸の様子を確認した。摘出大腸は、10%ホルマリン液で 24 時間処理した後、0.2%メチレンブルー液で染色した。腫瘍は実態顕微鏡で検討し、Windows のソフト (Scion Image) で大きさを測定した。

### (2) 炎症性大腸癌モデルの作成

AOM の腹腔内投与とデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)の投与により炎症性大腸癌モデルを作成し野生型マウスと比較した。具体的には AOM 10mg/kg を腹腔内単回投与後に、2.5%デキストラン硫酸ナトリウムを 2 週間自由飲水させ、開始から 18 週後に解剖して、大腸の様子を確認した。摘出大腸は、10%ホルマリン液で 24 時間処理した後、0.2%メチレンブルー液で染色した。腫瘍は実態顕微鏡で検討し、Windows のソフト (Scion Image) で大きさを測定し

た。

動物実験を用いた実験のプロトコールについては、島根大学の実験動物委員会のおよび倫理委員会の承認を得た。

## 4. 研究成果と今後の課題

### (1) 散発性大および炎症性大腸癌モデル

AOM 10mg/kg 腹腔内投与を 6 回行ったあとに、31 週後に解剖して、大腸の様子を確認したところ、平均約 1.5 個、大きさは平均約 4.5mm の大腸腫瘍を確認できた。発生した腫瘍個数は KO マウスと野生型マウスの間で差は認められなかったが、腫瘍サイズは野生型で有意に大きいことが確認された。

一方、炎症性発癌モデルでは、AOM 10mg/kg を腹腔内単回投与後に、2.5%デキストラン硫酸ナトリウムを 2 週間自由飲水させ、開始から 18 週後に解剖して、大腸の様子を確認したところ、大腸に平均約 3 個、大きさは平均約 5mm の大腸腫瘍が確認できた。

以上の 2 つの発癌モデルを複数回作成し、コンスタントに大腸発癌がおこることを確認し、炎症の有無による癌幹細胞の同定という観点から研究を継続した。

上記モデルの腫瘍組織を用いて、LGR5 の免疫染色、および腫瘍細胞のフローサイトメトリー (LGR5 染色) によって幹細胞同定を試みた。しかし、今回の研究期間において 2 つのモデルにおける LGR5 の発現と癌幹細胞の関連を根拠を持って説明できる十分な結果を得ることができなかった。今後は LGR5 以外のマーカーの探索、また、遺伝子操作マウスを用いた大腸発癌モデル作成をおこなうなど、新たな検討内容を考案することが必要と考え、準備を進めている。

## 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 2 件 )

Kusunoki R, Ishihara S, Tada Y, Oka A, Sonoyama H, Fukuba N, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Md. Mesbah Uddin Ansary, Tajima Y, Maruyama R, Nabika T, Kinoshita Y: Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in colonic inflammation and carcinogenesis. J. Gastroenterol. (査読有)2015 Jan18 [Epub ahead of print]

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25596854>

Otani A, Ishihara S, Aziz MM, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Ansary MM, Kinoshita Y: Intrarectal administration of milk fat globule epidermal growth factor-8 protein ameliorates murine experimental colitis. Int J Mol Med. (査読有) 29:349-56, 2012. doi: 10.3892/ijmm.2011.866.

### [ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

Tada Y, Ishihara S, Kusunoki R, Fukuba N, Sonoyama H, Oka A, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Ansary MM, Kinoshita Y: Milk fat globule-epidermal growth factor 8 accelerates angiogenesis-related gene expression in colonic mucosa during regenerating phase of colitis. United European Gastroenterology Week (UEGW). Berlin 2013.10.14.

Oshima N, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Ansary MM, Kinoshita Y: Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 during

Citrobacter rodentium-induced colitis in mice. United European Gastroenterology Week (UEGW). Berlin 2013.10.15.

Ishihara S Tada Y, Fukuba N, Sonoyama H, Oka A, Kusunoki R, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kushiya Y, Fujishiro H, Kinoshita Y: Susceptibility for colitis-associated cancer development in SAMP1/Yit mice. United European Gastroenterology Week (UEGW). Berlin 2013.10.16.

Kusunoki R, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, M.U. Ansary, Oka A, Fukuba N, Moriyama I, Yuki T, Kawashima K, Kinoshita Y: Role of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation and carcinogenesis. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012.10.23.

Yuki T, Ishihara S, Sonoyama H, Tada Y, M.U. Ansary, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Moriyama I, Kawashima K, Kinoshita Y: Expression profiles of angiogenesis- and inflammation-related genes in colonic mucosa of ulcerative colitis in remission - comparison with narrow-band imaging magnifying colonoscopy findings. United European Gastroenterology Week (UEGW). Amsterdam 2012.10.24.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

結城 崇史 ( YUKI TAKAFUMI )

島根大学・医学部・助教

研究者番号 : 30397856