

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460945

研究課題名(和文) クローン病全小腸内環境解析によるバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenesis in CD using mapping biopsy from entire 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・准教授

研究者番号：80361690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クローン病における小腸内環境を理解し、最終的には本邦クローン病における病態を抽出し治療の標的を集約させることを目的とした。バルーン内視鏡によりクローン病全小腸からマッピング生検を施行し、部位別の細胞制御機構を解析した。その結果、潜在的炎症は回腸全域に波及していることが示唆された。抗菌物質の一つであるHD-6産生低下を認めたことから、消化管バリア能の低下がクローン病においても示唆された。さらにHD-6の発現制御解析を行い、カτεニンとAtoh1が協調して転写活性を制御することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand entire small enteral environment in the Crohn's disease (CD). Mapping biopsy from entire small intestine in CD patients by a balloon endoscope. As a result, it was suggested that potential inflammation spread throughout ileum in CD. We found that the HD-6 producing cells were decreased in CD, a dysfunction of the gastrointestinal barrier ability was suggested in CD. Furthermore, I performed the molecular mechanism for the expression of HD6 and found that catenin and Atoh1 controlled transcription activity of HD6.

研究分野：内視鏡学

キーワード：バルーン内視鏡 マッピング生検 潜在的炎症 クローン病

1. 研究開始当初の背景

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、これまで申請者が解析を行ってきたヒト小腸全長における腸管上皮細胞の組成制御・機能制御をさらに発展させ、クローン病における全小腸内の上皮細胞構成、腸内細菌叢を部位別に解析を行い、クローン病における小腸内環境を理解し、最終的には本邦クローン病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。

2. 研究の目的

小腸は全長 7 m、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以前は手術検体、病理解剖献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、分泌蛋白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 7 m 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たが、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。そこで申請者は平成 22-24 年基盤研究(C)「ライブ環境における小腸全長機能解析と病態の解明」(研究代表者)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。健康人 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考えた。

特に小腸病変が発見された場合最初にクローン病との鑑別が必要となることが多いが、病理検査の診断率が低いため小腸病変を確定診断することが困難な状況である。さらに欧米クローン病で同定された *NOD2* や *ATG16L1* などの疾患感受性遺伝子は本邦クローン病では認めないことから独自の診断基準となるマーカーを新たに同定する必要がある。

そのため本研究では小腸疾患の中でもクローン病に特定し、クローン病における小腸全体の変化を理解することで本邦独自の病態及び診断基準作成の基盤となることを目的とする。具体的には(1)クローン病小腸マッピング生検における全小腸発現遺伝子解析、(2)全小腸粘膜付着腸内細菌叢メタゲノム解析による疾患特異的細菌の同定、(3)クローン病小腸生検検体からの初代培養法の確立にてクローン病における全小腸環境の理解を目的とし、これらを研究期間 3 年で遂行する予定である。以上の研究に要する

生化学的、分子生物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、研究材料の点でも患者同意の下すでに 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にある。クローン病に関しても患者同意の下すでに 10 症例の小腸マッピング生検検体を保有している。また既に一部小腸生検検体の網羅的遺伝子発現解析を開始しており、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が明らかとなった。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關与する可能性が期待できる状況である。

上皮細胞機能解析においては、マウスの小腸における *ex vivo* 培養法が既に確立されており (*Nature* 2009)、我々も小腸上皮幹細胞から全ての細胞種への分化することを確認している。この上皮細胞の純粋培養系は腸内細菌などの小腸内環境の影響をうけずに、純粋に幹細胞能、上皮増殖分化能、機能制御を解析することが可能であることから、生検検体と比較することで、小腸内環境による影響を推測できる唯一の計画である。現在ヒト生検検体による培養条件の検討を行っており、健康人大腸生検上皮細胞のからの初代培養法は既に確立している。しかし潰瘍性大腸炎患者由来の炎症粘膜からの初代培養は約半数で増殖しないことが判明し、炎症粘膜の上皮細胞の期弱性を示唆していることからクローン病患者での小腸上皮の特殊性も描出できると思われる。さらにマウス小腸上皮初代培養細胞に Flagellin, LPS などの菌体成分を添加することで上皮細胞が自然免疫応答することを確認しており、将来的にはクローン病特異的な上皮-腸内細菌による自然免疫応答の制御機構を解析できる状況にある。以上より、すでに多数の小腸検体を有しており、上皮細胞機能解析方法を独自に確立しているのは当施設のみであり、メタゲノムなど

オーミクス解析を連携研究者である福田との共同研究により解析可能なことから、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。

「小腸」は人体の中で最後にクローズアップされた領域であり、今後次々と新しく創出される小腸疾患の概念を理解するためにも、小腸全体の構造、機能制御を主眼においた「小腸環境」を解明することが必要である。これまでは絨毛単位での局所的な細胞分化制御の解析が主であり、小腸の部位までも考慮した全小腸としての機能評価としては概念すらない状況であるため、本研究は一つの臓器としての根本的な機能評価の基盤を創成し小腸自体の存在意義を発見することで、小腸疾患に対しても小腸全体の環境を病態として認識するという新たな概念を創出することから有意義であると思われる。

またクローン病に代表される小腸疾患の症状は下痢・出血・狭窄・瘻孔形成等粘膜機能不全・再生障害が主たる原因であり、患者の Quality of Life に直結するものである。本研究で得られる成果は小腸粘膜構築・分化機構・管腔内環境制御機構の基盤を確立し、疾患による障害の原因を解明することで、「小腸環境」という新たな疾患領域を克服するものである。さらにヒト小腸培養法の確立は腸管上皮細胞の機能スクリーニング法としてだけでなく、幹細胞から分化誘導する系として再生医療への足がかりになるものである。

以上、本研究は以前より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、バルーン内視鏡という本邦で開発された機器を最大限に活用し、小腸環境という新たな理論基盤をもとにクローン病を代表とする小腸疾患における環境破綻を総合的に理解でき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ます。

3. 研究の方法

バルーン内視鏡によりクローン病全小腸からマッピング生検を施行し、上皮細胞の免疫染色による細胞組成、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い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粘膜付着菌メタゲノム解析を行い、クローン病特異的腸内細菌を抽出し、上皮-菌間の応答を解析する。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* における疾患特異的な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小腸機能からみたクローン病病態の有無を明らかとする。

4. 研究成果

クローン病患者の全長小腸のマッピング生検検体からマイクロアレイを行った。回腸末端の病変部では炎症関連遺伝子の増加を認めたが、内視鏡所見・病理所見で正常の非病変部まで炎症関連遺伝子の増加を認めた。一方で、空腸では発現遺伝子レベルにおいても炎症関連遺伝子の増加を認めず、「炎症」という影響を排除した粘膜のみのクローン病病態が描出できると考えた。そこで、粘膜防御に必須である抗菌物質のディフェンシン産生に着目し解析を行ったところ、Human defensin-6 (HD6)の発現細胞がクローン病空腸において有意に低下していることを発見した (IBD 2016)。その一方で HD5 の発現細胞に有意な差を認めなかったことから、HD6 の発現制御に注目し、HD6 のプロモーター解析を行った。その結果、HD5 とは異なり、-cateninのみならず Atoh1 により HD6 転写活性が誘導され、さらに Atoh1 の転写活性部位を同定し直接 Atoh1 が HD6 プロモーターに結合することを証明した。HD5 は抗菌活性を有しており、粘膜バリア機能に関わることから、これまで詳細な発現機構解析が報告されてきた。その一方で、HD6 は抗菌活性を持たないと多数報告されたことから粘膜バリア能への寄与は低いと考えられ、また、HD5 のプロモーター配列と高い相同性から HD5 と同様の発現制御であると予想されたことから、詳細な HD6 の発現制御解析はほとんど行われていない。しかしながら、2012 年に Chu らが Science 誌に HD6 は分泌後に自己組織化し「ナノネット」を形成することで腸内細菌を補足する作用があることが報告された。この HD6 の細菌捕捉能は HD5 よりも遥かに多いことから、腸管から体内への細菌侵入を防御する役割は HD5 ではなく HD6 が主に働くことが示唆され、その発現制御、病態が注目されている。つまり、本研究で独自に発見したクローン病空腸における HD6 発現低下は、深刻な粘膜バリア障害の誘因となりクローン病病態の根幹に関わることが示唆された。

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 4 件)

1: Hayashi R, Tsuchiya K, Fukushima K, Horita N, Hibiya S, Kitagaki K, Negi M, Itoh E, Akashi T, Eishi Y, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Fukuda S, Ohno H, Okamoto R, Nakamura T, Tanaka S, Chayama K, Watanabe M. Reduced Human α -defensin 6 in Noninflamed Jejunal Tissue of Patients with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016

May;22(5):1119-28.doi:10.1097/MIB.0000000000000707. PubMed PMID: 26891258. 査読有

2: Takenaka K, Ohtsuka K, Kitazume Y, Nagahori M, Fujii T, Saito E, Naganuma M, Araki A, Watanabe M. Comparison of magnetic resonance and balloon enteroscopic examination of the small intestine in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*.2014Aug;147(2):334-342. e3. doi: 10.1053/j.gastro.2014.04.008. Epub 2014 Apr 13. PubMed PMID: 24732015. 査読有

3: Araki A, Tsuchiya K, Watanabe M. Advances in balloon endoscopes. *Clin J Gastroenterol*. 2014 Jun;7(3):189-99. doi: 10.1007/s12328-014-0485-3. Epub 2014 Apr 23. PubMed PMID: 26183736. 査読有

4: Ito G, Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Fujii S, Nakata T, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. Lineage-specific expression of bestrophin-2 and bestrophin-4 in human intestinal epithelial cells. *PLoS One*. 2013 Nov 5;8(11):e79693.doi:10.1371/journal.pone.0079693. eCollection 2013. PubMed PMID: 24223998; PubMedCentral PMCID: PMC3818177. 査読有

[学会発表](計 11 件)

1. Okada E, Araki A, Nitta S, Watanabe M: The utilities and problems of the patency capsule for patients with non-suspected intestinal stenosis.

Asian Pacific Digestive Week (APDW) 2015. Taipei (Taiwan) .2015.12.6

2. Hayashi R, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Horita N, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Watanabe M :

Human alpha-Defensin 6 regulated by the cooperation of beta-catenin and Atoh1, might be the pathogenesis of Crohn's Disease. *Digestive Disease Week 2015. Washington, D.C. (USA) 2015.05.18*

3. Hayashi R, Tsuchiya K, Hibiya S,

Fukushima K, Horita N, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Watanabe M: Human alpha-defensin 6 regulated by both Atoh1 and beta-catenin might be the pathogenesis of Japanese Crohn's Disease. 10th Congress of ECCO - Inflammatory Bowel Diseases 2015. Barcelona (Spain), 2015.2.20

4. Hayashi R, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Horita N, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Watanabe M: Human alpha-defensin 6 regulated by both atoh1 and beta-catenin might be the pathogenesis of crohn's disease. UEGW2014. Vienna (Austria).2014.10.22

5. Akihiro Araki: Balloon enteroscopy-position statement Technique and Equipment of DBE. Endocon 2014 / the 15th Annual National Conference of the Society of Gastrointestinal Endoscopists of India (SGEI). Pune (India) .2014.3.14

6. 岡田英理子、土屋輝一郎、岩寄美智子、堀田伸勝、福島啓太、日比谷秀爾、加納嘉人、大塚和朗、荒木昭博、渡辺 守:全小腸マッピング生検を用いた NSAIDs・抗血小板薬による小腸粘膜障害の病理学的検討.第10回日本消化管学会総会学術集会. コラッセふくしま (福島県福島市) .2014.2.14

7. 竹中健人、大塚和朗、藤井俊光、長堀正和、斉藤詠子、荒木昭博、新田沙由梨、鈴木雅博、渡辺 守:クローン病における小腸病変に対するバルーン内視鏡所見とMR所見の比較.第97回日本消化器内視鏡学会関東地方会.海運クラブ (東京都千代田区) .2013.12.15

8. 荒木昭博: ダブルバルーン内視鏡の最近

の話題. 第7回姫路消化管フォーラム .姫路 (兵庫県姫路市) .2013.11.07

9. 荒木昭博、岡田英里子、渡辺守: 術後胆道へのアプローチダブルバルーン内視鏡の一人法. JDDW2013. グランドプリンスホテル新高輪他 (東京都港区) .2013.10.12

10. Akihiro Araki: Indication, Preparation, Technique and Equipment of Double-Balloon Endoscopy. Indonesian Digestive Disease Week (IDDW) 2013. Jakarta (Indonesia) .2013.6.13

11. 岡田英理子、土屋輝一郎、岩寄美智子、堀田伸勝、福島啓太、日比谷秀爾、加納嘉人、大塚和朗、荒木昭博、渡辺 守:NSAIDs服用患者における全長小腸粘膜の病理学的検討.第85回日本消化器内視鏡学会総会. 国立京都国際会館 (京都府京都市) .2013.5.12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

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・准教授
研究者番号：80361690

(2)研究分担者

土屋 輝一郎 (TSUCHIYA, Kiichiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：40376786

渡辺 守 (WATANABE, Mamoru)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10175127

(3)連携研究者

()

研究者番号：