

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07928

研究課題名(和文) 加齢に伴う幹細胞老化による胃発癌機構の3次元細胞培養に基づく解明

研究課題名(英文) Analysis of the gastric carcinogenesis with ageing based on the murine organoid model

研究代表者

今谷 晃 (Imatani, Akira)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30333876

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)：加齢は胃癌発症の要因の1つと考えられる。近年、幹細胞から臓器に類似したモデルを作成できる3次元細胞培養実験系のオルガノイドが確立してきている。これらを踏まえて、加齢マウス由来胃オルガノイドを樹立し、胃発癌機序を解析した。加齢由来胃オルガノイドでは若年由来に比較して、Wnt/beta-catenin細胞内シグナルが活性化し、予想に反し、細胞老化に関わる遺伝子の発現が抑制を受け、細胞周期G2/M期を制御する遺伝子の発現が亢進し、細胞増殖能が高いオルガノイドが出現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の加齢マウス由来の胃オルガノイドを用いた検討から、胃粘膜組織では、加齢とともに生理的な幹細胞老化から逸脱して、細胞増殖能が高い病的幹細胞(クローン)が出現することが類推でき、加齢に伴って胃癌が発生する極めて初期の病態の一端と考えられた。超高齢社会を迎えている日本において、胃癌に対する分子生物学的診断や治療の必要性について考える上で、本研究は基礎的資料となると思われる。

研究成果の概要(英文)：Ageing is one of the risk factors for gastric carcinogenesis. To clarify its mechanism with ageing, a novel 3D cell culture system "Organoids" established from the normal mice gastric mucosa was employed in this study. Interestingly, several gastric organoids with accelerated cell proliferation emerged from the gastric mucosa of the aged mice. The cell proliferation depended on Wnt/beta-catenin signaling and was involved in the suppressed expression of cellular senescence-related genes. This study suggested that the evasion from cellular senescence leads the gastric carcinogenesis with ageing.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃オルガノイド 加齢 細胞老化 胃発癌

1. 研究開始当初の背景

多くのがんにおいて加齢は発がん要因の1つと考えられる。胃癌においても *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) 感染率低下や除菌にも関わらず、国立がん研究センターがん対策情報センターの年齢階級別胃癌罹患率をみても、罹患率は加齢とともに高くなっており、加齢は重要な因子と思われる。一方で、各臓器の組織幹細胞が加齢とともに機能不全となり生理的老化に結びつく幹細胞老化 (ステムセルエイジング) という新しい概念が提唱されている。そして、この生理的な幹細胞老化から逸脱した病的幹細胞老化の1つとして発がんが考えられる。しかしながら、この幹細胞老化がどのように加齢に伴う胃発癌機構に関わっているか不明である。ところで近年、3次元細胞培養実験系として、正常消化管上皮組織からニッチ因子存在下で、幹細胞を維持増殖させ、消化管に類似したように分化が誘導できる3次元細胞培養であるオルガノイド培養実験法が急速に国内外で確立してきた。このため、従来の平面細胞培養と異なる、幹細胞の視点からの病態を解明する新たな環境が整ってきている。

2. 研究の目的

若年および加齢マウス胃粘膜組織から胃オルガノイドを安定的に樹立する実験系を立ち上げ、加齢マウス由来のオルガノイドにおいて、若年由来と比較して、形態学的特徴、細胞老化に関わる遺伝子、細胞内シグナルを解析し、生理的な幹細胞老化から逸脱した病的幹細胞老化の視点から、胃発癌に結びつく病態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 若年および加齢マウス胃粘膜組織から胃オルガノイドの樹立

野生型 C57BL/6J マウスの胃粘膜組織を細切後、Liberase 処理し、マトリゲルに混濁し、24 ウェルプレートに分配した。そして、Wnt3a、R-spondin、EGF、gastrin などのニッチ因子を含む培地を添加し、37°C CO₂ インキュベーターで培養した。オルガノイドが形成されることを確認後、十分に成長した5~7日後の時点で継代し観察を続けた。

(2) 胃オルガノイドの形態学的特徴と細胞増殖能の測定

播種4日後にオルガノイド画像を蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence) で取得し、定量的に数とサイズを測定した。3次元培養細胞の細胞生存性を測定する CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay (Promega) を用いて定量的に細胞増殖能をルミノメーターで測定した。

(3) 胃オルガノイドにおける遺伝子発現

胃オルガノイドから TRIzol 試薬 (Invitrogen) を用いて RNA を抽出し、RT-PCR 法で cDNA を合成した。まず、Wnt/ β -catenin シグナル経路上の分子とそのリガンド、細胞増殖、細胞老化に関わる遺伝子群に対して特化し解析するために、96-well TaqMan array plate (ABI) をカスタマイズした。mRNA 発現定量は StepOnePlus Real-Time PCR system (ABI) を用いた。さらに、遺伝子発現解析用マイクロアレイ ClariomTM S Mouse Array (Thermo Fisher) を用いて網羅的に解析した。

(4) 胃オルガノイドに対する免疫蛍光染色 (Immunofluorescence)

マトリゲル内の胃オルガノイドを4%パラホルムアルデヒドで固定し、ヤギ血清でブロッキング後、抗 Ki-67 ウサギ抗体 (SP6) (ニチレイ) 4°C O/N でインキュベートした。そして、2次抗体反応を行い、共焦点顕微鏡 (ニコン C2si) で観察した。

4. 研究成果

(1) 加齢マウス由来胃オルガノイドにおける細胞増殖能亢進と長期継代維持能獲得

まず野生型 C57BL/6J を用いて胃粘膜組織より胃オルガノイドを安定的に樹立する手技を確立した。次に若年マウス (2-4月齢) および加齢マウス (18-22月齢) 各々 (n=18) より胃オルガノイドを作成したところ、予想に反して、若年マウスに比較して加齢マウス由来のオルガノイドで形態学的に大きなものが多数観察された。(図1) つまり、50 μ m以上のオルガノイド数は、加齢由来で、若年由来に比べて2.38倍であった。加齢由来オルガノイドでは、若年由来と比較して細胞増殖能 (図2) は2.87倍であり、細胞増殖マーカー Mki67 mRNA の発現は4.24倍、IFでも加齢由来オルガノイドの核に Ki67 の強い染色を認めた (図3)。

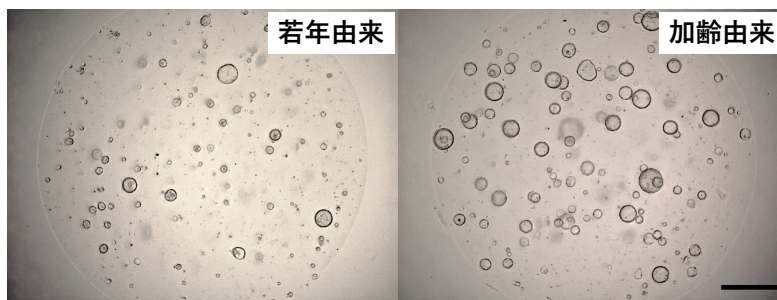


図1 若年および加齢マウス由来胃オルガノイド (bar = 500 μ m)

図1) つまり、50 μ m以上のオルガノイド数は、加齢由来で、若年由来に比べて2.38倍であった。加齢由来オルガノイドでは、若年由来と比較して細胞増殖能 (図2) は2.87倍であり、細胞増殖マーカー Mki67 mRNA の発現は4.24倍、IFでも加齢由来オルガノイドの核に Ki67 の強い染色を認めた (図3)。

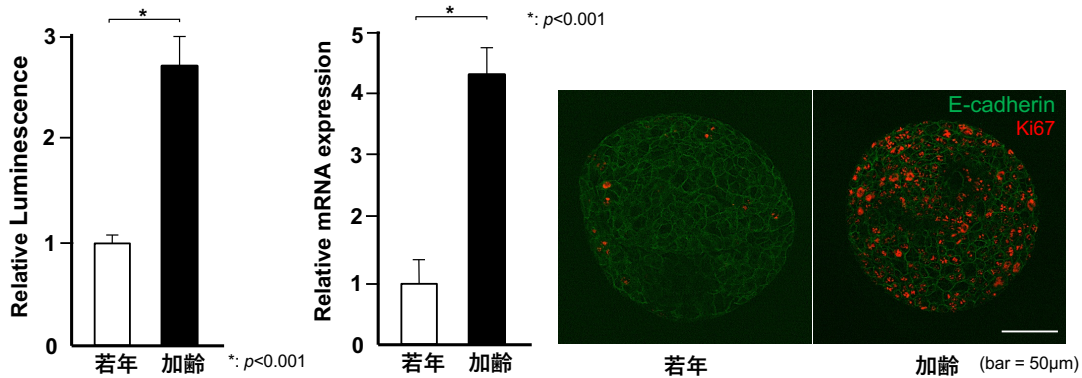


図2 細胞増殖能

図3 加齢由来胃オルガノイドにおけるKi-67の発現亢進

さらに

各々の胃オルガノイドを、継代を重ね観察したところ、若年由来の胃オルガノイドは継代困難であったが、加齢由来の胃オルガノイドのうち、5クローンは半永久的に継代が可能であった。

(2) Wnt/ β -catenin シグナル依存性の胃オルガノイド細胞増殖能の亢進

Wnt/ β -catenin シグナルを活性化する Wnt3a、R-spondin1、CHIR99021(Gsk3 β 阻害剤)を除いたオルガノイド培養培地では、

加齢由来の胃オルガノイドの細胞増殖能 (図4) は0.49倍と有意に低下した。このことから、この細胞増殖能は Wnt/ β -catenin シグナルに依存していることが判明した。

(3) 加齢マウス由来胃オルガノイドにおける遺伝子発現の網羅的プロファイル

カスタムメイドした 96-

well TaqMan array plate で、

Wnt/ β -catenin シグナル経路上の分子、細胞増殖、細胞老化に関わる遺伝子群、さらに ClariomTM S Mouse Array を用いて網羅的に遺伝子発現解析をした。その結果、Wnt/ β -catenin シグナル経路上の分子でシグナルを活性化する Fzds、Lrp5/6、 β -catenin の発現亢進は認められず、また、Rnf43、Znrf3、Axin、Apc、Gsk3 β といったシグナルを抑制する分子の発現低下も認められなかった。細胞増殖・細胞老化に関わる遺伝子に関しては、Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子としてよく知られている Myc、CyclinD1 の発現亢進は認められなかった。また、分化制御遺伝子・幹細胞マーカーである Notch1、さらにその下流の Hes1 や Atoh1 の発現には変化はなかった。一方で、細胞老化に関わる p16、p21、p53 の発現抑制と細胞周期 G2/M 期を司る Cyclin B および CDK1 の発現亢進を認めた (図5)。このため、加齢由来の胃オルガノイドでは、細胞周期 G2/M 期が亢進し、分裂期回避から細胞老化への経路が抑制を受け、細胞増殖と維持に結びつくことが示唆された。

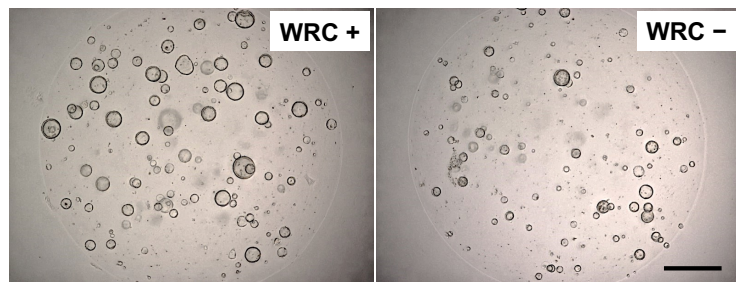


図4 加齢由来胃オルガノイドにおける Wnt/ β -cateninシグナル依存性細胞増殖

WRC: Wnt3a, R-spondin1, CHIR99021

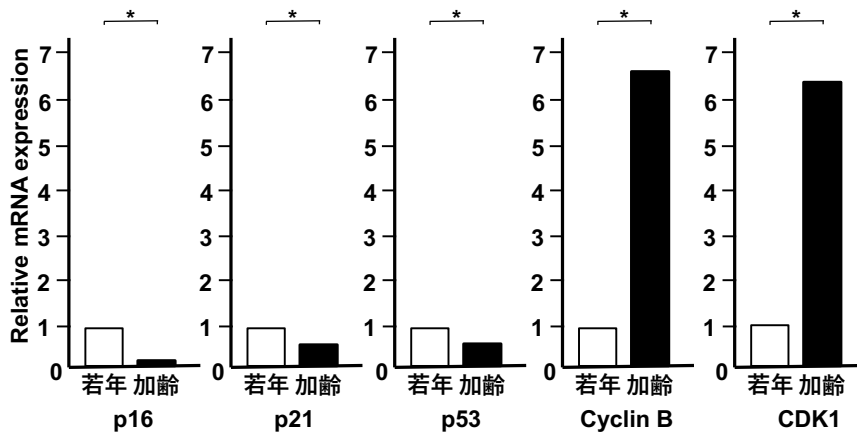


図5 加齢由来胃オルガノイドにおける細胞老化・細胞周期に関わる遺伝子の発現

以上より、本研究によって、加齢マウス胃粘膜組織から3次元細胞培養であるオルガノイドを樹立し解析する実験系は、加齢に伴う胃発癌機構を明らかにする上で有用と思われた。そして、加齢マウスの胃粘膜上皮幹細胞の一部では、生理的な幹細胞老化から逸脱し、細胞増殖能を獲得

した病的な幹細胞（クローン）が出現すると考えられた。このような病的な幹細胞（クローン）では、何らかの理由で Wnt/ β -catenin シグナルが活性化を受け、細胞老化に関わる p16、p21、p53 の発現が低下し、細胞増殖が亢進することが示唆され、加齢を起因する発癌機序の一端と類推できた。今後、このような病的な幹細胞（クローン）の出現メカニズムを点突然変異やエピゲノム変化も含めて更なる検討が必要と思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------