

粘膜-神経接合を介した消化管恒常性・発癌制御機構の解明と治療応用

東京大学 消化器内科

早河 翼

本検討では、消化管上皮細胞の一つである Tuft 細胞に着目し、消化管再生過程および発癌における Tuft 細胞と神経シグナルとの相互作用と粘膜恒常性制御機能を解明することを目的とした。

消化管上皮中の成熟 Tuft 細胞は、管腔からの刺激センサーとしての役割を果たす一方で、炎症再生や腫瘍発生過程で増殖し、様々な機序で再生・発癌を促進する作用を持つ。一つの機序として Cox2 や IL25 などの炎症惹起物質を分泌し、炎症免疫応答を介して上皮の細胞増殖に関与している可能性が指摘されている。一方、Tuft 細胞の一部は ChAT、Trpm5 などの神経関連マーカーを発現し、上皮内で神経細胞と類似した働きを持つ。さらに、腸内神経叢神経線維の一部は Tuft 細胞と直接結合しており（図 1）、Tuft 細胞と神経細胞が相互に刺激を伝達しながら、幹細胞のニッチ形成細胞として幹細胞機能と消化管恒常性に寄与しているとされる。

さらに特定の状況下では自らが脱分化して分裂・進展を生じ、幹細胞様の役割を果たす。この過程において、急性/慢性の炎症シグナルと特定の遺伝子変異が協調して Tuft 細胞の脱分化を生じさせると考えられているが、詳細なメカニズムは明らかでない（図 2）。即ち、Tuft 細胞は消化管恒常性及び発癌の制御において、傍分泌的に幹細胞を支持する間接的な機能と自ら幹細胞化する直接的な機能の二元的機能を有しており、網羅的かつ立体的な理解が必要であると考えられた。

申請者はまず、Tuft細胞を選択的に標識でき、かつアブレーションが可能なマウスとしてDclk1-DTR-ZSgreenマウスを作製した（図3）。このマウスでは、Dclk1を発現するTuft細胞特異的にジフテリア毒素受容体（DTR）と蛍光蛋白であるZSgreenが発現する。発現は蛍光顕微鏡により容易に確認可能であり、マクロ・ミクロでの観察で遺伝子の良好な発現を確認できた。また、本マウスにジフテリア毒素（DT）を投与することにより、Tuft細胞を選択的にアポトーシスを惹起することが可能であり、結果としてTuft細胞の選択的アブレーションを行うことができる。

まず、本マウスの胃組織からFACSによってZSgreen陽性Tuft細胞をSortし、そこからRNAを抽出して遺伝子発現網羅解析（RNAseq）を行った。対照グループとして同様にSortしたMist1陽性胃前庭部幹細胞から抽出したRNAと、胃前庭部組織全体から抽出したRNAを用いて比較を行った（図4）。その結果、Tuft細胞ではCox1/2

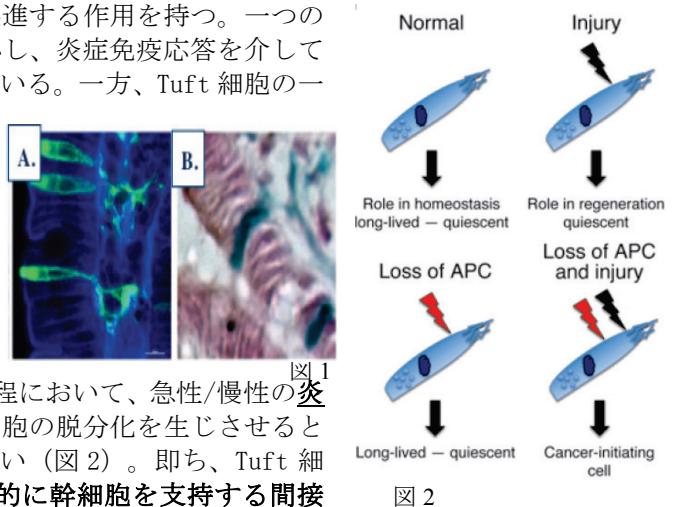


図 2

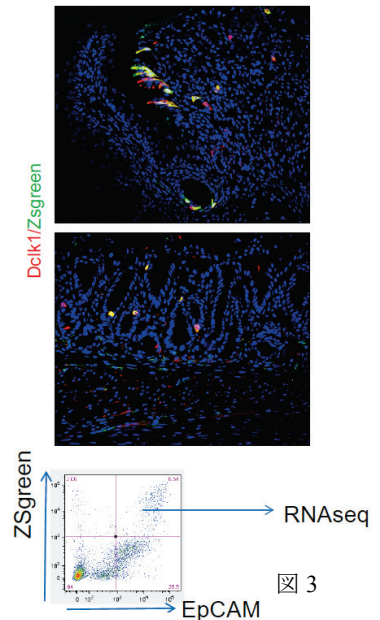
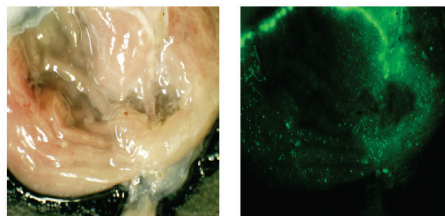


図 3

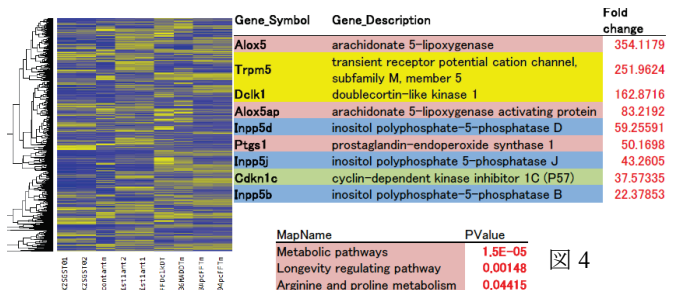


図 4

遺伝子の他、多くのアラキドン酸カスケード関連遺伝子群の高発現を認め、神経関連遺伝子群の発現上昇を認め、両経路を通じて幹細胞や腫瘍細胞の活性を制御している可能性が考えられた。これまでの報告でCox/PG経路は消化管幹細胞に維持・活性化に重要であると報告されており、また我々を含む複数のグループが神経シグナルによる幹細胞制御機構を報告しており、これらの幹細胞制御機構にTuft細胞が一翼を担っている可能性が示された。

それに加え、Tuft細胞ではイノシトールリン脂質代謝経路を構成する複数のイノシトールポリリン酸5-フォスファターゼ (IP5Pase) と、細胞周期を負に制御するCdkn1c (p57) が高発現していることが分かった。IP5Paseはイノシトールリン脂質のリン酸化によって、PI3K/Akt経路を抑制する機能があることが報告されている。PI3K/Akt経路は細胞周期を亢進させる働きがあることから、IP5Paseとp57はともに細胞周期を負に制御して細胞周期静止状態に関与している可能性が考えられる。実際、Tuft細胞は細胞分裂を行わず、かつ極めて長期の生存サイクルを持つことから、これらの遺伝子の発現によって細胞周期静止状態・長期安定状態を保っている可能性がある。さらに、Dcl1k1-CreERTマウス及びTFF1-Creマウスを用いてTuft細胞に腫瘍遺伝子変異 (Apc、PTEN) を導入してみると、ApcやPTENを欠損した後も細胞周期静止状態を保っていることがわかった。これらの細胞は遺伝子変異に関わらず、そのエフェクター分子の活性が阻害されていた。すなわち、Apc欠損Tuft細胞では通常起こるはずのbeta-cateninの核移行が生じず、またPTEN欠損Tuft細胞では通常起こるはずのAktリン酸化が生じていなかった (図5)。これらの結果から、定常状態のTuft細胞に腫瘍遺伝子変異が生じて、それ自体が癌幹細胞化することはないことを示唆する。実際、Dcl1k1-CreERTマウスにKras、Apc、p53等の変異を導入しても腫瘍発生は見られなかった。にも関わらず、以前の検討でTuft細胞にApc遺伝子変異を生じさせた状態で (Dcl1k1-CreERT; ApcF/F) DSS腸炎を惹起させると大腸癌が発生したことから、炎症によってTuft細胞の細胞周期静止状態が解除され、幹細胞化を引き起こすメカニズムが想定され、その過程でIP5Paseとp57が関与する可能性を考えている。今後、p57floxマウスやIP5Pase阻害剤の投与実験などを行い、Tuft細胞の幹細胞化メカニズムを検証する予定としている。

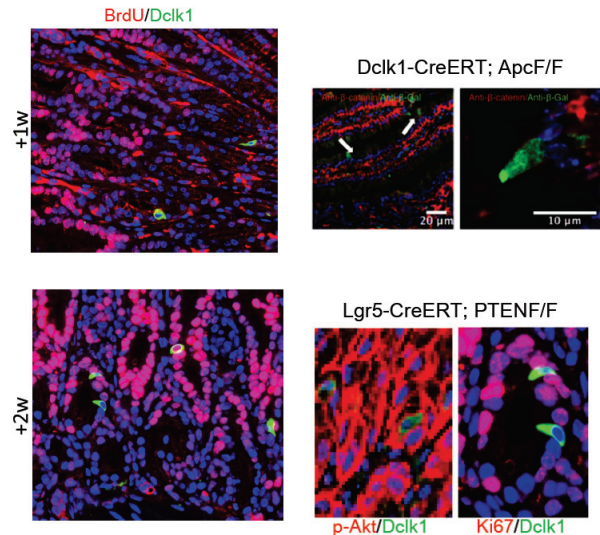


図 5

これらの細胞は遺伝子変異に関わらず、そのエフェクター分子の活性が阻害されていた。すなわち、Apc欠損Tuft細胞では通常起こるはずのbeta-cateninの核移行が生じず、またPTEN

次に、Tuft細胞の機能を in vivo で解析するため、Dcl1k1-DTR-ZSgreenマウスにDT投与を行ったところ、正常状態ではTuft細胞の消失を認めたほかは、各消化管に組織学的な大きな変化を認めなかった (図6)。そこで、粘膜障害・再生条件下でのTuft細胞の機能を解析するため、急性胃粘膜障害を引き起こす高容量タモキシフェン投与モデルによる検討を行った。高容量タモキシフェン投与は胃粘膜中の壁細胞の破壊を中心とする粘膜障害および腸上皮化生様変化、細胞増殖亢進などを引き起こす。通常高容量タモキシフェンによる障害は1週間程度で再生され、正常状態へと回復する。しかし、本モデルにTuft細胞アブレーションを追加したところ、驚くべきことに粘膜障害が増悪し、再生が著しく阻害された。これは、Tuft細胞が粘膜障害からの再生過程でより重要な働きを持つことを示唆している (図7)。

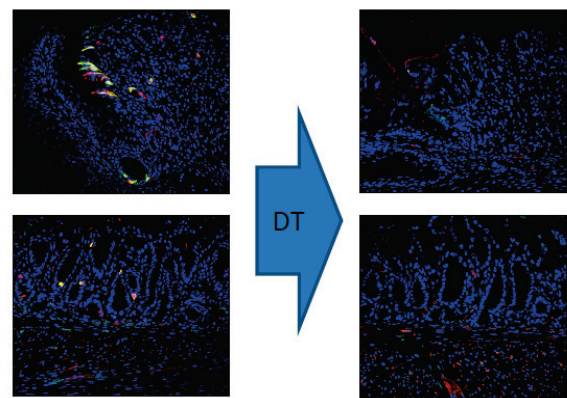
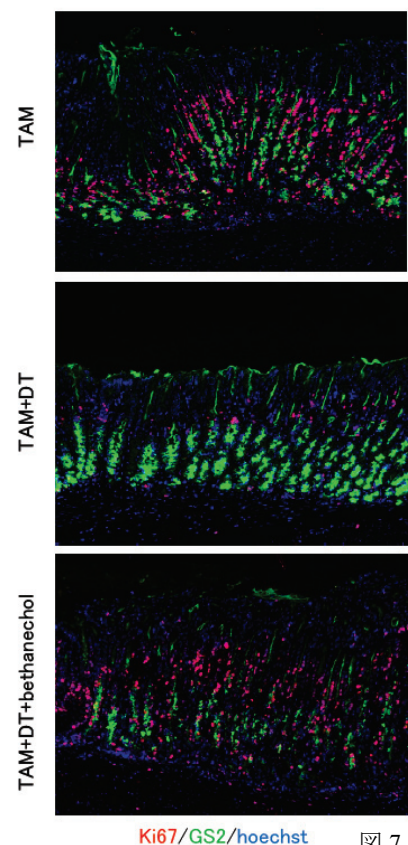


図 6

これまでのRNAseqおよびChAT-GFPマウス (アセチルコリン産生細胞をGFPで標識するマウス) の検討により、Tuft細胞がアセチルコリンを分泌して神経細胞類似の働きをもっている可能性が示唆されている。そこで、高容量タモキシフェンモデルにおけるTuft細胞の働きがアセチルコリン依存的なものである可能性を考え、タモキシフェン+Tuft細胞アブレーションに加えてムスカリン性アセチルコリンアゴニストであるベタネコールを投与する実験を行った。すると、Tuft細胞アブレーションによって阻害されていた細胞増殖・粘膜再生がほぼアブレーション無しの状態にまで回復したことから、胃粘膜再生におけるTuft細胞の粘膜再生亢進作用はアセチルコリン依存的であることが示唆された。実際、ムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストであるスコポラミンの投与によってタモキシフェン投与モデルにおけ



Ki67/GS2/hoechst

図 7

る粘膜障害が増悪したことから、胃粘膜の恒常性におけるアセチルコリンシグナルの重要性が示唆される。

次に、胃粘膜におけるアセチルコリンの受容体の発現を検討した。遺伝子発現解析の結果、5種類あるムスカリン性アセチルコリン受容体のうち、胃粘膜ではムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ3 (CHRM3) が最も高発現していることが分かったため、CHRM3のin situ hybridizationを施行した。結果前庭部と体部で発現パターンの違いがあり、前庭部では幹細胞の存在する腺管底部付近で高発現する一方、体部では主に胃壁細胞に発現を認めた。胃壁細胞はコリン作動性の迷走神経刺激に応じて胃酸を分泌する役割を担っており、壁細胞優位のCHRM3発現は合理的であった。

タモキシフェン投与モデルにおける粘膜障害は体部優位に生じるため、タモキシフェン投与後の体部におけるCHRM3発現パターンを解析した。すると、障害によってCHRM3陽性壁細胞が消失する一方で、もともとCHRM3を発現していない幹細胞領域にCHRM3の発現を認めるようになった。Tuft細胞は障害再生過程において幹細胞領域に増生する。すなわち、増生したTuft細胞がアセチルコリンを分泌し、その受容体CHRM3を発現するようになった胃体部幹細胞を刺激・活性化することで、粘膜再生を促進していることが示唆された。この過程において、壁細胞・主細胞・副細胞などの成熟分化細胞はTuft細胞のアブレーションによって影響を受けなかったことから、Tuft細胞は幹細胞または前駆細胞に直接的に働きかけているものと考えられる。

次に、胃腫瘍形成過程におけるTuft細胞の働きを解析するため、Apc欠損型の腫瘍を形成するMist1-CreERT; ApcF/Fマウスを用いてTuft細胞アブレーションの影響を検討した。ZSgreenの発現分布を組織透明化後の三次元画像解析によって探索したところ、Tuft細胞は主に腫瘍基部に散在していることが分かった。正常組織ではTuft細胞アブレーション単独では細胞増殖や病理像に大きな変化を認めないものの、腫瘍組織においてはTuft細胞アブレーションにより腫瘍全体の著しい細胞増殖の低下が認められた(図8)。

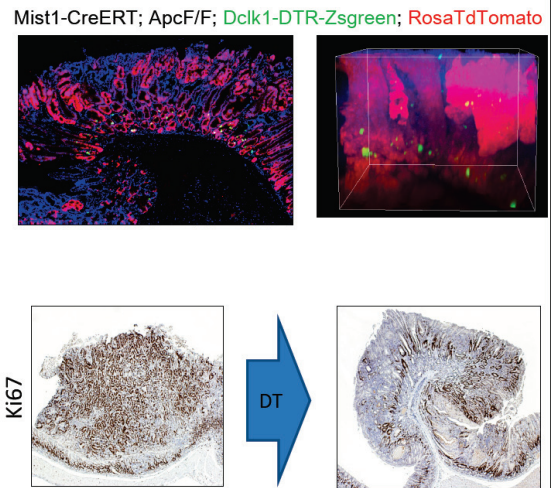
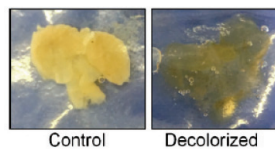


図 8

In situ hybridizationの結果、本胃腫瘍内ではCHRM3が腫瘍全体に高発現していることが分かり、Tuft細胞から産生されたアセチルコリンがCHRM3腫瘍細胞の細胞増殖を促進させている可能性が示唆される。

本腫瘍のTuft細胞アブレーション前後の網羅的遺伝子発現解析を施行したところ、アブレーションによって幹細胞マーカーであるLgr5の低下、また、腸上皮化生マーカーであるCDXや他の腸上皮特異的マーカーの上昇を認めた。この変化は、CHRM3遺伝子を同時にノックアウトした腫瘍 (Mist1-CreERT; ApcF/F; CHRM3F/Fマウス) と Mist1-CreERT; ApcF/Fマウスの腫瘍を遺伝子発現解析で比較した時と同様であり、あらためてTuft細胞の機能がアセチルコリン・CHRM3依存的であることが示唆された。

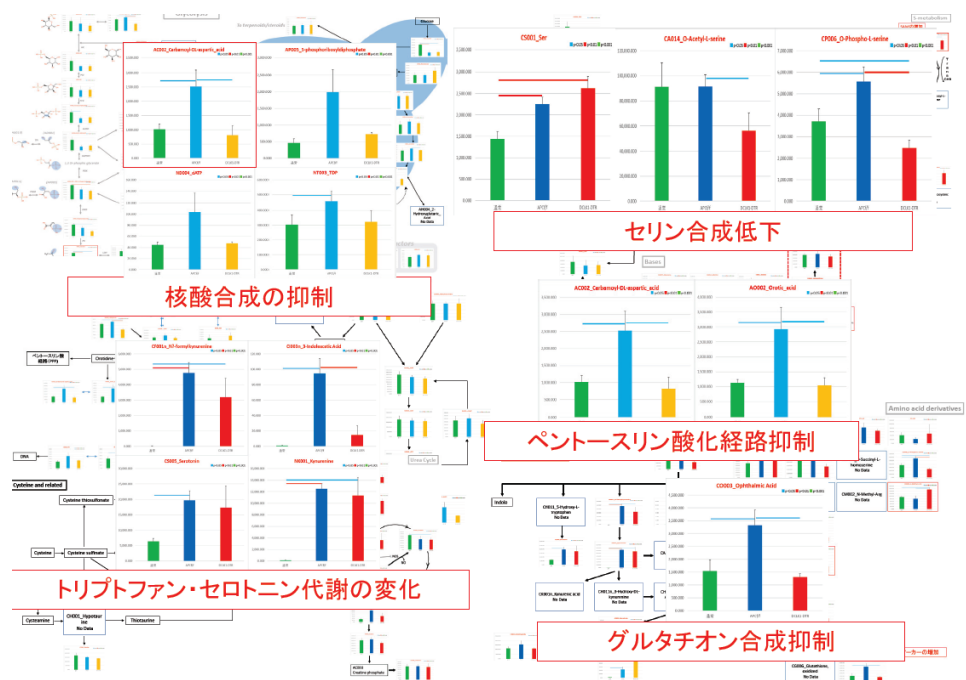


図 9

最後に、アブレーション前後の腫瘍組織検体を用いてメタボローム解析を施行した。その結果、アブレーションによってセリン・トリプトファン合成経路の抑制、核酸合成の低下、グルタミン酸合成経路の抑制が認められ、こうした代謝変化がCHRM3経路の低下によって引き起こされることで、最終的に細胞増殖の低下につながっているものと想定される(図9)。

以上の検討により、Tuft細胞は消化管粘膜の恒常性、および発癌に深く関与しており、Tuft細胞の働きを制御することや、選択的に標的とすることで消化管疾患の新規治療に結びつけることができる可能性を提示できた。