

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15917

研究課題名（和文）胃腺管の腸上皮化に必須の分子シグナルの同定

研究課題名（英文）Identification of molecular signals essential for intestinal epithelialization of gastric gland ducts.

研究代表者

坪井 真代（Tsuboi, Mayo）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40895421

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）：腸上皮化生モデルマウスを用いて胃体部腸上皮化生の特徴と発生機序を検討した。RNAシーケンスとCyTOF/FACSによる解析から、腸上皮化生には免疫応答は重要な要素ではなく、マウスモデルでも同様の結果が得られた。これまでの研究でRas/MAPK経路の活性化が必要であることが示されており、胃壁細胞を選択的に減少させたマウスとT1-Cdx2マウスを交配し、Notch 阻害薬を投与したところ、胃体部に腸上皮化生が発現した。Krasの活性化とNotch抑制の両方が胃体部の腸上皮化生発現には必要な可能性が示された。これらの研究成果は、胃癌や腸上皮化生のメカニズムを理解する知見を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸上皮化生は発がんの過程で、胃に生じる変化であるが、その意義や発生機序は明らかでない。多数ある胃炎マウスモデルを多角的に解析することで、腸上皮化生の発生、進展においては胃炎における獲得免疫応答は重要な要素ではないことを示した。

ヒトの腸上皮化生を呈する既報の胃炎モデルはないなかで、新規腸上皮化生マウスモデルを樹立した。さらに、胃体部の腸上皮化生発生機序にRas/MAPK経路活性化が重要な役割をもつことを示した。胃炎・胃癌の発生メカニズムには未知の点が多い中で、ヒト胃炎～腸上皮化生～胃癌発生に至る多段階発がんの病態理解、新規治療開発に貢献しうる成果を示した。

研究成果の概要（英文）：The characteristics and developmental mechanisms of intestinal metaplasia in the corpus were examined using a mouse model of intestinal metaplasia. RNA sequencing and CyTOF/FACS showed that no immune response is involved in intestinal metaplasia, and similar results were obtained in the mouse model. Since previous studies have shown that activation of the Ras/MAPK pathway is required, we crossed T1-Cdx2 mice with mice in which parietal cells were selectively ablated and further induced intestinal epithelialization by inhibiting notch signal.

The results of this study indicate that both Kras activation and Notch inhibition may be required for the development of intestinal transformation in the gastric body. These findings provide insight into the mechanisms of gastric cancer and intestinal metaplasia.

研究分野：発癌

キーワード：胃癌 胃炎 腸上皮化生 免疫応答

1. 研究開始当初の背景

胃炎・胃癌の発生メカニズムには未知の点が多く、既存の胃炎マウスモデルの遺伝子・免疫プロファイルを徹底的に比較解析し、それぞれの特徴と発生機序を把握することから研究を行ってきた。これまでの RNA シークエンスおよび CyTOF 解析の結果から、各胃炎マウスモデルには特徴的なシグナル活性化や免疫応答システムが存在することが明らかになったが、いずれのモデルもヒトの胃炎で見られる腸上皮化生を示さなかったため、新たな腸上皮化生マウスモデルを確立し、既存のモデルと比較することでその発生機序を解明する計画とした。

2. 研究の目的

本研究では、新規の腸上皮化生モデルを含む複数のマウス胃炎・化生モデルを網羅的かつ詳細に比較・解析し、各モデルの特徴・有用性とヒト病態との関連を明らかにし、慢性胃炎から腸上皮化生への変化に必須な分子学的機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 既存マウスモデルと T1-Cdx2 マウスの遺伝子発現・免疫プロファイルの比較: 過去の研究で明らかになったように、急性胃炎型と慢性胃炎型の胃炎モデルは異なる遺伝子発現プロファイルを持っている。また、免疫プロファイリングの結果によると、これらのモデルでは胃粘膜内の炎症細胞の種類も異なっている。この研究では、T1-Cdx2 マウスと LSL-KrasG12D マウスを交配させた T1-KrasCdx2 マウスを用いて、遺伝子発現と免疫プロファイルを RNA シークエンスと CyTOF/FACS を使用して網羅的に解析した。そして、これらの結果を既存のマウスモデルと比較し、T1-Cdx2 マウスの腸上皮化生腺管と既存のマウスモデルに生じる SPEM 腺管との分子的な差異を明らかにした。

(2) 胃体部腸上皮化生発生過程における Ras/MAPK 経路活性化の意義と機序解析: 上述のように、胃体部の腸上皮化生発生には Cdx2 の発現に加えて Ras/MAPK 経路の活性化が必要であった。マウス胃上皮に変異型 Kras を導入すると、MAPK 経路の活性化とともに壁細胞の減少を伴う萎縮性胃炎と SPEM 発生が誘導される。従って、胃体部腸上皮化生発生には MAPK 経路の活性化と萎縮性胃炎・SPEM の存在のどちらか、あるいは双方が必要な可能性がある。そこで新規に樹立した壁細胞選択的アブレーションマウスである Atp4b-DTR マウスと T1-Cdx2 マウスを組みあわせ、萎縮性胃炎・SPEM と腸上皮化生、及び Ras/MAPK 経路との相関関係を明らかにした。具体的には、Tff1-Cre; LSL-Cdx2; Atp4b-DTR マウス (T1-Cdx2Atp4b) に DT (ジフテリア毒素) を投与し、変異型 Ras を導入せずに萎縮性胃炎・SPEM を誘導し、腸上皮化生の発生の有無を検証した。さらに、T1-Cdx2・T1-KrasCdx2・T1-Cdx2Atp4b マウスに Ras/MAPK 経路阻害剤・刺激剤を投与し、本経路の腸上皮化生発生に対する役割を検討した。

(3) ゲノム編集オルガノイドを用いた腸上皮化生発生メカニズムの解析

(1)(2)においてマウスモデルで確認された腸上皮化生の発生機序について、in vitro での 3 次元胃オルガノイド培養系で検証・確認を加えた。マウス胃前庭部・胃体部より採取・培養したオルガノイドに、Cas9 発現レンチウイルスベクターを感染させ、Cas9 恒常発現前庭部・体部オルガノイドを樹立済みである。胃体部由来と前庭部由来のオルガノイドに変異型 Kras と Cdx2 を発現するレンチウイルスベクターを単独あるいは併用で感染させ、in vitro での腸上皮化生の誘導が可能かを検討した。

4. 研究成果

(1) 既存マウスモデルと T1-Cdx2 マウスの遺伝子発現・免疫プロファイルの比較

T1-Cdx2 マウスと LSL-KrasG12D マウスを交配させた T1-KrasCdx2 マウスを用いて、遺伝子発現と免疫プロファイルを RNA シークエンスと CyTOF/FACS を使用して網羅的に解析したところ、他の胃炎・火生マウスモデルとは異なり、腸管粘膜に遺伝子発現パターンが維持されていることがわかった。胃炎マウスモデルの免疫応答に注目した CyTOF/FACS 解析では、ピロリ菌感染マウスモデルと IL1 を過剰発現したマウスモデルでは獲得免疫応答が著しく活性化し、B 細胞、樹状細胞、T 細胞が増加しているのに対して、腸上皮化生マウスモデルでは大きな活性化は確認されず、免疫応答は腸上皮化生に重要な要素ではないと考えられた。

(2) 胃体部腸上皮化生発生過程における Ras/MAPK 経路活性化の意義と機序解析

T1-KrasCdx2 マウスでは胃体部に腸上皮化生が生じたことから、胃体部腸上皮化生発生過程における Ras/MAPK 経路活性化の意義と機序解析において、Kras 変異を導入せずに腸上皮化生マウスを作る目的で萎縮を模倣すべく壁細胞の選択的アブレーションマウスを T1-Cdx2 に交配させた。このマウスでは壁細胞減少による萎縮は認められたが、前庭部の腸上皮化生は予想とは異なり消失してしまった。解析を進めたところ、原因として Notch ターゲット遺伝子の Hes1 の発現が上昇していたため、MUC2 陽性の腸上皮化生への分化が抑制されていることが考えられた。そこで、Notch シグナルが腸上皮化生において MUC2 陽性の杯細胞の発達にどのような影響を与えているのか明らかにするため、T1-Cdx2 マウスを Eef1a1-LSL Notch1 マウスと交配させました。T1-Notch-Cdx2 マウスでは腸上皮化生は生じず、T1-Notch-KrasCdx2 マウスではわずかな腸上皮化生が確認されたことから、Notch シグナルがマウスモデルにおいても MUC2 陽性の腸上皮発現を抑制することが示唆された。そこで、Notch 阻害薬であるジベンザゼピンを壁細胞の選択的アブレーションマウスを T1-Cdx2 に交配させたモデルに投与したところ、胃体部に MUC2 陽性の腸上皮化生を発現させることに成功した。以上のことから、CDX2 が体内で発現することにより生じる萎縮を伴う MUC2 陽性の杯細胞を伴う腸上皮化生において、Kras の活性化と Notch 抑制の両方が胃体部の腸上皮化生発現には必要な可能性が示された。

なお、Lgr5 陽性胃幹細胞は化生変化をきたすという既報があるため、胃底腺を構成する幹細胞とされる Lgr5 陽性の主細胞に CDX2 を発現するマウスを作製した。しかし、リコンビネーション効率により、モザイク状に前庭部に CDX2 の発現と腸上皮化生を認めるにとどまった。このマウスを経時的に経過を追っても、CDX2 発現や腸上皮化生は進展しなかった。また、T1-Cdx2 マウスの壁細胞にヒトの胃炎や胃癌でみられる I11b の過剰発現、p53 変異、ピロリ菌感染を導入したマウスを作成した。これらのマウスでは、いずれも腸上皮化生の程度に変化は生じず、獲得免疫応答の活性を加えても腸上皮化生は進展しないことが示唆された。

(3) ゲノム編集オルガノイドを用いた腸上皮化生発生メカニズムの解析

ゲノム編集オルガノイドを用いた腸上皮化生発生メカニズムの解析に関しては、in vitro で腸上皮化生の誘導には Crispr/Cas9 システムが機能しなかったため、LSL-CDX2 マウスに胃前庭部レンチウイルスベクターを感染させ、Wnt, EGF, FGF の有無で MUC2 や CDX2 の発現を比較した。しかしながら、経時的にオルガノイドにおける cdx2 発現が減少してしまう事象が解決できず、定量が困難であった。

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 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Imai Satoshi,Ooki Takuya,Murata-Kamiya Naoko,Komura Daisuke,Tahmina Kamrunnesa,Wu Weida,Takahashi-Kanemitsu Atsushi,Knight Christopher Takaya,Kunita Akiko,Suzuki Nobumi,Del Valle Adriana A,Tsuboi Mayo,Hata Masahiro,Hayakawa Yoku et al.	4 . 巻 29
2 . 論文標題 Helicobacter pylori CagA elicits BRCAness to induce genome instability that may underlie bacterial gastric carcinogenesis	5 . 発行年 2021年
3 . 雑誌名 Cell Host & Microbe	6 . 最初と最後の頁 941 ~ 958.e10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chom.2021.04.006	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 該当する

〔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
---------	---------