

令和 4 年 4 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08411

研究課題名(和文) 胃上皮幹細胞を制御する免疫関連分子の異常による胃老化・発癌機序の解明

研究課題名(英文) The predominance of senescence-evading aged gastric epithelial cells may contribute to aging-related gastric carcinogenesis

研究代表者

浅野 直喜 (ASANO, Naoki)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20526454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：若年および老年の野生型マウス胃からオルガノイドを作成したところ、老年マウス胃から作成したオルガノイドは若年マウス胃から作成したものよりも、オルガノイド形成数は多く、細胞増殖能も高いという意外な結果が得られた。老年胃オルガノイドでは若年胃オルガノイドに比べてWntシグナルが活性化、転写因子Tbx3の発現が増強しており、さらには細胞老化が抑制されていることが判明し、これらが細胞増殖能の亢進に寄与していると考えられた。

ヒト胃生検検体および内視鏡切除標本を用いた検討により、ヒトにおいても加齢によるTBX3の発現亢進が認められること、胃癌においてTBX3が発現していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢は種々の臓器における発癌リスクと考えられている。本研究では、胃オルガノイドを用いた検討により、加齢によって転写因子Tbx3を高発現する細胞が出現することが判明した。このTbx3発現細胞では、細胞老化が抑制され、細胞増殖能が亢進していたことから、このTbx3の発現亢進という経路が加齢による胃発癌機序の一つとして考えられた。今後は胃粘膜上皮におけるTbx3を抑制することにより、発癌予防や治療に結びつく可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)： We established gastric organoids from young and aged murine stomachs, and found that aged organoids formed more organoids and proliferated vigorously. This resulted from accelerated Wnt signaling and enhanced expression of the transcription factor Tbx3. We also found that the cellular senescence in aged organoids, which may contribute to gastric carcinogenesis.

We then assessed the expression of TBX3 in human gastric tissues and found that TBX3 expression increased with age and that gastric cancers express TBX3.

研究分野：消化器内科学

キーワード：老化 オルガノイド 発癌 胃

1. 研究開始当初の背景

種々の臓器において老化は発癌に寄与すると考えられており(*de Magalhaes JP: Nat Rev Cancer, 2013*)、慢性炎症は老化を促進する原因と考えられている(*Fougère B et al.: J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2017*)。胃においては、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)感染による慢性活動性胃炎が持続した結果、胃粘膜萎縮や腸上皮化生という前癌病変が進展し、これらを背景に胃癌が発生すると考えられている(*Correa P et al.: Gastroenterology, 2007*)が、臨床的な検討から、加齢自体が胃粘膜萎縮進展の原因の1つであることも報告されている(*Sonnenberg A et al.: Clin Gastroenterol Hepatol, 2015*)。

一方、*H. pylori* 感染の際に、宿主側の免疫応答において重要な役割を果たす自然免疫関連分子として、nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1)が挙げられる(*Viala J et al.: Nat Immunol, 2004*)。本応募者は、*H. pylori* 感染早期において、NOD1 が *H. pylori* の排除に重要な役割を果たしていること(*Watanabe T, Asano N et al.: J Clin Invest, 2010*)、*H. pylori* 長期感染モデルにおいては、NOD1 が腸上皮化生の進展を抑制していること(*Asano N et al.: Cancer Res, 2016*)を報告している。さらに、*H. pylori* に感染していなくても、NOD1 欠損マウスの胃においては、野生型マウスに比べて胃粘膜萎縮が顕著に認められるようになることを見出している(unpublished data)。

以上から、本応募者は、胃粘膜萎縮を胃粘膜の老化、*H. pylori* 感染を老化促進させる accelerator と捉え、NOD1 には胃粘膜の老化を制御する能力があると考えた。

2. 研究の目的

加齢が胃粘膜上皮細胞に与える影響を検討し、それをもとに自然免疫関連分子 NOD1 による胃粘膜の老化を制御するメカニズムの解明することを目的とした。

3. 研究の方法

自然免疫分子 NOD1 による胃粘膜の老化を制御するメカニズムの解明を試みるにあたり、まず、加齢が胃粘膜上皮細胞に与える影響を検討することとした。

(1) マウス胃オルガノイドの作成

若年および老年の野生型 C57BL/6 マウス胃からオルガノイドを作成し、オルガノイド形成数を比較した。また、増殖能に関しては、Promega 社の CellTiter-Glo 3D によって比較検討した。

(2) Wnt シグナル伝達系の評価

若年および老年マウス胃オルガノイドに TOPFlash plasmid (Merck-Millipore)と pRL-TK Renilla control vector (Promega)を 4D-Nucleofector system (Lonza)を用いて遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、Wnt シグナル伝達系の活性を評価した。

