

令和 2 年 5 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09346

研究課題名(和文) 胃幹細胞の癌化メカニズムの解明と幹細胞マーカーの予防・治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of the gastric stem cell carcinogenic mechanism and application of stem cell marker for gastric cancer prevention and therapy

研究代表者

平田 喜裕 (Hirata, Yoshihiro)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：10529192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウスモデルおよび上皮培養モデルを用いて胃粘膜の癌化及び化生性変化における幹細胞およびその細胞内シグナルの役割を検討した。ヘリコバクター感染や癌源性遺伝子異常によるMAPK活性化は胃粘膜の化生性変化や細胞増殖の亢進を誘導したが、Lgr5陽性細胞および上皮TGFβシグナルの影響は限定的であった。変異型Krasによる化生性変化は粘膜の幹細胞マーカーCD44とSox9発現亢進と相関していた。一方新規に樹立した胃粘膜特異的Sox9ノックアウトマウスにおいてもCD44の高発現とともに上皮の過形成や腫瘍化がみられ、胃粘膜化生および癌化におけるCD44の重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目した胃粘膜の化生は胃癌の前癌病変もしくは傍癌病変として知られ、我々の既報においても胃癌高危険群の層別化に有用な病理学的変化である。胃癌幹細胞マーカーの一つとして知られているCD44の発現が化生発生に重要な役割を果たすことを解明した本研究から、胃炎患者をCD44の発現によってあらたな層別化を行うことによりさらに効率的な胃癌スクリーニング法を確立することができる。胃癌および胃粘膜の幹細胞マーカー分子は多数報告されているが、幹細胞を標的とした胃癌治療ははまだ実用化されていない。本結果からはCD44発現細胞を標的とすることが胃癌の有効な新規治療となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Role of gastric epithelial stem cell and its intracellular signaling in gastric carcinogenesis and metaplasia development were assessed using mouse and organoid model. Either infection with *Helicobacter pylori* or MAPK activation by Kras mutation in epithelial cells induced mouse gastric metaplasia and cell proliferation of organoid. Neither Lgr5+ gastric cells nor TGFβ signaling affected gastric metaplastic process. Kras induced metaplasia was associated with overexpression of stem cell markers, such as CD44 and Sox9 in gastric epithelial cells. Stomach specific marker knockout mice also showed epithelial proliferation and tumorigenesis with CD44 upregulation, suggesting the importance of CD44 in gastric carcinogenesis and metaplasia development.

研究分野：消化器疾患

キーワード：胃癌 幹細胞 オルガノイド 化生 ヘリコバクター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌はヘリコバクター感染によって生じる悪性腫瘍であり、ヘリコバクターの除菌治療により胃癌の発生は半分程度に抑制できると考えられている。しかし除菌治療後も癌の発生は一定頻度で見られ、今後ヘリコバクター総除菌時代には、除菌後胃癌の予防と治療が重要になる。腸上皮化生とは胃上皮細胞の変化の一形態であり、腸上皮の形質を有する細胞（杯細胞、吸収上皮）が発生する病理学的な異常である。ヘリコバクター感染では慢性炎症により正常の胃底腺が消失し（萎縮）、かわりに腸上皮が発生すること（化生）が以前から知られていたが、近年この変化がとくに胃癌の高危険群で認められることが報告されてきた。現在腸上皮化生の発生メカニズムについては十分に解明されておらず、とくにヘリコバクター感染が転写因子の活性化を惹起する機序やその変化が胃底腺のどの細胞でおこなうかなど分子生物学的に未解明の点が多い。近年さまざまな組織で幹細胞が同定され、疾患への関与が明らかになりつつある。胃粘膜の上皮幹細胞についても研究が進み、胃底腺の基部にある TROY 陽性細胞、CD44 陽性細胞、Lgr5 陽性細胞、腺峡部の増殖帯にある Mist1 陽性細胞、Sox9 陽性細胞が想定されている。幹細胞は正常の分化だけでなく病気における異常分化にも関与しており、幹細胞の遺伝子異常によって癌化がみられることも分かってきた。また炎症、化生の段階から遺伝子変異が見られることも報告されており、幹細胞マーカーの変化によって胃発癌のもっとも初期の変化をとらえられることが期待できる。

2. 研究の目的

胃粘膜化生および胃癌発生における胃上皮幹細胞の役割をヘリコバクター感染モデルとオルガノイドモデルを用いて検討する。化生および腫瘍発生過程での幹細胞マーカー発現変化とそれらの役割を明らかにし、幹細胞マーカーの発現変化を基盤とした胃癌の発癌高危険群の同定と胃癌の新規治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 胃粘膜特異的遺伝子改変マウスの作成とヘリコバクター感染

胃幹細胞と報告されている Lgr5 陽性細胞特異的に誘導性遺伝子変異を導入する Lgr5-creERT マウス、胃腺窩上皮特異的に誘導性遺伝子変異導入 K19-creERT マウス、恒常性胃上皮遺伝子変異マウス TFF1-cre マウスを用いた。上皮細胞における TGF R2 の役割は TGF R2^{fllox/fllox} マウスと交配し検討した。癌源性 Kras 遺伝子の役割は LSL-Kras^{G12D} マウスを用いて検討した。E-cadherin、Sox9 のノックアウトを行う目的で CDH1^{fllox/fllox}、Sox9^{fllox/fllox} マウスを用いた。Lgr5 陽性細胞を排除するために Lgr5-DTR-EGFP マウスにジフテリアトキシンを投与した。ヘリコバクター胃炎の検討のために PMSS1 株 1x10⁷CFU を経口的に投与し 4 か月後に胃粘膜を摘出し、解析に供した。病理学的評価は胃粘膜病理標本の HE 染色、幹細胞マーカー発現は免疫染色と胃粘膜から抽出した RNA の定量的 PCR で検討した。

(2) オルガノイドの作成と移植実験

特定の遺伝型マウスに必要なに応じて TAM4mg を投与し、胃粘膜を採取した。上皮細胞を分離しマトリゲルに包埋、Rspo1/EGF/Noggin/Gastrin を含む培養液で培養した。培養後 48hr、96hr、144hr 後にオルガノイドの径を測定した。オルガノイドの腫瘍形成能の評価として、およそ 1x10² 個の培養オルガノイドをマトリゲルより回収し、生後 6 週齢の野生型 B57BL6 マウスの背部に皮下注射し経時的に皮下腫瘍を測定した。

4. 研究成果

(1) 胃粘膜特異的 TGF R2 欠損マウスの樹立とヘリコバクター胃炎の解析

種々の悪性腫瘍で不活化されている TGF シグナルが胃癌発生におよぼす影響を解明するために、Lgr5-creERT;TGF R2^{fllox/fllox} マウス、KRT19-creERT;TGF R2^{fllox/fllox} マウスに TAM を投与し、ヘリコバクター PMSS1 株を感染させた。図 1 に示すようにいずれのマウスにおいても野生型マウス同様に GSII/TFF2、アルシアンブルーで染色される化生性変化と胃幹細胞マーカー Sox9/CD44 の発現増加が見られたが、TGF シグナル不活化の影響はほとんどみられなかった。一方、胃底腺底部に存在する Lgr5 陽性細胞が化生変化に与える影響を検討するために Lgr5-DTR-EGFP マウスに PMSS1 を感染させ、ジフテリアトキシンの投与によって Lgr5 陽性細胞を選択的に排除した。16w 後の胃粘膜で PBS 投与のコントロールマウスでは体部胃底腺あたり 12.8 ± 0.3 個のアルシアンブルー陽性化生粘膜の発生がみられ、ジフテリアトキシン投与マウスでは 13.5 ± 0.6 個の化生粘膜が発生しており有意な変化はみられなかった（図 1）。この結果よりヘリコバクター感染によって引き起こされる化生変化は TGF シグナルおよび Lgr5 陽性主細胞非依存的であると考えられた。

