

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09347

研究課題名(和文)炎症・発癌過程におけるDysbiosisが腸上皮幹細胞に与える影響の解明

研究課題名(英文)The effects of Dysbiosis on intestinal stem cells, inflammation, and cancer

研究代表者

神宝 隆行 (Shimpoh, Takayuki)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：90791591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：pks(+)E.coliの存在量を疾患別に比較し、健常者に比べて大腸腺腫・癌患者においては、pks(+)E.coli量が増加し、一方炎症性腸疾患患者ではpks(+)E.coliは逆に減少していた。Tgfr2欠損樹状細胞中ではCdh1遺伝子の発現が亢進していた。樹状細胞は上皮とカドヘリンタンパクを介して直接結合し、Notchの活性化を誘導することで腸炎の病態に関与していた。Notchの恒常的活性化によって内分泌系前駆細胞が幹細胞様細胞へ脱分化することがわかった。さらに、Apc遺伝子のノックアウトを併用することで、Notch活性型内分泌系前駆細胞が腫瘍起源細胞として働くことも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

E.coli中に含まれるpks island遺伝子の有無を大腸洗浄液中から非侵襲的に検出する方法を確立した。樹状細胞と上皮の相互作用をIn vitroでモニタリング可能な樹状細胞と上皮オルガノイドの共培養系を構築した。今回マウスモデルと臨床サンプルで同定した樹状細胞と上皮Notch経路、およびDysbiosisとの関連機構は、ヒトIBDの病態を理解する上で重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tested the positivity of E.coli with pks island sequence, and found that pks+ E.coli is increased in colorectal cancer patients, but decreased in IBD patients, compared to healthy control.

We demonstrated that Tgfr2-deficient dendritic cells have elevated expression of E-cadherin, and these DCs can directly bind to intestinal epithelial cells and activate Notch signaling, which contribute to the pathogenesis of colitis.

Notch activation in intestinal secretory progenitors lead to dedifferentiation into stem-like cells, and dedifferentiated progenitors can act as a tumor-initiating cells in the mouse intestine.

研究分野：消化器内科

キーワード：炎症性腸疾患 Dysbiosis Notch 消化管幹細胞 E-cadherin 樹状細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの発癌過程において、微生物による持続的慢性炎症が重要な役割を果たしている。特に消化器領域では、胃癌におけるピロリ菌や EB ウイルスの感染、肝癌におけるウイルス性肝炎、胆管癌における肝吸虫などがよく知られ

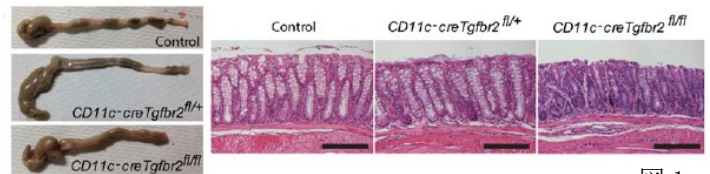


図 1

ている。大腸癌は炎症性腸疾患による慢性腸炎と密接な関連が指摘されているが、慢性腸炎が微生物感染あるいは腸内細菌叢の変化にどの程度影響を受けているのかは不明である。

申請者らは、マウスモデルを用いて、腸炎に重要な役割を果たす菌種群の同定に成功した (Ihara et al, J Immunol, 2016)。免疫応答に重要な樹状細胞特異的に Tgfb2 遺伝子をノックアウトしたマウスでは、小腸炎・大腸炎が自然発症する (図 1)。この炎症は抗菌剤投与によって消失することから、腸内細菌叢による影響が考えられるが、糞便中の細菌を 16S シークエンスによって網羅的に解析したところ、数ある細菌群の中で Enterobacteriaceae (E. coli) と Akkermansiaceae が選択的にかつ著明に増加していることがわかった (図 2)。すなわち、免疫応答の異常によって腸内細菌叢のバランスが崩れ (Dysbiosis)、それが炎症を引き起こすことを報告した。

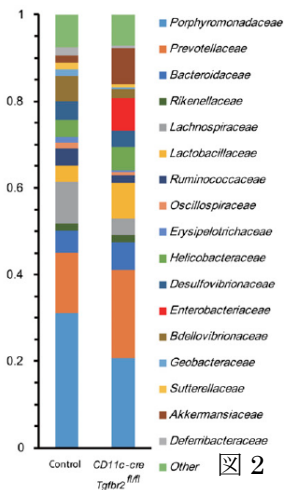


図 2

この考えのもとに、慢性腸炎・大腸腫瘍患者においてヒト腸内細菌叢の変化が生じている可能性を考え、申請者は学位論文の研究題目として、糞便中の大腸菌を単離・培養してその組成の解析を試みた。申請者はまず、患者腸内からできるだけ非侵襲的に細菌 DNA を採取する方法を樹立した。下部内視鏡検査時に、腸内洗浄液を経内視鏡的に回収し、洗浄液中に含まれる糞便から便中 DNA 培養キットによって高品質な DNA を採取するプロトコルを確立した。これらのデータから、本申請では下記に示す通り、消化管の炎症・発癌の病因としての腸内細菌叢の役割とその機序を、ヒトサンプルとマウスモデルを用いて解明することを目的とする。

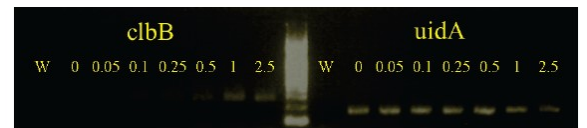


図 3

2. 研究の目的

- 1) 大腸炎・大腸癌患者の腸内細菌叢、特に E. coli 中に含まれる病原性遺伝子配列の可能性が報告されている pks island 遺伝子の変化を観察し、疾患別の比較検討を行う。
- 2) マウスモデルを用い、細菌叢の変化 (Dysbiosis) が腸上皮幹細胞の動態およびその後の腸炎・癌の発生に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

- 1) 内視鏡検査時に採取したヒト腸管洗浄液中糞便および粘膜から抽出した細菌 DNA 検体を用い、PCR 法によって pks island 遺伝子を保有する菌量を疾患別に比較する。
- 2) Lgr5 陽性幹細胞・Mist1 陽性前駆細胞を特異的に標識するマウスに Dysbiosis を生じさせ、幹細胞・前駆細胞の系譜追跡に与える影響を観察する。炎症・発癌モデルと組み合わせ、Dysbiosis 環境下での炎症・発癌への影響を観察する。

4. 研究成果

上述の腸管洗浄液中糞便からの DNA 抽出法を用い、104 名 (正常: 26、炎症性腸疾患: 6、腺

腫：37、癌：35) 分の便中細菌 DNA の採取に成功した。便中の E. coli 量を定量 PCR 及び段階希釈培養によって比較したものの、各疾患で有意な差はなかった。E. coli 中に含まれる病原性遺伝子配列の可能性が報告されている pks island 遺伝子 (Janelle C, Science, 2012) に着目し、pks(+)E. coli の存在量を比較した。pks island 遺伝子は、特異的配列を標識するプライマーにより検出可能であり、検出感度は粘膜生検からの抽出 DNA と腸管洗浄液中糞便 DNA の間に差はなかった (図 4)。疾患別では、大腸癌、大腸腺腫、および正常大腸の患者群でそれぞれ 4.3%、5.1%、4.6% が pks 陽性大腸菌を有しており、健常者に比べて大腸腺腫・癌患者においては、pks(+)E. coli 量が増加していることが分かった (図 5)。一方炎症性腸疾患患者では、pks(+)E. coli は逆に減少していた。年齢・性別・癌のステージなどで層別化を行なったが、群間で陽性率及び発現量に有意差を認めなかった (図 6)。このように pks 陽性大腸菌の有無を大腸洗浄液中から非侵襲的に検出する方法を確立できたため、国際科学誌 Gut Pathogen に報告した。

Table 1 Correlation between pks positivity in colonic lavage samples and biopsy samples

	Biopsy: pks-positive	Biopsy: pks-negative	Total
Colonic lavage: pks positive	3	1	4
Colonic lavage: pks negative	0	9	9
Total	3	10	13

図 4

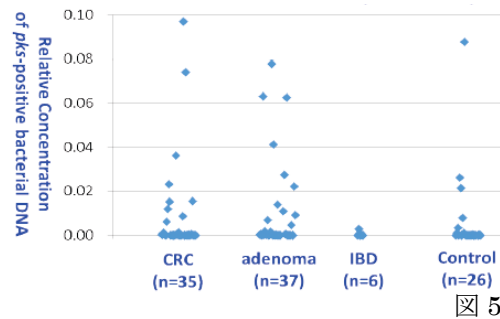


図 5

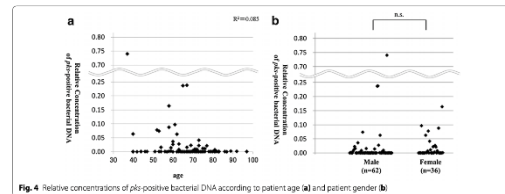


Fig. 4 Relative concentrations of pks-positive bacterial DNA according to patient age (a) and patient gender (b)

図 6

次に、マウスモデルを用いて腸管 Dysbiosis が腸粘膜の恒常性および腫瘍発生に及ぼす影響を解析した。すでに樹状細胞の Tgfbr2 シグナルの異常によって上皮中の Notch 経路の異常活性化がもたらされ、それによって炎症が促進されることを報告していたが、今回 Tgfbr2 シグナルの異常をもつ樹状細胞中の遺伝子発現を網羅的に解析することで、樹状細胞中の Cdh1 遺伝子の発現が亢進していることがわかった (図 7)。実際、Tgfbr2 シグナルの異常とともに Cdh1 遺伝子を樹状細胞中でノックアウトすることで、上皮中の Notch シグナルは減弱化し、腸炎の改善が認められた。In vitro の樹状細胞と上皮オルガノイドの共培養系を構築し、上皮中の Notch シグナルをモニタリングしたところ、樹状細胞と上皮がカドヘリンパクを介して直接結合することで、Notch が活性化することがわかった (図 8)。E-カドヘリンの中和抗体投与により、上皮中の Notch 活性化を抑え、腸炎を改善させることも可能であった。さらに、潰瘍性大腸炎患者の粘膜サンプルから抽出した樹状細胞では、E-cadherin の発現が上昇していることも確認した (図 9)。

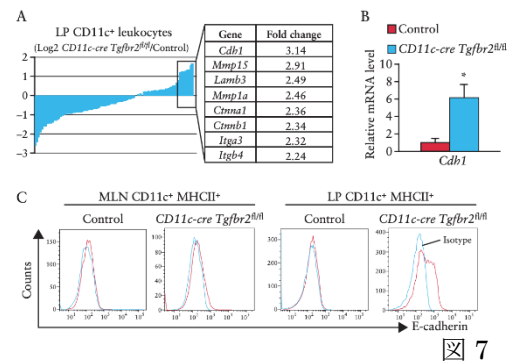


図 7

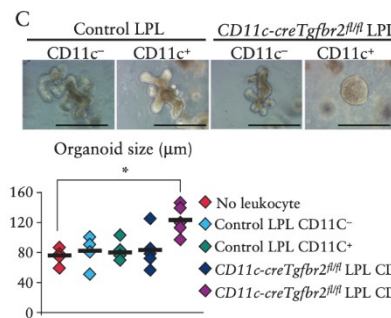


図 8

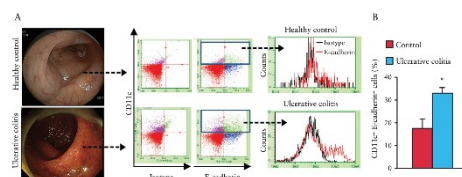


図 9

また、Notch シグナルが腸上皮幹細胞・前駆細胞に与える影響を解析したところ、Notch の恒常的活性化によって小腸の Mist1 陽性内分泌系前駆細胞が幹細胞様細胞へ脱分化することがわ

かったが、この Notch 活性化型幹細胞様細胞からは内分泌系細胞は供給されず、吸収上皮系の細胞のみが供給されていた。このような Notch 活性化と吸収上皮系への分化促進は、ドキソルビシンによる上皮障害モデルでも認められたが、減少は一時的なものであり粘膜再生後には脱分化機能は失われた。さらに、Apc 遺伝子のノックアウトを併用することで、小腸においては Notch 活性化型内分泌系前駆細胞が腫瘍起源細胞として働き、4 週以内に腫瘍死を導くことも明らかにした。一方大腸における Mist1 陽性内分泌系前駆細胞は DSS 炎症刺激によって脱分化を生じ、Apc 遺伝子の欠損とともに腫瘍起源細胞としての働きを有することが分かった。大腸の Mist1 陽性内分泌系前駆細胞は Notch 経路よりも Wnt/YAP 経路により依存しており、炎症刺激によって Wnt/YAP 経路の活性化が生じることが脱分化の直接の契機となっていた。以上の結果は国際誌である Journal of Crohn's and colitis、Gastroenterology に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ihara Sozaburo, Hirata Yoshihiro, Hikiba Yohko, Yamashita Aya, Tsuboi Mayo, Hata Masahiro, Konishi Mitsuru, Suzuki Nobumi, Sakitani Kosuke, Kinoshita Hiroto, Hayakawa Yoku, Nakagawa Hayato, Ijichi Hideaki, Tateishi Keisuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Adhesive Interactions between Mononuclear Phagocytes and Intestinal Epithelium Perturb Normal Epithelial Differentiation and Serve as a Therapeutic Target in Inflammatory Bowel Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Crohn's and Colitis	6. 最初と最後の頁 1219-1231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ecco-jcc/jjy088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayakawa Yoku, Wang Timothy C.	4. 巻 174
2. 論文標題 The Tuft Cell-ILC2 Circuit Integrates Intestinal Defense and Homeostasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 251 ~ 253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.cell.2018.06.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayakawa Yoku, Tsuboi Mayo, Asfaha Samuel, Kinoshita Hiroto, Niikura Ryota, Konishi Mitsuru, Hata Masahiro, Oya Yukiko, , , Koike Kazuhiko, Wang Timothy C.	4. 巻 156
2. 論文標題 BHLHA15-Positive Secretory Precursor Cells Can Give Rise to Tumors in Intestine and Colon in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1066 ~ 1081.e16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2018.11.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Nobumi, Niikura Ryota, Ihara Sozaburo, Hikiba Yohko, Kinoshita Hiroto, Higashishima Naoko, Hayakawa Yoku, Yamada Atsuo, Hirata Yoshihiro, Nakata Ryo, Okamoto Makoto, Sano Munetaka, Kushiya Akifumi, Ichinose Mari, Woods Susan L., Worthley Daniel, Iwamoto Yasuhiko, Koike Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Alpha-Blockers As Colorectal Cancer Chemopreventive: Findings from a Case?Control Study, Human Cell Cultures, and In Vivo Preclinical Testing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Prevention Research	6. 最初と最後の頁 185 ~ 194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1940-6207.CAPR-18-0288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimpoh T, Hirata Y, Ihara S, Suzuki N, Kinoshita H, Hayakawa Y, Ota Y, Narita A, Yoshida S, Yamada A, Koike K.	4. 巻 Jun 12;9
2. 論文標題 Prevalence of pks-positive Escherichia coli in Japanese patients with or without colorectal cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gut Pathog	6. 最初と最後の頁 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13099-017-0185-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Middelhoff Moritz, Nienhuser Henrik, Valenti Giovanni, Maurer H. Carlo, Hayakawa Yoku, Takahashi Ryota, Kim Woosook, Jiang Zhengyu, Malagola Ermanno, Cuti Krystle, Tailor Yagnesh, Zamechek Leah B., Renz Bernhard W., Quante Michael, Yan Kelley S., Wang Timothy C.	4. 巻 11
2. 論文標題 Prox1-positive cells monitor and sustain the murine intestinal epithelial cholinergic niche	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13850-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Konishi Mitsuru, Hayakawa Yoku, Koike Kazuhiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Role of Muscarinic Acetylcholine Signaling in Gastrointestinal Cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 58 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines7030058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 HAYAKAWA YOKU
2. 発表標題 MIST1+ SECRETORY PROGENITOR CELLS CAN GIVE RISE TO CANCER IN THE INTESTINE AND COLON.
3. 学会等名 Digestive Disease Week 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	早河 翼 (Hayakawa Yoku) (60777655)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	