(3) マイクロアレイ解析

若年および老年マウス胃オルガノイドから RNA を抽出し、Clariom S mouse array (Applied Biosystems)によりマイクロアレイ解析を行った。両者の間で発現量に差のある Wnt シグナル伝達系の標的遺伝子に注目し、その発現を定量リアルタイム PCR により確認した。

(4) 細胞老化の評価

若年および老年マウス胃オルガノイドにおいて、同仁化学研究所の SPiDER-βgal キットを用いて細胞老化を評価した。

(5) ヒト胃における発現の検討

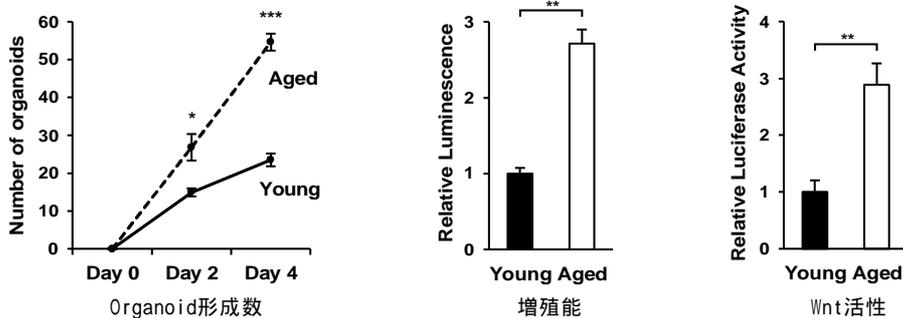
ヒト胃の生検検体および内視鏡的粘膜下層剥離術によって得られた組織標本における遺伝子の発現を免疫組織化学を用いて検討した。

4. 研究成果

若年および老年の野生型マウス胃からオルガノイドを作成したところ、老年マウス胃から作成したオルガノイドは若年マウス胃から作成したものよりも、オルガノイド形成数は多く、細胞

増殖能も高いという
意外な結果が得られ
た(図1左、中)。また、
TCF レポーターアッセイ
による検討では、老年
胃オルガノイドでは若
年胃オルガノイドに比
べてWntシグナルが活
性化していることが
確認された(図1右)。

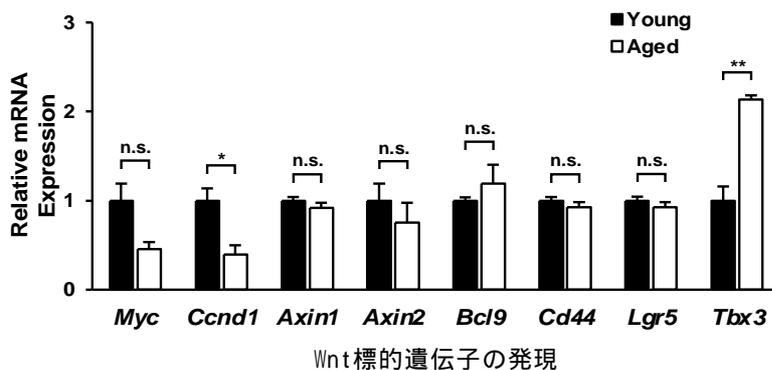
図1



この結果から、Wnt
によって活性化される
因子が、老年マウス
胃オルガノイドにお
けるオルガノイド形
成能および増殖能に
影響していると考え、
その因子を特定する
ことを目的として、
マイクロアレイ解析
を行った。

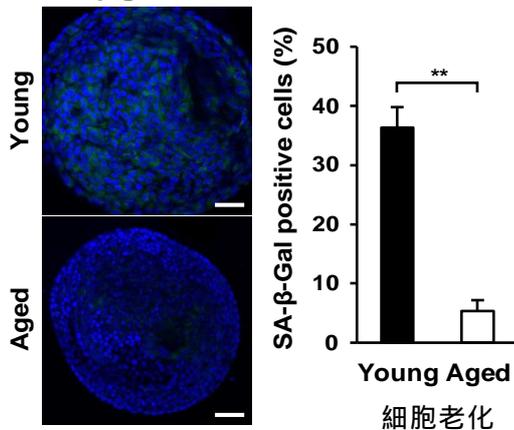
マイクロアレイ解析
の結果から候補遺伝
子を検討したところ、
老年マウス胃オルガ
ノイドでは若年マウ
ス胃オルガノイドに
比して転写因子 Tbx3
の発現が高値である
という結果が得られ、
その検証のために行
った定量PCRでも老
年マウス胃オルガノ
イドにおける発現高
値が確認された(図2)。

図2



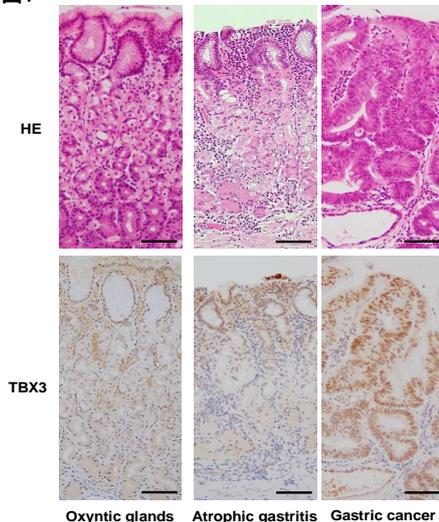
Tbx3はUlna-Mammary Syndrome
の原因遺伝子として1997年
に同定された転写因子
(Bamshad M et al.: Nat Genet.,
1997)で、Wnt/ β -cateninシ
グナル伝達系によって制
御され(Renard CA et al.:
Cancer Res., 2007)、p19^{ARF1}、
p53、p21^{WAF1}の発現を低下
させることで細胞老化を
抑制することが知られて
いる(Brummelkamp TR et al.:
J Biol Chem., 2002)。さら
に、進行胃癌や乳癌にお
いて発現が亢進している
ことも報告されており
(Miao ZF et al.: Virchows
Arch., 2016; Kristic M et
al.: J Pathol., 2019)、本
研究でも同遺伝子に着
目して検討することと
した。

図3 SA- β -gal / DAPI

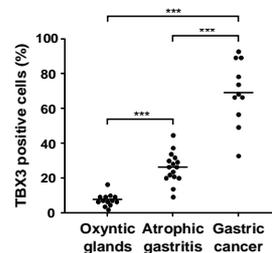


Tbx3の機能として、
細胞老化の抑制が挙
げられるため、本研
究でも細胞老化関連
 β -galactosidase assay
(SABG)にてオルガ
ノイドにおける細胞
老化を評価した。そ
の結果、老年マウス
胃オルガノイドでは
若年マウス胃オルガ
ノイドに比較して、
細胞老化が抑制され
ていることが判明し、
老年マウス胃オルガ
ノイドにおけるオル
ガノイド形成能およ
び細胞増殖能の亢進
には、細胞老化の抑
制が寄与している可
能性が示唆された(図
3)。

図4



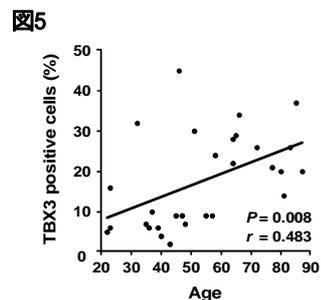
以上のマウス胃オル
ガノイド実験系から、
加齢マウスでは、
Wntシグナル伝達系
の亢進によってTbx3
の発現が誘導され、
細胞老化の回避、細
胞増殖能の亢進を
認める胃粘膜上皮細
胞が出現することが
判明し、加齢による
発癌の機序の一つ
である可能性が考
えられた。



ヒト胃粘膜におけるTBX3の発現

そこで、マウス胃オルガノイドの系から得られた結果が、ヒトにおいても当てはまるかを検討するために、ヒト胃生検検体および胃 ESD 標本を用いて、TBX3 の発現を免疫組織化学により評価した。その結果、固有胃腺、萎縮性胃炎、胃癌と進むにつれてヒト胃粘膜における TBX3 の発現が亢進することが確認された(図4)。さらに、胃癌を除いた症例での検討では、加齢と TBX3 の発現との間には正の相関が認められた(図5)。このことから、マウス胃オルガノイドの実験によって見出された、加齢と Tbx3 との関連は、ヒト胃においても成り立っていることが示唆された。

以上から、胃において、加齢によって Tbx3 の発現が亢進した細胞が生じ、同細胞においては細胞老化が抑制されているために細胞増殖能が亢進しており、この細胞が優勢となるような環境下では胃癌の発生に寄与する可能性が考えられた。



年齢とヒト胃粘膜におけるTBX3の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 竹内章夫、浅野直喜、正宗淳 |
| 2. 発表標題 マウス胃オルガノイドを用いた加齢に伴う細胞老化回避による胃発癌機序の解明 |
| 3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会 シンポジウム3:消化器疾患に対する分化・老化・再生研究の展開 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akio Takeuchi, Naoki Asano, Akira Imatani, Masashi Saito, Xiaoyi Jin, Masahiro Saito, Takeshi Kanno, Waku Hatta, Kaname Uno, Tomoyuki Koike, Atsushi Masamune |
| 2. 発表標題 THE EMERGENCE OF ANTI-SENESCENT PROPERTY IN AGED GASTRIC EPITHELIAL CELLS MAY CONTRIBUTE TO AGING-RELATED GASTRIC CARCINOGENESIS |
| 3. 学会等名 DDW 2022 Research Forum: Pathogenesis of GI Metaplasia and Neoplasia (国際学会) |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|