

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20726

研究課題名(和文) 遺伝子操作オルガノイドを用いた培養皿でのヒト胃がんの再現

研究課題名(英文) Development of gastric cancer in a dish by gene editing

研究代表者

菱田 友昭 (Hishida, Tomoaki)

和歌山県立医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80521062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでに体性幹細胞であるSox2陽性細胞に着目して研究を進めてきた。この中で、(1) Sox2を発現する食道上皮細胞が細胞老化抵抗性を有し、MYCがその老化抵抗性を支持すること、また、(2) Sox2を発現する胃上皮細胞にMYCを強制発現させると同時にp53を欠失することで、転移性のある未分化胃がんを誘導でき、この未分化胃がんの増殖にはTop2aが関与していることを明らかにした。食道上皮細胞の細胞老化抵抗性についてはFrontiers in Cell and Developmental Biologyに論文を提出し、胃上皮の発がんについては論文にまとめ投稿準備段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道細胞が細胞老化に抵抗性があるという特殊性とその分子機序についてその一端を明らかにした。この成果は老化の分子機序の一端を明らかにすることに加え、組織に違いがあることを示唆するもので、高齢化社会における老化研究のニーズに合致するものだと考えられる。

また、胃がんについては転移性未分化胃がんを生体内で誘導的に作製するモデルであり、我が国で依然として発症率、致死率が高い胃がんを標的とした分子機序解明及び創薬に結びつく成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We focused on Sox2-positive cells, which are adult stem cells. In this study, we found that (1) Sox2-expressing esophageal epithelial cells are resistant to senescence and that MYC supports this resistance, and (2) combination of forced expression of MYC with deletion of p53 in Sox2-expressing gastric epithelial cells drives metastatic undifferentiated gastric carcinoma, and that Top2a is involved in the growth of this undifferentiated gastric carcinoma. We have submitted a paper on cellular senescence resistance of esophageal epithelial cells to Frontiers in Cell and Developmental Biology, and a paper on carcinogenesis of gastric epithelium is in preparation for submission.

研究分野：発がん、再生、老化

キーワード：発がん 老化 MYC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでにマウスモデルを用いて体性幹細胞の一つである Sox2 陽性細胞が、腫瘍の起源細胞になることを明らかにしている。Sox2 は脳ばかりでなく、胃や食道上皮の細胞にもその発現が認められ、再生や可塑性、発がんなどに関与している可能性が示唆されている。申請者はこれまでに Oncogenic Kras (G12D) を発現することで、食道上皮と胃上皮に過形成を誘導することを報告した (Protein Cell 2018)。また、MYC と p53 遺伝子の欠損により、転移性の未分化胃癌が誘導されることを見出した (論文未投稿)。

2. 研究の目的

申請者は生体内で発現している Sox2 陽性細胞に着目して、その特性を調べることに加え、転移性の未分化胃癌発症のメカニズム解明を行い、それをオルガノイド樹立に応用することを目的とした。

3. 研究の方法

【使用したマウス】

若齢マウスと老齢マウスに加え、下記のトランスジェニックマウスを使用した。

#1 Sox2-CreER; Flox-Myc; Flox-MycN; ROSA26-LSL-GFP (Sox2 陽性細胞に Myc 遺伝子と N-Myc 遺伝子を欠失される)

#2 Sox2-CreER; tet0-MYC; ROSA26-LSL-rtTA (Sox2 陽性細胞に Myc を誘導できる)

#3 Sox2-CreER; tet0-MYC; Flox-p53; ROSA26-LSL-rtTA (Sox2 陽性細胞に Myc を誘導できると同時に p53 を欠失できる)

*CreER: リコンビネーションを誘導する Cre と、Estrogen Receptor (ER) の融合タンパク質。リガンドとなるタモキシフェン (TAM) を処理することで、細胞質に存在する CreER は核内に移行し、LoxP を有する DNA 配列において組み換えを引き起こす。

*Flox: flanked by loxP の略であり、Cre によるリコンビネーションにより欠失の対象となる。例えば、マウス#1 においては、Cre 依存的に Myc 遺伝子や MycN 遺伝子が欠失される。

*LSL: LoxP-STOP-LoxP の略で、Cre によってその下流遺伝子が活性化される仕組みの一つ。例えば、マウス#1 においては Cre 依存的に LSL が取り除かれ、GFP が発現する。

*rtTA: reversed-tTA (テトラサイクリントランスアクチベーター) の略。Tet-ON システムで使用される。テトラサイクリンやその誘導体であるドキシサイクリン (Dox) により、下流遺伝子の発現が誘導される。例えば、マウス#2 においては Dox 依存的に MYC 遺伝子の発現を誘導できる。

【実験方法】

食道上皮における老化の影響を調べるため、野生型の若齢と老齢マウスを用いて調べた。また、マウス#1 を用いて、Sox2 陽性細胞において Myc 遺伝子を欠失した際の影響を調べ、マウス#2 を用いて Sox2 陽性細胞に MYC を強制発現すると同時に P53 遺伝子を欠失した際の影響を調べた。

マウス#1-#3 の Cre の活性化のため、50 mg/ml TAM を経口投与し、マウス#2-3 の rtTA の活性化には 1 mg/ml の Dox 含有飲料水を用いた。

4. 研究成果

(1) 食道上皮の老化抵抗性について

若齢マウスと老齢マウスの食道上皮から凍結切片を作製し、SA- β -gal (senescence-associated beta-galactosidase) 染色と各種老化マーカー遺伝子の遺伝子発現について解析した。その結果、食道上皮の細胞では老齢のマウスにおいても、細胞老化のマーカーが認められず、食道上皮の老化抵抗性が認められた (Figs. 1A & 1B)。また、マウス#1 を用いて、Sox2 陽性細胞において Myc 遺伝子を欠失することで、食道上皮細胞の増殖が抑えられること (Fig. 2A)、また、

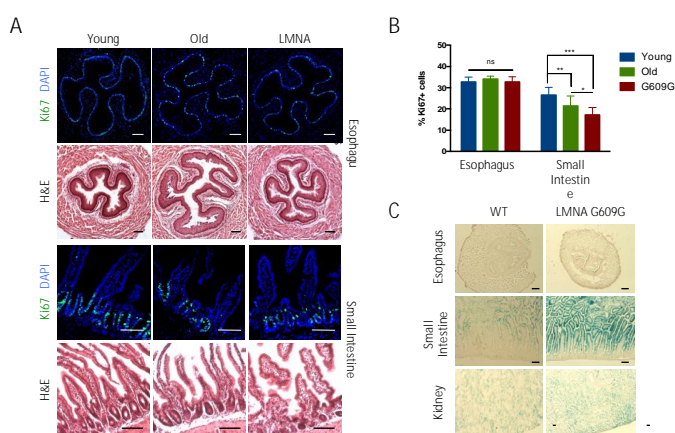


Fig. 1. No visible senescence of esophageal epithelial cells expressing pluripotency factors.

(A) Representative immunofluorescent pictures of Ki67 (green) staining and H&E staining in the esophagus and small intestine for young (3 months old), old (22 months old) and LMNA G609G HGPS mouse model (3 months old). Scale bars, 100 μ m.

(B) Proliferative index of the esophagus and small intestine. We quantified Ki67⁺ cells in the esophagus and small intestine from three mice for each group. Data represent the mean with SD. ns = non-significant, *p < 0.01, **p < 0.001, ***p < 0.0001.

マウス#2 を用いて MYC を強制発現することで誘導が認められたことから (Fig. 2B)、Myc が食道上皮細胞の細胞増殖を正に制御することが明らかとなった。これらの成果を論文として提出した (Hishida et al, Front Cell Dev Biol, 2022)。

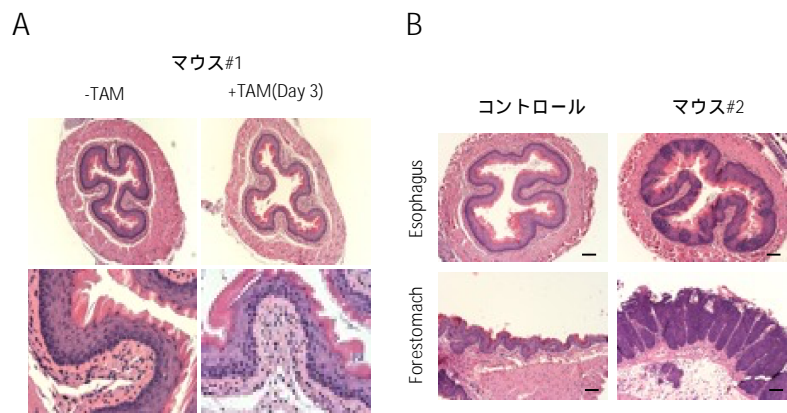


Fig. 2. Role of Myc on the proliferation of esophageal epithelial cells.

(A) H&E staining for esophagi from the mice #1 treated with TAM. Two mice were analyzed for each condition.

(B) H&E on paraffin-embedded sections of the indicated tissues corrected from the mice #2.

(2) 未分化胃がんについて

マウス#3 を用いることで、Sox2 陽性細胞に MYC 遺伝子を発現誘導すると同時に p53 遺伝子を欠失することで、未分化胃がんを誘導できることが明らかとなった (Figs. 3A & 3B)。また、その分子機序を調べるため RNA シークエンスを行った結果、トポイソメラーゼ 2a (Top2a) が高発現していることを見出した (data not shown)。実際、がんサンプルの public database を用いて、Top2a の発現を調べた結果、ステージが進行した胃がんサンプルで Top2a の発現が有意に高いことを示した (Figs. 3D & 3E)。また、Top2a の上流に Myc が結合し、その結合部位を CRISPR/Cas9 で削ることで、Top2a の発現が減少したことから、Myc が Top2a の遺伝子発現を制御していることを明らかにした (data not shown)。

また、これらの細胞からオルガノイドの作製を試みたが、上手くいかなかったため、正常の胃上皮細胞を出発材料にする必要性が示唆された。

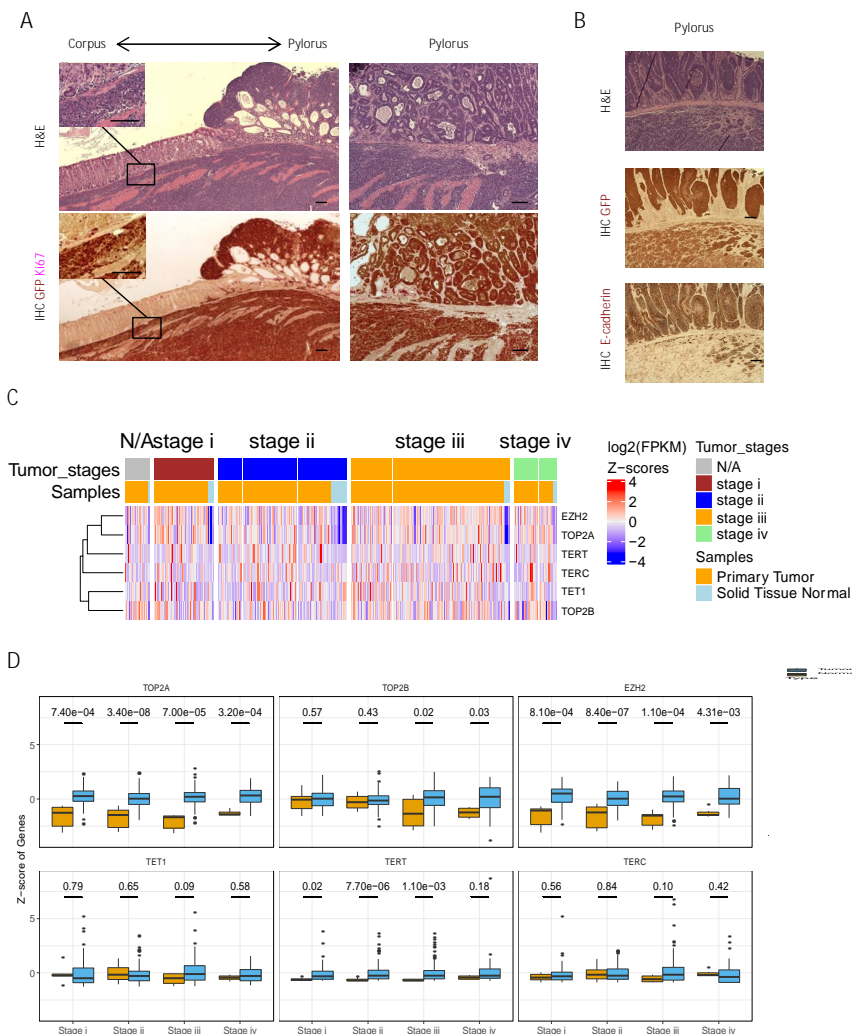
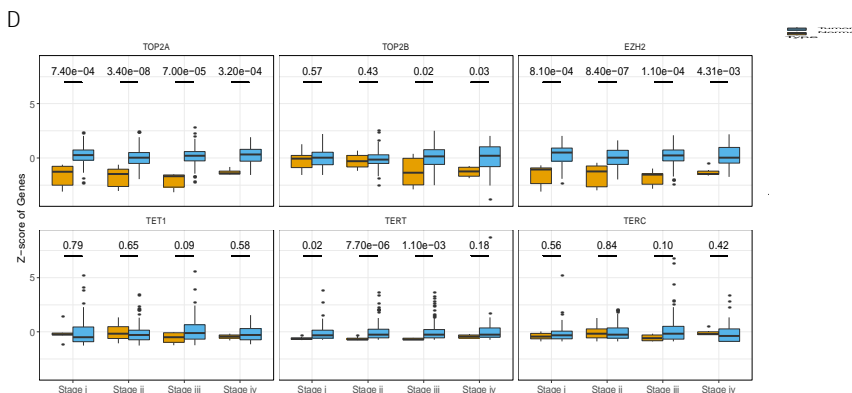


Fig. 3. Generation of metastatic gastric adenocarcinomas.

(A) H&E and IHC on paraffin-embedded glandular stomach sections of the mice #3. Infiltrated GFP+ cancer cells were observed under the gastric epithelium.

(B) IHC for pyloric glandular stomach. GFP+/E-cadherin-infiltrated cancer cells were observed. H&E on paraffin-embedded sections of the indicated tissues corrected from the mice #2.

(C, D) Heatmap (C) and bar chart (D) for expression of the indicated genes in human gastric cancers from the data deposited in TCGA.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Hishida Tomoaki et al	4. 巻 10
2. 論文標題 Myc Supports Self-Renewal of Basal Cells in the Esophageal Epithelium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 Article 786031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.786031	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 Hishida Tomoaki et al	4. 巻 39
2. 論文標題 In vivo partial cellular reprogramming enhances liver plasticity and regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110730 ~ 110730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110730	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 Yuan Baolei, Hishida Tomoaki et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Wiskott-Aldrich syndrome protein forms nuclear condensates and regulates alternative splicing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 Article 3646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-31220-8	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 -
1. 著者名 Browder Kristen C., Hishida Tomoaki et al	4. 巻 2
2. 論文標題 In vivo partial reprogramming alters age-associated molecular changes during physiological aging in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Aging	6. 最初と最後の頁 243 ~ 253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43587-022-00183-2	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
---------	---------