

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19474

研究課題名(和文)多系統胃上皮幹細胞の傍分泌制御機構と同時系譜追跡

研究課題名(英文) Simultaneous lineage tracing of multiple gastric stem cells and their paracrine regulation by stem cell niche

研究代表者

早河 翼 (Hayakawa, Yoku)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60777655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞に対するRspodinシグナルの検討を行うため、Tff1-Cre; tet0-Rspo3; R26-LSL-rtTAマウス、およびその受容体のLgr4・Lgr5の条件的ノックアウトマウスを用いた解析を行なった。その結果、Rspo3は幹細胞・頸部粘液細胞に発現するLgr4を介して主細胞への分化を誘導した。さらに、頸部粘液細胞から主細胞に分化する中間に位置する中間細胞を選択的に標識するマウスを作成して系譜追跡実験を施行した結果、この中間細胞集団は2分画に分けられ、分化型細胞は分裂能を有さず、前駆細胞型細胞は徐々に主細胞方向へに分化する機能があることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管上皮の腺管底部に存在するLgr5陽性幹細胞が同定されて以降、消化管幹細胞研究はLgr5陽性細胞の動態解析を中心に進められてきた。しかし申請者の精密かつ詳細な観察によって、胃上皮ではLgr5陽性幹細胞よりもその上方に位置するLgr5陰性(Lgr4陽性)幹細胞の方がより活発に腺管構成細胞を供給していることが明らかとなった。本研究は「これまでのLgr5=胃上皮の主たる幹細胞」という学説を覆す、大きな成果を輩出した。また、胃の基礎研究領域で簡易的な脱分化マーカーとして汎用されている主細胞・頸細胞間の中間細胞について世界で初めて選択的な細胞標識を実現し、分裂・分化様式を可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To examine Rspodin signaling to stem cells, we analyzed Tff1-Cre; tet0-Rspo3; R26-LSL-rtTA mice and conditional knockout mice of its receptors Lgr4 and Lgr5. As a result, Rspo3 induced differentiation into chief cells via Lgr4 expressed in stem cells and mucous neck cells. Furthermore, as a result of a lineage tracing experiment in mice in which intermediate cells located in the middle of differentiation from mucous neck cells to chief cells were selectively labeled, this intermediate cell population was divided into two fractions. The more differentiated cell type cells do not have the ability to divide, while the progenitor type cells have the function of gradual differentiation towards chief cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胃 幹細胞 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

消化管上皮は活発に増殖・分裂する幹細胞が子孫細胞を絶えず供給し、その恒常性を保っている。現在の認識では、消化管幹細胞群は少なくとも2種類の幹細胞分画により構成されており、大きく分けて腺管最底部に存在する Lgr5 陽性幹細胞と、そのやや管腔側に存在する Lgr5 陰性幹細胞が存在するとされる。幹細胞領域近傍の間質には傍分泌的に幹細胞機能を支持するニッチ細胞が存在し、幹細胞の生存・分裂に最適な環境を作り出している。これまでの消化管幹細胞研究では、単一のマーカーを発現する細胞集団の系譜追跡実験を行うことでその幹細胞性や分化能を証明してきたが、マーカーの特異性や検出能の問題があり、異なるマーカーにより標識される細胞集団が完全に異なる分画なのか、あるいは実際にはオーバーラップする一つの亜分画の表現型を見ているだけなのかがはっきりしなかった。そこで本研究提案では、Lgr5 陰性幹細胞と Lgr5 陽性幹細胞、さらに両群にオーバーラップする細胞を異なる蛍光蛋白で標識し、別の組み換え酵素を発現するマウスを用いて、複数細胞群の同時系譜追跡を行うことで、これまで不明確であった2つの細胞分画の独立性・相互転換性を明らかにする。

さらに、R-spondin 経路依存的傍分泌ニッチにより2つの幹細胞分画が受ける影響について検討する。R-spondin と結合する受容体である Lgr5 が腺管底部幹細胞に発現しているのに対し、同様に R-spondin と結合する Lgr4 は Lgr5 陽性細胞と Lgr5 陰性細胞の両分画に発現している。また、R-spondin は Lgr5 陽性幹細胞の増殖を抑制する一方、Lgr5 陰性幹細胞の増殖を Lgr4 を介して促進する。こうした解剖学的部位によって複雑な幹細胞制御機構を明らかにするため、Rspo3 傍分泌ニッチ刺激を変化させた環境下において多重系譜追跡実験と各細胞群の scRNAseq 解析を行う。

## 2. 研究の目的

本提案では、胃上皮内幹細胞集団の動態とその制御機構について、新規のマウスモデルと単一細胞レベルの解析を用いて詳細に解析し、複数の学説が存在する学術的議論点に明確な解を出すことを目的とする。具体的には、腺管内に存在するとされる複数の幹細胞群がどのように分裂・分化を行い、細胞間相互転換および子孫細胞の供給を行っていくのかを、これまでの実験手法とは異なり多系統の細胞群を異なる蛍光蛋白で標識・追跡可能なマウスを用いることにより、複数細胞集団の系譜を同一個体内で同時系列的に可視化し、真の幹細胞集団とその動態を解明する。さらに、R-spondin 依存性の周囲傍分泌ニッチ刺激が、胃内解剖学的部位によって異なる幹細胞の分裂・分化様式を誘導する様子とその機序を、単一細胞レベルの転写プロファイリングを含めた解析により明らかにする。

## 3. 研究の方法

Lgr5 陰性・Lgr5 陽性幹細胞の同時追跡目的に、両分画を選択的に標識・追跡可能なマウスを使用し、それぞれの幹細胞群が進展・相互転換していく様子を時空間的に詳細に可視化する。胃体部の一部では Lgr5-CreERT コンストラクトの発現が不十分なため、代替として底部細胞を広く標識する Gif-rtTA マウスを使用する。また、両マーカーのオーバーラップ分画を選択的に標識する目的で、別に FSF-LSL-mTFP1 マウスと交配させたマウスを用いる。rtTA-tet0 システムをドキシサイクリン投与により、LoxP-CreERT

システムをタモキシフェン投与により組み換え誘導し、時系列的に蛍光・多光子顕微鏡によって各蛍光蛋白を発現する細胞の局在・個数を観察記録する。これにより、胃のLgr5陽性・陰性幹細胞群およびオーバーラップ細胞の進展様式と相互転換の状況が明らかになる。

Rspondinシグナル増強時の幹細胞動態を追跡するため、Rspo3発現AAVベクターを投与後に同様の幹細胞系譜追跡を行い、Rspo3に応答し粘膜再生に貢献する主たる幹細胞群の同定を試みる。Rspo3の受容体であるLgr4・Lgr5をノックアウト可能なLgr4<sup>flox/flox</sup>、Lgr4<sup>5lox/flox</sup>マウス、Lgr5陽性細胞の選択的アブレーションが可能なGif-DTRマウス・Lgr5-DTRマウスを用いて両シグナル阻害時の検討を行う。蛍光蛋白で標識後にRspondinシグナルを変化させた状態で幹細胞およびそれらの子孫細胞をFACSにて抽出し、単一細胞レベルの遺伝子発現解析を行うことで、各幹細胞群の傍分泌シグナルによる制御機構を明らかにする。

#### 4. 研究成果

幹細胞に対するRspondinシグナルの検討を行うため、Tff1-Cre; tet0-Rspo3; R26-LSL-rtTAマウス、およびその受容体のLgr4・Lgr5の条件的ノックアウトマウス(Lgr4<sup>flox/flox</sup>、Lgr5<sup>flox/flox</sup>)を用いた解析を行なった。その結果、Rspondin3は幹細胞・頸部粘液細胞に発現するLgr4を介して主細胞への分化を誘導する働きがあった。一方、Lgr5のノックアウトマウスを用いた解析では、Lgr4でみられたような分化誘導機能は確認されなかった。

頸部粘液細胞を標識するMuc6FlpER; R26-FSF-GFPマウス、幹細胞を標識するKit1-CreERT; R26-LSL-RFPマウス、主細胞を標識するGpr30-rtTAマウス、およびこれらを交配させたマウスを用いた系譜追跡実験により、Rspondin3過剰発現によって伸展がみられる分画は主として頸部粘液細胞であることが示された。

WTマウス、Tff1-Cre; Lgr4<sup>flox/flox</sup>マウス、Tff1-Cre; tet0-Rspo3; R26-LSL-rtTAマウス、Tff1-Cre; tet0-Rspo3; R26-LSL-rtTA; Lgr4<sup>flox/flox</sup>マウスを用い、上皮細胞を単離したのちにscRNAシーケンスを施行した。クラスタリング後のTrajectory解析により、幹細胞 頸部細胞 主細胞への分化がRspoシグナルにより増強されることが点差レベルでも支持された。Muc6FlpER-dsREDをこれらのマウスと交配し、Muc6陽性細胞についてFACSにより抽出後にRNAseqを施行した。予想通り、こちらの解析においてもMuc6陽性細胞がRspo3によりLgr4依存的に活性化され、幹細胞様の働きを獲得することが示唆された。

さらに、頸部粘液細胞から主細胞に分化する中間に位置する、両者のマーカーを共発現する中間細胞を選択的に標識するため、Muc6FlpER-dsRED; Mist1-CreERT; R26-FSF-LSL-mTFP1マウスを作成して系譜追跡実験を施行した。この中間細胞は2つの異なる細胞集団により構成され、より分化型の集団は定常状態・障害状態においても分裂能を有さず、主細胞に分化する機能があるものの、数ヶ月の経過で腺管から消失することが証明された。一方もう一つのより前駆細胞型の中間細胞は、定常状態・障害状態のどちらにおいても幹細胞近傍より徐々に多系統への分化を生じ、最終的に頸部細胞 主細胞へと分化して腺管全体を構成する起源細胞であることがわかった。

消化管上皮の腺管底部に存在するLgr5陽性幹細胞が同定されて以降、消化管幹細胞研究はLgr5陽性細胞の動態解析を中心に進められてきた。しかし申請者の精密かつ詳細な観察によって、胃上皮ではLgr5陽性幹細胞よりもその上方に位置するLgr5陰性(Lgr4陽

性)幹細胞の方がより活発に腺管構成細胞を供給していることが明らかとなった。本研究は「これまでのLgr5=胃上皮の主たる幹細胞」という学説を覆す、大きな成果を輩出した。また、胃の基礎研究領域で簡易的な脱分化マーカーとして汎用されている主細胞・頸細胞間の中間細胞について世界で初めて選択的な細胞標識を実現し、分裂・分化様式を可視化することに成功した、意義のある研究であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Del Poggetto Edoardo, Ho I-Lin, 省略, Hayakawa Yoku, 省略, Viale Andrea	4. 巻 373
2. 論文標題 Epithelial memory of inflammation limits tissue damage while promoting pancreatic tumorigenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 6561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abj0486	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 該当する
1. 著者名 Kurosaki Shigeyuki, Nakagawa Hayato, Hayata Yuki, Kawamura Satoshi, Matsushita Yuki, Yamada Tomoharu, Uchino Koji, Hayakawa Yoku, Suzuki Nobumi, Hata Masahiro, Tsuboi Mayo, Kinoshita Hiroto, Tanaka Yasuo, Nakatsuka Takuma, Hirata Yoshihiro, Tateishi Keisuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Cell fate analysis of zone 3 hepatocytes in liver injury and tumorigenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JHEP Reports	6. 最初と最後の頁 100315 ~ 100315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jhepr.2021.100315	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 Hayakawa Yoku, Nakagawa Hiroshi, Rustgi Anil K., Que Jianwen, Wang Timothy C.	4. 巻 28
2. 論文標題 Stem cells and origins of cancer in the upper gastrointestinal tract	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 1343 ~ 1361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stem.2021.05.012	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 Imai Satoshi, Ooki Takuya, 省略, Hayakawa Yoku, Ohnishi Naomi, Ueda Koji, Fukayama Masashi, Ushiku Tetsuo, Ishikawa Shumpei, Hatakeyama Masanori	4. 巻 29
2. 論文標題 Helicobacter pylori CagA elicits BRCAness to induce genome instability that may underlie bacterial gastric carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Host & Microbe	6. 最初と最後の頁 941 ~ 958.e10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chom.2021.04.006	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 -

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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