

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03656

研究課題名(和文) シングルセル解析を用いた消化管癌起源細胞と周囲ニッチの進展機序解析

研究課題名(英文) Single cell profiling of GI cancer-initiating cells and their niche

研究代表者

早河 翼 (Hayakawa, Yoku)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60777655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウスモデルを用いて胃癌起源細胞の増殖・拡大様式と癌組織構成細胞の進展様式を、単一細胞レベル解析・空間解析を含むオミクス解析により分子学的に検証した。胃癌の主たる起源細胞は上皮幹細胞であり、主細胞などの成熟分化細胞からの脱分化はほとんど寄与しないことを系譜追跡実験により明らかにした。遺伝子改変マウスと単一細胞レベルの解析により、幹細胞の増殖・分化にRspo3/Lgr4シグナルが重要であることを示した。胃癌を発症する遺伝子改変モデルの検討により、腫瘍細胞の遺伝子変異により特徴的な分子の高発現が生じ、それにより周囲微小環境の理モデリングが生じることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌発生段階における癌起源細胞とその周囲微小環境の変化の詳細解析により、胃発癌の分子学的メカニズムの一端が明らかになった。癌起源細胞とその周囲微小環境の変化を独自の遺伝子改変マウスの解析により、前癌病変・早期癌・浸潤癌・転移性癌の分子学的相違を明らかとなり、癌進行度別・サブタイプ別の病態理解が促進された。本解析によって得られたデータは、癌の予防および治療戦略を構築する上で極めて重要な新規創薬シーズとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we molecularly examined the proliferation and expansion of gastric cancer-originating cells and the progression of cancer cells using mouse models and omics-analysis including single-cell level analysis and spatial analysis. Lineage tracing experiments revealed that epithelial stem cells are the main source of gastric cancer, and that dedifferentiation from mature differentiated cells such as chief cells hardly contributes to gastric cancer. Genetically engineered mice and single cell analysis showed that Rspo3/Lgr4 signals are important for proliferation and differentiation of stem cells. Investigation of a genetically modified model that develops gastric cancer revealed that gene mutations in tumor cells lead to high expression of characteristic molecules, which in turn causes remodeling of the surrounding microenvironment.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃癌

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌や大腸癌は、病理学的あるいは分子学的に複数のサブタイプに分類される、Heterogeneous な疾患である。それぞれのサブタイプ毎に特徴的な遺伝子異常が認められ、またマウスに特定の遺伝子変異を導入すると一定の表現型が得られることから、癌細胞の遺伝子変異が癌形質の違いを生み出す主たる原因の一つである。しかし、同じ遺伝子変異を持つ癌であっても患者により表現型が異なったり、別の遺伝子変異を持つにも関わらず類似の病態を呈することもある。マウスモデルにおいても、遺伝子変異を導入する標的細胞の違いにより、異なる腫瘍を形成することがある。また、消化管癌は慢性炎症と密接な関連があるが、炎症存在下で何が起きているのか、即ちどの細胞がどのような因子を介して癌起源細胞にどのような変化を引き起こし、最終的な表現型を形成するのか、その詳細は明らかでない。

消化管上皮の腺管底部に存在する Lgr5 陽性幹細胞が同定され、また癌起源細胞としての働きが報告されて以降、消化管幹細胞研究は Lgr5 陽性細胞の動態解析を中心に進められてきた。しかし、消化管上皮の細胞増殖帯には Lgr5 陽性細胞とは異なる Lgr5 陰性幹細胞群が存在し、Lgr5 陽性幹細胞を障害しても Lgr5 陰性幹細胞が相互転換を起こすことによって腺管・腫瘍の恒常性や増殖を維持している。これまで申請者は消化管幹細胞研究に取り組み、複数の Lgr5 陰性消化管幹細胞・前駆細胞群と、それを支持する様々な間質のニッチを同定した。細胞増殖帯に存在する Cck2r 陽性前庭部・噴門部胃上皮幹細胞、Mist1 陽性胃上皮幹細胞(胃体部・前庭部)は、発癌の原因となる遺伝子変異の種類に応じて、異なった形質の癌起源細胞へと変化し増殖する(例; Kras 変異により粘液産生化生型細胞、Apc 変異により腸型癌細胞、Cdh1 変異により印環細胞型癌細胞など)。この癌起源幹細胞の増殖にあたり、消化管癌幹細胞のニッチ構成因子である Cxcl12 産生血管内皮細胞、Wnt5a 産生 2 型自然リンパ球、ACh 産生神経細胞及び Tuft 細胞、Grem1 産生 Pericyte、などが重要であると報告してきた。他方、幹細胞以外の癌起源細胞の可能性として、胃の成熟主細胞や大腸の Tuft 細胞が、炎症刺激あるいは遺伝子変異の導入によって脱分化して癌の起源となりうるとされており、こうした環境下では異なるニッチ構成因子の存在も示唆されている。癌発生・進展機序の解明においては、これらの多彩な細胞群を包括的に解析する必要がある。

