

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08375

研究課題名（和文）ヒト胃幹細胞の腸上皮化生・胃癌起源細胞へのガストリン依存性転化機序の解析

研究課題名（英文）Mechanism of gastrin-dependent conversion of human stomach stem cells to intestinal metaplasia / gastric cancer origin cells

研究代表者

新倉 量太 (Niikura, Ryota)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90625609

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）：特定の胃内細菌叢（*Fusobacterium nucleatum*と*Neisseria subflava*）が*Helicobacter pylori*除菌後胃癌の発癌、幹細胞nicheシグナル増強と関連を明らかにした。これらの細菌投与による胃癌細胞株、マウスモデル解析を行った。*Fusobacterium nucleatum*は直接胃粘膜上皮に接着し、接着後は、壁細胞の発現低下による高ガストリン状態の可能性が示唆された。さらに、これらの細菌は*Helicobacter pylori*の存在によらず免疫反応をenhanceし、oncogenicな反応を引き起こしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘリコバクターピロリ菌の除菌療法の普及により、胃癌の発生リスクの低下が行われるようになった。しかし、ヘリコバクターピロリ菌除菌後にも胃癌が発生することが多くの疫学研究により報告されるようになった。日本国内には、数百万の除菌後の慢性胃炎患者があり、これらの患者に対する除菌後胃癌の病態解明、サーベイランス、予防が求められている。本研究事業は、学術的に新規性が高い幹細胞niche、ガストリン、胃内細菌叢の分野に焦点をあてたものである。ヘリコバクターピロリ菌除菌後胃癌の病態解明に取り組むことで胃癌の診療に寄与することが可能であり、社会的意義が高い研究事業である。

研究成果の概要（英文）：Based on our previous studies, we revealed that specific gastric microbiota such as *Fusobacterium nucleatum* and *Neisseria subflava* may be associated with gastric cancer development after *Helicobacter pylori* eradication in human patients. Enhancement of signals associated with the stem cell niche was observed. To elucidate the causality of these results, we performed multiple model analyses using gastric cancer cell lines, *Atp4b-111b* mouse models, and mouse organoid models, with the administration of *Fusobacterium nucleatum* and *Neisseria subflava*. We showed that *Fusobacterium nucleatum* directly adheres to the gastric mucosa, and subsequent adhesion may lead to downregulation of the expression of H+/K+-ATPase, resulting in a hypergastrinemic state. Furthermore, these bacteria may enhance immune responses and induce oncogenic reactions regardless of the presence of *Helicobacter pylori*.

研究分野：胃癌

キーワード：胃癌幹細胞niche 胃内細菌叢 *Fusobacterium nucleatum* *Neisseria subflava* 胃癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

我が国は胃癌の罹患率が非常に高く、悪性腫瘍死の主な原因を占める。胃癌の大部分を占める分化型胃癌はヘリコバクター・ピロリ菌 (HP) 感染による慢性炎症が胃粘膜萎縮と呼ばれる前癌病変として発症する。この胃粘膜萎縮は、HP の除菌に成功した後も多くの患者群で持続し、これが HP 除菌後の胃癌リスクの一因と考えられている。我々はこれまでに 573 人の除菌後の患者の追跡調査を行い、胃粘膜萎縮を有する患者はその後の累積胃癌リスクが 9 倍増加し、腸上皮化生を有する患者は 3 倍増加することを報告している [図 1、業績 1]。

これらの現象には胃幹細胞内の異常が関与していると考えられている。HP 感染により活性化された胃幹細胞が、DNA メチル化による epigenetic な変化と遺伝子レベルでの oncogenic な変異を生じることによって、腸上皮化生および胃癌の起源細胞と変化すると考えられている。しかしながら、以下のような疑問点が残されている。幹細胞が HP による慢性炎症によりどのように腸上皮化生や胃癌の起源細胞となるのか、また除菌前後でどのような変化が生じるのか。高ガストリン状態が胃炎免疫系および発癌に与える影響小腸粘膜障害は現在でもその機序が不明であり、スクリーニングや予防戦略が確立されていない。これらの機序は不明でありその病態解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、HP 除菌後も持続する胃粘膜萎縮と腸上皮化生からの発癌に関与する胃幹細胞 niche のメカニズムを明らかにし、新規の胃癌の予防治療アプローチを提唱することである。

3. 研究の方法

(1) HP 除菌後胃癌、自己免疫性胃炎後胃癌の遺伝子異常の機能解析

ヒト胃検体を用いた、幹細胞 niche 構成成分を次世代シーケンサーにより解析を行う。免疫・間質系細胞の違いや、各細胞集団（好中球、単球、ヘルパーT細胞等）から分泌されるサイトカイン、ケモカイン群の解析、シグナル伝達系の解析を行う。

(2) 胃癌細胞株、マウスモデル、オルガノイドモデルを用いた機能解析、制御法の開発
ヒト胃検体にて同定された幹細胞 niche を、胃癌細胞株、マウスモデル、オルガノイドモデルを用いて再現を行う。さらに、その制御法の探索的な開発も行う。

4. 研究成果

(1) HP 除菌後胃癌、自己免疫性胃炎後胃癌の遺伝子異常の機能解析

288 人の HP 除菌後の患者胃粘膜を解析した。16srRNA シークエンスを行い、幹細胞 niche としての胃内細菌叢の解析を行った。PCA 解析から胃内細菌叢の Profile を 3 つの集団に分類することができた。疫学データを参照し、Group3 の集団において HP 除菌後胃癌の発生率が高いことが明らかになった。Group3 の集団には、*Fusobacterium nucleatum*、*Neisseria subflava* の割合が高率であった。幹細胞 niche に胃内細菌叢が関与している可能性に着目した。

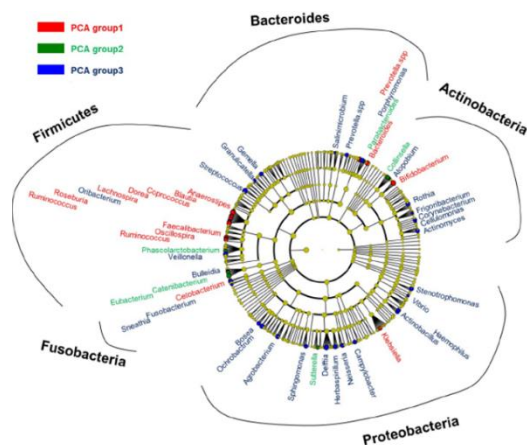


図1 Hp除菌後患者胃内細菌叢

The cancer genome atlas (TCGA) のシークエンスデータの解析を行い、胃癌組織の 76% に *Fusobacterium nucleatum*、50% に *Neisseria subflava* が検出された。さらに、シグナル解析の結果、CXCL1、CXCL2、CXCL10、CCL20、CCL22 シグナルの増強が認められた。これらの結果の因果関係を明らかにするために、胃癌細胞株、遺伝子改変マウスモデルを用いた、*Fusobacterium nucleatum* と *Neisseria subflava* 投与による in vitro、in vivo モデル解析を行った。

AGS 胃癌細胞株を用いた in vitro モデルにおいて、そのほかの Group3 の細菌 (*Neisseria cinerea*、*Haemophilus parainfluenzae*、*Streptococcus mutans*、*Delftia tsuruhatensis*) と比較し、*Fusobacterium nucleatum*、*Neisseria subflava* は NF- κ B 及び SRE シグナル活性の有意な増強を認めた。共培養細胞株の RNA-seq の結果、*Fusobacterium nucleatum*、*Neisseria subflava* の transcriptomic changes は、*Helicobacter pylori* よりも高度であった。RT-PCR の結果、*Fusobacterium nucleatum*、*Neisseria subflava* は、CCL20、CCL22、CD274、PTGS1 の有意な upregulated を認めた。この結果は、ヒト胃癌患者の遺伝子解析結果と同様であった。

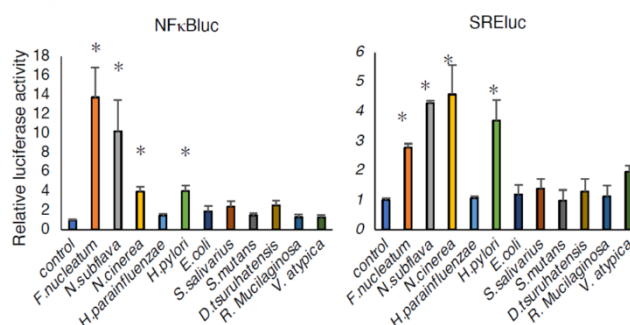


図2 *Fusobacterium nucleatum*、*Neisseria subflava*、他の細菌共培養における luciferase activity (AGS 胃癌細胞株)

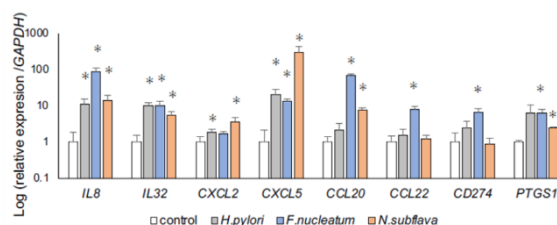


図3 *Fusobacterium nucleatum*、*Neisseria subflava*、*H. pylori* 共培養における遺伝子発現 (AGS 胃癌細胞株)

Atp4b-I11b マウスを用いた in vivo モデルにおいて、*Fusobacterium nucleatum*、

Neisseria subflava の経口投与実験を行った。Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava 投与群のマウスは、対照群のマウスと比べて F4/80+ macrophages、CD11c+ dendritic cells、CD3+ T lymphocytes、CD45R+ / CD19+ B lymphocytes の増加を認めた。Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava の経口投与により、H/K-ATPase の発現低下を認め、negative feed backによりガストリンが増強している可能性が示唆された。

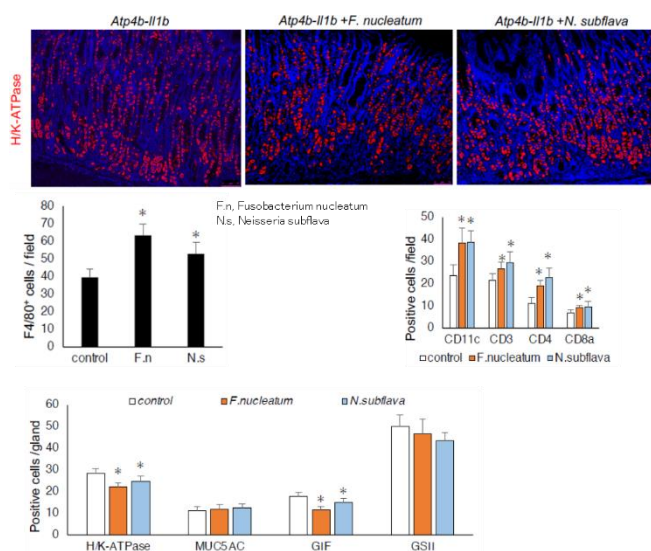


図4 Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava、H. pylori経口投与におけるリンパ球、H+/K+ ATPaseの比較(マウスAtp4b-II1bモデル)

Atp4b-II1b マウスモデルから樹立したオルガノイドモデルにおいて、Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava、H. pylori 投与を行った。RNA-seqの結果、Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava、H. pylori の transcriptomic changes はそれぞれ独立していた。多くの炎症性メディエーターは、Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava 投与によりシグナルの増強をみとめ、AGS 細胞株の結果と一致していた。GSEA 解析から Kras、Nfκβ、PI3K-mTOR のシグナル増強も認め、これらの結果も AGS 細胞の結果と一致していた。RT-PCR の結果、Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava は、IL33、CXCL5、CC122、Ptgs1 の有意な upregulated を認めた。

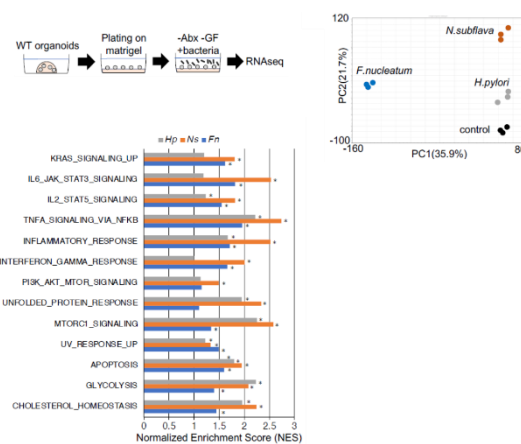


図5 Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava、H. pylori投与における遺伝子発現の比較(マウスオルガノイドモデル)

ヒト胃癌患者検体において、胃内細菌叢 (Fusobacterium nucleatum と Neisseria subflava) が rich な患者集団は、low な集団と比べて CD68+、CD163+マクロファージの割合が有意に高率であった。これらの結果から、H. pylori の有無にかかわらず、Fusobacterium nucleatum、

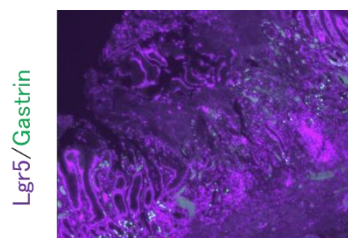


図6 ヒト胃癌部におけるGastrinの発現

Neisseria subflava は免疫反応を enhance し、oncogenic な反応を引き起こしている可能性が示唆された[業績 1]。さらに、Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava rich な胃癌患者検体の免疫染色において、癌部での Lgr5 の発現低下、ガストリンの高発現を明らかにした。

Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava の胃粘膜上皮への接着に関するメカニズムを解析するために、抗生剤投与モデルの代わりに、heat killed Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava と heat killed していない Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflava を AGS 胃癌細胞株に感染させ adhesion assay を行った。Fusobacterium nucleatum は胃癌上皮細胞への強い接着反応を示すことが明らかになっ

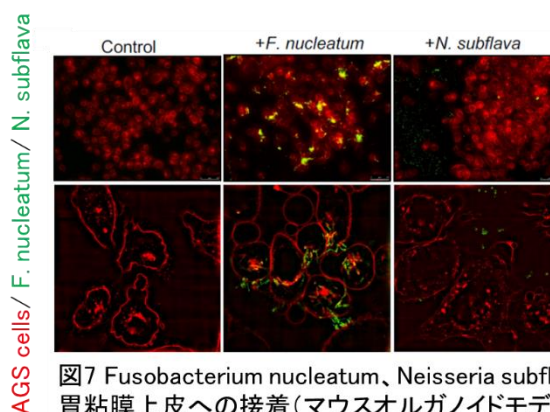


図7 Fusobacterium nucleatum、Neisseria subflavaの胃粘膜上皮への接着(マウスオルガノイドモデル)

た。次に、Fusobacterium nucleatum の上皮細胞の接着メカニズムの解明に取り組んだ。胃粘膜に多く発現する Muc6 の糖鎖系に着目した。GlcNAC は Muc6 と相関して発現する。特に、胃癌の前癌病変である腸上皮化生において、Muc6、GlcNAC は発現が低下する結果が報告されている。Fusobacterium nucleatum に GlcNAC を加えることで Fusobacterium nucleatum の上皮細胞の接着を減らし、糖鎖の投与による新しい治療ターゲットの可能性を明らかにした。

今後、多数の胃癌患者検体を持って、癌部、前眼部、非癌部における Fusobacterium nucleatum の接着の違いについてさらなる検討を行うことを予定している。さらに、GlcNAC による Fusobacterium nucleatum 接着、感染予防の阻害剤としての可能性についての検討も行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Arai Junya, Niikura Ryota, Hayakawa Yoku, Kawahara Takuya, Honda Tetsuro, Hasatani Kenkei, Yoshida Naohiro, Nishida Tsutomu, Sumiyoshi Tetsuya, Kiyotoki Shu, Ikeya Takashi, Arai Masahiro, Suzuki Nobumi, Tsuji Yosuke, Yamada Atsuo, Kawai Takashi, Koike Kazuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Use of Antibiotics and Probiotics Reduces the Risk of Metachronous Gastric Cancer after Endoscopic Resection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 455 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology10060455	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 -

1. 著者名 Arai Junya, Niikura Ryota, Hayakawa Yoku, Sato Hiroki, Kawahara Takuya, Honda Tetsuro, Hasatani Kenkei, Yoshida Naohiro, Nishida Tsutomu, Sumiyoshi Tetsuya, Kiyotoki Shu, Ikeya Takashi, Arai Masahiro, Suzuki Nobumi, Tsuji Yosuke, Yamada Atsuo, Koike Kazuhiko	4. 巻 5
2. 論文標題 Nonsteroidal anti inflammatory drugs prevent gastric cancer associated with the use of proton pump inhibitors after Helicobacter pylori eradication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 770 ~ 777
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12583	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 -

1. 著者名 Notoya Genso, Niikura Ryota, Yamada Atsuo, Ochi Masanori, Kawai Takashi, Koike Kazuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Long Survival after Gastrointestinal Bleeding in a New-Onset Heyde 's Syndrome Patient Treated with Multiple Endoscopic Hemostatic Procedures and Repeated Transfusions after Aortic Valve Replacement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 819 ~ 824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000519004	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 -

1. 著者名 Arai Junya, Niikura Ryota, Hayakawa Yoku, Kawahara Takuya, Honda Tetsuro, Hasatani Kenkei, Yoshida Naohiro, Nishida Tsutomu, Sumiyoshi Tetsuya, Kiyotoki Shu, Ikeya Takashi, Arai Masahiro, Suzuki Nobumi, Tsuji Yosuke, Yamada Atsuo, Kawai Takashi, Koike Kazuhiko	4. 巻 103
2. 論文標題 Chemoprevention of Oesophageal Squamous-Cell Carcinoma and Adenocarcinoma: A Multicentre Retrospective Cohort Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 192 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000520924	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 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 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 -

1. 著者名 Niikura Ryota, Hayakawa Yoku, Nagata Naoyoshi, Miyoshi-Akiyama Tohru.	4. 巻 .
2. 論文標題 Non-Helicobacter pylori gastric microbiome modulates prooncogenic responses and is associated with gastric cancer risk	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gastro Hep Advances	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gastha.2023.03.010	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
研究分担者	早河 翼 (Hayakawa Yoku) (60777655)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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