

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590694

研究課題名（和文） ライブ環境における小腸全長機能解析と病態の解明

研究課題名（英文） The elucidation of functional regulation and pathogenesis in the entire human small intestine.

研究代表者

荒木 昭博（ARAKI AKIHIRO）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80361690

研究成果の概要（和文）：

これまで未知の領域であるヒト小腸に関して、バルーン内視鏡はライブでの生理的な環境下における観察だけでなく、生検による上皮細胞、間質、腸内細菌を含めた小腸環境を反映した検体の採取が可能となった。そこで本研究では、これまで申請者らが解析を行ってきた腸管上皮細胞の分化再生機構をさらに発展させ、ヒト小腸全長における腸管上皮細胞の組成制御、機能制御を解析することで、小腸全体としての機能評価を確立することを目的とし、最終的には各小腸疾患における病態を抽出し治療の標的を集約させることである。またその補助としてヒト小腸組織の培養におけるex vivoの小腸上皮機能、幹細胞機能評価を確立し消化管機能スクリーニング法を開発する。本研究ではクローン病患者と健常者との比較を行い、クローン病患者の空腸では内視鏡的に正常粘膜であり、生検組織による病理学的検討においても健常人と比較しても大きな変化を認めなかった。しかし、生検検体のRNAから遺伝子発現を定量的PCRを用いて解析したところ、分化制御遺伝子、形質発現遺伝子の発現差異を認めたため、さらにマイクロアレイにて網羅的に遺伝子解析を施行したところ有意に差異のある遺伝子を抽出しえた。

研究成果の概要（英文）：

The balloon endoscopy enables the collection of the biopsy specimen which reflected the entire small intestine environment in live. Therefore, we develop the differentiation mechanism of the intestinal epithelial cells to establish the assessment of whole small intestinal function in human. Then we finally aimed to consolidate a target of the treatment for small intestinal disease. In addition, I aimed to establish ex vivo culture of small intestinal epithelial cells to assess the function of the stem cells as a screening method. In this study, we compared the pathological findings between the patients with Crohn's disease and healthy control. Interestingly, no change was shown in jejunum between the patients with Crohn's disease and healthy control. However, comprehensive gene expression analysis with microarray showed the significant difference between the patients with Crohn's disease and healthy control. Finally we identified specific genes in Japanese patients with Crohn's disease.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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

キーワード：ダブルバルーン内視鏡、DBE、小腸生検、Hath1、Atoh1、マッピング生検、小腸培養、杯細胞

1. 研究開始当初の背景

以前より申請者らは大腸において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による疾患病態と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、上皮細胞機能障害が病態発現の原因となる可能性を示唆した。

以上の解析より正常な上皮細胞の構築が腸管のホメオスター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 Atoh1 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 遺伝子発現は Notch シグナルによって負に制御されていること(Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009)、2) Hath1 タンパクは Wnt シグナル下の GSK3 のターゲットとなり、 β -catenin と同様のタンパク分解制御機構を用いて、 β -catenin とは相反する分解制御をうけることから、腸管上皮の「 β -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. 2007)、を示した。さらに潰瘍性大腸炎では Notch シグナル亢進が Hath1 遺伝子発現を抑制することで杯細胞減少を引き起こし、大腸癌では Wnt シグナル亢進が Hath1 蛋白分解をおこし未分化形質を維持することを明らかとし、上皮分化異常が大腸疾患の病態発現に関連する事を示した。

一方小腸においても、クローン病の疾患感受性遺伝子の解析からパネート細胞の抗菌物質の産生低下や、オートファジー機能障害によ

る抗菌力の減少が指摘されており、小腸上皮細胞の機能破綻が種々の小腸疾患の病態と関わることが予想された。さらに、この上皮機能異常は分化制御の異常以外に腸内細菌叢の増殖パターンなど腸管管腔内環境に影響されると着想し、これら管腔内環境を維持したままバルーン内視鏡を用いて小腸粘膜を生検で採取することが小腸のライブ環境を解析することを可能にすると申請者は計画した。

すなわち、本研究では1)ヒト小腸全長粘膜構造解析、2)小腸生検組織培養による上皮細胞機能解析を中心課題に据え、それぞれ、1)小腸の長軸構造制御機構の解明、2)上皮細胞機能評価法の確立を実行することで、経時的・3次元的な全小腸内環境の理解を目指し最終的には小腸疾患の病態との連係を抽出する事を目的としこれらを研究期間3年で遂行する予定である。

