

令和元年5月22日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09278

研究課題名(和文) 胃において自然免疫が粘膜の老化・発癌を制御する機序の解明

研究課題名(英文) Innate immunity-mediated regulation of aging and carcinogenesis in the stomach

研究代表者

浅野 直喜 (ASANO, NAOKI)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20526454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫関連分子NOD1欠損マウスの胃では、前癌病変である胃粘膜萎縮が認められた。マイクロアレイ解析ではNOD1欠損マウス胃において、酸分泌に関連する遺伝子群の発現低下が認められた。胃オルガノイドを用いた検討では、NOD1欠損マウス胃オルガノイド形成能は、野生型マウスのそれに比べて低下していた。オルガノイドにおける遺伝子発現の比較では、Lgr5、Muc5acの発現に差は認めなかったものの、NOD1欠損マウス胃オルガノイドにおいて、Atp4a、Pgcの発現が抑制されていた。以上からNOD1が胃幹細胞の分化に影響を及ぼしている可能性が考えられ、その欠損は胃前癌病変の出現に関与す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

胃発癌の主な病因はHelicobacter pylori (H. pylori)感染であると考えられているが、一方でH. pylori陰性胃癌やH. pylori除菌後胃癌の報告も増加している。自然免疫関連分子NOD1はH. pyloriの排除に重要な役割を果たしていることが知られているが、本研究により、H. pylori非感染下でも、胃の前癌病変の出現に関与していることが判明した。今後、NOD1を活性化を通して前癌病変の出現を抑制することにより、H. pylori陰性胃癌やH. pylori除菌後胃癌の発生を抑制できる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The stomachs of mice deficient in the innate immunity-related molecule NOD1 displayed gastric mucosal atrophy, the precancerous change of gastric cancer. Microarray analysis of the RNA extracted from the stomachs of NOD1-deficient and NOD1-intact mice revealed that the expression of genes related to acid secretion was suppressed in NOD1-deficient mice. NOD1-deficiency led to fewer gastric organoid formation. Furthermore, NOD1-deficient gastric organoids expressed less Atp4a and Pgc, while the expression of Lgr5 and Muc5ac was not altered by the presence of the absence of NOD1. These findings suggested that NOD1 has an influence on the differentiation of gastric stem cells, and its deficiency leads to precancerous changes of gastric cancer.

研究分野：消化器内科

キーワード：上部消化管 自然免疫 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (*H. pylori*)感染は胃癌の group 1 carcinogen として考えられており (IARC, 1994)、その感染によって生じる腸上皮化生や胃粘膜萎縮といった変化は胃の前癌病変として考えられている (Correa P: *Cancer Res*, 1992)。加えて、*H. pylori* 除菌後胃癌は酸分泌が回復しない胃粘膜から発生することが報告されており (Iijima K et al: *Tohoku J Exp Med*, 2012)、これら前癌病変が発生する機序の解明は、胃発癌を抑止するためには重要であると考えられる。

ところで、*H. pylori* 感染の際に重要な役割を果たしている宿主側の分子としては、nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1)が挙げられる (Viala J et al: *Nat Immunol*, 2004)。NOD1は細菌の菌体成分 peptidoglycan (PGN)の分解産物を認識する細胞内受容体であり (Strober W et al: *Nat Rev Immunol*, 2006)、Toll様受容体と同様に自然免疫において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。本応募者らは、*H. pylori* 感染の急性期には、胃粘膜上皮に存在する NOD1 が *H. pylori* による NF- κ B の活性化を抑制し、interferon- β 、ケモカイン CXCL10 の産生を介して菌体の排除に重要な役割を果たしていることを報告している (Watanabe T, Asano N et al: *J Clin Invest*, 2010)。

