

平成22年4月29日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19209027

研究課題名（和文） 腸管炎症における上皮分化障害分子機構と粘膜再生誘導解析

研究課題名（英文） Regeneration of intestinal mucosa and molecular mechanism of the failure of intestinal epithelial cells under intestinal inflammation.

研究代表者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10175127

研究成果の概要（和文）：本研究では当初の研究計画に示した項目につき、下記に示すごとく大きな研究成果が得られた。1)炎症性腸疾患における慢性炎症粘膜ではNotchシグナルが亢進しておりHes1の高発現も明らかとし、Notchシグナルが炎症時の細胞増殖を促進することが粘膜構築に必要な刺激である事が判明した。2)腸管上皮由来細胞株にテトラサイクリン誘導Notch発現系を確立しNotch刺激による遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、Hes family遺伝子群の中でもHes1が未分化機構と密接に関連することを明らかとした。3)杯細胞分化に必須である転写因子であるHath1がHes1により直接転写レベルにて抑制されることを明らかとした。またHes1がHath1のプロモーター領域に直接結合することおよびその結合部位の同定にも成功した。以上より慢性炎症状態でのシグナル異常による細胞増殖、分化形質発現制御機構を明らかとし、その分子機構を標的とした腸管細胞分化誘導を確立するなど多大な成果を挙げた。

研究成果の概要（英文）：

Significant results were provided as we showed it in this study as follows.

- 1) We showed that the up-regulation of Notch signal in inflammatory bowel disease was necessary to promote cell proliferation to maintain mucosal barrier with a sacrifice of differentiation state.
- 2) We identified Hes1 as the critical gene to suppress the differentiation of intestinal mucosa under the Notch signal stimulation in inflammatory bowel disease, using microarray examination.
- 3) We showed that Hes1 protein is highly expressed on the chronic inflammation mucosa under the Notch signal up-regulation in inflammatory bowel disease.
- 4) Hes1 suppress goblet cell differentiation by the repression of Hath1 gene transcription.
- 5) Hes1 directly binds to the 5' promoter region of Hath1 resulting in the suppression of Hath1 gene expression, using ChIP assay.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2008年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2009年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
年度			
年度			
総計	37,700,000	11,310,000	49,010,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：腸管再生、Wnt シグナル、Notch シグナル、Atoh1、炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は慢性の難治性の腸炎であり、近年罹患者の増大と共に難治化、重症化する患者が多くなり、新規治療法の開発が急務となっている疾患である。その治療法としては免疫調節機構破綻からの免疫抑制をターゲットとした治療が主要となっているが、新たな視点、標的とした新規治療法の開発が望まれている。以前より我々は免疫調節機能として腸管上皮細胞、中でも杯細胞の機能に着目し、1) 杯細胞がサイトカイン IL-7 を産生し、粘膜局所のリンパ球産生、パイエル板構築に必須であること (J Clin Invest. 1995)、2) IL-7 産生は IFN- γ を介した転写因子 IRF-1, IRF-2 の競合により、厳密な転写制御をされていること (Mol Cell Biol. 2004)、3) 炎症性腸疾患患者における大腸粘膜では杯細胞が減少し、IL-7 産生が低下すること (J Clin Invest. 1995)、4) IL-7 産生異常により慢性腸炎を惹起すること (J Exp Med. 1998, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005)、を見だし、上皮細胞分化障害と免疫制御破綻の関連性を示してきた。また近年腸管上皮細胞の機能として、抗原提示能 (FEBS Lett. 2005)、管腔内異物からのバリアー制御、抗菌作用など上皮細胞機能と粘膜局所免疫制御が密接に関わっている事が判明し、上皮再生による局所免疫制御の可能性が示唆された。

そこで腸管上皮細胞分化・再生機構解明の発端として骨髄由来細胞に着目し、1) 骨髄移植後の患者の腸管上皮細胞にはドナー骨髄細胞由来の細胞が存在すること、2) 移植後の GVHD 腸炎再生期においては骨髄由来細胞がより多く腸管上皮細胞へ分化すること (Nature Med. 2002)、3) その中でも4種類の腸管上皮細胞のうち杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞の分泌型細胞、特に杯細胞への分化が多くなること (Gastroenterology. 2005)、を示し、炎症からの粘膜再生においては骨髄由来細胞が積極的に腸管上皮へと動員され、さらに杯細胞を中心とした分泌型の細胞に分化し、サイトカイン、粘膜防御因子、増殖因子、抗菌物質を分泌することで粘膜再生に寄与

することが示唆された。

我々は、以上の解析より分泌型細胞の構築が腸管のホメオスタシスに重要であると考えたが、近年分泌型細胞への分化に b-HLH 型転写因子である Math1 が必須であることが報告され (Science. 2002)、そのヒト遺伝子である Hath1 を中心に解析を行い、1) Hath1 遺伝子がヒトにおいても小腸及び大腸のみ多く発現していること、2) Hath1 遺伝子発現は Notch シグナルによって負に制御されていること (投稿準備中)、3) Hath1 タンパクがユビキチン-プロテアソーム系タンパク分解経路にて安定性においても制御されていること、4) Hath1 タンパクは Wnt シグナル下の GSK3 のターゲットとなり、b-catenin と同様のタンパク分解制御機構を用いて、b-catenin とは相反する分解制御をうけることから、腸管上皮の「b-catenin - 増殖」と「Hath1-分化」をタンパク分解スイッチングにより制御すること (Gastroenterology. 2006 in press)、を示した。これは Hath1 遺伝子が Notch シグナルを介した遺伝子発現調節と Wnt シグナルの新規経路を介したタンパク発現調節を受けることから、一つの「分化」遺伝子が二つの主要な「増殖」シグナルのクロストークにより腸管上皮細胞の分化調節が規定されるという画期的知見を世界に先駆けて示した。近年の組織再生研究の進展を反映し、特異的幹細胞システムにもとづく腸管上皮分化・再生機構の理解が急速に進みつつあり、Wnt, Notch シグナルによる腸管上皮細胞増殖・未分化形質維持能やそのシグナル破綻による発癌機構など報告されているが、我々が報告した特定の分子を標的とした細胞・組織両レベルにおける「増殖」と「分化」の調和を維持する分子機構は、他臓器に類をみない迅速な細胞増殖により数的供給を受ける腸管上皮において、特定の機能細胞への分化バランスが秩序正しく連動し進行するための分子機構理解に大きな進展となった。

そこで申請者らは炎症性腸疾患腸管組織における分化障害はこれら新規分子調節機構に原因がある可能性を考え、さらに治療標的にまで発展すると着想した。最近の我々の得た知見では興味深いことに潰瘍性大腸炎

患者の大腸検体においては分泌型細胞である杯細胞が減少しているが、Notch レセプターの細胞内ドメイン (NICD) に対する抗体にて免疫染色したところ、核内陽性細胞が非常に多く増えている結果が得られた。これは Notch シグナルの異常亢進を意味し、実際に分子機構破綻の一端を示唆していると考えた。本研究ではこれらの知見をさらに発展させ、1) 炎症性腸疾患における粘膜組織の Notch シグナル群、Wnt シグナル群、分化転写因子群の機能解析、2) Notch, Wnt シグナルの腸管細胞における標的遺伝子の解明、3) 炎症状態における上皮細胞異常分子機構を標的とした粘膜再生誘導解析を中心課題に据え、これらを研究期間3年で遂行する予定である。これらの研究に要する生化学的、分子生物学的および発生工学的技術は、すでに申請者らのグループで確立しているのみならず、研究材料の点でも、Wnt, b-catein、TCF4 など Wnt シグナル構成分子群の発現システムと腸管上皮細胞内 Wnt シグナル再構成系を確立し、また、活性型 Notch 誘導系、および Notch 阻害剤による Notch シグナル動揺系も確立した。加えて、腸管分化に必須の Hath1 を含めた種々の bHLH 型転写因子を誘導性に発現する細胞株をすでに樹立した。これら種々の細胞株の条件検討により分化誘導系または未分化誘導系を既に確立しており、さらに未分化・分化を決定づける際の遺伝子ネットワーク変容を追求するため、マイクロアレイ解析による網羅的な標的遺伝子解析を開始し、すでに腸管上皮細胞の Notch 刺激にて強発現する HES ファミリー転写因子をマイクロアレイ解析にて発見し、興味深い結果を得て機能解析を進めている。さらに個体レベルでは、ヒト炎症性腸疾患患者検体はダブルバルーン小腸内視鏡及び大腸内視鏡を用い、大腸粘膜だけでなく小腸粘膜も生検にて入手し、さらに消化器外科の協力にて手術検体の供与を受けており、Wnt および Notch シグナル構成分子の発現量とパターン変化に関する検討を開始し、Notch シグナルの異常亢進を既に確認している。大腸炎モデルマウスでは Notch 阻害剤を用いた治療効果解析を始めるなど、本申請で計画する項目のいずれもが当該期間内で遂行可能な状況にある。元来申請者らは大腸炎モデルマウスを用い抑制性 T 細胞移入による腸炎改善機構も構築しており、大腸炎作成、及び腸炎評価において既に確立した手法を持つ。またヒト腸管上皮細胞分化異常解析には分泌型細胞への分化マスター遺伝子である bHLH 型転写因子 Hath1 の解析が必須となるが、Wnt, Notch シグナル

による制御は申請者が発見した機構であり、Hath1 に対する抗体を独自に作成し、精度の高い Hath1 タンパク検出系を確立するなど申請者のみ解析可能な状況にある。また研究分担者である深尾・永石・竹田は腸管における自然免疫調節に精通し各種モデルマウスの構築、解析により世界的に高い評価を得ている。半田は転写因子機構解析において第一人者であり、精度の高い新規転写機能解析法の開発を行うなど前記分担者と共に協力して研究計画、実行していくことから本計画は達成可能であると考えられる。

炎症性腸疾患の難治化、遷延化を考察する上で、腸管組織は間質細胞、免疫担当細胞、粘膜上皮細胞、管腔内の細菌、食餌抗原など多様な状況で互いに影響し合いながら機能維持しているという特殊性を認め、その一つの破綻が雪崩式にすべての破綻を誘発し、慢性炎症、発癌へと発症していくというその環境の多様性のため詳細な解析が非常に困難である現況となっている。そのため、すべてが破綻している状況では治療すべきターゲットが絞れず治療に難渋化していることから、組織再生研究の進展から腸管上皮細胞の幹細胞維持機構、分化機構の分子基盤は理解されつつある粘膜再生に焦点を絞り、本研究では申請者が基盤を築いてきた上皮細胞の免疫調節機能、分化調節分子機構を基に粘膜再生による腸管組織全体の恒常性維持を目指すものであり、申請者の独創性の高い着想を基に遂行可能な研究と考える。また臨床現場においても実際に治療に苦慮する症状として、下痢、吸収不良による低栄養、腸管狭窄・潰瘍形成・出血・瘻孔など頻繁に認められるものは粘膜障害が主たる原因であることから粘膜再生を目標とした本研究成果は患者の Quality of Life の向上につながる可能性をもつ。

以上、本研究は以前より腸管慢性炎症状態による腸管上皮再生障害に着目し、上皮細胞機能における局所粘膜免疫調節解析、腸管分化分子機構解析を主にヒトの検体、細胞、遺伝子を用いヒトを主眼において進めてきた申請者らにのみ遂行可能でかつ独創性の高い研究である点に加え、得られる成果により最終的には炎症性腸疾患の重篤な腸管組織傷害に対し腸管上皮の「機能的修復」を可能にする新規治療薬の開発だけでなく、上皮細胞の内在性の恒常性維持機能からの粘膜局所免疫統御を目指すという新たな理論基盤を創出する可能性が期待される点においても、世界的評価に耐えうる研究であると考えられる。

2. 研究の目的

腸管上皮組織は、幹細胞を由来とする細胞群の秩序正しい「増殖」と「分化」の調和のもと、生涯を通じ絶えず短い細胞回転で再生を繰り返す特殊な組織機構を有する。また一方、この制御システムの破綻が、重篤な増殖・分化障害による組織再生不全、あるいは異常増殖能獲得による癌化機構と密接に関わることは明らかである。特に炎症性腸疾患などの慢性、難治性炎症疾患においては腸管の免疫調節機構破綻による持続炎症だけでなく腸管上皮障害も病態の一因とされているが、その分子基盤は全く確立されていない。本研究では我々が基盤を築いた「腸管上皮細胞機能と慢性炎症との関連機構」、「Wnt, Notch シグナルクロストークを介した腸管上皮細胞増殖・分化調節機構」をさらに発展させ、慢性炎症での上皮細胞分化に関わる分子異常機構解析とその分子異常を標的とした粘膜再生誘導を目的とし、粘膜再生を主眼とした難治性慢性腸炎の新規治療法開発への基盤とするものである。

3. 研究の方法

平成19年度

1) 炎症性腸疾患における粘膜組織の Notch シグナル群、Wnt シグナル群、分化転写因子群の機能解析(土屋、永石、研究員1名、大学院生3名)

A) ヒト正常及び炎症性腸疾患患者の大腸および小腸発現解析(土屋、大学院生2名)

ダブルバルーン小腸内視鏡、大腸内視鏡または手術検体により採取した大腸および小腸粘膜の組織を固定した後、各種染色法にて解析する。評価項目としては

粘膜形態 (HE 染色)、細胞増殖解析 (Ki-67 染色)、分化マスター遺伝子 (Hath1 染色)、

細胞種類解析杯細胞 (アルシアンブルー染色、Mucin2 染色)、内分泌細胞 (クロモグラニン染色等の各内分泌タンパクの染色)、パネート細胞 (HE 染色、difensin 染色)、吸収上皮細胞 (CD10 染色、ラクターゼ染色)