2. 研究の目的

小腸は全長7m、表面積がテニスコート2面分と人体において最大の器官である。これまでは検査が難しく、暗黒大陸と称されるほどその実態は把握出来ない状態が続いていた。ところが近年、カプセル内視鏡、バルーン内視鏡の登場によりその環境は劇的に変化し、小腸病態、機能制御に注目が集まっている。驚くべき事に各内視鏡による小腸観察は予想以上の多彩な病変が描出され、その疾患の原因・治療に関して新たな領域の創出として認識されつつある。しかし小腸の病態を理解するにあたり、正常の機能制御自体が全く解明されていない状況である。以前は手術検体、解剖検体を用いて解析されていたが、いずれも生理的な状態から逸脱しており食事負荷・腸内細菌の暴露などを含めた、いわゆる「ライブ環境」での小腸解析は不可能であった。小腸は常に食餌抗原、腸内細菌、消化液に暴露されている環境であることから、これらの影響をすべて加味した制御機構の解明が求められる。さらに全長が7mの小腸は空腸と回腸に区分され、解剖学的に明確な差はないとされていないが、小腸全体が均一な組織として機能するよりは部位別に機能が異なることが予想される。今回バルーン内視鏡により生検を行うことで、ライブ環境での全小腸の採取・解析が可能となった。そこで本研究においては、同一人物による小腸全体の生検検体による上皮細胞機能を部位別に解

析することで、小腸のライブ環境での機能制御を構築し、病態における異常を検出することを目的とする。

3. 研究の方法

バルーン内視鏡によりヒト全小腸から生検を施行し、採取した検体を用いて細胞組成、機能遺伝子発現を解析し、部位別の細胞制御機構を解明する。部位間の比較は同一人物のため、個人差を回避出来る唯一の系である。また次世代シーケンスにより網羅的な遺伝子発現解析を行い、部位特異的発現遺伝子を抽出し、その部位のみの特徴的な機能や細胞組成制御機構を同定する。また各部位からの小腸を培養することで、純粋な上皮細胞の分化系を確立し、各部位での幹細胞機能、細胞組成制御、部位特異的機能を抽出し、*ex vivo*における各腸管機能評価を確立する。これらの全小腸としての基礎解析をもとに各小腸疾患における生検検体、および検体培養した上皮機能を用いて正常人と比較検討することで、小腸機能からみた病態の有無を明らかとする。

研究計画・方法 (平成22年度)

1) ヒト小腸全長粘膜構造解析(荒木・岡田・大学院生1名)

内視鏡所見上正常部分の小腸を5区域(空腸2区域、回腸3区域)に分けて、それぞれダブルバルーン内視鏡にて1個人ごとに生検し、一カ所から3個生検を施行する。

1つはホルマリン固定後OCT包埋し、免疫染色用として準備し、1つはRNA発現解析用に、1つは培養用として準備する。

A)免疫染色による組織局在解析は各部位において下記のごとく発現解析を行う。

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、 β -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)として評価し、部位別特徴の有無を検討する。

B)遺伝子形質発現解析としてはRNA解析用の検体を用い下記項目により解析する。

幹細胞形質 Musashi-1, Lgr-5、杯細胞 Mucin2, TFF3, IL-7、アルシアンブルー染色

内分泌細胞 CgA, CCK, NeuroD, Ngn3、パネート細胞 Defensin5, Defensin6, SOX9, lysozyme

吸収上皮細胞 Lactase, Isomaltase, CD10

2) 小腸生検組織培養による上皮細胞機能解析(土屋・渡辺・大学院生1名)

マウス小腸では既報通り、EDTA処理にて上皮を分離し、Matrigelにて封入して3Dにて培養液にNoggin, Rspnsin-1, EGFを添加することで幹細胞から小腸構造が構築出来ることを確認する。

ヒト小腸生検検体も同様にEDTAにて間質と上皮組織を分離し、培養することを確立する。

ヒト小腸の条件検討として添加物のリコンビナント蛋白をヒト由来に置き換えて、至適濃度の組み合わせを行いながら培養を試みる。培養条件を決定したのち、培養後1週間後にクリプトが十分増殖したところで、RNA発現解析を行う。具体的には、同一人物の部位別の培養上皮のRNA発現の差異をマイクロアレイ及び全RNAシーケンスにより上皮に特化した部位別の特異的発現遺伝子を抽出する。また同部位でのライブ環境での生検検体と上皮を純粋に培養した細胞でのRNA発現の差異を検討する。

研究計画・方法 (平成23年度以降)

1) ヒト小腸全長粘膜構造解析(荒木・岡田・大学院生1名)

