

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がん発生・悪性化に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：マウス胃がんモデルにおける幹細胞マーカーDclk1の役割

研究代表者：京都大学医学部附属病院 講師 妹尾 浩

#### 研究成果の概要：

マウス胃がんモデルおよびその他の消化器がんモデルにおいて、腫瘍幹細胞特異的マーカー候補である Dclk1 の意義を検証した。K19-C2mE; Dclk1-CreERT2; Rosa26-R マウスの過形成胃粘膜には Dclk1 陽性細胞が著明に増加していたが、子孫細胞を供給しなかった。これにより、胃では非がん部の Dclk1 陽性細胞は幹細胞性を示さないこと、プロスタグランジン E2 が Dclk1 の発現を誘導することが明らかになった。K19-Wnt1/C2mE; Dclk1-CreERT2; Rosa26-R マウスの解析は生後 50 週以降で行うため、2013 年春に解析を予定する。さらにマウス消化管粘膜から Dclk1 陽性細胞をソーティングし、cDNA アレイを行った。その結果、Dclk1 陽性細胞にはプロスタグランジン合成酵素の他、ロイコトリエン合成酵素も高発現していることが明らかとなった。また、Dclk1 C 末端蛋白に対するモノクローナル抗体樹立のためにマウス免疫を進め、Gan マウスにおける Dclk1 陽性細胞に対する細胞標的治療の可能性を探るべく準備を進めている。

#### 研究分野：腫瘍遺伝学

キーワード：胃がん、がん幹細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞を標的とするがん治療実現のためには、がん幹細胞と正常組織幹細胞を区別する、がん幹細胞特異的マーカーの同定が必要である。しかし、これまでに報告されたがん幹細胞マーカーの多くは、正常組織幹細胞にも発現する点が問題であった。研究代表者らは、マウス腸がんモデルにおいて Dclk1 が、正常腸組織では分化した細胞を、腸腫瘍では腫瘍幹細胞をマークすることを示した。さらに Dclk1 陽性の腫瘍幹細胞を選択的に障害することによって、マウス腸腫瘍が劇的に退縮することを示した。すなわち、Dclk1 は、マウス腸管において、がん幹細胞と正常組織幹細胞を区別することが出来るユニークな因子であることが示された。そこで、腸以外の他の臓器でも Dclk1 陽性細胞が腫瘍幹細胞の特異的マーカーであるか否かを検討するとともに、Dclk1 を利用したがん幹細胞治療の実現へ向けたストラテジー構築が必要と考えられた。

#### 2. 研究の目的

本研究では、種々の消化器がん、とくに胃

がんにおいて、Dclk1 が腫瘍幹細胞に特異的なマーカーであるか否かを検討し、Dclk1 陽性細胞を標的とする新規抗がん治療の可能性を検証することを目的とした。そのため、代表的なマウス胃がんモデルである Gan マウスを用いた研究が必要と考えられ、腫瘍遺伝学・大島研究室と共同研究を行った。

#### 3. 研究の方法

K19-Wnt1/C2mE; Dclk1-CreERT2; Rosa26-R マウスを作成して、マウス胃がんモデルにおけるリニエージトレーシングを行う。また、Dclk1 陽性細胞をソーティングし、cDNA アレイによって Dclk1 陽性細胞に特異的に高発現する因子を同定する。さらに、Dclk1 陽性細胞に対する細胞標的治療を可能にするための方策として、Dclk1 C 末端蛋白に対するモノクローナル抗体を樹立する。

#### 4. 研究成果

① K19-C2mE; Dclk1-CreERT2; Rosa26-R マウスを作成した。既報のごとく、同マウスの胃粘膜には過形成が生じ、同部では Dclk1 陽性細胞が著明に増加していた。しかし、タ

モキシフェン投与を行ってリニエージトレーシングを行ったところ、胃過形成性粘膜の Dcl1 陽性細胞からは子孫細胞が供給されなかった。このことから、胃においても非がん部の Dcl1 陽性細胞は幹細胞性を示さないことが明らかとなった。さらに、プロスタグランジン E2 が Dcl1 の発現を誘導することが示唆され、Dcl1 陽性細胞の発現誘導に関する初めての知見が得られた。なお、がん部の Dcl1 陽性細胞の意義を検証するためには、K19-Wnt1/C2mE; Dcl1-CreERT2; Rosa26-R マウスを生後 50 週以降で解析する必要がある。そのため、同マウスの解析を 2013 年春に予定して、交配を進めている。

② マウス消化管粘膜から Dcl1 陽性細胞をソーティングし、RNA を抽出して、cDNA アレイを行った。Dcl1 陽性細胞と Dcl1 陰性細胞の間で比較を行った結果、Dcl1 陽性細胞には Cox-1 などプロスタグランジン合成酵素の他、Lox などロイコトリエン合成酵素も高発現していることが明らかになった。現在、これらアラキドン酸カスケードの諸因子が Dcl1 陽性細胞の維持・機能に果たす役割を検討している。

③ Dcl1 に対するモノクローナル抗体樹立のため、作業を進めた。そのために、GST フュージョン蛋白を用いて約 200 アミノ酸からなる Dcl1 C 末端蛋白を合成し、マウス免疫を開始した。モノクローナル抗体作製後は、同抗体を殺細胞化合物で標識し、Gan マウスなどのマウスがんモデルを用いて、Dcl1 陽性細胞に対する細胞標的治療の可能性を探る。

#### 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 8 件)

1. Akitake-Kawano R, Seno H, Nakatsuji M, Kimura Y, Nakanishi Y, Yoshioka T, Kanda K, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Chiba T. Inhibitory role of Gas6 in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. (in press)
2. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T. Dcl1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nat Genet*. 2013 Jan;45(1):98-103.

3. Murakami T, Kawada K, Iwamoto M, Akagami M, Hida K, Nakanishi Y, Kanda K, Kawada M, Seno H, Taketo MM, Sakai Y. The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis. *Int J Cancer*. 2013 Jan 15;132(2):276-87.

4. Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa TO, Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor-suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene*. 2012 Aug 30;31(35):3949-60.

5. Kawada M, Seno H, Kanda K, Nakanishi Y, Akitake R, Komekado H, Kawada K, Sakai Y, Mizoguchi E, Chiba T. Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2012 Jun 28;31(26):3111-23.

6. Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake R, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, Seno H, Nishi E, Chiba T. Nardilysin promotes gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF-alpha. *EMBO Mol Med*. 2012 May;4(5):396-411.

7. 中西祐貴、妹尾浩、千葉勉：腸腫瘍幹細胞特異的マーカーDcl1 の同定：分子消化器病. 10, 93-97, 2013.

8. 上尾太郎、妹尾浩：Notchシグナルは、消化管上皮細胞の分化と癌化にどのように関わっているのか：分子消化器病. 9, 325-329, 2012.

[学会発表] (計 9 件)

1. Nakanishi Y, Seno H, Ueo T, Chiba T. The role of Dcl1-positive cells in the intestinal homeostasis. 2012 James W. Freston Single Topic Conference: Gastrointestinal Stem Cell Biology and Pathobiology. Aug 27-28, 2012, Chicago.

2. Seno H. Dclk1 discriminates between tumor and normal stem cells in the intestine. GI Research Academy 2012. June 15, 2012, Tokyo.

3. Kanda K, Komekado H, Seno H, Chiba T. Nardilysin maintains gastric cancer cell growth via promoting shedding of TNF- $\alpha$  and intrinsic cytokine signaling. Research Forum, Lecture Presentation. Digestive Disease Week 2012. May, 2012, San Diego.

4. 中西祐貴、妹尾浩、上尾太郎：正常腸管および腸腫瘍における Dclk1/Lgr5 陽性細胞の役割：第 99 回日本消化器病学会総会 2013.3.23 鹿児島

5. 神田啓太郎、妹尾浩、千葉勉、西英一郎：ナルディライジンは TNF- $\alpha$  のシェディングを促進し、マウス腸腫瘍を増大させる：第 71 回日本癌学会学術総会 2012.9.19 札幌

6. 中西祐貴、妹尾浩、千葉勉：Cox-2 阻害は IFN- $\gamma$  依存性に腫瘍関連マクロファージの極性を変化させる：第 71 回日本癌学会学術総会 2012.9.19 札幌

7. 中西祐貴、上尾太郎、妹尾浩：腸腫瘍幹細胞特異的マーカー Dcamk11 の同定：第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4.19 東京

8. 上尾太郎、妹尾浩、仲瀬裕志：Hes1 は大腸上皮細胞の一を規定し、ニッチ由来の Wnt や BMP シグナルによる分化制御に関与する：第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4.19 東京

9. 神田啓太郎、妹尾浩、木村勇斗、石津祥子、米門秀行、千葉勉：Nardilysin は TNF- $\alpha$  のシェディングを促進し、腸炎を増悪させる：第 98 回日本消化器病学会総会 2012.4.19 東京

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

京都大学医学部附属病院・消化器内科  
講師 妹尾 浩

### (2) 研究分担者

京都大学医学部附属病院・消化器内科  
教授 千葉 勉

京都大学医学部附属病院・消化器内科  
医員 上尾太郎

京都大学大学院医学研究科・消化器内科学  
大学院生 中西祐貴

京都大学大学院医学研究科・消化器内科学  
大学院生 山賀雄一

### (3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学・教授 大島正伸