

## 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：23790777

研究課題名（和文）Notchシグナル活性化幹細胞による腸管上皮再生機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of intestinal mucosal repair by Notch-activated stem cells

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）：

Notchシグナル活性化・腸管上皮幹細胞の可視化による上皮培養技術の開発に取り組み、Lgr5遺伝子の発現制御下にEGFPを発現するマウスの腸上皮を、幹細胞を豊富に含むオルガノイドとして安定して培養し得る技術を確立した。同オルガノイドにつき、腸炎モデルへの移植により、腸上皮を再構成し長期生着する事を確認した。上記成果は、腸上皮培養が上皮再生治療へも応用可能である事を示した重要な成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Through our studies aimed to develop a primary culture system of the intestinal epithelial cells, in which Notch-activated stem cell can be easily visualized, we succeeded to establish a culture method using the LGR5-EGFP mice. Using those mice, we found that the intestinal organoids that were maintained in our culture method contains high number of stem cells. In addition, transplantation of those organoids to a colitic mice model resulted in re-construction of the damaged epithelia by the organoids, which was maintained for a sustained time period. These results establish the basis for cell transplantation-mediated regeneration therapy for intestinal diseases.

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・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、Notchシグナル、腸管上皮、上皮幹細胞、粘膜再生

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎およびクローン病）患者は、国民生活・食習慣の欧米化を反映し増加の一途を辿っているのみならず、既存の治療が無効である「難治・不応例」の急速な増加も進行しており、同疾患に対する全く新しい概念に基づく治療法の開発・確立は急務である。これら腸疾患の治療において、これまで抗TNF- $\alpha$ 抗体治療をはじめとする強力な免疫調節治療が追求されてきたが、にも関わらず未だ難治・

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重要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上皮再生メカニズムを分子レベルで解明し、上皮構築のみならず粘膜機能の完全回復を目指した治療法の研究・開発は未だ皆無であった。

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）、同作用による杯細胞への分化誘導システムが粘膜再生に必須である

ことを示した (*Gastroenterology* 2005)。

また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を更に追求する過程で、ヒト腸管上皮細胞に於いて、転写因子 ATOH1 が Wnt-GSK3b 経路依存的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)。

研究代表者は杯細胞分化のマスター分子 ATOH1 をさらに上流で制御する Notch シグナルに着目し、1) 炎症性腸疾患の粘膜上皮では同シグナル活性化細胞が陰窩上皮の全長に渡り著しく増加すること、2) 同シグナル活性化上皮細胞の増加が即ち「杯細胞の欠失」と「PLA2G2A 産生」を誘導するのみならず、上皮再生に不可欠な細胞増殖促進・分化調節機能を果たしている事、3) 同シグナル活性化不全が即ち上皮再生不全と大腸炎の難治・重篤化に直結すること、を明らかとした (*Am J Physiol* 2009)。これは炎症性腸疾患病変部に於いて Notch シグナル活性化上皮細胞が上皮再生応答を促進・統御するマスター細胞群を構成し、迅速かつ秩序立った再生プロセスを駆動する「メインエンジン」として機能していることを示した重要な知見であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では従って炎症腸管粘膜上皮に於いて誘導される「Notchシグナル活性化上皮細胞」に着目し、同細胞が獲得する「再生粘膜幹細胞」機能につき、獲得における分子メカニズムと炎症粘膜修復機能に関する検討を目的とした。具体的には、1) Notchシグナル活性化維持・腸管上皮培養系の構築、2) 培養Notchシグナル活性化維持・腸管上皮オルガノイドの組織再生機能の解析、について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### ① Notchシグナル活性化維持・腸管上皮培養系の構築

腸管上皮幹細胞特異的遺伝子である Lgr5 のプロモーター制御下に EGFP-CreERT 融合タンパクを発現するマウス (LGR5-EGFP-IRES-CreERT マウス) を用い、腸上皮幹細胞を可視化した腸上皮初代培養系の構築を行った。樹立した培養法にて維持された腸上皮オルガノイド内で Notch シグナル活性化が維持されているか否かを  $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬を用いて検討した。さらに同マウスと DLL1、DLL4 の flox マウス (東海大学・穂積勝人准教授より供与) を交配することにより、幹細胞における欠損を誘導し、DLL1、DLL4 の発現分布、並びに生体表現型について解析を加えた。

### ② 培養Notchシグナル活性化維持・腸管上皮オルガノイドの組織再生機能の解析

前記にて確立した手法で培養した Notch シグナル活性化維持・腸管上皮オルガノイドが生体内に定着し、損傷粘膜の修復能を発揮し得るか否かについて、デキストラン硫酸 (DSS) による腸炎誘発モデル (DSS腸炎) を用い、同マウスモデルに対しオルガノイドを経肛門的に移植することにより、組織学的に検討を加えた。

