

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590696

研究課題名（和文） 炎症性腸疾患における発癌調節機構の解明と臨床応用への基盤樹立

研究課題名（英文） Identification of the inflammatory signaling in intestinal epithelial cells involved in colitis-associated carcinogenesis

研究代表者

長沼 誠 (NAGANUMA MAKOTO)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00265810

研究成果の概要（和文）：

本研究は申請者らが独自に研究を展開してきた炎症性サイトカインを介した腸管上皮細胞における免疫学的シグナル伝達に注目し、炎症性腸疾患における特異的発癌分子機構とその新規治療標的としての可能性について解析した。その結果、腸管上皮細胞における特異的な TNF シグナルが NF- κ B の活性化に深く関与する事実と、それによって腸管上皮細胞の発癌誘導が促進され得る可能性が暗示された。この分子メカニズムが炎症性腸疾患における特異的発癌の病態機序においてその治療標的になりうることが示唆され、今後の研究成果が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Treatment with anti-tumor necrosis factor (TNF) mAb has been accepted as a successful therapy for patients with inflammatory bowel diseases (IBD). It has been recently reported that blockade of TNF receptor (TNFR) signaling in infiltrating hematopoietic cells may prevent the development of colitis-associated cancer (CAC). However, it remains unclear whether the TNF signaling in the epithelial cells is also involved in the development of CAC. To investigate this, we studied the effects of anti-TNF mAb in animal models of colitis and CAC. Our studies suggest that the TNFR signaling in intestinal epithelial cells may be directly involved in the development of CAC with persistent colitis, and imply that the maintenance therapy with anti-TNF mAb may prevent the development of CAC in patients with IBD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学（内科系臨床医学）

科研費の分科・細目：消化器内科学・下部消化管学（小腸、大腸）

キーワード：炎症性腸疾患、炎症性発癌、新規治療法、粘膜免疫、MLCK

1. 研究開始当初の背景

我が国では食生活の欧米化に伴い炎症性腸疾患患者の発生は増加の一途を辿っている。近

年の急速な治療法の進歩に伴い、同疾患における長期経過例もまた増加の一途であり、従って同症例の予後を規定する「炎症粘膜を母地と

する発癌」の機序解明・予防及び治療法の確立に対する要請もまた高まる一方である。炎症粘膜における発癌は正常粘膜における adenoma-carcinoma sequence や de novo 発癌とは明らかに異なる発癌経路から成立し、特異な臨床経過を辿る事は知られているが、その成立過程における分子機序や発癌制御の中核を成す分子経路は未だ全く不明である。従って、同経路を利用した炎症粘膜特異的な癌抑制療法を開発する試みは未だ皆無である。

2. 研究の目的

本研究は我々が独自に見出した、炎症腸管粘膜に於ける TNF α 受容体(TNFR)依存性発癌促進機構に着目し、同機構による発癌機序について網羅的・包括的解析を加え、その細胞内経路の全貌解明を目指すとともに同経路による発癌制御のマスター遺伝子を同定し、これを標的とした炎症粘膜特異的な癌抑制療法の開発を目的とする。本研究により、これまで全く明らかとされていなかった炎症腸管粘膜における発癌の中核を成す分子機序の全貌解明につながる事が期待されるのみならず、最終的には同経路を利用した分子標的治療の開発によって炎症性腸疾患における画期的な癌抑制療法の確立へと発展することが期待される。

3. 研究の方法

当該研究計画は I) 腸管上皮細胞における TNFR 特異的細胞内経路の網羅的解析、II) TNFR 依存性発癌機構におけるマスター分子の同定、および III) TNFR 経路を標的とした炎症粘膜特異的癌抑制療法の開発に大別され、段階的に遂行する。

I. 腸管上皮細胞における TNFR 特異的細胞内経路の網羅的解

I-1)腸管上皮細胞における TNFR 特異的シグナルの誘導系の確立

- マウス腸上皮非腫瘍細胞株 MODE-K 細胞を用い、レンチウイルスベクターを用いてテトラサイクリン誘導下にマウス TNFR を恒常的に発現する細胞株を作製する。
- 樹立した同細胞に対し、ドキシサイクリン存在下においてリコンビナント rTNF- α 又は野生型 C57BL/6 マウスから単離し、rIFN- γ で前処理したマクロファージとの混合培養により各受容体特異的シグナルを誘導後、MODE-K 細胞のみを回収し、NF- κ B 単独の活性化をルシフェラーゼアッセイ及びウエスタンブロット法を用いて確認し発現蛋白の受容体機能を確認する。

I-2)腸管上皮細胞における TNFR 特異的シグナルの網羅的解析

- 上記 I-1)にて TNFR 特異的な NF- κ B 単独の活性化が確認された細胞株を用いて、これを 1)無刺激 2)ドキシサイクリン単独存在下 3) rTNF- α 単

独存在下 4)ドキシサイクリン・rTNF- γ 共存存在下の 4 条件においてマイクロアレイ法を用いて mRNA 発現プロファイルを明らかにする。得られたプロファイルと比較し、TNFR 依存性・TNF- α 非依存性経路において発現制御を受ける全遺伝子を抽出する。

- マイクロアレイ法により抽出された各遺伝子につき、TNFR 依存性・TNF- α 非依存性経路による発現制御の有無を I-1)にて樹立した細胞にて RT-PCR 法を用いて検証する。

II. TNFR 依存性発癌機構におけるマスター分子の同定

II-1) TNFR 依存性・TNF- α 非依存性経路におけるマスター分子の同定

- 上記 I-1 及び I-2 において同定された候補遺伝子につき、各々レトロウイルスベクターを用いた shRNA-mediated knockdown により、各遺伝子間の依存関係をマッピングし、細胞内変化の中心となっているマスター候補分子を抽出する。

II-2) TNFR 依存性・TNF- α 非依存性経路における癌化形質マスター分子の同定

- 上記 II-1 において同定されたマスター候補分子につき、各々レトロウイルスベクターを用いた shRNA-mediated knockdown により、TNFR 依存性癌化形質に及ぼす効果を 1)光学観察による細胞の形態的变化・細胞骨格構造の変化・細胞間構造の変化、2)ウエスタンブロット及びレポーターアッセイによる β -catenin-TCF 経路活性の測定により解析する。さらにヒト炎症発癌症例を用いた免疫組織学的検討により、in vivo における発現分布の解析を加える。

III. TNFR 経路を標的とした炎症粘膜特異的癌抑制療法の開発

III-1) TNF シグナル阻害による炎症粘膜特異的癌抑制効果の解析

- 野生型 C57BL/6 マウスを用いて、azoxymethane (AOM)および dextran sodium sulfate (DSS)を投与することにより colitic cancer モデルを作製する。同マウスに TNF シグナル特異的阻害薬を経静脈的及び経直腸的に投与し、発癌抑制効果を組織学的に解析する。さらに I-2 に於いて同定した各遺伝子発現変化を検討し、in vivo に於ける TNF シグナル阻害の効果を確認する。

III-2)癌化形質マスター分子阻害薬のスクリーニング

- MODE-K 細胞を用いて II-2 において抽出された癌化形質マスター分子の分子機能をルシフェラーゼ活性で読み出す機能アッセイ系を樹立する。同系を用いた低分子化合物スクリーニングにより癌化形質マスター分子阻害効果を有する低分子化合物を抽出する。

III-3)癌化形質マスター分子阻害による炎症粘

膜特異的癌抑制効果の解析

●野生型 C57BL/6 マウスを用いて、AOM および DSS を投与することにより colitic cancer モデルを作製する。同マウスに III-2) において抽出された癌化形質マスター分子特異的阻害薬を経静脈的及び経直腸的に投与し、発癌抑制効果を組織学的に解析する。

4. 研究成果

本研究は申請者が独自に研究を展開してきた腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体シグナルを介した腸管上皮細胞における免疫学的シグナル伝達に注目し、炎症性腸疾患における特異的発癌分子機構とその新規治療標的としての可能性について着目している。その結果、本研究では当該研究期間に以下のような成果が得られた。

1) マウス腸上皮細胞株 MODE-K および CT-26 細胞を用いた実験では、1型 TNF 受容体 (TNFR1) および2型 TNF 受容体 (TNFR2) がそれぞれこれらの細胞に発現していることが mRNA および蛋白質レベルで確認された。2) またリコンビナント(r)インターフェロン-ガンマ (rIFN- γ) の存在下でこれらの細胞を培養すると、TNFR1 の発現には変化がみられないものの、TNFR2 の発現は増加することが Western blot 法で観察された。3) また rIFN- γ や rTNF- α の存在下で培養したこれらの細胞において、コントロールと比較して p65 や I κ -B α のリン酸化が誘導されることが生化学的に確認された。これを受けて、腸管上皮細胞のアポトーシスに対する TNF シグナルの影響を解析した結果、以下のような成果が得られた。4) rIFN- γ や rTNF- α の存在下でマウス腸上皮細胞株 MODE-K および CT-26 細胞を培養したときに誘導される2型 TNF 受容体 (TNFR2) 特異的な発現上昇は、細胞内の p65 や I κ -B α のリン酸化を誘導することのほか、これらの細胞では caspase 8 や caspase3 の活性化が誘導されないことが Western blot 法で確認された。5) またマウス慢性大腸炎モデルを作製したとき、in vitro での結果と同様に大腸上皮において p65 や I κ -B α のリン酸化が誘導されることが Western blot 法で観察された。さらにこれを受けて、in vivo における炎症性発癌に対する TNF シグナルの影響を解析した結果、本研究では当該研究期間に以下のような成果が得られた。6) in vivo における炎症性発癌モデルとして azoxymethane (AOM) と dextran sodium sulfate (DSS) の投与による colitis-associated cancer (CAC) をマウスに誘導した。その大腸組織の解析結果から、in vitro と同様に炎症時の上皮細胞において TNFR2 特異的な発現上昇が誘導され、それと相関して細胞内の p65 や I κ -B α のリン酸化も誘導される一方、同組織において

caspase 8 や caspase3 の活性化は誘導されないことが確認された。7) またこうした傾向は非腫瘍部と比較して腫瘍部でさらに強い反応として確認された。8) さらにこうした反応は in vivo における抗 TNF 抗体によって阻害されることが確認された。これらの研究結果は腸管上皮細胞における特異的な TNF シグナルが NF- κ B の活性化に深く関与する事実と、それによる腸管上皮細胞の発癌を誘導し得る可能性を暗示するものと思われる。さらにこの分子メカニズムが炎症性腸疾患における特異的発癌の病態機序においてその治療標的になりうることが示唆され、今後の研究成果が期待されるものと思われる。

炎症性発癌モデルにおけるその調節機構に関しては、当初に想定されていた標的分子のほか、アポトーシス関連分子の影響を受けているか否か、その解析を同時に進めたため、本研究は予定されていた計画から若干異なる展開を辿ったが、炎症性発癌機構における TNF の重要性が明確化するなどの大きな成果が得られた。炎症性腸疾患に合併する炎症性発癌機構において、TNF が中心的役割を担っている可能性が示唆されたことを受けて、今後はさらに詳細な分子メカニズムが解析され、CAC の新規治療法開発に発展すると期待する。

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 17 件)

(英文)

1. Naganuma M, Fujii T, Kunisaki R, Yoshimura N, Takazoe M, Takeuchi Y, Saito E, Nagahori M, Asakura K, Takebayashi T, Watanabe M : Incidence and characteristics of the 2009 influenza (H1N1) infections in inflammatory bowel disease patients. **J Crohns Colitis**.7:308-313,2013 査読有,DOI : 10.1016/j.crohns.06.019
2. Naganuma M, Nagahori M, Fujii T, Morio J, Saito E, Watanabe M : Poor recall of prior exposure to varicella zoster, rubella, measles, or mumps in patients with IBD. **Inflamm Bowel Dis**. 19: 418-422,2013 査読有,DOI : 10.1002/ibd.23027
3. Chen L, Chen Z, Baker K, Halvorsen EM, da Cunha AP, Flak MB, Gerber G, Huang YH, Hosomi S, Arthur JC, Dery KJ, Nagaishi T, Beauchemin N, Holmes KV, Ho JW, Shively JE, Jobin C, Onderdonk AB, Bry L, Weiner HL, Higgins DE, Blumberg RS : The short isoform of the CEACAM1 receptor in intestinal T cells regulates mucosal immunity and homeostasis via Tfh cell induction. **Immunity**. 37: 930- 946,2012

査読有, DOI : 10.1016/j.immuni.2012.07.016

4. Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M : Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. **Nature Medicine**. 18: 618- 623, 2012 査読有, DOI : 10.1038/nm.2695

5. Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M : Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**. 419: 238- 243, 2012 査読有, DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.01.155

6. Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, Watanabe M : The development of colitogenic CD4+ T cells is regulated by IL- 7 in collaboration with natural killer cell function in a murine model of colitis. **J Immunol**. 188: 2524 – 2536, 2012 査読有, DOI : 10.4049/jimmunol.1100371

7. Hyun SB, Kitazume Y, Nagahori M, Toriihara A, Fujii T, Tsuchiya K, Suzuki S, Okada E, Araki A, Naganuma M, Watanabe M : Magnetic resonance enterocolonography is useful for simultaneous evaluation of small and large intestinal lesions in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**. 17: 1063-1072, 2011 査読有, DOI : 10.1002/ibd.21510

8. Naganuma M, Kunisaki R, Yoshimura N, Nagahori M, Yamamoto H, Kimura H, Sako M, Kawaguchi T, Takazoe M, Yamamoto S, Matsui T, Hibi T, Watanabe M : Conception and pregnancy outcome in women with inflammatory bowel disease: A multicentre study from Japan. **J Crohns Colitis**. 5:317-323, 2011 査読有, DOI : 10.1016/j.crohns.2011.02.003

9. Naganuma M, Fujii T, Watanabe M : The use of traditional and newer calcineurin inhibitors in inflammatory bowel disease. **J Gastroenterol**. 46: 129-137, 2011 査読有, DOI : 10.1007/s00535-010-0352-z

10. Naganuma M, Watanabe M, Hibi T : Safety and usefulness of balloon endoscopy in Crohn's disease patients with postoperative ileal lesions. **J Crohns Colitis**. 5 : 73-74, 2011 査読有, DOI : 10.1016/j.crohns.2010.10.003

11. Nagahori M, Hyun SB, Totsuka T, Okamoto R, Kuwahara E, Takebayashi T, Naganuma M, Watanabe M : Prevalence of metabolic syndrome is comparable between inflammatory bowel disease patients and the general population. **J**

Gastroenterol. 45: 1008-1013, 2010 査読有, DOI : 10.1007/s00535-010-0247-z

12. Naganuma M, Ichikawa H, Inoue N, Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Hibi T : Novel endoscopic activity index is useful for choosing treatment in severe active ulcerative colitis patients. **J Gastroenterol**. 45 : 936-943, 2010 査読有, DOI : 10.1007/s00535-010-0244-2 (邦文)

13. 永石宇司、渡辺守、他. IBD モデルにおける病原性 T 細胞の分化増殖は IL-7 と NK 細胞によって制御される. 消化器と免疫 49; 35-38, 2012 査読無

14. 鈴木雅博、永石宇司、渡辺守. IBD とサイトカイン-ケモカイン. *G.I.Research* 20(5); 53- 64, 2012 査読無

15. 鈴木雅博、永石宇司、渡辺守. ここまでわかった自己免疫疾患- Crohn 病・潰瘍性大腸炎. 臨床検査 臨時増刊号 55 (11); 1258-1264, 2011 無

16. 永石宇司、渡辺守. 分泌メディエーターはヒトマクロファージにおける Nod2 誘導性寛容を調節する. *Review of Gastroenterology & Clinical Gastroenterology and Hepatology* 6 (2);12-16, 2011 査読無

17. 永石宇司、山地統、渡辺守. 腹部症状発現メカニズム解明への臨床的アプローチ: 腸内細菌、炎症と腹部症状. *Modern Physician* 31: 310-313, 2011 査読無

[学会発表] (計 20 件)
(国際学会)

1. Nagaishi T, Watanabe M et al. Natural killer cells regulate the early stage of pathogenic T cell development in a murine model of colitis. *Immuno* 2013. 2013.3.11. Barcelona

2. Nagaishi T, Watanabe M et al. Natural killer cells suppress an animal model of colitis by targeting the early stage of pathogenic T cell development. 日本免疫学会総会 2012. 2012 年 12 月 5 日 Kobe

3. Nagaishi T, Watanabe M et al. Natural killer cells suppress an animal model of IBD by targeting the early stage of pathogenic T cell development. *Asian IBD Symposium* 2012. 2012 年 11 月 3 日. Seoul

4. Nagaishi T, Watanabe M et al. Natural killer cells regulate colitis by targeting the early stage of pathogenic T cell development. *Federation of Clinical Immunology Societies* 2012. 2012 年 6 月 22 日. Vancouver

5. Yui S, Nakamura T, Nagaishi T, Watanabe M et al. Regeneration of damaged colon epithelium by transplanted colon Lgr5+ stem cells maintained and expanded in vitro. 幹細胞シンポジウム. 2012 年 6 月 1 日. Awajishima

6. Naganuma M, Watanabe M et al. Serological test and vaccinations for Measles, Mumps, Rubella, and Varicella Zoster deserve considerations as early as possible after diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. UEGW 2011.10.25. ストックホルム
7. Nagaishi T, Yamaji O, Watanabe M, et al. Natural killer cells suppress a murine model of colitis by targeting the early stage of T cell development. 国際粘膜免疫学会議. 2011. 7. 7. パリ
8. Yui S, Nakamura T, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Regeneration of damaged colonic tissue by transplanted colonic epithelial stem cells maintained and expanded in vitro. GI Research Academy. 2011.6.17. 京都
9. Yui S, Nakamura T, Nagaishi T, Okamoto R, Watanabe M, et al. Regeneration of damaged colonic tissue by transplantation of colonic epithelial stem cells maintained and expanded in vitro. アメリカ消化器病学会. 2011.5.7. シカゴ
10. Yamaji Y, Nagaishi T, Watanabe M, et al. NK cells regulate CD62L⁺ CD44⁻ T cell subset in the development of pathogenic T cells in a murine model of colitis. アメリカ消化器病学会. 2011.5.7. シカゴ
11. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. TNF- α /NF- κ B pathways in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. The 4th Japan and US Collaboration Conference in Gastroenterology. 2010.11.18. 東京
12. Yui S, Nagaishi T, Okamoto R, Watanabe M, et al. A well-defined culture system for colonic epithelial cells that allows efficient enrichment of LGR5⁺ stem cells. The 1st JSGE International Topic Conference -Stem cells in digestive organs. 2010.9.26. 鎌倉
13. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. TNF path-way in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. 国際免疫学会議. 2010.8.25. 神戸
14. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Myosin light chain kinase is associated with disruption of epithelial tight junction in an animal model of colitis-associated tumor. アメリカ臨床免疫学会. 2010.6.25. ボストン
15. Onizawa M, Nagaishi T, Watanabe M, et al. Myosin light chain kinase is associated with disruption of epithelial tight junction in colitis-associated tumor. アメリカ消化器病学会. 2010. 5.2. ニューオリンズ
(国内学会)
16. 永石宇司, 渡辺守, 他. Natural killer cells suppress an animal model of IBD by targeting the early stage of pathogenic T cell development. 日

本臨床免疫学会総会 2012. 2012年9月27日. 東京

17. 永石宇司, 渡辺守, 他. 慢性大腸炎モデルにおける腸炎惹起性 T 細胞の増殖は IL-7 と NK 細胞により制御される. 日本消化器免疫学会総会 2011. 2012年7月6日. 鹿児島

18. 山地統, 永石宇司, 渡辺守, ほか. マウス腸炎モデルにおける腸炎惹起性 CD4⁺ T 細胞の増殖は IL-7 と NK 細胞により制御される. 日本消化器病学会大会. 2011.10.20. 福岡

19. 長沼誠, 渡辺守 他. 本邦における IBD 患者の妊娠・出産の転帰に関する検討. 日本消化器病学会総会. 2011.5.14. 東京

20. 長沼誠, 渡辺守 他. 免疫調節薬・抗体製剤使用 IBD 患者におけるインフルエンザ感染症の現状. 日本消化器病学会総会. 2011.5.13. 東京

[図書] (計2件)

1. 永石宇司, 渡辺守. 医学書院. 炎症性腸疾患: 腸管粘膜免疫の特殊性. 2010. 267-282

2. 永石宇司, 渡辺守. シナジー. 臨床粘膜免疫学: 潰瘍性大腸炎. 2010. 218-232

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 大腸上皮幹細胞の単離・培養技術とこれを用いた大腸上皮移植技術

発明者: 渡辺守・中村哲也

権利者: 国立大学法人東京医科歯科大学

種類: 特願

番号: 2011-236469

出願年月日: 平成23年10月27日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/gast/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長沼 誠 (NAGANUMA MAKOTO)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 00265810

(2) 研究分担者

永石 宇司 (NAGISHI TAKASHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60447464

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)

東京医科歯科大学・

大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 10175127

(3) 連携研究者

なし