

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26253069

研究課題名(和文) "異なる上皮の接点" の形成・維持機構の解明と試験管内発がんモデルの開発

研究課題名(英文) Molecular mechanism in the formation of the junction between different epithelia and in vitro recapitulation

研究代表者

川口 義弥 (Kawaguchi, Yoshiya)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：60359792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発生過程における食道 胃接合部形成機構の解明を目指した。遺伝子ノックアウト及びlineage tracing実験、複数の転写因子の発現を示す蛍光蛋白レポーターマウス ("Rainbow Mouse") の作成と同マウスから採取した細胞のin vitro分化誘導実験の結果、発生13.5日までに接合部形成位置を境として逆方向のSox2/GATA4の濃度勾配が形成され、結果的に胃側間質にFGF10、食道側上皮にFGFR2が誘導される結果、限局したERK活性化を引き起こすことで、接合部が未分化状態の上皮として成体まで維持されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道 胃接合部や十二指腸Vater乳頭部、直腸歯状線、子宮頸部などの "異なる上皮の接点" は人体の複数の場所に存在し、腫瘍の発生母地になり得るといふ臨床上的共通した特性がある。

本研究では、これまで未解明であった発生期食道 胃接合部の形成機構/維持機構を明らかにした。まず、接合部形成位置を挟んでそれぞれの細胞運命を規定する転写因子が逆方向の濃度勾配を形成し、上皮 間質相互作用で一方の間質シグナルを誘導し、他方の上皮でその受容体を発現するという巧みな方法で、接合部に限局したシグナル活性化を来すことがわかった。他の "異なる上皮の接点" 形成機構にも共通する可能性があり、今後の解明が待たれる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we dissected the molecular mechanism in the formation of esophago-gastric (EC) junction during organogenesis. We found that Sox2 and Gata4 are initially co-expressed in the progenitor epithelia then expressions of Sox2 and Gata4 gradually formed gradients in inverse direction across the EC junction. Meanwhile, Fgf2 was induced in the gastric mesenchyme and proximal epithelial cells expressed FgfR2, resulting in the restricted activation of ERK at the junction. Separately sorted Gata4-low, -mid and -high epithelial cells at E13.5 formed stratified squamous, pseudostratified and simple columnar organoid, respectively, by in vitro culture. Furthermore, Fgf2 treatment to Gata4-low cells inhibited the differentiation to stratified squamous epithelia and stimulated the differentiation to transitional epithelia correspond to the E-C junction. Thus, spatio-temporal patterning of epithelial and mesenchymal Sox2/Gata4/ Fgf2 is important for the construction of EC junction.

研究分野：発生学

キーワード：食道胃接合部

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道-胃接合部や十二指腸 Vater 乳頭部、直腸歯状線、子宮頸部などの“異なる上皮の接点”は人体の複数の場所に存在するが、このような領域には特殊な分化能(2種類の異なった上皮への分化能力)を持つ組織幹細胞の存在が示唆されているだけでなく、腫瘍の発生母地になり得るという臨床上的共通した特性がある。

受精卵から多段階のステップを経て特定の臓器細胞となる発生の一連の分化プロセスには、運命決定の枝分かれとなるポイントが複数存在する。遺伝子ノックアウトマウス作成技術や Cre/loxP を用いた lineage tracing(細胞系譜解析)等に代表される研究手法の進歩により、発生における細胞の運命決定機構に対する我々の理解は確かに深まってきた。これらの実験手法はがん研究にも応用され、成体の細胞をターゲットとした発がんモデルマウスの作製も可能となっている。しかしながら、“異なる上皮の接点”が発生過程でどのように形成され、維持されるか?に対する解は得られていない。この事は、上皮細胞の運命が必ずしも cell autonomously に決定されるのではなく、細胞の存在する環境(前後軸での相対的位置や間質細胞からのシグナル)によって制御される事と無関係ではなく、特定の位置におかれた上皮/間質細胞をターゲットとした遺伝子改変が今なお困難な現状、すなわち現時点における発生生物学的実験手法の限界を反映している。

“異なる上皮の接点”が腫瘍の発生母地になり得る事は臨床に広く知られた事実であるが、腫瘍発生のメカニズムについては不明な点ばかりである。腫瘍発生の起源細胞だけでなく、多段階のがん化ステップにおけるエピゲノム制御も良く解っていない。すなわち、“異なる上皮の接点”の形成/維持および発がん機構の解明は、発生学的にも臨床病理学的にも重要なテーマであるにも関わらず、既存の実験技術の限界の為に解明されていない問題であり、新たな技術革新が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、上に記した実験技術の限界を、立体構築を有するオルガノイド作成技術の導入で克服する。オルガノイド技術を用いる利点は、一定の培養条件で一定の分化状態を保ったまま増殖可能である事、特定のマーカー発現細胞のみを損傷なく単離できる事、これまでの発生研究では明らかになっていない細胞分化メカニズムでさえも、試行錯誤的に様々なシグナル分子を添加する事(細胞周囲環境を自由に操る事)で解明可能であり、試験管内で極めて短時間のうちに細胞分化を再現でき、しかも、発生における細胞分化/組織構築形成現象をリアルタイムで観察できることにある。

本研究では、異なる上皮の接点”の例として食道-胃接合部をとりあげ、その形成過程を培養皿上で再現することで、「隣り合った異なる種類の細胞が、如何にして分化しつつ/あるいはそれぞれの identity を維持しつつ/組織構築(接点)を形成するか?」を解明する。さらに、発癌遺伝子変異を特定の細胞に誘導することで試験管内発癌モデルを樹立し、がん化の複数段階におけるエピゲノム修飾の変化を解析し、エピゲノム改変による治療薬開発の基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) “Rainbow Mouse”と“Rainbow Organoid”による食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成の可視化

まず、複数の転写因子の発現を示す蛍光蛋白レポーター遺伝子をもつマウス ES 細胞を樹立する。このレポーター ES 細胞を用いて in vitro 分化誘導で作成された立体組織(“Rainbow Organoid”)は、同じレポーター ES 細胞を用いて作成されたマウス個体(“Rainbow Mouse”)と直接比較することができるので、各分化誘導過程が実際の発生のどの段階に相当するのかの検証が容易となる。

具体的には、GATA4-tdTomato ノックインマウスと SOX2-GFP ノックインマウスを用いて交配によりダブルレポーターマウス及び ES 細胞を作成し、食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成過程での GATA4、SOX2 の発現パターンを解析する。ES 細胞をスタートとした分化誘導系に困難があれば、マウスから蛍光発症を手がかりに細胞を採取し、in vitro 分化誘導を進める方針とする。

(2) 食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成における GATA4、SOX2 の意義の解明

GATA4、SOX2 の発現パターンを把握した上で、CreER を用いた細胞種/時期特異的 GATA4、SOX2 lineage tracing 及びノックアウトを行う。Lineage tracing からは、それぞれの遺伝子を発現した、どの時点の細胞が、将来どのような運命を辿るのか? 具体的には胃になるのか、食道になるのかが判定可能である。この情報とノックアウト実験の結果を組み合わせることで、それぞれの発生時期のそれぞれの遺伝子が、遺伝子食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成にどのような意義を持つのか? の理解が可能となる。

(3) 食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成における間質シグナルの関与の解明

上皮細胞の分化は必ずしも cell autonomously に決定されるのではなく、細胞の存在する環境(前後軸での相対的位置や間質細胞からのシグナル)によって制御される。上皮細胞と間質細胞がどのようなシグナルのやりとりを介して食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成がなされるのか? In situ hybridization および GATA4-tdTomato/SOX2-GFP Rainbow Mouse から、部位別に採取した上皮細胞と間質細胞を用いた RNA seq 解析から候補シグナルを抽出する。得

られた候補について、in vitro organoid assay を用いてその意義を検証する。

(4) 試験管内食道-胃接合部作成及び発癌モデルの樹立

上記実験にて食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成機構が解明されれば、それを試験管内で再現することで、食道-胃接合部を含む立体組織を in vitro で作成する。臨床的 Barrett 上皮形成に関与すると考えられる胃酸/胆汁逆流や発癌遺伝子導入を含む手法で試験管内発癌モデルの樹立を試みる。

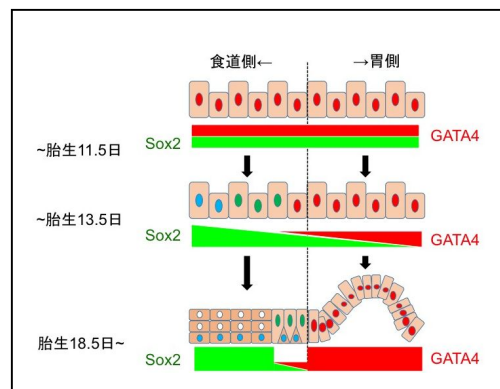
4. 研究成果

概要：計画した内容のうち、食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成機構の解明を概ね終了し、以下に詳細を記載する。マウス ES 細胞を用いた in vitro 分化誘導で、食道-胃接合部を含む立体組織の作成は可能であったが、その再現性は高くなかった。その理由として、分化誘導実験での間質細胞の混入程度が実験毎に一定しないことが考えられ、この結果は本研究で明らかにした食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成における間質シグナルの重要性を鑑みて矛盾しない。結果的に試験管内発癌モデルの作成実験には着手できなかった。

(1) 食道・胃細胞の分化/食道-胃接合部形成過程における GATA4, SOX2 発現パターン

マウス胎生(e)9.5, 11.5, 13.5, 16.5, 18.5 日の上部消化管組織を用い、GATA4, SOX2 及び重層扁平上皮のマーカーとして p63 の3つのタンパク質発現を免疫染色で検討した。(マウスでの組織学的食道-胃接合部(重層扁平上皮と単層円柱上皮の境界)は実際には胃の中に存在する(ヒトの胃体上部は重層扁平上皮で構成される)が、以下では混乱を避けるために将来の重層扁平上皮部位を食道、単層円柱上皮部位を胃と記載する。)

その結果、SOX2 は e9.5 時点で食道~胃~十二指腸にかけて広く発現しており、e11.5 では十二指腸での発現は消失するが、食道/胃では持続した。e13.5 以降、胃側の発現量は低下してゆき、e18.5 になると極めて少なくなった。GATA4 は当初食道側に発現が弱い胃には発現しており、e11.5 では確実に両方で発現し、e16.5 日頃を境に食道での発現を消失した。P63 は発生が進むにつれて次第に食道側から胃側に発現領域を広げてゆき、最終的に e16.5 時点で GATA4 陽性の胃(単層円柱上皮)領域とわずかな数個の細胞列を残して接するようになった(右図)。



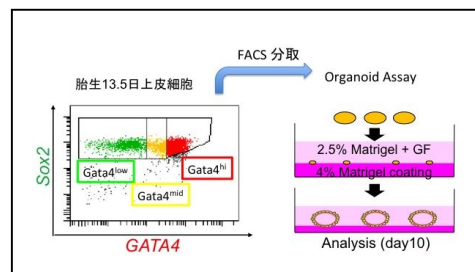
(2) 食道-胃接合部の形成位置の決定機構

つまり、e11.5 日時点で SOX2/GATA4 共陽性の原始腸管から食道・胃が分化してゆく過程で、SOX2 は食道側、GATA4 は胃側に強い発現パターンをとることで、大まかに将来の食道と胃の領域化がなされると考えた。その間、GATA4 と p63 の発現領域には明らかな gap(p63 陰性/SOX2・GATA4 共陽性領域)が存在し、食道-胃接合部形成は、p63 陰性/SOX2・GATA4 共陽性領域が次第に狭められる e13.5~16.5 の間の時期に完成すると考えた。

