

# 論 文 要 旨

Intestinal cancer stem cells marked by Bmi1 or Lgr5 expression contribute to tumor propagation via clonal expansion

(Bmi1 陽性細胞や Lgr5 陽性細胞である腸管癌幹細胞はクローン性に増殖することにより腫瘍増殖に関与する)

関西医科大学外科学講座  
(指導：権 雅憲 教授)

矢内 洋次

## 【はじめに】

正常腸管上皮幹細胞・腸管癌の起源細胞として Bmi1 陽性細胞、Lgr5 陽性細胞が同定されている。しかし、腸管腫瘍の増殖においてこれらの細胞の関与は明確でない。そのため、多色細胞系譜追跡法を用いて、腸管腫瘍の発生・増殖における Bmi1 陽性細胞、Lgr5 陽性細胞の関与を検討した。

## 【方法】

大腸癌の発症には多段階発癌モデルが提唱され、初期に腺腫が形成され、さらに遺伝子変異が起り、大腸癌が発症すると考えられている。そのため、APC 遺伝子変異を伴う家族性ポリポーシス (FAP) モデル (小腸腺腫モデル (APC<sup>min/+</sup>マウス))・APC<sup>min/+</sup>マウスに対して大腸起炎物質である DSS (dextran sulfate sodium) を投与した大腸腫瘍モデルである 2 段階発癌モデル・APC 遺伝子変異をもたないマウスに対して大腸特異的発癌物質であるアゾキシメタン投与後に DSS を投与する散発性発癌モデルを用い、すべての細胞をタモキシフェンにより青・オレンジ・赤の 3 色に標識する多色細胞系譜追跡法 (レポーターマウスにレインボーマウス: Rosa26<sup>rbw/+</sup>を使用) を行い、大腸腫瘍・小腸腫瘍の clonality 解析を試みた。その際、Lgr5・Bmi1 遺伝子の CreERT2 ノックインマウスによる解析を行った。

## 【結果】

Rosa26<sup>rbw/+</sup>マウスと Bmi1 陽性細胞のプロモーター下流に CreERT2 を発現するマウスをかけ合わせ、腸管腫瘍形成が行われた後にタモキシフェンを投与し、Bmi1 陽性細胞を含む細胞集団を多色で標識し、各種腸管腫瘍形成モデルマウスを用いて、大腸腫瘍・小腸腫瘍を検討した。タモキシフェン投与 3 日目の段階では、単一細胞レベルで標識されていた細胞が、投与 7 日、28 日目の段階では個々の Bmi1 陽性細胞が独立して自己複製を繰り返しながら周囲に腫瘍細胞を供給することで、同色の細胞クローンが形成された。次に Lgr5 陽性細胞についても同様の検討を行い、大腸腫瘍・小腸腫瘍において Lgr5 陽性細胞により同色の細胞クローンが形成された。その際、正常腸管上皮幹細胞ニッチであるパネート細胞は必ずしも必要ではなかった。

次に、各種腸管腫瘍形成モデルマウスを用いて、腫瘍形成前にタモキシフェン投与し、多色細胞系譜追跡法により Bmi1 陽性細胞・Lgr5 陽性細胞を標識し、腫瘍形成時における起源細胞の関与を視覚化し、個々の腫瘍の起源となる細胞の clonality を解析した。Lgr5 陽性細胞集団は、大腸腫瘍・小腸腫瘍において、腫瘍の発生に関与し、発生初期ではモノクローナルであるが、腫瘍が発育するとポリクローナルとなっていた。一方、Bmi1 陽性細胞集団は、発生初期では検出できず、腫瘍が発育した際にポリクローナルで検出されたのみであった。次に、腫瘍の起源となる細胞の clonality をより詳細に検証するために、全身の細胞を蛍光蛋白で標識する Rosa26<sup>CreERT2/rbw</sup> マウスを用いて、同様の検討を行った。大腸腫瘍では、発生初期ではモノクローナルで、発育しポリクローナルとなっ

ていた。以上から、近接する腫瘍が結合したと考えられた。対照的に、小腸腫瘍では発生初期ではポリクローナルであったが、一部のクローンのみが増殖し一旦モノクローナルとなり、発育すると大腸腫瘍と同様に、近接する腫瘍が結合し、ポリクローナルになったと考えられた。その際、正常小腸・大腸・大腸腫瘍・小腸腫瘍の陰窩の長さを比較検討することにより、腫瘍のクローン性の増殖は、陰窩の分裂により成立していると考えられた。

#### 【考察】

一部の Bmi1 陽性細胞、または、Lgr5 陽性細胞が腫瘍の起源細胞として機能すると同時に、形成された腫瘍内においてがん幹細胞として機能している事が証明された。従来家族性腺腫症をバックグラウンドとして発症する大腸がんは起源がポリクローナルとする学説があったが、本研究において3種類の大腸がんモデルにおいていずれも腫瘍の起源はモノクローナルであり、複数の腫瘍が同時多発して融合することでポリクローナルに見えることが判明した。