

胃粘膜における Lgr5陽性幹細胞

信州大学医学部病態解析診断学講座

上原 剛

I はじめに

胃癌や大腸癌など消化管由来の癌は、日本において罹患率の高い代表的な悪性腫瘍である。これらは予後不良となることがしばしばあり、その原因は進行してからの発見や、決定的な腫瘍マーカーがないことなどによるとされている。治療方法も進行癌や転移例では限られている。治療効果が得られない理由の1つに cancer stem cells (CSC) の存在が挙げられる。この説によれば、癌は多くのヘテロな細胞群からなり、CSC は癌細胞の増殖や転移に関与しており、化学療法抵抗性であるとされている。この CSC モデルは広く受け入れられつつあるが、実際のところヒトにおいては有用な幹細胞マーカーの同定は難航していた。しかし近年になって stem cell 同定の新たな手法によって、Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 (Lgr5) は毛胞、小腸、大腸および胃における幹細胞として同定された¹⁾²⁾。Lgr5は大腸癌培養細胞などで Wnt のターゲット遺伝子であることが確認されている。また Lgr5は胃癌組織での存在も報告されている³⁾。この新しい幹細胞マーカーである Lgr5について、胃粘膜および胃癌での局在や特性について簡単に解説を加えたい。

II 胃幹細胞としての Lgr5 陽性幹細胞

胃粘膜と腸粘膜の上皮は多くの点で同じ特徴を有している。それは組織構築の類似性のみならず、規則的な自己複製も共通点の1つであり、その自己複製は多くは epithelial pockets に存在する成体幹細胞によって制御されている。胃粘膜において epithelial pockets はそれぞれの管状腺内に存在している。各々の腺は頸部、峽部、腺体部、腺底部にさらに分類される。ヒトの胃粘膜は大きく分けて幽門腺領域と体部腺(あるいは胃底腺)領域の2つの部位に分けられ、それぞれの部位における細胞構成や構造、細胞のターンオーバーは異なっている。Bjerknes と Cheng⁴⁾は胃

の固有腺での多分化能成体幹細胞の存在を明らかにしたが、それらの正体を明らかにすることはできなかった。一方で以前から胃小窩の下方、つまり峽部が胃粘膜細胞の増殖の場であることが知られていた。峽部に embryonic stem cells (ES 細胞) に似ている未熟な顆粒のない細胞が発見されて以降、峽部が成人胃幹細胞の存在部位ではないかという推測がされるようになった。しかし峽部における幹細胞の特異的なマーカーはなく、胃における幹細胞同定の実証を妨げていた。

Barker らはマウス胃において lineage tracing という手法を用いて、幽門腺の底部に存在する N/C 比が高く細胞小器官の乏しい未熟な Lgr5陽性細胞は長寿であり、日々の上皮再生に関与している多分化能成体幹細胞として機能することを見事に証明した(図1 A, B)²⁾。これによって胃における幹細胞は峽部に存在するという説は一転して疑問視されるようになった。この Lgr5陽性細胞は、新生児マウス胃において体部と幽門腺の底部に認められるが、成体マウスでは幽門腺の底部にしか存在していない。また幹細胞は静止しているという一般の概念とは対照的に、Lgr5陽性細胞は増殖スピードが速く短時間で胃の腺を作り上げることができ、*in vitro* において1個の Lgr5陽性細胞は、幽門領域に類似した構築と細胞性質を有する自己複製胃粘膜上皮を部分的に作成することが可能である³⁾。Lgr5陽性幹細胞の mRNA 解析で認められた発現遺伝子の多くは CD44, Sox9, Sord, Prss23, Sp5 を含む Wnt 標的遺伝子で、幽門腺底部での Wnt シグナル活性の存在を表していた³⁾。一方で Chromogranin A&B, Somatostatin, Gastrin G を含む、いくつかの神経内分泌細胞関連の遺伝子は、Lgr5娘細胞では上方抑制されており神経内分泌細胞へ分化を意味するものと思われた。

III 胃癌の Lgr5 陽性胃癌幹細胞

胃癌発癌や進行の根底にある遺伝的な変化は大腸癌ほどには、はっきりしていない。しかし Wnt シグナ

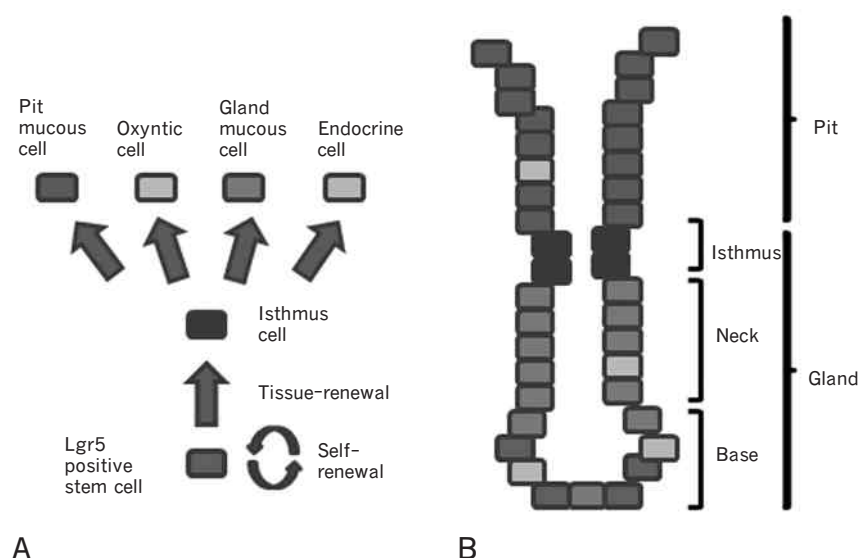


図1 マウス幽門における Lgr5陽性細胞の分布と構成細胞の関係
 A：Lgr5陽性幹細胞のフローチャート。Lgr5陽性幹細胞は、自己再生を繰り返しながら、幽門を構成する他の細胞を作り出している。
 B：幽門の構造。増殖 Lgr5陽性幹細胞は幽門の腺底部に位置している。

ル経路の異常な活性化が、幽門発生の胃癌の一部で生じることは、すでにいくつかの論文で十分に裏付けられている。実際、APC 突然変異を有しているマウスとヒトには大腸癌に加えて胃癌の発生もみられる。胃幽門部における Lgr5陽性幹細胞集団の発見は、*in vivo* において Wnt 関連胃癌への胃幹細胞の関与について直接的な評価を可能にした。APC 遺伝子の欠損のマウスを用いると、Lgr5陽性幹細胞に必須の Wnt シグナル遺伝子は結果的に β -カテニンの上方制御をもたらし、2-3weeks 以内にこれらの Lgr5陽性幹細胞は腺腫を形成する。つまり Lgr5陽性幹細胞は発癌性を有しているのである。しかしこの作用は Lgr5陽性幹細胞の存在しない胃体部では確認できなかった。この研究は Lgr5陽性幹細胞が Wnt 関連胃癌の起源となりうる可能性を持った細胞であることを証明した。しかし Wnt と関連のない腫瘍発生への Lgr5陽性幹細胞の関与については未だ不明のままである。一方で胃癌の発育速度やリンパ節転移と、腫瘍の中心部や浸潤フロントでの Lgr5陽性細胞の分布が相関するとの報告がある³⁾。Lgr5陽性細胞を有する胃癌症例は Lgr5陽性細胞を持たない群より median survival time が短い。また食道、胃、大腸、肝臓、膵臓において、腫瘍部では非腫瘍部に比べて Lgr5陽性細胞が多く、また mRNA のレベルが高い³⁾。マウスやヒトでの実験結果から当初考えられていた以上に胃幹細胞は、はるかに移動性があり、位置に制限されないことが実証された。そのうえ Lgr5陽性胃癌幹細胞は粘膜の

様々な方向へ浸潤増殖することができ、Lgr5陽性胃癌幹細胞が胃癌の発達と進行に重要なことを示唆していた。さらなる興味は胃癌の原因とされている *Helicobacter pylori* 感染症において、Lgr5陽性幹細胞が胃癌にどのような役割を果たしているのかである。我々はヒト胃癌症例の背景幽門粘膜を用いて、*H. pylori* 感染例では Lgr5陽性幹細胞の DNA 損傷度が非 Lgr5陽性細胞に比較して有意に高いことを報告した⁵⁾。これは *Helicobacter pylori* 感染が胃幹細胞をより障害しやすく、発癌につながる可能性を秘めていることを示している。

IV 他の胃幹細胞との関連

Lgr5陽性幹細胞が幽部門のみで確認されていることからわかるように、胃における幹細胞マーカーは一種類ではない。Lineage tracing によって今までいくつかの胃幹細胞と目されるマーカーが報告されている。胃幽門においても Lgr5陽性幹細胞の以外に Villin promoter 陽性幹細胞が報告されている³⁾。もともと Villin はアクチン結合タンパク質で腸上皮の刷子縁に発現している。Villin は微絨毛の形態形成において鍵となる役割を演じている。Villin は腸には高度に発現しているが、胃上皮細胞では広範囲にわたって発現を欠く。Villin-promoter 陽性幹細胞は lineage tracing によってマウスの胃上皮で発見された。Villin-promoter 陽性幹細胞は通常静止しており、峽部の下方、幽門腺の底部から3番目の部分にあるとされた。これ

ら Villin-promoter 陽性幹細胞は、胃小窩（粘液を分泌する腺細胞）、内分泌細胞と壁細胞を含む幽門部の複数の系統に分化した。しかし内因性 Villin タンパク質そのものの発現は、おそらく遺伝子構造破壊のため、これらのマウスの胃上皮で観察されない。したがって、活動期や静止期にある Villin-promoter 陽性幹細胞集団の正確な把握は難しい。また Lgr5陽性幹細胞と同様に Villin-promoter 陽性幹細胞の集団は体部に認められない。多くの類似点のある Lgr5陽性幹細胞と Villin-promoter 陽性幹細胞であるが、相違点も多数あり両者の関連については今後の解明が待たれるところである。

体部においては Trefoil factor 2 (TFF2) mRNA 陽性幹細胞が lineage tracing によって胃幹細胞であると報告されている³⁾。TFF2タンパクは胃体部の粘液頸細胞に発現しているが、TFF2 mRNA は体部粘膜において粘液頸細胞より上の胃小窩峽部細胞内に強く発現している。この位置変化は TFF2 mRNA-expressing cells (TTE) が胃幹細胞であるかもしれないことを意味しており、実際 lineage tracing によって TTE は体部腺の下方へ移動し、粘液頸細胞、壁細胞、主細胞に分化した。この結果はTTEが幹細胞マーカーとなる可能性を示唆しているが、興味深いことに胃小窩上方や神経内分泌細胞への分化は認めなかった。

また壁細胞の欠損状況下において、胃底部に存在する主細胞が Spasmodic Polypeptide-Expressing Metaplasia (SPEM) として知られている、いわゆる偽幽門腺化生粘膜に移行することが lineage tracing によって報告され³⁾、主細胞は潜在的な SPEM の幹

細胞になりうる可能性が指摘された。現在この際に主細胞に発現している Mist1 (BHLHA15) と呼ばれる転写制御因子は SPEM の幹細胞マーカーであると考えられている。当初 Mist1は胃主細胞や膵腺房細胞を含む全身諸臓器の漿液分泌を制御する転写制御因子として報告された。その後、Mist1は胃において粘液頸細胞から主細胞分化の最終段階に重要であることが示された。その Mist1陽性主細胞が壁細胞喪失によって幹細胞としての分裂能力を再獲得し SPEM を導き、またこの化生性変化は炎症状況下でますます増強されるかもしれないようである。

TFF2 mRNA と Mist1は、その存在部位などから Lgr5陽性幹細胞と関係はないようである。しかし Mist1陽性幹細胞が SPEM として知られている化生細胞系譜（いわゆる偽幽門腺化生で TFF2を発現する）を作り出すことを証明したので、TFF2 mRNA 陽性幹細胞と Mist1陽性幹細胞由来の SPEM には何らかの共通項があるのかもしれない。

V おわりに

ここ数年で胃幹細胞ならびに胃癌幹細胞は急速に解明されてきた。Lgr5陽性幹細胞はその代表であり、胃粘膜における発癌のメカニズムやその治療方法の開発に大いに役立つ可能性を秘めている。一方で他の幹細胞マーカーの存在も指摘されており、さらなる研究発展のためには、これらの相互関係の解明や、包括する幹細胞マーカーの同定が期待される。また Lgr5陽性幹細胞にも腫瘍生物学的機能など未だ多くの部分ではっきりしない問題があり、更なる研究が望まれる。

文 献

- 1) Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H: Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449: 1003-1007, 2007
- 2) Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R, Clevers H: Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6: 25-36, 2010
- 3) Ding SZ, Zheng PY: Helicobacter pylori infection induced gastric cancer; advance in gastric stem cell research and the remaining challenges. *Gut Pathog* 4: 18, 2012
- 4) Bjercknes M, Cheng H: Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: 767-777, 2002
- 5) Uehara T, Ma D, Yao Y, Lynch JP, Morales K, Ziober A, Feldman M, Ota H, Sepulveda AR: H. pylori infection is associated with DNA damage of Lgr5-positive epithelial stem cells in the stomach of patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci* 58: 140-149, 2013