

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17048

研究課題名(和文) iPS細胞由来胃オルガノイドによる粘膜筋板形成及び破綻のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of muscularis mucosa formation and collapse on gastric organoids derived from human-induced pluripotent stem cell

研究代表者

上原 慶一郎 (Uehara, Keiichiro)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70710557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの胃の粘膜筋板形成については、これまで研究がなされていない。我々は、既報を参考にヒトiPS細胞から粘膜筋板を伴った胃オルガノイドを作製し、経時的解析で上皮由来の因子が粘膜筋板形成に関わっている可能性を考えた。この粘膜筋板を伴った胃オルガノイドを用いて上皮由来ヘッジホッグシグナルとTGF- $\beta$ シグナル、基質の機械的環境が粘膜筋板形成に関わっていることを明らかにした。TGF- $\beta$ シグナルは、ヘッジホッグシグナルと機械的環境にも影響を与える可能性が示された。さらに、ヒトのESD後切除検体からTGF- $\beta$ シグナルは潰瘍癒着上皮で発現頻度が有意に高く認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞由来胃オルガノイドを用いて、粘膜筋板形成に胃上皮由来のヘッジホッグシグナル、TGF- $\beta$ シグナル、基質の機械的環境が協同的に作用していることを初めて明らかにした。また、TGF- $\beta$ シグナルは粘膜筋板再生の際にも作用している可能性が示唆された。今後、胃癌において粘膜筋板が再生することなく粘膜下層に浸潤するメカニズムを明らかできる可能性があり、新たな胃癌治療の標的を探索することができるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human gastric development has not been well studied. The generation of human pluripotent stem cell-derived gastric organoids (hGOs) comprising gastric marker-expressing epithelium without an apparent smooth muscle structure has been reported. We modified previously reported protocols to generate hGOs with muscularis mucosa (MM) from hiPSCs. Time-course analyses revealed that epithelium development occurred prior to MM formation. Sonic Hedgehog (SHH) and TGF- $\beta$ 1 were secreted by the epithelium. HH and TGF- $\beta$  signal inhibition prevented MM formation. A mechanical property of the substrate promoted MM formation around hGOs. TGF- $\beta$  signaling was shown to influence the HH signaling and mechanical properties. In addition, clinical specimen findings suggested the involvement of TGF- $\beta$  signaling in MM regeneration. HH and TGF- $\beta$  signaling from the epithelium to the stroma and the mechanical properties of the subepithelial environment may influence the emergence of MM in human stomach tissue.

研究分野：病理診断学

キーワード：iPS細胞 胃分化誘導 粘膜筋板

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)胃粘膜筋板は、粘膜と粘膜下層を分ける平滑筋の薄い層で、腺管内容物の排出を促したり、胃上皮と胃内容物との接触を高めて消化を促したりする役割がある。胃上皮の発生には、様々なシグナル伝達経路が関与することが報告されているが、胃間葉系発生は十分に解明されておらず、ヒトの胃粘膜筋板がどのように誘導されるかは明らかにされていない。

(2)ヒト多能性幹細胞 (ES 細胞、iPS 細胞) から様々な組織が誘導できるようになり、ヒトの組織発生過程とそのメカニズムを研究できるようになった。McCracken らによって、ヒト多能性幹細胞から胃オルガノイドへの分化誘導が報告されたが、上皮下平滑筋組織である粘膜筋板はみられなかった。

### 2. 研究の目的

(1)ヒト iPS 細胞から粘膜筋板を伴った胃オルガノイドを誘導する。

(2)(1)の胃オルガノイドを用いて粘膜筋板形成に関わる因子を明らかにする。

### 3. 研究の方法

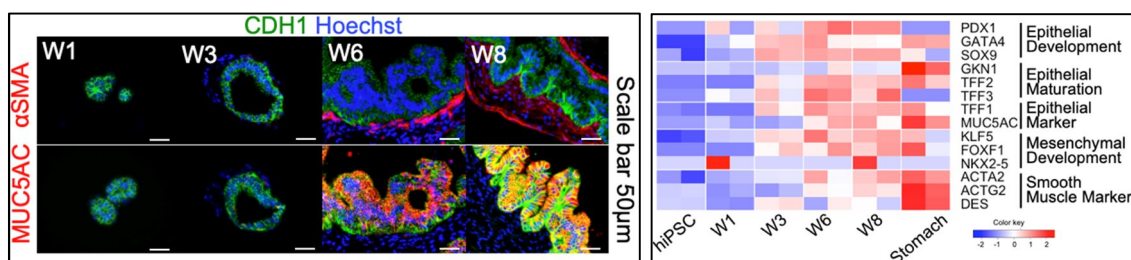
既報と同様にヒト iPS 細胞から分化誘導を行い、既報よりも3週間長い全8週間オルガノイドを維持した。ヘッジホッグシグナルと TGF- $\beta$  シグナル抑制実験では、ヘッジホッグシグナル阻害剤であるシクロパミンと TGF- $\beta$ R1 阻害剤である SB431542 をそれぞれ3週目から添加し、8週目で胃オルガノイドを評価した。接着実験では3週目から接着プレートと低接着プレートに移して2週間培養した。オルガノイドの評価は、組織標本を作成し免疫染色や in situ hybridization (ISH) 、qRT-PCR、RNA シーケンス、ウェスタンブロットを施行した。ヒト ESD 後潰瘍での TGF- $\beta$ 1 発現実験では、神戸大学医学部附属病院病理診断科に提出された内視鏡的粘膜下層剝離術 (ESD) 施行後胃切除標本と正常胃粘膜とで TGF- $\beta$ 1 免疫染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)粘膜筋板を伴う胃オルガノイドの誘導

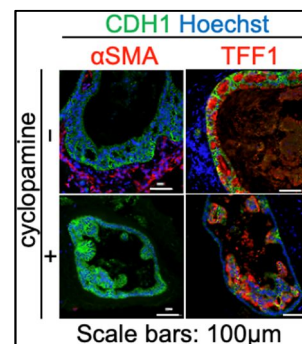
作製されたオルガノイドには腺管状構造を示す上皮が認められ、胃上皮マーカーである MUC5AC および TFF-1 が陽性であった。経時的観察では、上皮下には  $\alpha$ SMA 陽性の紡錘形細胞が6週目に出現し始め、8週目に粘膜筋板に類似した帯状構造を形成した。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来の粘膜筋板を伴った胃オルガノイドを作製することができたと考えられた。

RNA-seq を用いて経時的な遺伝子発現パターンを解析した。ヒートマップでは胃上皮と間葉系発生・成熟マーカー、平滑筋マーカー発現は8週目に向かって増加傾向を示し、最終的に胃と類似した発現を示した。興味深いことに、胃上皮マーカーの発現は平滑筋マーカーの発現より先に認められた。このことから、胃の上皮成熟後に上皮下平滑筋細胞が分化を開始しており、その分化には、上皮由来の因子が関与しているという仮説を立てた。



#### (2) ヘッジホッグシグナル発現解析とその阻害剤による胃オルガノイドの粘膜筋板形成抑制

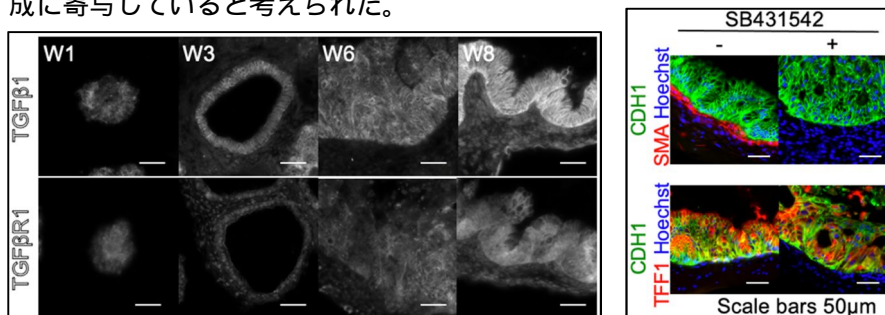
まず、免疫染色と ISH で、胃オルガノイド誘導中の Sonic 及び Indian hedgehog 発現を確認すると、分化誘導開始後3週から8週目にかけて上皮内で増加していた。このことから上皮由来のヘッジホッグシグナルが上皮下の細胞分化に関わっている可能性が示唆された。3週目からヘッジホッグシグナル阻害薬であるシクロパミンを培地に添加すると、 $\alpha$ SMA 陽性の上皮下紡錘形細胞が減少した。これらの結果から、上皮由来のヘッジホッグシグナルが、 $\alpha$ SMA の発現を亢進させ、粘膜筋板形成を正に制御していると考えられた。



#### (3) TGF- $\beta$ シグナル発現解析と TGF- $\beta$ R1 阻害剤による胃オルガノイドの粘膜筋板形成抑制

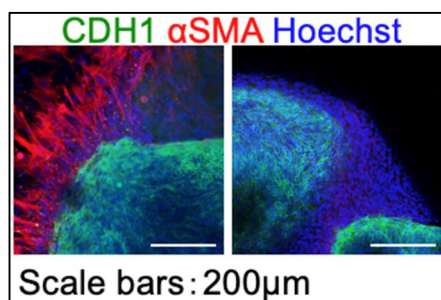
免疫染色と ISH にて、胃オルガノイドの上皮で TGF- $\beta$ 1 の発現が認められ、3週から8週目にかけて増加した。免疫染色にて、そのレセプターである TGF- $\beta$ R1 発現も上皮では増加し、上

皮下細胞でも3週目以降発現を認めた。TGF- $\beta$ R1 阻害剤 SB431542 を3週目から投与すると、オルガノイドの  $\alpha$ SMA 陽性の上皮細胞は認められず、TGF- $\beta$  シグナルの阻害により胃オルガノイドの粘膜筋板形成が抑制されることが示された。上皮由来の TGF- $\beta$  シグナルが粘膜筋板形成に寄与していると考えられた。



#### (4) 機械的環境による上皮 $\alpha$ SMA 発現の亢進

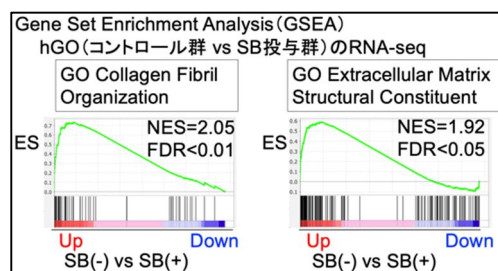
接着プレートで培養したオルガノイドは低接着プレートで培養したもの比べて周囲に  $\alpha$ SMA 陽性紡錘形細胞がみられ、ウェスタンブロットおよび qRT-PCR でも  $\alpha$ SMA 発現が増加したことが確認された。3週目の胃オルガノイドには、間葉系幹細胞マーカーである CD146 や CD44 が免疫染色にて陽性を示す上皮細胞があり、上皮由来 TGF- $\beta$  の下で機械的環境の影響を受け、平滑筋細胞へと分化したことが示唆された。



#### (5) TGF- $\beta$ シグナルがヘッジホッグシグナルや細胞外基質の機械的性質に及ぼす影響

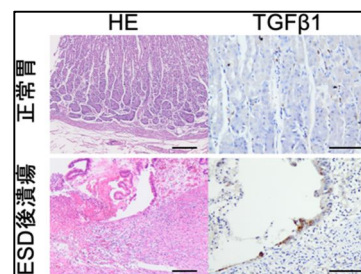
TGF- $\beta$  は、様々なヒトの細胞や癌細胞株において、ヘッジホッグシグナル下流の GLI2 の発現を誘導することが報告されている。qRT-PCR にて、GLI2 の発現は、SB431542 によって減少し、胃オルガノイドの GLI1 陽性上皮紡錘形細胞が免疫染色にて減少したことから、TGF- $\beta$  シグナルとヘッジホッグシグナルが、胃オルガノイドにおける粘膜筋板の誘導に協調的にも作用することが示唆された。

胃オルガノイド誘導での TGF- $\beta$  シグナル阻害による反応をみるために RNA-seq を行ったところ、SB431542 の添加により、70 以上の遺伝子において log<sub>2</sub>TPM 値が 10 以上亢進し、66 遺伝子において抑制されていた。これら発現変動遺伝子についてパスウェイ解析を行うと、細胞外基質などに関わるカテゴリが含まれていた。さらに、Gene Set Enrichment Analysis の結果、“Collagen Fibril Organization” と “Extracellular Matrix Structural Constituent” に関する遺伝子セットが有意に変化していた。これらの結果は、TGF- $\beta$  シグナルが、細胞外基質の硬さに寄与し、その結果、胃オルガノイドの粘膜筋板形成を促進する可能性があることを示唆した。



#### (6) 胃粘膜筋板の再生

ESD 後の胃粘膜では粘膜筋板の再生に先行して上皮の再生がみられ、上皮由来の因子が粘膜筋板の再生にも関与している可能性が示唆された。TGF- $\beta$ 1 が粘膜筋板の再生に関与しているか調べるため、ESD 後の潰瘍標本に対して TGF- $\beta$ 1 免疫染色を行った。正常胃粘膜では 24 例中 4 例、ESD 後の潰瘍や潰瘍癒痕で 18 例中 13 例が陽性を示した。上皮由来の TGF- $\beta$ 1 が発生過程だけでなく、成人の組織損傷後の胃粘膜筋板の再生にも関与していることが示唆された。



#### (7) まとめ

上皮由来のヘッジホッグシグナルと TGF- $\beta$  シグナル、上皮下の機械的性質が、胃オルガノイドの上皮細胞の平滑筋分化、粘膜筋板形成に関与していることを本研究で明らかにした。さらに、TGF- $\beta$  シグナルは、粘膜筋板の発生だけでなく、再生でも作用していることが示唆された。今後の研究により、これらの因子と粘膜筋板が再生することなく、胃癌が粘膜下層に浸潤する仕組みとの関連を明らかにできる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uehara Keiichiro, Koyanagi-Aoi Michiyo, Koide Takahiro, Itoh Tomoo, Aoi Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Epithelial-derived factors induce muscularis mucosa of human induced pluripotent stem cell-derived gastric organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 820 ~ 834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2022.02.002	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiichiro Uehara, Michiyo Koyanagi-Aoi, Takashi Aoi
2. 発表標題 Epithelial-Derived Factors And Mechanical Property Of Substrate Orchestrate The Emergence Of Muscularis Mucosa Of The Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Gastric Organoid.
3. 学会等名 ISSCR（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上原慶一郎、小柳三千代、伊藤智雄、青井貴之
2. 発表標題 上皮由来SHH、TGF シグナル及び基質の硬度がhiPSC由来胃オルガノイドの粘膜筋板を誘導する
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上原慶一郎、小柳三千代、伊藤智雄、青井貴之
2. 発表標題 上皮由来SHH、TGF シグナル及び基質の硬度がhiPSC由来胃オルガノイドの粘膜筋板を誘導する
3. 学会等名 第110回日本病理学会
4. 発表年 2021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
---------	---------