

- diseases: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin J Gastroenterol.* (in press)
2. Fujiya M, Konishi H, Kamel M.K.M, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Ikuta K, Ohtake T, Kohgo Y. microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear. *Oncogene.* (in press)
  3. Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, Shindo M, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. Up-regulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon  $\alpha$ . *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* (in press)
  4. Nomura Y, Tanabe H, Moriichi K, Igawa S, Ando K, Ueno N, Kashima S, Tominaga M, Goto T, Inaba Y, Ito T, Ishida-Yamamoto A, Fujiya M, Kohgo Y. Reduction of E-cadherin by Human Defensin-5 in Esophageal Squamous Cells. *Biochem Bioph Res Co.* 439(1):71-7, 2013.
  5. Nata T, Fujiya M, Ueno N, Moriichi K, Konishi H, Tanabe H, Ohtake T, Ikuta K, Kohgo Y. microRNA-146b improves intestinal injury in mouse colitis by activating NF- $\kappa$ B and improving epithelial barrier function. *Journal of Gene Medicine.* 15(6-7):249-60, 2013
  6. Ito T, Ayabe T, Ishikawa C, Inaba Y, Tanabe H, Maemoto A, Kono T, Ashida T, Fujiya M, Kohgo Y. Paneth cell regulate gut inflammation, thereby inducing chemotaxis of dendritic cells and cytokine production from epithelial cells. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 227(1):39-48, 2012.
  7. Fujiya M, Inaba Y, Musch MW, Hu S, Kohgo Y, Chang EB. Cytokine Regulation of OCTN2 Expression and Activity in Small and Large Intestine. *Inflammatory Bowel Diseases* 17(4):907-16, 2011.
  8. Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One* 6 (8): e23278, 2011.
  9. Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Nata T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Kobayashi N, Ito K, Kohgo Y. Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflammatory Bowel Diseases* 17(11):2235-50, 2011.
  10. 藤谷幹浩、高後 裕. 潰瘍性大腸炎と粘膜治療. *日本消化器病学会雑誌.* 110(11):1900-8, 2013.
  11. 藤谷幹浩、高後 裕. プロバイオティクス由来活性物質の同定とその作用メカニズム. *BIO INDUSTRY* 29 (4): 57-65, 2012.
  12. 安藤勝祥、上野伸展、藤谷幹浩、瀬川修一、稲場勇平、盛一健太郎、高後 裕. 麦芽乳酸菌 (*Lactobacillus brevis*) SBC8803 死菌は DSS 慢性腸炎モデルマウスを改善する. *消化器と免疫* 48: 120-123, 2012.
2. 学会発表
    1. Inaba Y, Fujiya M, Kohgo Y. The novel probiotic function through activation of intestinal epithelial autophagy. 16th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2013). Vancouver.
    2. Fujiya M, Segawa S, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Kohgo Y. A probiotic-derived polyphosphate improves chronic inflammation and fibrosis via caveolin-dependent

- endocytosis. GI Research Academy 2013. Kyoto.
3. Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Dokoshi T, Ando K, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. Treatment with the heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a dextran sulfate sodium-induced chronic colitis model by enhancing the intestinal barrier function. AOCC2013. Tokyo.
  4. Konishi H, Fujiya M, Segawa S, Kashima S, Ueno N, Tanaka K, Sakatani A, Dokoshi T, Ando K, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Moriichi K, Kohgo Y. A probiotic-derived polyphosphate improves chronic inflammation and fibrosis via caveolin-dependent endocytosis. DDW 2013 (AGA). Orland.
  5. Sakatani A, Fujiya M, Konishi H, Segawa S, Kashima S, Ueno N, Tanaka K, Dokoshi T, Ando K, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Tanabe H, Moriichi K, Kohgo Y. Probiotic-derived polyphosphate inhibits colon cancer progression through the inactivation of the ERK pathway and the induction of cancer cell apoptosis. DDW 2013 (AGA). Orland.
  6. Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Segawa S, Shigyo T, Kohgo Y. A polyphosphate derived from *Lactobacillus brevis* improves the intestinal barrier function and injury in acute and chronic experimental colitis. Kyoto.
  7. Fujiya M, Segawa S, Ueno N, Inaba Y, Moriichi K, Tanabe H, Kohgo Y. Polyphosphate derived from *Lactobacillus* contributes to the maintenance of intestinal homeostasis and the improvement of intestinal injury in experimental colitis. 10th Asian IBD Symposium, Seoul, 2012. 11. 03.
  6. Fujiya M, Ueno N, Sakatani A, Dokoshi T, Ando K, Nomura Y, Kashima S, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Segawa S, Shigyo T, Kohgo Y. Polyphosphate is a novel active molecule derived from *Lactobacillus brevis* that contributes to the maintenance of intestinal homeostasis and the improvement of intestinal injury in acute and chronic experimental colitis. DDW 2012 (AGA), DDW 2012 (AGA), 2012. 05. 20.
  7. 藤谷幹浩、小西弘晃、嘉島 伸、瀬川修一、上野伸展、稲場勇平、岡本耕太郎、高後 裕。乳酸菌由来長鎖ポリリン酸による慢性腸炎および腸管線維化の改善効果。第 50 回小腸研究会、京都、2012. 11. 10.
  8. 稲場勇平、藤谷幹浩、高後裕。腸管オートファジー誘導による抗酸化作用、腸管バリア増強作用を応用した過敏性腸症候群の新規治療開発。第 54 回日本消化器病学会大会、神戸、2012. 10. 12.
  9. 藤谷幹浩、上野伸展、後藤拓磨、笹島順平、稲場勇平、伊藤貴博、盛一健太郎、高後 裕。microRNA-18a による癌関連蛋白 hnRNP A1 の機能抑制を介した大腸癌細胞のアポトーシス誘導。第 108 回北海道癌談話会例会。旭川。
  10. 藤谷幹浩、嘉島 伸、高後 裕。乳酸菌由来長鎖ポリリン酸を用いた新しい腸炎治療の開発。第 50 回消化器免疫学会。東京。
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得、出願
    - 特許第 5190849 号  
「消化器癌に対する抗腫瘍剤」
    - 特開 2010-083881  
「腸管保護剤」
    - 特願 2010-089469、PCT/JP2011/057689「腸管保護剤」(公開予定)
  2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

腸管上皮のオートファジーによる *Citrobacter rodentium* 感染の制御

研究協力者 吉田 優 神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 准教授

研究要旨：近年、クローン病の感受性遺伝子としてオートファジー関連遺伝子が同定され、オートファジーは腸管免疫において重要な働きを担っている可能性が示唆されている。我々はマウスにおける *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) 腸炎制御において、オートファジーの役割を検討した。腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、LPS に対する炎症性サイトカインの発現の亢進や *C. rodentium* による感染性腸炎の増悪を認め、腸管上皮のオートファジーが腸管上皮での炎症を制御し、さらに病原性大腸菌などの非共生細菌の排除において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

オートファジーとは細胞内のタンパクやオルガネラなどの大分解機構である。近年、遺伝子の網羅的解析において、オートファジー関連遺伝子である IRGM1、NOD2、ATG16L1 がクローン病の感受性遺伝子として同定され、腸管の炎症制御においてオートファジーが重要である可能性が示された。我々はこれまでに、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに対する LPS 刺激によって、腸管における TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現が NF- $\kappa$ B の活性化を介して亢進することを明らかにした。このことにより、腸管のオートファジーは腸管内のバクテリアなどに対する免疫的な反応を制御している可能性が示唆された。そこでマウス病原性大腸菌モデルである *C. rodentium* を腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに感染させることで、細菌感染に対する防御機構において腸管上皮のオートファジーが果たす役割を解析した。

B. 研究方法

Atg7 Flox/Flox マウスと Villin-cre マウスを交配させ、Cre/loxP システムによって腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスを作製した。*C. rodentium* を経口ゾンデを用いて 4 週齢のマウスに経口感染させ、体重の変化、便中の菌量を経時

的に測定した。感染後 7、14、21 日目で直腸を取り出し、10%ホルムアルデヒドで固定し切片を作製した。切片の H/E 染色を行い、腸炎の程度を病理学的スコアにて評価した。また、感染後 14 日目で取り出した大腸の粘膜上皮を採取し、抽出した RNA を、real-time PCR によって TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  の mRNA レベルの発現量を解析した。また、感染後 7、14、21 日目で血液を採取し、血中抗 *C. rodentium* IgG 抗体濃度を ELISA 法にて解析した。（倫理面への配慮）

神戸大学動物実験委員会の規約に沿い、動物への倫理的配慮を行った。

C. 研究結果

腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスとコントロールマウスに *C. rodentium* を経口感染させた。その結果、感染後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスで、コントロールと比べ有意な体重減少を認めた。また、病理学的にも腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスで有意な炎症増悪を認めた。更に、*C. rodentium* 感染後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスの腸管上皮において TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  の mRNA レベルの発現亢進を認めた。

次に、*C. rodentium* 感染後の腸管上皮特異的オ

オートファジー欠損マウスの血清中抗 *C. rodentium* IgG 濃度を ELISA 法によって解析した。その結果、感染 21 日後の腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、有意に血清中の抗 *C. rodentium* IgG 抗体の産生亢進が観察された。更に、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、感染後 14 日目の糞便中の菌量が有意に多いことが分った。

#### D. 考察

近年、臓器特異的オートファジー欠損マウスを用いた研究が広く実施され、オートファジーの機能異常が様々な疾患と関連することが示唆されている。本研究では、腸管のオートファジーが細菌感染に対する防御機構に影響を与えているかを検討するため、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに *C. rodentium* を感染させ解析した。腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスでは、*C. rodentium* 感染による腸炎が病理学的に悪化し、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  等の炎症性サイトカイン発現が亢進することが明らかとなった。これらは、*C. rodentium* に対する炎症反応が腸管上皮のオートファジーにより制御されている可能性を示唆する。我々はこれまで、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスに LPS 刺激を行うと腸管の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の発現が NF- $\kappa$ B の活性化を介して亢進することを確認しており、オートファジーは NF- $\kappa$ B を負に制御し、*C. rodentium* 等の病原体に対する炎症反応を軽減している可能性が示唆されている。また、腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスにおいて、糞便中の *C. rodentium* の菌量が多く、血中の抗 *C. rodentium* IgG 抗体濃度が上昇していることが明らかとなった。これらのことから、腸管のオートファジーは *C. rodentium* のクリアランスにおいても重要な役割を演じている可能性が示唆された。*C. rodentium* の排除のメカニズムは様々な報告がなされているものの、いまだ解明されていない。*C. rodentium* の排除に重要とされる Tリンパ球の動員、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などの発現上昇は、本研究における *C. rodentium* に感染した腸管上皮特異的オートファジー欠損マウスでも観察された。オートファ

ジー阻害剤の腹腔内投与によって、*C. rodentium* の排除能が低下したという報告もあるものの、臓器特異的オートファジー欠損マウスでの報告はこれまでになく、腸管のオートファジーの役割を理解する上で我々の示した結果は非常に重要であると考えられた。

#### E. 結論

腸管上皮のオートファジーが *C. rodentium* 感染に対する防御機構において重要な役割を担い、また、*C. rodentium* 感染による腸管の炎症制御においてもオートファジーが重要であることを示した。細菌性腸炎に対する宿主の防御機構における腸管のオートファジーの役割を理解することは、感染性腸炎を含む腸管炎症の病態の解明や治療法の開発において意義のあることであると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Inoue J, Nishiumi S, Fujishima Y, Masuda A, Shiomi H, Yamamoto K, Nishida M, Azuma T, Yoshida M. Autophagy in the intestinal epithelium regulates *Citrobacter rodentium* infection. *Arch Biochem Biophys*, 521(1-2):95-101, (2012).

##### 2. 学会発表

Jun Inoue1, Masaru Yoshida. Autophagy in the intestinal epithelium regulates *Citrobacter rodentium* infectious colitis. 日本免疫学会. 神戸国際会議場. 2012/10/10.

Inoue J, Hoshi N, Nishiumi S, Fujishima Y, Masuda A, Shiomi H, Yoshida M, Azuma T. Cell type-specific role of autophagy against *Citrobacter rodentium* infectious colitis. The American Association of Immunologists. Hawaii Convention center. 2013/5/5

井上潤, 西海信, 藤島佳未, 増田充弘, 塩見英之, 吉田優, 東健. 腸管のオートファジーによる *Citrobacter rodentium* 感染の制御. 腸内細菌学会. 神戸市産業振興センター. 2012/6/14.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

### 腸炎における Claudin-2 の役割について

研究協力者 吉田 優 神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 准教授

研究要旨：炎症性腸疾患において、Tight junction (TJ) の構成成分である claudin の発現が疾患に関与していることが報告されている。しかし、複数ある claudin の中で、炎症性腸疾患における claudin-2 の役割についてはその詳細は未だ不明である。本研究では、claudin-2 ノックアウトマウスを用い、腸炎における claudin-2 の役割を検討した。更に、腸管上皮の細胞株である Caco-2 細胞で claudin-2 の発現を siRNA で低下させ検討したところ、claudin-2 は TJ の透過性に関与する myosin light chain kinase (MLCK) の発現を制御することで腸管の炎症を修飾する機能があることが示唆された。

#### A. 研究目的

近年、TJ の構成成分である claudin の発現変動が様々な疾患に関与することが報告されており、炎症性腸疾患でも claudin の関与が明らかにされた。炎症性腸疾患において claudin-2 発現が変動することが報告されたが、腸管の炎症における claudin-2 の役割については、まだよくわかっていない。本研究では claudin-2 ノックアウトマウスを用いて、大腸の炎症における claudin-2 の役割について検討した。

#### B. 研究方法

claudin-2 ノックアウトマウスに TNF- $\alpha$  を腹腔内投与し、大腸の炎症反応の変化について検討した。また、DSS(デキストラン硫酸ナトリウム) をマウスに摂取させることで、腸炎における claudin-2 の役割について評価した。さらに、Caco-2 細胞を用いて、claudin-2 の siRNA を導入することで、TNF- $\alpha$  誘導性の炎症反応における claudin-2 の役割について検討した。

(倫理面への配慮)

神戸大学動物実験委員会の規約に沿い、動物への倫理的配慮を行った。

#### C. 研究結果

Claudin-2 ノックアウトマウスに TNF- $\alpha$  を投与した結果、ノックアウトマウスにおいて腸管での IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの発現が上昇するなど、炎症反応が野生株に比べ増強されることが分かった。更に、ノックアウトマウスの大腸組織の NF $\kappa$ B のシグナル伝達への影響を調べた結果、ノックアウトマウスでは NF- $\kappa$ B シグナル伝達が増強されていた。また、TJ の透過性に関与する myosin light chain kinase (MLCK) の発現もノックアウトマウスで増加していた。MLCK の発現増強は上皮細胞の透過性を上昇させることが知られており、claudin-2 ノックアウトマウスでの TNF- $\alpha$  に対する炎症反応の増強が MLCK を介している可能性が考えられた。そこで、Caco-2 細胞において siRNA にて claudin-2 の発現を抑制し TNF- $\alpha$  誘導性の炎症反応を誘導したところ、*in vivo* の結果と同様に、IL-6、IL-1 $\beta$  の発現がコントロールに比べ増強していた。この炎症反応の増強は、Caco-2 細胞に MLCK の阻害剤を投与し細胞を刺激すると消失したことから、炎症反応の増強は MLCK を介していることが示唆された。また Caco-2 細胞を MLCK 阻害剤の存在下と非存在下に TNF- $\alpha$  で刺激し上皮細胞の透過性を調べたところ、非存在下では透

過性が亢進したのに対し、存在下では透過性亢進は認められなかった。したがって、腸管で炎症が惹起された際、claudin-2 の発現が MLCK の発現を抑制し、過剰な透過性亢進が抑制され炎症反応が増強しない防御機構が存在する可能性が考えられた。その機能を更に検討するため、炎症性腸疾患のモデルとしてノックアウトマウスへ DSS 腸炎を誘導し腸炎の形質を調べたところ、予測された通り Claudin-2 ノックマウスでは腸炎の増悪が認められた。

#### D. 考察

Claudin-2 ノックアウトマウスでは TNF- $\alpha$  誘導性の炎症反応による NF- $\kappa$ B シグナル伝達と MLCK 発現が増強されることが示唆された。更に MLCK は上皮細胞の透過性を亢進させることが示唆され、MLCK を介し、Claudin-2 が腸管上皮における透過性を制御する機能があることが示唆された。

#### E. 結論

claudin-2 は MLCK 依存的に上皮の透過性を修飾することにより、大腸の炎症を制御している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表 1. 論文発表

Nishida M, Yoshida M, Nishiumi S, Furuse M, Azuma T. Claudin-2 regulates colorectal inflammation via myosin light chain kinase-dependent signaling. *Dis Dis Sci*, 58(6):1546-59, (2013)

#### 2. 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

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ことを目的とした。 $\gamma$ H2AX 発現を DNA 二重鎖切断 (double strand breaks: DSB) のマーカーに、 $\gamma$ H2AX と 53BP1 の共局在を DSB に対する修復応答 (DNA damage response: DDR) のマーカーとした。共局在は二重蛍光免疫染色法を用いた。UC の炎症粘膜では正常大腸粘膜に比べ高頻度に DSB が生じていた。DSB は炎症の活動性に相関していたが、UC の罹患年数には相関していなかった。炎症性発癌早期病変 (UC-III: dysplasia) は寛解期 UC 粘膜に比べ高頻度に DSB が生じていた。炎症性発癌病変では、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

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎 (以下 UC) 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が、慢性持続性炎症と発癌とを結びつけている分子メカニズムは解明されていない。

他方、近年、早期発癌過程における DNA 二重鎖切断 (double strand breaks: DSB) の重要性が報告されており、発癌過程では核内で DNA 損傷と DNA 損傷部の修復応答 (DNA damage response: DDR) がおきており、細胞の DNA 損傷が修復できない状態に陥ると癌化することが解明されている。DNA 損傷部位には ATM が動員され活性化し、活性化された ATM はヒストン蛋白である H2AX をリン酸化する ( $\gamma$ H2AX)。 $\gamma$ H2AX は 53BP1 と結合し DNA 損傷部の修

復を行うとされている。

本分担研究では、炎症性発癌の癌化メカニズムの解明のため、潰瘍性大腸炎粘膜及び発癌早期病変 (dysplasia) における DNA 損傷及び修復応答の意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

DSB の指標である  $\gamma$ H2AX 発現や 53BP1 との結合についてはこれまでホルマリン固定材料での検討はなされてきていない。本研究ではまず、ホルマリン固定材料での検討が可能かどうかについて炎症性腸疾患を合併しない大腸粘膜に発生した腫瘍性病変を用いて予備的検討を行い、次に UC の炎症粘膜および発癌早期病変 (dysplasia) を対象とした検討を行った。

DSB の検出には、 $\gamma$ H2AX モノクローナル抗体による免疫組織化学染色を用いた。 $\gamma$ H2AX と 53BP1 の結合については、 $\gamma$ H2AX および 53BP1 に対する二重蛍光免疫染色を行い、これらの核内共局在を指標として検討した。



ホルマリン固定外科切除を用いた。対象は、①炎症性腸疾患を合併しない大腸腫瘍（散発性腫瘍）：腺腫 63 病変、粘膜内癌 12 病変、SM 以深浸潤癌 53 病変、②正常大腸 50 症例、③非担癌 UC 大腸 104 例、担癌 UC 大腸 13 例、④UC に発生した UC-IV（浸潤癌）13 病変、UC-IV（粘膜内癌）41 病変、UC-III (dysplasia) 9 症例 11 病変、である。UC 粘膜は炎症時相を活動期、慢性活動期、寛解期に分けた。

#### （倫理面への配慮）

本研究はホルマリン固定パラフィンブロックを用いた研究であり、その結果が患者の治療方針や生命予後に影響するものではない。また、症例サンプルは全て匿名化し、患者情報との非連結化を行っている。

#### C. 研究結果

①炎症性腸疾患を合併しない通常の大腸腺腫と癌を用いた予備的検討では、ホルマリン固定材料でも免疫染色により  $\gamma$ H2AX 発現の同定が可能であった。 $\gamma$ H2AX の発現には、核内点状と核内びまん性の 2 つのパターンがあった。蛍光免疫染色標本の観察では、核内に点状に発現する  $\gamma$ H2AX は 53BP1 との共局在が確認されたが、びまん性発現する  $\gamma$ H2AX では 53BP1 との共局在はみられなかった。

②UC 粘膜を用いた DSB の検討では、(1)非担癌、担癌 UC 大腸いずれも、正常大腸に比べ  $\gamma$ H2AX 陽性陰窩の頻度が有意に高かった ( $p < 0.001$ )。 (2)UC 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 陽性陰窩の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なかった。 (4)非担癌 UC における UC 罹患年数と  $\gamma$ H2AX 陽性陰窩との間に有意な相関は見られなかった。 (5)dysplasia ではいずれも寛解期 UC 粘膜に比べ  $\gamma$ H2AX 陽性陰窩頻度は有意に高かった ( $p = 0.015$ )。

③炎症性発癌病変の DSB および DDR の検討では、

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。

④UC 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。

#### D. 考察

炎症性腸疾患を合併しない大腸腫瘍と癌を用いた予備的検討では、ホルマリン固定材料でも免疫組織学的で DSB の指標である  $\gamma$ H2AX の同定、蛍光免疫染色標本の観察で DDR の指標である 53BP1 との共局在の観察、が可能である。

正常大腸粘膜に比べ UC の慢性持続性炎症粘膜では  $\gamma$ H2AX が高発現していることから、慢性持続性炎症により DSB (DNA 二重鎖切断) が高頻度に生じていることが推定される。しかし、 $\gamma$ H2AX 陽性陰窩の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、活動性炎症の結果に過ぎない可能性も否定できない。他方、寛解期 UC 粘膜に比べ dysplasia では  $\gamma$ H2AX 陽性陰窩頻度が有意に高かったことから、DSB は発癌の必要条件の一つになっていることが示唆される。

腫瘍性病変の検討では、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

UCの炎症粘膜では高頻度にDNA二重鎖切断が起きており、発癌過程に関与していると考えられるが、発癌早期病変(UC-III:dysplasia)ではDNA損傷応答(DDR)は保たれており、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) Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Korita PV, Matsuda Y, Takamura M, Ohashi R, Nagahashi M, Ajioka Y, Hatakeyama K. Alteration of p53-binding protein 1 expression as a risk factor for local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* 38: 1227-1236, 2011
- 4) Watanabe T, Kobunai T, Ikeuchi H, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H.

RUNX3 copy number predicts the development of UC-associated colorectal cancer. *Int J Oncol*. 38: 201-207, 2011

- 5) Watanabe T, Ajioka Y, Matsumoto T, Tomotsugu N, Takebayashi T, Inoue E, Iizuka B, Igarashi M, Iwao Y, Ohtsuka K, Kudo SE, Kobayashi K, Sada M, Matsumoto T, Hirata I, Murakami K, Nagahori M, Watanabe K, Hida N, Ueno F, Tanaka S, Watanabe M, Hibi T. Target biopsy or step biopsy? Optimal surveillance for ulcerative colitis: a Japanese nationwide randomized controlled trial. *J Gastroenterol*. 46: 11-16, 2010
  - 6) 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
  - 7) 味岡洋一、横山純二. 潰瘍性大腸炎の病理形態学. *Progress in Medicine* 31: 13-16, 2011
  - 8) 味岡洋一. 大腸癌の組織発生と発育進展様式. *臨床外科*. 65: 16-21, 2010
- ### 2. 学会発表
- 1) Ajioka Y. Pathology of Colitic Cancer. The 2nd International Forum of the 96 Annual Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology. Niigata, 2010. 4. 23
  - 2) 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
  - 3) 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
  - 4) 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
  - 5) 味岡洋一. コアシンポジウム 2 炎症性腸疾

- 患: colitic cancer の診断と治療の進歩. 第 8 回消化管学会総会. 仙台, 2012. 2. 11
- 6) 味岡洋一. 特別企画内視鏡医のための病理セッション. 炎症性発癌の病理診断. 第 82 回日本消化器内視鏡学会. 福岡, 2011. 10. 22
- 7) 高林広明、味岡洋一、若井俊文. 大腸腫瘍の発育進展における、53BP1 を介した DNA 損傷修復応答の変化. 第 70 回日本癌学会. 名古屋, 2011. 10. 5
- 8) 須田和敬、味岡洋一. 特別企画シンポジウム—炎症性腸疾患からの発癌—潰瘍性大腸炎の発癌背景粘膜の粘液形質変化. 第 6 回日本消化管学会. 福岡, 2010. 2. 19
- 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

### 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が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注目し、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。

### C. 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。

マウスに腫瘍細胞を接種したところ Atoh1 発現腫瘍内が印環細胞様に形質転換し、抗がん剤耐性を獲得した。さらに野生型 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。さらに最も多く発現誘導する遺伝子を同定し、その機能解析を行っている。

#### 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。

### D. 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, 2012.
  - 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. *Dig Endosc.* 5:544-546, 2013.
  - 23) Araki A, Suzuki S, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Watanabe M: Modified single-operator method for double-balloon endoscopy. *Dig Endosc.* 24:470-474, 2012.
  - 24) 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.* 6:328, 2012.
  - 25) 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.* 57:3303-3308, 2012.
  - 26) 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.

- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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: 1288-1297, 2012.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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: 2524-2536, 2012.
- 35) Nemoto Y, Kanai T, Shinohara T, Ito T, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Lipp M, Eishi Y, Watanabe M: Luminal CD4+ T cells penetrate gut epithelial monolayers and egress from lamina propria to blood circulation. *Gastroenterology.* 141: 2130-2139, 2011.
- 36) Watanabe T, Ajioka Y, Matsumoto T, Tomotsugu N, Takebayashi T, Inoue E, Iizuka B, Igarashi M, Iwao Y, Ohtsuka K, Kudo SE, Kobayashi K, Sada M, Matsumoto T, Hirata I, Murakami K, Nagahori M, Watanabe K, Hida N, Ueno F, Tanaka S, Watanabe M, Hibi T: Target biopsy or step biopsy? Optimal surveillance for ulcerative colitis: a Japanese nationwide randomized controlled trial. *J Gastroenterol.* 46: 11-16, 2011.
- 37) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Ikeuchi H, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H: Predicting ulcerativecolitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. *Clin Colorectal Cancer.* 10: 134-141, 2011.
- 38) Watanabe T, Kobunai T, Ikeuchi H, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H: RUNX3 copy number predicts the development of UC-associated colorectal cancer. *International Journal of Oncology.* 38: 201-207, 2011.



- 39) Hyun SB, Kitazume Y, Nagahori M, Toriihara A, Fujii T, Tsuchiya K, Suzuki S, Okada E, Araki A, Naganuma M, Watanabe M: MR enterocolonography is useful for simultaneous evaluation of small and large intestinal lesions in Crohn's disease. *Inflam Bowel Dis.* 17: 1063-1072, 2011.
- 40) 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. *Inflam Bowel Dis.* 18: 17-24, 2011.
- 41) Naganuma M, Kunisaki R, Yoshimura N, Nagahori M, Yamamoto H, Kimura H, Sako M, Kawaguchi T, Takazoe M, Yamamoto S, Matsui T, Hibi T, Watanabe M: Conception and pregnancy outcome in women with inflammatory bowel disease: A multicentre study from Japan. *Journal of Crohn's and Colitis.* 5: 317-323, 2011.
- 42) Naganuma M, Watanabe M, Hibi T: The use of traditional and newer calcineurin inhibitors in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 46: 129-137, 2011.
- 43) Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe M: Suppression of *hath1* gene expression directly regulated by *hes1* via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflam Bowel Dis.* 11: 2251-2260, 2011.
- 44) D'Haens GR, Panaccione R, Higgins PD, Vermeire S, Gassull M, Chowers Y, Hanauer SB, Herfarth H, Hommes DW, Kamm M, Löfberg R, Quary A, Sands B, Sood A, Watermayer G, Lashner B, Lémann M, Plevy S, Reinisch W, Schreiber S, Siegel C, Targan S, Watanabe M, Feagan B, Sandborn WJ, Colombel JF, Travis S: The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD With the European Crohn's and Colitis Organization: When to Start, When to Stop, Which Drug to Choose, and How to Predict Response? *Am J Gastroenterol.* 106: 199-212, 2011.
- 45) Naganuma M, Watanabe M, Hibi T: Safety and usefulness of balloon endoscopy in Crohn's disease patients with postoperative ileal lesions. *J Crohns Colitis* 5: 73-74, 2011.
- 46) 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.* 46: 191-202, 2011.
- 47) Shinohara S, Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Totsuka T, Ikuta K, Watanabe M: Upregulated IL-7R $\alpha$  expression on colitogenic memory CD4+ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J Immunol.* 186: 2623-2632, 2011.
- 48) Kameyama K, Nemoto Y, Kanai T, Shinohara T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Totsuka T, Hibi T, Watanabe M: IL-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4(+) IL-7R $\alpha$  (high) memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol* 40: 2423-2436, 2011.
- 49) Akiyama J, Okamoto R, Iwasaki M, Zheng X, Yui S, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Delta-like 1 expression promotes goblet cell differentiation in Notch-inactivated human colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 393: 662-667, 2011.

## 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 bestrohin-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 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 D114 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) 永石宇司、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 月 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 月 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 月 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 月 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 月 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 月 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、岩崎美智子、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 後瘻炎回避にお

- 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) Watanabe M: Adult Stem Cell Therapy for Gastrointestinal Diseases. International Ulcer Week 2012. Tokyo, 2012年7月12日.
- 50) 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.
- 51) 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. Awajishima, 2012年6月1日.
- 52) 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. Awajishima, 2012年6月1日.
- 53) Watanabe M: Stem Cells. DDW2012. San Diego, 2012年5月22日.
- 54) 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.
- 55) 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.
- 56) 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.
- 57) 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.
- 58) 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.
- 59) 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