

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 に発生した腫瘍における  $\gamma$ H2AX と 53BP1 との共局在率を検討した。 $\gamma$ H2AX は DNA 二重鎖切断 (double strand breaks: DSB) のマーカーであり、DSB に対する修復応答 (DNA damage response: DDR) の際には、 $\gamma$ H2AX に 53BP1 が結合・活性化することが知られている。二重蛍光免疫染色を用いた観察では、UC-IV (浸潤癌) は UC-III (dysplasia) に比べ  $\gamma$ H2AX と 53BP1 の共局在率が有意に低く、炎症性発癌では浸潤癌で DDR の破綻がおきていると考えられた。散発性腫瘍との比較では、UC-IV (浸潤癌) は通常の大腸浸潤癌に比べ有意に  $\gamma$ H2AX と 53BP1 との共局在率が低く、UC-IV (粘膜内癌) は通常の大腸粘膜内癌に比べ共局在率が低い傾向があった。以上のことから、炎症性発癌では通常の大腸癌よりも DDR の破綻が早期におきている可能性が示唆された。

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

発性腫瘍) した浸潤癌 16 症例 16 病変、粘膜内癌 8 症例 8 病変、腺腫 3 症例 3 病変、を対象とし、DSB 部位に動員されるリン酸化 H2AX ( $\gamma$ H2AX) と DDR の際に  $\gamma$ H2AX と結合する 53BP1 との共局在率を、二重蛍光免疫染色法を用いて算定した。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎 (以下 UC: ulcerative colitis) 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た。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

①UC-IV (浸潤癌) は UC-III (dysplasia) に比べ、 $\gamma$ H2AX と 53BP1 の共局在率が有意に低かった ( $p=0.015$ )。UC-IV (粘膜内癌) と UC-III との間には有意差は無かった。

②UC に発生した腫瘍と散発性腫瘍との比較では、UC-IV (浸潤癌) は通常の大腸浸潤癌に比べ  $\gamma$ H2AX と 53BP1 の共局在率が有意に低く ( $p=0.002$ )、UC-IV (粘膜内癌) は通常の大腸粘膜内癌に比べ共局在率が低い傾向があった ( $p=0.089$ )。UC-III (dysplasia) と腺腫との間には有意差はなかった。

B. 研究方法

ホルマリン固定外科切除を用いた。UC に発生した UC-IV (浸潤癌) 7 症例 7 病変、UC-IV (粘膜内癌) 5 症例 5 病変、UC-III (dysplasia) 9 症例 11 病変、炎症性腸疾患を合併しない通常の大腸に発生 (散

D. 考察

UC-IV (浸潤癌)はUC-III (dysplasia)に比べ $\gamma$ H2AXと53BP1の共局在率が有意に低かったことから、UC粘膜における炎症性発癌では粘膜下層浸潤を来す際にDDRの破綻が生じていると考えられる。他方、UC-IVは通常の大腸癌に比べ、 $\gamma$ H2AXと53BP1の共局在率が有意(もしくは傾向)に低いことから、慢性持続性炎症を背景とする炎症性発癌では、通常の大腸粘膜における発癌過程に比べDDRの破綻が早期におきている可能性が推定された。

#### E. 結論

炎症性発癌過程では粘膜内腫瘍から浸潤癌への過程でDDRの破綻が生じているが、炎症性発癌におけるDDRの破綻は通常の大腸粘膜における発癌過程より早期におきている可能性が推定された。

#### 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*, 44: 1038-1046, 2013
- 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*, 20: 1227-1236, 2013

- 3) 味岡洋一、佐野知江. 潰瘍性大腸炎における大腸癌の病理組織学的特徴と生検診断。日本消化器病学会誌 110: 379-384, 2013

#### 2. 学会発表

- 1) 谷 優佑、味岡洋一、渡辺佳緒里、若井俊文、山口尚之、高林広明、小林和恵. 潰瘍性大腸炎の炎症性発癌過程におけるDNA損傷. 第102回日本病理学会総会. 札幌、2013. 6. 7
- 2) 渡辺佳緒里、味岡洋一、谷 優佑、小林和恵. 潰瘍性大腸炎における胃型粘液発現の検討. 第102回日本病理学会総会. 札幌、2013. 6. 7

#### 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

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、林 亮平、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

A. 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で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。

B. 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。

さらに大腸がん、粘液形質を有する大腸がん、炎症性腸疾患に付随した大腸がんの Atoh1 発現を免疫染色にて解析を行う。

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のみ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。

#### C. D. 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。

さらに本年度は野生型 Atoh1 蛋白の大腸がんにおける安定条件を検討したところ、TNF $\alpha$  刺激により Atoh1 蛋白の安定化、定常発現を認めた。

また臨床検体を用いて、各種大腸がんの Atoh1 発現解析を行ったところ、非粘液形質大腸がんでは Atoh1 発現を認めないが、粘膜深部の粘液形質発現部では Atoh1 発現を認めた。さらに潰瘍性大腸炎付随がんでは粘液形質がんを認め、同部位での Atoh1 発現を認めたことから Atoh1 発現と粘液形質発現の関連が示唆された。

##### 2) Atoh1 発現における形質発現解析。

マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現解析、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。本年度はさらに最も多く発現誘導する遺伝子を同定し、その機能解析を開始している。

##### 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発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。

#### E. 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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Esaki M, Matsumoto T, Watanabe K, Arakawa T, Naito Y, Matsuura M, Nakase H, Hibi T, Matsumoto T, Nouda S, Higuchi K, Ohmiya N, Goto H, Kurokawa S, Motoya S, Watanabe M: Use of capsule endoscopy in patients with Crohn's

