

令和 3 年 10 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02364

研究課題名(和文) 舌・食道扁平上皮がん克服に向けた幹細胞階層構造解析と治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of lingual and esophageal epithelial stem cells and their hierarchy, and of target genes for cancer treatment

研究代表者

上野 博夫 (UENO, Hiroo)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：60332368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまで食道上皮組織には特異的成体幹細胞は存在しないとするDoupeらによる2012年サイエンス論文が定説となっていた。私達は多色細胞系譜追跡法にて食道上皮組織遺伝子A陽性細胞集団内にマウス食道上皮幹細胞が存在すること、単離した食道上皮組織およびそれに由来する食道オルガノイドの単一細胞RNAseq法にて発現遺伝子の網羅的解析とそれによる細胞のクラスタリングを行い、食道上皮幹細胞集団を特定、その特異的マーカーを複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまでその存在さえ明らかでなかった食道上皮幹細胞の詳細が明らかとなった。また、化学発がんモデルを用いてがん化した組織より当該幹細胞に相当する細胞集団(がん幹細胞候補細胞)とのsingle cell RNAseqの比較検討を行い、その差異を解析を通じて、これまで決め手となる分子標的療法にかけていた食道がんの新規分子標的療法開発への基盤が形成できた。

研究成果の概要(英文)：It has been proposed by Doupe et al (2012 Science) that the specific adult stem cells do not exist in the esophageal epithelial tissue. We by the multicolor cell lineage tracing method found that the gene A positive esophageal epithelial basal cells include esophageal epithelial stem cells. Also, by single cell RNAseq method of isolated esophageal epithelial tissue, and cell clustering based on the expressed genes, we identified a group of esophageal epithelial stem cells, and specific markers for them.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の研究の進展によりいくつかの悪性腫瘍に対する分子標的療法が開発され、これまで不治であった癌の一部が克服されつつある。代表的な成功例として慢性骨髄性白血病に対する ABL 阻害剤、肺非小細胞がんに対する ALK 阻害剤が挙げられ、劇的な予後の改善をもたらしている。しかし癌がその由来組織によって原因の異なる heterogeneous な疾患群である事から、その治療法開発はそれぞれの由来組織、原因遺伝子によって各論的になされる必要がある。食道及び舌扁平上皮がんは発症頻度・予後より克服すべき重要な疾患群であるが、これまで分子標的療法等の新世代治療法が開発が遅れており、その原因の 1 つにこれまで当該組織に存在する成体幹細胞が未同定であった事が挙げられていた。私達は最近多色細胞系譜追跡法にて舌上皮幹細胞(田中ら, 2013 Nat Cell Biol)及び食道上皮幹細胞(未発表)を同定した。舌と食道は胚葉起源の異なる隣接臓器と考えられていたが、予備的検討ではこれら幹細胞の細胞代謝動態、発現遺伝子は酷似しており、またともに発がん物質 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) 誘導性腫瘍内にがん幹細胞候補細胞の存在が確認されており、並行して解析する合理性があると考えられる。私達は舌がん幹細胞候補細胞の in vivo における挙動について多色細胞系譜追跡法にて解析し報告している(田中ら, 2019 Sci Rep)。

2. 研究の目的

本研究提案では、基本的にこれまでに同定された舌・食道上皮幹細胞と当該組織に存在する一過性増殖細胞との単細胞遺伝子発現解析を通して幹細胞の階層構造を明らかとし、その情報を 4NQO 投与発がんモデルマウスにおける扁平上皮がんの起源細胞、また、腫瘍形成後の腫瘍内がん幹細胞候補細胞の同定、またシングルセル遺伝子発現解析による特異的発現分子の同定などがん治療などの臨床応用へと結びつけて行くための手がかりとする事が目的である。

3. 研究の方法

(1) 舌および食道上皮組織内幹細胞階層構造の有無を解析する目的にてシングルセル遺伝子発現解析を行う。これまでの予備的解析において食道及び舌上皮組織において Sox2 は基底細胞層に広く発現しているが、は長期幹細胞および一過性増殖細胞双方に発

現していることから幹細胞マーカーとしては使えないが、上皮細胞から比較的未分化な細胞集団を純化するには有用であることが判明したため、Sox2 陽性細胞を Sox2-GFP マウスから FACS にて単離しシングルセル遺伝子発現解析を行うこととする。その結果を基に特徴的発現遺伝子パターンからの細胞集団クラスタリングを行い、長期幹細胞、一過性増殖細胞を特徴づける遺伝子群をリストアップする。

(2) 発がん物質 4NQO によるがん化モデルマウスを用いて食道がん、舌がんを発症させ、当該組織における悪性腫瘍の起源細胞と正常成体幹細胞の関係、また悪性腫瘍内の幹細胞としての性質を持つ細胞(がん幹細胞の候補となる細胞)と正常成体幹細胞との系譜関係を解析する。

(3) 上記で見いだされた舌がんおよび食道がん幹細胞候補細胞のシングルセル遺伝子発現解析、またそれらの正常幹細胞、一過性増殖細胞クラスタとの比較から、がん幹細胞候補細胞群を特徴づける遺伝子群をリストアップする。

(4) これらを通して治療標的候補遺伝子を選定、さらに余裕があればがん幹細胞標識マウスを作製、Cre 誘導性にジフテリア毒素を発現するマウスを用いて腫瘍モデルでのがん発生抑制効果、腫瘍内がん幹細胞候補細胞除去効果などを検証していく。

4. 研究成果

これまで、他の消化管上皮組織(大腸、小腸、胃、舌など)と異なり、食道上皮組織には特異的成体幹細胞は存在しないとする論文が 2012 年サイエンスに発表(Doupe et al, 2012 Science)され、これが定説となっていた。しかしながら、私達のこれまでの解析によって食道上皮組織にも長期成体幹細胞に相当する細胞群が存在することが示されており、定説と異なるものであった。また本研究によって食道上皮組織の細胞維持機構、障害後再生機序、がん化メカニズムなどの研究分野で大きな進展が期待され、またそれに基づいた食道上皮組織の再生医療、食道がんの分子標的薬の開発などの研究の発展が期待できる。まず、多色細胞系譜追跡法にて食道上皮幹細胞の存在を検証した。その結果遺伝子 A 陽性細胞内に特異的成体幹細胞が存在することが判明した。この結果をより詳細に解析するために、マウス食道上皮未分化細胞マーカー Sox2 を用いてマウス食道上皮組織およびそれに由来する食道オルガノイドより Sox2 陽

性細胞を単離、単一細胞 RNAseq 法にて発現遺伝子の網羅的解析を行った。その結果に基づき、発現遺伝子による細胞のクラスタリングを行うことで、食道上皮幹細胞集団を特定、その特異的マーカーを複数同定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

1. (発表論文) Intestinal stem cells contribute to the maturation of the neonatal small intestine and colon independently of digestive activity. Yanai H and Ueno H. (18人中、研究代表者18番目) **Sci. Rep.** (査読あり) doi:10.1038/s41598-017-09927-2 (2017)
2. (発表論文) Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem cell self-renewal. Yan KS and Ueno H. (31人中、研究代表者19番目) **Nature** (査読あり) 545, 238-242 (2017)
3. (発表論文) Identification of mouse cochlear progenitors that develop hair and supporting cells in the organ of Corti. Jinshu Xu, Ueno H., Chelsea Xu, Binglai Chen, Irving Weissman, and Pin-Xian Xu. **Nat. Comm.** (査読あり) doi:10.1038/ncomms15046 (2017)
4. (発表論文) Intestinal cancer stem cells marked by Bmi1 or Lgr5 expression contribute to tumor propagation via clonal expansion. Yanai H, and Ueno H. (18人中、研究代表者18番目) **Sci. Rep.** (査読あり) doi:10.1038/srep41838 (2017)
5. (発表論文) Bmi1-positive cells in the lingual epithelium could serve as cancer stem cells in tongue cancer. Tanaka T, and Ueno H. (17人中、研究代表者17番目) **Sci. Rep.** (査読あり) doi:10.1038/srep39386 (2016)
6. (発表論文) Lingual epithelial stem cells and organoid culture of them. Hisha H, Tanaka T, and Ueno H. **Int. J. Mol. Sci.** (査読あり) doi:10.3390/ijms17020168. (2016)
7. (発表論文) Identification of normal and neoplastic stem cells by the multicolor lineage tracing methods. Ueno H. **Pathol. Int.** (査読あり) doi:10.1111/pin.12425 27345364(2016)
8. (発表論文) Organoid Culture of Lingual Epithelial Cells in a Three-Dimensional Matrix. Hisha H, Ueno H. **Methods Mol. Cell. Biol.** (査読あり) doi:10.1007/7651 2016 3 27539458 (2016)
9. (発表論文) Maintenance of sweat glands

by stem cells located in the acral epithelium. Ohe S, Ueno H. (19人中、研究代表者19番目) **Biophys. Biochem Res. Commun.** (査読あり)

- doi:10.1016/j.bbrc.2015.09.022 (2015)
10. (発表論文) Intracellular signals of lung cancer cells as possible therapeutic targets. Tanaka K, Kumano K, and Ueno H. **Cancer Sci.** (査読あり) CAS-SRA-1179-2014.R1 (2015)
 11. (発表論文) Intestinal stem cells contribute to the maturation of the neonatal small intestine and colon independently of digestive activity. Yanai H, and Ueno H. (18人中、研究代表者18番目) **Sci. Rep.** (査読あり) DOI: 10.1038/s41598-017-09927-2 (2017)
 12. (発表論文) Intestinal cancer stem cells marked by Bmi1 or Lgr5 expression contribute to tumor propagation via clonal expansion. Yanai H, and Ueno H. (18人中、研究代表者18番目) **Sci. Rep.** (査読あり) DOI: DOI: 10.1038/srep41838 (2017)
 13. (発表論文) Identification of mouse cochlear progenitors that develop hair and supporting cells in the organ of Corti. J. Xu, H. Ueno, C. Y. Xu, B. Chen, I. L. Weissman and P. X. Xu. (6人中、研究代表者2番目) **Nat. Comm.** (査読あり) 8, 15046 (2017)
 14. (発表論文) Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16(high) Cells In Vivo. Ishigaki K, and Ueno H. (33人中、研究代表者26番目) **Cell Metab.** (査読あり) 32, 814-828 (2020)
 15. (発表論文) Cellular basis of omentum activation and expansion revealed by single-cell RNA sequencing using a parabiosis model. Ishigaki K, and Ueno H. (4人中、研究代表者4番目) **Sci. Rep.** (査読あり) DOI: 10.1038/s41598-021-93330-5 (2021)

[学会発表](計 9 件)

1. (招待講演) 第 65 回群馬大学保健学公開セミナー
「多色細胞系譜追跡法を用いた成体幹細胞研究」上野博夫(2016)
2. (招待講演) 第 15 回日本再生医療学会総会 特別講演「多色細胞系譜追跡法による幹細胞・発生研究」上野博夫(2016)
3. (招待講演) 第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会
「多色細胞系譜追跡法による新規成体幹細胞、がん幹細胞の同定」上野博夫 (2016)
4. (招待講演) EMBO|EMBL Symposium: Organoids: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture

(Germany)「Organoids of tongue and esophagus」 Ueno H (2016)

5. (招待講演) 第104回日本病理学会総会「新規成体幹細胞の同定とがん化における細胞動態解析」 上野博夫 (2015)

6. (招待講演) 関西眼科先進医療研究会「多色細胞系譜追跡による成体幹細胞の同定・発生・がん化研究」 上野博夫 (2015)

7. (招待講演) 平成27年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」支援説明会・公開シンポジウム「多色細胞系譜追跡法による成体幹細胞・がん幹細胞の解析」 上野博夫 (2015)

8. (招待講演) 第74回日本癌学会学術総会「Identification of normal and cancer stem cells and their niche」 上野博夫 (2015)

9. (招待講演) BMB2015(第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学大会合同大会)「Identification of novel stem cells by the multicolor lineage tracing method」 上野博夫 (2015)

[受賞]

2019年度 日本再生医療学会学会賞(基礎部門) 上野博夫

[産業財産権]

該当無し

出願状況(計 件)

該当無し

取得状況(計4件)

名称: 舌上皮幹細胞とそれに由来する細胞塊

発明者: 上野博夫

権利者: 学校法人関西医科大学

種類: 特許

番号: 2018-055301

取得年月日: 2018.03.22

国内外の別: 国内

名称: 舌上皮幹細胞の単離方法

発明者: 上野博夫

権利者: 学校法人関西医科大学

種類: 特許

番号: 2013-118649

取得年月日: 2013.6.5

国内外の別: 国内

名称: 食道上皮幹細胞の単離方法

発明者: 上野博夫

権利者: 学校法人関西医科大学

種類: 特許

番号: 2013-118652

取得年月日: 2013.6.5

国内外の別: 国内

名称: 造血幹細胞増殖調節因子及びそれを

コードするポリヌクレオチド

発明者: 上野博夫

権利者: 独立行政法人科学技術振興機構・国立がん研究センター

種類: 特許

番号: 2007-025808

取得年月日: 2007.2.5

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www3.kmu.ac.jp/pathol1/member.html>

<https://researchmap.jp/read0079199>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 博夫 (UENO Hiroo)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60332368

(2) 研究分担者

厚海 奈穂 (ATSUMI Naho)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90612151

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し