A)同一人物の部位別のRNA発現解析により、形質発現の差異を描出した検体に関して、マイクロアレイ解析、全RNAシーケンスを行い、部位別のRNA発現を網羅的に検索し、それぞれ部位において特異的に発現している遺伝子を同定する。その遺伝子の局在を免疫染色にて確認する。さらに計画2)の同一人物の生検検体からの部位別培養小腸組織と発現特異性を確認する。

B)上記の部位特異的発現遺伝子を発現ベクターに組み込みヒト小腸由来細胞株であるHIEC細胞に発現させ、細胞形質発現に変化があるか検討する。

C)疾患における小腸解析。まず疾患ごとにカテゴリーを設定する。

カテゴリー1:クローン病、潰瘍性大腸炎、FAPなどの腸管を主病変とする疾患。

カテゴリー2:SLE、PSS、皮膚筋炎、RAなど付随病変として腸管に病変を有する疾患。

カテゴリー3:基礎疾患がなく小腸内視鏡にて小腸にびらん、潰瘍などの病変を認める。以上の疾患において全小腸を生検し、細胞組成、遺伝子発現を検討する。正常の部位制御と異なる場合、上記計画で明らかにされる部位特異的発現遺伝子の発現を検討し、各疾患における腸管異常を抽出する。

2) 小腸生検組織培養による上皮細胞機能解析 (土屋・渡辺・大学院生1名)

A) 培養上皮の消化管機能スクリーニングの開発。下記のごとく項目を設定して各機能を評価する。幹細胞機能 (幹細胞数、クリプト数) 増殖能、吸収負荷試験 (アミノ酸負荷による吸収)、抗菌能 (細菌負荷、LPS 処理における抗菌物質分泌)、修復能 (機械的、放射線、抗がん剤、紫外線などの傷害による修復遺伝子の発現、細胞耐性を評価)、消化管ホルモン産生能 (ホルモンの定量)。

さらに上記疾患における培養細胞の消化管機能を解析し異常点を抽出する。

B) 計画1) で明らかとなった部位特異的遺伝子をレンチベクターに組み込み、培養上皮に発現させ、形質発現、消化管機能の変化を解析し、部位別機能制御を明らかとする。

C) 上記疾患における培養上皮の形質発現、消化管機能を評価し、上皮細胞だけの培養環境と生検による小腸内ライブ環境とを比較して、上皮細胞を主とした病態か、腸内細菌、間質などの影響が病態の本態かを解析する。

4. 研究成果

本研究においてバルーン内視鏡によりマッピング生検を行うことでライブ環境での全小腸の採取・解析を行い、同一人物の生検検体を用いて部位別の遺伝子発現の差異を解析することを可能とした。健常人10症例を統合した結果、空腸から回腸にかけて杯細胞が増加し吸収上皮細胞が減少する一方、パネート細胞・内分泌細胞の構成は全小腸を通じて一定であることを示した。また遺伝子発現解析の結果により、回腸末端での杯細胞増加は杯細胞分化に必須である *Atoh1* と *Klf4* の発現がそれぞれ独立して増加することが示唆された。興味深いことに、生検検体の免疫染色による局在解析では *Atoh1* 陽性細胞は空腸から回腸にかけて陰窩底部から徐々に絨毛の管腔側に上昇して増加し、逆に *Klf4* は空腸側では絨毛頂部にのみ発現を認めるが回腸側になるにつれて絨毛を陰窩側に下降して発現増加しており、回腸末端ではその両者が共局在することで杯細胞形成を促進させることを明らかとした (*J Gastroenterol.* 2011)。さらに以上の部位別発現、局在解析を定量化し部位間での比較を行うと空腸と回腸口側部までは変化を認めず、回腸末端のみ有意差をもって発現変化を認めることが明らかとなった。これまでは小腸を空腸と回腸に分類し、特に根拠無く口側2: 肛門側3の比率で区分されており教科書にも記載されているが、今回の検討により分子生物学的

には口側3: 肛門側2で区分されるというヒト小腸の構造本幹に関わる現象の解明に成功し、小腸疾患では回腸末端が好発部位であることとの関連も示唆された。つまり小腸には明確な区切りは無いものの、個々の部位での異なる機能を統合した結果が「小腸機能」として制御されるため、申請者は小腸疾患においても「病変部」のみを詳細に解析するだけでなく、「小腸全体」を疾患の病態として理解する必要があるという概念を創出できた。

さらに患者同意の下400サンプル以上の小腸生検検体を保存し、遺伝子発現、蛋白発現、局在解析が可能な状況とし、クローン病に関しても患者同意の下10症例の小腸マッピング生検検体の解析を行っている。また一部小腸生検検体の網羅的遺伝子発現解析を行いクローン病では潰瘍の有無にかかわらず回腸の生検検体からは炎症性サイトカイン産生、リンパ球特異的発現遺伝子が検出されたことから炎症状態部位を同定したところ、内視鏡的及び病理的な病変範囲と生検検体遺伝子発現範囲は異なることを明らかとした。

また生検検体からDNAを抽出し16S rRNAを増幅することで粘膜に付着する菌由来の配列の抽出が可能であった。さらに次世代シーケンスによりゲノム配列を網羅的に解析し小腸各部位での腸内細菌叢を同定したところ、興味深いことに便中の一般的な細菌叢と粘膜付着菌叢は全く異なることが明らかとなり、小腸上皮細胞と直接接する付着菌の同定がクローン病の病態に関与する可能性が期待できる状況としている。

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 7件)

1: Okada E, Araki A, Suzuki S, Watanabe H, Ikeda T, Watanabe T, Kurata M, Eishi Y, Watanabe M. Histological Diagnosis of Follicular Lymphoma by Biopsy of Small Intestinal Normal Mucosa. *Dig Endosc.* 2012 22. 査読有
doi:10.1111/j.1443-1661.2012.01386.x.

2: Araki A, Suzuki S, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Watanabe M. Modified single-operator method for double-balloon endoscopy. *Dig Endosc.* 2012 24(6):470-4. 査読有
doi:10.1111/j.1443-1661.2012.01321.x.

3: 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. 2012;6(1):328. 査読有
doi:10.1186/1752-1947-6-328.

4: Fujita K, Naganuma M, Saito E, Suzuki S, Araki A, Negi M, Kawachi H, Watanabe M. Histologically confirmed IgG4-related small intestinal lesions diagnosed via double balloon enteroscopy. Dig Dis Sci. 2012;57(12):3303-6. 査読有
doi: 10.1007/s10620-012-2267-4.

5: Sakurai K, Nagahara A, Inoue K, Akiyama J, Mabe K, Suzuki J, Habu Y, Araki A, Suzuki T, Satoh K, Nagami H, Harada R, Tano N, Kusaka M, Fujioka Y, Fujimura T, Shigeto N, Oumi T, Miwa J, Miwa H, Fujimoto K, Kinoshita Y, Haruma K. Efficacy of omeprazole, famotidine, mosapride and teprenone in patients with upper gastrointestinal symptoms: an omeprazole-controlled randomized study (J-FOCUS). BMC Gastroenterol. 2012 May 1;12:42. 査読有
doi: 10.1186/1471-230X-12-42.

6: Hyun SB, Kitazume Y, Nagahori M, Toriihara A, Fujii T, Tsuchiya K, Suzuki S, Okada E, Araki A, Naganuma M, Watanabe M. Magnetic resonance enterocolonography is useful for simultaneous evaluation of small and large intestinal lesions in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2011 May;17(5):1063-72. 査読有
doi:10.1002/ibd.21510

7: 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. 2011 Feb;46(2):191-202. 査読有
doi: 10.1007/s00535-010-0346-x.

〔学会発表〕（計6件）

1: 荒木昭博 ダブルバルーン内視鏡の一人法新しい挿入方法 Hooking Technique. 第99回
2: 鈴木伸治、荒木昭博、渡辺 守 原因不明消化管出血（OGIB）症例におけるカプセル内

視鏡に対するダブルバルーン内視鏡の有用性の検討. JDDW2011 2011. 10. 22 福岡
3: 荒木昭博 カプセル内視鏡の画像保存に関する検討. 第81回 日本消化器内視鏡学会総会 2011. 08. 17 名古屋
4: 荒木昭博 小腸内視鏡. 第22回 日本消化器内視鏡学会関東セミナー ～内視鏡診断と治療の進歩～ 2011. 01. 23 東京
5: 土屋輝一郎、岩寄美智子、鄭 秀、岡本英子、加納嘉人、岡本隆一、中村哲也、荒木昭博、渡辺 守 ダブルバルーン内視鏡による全小腸マッピング生検の有用性. 第28回 大腸検査学会総会 2010. 11. 28 東京

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

名称：ダブルバルーン内視鏡用係止具及び内視鏡用アダプタ
発明者：荒木昭博、土屋輝一郎、大島茂
権利者：国立大学法人 東京医科歯科大学
種類：特許
番号：特許第5103610号
取得年月日：平成24年10月12日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 昭博 (ARAKI AKIHIRO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80361690

(2) 研究分担者

土屋 輝一郎 (TSUCHIYA KICHIRO)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号：40376786
岡田 英理子 (OKADA ERIKO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20376784
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