

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07915

研究課題名(和文) 萎縮性胃炎オルガノイドからの腸上皮化生、腸型胃癌発がんモデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of carcinogenesis model of intestinal type gastric cancer from the organoid of atrophic gastritis patient.

研究代表者

有山 寛 (Ariyama, Hiroshi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80713437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：萎縮性胃炎から樹立したオルガノイドにはLGR5陽性細胞が含まれていた。LGR5陽性細胞の維持にはWNTシグナルが必須であり、臨床検体においては腺底部にWNT3aを発現する細胞が認められ、ニッチとして機能していると考えられた。オルガノイド形成細胞においてLATS2またはRUNX3をKOすることでCDX2の発現をおこすことが確認され、LAT2ノックアウトによりID4の発現亢進が認められることから、BMPシグナルの活性化が腸上皮化生に関与することが示唆された。LATS2またはRUNX3に加えてTP53あるいはSMAD4をノックアウトすることで、マウスにおける造腫瘍性が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃発がんメカニズムの解析はこれまで進んでいないが、萎縮性胃炎患者検体から樹立したオルガノイドを用いることで、腸型胃癌の発がんメカニズムの解析が行えることが確認できた。萎縮性胃炎から腸上皮化生に至るメカニズムにおいてはLATS2/RUNX3の遺伝子発現低下が関与しており、BMPシグナルが活性化が重要で、その後のがん化につながることを確認できた。本結果から、腸上皮化生患者からの胃癌発症予防のためにBMPシグナルを抑制することが重要であると推察され、今後の胃癌発症予防に重要な研究結果と考える。

研究成果の概要(英文)：The organoid from atrophic gastritis patients contained LGR5-positive cells. WNT signaling is essential for the survival of LGR5-positive cells in vitro, and WNT3a positive cells located in the base of the gastric gland were thought to be the niche for LGR5 positive cells in atrophic gastritis patients. LATS2 or RUNX3 knock out in organoid cells led to the CDX2 expression. LATS2 knock out was also induced ID4 upregulation. With these, BMP signaling activation is associated with intestinal metaplasia. LATS2 or RUNX3 knock out organoid cells acquired tumorigenic potential after TP53 or SMAD4 knock out in vivo.

研究分野：gastric carcinogenesis

キーワード：intestinal metaplasia BMP LGR5 WNT LATS2 RUNX3

1. 研究開始当初の背景

本邦における胃がんの罹患率は2018年の統計では第2位と多く、転移のある状態で見つかりと治癒は期待できない。胃がんの治療成績向上のためには胃がんの発がんメカニズムを詳細に解析する必要があるが、胃発がんモデルの構築はなされておらず、胃の発癌メカニズムの理解は十分でない。

2. 研究の目的

我々は *in vitro* においてヒト臨床検体より胃オルガノイドを作成することに成功し、オルガノイドにおいて CRISPR-Cas9 システムを用いて CDH1 遺伝子をノックアウトすることで胃印環細胞がんの *in vitro* 発がんモデルを構築した。一方腸型胃がんでは、*Helicobacter pylori* 感染による慢性胃炎→萎縮性胃炎→腸上皮化生→腸型胃がんへとがん化が進むが、各段階で起こる遺伝子変異の詳細は不明である。我々は萎縮性胃炎検体からのオルガノイド培養系を用いて腸上皮化生さらに腸型胃がんへと至る発がんメカニズムにかかわる遺伝子異常を確認し、新たな胃癌治療ターゲットを同定することを目的に本研究を提案する。

3. 研究の方法

胃がん手術症例より同意を得、手術検体における非癌部の一部を採取し、オルガノイド培養を行った。遺伝子のノックアウトには CRISPR-Cas9 system を用いた。ノックアウト前後の遺伝子発現の変化は定量的 PCR 法を用いて解析した。またタンパクの発現の確認は免疫組織化学染色または蛍光免疫染色法を用いて行った。In vivo の造腫瘍性を確認するために NSG マウスを使用した。

4. 研究成果

萎縮性胃炎検体から樹立したオルガノイドでは CLDN18、MUC6 の発現がみられ、胃型形質を保持していた。臨床検体での解析から健常部では LGR5 陽性細胞は検出困難でオルガノイド形成能は乏しかったが、萎縮性胃炎では有意に LGR5 発現細胞が増加しており、萎縮性胃炎から樹立したオルガノイドも多くが LGR5 陽性であった(図1)。WNT3a・R-spondin を添加しない培地では LGR5 陽性細胞の減少を認めた。臨床検体においては腺底部に WNT3a を発現する細胞が認められ(図2)、これらが萎縮性胃炎において LGR5 細胞のニッチとして機能する可能性が考えられた。LATS2 あるいは RUNX3 をノックアウトしたオルガノイドにおいて CDX2 の発現が亢進していることが確認された。LATS2 KO による腸上皮化生のメカニズムとして BMP シグナルの関与を検証するため、BMP シグナルの下流である ID1~4 の発現を定量的 PCR で評価をした。LATS2 ノックアウトでは ID3、ID4 が、RUNX3 ノックアウトでは ID1、ID4 の発現亢進が認められ、BMP シグナルが亢進していることが確認できた。以上より LATS2 あるいは RUNX3 は BMP シグナルの抑制を介して腸上皮化生を抑制していると考えられた。さらに CRISPR-Cas9 システムを用いて TP53 あるいは SMAD4 をノックアウトした。LATS2 または RUNX3 に加えて TP53 あるいは SMAD4 をノックアウトすることで、マウスにおける造腫瘍性が確認できた(表2、3)。TP53 と SMAD4 をノックアウトすることでより大きな腫瘍が免疫不全マウスに形成されることを確認し、腫瘍内では p21 の発現が著明に低下していた。これらのことより萎縮性胃炎から腫瘍形成能を持つためには p21 の発現低下による senescence の回避が重要であると考えられた。

図1 (LGR5:赤)

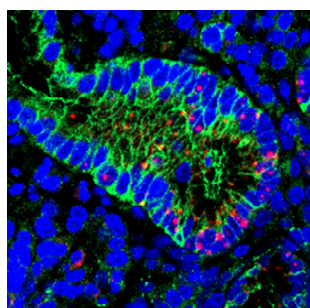


図2 (WNT3a:赤)

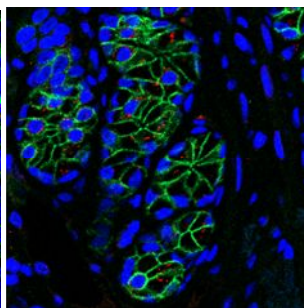


表1 Relative to GAPDH expression (CDX2)

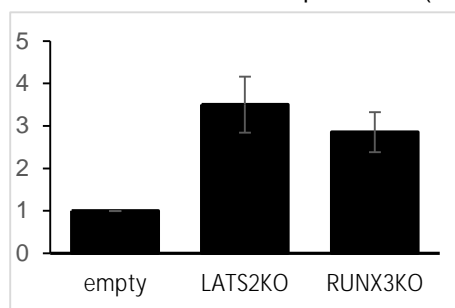


表 2

	nodules/injections
WT	0/11
LATS2 KO	2/4
RUNX3 KO	1/6

表 3

	nodules/injections
TP53KO	6/11
SMAD4KO	4/5
TP53+SMAD4KO	6/6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomoyasu Yoshihiro
2. 発表標題 Elucidation of the Mechanism of Carcinogenic Transformation of Human Gastric Epithelial Cells in Atrophic Gastritis.
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2024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
---------	---------