

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23102003

研究課題名(和文)生体センサー腸上皮によるバイオスクリーニング法の開発

研究課題名(英文)Development of a bio-screening method using intestinal epithelial cells

研究代表者

岡本 隆一(Okamoto, Ryuichi)

東京医科歯科大学・再生医療研究センター・教授

研究者番号：50451935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らが独自に有する正常腸管上皮培養法を展開することにより、腸上皮幹細胞やその娘細胞を可視化する技術としてレンチウイルスを用いた幹細胞標識法や遺伝子改変マウスを利用した特定の娘細胞系譜の可視化に関する技術を確立した。また、腸管特異的機能に関する生物学的活性を簡便かつ定量的に測定可能な評価系としてP-glycoproteinの基質輸送を可視化・定量する系に加え、体液調節機能(水・電解質調節機能)についても定量的な測定系を確立した。腸管上皮幹細胞の増殖・分化を制御する天然物リガンドのスクリーニング系としてA02班の石橋教授との共同研究を通じ、Notch受容体経路の活性測定系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Based on our culture method for primary human intestinal cells, we developed methods by which we can visualize and trace stem cells by lentiviral infection, or visualize their daughter cells through genetic modification in mice. Also, we developed our quantitative measurement system to evaluate the fluid/anion transport by intestinal epithelial cells, in addition to the system dedicated to measure the function of P-glycoprotein. Finally, through our collaborative work with professor Ishibashi of A02 group, we established an activity measurement system for Notch-receptor mediated signaling.

研究分野：消化器内科

キーワード：腸管上皮 初代培養 天然物リガンド 生体活性評価

1. 研究開始当初の背景

腸管は消化・吸収を司る主たる臓器であるばかりではなく、人体最大の免疫・末梢血管・末梢神経組織を有し、多くの神経・消化管ホルモンを分泌する巨大な内分泌器官でもあることから、腸管の機能が即ち全身の恒常性を支配していると言っても過言ではない。研究代表者らは前記概念を発展させ、腸管を構成する主たる組織であり2-3日という生体内で最も短い周期で更新される腸上皮は、「全身のホメオスタシスを監視・統合・決定する生体センサーの役割を担っている」という仮説を立て、これに基づく独自の研究成果を提示してきた。即ち腸上皮が全身免疫応答と組織再生の司令塔の役割を果たす事を独自に提唱してきた。

さらに、研究代表者らは腸上皮の機能と恒常性を維持する「幹細胞システム」に着目し、幹細胞が増殖・分化を繰り返し、種々の分化形質を有する細胞群から成る立体構造を構築し維持する同システムが病的環境、即ち組織修復及び発癌において如何なる機能的変容を来しているか、追求してきた。この成果から、「幹細胞システム」を構成するシグナル・分子を機能的にモニターする事により、生体恒常性の破綻から回復に至る過程を簡便且つ鋭敏に検出する「センサー細胞」として、腸上皮細胞の有用性を追求してきた。

しかしながらこれまで腸上皮を用いた生体応答の研究は、大腸癌由来株化細胞を用いた解析に止まり、真に正常な腸上皮細胞による「幹細胞システム」維持機構や、天然物リガンドを初めとする外的因子への曝露に対する正常腸上皮細胞の細胞応答を解析し得た例は皆無であった。これは、正常腸上皮を体外で純化・培養する技術、即ち正常腸管上皮細胞の初代培養技術が、世界的な試みが成されていたにもかかわらず全く未確立であったことに起因する。研究分担者らは3年を超える基礎検討の結果、正常腸管上皮細胞を効率よく単離し、無血清かつ無フィーダー条件で、単層上皮細胞で構成されるオルガノイド構造として長期培養しうる画期的手法をマウス・ヒトで確立した。同方法により、正常腸上皮機能を保持した腸上皮オルガノイドを1年以上の長期に渡り継代・維持可能であるのみならず、例えば消化管内視鏡生検体の様な微小ヒト検体から培養・増殖することも可能となる画期的新技術である。

2. 研究の目的

本研究では上記概念に基づき、画期的技術として開発に成功した正常腸上皮初代培養技術を用い、これを領域内2班・3班との連携の下、研究対象となる天然物リガンド及び超活性単純化アナログの生体活性評価へと応用・展開することを目的とした。これにより、従来全く不可能であった、正常腸管上皮の機能制御に焦点を当てた生体活性機能評価系・高効率スクリーニング系を確立し、疾患発症前の生体恒常性維持機構へと生物学的評価の領域を飛躍的に広げた画期的バイオスクリーニング法の実現を目指した。本研究の推進により、正常腸管上皮の機能を司る「腸上皮システム」に対する個々の天然物リガンドが与える生理活性機能を迅速・高効率に評価可能とするのみならず、同システムの制御機構理解

にも大きなインパクトを与えることが期待される。さらに腸上皮を起点とした全身恒常性の制御機構の解明、同機構を調節する天然物リガンド及び超活性単純化アナログの探索・同定を通じ、これまで全く不可能であった、疾患発症阻止を目標とする「未病」の概念に基づく高効率・高精度のリガンド生体活性スクリーニング法の創出へと発展する事が期待される。

3. 研究の方法

本計画研究では研究代表者らが独自に有する前記の正常腸管上皮培養法を生物学的活性評価系へと応用展開し、これを通じて正常腸管上皮の分化・増殖・特異的機能について制御活性を有する新規天然物リガンドを探索し、標的分子の同定を目指した。具体的には、以下に大別されるプロジェクトを挙げ、解析・検討を推進した。

(1) 腸管上皮幹細胞及びその娘細胞の可視化：培養腸上皮オルガノイド構成過程における幹細胞あるいはその娘細胞をリアルタイムで追跡可能な培養オルガノイドを樹立することにより、同過程の制御活性を有する天然物リガンドスクリーニングが実施可能となる系の構築を試みた。具体的には腸上皮幹細胞特異的遺伝子LGR5ロカスにおけるコード領域をEGFP-ires-CreERT2に置換した

LGR5-EGFP-CreERT2マウスを用い、同マウスの腸管を用いた腸上皮オルガノイド培養を行うことにより、EGFPを指標とした腸上皮幹細胞のリアルタイム追跡が可能であるか、検討した。更にROSA26アリルにloxP-STOP-loxP-tdTomatoコンストラクトを挿入したトランスジェニックマウスとの交配により作出したマウスから培養オルガノイドを作製することにより、幹細胞から分裂増殖する細胞の動態をリアルタイムで追跡可能な系の構築を試みた。

(2) 腸管特異的機能に関する生物学的活性を簡便・定量的に測定可能な評価系の構築：腸上皮が有する特異的機能のうち、本研究計画に於いては薬物排泄機能、水・電解質調節機能に焦点を当て、両機能についてマウス及びヒト培養腸上皮オルガノイドを用いて定量的かつ簡便に評価可能な系の構築を試みた。

(3) 腸上皮幹細胞の増殖・分化を制御する天然物リガンドのスクリーニング：腸上皮幹細胞の「幹細胞性」を維持する主たる分子機構であるNotchシグナルに特に焦点を当て、腸上皮において同シグナルの制御活性を有する天然物リガンドの探索を行った。

4. 研究成果

(1) 腸管上皮幹細胞及びその娘細胞の可視化：LGR5-EGFP-CreERT2 マウスの腸管を用いたオルガノイド培養を行い、幹細胞特異的に発現するEGFPを指標としたリアルタイム追跡を行った結果、小腸・大腸いずれにおいてもオルガノイド培養条件下においてEGFPの発現が保持され、タイムラプスイメージングにより追跡可能であることが明らかとなった。更に異なる増殖因子・添加因子の組み合わせによる培養条件検討を行った結果、R-Spondin1、Wnt3a、BSA、EGF、HGF、Nogginを含む独自の培地組成にて培養を実施することにより、EGFP陽性細胞を高密度に保持したオルガノイドとして培養維持が可能であることを明らかとした (Yui S. *et al.* *Nat. Med.*

2012, 18, 618-623)。一方、レンチウイルスを用い、オルガノイドを構成する細胞をランダムに蛍光標識した後、経時的に追跡することにより、正常腸上皮幹細胞間の「不均一さ (heterogeneity)」を描出可能であることも示している (Horita N. *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 454, 493-499)。さらに上記マウスと ROSA26 アリルに loxP-STOP-loxP-tdTomato コンストラクトを挿入したトランスジェニックマウスとの交配により作出したマウスよりオルガノイド培養を行い、タモキシフェンによる誘導下に経時的な追跡を行った結果、幹細胞から分裂・増殖する娘細胞の可視化・追跡が可能であることも明らかとしている (投稿準備中)。

(2) 腸管特異的機能に関する生物学的活性を簡便かつ定量的に測定可能な評価系の構築

薬物排泄機能評価系の構築：腸上皮特異的機能の1つである薬剤排泄機能に着目し、その主たる機能を担う P-glycoprotein の基質輸送を可視化・定量する系の構築を実施した。その結果、蛍光基質である Rhodamine123 を培地に添加することにより、時間依存的に正常腸管上皮で構成されるオルガノイド内腔に集積し、これを指標とした排泄能の定量化が可能であることを明らかとした (Mizutani T, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2012, 419, 238-243)。同定量系に P-glycoprotein の阻害剤である verapamil を添加すると、濃度依存的に集積が抑制されることも確認済みであり、従って同測定系を用いた P-glycoprotein 依存的輸送を調節する天然物リガンドの探索が可能となる系の構築に成功したものと考えている。水・電解質調節機能評価系の構築：腸上皮が有するもう一つの機能である体液調節機能(水・電解質調節機能)についても定量的な測定系の構築を試みた。腸上皮による能動的な水排泄は主に基底膜(basal)側から頂端(apical)側への Cl⁻イオンの輸送により担われているが、従来法では困難であった「上皮層を介した水の移動」の可視化・定量化を実現するため、ヒト腸上皮オルガノイドにおける「Swelling (膨張)」現象を利用し、これを簡便・迅速に定量化する系の構築を試みた。同現象はリガンド活性依存的な水の移動により 3次元構造体であるオルガノイド内腔が膨張する現象であるが、3次元スキャナーを用いて培養ウェル内の各オルガノイドの膨張過程を経時的に記録し、断面積の変化を追跡した結果、同スキャナーによる画像記録と解析により、簡便かつ迅速に「上皮層を介した水の移動」の定量的な評価が可能であることが明らかとなった。同法を用い、複数の天然物リガンド・内因性生理活性物質に対する応答を解析した結果、PGE₂ と並び、*Coleus forskohlii* より抽出された化合物として知られる Forskolin が、ヒト小腸及び大腸上皮に直接作用し、強力な水・Cl⁻排泄促進活性を有することが明らかとなった (Fujii S, in revision)。3次元スキャナーを用いた同法は 96 ウェル・フォーマットでも容易に Swelling 現象の評価・解析が可能であることから、多数の候補リガンドから、ヒト腸上皮による水・Cl⁻排泄促進活性を有する天然物リガンドのスクリーニングを行い得る評価系を構築したものと考えている。

(3) 腸管上皮幹細胞の増殖・分化を制御する天然物リガンドのスクリーニング：研究代表者らによるこれまでの研究から、腸管上皮幹細胞の分化・増殖を制御する主要な分子シグナル系として Wnt 及び Notch シグナルが重要であることが示されている。これら知見に基づき、Notch 受容体経路に着目し、同経路の活性測定系を構築するため、A02 班の石橋教授との共同研究を実施した。同研究において、テトラサイクリン依存的に活性型 Notch 受容体を強制発現するヒト大腸上皮由来培養細胞に、RBP-Jk 依存的転写活性を高感度に検出可能なレポーターコンストラクトを恒常的に導入した細胞系の構築に成功した。同細胞を用いリガンド探索を実施した結果、Notch 受容体経路の調節活性を有する可能性のある複数の候補化合物が得られている。それらの中で、*Coleus forskohlii* より抽出された化合物として知られる Forskolin については、前記の水・Cl⁻排泄促進活性に加え、ヒト腸上皮における Notch シグナルの活性増強作用も有する可能性を示す結果が得られている。一方、A02 班の石橋教授においては、領域内共同研究として同系を用いることにより *Garcinia speciosa* および *Calotropis gigantea* からの Notch シグナル伝達阻害活性を有する天然物の探索を行い、神経幹細胞分化促進活性を有する候補化合物の同定に成功している。

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17件)

- 1 Okamoto R, Watanabe M: Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 51:11-21, 2016 査読有
DOI:10.1007/s00535-015-1098-4
- 2 Okamoto R, Watanabe M: Perspectives for Regenerative Medicine in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Digestion* 92:73-77, 2015 査読有
DOI:10.1159/000438663
- 3 Matsuzawa Y, Oshima S, Takahara M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Kobayashi M, Nibe Y, Nozaki K, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Ma A, Watanabe M: TNFAIP3 promotes survival of CD4 T cells by restricting MTOR and promoting autophagy. *Autophagy* 11: 1052-1062, 2015 査読有
DOI : 10.1080/15548627.2015.1055439
- 4 Fukushima K, Tsuchiya K, Kano Y, Horita N, Hibiya S, Hayashi R, Kitagaki K, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Oshima S, Nagaishi T, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Atonal homolog 1 protein stabilized by tumor necrosis factor α induces high malignant potential in colon cancer cell line. *Cancer Sci* 106:1000-1007, 2015 査読有
DOI : 10.1111/cas.12703
- 5 Matsuzawa Y, Oshima S, Nibe Y, Kobayashi M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: RIPK3 regulates p62-LC3

- complex formation via the caspase-8-dependent cleavage of p62. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 456:298-304, 2015 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2014.11.075
- 6 Murano T, Okamoto R, Ito G, Nakata T, Hibiya S, Shimizu H, Fujii S, Kano Y, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 promotes the IL-22-mediated antimicrobial response by enhancing STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 442:840-846, 2014 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.061
- 7 Horita N, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Kano Y, Mizutani T, Nemoto Y, Yui S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Fluorescent labelling of intestinal epithelial cells reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt. *Biochem Biophys Res Commun* 454: 493-499, 2014 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2014.10.091
- 8 Shimizu H, Okamoto R, Go Ito, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Murano T, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M: Distinct expression patterns of Notch ligands, Dll1 and Dll4, in normal and inflamed mice intestine. *PeerJ* 2: e370-e370, 2014 査読有
DOI : 10.7717/peerj.370
- 9 Suzuki M, Nagaishi T, Yamazaki M, Onizawa M, Watabe T, Sakamaki Y, Ichinose S, Totsuka M, Oshima S, Okamoto R, Shimonaka M, Yagita H, Nakamura T, Watanabe M: Myosin light chain kinase expression induced via tumor necrosis factor receptor 2 signaling in the epithelial cells regulates the development of colitis-associated carcinogenesis. *PLoS ONE* 9: e88369-e88369, 2014 査読有
DOI : 10.1371/journal.pone.0088369
- 10 Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Matsumoto S, Watanabe M: Th1/Th17-mediated interstitial pneumonia in chronic colitis mice independent of intestinal microbiota. *J. Immunol.* 190:6616-25,2013 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1202930
- 11 Go Ito, Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Fujii S, Nakata T, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Lineage-specific expression of bestrophin-2 and bestrophin-4 in human intestinal epithelial cells. *PLoS ONE* 8: e79693-e79693, 2013 査読有
DOI : 10.1371/journal.pone.0079693
- 12 Takahara M, Nemoto Y, Oshima S, Matsuzawa Y, Kanai T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Yamamoto K, Watanabe M: IL-7 promotes long-term in vitro survival of unique long-lived memory subset generated from mucosal effector memory CD4+ T cells in chronic colitis mice. *Immunol. Lett.* 156:82-93,2013 査読有
DOI : 10.1016/j.imlet.2013.09.001
- 13 Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4 memory T cells. *Gut* 62:1142-1152, 2013 査読有
DOI : 10.1136/gutjnl-2012-302029
- 14 Kano Y, Tsuchiya K, Zheng X, Horita N, Fukushima K, Hibiya S, Yamauchi Y, Nishimura T, Hinohara K, Gotoh N, Suzuki S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of malignant potential in colon cancer is regulated by the stabilization of Atonal homolog 1 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 432: 175-181, 2013 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2013.01.034
- 15 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 NK cell function in a murine model of colitis. *J. Immunol* 188: 2524-2536, 2012 査読有
DOI : 10.4049/jimmunol.1100371
- 16 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.* 419:238-43, 2012 査読有
DOI : 10.1016/j.bbrc.2012.01.155.
- 17 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. *Nat Med* 8:618-23, 2012 査読有
DOI : 10.1038/nm.2695.
- [学会発表](計31件)
- 1 Fujii S, Okamoto R, Nakata T, Suzuki K, Ishibashi F, Kawamoto A, Ohashi-Segawa S, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Establishment of a 3D cell culture-based screening platform to identify natural products that can regulate transepithelial water transport of the human gastrointestinal tract. *Pacificchem2015* Hawaii (U.S.A), 2015年12月17日
- 2 Shirasaki T, Fukushima K, Tsuchiya K, Hibiya S, Hayashi R, Horita N, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: TNF- α stabilizes atoh1 protein in colitis-associated colorectal cancer resulting in enhanced malignant

- potential. *UEGW2015* Barcelona(Spain), 2015 年 10 月 28 日
- 3 Shirasaki T, Fukushima K, Tsuchiya K, Hibiya S, Hayashi R, Horita N, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Atoh1 protein stabilized by TNF- α acquires enhanced malignant potential in colitis-associated colorectal cancer. *AOCC2015* Beijing(China), 2015 年 6 月 19 日
 - 4 Horita N, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Mizutani T, Okamoto R, Nakamura T and Watanabe M: A novel fluorescent labelling system into small intestinal organoid reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt. *AOCC2015* Beijing(China), 2015 年 6 月 19 日
 - 5 Suzuki K, Fujii S, Nakata T, Kawamoto A, Ishibashi F, Ohashi-Segawa S, Mizutani T, Tsuchiya K, Otsuka K, Nakamura T, Okamoto R, Watanabe M: Enrichment of Intestinal Stem Cells by the 3D-Culture of IBD Patient Derived Intestinal epithelium. *AOCC2015* Beijing(China), 2015 年 6 月 19 日
 - 6 Nakata T, Shimizu H, Suzuki K, Fujii S, Go Ito, Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Hozumi K, Watanabe M: Distinct Role of Notch Ligands, DLL1 and DLL4, in Normal and in Tumor Intestinal Epithelium. *DDW 2015* Washington, D.C (U.S.A), 2015 年 5 月 19 日
 - 7 Fukushima K, Tsuchiya K, Hibiya S, Hayashi R, Horita N, Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Atoh1 Protein Expression by TNF-a and the Acquisition of Malignant Potential in Colitis- Associated Colorectal Cancer. *DDW 2015* Washington, D.C (U.S.A), 2015 年 5 月 17 日
 - 8 Shimizu H, Suzuki K, Fujii S, Nakata T, Go Ito, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Hozumi K, Watanabe M: Notch Ligands DLL1 and DLL4 Are Expressed by Distinct Population of Epithelial Cells in the Mice Intestine. *DDW 2015* Washington, D.C (U.S.A), 2015 年 5 月 16 日
 - 9 Go Ito, Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Fujii S, Nakata T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch signaling and TNF- α synergistically up-regulates expression of OLFM4 in human intestinal epithelial cells. **第8回 Japan-US Collaboration Conference in Gastroenterology** ホテルインターコンチネンタル東京ベイ (東京都港区), 2014 年 11 月 21 日
 - 10 Okamoto R, Ito G, Shimizu H, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Watanabe M: Notch signaling regulates expression of gelsolin superfamily genes, gelsolin and scinderin and promotes re-assembly of actin cytoskeleton in human intestinal epithelial cells. *UEGW2014* Vienna(Austria), 2014 年 10 月 22 日
 - 11 Ito G, Okamoto R, Shimizu H, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch Signaling and TNF-alpha synergistically promotes intracellular protein accumulation of olfm4 in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *UEGW2014* Vienna(Austria), 2014 年 10 月 21 日
 - 12 Go Ito, Okamoto R, Shimizu H, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch signaling and TNF- α synergistically promotes intracellular protein expression of OLFM4 in human intestinal epithelial cells. *The 2nd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis* Seoul (Korea), 2014 年 6 月 21 日
 - 13 Shimizu H, Okamoto R, Go Ito, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Murano T, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M: Distinct Expression Patterns of Notch Ligands, DLL1 and DLL4, in Normal and Inflamed Mice Intestine. *The 2nd Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis* Seoul (Korea), 2014 年 6 月 21 日
 - 14 Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Ito G, Fujii S, Nakata T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: IL-22-mediated antimicrobial response is regulated by hes1 via stat3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. *UEGW 2013* Berlin(Germany), 2013 年 10 月 16 日
 - 15 Ito G, Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Lineage-specific expression of bestrophin-2 and bestrophin-4 is regulated by notch signaling in human intestinal epithelial cells. *UEGW 2013* Berlin(Germany), 2013 年 10 月 14 日
 - 16 Shimizu H, Okamoto R, Nakata T, Fujii S, Ito G, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Complete conversion of crypt progenitor cells into atoh1-positive cells by targeted deletion of dll1 and dll4 in lgr5-positive intestinal stem cells. *UEGW 2013* Berlin(Germany), 2013 年 10 月 14 日
 - 17 Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Go Ito, Fujii S, Tsuchiya K, Nakamura T, and Watanabe M: Hes1 promotes IL-22-mediated antimicrobial response through enhancement of STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. *The 1st Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis* ホテルラフォーレ東京 (東京都品川区), 2013 年 6 月 13 日
 - 18 Go Ito, Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Fujii S, Tsuchiya K, Nakamura T, and Watanabe M: Lineage-specific expression of bestrophin genes in normal and inflamed human intestine: implications for ulcerative colitis. *The 1st Annual Meeting of Asian Organization for Crohn's and Colitis* ホテルラフォーレ東京 (東京都品川区), 2013 年 6 月 13 日
 - 19 Go Ito, Okamoto R, Fujii S, Shimizu H, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch signaling regulates expression of Bestrophin-4, a novel enterocyte-specific HCO₃⁻/Cl⁻ channel, in human intestinal epithelial cells. *DDW 2013* Orlando (U.S.A), 2013 年 5 月 20 日
 - 20 Shimizu H, Okamoto R, Fujii S, Go Ito, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T,