- disease in Japan: A multicenter survey. *J Gastroenterol Hepatol.* 29:96-101, 2014.
- 2) Murano T, Okamoto R, Ito G, Nakata T, Hibiya S, Shimizu H, Fujii S, Kano Y, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 promotes the IL-22-mediated antimicrobial response by enhancing STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 443:840-846, 2014.
  - 3) Hisabe T, Hirai F, Matsui T, Watanabe M: Evaluation of diagnostic criteria for Crohn's disease in Japan. *J Gastroenterol.* 49:93-99, 2014.
  - 4) Suzuki M, Motoya S, Hanai H, Matsumoto T, Hibi T, Robinson AM, Mostafa NM, Chao J, Arora V, Camez A, Thakkar RB, Watanabe M: Efficacy and safety of adalimumab in Japanese patients with moderately to severe active ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2013.
  - 5) Fordham RP, Yui S, Hannan NRF, Madgwick A, Vallier L, Pedersen RA, Nakamura T, Watanabe M, Jensen KB: Establishment of Fetal Enteric Progenitors as a Source for Transplantation. *Cell Stem Cell.* 13:734-744, 2013.
  - 6) 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.* 8:e79693, 2013.
  - 7) Takahara M, Nemoto Y, Oshima S, Matsuzawa Y, Kanai T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Yamamoto K, Watanabe M: IL-7 promotes long-term in vitro survival of unique long-lived memory subset generated from mucosal effector memory CD4+ T cells in chronic colitis mice. *Immunol Lett.* 156:82-93, 2013.
  - 8) Fukata N, Okazaki K, Omiya M, Matsushita M, Watanabe M; The Members of the Ministry of Health and Welfare of Japan's Inflammatory Bowel Diseases Study Group.: Hematologic malignancies in the Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2013.
  - 9) Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Matsumoto S, Watanabe M: Th1/Th17-Mediated Interstitial Pneumonia in Chronic Colitis Mice Independent of Intestinal Microbiota. *J Immunol.* 190: 6616-6625, 2013.
  - 10) Watanabe M, Nishino H, Samejima Y, Ota A, Nakamura S, Hibi T: Randomised clinical trial: evaluation of the efficacy of mesalazine suppositories in active ulcerative colitis patients with rectal inflammation - a placebo-controlled study. *Aliment Phar Ther.* 38:264-273, 2013.
  - 11) Hibi T, Sakuraba A, Watanabe M, Motoya S, Ito H, Sato N, Yoshinari T, Motegi K, Kinouchi Y, Takazoe M, Suzuki Y, Matsumoto T, Kawakami K, Matsumoto T, Hirata I, Tanaka S, Ashida T, Matsui T: C-reactive protein is an indicator of serum infliximab level in predicting loss of response in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2013.
  - 12) Watanabe M, Hanai H, Nishino H, Yokoyama T, Terada T, Suzuki Y: Comparison of QD and TID oral mesalazine for maintenance of remission in quiescent ulcerative colitis: a double-blind, double-dummy, randomized multicenter study. *Inflamm Bowel Dis.* 19:1681-1690, 2013.
  - 13) Watanabe K, Sasaki I, Fukushima K, Futami K, Ikeuchi H, Sugita A, Nezu R, Mizushima T, Kameoka S, Kusunoki M, Yoshioka K, Funayama Y, Watanabe T, Fujii H, Watanabe M, for the Surgical Research Group, the Research Committee of Inflammatory Bowel Disease, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: Long-term Incidence and Characteristics of Intestinal Failure in Crohn's disease: A Japanese Multicenter Study. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2013.

- 14) 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.
  - 15) 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.* 432:175-181, 2013.
  - 16) 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.* 48:31-72, 2013.
  - 17) 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.
  - 18) 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. *Journal of Crohn's & colitis.* 7:308-313, 2013.
  - 19) Kuwahara E, Asakura K, Nishiwaki Y, Inoue N, Watanabe M, Hibi T, Takebayashi T: Reply to the letter by A. M. Bianco et al. regarding 'Effects of family history on IBD characteristics in Japanese patients'. *J Gastroenterol.* 48:145-146, 2013.
  - 20) 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* 62:1142-1152, 2013.
  - 21) 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.* 48:595-560, 2013.
  - 22) Okada E, Araki A, Suzuki S, Morio Akiyama J, Fujii T, Okamoto R, Watanabe M: Histological diagnosis of follicular lymphoma by biopsy of small intestinal normal mucosa. *Digestive Endoscopy.* 25:544-546, 2013.
2. 学会発表
- 1) Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Ito G, Fujii S, Nakata T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: IL-22-mediated antimicrobial response is regulated by hes1 via stat3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. UEGW2013, Berlin, 2013年10月16日.
  - 2) Ito G, Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Lineage-specific expression of bestrophin-2 and bestrophin-4 is regulated by notch signaling in human intestinal epithelial cells. UEGW2013, Berlin, 2013年10月14日.
  - 3) Shimizu H, Okamoto R, Nakata T, Fujii S, Ito G, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Complete conversion of crypt progenitor cells into ATOH1-positive cells by targeted deletion of DLL1 and DLL4 in LFR5-positive intestinal stem cells. UEGW2013, Berlin, 2013年10月14日.
  - 4) Takahara M, Nemoto Y, Oshima S, Watanabe M: IL-7 promotes long-term in vitro survival of unique long-lived memory subset generated from mucosal effector memory CD4+ T cells in chronic colitis mice. UEGW2013, Berlin, 2013年10月14日.

- 5) Tsuchiya K, Kano Y, Watanabe M: Cancer Stemness In Mucinous Colon Cancer. BIT's 6th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells-2013. Dairen, 2013年10月13日.
- 6) Watanabe M: JGF Marshal & Warren Lecture: Adult tissue stem cell therapy for gastrointestinal diseases. GASTRO 2013. Shanghai, 2013年9月23日.
- 7) Watanabe M: Colonic Stem Cell Culture and Transplantation-Application in Mucosal Immunology. ICMI 2013, Vancouver, 2013年7月19日.
- 8) Suzuki M, Nagaishi T, Onizawa M, Yamazaki M, Tsuge N, Watanabe M: Myosin Light Chain Kinase is Involved in the Development of an Animal Model of Colitis-Associated Tumor. ICMI 2013, Vancouver, 2013年7月17日.
- 9) Watanabe M: Colonic Stem Cell Culture and Transplantation -Application in Mucosal Immunology-. RCAI-JSI International Symposium. Yokohama, 2013年6月27日.
- 10) Nagahori M, Saito E, Fujii T, Otsuka K, Watanabe M: Analysis of indication and volume of colonoscopy for ulcerative colitis patients in the era of mucosal healing. 1st Annual Meeting of AOCC. Tokyo, 2013年6月14日.
- 11) Watanabe M: Epidemiology of Asian IBD. 1st Annual Meeting of AOCC. Tokyo, 2013年6月13日.
- 12) Watanabe M: State-of-the-Art lecture: Stem cell therapy in IBD? Falk Sympo2013. Stuttgart, 2013年6月8日.
- 13) Ito G, Murano T, Shimizu H, Fujii S, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch signaling regulates expression of Bestrophin-4, a novel absorptive cell specific HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> channel, in human intestinal epithelial cells. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
- 14) Fujii T, Naganuma M, Kitazume Y, Saito E, Nagahori M, Watanabe M: MR enterocolonography can predict clinical recurrence of Crohn's disease. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
- 15) Horita N, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Kano Y, Xiu Zheng, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Live imaging of single cell reveals single stem cell dynamics in an organoid derived from murine small intestine. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
- 16) Tsuchiya K, Fukushima K, Kano Y, Hibiya S, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Stabilization of Atohl protein by TNF- $\alpha$  in colitic cancer might acquire the cancer stemness. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
- 17) Shimizu H, Okamoto R, Fujii S, Ito G, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Complete conversion of crypt progenitor cells into ATOH1-positive cells by targeted deletion of DLL1 and Dll4 in LGR5-positive intestinal stem cells. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
- 18) 高原政宏、根本泰宏、大島 茂、渡辺 守: 炎症性腸疾患マウスモデルにおける腸炎惹起性 memory stem cell. 第41回日本臨床免疫学会総会. 下関, 2013年11月27日.
- 19) 永石字司、渡辺 守: 炎症性腸疾患の病態理解と実験モデル. 第41回日本臨床免疫学会総会. 下関, 2013年11月27日.
- 20) 渡辺 守: 腸からヒト全身を繙く新しい時代に向けて. 第68回日本大腸肛門病学会学術集会. 東京, 2013年11月16日.
- 21) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の治療を考え直す. 木曜会特別講演会. 東京, 2013年11月14日.
- 22) 土屋輝一郎、堀田伸勝、林 亮平、日比谷秀爾、福島啓太、加納嘉人、渡辺 守: 全小腸マッピング生検によるクローン病病態解析. 第51回小腸研究会. 名古屋, 2013年11月9日.
- 23) 渡辺 守: 消化管からヒト全身を繙く新しい時代の到来. 第102回日本消化器病学会九州支部例会/第96回日本消化器内視鏡学会九州支部例会, 宮崎, 2013年11月8日.
- 24) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の最新治療戦略. 13th APPSPGHAN-40th JSPGHAN 2013. 東京, 2013年11月3日.
- 25) 渡辺 守: IBDにおける治療を考え直す. 多摩腸疾患カンファレンス. 東京, 2013年11月1日.

- 26) 荒木昭博、岡田英理子、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. 東京, 2013 月 10 月 12 日.
- 27) 仁部洋一、金子 俊、竹中健人、後藤文男、岡本英子、加納嘉人、福田将義、新田沙由梨、藤井俊光、齋藤詠子、櫻井 幸、岡田英理子、鈴木伸治、荒木昭博、大塚和朗、朝比奈靖浩、渡辺 守: 抗血栓薬内服患者におけるヘパリン置換法下での大腸内視鏡的粘膜切除術後出血の検討. JDDW2013. 東京, 2013 月 10 月 11 日.
- 28) 渡辺 守: 潰瘍性大腸炎の治療における医師と患者の意識比較. JDDW2013. 東京, 2013 月 10 月 9 日.
- 29) 渡辺 守: 新ガイドライン作成の基本コンセプト. JDDW2013. 東京, 2013 月 10 月 9 日.
- 30) 齋藤詠子、長堀正和、渡辺 守: IBD に対する内科治療とその限界. JDDW2013. 東京, 2013 月 10 月 9 日.
- 31) 渡辺 守: 腸からヒト全身を繙く新しい時代の到来. 北海道 IBD 講演会. 札幌, 2013 月 9 月 14 日.
- 32) 渡辺 守: IBD における治療を考え直す. 岡山 IBD カンファレンス. 岡山, 2013 月 9 月 12 日.
- 33) 渡辺 守: 東京医科歯科大学消化器内科の活動に見る最新情報の UP to DATE. 文京・小石川地区消化器疾患先端医療セミナー. 東京, 2013 月 9 月 9 日.
- 34) 渡辺 守: 炎症性腸疾患: 最新の知見と治療戦略. 平成 25 年度日本消化管学会教育集会. 東京, 2013 月 9 月 8 日.
- 35) 渡辺 守: IBD 診療の進歩と近未来像-治る時代へ-. 第 12 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. 東京, 2013 月 8 月 10 日.
- 36) 高原政宏、根本泰宏、大島 茂、渡辺 守: 炎症性腸疾患マウスモデルにおける腸炎惹起性 memory stem cell. 第 50 回日本消化器免疫学会総会. 東京, 2013 月 8 月 2 日.
- 37) 高原政宏、根本泰宏、大島 茂、渡辺 守: 炎症性腸疾患マウスモデルにおける腸炎惹起性 memory stem cell 同定の試み. 厚生労働科学研究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」. 東京, 2013 月 7 月 26 日.
- 38) 渡辺 守: 炎症性腸疾患における内視鏡を考え直す. 千葉 IBD フォーラム. 千葉, 2013 月 7 月 13 日.
- 39) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の up to date. 日本消化器病学会関東支部 第 22 回教育講演会. つくば, 2013 年 6 月 23 日.
- 40) 堀田伸勝、土屋輝一郎、渡辺 守: 全小腸マッピング生検検体を用いた網羅的遺伝子発現解析によるクローン病特異的遺伝子の同定. 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会. 京都, 2013 年 5 月 10 日.
- 41) 齋藤詠子、長堀正和、渡辺 守: 潰瘍性大腸炎 (UC) に対するインフリキシマブ (IFX) の中長期予後の内視鏡的検討. 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会. 京都, 2013 年 5 月 10 日.
- 42) 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: 腸管幹細胞を用いた消化管上皮再生. 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会. 京都, 2013 年 5 月 10 日.
- 43) 上山俊介、堀内亮郎、真栄城剛、浅野 徹、古本洋平、間野真也、村山巖一、石橋史明、外山雄三、港 洋平、村松雄輔、宮本勇治、松田真輝、那須啓一、佐崎なほ子、鈴木伸治、忠願寺義通、藤木和、渡辺 守: EBD 時 EST の ERCP 後肺炎回避における有効性の検討. 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会. 京都, 2013 年 5 月 10 日.
- 44) 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小腸粘膜の病態学的検討. 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会. 京都, 2013 年 5 月 10 日.
- 45) 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: 潰瘍性大腸炎 (UC) に対するインフリキシマブ (IFX) の中長期予後の内視鏡的検討. 第 85 回日本消化器内視鏡学会総会. 京都, 2013 年 5 月 10 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(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

潰瘍性大腸炎の炎症性発癌過程における microRNAs メチル化の意義

研究協力者 楠 正人 三重大学大学院医学系研究科消化管・小児外科学 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎の炎症性発癌過程における microRNAs メチル化の意義を検討した。潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜において、miR-124,-137 および miR-34b/c の promoter 領域における CpG island の methylation levels は、年齢、部位ならびに悪性新生物依存的変化を認め、"field defect"が確認された。潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜生検組織を用いた miR-137 methylation levels 測定は、colitic cancer, dysplasia を合併している潰瘍性大腸炎患者のふり分けに有用であると考えられた。

共同研究者：問山裕二、荒木俊光、大北喜基、藤川裕之、奥川喜永、三枝 晋、川村幹雄、近藤哲、北島貴仁、志村匡信、川本 文、廣純一郎、田中光司、井上靖浩、内田恵一、毛利靖彦（三重大学大学院医学系研究科 消化管・小児外科学）

A. 研究目的

miR-124, -137 ならびに-34b/c のプロモーター領域における CpG アイランド methylation ならびにそれらの発現と潰瘍性大腸炎癌化との関連を検討すること。

B. 研究方法

非癌合併、dysplasia 合併、癌合併それぞれの潰瘍性大腸炎大腸全摘患者の切除標本を用い、①大腸粘膜 miR-124, -137 and -34b/c methylation levels の定量。②UC 大腸粘膜の miR-124, -137 and -34b/c 発現の定量を行った。

標本の使用、解析およびデータの管理について三重大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得、患者へのインフォームドコンセントを行って研究を実施した。

C. 研究結果

①Methylation levels は、盲腸から直腸にかけて徐々に高くなり、とりわけ直腸の miR-124 and -137 methylation levels は盲腸に比べ有意に高い。

②直腸非癌部 UC 粘膜における miR-124

methylation levels は診断時、手術時年齢 ならびに病脳期間と有意に相関をみとめた。

③直腸非癌部 UC 粘膜における miR-137 methylation levels は診断時、手術時年齢 ならびに病脳期間と有意に相関をみとめた。

④非癌部 UC 粘膜における miR-34b/c methylation levels は臨床所見との関連を認めなかった。

⑤Dysplasia, Cancer におけるそれぞれの microRNA methylation levels は非癌部 UC 粘膜に比べ有意に高い。

⑥直腸非癌部 UC 粘膜における miR-124, -137 ならびに-34b/c methylation levels は癌合併 UC 患者で有意に高い。特に miR-137 methylation levels は neoplasia (dysplasia, cancer) 合併 UC 患者で有意に高い。

⑦非癌部直腸粘膜における miR-124, -137, -34b/c methylation levels の癌合併 UC 患者診断能はそれぞれ 74%, 79%, 71%であった。

⑧非癌部直腸粘膜における miR-137 methylation 高値群は独立した癌合併潰瘍性大腸炎患者の同定因子であった。

⑨潰瘍性大腸炎粘膜における miR-124, -137 ならびに-34c 発現では、潰瘍性大腸炎癌化に伴い

miR-124, -137 ならびに-34c 発現が低下し,  
miR-124 および miR-137 の発現と methylation  
levels は逆相関をみとめた.

#### D. 考察

大腸粘膜における miR-124, -137, -34b/c の高メ  
チル化は Field effect と関連があり、これを  
用いた潰瘍性大腸炎癌化ハイリスク患者の同  
定が期待される。これらの microRNAs の賦活化  
は、潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜の炎症により  
誘導される aging ならびに癌化抑制に寄与する  
可能性があり、現在動物実験モデルにて検証中  
である

#### E. 結論

潰瘍性大腸炎患者の直腸粘膜における miR-137  
methylation levels は neoplasia (dysplasia,  
cancer) 合併 UC 患者を高率に選別できる.

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  
1. Yuji Toiyama et al. The Clinical  
Significance of tissue miR-124 Methylation in  
Sporadic and Ulcerative Colitis-Associated  
Colorectal Cancer. AACR 2013 Chicago.  
2. Yuji Toiyama et al. MicroRNA-124, -137 and  
-34b/c methylation predict the development of  
UC-associated neoplasia. ASCO 2013 Chicago  
3. 問山裕二潰瘍性大腸炎癌化における  
microRNA-124, -137, -34b/c メチル化の意義 日  
本癌治療学会総会 2013 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む.)  
1. 特許取得  
申請中  
2. 実用新案登録  
なし  
3. その他  
なし

腸上皮細胞運命に対する MSC のニッチ作用

研究分担者 有村 佳昭 札幌医科大学消化器・免疫・リウマチ内科学講座 講師

研究要旨：MSC は腸上皮細胞とニッチを形成し，その形質に応じて異なる複数のニッチシグナルを介して，その細胞運命を制御することが予想された．今後，腸上皮幹細胞培養系を応用することで，より生理的な条件でのニッチを *ex vivo* において再構築し，ニッチ治療標的の探索と治療応用を目指す．

共同研究者：一色裕之<sup>1</sup>，永石歓和<sup>2</sup>，小野寺馨<sup>1</sup>，今井浩三<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>，東京大学医科学研究所附属病院長<sup>3</sup>

A. 研究目的

「骨髄間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell; MSC）は腸管上皮幹細胞（intestinal epithelial stem cell; ISC）と微小環境（ニッチ）を形成し，腸管粘膜修復・再生に関与する」との仮説を検証し，腸上皮再生治療への応用を探索する．

B. 研究方法

MSC のニッチ作用のうち細胞接触を介するニッチシグナル（VCAM/Integrin  $\alpha 4$ , E-cadherin, CXCL12/CXCR4, CCL5/CCR5, Notch/Jagged）に着目して，IEC-6（小腸上皮幹細胞株），COL0320（MSC 依存株），および HT-29（MSC 非依存株）と MSC の共培養実験を施行した．各種中和抗体（CD49d, E-cadherin, CCL5）と小分子阻害薬（AMD3100 および g-secretase 阻害薬）で処理後，細胞増殖に与える影響を，PCR および細胞免疫，MTT アッセイ（FACS による増殖細胞数の検討），細胞周期解析，TUNNEL 法，WB 法により検討した．

（倫理面への配慮）

本研究は，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，パートナー細胞に関わらず，VCAM/Integrin  $\alpha 4$  を介して細胞増殖シグナルを，E-cadherin を介して増殖抑制シグナルを伝達した．

一方，MSC 依存性は，CXCL12/CXCR4 が関与した．今回新たに解析した CCL5/CCR5 および Notch/Jagged はいずれも増殖促進シグナルとして作用した．この際，抗 E-cadherin 抗体処理においてのみ cyclinD1 およびリン酸化 Akt タンパク発現が増強した．

D. 考察

MSC は E-cadherin を介して増殖を抑制し，stemness の維持を図ることが予想された．一方，増殖促進シグナルの使い分けが，今後の検討課題であろう．

E. 結論

MSC は，腸上皮細胞の形質により異なる複数の経路を介し，腸上皮細胞の細胞運命を制御していると考えられた．

F. 健康危険情報  
なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. STEM CELLS 2013 (in press).
- 2) Watanabe S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nasuno M, Yamashita K, Idogawa M, Naishiro Y, Murata M, Adachi Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors. J Gastroenterol 2013 [Epub ahead of print].
- 3) 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 2013;144:781-8.
- 4) Arimura Y, Isshiki H, Onodera K, Nagaishi K, Yamashita K, Sonoda T, Matsumoto T, Takahashi A, Takazoe M, Yamazaki K, Kubo M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Characteristics of Japanese inflammatory bowel disease susceptibility loci. J Gastroenterol 2013 [Epub ahead of print].

### 2. 学会発表

- 1) Nagaishi K, Isshiki H, Arimura Y, Naishiro Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice by regulating bone marrow niche cells and

hematopoietic stem cells. ISSCR Jun 12-15, 2013.

- 2) Isshiki H, Arimura Y, Nasuno M, Nakagaki S, Nagaishi K, Naishiro Y, Yamashita K, Shinomura Y, Imai K. Mesenchymal stem cells partially cancel azoxymethane-induced tumor initiation. DDW2013 Orland Jun 2, 2013.

