

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07507

研究課題名(和文)オルガネラ損傷により誘導される細胞応答の分子機序解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms on the cellular response induced by organelle damages

研究代表者

印東 厚(Intoh, Atsushi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：70779058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではオルガノイドを用いた病原性因子への応答を解析した。ヒトiPS細胞から中胚葉由来の体幹伸長モデルを樹立し、環境汚染因子によってこの伸長が阻害されることを見出し、その要因がWNTシグナルの阻害であることを明らかにした(Ninomiya H et al, Chemosphere, 2020)。加えて、外的刺激の応答で顕著な発現変動をする細胞膜タンパク質を見出し、詳細な解析を進めている。以上までの解析で、病原性の細胞外因子が誘導する遺伝子発現の攪乱やシグナル伝達経路の一端を解明し、新たな機能因子候補を見出した。今後、詳細な解析を進めることで、疾患発症機序の深い理解を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行ったオルガノイドを用いた疾患モデル解析の成果は、創薬スクリーニングや早期診断のバイオマーカーの同定に有用であると期待される。これまでは動物実験や単一細胞種における解析が主だった疾患機序の解明手法に加えて、複雑な細胞群が構成する立体構造を持った機能的なオルガノイドを用いた疾患モデルの樹立を行うことで、疾患発症機序のより深い理解に繋がるものである。今後の詳細な解析を経ることでスクリーニングツールとしての実用化を目指す。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first generated human iPSC-derived mesodermal elongation model to elucidate cellular responses by environmental materials. We also treated the elongation tissues with placental permeability chemicals and found that some toxic compounds induced inhibition of the elongation, which is caused by disturbance of WNT signaling (Ninomiya H et al, Chemosphere, 2020).

Additionally, we established human iPSC-derived gastric organoids with mature cell compositions. We are creating gastric cancer models from this organoid system, and elucidating disturbance of gene expression among tumorigenesis and gastric ulcer. In relation to this examination, we also identified a novel plasma membrane protein that is significantly downregulated by extracellular stimuli. We expected this protein can be a cell surface marker for tumorigenesis and also as a functional protein that regulates stemness and tissue homeostasis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：幹細胞制御 オルガノイド iPS細胞 疾患発症機序 オルガネラ バイオマーカー 細胞膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

自然免疫機構は病原体成分をパターン認識受容体により感知し、サイトカインやインターフェロンを産生することにより感染防御を担う。一方で、自然免疫機構は代謝成分や環境汚染物質などの本来反応するべきではない物質に誤って反応し、神経変性疾患や呼吸器疾患、生活習慣病などの発症要因となる。このような正負の両面性を持ち、様々な疾患の発症に深く関わる自然免疫機構は重要な研究課題と考えられている。免疫担当細胞は、自然免疫機構の一つでパターン認識受容体 NLRP3、下流のアダプター ASC、プロテアーゼ Caspase-1 からなるタンパク質複合体 NLRP3 インフラマソームを有している。細菌を貪食した免疫担当細胞においては、細菌が放出する膜溶解毒素によるファゴソーム膜の損傷に応じて NLRP3 インフラマソームが活性化し、サイトカイン Interleukin (IL)-1・IL-18 の産生を介して炎症を誘導することにより、細菌を排除する。一方で、自己由来タンパク質重合体や、環境汚染物質、細菌由来の病原性因子の蓄積などにより、免疫担当細胞においてファゴソーム膜が損傷するため、NLRP3 インフラマソームが活性化する。これらに応じて誤って活性化する NLRP3 インフラマソームは、アルツハイマー病、痛風、がん、塵肺などの様々な疾患の発症に関わる。NLRP3 インフラマソームの制御機構に関するこれまでの研究により、粒子状物質などによるファゴソーム損傷、その後誘導されるミトコンドリア損傷が、NLRP3 インフラマソームの活性化にそれぞれ必要であることが明らかとなっている。しかしながら、ファゴソーム損傷後、どのような分子機序によりミトコンドリアの損傷が誘導されるのかについては未だに不明なままである。

2. 研究の目的

本研究のターゲットは、環境汚染因子や細菌由来の病原性因子など外的要因に起因した分子攪乱機序の解明にあり、これを明らかにすることで様々な疾患の創薬標的の発見に寄与する。また、外的刺激により細胞表面に発現する膜タンパク質に着目することで、疾患マーカーや標的因子候補としての検証を行う。

3. 研究の方法

本研究ではヒト iPS 細胞を用いて立体構造を有するミニ臓器(オルガノイド)を作製した。目的とする各疾患を模するため、既知マーカーの発現変動を検証して培養方法を最適化した。それぞれのオルガノイドを樹立した後は、オルガネラ損傷を誘導する環境汚染因子を培地中に添加するか、病原性の細菌由来タンパク質をオルガノイドで強制発現して病態の初期状態を再現できたかを検討した。条件検討の結果、中胚葉伸長モデルにおける胎盤透過性化合物の添加と胃オルガノイドにおける CagA 発現に成功し、これらの詳細な解析を進めた。

4. 研究成果

本研究では細胞外因子のストレスにより変動したタンパク質群のプロテオーム変動から得た知見を利用して、オルガノイドを用いた病原性因子への応答を解析した。まず、ヒト iPS 細胞から中胚葉の立体的な伸長モデルを樹立した(図 1)。次に環境汚染因子として胎盤通過性の水銀化合物を添加して伸長モデルの応答を解析したところ、この伸長が有意に阻害されることを見出した(図 2)。さらに水銀化合物による遺伝子発現の影響を解析し、WNT シグナルの阻害が起こることを明らかにした。本研究で確立した環境汚染物質によるリスクアセスメントの解析手法を国際学術論文誌に第二著者として投稿し、掲載された (Ninomiya H et al, Chemosphere, 2020)。

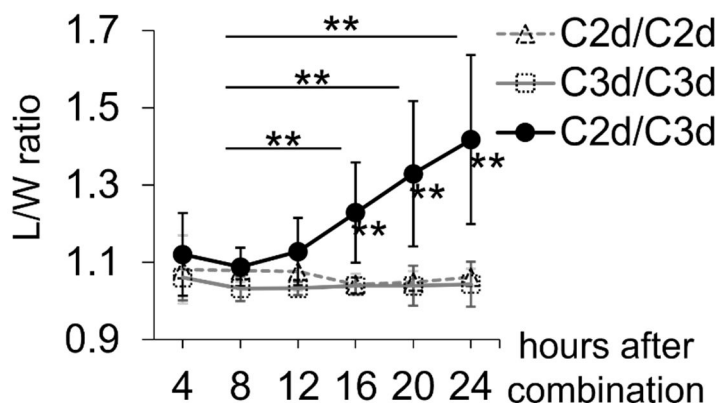


図 1 伸長モデルの幅・長さ比 (L/W)

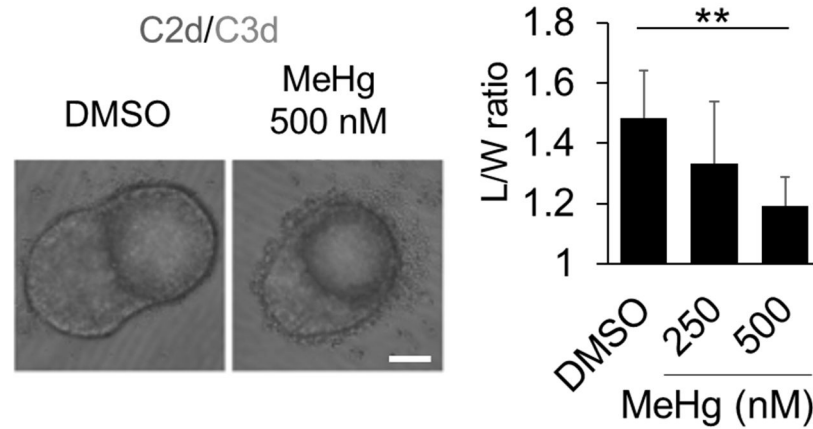


図2 水銀化合物による伸長反応の阻害 DMSOはコントロール

加えて、ヒト iPS 細胞の3次元培養によって胃オルガノイドを樹立し、胃癌モデルとして培養法の検討を行った。胃癌はヘリコバクターピロリ菌の感染が主な原因であることが分かっており、特にピロリ菌が宿主細胞へ注入する CagA タンパク質により、宿主の上皮細胞群において遺伝子発現の攪乱や極性の崩壊が起こることが分かっている。しかし、ヒト細胞由来でこれを再現できた例は報告が少なく、CagA に起因する上皮細胞におけるオルガネラの損傷とそれに起因する細胞応答の詳細な分子機構は未だ明らかでない部分が多い。本研究ではヒト iPS 細胞由来の胃オルガノイド作製条件を検討し、終末分化細胞群のマーカー遺伝子の発現上昇を確認した。この胃オルガノイドにおいて病原性 CagA の強制発現系を樹立し、遺伝子の発現変動や組織変容を解析した(図3)。

