

炎症性発癌における DNA 損傷応答の意義

研究分担者 味岡 洋一 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：炎症性発癌における DNA 損傷応答の意義を明らかにするため、ホルマリン固定材料を用いて、UC の慢性持続性炎症粘膜における「DNA 二重鎖切断 (DSB)」の状態を検討した。DSB のマーカーである  $\gamma$ H2AX 発現は、非 IBD 合併大腸に比べ UC 粘膜が高頻度で、UC 粘膜では炎症活動期が寛解期に比べ高頻度であった。DSB は活動性炎症の結果である可能性も否定できず、今後 DSB に対する修復応答が機能しているかどうかの検討が必要である。他方、UC の発癌早期異型上皮では、寛解期 UC 粘膜に比べ有意に高い  $\gamma$ H2AX 発現を示したことから、DSB が炎症性発癌過程における必要条件の一つであることが示唆された。

共同研究者

渡辺聡明 1)、若井俊文 2)

1) 東京大学大学院腫瘍外科学、2) 新潟大学大学院  
消化器・一般外科学

UC-III (腺腫とも癌とも判定できない腫瘍性病変) を low grade (UC-III-L) と high-grade (UC-III-H) とに細分類した。UC 大腸については、UC 罹患期間と  $\gamma$ H2AX 発現との相関も検討した。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎の慢性持続性炎症粘膜には高頻度で大腸癌が発生 (炎症性発癌) することが知られている。近年、癌の発生には DNA の二重鎖切断 (double strand breaks: DSB) とそれに対する修復応答 (DNA damage response: DDR) の破綻が関連することが明らかになってきた。本研究では、慢性持続性炎症による大腸上皮細胞の DSB と DDR の破綻が、炎症性発癌過程にも関連しているかどうかを明らかにすることを目的とし、まず、大腸非炎症粘膜、UC 粘膜および UC に発生した異型上皮 (発癌早期病変) における DSB を比較検討した。

B. 研究方法

ホルマリン固定外科切除非 IBD 合併大腸 50 症例、非担癌 UC 大腸 104 症例、担癌 UC 大腸 13 症例の直腸または S 状結腸代表切片、および UC 粘膜に発生した異型上皮 41 領域を対象に、DSB 部位に動員されるリン酸化 H2AX ( $\gamma$ H2AX) の発現を、免疫組織学的に比較・解析した。UC 粘膜は活動期、慢性活動期、寛解期、の炎症時相に分けた。異型上皮の分類には厚労省分類を用い、

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

- ①非担癌、担癌 UC 大腸いずれも、非 IBD 合併大腸に比べ  $\gamma$ H2AX 陽性陰窩頻度が有意に高かった ( $p < 0.001$ )。
- ②UC 大腸の炎症時相別の比較では、非担癌、担癌例ともに活動期の  $\gamma$ H2AX 陽性陰窩頻度が寛解期に比べ有意に高かった ( $p < 0.001$ )。
- ③同一の炎症時相では、非担癌、担癌例間で  $\gamma$ H2AX 陽性陰窩頻度に有意差は無かった。
- ④非担癌 UC における UC 罹患年数と  $\gamma$ H2AX 陽性陰窩頻度の間には有意な相関はみられなかった。
- ⑤UC-III-L, H いずれも寛解期 UC 粘膜に比べ、 $\gamma$ H2AX 陽性陰窩頻度は有意に高かった ( $p = 0.015$ )。

D. 考察

非 IBD 合併大腸に比べ UC の慢性持続性炎症では DSB (DNA 二重鎖切断) が高頻度に生じているが、 $\gamma$ H2AX 陽性陰窩頻度は炎症活動期が寛解期に比べ高頻度

であったこと、UC罹患年数と $\gamma$ H2AX陽性陰窩頻度との間にも有意な相関がなかったことから、DSBは必ずしも発癌の高リスクを示すものではなく、単に活動性炎症の結果に過ぎない可能性も否定できない。こうした活動性炎症によって生じたDSBに対してDDRが機能しているかどうかの検討が必要である。他方、寛解期UC粘膜に比べUCの異型上皮（UC-III）では $\gamma$ H2AX陽性陰窩頻度が有意に高かったことから、DSBが発癌の必要条件の一つになっていることは示唆される。

なし  
2. 実用新案登録  
なし  
3. その他  
なし

#### E. 結論

DSBはUCの炎症性発癌の必要条件の一つになっている可能性がある。今後DSBに対するDDRの破綻状態についての検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takabayashi H, Wakai T, Ajioka Y, Korita PV, Yamaguchi N. Alteration of DNA damage response in colorectal tumor progression. Human Pathol 2013 (in press)
- 2) Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Korita PV, Ajioka Y, Hatakeyama K. Early DNA damage response in residual carcinoma in situ at ductal stumps and local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma J Hepatobiliary Pancreas Sci (Published online, 11 August 2012)

##### 2. 学会発表

- 1) 味岡洋一. 特別発言、パネルディスカッション3. Colitic cancerの診断と治療におけるup to date. 第67回日本大腸肛門病学会学術総会. 福岡, 2012. 11. 21

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

### MSC による腫瘍イニシエーション抑制機構の解明

研究分担者 今井 浩三 東京大学医科学研究所 病院長

研究要旨：炎症性腸疾患に対する骨髄間葉系幹細胞(MSC)治療が有望視されるなか、炎症関連発癌における MSC の影響は現時点で明らかではない。本研究では、azoxymethane (AOM) 誘導発癌における MSC の腫瘍イニシエーション抑制機構を明らかにし、その機序を一部解明した。

共同研究者：那須野正尚<sup>1</sup>、有村佳昭<sup>1</sup>、  
一色博之<sup>1</sup>、永石歓和<sup>2</sup>、苗代康可<sup>3</sup>、篠村恭久<sup>1</sup>  
所属；札幌医科大学第一内科<sup>1</sup>、札幌医科大学第二  
解剖<sup>2</sup>、札幌医科大学医療人育成センター<sup>3</sup>

#### A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞(MSC)は再生医療や遺伝子治療のソースとして期待される一方で、腫瘍に対する影響は明らかではない。炎症発癌モデルに対する MSC の影響を検討することで、炎症性腸疾患における MSC 治療の臨床応用に備えることを目的とした。

#### B. 研究方法

AOM 発癌および acute apoptotic response of genotoxic carcinogen (AARGC) モデルおよび MSC-IEC6 共培養モデルを使用した。形成された腫瘍数、サイズを計測し、WNT, TGF $\beta$  シグナル活性化を、AARGC モデルでは、大腸上皮細胞の増殖、アポトーシス、細胞周期および O<sup>6</sup>メチルグアニン定量とこれらに対する MSC の作用を検討した。共培養実験ではこれらの MSC の作用機序解析を試みた。

(倫理面への配慮)

動物実験に関する法律・基準・指針を遵守し、生物の多様性の確保に関する法律に抵触しない。

#### C. 研究結果

MSC は AOM 発癌におけるプロモーションではなくイニシエーションを抑制した。その主要な化学予防効果

は、何らかの機序で DNA 傷害そのものを減じる可能性が示された。さらに DNA 傷害によるアポトーシスを免れたイニシエーション細胞に対して、TGF $\beta$  を介する G1 期停止をもたらす発癌を抑制する可能性を示した。さらに、MSC のもつ抗腫瘍効果は WNT, TGF $\beta$  シグナルにも広範に作用する可能性が示された。

