

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02639

研究課題名(和文) 成体上皮細胞の組織アイデンティティを特定するエピジェネティック修飾の解明

研究課題名(英文) Investigation of epigenetic modifications that specify tissue identity of adult epithelial cells

研究代表者

三好 弘之 (Miyoshi, Hiroyuki)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30362479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では消化器系臓器の上皮幹細胞および大腸がん幹細胞が外部環境に影響されることなくそのアイデンティティを維持するメカニズムの解明を目的として、生体由来の上皮幹細胞培養系(スフェロイド培養)を用いた研究を行なった。正常上皮幹細胞では、転写因子の発現とオープンクロマチン領域の近縁性が器官発生の過程をほぼ再現しており、特に肝臓と膵臓の幹細胞に高い近縁性が認められた。また、悪性度の高いWnt低活性型の大腸がん細胞がWntシグナルをバイパスして細胞増殖や幹細胞性を維持する分子機構を探索した結果、MYCの安定的発現がその一部であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で様々な組織から分離した上皮幹細胞を横断的に比較解析することにより、転写因子の組み合わせと強固なエピジェネティック修飾によって厳格に規定された臓器特異性の理解が進んだ。また、組織幹細胞の自家移植による組織修復の可能性が示された。

本研究で樹立した患者由来大腸がんスフェロイドは治療法開発のための有用な材料である。これらの培養でがん幹細胞が維持されるメカニズムを解明することにより、幹細胞性をターゲットとした治療戦略の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated molecular and genetic mechanisms in which tissue and cancer stem cells specify their identity. Using a stem cell spheroid culture system, we demonstrated that transcriptional and epigenetic landscapes of normal tissue stem cells recapitulated their developmental stages. In colorectal cancer cells with low Wnt/beta-catenin signaling, cell growth and stemness were promoted partly by constitutive expression of MYC.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：エピジェネティクス スフェロイド培養 組織幹細胞 癌幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚盤胞の内部細胞塊は発生段階を経て様々な組織幹細胞に分化する。このプロセスで、個々の細胞のゲノムには自律性のプログラムや微小環境からのシグナル入力を通して誘導される様々なエピジェネティック修飾が付加される。成熟した組織幹細胞は個体の生涯を通して安定的に各組織の系列細胞(lineage cell)を産生するが、近年の研究では、スーパーエンハンサーと呼ばれる大規模なエピジェネティック修飾が組織アイデンティティを特定していることが示唆されている。近年胃腸管や肝臓などの正常上皮細胞を培養することが可能になり、培養条件下でも系列細胞を産生する能力が長期間にわたって維持されることが示された。よって、これらの細胞の組織アイデンティティを特定するスーパーエンハンサーはシグナル非依存的な転写因子群によって構成されていると考えられる。

組織アイデンティティとは異なり、上皮細胞の幹細胞性は微小環境からの古典的 Wnt シグナル (以下 Wnt シグナル) に依存して維持されている。間質細胞から分泌される Wnt リガンドと R-spondin はβカテニン依存性の転写を誘導し、増殖性と幹細胞性を維持する。しかし我々は小腸上皮幹細胞へのプロスタグランジン E2 投与によって起こるβカテニンの核内移行が下流の遺伝子発現を誘導しないことを示しており、正規の Wnt シグナルの下流では TCF/Lef のリプレッサーである Gro/TLE の不活性化が並行して起こっている可能性が示唆された。上皮性のがん細胞の多くでは古典的 Wnt 経路が細胞自律的に活性化しており、細胞外の Wnt リガンドに依存しない。大腸がん細胞では高頻度で APC 遺伝子の変異が起こっており、APC の欠損によって蓄積したβカテニンが古典的 Wnt 経路下流の遺伝子群の発現を活性化する。しかし APC やβカテニン遺伝子に変異のない場合は、エピジェネティック修飾ががん化のドライバーとなっている可能性がある。例えば、がん組織特異的なスーパーエンハンサーの形成によって、本来 Wnt シグナルの制御下にある myc が安定的に高発現することが知られている。また、TCF/Lef や Sp5/8 などのβカテニン複合体の構成因子がエピジェネティック修飾によって過剰発現している可能性も示唆される。

以上の知見から、成体組織上皮細胞およびがん細胞の組織アイデンティティは細胞外環境の影響を受けにくい安定的なエンハンサーによって維持されていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の全体的な目的は、正常上皮幹細胞およびがん幹細胞において安定的に発現が維持されている転写遺伝子群とそのゲノム上の結合領域を同定し、成体組織上皮細胞のアイデンティティを特定するエピジェネティック制御機構を明らかにすることである。さらに、得られた知見を基に分化転換(transdifferentiation)および正常細胞の腫瘍化が一過性の遺伝子発現によって誘導されるかどうかを検証する。具体的には、内胚葉由来組織(肺、胸腺、肝臓、膵臓、胃、小腸、大腸)の上皮細胞および大腸がん細胞を対象にして、各組織から分離した上皮幹細胞スフェロイドのエピジェネティック修飾を同定・比較し、組織アイデンティティを特定する転写遺伝子群の発現がシグナルに依存しないエンハンサーによって安定的に維持されている可能性を検証する。また、マウス大腸腫瘍スフェロイドおよびヒト大腸がんスフェロイドのエピジェネティック修飾とそれらの Wnt シグナル経路への影響を解明し、がん組織特異的なエンハンサーの形成により Wnt 非依存的に増殖能と幹細胞性が維持される可能性を検証する。

本研究により、組織アイデンティティが細胞自律的に維持される機序およびその可塑性が明らかになり、成体の上皮幹細胞が個体の生涯にわたって安定的に系列細胞を産生する分子的背景と、異所性に形成されたエピジェネティック修飾が正常細胞のがん化を誘導する機序が解明されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 組織幹細胞スフェロイドの樹立

A. マウス組織幹細胞スフェロイド

正常マウス(C57BL/6)の胸腺、肺、胃(corpus)、肝臓、膵臓、小腸(jejunum)、大腸(distal colon)、腎臓を摘出し、コラゲナーゼ処理により上皮細胞を分離した。これらを Wnt3a、R-spondin 3、Noggin を含む L-WRN 培地で培養し、上皮幹細胞スフェロイドを樹立した。また、Apc 変異マウス小腸に発生した腺腫より分離した上皮細胞を L-WRN 培地を含まないがんスフェロイド培養培地で培養し、腫瘍上皮スフェロイドを樹立した。マウスを用いた実験は京都大学動物実験委員会の承認を得て行った。

B. 大腸がん患者由来スフェロイド

大腸がん患者より摘出した腫瘍組織と隣接する正常組織を切り出し、コラゲナーゼ処理により上皮細胞を分離した。これらをごんスフェロイド培養培地(がん上皮)または L-WRN 培地(正常上皮)で培養し、スフェロイド株を樹立した。ヒト試料を用いた実験は京都大学医の倫理委員会の承認を得て行った。

(2) スフェロイドのマイクロアレイ発現解析

マウススフェロイドから RNA を抽出し、アジレント社マイクロアレイ(SurePrint G3 Mouse Gene Expression Microarray 8X60K)を用いて発現解析を行なった。患者由来大腸がんスフェロイドについても SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray 8X60K を用いて同様に解析を行った。

(3) 患者由来大腸がんスフェロイドの変異解析：

患者由来大腸がんスフェロイドの遺伝子変異背景を明らかにするため、サーモフィッシュャー社 Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel (409 遺伝子) を用いたターゲットシーケンスによる変異解析を行なった。

(4) スフェロイドの ATAC-seq 解析

正常マウス (C57BL/6) の肝臓、膵臓、小腸、および Apc 変異マウス小腸腺腫スフェロイドをトリプシンと 1 μm セルストレーナーを用いて単一細胞まで分解し、Tn5 トランスポゼースを用いて ATAC-seq 解析を行なった。患者由来大腸がんスフェロイドについても同様の解析を行なった。

(5) スフェロイドへの遺伝子導入と CRISPR/CAS9 による変異導入

スフェロイド細胞への持続的な遺伝子導入は組換えレンチウイルスの感染により行なった。一時的発現のためのプラスミド導入には Lipofectamine 2000 を用いた。CRISPR/CAS9 システムによる変異導入には PrecisionX T7Cas9 SmartNuclease Vector System (SBI 社) を用いた。

(6) 上皮幹細胞スフェロイドの分化能解析

A. In vitro 解析

幹細胞スフェロイド細胞の in vitro 分化能を明らかにするため、Cell Recovery Solution でマトリゲルを除去して回収したスフェロイドを低接着プレート中で 4-14 日間浮遊培養した。

B. In vivo 解析

幹細胞スフェロイド細胞の生体内での分化能を明らかにするため、マウス幹細胞スフェロイドを同系の B57BL/6J マウス腎臓被膜下に移植した。移植 2 ヶ月後にマウスより腎臓を摘出し、組織標本を作製した。

4. 研究成果

(1) 簡便なスフェロイド遺伝子導入法の開発

生体組織から樹立した上皮オルガノイド・スフェロイドはリポソームによる DNA 導入効率が低いことが知られている。近年効率の高い電気穿孔法が開発されたが、機器が高価であり手順も複雑である。リポソーム法での低導入効率は、DNA-脂質複合体がオルガノイド・スフェロイドを構成する個々の細胞に効率的にアクセスできないことによると考えられた。そこで、スフェロイドをトリプシン処理後、1 μm のセルストレーナーをシリンジ吸引により通過させることでほぼ単一細胞にまで分散した。Opti-MEM で定法通り調整した Lipofectamine 2000-EGFP 発現プラスミド DNA 複合体溶液中にスフェロイド細胞を分散させて FBS (10%) と ROCK 阻害薬 (Y27632, 10 μM) を添加し、6 時間 37°C で保温した後細胞を回収してマトリゲル中で培養した。1 日後に EGFP 陽性細胞の割合を算出したところ、電気穿孔法と同等の導入効率 (約 20%) を達成した (図 1)。ROCK 阻害薬を使用しないことにより、導入効率は 30% に改善したが、スフェロイドの由来組織によっては細胞の生存率が下がるため注意が必要である。

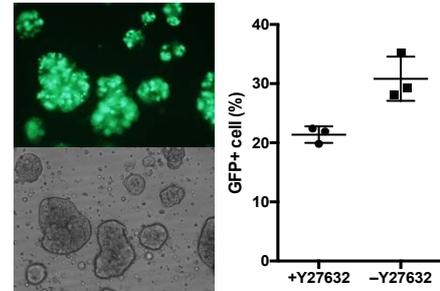


図 1 (左) EGFP 発現プラスミドを導入したヒト大腸上皮スフェロイド。(右) スフェロイド細胞の EGFP 発現効率。

(2) マイクロアレイ解析による組織特異的転写因子の同定

上皮幹細胞スフェロイドの RNA の発現プロファイルから転写因子 (1707 遺伝子) を抽出し、階層的クラスタリング解析を行ったところ、発生過程とほぼ関連して近縁性が保たれていることがわかった (図 2)。3 種類以下の組織で高発現している組織特異的転写因子 (175 遺伝子) の発現プロファイルを用いた解析でも同様の結果が得られた。消化器組織 (胃、肝臓、膵臓、小腸、大腸) は 1 つのクラスターを形成し、特に肝臓と膵臓が高い近縁性を示した。

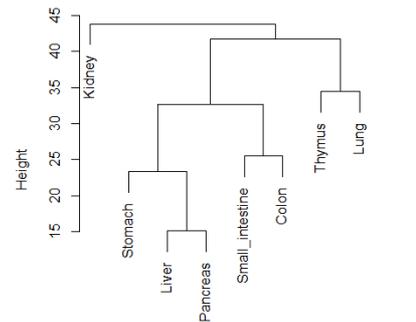


図 2 上皮幹細胞スフェロイドの階層的クラスタリング解析 (樹形図)。

(3) マウス上皮組織および腫瘍組織スフェロイドの ATAC-seq 解析
組織特異的エンハンサー領域を同定するため、アセチル化ヒストンの ChIP-seq 解析を検討したが、スフェロイドから得られる細胞数に制限があり解析の精度が低下することが予想されたため、少ない細胞数でも解析が可能な ATAC-seq に変更した。予備検討の結果、非特異的ノイズが広範に検出されたが、死細胞由来の DNA がスフェロイド細胞塊の内部に残存しており前処理の段階で DNase がアクセスできないためと考えられた。そこで、1 μm メッシュによりスフェロイドをほぼ単一細胞にまで分解したところ、ノイズの少ない明瞭な結果が得られた。改善した方法を用いて、

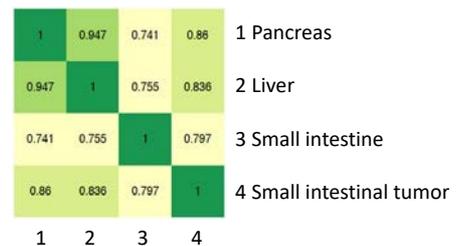


図 3 ATAC-seq ピークの相関係数ヒートマップ。

肝臓、膵臓、小腸の上皮幹細胞スフェロイドと、*Apc* 変異マウスの小腸腺腫スフェロイドのオープンクロマチン領域を検出した。ピーク解析では mRNA 発現プロファイルと同様に肝臓スフェロイドと膵臓スフェロイドの間で高い相関が見られた。興味深いことに、小腸腺腫のピークパターンは由来組織である小腸よりも肝臓・膵臓スフェロイドに高い相関を示した(図3)。組織特異的に発現する転写因子のゲノム領域を検索したところ、膵臓スフェロイドの *Nkx2-2* 遺伝子座で広範囲のオープンクロマチン領域が検出された(図4)。

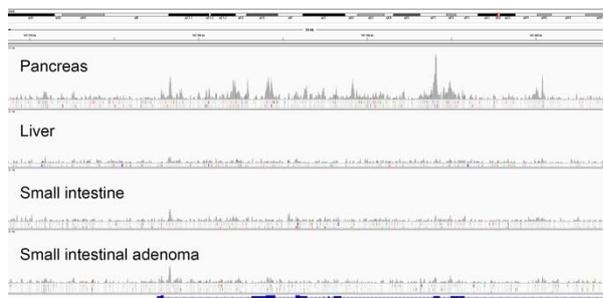


図4 膵臓スフェロイドに形成された *Nkx2-2* 遺伝子座のオープンクロマチン領域(最上段)。

(4) 上皮幹細胞スフェロイドの分化能解析

マトリゲルに包埋した上皮幹細胞スフェロイドを L-WRN 培地を含まない基礎培地で培養すると増殖は速やかに停止し、幹細胞性は不可逆的に失われる。しかし、ヒト大腸スフェロイドを用いた実験では完全に分化した細胞が得られなかったことから、培養条件が分化に適していないと考えられた。そこで、iPS 細胞から膵島細胞への *in vitro* 分化の最終段階で用いられる培養法を参照し、マトリゲルを取り除いたスフェロイドを低接着培養プレートで浮遊培養した。分化を促進するため、培養液には BMP 受容体阻害薬および Notch 阻害薬を添加した。この条件では、大腸幹細胞は colonocyte (吸収上皮細胞) や goblet cell (杯細胞) へ完全に分化した。同様の条件下で、マウス肝臓スフェロイドは胆管上皮様に分化した(図4)。マウス膵臓スフェロイドは *in vitro* で組織学的に明瞭な分化傾向を示さなかった(図5)。膵管細胞と膵島細胞は共通の前駆細胞から分化し、膵臓上皮オルガノイドは両者への分化能を持つと報告されている。さらに *in vivo* での分化能を検討するため、1日間浮遊培養した肝臓および膵臓スフェロイドを同系マウスの腎被膜下に移植し、2ヶ月後に生着した細胞を観察した。膵臓スフェロイドは腎被膜下で膵島様の細胞形態と組織構造を示したが、膵島特異的遺伝子の発現は確認できず、分化の途中であると考えられた。肝臓スフェロイド細胞は胆管とほぼ同一の上皮構造を形成した(図5)。これらの結果から、自家移植した上皮幹細胞スフェロイド細胞が長期間にわたって維持されることが示された。

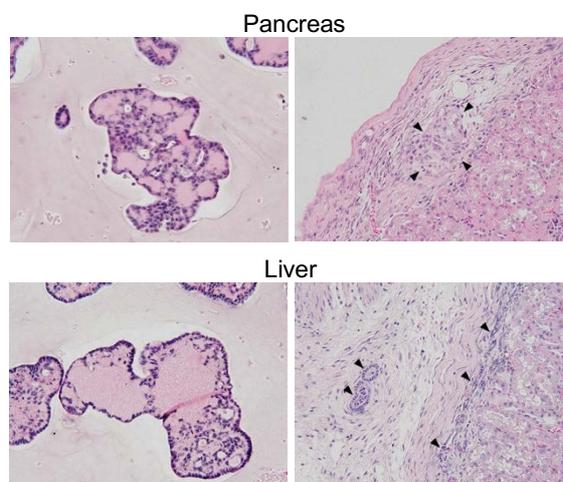


図5 膵臓スフェロイド(上段)および肝臓スフェロイド(下段)の *in vitro* 分化後(14日間)の組織像(左)と腎被膜下移植後(2ヶ月間)の組織像(右)

(5) 肝臓上皮幹細胞スフェロイドへの膵臓特異的転写因子の導入

ATAC-seq 解析の結果から、大規模なオープンクロマチン領域が存在する *Nkx2-2* が膵臓上皮のアイデンティティを規定する最も重要な因子であると考えられた。そこで、*Nkx2-2* を肝臓スフェロイドに発現させることにより、膵臓スフェロイドの形質を獲得することができるかどうかを検討した。まず *Nkx2-2* 遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを作製し、肝臓スフェロイドに感染させたが、導入した遺伝子の mRNA 発現が見られなかった。次にプラスミドトランスフェクションによる一過性発現を試みたが、やはり *Nkx2-2* mRNA は検出されなかった。次にイントロン上に制御領域が存在する可能性を考慮して、*Nkx2-2* のゲノム領域を含む DNA 断片を用いて一過性発現を試みたが、mRNA の発現は確認できなかった。293T 細胞では問題なく発現したことから、肝臓スフェロイド細胞に *Nkx2-2* mRNA 発現を強力に抑制する機構が存在する可能性が示唆されたが、技術的な問題の可能性も排除できないため、引き続き原因を究明している。

(6) 患者由来大腸がんスフェロイド株の Wnt シグナル標的遺伝子発現量による分類

大腸がんスフェロイドの mRNA 発現プロファイルを調べるため計 33 株のマイクロアレイ解析を行い、Wnt シグナルの標的遺伝子である *LEF1* と *AXIN2* の発現レベルが低い 2 株 (CRC#1、CRC#2) に着目した(図6)。この 2 株で高発現する遺伝子を検索したところ、*HOXC4*、*HOXC6*、*MEIS2* が見出された。TCGA のデータベースでは、これらの遺伝子を高発現する

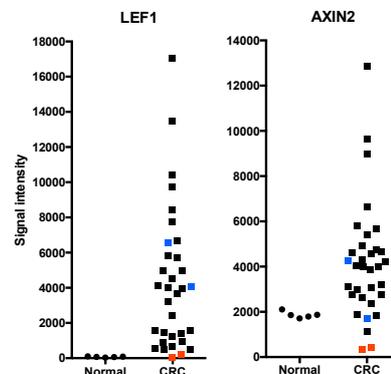


図6 ヒト大腸正常上皮(Normal)および大腸がん(CRC)スフェロイドの *LEF1* および *AXIN2* 発現レベルの分布。(赤) Wnt 低活性株(#1、#2)。(青) ATAC-seq 解析の対照株(#3、#4)。

大腸がん患者は予後が悪かった。

(7) Wnt 低活性大腸がんスフェロイド株の ATAC-seq 解析
 Wnt 低活性大腸がんスフェロイド 2 株 (CRC#1, CRC#2) と対照の 2 株 (CRC#3, CRC#4) の ATAC-seq 解析を行った。ピーク解析ではグループ間に明確な差は認められなかったが、主成分分析 (PCA) では CRC#1 と CRC#2 が近縁にプロットされた (図 7)。今回の解析では Wnt 低活性大腸がんスフェロイドが 2 株しか確保できなかったため、発現プロファイルやオープンクロマチン領域の分布から発がんのドライバーとなるエピジェネティック修飾を同定するための十分なデータが得られなかった。今後新たに樹立するスフェロイド株をスクリーニングしてサンプル数を増やす必要がある。

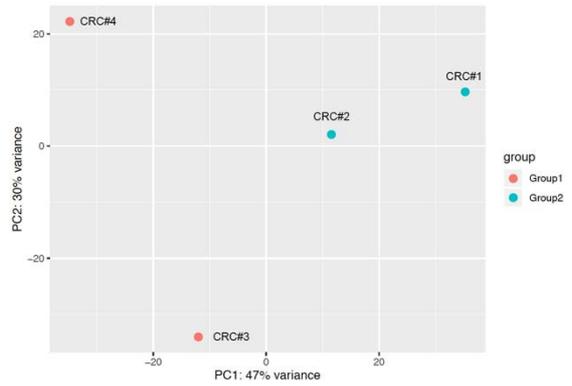


図 7 ヒト大腸がんスフェロイド ATAC-seq ピーク解析の PCA プロット。

(8) Wnt 非依存性大腸がん形成機構の解析

CRC#1, CRC#2 は *APC* 遺伝子が野生型で、*BRAF* V600E 変異と *TP53* 変異を持つ。そこで、まず *BRAF* 変異の役割を解析するため、正常大腸上皮幹細胞スフェロイドに CRISPR/CAS9 による相同組換えを利用して V600E 変異を導入したところ、L-WRN 培地中での増殖率が増加した。しかし、Wnt を含まない培養液中では増殖が停止し、*Lgr5* (幹細胞マーカー) の発現も低下した。浮遊培養により *in vitro* で分化を誘導したところ、正常に分化し *Ki-67* の発現は消失した (図 8)。

APC 遺伝子野生型の大腸がんは予後が悪いことが知られており、このサブタイプでは R-spondin の過剰発現により Wnt 経路が活性化されていることが報告されている。しかし、CRC#1、CRC#2 共に Wnt 標的遺伝子である *LEF1*、*AXIN2* の発現は低く、CRC#2 では R-spondin 遺伝子の発現が見られなかったことから、Wnt をバイパスする経路により増殖能や幹細胞性が維持されている可能性が示唆された。Wnt シグナルの標的遺伝子の中で最も重要な遺伝子の一つが *MYC* である。*MYC* の発現に影響を及ぼすゲノム領域 (topologically associated domain: TAD) で ATAC-seq のピークを検索したところ、CRC#1、CRC#2 で複数のピークが認められたことから、TAD に形成されたエンハンサーによって *MYC* の発現が Wnt 非依存的に維持されていることが示唆された。正常大腸上皮細胞では *MYC* の発現は Wnt シグナルによって誘導されており、培養液中から Wnt を取り除くと *MYC* の発現は急速に低下する。そこで、正常大腸上皮スフェロイドにおける *MYC* の恒常的発現の影響を解析するために、レンチウイルスを用いて強力な CAG プロモーター制御下で発現する *MYC* 遺伝子を導入した。この操作により L-WRN 培地中での増殖率が増加したが、Wnt を含まない培養液中では増殖が停止し、*Lgr5* の発現も消失した。*MYC* 発現株を *in vitro* で分化誘導したところ、スフェロイドは大型の核を持つ未分化な細胞が大半を占めており、完全に分化した細胞は全く観察されなかった。また、細胞増殖は停止しているにもかかわらず *Ki-67* の発現が残存していた (図 8)。

さらに *BRAF* V600E 変異を持つ *MYC* 安定発現株を作製したが、Wnt 非依存性の増殖能は獲得できなかった。これらの結果から、Wnt シグナルをバイパスするためには MAPK 経路の活性化と *MYC* の安定的発現では不十分であることが示された。今後も引き続き、*MYC* 発現株で L-WRN 培地の有無による遺伝子発現プロファイルの変化を調べることにより、*MYC* と協調して Wnt 非依存的な細胞増殖と幹細胞性維持に働く因子の同定を行う予定である。

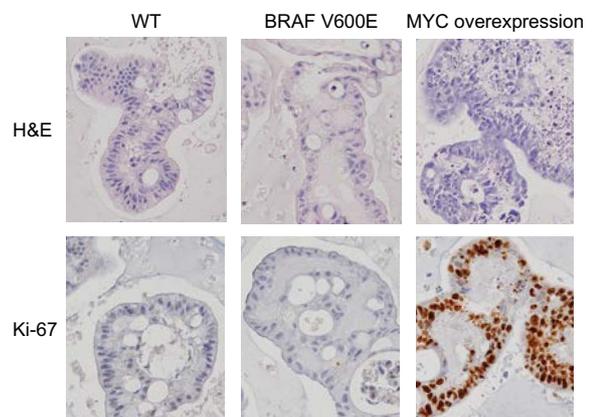


図 8 正常大腸スフェロイドの *in vitro* 分化後 (4 日間) の H&E 染色 (上段) および *Ki-67* 免疫染色 (下段) 組織像。

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 Yamamoto Takehito, Miyoshi Hiroyuki, Kakizaki Fumihiko, Maekawa Hisatsugu, Yamaura Tadayoshi, Morimoto Tomonori, Katayama Toshiro, Kawada Kenji, Sakai Yoshiharu, Taketo M. Mark	4. 巻 12
2. 論文標題 Chemosensitivity of Patient-Derived Cancer Stem Cells Identifies Colorectal Cancer Patients with Potential Benefit from FGFR Inhibitor Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2010 ~ 2010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12082010	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三好 弘之
2. 発表標題 高効率で低コストの患者由来大腸がんスフェロイド培養法
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター（iACT）大腸がん新個別化治療プロジェクト https://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/researchjp.html 京都大学医学研究科遺伝薬理学ユニット 研究内容 http://www4.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/researchjp.html
--

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