

平成21年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890064

研究課題名（和文） 腸管特異的Notch標的遺伝子の探索による粘膜再生療法の開発

研究課題名（英文） Development of mucosa-regenerating therapy through comprehensive analysis of intestine-specific Notch target genes

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：本研究では炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎患者の炎症部に於ける上皮分化制御の分子機構と粘膜再生メカニズムに焦点をあて、粘膜再生促進につながる分子標的の探索を行った。我々が独自に樹立したヒト腸管上皮培養細胞株及び患者臨床検体を用いた分子生物学的探索により、炎症性腸疾患患者の粘膜上皮に於ける再生促進に寄与する主たる分子シグナルとしてNotchシグナルを同定した。同シグナルは炎症性腸疾患に特徴的な上皮分化様式を決定するシグナル経路であるのみならず、細胞増殖を介した粘膜再生に積極的に関与し、同シグナル活性化の欠如が即ち粘膜再生不全につながることを明確に示した。さらに、ヒト腸管上皮細胞におけるNotch活性化により制御される遺伝子群の網羅的探索により、粘膜再生応答における腸管上皮細胞トランスクリプトームを明らかとし、粘膜再生治療に於ける新規標的分子探索の基盤を構築した。これらの成果は炎症性腸疾患における難治化の主たる要因である粘膜再生不全の機序を分子レベルで解明した画期的知見であるのみならず、特定のシグナル活性化を誘導することにより粘膜再生を促進する新規治療法の開発に重要な分子基盤を確立したものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患・粘膜再生・Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

近年我が国における炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）患者は急速に増加しつつあり、従って同疾患における古典的治療に不応である難治例もまた増加の一途である。これまで同疾患の本態は遷延する粘膜の炎

症であると考えられてきたが、難治症例における粘膜上皮再生不全が疾患予後と密接な関連を持つ事が明らかとされ、炎症の制御とともに粘膜再生促進を如何に円滑に完了するかが疾患治癒を左右する重要な分岐点であると考えられている。さらに遷延する粘膜の

炎症は粘膜上皮の再生異常とともに長期的には Colitic cancer の発症と密接に関わり得る事から、上皮再生/修復機構の詳細な解明は急務である。近年の分子生物学のめざましい進展は、従来解析困難であった様々な病態を分子レベルで解明し、画期的な分子標的治療の基盤を提供してきた。研究代表者らは最新の分子生物学的手法を炎症性腸疾患の病態解析に導入することにより独自の研究成果を提供してきた。即ち、研究代表者らは傷害後の腸管上皮再生に骨髄細胞による組織修復機構が関わることを明らかとし (Nat Med 2002)、腸管上皮再生研究において世界的に高い評価を獲得してきた。さらに、腸管上皮における杯細胞の機能解析から、同細胞において Interferon Regulatory Factor (IRF)ファミリー転写因子群による腸管上皮特異的な転写制御によりサイトカイン分泌を含む初期免疫応答を調節する機構が内在していることを明らかとした (Mol Cell Biol 2004)。このように腸管炎症を制御する細胞内シグナルと上皮細胞分化制御の両面から炎症性腸疾患の病態解析を行い、画期的な成果を報告してきた。従って腸管炎症と粘膜再生を統合する独創的な視点を提唱し、これに基づく腸管炎症と粘膜再生機構の解析こそが炎症性腸疾患の新規治療法の開発につながる事を指摘してきた。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究成果を発展させ、1)炎症性腸疾患局所にみられる杯細胞の減少とパネート細胞の増加を司る分子機構の解明 2)上皮再生過程における細胞分化、増殖を制御する分子シグナル系の同定を行なうこと、を目的とした。

3. 研究の方法

1)潰瘍性大腸炎病変部において特異的に出現する「杯細胞の減少」と「異所性パネート細胞」と大腸上皮細胞内 Notch シグナル活性化の関係について免疫組織学的に解析を行った。

2)ヒト大腸上皮由来培養細胞株に於ける活性型 Notch 誘導発現系を樹立し、これを用いて Notch シグナル活性化が大腸上皮細胞内の遺伝子発現に与える影響について、マイクロアレイ法を用いて解析し、得られた成果につき分子生物学的手法に基づき解析を加えた。

3)潰瘍性大腸炎病変部における Notch 活性化の亢進が同疾患の病態に如何なる役割を担っているかを解析するため、大腸炎モデルマウス(デキストラン硫酸投与による大腸炎誘導モデル)に Notch シグナル阻害薬を投与し、その効果を組織学的に解析した。

4. 研究成果

1)潰瘍性大腸炎病変部の免疫組織学的解析により、炎症部上皮細胞において細胞分化

制御シグナル系として知られる Notch シグナルの構成分子の発現亢進を認めた。即ち、a)ヒト小腸および大腸粘膜に於いて、活性型 Notch 及びその標的遺伝子 Hes1 は陰窩内の上皮細胞に限局して発現が確認された。b)潰瘍性大腸炎病変部の陰窩においては杯細胞の著しい減少と一致して同部位の上皮における Notch の広範な活性化が確認された。

2)ヒト大腸癌由来培養細胞株に於ける誘導発現系を用いて Notch シグナル活性化が大腸上皮細胞分化に与える影響を解析した。その結果、a)ヒト大腸癌由来細胞株に強制的に Notch 活性化を誘導する事により、杯細胞特異的遺伝子 MUC2 の mRNA およびタンパク発現の著しい現象が誘導され、杯細胞の特異的機能である粘液分泌能に於いても著しい低下が確認された。b)同様の Notch 活性化を誘導する事によりパネート細胞特異的遺伝子 PLA2G2A の発現及び分泌の亢進が誘導された。更に同シグナルの活性化により、腸管上皮細胞内で発現制御を受ける遺伝子群を網羅的に解析した結果、Notch 活性化細胞に於けるトランスクリプトームが明らかとなり、複数の新規標的遺伝子候補が得られた。これら候補遺伝子は、Notch シグナル下流で粘膜再生応答に重要な機能を有している可能性が考えられ、粘膜再生治療に於ける新規分子標的となり得る可能性があるものと考えられる。

3)大腸炎モデルマウス(デキストラン硫酸投与による大腸炎誘導モデル)に Notch シグナル阻害薬を投与し、粘膜再生時の Notch 活性化を阻害した結果、a)Notch シグナル阻害薬投与によりデキストラン硫酸誘導腸炎の著しい増悪と個体死亡率の上昇が誘導された。b)Notch シグナル阻害薬は非炎症部腸管に於ける杯細胞分化を促進する効果を有する一方、炎症部腸管に於いて細胞増殖を著しく抑制する効果を有していた。即ち、同阻害薬投与により、炎症により傷害された粘膜上皮の再生反応は著しく抑制されるとともに広汎かつ重篤な上皮の脱落が観察され、これにより大腸炎の病態が致死的な増悪を来したものと考えられた。従って、炎症性腸疾患に於ける Notch シグナル活性化の亢進は、組織再生に必須のイベントであり、同シグナル活性化の欠如が即ち粘膜再生不全に直結している事が明確に示された。

これらの研究成果は、炎症性腸疾患の粘膜再生の中心に上皮細胞における Notch 活性化が存在し、同シグナルの活性化不全と粘膜再生不全が直結する事を示した画期的成果である。本研究の成果を基盤とし、腸管上皮に於ける Notch 活性化及び下流遺伝子の発現調節を制御する事により、粘膜再生が困難な難治性炎症性腸疾患に対する新規治療法の確

立に貢献し得るものと考えられる。

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 15 件)

1. Okamoto R, Tsuchiya K, et al: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296:G23-35 査読有
2. Murayama M, Okamoto R, Tsuchiya K, Akiyama J, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 2009;44 (3) 173-182 査読有
3. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Fujii T, Nozaki K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Totsuka T, Watanabe M: Colitogenic CD4(+) effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. *Inflamm Bowel Dis* 2008 (in press) 査読有
4. Yoshioka A, Okamoto R, Oshima S, Akiyama J, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Flagellin stimulation suppresses IL-7 secretion of intestinal epithelial cells. *Cytokine* 2008;44 (1)57-64, 査読有
5. Nemoto Y, Kanai T, Tohda S, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Fukuda T, Miura O, Yagita H, Watanabe M: Negative feedback regulation of colitogenic CD4(+) T cells by increased granulopoiesis. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14 (11):1491-503. 査読有
6. Hino K, Tsuchiya K, Fukao T, Kiga K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Inducible expression of microRNA-194 is regulated by HNF-1alpha during intestinal epithelial cell differentiation. *RNA* 2008 Jul;14(7):1433-42. 査読有
7. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Tsuchiya K, Sakamoto N, Okamoto R, Watanabe M. Immunosenescent colitogenic CD4(+) T cells convert to regulatory cells and suppress colitis. *Eur J Immunol* 2008 May;38(5):1275-86. 査読有
8. 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 of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. *J Immunol* 2008 Apr 15;180(8):5291-9. 査読有
9. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Apr 18;368(4):923-9. 査読有
10. 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* 2008 Jan 1;180(1):383-90. 査読有
11. Ito Y, Kanai T, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Yoshioka A, Tomita T, Nagaishi T, Sakamoto N, Sakanishi T, Okumura K, Yagita H, Watanabe M: Blockade of NKG2D signaling prevents the development of murine CD4+ T cell-mediated colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008 Jan;294(1):G199-207. 査読有
12. 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* 2007 Apr 15;178(8):4937-46. 査読有
13. 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* 2007 Apr 15;178(8):4737-48. 査読有
14. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of Hath1 and beta-catenin by Wnt- glycogen synthase kinase 3 beta in human colon cancer.

Gastroenterology 2007; 132(1):
208-220. 査読有

15. 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* 2007; 132(1): 176-189. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. Okamoto R, Tsuchiya :Dysregulated differentiation of intestinal epithelia in UC. 3rd Japan - Korea IBD Symposium. 2008.9.20. ソウル
2. Onizawa M , Nagaishi T , Nemoto Y , Oshima S , Okamoto R, et al: Neutralization of tumor necrosis factor suppresses the development of colitis-associated tumor in mice. DDW 2008. 2008.5.21. San Diego
3. Tsuchiya K , Inoue K, AragakiM , Okamoto R et al: Notch signaling suppresses the transcriptional activity of Hath1 Gene, resulting in the undifferentiated form of human intestinal epithelial cells. DDW 2008. 2008.5.20. San Diego.
4. Okamoto R: Role of Notch signaling in inflammatory bowel diseases. アジア太平洋消化器病学会. 2007.10.16. 神戸.
5. Okamoto R: Activated Notch Signalling Suppresses Generation of Goblet Cells in the Human Intestinal Mucosa. DDW2007. 2007.5.20. ワシントン

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・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授
研究者番号：50451935

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし