

令和 2 年 4 月 25 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860436

氏 名

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ボストン (国名: アメリカ合衆国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

腸管幹細胞の老化が腫瘍形成に与える影響3. 派遣期間: 令和 30 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Koch Institute for Integrative Cancer Research at Massachusetts Institute of TechnologyYilmaz lab5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

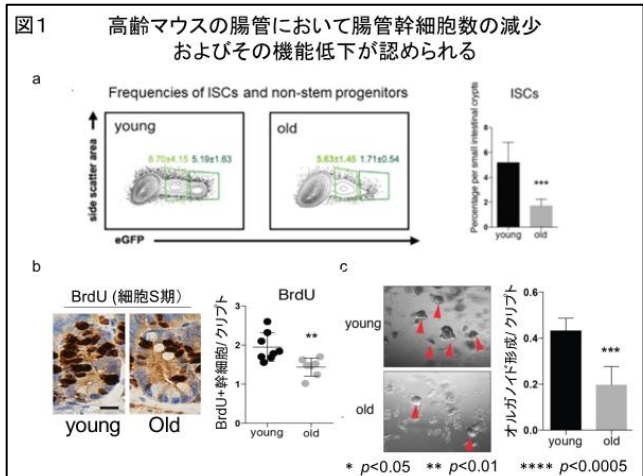
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

<研究目的>

- ① 加齢が腸上皮幹細胞の数や機能にどのような変化をもたらすかを明らかにする。
- ② 加齢による腸上皮幹細胞の機能変化が腸管腫瘍形成にどのような影響を与えるかを解析し、さらにその表現型にどのような遺伝子、細胞内シグナルおよび細胞内器官の働きが関与するかを明らかにする。
- ③ 加齢に伴い腸管幹細胞以外の腸上皮細胞が腫瘍形成能を獲得する可能性を探る

<調査実施状況>

目的①に対して、腸上皮幹細胞(ISCs; Intestinal Stem Cells) マーカーである Leucine-rich orphan G-protein(Lgr5) 陽性細胞特異的に GFP タンパクおよび Cre リコンビナーゼタンパクを発現する *Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2* マウス(以下 *Lgr5+GFP* マウス)を用いて、若年(8-16週齢)および高齢(72-96週齢)の *Lgr5+GFP* マウスにおける幹細胞数および機能解析を行った。具体的には、腸管幹細胞数を解析するために腸管陰窩(クリプト)を回収し、FACS でクリプトにおける GFP 陽性細胞の割合を調べたところ、若年マウスでは GFP 陽性細胞の割合が高齢マウスと比較し優位に高い結果となった(図 1a)。また、ISCs の増殖能を評価するために細胞周期 S 期を反映するチミジンアナログである BrdU をマウスに腹腔内投与した後、4 時間後にマウスから腸管を回収し免疫組織学的解析を行った。図 1b に示すように、高齢マウスと比較して若年マウスでは BrdU 陽性の ISCs の数が多いことが明らかとなった。さらに ISCs の機能解析を行うために、若年および高齢の *Lgr5+GFP* マウスからクリプトを回収し *in vitro* でのオルガノイド形成能の評価を行った。培養開始 3 日のオルガノイド形成能を評価したところ、若年マウスから回収したクリプトは高齢マウスに比較してオルガ