- Watanabe M: Complete conversion of crypt progenitor cells into Atoh1-positive cells by targeted deletion of Dll1 and Dll4 in Lgr5-positive intestinal stem cells. *DDW 2013* Orlando (U.S.A), 2013年5月19日
- 21 岡本隆一、村野竜朗、渡辺 守：炎症性腸疾患における上皮再生機構の解明と粘膜再生治療への応用。第99回日本消化器病学会総会 城山観光ホテル（鹿児島県鹿児島市）2013年3月23日
- 22 Okamoto R, Go Ito, Fujii S, Shimizu H, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 promotes IL-22-mediated epithelial regeneration through enhancement of STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. *Asian IBD Symposium 2012* Seoul (Korea), 2012年11月3日
- 23 Okamoto R, Watanabe M: Notch pathway and TNF-a synergistically up-regulates OLFM4 expression in the inflamed mucosa of the human intestine. *Asian IBD Symposium Seoul 2012* Seoul (Korea), 2012年11月3日
- 24 Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. *ISSCR 2012* パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2012年6月14日
- 25 Yui S, Nakamura T, Okamoto R, Watanabe M, et al. Regeneration of damaged colon epithelium by transplanted colon Lgr5+ stem cells maintained and expanded in vitro. 第10回幹細胞シンポジウム 淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）, 2012年6月1日
- 26 Nemoto Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Colitogenic effector memory CD4+ T cells develop TH1/TH17 mediated interstitial pneumonia independent to intestinal antigens. *DDW 2012* San Diego (USA), 2012年5月22日
- 27 Tsuchiya K, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Flagellin response via TLR5 on basolateral membrane of primary intestinal epithelial cells is regulated by Notch signaling. *DDW 2012* San Diego (USA), 2012年5月22日
- 28 Murano T, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 promotes IL-22-mediated epithelial regeneration through enhancement of STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. *DDW 2012* San Diego (USA), 2012年5月19日
- 29 Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M, et al: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. *DDW 2012* San Diego (USA), 2012年5月19日
- 30 Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Notch signaling regulates expression of Gelsolin superfamily genes, Gelsolin and scinderin and promotes re-assembly of actin cytoskeleton in human intestinal epithelial cells. *DDW 2012* San Diego (USA), 2012年5月21日
- 31 Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Okamoto R, Tsuchiya K,

Watanabe M: Real-time analysis of p-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelial cells three-dimensionally cultured in vitro. *DDW 2012* San Diego (USA), 2012年5月19日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

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 再生医療研究センター
教授
研究者番号：50451935

(2) 研究分担者

中村 哲也 (Nakamura Tetsuya)
東京医科歯科大学 医歯学(薬)学総合研究科 寄附講座教授
研究者番号：70265809