

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08377

研究課題名(和文) 時空間的解析による胃化生粘膜発生機序の解明と胃粘膜再生療法の開発

研究課題名(英文) Spatiotemporal analysis of gastric metaplasia and development of gastric mucosa regenerative therapy

研究代表者

平田 喜裕 (Hirata, Yoshihiro)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：10529192

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)：胃粘膜特異的IL-33発現マウスおよびSox9ノックアウトマウスを樹立し、任意のタイミングで胃体部、もしくは胃前庭部特異的に化生粘膜を作成することに成功した。これらのモデルにより急性発症、および慢性発症の化生について検討することが可能となった。これらの胃組織にはCD45陽性炎症細胞浸潤がみられ、化生発生において炎症細胞浸潤が重要と考えられた。また体部および前庭部では化生粘膜の性状と発生機序が異なっていた。粘膜RNAでは、上皮細胞におけるこれらの遺伝子変異によってケモカインや接着分子の発現が上昇しており、化生発生における上皮細胞と炎症細胞間の相互作用のメディエーターになっていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃粘膜の化生はピロリ菌感染などにもなって発生する前癌病変として知られているが、その発生機序は明らかになっておらず、化生粘膜の再生、治療法は確立されていない。本課題において新規の化生発生モデルが樹立され、発生機序の解明や治療法の開発に役立つと考える。とくに動物モデルを用いることで初めて明らかになった炎症細胞との相互作用については、キーマediatorであるケモカインをブロックすること、もしくは炎症細胞そのものを標的として枯渇させることなどによって化生粘膜の再生、もしくは再分化を可能とする新規治療となる可能性がある。また化生粘膜からの発癌機序、発癌の予防法についても研究が展開可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated novel mouse strains using stomach specific IL-33 expression or SOX9 deletion, in which gastric metaplasia developed corpus or antrum specific manners. Metaplasia can be rapidly induced by exogeneous treatment with tamoxifen in former strain, enabling us to investigate the acute phase of metaplasia. TFF1cre;IL33 mouse showed chronic metaplasia. In addition, SOX9 KO model developed chronic metaplasia with antrum dominant gastritis. All models showed dense CD45+ inflammatory cell infiltration around the metaplastic epithelium, indicating the critical role of inflammatory cells in metaplasia development. In these models, characteristics of metaplastic epithelium were different between corpus and antrum metaplasia, suggesting location specific metaplastic process. RNA from metaplastic epithelium showed enhanced chemokine and adhesion molecule expression, which may be the mediator of interactions between epithelium and inflammatory cells in metaplasia development.

研究分野：消化器内科

キーワード：化生 胃癌 炎症 相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は依然として日本における死亡者数第三位の悪性腫瘍であり、その大部分がピロリ菌感染による胃炎を背景として発症する。ピロリ菌の除菌治療により胃癌の予防が期待され、約 1/2 程度に発癌が減少すると報告されているが、除菌治療だけでは完全に胃癌発生を抑制することができない。除菌後胃癌の危険因子の研究により、胃粘膜の萎縮および腸上皮化生という胃炎に伴う粘膜変化のある症例では発癌率が高いことがわかってきた。また以前より胃化生粘膜は除菌治療による改善効果に乏しく、“point of no return”と呼ばれてきた。これらの臨床研究の結果からは除菌後に化生粘膜が残存することが長期的な胃癌リスクを高めていると考えられる。胃癌の完全な予防のためには化生粘膜の治療、すなわち正常粘膜の再生が重要である。

胃粘膜では上皮幹細胞による細胞供給と制御された分化によって胃底腺が構成され、恒常性を保ちつつ食物の消化という重要な生体機能を担う。微生物感染、食事抗原、胃酸など様々な刺激による慢性的な炎症によって恒常性の破綻が起こると、一部の上皮細胞は細胞死を起こすが、大部分は細胞死を回避して臓器の損傷を最低限に保つ。しかしその代償として上皮細胞は正常な分化プログラムを逸脱し、胃粘膜固有細胞以外へと異常分化をきたし化生粘膜が生じる。現在この化生粘膜を回復させ、正常上皮細胞を再生する粘膜再生治療はない。近年の研究で化生は上皮幹細胞が起源になっている可能性が示唆され、幹細胞の遺伝子発現変化や化生粘膜の遺伝子発現パターンなどが報告されてきた。しかし化生粘膜における上皮細胞内の分子機序の理解はいまだ十分とはいえず、治療法は開発されていない。また化生が慢性的な炎症に伴って発生することを考えると、上皮細胞だけでなく、周囲の環境との相互作用、とくに免疫細胞、血管内皮細胞、消化管ホルモンなどが関与している可能性が高い。しかし化生発生におけるこの複雑な細胞間相互作用機序については大部分が未解明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は複雑な胃化生粘膜発生の分子機序を解明すること、そして胃粘膜再生療法の基盤を確立することである。大部分の胃癌が慢性胃炎を背景に胃炎—萎縮—化生—癌という連続的な粘膜変化を経て発生することを考えると、化生の発生機序の解明とその治療応用は胃癌の制圧に必要不可欠である。まず化生の内因性要因の解明として、化生細胞の起源である上皮細胞（およびそれを供給する上皮幹細胞）そのものの経時的分子生物学的変化の解明をめざす。さらに外的要因として、胃粘膜において上皮細胞に影響を与える炎症細胞、間質組織などの周囲の微小環境との細胞間相互作用を明らかにする。これらにより既存の研究で十分に明らかにされていない化生の重要分子、治療標的分子の同定を目指す。

3. 研究の方法

胃粘膜に遺伝子変異を導入するために、胃腺窩上皮特異的誘導性遺伝子変異導入 K19-creERT マウス、また我々が以前の助成事業で樹立した恒常性胃上皮遺伝子変異マウス TFF1-cre マウスを用いた。胃化生粘膜の発生を目指し、ヘリコバクター感染で胃粘膜に誘導されることが報告されている IL-33 に着目して、誘導性 IL33 発現マウス(LSL-IL33 トランスジェニックマウス)を作成した。非誘導性恒常的 IL-33 発現マウスとして TFF1-promoter 下に IL-33 を発現させるノックインマウス(TFF1pro-IL33 マウス)を作成した。Sox9 のノックアウトを行う目的で Sox9^{fllox/fllox} マウスを用いた。

(2) 胃炎の評価と解析

マウスを交配し、必要に応じてタモキシフェンを経口投与し、経時的に胃粘膜を摘出し、解析に供した。病理学的評価は胃粘膜病理標本の HE 染色、幹細胞マーカー発現は免疫染色と胃粘膜から抽出した RNA の定量的 PCR および RNAsequence で検討した。摘出した胃組織を細切し、EDTA およびコラゲナーゼで処理して細胞を抽出、フローサイトメトリーで炎症細胞の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 胃粘膜特異的サイトカイン発現マウスの樹立と解析

ピロリ菌感染粘膜で高発現が確認されているインターロイキン 33 (IL-33) に着目し、CAG-promoter および lox-stop-lox 配列の下流にマウス IL-33 を発現させるコンストラクトを用いてマウストランスジェニックライン (LSL-IL33 マウス) を樹立した。そのうち系統 3 および系統 5 を KRT19-creERT マウスと交配させタモキシフェンの投与による遺伝子組み換えを誘導し、胃組織の免疫染色により IL-33 発現を確認した。このマウス (KRT19-creERT; LSL-IL33 マウス) はタモキシフェン投与 1w 後に胃体部の腺峡部付近に GSII 陽性となる化生粘膜を生じ、4w 後にはほぼ正常に回復していた。さらに 1w 後の胃粘膜の腺底部と粘膜下層に CD45、CD11b 陽性の炎症細胞が浸潤し、また上皮細胞とくに GSII 陽性細胞で Sox9 の発現が増加していたが、これらはすべて 4w 後に消失していることがわかった (図 1)。4w 後には IL-33 発現も野生型と同程度まで減少していた。本モデルは誘導性、一過性に炎症細胞浸潤と化生粘膜を生じる急性モデルとなると考えられた。次に慢性的な化生粘膜作成を目指し、恒常的な IL-33 発現モデルの樹立を行った。胃粘膜特異的、恒常的遺伝子改変を可能とする TFF1-cre マウスと LSL-IL33 マウスを交配したマウス (TFF1-cre; LSL-IL33 マウス) では生後 3w で IL-33 の腺窩上皮での発現増加がみられた。6w 齢では体部を中心に主細胞、壁細胞の減少、消失と GSII 陽性の化生粘膜が発生し、12w 齢 24w 齢 65w 齢とさらに化生粘膜の増加がみられた。これらの化生粘膜は炎症細胞浸潤を伴っていた (図 2)。これらより LSL-IL33 系統は化生粘膜の研究に有用なモデルと考えられた。

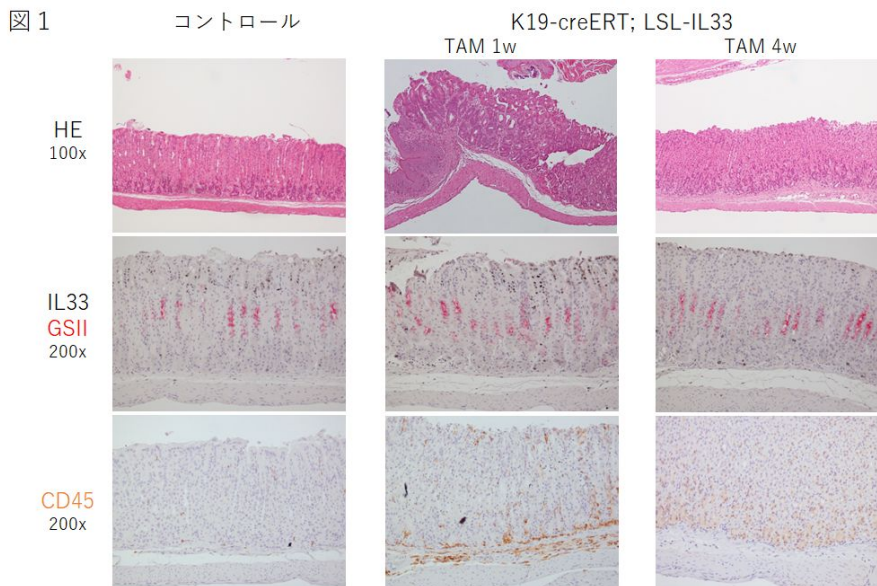


図 1 胃粘膜特異的 IL33 発現による化生粘膜発生とその特徴

コントロールマウス (LSL-IL33) とタモキシフェン (TAM) 投与後の K19-creERT; LSL-IL33 の胃組織
マウス上段 HE 染色 100x 中段 IL33 および GSII による染色 200x 下段 CD45 染色 200x

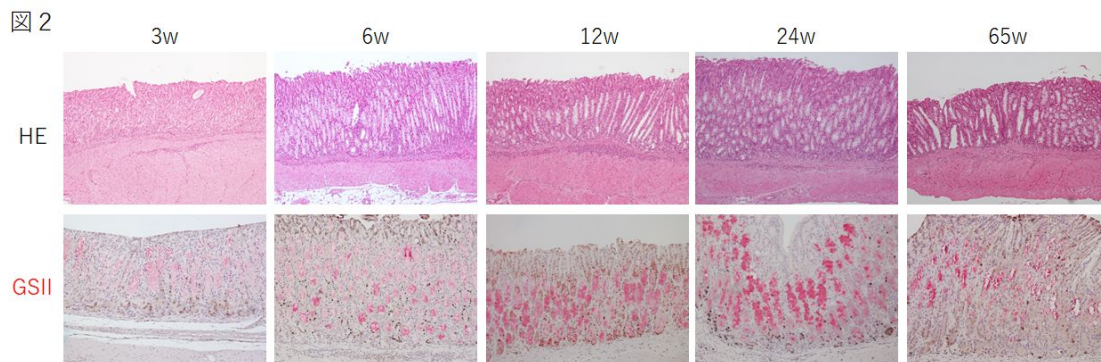


図 2 恒常的 IL33 発現による化生粘膜発生とその時間経過

TFF1cre; LSL-IL33 マウスの経時的胃組織像
マウス上段 HE 染色 100x 下段 GSII による染色 200x

(2) CRISPR-CAS9 を用いた化生粘膜発生マウスの作成

つづいて cre システムによる遺伝子改変によらない慢性的な化生粘膜作成を目指し、恒常的な IL-33 発現モデルの樹立を行った。前年度の結果より胃腺窩上皮に恒常的に IL33 を発現させるため CRISPR-CAS9 システムを用いて TFF1 プロモーター下に直接 IL33 を発現させるノックインマウス(TFF1pro-IL33 マウス)を作成した。得られたマウス二系統(Line6,8)において KRT19-creERT;LSL-IL33 マウスと同様に化生と炎症細胞浸潤を伴う胃炎発生系統となることが確認された。また炎症細胞浸潤、化生粘膜ともに 24w まで経時的に増加していた(図 3 A)。またこれらの炎症細胞を FCM で解析したところ Gr1 陽性の好中球はわずかであり大部分が F4/80 を中等度発現する骨髓球系の細胞であった(図 3 B)。すなわち化生粘膜を慢性的に発生させるモデルの作成に成功した。

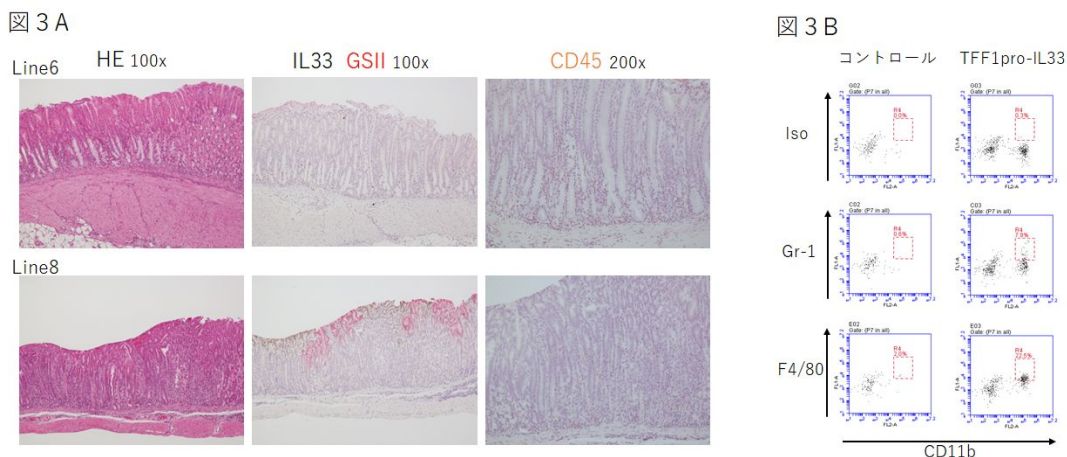


図 3 TFF1pro-IL33 マウスの解析

- (A) 6w 齢の TFF1pro-IL33 マウス系統 6 および 8 の胃組織像 (左 HE 100x 中 IL33 と GSII による免疫染色 200x 右 CD45 免疫染色 200x)
 (B) 6w 齢の TFF1pro-IL33 マウス系統 6 および コントロール マウス 胃組織白血球のフローサイトメトリー

(3) Sox9 ノックアウトマウスの解析

IL33 の過剰発現により化生粘膜が発生、また Sox9 や CD44 の幹細胞マーカーの発現亢進がみられたため、これら化生発生における Sox9 の役割について検討した(図 4 A)。TFF1-cre; Sox9^{flx/flx} マウスは時間経過とともに前庭部特異的に炎症細胞浸潤と上皮の過形成、また主細胞の消失を認めた。TFF1cre; LSL-IL33 マウスとは異なり体部にはほとんど化生と炎症細胞浸潤を認めなかった。免疫染色で TFF1-cre; Sox9^{flx/flx} マウスでとくに前庭部での Sox9 発現消失と CD45 陽性炎症細胞の増加、また上皮細胞の増殖マーカーの発現亢進がみられた(図 4 B)。このことより Sox9 の前庭部における恒常性維持、正常分化の促進作用が明らかになった。また体部では Sox9 のノックアウトが見られなかったことは、この分子が体部粘膜の発生に不可欠であり、TFF1-cre リコンビナーゼによるリコンビネーションを回避した細胞による組織恒常性維持作用の可能性が示唆された。これらより IL33 過剰発現系が体部化生粘膜の発生に、一方 Sox9 は前庭部の化生抑制に重要であると考えられた。

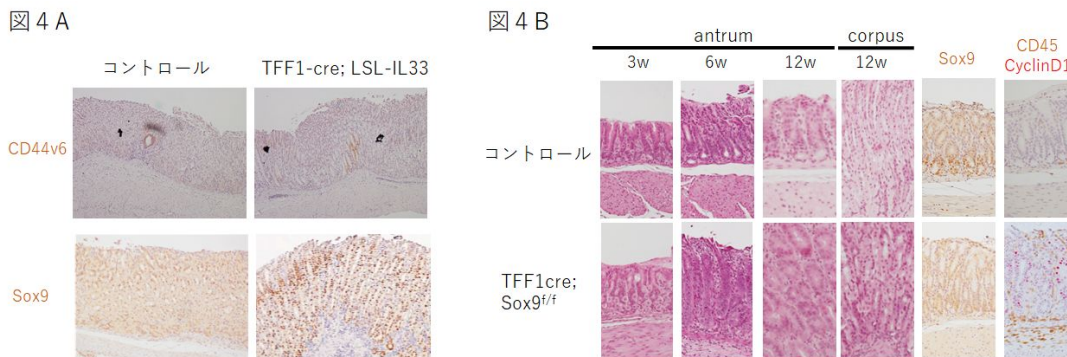


図 4 化生粘膜における Sox9 の役割

- (A) 6w 齢の TFF1-cre; LSL-IL33 マウス、コントロールマウスの胃組織の CD44v6, Sox9 の免疫染色 200x
 (B) TFF1-cre; Sox9^{flx/flx} マウスとコントロールの前庭部および体部胃粘膜の HE 染色 100x, Sox9, CD45, CyclinD1 の免疫染色 200x

(4) 化生粘膜のトランスクリプトーム解析

長期的に安定して化生粘膜を生じた TFF1-cre; LSL-IL33 マウスを用いて胃粘膜の RNA 発現の特徴を検討した。6w 齢のコントロールおよび IL33 発現マウスより RNA を抽出し、RNAseq にて発現変動を検討した(各群 n=3)。MAplot では化生発生マウスで 700 強の有意な発現増加遺伝子、500 強の発現低下遺伝子が認められた(図 5 A)。発現変動遺伝子でのヒートマップでクラスター化が確認された(図 5 B)。発現上昇遺伝子の GO 解析で cell activation, regulation of cell activation, cytokine production などの上皮系の細胞反応に加え、immune system process, immune response, leukocyte activation など免疫細胞の活性化や相互作用を示唆する発現変化がみられた(図 5 C,D)。発現上昇遺伝子の中には化生そのものを反映する Muc6 や Tff2 などの上皮細胞マーカーに加え、転写因子 Sox9、サイトカイン IL6、細胞接着分子 Itga2b, Itgb7, Itgae などが見られ、この化生モデルにおける炎症細胞との相互作用の重要性が示唆された(図 5 E)。今後はこれらの分子の阻害による化生粘膜の再生、制御を検討していく予定である。

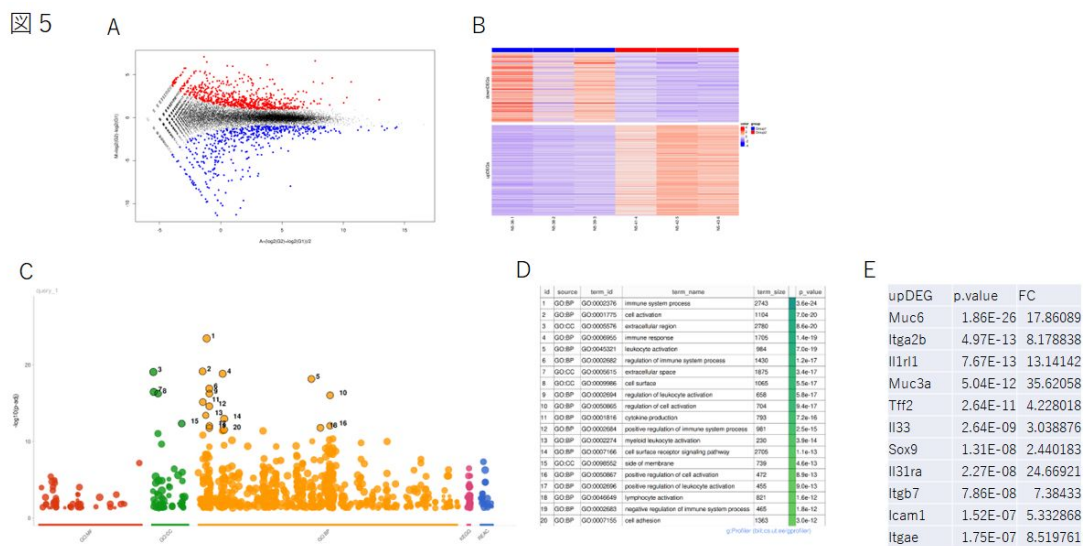


図 5 化生粘膜のトランスクリプトーム解析

(A) MA plot (B) 発現遺伝子のヒートマップ (C,D) GO解析 発現上昇GOタームtop20 (E) 発現上昇遺伝子例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayakawa, Y.; Hirata, Y.; Hata, M.; Tsuboi, M.; Oya, Y.; Kurokawa, K.; Abe, S.; Arai, J.; Suzuki, N.; Nakagawa, H.; Fujiwara, H.; Tateishi, K.; Maeda, S.; Koike, K	4. 巻 8
2. 論文標題 Dysregulated Immune Responses by ASK1 Deficiency Alter Epithelial Progenitor Cell Fate and Accelerate Metaplasia Development during H. pylori Infection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8121995	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 Tsuboi M, Niikura R, Hayakawa Y, Hirata Y, Ushiku T, Koike K.	4. 巻 10
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 1-11
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 -

〔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 Kazuya Koyanagi, Yoshihiro Hirata
2. 発表標題 Roles of Sox9 in gastric homeostasis
3. 学会等名 IMSUT Founding Commemorative Symposium Flash Talks Program
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuya Koyanagi, Yoshihiro Hirata
2. 発表標題 Roles of Sox9 in gastric homeostasis
3. 学会等名 The 81st Annual meeting of the Japanese cancer association
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
---------	---------