シンポジウム

2. 幹細胞異常と内科系疾患，現況と展望

4) 消化管幹細胞と消化器がん幹細胞

土屋輝一郎

Key words : 大腸上皮幹細胞, 再生医療, 炎症発がん, 粘液産生がん

はじめに

腸管は人体の中で最も長い臓器であり，とくに小腸は全長 6～7 m の管腔臓器で明確な境界はないとされてきた．しかし近年本邦で開発されたダブルバルーン内視鏡 (Double balloon endoscopy : DBE) により安定して全小腸の観察，生検が可能となったことから我々は同一人物の全小腸をマッピング生検することで小腸部位別の分化制御と細胞構成を解析したところ，分化機構が部位別に緻密に制御されることで細胞構成が変化することを明らかとした (図 1)¹⁾．そこで幹細胞を含む上皮細胞分化制御機構と消化管疾患が密接に関与することを予想し解析を行い，本稿では腸管における幹細胞制御および疾患関連性について概略する．

1. 腸管上皮細胞分化制御における腸管機能と腸管疾患

腸管上皮細胞の分化機構は転写因子群により運命決定がされている．最初の分岐点として分泌系の細胞と吸収上皮細胞の運命決定には Notch シグナルが関与しており，Notch シグナルの下流遺伝子である HES1 と HES1 が発現を制御する Atonal homolog 1 (Atoh1) の発現がそれぞれ吸収上皮細胞と分泌系細胞へと分化する²⁾．潰瘍性大腸炎は腸の持続炎症が病態の主体であると考えられていたが，その一方で粘膜では杯細胞が有意に減少することが以前から指摘されていた．そこで我々は潰瘍性大腸炎の杯細胞減少が Notch シグナル制御異常によると推測し，潰瘍性大腸炎患者の大腸検体を用いて Notch シグナルを解析したところ，正常人と比較して Notch シグナルが亢進することで HES1 陽性細胞が増加し，Atoh1 陽性細胞が減少することを明らかとした^{3, 4)}．さ

東京医科歯科大学消化管先端治療学

110th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine : Symposium : 2. Diseases originated from stem cell abnormalities ; 4) The intestinal epithelial stem cells and Cancer stem cells.

Kiichiro Tsuchiya : Department of Advanced Therapeutics for Gastrointestinal Diseases, Tokyo Medical and Dental University, Japan.

本講演は，平成 25 年 4 月 13 日 (土) 東京都・東京国際フォーラムにて行われた．

(Iwasaki et al. J Gastroenterol. 2011 より引用)

図 1. 腸管は多彩な機能を有する。

腸管上皮細胞は 4 種類の細胞から構成される。細胞構成は部位により異なり、種々の分化因子により制御される。

図 2. 大腸疾患は分化制御機構の破綻と関連する。

らに大腸がんにおいてはadenomatous polyposis coli (APC) の異常によりWntシグナルが亢進することが知られているが、上皮細胞分化制御機構との関連は指摘されていなかった。そこで我々は大腸がんではAtoh1がWntシグナル亢進状態においてGSK3βのリン酸化によりプロテアソーム系蛋白分解を起こし分化抑制を起こすことを見いだしたことからWntシグナル亢進が細胞増殖だけでなく直接未分化維持機構を制御する事を明らかにした⁵⁾。以上より、腸疾患の粘膜異常は、分子制御機構の破綻により必然的に病態として表現系を有することが示唆された(図2)。

また分化制御機構だけでなく幹細胞そのものの異常も予想されたが、幹細胞がこれまで同定されないため解析は不可能であった。

2. 大腸上皮の幹細胞を同定する

近年、小腸及び胃の上皮細胞は初代培養法を確立することでleucine-rich-repeat containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) 陽性の1個の細胞から全ての細胞種へ分化することで幹細胞の証明がされた⁶⁾。同時に当教室の油井・中村らが小腸上皮細胞における初代培養系の構築

を試みており、大腸上皮細胞をマウス腸管から単離し、胃・小腸と同様の条件で培養を行ったが継続的な培養は不可能であった。そこで種々の因子を添加して試行錯誤した結果、Wnt3A、BSAの添加にて大腸上皮の初代培養が可能となった。大腸も同様にLgr5 陽性細胞から単離した細胞の培養が可能であり、大腸粘膜が構成する全ての細胞腫への分化も確認できた。初代培養では球形のオルガノイドをして培養されており、経時的な解析によりLgr5 陽性細胞が増加することからより幹細胞維持に適した環境である一方で、腺管構造は保てないことが明らかとなった。そこでこの初代培養オルガノイドが*in vivo*において正常な腺管構造を再び有することが出来るか試みている。デキストラン硫酸 (DSS) を経口投与することにより、大腸炎を誘発し粘膜に潰瘍を形成させ、そこに経肛門的にオルガノイドを注入し潰瘍からの治癒過程において粘膜に生着するかを解析した。腸炎形成し治癒してから6カ月後に腸管を観察すると粘膜の一部にドナー由来の腸管上皮が生着しており、正常な腺管構造を有していた。さらに増殖細胞や分化細胞構成など全く変化を認めなかった。そこで油井・中村らは1個のLgr5 陽性上皮幹細胞から腺管が構成できるか解析を行った。腸管から幹細胞を抽出しLgr5 プロモーター下にて発現するGFP 陽性細胞をさらにConfettiマウスを用いて赤色に蛍光発色させた。つまり1個のLgr5 陽性細胞から分裂した細胞はすべて赤色に蛍光標識されることになる。1個の細胞から初代培養にて赤色蛍光のオルガノイドを量産し、DSS腸炎モデルに移入したところ、腺管として機能することが確かめられた。以上より世界で初めて大腸の幹細胞を同定し、さらには腺管構造まで再生可能であることが証明された (図3)⁷⁾。

3. 1 幹細胞を可視化する。

この腸管幹細胞の同定・維持・腺管への再生

は腸管制御機構解明に大きな進歩であったが、一つの腺管に複数の幹細胞が存在することが報告され幹細胞同士の制御機構が腺管機能に大きな影響を与えることが予想された。小腸は陰窩底部の+4細胞とCrypt base columnar (CBC) 細胞の2種類が存在しそれぞれが障害時にカバーし合うことが報告されている⁸⁾。またCBC細胞は陰窩内に14個存在し長時間で1幹細胞由来の腺管になることが指摘されているが⁹⁾、CBC細胞同士の制御がどのように腺管機能維持に関わるかは未だ不明である。そこで我々はマウス小腸初代培養のオルガノイドに直接mCherry遺伝子を導入したところ、一部の細胞のみにmCherry 蛍光発色を確認した。さらに長期培養にても同一陰窩にmCherry陽性CBC細胞と陰性CBCが存在することが明らかとなった。興味深いことに、陰窩内のパネート細胞をライソザイム染色にて同定したところmCherry陽性と陰性のパネート細胞が存在することが判明し、mCherry陽性、陰性CBC細胞からそれぞれ分化したことが示唆された。またmCherry陽性細胞が陰窩内に1つのみ存在する陰窩をライブイメージングにて4日間観察したところ、陰窩底部及び増殖帯にmCherry陽性細胞が分裂して供給することを確認しえた。今後陰窩内での1幹細胞の動態、幹細胞同士の制御機構の解析をさらに進めていく予定である。

4. 粘液産生がんのがん幹細胞制御

さらに我々は腸管上皮幹細胞の破綻としてがん幹細胞に着目した。近年多くのがん幹細胞マーカーが報告されているが、中でもLgr5 陽性細胞から大腸がんが発生し、さらにlineage tracingを用いて初めてLgr5 陽性細胞から大腸腺腫細胞が供給されていることが報告されたことからがん細胞におけるLgr5 発現が着目されている¹⁰⁾。そこで我々は大腸がんの中でも粘液産生がんに着目した。粘液産生という分化形質を保持しな

図 3. Lgr5 陽性大腸上皮単細胞から腺管が構築される。
Lgr5 陽性単細胞を培養にて増やし、マウスの潰瘍部への移植にて腺管として再生する。
(Yui et al. Nat Med (2012) より引用)

がら病理学的にはその構造異型から未分化として分類されることが多く予後不良であることから、大腸癌における分化形質と悪性形質の関連を解析した。前述のごとく通常の大腸癌では分化マスター因子である Atoh1 が蛋白分解をおこすことで、非粘液形質を維持していることを報告している。しかし粘液産生癌では Atoh1 蛋白が発現していることが報告され、がん細胞における Atoh1 蛋白の機能が粘液産生癌の形質に関連することが示唆されたがその詳細は不明であった。そこで Atoh1 の蛋白分解認識部位を同定しその変異体を作成したところ大腸癌細胞株においても安定して発現することを確認した。Atoh1 発現大腸癌細胞の形質を解析すると Mucin2 や trefoil factor 3 (TFF3) などの発現上昇を認めたことから粘液形質を獲得することが明らかとなっ

た。さらにがん幹細胞マーカーとして Lgr5, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1) を解析したところ予想に反して Atoh1 発現によりこれらの遺伝子発現の亢進を認めた(図 4)^{1,11)}。ヌードマウスの皮下に接種し腫瘍形成能を解析したところ Atoh1 発現により腫瘍形成の亢進を認めたことからがん幹細胞が増加していることが示唆された。さらに抗癌剤耐性能の獲得や遊走能の亢進を認めるなど粘液産生形質の獲得だけでなく、がん悪性度の獲得を認めたことから大腸癌における粘液産生がんがより悪性度が強く予後不良であることの機構と密接に関わることが予想された(図 5)。

しかし粘液産生がんにおいて Atoh1 蛋白が発現している機構はいまだ不明であり、Atoh1 蛋白発現機構の解明が粘液産生がんの発生理解に

図 4. Atoh1 変異体を用いて大腸がん細胞にAtoh1 蛋白を安定発現させる。
マイクロアレイ解析にて粘液産生及び幹細胞マーカーの発現上昇を認める
(Kano et al BBRC 2013 より引用)

図 5. Atoh1 発現が粘液産生形質とがん幹細胞形質を誘導する。

重要であると思われる。また今回の解析において、Atoh1 が直接Lgr5のプロモーター部位に結合して遺伝子発現を誘導する結果も得られたが、Lgr5 発現とがん幹細胞形質との関連についても今後詳細な機構解明が望まれる。

おわりに

腸管上皮細胞は1週間で入れ替わるというターンオーバーの短い組織でありそれが一生の間恒常性を維持する必要がある。その維持の破綻が炎症性腸疾患や大腸癌などの疾患と密接に関与

することが示されているが、幹細胞の維持、制御機構の解明がこれらの病態を理解する上で最も重要な位置づけになると思われる。今後正常幹細胞のみならず、疾患での幹細胞制御破綻の解明が望まれる。

著者のCOI(conflicts of interest)開示：土屋輝一郎：寄付講座(旭化成クラレメディカル，味の素製薬，アステラス製薬，アボットジャパン，エーザイ，大塚製薬，杏林製薬，協和発酵キリン，JIMRO，ゼリア新薬工業，田辺三菱製薬，ユーシービージャパン)

文 献

- 1) Iwasaki M, et al: Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of Hath1 and Klf4. *J Gastroenterol* 46: 191-202, 2011.
- 2) Yang Q, et al: Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294: 2155-2158, 2001.
- 3) Okamoto R, et al: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G23-35, 2009.
- 4) Zheng X, et al: Suppression of hath1 gene expression directly regulated by hes1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17: 2251-2260, 2011.
- 5) Tsuchiya K, et al: Reciprocal targeting of Hath1 and beta-catenin by Wnt glycogen synthase kinase 3beta in human colon cancer. *Gastroenterology* 132: 208-220, 2007.
- 6) Sato T, et al: Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262-265, 2009.
- 7) Yui S, et al: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5⁺ stem cell. *Nat Med* 18: 618-623, 2012.
- 8) Buczacki SJ, et al: Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature* 495: 65-69, 2013.
- 9) Snippert HJ, et al: Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 143: 134-144, 2010.
- 10) Schepers AG, et al: Lineage tracing reveals Lgr5⁺ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 337: 730-735, 2012.
- 11) Kano Y, et al: The acquisition of malignant potential in colon cancer is regulated by the stabilization of Atonal homolog 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 432: 175-181, 2013.