

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2021～2022
課題番号：21K20822
研究課題名（和文）胃癌の発生メカニズムと幹細胞との関連

研究課題名（英文）Mechanism of gastric cancer development

研究代表者

堂地 大輔（Douchi, Daisuke）

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・助教

研究者番号：30907704

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）：正常胃上皮幹細胞を標識できる遺伝子改変マウスであるIqgap3マウスと、胃癌の発生に関連するRUNX3のmutationを持つ RUNX3(R122C)ノックインマウスを交配し、Iqgap3-RUNX3(R122C)ノックインマウスを作成した。このマウスを用いて様々な解析を行った。解析により、RUNX3(R122C)変異は細胞周期の増殖状態(G1)と静止状態(G0)のどちらに入るかを決定する制限点 (Restriction point) の制御を乱し、幹細胞の増殖 (self-renewal)を促す一方で、その分化(differentiation)を抑制し、組織学的に前癌状態を形成していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃上皮幹細胞/前駆細胞の細胞周期の増殖状態(G1)と静止状態(G0)のどちらに入るかを決定する制限点 (Restriction point) の制御が乱れることにより、胃癌の前癌状態が形成されることが示唆された重要な結果が得られた。幹細胞が主原因となって前癌状態となるこれまでの定説を覆す知見が得られた。すなわち、正常胃上皮幹細胞の細胞周期における制限点が制御不能になる遺伝子変化が加わることにより、胃癌の前癌状態が形成されるという血液腫瘍でよく観察される事象を実験的に証明することができた。幹細胞研究で発展している血液腫瘍の研究と相同する事象を観察することができ、有意義な成果を獲得できた。

研究成果の概要（英文）：Iqgap3 reporter mice, genetically engineered mice that can label normal gastric epithelial stem cells, were crossed with RUNX3(R122C) knock-in mice. Various analyses were performed using these Iqgap3-RUNX3(R122C) mice. Analysis revealed that the RUNX3(R122C) mutation disrupts the regulation of the restriction point that determines whether cells enter the proliferative (G1) or quiescent (G0) state of the cell cycle, promoting stem cell self-renewal while suppressing their differentiation, resulting in the formation of a histologically precancerous state.

研究分野：がん幹細胞

キーワード：胃癌 前癌状態

1. 研究開始当初の背景

胃癌は他の癌腫と比較して、その発生の分子メカニズムについては未解明なところが多い。その原因は胃正常上皮幹細胞分野での研究の遅れに由来しているとも言われている。また、胃癌の発生には地域差があり、欧米では東アジアと比べて稀であり、世界全体でみて研究対象としてなかなか選ばれづらいことも原因である。

胃癌の発生は、ピロリ菌感染がその主たる原因と言われているが、ピロリ菌発見以降、どのようにしてそれが胃癌の発生に寄与するかを追求する研究は数多くすすめられてきた。しかしながら、その謎はまだ多く残っている。なかでもピロリ菌の正常幹細胞に与える影響についてはほとんど解明されていないのが現状である。さらに正常胃上皮幹細胞と胃癌の関係は、その発生起源について、2010年以降からその主張が幹細胞派と非幹細胞派に二分されている。正常胃上皮幹細胞(特に胃の corpus)を標識できるマーカーの特異性が低いことも議論を長引かせている要因の一つであった。

申請者が2021年3月まで所属していたシンガポール国立大学の研究室では、eR1というRunx1 enhancer elementに注目し、それが胃上皮幹細胞を標識するマーカーであることを2017年に報告した。さらに、そのeR1に関する研究成果をもとにさらに解析を進め、胃上皮幹細胞標識マーカーである可能性の高いIqgap3というタンパク質に着目した。その遺伝子改変マウス(Iqgap3-reporter マウス)を作成し解析した結果、今まで報告された幹細胞標識遺伝子改変マウスより胃の正常上皮幹細胞標識マーカーとしてその感受性・特異性が高いことを報告した。さらに、そのマウスに遺伝子変異(Rasなど変異)を加えれば胃癌の前癌状態(metaplasia)を起こすことも同時に報告し、正常胃上皮幹細胞に特異的に遺伝子変異を加え、胃の前癌状態の作成が可能であることも明らかにしてきた。

2. 研究の目的

申請者らは、正常胃上皮幹細胞を標識できる遺伝子改変マウス(Iqgap3-reporter マウス)を作成し、幹細胞という視点から胃癌の病態解明に有益なツールを利用できる状況下にある。それを使用し、ピロリ菌感染や遺伝子変異などによる胃正常上皮幹細胞への影響を、マウスでのin vivo解析を中心にを行い、胃癌の発生メカニズム(前癌病変も含め)で中心的役割を担うと予想される正常胃上皮幹細胞において、遺伝子レベルでどのような変化をきたすのかを研究することを目的としている。

3. 研究の方法

上記遺伝子改変マウスを使用し、さらにそのマウスに遺伝子変異やピロリ菌感染などを伴わせることで、人為的に胃癌や胃癌の前癌病変を胃の粘膜に作成させたいと考えている。胃癌や胃の前癌状態を作成したマウスから胃上皮を分離し、さらに上皮細胞を単離することで幹細胞と非幹細胞をフローサイトメトリーにより選別し、RNAなどを抽出することにより遺伝子変化を比較。さらには、ピロリ菌感染をマウスに起こすことで、ピロリ菌感染の病態とどのように密接に関与しているかを実験で明らかにしたいと考えている。

4. 研究成果

正常胃上皮幹細胞を標識できる遺伝子改変マウスであるIqgap3マウスと胃癌の発生に関連するRUNX3のmutationを持つRUNX3(R122C)ノックインマウスを交配して、Iqgap3-RUNX3(R122C)ノックインマウスを作成した。すなわち、このマウスはRUNX3(R122C)の変異を持ちながら、Iqgap3で胃の上皮幹細胞を標識できるマウスである。RUNX3(R122C)マウスから胃組織を採取したあと、組織学および蛍光免疫染色、オルガノイド培養を実施した。またIqgap3マウスとRUNX3(R122C)マウスを掛け合わせて、フローサイトメトリーにより胃の上皮幹細胞と非上皮幹細胞を分離してトランスクリプトーム解析を行った。

6か月齢のRUNX3(R122C)ホモマウスの胃体部組織は、組織学的に前癌状態を呈することが判明した。急速に増殖する胃上皮幹細胞/前駆細胞の増加と分化停止を認めた。フローサイトメトリーから単離した胃上皮細胞のトランスクリプトーム解析からは、野生型と比較してRUNX3(R122C)マウスの上皮幹細胞では、細胞周期に関連するMYC遺伝子の関連遺伝子群が上昇していることが判明した。in vitroの実験では、RUNX3(R122C)変異は細胞周期の増殖状態(G1)と静止状態(G0)のどちらに入るかを決定する制限点(Restriction point)の制御を乱し、幹細胞の増殖(self-renewal)を促す一方で、その分化(differentiation)を抑制していることがわかった。胃上皮幹細胞/前駆細胞の細胞周期が崩れることにより、前癌状態が形成されることが示唆する重要な結果が得られた。

当初の研究の目的であった、ピロリ菌が胃上皮幹細胞に感染し、幹細胞の性質を改変し、胃癌の発生母地を作っているのではないかという点に、今後は取り組む予定である。今後は、ピロリ菌感染モデルと薬剤誘導性前癌病変作成モデルなどの実験まで発展させて、そのような状況下で

は幹細胞において正常な状態と比べてどのような差があるのかを確かめる実験計画を今後検討していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Douchi D, Yamamura A, Matsuo J, Lee JW, Nuttonmanit N, Melissa Lim YH, Suda K, Shimura M, Chen S, Pang S, Kohu K, Kaneko M, Kiyonari H, Kaneda A, Yoshida H, Taniuchi I, Osato M, Yang H, Unno M, Bok-Yan So J, Yeoh KG, Huey Chuang LS, Bae SC, Ito Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 A Point Mutation R122C in RUNX3 Promotes the Expansion of Isthmus Stem Cells and Inhibits Their Differentiation in the Stomach	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1317 ~ 1345
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2022.01.010	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堂地 大輔
2. 発表標題 がん抑制遺伝子RUNX3の点変異体RUNX3(R122C)は、胃の上皮幹細胞の増殖を促進し、その分化を阻害する
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
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
---------	---------