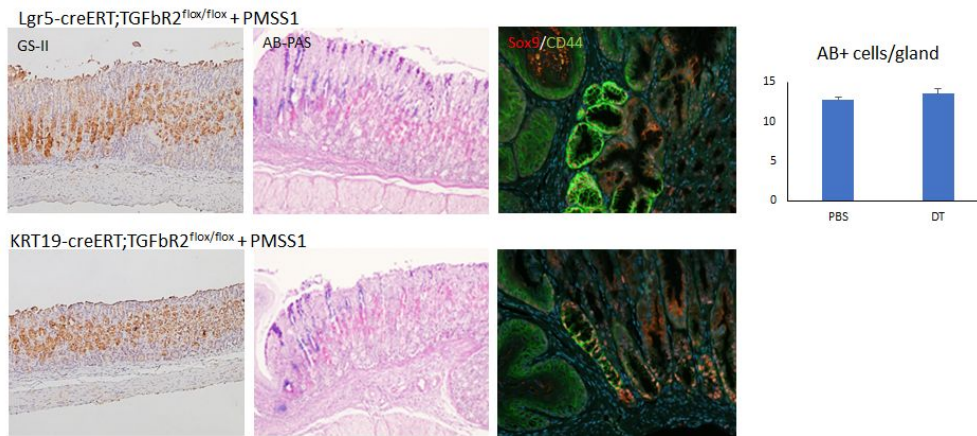


図1 ヘリコバクター感染胃粘膜における化生変化と細胞内シグナル

左：ヘリコバクター感染各遺伝子型マウスのGS-II/Alucian blue/Sox9/CD44染色

右：ヘリコバクター感染 Lgr-creERT;DTR マウスに PBS もしくは DT を投与し、各腺管あたりの Alucian blue 陽性細胞数の比較

(2) オルガノイドにおける遺伝子変異と腫瘍化の検討

TAM 誘導後の K19-creERT;Kras^{G12D}、K19-creERT;TGF R2^{flox/flox}、K19-creERT;Kras^{G12D};TGF R2^{flox/flox} マウスからオルガノイドを作成した。Matrigel 内の増殖速度をオルガノイドの径で測定したところ、図2のように Kras^{G12D} 変異をもつオルガノイドで有意に増殖速度が亢進していた。しかし、これらのオルガノイドを正常免疫を有する野生型マウスに移植したところいずれも生着を認めなかった(腫瘍発生率 0%, n=5)。すなわち癌化していないと考えられた。次に K19-creERT;Kras^{G12D};TGF R2^{flox/flox};CDH1^{flox/flox} マウスからオルガノイドを作成した。野生型マウスのオルガノイドに比して有意な増殖能の亢進がみられた。また野生型マウスに生着し、腫瘍の発生が認められた(60%, 3/5)。またこの腫瘍の病理所見では poorly differentiated adenocarcinoma 相当の癌細胞が確認された。この実験からマウス胃粘膜では癌源性 Kras、TGF R2 欠失のみでは癌化せず、CDH1 遺伝子の不活化が重要であると考えられた。

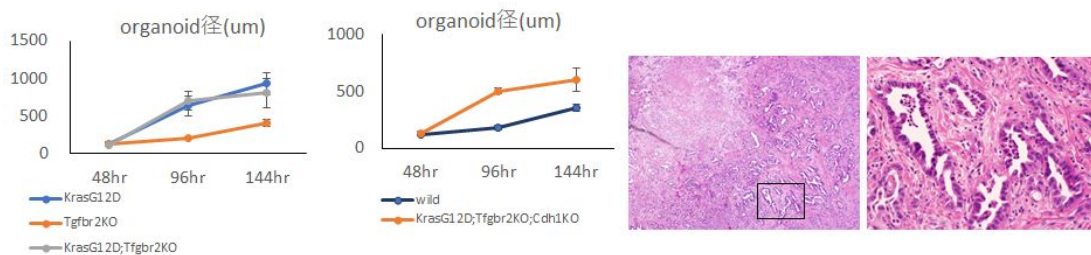


図2 オルガノイドにおける遺伝子変異と腫瘍化の検討

左：各遺伝子型マウスより作成したオルガノイドの経時的サイズ変化

右：野生型マウスに生着した K19-creERT;Kras^{G12D};TGF R2^{flox/flox};CDH1^{flox/flox} マウス由来オルガノイドの病理組織像 (40x, 200x)

(3) 胃粘膜特異的恒常的遺伝子変異マウスを用いた化生粘膜幹細胞マーカーの解析

次に恒常的に腺窩上皮に遺伝子異常を導入する目的で開発した TFF1-cre マウス系統を用いて、癌源性 Kras 遺伝子変異の影響を検討した。以前の検討において本マウスの胃粘膜では約 20%の腺管では腺管全体における遺伝子変異が確認されており、当該腺管の幹細胞における cre リコンビナーゼの活性が示されている。Kras^{G12D} 遺伝子発現により生後 4 週より腺窩上皮の過形成による粘膜肥厚とアルシアンブルー、Sox9/CD44 陽性の化生性腺管が出現し、ヘリコバクター感染と同様の胃炎が起こっていると考えられた。生後 12w のマウスで CD44 陽性細胞および Sox9 陽性細胞数をそれぞれのマウスで定量化した。どちらのマーカーについても野生型マウスでは 5%以下であったが、TFF1-cre;Kras^{G12D} マウスでは 90%以上の陽性率であり、Kras 変異はヘリコバクター感染同様の化生性幹細胞マーカー変化を惹起することが明らかになった(図3)。

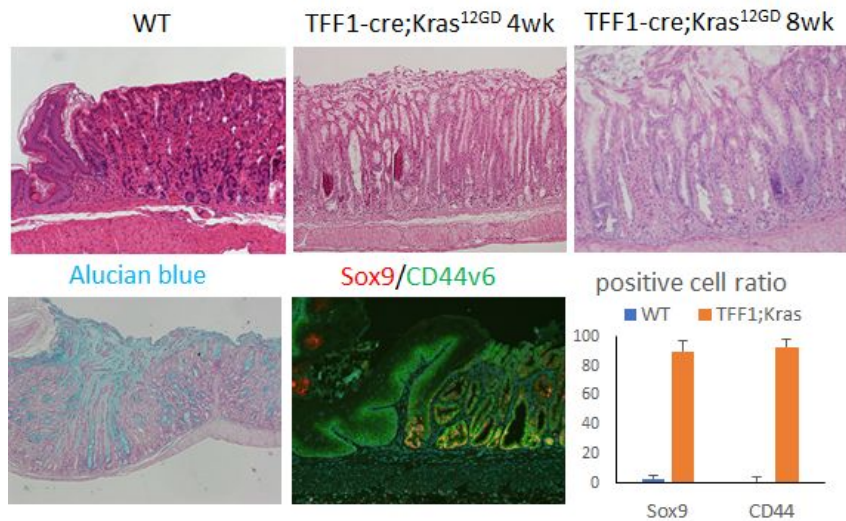


図3 胃粘膜恒常的遺伝子変異化生マウスを用いた幹細胞マーカーの解析

上段：各遺伝子型マウスの胃粘膜の病理評価 (100x)

下段：12週齢 TFF1-cre;Kras^{G12D} マウス胃粘膜の免疫染色(100x, 200x)と野生型との胃腺管 Sox9, CD44 陽性細胞割合の比較

(4) 胃粘膜腫瘍性変化における Sox9 の役割

上記結果より化生において Sox9 遺伝子発現が増加していることが明らかになったため、Sox9 の発現が化生および腫瘍化に関与するか検討した。以前の検討で作成した K19-creERT;Kras^{G12D};TGF R2^{fllox/fllox} マウスでは胃体部および前庭部には過形成および化生性変化しか起こさないが、胃食道接合部に特異的に浸潤癌を発生する。このモデルに Sox9 ノックアウトマウスを交配して検討した。図4に示すように K19-creERT;Kras^{G12D};TGF R2^{fllox/fllox} 腫瘍では広範に Sox9 の発現がみられたが、ノックアウトでは大部分の腫瘍細胞では Sox9 の発現が消失した。しかし HE 染色における腫瘍悪性度、深達度ともに Sox9 陽性癌に比べて改善は見られなかった(いずれも漿膜下までの腫瘍浸潤を認めた)。

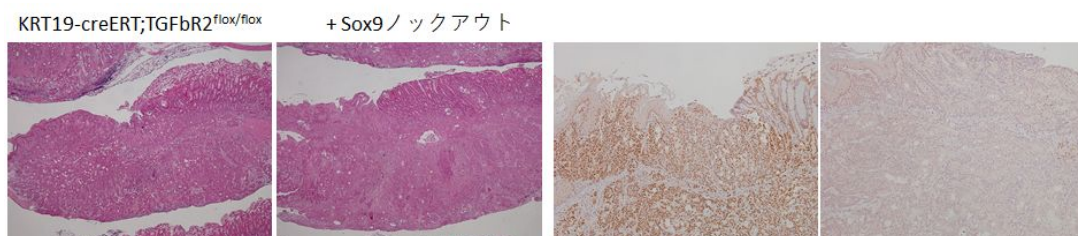


図4 マウス胃食道接合部癌モデルにおける SOX9 発現の検討

左：各遺伝子型マウスの胃食道接合部腫瘍の病理像 (HE 染色 40x)

右：同部位の Sox9 免疫染色(200x)

次に TFF1-cre マウスと Sox9 ノックアウトマウスを交配して野生型マウスと胃粘膜の病理を比較した。ノックアウトマウスにおいてとくに胃前庭部に炎症細胞浸潤と化生粘膜の出現が認められた。前庭部、とくに幽門では上皮の腫瘍化がみられた。免疫染色によって前庭部特異的な CD44 発現の亢進を認め、CD44 の発現と腫瘍発生との相関が示唆された(図5)。また前庭部の炎症細胞は MPO 陽性の好中球が大部分を占めていた。これらの結果から胃粘膜の化生および腫瘍発生において好中球を含む炎症細胞浸潤と上皮の幹細胞マーカーである CD44 の発現増加が重要な役割を果たす可能性が示唆された。これらの結果から CD44 の発現を標的とした胃癌高危険群の設定が有用であると考え、今後検証予定である。

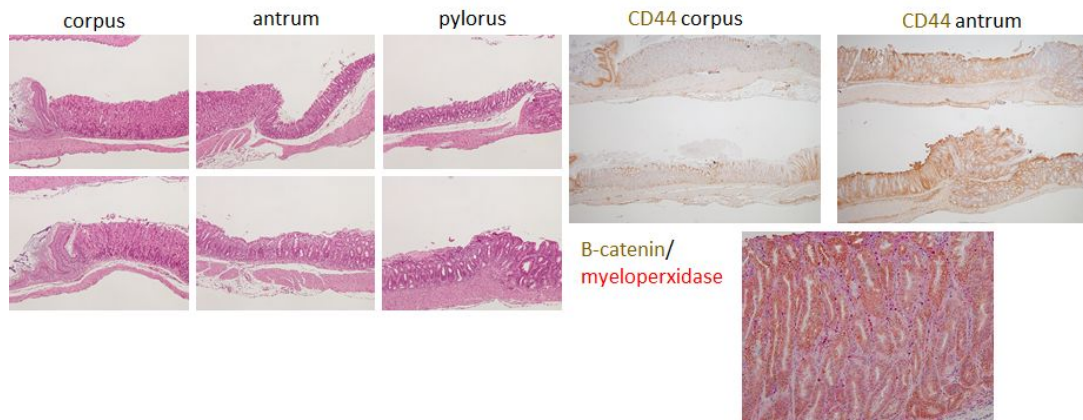


図5 胃粘膜における SOX9 の役割

左：100xHE 染色像(上段コントロールマウス、下段 SOX9 ノックアウトマウス)

右上段：SOX9 ノックアウトマウスの CD44 免疫染色 100x

右下段：b-catenin/myeloperoxidase 免疫染色 200x

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kinoshita H, Hayakawa Y, Konishi M, Hata M, Tsuboi M, Hayata Y, Hikiba Y, Ihara S, Nakagawa H, Ikenoue T, Ushiku T, Fukayama M, Hirata Y, Koike K.	4. 巻 247
2. 論文標題 Three types of metaplasia model through Kras activation, Pten deletion, or Cdh1 deletion in the gastric epithelium.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pathol.	6. 最初と最後の頁 35-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5163.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shichijo S, Hirata Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Characteristics and predictors of gastric cancer after Helicobacter pylori eradication.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 2163-2172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v24.i20.2163.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita H, Hayakawa Y, Niu Z, Konishi M, Hata M, Tsuboi M, Hayata Y, Hikiba Y, Ihara S, Nakagawa H, Hirata Y, Wang TC, Koike K.	4. 巻 314
2. 論文標題 Mature gastric chief cells are not required for the development of metaplasia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	6. 最初と最後の頁 G583-G596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00351.2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahiro Hata, Yoku Hayakawa, Hiroto Kinoshita, Hayato Nakagawa, Yoshihiro Hirata, Timothy C. Wang, Kazuhiko Koike
2. 発表標題 MODELING SIGNET RING CELL CANCER BY USING MOUSE MODELS AND ORGANOIDS
3. 学会等名 米国消化器病学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新倉量太 平田喜裕 小池和彦
2. 発表標題 除菌前・後の組織学的腸上皮化生と内視鏡的萎縮による除菌後胃癌のリスクの相違
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山田 篤生 (Yamada Atsuo) (80534932)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	