前述のように、*H. pylori* 感染によって生じる前癌病変の一つとして、腸上皮化生が挙げられる。胃における腸上皮化生は *H. pylori* 感染や胆汁への暴露等により生じることが広く知られており、その発生に関与するメカニズムの一つとして、ホメオボックス遺伝子 *Cdx2* の発現誘導が考えられている (Silberg D et al: *Gastroenterology*, 2002; Muto H et al: *Biochem Biophys Res Commun*, 2002)。本応募者らもこの *Cdx2* の誘導には、それと reciprocal に変動する遺伝子 *Sox2* の発現抑制が関与していることを報告している (Asonuma S, Imatani A, Asano N et al: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009)。さらに、NOD1 が腸上皮化生の出現に及ぼす影響に関する検討では、NOD1 が *H. pylori* による NF- κ B の活性化とそれに続く *Cdx2* の発現を抑制することにより、腸上皮化生の出現を抑制することを見出し、報告している (図 1; Asano N et al: *Cancer Res*, 2016)。

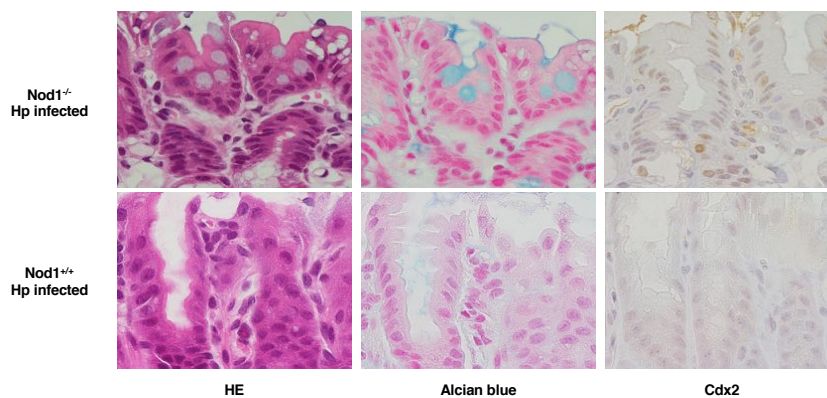


図1

以上のように NOD1 が胃の前癌病変である腸上皮化生の出現を抑制することは判明したが、NOD1 がもう一つの前癌病変である胃粘膜萎縮に及ぼす影響に関しては不明なままであった。しかしながら、本応募者は、*H. pylori* を経口感染させたマウス長期感染モデルにおいて、

NOD1 欠損マウスの胃粘膜では野生型マウスの胃に比べて著明に胃粘膜層の厚さが薄くなっていることを見出した (unpublished observation)。さらには、*H. pylori* 非感染マウスを比べた際にも、NOD1 欠損マウスの胃において胃粘膜層が薄くなっていたため、自然免疫関連分子 NOD1 自体が胃粘膜萎縮を制御している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

胃癌発生機序を解明するために、胃の前癌病変の一つである胃粘膜萎縮の発生に対して、自然免疫関連分子 NOD1 がどのような役割を果たすかについて、幹細胞からの分化という点から検討し、解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *H. pylori* 感染実験

8週齢の野生型マウスと NOD1 欠損マウスを麻酔下に経口挿管し、*H. pylori* を感染させた。12ヶ月後に胃を摘出し、その半分を 4% paraformaldehyde で固定して免疫組織化学を行い、もう半分からは RNA を抽出し、遺伝子発現を検討するために定量 RT-PCR を行った。

(2) マウス胃のマイクロアレイ解析

8週齢の野生型マウスと NOD1 欠損マウスから胃を摘出し、RNA を抽出した。RNA の quality を確認した後に、マイクロアレイ解析を行い、NOD1 欠損マウスにおいて、発現が 2倍以上に上昇している遺伝子、1/2以下に減少している遺伝子を抽出した。

