

令和 4 年 10 月 26 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H00861

研究課題名(和文) ヒトミニ胃組織を用いた胃がん病態の究明と創薬応用

研究課題名(英文) Pathological analysis and drug discovery for stomach cancer using human stomach organoids

研究代表者

栗崎 晃 (Kurisaki, AKIRA)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：60346616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はピロリ菌に感染した胃の疾患モデルの作製を目的とした。既にマウスES細胞から機能的なミニ胃組織オルガノイドを作製する培養方法を開発しており、胃がんモデルオルガノイドの作製を急ぐため、培養方法と前がん状態作製方法が確立しているマウスES細胞分化系でピロリ菌の主要病原性遺伝子を発現誘導可能なノックインES細胞を樹立を進めた。しかし、ES細胞は徐々に外来遺伝子を発現しなくなる問題があり、発現誘導株の樹立に時間を要している。一方、ヒトiPS細胞を用いた胃オルガノイド作製は、胚様体形成、内胚葉誘導条件、胃前駆細胞分化条件の培地の最適化を行い、前半部分の目的が立った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では既に作製方法を確立済みのマウス胃オルガノイドを利用して、病原タンパク質を発現するES細胞を樹立したが、徐々に発現量が低下する問題があり、原因究明中である。また、ヒトiPS細胞を用いた胃オルガノイドの作製に関しては、胃の前駆細胞を作製する分化培養条件を最適化することができた。今後この研究を進めることで、将来的にはピロリ菌病原タンパク質を発現させたミニ胃組織(胃オルガノイド)を幹細胞からシャーレの中で作製し、ピロリ菌に感染した胃の細胞で起こる現象を詳細に解析することや新たな治療薬の探索が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to create an in vitro disease model of the stomach infected with *H. pylori* using stomach organoid. We had developed a culture method to produce functional mini-stomach tissue organoids and the precancerous state model of the organoids from mouse ES cells. In this research, we took advantage of this system to establish several knock-in ES cell lines capable of inducing the major pathogenic gene of *H. pylori*. However, these ES cells gradually decreased the induction of exogenous genes with unknown reasons. For the differentiation of mini-stomach tissue using human iPS cells, the medium and culture conditions for embryoid body formation, foregut endoderm induction, and gastric progenitor cell differentiation were optimized.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：胃 分化 幹細胞 遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胃がんはわが国では肺がんに次いで患者数の多いがんであり、毎年 10 万人が胃がんと診断され、5 万人が胃がんで死亡している。ピロリ菌は胃炎・胃潰瘍との関連が示されており(1)、長年のピロリ菌感染が胃がんの重大なリスク要因であることがわかっている。ピロリ菌は世界の半数が感染しているが、特に日本、韓国、中国をはじめ、東アジアで蔓延しているピロリ菌は胃がんを発症しやすい菌種であり、早期のピロリ菌除去が胃がんの発症を抑制する有効な方法であることが報告されている(2)。今後衛生状態の改善や抗生剤による除菌でピロリ菌感染者は減少し、胃がんの発生も減少していくと考えられるが、昨今 20 - 40 代の若い女性で多い浸潤性のスキルス胃がんや胃食道逆流症に由来するがんは依然として難治がんである。また胃がん動物モデルは有用なものが少なく、胃がんの発症メカニズムの解明にも時間を要している。

我々はこれまでに、多能性幹細胞であるマウス ES 細胞からミニ胃組織(オルガノイド)を試験管内で作製する培養技術を開発している。この胃組織は内側に胃腺構造を有し外側を平滑筋組織に覆われた蠕動運動をする直径 2mm 程度の風船状組織であり、ペプシノゲンなどの消化酵素やムチン粘液を分泌し、ヒスタミンに应答して胃酸を分泌する機能的な胃組織である。我々はさらにこの機能的ミニ胃組織作製技術を応用して試験管内で胃がんの前がん状態に相当するメネトリエ病モデルを作製している。本疾患は上腹部痛、嘔吐、下痢や低蛋白血症を示し、進行すると胃酸やペプシンの分泌低下や低酸症が起こるが、腺萎縮と腺窩上皮過形成が特徴で TGF $\beta$  の増加も報告されている。実際に TGF $\beta$  をミニ胃組織で高発現させると胃上皮の著しい肥厚と粘液分泌増加、胃酸の減少が観察され、本病態を *in vitro* で再現することが可能であることを示している(3)。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、我々のミニ胃組織作製技術をさらに発展させて、ピロリ菌感染依存的に発生する胃がん初期形成過程のモデルを作製し、発がんメカニズムの解明を一段と加速することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、初期の胃がんモデルを作製する技術を構築するため、胃がんの発症メカニズムの解明や将来的な治療薬候補のスクリーニングに用いることができる胃がん評価基盤技術の構築を目指し研究を行った。特に本研究では、以下の A と B の 2 つの課題を解決し、胃がん初期発症機構の解析を可能にする *in vitro* で作製したミニ胃がんモデルの構築を試みた。

#### A. ヒトミニ胃組織作製技術の構築

本研究では、我々のマウス胃組織分化培養方法を改良し、分化能力が低いヒト iPS 細胞でも安定して胃組織へと分化させることができる培養プロトコルを構築する。具体的には、A1. 胃組織前駆組織の作製効率の向上、A2. 作製した胃組織の成熟化方法の改良の 2 つの課題を解決することで、ヒトミニ胃組織作製技術の構築を目指した。

#### B. ピロリ菌感染胃組織の病態モデルの作製

ピロリ菌の病原性遺伝子などを発現誘導するマウス ES 細胞やヒト iPS 細胞を樹立して、初期の胃がん組織発症過程を模倣した胃組織を作製し、その病態モデルとしての有用性を検証する。

### 4. 研究成果

#### A1. ミニ胃組織のもととなる胃組織前駆組織の作製効率の向上

我々のこれまでの予備的検討では、ヒト iPS 細胞とマウス ES 細胞はかなり性状が異なることから、ヒト胃オルガノイドを作製には十分な条件検討が必要であることが分かっている。例えば、マウス ES 細胞と同様にヒト iPS 細胞を単一細胞までに解離すると細胞死を引き起こしやすいこと、またマウス ES 細胞に比べて細胞増殖速度が遅いため、iPS 細胞の培養にフィーダーとして使用する線維芽細胞の混入が多くなると分化開始時の iPS 細胞胚様体の性状が劣化し、効率よく分化誘導できないことなどが分かっている。

そこでフィーダー無しで培養したヒト iPS 細胞を様々な市販の基礎培地を組合せて比較検討し、qRT-PCR で初期内胚葉マーカーの発現を解析することで胚様体形成培地条件を最適化した。その結果、安定して胚葉体系性が可能な培地や胚葉体形成に最適な細胞数を見出した(図 1)。さらにアクチビンなどの前方内胚葉誘導に使用する細胞増殖因子の処理条件を改変することで、

安定した初期分化誘導条件を構築した。また、分化培養系の再現性を高め分化培地コストを抑えるため、ロット差が出やすい上に高価なタンパク質製品である細胞増殖因子を低分子化合物に置き換えたプロトコル作りも進めており、低分子化合物の処理濃度や処理時間の検討を進めている。このようにして培養条件を最適化し、さらに3次元培養することで立体的な胃前駆細胞組織を作製できるようになりつつある(図2)。

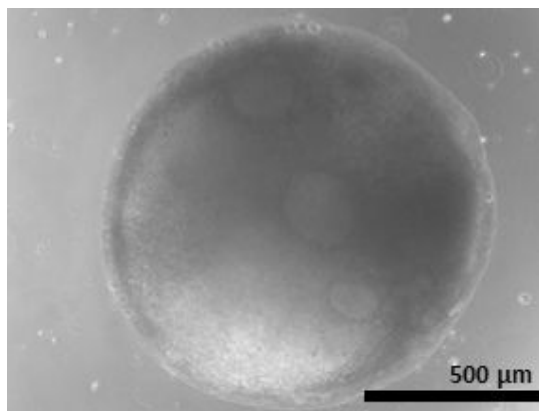


図1．最適化した培地で作製したヒト iPS 細胞由来の胚様体 (Day6)。

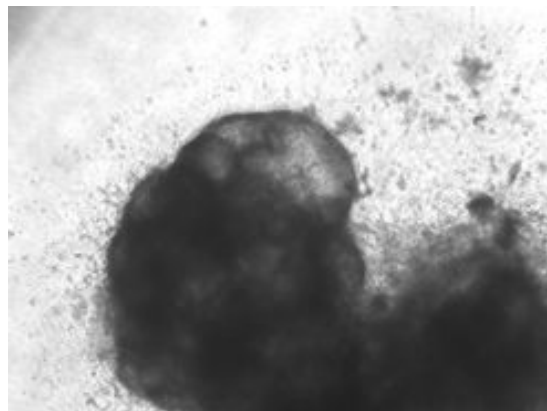


図2．3次元培養によりヒト iPS 細胞から作製した胃前駆細胞組織。

## A2．作製した胃組織の成熟化方法の改良

ES 細胞や iPS 細胞のような非常に未分化な多能性幹細胞は、*in vitro* の分化培養で胎児や新生児の組織と類似の組織へと分化するが、大人の非常に成熟した組織までは分化しにくいことが経験的に知られている。

そこで本研究では、マウスの胎児の胃組織と大人の胃組織について次世代シーケンサーを用いた発現比較解析を行っている。特に成体の胃組織で活性化しているシグナルを Gene Ontology 解析や Gene Set Enrichment Analysis など解析することで、成熟化シグナル候補を選択中である。さらにそれらバイオインフォマティクス解析でリスト化されたシグナル経路の真偽を *in vitro* のオルガノイド分化誘導系で検証することで、ヒト iPS 細胞から高精度で高度に成熟化した胃組織を作製する培養条件の最適化を進めている。

## B．ピロリ菌感染胃組織の病態モデルの作製

我々は既に機能的な胃組織を分化誘導できているマウス ES 細胞を用いて、ピロリ菌の病原性遺伝子などを発現誘導するノックイン ES 細胞株を樹立した。当初複数の細胞株の樹立に成功したが、その後徐々に発現が低下し、ピロリ菌病原遺伝子の発現を観察することができなくなった。この原因として発現誘導していない状態で僅かに発現したピロリ菌病原遺伝子が ES 細胞に悪影響を与えているのではと考えているが詳細な原因は不明である。現在、分化した胃オルガノイドに病原遺伝子を発現させる新たな発現システムの構築を検討している。

以上、胃がん初期発症機構の解析を可能にするミニ胃がんモデルの前半部分についてはヒト iPS 細胞を用いて構築できたが、十分成熟化した胃組織の作製までは至っていない。今後、上記解析で同定した成熟化シグナルの有効性を検証することで、ピロリ菌感染依存的に発生する胃がん初期形成過程のモデルのベースとなる機能的な胃組織を3次元培養の最終分化誘導により *in vitro* で作製する予定である。さらに、ピロリ菌病原遺伝子を成熟化した胃組織で発現させ、本研究の最終目的である病態モデルとしての有用性を検証する予定である。

## 引用文献：

- 1) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1984; 1311-15.
- 2) Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. Helicobacter Pylori Infection and the Development of Gastric Cancer. *N Engl J Med*, 345: 2001; 784-789.
- 3) Noguchi TK, Ninomiya N, Sekine M, Komazaki S, Wang PC, Asashima M, Kurisaki A. Generation of stomach tissue from mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 17: 2015; 984-993.

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 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akira Kurisaki
2. 発表標題 Differentiation of pluripotent stem cells and the regulatory mechanisms
3. 学会等名 3rd International Conference for Molecular Biology and Biotechnology (ICMBB) 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Kurisaki
2. 発表標題 Generation of stomach tissue from embryonic stem cells
3. 学会等名 Dazan Conference 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 栗崎晃、高田仁実 (分担執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 368 (この内P126-137を執筆)
3. 書名 オルガノイド実験スタンダード (12章 胃オルガノイド)	

1. 著者名 Takaaki, k. Noguchi, Akira Kurisaki (分担執筆)	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 248 (この内P217-228を執筆)
3. 書名 Organ Regeneration: 3D Stem Cell Culture & Manipulation (Methods in Molecular Biology)	

〔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
研究分担者	原本 悦和  (Haramoto Yoshikazu)  (30540869)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員   (82626)	
研究分担者	畠山 昌則  (Hatakeyama Masanori)  (40189551)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授   (12601)	
研究分担者	高田 仁実  (Takada Hitomi)  (80641068)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教   (14603)	

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
---------	---------