

機関番号：12602

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790651

研究課題名 (和文) Notch シグナルによる腸管粘膜再生機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of Notch-mediated regeneration of the intestinal epithelia

研究代表者

岡本 隆一 (OKAMOTO RYUICHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：50451935

研究成果の概要 (和文)：正常ヒト腸管上皮の恒常性維持において Notch シグナルが重要な機能を有するのみならず、分化及び増殖制御を通じて粘膜再生遂行の主たる経路として機能している事を明らかとした。更に Notch 活性化を担うリガンド分子群に於いて Jag1、Dll1、Dll4 がヒト腸管に発現分布し、上皮分化制御を担う可能性が示された。本研究成果は難治性炎症性腸疾患における粘膜再生治療確立に重要な基盤を提供する画期的成果である。

研究成果の概要 (英文)：Our current study revealed the role of Notch signaling not only in homeostasis of the intestinal epithelial tissue, but also in tissue regeneration, through regulation of epithelial cell proliferation and differentiation. In addition, we showed that among Notch ligands, Jag1, Dll1 and Dll4 are expressed in the human intestinal epithelial tissue, suggesting their involvement in regulation of epithelial cell differentiation. These results provide a novel basis for the establishment of therapeutic approaches aimed to promote mucosal regeneration of refractory inflammatory bowel disease patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：腸管粘膜、Notch シグナル、上皮再生、炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らのグループは、腸管上皮、なかでも杯細胞から産生される IL-7 が粘膜局所リンパ球に作用する「粘膜 IL-7 ネットワーク」の重要性を提唱し、これが粘膜局所の防御機構に不可欠な機能を果たすこと、即ち、粘膜上皮杯細胞が腸管粘膜局所の生体防御機能に必須であることを示してきた (JCI 1995, JEM 1998, Immunity 2000, JI 2004)。

更に転写因子 IRF ファミリー分子群が腸管上皮細胞における IL-7 の転写調節に必須であり (MCB 2004)、かつ IRF-1 が杯細胞特異的に発現していることを示し、杯細胞が局所の免疫機能の維持に必須である事を示すきわめて重要な知見である。

(2) 研究代表者は傷害後の消化管上皮細胞の再生過程に骨髄-上皮細胞相互作用が関与

し (Nat Med 2002)、同作用により杯細胞への分化誘導システムが機能する事が粘膜再生に必須であることを示した (Gastroenterology 2005)。即ち研究代表者は腸管上皮細胞の分化/再生機構の両研究領域において腸管粘膜における杯細胞機能の重要性を提唱し、国際的にも高い評価をうける研究を展開してきた。

(3) 研究代表者らのグループは腸管杯細胞の分化メカニズムの解明に着手し、1) bHLH型転写因子 ATOH1 がヒト腸管組織特異的に発現していること、2) ヒト腸管上皮細胞に於いて、同転写因子が Wnt シグナル依存性にタンパク分解される事により、細胞増殖と表裏一体となった特殊な分化制御機構が存在すること、を明らかとした (Gastroenterology 2006)。

(4) 一方、ATOH1 の発現を制御する Notch シグナルの腸管上皮恒常性維持における重要性を示唆する研究成果が我々を含む国内外から報告が成されているものの、炎症性腸疾患に焦点を当てた Notch シグナルの研究は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究は炎症性腸疾患における特異的な上皮分化機構の解明を通して、同疾患に於ける上皮再生治療への応用を最終的な目的としている。同目的を目指すに当たり、以下の目標を掲げ、研究を実施した。

(1) ヒト正常腸管上皮に於ける Notch シグナル活性化の重要性の解明：細胞分化に重要な分子機構として知られる Notch シグナルがヒト正常腸管において如何なる活性制御を受け、その結果如何なる機能を発揮し腸管上皮の恒常性維持に貢献しているか、を解明する。

(2) 炎症性腸疾患の粘膜再生に於ける Notch シグナル活性化の重要性の解明：炎症性腸疾患の病態における Notch シグナルの重要性を、分化・増殖制御及び粘膜再生に焦点を当て、解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 正常ヒト腸管及び炎症性腸疾患粘膜における Notch シグナルの重要性の解析

①主に患者手術検体を用いた組織学的解析により、正常腸管及び炎症性腸疾患患者における活性型 Notch、Hes1 及び上皮分化マーカーに加え、Notch 活性化を制御するリガンド分子群の発現分布から、各分子の腸管上皮に

ける重要性を検討した。

②ヒト正常小腸全域に於ける上皮細胞分化に於ける Notch 下流遺伝子 ATOH1 及び Hes1 発現の重要性を、ダブルバルーン内視鏡を用いた計画的全小腸生検検体を用いて解析した。

(2) ヒト腸管上皮細胞における Notch シグナル活性化の機能解析

Notch シグナル活性化がヒト腸管上皮細胞分化に与える影響を、ヒト大腸癌由来細胞株に強制的に Notch 活性化を誘導する事が可能な系を樹立し、これを用いて解析した。さらに Notch 下流の主たる機能分子と同定された Hes1 についてもヒト大腸癌由来細胞株に強制的に Hes1 発現を誘導する事が可能な系を樹立し、これを用いて解析した。

(3) 炎症性腸疾患における Notch 活性化の機能的意義の解析

薬剤添加によるマウス大腸炎モデルマウスと Notch 活性化阻害薬を用いて、炎症からの回復期に Notch 活性化を阻害し、その表現型及び組織学的変化を検討することにより、腸炎の粘膜再生における Notch 活性化の機能的意義を解析した。

4. 研究成果

(1) 正常ヒト腸管及び炎症性腸疾患粘膜における Notch シグナルの重要性：正常ヒト腸管組織を免疫組織学的に解析した結果、以下の知見を得た。

①活性型 Notch1 の発現はクリプト内のヒト腸管上皮細胞で特異的に観察され、同部位に限局して Notch シグナルが活性化されていることが示された。

②同シグナルの主たる標的遺伝子である Hes1 も同様の発現分布を呈し、Notch シグナルの主たる機能分子として腸管上皮の分化・増殖に主体的に関わっている可能性が示された。

③実際、ヒト小腸粘膜における分化決定因子の解析を行うため、ダブルバルーン内視鏡による同一ヒト個体の小腸粘膜における長軸方向の遺伝子発現解析を実施した結果、十二指腸〜回腸末端方向により多くの杯細胞が配置されていること、この杯細胞分化に際し、Notch シグナル下流の転写因子 Hath1 と Klf4 の協調が重要であること、を明らかとした。

④一方、Notch 活性化を制御する Notch リガンド分子群の発現解析を同様の手法で実施した結果、Jagged1、Dll1、Dll4 の各分子が腸管上皮細胞で発現しており、同分子群が腸管上皮組織内における Notch 活性化を担う主たる分子群である可能性が示された。

さらに潰瘍性大腸炎病変部の免疫組織学的解析により以下の知見を得た

⑤潰瘍性大腸炎病変部の陰窩においては杯細胞の著しい減少と一致して同部位の上皮における Notch の広範な活性化が確認された。即ち、同病理事象に於いて、Notch 活性化が主体的に関わる可能性が示された。

⑥さらに、Notch シグナル機能の主たる担い手である Hes1 分子の発現は、活性型 Notch と同様に杯細胞の著しい減少と一致し、炎症粘膜に於ける発現上皮細胞数の著しい増加が認められた。

(2)ヒト腸管上皮細胞における活性型 Notch1 の分子機能の解明:ヒト大腸癌由来培養細胞株に於ける誘導発現系を用いた解析の結果、以下の知見を得た

①ヒト大腸癌由来細胞株に強制的に Notch 活性化を誘導する事により、杯細胞特異的遺伝子 MUC2 発現の著しい減少が誘導され、粘液分泌能も著しい低下が確認された。

②同様の Notch 活性化を誘導する事によりパネート細胞特異的遺伝子 PLA2G2A の発現及び分泌の亢進が誘導された。即ち、Notch 活性化が分化制御のみならず、抗菌活性を有するペプチド産生を通じ、局所粘膜の防御機能にも貢献し得る可能性が示された。

③Notch 活性化における Notch リガンド発現の変動を同様の細胞を用いて解析した結果、Notch リガンド Jag1 は Notch 活性化非依存的に発現が維持される一方、Dll1 及び Dll4 は Notch 活性化依存的に相反制御を受けており、同制御による発現が腸管杯細胞分化に必須の機構であることを明らかとした。

④Notch 活性化による杯細胞分化の抑制は Notch 下流の遺伝子 Hes1 による ATOH1 遺伝子の直接的な転写制御により遂行されるものであることを示し、Notch シグナルが杯細胞分化を制御する具体的な分子機構の解明に成功した。また、炎症腸管粘膜における Notch シグナルの

活性化が「杯細胞の減少」を誘導するには ATOH1 遺伝子の発現抑制が必須の役割を担っており、同機構を介して炎症粘膜再生に寄与している可能性があること、が明らかとされた。

(3)腸管粘膜再生における Notch シグナルの重要性: 腸炎動物モデルであるデキストラン硫酸投与による大腸炎誘導モデルマウスに Notch シグナル阻害薬を投与し、その効果を組織学的に解析した。その結果、以下の知見を得た。

①Notch シグナル阻害薬によりデキストラン硫酸誘導腸炎の著しい増悪と個体死亡率の上昇が誘導された。

②Notch シグナル阻害薬は非炎症部腸管に於ける杯細胞分化を促進する効果を有する一方、炎症部腸管に於いて細胞増殖を著しく抑制する効果を有していた。同効果により、炎症により傷害された粘膜上皮の再生反応は著しく抑制された。

これらの成果は、正常腸管における恒常性維持に於いて、Notch シグナルが必須の機能を有することを示したのみならず、難治性炎症性腸疾患における上皮再生機構を分子レベルで解明した画期的知見である。また、炎症性腸疾患における Notch シグナルの活性化が下流の転写因子 Hes1-Hath1 を介した分化制御により粘膜再生を促進し得る分子機構を解明した成果は、炎症性腸疾患の病態解明と粘膜再生治療法の開発に重要な基盤となる新知見を提供した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Shinohara T, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M (他 6 名、5 番目) : Upregulated IL-7 receptor (alpha) expression on colitogenic memory CD4+ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J Immunol.*, 186, 2623-2632 (2011). (査読有)
2. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Watanabe M. (他 4 名、3 番目) : Suppression of hath1 gene expression directly regulated by hes1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011, 査読有
3. Iwasaki M, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M (他 11 名、3 番目) :

Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of Hath1 and Klf4. *J Gastroenterol.*, 46, 191-202 (2010). (査読有)

4. Kameyama K, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M (他 7 名、5 番目) : IL-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4+ IL-7R alpha high memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol.*, 40, 423-36 (2010). (査読有)
5. Akiyama J, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M (他 4 名、2 番目) : Delta-like 1 expression promotes goblet cell differentiation in Notch-inactivated human colonic epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 393, 662-667 (2010). (査読有)
6. Onizawa M, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M (他 12 名、9 番目) : Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 296, G850-859 (2009). (査読有)
7. Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M (他 4 名、1 番目) : Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G23-35, (2009). (査読有)
8. Nemoto Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. (他 8 名、7 番目) : Long-lived colitogenic CD4+ memory T cells residing outside the intestine participate in the perpetuation of chronic colitis. *J. Immunol.* 183(8), 5059-5068 (2009). (査読有)
9. Tomita T, Okamoto R, Watanabe M. (他 7 名) : IL-7 is essential for lymphopenia-driven turnover of colitogenic CD4(+) memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol.*, 39, 2737-2747 (2009). (査読有)
10. Totsuka T, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M (他 8 名、5 番目) : RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4+CD25+ regulatory T cells in chronic colitis. *J. Immunol.* 182, 6079-6087 (2009). (査読有)
11. Murayama M, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M (他 4 名、2 番目) : Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell-specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol.*, 44, 173-182 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 岡本隆一、Notch1 activation promotes goblet cell depletion and expression

of PLA2G2A in the inflamed mucosa of ulcerative colitis、米国消化器病学会週間 2009、2009 年 6 月 1 日、シカゴ

2. 岡本隆一、Notch1 activation promotes goblet cell depletion and expression of PLA2G2A in the inflamed mucosa of ulcerative colitis、The Notch Meeting、2009 年 9 月 27 日、アテネ
3. 秋山純子、岡本隆一 Expression of Delta ligands is regulated by Notch-Hes1 signaling pathway in human intestinal epithelial cells、The Notch Meeting、2009 年 9 月 27 日、アテネ
4. 岡本隆一、炎症性腸疾患における上皮分化・増殖機構の解析と粘膜再生治療への応用、日本消化器病学会週間、2009 年 10 月 16 日、京都
5. 岡本隆一、炎症性腸疾患における粘膜修復機構の解析と上皮再生治療への応用、第 6 回日本消化管学会総会、2010 年 2 月 19 日、福岡
6. 秋山純子、岡本隆一 Up-regulation of Deltal expression is required for goblet cell differentiation in human intestinal epithelial cells、米国消化器病学会週間 2010、2010 年 5 月 4 日、ニューオリンズ
7. 岡本隆一、TNF-alpha and Notch signaling synergistically up-regulate OLFM4 expression in human intestinal epithelial cells、米国消化器病学会週間 2010、2010 年 5 月 5 日、ニューオリンズ
8. 岡本隆一、炎症性腸疾患と上皮再生、第 31 回日本炎症・再生医学会、2010 年 8 月 5 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 隆一 (OKAMOTO RYUICHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授
研究者番号 : 50451935

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :