

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04505

研究課題名(和文) 胃臓器工学基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of fundamental technologies for stomach tissue regeneration

研究代表者

栗崎 晃 (Kurisaki, Akira)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：60346616

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、マウスの胃をモデルに用いて、機能性の胃上皮組織の再生のための基盤技術の開発を行った。成体マウスの胃から上皮細胞の集合体である胃腺を採取し、無血清培地で三次元培養することで、主に増殖性の幹細胞集団を調製する方法を開発した。また、成体マウス胃組織のシングルセル解析データを駆使することで、特に胃上皮細胞の分化制御シグナルを探索した結果、EGFシグナルが幹細胞から粘液分泌細胞への分化を促進することを見出した。一方、NK-kBシグナルを活性化すると分化シグナルが抑制されて幹細胞状態が維持されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、成体の胃組織から幹細胞を取り出して、幹細胞増殖シグナルを同定した。また、幹細胞から胃粘膜を形成する表層粘液細胞への分化シグナルも同定した。本成果は胃の組織再生のための基盤となる細胞調製法の構築に有用と考えられる。組織の幹細胞から様々な細胞種が作られる詳細なしくみは十分明らかになっていないが、本研究ではQualitz-seq2という高精度なシングルセル解析を駆使して、胃組織の遺伝子発現を詳細に解析することで、1細胞レベルでシグナル経路の解明に成功した。即ち、非常に高い精度のシングルセル解析で、成体組織の細胞シグナル経路の解明が可能であることを実証できた点でも学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the mouse stomach as a model system to develop basic technologies for the regeneration of functional gastric epithelial tissue. Firstly, we developed a 3-dimensional culture method to prepare the proliferative stem cells from adult mouse stomach by culturing them in serum-free medium. Taking advantage of single cell analysis technologies, we identified the regulatory signals for gastric epithelial cell differentiation. We found that EGF signaling promotes differentiation from the stem cells to mucus-secreting cells. We also found that activation of NK-kB signaling suppressed differentiation signaling and maintained the stem cell state.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：胃 幹細胞 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本は世界でも胃がん患者発生率の高い国のひとつである。胃がんは、長期にわたるピロリ菌感染による段階的な胃組織の変化の末に発症すると言われており、ピロリ菌の抗生物質による早期除菌は胃がん発症の予防に有効である。しかし、長年ピロリ菌に感染していた場合、除菌してもすでに蓄積した遺伝子変異などでがんを発症する場合も多いため、除菌で完全にがんを抑制できるわけではないことが知られている。胃がんを発症した場合、ごく初期には内視鏡手術が、やや進行した場合には胃の部分切除や全摘出が行われる。胃切除術後には、胃の縮小、内分泌機能の低下による消化管の協調不全が起こり、多くの患者でQOLが低下することが知られている。

2. 研究の目的

本研究では、胃再生のための組織工学の基盤技術を構築することを目的とした。モデル生物としてマウスを利用して機能的な胃組織を再生するため、まず胃上皮幹細胞の増殖制御シグナルを解明し、さらに幹細胞を分化させるシグナル経路を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

胃の幹細胞の増殖と分化シグナルを同定するため、成体マウスの胃組織をプロテアーゼ処理することにより、胃組織を構成する様々な細胞をバラバラに解離させ、約4,000細胞について1細胞レベルで遺伝子発現を網羅的に解析した。このシングルセル解析には理化学研究所の二階堂博士、笹川博士、團野博士らが開発したQualitz-seq2を用いた。特に胃酸を分泌する壁細胞や消化酵素を分泌する主細胞が存在する胃体部組織について解析し、得られた遺伝子発現情報のインフォーマティクス解析によりこれら上皮細胞の制御シグナル情報を得た。さらに、得られた有望な分化シグナル候補について、細胞増殖因子やその阻害剤を添加した*in vitro*のオルガノイドアッセイを行い、特に幹細胞の未分化・増殖制御シグナルと表層粘液細胞への分化シグナルを解析した。

4. 研究成果

成体マウス(C57BL/6J)の胃組織から上皮組織を分離し、Qualitz-seq2を用いてシングルセル解析した結果、図1に示した通り、表層粘液細胞、表層粘液前駆細胞、峽部幹細胞、副細胞、主細胞、壁細胞、各種内分泌細胞などを同定した。

