

令和元年5月31日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05284

研究課題名(和文)炎症性腸疾患における可塑性上皮細胞脱分化機構の解析と粘膜再生治療への応用

研究課題名(英文) Analysis and therapeutic application of intestinal epithelial cell plasticity in inflammatory bowel disease

研究代表者

岡本 隆一 (Okamoto, Ryuichi)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：50451935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患において問題となる腸粘膜の損傷や消化管潰瘍の修復機構について、内在する幹細胞とは異なる分泌型上皮細胞分画(Atoh1陽性細胞)による新たな組織修復機構の存在を明らかにした。また、同疾患における抗TNF- $\alpha$ 抗体治療の効果予測指標となり得る新たな遺伝子マーカーとしてUBDを同定した。患者由来腸上皮等における同遺伝子の発現制御がTNF- $\alpha$ とNotchシグナルにより協調的に制御されていることを併せて明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患において幹細胞とは異なる上皮細胞分画による新たな組織修復機構の存在を明らかにしたことにより、同細胞の機能を活用した新たな粘膜再生・修復治療に繋がる成果を提示した。同疾患における抗TNF- $\alpha$ 抗体治療の効果予測指標となり得る遺伝子UBDの同定については、当該治療を実施した患者における治療の有効性を早期に予測し、より適切な治療の選択が可能となることに貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Through our current research project focused on mucosal damage in inflammatory bowel diseases, we found and confirmed a novel endogenous tissue repair system supported by a secretory-type cell population (Atoh1-positive cells) distinct from the genuine intestinal stem cells. In addition, we successfully identified a novel genetic marker, UBD, for the prediction of favorable clinical outcome in response to anti-TNF- $\alpha$  therapy. Expression of UBD was regulated by a synergistic enhancement between the TNF- $\alpha$  pathway and the Notch signaling pathway, as confirmed by experiments using patient-derived intestinal epithelial cells.

研究分野：消化器内科

キーワード：炎症性腸疾患 腸上皮幹細胞 分泌型上皮細胞 可塑性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国において炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎およびクローン病)の患者数は増加の一途であり、これに伴い難治・不応例が急増しており、新規概念に基づく治療法の開発・確立は急務である。同疾患の治療において、抗 TNF- $\alpha$ 抗体等の生物学的製剤の登場により局所炎症の制御は革新的な進歩を遂げた。しかしながら未だ繰り返し再発し治療に不応の経過を取る難治・重篤例が後を絶たない要因として、上皮再生不全に起因する粘膜機能の持続的破綻が極めて大きな要因であり、従って「粘膜上皮の治癒」を達成する事が疾患治療を飛躍的に進歩させることは明らかであるが、上皮粘膜機能の正常かつ完全な回復を積極的に目指した治療法の開発は未だ達成されていない。

(2) 研究代表者は傷害後の腸管上皮細胞の再生機構について一貫して研究を行っており、骨髄-上皮細胞相互作用による「細胞の可塑性」が腸上皮再生を支持すること (*Nat Med* 2002)、同細胞の可塑性により分泌型上皮が誘導され粘膜再生に貢献することを示し (*Gastroenterology* 2005)、世界的に高い評価を獲得してきた。さらに研究代表者らのグループは転写因子である Atoh1 が細胞増殖と表裏一体となった分泌型上皮細胞の分化制御を行うことを明らかとし (*Gastroenterology* 2006、*BBRC* 2008)、同転写因子が Notch シグナルにより制御され、1) 炎症性腸疾患の粘膜上皮における同シグナルの広汎な活性化が「杯細胞の欠失」と「パネート細胞化生」を特徴とする特有の陰窩構造を誘導すること、2) 同シグナル活性化不全が即ち上皮再生不全・大腸炎の難治化に直結すること、3) 一方、炎症粘膜の再生過程において Atoh1 陽性・分泌型細胞が増加・動員され、Notch 活性化細胞と協調して再生上皮を構成している事を明らかとした (*Am J Physiol* 2009、*Inflamm Bowel Dis* 2011、*PeerJ* 2014)。

(3) 一方、上記研究を行う過程で、腸上皮の恒常性が Atoh1 陽性細胞の脱分化により幹細胞が恒常的に補填される事により成立していること、2) 大腸炎等による粘膜傷害時には同脱分化機構がより積極的に動員される事により大量の幹細胞を調達し組織再生を達成していること、3) 一方、前記の脱分化により動員される細胞は APC 変異を契機とした腫瘍の起源とはなり得ず、従って同脱分化細胞の増加は腫瘍発生のリスク増大に直結しないこと等を示す重要な知見を得ていた。

#### 2. 研究の目的

本研究は、腸管粘膜における幹細胞を起点とした恒常性維持・組織再生機構を追求する過程で研究代表者らが独自に同定した腸管粘膜上皮の恒常性維持・再生・腫瘍発生に関する全く新しい知見、即ち 1) 正常腸管上皮に於いて Atoh1 陽性分泌型細胞の恒常的脱分化により幹細胞機能が再獲得され、陰窩-絨毛単位 (Clonal ribbon) が再構成される機構が内在し、これにより恒常性が維持されていること、2) 同細胞の脱分化は炎症粘膜の再生により促進され、小腸・大腸の再生上皮を積極的に構成していること、3) 同脱分化細胞は APC 変異に耐性を有し、腫瘍を構成することなく上皮再生に貢献可能であること、という「恒常的に高い可塑性を具備する分泌型上皮細胞の存在」に関する知見を基盤とし、炎症性腸疾患の粘膜再生機構の解明とこれを通じた粘膜再生を促進する治療の開発等を目的とし実施した。

#### 3. 研究の方法

上記研究目的に沿い、以下の方法で実施した。

(1) マウス腸管における可塑性を有する分泌型上皮細胞分画 (Atoh1 陽性細胞) の解析: Atoh1 陽性細胞の系譜解析が可能な Atoh1-Cre; tdTomato マウスを交配により作出し、腸炎モデル等の作成に用いることで、同環境下における動態等の解析を行った。必要に応じ、同マウスから腸上皮オルガノイドを樹立し、同培養系におけるオルガノイド再構成能や遺伝子発現の変化等について解析を行った。

(2) クローン病小腸病変部における幹細胞性を有する腸上皮細胞の解析: クローン病患者の小腸病変部・非病変部等における単一細胞レベルの遺伝子発現や幹細胞機能を解析するため、各々の粘膜から採取した内視鏡生検組織を用いて患者由来オルガノイドを樹立した。同オルガノイドを用い、マイクロ流路チップを用いたシングルセル化とマルチプレックス Taq-man PCR により定量的な遺伝子発現解析を行った。更に 3D スキャナーを用いることにより、同オルガノイドを単一細胞に分離しオルガノイド再構成能を評価するアッセイを実施した。

(3) クローン病小腸病変部における幹細胞性を有する腸上皮細胞の解析: ヒト腸上皮由来細胞及び患者由来オルガノイドを用い、サイトカイン刺激等に応答して発現する遺伝子群の解析を PCR 法やマイクロアレイ等により行った。炎症性腸疾患の活動性に応じた UBD 遺伝子発現の分布等の変化について、患者由来内視鏡生検組織等を用いた免疫染色にて比較解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) マウス腸管における可塑性を有する分泌型上皮細胞分画(Atoh1 陽性細胞)の解析  
 マウス腸管(小腸及び大腸)において、Atoh1 陽性細胞の可塑性について検証するため、Atoh1-Cre; tdTomato マウスを樹立し、Atoh1 陽性細胞の系譜解析(Lineage tracing)を行った。その結果、恒常状態においても小腸及び大腸にて陰窩-絨毛単位(Clonal ribbon)が再構成される機構が内在すること、放射線腸炎(小腸)や DSS 腸炎(大腸)等の腸粘膜傷害を来す疾患モデルに於いて Clonal ribbon の構成頻度が著しく増加することが明らかとなった。同知見は、粘膜傷害を契機とし、一定数の Atoh1 陽性細胞が幹細胞性を再獲得することにより組織再生に貢献する機構が内在していることを反映したものと考えられた。

実際に Atoh1 陽性細胞が幹細胞性を再獲得するか否かを検証するため、DSS 腸炎を惹起したマウスから陰窩を単離し、体外にて腸上皮オルガノイドとして培養を行った。同オルガノイドを用いて単一細胞からのオルガノイド再構成能等を評価した結果、体外に於いても単一の Atoh1 陽性細胞が幹細胞性を獲得し、オルガノイドを再構成し得ることが確認された。同幹細胞性の再獲得に於いて、炎症環境における如何なる因子が関わるのかを検証するため、炎症環境に於いて上皮細胞が暴露される各因子と腸上皮オルガノイドとの共培養を行うことにより、同定を試みた。この結果、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS, フラジェリンを組み合わせて添加した際に、腸上皮オルガノイドにおける「幹細胞性の再獲得」が著しく促進されることが明らかとなった(図1)。同条件で促進される「幹細胞性の再獲得」は NF- $\kappa$ B 経路の阻害剤を添加することで遮断されることから、NF- $\kappa$ B 経路を介した細胞内機構が重要であることも示された。また同条件にて Notch リガンド分子である DLL1 の発現も促進されたこと、DSS 腸炎の再生過程においても Atoh1 陽性細胞由来の DLL1 陽性細胞が増加することから(図2)、幹細胞性を再獲得する亜分画として Atoh1 陽性細胞由来 DLL1 陽性細胞が重要である可能性も示された。これら成果は国際幹細胞学会(ISSCR)の機関紙 Stem Cell Reports に公開された(Stem Cell Reports, 2018)。

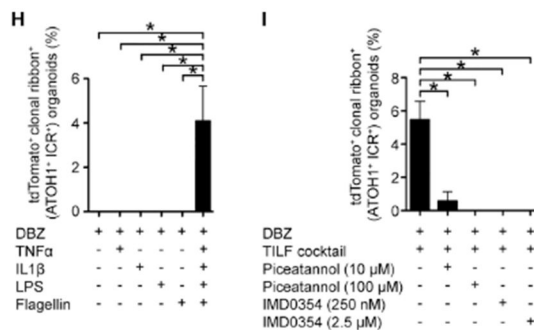


図1 オルガノイドにおける幹細胞性の獲得 (Stem Cell Reports, 2017)

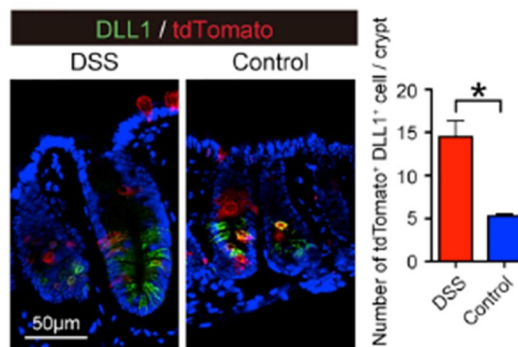


図2 大腸炎粘膜における Atoh1+由来 DLL1+細胞の増加 (Stem Cell Reports, 2017)

(2) クローン病小腸病変部における幹細胞性を有する腸上皮細胞の解析

上記(1)にて見られた「幹細胞性」を有する細胞が患者の病変部粘膜で如何なる遺伝子発現パターンや機能的特徴を有するかを明らかにするため、クローン病患者小腸の異なる部位より生検組織を採取し、各々腸上皮オルガノイドを樹立した後、比較検討を行った。マイクロ流路を用いた方法でシングル・セルを単離し、Taq-man PCR 法にて遺伝子発現の解析を行ったところ、総計 1215 個の細胞より幹細胞特異的遺伝子の発現パターンに関するデータを得ることが可能であった。同データの t-SNE 解析により、幹細胞特異的遺伝子を複数高発現する細胞集団の同定が可能であった。また同細胞集団において、病変部由来オルガノイドの細胞は他とは異なる SMOC2 及び LGR5 の発現パターンを有することも明らかとなった。クローン病患者の小腸病変部に内在する上皮細胞の幹細胞性機能に関する差異の有無を検証するため、同部位より樹立した腸上皮オルガノイドを単一細胞まで分離し、オルガノイド構造の再構成能・再構成率を比較検討した。この結果、クローン病の小腸病変部より樹立した腸上皮オルガノイドには「幹細胞性」機能を有する上皮細胞がより高い頻度で

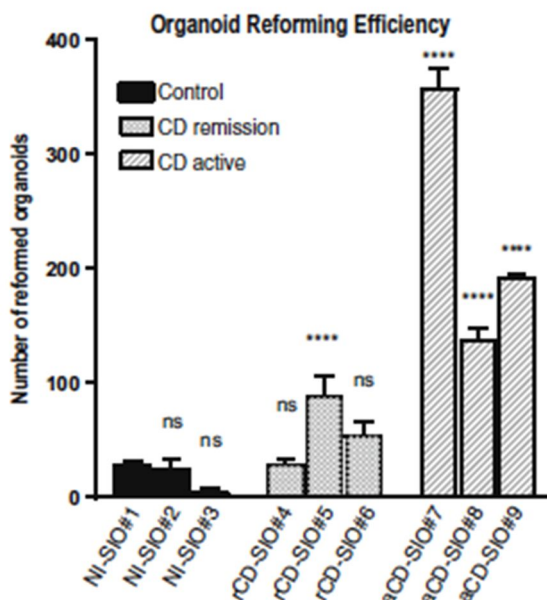


図3 クローン病小腸粘膜より樹立した腸上皮オルガノイドにおける「幹細胞性」細胞の増加 (J Gastroenterol, 2018)



含まれることが明らかとなった(図3)。同知見から、傷害を受けたクローン病患者の小腸病変部において、特徴的な遺伝子発現パターンを有し幹細胞性機能を発揮し得る未知の上皮細胞集団が誘導されている可能性が考えられた。

### (3)炎症性腸疾患の粘膜上皮で発現変動する幹細胞関連遺伝子に関する解析

前記(1)及び(2)の結果を踏まえ、炎症性腸疾患の粘膜上皮で発現変動する幹細胞関連遺伝子について更に探索し、解析を行った。同解析の結果、ヒト腸上皮培養細胞において TNF- $\alpha$ シグナルと Notch ;  $\cdot$ シグナルを同時に活性化すると、特定の遺伝子群の発現が著しく促進されることが明らかとなった。この様な Notch シグナルとの協調的な遺伝子発現調節は TNF- $\alpha$ に特徴的な機能であり、他の炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ や LPS では見られない機能であった。両シグナルの協調制御により最も高い発現が誘導される遺伝子として ubiquitin-D(UBD)が同定された。同遺伝子の転写調節領域を組み込んだレポータープラスミド等を用いた解析により、同遺伝子の発現は転写レベルで TNF- $\alpha$ シグナルと Notch シグナル双方の調節を受けることが明らかとなった。

同遺伝子の発現について、ヒト消化管粘膜における局在を明らかにするため、免疫染色等による組織学的解析を行った結果、クローン病寛解期の小腸粘膜においては幹細胞領域に局限して発現していることが明らかとなった(図4)。一方、クローン病病変部や潰瘍性大腸炎病変部等の炎症粘膜に於いてはより広い陰窩～絨毛領域に分布する上皮細胞で発現が誘導されていることが明らかとなった。更に、抗 TNF- $\alpha$ 抗体による治療を行った患者由来の生検組織を用いて比較検討を行った結果、同治療が有効であり寛解導入に至った症例では早期に UBD の発現が抑制されている一方で、同治療が無効であり寛解導入に至らなかった症例では UBD の高発現が持続するパターンを示すことが明らかとなった。同知見から、UBD は抗 TNF- $\alpha$ 抗体治療の効果予測指標となり得る可能性がある遺伝子であることが示された。

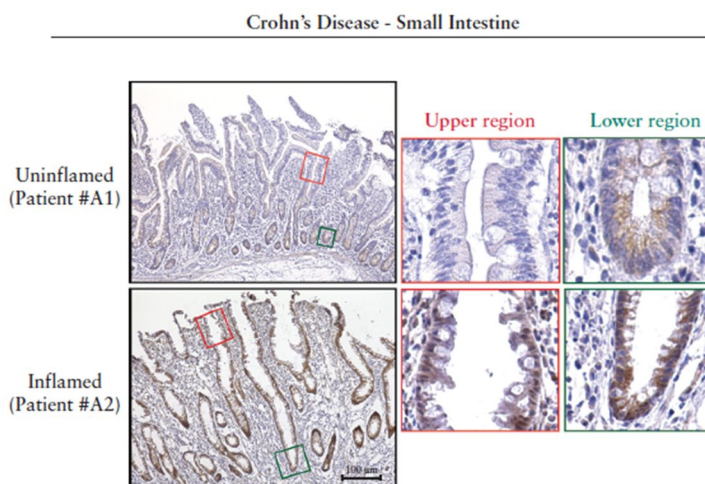


図4 クローン病非病変部と病変部における UBD の発現 (J Crohns Colitis, 2018)

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Kawamoto A, Nagata S, Anzai S, Takahashi J, Kawai M, Hama M, Nogawa D, Yamamoto K, Kuno R, Suzuki K, Shimizu H, Hiraguri Y, Yui S, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Kitagawa M, Okamoto R, Watanabe M. Ubiquitin D is Upregulated by Synergy of Notch Signalling and TNF- in the Inflamed Intestinal Epithelia of IBD Patients. J Crohns Colitis. 査読有, 30;13(4), 2019,495-509. DOI:10.1093/ecco-jcc/jjy180.

Suzuki K, Murano T, Shimizu H, Ito G, Nakata T, Fujii S, Ishibashi F, Kawamoto A, Anzai S, Kuno R, Kuwabara K, Takahashi J, Hama M, Nagata S, Hiraguri Y, Takenaka K, Yui S, Tsuchiya K, Nakamura T, Ohtsuka K, Watanabe M, Okamoto R. Single cell analysis of Crohn's disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties. J Gastroenterol. 査読有, 53(9), 2018, 1035-1047. DOI:10.1007/s00535-018-1437-3.

Ishibashi F, Shimizu H, Nakata T, Fujii S, Suzuki K, Kawamoto A, Anzai S, Kuno R, Nagata S, Ito G, Murano T, Mizutani T, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M, Okamoto R. Contribution of ATOH1(+) Cells to the Homeostasis, Repair, and

Tumorigenesis of the Colonic Epithelium. Stem Cell Reports. 査読有, 10(1),2018, 27-42. DOI:10.1016/j.stemcr.2017.11.006.

〔学会発表〕(計3件)

Kawamoto A, Nagata S, Anzai S, Okamoto R, Watanabe M et al. Synergy of Notch Signaling and TNF-alpha Leads to Up-regulation of UBD in the Inflamed Intestinal Epithelia of IBD Patients. AOCC 2019, 2019.

Kawamoto A, Nagata S, Anzai S, Okamoto R, Watanabe M et al. Synergy of Notch signalling and TNF-alpha in the inflamed intestinal epithelia of IBD patients leads to up-regulation of UBD, a ubiquitin-like protein. 14th ECCO, 2019.

鈴木康平, 村野竜朗, 平栗優衣, 高橋純一, 河本亜美, 石橋史明, 安斎翔, 久野玲子, 栗原小の実, 川井麻央, 永田紗矢香, 油井史郎, 土屋輝一郎, 中村哲也, 大塚和朗, 渡辺守, 岡本隆一. クローン病由来の小腸上皮オルガノイド構築による幹細胞形質の解析. 第17回再生医療学会総会, 2018年.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20181213\\_1.pdf](http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20181213_1.pdf)

[http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20171208\\_1.pdf](http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20171208_1.pdf)

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。