Wnt シグナル解析 (Wnt 染色、APC 染色、GSK-3 染色、Axin 染色、b-catenin 染色、c-myc 染色)、Notch シグナル解析 (Notch 細胞内ドメイン (NICD) 染色、HES1 染色、Musashi-1 染色) とし、正常検体及び腸炎検体で発現量、発現部位の差異を解析する。

B) 大腸炎モデルマウスにおける腸管発現解析(土屋、永石、研究員1名、大学院生1名)

DSS 飲水腸炎モデル (腸管上皮障害を伴う) 及び CD45RB^{high} 細胞移入腸炎モデルマウス

(腸管上皮障害を組織学的に認めない) においてヒトと同様に上記項目についてマウスホモログ遺伝子発現を解析する。

2) Wnt, Notch シグナルの腸管細胞における標的遺伝子の網羅的解析 (深尾、土屋、半田、渡辺、大学院生2名)

A) 大腸癌細胞株において確立した Wnt シグナル動揺系を用いた標的遺伝子解析 (深尾、土屋、半田)

大腸癌細胞株 (SW480 細胞及び Hath1 遺伝子導入 SW480 細胞) に正常 APC を導入することにより分化誘導した際の遺伝子発現をマイクロアレイ法にて網羅的に解析する。

B) 大腸癌細胞株において確立した Notch シグナル動揺系を用いた標的遺伝子解析 (深尾、渡辺、半田)

大腸癌細胞株に NICD を発現し Notch シグナルを亢進させ、さらに未分化誘導するもしくは Notch 阻害薬にて Notch シグナルを減弱させ、分化誘導した際の遺伝子発現をマイクロアレイ法にて網羅的に解析する。

C) Wnt, Notch シグナルを同時に動揺させた際の標的遺伝子解析 (深尾、半田、大学院生2名)

大腸癌細胞株 (SW480 細胞及び Hath1 遺伝子導入 SW480 細胞) に正常 APC を導入すると同時に Notch 阻害剤を用いて Wnt, Notch シグナルを同時に減弱させた際の標的遺伝子をマイクロアレイ法にて網羅的に解析する。

3) 炎症状態における上皮細胞異常分子機構を標的とした粘膜再生誘導解析 (永石、土屋、深尾、竹田、渡辺、大学院4名)

A) 大腸炎モデルマウスの Notch 阻害薬効果解析 (永石、竹田、大学院生1名)

申請者らは企業との共同研究にて既存の1000倍力価のあるγセクレターゼインヒビターの供与をうけている。つまり Notch レプターの細胞内ドメイン切断酵素阻害により、より強い Notch シグナル阻害効果を期待できる。この阻害薬を用いて、DSS 腸炎、及び CD45RB^{high} 移入腸炎の改善効果を解析する。特にヒト炎症性腸疾患患者においては上皮細胞の Notch シグナルの異常亢進を申請者が既に発見しており、Notch シグナル阻害により、粘膜形態変化が期待される。

解析項目は炎症状態評価として

臨床的評価 (体重減少、便性状、血便の有無)

組織学的評価 (細胞浸潤部位、細胞浸潤数、組織障害度) に加えて細胞表面マーカーによる浸潤リンパ球性状解析 (T:B 細胞比率、メモリー細胞比、CD4/8 比)

粘膜再生評価として

計画 1)と同様に粘膜形態、増殖解析、分化遺伝子発現解析、細胞種類解析、Wnt, Notch シグナル解析
を行い評価する。

B) Wnt シグナル阻害による Hath1 発現機構解析と腸炎効果解析(永石、竹田、大学院生 1名)

申請者らの解析により分泌型腸管上皮細胞分化のマスター遺伝子である Hath1 は Wnt-GSK3 経路により積極的タンパク分解を受けるため、GSK3 阻害剤による粘膜再生効果を解析する。実際細胞レベルにおいては GSK3 阻害薬処理 (LiCl, BIO)にて Hath1 タンパクの安定化を確認している。

Notch 阻害薬と同様に腸炎モデルマウスを用い、同様の評価を行う。

C) Notch, Wnt 両シグナル阻害による腸炎治療効果解析 (永石、渡辺、大学院生 1名)

両シグナルを阻害することによって Hath1 遺伝子発現増強、及びタンパク安定効果を確認し、さらに腸炎モデルマウスを用い、効果判定を上記と同様に行う。

D) Hath1 遺伝子導入における腸炎効果解析 (永石、土屋、深尾、大学院生 1名)

Hath1 遺伝子または Wnt-GSK3 による Hath1 タンパク分解を回避できるセリン変異体 Hath1 遺伝子をレトロベクターに組み込み、さらに IRES 下に GFP 遺伝子を組み込んだベクターを構築する。

それぞれをレトロウイルスに導入し、ウイルスをマウスに注腸し腸管上皮細胞に感染させ、Hath1 遺伝子発現を試みる。正常および変異型 Hath1 蛋白発現を GFP 発現と対比して解析するとともに、粘膜変化を解析する。さらにそれぞれ発現したマウスに腸炎を発症させ炎症、粘膜障害に関して解析する。

また腸管特異的に Hath1 を強発現させるモデルマウス作成のため腸管特異的発現プロモーターである villin プロモーターに正常または変異体 Hath1 遺伝子を組み込み、Hath1 トランスジェニックマウスを作成する。

平成 20 年度以降

1)炎症性腸疾患における粘膜組織の Notch シグナル群、Wnt シグナル群、分化転写因子群の機能解析(土屋、永石、研究員 1名、大学院生 3名)

A)シグナル標的遺伝子のヒト正常および炎症性腸疾患患者の大腸および小腸における発現解析(土屋、大学院生 2名)

平成 19 年度の研究によって明らかとなった各シグナル標的遺伝子に関して炎症状

態において発現変化があるかを解析する。特に Notch, Wnt 両シグナルにおいて共通の標的遺伝子を認めた場合はその遺伝子を優先して解析していく。

B)シグナル標的遺伝子の腸炎モデルマウスにおける腸管発現解析(土屋、永石、研究員 1名、大学院生 1名)

上記解析において炎症状態にて発現変化を認めた遺伝子に関して、腸炎モデルマウスにおいてマウスホモログ遺伝子の発現変化を解析する。

2) Wnt, Notch シグナルの腸管細胞における標的遺伝子の網羅的解析(深尾、土屋、半田、渡辺、大学院生 2名)

A)シグナル標的遺伝子の分化誘導能解析(深尾、土屋、渡辺、大学院生 1名)

平成 19 年度の研究にて明らかとなった各シグナル標的遺伝子に関して、分化誘導または未分化誘導した際の発現変化を確認し、発現変化が顕著である遺伝子、計画 1) で炎症状態において変化の確認できた遺伝子を中心に、強制発現および siRNA による発現抑制によって細胞形質変化を解析する。

B)ヒト正常腸管上皮細胞株の分化誘導解析(深尾、土屋、半田、大学院生 1名)

カナダ Sherbrooke 大学の Beaulieu 教授との共同研究にてヒト正常小腸上皮由来細胞株 (HIEC) (Exp Cell Res. 1996) の供与を受けている。これはヒト腸管由来としては唯一の非癌由来細胞株である。この細胞株を用いて Wnt, Notch シグナル動揺における分化誘導系を確認した後、シグナル標的遺伝子の発現増減にて分化形質変化を解析する。3) 炎症状態における上皮細胞異常分子機構を標的とした粘膜再生誘導解析(永石、土屋、深尾、竹田、渡辺、大学院 4名)

平成 20 年度の計画 1) 及び 2) にて明らかとなったシグナル群標的遺伝子における粘膜再生、炎症統御効果を解析する。

A)Wnt, Notchシグナルの標的遺伝子消失による腸炎治療効果解析 (永石、深尾、土屋、竹田、大学院生 2名)

未分化誘導にて各シグナル標的遺伝子を Cre-loxP システムを用いて腸管特異的ノックアウトマウスを作成する。誘導による遺伝子消失により、粘膜形態解析をした後、上記腸炎モデルを作成し、治療効果判定を行う。

B)分化標的遺伝子発現による腸炎治療効果解析 (永石、深尾、土屋、竹田、渡辺、大学院 2名)

細胞レベルにおいて遺伝子導入により分化形質を獲得した遺伝子に関し、分化形質ご

とに分類する。

- ① 4種類すべての細胞分化を認める。
- ② 分泌型細胞（パネート、内分泌、杯細胞）優位の分化を認める。
- ③ 吸収上皮細胞優位の分化を認める。
- ④ パネート細胞優位の分化を認める。
- ⑤ 内分泌細胞優位の分化を認める。
- ⑥ 杯細胞優位の分化を認める。

それぞれをvillinプロモーター下に標的遺伝子を組み込み、トランスジェニックマウスを作成する。

粘膜分化形質を確認した後上記と同様に大腸炎モデルを作成し、治療効果解析を行う。

以上Wnt, Notchシグナルの直接作用効果とその標的遺伝子の網羅的検索とその粘膜再生機能を*in vivo*および*in vitro*の両面より解析し、その結果をもとに*in vitro*にて炎症抑制効果を確認する計画である。さらにこれら腸管再生に影響のある遺伝子群について今後注目し、細胞内機能について解析を続ける予定である。

4. 研究成果

1) 炎症性腸疾患における粘膜組織の Notch シグナル群、Wnt シグナル群、分化転写因子群の機能解析

炎症性腸疾患とくに潰瘍性大腸炎では杯細胞減少が病理所見として特徴的であることが以前より指摘されていたが、その分子機構を全く解析されていなかった。そこで我々はNotchシグナルの影響に関して解析を行った。まず腸管上皮細胞株にNotch阻害剤であるガンマーセクレターゼ阻害薬(GSI)を投与したところ、腸管上皮細胞株の杯細胞形質獲得を認めた。また逆にNotchシグナル亢進の影響を確認するため、Notchレセプターの機能部位である細胞内ドメイン(NICD)の遺伝子のみを抽出し、発現ベクターに組み込み腸管上皮細胞株に発現させたところ、杯細胞形質の発現抑制を認めた。またその一方で一部のパネート細胞形質発現を認めた。この杯細胞形質抑制とパネート細胞形質異所性発現は潰瘍性大腸炎の腸粘膜を同じ現象を起こしていることが判明した。以上より潰瘍性大腸炎においてもNotchシグナルが亢進していることが予想された。そこで潰瘍性大腸炎患者の手術検体を用い、抗NICD抗体を用い免疫染色を行ったところ、潰瘍性大腸炎粘膜において有意に陽性細胞の増加を認めた。つまり潰瘍性大腸炎においてはNotchシグナルの亢進により、杯細胞形質抑制、異所性パネート形質発現を認めることを初めて明らかにした。さらに杯細胞分化に関わる転写因子群に関して解析を行ったところ、潰瘍性大腸炎の粘膜上皮ではHath1の発現を認めるが、

杯細胞が欠失した部分ではHath1の発現が低下していることを解明した。以上より次項の細胞解析の結果と併せてNotchシグナルの亢進がHes1の発現を亢進し、Hath1の発現を抑制することで杯細胞減少が引き起こされることが明らかとなった。

しかし大腸に関しては制御機構が明らかにされたが、小腸に関しては全長が非常に長く疾患異常を解析する以前に根本的な構造制御が全く解明されていない状況であった。そこで我々はまず、正常ヒト小腸における構造制御の解析を行った。近年ダブルバルーン内視鏡の開発により、ヒト全小腸の観察、生検による組織採取が可能となったため、我々は全小腸を5区域に分割しそれぞれから生検を行い、「ライブ環境」での組織構造解析を行った。口側の空腸と肛門側の回腸を比較検討したところ、空腸から回腸にかけて徐々に杯細胞が増加し、吸収上皮細胞が減少していた。パネート細胞、内分泌細胞の分布は全小腸を通して差を認めなかった。これらの細胞種の分布変化にはNotchシグナルが関与すると予想し、Notchシグナル下流のHes1蛋白の局在を免疫染色にて確認したが、全小腸にわたり変化を認めなかった。これは小腸の長軸方向の細胞分布にはNotchシグナルは関与しないことが明らかとなった。またWntシグナルに関しても同様の解析を行ったが変化を認めないことから他のシグナル制御の存在が予想された。しかし分化に必須の転写因子群を解析すると杯細胞分化に必須の遺伝子であるAtoh1(Hath1)やKlf4の発現は回腸側で増加しており、回腸での杯細胞増加に関わっていることが示唆された。さらに興味深いことにHath1は絨毛の陰窩から管腔側へ局在を増加していくのに対し、Klf4は管腔側から陰窩側に局在を移行させており、回腸ではHath1とKlf4の局在が合わさることで杯細胞分化を促進させていることを明らかとした。以上より正常ヒト小腸の構造制御を基盤として、現在クローン病における疾患異常を解析中であるが、クローン病では抗菌物質であるディフェンシンの発現が病変部以外の全小腸で発現低下していることを発見した。これらは我々の正常検体との比較で初めて解析が可能となったことを示唆しており、今後新たな病態の発見に繋がると期待される。

2) Notch, Wntシグナルの腸管細胞における標的遺伝子の解明

潰瘍性大腸炎におけるNotchシグナル亢進の影響を解析するために、Notchレセプターの細胞内ドメインを発現ベクターに組み込み、tet-onの系にてドキシサイクリン添加にてNotch細胞内ドメインを誘導発現させる細胞を構築した。ドキシサイクリン添加にてNotch細胞内ドメインが発現誘導されること

を確認し、下流の標的遺伝子である HES1 遺伝子が発現上昇を認めたことより Notch シグナルの亢進系を確立できた。この系を用いてドキシサイクリン処理の 40 分後と 12 時間語の RNA を採取しマイクロアレイによる遺伝子の網羅的解析を行った。興味深いことに 40 分後の Notch シグナルの早期相での遺伝子発現に OLFM4 という幹細胞マーカーの著増を認めた。これは杯細胞形質発現を抑制するだけでなく、幹細胞形質を獲得することを明らかとした。今後潰瘍性大腸炎における OLFM4 の役割を明らかにしていく予定である。また Notch シグナル亢進では Hes ファミリー遺伝子の増加を認めるが、腸管上皮細胞ではどの Hes ファミリーが発現増加するか不明であった。マイクロアレイにて抽出された遺伝子の中から HES ファミリー遺伝子を探索したところ Hes1 と HeyL の 2 遺伝子の同定に成功した。さらにこれらの遺伝子の機能を解析するために、Hes1, HeyL をそれぞれ発現ベクターに組み込み、tet-on の系にてドキシサイクリン添加にて誘導発現させる細胞をそれぞれ構築した。驚いたことに HeyL のみを誘導発現させても腸管上皮の分化形質に全く影響を与えなかった。対照的に Hes1 の誘導発現のみにて Hath1 の遺伝子発現抑制とともに杯細胞分化形質の発現抑制を認めた。我々はさらに Hes1 による Hath1 の発現抑制機構を解析したところ、Hath1 の 5' プロモーター部位に Hes1 が直接結合し転写活性を抑制することを ChIP アッセイ、レポーターアッセイにて明らかにした。しかしもう一方の Klf4 の遺伝子発現に関して NICD, Hes1 の発現による影響は全く無かったことから Klf4 は Notch シグナルに制御されていないことが示唆された。以上より Notch シグナルに影響をうける Hath1 の遺伝子発現制御が杯細胞分化には重要であることが示唆された。

3) 炎症状態における上皮細胞異常分子機構を標的とした粘膜再生誘導解析

上記の潰瘍性大腸炎における異常機構を標的とした分化誘導療法が潰瘍性大腸炎の治療として改善を認めるかを解析した。まず Notch シグナルの亢進が杯細胞の減少に繋がり、杯細胞から分泌される蛋白の機能を障害していることが粘膜維持を抑制していると予想した。そこでマウスに DSS を飲水させ、大腸炎マウスモデルを作成した。さらに GSI を投与したところ、大腸炎は逆に悪化していた。正常のマウスに GSI を投与すると杯細胞の増加を確認できたが、その代わりに絨毛陰窩にある増殖細胞が極端に減少していることが確認できた。さらに腸炎マウスモデルでは増殖細胞が減少することで粘膜の維持がさらに脆弱になっており、炎症が悪化することが判明した。これは炎症時には分化を

犠牲にして未分化な増殖細胞を促進して増加させることで粘膜を維持しバリアー機能を保持させているという理論の創設に寄与した。

そこで細胞増殖を阻害せずに杯細胞を分化させることが正常の粘膜回復に繋がると考えた。以前の解析にて杯細胞分化に関わる Hath1 は蛋白安定性でも制御を受けており、Wnt シグナルによる GSK3 の活性化が Hath1 のリン酸化を促進しプロテアソーム系蛋白分解をおこすことを明らかとしてきた。さらに GSK3 阻害剤は Hath1 と β -catenin の両方の蛋白を安定化することを解明した。そこでヒト正常腸管上皮由来の HIEC 細胞を用いて GSK3 阻害剤である LiCl にて処理したところ、細胞増殖と分化を同時に促進することが判明した。この LiCl の in vivo での機能をマウスを用いて解析した。しかしながら DSS 腸炎に LiCl を投与したところその炎症、粘膜治癒に大きな変化を認めなかった。今後詳細な条件検討および他の GSK3 阻害剤での機能解析を試みる予定である。

我々はさらに Cre-loxp システムを用い、腸管上皮細胞特異的に遺伝子を欠損させる系を構築し解析を進めている。現時点では上皮細胞のオートファジー機能に着目し腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを構築しその粘膜機能および抗炎症作用を解析中である。また同様の手法にて Notch レセプターのリガンドである Jagged1 の腸管上皮特異的欠損マウスを構築し、Notch シグナル影響をさらに詳細に検討することで新しい標的蛋白の探索を行っている。

以上より本研究計画に従い、炎症性腸疾患の腸管上皮細胞における病態を分子生物学的に詳細に解明でき、その中でも新規治療の標的となるシグナル群、遺伝子を同定することに成功したなど多大な成果を上げられたことから今研究の目標は十分に達成されたと思われる。

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 93 件)

1. Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. **Am J Physiol GI & Liver.** 296:G23-G35, 2009. 査読有
2. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Watanabe M: RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of

- CD4+CD25+ regulatory T Cells in chronic colitis. **J Immunol.** 182: 6079-6087, 2009. 査読有
3. Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Shinohara T, Sakamoto N, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sudo T, Matsumoto S, Watanabe M: Long-Lived colitogenic CD4+ Memory T Cells residing outside the intestine participate in the perpetuation of chronic colitis. **J Immunol.** 183: 5059-5068, 2009. 査読有
4. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Akira S, Watanabe M: MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion and survival of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. **J Immunol.** 180: 5291-5299, 2008. 査読有
5. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M: Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. **J Immunol.** 180: 383-390, 2008. 査読有
6. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. **Gastroenterology.** 132: 176-189, 2007. 査読有
7. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis **J Immunol.** 178: 4737-4748, 2007. 査読有
8. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, Kiyono H, Watanabe M: Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. **J Immunol.** 178: 4937-4946, 2007. 査読有
9. Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, Saiga H, Okuyama M, Kayama H, Kubo E, Ito H, Takaura M, Matsuda T, Soldati-Farve D, Takeda K: A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. **J. Exp. Med.** in press. 査読有
10. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch S V, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR: Induction of Intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell.** 139: 485-498, 2009. 査読有
11. Kayama H, Koga R, Atarashi K, Mak T W, Takayanagi H, Honda K, Yamamoto M. and Takeda K: NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS Pathogens.** 5, e1000514, 2009. 査読有
12. Honda K, Takeda K: Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. **Mucosal Immunol.** 2: 187-196, 2009. 査読有
13. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, Takeda K: ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. **Nature.** 455: 808-812, 2008. 査読有
14. Yamamoto M, Takeda K: Role of nuclear IκB proteins in the regulation of host immune responses. **J. Infect. Chemother.** 14, 265-269, 2008. 査読有
15. Kayama H, Ramirez-Carrozzi VR, Yamamoto M, Mizutani T, Kuwata H, Iba H, Matsumoto M, Honda K, Smale ST, Takeda K: Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and IκBz. **J. Biol. Chem.** 283, 12468-12477, 2008. 査読有
16. Yamamoto M, Uematsu S, Okamoto T, Matsuura Y, Sato S, Kumar H, Satoh T, Saitoh T, Takeda K, Ishii KJ, Takeuchi O, Kawai T, Akira S: Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. **J. Exp. Med.** 204: 2233-2239, 2007. 査読有
17. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H: Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. **Science.** in press. 査読有
18. Tominaga A, Sugawara H, Futagawa T, Inoue K, Sasaki K, Minamino N, Hatakeyama M, Handa H, Miyata A: Characterization of the testis-specific promoter region in the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. **Genes Cells.** in press. 査読有
19. Park S. Y., Handa H, Sandhu A: Magneto-optical biosensing platform based on light scattering from self-assembled chains of functionalized rotating magnetic beads. **Nano Lett.** 10: 446-451, 2010. 査読有
20. Masaike Y, Takagi T, Hirota M, Yamada J, Ishihara S, Yung T M C, Inoue T, Sawa C, Sagara H, Sakamoto S, Kabe Y, Takahashi Y, Yamaguchi Y, Handa H: Identification of

- dynamain-2-mediated endocytosis as a new target of osteoporosis drugs, bisphosphonates. **Mol. Pharmacol.** 77: 262-269, 2010. 査読有
21. Chen H, Contreras X, Yamaguchi Y, Handa H, Peterlin B.M, Guo S: Repression of RNA Polymerase II elongation in vivo is critically dependent on the C-terminus of Spt-5. **PLoS ONE.** 4 e6918, 2009. 査読有
22. Kabe Y, Hatakeyama M, Sakamoto S, Nishio K, Handa H: Novel applications of affinity beads. In Protein Targeting with Small Molecules: Chemical Biology Techniques and Applications. (ed. Oasda, H) **John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.** 39-56, 2009. 査読有
23. Masaike Y, Takagi T, Hirota M, Yamada J, Ishihara S, Yung T.M.C., Inoue T, Sawa, C, Sagara H, Sakamoto S, Kabe Y, Takahashi Y, Yamaguchi Y, Handa H: Identification of dynamain-2-mediated endocytosis as a new target of osteoporosis drugs, bisphosphonates. **Mol. Pharmacol.** in press. 査読有
24. Kawano M, Xing L, Tsukamoto H, Inoue T, Handa H, Holland R: Calcium-bridge Triggers capsid Disassembly in the Cell Entry Process of Simian Virus 40. **Biochem. Mol. Biol.** in press. 査読有
25. Chen Y, Yamaguchi Y, Tsugeno Y, Yamamoto J, Yamada T, Nakamura M, Hisatake K, Handa H: DSIF, the Paf1 complex, and Tat-SF1 have non-redundant, cooperative roles in RNA polymerase II elongation. **Genes Dev.** in press. 査読有
26. Tanaka T, Shimazu R, Nagai H, Tada M, Nakagawa T, Sandhu A, Handa H, Abe M: Preparation of spherical and uniform-sized ferrite nanoparticles with diameters between 50-150 nm for biomedical applications. **J. Magn. Magn. Mater.** 321(10):1417-1420, 2009 abstract. 査読有
27. Suzuki E, Ogura H, Kato K, Takei I, Kabe, Y, Handa H, Umezawa K: Preparation of conophylline affinity nano-beads and identification of target preotein. **Bioorg. Med. Chem.** 17: 6188-6195, 2009. 査読有
28. Kamiya H, Suzuki A, Yamaguchi Y, Handa H, Harashima H: Incorporation of 8-hydroxyguanosine 5'-triphosphate (8-oxo-7, 8-dihydroguanosine5'-triphosphate) by bacterial and human RNA polymerases. **Free Radic. Biol. Med.** 46: 1703-1707, 2009. abstract. 査読有
29. Yung T M.C., Narita T, Komori T, Yamaguchi Y, Handa H: Cellular dynamics of the negative transcription elongation factor NELF. **Exp. Cell Res.** in press. abstract. 査読有
30. Abe M, Nishio K, Hatakeyama M, Hanyu N, Tanaka T, Tada M, Nakagawa T, Sandhu A, Handa H. Preparation and medical application of magnetic beads conjugated with bioactive molecules. **J. Magn. Magn. Mater.** 321: 645-649, 2009. abstract. 査読有
31. Hanyu N, Nishio K, Hatakeyama M, Yasuno H, Tanaka T, Tada M, Nakagawa T, Sandhu A, Abe M, Handa H: High-throughput bioscreening system utilizing high-performance affinity magnetic carriers exhibiting minimal non-specific protein binding. **J. Magn. Magn. Mater.** 321:1625-1627, 2009. abstract. 査読有
32. Tada M, Kanemaru T, Hara T, Nakagawa T, Handa H, Abe M: Synthesis of hollow ferrite nanospheres for biomedical applications. **J. Magn. Magn. Mater.** 321:1414-1416, 2009. Abstract. 査読有
33. Kuramori C, Hase Y, Hoshikawa K, Watanabe K, Nishi T, Hishiki T, Soga T, Nashimoto A, Kabe Y, Yamaguchi Y, Watanabe H, Kataoka K, Suematsu M, Handa H: Mono-(2-ethylhexyl) phthalate targets glycogen debranching enzyme and affects glycogen metabolism in rat testis. **Toxicological Sciences.** in press. abstract. 査読有
34. Zou G-M, Karikari C, Kabe Y, Handa H, Anders R. A, Maitra A: The Ape-1/Ref-1 redox antagonist E3330 inhibits the growth of tumor endothelium and endothelial progenitor cells: Therapeutic implications in tumor angiogenesis. **J. Cell. Physiol.** 219:209-218, 2009. 査読有
35. Park S Y, Handa H, Sandhu A: High speed magneto-optical valve: Rapid control of the optical transmittance of aqueous solutions by magnetically induced self-assembly of superparamagnetic particle chains. **J. Appl. Phys.** 105: 07B526, 2009. Abstract. 査読有
36. Bando M, Ohashi T, Dede M, Akram R, Oral A, Park S Y, Shibasaki I, Handa H, Sandhu A: High sensitivity and multifunctional micro-Hall sensors fabricated using InAlSb/InAsSb/InAlSb heterostructures. **J. Appl. Phys**, 105, 07E909, 2009. abstract. 査読有
37. Morimoto Y, Abe M, Hatakeyama M, Handa H, Sandhu A: Detection of Magnetic

- Nanobeads by Self-Assembly of Superparamagnetic Microbeads for Biosensing. **IEEE Transactions on Magnetism**. 45: 2871-2874, 2009. abstract. 査読有
38. Sakamoto S, Kabe Y, Hatakeyama M, Yamaguchi Y, Handa H: Development and application of high-performance affinity beads: toward chemical biology and drug discovery. **Chem. Rec.** 9: 66-85, 2009. abstract. 査読有
39. Kuramori C, Azuma M, Kume K, Kaneko Y, Inoue A, Yamaguchi Y, Kabe Y, Hosoya T, Kizak M, Suematsu M, Handa H: Capsaicin binds to prohibitin 2 and displaces it from the mitochondria to the nucleus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 379: 519-525, 2009. abstract. 査読有
40. Hatakeyama M, Mochizuki Y, Kita H, Kishi K, Nishio S, Sakamoto M, Abe, M. and Handa, H. Characterization of a magnetic carrier encapsulating europium and ferrite nanoparticles for biomolecular recognition and imaging. **J. Magn. Magn. Mater.** 321: 1364-1367, 2009. abstract. 査読有
41. Komori K, Inukai N, Yamada T, Yamaguchi Y, Handa H: The role of human transcription elongation factor DSIF in the suppression of senescence and apoptosis. **Genes Cells**. 14: 343-354, 2009. abstract. 査読有
42. Nagasaki S, Suzuki T, Miki Y, Akahira J-I, Kitada K, Ishida T, Handa H, Ohuchi N, Sasano H: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 12 in human breast carcinoma: a prognostic factor via potential regulation of fatty acids synthesis. **Cancer Res.** 69: 1392-1399, 2009. abstract. 査読有
43. Kang J, Gemberling M, Nakamura M, Whitby F G, Handa H, Fairbrother W, Tantin D: A general mechanism for transcription regulation by Oct1 and Oct4 in response to genotoxic and oxidative stress. **Genes Dev.** 23: 208-222, 2009. abstract. 査読有
44. Nakanishi A, Chapellie B., Maekawa N, Hiramoto M, Kuge T, Takahashi R-H, Handa H, Imai T: SV40 vectors carrying minimal sequence of viral origin with exchangeable capsids. **Virology**. 379:110-117, 2008. abstract. 査読有
45. Takahashi R-H, Kaneshashi S-N, Inoue T, Enomoto T, Kawano M-A, Tsukamoto H, Takeshita F, Imai T, Ochiya T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H: Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. **J. Biotechnol.** 135:385-392, 2008. abstract. 査読有
46. Azuma M, Kabe Y, Kuramori C, Kondo M, Yamaguchi Y, Handa H: Adenine nucleotide translocator transports haem precursors into mitochondria. **PLoS ONE**. 3, e3070, 2008. abstract. 査読有
47. Shimizu N, Yoshikawa N, Wada T, Handa H, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Sawai T, Morimoto C, Tanaka H: Tissue- and context-dependent modulation of hormonal sensitivity of glucocorticoid-responsive genes by HEXIM1. **Mol. Endocrinol.** 22: 2609-2623, 2008. abstract. 査読有
48. Ando K, Hirao S, Kabe Y, Ogura Y, Sato I, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H: A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. **Nucleic Acid Res.** 36:4327-4336, 2008. abstract. 査読有
49. Hase Y, Tatsuno M, Nishi T, Kataoka K, Kabe Y, Yamaguchi Y, Ozawa N, Natori M, Handa H, Watanabe H: Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 366:66-72, 2008. abstract. 査読有
50. Suzuki M, Furukawa S, Kuramori C, Sawa, C, Kabe Y, Nakamura M, Sawada J, Yamaguchi Y, Sakamoto S, Inoue, S, Handa H: Development of a chemical screening system using aqueorin-fused protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 368:600-605, 2008. abstract. 査読有
51. Nishio K, Masaike Y, Ikeda M, Narimatsu H, Gokon N, Tsubouchi S, Hatakeyama M, Sakamoto S, Hanyu N, Sandhu A, Kawaguchi H, Abe M, Handa H: Development of novel magnetic nano-carriers for high-performance affinity purification. **Colloid and Surface B: Biointerfaces**. 64: 162-169, 2008. abstract. 査読有
52. Yoshida M, Kabe Y, Wada T, Asai A, Handa H: A new mechanism of 6-((2-(dimethylamino)ethyl)amino)-3-hydroxy-7H-indeno(2,1-c)quinolin-7-one dihydrochloride (TAS-103) action discovered by target screening with drug-immobilized affinity beads. **Mol. Pharmacol.** 73:987-994, 2008. abstract. 査読有
53. Inoue T, Kawano M, Takahashi R, Tsukamoto H, Enomoto T, Imai T, Kataoka K, Handa H: Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with minor capsid

- proteins VP2/3. **J. Biotechnol.** 134: 181-192, 2008. abstract. 査読有
54. Saito Y, Imazeki H, Miura S, Yoshimura T, Okutsu H, Harada Y, Ohwaki T, Nagao O, Kamiya S, Hayashi R, Kodama H, Handa H, Yoshida T, Fukai F: A peptide derived from tenascin-C induces beta1 integrin activation through syndecan-4. **J. Biol. Chem.** 282:34929-34937, 2007. abstract. 査読有
55. Kuraoka I, Ito S, Wada T, Hayashida M, Lee L, Saijo M, Nakatsu Y, Matsumoto M, Matsunaga T, Handa H, Qin J, Nakatani Y, Tanaka K: Isolation of XAB2 complex involved in pre-mRNA splicing, transcription and transcription-coupled repair. **J. Biol. Chem.** 283:940-950, 2008. abstract. 査読有
56. Agawa Y, Sarhan M, Kageyama Y, Akagi K, Takai M, Hashiyama K, Wada T, Handa H, Iwamatsu A, Hirose S, Ueda S: Drosophila Blimp-1 is a transient transcriptional repressor that controls timing of the ecdysone-induced developmental pathway. **Mol. Cell. Biol.** 27: 8739-8747, 2007. abstract. 査読有
57. Iizumi Y, Sagara H, Kabe Y, Azuma M, Kume K, Ogawa M, Nagai T, Gillespie P G, Sasakawa C, Handa H: The Enteropathogenic E. coli effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. **Cell Host & Microbe.** 2:383-392, 2007. abstract. 査読有
58. Tsukamoto H, Kawano M, Inoue T, Enomoto T, Takahashi R, Yokoyama N, Yamamoto N, Imai T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H: Evidence that SV40 VP1-DNA interactions contribute to the assembly of 40-nm spherical viral particles. **Genes Cells.** 12:1267-1279, 2007. abstract. 査読有
59. Yamaguchi Y, Mura T, Chanarat S, Okamoto S, Handa H: Hepatitis delta antigen binds to the clamp of RNA polymerase II and affects transcriptional fidelity. **Genes Cells.** 12:863-875, 2007. abstract. 査読有
60. Zhu W, Wada T, Okabe S, Taneda T, Yamaguchi Y, Handa H: DSIF contributes to transcriptional activation by preventing pausing during transcription elongation. **Nucleic Acids Res.** 35: 4064-4075, 2007. abstract. 査読有
61. Amir-Zilberstein L, Ainbinder E, Toube L, Yamaguchi Y, Handa H, Dikstein R: Differential regulation of NF-kappaB by elongation factors is determined by core promoter type. **Mol Cell Biol.** 27, 5246-5259, 2007. abstract. 査読有
62. Kuraoka I, Suzuki K, Ito S, Hayashida M, Kwei JS, Ikegami T, Handa H, Nakabeppu Y, Tanaka K. RNA polymerase II bypasses 8-oxoguanine in the presence of transcription elongation factor TFIIS. **DNA Repair.** 6:841-851, 2007. abstract. 査読有
63. Narita T, Yung T M C, Yamamoto J, Tsuboi Y, Tanabe H, Tanaka K, Yamaguchi Y, Handa H: NELF interacts with CBC and participates in 3'-end processing of replication-dependent histone mRNAs. **Mol Cell.** 26:349-365, 2007. abstract. 査読有
64. Sandhu A, Kumagai Y, Lapicki A, Sakamoto S, Abe A, Handa H: High efficiency Hall effect micro-biosensor platform for detection of magnetically labeled biomolecules, **Biosensors and Bioelectronics.** 22:2115-2120, 2007. abstract. 査読有
65. Yokoyama N, Kawano M, Tsukamoto H, Enomoto T, Inoue T, Takahashi R, Nakanishi A, Imai T, Wada T, Handa H: Mutational analysis of the carboxyl-terminal region of the SV40 major capsid protein VP1. **J. Biochem.** 141:279-286, 2007. abstract. 査読有
66. Nakanishi A, Itoh N, Li P P, Handa H, Liddington R C, Kasamatsu H: Minor capsid proteins of SV40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry, but are required for nuclear entry of the viral genome. **J. Virol.** 81:3778-3785, 2007. abstract. 査読有
67. Nishio K, Ikeda M, Gokon N, Tsubouchi S, Narimatsu H, Mochizuki Y, Sakamoto S, Sandhu A, Abe M, Handa H: Preparation of size controlled (30-100 nm) magnetite nanoparticles for biomedical applications. **J. Magn. Magn. Mater.** 310:2408-2410, 2007. abstract. 査読有
68. Nishio K, Gokon N, Hasegawa M, Ogura Y, Ikeda M, Narimatsu H, Tada M, Yamaguchi Y, Sakamoto S, Abe M, Handa H: Identification of a chemical substance that is immobilized to ferrite nanoparticles (FP). **Colloid and Surface B: Biointerfaces.** 54:249-253, 2007. abstract. 査読有
69. Yamamoto N, Suzuki M, Kawano M, Inoue T, Takahashi R, Tsukamoto H, Enomoto T, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H: Adeno-associated virus site-specific integration is regulated by TRP-185. **J.**

Virol. 81:1990-2001, 2007. Abstract. 査読有

70. Yugami M, Kabe Y, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H: hnRNP-U enhances the expression of specific genes by stabilizing mRNA. **FEBS Lett.** 581:1-7, 2007. abstract. 査読有
[学会発表] (計 204 件)

1. Tsuchiya K, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: GSK3 inhibitor induces the intestinal differentiation by the protein stabilization of Atoh1. DDW2009. Chicago, 2009年6月2日

2. Okamoto R: Notch1 activation prompts goblet cell depletion and expression of PLA2G2A in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. DDW2009. Chicago, 2009年6月1日

3. Totsuka T: Systemic, but not intersinal, IL-7 is essential for the development and persistence of Chronic Colitis. DDW2009. Chicago, 2009年5月31日

4. Watanabe M: Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: Current Understanding. Asia Pacific Working Group Inaugural Meeting on IBD. Chaina, 2009年3月7日

5. Tsuchiya K, Inoue K, Aragaki M, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Notch signaling suppresses the transcriptional activity of Hath1 Gene, resulting in the undifferentiated form of human intestinal epithelial cells. DDW 2008. San Diego, 2008年5月20日

6. 渡辺 守: 炎症性腸疾患と発癌. 第106回日本内科学会総会・講演会. 東京, 2009年4月10日

7. 渡辺 守: 「消化器疾患のトピックス」IBD. 第51回日本消化器病学会. 京都, 2009年10月17日

8. 渡辺 守: 炎症性腸疾患における Notch シグナル異常と分子標的の可能性. 第37回日本臨床免疫学会総会. 東京, 2009年11月14日

9. 渡辺 守: 炎症性腸疾患における粘膜免疫異常と上皮分化・再生障害の接点. 第29回日本炎症・再生医学会. 東京, 2008年7月9日

10. 渡辺 守: Ulcerative colitis: A disorder of epithelial cell differentiation? 第93回日本消化器病学会 (4th Joint Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology and the American Gastroenterological Association). 青森, 2007年4月21日

11. 渡辺 守: Emerging issues in inflammatory bowel diseases. 神戸. 2007年10月15日-18日

12. Kiyoshi Takeda: Innate immune

responses at the intestinal mucosa. The first CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, Shanghai, China, 2009年11月7日-8日

13. Kiyoshi Takeda: Innate immune responses at the intestinal mucosa. The 2009 Fall Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea, 2009年11月9日-10日

14. Kiyoshi Takeda: ATP from commensal bacteria induces Th17 cell development in the intestine. Regulation of innate immunity, Seoul, Korea, 2009年9月17日-18日

15. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda: A mechanism for development of intestinal Th17 cells causing intestinal inflammation. The 7th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research. Guangzhou, China, 2008年12月7日-10日

16. 竹田 潔: 腸管粘膜に特有の自然免疫系細胞の機能 第39回日本免疫学会学術集会、大阪, 2009年12月2日-4日

17. 竹田 潔: 自然免疫系の活性制御と免疫疾患 (特別講演) 第51回日本小児血液学会, 東京, 2009年11月27日-29日

18. Kiyoshi Takeda: Commensal bacteria-derived ATP mediates development of intestinal Th17 cells. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2009、横浜, 2009年7月9日-10日

19. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Masahiro Yamamoto NFAT is responsible for TLR-independent innate immune responses to a protozoan parasite 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、神戸, 2008年12月9日-12日

20. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda: Commensal bacteria-derived ATP mediates Th17 cell development in the intestinal lamina propria (Symposium) 第37回日本免疫学会学術集会, 京都, 2008年12月1日-3日

21. 竹田 潔: 自然免疫系と炎症性腸疾患 第29回日本炎症・再生医学会、東京, 2008年7月9日

22. 竹田 潔: 腸内フローラと炎症性腸疾患 第12回腸内細菌学会、東京, 2008年6月13日

23. Kiyoshi Takeda: Regulation of inflammatory responses by nuclear IκB proteins. Regulation of inflammatory responses by nuclear IκB proteins., Sendai, 2007年10月25日

24. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, Tsukuba,

2007年10月29日

25. 竹田 潔：自然免疫系による結核感染防御機構，第60回日本細菌学会九州支部総会、長崎，2007年10月12日

26. 竹田 潔：自然免疫シグナルの制御機構第28回日本炎症・再生医学会、東京，2007年8月2日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10175127

(2) 研究分担者

竹田 潔 (TAKEDA KIYOSHI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20309466

半田 宏 (HANDA HIROSHI)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：80107432

(3) 連携研究者

()

研究者番号：