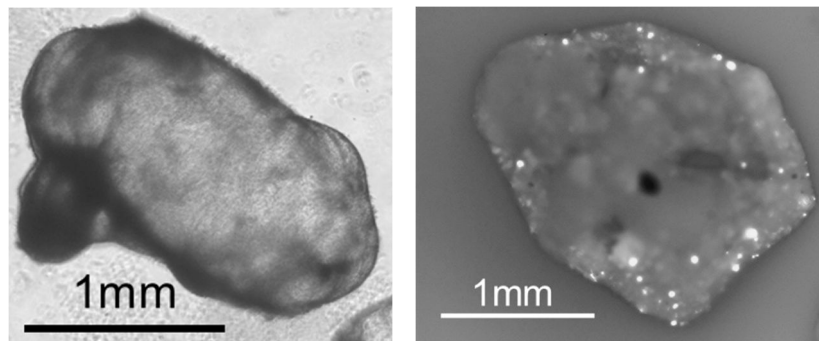


図3 ヒト iPS 細胞由来胃オルガノイド 位相差(左)および CagA-GFP 導入後の蛍光観察(右)

この際に、分化誘導や病原性因子などの一連の外的刺激の応答で顕著な発現変動をする細胞膜タンパク質を見出した。当該タンパク質は、オルガノイド中に一定の割合で細胞表面に発現しており、約20%が陽性であった(図4)。ノックダウン解析や免疫不全マウスへの細胞移植結果から、当該因子は幹細胞性や腫瘍形成に重要な機能を有することを示唆しており、詳細な解析を進めている。

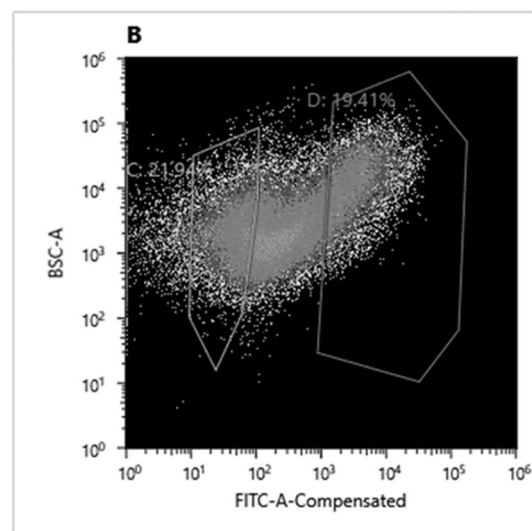


図4 FACS 解析 横軸が新規膜タンパク質の発現 未染色コントロールに比べて約20%の陽性細胞が確認された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ninomiya Hiromasa, Intoh Atsushi, Ishimine Hisako, Onuma Yasuko, Ito Yuzuru, Michiue Tatsuo, Tazaki Akira, Kato Masashi	4. 巻 250
2. 論文標題 Application of a human mesoderm tissue elongation system in vitro derived from human induced pluripotent stem cells to risk assessment for teratogenic chemicals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 126124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2020.126124	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 Deng Yuqi, Ohgami Nobutaka, Iida Machiko, Tazaki Akira, Intoh Atsushi, Kondo-Ida Lisa, Lu Rui, Tsuzuki Toyonori, Yokoyama Shinji, Kato Masashi	4. 巻 29
2. 論文標題 Histological analysis of the skin of Abca1-deleted mice: A potential model for dry skin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 549 ~ 551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1684/ejd.2019.3621	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 Chen Wei, Hashimoto Kazunori, Omata Yasuhiro, Ohgami Nobutaka, Tazaki Akira, Deng Yuqi, Kondo-Ida Lisa, Intoh Atsushi, Kato Masashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Adsorption of molybdenum by melanin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Health and Preventive Medicine	6. 最初と最後の頁 PMC6525471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12199-019-0791-y	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 印東厚、桐谷響暉、栗崎晃
2. 発表標題 Functional Assay of EphA2 in Pluripotent Mouse Embryonic Stem Cells.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 印東厚、栗崎晃
2. 発表標題 ヒトおよびマウス多能性幹細胞におけるEPH受容体群の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------