その後の検討により申請者は、消化管粘膜細胞増殖帯には Wnt/Rspondin の受容体である Lgr4・Fzd5 が特異的に発現していることを発見した。一方腺管底部に存在する Lgr5 陽性細胞---胃では成熟主細胞を含む---は異なる Fzd 受容体である Fzd7 を発現し、異なる Wnt リガンドによってその活性を制御されていると考えられる。また、消化管腫瘍内でも Apc・beta-catenin 経路の異常によって発生した腸型腫瘍では Lgr5/Fzd7 陽性細胞の著明な増生が認められた一方で、Kras・Notch・CDH1・Tgfbr2・Trp53 遺伝子異常などによる腫瘍(胃印環細胞癌や大腸鋸歯状型腫瘍を含む)では Lgr4/Fzd5 陽性細胞の増殖が認められ、こうした腫瘍の間質には non-canonical Wnt リガンドである Wnt5a が高発現していたことから、腫瘍内においても複数の幹細胞集団が異なる間質細胞との相互作用を介しながら腫瘍形質の形成に寄与していると考えられる。

本研究では特定の細胞分画を標識するマウスに、消化管腫瘍のサブタイプに特徴的な腫瘍遺伝子改変、及び発癌誘発刺激を組み合わせ、幹細胞群と成熟細胞群がどのように

癌起源細胞へと変質し、間質ニッチとどのような相互作用を起こすのかを、単一細胞レベルで詳細に解析する。

## 2. 研究の目的

本研究では、癌起源細胞群がいかにして癌化し、さらに増殖・浸潤・転移能を獲得していくのかを、周囲の微小環境の変化とともに詳細に分析するため、単一細胞レベルの Transcriptome profiling と系譜追跡実験によって解析し、上述の疑問点を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究の目的である癌発生メカニズムの包括的解析のため、以下のマウスを用いる。増殖帯内癌起源細胞を特異的に標識するマウス KitL-CreERT・Mist1-CreERT、胃主細胞と Tuft 細胞の脱分化の可能性を検証するための主細胞特異的標識マウス(Gpr30-rtTA、Gif-DTR-E2C)と Tuft 細胞標識マウス(Dclk1-DTR-ZSgreen、Trpm5-CreERT) 及び前癌病変とされる胃内腸上皮化生に特異的に発現する Muc6 を標識可能な Muc6-dsRED-FlpER マウス、である。

これらと組み合わせることで特異的腫瘍遺伝子改変が可能なマウス(LSL-Kras<sup>G12D</sup>、LSL-p53<sup>R172H</sup>、Cdh1<sup>fllox/fllox</sup>、Tgfr2<sup>fllox/fllox</sup>、Apc<sup>fllox/fllox</sup>) さらに系譜追跡を可能にする R26 蛍光レポーターマウスを使用し、正常幹細胞が癌起源細胞となり進展していく様子を時空間的に詳細に可視化する。発癌超初期における各細胞群の分子プロファイルの変化を解明するため、蛍光レポーターで標識した癌起源細胞群を FACS にて抽出し、scRNAseq で幹細胞と成熟細胞の相違及び細胞集団内の遺伝子変化、Heterogeneity について経時的に解析する。

