

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790776

研究課題名（和文）Notchリガンド・受容体システムによる腸管粘膜維持再生機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of maintenance and repair mechanism of the intestinal mucosa by the Notch ligand-receptor system

研究代表者

森尾 純子（秋山純子）（MORIO JUNKO（AKIYAMA JUNKO））

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70581297

研究成果の概要（和文）：

マウス正常腸管及び炎症腸管におけるNotchリガンド分子の発現解析を行い、正常・炎症の両腸管でDLL1, DLL4及びJAG1のmRNA発現を認め、更にDLL1及びDLL4はいずれも腸管上皮に発現していた。腸管上皮幹細胞特異的にDLL1及びDLL4を欠損したマウス腸上皮に於いて、分泌型細胞への明らかな分化偏位を認め、腸管においてDLL1及びDLL4が機能的な役割を担っている事を示す重要な知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Analysis of normal and inflamed intestinal mucosa of mice revealed that mRNA of Notch ligands, DLL1, DLL4 and JAG1, is expressed within those tissues. Further analysis by immunohistochemistry showed that DLL1 and DLL4 are surely expressed in intestinal epithelial cells. Targeted disruption of DLL1 and DLL4 in intestinal stem cells clearly shifted the differentiation of intestinal epithelial cells towards secretory lineage cells, which clearly demonstrated that DLL1 and DLL4 surely has an indispensable functional role within the intestinal epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・下部消化管学（小腸、大腸）

キーワード：炎症性腸疾患、Notch シグナル、腸管上皮、分化制御、杯細胞

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎およびクローン病）は、わが国において急速な患者数の増加のみならず、既存の治療に不応・抵抗性の「難治化」が同時に進行していることから、同疾患に対する新規治療法の開発・普及は緊急の課題であり国民的要請である。これら腸疾患に於いて特徴的かつ本質的な病態である上皮細胞層の欠損・潰瘍形成は「上皮粘膜バリア機能の破綻」のみならず消化・吸収・ホルモン分泌・免疫調節といった「汎粘膜機

能の破綻」を通じ、疾患の治療抵抗性・難治化に直結する病態であることが近年明らかにされつつある。しかしながら、同疾患における粘膜再生・再構築の分子機構については未だ全く不明であり、従って損傷粘膜の再生・再構築に着目した疾患治療の研究・開発は皆無である。

研究代表者らは腸管杯細胞の分化メカニズムと粘膜再生を制御する分子機構の解明を行い、1) ヒト杯細胞分化と細胞増殖が転写因子 ATOH1 で相反的に制御されていること

(Gastroenterology, 2007)、2)同時にヒト杯細胞分化と細胞増殖はNotchシグナルの活性化により規定されていることを明らかとした(Am J Physiol, 2010)。

さらに研究代表者はこれら研究成果をさらに発展させる知見として、ヒト腸管上皮におけるNotchリガンドの発現と分化制御機構について追求し、1)NotchリガンドJagged1が細胞系譜非特異的に、Dll1/4が細胞系譜特異的に発現していること、Dll1の発現が細胞内Notch活性依存的に調節され、これがATOH1を介した杯細胞形質の獲得に必要な不可欠の分子機能を有していること、を明らかとした(BBRC, 2010)。これはNotchリガンド・受容体システムがヒト腸管に於いて機能を有する事を世界に先駆けて明確に示したのみならず、腸管に於いて発現する個々のNotchリガンド分子が各々独自の役割を担う事により、上皮組織の恒常性と再生応答の両者を統合するNotchリガンド・受容体システムを構成している可能性を示した重要な知見と考えている。しかしながら、これら個々のNotchリガンドの腸管上皮における更に詳細な発現分布、並びに腸管上皮の恒常性維持に果たしている機能的意義、については明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では従って腸管上皮における「Notchリガンド・受容体システム」に着目し、「Notchシグナル活性化」を規定する腸管特異的リガンド分子の分子特異的な生体内機能に関し検討を加えることを目的とした。具体的には、1)正常腸管及び炎症腸管粘膜におけるNotchリガンド分子の発現解析、2)Notchリガンド分子発現の臓器選択的破綻による生体表現型(in vivo)の解析、を行った。

3. 研究の方法

① 正常腸管及び炎症腸管粘膜におけるNotchリガンド分子の発現解析

マウス正常腸管(小腸及び大腸)を用い、定量的RT-PCR法で組織中のmRNA発現量を解析した。また上記手法で発現の可能性が考えられた各リガンド分子について、特異的抗体を用いた免疫染色法により、各組織内における発現細胞の局在の同定を試みた。同定された発現細胞については、各種分化マーカーとの2重染色法で解析を加える事により、発現細胞種の分類を可及的に試みた。

更に、炎症腸管粘膜における発現分布変化の有無を明らかにするため、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)投与により被験マウスに誘発したDSS腸炎の各時相において腸管組織を回収し、上記により確立した免疫組織学的手法により、発現解析を行った。

② Notchリガンドの腸管上皮及び幹細胞選択的破綻による生体表現型の解析

腸管上皮特異的な遺伝子欠損による表現系解析のため、T3b遺伝子プロモーター下流にCreリコンビナーゼをコードした遺伝子を導入したマウス(T3b-Creトランスジェニックマウス)を用いた。レポーターマウスを用いた事前の解析により、同マウスによるCre依存的な組換えが腸管上皮に限局して誘導される事を確認している。更に、腸管上皮幹細胞特異的な遺伝子欠損による表現系解析のため、LGR5遺伝子領域のLGR5コード領域をEGFP遺伝子、IRES(Internal Ribosome Entry Site)及びCreERT遺伝子(Cre遺伝子とヒトエストロゲン受容体遺伝子の一部を連結した融合遺伝子)にて置換したノックインマウス(LGR5-EGFP-IRES-CreERTマウス)を用いたこれらCre発現マウスと、Dll1及びDll4の各遺伝子領域内にlox-P配列を挿入したfloxedマウス(Dll1-floxed及びDll4-floxedマウス、東海大学・穂積勝人准教授より供与)と交配し、作出したマウスを解析に用いた。LGR5-EGFP-IRES-CreERTマウスの解析にあたっては、解析前にタモキシフェンを5日間連続して腹腔内投与した。同マウスの解析に当たり、腸管組織の回収を行う最適な時期を同定するため、レポーターアレルを持つマウスと交配し作出したマウスを用い、タモキシフェンによる遺伝子組換え誘導から異なる時期にレポーター遺伝子の発現領域を検討した。これらマウスの解析は、いずれも腸管組織を用いた免疫組織学的手法にて検討した。

4. 研究成果

① 正常腸管及び炎症腸管粘膜におけるNotchリガンド分子の発現解析

- 1) マウス正常腸管組織におけるNotchリガンド分子のmRNA発現をRT-PCR法で解析した結果、小腸及び大腸に於いてDLL1, DLL4, JAG1の発現を認めた。免疫染色による発現解析の結果、DLL1及びDLL4はいずれも腸管上皮に発現し、絨毛・陰窩軸に沿って異なる分布を呈していた。更にこれらDLL1及びDLL4陽性細胞は、i)一部の分画はKi67陽性であり、ii)杯細胞マーカーMUC2、内分泌細胞マーカーCgA、タフト細胞マーカーDCAMKL1と共局在する細胞分画を認め、分泌型細胞形質を獲得しているものと考えられた。
- 2) DSS腸炎モデルの炎症粘膜に於けるDLL1及びDLL4陽性細胞の動態を解析した結果、炎症・再生過程の粘膜でDLL陽性上皮細胞数が著増している事が示された。

② Notchリガンドの腸管上皮及び幹細胞選択的破綻による生体表現型の解析

腸管上皮特異的プロモーターT3bの制御下に遺伝子欠損を誘導可能なマウス系統を樹立し腸管上皮特異的に各リガンド分子を欠損させた際の生体表現型の解析を行い、以下の結果を得た。

1) 腸管上皮特異的にJAG1を欠損したマウスは正常の発達・成長を示し、腸管上皮の細胞構成に於いても明らかな表現型を認めなかった。

2) 腸管上皮特異的にDLL1を欠損したマウスでは十二指腸～上部空腸にかけ、野生型と比較し約50%の杯細胞数増加を認めた。

腸管上皮幹細胞特異的遺伝子LGR5のコード領域をCreリコンビナーゼに置換したノックインマウス(LGR5-EGFP-IRES-CreERTマウス)を用い、腸管上皮幹細胞特異的にリガンド分子を欠損させた際の生体表現型の解析から、以下の結果を得た。

3) 腸管上皮幹細胞特異的にDLL1及びDLL4を欠損したマウスは、タモキシフェンによる遺伝子組み換え誘導開始から10日目には幹細胞ニッチの構成に変化を認めなかった。

4) 一方、腸管上皮幹細胞特異的にDLL1及びDLL4を欠損したマウスは、タモキシフェンによる遺伝子組み換え誘導開始から10日目には杯細胞・内分泌細胞・タフト細胞の3系統の細胞の著しい増加を認め、分泌型細胞への明らかな偏位を認めた。

上記の各成果は、腸管上皮幹細胞からの分化制御及び炎症粘膜における再生応答に於いて、DLL及びDLL4が機能的な役割を担っている事を示す重要な知見と考えている。

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2件)

1. Ohyagi M, Ohkubo T, Yagi Y, Ishibashi S, Akiyama J, Nagahori M, Watanabe M, Yokota T, Mizusawa H. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in a patient with Crohn's disease. Intern Med. 52(1), 125-128 (2013). 査読有
DOI:10.2169/internalmedicine.52.8452
2. Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada

E, Suzuki S, Akiyama JM, Fujii T, Okamoto R, Watanabe M. Endoscopic ultrasound with double-balloon endoscopy for the diagnosis of inverted Meckel's diverticulum: a case report. *J Med Case Rep.* 6(1), 328(2012). 査読有
DOI:10.1186/1752-1947-6-328

[学会発表] (計5件)

1. 武井ゆりあ、吉野耕平、東 正新、藤木純子、藤井俊光、森尾純子、齊藤詠子、櫻井 幸、中川美奈、大岡真也、長堀正和、土屋輝一郎、渡辺 守、裴有安、小林大輔：非典型的な画像所見を呈し診断に難渋した転移性肝血管肉腫の一例 第319回日本消化器病学会関東支部例会 東京，2012年5月26日
2. 長堀正和、藤井俊光、齊藤詠子、森尾純子、長沼 誠、渡辺 守：炎症性腸疾患患者における抗TNF α 受容体拮抗薬の選択に関する研究 第98回日本消化器病学会総会 東京，2012年4月21日
3. 藤井俊光、齊藤詠子、森尾純子、長堀正和、長沼 誠、渡辺 守：難治性潰瘍性大腸炎に対するTacrolimus静注療法の有用性と安全性の検討 第98回日本消化器病学会総会 東京，2012年4月21日
4. Shimizu H, Ryuichi Okamoto, Tatsuro Murano, Go Ito, Satoru Fujii, Morio-Akiyama Junko, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe: Identification of Notch ligand expressing cells in normal and inflamed intestinal mucosa.

Asian IBD Symposium Seoul 2012.

Seoul, 2012年11月3日

5. Ryuichi Okamoto, Morio-Akiyama Junko, Hiromichi Shimizu, Tatsuro Murano, Go Ito, Satoru Fujii, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe: Notch pathway and TNF- α synergistically up-regulates OLFM4 expression in the inflamed mucosa of the human intestine. Asian IBD Symposium Seoul 2012. Seoul, 2012年11月3日

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 森尾 純子 (秋山純子)
(MORIO JUNKO (AKIYAMA JUNKO)) 東京医
科歯科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70581297

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし