Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

CDX2-induced intestinal metaplasia in human gastric organoids derived from induced pluripotent stem cells

古出，隆大

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2022-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8411号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477837

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

学位論文の内容要旨

CDX2-induced intestinal metaplasia in human gastric organoids derived from induced pluripotent stem cells

iPS 細胞由来ヒト胃オルガノイドにおける
CDX2 誘導性腸上皮化生

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
食道胃腸外科学
（指導教員：掛地　吉弘　教授）

古出　隆大

胃腸上皮化生は慢性胃炎においてみられる所見であり、腸型胃癌はその背景粘膜として腸上皮化生を伴うことが多い（Correa、1992; Correa and Shiao、1994; Plummer et al、2015）。これらのことから、腸上皮化生は、H.pylori 感染に誘発される慢性炎症－化生－異形成－癌という一連の病態の中に位置づけられる前癌性病変と見なされてきた（de Vries et al、2008）。一方、腸上皮化生は傍癌性病変であるという報告もある（Kawachi et al、2003; Hattori、1986）。胃腸上皮化生が前癌病変であるにせよ傍癌病変であるにせよ、その分子メカニズムを理解することは胃の発癌のメカニズムを明らかにするために重要である。

腸特異的ホメオボックス遺伝子である CDX2 は、腸粘膜の発達および維持に加え、胃腸上皮化生においても重要な役割を果たすと報告されてきた（Beck et al、1999; Chen et al、2021）。例えば、トランスジェニックマウスを用いた実験で、Cdx2 の強制発現によりマウス胃粘膜に腸上皮化生が誘導されることが示されているほか（Mutoh et al、2002; Silberg et al、2002）、ヒト胃の腸上皮化生組織では CDX2 発現がみられる（Almeida et al、2003）。しかし、実際のヒト胃粘膜で遺伝子改変実験を行うのは不可能であったことから、ヒトの胃粘膜に腸上皮化生を人為的に誘導するモデルはこれまで報告されていない。近年、ヒト多能性幹細胞から in vitro で胃粘膜を含むさまざまな種類のヒト組織（オルガノイド）を作製する技術が発展し（McCracken et al、2017; McCracken et al、2014）、in vitro ヒト組織での遺伝子改変実験が可能になった。本研究は、人工多能性幹細胞（iPSC）由来胃オルガノイドに CDX2 を強制発現させることでヒト胃腸上皮化生モデルを確立することを目的とした。

まず、以前に報告された方法（McCracken et al、2017; McCracken et al、2014）を用いて、我々の研究室で用いている健常人由来 iPSC からの胃幽門部オルガノイドへの分化誘導を試みた。作製されたオルガノイドの免疫染色を行うと、ほとんどの上皮細胞が胃腺窩上皮細胞マーカーである MUC5AC 陽性であり、壁細胞マーカーである H、K-ATPase（ATP4A）、および内分泌細胞マーカーであるソマトスタチン（SST）、シナプトフィジン（SYP）、クロモグラニン A（CHGA）陽性細胞も散見された。胃上皮で発現することが知られている転写因子 SOX2 も陽性だった。一方、腸マーカーである CDX2 や MUC2 の発現は認めなかった。これらから、既報と同様にヒト iPSC から胃オルガノイドが作製されたことが分かった。次に iPSC 由来胃オルガノイドでドキシサイクリン（DOX）誘導性に CDX2 と赤色蛍光タンパク質 mCherry を同時に強制発現させるためのプラスミドを作製しヒト iPSC 株に導入した。DOX 添加後に mCherry を発現するサブクローン（CDX2-iPSC）を分離した。CDX2-iPSC は親細胞株（Parental iPSC）と同様に多能性を有することが確認された。1 μM の DOX を 24 時間添加すると、CDX2-iPSC のほぼすべてが mCherry を発現することが蛍光顕微鏡で観察されたのに加え、CDX2 が発現することが mRNA およびタンパク質レベルで確認された。

CDX2-iPSC からも Parental iPSC からと同様に、胃上皮マーカーである MUC5AC を発現する胃オルガノイドが誘導できた。Parental iPSC 由来胃オルガノイドでは MUC5AC の発現を分化誘導開始後約 30 日で認めたことから、誘導開始から 35 日後に DOX 添加を行う

ことにした。DOX 添加がヒト iPSC 由来胃オルガノイドにおいても CDX2 発現を誘導すること、ならびに CDX2 が mCherry と共発現することを確認した。ヒト iPSC 由来胃オルガノイドに DOX を添加すると、マウスやヒトの生体組織に由来する腸オルガノイドで認められるのと同様の陰窩様構造の出現を認めた（Barker et al、2010; Fordham et al、2013; Jung et al、2011; Sato et al、2009）。DOX（-）オルガノイドの上皮細胞では CK20 が陰性だったが、DOX（+）オルガノイドの上皮細胞では CK20 陽性細胞を認めた。DOX（-）オルガノイドの上皮には CK7 陽性細胞と CK7 陰性細胞を認めた。これは、胎児胃上皮に CK7 陽性細胞と CK7 陰性細胞が同時に含まれていることと一致する（Kirchner et al、2001）。また、DOX（+）オルガノイドでも CK7 陽性および陰性細胞の両方が観察された。胃腸上皮化生の表現型は CK7（-）/ CK20（+）または CK7（+）/ CK20（+）であることが知られており（Ormsby et al、1999; Couvelard et al、2001）、我々の結果は DOX（+）オルガノイドでその腸上皮化生が誘導されていることを示唆した。RNA-seq 解析では CDX2 の強制発現により CK20 および他の腸マーカー（CDH17、MUC13、CDX1）の上昇と胃マーカー（CLDN18、TFF2、MUC5AC、MUC1 および GIF）の低下を認めた。さらに、DOX（+）オルガノイドでは腸マーカーである MUC2 の発現も認めた。MUC2 陽性細胞は DOX（+）オルガノイドの陰窩様構造に集簇していた。DOX（-）オルガノイドで E-cad を発現する細胞はすべて MUC5AC を発現していた。一方、DOX（+）オルガノイドでは mCherry 陰性の上皮細胞はすべて MUC5AC 陽性だったのに対し、mCherry 陽性の上皮細胞はすべて MUC5AC 陰性だった。この結果は、ヒト iPSC 由来胃オルガノイドにおける CDX2 強制発現細胞では MUC5AC の発現が消失したことを意味する。

RNA-seq 解析により、CDX2 遺伝子の強制発現を行った場合と行っていない場合のヒト iPSC 由来胃オルガノイドにおける遺伝子発現パターンを比較した。腸上皮化生の発現パターンを評価するために、2 つの遺伝子リストを用いた。一つは、各種正常組織の遺伝子発現のデータベース（Fagerberg et al、2014）を用いて、正常な胃と比較して正常な腸で高度に発現する遺伝子を我々が抽出して作成したリスト「Intestinal genes」であり、もう一つはヒト腸上皮化生組織のマイクロアレイ分析によって得られた既報の腸上皮化生マーカー遺伝子のリスト「IM genes」（Lee et al、2010）である。クラスタリング分析では「All genes」、「Intestinal genes」、「IM genes」のすべてで DOX（-）サンプル群と、DOX（+）サンプル群を明確に分けることができた。RNA-seq 解析では DOX（-）オルガノイド群と比べ DOX（+）オルガノイド群で「All genes」のうち 10887 遺伝子（70.2%）の発現が上昇し、4624 遺伝子（29.8%）が低下、「Intestinal genes」のうち 61 遺伝子（85.9%）が上昇し、10 遺伝子（14.1%）が低下、「IM genes」では 205 個の遺伝子（63.9%）が上昇し、116 個の遺伝子（36.1%）が低下していた。CDX2 過剰発現で発現上昇した遺伝子の割合は「IM genes」群が「Intestinal genes」群よりも有意に低かった。71 個の「Intestinal genes」のうち 8 つの遺伝子（BEST4、GUCA2A、CA7、RNF186、TMIGD1、MYO7B、OTOP3、および CDX2）は、DOX（-）サンプルと比較して DOX（+）サンプルで平均 5 倍以上の発現上昇を認めた。興味深いことに、この 8 つの遺伝子すべてがパネート細胞で高発現するもので（Karlsson et al、2021）、CDX2 誘導後にパネート細胞の遺伝子発現メカニズムが活性化されている可能性が示唆された。

最後に、胃と腸で重要であることが知られている転写因子に着目して DOX（-）オルガノイドと DOX(+)オルガノイドを比較した。RNA-seq データでは、腸でみられる転写因子である CDX1 は、DOX（+）オルガノイドで上昇していた。胃の転写因子である SOX2 の発現については、RNA-seq データでは DOX の有無による有意な差はなかったものの（倍率変化：0.77-1.24）、免疫染色では DOX（+）オルガノイドにおいて E-cad かつ CDX2 が発現している上皮細胞では SOX2 発現が消失していた。このことは、CDX2 の発現が胃上皮で SOX2 の発現を抑制することを示唆した。

本研究では iPSC 由来ヒト胃オルガノイドにおいて CDX2 を過剰発現させることで、*in vitro* でのヒト腸上皮化生モデルを確立した。このモデルは、(i) mRNA レベルで腸および胃のマーカー遺伝子の発現上昇と低下、(ii) 腸マーカーCK20 および MUC2 陽性細胞の出現、(iii) 胃腺窩細胞マーカーである MUC5AC 発現細胞の消失、(iv) 陰窩様構造および構造内の MUC2 陽性細胞の集簇の出現、および (v) パネート細胞に特異的な遺伝子の発現を示した。

現在では腸上皮化生の原因となる *H. pylori* の除菌が広く行われている。しかし、腸上皮化生は *H. pylori* 除菌後も不可逆な変化であることや（Chen et al、2020）、*H. pylori* 感染の再発率が近年増加していること（Zhao et al、2021）、さらに、腸上皮化生は、*H.pylori* 感染だけでなく胆汁酸によっても誘発されることが近年報告された（Li et al、2019; Xu et al、2020; Yu et al、2019; Yuan et al、2019 ）ことから、腸上皮化生の形成にいたる病態の理解と腸上皮化生を有する胃粘膜を回復させる方法を研究することは依然として重要である。本研究で確立されたモデルは、胃癌発生に大きく関わる分子メカニズムを明らかにするのに役立ち、胃癌の新しい治療法や予防法の開発につながる可能性がある。

本研究にはいくつかの限界もある。以前に報告されたマウス腸上皮化生モデル（Silberg et al、2002）とは異なり、本研究で作製したモデルでの mRNA 発現解析の結果は MUC2 や villin などの腸上皮化生マーカー（Park et al、2010; Reis et al、1999）の発現上昇を示さなかった。Cdx2 トランスジェニックマウスモデルの胃は 1〜15 週齢で分析されたが（Silberg et al、2002）、本研究では CDX2 過剰発現の 5〜12 日後に分析しており、CDX2 を過剰発現させる期間の違いが、マーカー遺伝子の発現パターンに違いをもたらした可能性が考えられる。また本研究では CDX2 発現誘導後も腸オルガノイド培地ではなく胃オルガノイド培地（McCracken et al、2014）を使用した。Noggin、R-Spondin、Wnt3a を含む腸オルガノイド培養条件（Fordham et al、2013; Sato et al、2009）を用いることで、CDX2 を過剰発現する胃オルガノイドを長期間維持でき、完全な腸の表現型が得られる可能性が考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 3202 号	氏 名	古出 隆大
論文題目 Title of Dissertation	CDX2-induced intestinal metaplasia in human gastric organoids derived from induced pluripotent stem cells iPS 細胞由来ヒト胃オルガノイドにおける CDX2 誘導性腸上皮化生		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 福本 巧 副 査 Vice-examiner 児玉 裕三 副 査 Vice-examiner 伊藤 智雄		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

〔目的〕

腸上皮化生は、H.pylori 感染に誘発される慢性炎症－化生－異形成－癌という一連の病態の中に位置づけられる前癌性病変と見なされてきた。胃腸上皮化生の分子メカニズムを理解することは胃の発癌のメカニズムを明らかにするために重要である。

腸特異的ホメオボックス遺伝子である CDX2 は、腸粘膜の発達および維持に加え、胃腸上皮化生においても重要な役割を果たす。Cdx2 の強制発現によりマウス胃粘膜に腸上皮化生が誘導されることが示されているほか、ヒト胃の腸上皮化生組織では CDX2 発現がみられる。しかし、ヒトの胃粘膜に腸上皮化生を人為的に誘導するモデルはこれまで報告されていない。本研究は、人工多能性幹細胞（iPSC）由来胃オルガノイドに CDX2 を強制発現させることでヒト胃腸上皮化生モデルを確立することを目的とした。

〔方法ならびに結果〕

Ⅰ. ヒト由来 iPSC からの胃幽門部オルガノイドへの分化誘導

以前に報告された方法を用いて健常人由来 iPSC からの胃幽門部オルガノイドへの分化誘導を行った。作製されたオルガノイドのほとんどの上皮細胞が胃腺窩上皮細胞マーカーである MUC5AC 陽性であり、壁細胞マーカーである H、K-ATPase（ATP4A）、および内分泌細胞マーカーであるソマトスタチン（SST）、シナプトフィジン（SYP）、クロモグラニン A（CHGA）陽性細胞も散見された。既報と同様にヒト iPSC から胃オルガノイドが作製された。

Ⅱ. CDX2 強制発現系の確立

ドキシサイクリン（DOX）誘導性に CDX2 と赤色蛍光タンパク質 mCherry を同時に強制発現させるためのプラスミドを作製しヒト iPSC 株に導入した（CDX2-iPSC）。CDX2-iPSC は親細胞株（Parental iPSC）と同様に多能性を有することが確認された。CDX2-iPSC からも Parental iPSC からと同様に、胃上皮マーカーである MUC5AC を発現する胃オルガノイドが誘導できた。DOX 添加がヒト iPSC 由来胃オルガノイドにおいても CDX2 の発現を認めた。

Ⅲ. ヒト iPSC 由来胃オルガノイドに CDX2 を強制発現

ヒト iPSC 由来胃オルガノイドに DOX を添加するとマウスやヒトの生体組織に由来する腸オルガノイドで認められるのと同様の陰窩様構造の出現を認めた。さらに、DOX（+）オルガノイドの陰窩様構造に腸マーカーである MUC2 の集簇を認めた。ヒト iPSC 由来胃オルガノイドにおける CDX2 強制発現細胞では MUC5AC の発現が消失した。DOX（-）オルガノイドでは CK20 が陰性だったが、DOX（+）オルガノイドでは CK20 陽性細胞を認めた。DOX（+）オルガノイドで腸上皮化生が誘導されていることを示唆した。

Ⅳ. RNA-seq 解析

RNA-seq 解析では CDX2 の強制発現により CK20 および他の腸マーカー（CDH17、MUC13、CDX1）の上昇と胃マーカー（CLDN18、TFF2、MUC5AC、MUC1 および GIF）の低下を認めた。「Intestinal genes」と「IM genes」の 2 つのリストを用いて腸上皮化生の発現パターンを評価した。

クラスタリング分析では「All genes」、「Intestinal genes」、「IM genes」のすべてでDOX（-）サンプル群と、DOX（+）サンプル群を明確に分けることができた。DOX（-）オルガノイド群と比べDOX（+）オルガノイド群で「All genes」のうち10887遺伝子（70.2%）の発現が上昇し、4624遺伝子（29.8%）が低下、「Intestinal genes」のうち61遺伝子（85.9%）が上昇し、10遺伝子（14.1%）が低下、「IM genes」では205個の遺伝子（63.9%）が上昇し、116個の遺伝子（36.1%）が低下していた。71個の「Intestinal genes」のうち8つの遺伝子（BEST4、GUCA2A、CA7、RNF186、TMIGD1、MYO7B、OTOP3、およびCDX2）は、DOX（+）サンプルで平均5倍以上の発現上昇を認めた。この8つの遺伝子すべてがパネート細胞で高発現するものであった。

V.転写因子の変化

胃と腸で重要であることが知られている転写因子に着目した。RNA-seqデータでは、腸でみられる転写因子であるCDX1は、DOX（+）オルガノイドで上昇していた。胃の転写因子であるSOX2の発現については、RNA-seqデータでは有意差はなかったものの（倍率変化：0.77-1.24）、免疫染色ではDOX（+）オルガノイドにおいてCDX2が発現している上皮細胞ではSOX2発現が消失していた。このことは、CDX2の発現が胃上皮でSOX2の発現を抑制することを示唆した。

〔総括〕

本研究ではiPSC由来ヒト胃オルガノイドにおいてCDX2を過剰発現させることで、in vitroでのヒト腸上皮化生モデルを確立した。このモデルは、(i) mRNAレベルで腸および胃のマーカー遺伝子の発現上昇と低下、(ii) 腸マーカーCK20およびMUC2陽性細胞の出現、(iii) 胃腺窩細胞マーカーであるMUC5AC発現細胞の消失、(iv) 陰窩様構造および構造内のMUC2陽性細胞の集簇の出現、および (v) パネート細胞に特異的な遺伝子の発現を示した

本研究は、人工多能性幹細胞（iPSC）由来胃オルガノイドにCDX2を強制発現させることでヒト胃腸上皮化生モデルを確立することについて研究したものであるが、ヒトの胃粘膜に腸上皮化生を人為的に誘導するモデルはこれまで報告されていない。本研究で確立されたモデルは、胃癌発生に大きく関わる分子メカニズムを明らかにするのに役立ち、胃癌の新しい治療法や予防法の開発につながる可能性がある点で価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。