(3) マウス胃のオルガノイド培養

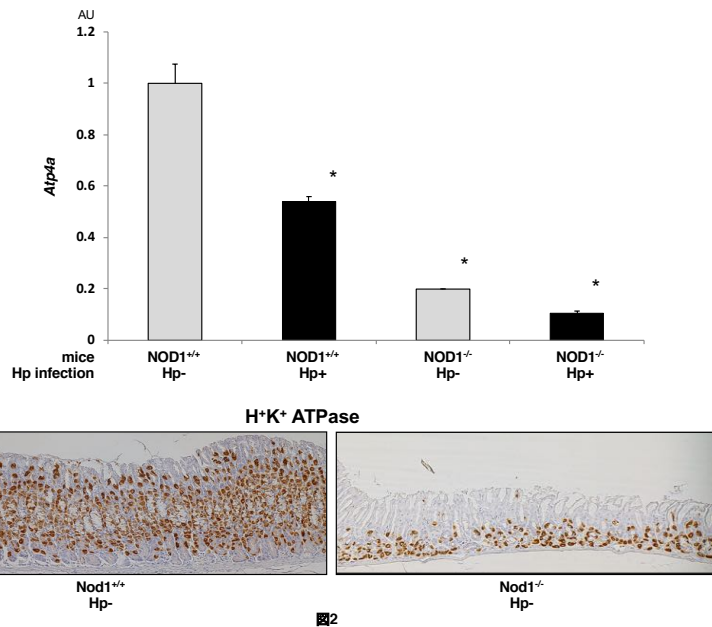
8週齢の野生型マウスと NOD1 欠損マウスから胃を摘出。細断した上で、collagenase 処理を行い、幹細胞の培養に必要な因子の存在下にマトリゲル内で三次元培養を行った。ニッチ因

子を加えた培地は3日ごとに交換し、2週間ごとに新しいマトリゲルを用いて継代した。NOD1欠損マウス胃と野生型マウス胃とのオルガノイド形成能を比較するとともに、タンパク発現を検討するために蛍光免疫組織化学、mRNAはつげんを検討するために定量RT-PCRを行った。

4. 研究成果

(1) NOD1欠損マウスの胃では胃粘膜萎縮が認められた

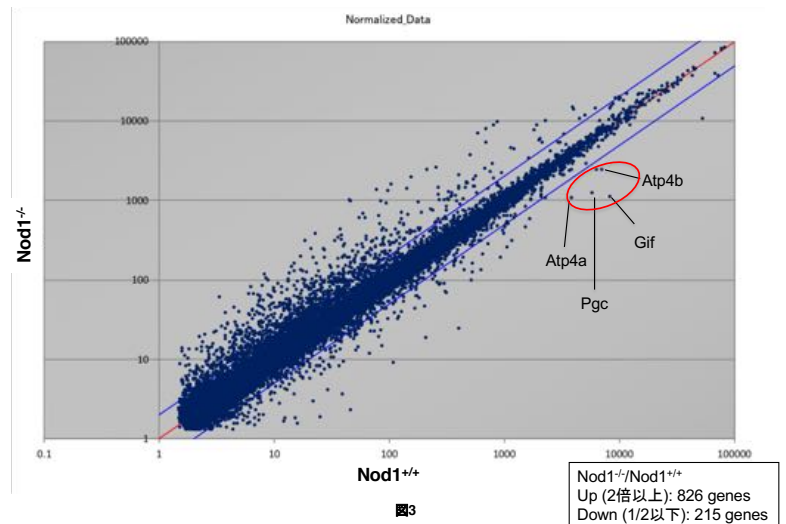
*H. pylori*を12ヶ月間感染させた長期感染マウスモデルを用いた検討では、NOD1欠損マウスの胃において、野生型マウスの胃に比べて胃粘膜の菲薄化を認めた。胃粘膜萎縮は胃酸を分泌する壁細胞の減少として定義されるため、壁細胞に存在するプロトンポンプの遺伝子(*Atp4a*)発現を定量RT-PCRで検討したところ、*H. pylori*感染NOD1欠損マウス胃では野生型マウス胃に比べてその発現量は0.1倍にまで低下していた。さらに注目すべきは、*H. pylori*非感染マウスにおいても、NOD1欠損マウス胃における*Atp4a*の発現量は野生型マウス胃の0.20倍まで低下していたことであった。プロトンポンプ($H^+K^+-ATPase$)に対する免疫組織化学でも、非感染NOD1欠損マウス胃において、野生型マウス胃に比べてプロトンポンプの発現量が少ないこと、つまり壁細胞の数が減少していることが確認された(図2)。



(3) NOD1欠損マウス胃と野生型マウス胃のマイクロアレイ解析

NOD1欠損マウスおよび野生型マウス、各区3匹ずつの胃からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。では、NOD1欠損マウス胃において、プロトンポンプをエンコードする*Atp4a*と*Atp4b*、内因子をエンコードする*Gif*、ペプシノーゲンCをエンコードする*Pgc*の発現低下を認めた。この結果は、NOD1欠損マウス胃では野生型マウス胃に比して、壁細胞および主細胞の割合が少ないことを表しており、マイクロアレイの結果からもNOD1欠損マウス胃では野生型マウス胃よりも胃粘膜が萎縮していることが確認された(図3)。

パスウェイ解析の結果でもNOD1欠損マウス胃において、胃酸分泌に関連するパスウェイが抑制されているという結果が得られた。



(4) マウス胃のオルガノイド培養

NOD1の欠損が胃粘膜萎縮を来す機序を解明する目的で、胃上皮のオルガノイド培養系を樹立した。従来、正常胃粘膜上皮細胞は培養不可能だと考えられていたが、近年になり、正常消化管上皮細胞の培養方法が編み出され、その手法を用いた報告が散見されるようになってきた。本研究においても、マトリゲルを用いて、*Wnt3a*、*Rspondin1*、*Noggin*をはじめとしたニッチ因子を加えた3次元培養を行うことにより、正常胃粘膜上皮細胞の培養に成功した。

NOD1 欠損マウスと野生型マウスの胃から作成し直径 50 μ m 以上の胃オルガノイドの数を比較したところ、NOD1 欠損マウス胃から形成されるオルガノイドの数は野生型マウス胃から形成されるオルガノイドの数よりも有意に少ないことが判明した（野生型マウス胃 29.2 個に対して NOD1 欠損マウス胃は 9.7 個）（図 4）。

(5) 胃オルガノイドにおける遺伝子発現

オルガノイドは正常幹細胞が増殖・分化して作成されるミニ臓器と考えられている。前述の様に、NOD1 欠損マウスの胃では胃粘膜萎縮が顕著に認められたことから、NOD1 の欠損が胃幹細胞の分化に影響を与えていて、その結果、胃粘膜萎縮が生じている可能性を考え、胃オルガノイドにおける遺伝子発現について比較検討した。

NOD1 欠損マウス胃オルガノイドと野生型マウス胃オルガノイドから RNA を抽出し、定量 RT-PCR で比較検討したところ、幹細胞マーカーと考えられている *Lgr5* の発現に関しては、NOD1 の有無による差は認められなかった。また、NOD1 の下流分子である *Traf3* の発現量も NOD1 の有無による影響は認められなかった。しかしながら、*Atp4a* の発現は NOD1 欠損マウス胃オルガノイドにおいて、野生型マウス胃オルガノイドの 0.36 倍まで有意に低下していることが確認された。また、*Pgc* の発現は NOD1 の欠損により、0.76 倍まで低下することが判明した。胃粘膜被蓋細胞のマーカーである *Muc5ac* の発現に関しては NOD1 の有無による差は認められなかった（図 5）。

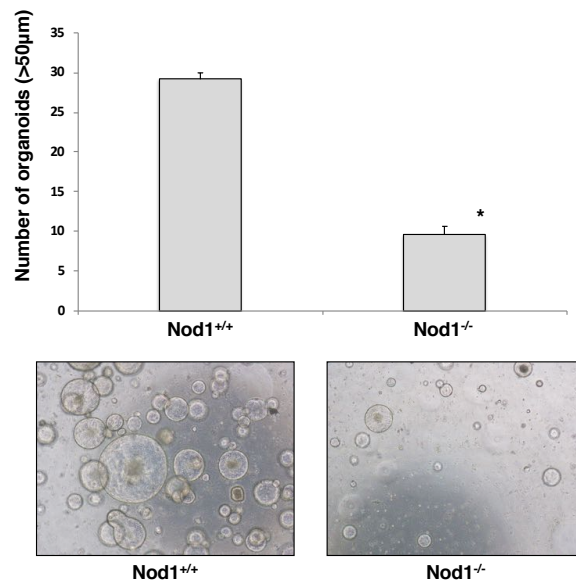


図4

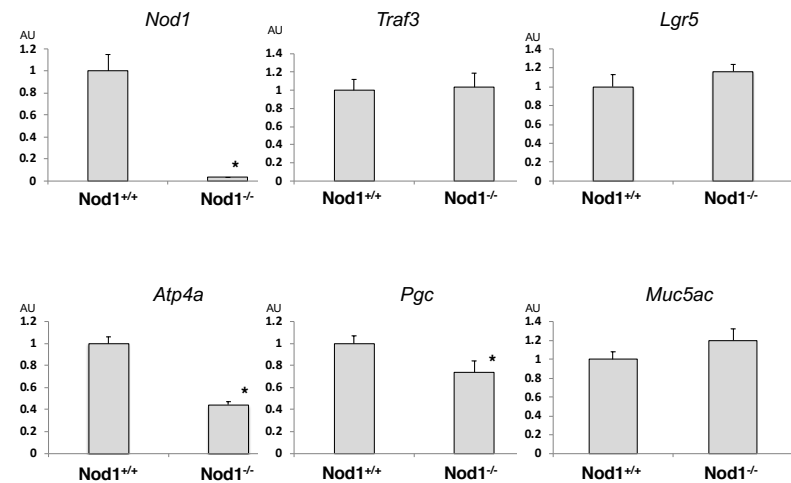


図5

この結果からは、NOD1 が、胃幹細胞からとくに壁細胞への分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、NOD1 が主細胞への分化にも、ある程度の影響は及ぼしている可能性が考えられたが、胃粘膜上皮細胞への分化には関与していないものと考えられた。

上記定量 RT-PCR で得られた mRNA 発現の結果をタンパクレベルでも確認するため、胃オルガノイドに対する蛍光免疫組織化学を行った。

定量 RT-PCR で得られた結果と同様、NOD1 欠損マウス胃オルガノイドでは、野生型マウス胃オルガノイドに比べて H⁺K⁺-ATPase の発現が低いことが蛍光免疫組織化学でも確認された。Pepsinogen C の発現も NOD1 欠損マウス胃オルガノイドでは低下しており、定量 RT-PCR で得られた結果を再確認することができた（図 6）。

以上から、自然免疫関連分子 NOD1 が胃幹細胞の分化に関与していて、その欠損により壁細胞への分化が抑制され、胃粘膜萎縮という前癌病変の発生につながることを示唆された。自然免疫分子 NOD1 が腸上皮化生のみならず、胃粘膜萎縮という前癌病変の発生を抑制していることから、NOD1 の活性化により、胃の前癌病変の発生、さらには胃発癌を抑制できることが期待される。

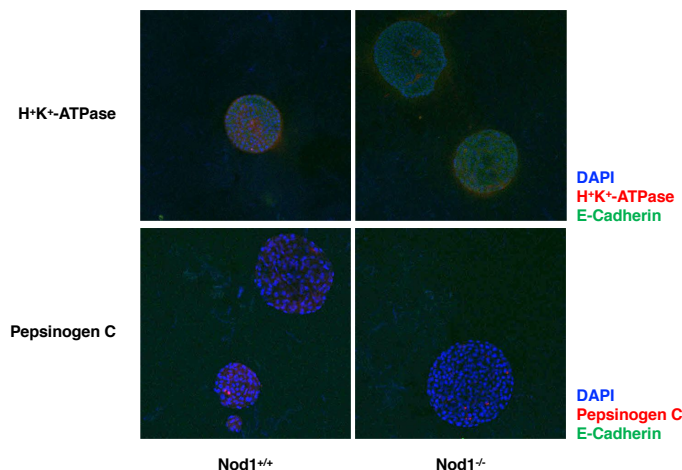


図6

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 1 件）

浅野直喜、今谷晃、竹内章夫、高橋貴一、金笑奕、齊藤真弘、八田和久、浅沼清孝、宇野要、小池智幸、正宗淳、NOD1 deficient gastric stem cells fail to differentiate to parietal cells and cause gastric mucosal atrophy、DDW2019、2019年5月19日、サンディエゴ・アメリカ

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：Warren Strober

ローマ字氏名：(STROBER, Warren)

※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。