- 3) Isshiki H, Arimura Y, Nasuno M, Nakagaki S, Nagaishi K, Naishiro Y, Yamashita K, Shinomura Y, Imai K. Mesenchymal stem cells partially cancel azoxymethane-induced tumor initiation. 1st. Asian Organization for Crohn's & Colitis. Jun 13-14, 2013, Tokyo, Japan.

- 1) 一色裕之, 有村佳昭, 永石歓和, 苗代康可, 篠村恭久, 今井浩三. 骨髄間葉系幹細胞依存性の大腸癌細胞増殖の機序. JDDW2013 東京 2013年10月10日.

- 2) 小野寺馨, 有村佳昭, 一色裕之, 永石歓和, 山下健太郎, 苗代康可, 松本主之, 山崎慶子, 久保充明, 今井浩三, 篠村恭久. 日本人における炎症性腸疾患関連遺伝子のメタアナリシス. 第63回日本体質医学会総会 久留米 2013年10月6日.

- 3) 一色裕之, 有村佳昭, 小野寺馨, 永石歓和, 苗代康可, 篠村恭久, 今井浩三. 骨髄間葉系幹細胞依存性大腸癌細胞増殖の機序. 第50回日本消化器免疫学会総会 東京 2013年8月2日.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
『特願 51101427046』(間葉系幹細胞(MSC)の培養上清を含む腸炎の予防・治療剤) 2011年7月13日出願
2. 実用新案登録  
なし.
3. その他  
骨髄間葉系幹細胞による大腸がん予防 北海道医療新聞 2013年12月27日掲載.

炎症性腸疾患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 in vivo の実験系にて検証し、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。さらに、この Wnt5a SP が大腸上皮細胞の創傷治癒を促進することも in vitro の検討で明らかにしてきた。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しての報告はない。本年度の研究においてわれわれは、この Wnt5a SP の生理活性、特に炎症性腸疾患の粘膜における大腸上皮創傷治癒作用を in vivo の実験系で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、マウス大腸粘膜における Wnt5a SP の作用を検討するため、DSS 腸炎回復期に Wnt5a SP (10  $\mu$ mol/body) を腹腔内投与し、体重の推移、腸管長、大腸粘膜における遺伝子発現を検討した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

マウス DSS 腸炎の回復期において、Wnt5a SP 投与群ではコントロールと比較し、有意に腸管長が長く、体重の回復も早かった。さらに、大腸粘膜における Hsp25 mRNA 発現は有意に低下し、TGF- $\beta$  の mRNA 発現は有意に増加した。

D. 考察

これまでのわれわれの検討で、Wnt5a SP は in vitro の実験系において YAMC 細胞の創傷治癒を促進することが分かっている。さらに今回の検討に用いたマウスの実験腸炎モデルの回復期においても有意に腸炎からの回復を促進することが認められた。潰瘍性大腸炎患者、特に治療に良く反応し、良好な予後がえられた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。本検討では、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 in vivo のマウス腸炎モデルからの回復も促進した。

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

○内山和彦、高木智久、内藤裕二・大腸筋繊維芽細胞からみた大腸粘膜の潰瘍治癒～Wnt5a の役割～・第41回日本潰瘍学会・ホテル阪急エキスポパーク・2013年12月6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

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、異なる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。

また、新規にマウス胎児腸管上皮細胞培養技術を確立したコペンハーゲン大学・Kim Jensen 研究室との共同研究で、得られた胎児腸管上皮細胞の移植実験を同様の手法で

おこなった。

（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。興味深いことに、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。

続いて、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。

さらにわれわれは、コペンハーゲン大学・Kim Jensen研究室と共同し、培養したマウス胎児腸管上皮細胞の大腸への移植をおこない、これら細胞が成体マウス大腸に生着しうること、そしてその際には大腸環境に適応し、胎児小腸由来の上皮が一部大腸形質を獲得することを見いだした。

#### D. 考察

本研究では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認した。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。さらにわれわれは、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。本実験では、ただ一個の幹細胞の培養とこれに続く移植実験にも成功しており、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。

また、海外のグループと共同しおこなった胎児腸管上皮細胞の移植実験の成果もあわせ、さまざまな細胞ソースを利用した幹細胞移植治療の可能性も提示した。

#### 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認することにより、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。また本研究は、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ものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Esaki M, Matsumoto T, Watanabe K, Arakawa T, Naito Y, Matsuura M, Nakase H, Hibi T,

Matsumoto T, Nouda S, Higuchi K, Ohmiya N, Goto H, Kurokawa S, Motoya S, Watanabe M: Use of capsule endoscopy in patients with Crohn's disease in Japan: A multicenter survey. *J Gastroenterol Hepatol.* 29:96-101, 2014.

- 2) Murano T, Okamoto R, Ito G, Nakata T, Hibiya S, Shimizu H, Fujii S, Kano Y, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 promotes the IL-22-mediated antimicrobial response by enhancing STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 443:840-846, 2014.
- 3) Hisabe T, Hirai F, Matsui T, Watanabe M: Evaluation of diagnostic criteria for Crohn's disease in Japan. *J Gastroenterol.* 49:93-99, 2014.
- 4) Suzuki M, Motoya S, Hanai H, Matsumoto T, Hibi T, Robinson AM, Mostafa NM, Chao J, Arora V, Camez A, Thakkar RB, Watanabe M: Efficacy and safety of adalimumab in Japanese patients with moderately to severely active ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2013.
- 5) Fordham RP, Yui S, Hannan NRF, Madgwick A, Vallier L, Pedersen RA, Nakamura T, Watanabe M, Jensen KB: Establishment of Fetal Enteric Progenitors as a Source for Transplantation. *Cell Stem Cell.* 13:734-744, 2013.
- 6) 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.* 8:e79693, 2013.
- 7) Takahara M, Nemoto Y, Oshima S, Matsuzawa Y, Kanai T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Yamamoto K, Watanabe M: IL-7 promotes long-term *in vitro* survival of unique long-lived memory subset generated from

- mucosal effector memory CD4<sup>+</sup> T cells in chronic colitis mice. *Immunol Lett.* 156:82–93, 2013.
- 8) Fukata N, Okazaki K, Omiya M, Matsushita M, Watanabe M; The Members of the Ministry of Health and Welfare of Japan's Inflammatory Bowel Diseases Study Group.: Hematologic malignancies in the Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2013.
  - 9) Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Matsumoto S, Watanabe M: Th1/Th17-Mediated Interstitial Pneumonia in Chronic Colitis Mice Independent of Intestinal Microbiota. *J Immunol.* 190: 6616–6625, 2013.
  - 10) Watanabe M, Nishino H, Samejima Y, Ota A, Nakamura S, Hibi T: Randomised clinical trial: evaluation of the efficacy of mesalazine suppositories in active ulcerative colitis patients with rectal inflammation - a placebo-controlled study. *Aliment Phar Ther.* 38:264-273, 2013.
  - 11) Hibi T, Sakuraba A, Watanabe M, Motoya S, Ito H, Sato N, Yoshinari T, Motegi K, Kinouchi Y, Takazoe M, Suzuki Y, Matsumoto T, Kawakami K, Matsumoto T, Hirata I, Tanaka S, Ashida T, Matsui T: C-reactive protein is an indicator of serum infliximab level in predicting loss of response in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2013.
  - 12) Watanabe M, Hanai H, Nishino H, Yokoyama T, Terada T, Suzuki Y: Comparison of QD and TID oral mesalazine for maintenance of remission in quiescent ulcerative colitis: a double-blind, double-dummy, randomized multicenter study. *Inflamm Bowel Dis.* 19:1681–1690, 2013.
  - 13) Watanabe K, Sasaki I, Fukushima K, Futami K, Ikeuchi H, Sugita A, Nezu R, Mizushima T, Kameoka S, Kusunoki M, Yoshioka K, Funayama Y, Watanabe T, Fujii H, Watanabe M, for the Surgical Research Group, the Research Committee of Inflammatory Bowel Disease, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan: Long-term Incidence and Characteristics of Intestinal Failure in Crohn's disease: A Japanese Multicenter Study. *J Gastroenterol.* (Epub ahead of print), 2013.
  - 14) 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.
  - 15) 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.* 432:175–181, 2013.
  - 16) 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.* 48:31–72, 2013.
  - 17) 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.
  - 18) 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. *Journal of Crohn's & colitis.* 7:308–313, 2013.

- 19) Kuwahara E, Asakura K, Nishiwaki Y, Inoue N, Watanabe M, Hibi T, Takebayashi T: Reply to the letter by A. M. Bianco et al. regarding 'Effects of family history on IBD characteristics in Japanese patients'. *J Gastroenterol.* 48:145-146, 2013.
  - 20) 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* 62:1142-1152, 2013.
  - 21) 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.* 48:595-560, 2013.
  - 22) Okada E, Araki A, Suzuki S, Morio Akiyama J, Fujii T, Okamoto R, Watanabe M: Histological diagnosis of follicular lymphoma by biopsy of small intestinal normal mucosa. *Digestive Endoscopy.* 25:544-546, 2013.
2. 学会発表
- 1) Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Ito G, Fujii S, Nakata T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: IL-22-mediated antimicrobial response is regulated by hes1 via stat3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. UEGW2013, Berlin, 2013年10月16日.
  - 2) Ito G, Okamoto R, Murano T, Shimizu H, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Lineage-specific expression of bestrophin-2 and bestrophin-4 is regulated by notch signaling in human intestinal epithelial cells. UEGW2013, Berlin, 2013年10月14日.
  - 3) Shimizu H, Okamoto R, Nakata T, Fujii S, Ito G, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Complete conversion of crypt progenitor cells into ATOH1-positive cells by targeted deletion of DLL1 and DLL4 in LFR5-positive intestinal stem cells. UEGW2013, Berlin, 2013年10月14日.
  - 4) Takahara M, Nemoto Y, Oshima S, Watanabe M: IL-7 promotes long-term in vitro survival of unique long-lived memory subset generated from mucosal effector memory CD4+ T cells in chronic colitis mice. UEGW2013, Berlin, 2013年10月14日.
  - 5) Tsuchiya K, Kano Y, Watanabe M: Cancer Stemness In Mucinous Colon Cancer. BIT's 6th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells-2013. Dairen, 2013年10月13日.
  - 6) Watanabe M: JGF Marshal & Warren Lecture: Adult tissue stem cell therapy for gastrointestinal diseases. GASTRO 2013. Shanghai, 2013年9月23日.
  - 7) Watanabe M: Colonic Stem Cell Culture and Transplantation-Application in Mucosal Immunology. ICMI 2013, Vancouver, 2013年7月19日.
  - 8) Suzuki M, Nagaishi T, Onizawa M, Yamazaki M, Tsuge N, Watanabe M: Myosin Light Chain Kinase is Involved in the Development of an Animal Model of Colitis-Associated Tumor. ICMI 2013, Vancouver, 2013年7月17日.
  - 9) Watanabe M: Colonic Stem Cell Culture and Transplantation -Application in Mucosal Immunology-. RCAI-JSI International Symposium. Yokohama, 2013年6月27日.
  - 10) Nagahori M, Saito E, Fujii T, Otsuka K, Watanabe M: Analysis of indication and volume of colonoscopy for ulcerative colitis patients in the era of mucosal healing. 1st Annual Meeting of AOCC. Tokyo, 2013年6月14日.
  - 11) Watanabe M: Epidemiology of Asian IBD. 1st Annual Meeting of AOCC. Tokyo, 2013年6月13日.
  - 12) Watanabe M: State-of-the-Art lecture: Stem cell therapy in IBD? Falk Sympo2013. Stuttgart, 2013年6月8日.
  - 13) Ito G, Murano T, Shimizu H, Fujii S, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Notch signaling regulates expression of Bestrophin-4, a novel absorptive cell specific HCO3-/Cl- channel, in

- human intestinal epithelial cells. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
- 14) Fujii T, Naganuma M, Kitazume Y, Saito E, Nagahori M, Watanabe M: MR enterocolonography can predict clinical recurrence of Crohn's disease. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
  - 15) Horita N, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Kano Y, Xiu Zheng, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Live imaging of single cell reveals single stem cell dynamics in an organoid derived from murine small intestine. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
  - 16) Tsuchiya K, Fukushima K, Kano Y, Hibiya S, Horita N, Zheng X, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Stabilization of Atoh1 protein by TNF- $\alpha$  in colitic cancer might acquire the cancer stemness. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
  - 17) Shimizu H, Okamoto R, Fujii S, Ito G, Murano T, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Complete conversion of crypt progenitor cells into ATOH1-positive cells by targeted deletion of DLL1 and Dll4 in LGR5-positive intestinal stem cells. DDW2013. Orland, 2013年5月20日.
  - 18) 高原政宏、根本泰宏、大島 茂、渡辺 守: 炎症性腸疾患マウスモデルにおける腸炎惹起性 memory stem cell. 第41回日本臨床免疫学会総会. 下関, 2013年11月27日.
  - 19) 永石字司、渡辺 守: 炎症性腸疾患の病理理解と実験モデル. 第41回日本臨床免疫学会総会. 下関, 2013年11月27日.
  - 20) 渡辺 守: 腸からヒト全身を繙く新しい時代に向けて. 第68回日本大腸肛門病学会学術集会. 東京, 2013年11月16日.
  - 21) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の治療を考え直す. 木曜会特別講演会. 東京, 2013年11月14日.
  - 22) 土屋輝一郎、堀田伸勝、林 亮平、日比谷秀爾、福島啓太、加納嘉人、渡辺 守: 全小腸マッピング生検によるクローン病病態解析. 第51回小腸研究会. 名古屋, 2013年11月9日.
  - 23) 渡辺 守: 消化管からヒト全身を繙く新しい時代の到来. 第102回日本消化器病学会九州支部例会 / 第96回日本消化器内視鏡学会九州支部例会, 宮崎, 2013年11月8日.
  - 24) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の最新治療戦略. 13th APPSPGHAN-40th JSPGHAN 2013. 東京, 2013年11月3日.
  - 25) 渡辺 守: IBDにおける治療を考え直す. 多摩腸疾患カンファレンス. 東京, 2013年11月1日.
  - 26) 荒木昭博、岡田英理子、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. 東京, 2013年10月12日.
  - 27) 仁部洋一、金子 俊、竹中健人、後藤文男、岡本英子、加納嘉人、福田将義、新田沙由梨、藤井俊光、齊藤詠子、櫻井 幸、岡田英理子、鈴木伸治、荒木昭博、大塚和朗、朝比奈靖浩、渡辺 守: 抗血栓薬内服患者におけるヘパリン置換法下での大腸内視鏡的粘膜切除術後出血の検討. JDDW2013. 東京, 2013年10月11日.
  - 28) 渡辺 守: 潰瘍性大腸炎の治療における医師と患者の意識比較. JDDW2013. 東京, 2013年10月9日.
  - 29) 渡辺 守: 新ガイドライン作成の基本コンセプト. JDDW2013. 東京, 2013年10月9日.
  - 30) 齊藤詠子、長堀正和、渡辺 守: IBDに対する内科治療とその限界. JDDW2013. 東京, 2013年10月9日.
  - 31) 渡辺 守: 腸からヒト全身を繙く新しい時代の到来. 北海道IBD講演会. 札幌, 2013年9月14日.
  - 32) 渡辺 守: IBDにおける治療を考え直す. 岡山IBDカンファレンス. 岡山, 2013年9月12日.
  - 33) 渡辺 守: 東京医科歯科大学消化器内科の活動に見る最新情報のUP to DATE. 文京・小石川地区消化器疾患先端医療セミナー. 東京, 2013年9月9日.
  - 34) 渡辺 守: 炎症性腸疾患: 最新の知見と治療戦略. 平成25年度日本消化管学会教育集会. 東京, 2013年9月8日.
  - 35) 渡辺 守: IBD診療の進歩と近未来像-治る時代へ-. 第12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. 東京, 2013年8月10日.
  - 36) 高原政宏、根本泰宏、大島 茂、渡辺 守: 炎症性腸疾患マウスモデルにおける腸炎惹起性