#### D. 考察

MSC の発癌に対する化学予防は、これまでに報告のない新しい腫瘍イニシエーションの抑制機構である。さらに WNT, TGF $\beta$  シグナルにも広範に作用する可能性があり、今後の重要な研究課題である。これらは将来、炎症性腸疾患に対する MSC 治療に必須な情報である。

#### E. 結論

azoxymethane (AOM) 誘導発癌における MSC の腫瘍イニシエーション抑制機構の一部を解明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamazaki K, Umeno J, Takahashi A, Hirano A, Johnson TA, Kumasaka N, Morizono T, Hosono N, Kawaguchi T, Takazoe M, Yamada T, Suzuki Y, Tanaka H, Motoya S, Hosokawa M, Arimura Y, Shinomura Y, Matsui T, Matsumoto T, Iida M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M. A Genome-Wide Association Study

Identifies 2 Susceptibility Loci for Crohn's Disease in a Japanese Population. Gastroenterology [Epub ahead of print]

## 2. 学会発表

1. Arimura Y. Genetic Characteristics of Japanese IBD. Asian IBD Symposium Seoul Nov 2, 2012.
2. Nasuno M, Arimura Y, Watanabe S, Nakagaki S, Nagaishi K, Naishiro Y, Yamashita K, Imai K, Yashuhisa Shinomura. Mesenchymal Stem Cells Partially Cancell Azoxymethane-induced Tumor Initiation. Asian IBD Symposium Seoul Nov 3, 2012.
3. Nagaishi K, Ishiki H, Arimura Y, Naishiro Y, Imai K, Shinomura Y. Mesenchymal Stem Cell ameliorates Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis by regulating bone marrow niche cells and hematopoietic stem cells. Asian IBD Symposium Seoul Nov 3, 2012.
4. Nagaishi K, Watanabe S, Naishiro Y, Yamashita K, Arimura Y, Fujimiya M, Shinomura Y. Pleiotropic Action of Gut Tropic Factors Derived from Conditioned Mesenchymal Stem Cells. DDW2012 San Diego May 19, 2012.
5. Nagaishi K, Watanabe S, Naishiro Y, Yamashita K, Arimura Y, Fujimiya M, Imai K. Pleiotropic Action of Gut Tropic Factors Derived from Conditioned Mesenchymal Stem Cells. 6th Japan-Korea IBD Symposium Tokyo Jan 28, 2012.
6. 那須野正尚, 有村佳昭, 渡邊秀平, 中垣 卓, 永石 歓和, 苗代康可, 山下健太郎, 山本博幸, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞は azoxymethane による発癌のイニシエーションを一部解除する. JDDW2012 神戸 2012年11月11日
7. 那須野正尚, 有村佳昭, 渡邊秀平, 中垣 卓, 永石 歓和, 苗代康可, 山下健太郎, 山本博幸, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞は azoxymethane による発癌のイニシエーションを一部解除する. 第49回日本消化器免疫学会総会 鹿児島 2012年7月6日
8. 永石 歓和, 有村佳昭, 渡邊秀平, 那須野正尚, 藤宮 峯子, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞を用い

た炎症性腸疾患の新規治療戦略. 第33回日本炎症・再生医学会 福岡 2012年7月5日

9. 永石 歓和, 有村 佳昭, 安宅 弘司, 篠村 恭久, 藤宮 峯子. 炎症性腸疾患の治療戦略としての骨髄間葉系幹細胞療法 第117回日本解剖学会総会 甲府 2012年3月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））  
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究  
分担研究報告書

炎症性大腸発癌における組織修復マクロファージの役割

研究分担者 坪内 博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨：腸管マクロファージは腸内細菌に対して過剰な免疫反応を引き起こさないよう、何らかの分子機構によって抑制系に制御されている。一方、マクロファージなどの抗原提示細胞で発現されるオステオアクチビン（osteocalcin）は炎症のフィードバック調節因子として作用している。本研究では実験大腸炎モデルを用いて傷害粘膜のマクロファージに発現するオステオアクチビンの傷害粘膜の修復および炎症性大腸発癌に及ぼす影響を検討した。オステオアクチビンはデキストラン硫酸で誘導した大腸炎の傷害粘膜に浸潤するマクロファージに強く発現し、その発現は傷害粘膜の修復過程においても持続し、また LPS 刺激後のマクロファージにおいてオステオアクチビン発現が増強した。さらに、オステオアクチビン変異マウスに低濃度の DSS で大腸炎を誘導すると傷害粘膜の修復が遅延していた。一方、azoxymethane を投与した後に低濃度の DSS で繰り返し大腸炎を誘導したところ、オステオアクチビンは大腸腫瘍の発生率には影響を及ぼさなかったが、オステオアクチビン変異マウスでは 1 個体当たりの腫瘍数が有意に増加した。これらの結果から、オステオアクチビンおよび傷害粘膜に浸潤する抗炎症（免疫抑制）性のオステオアクチビン陽性マクロファージが大腸発癌を誘導する可能性は低いこと、一方、傷害粘膜の再生・修復の遅延（炎症の持続）が大腸腫瘍の発生を促進することが示唆された。

共同研究者

井戸章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 准教授  
呉 建 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学  
上村修司 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 特任助教  
佐々木文郷 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 特任助教  
熊谷公太郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学  
沼田政嗣 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院  
光学医療診療部 講師  
藤田 浩 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
消化器疾患・生活習慣病学 助教

この抑制系の腸管マクロファージの機能異常によって腸管内抗原に対する過剰な免疫反応が誘導されていることが考えられる。

オステオアクチビンは、我々がコリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラット肝臓において発現亢進している遺伝子群から単離した遺伝子で、ヒト肝硬変および肝細胞癌組織においても発現している。オステオアクチビンはヒト乳癌細胞から単離された glycoprotein nmb (gpnm) および マウス樹状細胞から単離された DC-HIL のラットホモログであり、最近、急性肝障害モデルの肝マクロファージにおいて発現していることが報告され、さらにマクロファージなどの抗原提示細胞で発現されるオステオアクチビンは炎症のフィードバック調節因子として作用していることが報告された。以上の知見から、オステオアクチビンは傷害組織に浸潤した抗原提示細胞に発現し、抗炎症に作用して、炎症の持続、傷害組織の再生・修復に関与していることが推測される。

本研究では、実験大腸炎モデルを用いて抑制系のマクロファージに発現するオステオアクチビンが傷害粘

A. 研究目的

腸管マクロファージは腸内細菌に対して過剰な免疫反応を引き起こさないよう、何らかの分子機構によって抑制系に制御されている。一方、炎症性腸疾患では

膜の修復および炎症性大腸発癌に及ぼす影響を明らかにした。

## B. 研究方法

### 1. 実験大腸炎モデルにおけるオステオアクチビンの発現

7週齢のBalb/cマウスに2%デキストラン硫酸 (DSS) を7日間自由飲水させ、下記を検討した。

- (1) DSS 投与前, 投与2, 5, 7日目, 投与中止後3, 7日目の大腸組織におけるオステオアクチビン遺伝子の発現を realtime RT-PCR にて検討した。
- (2) 投与7日目の大腸組織におけるオステオアクチビンの発現をウェスタンブロット法, 免疫組織化学染色にて検討した。

### 2. マクロファージ細胞株におけるオステオアクチビンの発現とサイトカイン産生に及ぼす影響

オステオアクチビンを恒常的に発現するマウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 を用いて下記を検討した。

- (1) LPS のオステオアクチビン発癌に及ぼす影響
- (2) RAW264.7 にオステオアクチビン siRNA を導入し, サイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

### 3. オステオアクチビンの大腸発癌に及ぼす影響

オステオアクチビン変異 (OA-mut) マウスおよび野生型 (OA-wt) マウスに Azoxymethane (AOM) を単回投与した後に5日間の1.5% DSS の自由飲水と15日間の休薬を3回繰り返し, 下記を検討した。

- (1) 大腸炎の組織学的評価
- (2) 大腸腫瘍の発生

## C. 研究結果

### 1. 実験大腸炎モデルにおけるオステオアクチビンの発現

- (1) オステオアクチビン mRNA の発現はDSS投与開始後, 大腸炎の進展に伴って誘導され, 投与7日にピークとなり, 投与中止後も強い発現が持続した。
- (2) DSS 投与7日目の大腸組織において, オステオアクチビンの発現はタンパクレベルでも増強しており, 免疫組織化学染色では, OA は傷害粘膜に浸潤したマクロファージに発現していた。

### 2. マクロファージ細胞株におけるオステオアクチビンの発現とサイトカイン産生に及ぼす影響

- (1) 24時間のLPS刺激によってLPS刺激中のオステオアクチビン発現は抑制されたが, LPS刺激後にオステオアクチビン発癌はむしろ増強した。
- (2) siRNAによるオステオアクチビン発現抑制によってL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1の発現が増強した。

### 3. オステオアクチビンの大腸発癌に及ぼす影響

- (1) OA-mut および OA-wt マウスにおいて, 粘膜傷害(大腸炎)の程度に差異はみられなかったが, OA-mut マウスでは傷害粘膜の修復が遅延していた。
- (2) OA-mut および OA-wt マウスに大腸腫瘍の発生率に差異はみられなかったが, OA-mut マウスでは1個体当たり的大腸腫瘍数が有意に増加した。

## D. 考察

傷害大腸粘膜に浸潤したマクロファージに発癌するオステオアクチビンは傷害粘膜の修復期においても強い発現が持続すること, さらにマクロファージではLPS刺激後にオステオアクチビン発現が増強した。さらに, オステオアクチビン変異マウスに低濃度のDSSで大腸炎を誘導すると, 大腸炎の程度には差異を認めなかったものの, 傷害粘膜の修復が遅延していたことから, オステオアクチビンは傷害粘膜の再生・修復に関与していることが示唆された。一方, AOMを投与した後に低濃度のDSSで繰り返し大腸炎を誘導したところ, オステオアクチビンは大腸腫瘍の発生率には影響を及ぼさなかったが, オステオアクチビン変異マウスでは1個体当たりの腫瘍数が有意に増加した。

これらの結果から, オステオアクチビンおよび傷害粘膜に浸潤する抗炎症(免疫抑制)性のオステオアクチビン陽性マクロファージが大腸発癌を誘導する可能性は低いこと, 一方, 傷害粘膜の再生・修復の遅延(炎症の持続)が大腸腫瘍の発生を促進することが示唆された。

## E. 結論

傷害粘膜に浸潤するマクロファージに発現するオステオアクチビンはその再生・修復に関与していること

が示唆された。オステオアクチビンは抗炎症、すなわち免疫抑制系に作用することが考えられるが、大腸炎に関連した大腸腫瘍の発生には直接関与していないことが示唆され、むしろオステオアクチビン変異マウスではその傷害粘膜の再生・修復の遅延（炎症の持続）が大腸腫瘍の発生に関与していることが考えられた。以上の結果から、炎症性腸疾患患者における大腸発癌を抑制するためには、傷害粘膜の再生・修復、いわゆる粘膜治癒（mucosal healing）を早期に誘導し、持続させることが大腸発癌抑制につながることを考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

### Colitic cancer における Atoh1 発現の意義

研究代表者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：炎症性腸疾患特に潰瘍性大腸炎に付随する大腸がん(Colitic cancer)は早期発見が困難であり、難治性であることが問題となっている。そのため、慢性の炎症持続による発がん機構、がん進展機構、治療抵抗性機構について理解が必要な状況である。本研究では炎症発がんによく認められる粘液産生形質に着目し腸管上皮細胞分化制御における必須遺伝子である Atoh1 の大腸がんにおける機能を解析した。その結果、大腸がんにおける Atoh1 発現は粘液形質発現のみならず、がん幹細胞形質を発現し抗がん剤耐性を獲得することを明らかとした。粘液形質と幹細胞形質の共存が新たな悪性形質獲得機構である可能性を示唆し、Colitic cancer の難治性の改善を期待できる成果と思われる。

#### 共同研究者

土屋輝一郎、加納嘉人、鄭 秀、堀田伸勝、福島啓太、日比谷秀爾、根本泰宏、大島 茂、岡本隆一、永石宇司、中村哲也

東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

#### 1. 研究目的

Colitic cancer は散発性大腸がんとならぬ発がん形式が異なり、内視鏡で発見が困難であるため進行がんとならぬ発見されることが多いこと、抗がん剤耐性を示し予後不良であることが問題となっている。特に Colitic cancer では粘液産生形質を有することが知られているが、その形質発現の意義は未だ解明されていない。以前より我々は大腸がん細胞の分化度に着目し、その機能解析として大腸上皮細胞の分化制御に必須な蛋白に注目した。転写因子である Atoh1 は腸管上皮細胞の分泌系細胞への分化に必須であることが報告されており、Atoh1 は非粘液大腸癌では発現していないことを以前我々は報告している。さらに Atoh1 は APC 変異による Wnt シグナル亢進が Atoh1 の積極的な蛋白分解を誘導し Atoh1 の発現を抑制することで非粘液形質を維持することを証明している。近年粘液産生大腸がんでは Atoh1 が発現していることが報告され大腸がんにおける Atoh1 発現の意義を解析することを目的とした。

#### 2. 研究方法

1) 大腸がん細胞への Atoh1 蛋白発現。

種々の Atoh1 変異体の解析により蛋白分解認識部位を同定し、さらに分解認識部位の変異体を用いて大腸がん細胞に Atoh1 を安定して発現する系を構築する。

2) Atoh1 発現における形質発現解析。

Atoh1 安定発現大腸がん作成ののち、そのがん細胞の粘液産生性、がん幹細胞マーカー発現を解析する。

3) Atoh1 発現大腸がんの悪性度解析。

Atoh1 発現大腸がんの細胞増殖、抗がん剤耐性、migration 活性を解析し、Atoh1 における大腸がん悪性度への影響を評価する。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1) 倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2) 意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。動物実験に関しては、



当施設の動物実験ガイドラインに準拠して、動物実験委員会の承認を受けて実施した。

### 3. 研究結果及び考察

#### 1) 大腸がん細胞への Atoh1 蛋白発現。

Atoh1 蛋白は GSK3 依存性に分解されることを証明し、さらに GSK3 によってリン酸化される部位を検索したところ、5 個のセリン残基を同定した。このセリンをすべてアラニン残基に変換した変異体を作成し大腸がん細胞に導入したところ安定した蛋白発現を認めた。

#### 2) Atoh1 発現における形質発現解析。

本年度はマイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現解析を行った。GSEA 解析によるクラスタリングにより、Wnt シグナル関連遺伝子の発現、ALDH1 などの幹細胞マーカーの発現、がん転移巣に認められる遺伝子発現を認めた。

#### 3) Atoh1 発現大腸がんの悪性度解析。

以上より Atoh1 発現による粘液産生は本来の細胞形質を獲得した分化誘導だけでなく、幹細胞形質も獲得したことから悪性度について解析を行った。

細胞増殖については、MTS アッセイと FUCCI システムを用いて解析を行ったところ、細胞増殖は Atoh1 発現により抑制されていたが、G0/G1 期が延長しており、幹細胞形質である G0 アレストを起こすことが明らかとなった。

また migration アッセイにて増殖はしないまま遊走能は亢進していた。さらに大腸がん治療に用いられる種々の抗がん剤にて処理したところ、Atoh1 発現は有意にアポトーシスを抑制し抗がん剤耐性を示した。大腸がんをヌードマウスに皮下接種した *in vivo* の系においても同様の結果がえられた。*In vivo* においては Lgr5 陽性細胞と粘液産生細胞がそれぞれ別の細胞に分かれたことから、ニッチを形成することが示唆された。

### 4. 評価

#### 1) 達成度について

本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができた。臨床情報に基づいた思考過程によって得られた基礎的データから新たな治療法への可能性を示すことができ、画期的治療法が確立できるものと考えられる。よって本研究の達成度は高いと思われる。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究結果に関しては Colitic cancer における難治性のメカニズムに貢献でき、がん幹細胞形質獲得の新たなシステムの解明はがん医療への可能性も示し学術的にも高く評価され、実際インパクトの高い海外学術雑誌に多数掲載されたことより国際的評価も高いと考えられる。

#### 3) 今後の展望について

Atoh1 が、がん幹細胞形質を獲得する機構をさらに詳細に検討することで、がん幹細胞を標的とした新規治療法の開発を試みる。動物モデルの構築も既に確立しているためヒトへの応用も実現可能と思われる。また Colitic cancer において Atoh1 蛋白が安定発現する機構を解明し炎症がんを抑制させる機構を明らかとしていく。

#### 4) 研究内容の効率性について

当初たてた目標を着実に遂行できており一定の効率性は挙げられた。

### 5. 結論

Colitic cancer に認められる Atoh1 発現は、粘液産生のみならず、がん幹細胞形質を獲得することで抗がん剤耐性を示すことから、難知性のメカニズムを解明知ることができた。今後、Atoh1 発現機構解析、抗がん剤耐性機構解析を行うことで、Colitic cancer の発がん予防、有効ながん治療法の開発が期待できる。

### G. 研究発表

#### 論文発表

- 1) Kano Y, Tsuchiya K, Zheng X, Horita N, Fukushima K, Hibiya S, Yamauchi Y, Nishimura T, Hinohara K, Gotoh N, Suzuki S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of malignant potential in colon cancer is regulated by the stabilization of Atonal homolog 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* (Epub ahead of print), 2013.
- 2) Naganuma M, Nagahori M, Fujii T, Morio J, Saito E, Watanabe M: Poor recall of prior exposure to varicella zoster, rubella, measles, or

- mumps in patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 19:418–422, 2013.
- 3) Ueno F, Matsui T, Matsumoto T, Matsuoka K, Watanabe M, Hibi T, on behalf of the guideline project group of intractable Inflammatory Bowel Disease granted by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and the Guidelines Committee of the Japanese: Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan. *J Gastroenterol*. 48(1):31–72, 2013
  - 4) Ohyagi M, Ohkubo T, Yagi Y, Ishibashi S, Akiyama J, Nagahori M, Watanabe M, Yokota T, Mizusawa H: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in a patient with Crohn's disease. *Intern Med*. 52: 125–128, 2013.
  - 5) Araki A, Suzuki S, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Watanabe M: Modified single-operator method for double-balloon endoscopy. *Dig Endosc*. 24(6):470–474, 2012
  - 6) Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Suzuki S, Morio-Akiyama J, 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*. 6(1):328, 2012.
  - 7) 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*. 57(12):3303–3308, 2012.
  - 8) Hibi T, Sakuraba A, Watanabe M, Motoya S, Ito H, Motegi K, Kinouchi Y, Takazoe M, Suzuki Y, Matsumoto T, Kawakami K, Matsumoto T, Hirata I, Tanaka S, Ashida T, Matsui T: Retrieval of serum infliximab level by shortening the maintenance infusion interval is correlated with clinical efficacy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 18: 1480– 1487, 2012.
  - 9) Kuwahara E, Asakura K, Nishiwaki Y, Inoue N, Watanabe M, Hibi T, Takebayashi T: Effects of family history on inflammatory bowel disease characteristics in Japanese patients. *J Gastroenterol*. 47:961–968, 2012.
  - 10) Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* . 419:238–243, 2012.
  - 11) Naganuma M, Fujii T, Kunisaki R, Yoshimura N, Takazoe M, Takeuchi Y, Saito E, Nagahori M, Asakura K, Takebayashi T, Watanabe M: Incidence and characteristics of the 2009 influenza (H1N1) infections in inflammatory bowel disease patients. *J Crohns Colitis*. (Epub ahead of print), 2012.
  - 12) Naganuma M, Kunisaki R, Yoshimura N, Takeuchi Y, Watanabe M: A prospective analysis of the incidence and risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. (Epub ahead of print) , 2012.
  - 13) Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4+ memory T cells. *Gut*. (Epub ahead of print) 2012.
  - 14) Okada E, Araki A, Suzuki S, Watanabe H, Ikeda T, Watanabe T, Kurata M, Eishi M, Watanabe M: Histological diagnosis of follicular lymphoma

- by biopsy of small intestinal normal mucosa. *Dig Endosc.* (Epub ahead of print) 2012.
- 15) Ono Y, Kanai T, Sujino T, Nemoto Y, Kanai Y, Mikami Y, Hayashi A, Matsumoto A, Takaishi H, Ogata H, Matsuoka K, Hisamatsu T, Watanabe M, Hibi T: T-helper 17 and interleukin-17-producing lymphoid tissue inducer-like cells make different contributions to colitis in mice. *Gastroenterology.* 143(5):1288-1297, 2012
- 16) Watanabe M, Hanai H, Nishino H, Yokoyama T, Terada T, Suzuki Y: Comparison of QD and TID oral mesalazine for maintainance of remission in quiescent ulcerative colitis: a double-blind, double-dummy, randomized multicenter study. (in press) *Inflamm Bowel Dis.* 2012
- 17) Watanabe M, Hibi T, Lomax KG, Paulson SK, Chao J, Alam SS, Camez A: Adalimumab for the Induction and Maintenance of Clinical Remission in Japanese Patients With Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 6:160-173, 2012.
- 18) Watanabe T, Sasaki I, Sugita A, Fukushima K, Futami K, Hibi T, Watanabe M: Interval of less than 5 years between the first and second operation is a risk factor for a third operation for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 18: 17- 24, 2012.
- 19) Watanabe T, Sasaki I, Sugita A, Fukushima K, Futami K, Hibi T, Watanabe M: Time trend and risk factors for reoperation in Crohn's disease in Japan. *Hepatogastroenterology.* 59: 1081- 1086, 2012.
- 20) Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med.* 18:618-623, 2012.
- 21) Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, Watanabe M: The development of colitogenic CD4+ T cells is regulated by IL-7 in collaboration with NK cell function in a murine model of colitis. *J Immunol.* 188(6):2524-2536, 2012.

#### 学会発表

- 1) Kano Y, Tsuchiya K, Watanabe M: The acquirement of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. 第71回日本癌学会学術総会. Sapporo, 2012年9月20日
- 2) Tsuchiya K, Kano Y, Watanabe M: The stabilization of Atoh1 protein in colitic cancer induces cancer stemness and chemoresistance. 第71回日本癌学会学術総会. Sapporo, 2012年9月19日
- 3) Kano Y, Tsuchiya K, Watanabe M: New classification based on Atoh1 expression in colon cancer might be useful as Biomarker. 第10回日本臨床腫瘍学会. Osaka, 2012年7月27日
- 4) Watanabe M: Adult Stem Cell Therapy for Gastrointestinal Diseases. International Ulcer Week 2012. Tokyo, 2012年7月12日
- 5) Kano Y, Tsuchiya K, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. ISSCR2012. Yokohama, 2012年6月14日
- 6) Yui S, Nakamura T, Nemoto Y, Mizutani T, Fukuda M, Nozaki K, Yamauchi Y, Mochiduki W, Zheng X, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Regeneration of damaged colon epithelium by transplanted colon Lgr5+ stem cells maintained and expanded in vitro. 第10回幹細胞シンポジウム. 淡路島, 2012年6月1日

- 7) Tsuchiya K, Kano Y, Mizutani T, Yui S, Nakamura T, Watanabe M: The stabilization of Atoh1 protein in colon cancer acquires cancer stemness and chemoresistance. 第10回幹細胞シンポジウム. 淡路島, 2012年6月1日
- 8) Watanabe M: Stem Cells. DDW. San Diego, 2012年5月22日
- 9) Nemoto Y, Kanai T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Matsumoto S, Watanabe M: Colitogenic effector memory CD4+ T cells develop TH1/TH17 mediated interstitial pneumonia independent to intestinal bacterial antigens. AGA. San Diego, 2012年5月22日
- 10) Tsuchiya K, Zheng X, Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Flagellin response via TLR5 on basolateral membrane of primary intestinal epithelial cells is regulated by Notch signaling. DDW2012. San Diego, 2012年5月22日
- 11) Nemoto Y, Kanai T, Matsumoto T, Watanabe M: Colitogenic effector memory CD4+ T cells develop Th1/Th17 mediated interstitial pneumonia independent to intestinal bacterial antigens. DDW2012. San Diego, 2012年5月22日
- 12) Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of p-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelial cells three-dimensionally cultured in vitro. DDW2012. San Diego, 2012年5月21日
- 13) Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Ito G, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch signaling regulates expression of Gelsolin superfamily genes, Gelsolin and Scinderin, and promotes re-assembly of actin cytoskeleton in human intestinal epithelial cells. DDW2012. San Diego, 2012年5月21日
- 14) Kano Y, Tsuchiya K, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of cancer stemness in colon cancer by the Atoh1 protein stabilization. DDW2012. San Diego, 2012年5月19日
- 15) Fujii T, Naganuma M, Saito E, Nagahori M, Watanabe M: Intravenous tacrolimus therapy can rapidly induce remission in refractory ulcerative colitis. DDW2012. San Diego, 2012年5月19日
- 16) Murano T, Okamoto R, Shimizu H, Ito G, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 promotes IL-22-Mediated epithelial regeneration through enhancement of STAT3-Dependent transcription in human intestinal epithelial cells. AGA. San Diego, 2012年5月19日
- 17) 渡辺 守: IBD診療の進歩と近未来像-治る時代へ- 第11回市民公開講座プログラム 炎症性腸疾患の治療をめぐる。名古屋, 2012年12月16日
- 18) 油井史郎、中村哲也、渡辺 守: マウスおよびヒトの正常な腸管上皮初代培養法の確立. 第3回 Japan Gut Forum. 東京, 2012年11月24日
- 19) 渡辺 守: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生. 第14回北関東・甲信越「GUTフォーラム」. 東京, 2012年11月24日
- 20) 渡辺 守: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生. 第50回小腸研究会. 京都, 2012年11月10日
- 21) 渡辺 守: ~はじめに~治療における医師と患者のギャップ調査. JDDW2012. 神戸, 2012年10月13日
- 22) 渡辺 守: 「消化器疾患治療の最新のトピックス」大腸: 炎症性腸疾患-最近の進歩-. JDDW2012. 神戸, 2012年10月13日
- 23) 藤井俊光、長堀正和、渡辺 守: クロウン病小腸大腸病変の評価および再燃予測におけるMR エンテロコロノグラフィー (MREC) の有用性. JDDW2012. 神戸, 2012年10月12日
- 24) 渡辺 守: 消化器病学会特別企画1: 日本消化器病学会ガイドライン (大腸ポリープ、機能性消化管

- 障害、NAFLD/NASH) 中間報告. JDDW2012. 神戸, 2012年10月12日
- 25) 加納嘉人、土屋輝一郎、渡辺 守: 新たな「分化度」スケーリングを用いた大腸癌形質制御と個別化医療への可能性. JDDW2012. 神戸, 2012年10月11日
- 26) 渡辺 守: Go beyond usual standard care in Crohn's disease management. JDDW2012. 神戸, 2012年10月11日
- 27) 渡辺 守: IBD 治療において免疫調節薬を実際にどう使うか. JDDW2012. 神戸, 2012年10月11日
- 28) 渡辺 守: 新しい消化管再生医療—難病克服に向けて—. 医科学術研究会. 千葉, 2012年10月4日
- 29) 土屋輝一郎、加納嘉人、中村哲也、渡辺 守: 大腸における幹細胞維持とがん幹細胞発現機構. 第44回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 高知, 2012年9月28日
- 30) 渡辺 守: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生. 平成24年度第1回クリニカルサミット. 東京, 2012年9月28日
- 31) 渡辺 守: 炎症性腸疾患における内視鏡を考え直す. OMC Gastroenterology & Hepatology Research Group カンファレンス. 大阪, 2012年9月27日
- 32) 渡辺 守: 大腸上皮幹細胞—培養系の確立と移植への応用—. がん若手研究者ワークショップ. 蓼科, 2012年9月6日
- 33) 藤井俊光、齊藤詠子、長堀正和、長沼 誠、大塚和朗、渡辺 守: MR enterocolonography (MREC) の実際とクローン病小腸大腸病変の評価における有用性. 第30回日本大腸検査学会総会. 東京, 2012年9月1日
- 34) 長堀正和、藤井俊光、齊藤詠子、渡辺 守、大塚和朗: クローン病診療における当院での MREC (MR enterocolonography) の試み—モニタリングとしての有用性. 第30回日本大腸検査学会総会. 東京, 2012年9月1日
- 35) 加納嘉人、土屋輝一郎、渡辺 守: 新たな分化度スケーリングを用いた大腸がん形質制御とバイオマーカーとしての可能性. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会. 大阪, 2012年7月27日
- 36) 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 炎症性腸疾患難治性の要因としての腸炎惹起性メモリーCD4+T 細胞維持機構の解析. 第49回日本消化器免疫学会総会. 鹿児島, 2012年7月6日
- 37) 永石宇司、山地 統、戸塚輝治、鬼澤道夫、柘植直人、鈴木雅博、金井隆典、渡辺 守: 慢性大腸炎モデルにおける腸炎惹起性T細胞の増殖はIL-7とNK細胞により制御される. 第49回日本消化器免疫学会総会. 鹿児島, 2012年7月6日
- 38) 渡辺 守: 新しい時代に入ったIBD—考えておくべきこと—. 名古屋IBDセミナー. 名古屋, 2012年6月29日
- 39) 長堀正和、藤井俊光、齊藤詠子、森尾純子、長沼誠、渡辺 守: 炎症性腸疾患患者における抗TNF $\alpha$ 受容体拮抗薬の選択に関する研究. 第98回日本消化器病学会総会. 東京, 2012年4月21日
- 40) 藤井俊光、齊藤詠子、森尾純子、長堀正和、長沼誠、渡辺 守: 難治性潰瘍性大腸炎に対するTacrolimus 静注療法の有用性と安全性の検討. 第98回日本消化器病学会総会. 東京, 2012年4月21日
- 41) 水谷知裕、中村哲也、渡辺 守: 正常小腸上皮培養細胞を用いたMDR1依存性薬剤排出機構の解析. 第98回日本消化器病学会総会. 東京, 2012年4月20日
- 42) 渡辺 守: 日本消化器病学会大腸ポリープ診療ガイドラインを目指して. 第98回日本消化器病学会総会. 東京, 2012年4月20日
- 43) 本谷 聡、渡辺 守、日比紀文: 日本人クローン病患者に対するアダリムマブ長期継続投与による3年間の寛解維持効果. 第98回日本消化器病学会総会. 東京, 2012年4月19日
- 44) 藤井俊光、長沼 誠、渡辺 守: 抗体製剤使用炎症性腸疾患患者における血中濃度測定と中和抗体測定の意義. 第98回日本消化器病学会総会. 東京, 2012年4月19日
- 45) 中村哲也、渡辺 守: 単一幹細胞からの大腸上皮大量培養と細胞移植による大腸上皮再生. 第98

回 日本消化器病学会総会. 東京, 2012 年 4 月  
19 日

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

1) 特許取得

渡辺 守、中村哲也: 「大腸上皮幹細胞の単離・  
培養技術と、これを用いた大腸上皮移植技術」特  
願 2011-236469

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

### 腸炎における造血幹細胞と骨髄ニッチの異常

研究分担者 今井 浩三 東京大学医科学研究所 病院長

研究要旨：炎症性腸疾患に対する骨髄間葉系幹細胞(MSC)を用いた新規治療法の開発において、MSCは腸上皮再生を伴う腸炎治療効果を示す一方、MSCの腸管への生着頻度が非常に少ないことから、有効性機序の解明が課題である。本研究では、MSCの骨髄への集積が経時的に増加することに注目し、炎症細胞の供給源である骨髄を標的としたMSC治療の有効性を解明した。

共同研究者：永石 歆和<sup>1</sup>、一色 裕之<sup>2</sup>、有村 佳昭<sup>2</sup>、苗代 康可<sup>3</sup>、篠村 恭久<sup>2</sup>

所属；札幌医科大学第二解剖<sup>1</sup>、札幌医科大学第一内科<sup>2</sup>、札幌医科大学医療人育成センター<sup>3</sup>

#### A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cells, MSC)の腸炎に対する有効性機序の解析において、炎症細胞の供給源である骨髄に注目し、造血幹細胞(Hematopoietic stem cells, HSC)およびこれを支持する骨髄ニッチ細胞の腸炎における異常性を解析した。さらに、MSC治療が腸炎における骨髄ニッチの異常性、さらにはHSCの異常性を改善できるか検討し、MSC治療の骨髄における有効性を解析することを目的とした。

#### B. 研究方法

マウスDSS腸炎モデルを作成し、ラット骨髄から単離培養したMSCを腸炎急性期に経静脈的に投与した。MSC治療による腸炎治療効果は、組織学的に評価した。XenoLightDiRで標識したMSCを腸炎マウスに全身投与し、ZENOGEN/IVIS\_LUMINAにて蛍光強度を経時的に追跡することで、MSCの各臓器への分布・集積を解析した。コントロールマウス、DSS腸炎-MSC未治療マウス(DSS-vehicle)、DSS腸炎-MSC治療マウス(DSS-MSC)の骨髄からNestin陽性細胞(ニッチ細胞)を磁気細胞分離装置にて、さらに各分化段階の造血幹細胞(LT-HSC; long-term re-constituting HSC, ST-HSC; ong-term re-constituting HSC, MPP; Multipotent progenitor cell)をFACSにて単離し、各幹細胞の自己複製能、未分化性維持、静止性、細胞接着能に関する異常性を解

析した。次に、DSS-vehicle由来の異常なニッチ細胞をMSCと*in vitro*で共培養し、MSCがニッチ細胞の機能に与える影響を検討した。さらに、ニッチ細胞とHSCの共培養系を用いて、DSS-vehicle由来の異常なニッチ細胞をコントロールマウス由来の正常な細胞に入れ替えることで、HSCの機能を回復できるかを検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関する法律・基準・指針を遵守し、生物の多様性の確保に関する法律に抵触しない。

#### C. 研究結果

DSS-vehicleマウスの骨髄では、Nestin陽性ニッチ細胞の数には差を認めなかったが、CFU-F形成能の低下、およびWnt5a, Scf, Sdf-1の発現低下を認めた。これらはDSS-MSCマウスで回復した。一方、HSCにおいては、LT-HSCの数はコントロール、DSS-vehicleマウスで不変なるものの、ST-HSCの数が腸炎において増加しており、MSC治療でその増加が抑制された。またLT-HSCにおいてFzd4, b-catenin, Tie2の発現異常がMSC治療により改善した。*In vitro*におけるDSS-vehicleマウス由来のニッチ細胞とMSCとの共培養により、Wntシグナル関連因子、osteopontin, Sdf-1, TPOの各因子の発現回復を認めた。さらに、ニッチ細胞の入れ替えにより、DSS-vehicleマウス由来のLT-HSCに発現するFzd7, N-cadherin, Cxcr4, Tie2の発現異常が回復した。

#### D. 考察

MSC治療は、腸管粘膜局所における炎症細胞の活性

化を抑制するのみならず、炎症細胞の供給源である骨髄において、その有効性を発揮することが示唆された。生着したMSCがニッチ細胞へ分化するか否かは今後の検討課題であるが、MSC由来の液性因子によるパラクライン効果等により、ニッチ細胞の自己複製能やHSCとの接着性、HSCの未分化性維持に関与する各種因子の発現に広範に影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、ニッチ機能を改善させることで、支持されるHSCおよびHSCから分化する各種炎症担当細胞の過剰供給を抑制すると考えられた。今後は、さらに慢性炎症の持続性に寄与する、腸管粘膜から骨髄へホーミングする活性化炎症細胞を標的としたMSC治療の有効性を検討し、腸管炎症制御におけるMSC治療の有効性を明らかにしていく。

#### E. 結論

腸炎に対するMSC治療の有効性機序として、骨髄におけるニッチ機能の回復による、過剰な炎症細胞の供給抑制の関与が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamazaki K, Umeno J, Takahashi A, Hirano A, Johnson TA, Kumasaka N, Morizono T, Hosono N, Kawaguchi T, Takazoe M, Yamada T, Suzuki Y, Tanaka H, Motoya S, Hosokawa M, Arimura Y, Shinomura Y, Matsui T, Matsumoto T, Iida M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M. A Genome-Wide Association Study Identifies 2 Susceptibility Loci for Crohn's Disease in a Japanese Population. *Gastroenterology* [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

1. Arimura Y. Genetic Characteristics of Japanese IBD. Asian IBD Symposium Seoul Nov 2, 2012.  
2. Nasuno M, Arimura Y, Watanabe S, Nakagaki S, Nagaishi K, Naishiro Y, Yamashita K, Imai K, Yashuhisa Shinomura. Mesenchymal Stem Cells Partially Cancell Azoxymethane-induced Tumor Initiation. Asian IBD Symposium Seoul Nov 3, 2012.

3. Nagaishi K, Ishiki H, Arimura Y, Naishiro Y, Imai K, Shinomura Y. Mesenchymal Stem Cell ameliorates Dextran Sodium Sulfate-induced Colitis by regulating bone marrow niche cells and hematopoietic stem cells. Asian IBD Symposium Seoul Nov 3, 2012.

4. Nagaishi K, Watanabe S, Naishiro Y, Yamashita K, Arimura Y, Fujimiya M, Shinomura Y. Pleiotropic Action of Gut Tropic Factors Derived from Conditioned Mesenchymal Stem Cells. DDW2012 San Diego May 19, 2012.

5. Nagaishi K, Watanabe S, Naishiro Y, Yamashita K, Arimura Y, Fujimiya M, Imai K. Pleiotropic Action of Gut Tropic Factors Derived from Conditioned Mesenchymal Stem Cells. 6th Japan-Korea IBD Symposium Tokyo Jan 28, 2012.

6. 那須野正尚, 有村佳昭, 渡邊秀平, 中垣 卓, 永石 歓和, 苗代康可, 山下健太郎, 山本博幸, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞は azoxymethane による発癌のイニシエーションを一部解除する. JDDW2012 神戸 2012年11月11日

7. 那須野正尚, 有村佳昭, 渡邊秀平, 中垣 卓, 永石 歓和, 苗代康可, 山下健太郎, 山本博幸, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞は azoxymethane による発癌のイニシエーションを一部解除する. 第49回日本消化器免疫学会総会 鹿児島 2012年7月6日

8. 永石 歓和, 有村佳昭, 渡邊秀平, 那須野正尚, 藤宮 峯子, 今井浩三, 篠村恭久. 骨髄間葉系幹細胞を用いた炎症性腸疾患の新規治療戦略. 第33回日本炎症・再生医学会 福岡 2012年7月5日

9. 永石 歓和, 有村 佳昭, 安宅 弘司, 篠村 恭久, 藤宮 峯子. 炎症性腸疾患の治療戦略としての骨髄間葉系幹細胞療法 第117回日本解剖学会総会 甲府 2012年3月28日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））  
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究  
分担研究報告書

潰瘍性大腸炎における大腸上皮の創傷治癒に対する Wnt5a short peptide の効果に関する検討

研究協力者 内藤 裕二 京都府立医科大学 准教授

研究要旨：大腸 myofibroblast から分泌された Wnt5a の一部である Wnt5a short peptide (36aa) の大腸上皮細胞に対する生理活性作用、特に大腸上皮の創傷治癒に対してその作用を検証し、治療標的としての可能性を検討する。

A. 研究目的

大腸上皮においては crypt の上部にのみ Hsp25 の発現が認められることが分かっており、これまでの我々の検討で myofibroblast から分泌される Wnt5a が大腸上皮細胞の Hsp25 発現を抑制していることが分かっている。さらに、その作用は Wnt5a 蛋白の全長ではなく、36 のアミノ酸からなるペプチド (Wnt5a short peptide : Wnt5a SP) が関与していることも明らかにしてきた。Wnt5a は種をこえて高度に保存されている蛋白であり、様々な生理活性を有していることが多く報告されている。しかしながら、炎症性腸疾患における関与および、粘膜の創傷治癒に関する報告はない。本研究においてわれわれは、この Wnt5a SP の生理活性、特に潰瘍性大腸炎の粘膜における大腸上皮創傷治癒に対する作用を検討することを目的とした。

B. 研究方法

Wnt5a SP は人工合成が可能であり、YAMC 細胞 (Young Adult Mouse Colonic epithelial cell) に対するペプチドの作用を検討した。創傷治癒は micro tip による Wound Healing Assay を用いた。100% confluent の YAMC 細胞を 37°C、24 時間で分化させ、12 時間の FBS free 下での培養の後、micro tip を用いて吸引による円形の穴を形成した。その直後より Wnt5a SP を添加 (0, 30, 300, 3000ng/ml) し、経時的に穴の面積を非添加群と比較した。また、実際にヒト大腸粘膜内での Wnt5a SP の存在を確認するために、大腸癌手術標本の非癌部組織を用いて、10kDa 以下の成分を抽出し、LC-MS によ

てその分画に含まれるペプチドの構造解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

ヒト大腸癌組織を用いた検討では、京都府立医科大学の IRC の承認 (C-1124) を得ており、患者の同意のもと、検体採取をおこなった。

C. 研究結果

YAMC 細胞における創傷治癒は Wnt5a SP を添加することによって非添加群と比べて有意に促進された。また、ヒト大腸粘膜におけるペプチド解析では Wnt5a SP の配列を一部含んでいるペプチドが同定されたが、さらなる詳細な検討が必要であり、今後解析を進めていく予定である (平成 25 年 1 月現在)。

D. 考察

これまでのわれわれの検討で、Wnt5a SP は butyrate 存在下で YAMC 細胞の増殖を促進することが分かっているが、今回の検討で創傷治癒も促進することが明らかとなった。また、潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜上皮において Wnt5a mRNA 発現が上昇していることも予備検討で分かっており、Wnt5a の作用、とくに大腸粘膜障害時における上皮細胞創傷治癒を促進する作用は治療標的因子として期待できる。これまでの検討で、Wnt5a の全長ではなく、その一部の人工合成可能な Wnt5a SP がその作用を有していることが分かっているため、将来的に創薬も視野に入れた研究が可能であると考えら

れる。

#### E. 結論

Wnt5a SPは大腸上皮細胞の創傷治癒を促進した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, et al. Serpin B1 protects colonic epithelial cell via blockage of neutrophil elastase activity and its expression is enhanced in patients with ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 May 15;302(10):G1163-70.

2. Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, et al. FGF19 protects colonic epithelial cells against hydrogen peroxide. *Digestion.* 2011;83(3):180-3.

##### 2. 学会発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし。

## 大腸上皮幹細胞培養とその臨床応用技術開発

研究代表者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

要旨：炎症性腸疾患研究において、腸管上皮の再生機構を解明し、上皮異常の診断や上皮再生治療に利用する技術が期待されている。本研究では、数多くの条件検討の結果、これまで困難とされてきた正常腸管上皮の体外培養技術確立に成功した。また、この独自の先端技術を応用し、培養腸管上皮細胞を用いて傷害大腸上皮を修復する移植治療の技術基盤確立を目指した研究をおこなった。

共同研究者：中村哲也

東京医科歯科大学大学院消化管先端治療学

### A. 研究目的

炎症性腸疾患（IBD）の新しい診断・治療法の開発が求められている。中でも腸管上皮が再生する機構を解析し、上皮異常の診断や上皮再生治療に応用することが期待されている。しかしながら、腸管上皮の増殖・分化機構の研究領域では、正常腸管上皮細胞培養技術が未確立であったことが大きな障壁となってきた。本研究プロジェクトでは、正常マウス大腸上皮細胞を効率よく単離し、純度の高いまま、無血清培地中で、しかも継代操作を経て長期にわたり維持できる技術の確立を目指した。また、この独自の先端技術を応用し、培養腸管上皮の移植による大腸上皮再生の可能性につき検討した。

### B. 研究方法

マウス大腸上皮細胞を培養する条件を、1) 単離条件、2) 3次元培養に用いる支持基質、3) 無血清培地に加える添加因子について数多くの組み合わせで検討した。培養技術確立の後には、培養細胞の詳細な性状解析を、RT-PCR法、免疫染色法、電子顕微鏡観察、ライブイメージング法を用いおこなった。

つづいて培養上皮が移植可能であるか否かを検証した。すなわち免疫不全マウスをレシピエントとし、これらに大腸炎を惹起し、培養大腸上皮細胞をドナーとして経肛門的に移入した。レシピエント大腸は1ヶ月

後に解析した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換えマウスの使用を含む動物実験は、東京医科歯科大学動物実験ガイドラインにそって実施した。本研究の遂行については、東京医科歯科大学動物実験審査委員会・および組換えDNA実験安全管理委員会により承認を受けた。

### C. 研究結果

マウスより大腸陰窩を効率よく単離し、細胞外マトリックスゲルへ3次元的に包埋し、無血清培地に複数の因子を加えることで、正常な大腸上皮細胞が長期に培養できる条件を見出した。培養大腸上皮は細胞が単層で配列する嚢状構造を形成し、大腸の全分化細胞、ならびにKi67陽性の未分化細胞を含んでいた。本法で維持される培養細胞には、Lgr5発現陽性の幹細胞が単に含まれるのみならず、培養過程で著明に増殖することを明らかにした。

次に、培養大腸上皮細胞の移植が可能かを検証した。免疫不全マウスにDSS腸炎を惹起しレシピエントとし、EGFPトランスジェニックマウス由来の培養大腸上皮細胞を経肛門的に移入した。驚くべきことに、ドナー細胞は傷害大腸上皮を補填しながら生着し、その後形態的に正常な上皮を再生した。組織学的にもドナー由来EGFP陽性クリプトはすべての分化細胞および増殖細胞を含むことから、培養細胞に含まれていたLgr5陽性幹細胞が、移植後レシピエント組織内で再び上皮幹細胞として機能したことが示唆された。

さらにわれわれは、ただ一個のLgr5陽性幹細胞を体

外で増やした細胞群によって大腸再生が可能かを検討した。リニエージトレーシングが可能なマウスより得た培養大腸上皮を移植し解析した結果、一個の幹細胞由来の培養細胞が、複数のマウスに複数のクリプトを再生しうること、およびこのドナー由来上皮が6ヶ月を超える長期にわたり生着しうるということがわかった。

#### D. 考察

腸管上皮幹細胞研究の進展が著しいものの、正常な大腸上皮細胞を長期培養できるとの報告はなかった。本研究では、これまで不可能であった大腸上皮の体外培養を可能とし、正常なマウスの大腸上皮細胞が、非上皮細胞なしに、無血清培地で、3次元的に、継代操作を経て、1年を超える長期にわたり培養できる技術を確立した。この方法では大腸上皮幹細胞が効率よく増えることから、本法がこれら幹細胞の性状・挙動解析の有用なツールとなりうることが示された。さらに我々は、培養大腸上皮幹細胞を用いた移植実験をおこない、体外培養を経たこれらの幹細胞が、傷害を受けた大腸粘膜の修復に寄与しうることを初めて明らかにした。また、ただ一個の幹細胞の培養と、これに続く移植実験の成功から、組織再生能を保持する上皮幹細胞を数的に増やし、これを用いる幹細胞移植治療が技術的に可能であることを明らかとした。

#### E. 結論

大腸上皮幹細胞を *in vitro* で増やしうること、また増やした大腸上皮幹細胞が他個体の大腸上皮においても上皮幹細胞として機能し、正常な陰窩を再生しうることを明確にした。今後、ヒト大腸上皮上皮についても類似の技術を確立することにより、ヒト大腸疾患における上皮障害機構の解析ツールとして高い意義を有すると考える。また、培養大腸細胞を移植治療に利用する技術の基礎として、消化管疾患における再生医療研究に大きなインパクトを与えるでであると考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 論文発表

- 1) Kano Y, Tsuchiya K, Zheng X, Horita N, Fukushima K, Hibiya S, Yamauchi Y, Nishimura T, Hinohara K, Gotoh N, Suzuki S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: The acquisition of malignant potential in colon cancer is regulated by the stabilization of Atonal homolog 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun*. (Epub ahead of print), 2013.
- 2) Naganuma M, Nagahori M, Fujii T, Morio J, Saito E, Watanabe M: Poor recall of prior exposure to varicella zoster, rubella, measles, or mumps in patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 19:418-422, 2013.
- 3) Ueno F, Matsui T, Matsumoto T, Matsuoka K, Watanabe M, Hibi T, on behalf of the guideline project group of intractable Inflammatory Bowel Disease granted by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan and the Guidelines Committee of the Japanese: Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan. *J Gastroenterol*. 48(1):31-72, 2013
- 4) Ohyagi M, Ohkubo T, Yagi Y, Ishibashi S, Akiyama J, Nagahori M, Watanabe M, Yokota T, Mizusawa H: Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy in a patient with Crohn's disease. *Intern Med*. 52:125-128, 2013.
- 5) Araki A, Suzuki S, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Watanabe M: Modified single-operator method for double-balloon endoscopy. *Dig Endosc*. 24(6):470-474, 2012
- 6) Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Suzuki S, Morio-Akiyama J, 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*. 6(1):328, 2012.