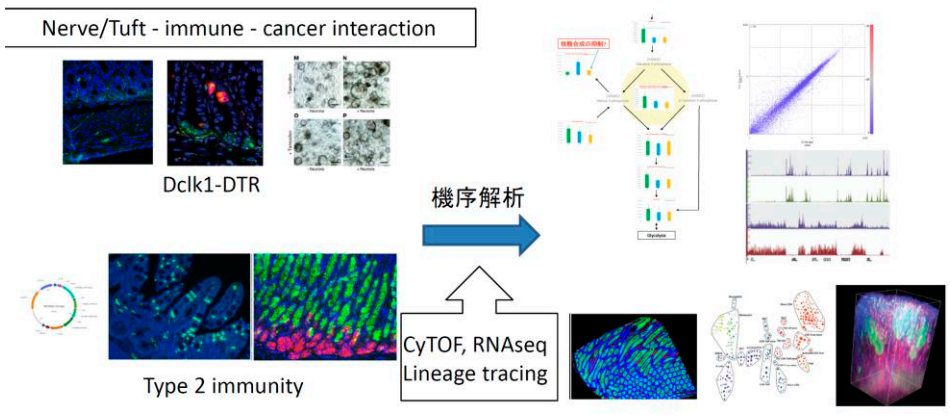
69　神経・免疫連関による胃癌制御機構の解明	早河　翼

【目的】本研究では Tuft 細胞を介したシグナルが免疫系と協調しながら胃癌進展に与える影響を、オミクス解析および系譜解析実験を用いて検討し、神経 - 免疫 - 胃癌連関機構を包括的に解明するとともに、新規治療標的を提示することを目的とした。

【方法】マウス胃炎モデルとして高容量タモキシフェンモデル、IL1β過剰発現モデル、胃癌モデルとして *Mist1*-CreERT ; *Apc*F/F モデルを用い、Dclk1 陽性 Tuft 細胞アブレーションを施行した *Dclk1*-DTR マウスの胃組織における免疫応答状態・遺伝子発現状態・代謝状態の比較を行った。具体的には、FACS/免疫染色による免疫細胞のプロファイリング・RNA シークエンス・メタボローム解析を行った。胃炎・胃癌発生過程において放出される神経伝達物質であり、Tuft 細胞と関連する 2 型免疫との関連が報告されている NMU の働きを解析するため、*NMU* 欠損マウスを用い、免疫・転写プロファイルを比較した。さらに、2 型免疫サイトカインを高発現する AAV ベクターの投与を用い、Tuft 細胞～2 型免疫シグナルの胃組織内免疫応答に与える影響を検討した。また、Tuft 細胞は細胞周期制御因子である p57 を高発現しており、これが自身の持続的静止期を実現している可能性を考えた。Tuft 細胞を特異的に標識できる新規遺伝子改変マウス（*Trpm5*-CreERT マウス）と *Rosa26* レポーターマウスを組み合わせ系譜追跡実験を行い、さらに新規に樹立した *p57*^{flox} マウスを組み合わせることで、Tuft 細胞の脱分化に及ぼす p57 の役割を検討した。

【結果】胃炎モデルである高容量タモキシフェン投与モデル・IL1β過剰発現モデル、さらに胃癌モデルとして *Mist1*-CreERT ; *Apc* F/F モデルともに、*Dclk1*-DTR マウスによる Tuft cell ablation によって有意に上皮細胞増殖が低下した。RNA シークエンスの結果、Tuft cell 消失後にアミノ酸代謝を含む各種代謝関連遺伝子群の発現低下と、MAPK 経路関連遺伝子の発現低下が認められた。胃組織のメタボローム解析を実施した結果、*Dclk1*-DTR アブレーションによりセリン・プロリン系の代謝産物の減少が認められ、これが細胞増殖の低下を引き起こした可能性がある。胃炎モデルと組み合わせた *NMU* 欠損マウスにおいて、前癌病変である化生性病変の出現が有意に抑制された。胃内に浸潤する免疫分画のうち、Mast cell、ILC2 の減少を認め、上皮中では Tuft 細胞が減少していた。胃炎組織中の血球分画の scRNAseq の結果、Mast cell、ILC2 は 2 型サイトカインである IL33、IL13、IL4 を高発現していることがわかった。これらのサイトカインを発現する AAV ベクター投与により、胃内に化生性変化と Tuft 細胞の増生が誘導された。2 型サイトカイン発現細胞と Tuft 細胞の間には相互に活性化を誘導する機構があり、これが化生性変化の原因となっていると考えられる。最後に Tuft cell の脱分化機能の検証のために作製した *Trpm5* CreERT ; *p57* F/F; *R26*-Tomato マウスの解析により、p57 の欠損により Tuft cell が脱分化し幹細胞様機能を有するようになることが示された。炎症および腫瘍遺伝子の変異導入により Tuft 細胞中 p57 の発現が低下することも分かり、実際それらの環境下では Tuft cell が癌起源細胞としての役割も持つようになることが分かった。

神経・免疫連関による胃癌制御機構の解析



69. 神経・免疫連関による胃癌制御機構の解明

早河　翼

東京大学 大学院医学系研究科 消化器内科学

Key words：胃癌，神経シグナル，Tuft 細胞，2 型免疫，脱分化

緒　言

近年、消化管のみならず骨髄・膵臓・皮膚・前立腺など、多くの臓器において幹細胞や再生、発癌が神経シグナルによって制御されていることが明らかになった［1〜4］。その中で研究代表者らは消化管幹細胞制御と発癌における神経シグナルと、その中核をなす Tuft 細胞の役割を解析し、アセチルコリン（ACh）による消化管幹細胞内の Wnt／YAP 経路制御機構を報告してきた［5，6］。一方最新の研究により、神経シグナルや Tuft 細胞が免疫系にも影響を及ぼすことが報告されてきている。脾臓に到達する迷走神経からの ACh がリンパ球を刺激して末梢臓器における炎症反応を制御しているという神経 - 免疫反射機構や、Tuft 細胞からの IL25 産生を介した 2 型免疫応答の活性化などが知られており、結果として消化管上皮の恒常性に関与しているとされる［7，8］。粘膜内神経細胞末端および Tuft 細胞から放出される神経伝達物質や代謝産物は、傍分泌的に腫瘍内の幹細胞・癌細胞、及び間質の内皮細胞や免疫細胞に働きかけ、様々な細胞内シグナル・免疫応答の変化を引き起こしていると考えられるが、粘膜再生・癌進展において神経・免疫システムがどのような役割を果たすのかはまだ解明されていない。本研究においては、胃炎症・発癌過程における神経・免疫連関機構を解明し、病態の理解と新規治療標的の同定に貢献したいと考えている。また Tuft 細胞は傍分泌的な免疫・腫瘍制御機能のほか、自らが脱分化して癌幹細胞としての機能も合わせ持つ［9］。この脱分化に際し、炎症刺激が必須であることまでは分かっているが、詳細な制御メカニズムは明らかになっていないため、この点についても検討を加え、Tuft 細胞が癌幹細胞として癌進展に与える影響を解析する。

具体的には、神経・Tuft 細胞シグナルが免疫系を制御して胃炎・胃癌進展に与える影響を、複数のオミクス解析および系譜解析実験を用いて検討し、神経 - 免疫 - 胃癌連関機構を包括的に解明することを目的とし、研究を行った。結果として、Tuft 細胞には組織中の代謝状態の制御機能が存在し、これが炎症・発癌過程における細胞増殖に重要であることを示した。さらに、2 型免疫系との相互作用を通じ、化生性病変の発生に極めて重要な役割を果たすことを示した。さらに、Tuft 細胞内に高発現している p57 が細胞周期の静的状態維持に重要であり、p57 の発現低下によって Tuft 細胞の脱分化がもたらされることが分かった。

方　法

1.　Tuft 細胞シグナルが胃炎症・発癌過程における免疫応答と粘膜恒常性に与える影響の解析

マウス胃炎モデルとして高容量タモキシフェン投与急性胃炎モデル、IL1β過剰発現慢性胃炎モデル、胃癌モデルとして *Mist1*–CreERT；*Apc* F/F モデルを用いた。Dclk1 陽性 Tuft 細胞の選択的アブレーションが可能な *Dclk1*-DTR マウスをこれらのモデル・マウスと組み合わせ、Tuft 細胞アブレーション後の胃組織における細胞増殖状態・免疫応答状態・遺伝子発現状態・代謝状態の比較を行った。具体的には、免疫染色による各種マーカーの発現状態の比較、FACS／免疫染色による免疫細胞のプロファイリング、RNA シークエンスによる網羅的転写状態解析、メタボローム解析による組織中代謝産物の測定を行った。また、胃炎・胃癌発生過程において放出される神経伝達物質として知られ、2 型免疫との関連が報告されている NMU の機能を解析するため、*NMU* 欠損マウスを用い、上述の胃炎モデルと組み合わせて同様に免疫・転写プロファイルを比較した。さらに、2 型免疫サイトカインを高発現する AAV ベクターの投与を

用い、Tuft 細胞～2 型免疫シグナルの胃組織内免疫応答に与える影響を検討した。

2. Tuft 細胞の脱分化機構の解明

Tuft 細胞には細胞周期を負に制御する Cdkn1c（p57）が高発現していることから、Tuft 細胞の脱分化に p57 による細胞周期抑制が関与している可能性を考えた。これを検証するため、Tuft 細胞特異的標識マウスである *Trpm5*-CreERT マウスと Cre 依存的蛍光レポーターマウスである *R26*-LSL-TdTomato マウスを交配させ、さらに Cre 依存的に p57 遺伝子をノックアウト可能な *p57* F/F マウスと組み合わせた状態でタモキシフェン誘導性の系譜追跡実験を行った。

結　果

1. Tuft 細胞は組織中代謝を制御し、胃上皮細胞増殖に重要な役割を果たす

高容量タモキシフェン投与は胃粘膜に急性障害を引き起こす。*Dclk1*-DTR マウスに高容量タモキシフェン投与を行い、DT 投与による Tuft 細胞アブレーションの有無で粘膜再生・細胞増殖の程度を比較した。その結果、Tuft 細胞アブレーションを行ったマウスでは細胞増殖の程度が著明に低下し、粘膜再生が遅延した（図 1A）。

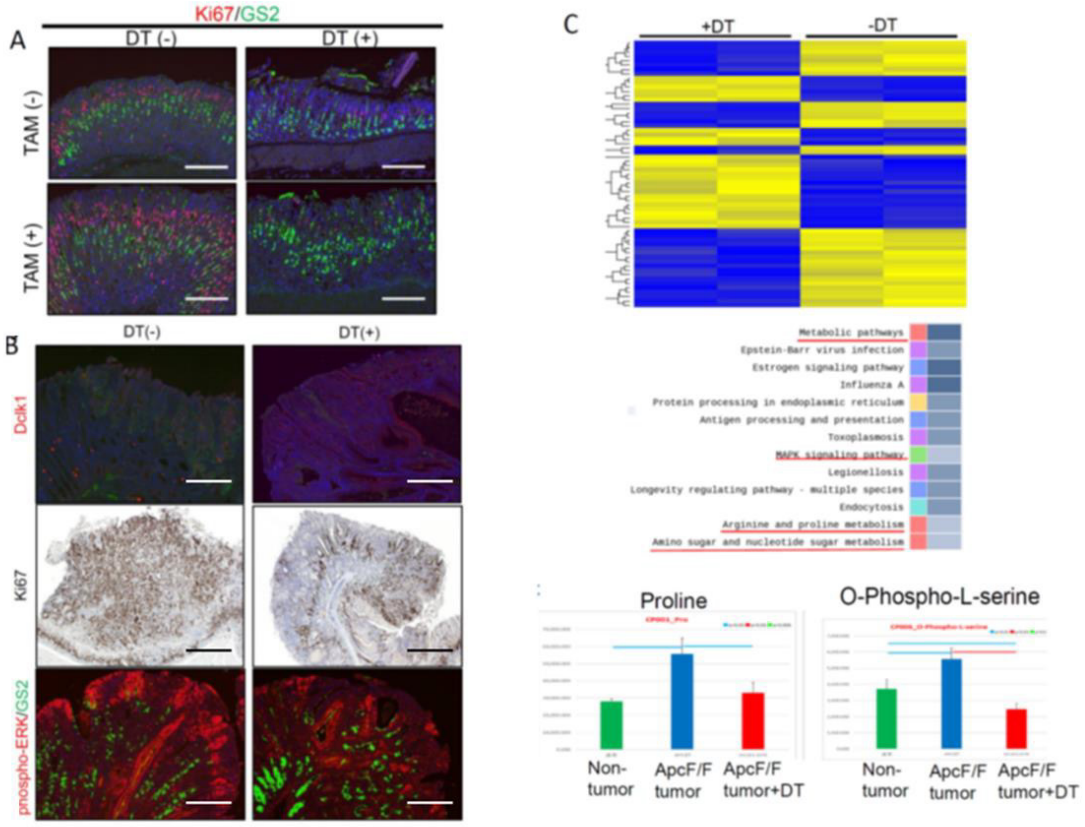


図 1. Tuft 細胞アブレーションの影響

A） 高容量タモキシフェン胃炎モデルにおける *Dclk1*-DTR アブレーション前後の細胞増殖（Ki67、赤）の比較。Bar＝100 μm

B） *Mist1*–CreERT；*Apc* F/F 腫瘍モデルにおける *Dclk1*-DTR アブレーション前後の Dclk1 発現（上）、細胞増殖（Ki67、中）、phosphoERK 発現（赤、下）の比較。Bar＝100 μm

C） *Mist1*–CreERT；*Apc* F/F 腫瘍モデルにおける *Dclk1*-DTR アブレーション前後の RNAseq の Heatmap（上）、GO 解析（中）、メタボロームデータ（下）。

同様に、慢性胃炎を生じる胃特異的 IL1β過剰発現マウスと *Dclk1*-DTR マウスを掛け合わせたマウスにおいて Tuft 細胞アブレーションを行うと、細胞増殖の抑制が認められた。さらにタモキシフェン誘導性に胃癌を生じる *Mist1*-CreERT ; ApcF/F マウスと *Dclk1*-DTR マウスを掛け合わせたマウスにおいて Tuft 細胞アブレーションを行った際も同様に腫瘍全体の細胞増殖の低下を認めた（図 1B)。Tuft 細胞アブレーション後の RNA シークエンスの結果、アミノ酸代謝を含む各種代謝関連遺伝子群の発現低下と、MAPK 経路関連遺伝子の発現低下が認められた（図 1C)。実際、免疫染色において Tuft 細胞アブレーションによる MAPK 活性化の減弱を認めた。*Mist1* -CreERT ; *Apc* F/F マウス胃腫瘍組織のメタボローム解析を実施した結果、*Dclk1*-DTR アブレーションによりセリン・プロリン系の代謝産物の減少が認められ（図 1C)、これが細胞増殖の低下を引き起こした可能性があると考えられた。

2. NMU・Tuft 細胞・2 型免疫サイトカインは協調して胃前癌病変の発生を促進する

慢性胃炎モデルである胃特異的 IL1b 過剰発現マウスと *NMU* 欠損マウスを交配したマウスでは、NMU を正常に発現する IL1b 過剰発現マウスと比較し、胃の前癌病変である化生性病変の出現が有意に抑制された（図 2A)。単一細胞レベルの免疫プロファイリングの結果、胃内に浸潤する免疫分画のうち、特に *NMU* 欠損マウスでは Mast cell、ILC2 の減少を認め、上皮中では Tuft 細胞が減少していた (図 2B)。さらに胃炎組織中の血球分画の scRNAseq の結果、Mast cell、ILC2 は 2 型サイトカインである IL33、IL13、IL4 を高発現していることがわかった。これらのサイトカインを発現する AAV ベクターを投与することによって、胃内に化生性変化と Tuft 細胞の増生が急速に誘導されたことから、NMU は 2 型サイトカイン発現細胞と Tuft 細胞をともに活性化し、これらの細胞群が相互作用を有しながら化生性変化の原因となっていると考えられた（図 2C)。

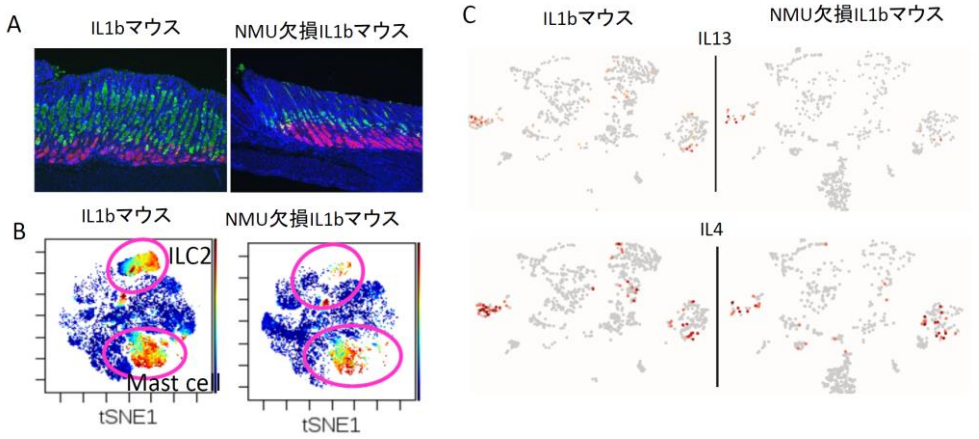


図 2. *NMU* 欠損と 2 型免疫

A）*NMU* 欠損により IL1β過剰発現モデルの化生性変化（緑）が減弱。Bar＝100μm

B）CyTOF 解析。*NMU* 欠損により IL1b 過剰発現モデルの ILC2 と Mast cell が減少。

C）scRNAseq 解析。*NMU* 欠損により IL1b 過剰発現モデルの IL13/IL4 発現分画が減少。

3. Tuft 細胞脱分化は、細胞内 p57 の発現喪失により誘導される

Tuft 細胞の系譜追跡が可能な *Trpm5*CreERT ; *R26*-Tomato マウスに対しタモキシフェンを投与し、Tuft 細胞選択的に Tomato 発現を誘導した際には、ほぼすべての Tomato 発現 Tuft 細胞が 2～3 週間の経過で粘膜から消失した（図 3A)。一方、*Trpm5*CreERT ; *p57*F/F; *R26*-Tomato マウスにタモキシフェンを投与すると、標識された Tuft 細胞が分裂を開始し、腺管内の構成細胞を供給するようになった（図 3B)。すなわち、p57 の欠損により Tuft cell が脱分化し幹細胞様機能を有するようになることが示された。通常状態では Tuft 細胞は p57 を高発現しているが、炎症および腫瘍遺伝子の変異導入により Tuft 細胞中 p57 の発現が低下することも分かり、実際それらの環境下では Tuft cell が癌起源細胞としての役割も持ち、腫瘍を形成するようになることが分かった（図 3C)。

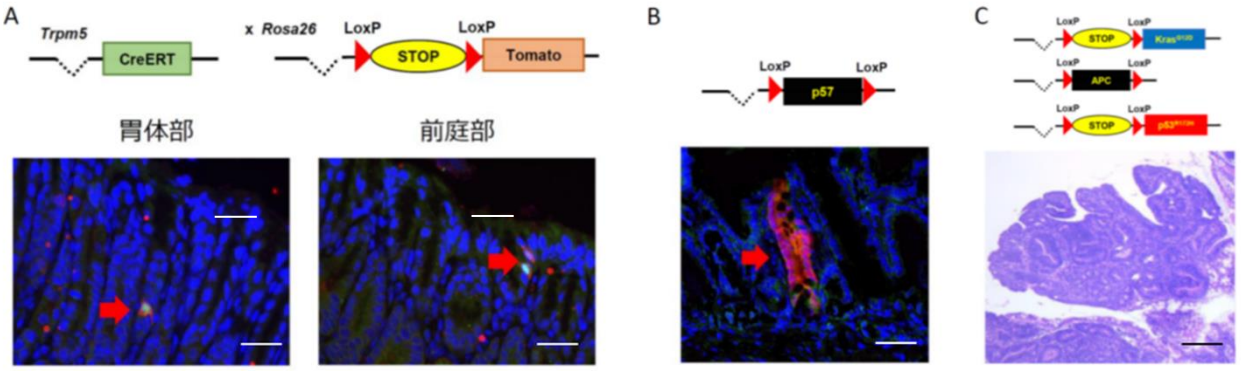


図 3. Tuft 細胞の脱分化機構

A) *Trpm5*–CreERT ; *R26*-LSL-TdTomato マウスの系譜追跡。Bar＝20 μm

B) *Trpm5*–CreERT ; *p57* F/F; *R26*-LSL-TdTomato マウスでは脱分化が発生。Bar＝20 μm

C) *Trpm5*–CreERT ; LSL-*Kras*; *Apc* F/F; LSL-*p53* マウスでは腫瘍が発生。Bar＝100 μm

考　察

神経・Tuft細胞ネットワークによる腫瘍内免疫制御機構は、近年注目を集めている腫瘍神経相互作用の一つであり、その一部を解明した本研究は学術的に重要な知見を有している。最新のオミクス技術の応用によって転写・代謝・免疫状態を単一細胞レベルで網羅的に解析した研究であり、Tuft細胞が胃炎・胃癌の病態にもたらす影響の包括的な理解が可能となった。

本研究結果は、胃炎・胃癌の病態解明に貢献し、将来的にはこれらの疾患に対する新たな治療法・治療薬の開発につながると期待される。さらに、本研究によって解明された腫瘍内神経・Tuft細胞ネットワークは、胃のみならず様々な臓器においても存在する可能性があると考えられ、広い範囲の癌研究及び新規治療開発に影響を与え、将来の新たな研究開発に寄与できるものと考える。

共同研究者・謝辞

本研究で用いた *p57* F/F マウスは共同研究者である群馬大学畑田出穂教授のご協力の下、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（BINDS）の課題番号 JP17am0101120 の支援を受け作製した。

文　献

1) Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS (2006) Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. Cell 124: 407-421.

2) Magnon C, Hall SJ, Lin J, Xue X, Gerber L, Freedland SJ, Frenette PS (2013) Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. Science 341: 1236361.

3) Venkatesh HS, Johung TB, Caretti V, Noll A, Tang Y, Nagaraja S, Gibson EM, Mount CW, Polepalli J, Mitra SS, et al. (2015) Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion. Cell 161: 803-816.

4) Renz BW, Takahashi R, Tanaka T, Macchini M, Hayakawa Y, Dantes Z, Maurer HC, Chen X, Jiang Z, Westphalen CB, et al. (2018) beta2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer. Cancer Cell 33: 75-90 e77.

5) Hayakawa Y, Sakitani K, Konishi M, Asfaha S, Niikura R, Tomita H, Renz BW, Tailor Y, Macchini M, Middelhoff M, et al. (2016) Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling. Cancer Cell.
6) Zhao CM, Hayakawa Y, Kodama Y, Muthupalani S, Westphalen CB, Andersen GT, Flatberg A, Johannessen H, Friedman RA, Renz BW, et al. (2014) Denervation suppresses gastric tumorigenesis. Sci Transl Med 6: 250ra115.
7) Dubeykovskaya Z, Si Y, Chen X, Worthley DL, Renz BW, Urbanska AM, Hayakawa Y, Xu T, Westphalen CB, Dubeykovskiy A, et al. (2016) Neural innervation stimulates splenic TFF2 to arrest myeloid cell expansion and cancer. Nat Commun 7: 10517.
8) Gerbe F, Sidot E, Smyth DJ, Ohmoto M, Matsumoto I, Dardalhon V, Cesses P, Garnier L, Pouzolles M, Brulin B, et al. (2016) Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. Nature 529: 226-230.
9) Westphalen CB, Asfaha S, Hayakawa Y, Takemoto Y, Lukin DJ, Nuber AH, Brandtner A, Setlik W, Remotti H, Muley A, et al. (2014) Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells. J Clin Invest 124: 1283-1295.