そこで、GATA4-CreER 及び SOX2-CreER マウスを用いた tamoxifen 誘導性 lineage tracing 解析で e9.5, 11.5, 13.5, 15.5 での細胞分化能力を検証した。その結果、SOX2 陽性細胞は少なくとも e15.5 時点まで食道・胃両方への分化能力を保持することがわかった。一方、GATA4 陽性細胞は e9.5 時点で食道・胃両方への分化能力を保持するが、その後 lineage label される領域が次第に肛門側へと移動し、e13.5 になると極一部のみが食道への分化能を保持するようになり、e15.5 ではそれが完全に消失した。以上より、食道-胃接合部形成に関わる細胞運命決定は e13.5~15.5 の間になされると結論され、接合部形成の位置は GATA4 発現領域の口側限により決定されると考えられた。

(3) GATA4 発現量による食道 v.s. 胃への運命決定機構

先に示した e13.5 にかけての GATA4 発現の濃度勾配形成は、GATA4 発現量による食道 v.s. 胃への運命決定機構を示唆すると考えた。そこで、GATA4-tdTomato/SOX2-GFP Rainbow Mouse から、蛍光発色を頼りに上皮細胞を Sox2⁺Gata4^{low}, Sox2⁺Gata4^{mid}, Sox2⁺Gata4^{hi} の3つに区分して FACS 分取し、in vitro 培養による organoid formation assay で検証した(右図)。その結果、Sox2⁺Gata4^{low} は大部分が食道オルガノイド、Sox2⁺Gata4^{hi} は全てが胃オルガノイドになった。Sox2⁺Gata4^{mid} は食道オルガノイドと胃オルガノイドの両方を形成した。尚、移行上皮オルガノイドが Sox2⁺Gata4^{low} と Sox2⁺Gata4^{mid} の一部に認められた。



(4) GATA4 ノックアウトマウスには異所性食道-胃接合部が形成される

上記実験結果は、GATA4 発現量が食道-胃接合部の位置決定に関与することを示唆しており、SOX2CreER;GATA4^{flox}; ROSA26r マウスを用いた GATA4 conditional knockout 実験による

検証を加えた。その結果、e9.5、11.5でGATA4をpatchyにノックアウトすると、その部分が胃上皮への分化能力を失って異所性のSOX2を伴う移行上皮になり、結果的に異所性食道-胃接合部を形成することが分かった。このことから、GATA4はSOX2発現を抑制しており、予想通りGATA4発現領域の移動は食道-胃接合部の位置決定に重要であると結論された。一方、*Sox2^{CreERT2/flox}*; *Rosa26r* マウスを用いたSOX2 conditional knockout実験から、SOX2はGATA4発現に影響を及ぼさず、食道-胃接合部の位置決定にも関与しなかった。ただし、e11.5でのSOX2 KOは(ヒトでいう)胃体上部領域の低形成を示し、細胞増殖能の低下をうかがわせた。このことはSOX2欠失細胞ではFGF2R発現を失い、結果的にERK活性が減弱していることで説明可能と考える(下記参照)。また、SOX2 KOではp16の発現を失い、重層扁平上皮の形成には至らなかった。

(5) 食道-胃接合部形成における間質由来FGF10シグナルの重要性

食道-胃接合部形成におけるGATA4の重要性を鑑み、FGF10KOマウスとFGF2R KOマウスが胃低形成とGATA4発現低下を示すという既報に注目し、詳細な解析を加えた。In situ hybridizationから、FGF2Rは発生を通じてGATA4陰性上皮側に広く発現するが、FGF10はe11.5からGATA4陽性上皮間質に発現し、e15.5になれば接合部から離れた遠位部にのみ弱く発現するようになった。つまり、発生が進むにつれてFGF10陽性間質とFGF2R発現上皮の距離は長くなり、尚且つシグナル自身も減弱すると考えられた。pERKはGATA4陰性領域に発現するが、e13.5以降はFGF2R発現領域の中で食道-胃接合部に局限化することが分かり、上記結果に矛盾しない。また、e13.5のGATA4-tdTomato/SOX2-GFP Rainbow Mouseから採取した細胞のRNA-seq解析では、FGF2R mRNA発現量は*Sox2⁺Gata4^{low}*上皮細胞で最も高く、GATA4発現量と逆相関の関係にあった。間質細胞のFGF10はGATA4陽性上皮遠位側に高い濃度勾配を形成していることが明らかになった。

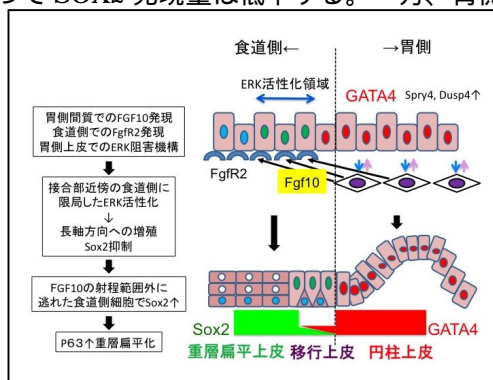
そこで、胎生13.5日のRainbow mouseの*Sox2⁺Gata4^{low}*, *Sox2⁺Gata4^{mid}*細胞をFACS分取し、in vitro organoid formation assayを行なったところ、FGF10濃度依存性に重層扁平上皮への分化を阻害し、移行上皮オルガノイドになることが判明した。

(6) 食道-胃接合部形成における上皮・間質相互作用の解明

以上より、GATA4とFGF10の濃度勾配が発生過程で次第に形成されることで食道-胃接合部の位置決定と組織構築を形成していると結論された。では、FGF10/FGF2Rシグナル自身がSOX2とGATA4による領域化をどのように制御しているのだろうか? e11.5のRainbow Mouseの組織培養にFGFR阻害剤SU5402を添加したところ、SOX2発現が上昇し、GATA4発現が低下した。つまり、間質由来FGF10シグナルは上皮側に働きかけてSOX2を負に、GATA4を正に制御すると結論された。一方、*Gata4^{CreERT2/flox}*マウスe11.5にタモキシフェンを投与すると間質のFGF10発現が著明に低下したことから上皮のGATA4発現が近傍の間質に働きかけることでFGF10を正に制御し、結果的にGATA4とFGF10が同方向の濃度勾配を形成すると考えられる。

さらに、Rainbow Mouseから採取した上皮細胞のRNA-seq解析から、GATA4発現量に相関して*Spry4*や*Dusp4,6*といったMAPK/ERK inhibitorが発現していることが判明しGATA4領域ではERK活性を抑制していることが分かった。

以上の結果より、食道-胃接合部形成過程では以下のような上皮・間質相互作用が存在すると結論される。GATA4-FGF10相互の正の制御機構により、両者は遠位側に高い濃度勾配を形成する。FGF10シグナルの受け手であるFGF2RはSOX2の制御下にあり食道側に広く発現するが、逆にFGF10/FGF2R/ERKシグナルによってSOX2発現量は低下する。一方、胃側では*Spry4*や*Dusp4*が発現してERKシグナルを阻害していることから、結果的にpERKは食道-胃接合部食道側の限られた部位にのみ発現し、長軸方向の細胞増殖を刺激する。FGF10発現間質領域は発生の進行とともに遠位側へ移動し、尚且つ発現量も低下することも相まって、結果的に長軸方向に増殖した上皮細胞がFGF10の射程範囲を超えた段階で*Sox2*発現抑制機構から逃れ、p63発現を経て垂直方向への分化(重層扁平上皮)を来すと考えられる(右図)。以上、本研究の成果を投稿準備中である。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/kawaguchi_summary.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山田 泰広

ローマ字氏名：Yamada Yasuhiro

所属研究機関名：東京大学

部局名：医科学研究所

職名：教授

研究者番号（8桁）：70313872

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三小田 直

ローマ字氏名：Sankoda Nao

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。