また、正常幹細胞～癌起源細胞～癌幹細胞へと変化する過程で生じる幹細胞周囲微小環境の変化を経時的に明らかにする。浸潤癌についてはすでに樹立したマウスモデル(TFF1-Cre; LSL-p53<sup>R172H</sup>; Cdh1<sup>fllox/fllox</sup>; Tgfr2<sup>fllox/fllox</sup>, TFF1-Cre; LSL-Kras<sup>G12D</sup>; p53<sup>R172H</sup>; Tgfr2<sup>fllox/fllox</sup>) を使用し、上記蛍光レポーターマウスと組み合わせる。癌発生段階・粘膜内癌・浸潤癌の各段階において癌のサブタイプ別に FACS 解析と scRNAseq 解析・空間遺伝子解析を行い、腫瘍細胞と間質・免疫細胞の網羅的転写・免疫プロファイリングを施行する。予備的検討により重要と予想される Wnt/Rspo 経路については、作製済みの条件的ノックアウト・強制発現(Fzd5<sup>fllox/fllox</sup>, Lgr4<sup>fllox/fllox</sup>, LSL-Wnt5a, tet0-Rspo3) マウスを交配させ、癌起源細胞進展への影響を考察する。さらに、上記マウスの腫瘍オルガノイドを Orthotopic に移植して転移病変を誘発し、転移巣の解析を行う。

## 4. 研究成果

Kitl 遺伝子と Gpr30 遺伝子を発現している細胞群を選択的に標識可能な Kitl-CreERT マウスと Gpr30-rtTA マウスを新規に作成し、系譜追跡および変異型 Ras 遺伝子誘導実験を行った。Kitl+細胞は時系列的に分化・増殖を繰り返し、腺管を標識し続けたことから幹細胞を含む細胞群と考えられた。また、Kitl+細胞に変異型 Ras を誘導すると腸上皮化生が引き起こされたことから、Kitl+幹細胞は前癌病変の起源となりうることが示された。対照的に、Gpr30+主細胞は分化・増殖を行うことなく、炎症再生を惹起しても脱分化を示すことはなかった。さらに、Ras 遺伝子の誘導をもってしても Gpr30+主細胞は前癌病変を形成せず、逆に細胞競合により腺管から消失した。この細胞競合は PDK 経路依存的であり、PDK 阻害薬の投与により Ras 変異主細胞の上皮からの消失が抑制された。以上の成果は Gastroenterology 誌に掲載された。また、幹細胞の発癌過程における増殖・

進展は、ガストリン依存性に前庭部では抑制的に、胃体部では促進的に制御されていることがCCK2R-CreERTマウスの解析でわかった。また、Wnt5aはFzd5を介してMist1陽性幹細胞の増殖を促進していることがわかった。以上の成果はCell Stem Cell誌、Gut誌に掲載された。

浸潤癌モデルの解析では、スキルス胃癌を発症するTff1-Cre;LSL-p53R172H;Cdh1F/F;Tgfbr2F/Fマウスを用いたFACS/RNA解析、シングルセル解析を施行した。スキルス胃癌に特異的なTIMEを形成していると考えられるCD105陽性血管内皮細胞(EC)、腫瘍関連線維芽細胞(CAF)、血球細胞に特徴的な遺伝子発現の探索を目的に、FACS sorted cell Bulk RNA sequenceとDigital Spatial Profiling(DSP)によるスキルス胃癌組織の各分画における遺伝子発現変動を解析した。CD105陽性ECでは血管新生を亢進する遺伝子群の高発現が確認され、さらに細胞外マトリックス増生や細胞接着を亢進する遺伝子群の発現がみられ、通常のCD105陰性内皮細胞に比しTIME形成において重要な役割を担っていると考えられた。CAFは、腫瘍細胞の粘膜下浸潤を伴わないTff1<sup>Cre</sup>; p53<sup>R172H</sup>; Cdh1<sup>F/F</sup>(T1-PC) マウスにおけるCAFと比較すると、Tff1<sup>Cre</sup>; p53<sup>R172H</sup>; Tgfbr2<sup>F/F</sup>; Cdh1<sup>F/F</sup>(T1-PTC) マウスにおけるCAFでCcl11・Ccl12・Cxcl10・Cxcl13・Il23a・Il33などのケモカイン関連遺伝子やVcam1・Trpm2・Flrt3・Tnfsf4などの線維化亢進関連遺伝子が高発現しており、炎症・サイトカイン関連シグナルを介した腫瘍支持的線維化への関与が示唆された。DSPでは腫瘍の深部浸潤抑制効果を示しているCD38中和抗体とCD105特異的抗体による治療前後での粘膜下層以深に位置する腫瘍細胞・血球細胞・CAFの遺伝子発現変動を検索し、抗体治療の分子メカニズムを特定した。CD38抗体による治療では、スキルス胃癌腫瘍細胞におけるSMADシグナルの補完、腫瘍細胞のアポトーシス誘導、エネルギー代謝シグナル変動を介した血球細胞の活性化、線維芽細胞自身の線維化亢進メカニズムの阻害によって治療効果を得ており、CD105抗体では、腫瘍細胞のanoikis制御、腫瘍細胞による膠原繊維形成、血球細胞によるRhoシグナル・血管新生機能の抑制、線維芽細胞における血管新生亢進因子・Hippoシグナルの制御によって腫瘍進展を妨げていると考えられた。各分画に特徴的な経路・遺伝子を特定できたことから、今後それらの治療標的としての可能性を検討し、今後共培養系での評価へと繋げていく。

in vivo の解析と並行して、スキルス化マスターレギュレーター阻害化合物の探索を目的にスキルス胃癌オルガノイドのプロテオーム解析を施行した。その結果、Rhoファミリーのエフェクター蛋白であるPAK経路のリン酸化亢進が確認され、その結果をもとにPAK阻害剤をオルガノイドに投与したところ、濃度依存性にPTCオルガノイドのCD38・LRG1の発現を低下した。すなわちPAKはTgfbr2 KOにより誘導されるCD38・LRG1シグナルの上流である可能性が示された。CD38とLrg1の治療標的の可能性の検討のため、Crispr-Cas9システムを用いてスキルス胃癌オルガノイドよりCD38・Lrg1各々をKOした細胞を樹立し、Xenograft・orthotopic transplantationの系で評価を行った。CD38 KO・Lrg1 KO腫瘍オルガノイドでは、コントロールに比しXenograftの腫瘍径は縮小し、orthotopic transplantation腫瘍の浸潤範囲を縮小させ遠隔転移を予防した。すなわち、CD38・Lrg1は腫瘍進展に重要な役割を果たしていると考えられ、治療標的としての可能性が期待される結果であった。空間遺伝子解析の結果、原発巣と肺転移、腹膜播種では各細胞分画に異なる遺伝子発現パターンが認められ、形成された転移巣ではCD38・Lrg1以外の治療標的が必要かもしれない。

CIN型腸型胃癌(TFF1-Cre; LSL-Kras<sup>G12D</sup>; p53<sup>R172H</sup>; Tgfbr2<sup>flox/flox</sup>)については、オルガ

ノイドとマウス胃腫瘍組織の RNA sequence を実施し、新規治療標的候補として Areg を着目した。Areg は in situ hybridization により腫瘍細胞に広く発現していることを確認できた。また、空間解析により Kras 変異 ON/OFF による腫瘍細胞・間質細胞の分子メカニズムの変化を解析した。結果として、腫瘍の粘膜下浸潤後は必ずしも腫瘍細胞の Kras シグナルが亢進していなくとも、TIME 形成などを介した腫瘍細胞支持機構が維持され、腫瘍維持・進展が起こりうるという結果が得られた。今後、更なる治療標的の探索が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Hiroki, Gieniec Krystyna A., (省略), Hayakawa Yoku, (省略), Leedham Simon J., Rustgi Anil K., Mukherjee Siddhartha, Takahashi Masahide, Wang Timothy C., Enomoto Atsushi, Woods Susan L., Worthley Daniel L.	4. 巻 162
2. 論文標題 The Origin and Contribution of Cancer-Associated Fibroblasts in Colorectal Carcinogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 890 ~ 906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.11.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hayakawa Yoku, Nakagawa Hiroshi, Rustgi Anil K., Que Jianwen, Wang Timothy C.	4. 巻 28
2. 論文標題 Stem cells and origins of cancer in the upper gastrointestinal tract	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 1343 ~ 1361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2021.05.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Imai Satoshi, Ooki Takuya, Murata-Kamiya Naoko, 省略, Hayakawa Yoku, Ohnishi Naomi, Ueda Koji, Fukayama Masashi, Ushiku Tetsuo, Ishikawa Shumpei, Hatakeyama Masanori	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayakawa Yoku, Hirata Yoshihiro, Hata Masahiro, Tsuboi Mayo, Oya Yukiko, Kurokawa Ken, Abe Sohei, Arai Junya, Suzuki Nobumi, Nakagawa Hayato, Fujiwara Hiroaki, Tateishi Keisuke, Maeda Shin, Koike Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Dysregulated Immune Responses by ASK1 Deficiency Alter Epithelial Progenitor Cell Fate and Accelerate Metaplasia Development during H. pylori Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1995 ~ 1995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8121995	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim Woosook, Chu Timothy H., Nienhuser Henrik, Jiang Zhengyu, Del Portillo Armando, Remotti Helen E., White Ruth A., Hayakawa Yoku, Tomita Hiroyuki, Fox James G., Drake Charles G., Wang Timothy C.	4. 巻 160
2. 論文標題 PD-1 Signaling Promotes Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells and Gastric Tumorigenesis in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 781 ~ 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.10.036	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuboi Mayo, Niikura Ryota, Hayakawa Yoku, Hirata Yoshihiro, Ushiku Tetsuo, Koike Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Distinct Features of Autoimmune Gastritis in Patients with Open-Type Chronic Gastritis in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 419 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8100419	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nienhuser Henrik, Kim Woosook, Malagola Ermanno, Ruan Tuo, Valenti Giovanni, Middelhoff Moritz, Bass Adam, Der Channing J, Hayakawa Yoku, Wang Timothy C	4. 巻 70
2. 論文標題 Mist1+ gastric isthmus stem cells are regulated by Wnt5a and expand in response to injury and inflammation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 654 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-320742	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sheng Weiwei, Malagola Ermanno, Nienhuser Henrik, Zhang Zhengyu, Kim Woosook, Zamechek Leah, Sepulveda Antonia, Hata Masahiro, Hayakawa Yoku, Zhao Chun-Mei, Chen Duan, Wang Timothy C.	4. 巻 10
2. 論文標題 Hypergastrinemia Expands Gastric ECL Cells Through CCK2R+ Progenitor Cells via ERK Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 434 ~ 449.e1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2020.04.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chang Wenju, Wang Hongshan, Kim Woosook, Liu Yang, Deng Huan, Liu Haibo, Jiang Zhengyu, Niu Zhengchuan, Sheng Weiwei, Nipoles Osmel Companioni, Sun Yihong, Xu Jianmin, Sepulveda Antonia, Hayakawa Yoku, Bass Adam J., Wang Timothy C.	4. 巻 26
2. 論文標題 Hormonal Suppression of Stem Cells Inhibits Symmetric Cell Division and Gastric Tumorigenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 739 ~ 754.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2020.01.020	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hata Masahiro, Kinoshita Hiroto, Hayakawa Yoku, Konishi Mitsuru, Tsuboi Mayo, Oya Yukiko, Kurokawa Ken, Hayata Yuki, Nakagawa Hayato, Tateishi Keisuke, Fujiwara Hiroaki, Hirata Yoshihiro, Worthley Daniel L., Muranishi Yuki, Furukawa Takahisa, Kon Shunsuke, Tomita Hiroyuki, Wang Timothy C., Koike Kazuhiko	4. 巻 158
2. 論文標題 GPR30-Expressing Gastric Chief Cells Do Not Dedifferentiate But Are Eliminated via PDK-Dependent Cell Competition During Development of Metaplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1650 ~ 1666.e15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.01.046	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------	---------