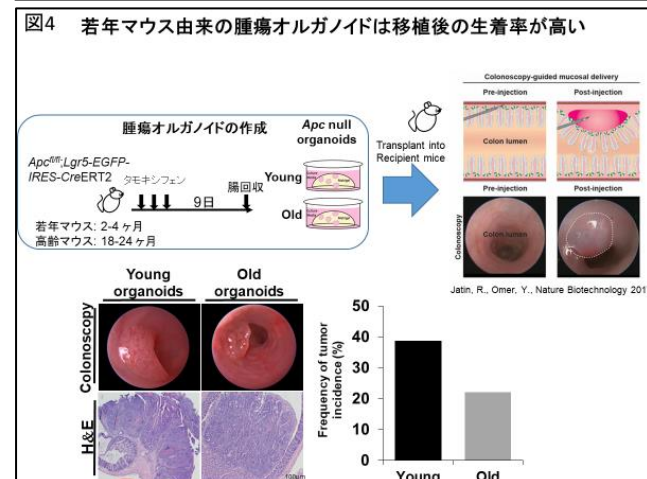
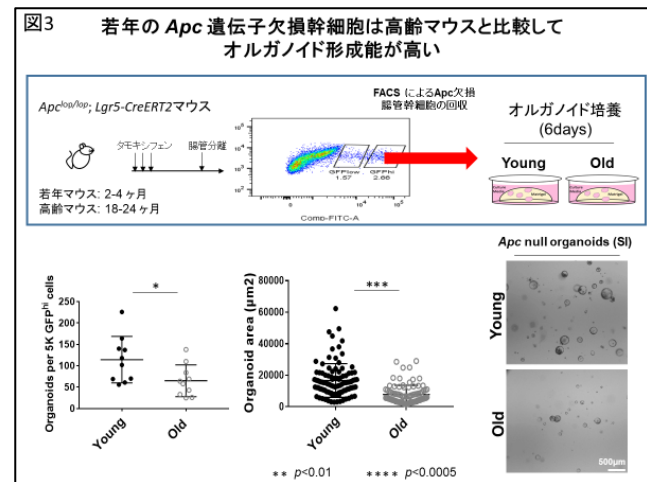
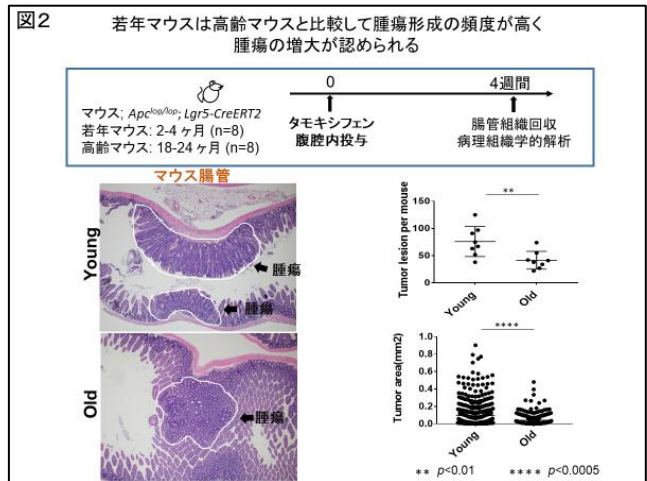


ノイド形成能が高いことが明らかとなった(図1c)。これらの結果から、若年マウスにおいては、高齢マウスと比較して腸管におけるISCsの数が多いだけでなく、ISCsの機能が高齢マウスより優れていることが示された。

目的②である加齢による腸上皮幹細胞の機能変化が腸管腫瘍形成にどのような影響を与えるかを解析するために、薬剤誘導性 Lgr5+細胞特異的 *Apc* 遺伝子欠損マウス (*Apc^{L/L};Lgr5-EGFR-IRES-CreERT2* マウス、以下 *Apc^{L/L};Lgr5* マウス) を用いて検討を行った。このマウスでは、薬剤(タモキシフェン)を腹腔内投与することで Lgr5+細胞特異的に癌抑制遺伝子である *Apc* 遺伝子が欠損し、細胞内で核移行した β -catenin が Wnt 標的遺伝子の発現を増加させることで、腸管において腫瘍が形成されるモデルマウスである。世界で広く受け入れられている大腸癌の多段階発癌説 (Adenoma-Carcinoma Sequence) において (Fearon ER et al, Cell, 1990)、*Apc* 遺伝子の変異は最初の、そして最も高頻度で大腸上皮で起こる変異であり、Lgr5+細胞は正常腸管の恒常性維持のために必須であるとともに腸管腫瘍の起源となる細胞と考えられている (Baker N et al, Nature, 2009)。このような理由からわれわれは、週齢の異なる *Apc^{L/L};Lgr5* マウスを用いて加齢が腫瘍形成にどのような影響を与えるかを解析を行った。図2上段に示したようにタモキシフェン (0.5mg/25g) をマウスに単回腹腔内投与した後、4週間後にマウスの腸管を回収し病理組織学的に腫瘍の数および各腫瘍の大きさを評価した。図2右中段に示すように、若年マウスでは高齢マウスと比較して腸管における腫瘍発生数が多く、それぞれの腫瘍面積が大きいという結果が得られた(図2右下段)。これらの結果は、若年のマウスにおける *Apc* 遺伝子欠損の Lgr5+細胞が高齢マウスの細胞に比べて腫瘍形成能が高く、また増殖能が高いことを示唆するものである。しかしながら、このマウスモデルにおける腫瘍形成においては、Lgr5+細胞の細胞内因子だけでなく腫瘍の微小環境を形成するニッチ細胞や免疫細胞、さらには腸内細菌叢等といった多数の因子が腫瘍形成に関与していると考えられる。

そこで若年および高齢マウスにおける *Apc* 遺伝子欠損の Lgr5+細胞の細胞内因子をより詳細に評価するために、図3に示すような実験を行った。若年および高齢 *Apc^{L/L};Lgr5* マウスにタモキシフェンを3日間連日投与した後、腸管から腫瘍を回収した。回収した腫瘍組織を単一細胞まで分離させた後、FACSを用いてそれぞれのマウスから *Apc* 遺伝子欠損の Lgr5+細胞 (GFP 高発現細胞) を 5000 細胞回収し、オルガノイド培養にて腫瘍形成能および腫瘍増殖能を評価した。培養6日後に、腫瘍オルガノイドの形成数および各オルガノイドのサイズを解析したところ、図3下段左に示すように若年マウスから回収した *Apc* 遺伝子欠損の Lgr5+細胞は高齢マウスと比較してオルガノイドの形成数が多く、また各オルガノイドのサイズも大きいという結果が得られた(図3下段右)。これらの結果は、*in vivo* の実験結果(図2)と同様の傾向を示すものであり、若年マウスの *Apc* 遺伝子欠損の Lgr5+細胞における内的因子が腫瘍形成能および腫瘍増殖能の高さに関連していることが示唆された。

さらに若年および高齢マウス由来の腫瘍の特性を比較するために、われわれの研究室で開発された新規大腸癌モデルマウスを用いて解析を行った (Roper J, et al, Nature Biotechnology, 2017)。実験手順については、図4上段に示すように若年および高齢 *Apc^{L/L};Lgr5* マウスから腫瘍を回収し培養条件下で腫瘍オルガノイドを作成した後、麻酔鎮静下にマウス内視鏡を用いてレシピエントである RAG2 ノックアウトマウスの大腸粘膜下に若年あるいは高齢マウス由来の腫瘍オルガノイドを移植した。移植後は経時的に内視鏡にて大腸粘膜の観察を行い、病理学組織学的に腫瘍形成の評価を行った。レシピエントで

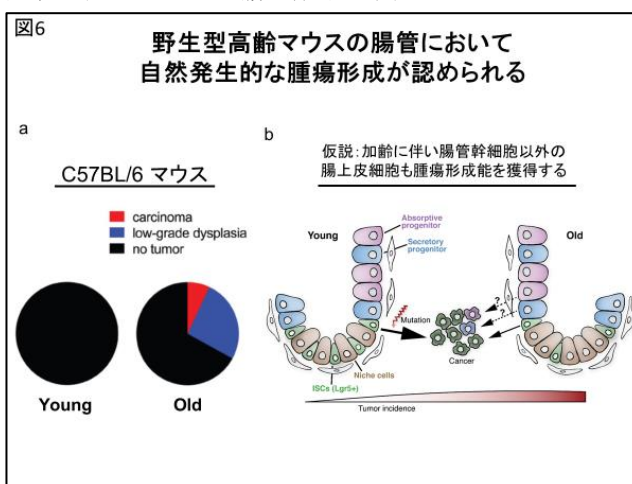
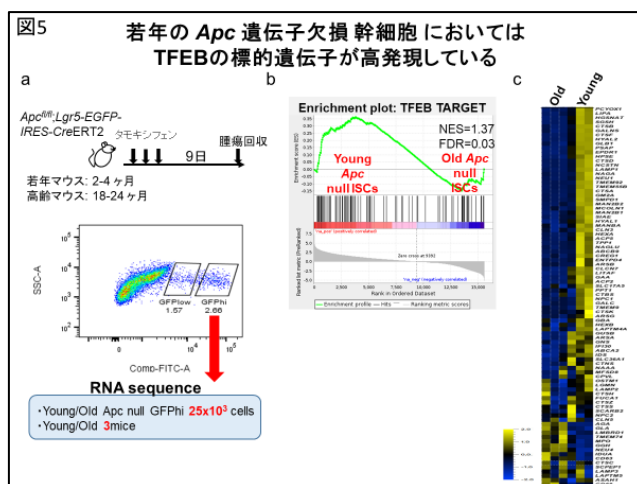


ある RAG2 ノックアウトマウスは T 細胞、B 細胞および NKT 細胞を欠く免疫不全マウスであり、レシピエントマウスの性別、週齢は同条件で行った。また移植オルガノイドの数については、顕微鏡下でオルガノイドの数をカウントし同数の腫瘍オルガノイドを移植した。これまでの実験では図 4 左下段に見られるように、若年および高齢マウス由来の腫瘍オルガノイドはいずれもレシピエントの大腸粘膜において生着および発育が見られたが、若年マウス由来の腫瘍オルガノイドの方がレシピエントの大腸粘膜において発育能が高い傾向が見られた。以上の in vivo および ex vivo の実験結果から若年マウスの *Apc* 遺伝子欠損腸管幹細胞の方が高齢マウスと比較して腫瘍形成能を有することが示された。

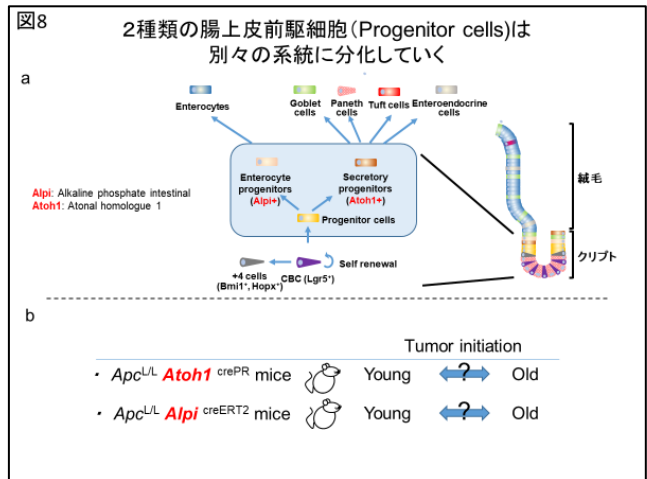
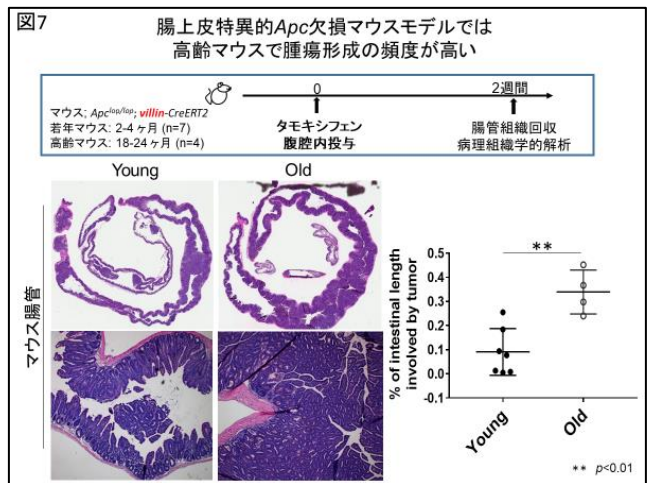
続いて目的②の後半部分である若年および高齢マウスの腫瘍の表現型にどのような遺伝子、細胞内シグナルの違いが認められるか解析を進めた。具体的には、図 5a に示したように若年および高齢 *Apc*^{L/L};Lgr5 マウスにタモキシフェンを 3 日間連続投与することで腸管の広範囲に腫瘍形成させ、回収した腫瘍細胞を単一細胞まで分離した後、FACS で *Apc* 遺伝子欠損の Lgr5+細胞 (GFP 高発現細胞) のみを 25000 細胞回収し RNA sequence による網羅的な遺伝子解析を行った。またサンプルについては、それぞれ 3 匹の若年および高齢のマウスから独立した細胞を回収した。網羅的な解析の結果から大変興味深いことにライソゾームに関連する遺伝子の発現が若年および高齢の細胞で差が認められた。ライソゾーム (Lysosome) は真核生物が持つ細胞小器官の 1 つであり、生体膜につつまれた構造体で細胞内消化

の場である。内部に加水分解酵素を持ち、エンドサイトーシスやオートファジーによって膜内に取り込まれた生体高分子はここで加水分解される。ライソゾームやオートファジーによってタンパク質が分解され、細胞は新陳代謝を行うことで恒常性が維持されている。加齢とライソゾームの関連性については、加齢に伴いライソゾームの機能が低下し、変性タンパク質や異常なミトコンドリアが細胞内に蓄積することで、神経変性疾患、肝障害、さらにはがんなどの疾患が引き起こされるということがこれまでに報告されている。また、がんにおいてはがん細胞の生存や持続的成長のためにがん細胞内においてライソゾームの活性が必須であるということも報告されている。そしてこのライソゾーム内の加水分解酵素やライソゾームの膜構成に関わる遺伝子の多くが転写因子である Transcriptional Factor EB (TFEB) によって制御されていることが最近になってわかってきた。栄養過多などの状況においては、TFEB は mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) によってリン酸化されることで活性化されず細胞質に留まる。一方、絶食などの飢餓状態においては、TFEB は脱リン酸化され、細胞質から核内へと移行し、それによりライソゾームの働きに関わる多数の遺伝子を発現させると言われている。そこでこの TFEB の標的遺伝子群を Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) によって調べたところ若年マウスの *Apc* 遺伝子欠損腸管幹細胞では高齢マウスと比較して TFEB の標的遺伝子が優位に高発現していることが明らかとなった (図 5b)。さらに Heat map を用いて各 TFEB の標的遺伝子の発現をサンプル間で比較したところ、GSEA の結果と一致して多くの遺伝子が若年群で高発現していることが明らかとなった (図 5c)。現在、若年マウスおよび高齢マウスの腸管腫瘍におけるライソゾームの活性を評価するとともに、腫瘍の発生および増大における TFEB の役割を評価するために *Apc*^{L/L};TFEB^{L/L};Lgr5 マウスの作製を行っているところである。残念ながら高齢の *Apc*^{L/L};TFEB^{L/L};Lgr5 マウスを得るまでにはまだ日数を要するが、すでに交配により少数の *Apc*^{L/L};TFEB^{L/L};Lgr5 マウスを得ることができており、今後の課題としてまずは若年マウスの腫瘍における TFEB およびライソゾームの役割を評価していく予定である。

上述したように、これまで解析を行ってきた腸管幹細胞特異的に癌抑制遺伝子 *Apc* を欠損させる腫瘍モデルマウス (*Apc*^{L/L};Lgr5 マウス) においては、若年マウスの方が腫瘍形成能が高いことが明らかとなったが、一方で世界共通の認識として加齢は大腸癌を含む多くの癌の単一危険因子であり (Yancik R, et al, Semin Oncol, 2004)、実際わが国における人口の高齢化とともに大腸癌の罹患数および死亡数の増加は顕著となっている。さらに図 6a に示したように若年および高齢の野生型マウスの腸管を観察したところ、高齢マウスの腸管において自然発生的な腸管異形成および癌腫の形成が認められたが、若年マウスの腸管においてこれらは認められなかった。これらの人間の背景や野生型マウスの実験結果を踏まえると *Apc*^{L/L};Lgr5 マウスにおける若年マウスの方が腫瘍形成能が高いという実験結果は逆説的である。これま



で腸管幹細胞である *Lgr5*⁺細胞が腫瘍幹細胞であると考えられてきたが、これは若年マウスを用いた実験結果であり高齢マウスにおける腫瘍の起源については依然明らかでない。そこでわれわれは、2つの相反する事象を説明する仮説として、加齢に伴い腸管幹細胞以外の腸上皮細胞も腫瘍形成能を獲得するという可能性を検討している (図 6b、研究目的③)。その可能性を検討するためにわれわれは *Apc*^{L/L};*Lgr5* マウスとは異なる腫瘍モデルを用いて腫瘍形成能の検討を開始した。*Villin* タンパクはアクチン結合タンパクであり全ての幹細胞を含む腸上皮細胞に発現している。そこで若年および高齢の *Apc*^{L/L};*villin-CreERT2* マウスを用いて腫瘍形成能を評価した。具体的には図 7 上段に示したようにタモキシフェンを単回腹腔内に投与し2週間後に腸管を回収し病理学組織学的に腫瘍形成を評価した。興味深いことにこれまでの実験結果からは高齢マウスの腸管において若年マウスより腫瘍発生頻度が高いことが明らかとなり (図 7 下段)、この結果は高齢マウスにおいて腸管幹細胞以外の上皮細胞から腫瘍が発生することが示唆された。腸管上皮組織において、幹細胞 (*Lgr5*⁺細胞) から作られた Progenitor cell (前駆細胞) は Alkaline phosphatase intestinal (Alpi)⁺ 細胞と Atonal homologue (Atoh1)⁺細胞の2種類が存在し、それぞれ吸収上皮細胞 (Enterocyte) と内分泌系細胞 (Secretory cell) に分化していくことが知られている (図 8b) (Tetteh PW, et al, Cell Stem Cell, 2016)。図 7 で示した *Apc*^{L/L};*villin-CreERT2* マウスの実験結果からわれわれは Alpi⁺ progenitor cell と Atoh1⁺ progenitor cell が高齢マウス腸管において腫瘍の起源になると仮説を立て *Apc*^{L/L};*Atoh1-CreERT2* および *Apc*^{L/L};*Alpi-CreERT2* という2種類のマウスを作成し現在腫瘍形成能を検証している途中である。



<まとめ>

本研究により若年マウスにおいて正常腸管幹細胞 (*Lgr5*⁺細胞) と同様に腫瘍幹細胞 (*Apc* 欠損 *Lgr5*⁺細胞) においてもその機能が高齢マウスと比較して優れていることが明らかとなった。一方で高齢マウスにおいてはこれまで腫瘍形成の起源であると考えられていた *Lgr5*⁺細胞以外の腸上皮細胞から腫瘍が形成される可能性が示唆された。引き続き腫瘍幹細胞におけるライソゾームを中心とした機能制御機構および高齢マウス腸管において新たな腫瘍起源となりうる細胞の同定という2点について研究を継続していく。

<成果の発表および学会発表>

これらの研究成果は Whitehead Institute for Biomedical Research at MIT と合同で開催される Floor meeting において口頭発表を行った (2019年3月、2020年2月)。また、JSPS が主催した The Japan-US Science Forum in Boston 2019 においてポスター発表を行ったほか、筆者が所属する Koch Institute at MIT が主催する Koch Fall Retreat (2018年11月、2019年10月) においてポスター発表を行った。