

胃を構成する細胞の空間情報を含めたアトラスの作成 ——新たな上皮幹細胞マーカーや腸上皮化生に関わる線維芽細胞の同定——

発表のポイント

- ◆大規模な胃粘膜のシングルセル RNA-seq、空間遺伝子発現解析を行うことで、胃を構成する細胞の空間情報を含めた遺伝子発現プロファイルを明らかにしました。
- ◆上皮細胞の新たな幹細胞マーカーとして LEFTY1 を同定し、腸上皮化生に先行して増加する線維芽細胞 (PDGFRA・BMP4・WNT5A 陽性) の亜集団を明らかにしました。
- ◆胃の幹細胞のマーカーや腸上皮化生に関連する線維芽細胞が明らかになったことで、胃粘膜の恒常性や胃がんの発生の原因究明の研究への応用が期待されます。

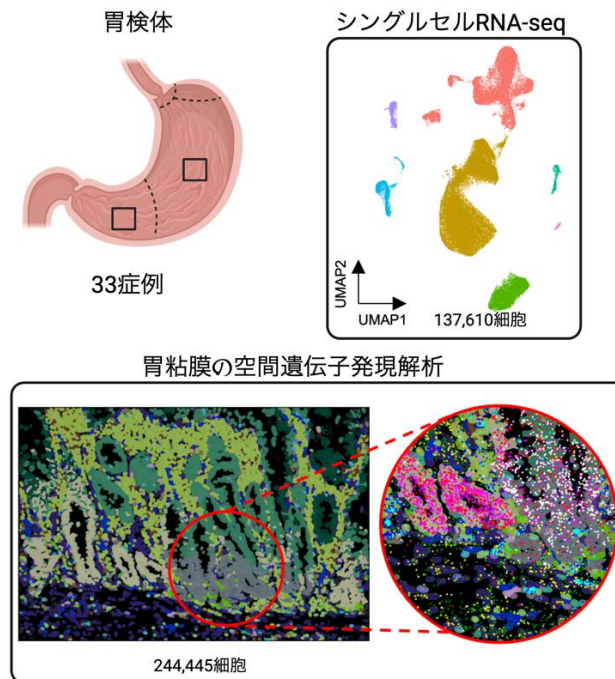


図 1: 胃のシングルセル RNA-seq 及び空間遺伝子発現解析

発表概要

東京大学大学院医学系研究科 衛生学分野の坪坂歩 大学院生、石川俊平 教授らの研究グループは、人体病理学・病理診断学分野の牛久哲男 教授、消化管外科学の瀬戸泰之 教授らのグループとともに、ヒトの胃の 137,610 細胞のシングルセル RNA-seq (注 1) 及び 244,445 細胞の空間遺伝子発現解析 (注 2) を行いました (図 1)。上皮細胞のシングルセル RNA-seq 解析では、正常な胃粘膜および腸上皮化生 (注 3) に共通する上皮細胞の幹細胞 (注 4) マーカーとして新たに LEFTY1 を同定しました。線維芽細胞の解析では、腸上皮化生の上皮性変化に先行して、線維芽細胞の亜集団 (PDGFRA・BMP4・WNT5A 陽性線維芽細胞) が増加することを明らかにしました。空間遺伝子発現解析では、シングルセル RNA-seq で同定された細胞の組織内局在を明らかにす

ることにより、腸上皮化生上皮細胞と PDGFRA・BMP4・WNT5A 陽性線維芽細胞が強く相互作用していることを明らかにしました。

今回の結果から、胃上皮のホメオスタシス(注 5)の研究や胃がんの発生の研究に繋がる可能性が期待されます。本研究成果は、米科学誌『Cell Reports』に 2023 年 10 月 10 日に公開されました。

発表内容

〈研究の背景〉

消化管の中でも胃は、食物の一過性の貯蔵・胃酸分泌・粘液分泌・消化ホルモン分泌など多彩な役割を持ち、小腸や大腸と比較して構成される細胞が多様です。そのため、胃粘膜上皮における幹細胞の同定や、細胞分化・ホメオスタシスについて、また前癌病変とされる腸上皮化生に至る詳細な過程の全貌は、未だ明らかにされておりません。

近年、1 細胞単位でそれぞれの細胞の発現パターンを明らかにするシングルセル RNA-seq が盛んに行われており、多様な細胞種の同定に始まり、その幹細胞性や分化段階を推測することや、各細胞間の相互作用を理解することにも役立っています。しかし、これまで世界的な正常細胞のシングルセル RNA-seq のデータベース (Human Cell Atlas (<https://www.humancellatlas.org/>)) には、胃のデータはほとんど含まれておりませんでした。また、シングルセル RNA-seq の欠点として、得られた細胞が組織内でどこに存在しているのか、という空間的な情報が失われてしまうことが挙げられるため、組織上で遺伝子の発現プロファイルを同定する空間遺伝子発現解析技術が、新たに開発されてきました。

これらを踏まえて、胃の各細胞の遺伝子発現プロファイルを 1 細胞単位で明らかにし、それぞれの相互作用を空間的に明らかにすることは、胃のホメオスタシスを理解したり、胃がんを始めとした様々な疾患のメカニズムや発症機序を明らかにしたりするために重要と考えられます。

〈研究の内容〉

本研究ではまず、東京大学医学部附属病院で外科的胃切除術を施行された 15 症例の正常胃組織についてシングルセル RNA-seq を行い、さらに公開データベースに登録された 17 症例のシングルセル RNA-seq のデータを統合して、合計 32 症例から 137,610 細胞の解析を行いました。そして、胃を構成する主要な細胞種である上皮細胞、線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞を同定し、特に上皮細胞・線維芽細胞について詳しい解析を行いました。

上皮細胞の解析では既知の細胞種を同定したのちに、trajectory 解析(注 6)を行ったところ、正常な胃の上皮細胞と腸上皮化生の細胞との間をつなぐ“Linking cell”が存在していました(図 2)。この細胞集団は、遺伝子発現パターンの解析結果から他の細胞よりも幹細胞性が高いと示唆され、特徴的に LEFTY1 遺伝子を発現していました。これまで、胃の幹細胞マーカーとして LGR5 や CD44 といった遺伝子が知られていましたが、“Linking cell”においては LEFTY1 の方がより特異的に発現しており、LEFTY1 は新たな幹細胞マーカーとして有意義であると考えられました。さらに、LEFTY1 陽性細胞の機能を調べるため、LEFTY1 レポーターマウス (*LEFTY1-CreERT2; Rosa26-tdTomato*) を用いた細胞系譜追跡解析(注 7)を行ったところ、薬剤性に胃粘膜障害を誘導した胃粘膜では、LEFTY1 陽性細胞が再生上皮細胞を生み出しており、幹細胞もしくは前駆細胞として働くことを示しました。このように、データ駆動型研究で幹細胞マーカーを新規に同定することに成功した研究はこれまでにほとんど報告されておらず、本研究の解析手法が非常に的確であったと考えられます。

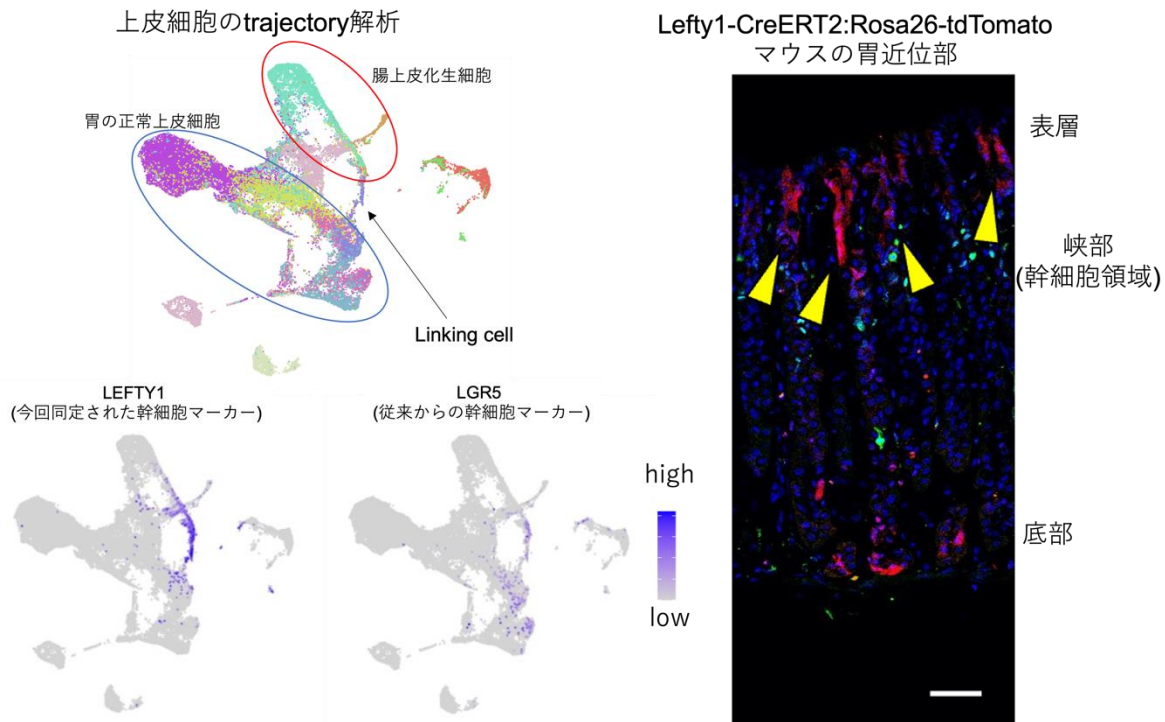


図 2：上皮細胞の解析及び細胞系譜追跡解析

(左図) trajectory 解析の結果。上皮細胞の trajectory 解析では青色の円で囲まれた正常上皮細胞と赤色の円で囲まれた腸上皮化生細胞の間に存在する“Linking cell”に着目した。“Linking cell”では今回同定された LEFTY1 遺伝子の発現が、LGR5 よりもより特異的に、強く発現していることがわかる。(右図) 細胞系譜追跡解析の結果。tdTomato 陽性の赤色の細胞が表層に向けて置き換わっている様子が観察された。

線維芽細胞の解析では、特徴的な遺伝子発現のパターンから 6 種類の亜集団を同定しました(図 3、左)。線維芽細胞の亜集団と腸上皮化生の関連を調べたところ、特に PDGFRA・BMP4・WNT5A 陽性線維芽細胞の増加が、胃上皮細胞の腸上皮化に先行して生じていることが明らかになりました(図 3、右)。また、小腸・大腸のシングルセル RNA-seq データベースである Gut Cell Atlas (<https://www.gutcellatlas.org/>)と比較すると、胃の線維芽細胞では特異的に BARX1 や TRPA1 という遺伝子が発現していることがわかり、これらの発現は腸上皮化生に移行しても維持されていました。この結果から、腸上皮化生の成り立ちには胃特異的な線維芽細胞の役割が非常に大きいことが想定されます。

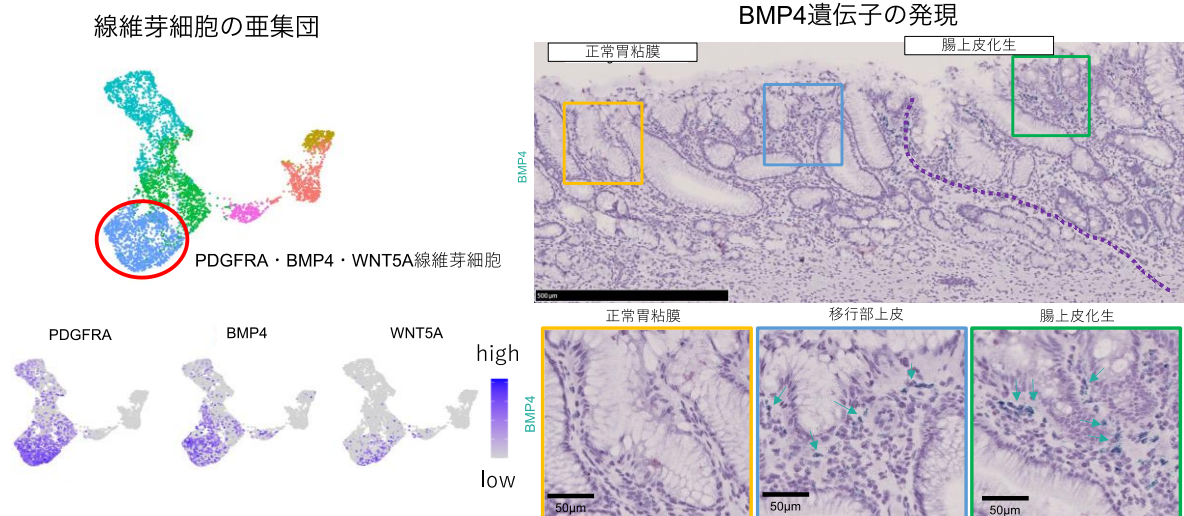


図 3：線維芽細胞の解析及び BMP4 の発現と腸上皮化生の関連性

(左図) 線維芽細胞の亜集団と重要遺伝子の発現。赤い円で囲まれた集団で PDGFRA・BMP4・WNT5A が特異的に発現していた。(右図) RNA in situ hybridization(注 8)による BMP4 の発現。BMP4 の発現は腸上皮化生で多く、腸上皮化生から遠ざかると発現が小さくなることがわかった。

次に、胃粘膜組織において 1 細胞レベルの解像度で空間遺伝子発現解析を行い、シングルセル RNA-seq で同定した各細胞が、組織内でどこに存在するのかを明らかにしました(図 4)。その中でも、粘膜深層は正常胃上皮細胞が保たれていても、表層は腸上皮化生細胞へ変化している組織(不完全型腸上皮化生)において、その移行部で幹細胞マーカーとして同定された LEFTY1 が部分的に過剰発現していました。すなわち、腸上皮化生の発生素地には、LEFTY1 陽性細胞の増殖が関与していることが示唆されました。また、各細胞間の距離を定量的に評価したところ、腸上皮化生領域表層に特異的に、上述した PDGFRA・BMP4・WNT5A 陽性線維芽細胞が増加していることが確認されました。さらに腸上皮化生上皮と PDGFRA・BMP4・WNT5A 陽性線維芽細胞の相互作用についてリガンド・レセプター解析(注 9)を行い、細胞増殖・分化に関わる NRG1-ERBB3 シグナルや WNT5A-FZD5 シグナルが重要であることがわかりました。

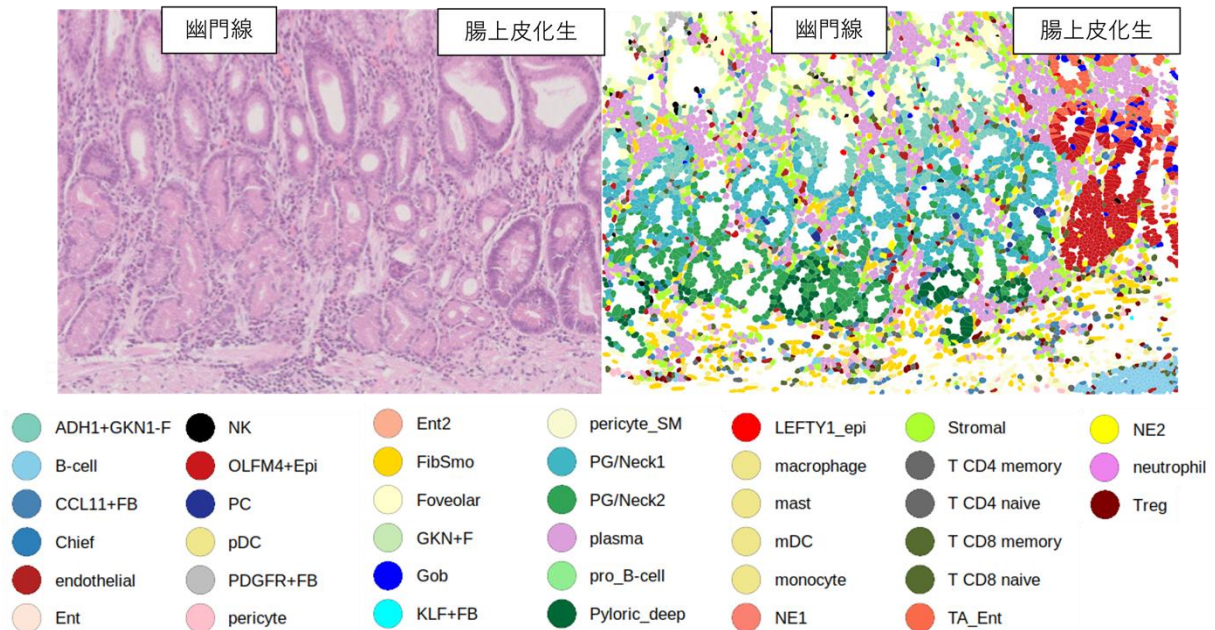


図 4：空間遺伝子発現解析による細胞の同定

(左図) 対応する Hematoxylin & Eosin 染色。(右図) シングルセル RNA-seq で同定された細胞の分布。

〈今後の展望〉

本研究では、大規模なシングルセル RNA-seq・空間遺伝子発現解析によって、新たな胃の上皮幹細胞の特徴や、腸上皮化生と線維芽細胞の相互作用が解明されました。この網羅的なデータは、胃の分化・ホメオスタシスから、炎症性変化を経て発癌に至るまで、我々の理解を深める礎となると考えられます。今後は、さらに詳細な病態解明および、予防・治療へ向けた研究への応用が期待されます。

発表者

東京大学大学院医学系研究科

衛生学分野

石川 俊平 (教授)

坪坂 歩 (博士課程)

人体病理学・病理診断学分野

牛久 哲男 (教授)

消化管外科学分野

瀬戸 泰之 (教授)

論文情報

- 〈雑誌〉 Cell Reports
〈題名〉 Stomach Encyclopedia: Combined Single-Cell and Spatial Transcriptomics Reveal Cell Diversity and Homeostatic Regulation of Human Stomach
〈著者〉 Ayumu Tsubosaka, Daisuke Komura, Miwako Kakiuchi, Hiroto Katoh, Takumi Onoyama, Asami Yamamoto, Hiroyuki Abe, Yasuyuki Seto, Tetsuo Ushiku, Shumpei Ishikawa*
(*は責任著者)
〈DOI〉 10.1016/j.celrep.2023.113236
〈URL〉 [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(23\)01248-2](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(23)01248-2)

研究助成

本研究は、科研費「組織空間とゲノム情報の定量的統合による胃癌多様性の新しい定義（課題番号：22H04990）」、「硫酸化糖鎖がん抗原と免疫ゲノム科学を基軸とした液性腫瘍免疫の本態解析と治療応用（課題番号：19H01032）」、次世代がん医療加速化研究事業（AMED-P-PROMOTE）「胃癌のゲノム病理情報の統合による診断・治療体系の開発（課題番号：JP23ama221502 研究代表者：石川俊平）」の支援により実施されました。

用語解説

（注1）シングルセル RNA-seq

1細胞ごとに遺伝子発現データを取得する手法。

（注2）空間遺伝子発現解析

組織の位置情報を保ったまま、遺伝子の発現データを取得する手法。

（注3）腸上皮化生

正常な胃粘膜に存在しない、小腸や大腸の粘膜を模倣した上皮細胞が胃に存在する状態。ピロリ菌などの慢性炎症により生じ、胃癌の前がん病変として知られている。

（注4）幹細胞

同じ種類の細胞を自己複製しつつ、別の種類の細胞にも分化する能力を持つ細胞。ここでは胃の上皮細胞を生み出す元となる細胞を示す。

（注5）ホメオスタシス

生体恒常性。外部からの刺激や内部の変化にかかわらず、状態を一定に維持しようとする働き。

（注6）trajectory 解析

遺伝子発現パターンの類似性から細胞の分化経路を推定する手法。

（注7）細胞系譜追跡解析

特定の細胞を蛍光タンパク質などで標識し、それらの細胞動態を追跡する実験。

（注8）RNA in situ hybridization

細胞内に存在する RNA の局在を明らかにする手法。

（注9）リガンド・レセプター解析

リガンドとは生体分子（レセプター）と結合して特定の生物学的目的を果たす物質のこと。シングルセル RNA-seq 解析や空間遺伝子発現解析はリガンドとレセプターの発現パターンから、細胞同士の相互作用を推定している。

問合せ先

〈研究に関する問合せ〉

東京大学大学院医学系研究科 衛生学分野

教授 石川 俊平 (いしかわ しゅんぺい)

Tel : 03-5841-3434 E-mail : ishum-prm@m.u-tokyo.ac.jp

〈報道に関する問合せ〉

東京大学大学院医学系研究科 総務チーム

Tel : 03-5841-3304 E-mail : ishomu@m.u-tokyo.ac.jp