38　ヒト胃組織作製技術の開発	栗崎　晃

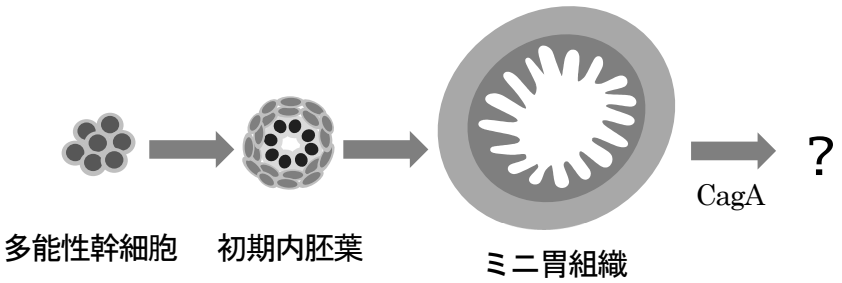
【目的】胃がんはわが国では肺がんに次いで患者数の多いがんであり、毎年 10 万人が胃がんと診断され、5 万人が胃がんで死亡している。これまでの研究から、日本でも胃がん患者の大半が長年のピロリ菌感染による慢性炎症が原因と考えられており、早期のピロリ菌の除去が胃がんの発症を抑制する有効な方法であることが示されている。

最近我々は、多能性幹細胞として知られる ES 細胞から胃組織を試験管内で丸ごと作製する培養技術を開発した。この胃組織は内側に胃腺構造を有し外側を平滑筋組織に覆われた蠕動運動をする直径 2 mm 程度の風船状組織であり、ペプシノゲンなどの消化酵素やムチン粘液を分泌し、ヒスタミンに応答して胃酸を分泌する機能的な胃組織である。そこで本申請研究では、ヒト iPS 細胞を材料にして我々の試験管内胃組織作製技術を発展させるとともに、胃がん治療薬候補探索に利用できる胃がんの試験管内モデルの構築を目的として研究を開始した。

【方法】我々が構築したマウス胃組織分化培養方法を改良し、ヒト iPS 細胞でも安定して胃組織へと分化させることができる培養プロトコルへと各分化段階で培養条件を最適化する。また、ピロリ菌感染後の胃組織のモデルを構築するため、ピロリ菌の病原因子として報告されている CagA を発現誘導する幹細胞株を樹立し、胃組織へと分化誘導させた後、CagA を過剰発現させることで、ピロリ菌病原因子により胃組織に引き起こされる現象の詳細を解析する。

【結果】ヒト iPS 細胞の胃組織分化培養方法の最適化に関しては、今までほとんど作製できなかった初期内胚葉組織を効率的かつ安定的に作製する培養条件を構築した。また、CagA ノックイン幹細胞株についても複数株樹立し、CagA の発現誘導についても確認した。現在、CagA ノックイン株からミニ胃組織を作製中であり、今後、CagA 発現誘導がどの程度ピロリ菌感染による現象を再現できるのか検証する予定である。

多能性幹細胞を用いた *in vitro* ミニ胃組織の作製とピロリ菌病因因子 CagA 発現の影響の解析



38. ヒト胃組織作製技術の開発

栗崎　晃

*産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 幹細胞工学研究グループ

Key words：胃，幹細胞，分化，がん，ピロリ菌

緒　言

胃がんはわが国では肺がんに次いで患者数の多いがんであり、毎年 10 万人が胃がんと診断され、5 万人が胃がんで死亡している。2005 年にオーストラリアの Barry Marshall と Robin Warren は、ピロリ菌による感染が胃炎や胃潰瘍を引き起こすことを示した［1］。また、上村らは、日本の胃がん患者の大半が長年のピロリ菌感染が原因であることを明らかにした［2］。世界中でピロリ菌感染者は多いが、特に日本、韓国、中国などの東アジアで蔓延しているピロリ菌は胃がんを引き起こしやすい菌種であり、早期のピロリ菌の除去が胃がんの発症を抑制する有効な方法であることが示されている。今後衛生状態の改善や抗生剤による除菌によりピロリ菌感染者が相対的に減少していくと期待されているが、長年ピロリ菌に感染し続けた人はたとえピロリ菌を除去できたとしても既に発がんリスクを十分抱え込んでしまっている場合も多い。また、昨今 30－50 代の若年層で多く見られ増殖が非常に早く浸潤性のスキルス胃がんや胃食道逆流症から派生するがんは難治疾患対象となると考えられている。

最近我々は、多能性幹細胞として知られるマウス ES 細胞から胃組織を試験管内で作製する培養技術を開発した［3］。この胃組織は内腔側に胃腺構造を有し外側を平滑筋組織に覆われた蠕動運動をする直径 2 mm 程度の中空の風船状組織であり、ペプシノゲンなどの消化酵素やムチン粘液を分泌し、ヒスタミンに応答して胃酸を分泌する機能的な胃組織である。我々はこの ES 細胞分化系を利用して、試験管内で胃の疾患組織の再現を試み、その具体例として胃がんの前がん状態としても知られるメネトリエ病モデルを作製した。メネトリエ病は、上腹部痛や嘔吐、下痢などの症状と低蛋白血症を示し、胃粘膜ヒダの肥厚を伴う過形成症であり、胃巨大皺襞症とも呼ばれる。腺萎縮と腺窩上皮過形成が特徴であり、病状の進行に伴って胃酸やペプシンの分泌低下や低酸症が起こる。また、粘膜細胞内で TGFα が増加することが知られている。実際に TGFα を我々のミニ胃組織で高発現させると胃上皮細胞の著しい肥厚化や粘液過剰分泌と胃酸の減少が観察され、本病態を試験管内で再現することができた。そこで本研究では、我々の試験管内胃組織作製技術をヒト iPS 細胞を材料にして発展させるとともに、ピロリ菌感染に起因する胃がんの試験管内モデルを構築し、胃がん治療薬候補の探索を可能にする基盤技術を開発する。

方　法

本研究では、ヒトの胃組織分化培養方法を最適化し、ヒト胃がんモデル作製技術を開発することを目的とする。
最近我々が開発した、マウス ES 細胞からミニ胃組織を作製する基盤技術を発展させ、ヒト iPS 細胞を用いてヒトのミニ胃組織分化方法を確立する。マウス ES 細胞もヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞も様々な組織細胞へ分化する能力を有する多能性幹細胞であるが、ヒト幹細胞はマウス幹細胞に比べて分化能が低く、単一細胞にすると死にやすいなど性質の違いがあり、単純にマウス幹細胞の分化方法をヒト幹細胞に適用することは難しい。そこで本研究では、我々のマウス胃組織分化培養方法を改良し、分化能力が低いヒト iPS 細胞でも安定して胃組織へと分化させることができる培養プロトコルへと最適化する。これまでマウス ES 細胞の分化方法を用いてヒト iPS 細胞で胚様体を形成させたところ、マウス ES 細胞で見られた FoxA2 陽性の初期内胚葉細胞がほとんど出現せず、初期分化効率が非常に低いことが問題であった。今回、フィーダーフリーの培養液を利用して条件を最適化させることにより、初期内胚葉が効率よく形成させる培養条件を最適化した。また、ピロリ菌感染胃組織モデルを作製するため、ピロリ菌病原因子のひとつである CagA を利

*現在の所属：奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 幹細胞工学研究室

用した薬剤誘導型の CagA ノックイン株を樹立し、CagA の発現を蛍光マーカーと qRT-PCR により確認した。

結　果　及び　考　察

1. ヒト胃組織分化方法の最適化

これまでマウス ES 細胞の分化方法を用いてヒト iPS 細胞で胚様体を形成させたところ、マウス ES 細胞で見られた FoxA2 陽性の初期内胚葉細胞がほとんど出現せず、初期分化効率が非常に低いことが問題であった。今回、フィーダーフリーの培養液を利用して条件を最適化させることにより、初期内胚葉が効率よく形成させる培養条件を構築した（図 1）。今後、培養条件をさらに最適化し、ヒト胃組織の安定した作製効率の向上を検討する計画である。

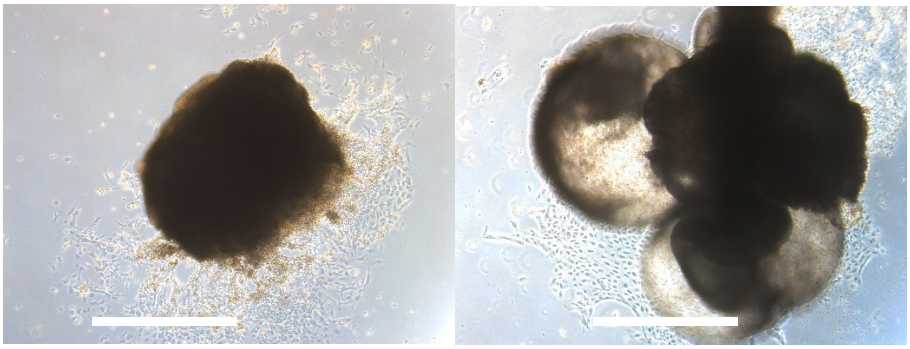


図 1. ヒト iPS 細胞を用いた胚様体形成条件の最適化。
左：最適化前の培養条件で作製した胚様体。右：最適化後の培養条件で作製した胚様体。大きな中空状の内胚葉組織の形成が誘導された。スケールバー：1 mm。

2. ピロリ菌感染ミニ胃組織モデルの作製

ピロリ菌は CagA という病原タンパク質を胃上皮細胞に打ち込み、細胞内に侵入した CagA が異常な足場タンパク質として細胞内シグナルを操作して細胞極性を破壊するとともに、異常な細胞増殖を誘導することで正常な胃上皮組織構造を破壊し胃がんの発生基盤を形成することが先行研究により報告されている［4, 5］。そこで本研究では、CagA タンパク質発現誘導型幹細胞からミニ胃組織を作製し、CagA の過剰発現で胃がんの初期状態と類似の病態を in vitro で作製可能か検証する。しかし、現段階ではヒト iPS 細胞を用いたヒト胃組織の培養条件の構築に今しばらく時間を要するため、現在分化系が確立しているマウス ES 細胞を用いて CagA ノックイン株を樹立して CagA の発現誘導による胃組織への影響について解析を進めている。CagA ノックイン株は、ROSA26 遺伝子座に Cre-LoxP を用いて CagA 遺伝子をノックインし、薬剤選択により樹立した（図 2）。現在、これらの細胞株からミニ胃組織を分化誘導させ、CagA 過剰発現が胃組織形成に及ぼす影響を解析中である。

謝　辞

今回、採択後すぐに研究機関を異動となり、引っ越しや人員の大幅入れ替えにより、研究の進展が計画通りに行かない状況となったが、本研究費のおかげで新しい学生やスタッフをトレーニングし、研究体制を短期間で再構築することができた。本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

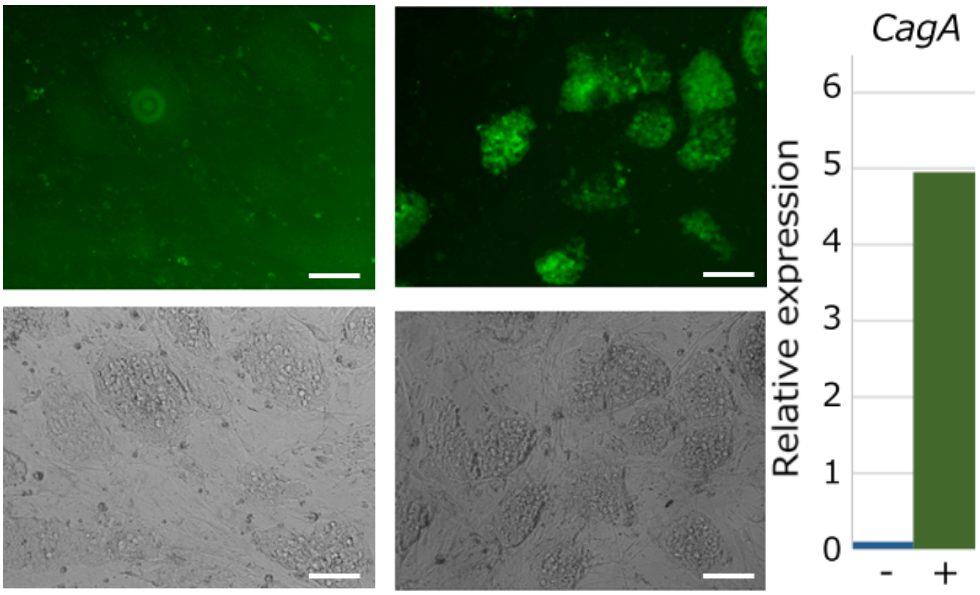


図 2. CagA 発現誘導型 ES 細胞における蛍光タンパク質 Venus の発現

CagA と同時に蛍光タンパク質 Venus を共発現するノックイン ES 細胞株を樹立した。

左：CagA 発現誘導前。ES 細胞のコロニーにおける Venus の特異的発現は観察されない。

右：CagA 発現誘導後。ES 細胞のコロニーに特異的に Venus の蛍光タンパク質の発現が観察された。

上：Venus の蛍光タンパク質の発現。下：フィーダー細胞上で増殖中の ES 細胞のコロニーの明視野像。

スケールバー：100 μm

右グラフ：ES 細胞株で発現誘導前後の CagA mRNA の相対的発現。

文　献

1) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet, 1984; 1: 1311—1315. PMID: 6145023

2) Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med, 2001; 345: 784-789. PMID: 11556297 DOI: 10.1056/NEJMoa001999

3) Noguchi TK, Ninomiya N, Sekine M, Komazaki S, Wang PC, Asashima M, Kurisaki A.Generation of stomach tissue from mouse embryonic stem cells.2015; Nat Cell Biol, 17: 984-993. PMID: 26192439 DOI: 10.1038/ncb3200

4) Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M.S HP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. Science. 2002; 295:683-686. PMID: 11743164 DOI: 10.1126/science.1067147

5) Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. Nature. 2007; 447: 330-333. PMID: 17507984 DOI: 10.1038/nature05765