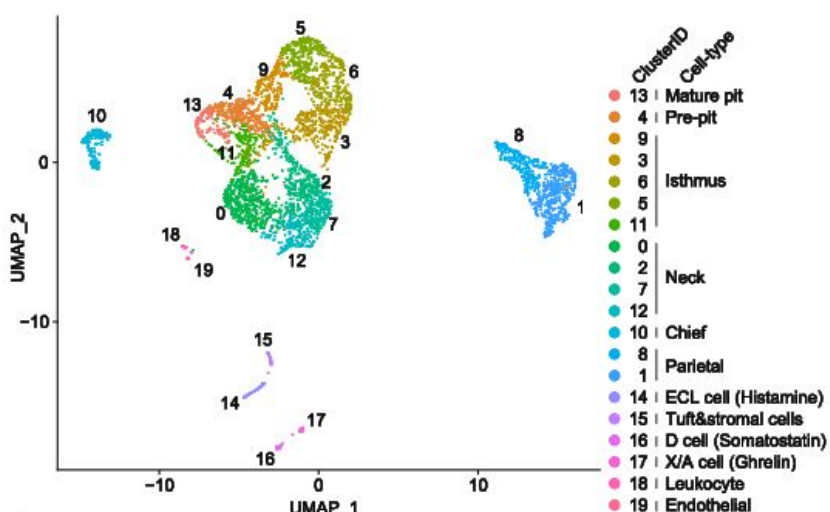


図1. 成体マウス胃体部上皮組織のシングルセル解析 UMAP で各細胞種の遺伝子発現を可視化した。

続いてこの発現データを用いて疑似時間解析を行った結果、図2に示した通り、特に表層粘液細胞、表層粘液前駆細胞、峽部幹細胞について、連続的な細胞集団を形成していることが確認された。そこで、これらの細胞集団間で特異的に発現変動する遺伝子群について解析したところ、峽部幹細胞で活性化し、表層粘液細胞で抑制されるパスウェイとしてmRNA プロセッシングやリボソームタンパク質関連に加えて、TNF-NF- κ Bシグナル経路が示唆された。一方、表層粘液細胞で活性化し、峽部幹細胞で抑制されるパスウェイとして、電子伝達系やEGFR1シグナル経路が示唆

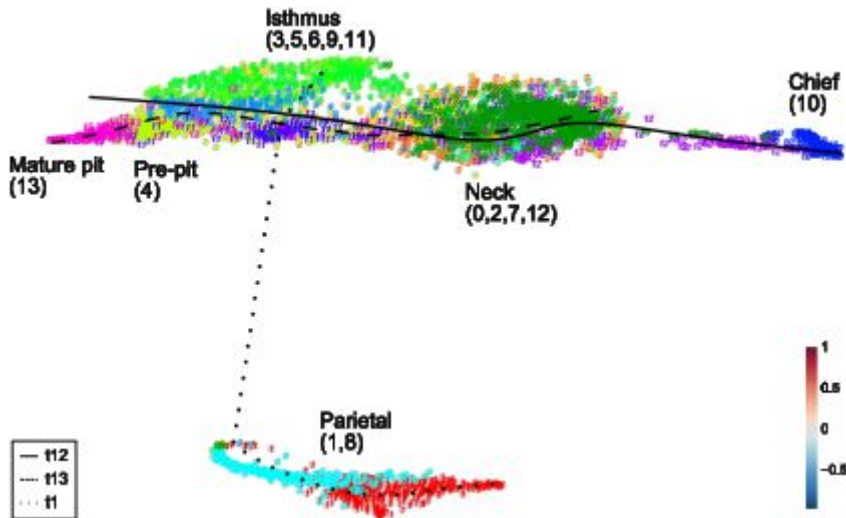


図2 . 成体マウス胃体部上皮細胞の疑似時間解析

された。さらに、TNFファミリーやEGFファミリーのリガンドと受容体に関して、各胃組織細胞での発現を解析したところ、幹細胞の制御に関与しているのはTNFファミリーの中でもTnfsf12とその受容体Tnfrsf12aであること、また、表層粘液細胞への分化に関与しているのはTGF α やその受容体Egfrであることが示唆された。

これらのシングルセル解析で示唆された情報が正しいか検証するため、*in vitro*の胃オルガノイド培養系で、これらリガンドやシグナル阻害剤を添加して培養した後、各種胃上皮細胞特異的マーカー遺伝子の発現やタンパク質マーカーの発現を確認することで検証した。我々の培養条件では、マウス成体から調製した胃組織上皮細胞を培養すると、中空の上皮細胞からなる胃オルガノイドが増殖するが、これらの構成細胞は、主にMKI67陽性の峽部幹細胞とGKN2を弱く発現する表層粘液前駆細胞であることを確認している。

これらの胃オルガノイドにEGFファミリーの1つであるTGF α を添加して培養したところ、図3に示した通り、EGFシグナルを活性化するとGkn2などの各種表層粘液細胞マーカーの発現が誘導され、Mki67などの増殖マーカーの発現が低下することが確認された。

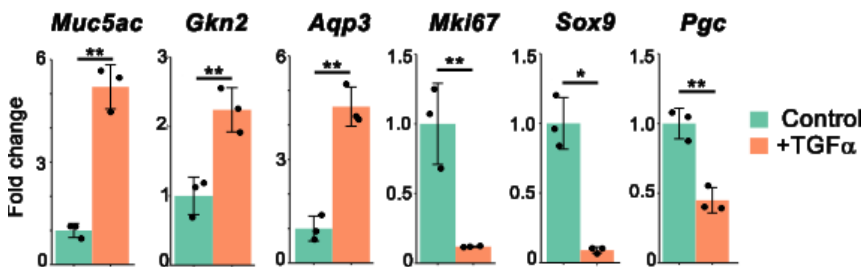


図3 . TGF α を添加して培養したマウス胃オルガノイドにおける各種胃上皮細胞マーカーの発現

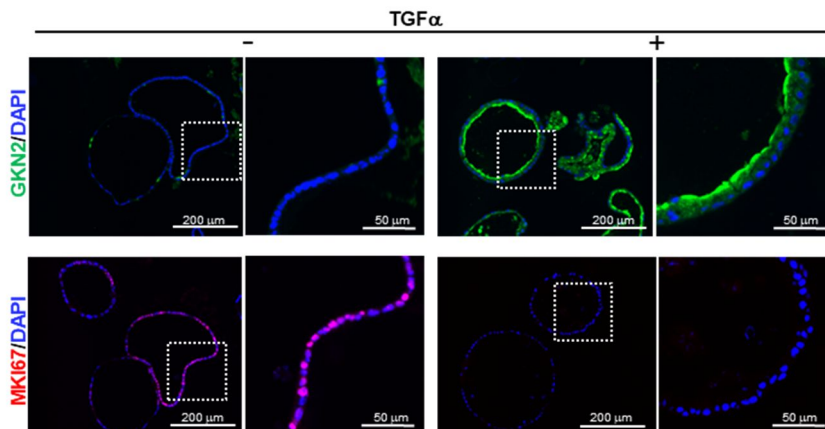


図4 . TGF α を添加して培養したマウス胃オルガノイドの免疫蛍光染色像

また、図4に示した通り、胃オルガノイドをTGF α 添加培地で培養すると、GKN2陽性の表層粘液

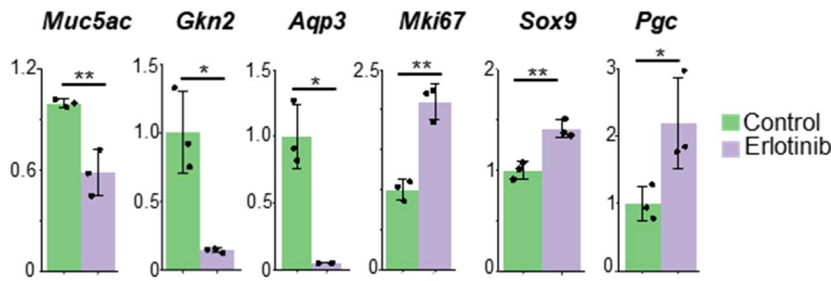


図5 .EGF シグナル阻害剤を添加して培養したマウス胃オルガノイドにおける各種胃上皮細胞マーカーの発現

細胞マーカーへと分化し、MKI67 陽性の峽部幹細胞が消失することが確認された。一方、EGF シグナル阻害剤である Erlotinib を添加してオルガノイドを培養すると、各種表層粘液細胞マーカーの発現が抑制され、増殖マーカー *Mki67* の発現が上昇することが確認されたことから、TGF などの EGF シグナルが峽部幹細胞から表層粘液細胞への分化に必要であることが確認された。

次に、胃オルガノイドに TNF ファミリーの 1 つである TNFSF12 を添加して培養したところ、図 6 に示した通り、*Gkn2* などの各種表層粘液細胞マーカーの発現が抑制され、*Mki67* などの増殖マーカーの発現が上昇することが確認された。また、図 7 に示した通り、胃オルガノイドを TNFSF12 添加培地で培養すると、GKN2 陽性の表層粘液細胞が減少し、多くの細胞が MKI67 陽性の幹細胞として確認された。一方、図 8 に示した通り、TNF シグナル下流の NF-κB 阻害剤を添加した培地でオルガノイドを培養すると、各種表層粘液細胞マーカーの発現が上昇し、増殖マーカー *Mki67* の発現が抑制されることが確認されたことから、TNF-NF-κB シグナルは峽部幹細胞の未分化状態を正に制御するシグナルであることが確認された。

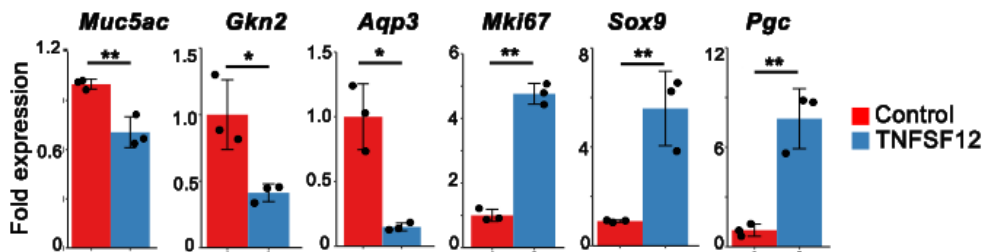


図6 .TNFSF12 を添加して培養したマウス胃オルガノイドにおける各種胃上皮細胞マーカーの発現

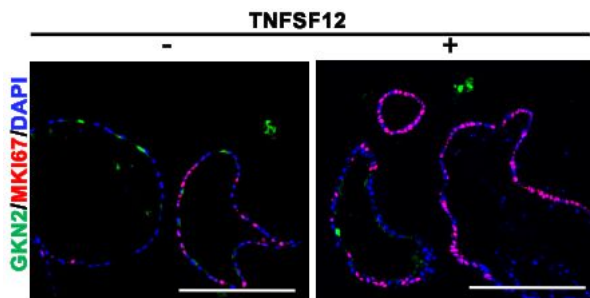


図7 .TNFSF12 を添加して培養したマウス胃オルガノイドの免疫蛍光染色像

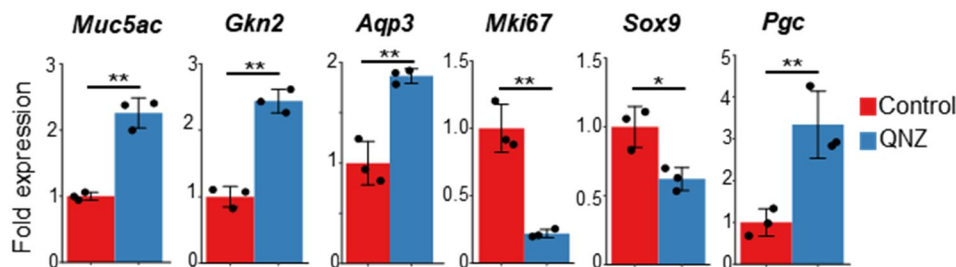


図8 .NF-κB 阻害剤を添加して培養したマウス胃オルガノイドにおける各種胃上皮細胞マーカーの発現

以上本研究では、胃上皮細胞のシングルセル解析を行い、胃の幹細胞の未分化状態を正に制御するシグナルとして TNF-NF- κ B 経路を同定し、幹細胞から表層粘液細胞への分化を促進するシグナルとして EGFR1 経路を同定した。これらの情報は、胃組織再生のための胃の幹細胞の増殖と分化をコントロールする上で重要な知見であり、将来の胃組織再生のための基盤的情報として有用と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 栗崎晃、高田仁実	4. 巻 276
2. 論文標題 胃オルガノイドによるマイ・メディシン	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 585-589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗崎晃
2. 発表標題 胃オルガノイドを用いた細胞分化と疾患モデルの作製
3. 学会等名 第22回外科分子細胞治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田仁実
2. 発表標題 Molecular Mechanisms Underlying Gastric Stem Cell Differentiation during adult tissue homeostasis
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗崎晃
2. 発表標題 胃オルガノイドを用いたマイメディシン
3. 学会等名 第回日本再生医療学会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	高田 仁実 (Takada Hitomi) (80641068)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教 (14603)	

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