## 4. 研究成果

### ① Notchシグナル活性化維持・腸管上皮培養系の構築

腸管上皮幹細胞特異的遺伝子である Lgr5 のプロモーター制御下に EGFP-CreERT 融合タンパクを発現するマウスを用い、以下の成果を得た。

- 1) 小腸及び大腸を安定して培養し得る独自の技術を確立したのみならず、LGR5-EGFP を指標とするライブイメージングにより、腸上皮幹細胞を豊富に含むオルガノイドとして長期培養が可能である事を明らかとした。
  - 2) 上記方法により培養したオルガノイドに Notch 活性化を阻害する  $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬を添加することにより、著しい杯細胞分化が誘導可能である事を明らかとした。即ち、本研究にて確立した培養法で維持されるオルガノイドは、恒常的な Notch 活性化により未分化な形質が維持されている事を明らかとした。
  - 3) 更に同マウスを用いて幹細胞特異的に Notch リガンド Dll1 並びに Dll4 を欠損させることにより、Notch 活性化阻害薬と同様の著しい杯細胞の増加と増殖帯の消失を誘導可能である事を明らかとした。
  - 4) これら Notch 活性化に必須と考えられるリガンド分子群は腸管上皮における異なる細胞集団に発現し、各々異なる役割を担っているものと考えられた。
- ### ② 培養Notchシグナル活性化維持・腸管上皮オルガノイドの組織再生機能の解析
- 上記方法にて体外にて維持したマウス大腸初代培養細胞オルガノイドにつき、腸炎モデルへの移植により組織再生修復能を検討し、以下の成果を得た。
- 1) 大腸上皮オルガノイドを DSS 腸炎モデルマウスに経肛門的に投与すると、粘膜欠損・潰瘍面に選択的に生着し得ることを確認した。同様の移植・生着は、単一の幹細胞から樹立した大腸上皮オルガノイドでも同様に可能であった。
  - 2) DSS 腸炎の臨床経過について、上記の移植により早期回復が得られ、腸管上皮移植

が炎症性腸疾患治療に有効である可能性を示す個体レベルでの知見を得た。

上記成果は、腸管上皮オルガノイドが上皮再生治療に有用であり、その培養増殖過程に D111 または D114 を介した Notch 活性化が必須の役割を担っている事を示す重要な成果であると考えている。

#### 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 10 件)

1. 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
2. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5 signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatology* in press. (2013). 査読有 DOI:10.1002/hep.26293
3. Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Kiichiro T, 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* in press. (2012). 査読有  
DOI:10.1136/gut.jnl-2012-302029
4. 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
5. 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(6): 2524-2536 (2012). 査読有  
DOI:10.4049/jimmunol.1100371
6. 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.* 18, 618-623 (2012). 査読有 DOI:10.1038/nm.2695
7. 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
8. Iwasaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Zheng X, Kano Y, Okamoto E, Okada E, Araki A, Suzuki S, Sakamoto N, Kitagaki K, Akashi T, Eishi Y, Nakamura T, Watanabe M. Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of Hath1 and Klf4. *J Gastroenterol.* 46: 191- 202 (2011). 査読有  
DOI:10.1007/s00535-010-0346-x
9. Nemoto Y, Kanai T, Shinohara T, Ito T, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Lipp M, Eishi Y, Watanabe M. Luminal CD4+ T cells penetrate gut epithelial monolayers and egress from lamina propria to blood circulation. *Gastroenterology.* 141:2130-2139, (2011). 査読有  
DOI:10.1053/j.gastro.2011.08.035
10. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe M. Suppression of

hath1 gene expression directly regulated by hes1 via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis.

*Inflamm Bowel Dis.* 11, 2251- 2260 (2011). 査読有

DOI:10.1002/ibd.21611

[学会発表] (計 16 件)

1. 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 鹿児島, 2013年3月23日
2. 村野竜朗、岡本隆一、渡辺 守：腸管上皮 Notch-Hes1 シグナルによる IL-22 誘導性抗菌応答の制御 第31回 サイトプロテクション研究会 京都, 2013年3月15日
3. Go Ito, Ryuichi Okamoto, Satoru Fujii, Hiromichi Shimizu, Tatsuro Murano, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe: Notch signaling regulates expression of Bestrophin-4, a novel enterocyte-specific HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> channel, in human intestinal epithelial cells. UEGW2012, Amsterdam, 2012年11月23日
4. Ryuichi Okamoto, Go Ito, Satoru Fujii, Hiromichi Shimizu, Tatsuro Murano, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe: Notch signaling and TNF- $\alpha$  synergistically up-regulate OLFM4 expression in human intestinal epithelial cells. UEGW2012, Amsterdam, 2012年11月23日
5. Hiromichi Shimizu, 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
6. Ryuichi Okamoto, Morio-Akiyama Junko, Hiromichi Shimizu, Tatsuro Murano, Go Ito, Satoru Fujii, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe: Notch pathway and TNF- $\alpha$  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
7. Okamoto R: Establishment of novel bio-screening methods using cultured intestinal epithelial cells. The 1st International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity. Kyoto, 2012年10月31日
8. Kano Y, Tsuchiya K, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. ISSCR2012. Yokohama, 2012年6月14日
9. Yui S, Nakamura T, Nemoto Y, Mizutani T, Fukuda M, Nozaki K, Yamauchi Y, Mochizuki W, Zheng X, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Regeneration of damaged colon epithelium by transplanted colon Lgr5<sup>+</sup> stem cells maintained and expanded in vitro. 第10回 幹細胞シンポジウム. 淡路島, 2012年6月1日
10. Nemoto Y, Kanai T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Matsumoto S, Watanabe M: Colitogenic effector memory CD4<sup>+</sup> T cells develop TH1/TH17 mediated interstitial pneumonia independent to intestinal bacterial antigens. AGA. San Diego, 2012年5月22日
11. Ryuichi Okamoto, Tatsuro Murano, Go Ito, Satoru Fujii, Hiromichi Shimizu, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe: 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, 2012年5月21日
12. 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. DDW2012. San Diego, 2012年5月21日

13. Tatsuro Murano, Ryuichi Okamoto, Go Ito, Satoru Fujii, Hiromichi Shimizu, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe: Hes1 promotes IL-22-mediated epithelial regeneration through enhancement of STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. DDW 2012, San Diego, 2012年5月19日
14. Kano Y, Tsuchiya K, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. DDW2012. San Diego, 2012年5月19日
15. Ryuichi Okamoto, Go Ito, Satoru Fujii, Hiromichi Shimizu, Tatsuro Murano, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe: Notch-Hes1 pathway and TNF- synergistically up-regulates OLFM4 expression in the inflamed mucosa of the human intestine. 6th Korea-Japan IBD Symposium, Tokyo, 2012年1月28日
16. Tatsuro Murano, Ryuichi Okamoto, Go Ito, Satoru Fujii, Hiromichi Shimizu, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Mamoru Watanabe: Hes1 promotes IL-22-mediated epithelial regeneration through enhancement of STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. 6th Korea-Japan IBD Symposium, Tokyo, 2012年1月28日

〔図書〕(計6件)

1. 岡本隆一、渡辺 守: Microscopic Colitis(顕微鏡的腸炎). Modern Physician 32: 1180-1180, 2012.
2. 森尾純子, 荒木昭博, 岡田英理子, 鈴木伸治, 土屋輝一郎, 藤井俊光, 長沼誠, 長堀正和, 江頭徹哉, 齊藤詠子, 福島啓太, 河合富貴子, 藤木純子, 櫻井幸, 根本泰宏, 中川美奈, 岡本隆一,

東正新, 柿沼晴, 永石宇司, 中村 哲也, 坂本直哉, 渡辺守, 河内洋, 江石義信: PD-3 確定診断困難な多発小腸潰瘍の1例栄養-評価と治療. 29(1): 76-77, メディカルレビュー社, 2012.

3. 伊藤 剛、岡本隆一、清水寛路、村野竜朗、水谷知裕、油井史郎、土屋輝一郎、中村哲也、渡辺 守: 腫瘍をめぐるQ&A(Question45) Lgr5 とは? (Q&A). Surgery Frontier. 19(2): 224-227, メディカルレビュー社, 2012
4. 岡本隆一、渡辺 守: 炎症と組織再生. Functional Food. 15(5): 52- 56, フジメディカル, 2011.
5. 岡本隆一、渡辺 守: 【炎症性腸疾患の診断と治療をめぐる新展開】炎症性腸疾患における粘膜修復機構. Mebio. 28:20-29, メジカルビュー社, 2011.
6. 中村哲也、岡本隆一、渡辺 守: 上皮細胞再生による腸炎治療戦略. Medical Science Digest. 37:22-24, ニューサイエンス社, 2011

〔産業財産権〕  
該当なし

〔その他〕  
該当なし

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・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  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし