

博士論文

マウス潰瘍性大腸炎モデルにおける細胞接着分子 **CADM1** の
病理学的意義の解析

花岡(池田) 有紀

要旨

潰瘍性大腸炎の原因は未だ特定されておらず、近年ではその原因として腸管上皮再生機構の異常が注目されている。CADM1は上皮細胞間接着分子であり、上皮再生に関与することが報告されている。本研究ではDSS誘発潰瘍性大腸炎マウスモデルを用いて、潰瘍性大腸炎におけるCADM1の役割を検討した。*Cadm1*欠損マウスで有意な生存率の低下、腸管上皮と陰窩の再生遅延を認めた。また、野生型マウスの再生腸管上皮においてCADM1が一時的に高発現し、Akt/ β -cateninの核移行と相関することが示された。従って、CADM1が潰瘍性大腸炎の上皮再生を促進し、腸炎の遷延を抑制していることが示唆された。

序文

潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)はクローン病(Crohn's disease; CD)とともに炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease; IBD)に分類された慢性疾患であり、厚生労働省難治性疾患克服研究事業の特定疾患に指定されている。潰瘍性大腸炎は大腸に限局した慢性炎症性疾患であり、主に粘膜を侵し、しばしばびらんや潰瘍を形成する原因不明のびまん性非特異性炎症である[1]。その罹患者数は近年において世界中で上昇の一途であり、日本では毎年 8000 人ずつ増加し、2008 年には 10 万人を超えた(図 1)[2]。内科的治療にて寛解導入・維持、もしくは再燃を繰り返すことが頻回にあり、長期炎症における結腸直腸がんの合併率は経過年数 10 年までは 2%未満、10 年以上経過すると 5%前後まで上昇し、20 年以上では 10%以上であることが報告されている [3]。

潰瘍性大腸炎の原因について多くの研究が報告されており、遺伝学的要因、環境因子、免疫学的要因などがあげられている。

潰瘍性大腸炎の遺伝学的要因に関しては、まず双生児研究により一卵性双生児で 16%、二卵性双生児で 4%の一致率を認め[4]、家族内発症では同胞が罹患する相対危険度は 7-17 倍と算出され[5]、本症の発症には遺伝的要因が関与すると考えられてきた。近年では解析技術の革新的進歩により遺伝子の網羅的解析が可能となり、一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)をマーカーとしたゲノムワイド関連研究(genome-wide association study; GWAS)が行われ、*Human leukocyte antigen-D*

*related(HLA-DR)*遺伝子近傍[6]やサイトカインシグナル関連遺伝子である *Janus kinase 2(JAK2)*や*signal transducer and activator of transcription 3(STAT3)*[7]、*IL-10*[8]、腸管免疫に関与する *FCGR2A* や *SLC26A3*、*13q12*[9]などが潰瘍性大腸炎の原因遺伝子としてあげられているが、大部分は機能や発症機序における役割が十分に解明されておらず、また人種間のアレル頻度の違いから更なる解析が必要とされている。

環境因子に関しては、ここ半世紀の間に世界的に **IBD** 患者が増加し、しかも先進国であるほど増加していることから環境因子の関与が注目されてきた[10]。喫煙はクローン病罹患リスクおよび疾患重症度を増加させる一方で潰瘍性大腸炎は非喫煙者あるいは禁煙者において喫煙者と比較して罹患リスクが増大することが報告されている[11, 12]。NSAIDs の内服[13]や経口避妊薬[14]が腸炎を発症しやすいとか、早期離乳と相関する[15]、虫垂切除の既往と逆相関する[16, 17]なども報告されている。近代化に伴う衛生仮説[18]、すなわち上下水道の衛生環境の向上が自己免疫疾患やアレルギー疾患増加に寄与する説も挙げられている。食文化の欧米化に伴い、精製砂糖や牛乳、マーガリンや脂質の多い食事生活なども環境因子として疫学的研究が広く行われ続けているが、決定的な因子は特定されていない。

免疫学的要因に関しては、腸管臓器の部位別にあげていく。腸管の断面は管腔側から粘膜上皮、粘膜固有層、粘膜下層、筋層、漿膜に分けられ、潰瘍性大腸炎の病因は主に管腔内の腸内細菌叢、粘膜上皮のバリア機能や再生能、粘膜固有層における炎症細胞や上皮—粘膜固有相間の炎症性サイトカインによる影響が報告されて

いる(図 2)。

特に炎症細胞や炎症性サイトカインの制御不全の解明に関して免疫系を中心に多様な研究報告があり、その歴史は 20 年前、Mosmann らが提唱した CD4 陽性 T リンパ球における「T helper (Th)1/Th2 サイトカインバランス」仮説の提唱[19]から始まる。ヘルパーT細胞の分化を図 3 に示す[20]。従来は潰瘍性大腸炎の腸管局所で IL-13 や IL-5 の発現亢進が認められることから Th2 細胞による炎症が主体であると推定されていた[21, 22]。しかしさらに IL-17 や IL-22 といった Th17 細胞の産生する炎症性サイトカインの発現が確認されている[23, 24]ことから獲得免疫の観点では Th2 細胞と Th17 細胞が密接に絡み合っている可能性が出てきている。また、免疫寛容に重要な制御性 T 細胞も大腸炎を制御することが腸炎マウスモデルにて示されており病因としての関与が注目されている[25, 26]。近年では自然免疫との相互作用も報告されており肥満細胞が炎症性腸炎の増悪因子であること[27]、マクロファージ[28-30]や樹状細胞[31-33]が免疫寛容による恒常性維持に寄与していることが報告されている。

管腔内の細菌叢に関しては、免疫関連遺伝子である *IL-10* 欠損マウスや *TCR α* 欠損マウスなど多くの IBD モデルマウスは無菌環境下では腸炎を発症せず、腸内細菌の存在する環境へふたたび移すことで腸炎を発症することが知られている [34]。また、T-bet・Rag 二重欠損マウスは腸炎を自然発症するが、このマウスと野生型マウスを同一環境下で飼育すると野生型マウスも腸炎を発症したことが報告されて

いる[35]。このことから腸内細菌は炎症性腸疾患の免疫応答のトリガーとして注目されている。潰瘍性大腸炎は健常人と比較して *Bacteroidetes* の腸内細菌数が上昇していること[36, 37]、粘膜障害性のある *Fusobacterium varians* が存在すること[38, 39]などが報告されている。前述の衛生仮説とともにクローズアップされているが、潰瘍性大腸炎と腸内細菌の因果関係で統一した見解はまだ得られておらず、今後はメタゲノム解析などで今まで培養が困難であった未知の菌種も含めて更なる知見が集約されることが期待されている。

腸管上皮に関してはバリア機能と粘膜治癒が主な焦点となる。バリア機能もしくは粘膜治癒のどちらかに障害があれば、結果的に管腔内から粘膜固有層への病原体および抗原透過性が亢進し、炎症細胞の活性化を誘導する。バリア機能に関しては、健常状態において腸管上皮ではタイトジャンクションによって隣接する細胞同士が強固に結合しバリア機能を発揮する。一方、潰瘍性大腸炎においては Claudin-2 の発現上昇[40]、ミオシン軽鎖キナーゼの活性低下や Claudin-5,-8 の発現低下[41, 42]によるタイトジャンクション構造の弱体化が患者の検体において報告されている[43]。粘膜治癒に関しては、健常状態において腸炎後の粘膜上皮の早期回復が粘膜免疫の恒常性に寄与しており、粘膜上皮の回復能力の遅延が IBD 発症の病因となることが言われている[44, 45]。粘膜上皮の回復には2段階あり、第1の段階は損傷後の欠落した上皮面を残存上皮が被覆し、管腔面と粘膜下を隔てる物理的境界を再構築する過程である。第2の段階は第1段階で応急的に被覆した上皮細胞は数

的に不足していることから活発な細胞増殖を伴う上皮再生が行われる。正常時を上回る速度で細胞増殖が起き、この過程では組織学的に陰窩の再構築と細胞増殖を呈する再生上皮像とが一致する。ひとたび上皮が回復すると、再び本来の腸管上皮組織としての機能を取り戻す[44, 46]。上皮修復の第 1 段階を促進する分子として多くの因子が報告されている[47]。IL-2 や TGF- β などのサイトカインによる粘膜上皮細胞遊走能の上昇[48, 49]、FGF-4 (fibroblast growth factor 4)や GLP-2 (glucagon like peptide 2)、NF- κ B、HGF (hepatocyte growth factor)、EGF (epidermal growth factor)、KGF (keratinocyte growth factor)などの増殖因子による細胞分化や増殖促進[50-55]、胆汁塩[57]やポリアミン[58]による細胞増殖などが報告されている。また第 2 段階である細胞増殖には正常時における増殖・分化と同様に Wnt, Notch, BMP (bone morphogenetic protein)シグナルがかかると考えられている[59-62]。近年では腸炎後の腸管上皮再生・増殖に PI3K/ Akt/ β -catenin シグナルの関与も報告されている[63, 64]。また 2011 年に Jung や Sato らが大腸粘膜の初期培養に成功しており[65]、大腸粘膜再生の更なる解明にもつながりつつあり、新規治療としての再生医療技術として注目されている[66]。

慢性炎症性腸疾患における細胞接着分子の関与としては、E-cadherin の発現異常が報告されている[56]。正常腸管上皮においては E-cadherin は α -catenin と複合体を形成することで細胞接着や細胞増殖による消化管粘膜修復に寄与し、病原体や抗原の侵入を妨げているが、慢性炎症性腸疾患患者では潰瘍部位の E-cadherin、

α -catenin の発現が低下していることが免疫組織染色 [143] や *in situ* hybridization [144] にて示され、炎症性腸疾患の潰瘍形成に E-cadherin- α -catenin 複合体の発現低下が関与していることが報告されている。従って細胞接着分子が慢性炎症性腸疾患の抑制に関与する可能性が考えられた。

当研究室で同定した細胞接着分子 CADM1 (cell adhesion molecule 1) に関して説明する。CADM1 遺伝子は染色体 11q23.2 に位置し、ヌードマウス皮下の腫瘍原性の抑制を指標に機能的相補法を用いて非小細胞肺癌のがん抑制遺伝子として同定された、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分野をコードする遺伝子である [67]。CADM1 はこの CADM1 遺伝子にコードされた 442 アミノ酸から成るタンパク質であり、細胞外領域に V 型、C2 型、C2 型の 3 つの免疫グロブリン様ループをもち、1 つの膜貫通領域と細胞内領域に Protein 4.1 結合モチーフと PDZ 結合モチーフをもつ一回膜貫通型の糖タンパク質である (図 4A) [68]。

CADM1 はリンパ球を除くほぼ全ての臓器で mRNA の発現が認められ、特に脳、肺、腎、精巣で強い発現が認められる [69]。詳細には肺胞上皮細胞 [70] や胆管上皮細胞 [71]、膵島細胞 [72] のような上皮細胞、あるいは神経 [73]、精原細胞 [74]、樹状細胞 [75]、肥満細胞 [76]、T 細胞 [77] のような非上皮細胞に発現していることが報告されている。よって多くの機能が報告されており、tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) [67]、synaptic cell adhesion molecule 1 (SynCAM1) [73]、supermatogenic immunoglobulin superfamily (SgIGSF) [78]、nectin-like molecule-2

(Necl2)[79]、immunoglobulin superfamily 4A (IgSF4A)[80]と様々な名前を持っていたことから 2006 年 7 月に *CADM1* に統一された。

2002 年から 2007 年頃に各研究グループがそれぞれに *CADM1* の機能を報告している。当研究室では肺癌において染色体の *CADM1* 遺伝子にヘテロ接合体の欠失がみられ、*CADM1* が非小細胞肺癌の腫瘍抑制因子であることを同定した[67]。他にも鼻咽頭がん[81, 82]、食道がん[83]、胃がん[84]、肝細胞がん[85]、膵がん[86]、乳がん[87, 88]、子宮頸がん[89-91]、前立腺がん[92]、髄膜腫[93]などで原発性腫瘍あるいは培養細胞における *CADM1* 遺伝子の発現欠如や遺伝子プロモーター領域のメチル化が見いだされ、がん抑制遺伝子であることが報告されている。

CADM1 はがん抑制遺伝子であること以外にも多様な病態への関与が示唆されている。*CADM1* 欠損マウスは精子形成障害により雄性不妊を引き起こすこと[106]、自閉症の傾向があることが報告されている[94]。また、*CADM1* が神経シナプス間隙の前膜・後膜に発現してホモフィリックに結合してシナプス特異的接着分子として機能していることが報告されている[73]。*CADM1* が発現する肥満細胞が腹膜に接着することで惹起される腹膜炎[95]や神経線維と接着して惹起されるアトピー性皮膚炎[96]、気管支平滑筋と接着して惹起される気管支喘息が報告されている[97]。樹状細胞に発現する *CADM1* が NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞に発現する CRTAM (class- I -restricted T cell-associated molecule) と結合することで NK 細胞の細胞傷害活性と CD8+T 細胞の IFN- γ の分泌を引き起こすこと[98, 99]などが報告されている。

上皮細胞に関しては、細胞側面において **CADM1** はホモ二量体を形成し、隣接細胞のホモ二量体とトランス結合をすることにより細胞間接着に働く [68](図 4B)。**CADM1** は細胞内領域の2つのタンパク質結合モチーフのうちの1つである **Protein 4.1** 結合モチーフを介して **DAL-1/ Protein 4.1B** や **Protein 4.1N** と結合し[100]、スペクトリン・アクチン結合ドメインを介してアクチン細胞骨格と相互作用する[101]。もう一つのタンパク質結合モチーフである **PDZ** 結合モチーフは **C** 末端に存在し、細胞の極性形成に関わる膜結合性グアニレートキナーゼ群(membrane-associated guanylate kinase homologue: **MAGuKs**)に属する **MPP3**、**CASK**、**Pals2**、**syntenin** などが結合する[73, 79, 102]。

これまでに **CADM1** は胆管上皮において再生や発生に関与することが示唆されている[71]。再生過程においては、ラットの肝臓切除後の再生肝臓での **CADM1** タンパク質の発現上昇が一時的に認められることをウェスタンブロット法にて示し、再生部位で胆管上皮細胞の幹細胞といわれている **Oval cell** に **CADM1** の発現が一時的に発現することを蛍光免疫染色を用いて示している。また肝硬変患者の肝臓組織でも再生部位においては **CADM1** 発現が蛍光免疫染色にて認められた。発生過程においては胎生マウスの肝臓の **CADM1** タンパク質発現が一時的に上昇することをウェスタンブロット法にて示し、胎生マウスやヒト胎児の胆管上皮細胞の細胞膜に **CADM1** の発現が一時的に認められることを蛍光免疫染色にて示している。以上のことから胆管上皮細胞では再生過程と発生過程において細胞側壁に一時的に

CADM1 が発現することで胆管上皮の発生や再生を促進すると考えられた。

大腸においては結腸直腸がんにおける *CADM1* 遺伝子のメチル化による発現低下が悪性度と相関することが報告されているが[103, 104]、腸炎に関する報告はまだない。しかし *CADM1* の炎症細胞への関与や上皮細胞の接着や再生といった多様な機能から、慢性炎症性疾患である潰瘍性大腸炎との関与が考えられた。

潰瘍性大腸炎における *CADM1* の役割として、潰瘍性大腸炎を増悪もしくは抑制する因子としての両方が考えられた(図 5)。

CADM1 は CD8+細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞の細胞膜上に発現する IgCAM である CRTAM(Class I -restricted T-cell-associated molecule)のリガンドと考えられており、*CADM1* と CRTAM の結合が CD8+細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞の活性化を促進し、細胞傷害性炎症を惹起することが報告されている[75, 98, 99, 105]。また、*CADM1* は T 細胞の細胞膜に発現することが近年報告されており、*CADM1* が何らかの機構で T 細胞受容体のリン酸化を促し T 細胞の活性を上昇することが示唆されている[77]。従って、炎症増悪における *CADM1* の役割として以下の 4 つが考えられた。①粘膜固有層の樹状細胞に発現する *CADM1* が CD8+細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞に発現する CRTAM と結合する。②T 細胞(制御性 T 細胞以外)に発現する *CADM1* と樹状細胞に発現する *CADM1* がホモトランス結合を形成する。③粘膜上皮に発現する *CADM1* と粘膜上皮内リンパ球としての CD8+細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞に発現する CRTAM と結合する。④粘膜上皮と樹状細胞に発現する *CADM1*

がホモトランス結合を形成する。以上の結果、CADM1 が樹状細胞、CD8+細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞の一部もしくは全ての活性化を促進し、炎症が増悪することが考えられた。

一方、炎症抑制における CADM1 の役割として以下の 3 つが考えられた。①制御性 T 細胞に発現する CADM1 と樹状細胞に発現している CADM1 がホモトランス結合を形成する。②粘膜上皮に発現する CADM1 がホモトランス結合を形成しバリア機能を強化する。③CADM1 が粘膜上皮の再生時に発現し、再生を促進する。以上の結果、CADM1 が炎症抑制に働くことが考えられた。

そこで本研究では、DSS (dextran sulfate sodium)誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスと潰瘍性大腸炎の病理検体を用いて、潰瘍性大腸炎における CADM1 の役割を明らかにすることを旨とした。DSS 誘発腸炎マウスでは *Cadm1* 欠損マウスの方で重症な症状が認められ、腸管粘膜上皮・陰窩の再生の遅れが認められた。炎症後の腸管粘膜の陰窩上皮に CADM1 が一時的に発現することを見出し、腸管上皮の再生を促進することで腸炎の遷延を抑制することを示唆した。

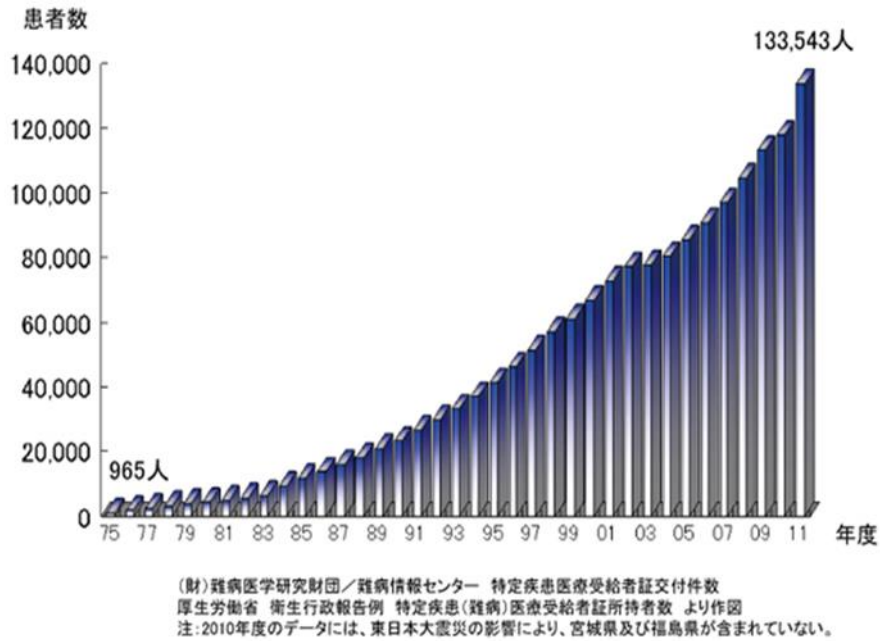


図 1. 潰瘍性大腸炎の年度別国内患者者数の推移

潰瘍性大腸炎の罹患者数は年間約 8000 人ずつ増加している。(2011 年度厚生労働省衛生行政報告例より)

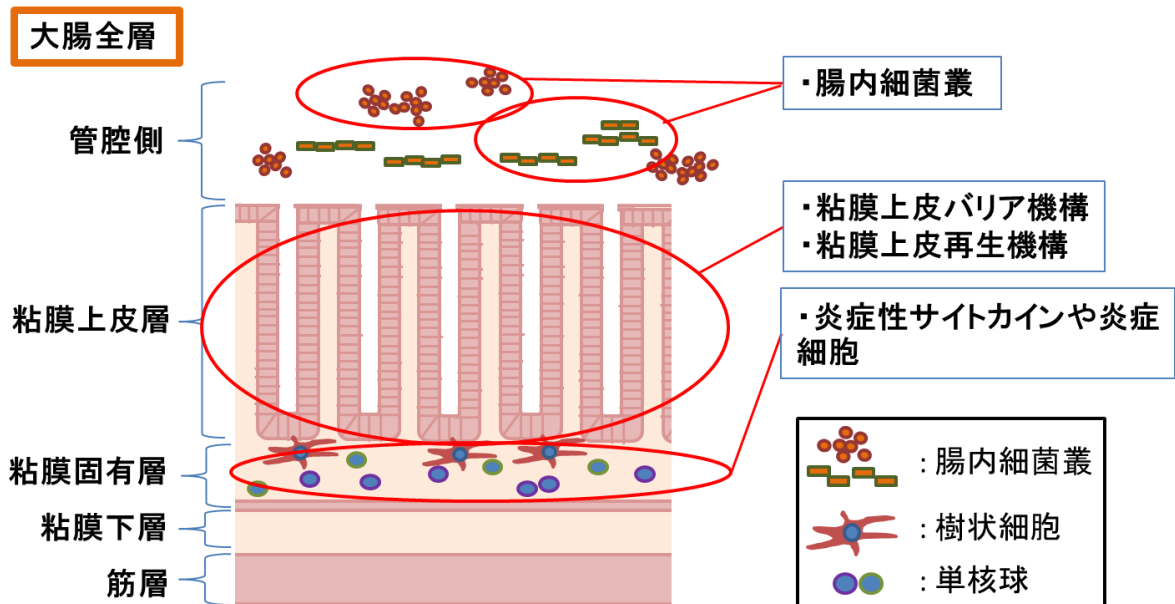


図 2. 潰瘍性大腸炎の免疫学的要因

大腸の断面図。潰瘍性大腸炎の病因の部位別提示

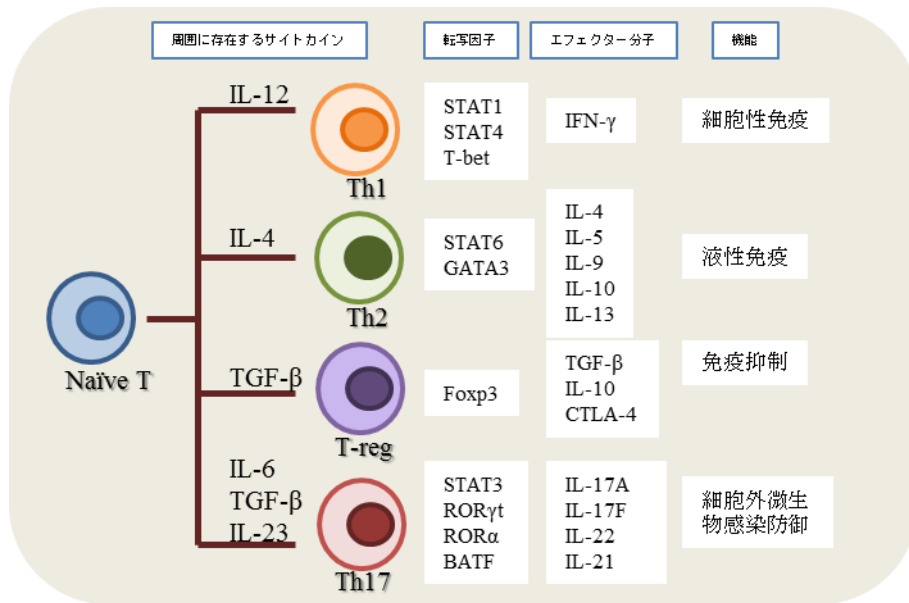
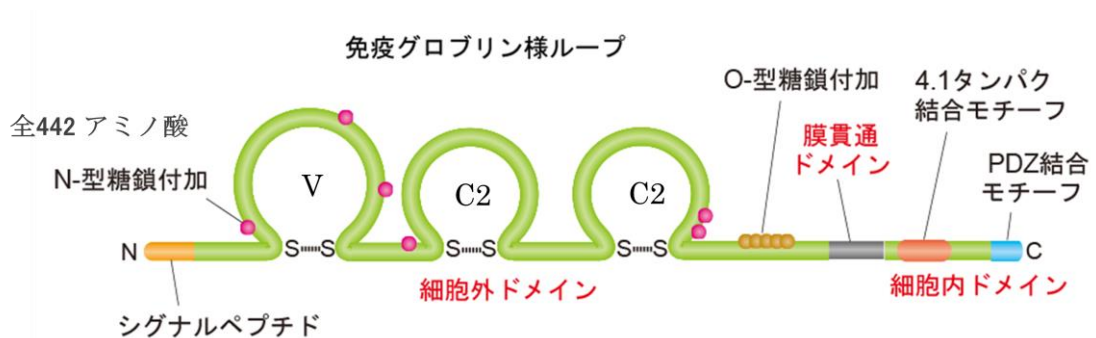


図 3. ヘルパーT細胞分化

胸線で分化したナイーブ CD4+細胞は、末梢で抗原提示を受けると同時に周囲のサイトカイン刺激によって機能の異なる Th 細胞へと分化する。それぞれの分化に必要な転写因子と、分化後に産生するエフェクター分子、そして機能を示した。

A



B

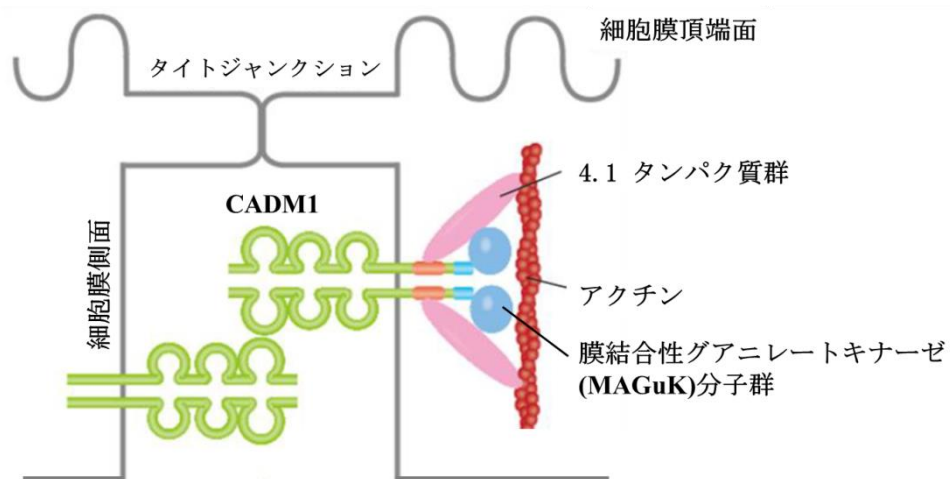


図 4. CADM1 分子の構造と上皮細胞における発現部位

A) CADM1 分子は免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子群 (IgCAMs) に属する。V: variable type 免疫グロブリンループ、C2: constant type 免疫グロブリンループ

B) CADM1 は上皮細胞では細胞膜側面に発現し、それぞれホモ二量体を形成して隣接細胞のホモ二量体とトランス結合する。細胞内では、アクチン結合タンパク質である 4.1 タンパク質群や、細胞の極性形成に関わる膜結合性グアニレート (MAGuK) 分子群と結合する。

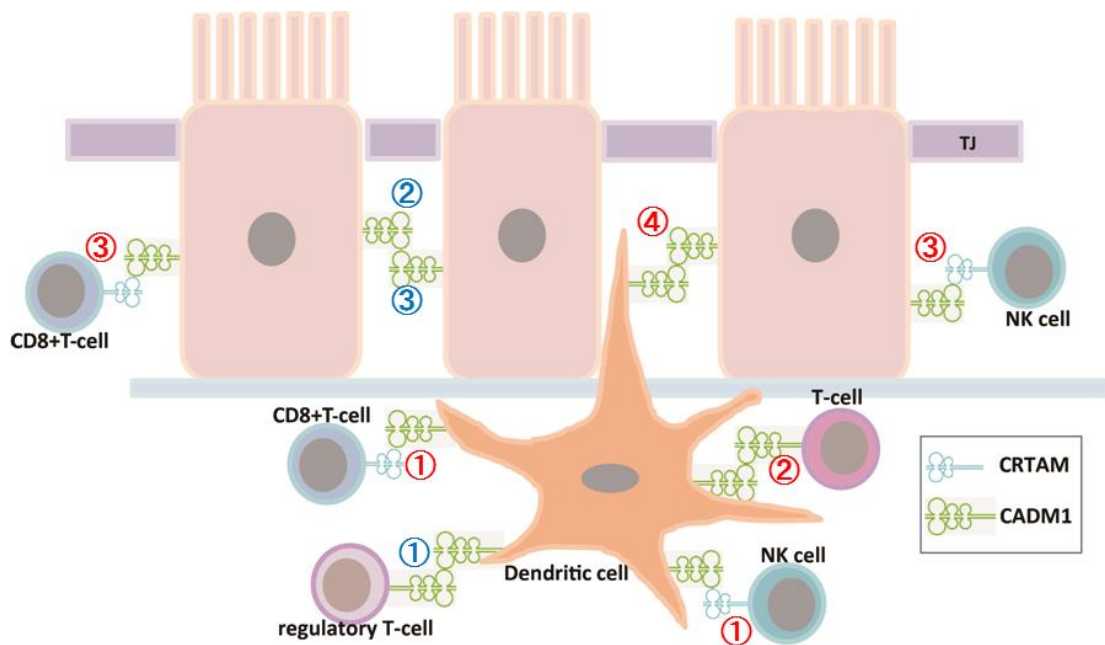


図 5. 潰瘍性大腸炎において予想されるCADM1の関与

炎症増悪説：①粘膜固有層の樹状細胞に発現する CADM1 が CD8+細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞に発現する CRTAM と結合する。②T 細胞(制御性 T 細胞以外)に発現する CADM1 と樹状細胞に発現する CADM1 がホモトランス結合を形成する。③粘膜上皮に発現する CADM1 と粘膜上皮内リンパ球としての CD8+細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞に発現する CRTAM と結合する。④粘膜上皮と樹状細胞に発現する CADM1 がホモトランス結合を形成する。以上の結果、CADM1 が樹状細胞、CD8+細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞の一部もしくは全ての活性化を促進し、炎症が増悪する。

炎症抑制説：①制御性 T 細胞に発現する CADM1 と樹状細胞に発現している CADM1 がホモトランス結合を形成する。②粘膜上皮に発現する CADM1 がホモトランス結合を形成しバリア機能を強化する。③CADM1 が粘膜上皮の再生時に発現し、再生を促進する。以上の結果、CADM1 が炎症抑制に働く。

材料と方法

培養細胞

CADM1 タンパク質を発現していないヒト大腸がん細胞株である HCT116 細胞と HT29 細胞は ATCC(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション) (Manassas, VA, USA)より購入し、McCoy's 5a (GIBCO by Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)に 10% FBS (BioWest, Nuaille, France)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を加えた培地にて培養した。細胞は CO₂ 濃度 5% の湿潤したインキュベーター(三洋電機, 東京, 日本) で 37°C にて培養した。

Cadm1 遺伝子欠損マウスの作製

Yamada らによる所属研究室の先行研究によって、*Cadm1* 遺伝子のエクソン 1 を欠損させることにより、コンベンショナル・*Cadm1* 遺伝子欠損マウスが作製された[106]。このマウスは C57BL/6J 系統と 129Sv 系統が 3:1 に交雑された遺伝子背景を有していたが、この後さらに、計 10 回 C57BL/6J マウスと交配させることで、C57BL/6J 系統にバッククロスを行った。10 回のバッククロスが終了した時点で、得られた *Cadm1* ヘテロ欠損マウスの第 1~19 染色体、及び X 染色体上について、各染色体につき 2 ヶ所ずつ、計 40 ヶ所のマイクロサテライトを PCR にて解析し、全てのマイクロサテライトの長さが C57BL/6J 系統のものと同じになっていることを確認した。マイクロサテライトの選出には Mouse Microsatellite Data Base of

Japan(MMDBJ; 国立遺伝学研究所、三島、日本) を用い、C57BL/6J 系統と 129Sv 系統とで長さの異なるマイクロサテライトを選出した。そして、10 回のバッククロスが終了した *Cadm1* ヘテロ欠損マウス同士を交配させることにより、*Cadm1* ホモ欠損マウス (*Cadm1*^{-/-} マウス)、*Cadm1* ヘテロ欠損マウス(*Cadm1*^{+/-} マウス)、野生型マウス(*Cadm1*^{+/+} マウス) を 1:2:1 の比率で得ることができ、自家繁殖させてコロニーを作った。全てのマウスは東京大学医科学研究所の動物センター内にて、動物センターの基準に従って飼育した。

マウスの交配と遺伝子型の決定

交配は*Cadm1*ヘテロマウス同士で行ない、自家繁殖させた。遺伝子型の決定は、離乳時に採取した尾または耳から抽出したDNAを用いたPCR法により行った。

DNAの抽出にはアルカリ溶解法を用いた。アルカリ抽出法は、マウステール約3 mm を50 mM NaOH 180 μ l 95 $^{\circ}$ にて10分間溶解した後、1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20 μ lを添加し、12000 rpm 10分間遠心してDNAを含む上清を採取する方法である。PCR反応に用いたプライマーは、野生型対立遺伝子の検出には

5'-TCCCTGTTTGTTCGCCGCTTATCAG-3'

と'-TGGCCCCTTCTAAGAAATACCCTC-3'を用い、ノックアウト対立遺伝子の検出には5'-TGCGAGGCCAGAGGCCACTTGTGTAGC-3'と

5'-CCCAATAAGTCTCATAGAAGTACTGATTGTC-3'を用いた。PCR反応にはHigh

Performance DNA Polymerase KOD FX Neo (TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、反応の条件は、変性は98°Cで1秒、アニーリングは62°Cで5秒、伸長反応は72°Cで30秒、これを35サイクル繰り返した。これらの動物実験は東京大学の動物実験ガイドラインに従っている。

抗体

免疫染色、FACS 法およびウェスタン・ブロット法に使用する抗体は以下より入手した。Abcam 社 (Cambridge, UK) よりウサギ・モノクローナル抗 Ki-67 抗体(SP6)、BD Biosciences 社 (San Jose, CA) よりマウス・モノクローナル抗 β -Catenin 抗体(14/Beta-Catenin)とラット・モノクローナル抗 CD11b 抗体(M1/70)と FITC 標識ハムスター・モノクローナル抗 CD3 ϵ 抗体(145-2C11)と FITC 標識ハムスター・モノクローナル抗 CD11c 抗体(HL3)、Cell Signaling Technology 社 (Danvers, MA, USA)よりウサギ・ポリクローナル抗 Cleaved Caspase-3 抗体、Santa Cruz 社 (CA, USA) よりヤギ・ポリクローナル抗 c-Kit (M-14) 抗体、Merck 社 (Darmstadt, Germany) よりマウス・モノクローナル抗 GAPDH 抗体(6C5)とウサギ・ポリクローナル抗リン酸化 AKT (Thr308) 抗体を購入した。ウサギ・ポリクローナル抗体である抗 CADM1 抗体 (それぞれ C18 と CC3)を使用した。この抗体は CADM1 の C 末端の 18 ペプチドをハプテン、keyhole limpet hemocyanin (KLH) を用いて、ウサギに対して免疫し、抗体は affinity column (C18 は MBL 社, Nagoya, Japan、CC3 は BioGate 社, Yamagata,

Japan) で精製して作製した[107]。CADM1 の N 末端の第 2 ループを認識するチキン・モノクローナル抗 CADM1 抗体(3E1)は伊藤彰彦教授(近畿大学医学部病理学講座)より分けていただいた。二次抗体として、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Millipore, Billerica, MA, USA) と HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Millipore)、LSAB2[®] System-HRP、EnVision[™] Labelled Polymer Peroxidase (Dako, Glostrup, Denmark)、Cy3 標識抗チキン抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Rural PA, USA)、Alexa Fluor[®] 488 標識抗マウス抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、Alexa Fluor[®] 488 標識抗ヤギ抗体 (Invitrogen)を使用した。

プラスミド

CADM1 遺伝子を強制発現させるために、*CADM1* 遺伝子の全長 cDNA を組み入れた哺乳類用発現ベクター pcDNA3.1-Hygro(+)-*CADM1*-full tag(-)を使用し[67]、そのコントロールベクターとして pcDNA3.1-Hygro(+)を使用した。TCF 結合配列を持つホタルルシフェラーゼレポータープラスミドとして pTCF-BP-Luc ベクターを使用し、その Tcf-motif に変異を導入した pTCF-MT-Luc ベクターをネガティブコントロールとして使用した。ウミシイタケルシフェラーゼ内部標準プラスミドとして pRL-TK ベクターを Promega 社 (Tokyo, Japan)より購入した。

ルシフェラーゼアッセイ

HCT116 細胞と HT29 細胞を 12 well 細胞培養プレートに 4×10^5 cells/well の密度で播種し、一晩培養した後、Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) を用いて下記のプラスミドをトランスフェクションした。HCT116 細胞の場合は 1.424 μ g の pcDNA3.1-Hygro(+)-CADM1-full tag(-)ベクターもしくは pcDNA3.1-Hygro(+)ベクターおよび 0.16 μ g の TCF-BP-Luc ベクターもしくは TCF-MT-Luc ベクターおよび 0.016 μ g の pRL-TK ベクターを導入し、HT29 細胞の場合は 1.104 μ g の pcDNA3.1-Hygro(+)-CADM1-full tag(-)ベクターもしくは pcDNA3.1-Hygro(+)ベクターおよび 0.48 μ g の TCF-BP-Luc ベクターもしくは TCF-MT-Luc ベクターおよび 0.016 μ g の pRL-TK ベクターを導入した。4 時間後に培地を交換し、さらに 20 時間培養した後、掻き取った細胞を Passive Lysis Buffer (Promega) に溶解した。ルシフェラーゼ活性の測定は、発光試薬 Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) およびルミノメーターLumat LB9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) を用いてホタルルシフェラーゼの活性値をウミシイタケルシフェラーゼの活性値で補正した値である Relative luciferase activity によってプロモーター活性を比較した。以上の実験は各 3 回ずつ行い、平均値で比較した。

ヒト組織サンプル

東京大学医科学研究所附属病院外科にて採取された潰瘍性大腸炎患者の大腸手

術検体16検体(平均年齢：45歳、年齢範囲：22-75歳、男性：10名、女性：6名、採取部位：上行結腸2名、横行結腸1名、下行結腸2名、S状結腸7名、直腸2名、部位不明2名)を解析に使用した。本研究に対して東京大学医科学研究所倫理委員会にて審査承認[承認番号：25-13-0705]を得た上で、患者から検体の研究使用への同意を得られている既存の検体の組織切片(厚さ3 μm の薄切切片を作製)を東京大学医科学研究所附属病院検査部病理室より得た。

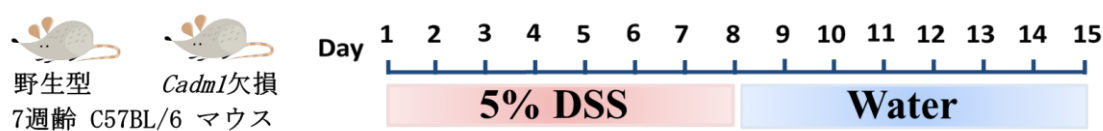
仔マウス組織サンプル

胎生14日マウスは妊娠14日目マウスを日本SLCより購入し、二酸化炭素下での安楽死させた後に胎生14日マウスを得た。出生1日目(出産日当日)から7日目マウスはそれぞれの日にちに安楽死させ、出生7日目以外のマウスは速やかに10% 中性緩衝ホルマリン液 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)にて固定し、固定後は正中より半分に裁断し、断面部が薄切面になるようパラフィンプロックを作製した。出生7日マウスは腸管のみ単離して10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、パラフィンプロックを作製した。パラフィンプロックから3 μm の薄切切片を作製して免疫組織染色に使用した。

デキストラン硫酸ナトリウム腸炎誘発モデルマウス作成と症状・病理組織学的評価

デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)は硫酸多糖体の一種であり、経口投与させることで大腸に局限した腸炎を惹起する[108]。特に肛門から連続して左側結腸に顕著に認められ[109]、炎症性細胞浸潤、陰窩膿瘍、びらん、潰瘍形成などのヒトの潰瘍性大腸炎に近い組織像を示し[108]、潰瘍性大腸炎モデルに多用されている。しかし、その炎症が大腸に局限して生じる機序についてはDSSの上皮細胞に対する直接的な作用や腸内細菌叢に対する影響[110]、さらに各種サイトカインの関与[111]などが報告されているがいまだに不明である。

7週齢の*Cadm1*欠損マウスと野生型マウスに5% (wt/vol) DSS (5 kDa: Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 水溶液を自由飲水にて7日間投与して急性腸炎を起こさせ、その後DSSを含まない水を7日間投与して回復期を観察した (図6)。これまで報告された論文において用いられたDSSの濃度は1.5%から5%まで多岐にわたっており、厳密に固定されたものではないが、この場合の5%DSS 7日間投与は潰瘍性大腸炎の急性腸炎を想定している[112, 113]。



解析

・ Disease activity index (DAI) ・ 生存率 ・ 病理所見 ・ タンパク発現 等

図 6. DSS 腸炎誘発モデルのプロトコール

7週齢の *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスに 5% DSS を 7 日間投与した後に、DSS を含まない水を 7 日間投与した。初日を day 1 とし、最終日は day 15 とした。それぞれを DAI や生存率、組織像、タンパク発現などで比較解析した。

マウスはDisease Activity Index (DAI) をもとに腸炎症状を毎日評価した。DAIとはCooperらが提唱したDSS腸炎症状の評価方法で、体重減少率、便の性状、血便の強さから構成されている [114, 115]。DAIの内訳を表1に示す。体重減少率が、[1% 未満 : 0、1% 以上5% 未満 : 1、5% 以上10% 未満 : 2、10% 以上15% 未満 : 3、15% 以上 : 4]、便の性状が、[下痢なし : 0、軟便 : 2、水様便 : 4]、血便の強さが、[血便なし : 0、中等度もしくは肛門に少量付着あり : 2、新鮮血便もしくは肛門出血あり : 4]とし、3つの項目の和でスコア化している。

表 1. Disease Activity Index (DAI)の内訳

DAIは体重減少、便の性状、血便の強さをスコア化し、総和で求める。

スコア	体重減少 (%)	便の性状	血便
0	なし	正常	正常
1	1-5		
2	5-10	軟便	血便+ 肛門少量出血
3	10-15		
4	>15	水様便	血便+++ 肛門出血

マウスは安楽死させた上で、マウスから大腸を単離し、余分な腸間膜や血管をトリミングし、腸管内の残渣をPBSにて洗浄した。長軸方向に切開し、10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した後、回盲部位と小腸接合部(上行結腸)から肛門部位までを3分割にしたものをパラフィンブロックに作製した。もしくは長軸方向に切開し、

回盲部位と小腸接合部(上行結腸)から肛門部位までを3分割にしたものを-20℃下でO.C.T. Compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) にて固定し凍結ブロックを作製した。パラフィンブロックから3 μmの薄切切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色し、小腸接合部(上行結腸)から肛門までの範囲についてDSS誘発腸炎の病理組織学的評価を行った。病理組織学的評価はWilliamsらが提唱したDSS腸炎病理組織評価基準で行った [116]。総腸炎スコア (total colitis score) は炎症重症度 (inflammation severity score)、炎症深達度 (inflammation extent score)、陰窩損傷度 (crypt damage score)の平均で算出される。炎症重症度が、[なし：0、軽度：1、中等度：2、重度：3]、炎症深達度は炎症細胞が、[認められない：0、粘膜固有層までに認められる：1、粘膜下層にまで認められる：2、筋層にまで達している：3]、陰窩損傷度は陰窩の損傷が、[なし：0、下1/3が損傷：1、下2/3が損傷：2、全て損傷しているが表層の上皮は残存：3、陰窩も表層の上皮も消失：4]としてスコア化する。それぞれの病変が全長に対して占める割合、[0%：0、1%以上25%未満：1、25%以上50%未満：2、50%以上75%未満：3、75%以上100%未満：4]との掛け算で各スコアを算出し、それらの平均を総腸炎スコアとした。

DSS誘発腸炎による病理所見は肛門より連続に認められるため、他の病理診断は肛門から炎症が認められる範囲(全長のおよそ1/3から2/3である)を観察し、定量においては野生型マウスと*Cadm1*欠損マウスで同様の上皮部位を比較検討した。

マウス血清中サイトカイン測定

マウスの屠殺の際、下大静脈より全血採血し、室温で15分安置した後に24°C 3000 rpm 10分間遠心し、上清の血清を採取した。血清は解析を行うまで-80°Cで保存した。血清中のサイトカインはVERITAS社 (Tokyo, Japan) のProcarta[®] Cytokine Assay Kitを使用して測定した。サイトカインはIL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-23p19、IFN- γ 、TGF- β 、TNF- α を計測した。サイトカインを認識する抗体付きビーズと血清サンプルを混合し反応させた後、ビオチン標識した検出用抗体を添加し、さらにPE標識のストレプトアビジンを添加して蛍光強度をLuminex[®] (BIO-RAD, Hercules, CA) にて測定し血清中のサイトカイン量を測定した。

マウス大腸腸管上皮細胞・粘膜固有層内単核細胞単離法

Nature Protocolを参考として大腸における粘膜固有層内単核細胞ならびに上皮細胞を単離した。単離方法を図7に示す[117]。マウスから大腸を単離し、余分な腸間膜や血管をトリミングし、腸管内の残渣をPBSにて洗浄した。長軸方向に切開し、1cm長に切り分け、PBSの入った4枚のシャーレに順に入れ、さらに洗浄した。それらを5ml Predigestion Solution (1 \times HBSS (Invitrogen), 5mM EDTA (Dojindo, Kumamoto, Japan), 1mM DTT (Sigma, St. Louis, MO)) に入れ37°C 20分間加温した。溶解液を茶こしでこし、残ったものを5ml Predigestion Solutionに入れさらに37°C 20

分間加温した。溶解液を茶こしでこし、残った腸管を1mm長に切断し、PBSで洗浄した。それらを1ml digestion solution (500 μ g collagenase D (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) +500 μ g DNase (SIGMA) +3mg dispase (Roche Diagnostics))に入れ37 $^{\circ}$ C 20分間加温した。ピペッティングしたのち、茶こしにてこし、こされた溶液を回収し、茶こしに残った方を、新たな1ml digestion solutionに入れ37 $^{\circ}$ C 20分間加温した。ピペッティングしたのち、茶こしにてこし、こされた溶液を回収し、茶こしに残った方をまた更に1ml digestion solutionに入れ37 $^{\circ}$ C 20分間加温した。ピペッティングしたのち、茶こしにてこし、こされた溶液は回収し、こされた溶液をすべて集めて20 $^{\circ}$ C 500 \times g 10分間遠心した。沈殿したペレットをFACS Buffer (FBSをPBSで2%に希釈) で溶かし、20 $^{\circ}$ C 500 \times g 10分間遠心した。上清を捨て、pelletを40%パーコール液(GE healthcare Bio-sciences AB, Uppsala, Sweden: RPMIで希釈)8mlに溶かし、80%パーコール液 (PBSで希釈) 4mlをパスツールで底から入れ、20 $^{\circ}$ C 1000 \times g 20分間遠心した。その際、粘膜固有層内単核細胞は40%/80%パーコールの境目に白いリング状に観察される。(topは腸管上皮細胞、bottomは死細胞などである) topの腸管上皮細胞を回収し、mRNAを採取した。Bottomをパスツールで回収し、残った中間層にPBSを加え、20 $^{\circ}$ C 500 \times g 10分間遠心し、pelletを取り出すことで粘膜固有層内単核細胞を単離した。

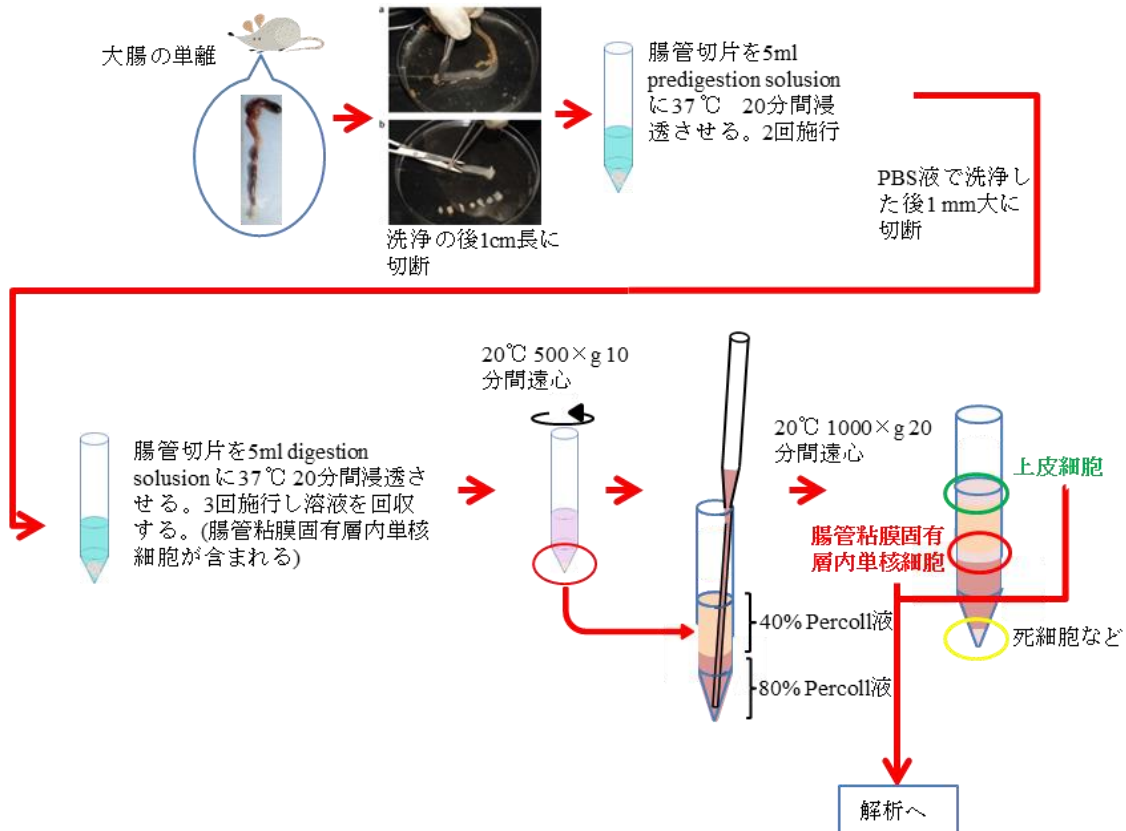


図 7. マウス 大腸粘膜固有層の単核細胞の単離方法

マウスから大腸を切除し、トリミングと洗浄したのち、1cm大に切り分ける。EDTA,DTT,collagenaseを使用し、37°Cで消化し、得られた溶液を遠心して沈殿物を回収する。沈殿物を40%パーコール液 (RPMIで希釈) に溶かし、80%パーコール液 (PBSで希釈) と重層を作成し、遠心分離する。単核細胞は40%/80%パーコールの境目に分離される。(topは上皮細胞、bottomは死細胞など) 中間層を取り出して洗浄し、解析や培養に使用する。(マウス1匹あたり、小腸は $2-3 \times 10^7$ 個、大腸は $2-3 \times 10^6$ 個の単核細胞が採取可能)

FACS解析

大腸粘膜固有層中単核細胞を前述のとおり調製 (必要量は1回の解析につき $2-3 \times 10^6$ 個) し、室温 $300 \times g$ で5分遠心した。細胞の遠心・洗浄をFACS buffer (2% FCS/PBS溶液) で2回行った後、 $2-3 \times 10^6$ 個/mlとなるようFACS bufferで希釈し、1.5mlを解析に用いた。一次抗体は単核細胞 3×10^6 個に対して抗CADM1抗体 (3E1)を

0.69 μ g、抗CD3 ϵ 抗体を1.5-0.15 μ g、ネガティブコントロールのチキンIgY (Promega) を3E1と同様の0.69 μ g添加し、4 $^{\circ}$ Cで20 - 40分反応させた。FACS bufferで2回洗浄と室温 300 \times g で5分遠心を行った後に十分量の二次抗体を添加した。単核細胞 3×10^6 個に対して抗CADM1抗体とチキンIgYにFITC標識抗チキンIgY抗体を3-0.3 μ g添加して4 $^{\circ}$ Cで20 - 40分反応させた。抗CD3 ϵ 抗体はFITCが標識されているものを用いた。2% FCS buffer で2回洗浄・遠心した後、0.5-1mlのFACS buffer で懸濁(1×10^7 個/ml)し、死細胞染色のためにPropidium Iodide (Wako Pure Chemical Industries) を1000~2000倍希釈で加えて氷中保存し2時間以内にFACS解析を行った。FACS解析はFACS Aria (BD Biosciences) を使用した。

免疫蛍光二重染色

凍結ブロックから3 μ mの凍結薄切切片を作製し、使用時までには-20 $^{\circ}$ Cにて保存した。使用時は切片を室温にて風乾させた後、アセトンで4 $^{\circ}$ C、5分間固定し、PBSで3回洗浄した。洗浄後、2% BSA/PBSで室温、10分間ブロッキングし、1次抗体は2% BSA/PBSで100倍希釈した抗CADM1抗体 (3E1) と250倍希釈した抗CD11b抗体の混合物もしくは100倍希釈した抗CADM1抗体 (3E1) のみの溶液で室温、1時間反応させた。PBSで3回洗浄した後、PBSで300倍希釈したCy3標識抗チキンIgY抗体を室温、45分間反応させた。PBSで3回洗浄した後、ProLong $^{\circ}$ Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen) にて封入した。蛍光観察にはAxio Vision蛍光顕微鏡 (Zeiss, Jena,

Germany)を用いた。

免疫組織化学染色

薄切切片は脱パラフィン処理した後、pH 6.0クエン酸緩衝液に浸してオートクレーブで121℃、10分間処理して抗原を賦活化した。室温に戻した後、3%過酸化水素水/H₂Oに室温で10分間浸して内因性ペルオキシダーゼを除去した。次に非特異的反応を抑制するために、2%ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) / PBS を加え、室温で30分間反応させた。一次抗体は2%BSA/PBS を溶媒とし、それぞれ、抗CADM1 抗体 (CC3) は1:1000、抗β-Catenin 抗体は 1:100、抗c-Kit抗体は1:300、抗Ki-67抗体は1:50の濃度で希釈し、4℃ で一晩反応させた。二次抗体はHRP 標識抗ウサギIgG 抗体をPBSにて1:300の濃度に希釈、もしくはEnVision™ Labelled Polymer Peroxidase (Dako) を滴下、もしくはAlexa Fluor® 488標識抗マウスIgG抗体をPBSにて1:300の濃度に希釈し4℃で2時間反応させた。抗Ki-67抗体の二次抗体はLSAB法を使用した。Dako社のLSAB2® System-HRPキットのBiotinylated linkを室温で15分間反応させた後、洗浄後にStreptavidin-HRPを室温で15分間反応させた。洗浄後に抗CADM1 抗体と抗β-Catenin 抗体と抗Ki-67抗体に反応させた検体はLiquid DAB diluted Mix Buffered Substrate (DAKO) で発色させた。最後に、ヘマトキシリンで対比染色を行い、透徹し、マリノールで封入し、Olympus BX40で検鏡した。肛門側より大腸陰窩ごとにKi-67陽性細胞を計測し、大腸陰窩の上皮細胞500細胞に

におけるKi-67陽性細胞の割合を算出した。抗c-Kit抗体に反応させた検体はProLong®

Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen) にて封入した。蛍光観察にはAxio

Vision蛍光顕微鏡 (Zeiss, Jena, Germany) を用いた。

抗 cleaved caspase-3 抗体の免疫組織染色に関しては、薄切切片を脱パラフィン処理した後、0.3%過酸化水素水/メタノールに浸して室温で 30 分間させ、内因性ペルオキシダーゼを除去した。pH 8.0 の 1 mM EDTA 溶液に浸して圧力鍋で 120°C、10 分処理して賦活化した。その後、圧力鍋からステンレス容器ごととりだし、室温で 30 分安置した。一次抗体は 2%BSA/PBS を溶媒とし、抗 cleaved caspase-3 抗体を 1:200 の濃度で希釈し、4°C で一晩反応させた。洗浄した後二次抗体は EnVision™ Labelled Polymer Peroxidase を滴下し、室温で 1 時間反応させた。洗浄後に Liquid DAB diluted Mix Buffered Substrate (DAKO) で発色させた。最後に、ヘマトキシリンで対比染色を行い、透徹し、マリノールで封入し、Olympus BX40 で検鏡した。200 倍で 5 視野をランダムに観察し、1 視野辺りの cleaved caspase-3 陽性細胞数の平均で陽性細胞を評価した。

Alcian blue 染色

Alcian blue 染色は生体に存在する酸性ムコ多糖物質を検出する方法として最も広く用いられており [118]、マウスの肥満細胞の同定にも使用されている [96, 119]。

薄切切片は脱パラフィン処理した後、Alcian blue buffer [0.1M NaH₂PO₄ · 2H₂O, HCl

(pH 0.4) に 3 分間浸し、その後 Alcian blue 染色液 [1% Alcian blue 8GX (Sigma)/Alcian blue buffer] に 1 時間浸した。再度 Alcian blue buffer に浸した後、流水水洗 10 分間を行い、ケルンエヒトロート (MUTO PURE CHEMICALS, Tokyo, Japan) に 5 分間浸して核染色を行った。流水水洗を 1 分間行った後、透徹し、マリノールで封入した。

ウェスタンブロット法

タンパク質を抽出するため、homogenize buffer (250 mM sucrose, 5 mM Hepes-NaOH (pH 7.2), 1 mM EDTA) にプロテアーゼ阻害剤混合物 (2 μ M 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, 0.1 μ M leupeptin, 0.01 μ M pepstatin A) を加え、マウス組織を磨砕溶解した。溶解したサンプルは 4°C 600 \times g で 10 分間遠心し、上清を回収した。回収した細胞溶解物に 1% Triton X-100 を加え、氷上にて 30 分安置した。その後 4°C、15000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清は Bio-Rad 社の protein assay reagent を用いてタンパク定量を行い、4 \times SDS loading buffer (0.2 M Tris-HCl [pH 6.8], 20% glycerol, 2% SDS, 20% β -Mercaptoethanol [β -ME], 0.2% BPB) と純水で 2-5 mg / ml となるよう調整し、95°C で 10 分間煮沸し、氷上で 10 分間静置し、各ウェスタンブロット用の試料を得た。SDS-PAGE ゲルは 10% acrylamide: bis Separating gel を用いた。SDS-PAGE electrodebuffer (25mM Tris / 0.2M Glycine / 0.1% SDS) にて定電流 15 mA で約 15 分、続いて定電流 45mA で約 80 分間泳

動した。ブロッティングはSEMI-DRY法を用いて、SEMI-DRY transfer buffer (50 mM Tris / 40 mM, Glycine / 20% methanol / 0.1% SDS) に浸したPVDF膜へ、定電流150 mAで60分間ブロットし、次に5% スキムミルク/PBSTを加えて、室温で60分間ブロッキングを行ない、その後、一次抗体を反応させた。一次抗体は、5% スキムミルク / PBSTを用いて、抗CADM1抗体(C18)は1:1000で、抗GAPDH抗体は1:40000の濃度で希釈し、4℃で一晩反応させた。二次抗体は、それぞれの動物種の horse raddish peroxidase (HRP) 標識抗 IgG 抗体を5% スキムミルク/PBST にて 1:1000 の濃度に希釈して、室温で 60 分反応させ、PBSTで洗浄した。検出は、GE Health-care 社の ECL™ Western Blotting Detection Reagentを用いた。現像後のPVDF膜は、Amide Blackにて染色した。

RT-PCR

mRNA は推奨のプロトコールに従って RNeasy Mini kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いてマウス組織から抽出した。抽出した total RNA は直ちに Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) を用いて cDNA に逆転写した。PCR の酵素には KOD FX (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用し、プライマーはそれぞれ、*Cadm1* の検出には 5'- CTCATTCGGACTATATGCTGTATGTAT-3' 及び 5'- CCTCCTTCTGCATTGATTATAGCTGTG-3' (PCR 産物は 368 bp)、対照の *Gapdh* の検出には 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' 及び

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (PCR 産物は 452 bp) を使用した。反応の条件は、変性は 98°C で 10 秒、アニーリングは 55°C で 30 秒、伸長反応は 68°C で 30 秒、これを 30 サイクル繰り返した。PCR 産物は 1% アガロースゲルで電気泳動しエチジウムブロマイドで染色した。

腸管上皮透過性試験

FITC-dextran (Sigma) を Milli-Q 水に 25mg/ml (0.1ml 辺り 2.5 mg) となるよう溶解した。マウス 1 匹あたりの体重を測定し、FITC-dextran を 6mg/マウス体重 10g となるよう薬液を調整した。経口ゾンデを使用し、経食道的に胃に投与した。4 時間後に屠殺して下大静脈より全採血し、血清を抽出した後、FLUO star OPTIMA (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) で蛍光測定し、血清中の FITC-dextran 濃度を測定した。

統計学的解析

潰瘍性大腸炎の腸管陰窩における CADM1 の発現の変化と β -Catenin の核濃染との関連の解析には Mann-Whitney U test を用いた。デキストラン硫酸塩腸炎誘発モデルマウスの生存曲線には Kaplan-Meier 法 Log-rank test を用いた。そのほかの解析には Student's t-test を用いた。全ての解析において $p < 0.05$ の時、有意差ありと判定した。統計解析ソフトには、SigmaPlot 11 (HULINKS, Tokyo, Japan) を使用した。

結果

1. *Cadm1* 欠損マウスの方が DSS 誘発腸炎の症状が重症化する

野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスの腸管における表現形態はヘマトキシリン・エオジン染色の結果、差は認められなかった。また、当研究室において野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスを通常飼育で 18 か月間まで観察した結果、大腸を含む消化管においては野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで表現形態に違いは認められなかった。従って、腸管の表現形態は野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで大きな差はないと考えられた。

7 週齢 *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスに 7 日間 5% DSS を投与して急性腸炎を誘発させたところ、回復期の day 8 以降において *Cadm1* 欠損マウスの死亡率の有意な低下が認められた (図 8A)。症状の重症度を測る Disease Activity Index (DAI) では *Cadm1* 欠損マウスが day 5 から day 10、day 14、day 15 において野生型マウスよりも有意に高値であり、重症度が高いことが明らかとなった (図 8B)。

野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスとの DSS 誘発腸炎による表現形態の違いや *Cadm1* 欠損マウスの死因を特定するため *Cadm1* 欠損マウスの死亡率が高い day 8 から day 10 における *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、胃、小腸、大腸(大腸においては後述する)や血清生化学を比較検討した。

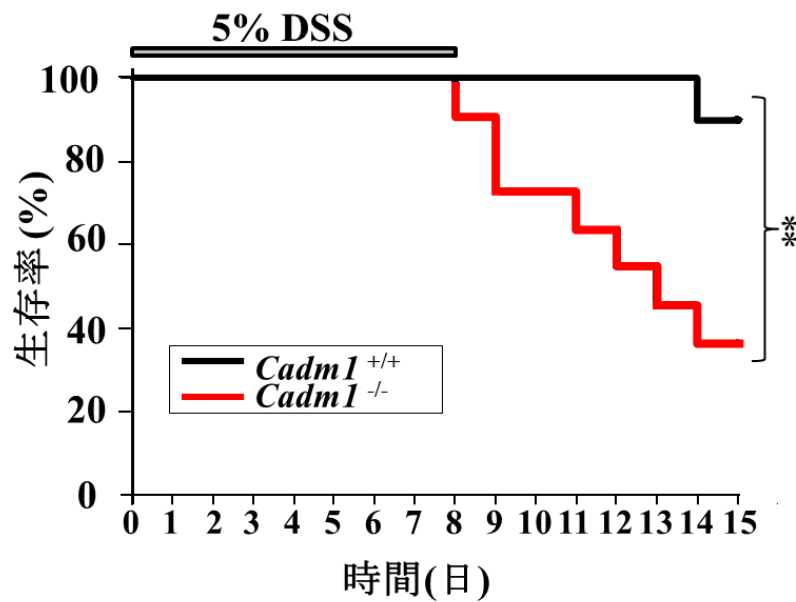
脳、肺、心臓、腎臓、胃、小腸では表現形態に有意な差は認められなかったが、肝臓、脾臓にて *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスで異なる所見が認められた (図

9)。肝臓 (図 9A) については *Cadm1* 欠損マウスで中心静脈周囲の肝細胞の淡明化、脂肪変性が目立つ。これは死亡直前の循環障害、あるいは低酸素状態、虚血状態などを示唆する所見である。脾臓 (図 9B) については *Cadm1* 欠損マウスでは脾臓内の造血細胞において、血球貪食像が認められた(野生型マウス : 7 匹中 1 匹、*Cadm1* 欠損マウス : 10 匹中 7 匹) (図 9B-b)。また、野生型マウスは白脾髄が保たれているが (7 匹中 6 匹) が *Cadm1* 欠損マウスは白脾髄が保たれず **Burn out** した状態が 10 匹中 9 匹認められた。以上の所見より、*Cadm1* 欠損マウスにおいては、最終的に全身性に急性炎症反応を起こす傾向が強いと考えられた。これらの状況が死亡の原因であるのか結果なのかは不明だが、最終的に *Cadm1* 欠損マウスにおいて全身に炎症が波及する傾向にあることが分かった。

血清生化学 (表 2) では DSS 誘発腸炎を惹起したマウスは *Cadm1* 欠損マウスも野生型マウスも低栄養、脱水になる傾向があるが、特に *Cadm1* 欠損マウスの Y-155 (day 9), I-13 (day 8) では総タンパク量の著明な低下、BUN の高値が見られた。採血時に day 8、day 9 の *Cadm1* 欠損マウスの下大静脈は著明な虚脱傾向であったことから循環血液量の低下が考えられた。よって *Cadm1* 欠損マウス死因の一つとして DSS 誘発腸炎をきっかけとした低栄養、脱水も考えられた。

以上より *Cadm1* 欠損マウスの方が野生型マウスと比較して DSS 誘発腸炎がより重症化することが判明した。

A



B

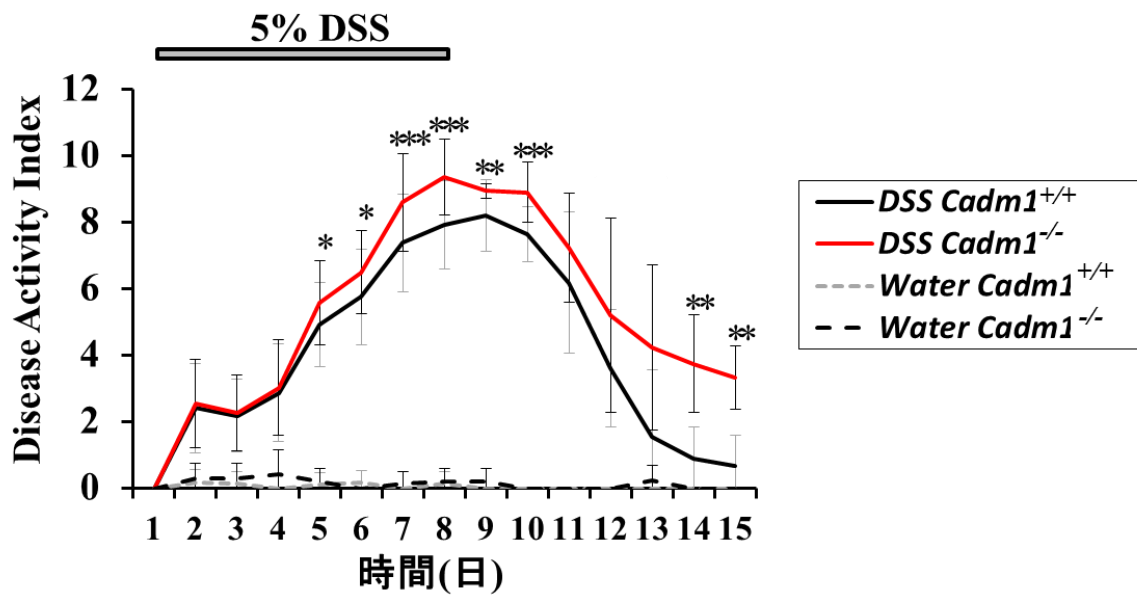


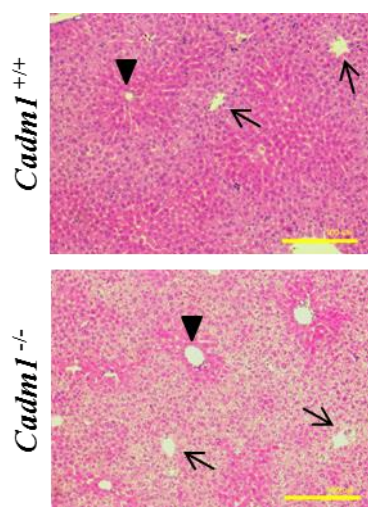
図 8. *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの DSS 誘発腸炎の生存率と Disease Activity Index の比較

A) DSS 誘発腸炎マウスの生存率。 *Cadm1* 欠損マウスの生存率が day 8 以降で有意に低下しており、day 15 での生存率は 36.4%であった。野生型マウス: n=10、 *Cadm1* 欠損マウス: n=11。 **, $p < 0.01$ ($p = 0.009$)

B) Disease Activity Index の推移。 day 5 から day 10、 day 14、 day 15 で *Cadm1* 欠損マ

ウスの有意な高値を認める。エラーバー：標準偏差 * , $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$

A



B

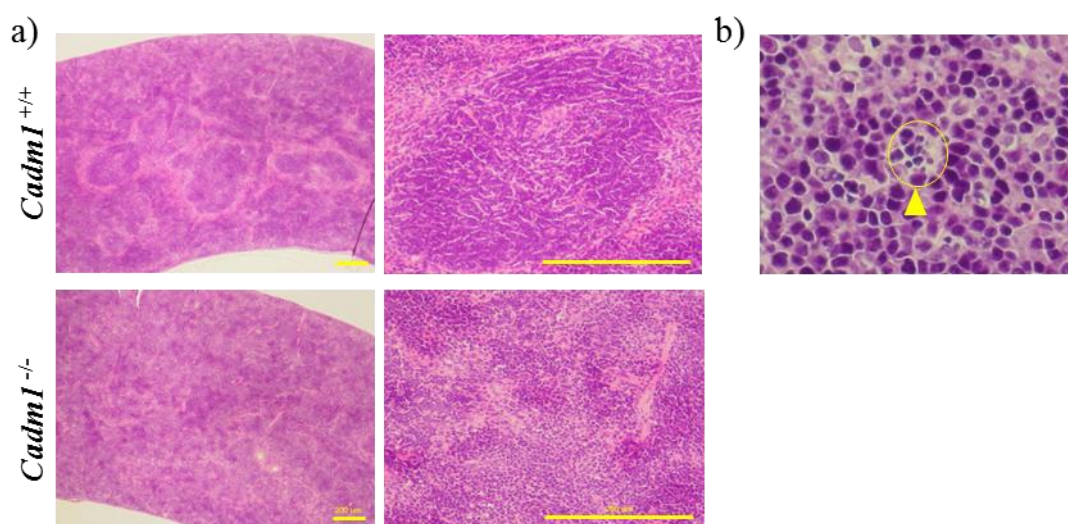


図 9. *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの DSS 誘発腸炎の病理組織学的比較(肝臓・脾臓)

DSS 誘発腸炎マウスの肝臓 (A) と脾臓(B)の切片のヘマトキシリン・エオジン染色。

A) 肝臓:野生型に比べて *Cadm1* 欠損マウスの方で中心静脈周囲の肝細胞の淡明化、脂肪変性が目立つ。スケールバー:200 μ m (上段:野生型マウス、下段: *Cadm1* 欠損マウス、矢印:中心静脈、矢頭:グリソン鞘)

B) a) 脾臓:野生型マウスは白脾髄が保たれているが *Cadm1* 欠損マウスは白脾髄が保たれず Burn out した状態が目立つ。スケールバー:200 μ m (上段:野生型マウス、下段: *Cadm1* 欠損マウス) b) *Cadm1* 欠損マウスに認められた貪食細胞が造血細胞を貪食する像 (黄矢頭)。

表 2. *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの DSS 誘発腸炎の血清生化学の比較
 基準値は 6 週齢 ICR mouse の値(長浜ライフサイエンスラボラトリーより提供)を参考とした。TP: total protein (総タンパク)、ALB: albmin (アルブミン)、BUN: blood urea nitrogen (血中尿素窒素)、CRE: creatinine (クレアチニン)の略であり、TP と ALB は栄養状態を、BUN と CRE は腎機能を示すが、BUN/CRE の値が高値であると脱水傾向を示唆する。 基準値より低値は青、高値は赤で示す。

サンプルNo		TP(g/dL)	ALB(g/dL)	BUN(mg/dL)	CRE(mg/dL)
normal ICR mouse	6 week	4.7-5.7	2.8-3.5	16.2-26.4	0.08-0.12
Y-16	WT day 9	4.8	2.4	25.0	0.15
Y-122	WT day 9	4.2	2.4	37.6	0.15
Y-143	WT day 9	3.9	2.3	25.1	0.10
I-196	WT day 8	4.0	2.4	30.3	0.17
I-301	WT day 8	4.1	2.3	28.0	0.15
I-304	WT day 8	3.8	2.4	30.6	0.17
Y-17	WT day 1	4.6	3.2	25.6	0.11
Y-20	WT day 1	5.4	3.5	28.4	0.10
I-199	WT day 1	5.0	3.3	26.8	0.13
Y-130	KO day 9	4.3	2.5	35.8	0.10
Y-133	KO day 9	4.0	2.4	45.0	0.12
Y-155	KO day 9	2.8	1.8 \geq	89.8	0.20
I-13	KO day 8	2.4	1.5	99.1	0.10
I-111	KO day 8	3.5	2.1	33.8	0.11
I-149	KO day 8	4.2	2.4	26.0	0.14
Y-148	KO day 1	4.8	3.1	24.6	0.10
Y-152	KO day 1	4.6	2.8	23.2	0.10
Mc-243	KO day 1	4.5	3.1	21.9	0.13

2. DSS 誘発腸炎において CADM1 は腸管上皮の再生に関与する

潰瘍性大腸炎における CADM1 の役割として、CADM1 が発現する炎症細胞を介した炎症制御、もしくは腸管上皮細胞のバリア機能や上皮再生を促進することによる炎症抑制が考えられた。

はじめに CADM1 が炎症細胞を介した炎症制御に関与するかを検討した。*Cadm1* 欠損マウスの方が野生型マウスと比較して DSS 誘発腸炎がより重症化するという結果から、CADM1 は制御性 T 細胞など炎症を制御する機構に関与することが考え

られた。そこで DSS 誘発腸炎による全身における炎症性サイトカインの変化を血清を用いて検出した。

血清サイトカインは、炎症性サイトカイン 10 項目(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-23p19、IFN- γ 、TGF- β 、TNF- α)を Procarta Immunoassay Kit (VERITAS 社)を使用して計測した(図 10)。それぞれのサイトカインは Th1 系(IFN- γ 、IL-12p70)、Th2 系(IL-4、IL-10)、T-reg 系(IL-10、TGF- β)、Th17 系(IL-6、IL-23p19、TGF- β)、T 細胞活性(IL-2)、早期炎症/自然免疫(TNF- α 、IL-1 β)、の指標となっている(図 3)[20]。

自然免疫はマクロファージが主に担っている。自然免疫で分泌が上がる IL-1 β 、IL-6 が day 8 において *Cadm1* 欠損マウスで有意に高く、制御性 T 細胞が分泌し炎症抑制に関わる IL-10、TGF- β が day 4 において *Cadm1* 欠損マウスで有意に低値であることが分かった。他のサイトカインに明らかな有意差は認められなかった。これらの結果から CADM1 は制御性 T 細胞による炎症制御のサイトカイン分泌に関与している可能性と、マクロファージによる自然免疫に関与する可能性が考えられた。

次に、野生型マウスより腸管粘膜固有層の単核細胞を採取し、CADM1 が発現する細胞を FACS を用いて解析した(図 11)。FITC 陽性細胞の側方散乱光(side scatter: SSC-A)、前方散乱光(forward scatter: FSC-A)の分布より、CADM1 陽性細胞の分布(図 11-a)は T リンパ球全般のマーカーである CD3 陽性細胞の分布(図 11-b)とは大きく異なり、CADM1 陽性細胞は細胞表面積が大きく、且つ顆粒を含む構造を持つ細胞であることが判明した。従って CADM1 は腸管粘膜固有層の単核細胞のうち、T リ

ンパ球には発現していないことが示唆された

単離した腸管粘膜固有層の単核細胞は主にリンパ球、形質細胞、樹状細胞、マクロファージ、肥満細胞が含まれている[27, 120]。よって CADM1 陽性の顆粒球として肥満細胞、樹状細胞が考えられ、また CADM1 が発現しているとの報告はないがマクロファージの可能性も考た。そこで、DSS 誘発腸炎 day 8 の野生型マウスの大腸凍結切片を使用して蛍光免疫二重染色や免疫組織化学染色を行い、CADM1 陽性細胞の同定を試みた(図 12)。抗 CADM1 抗体(3E1)と樹状細胞を認識する抗 CD11c 抗体(図 12A)やマクロファージを認識する抗 CD11b 抗体(図 12B)で共局在がみられるか検討したところ、共局在は認められなかった。また、DSS 誘発腸炎のマウス大腸における肥満細胞をアルシアンブルー、抗 c-kit 抗体を用いて染色した結果(図 12C)、肛門には肥満細胞の存在が認められたが、大腸のびらん部位には認められなかった。また、腸管粘膜固有層の単核細胞と腸管上皮から mRNA を抽出し、RT-PCR を行った結果、腸管上皮には *Cadm1* の発現が認められたが、腸管粘膜固有層の単核細胞には発現がほぼ認められなかった(図 13)。mRNA レベルでの CADM1 発現が腸管粘膜固有層の単核細胞にほぼ認められないことから、DSS 誘発腸炎マウスモデルにおいて CADM1 は炎症細胞を介した炎症制御には関与しないと考えられた。

次に CADM1 の腸管上皮への関与を検討した。まず DSS 投与した *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの大腸の病理切片を比較した(図 14)。ヘマトキシリン・エオジン染色の結果、day 1 (DSS 投与前)から day 5 までは *Cadm1* 欠損マウスと野生型マ

ウスとで炎症細胞浸潤や上皮びらんなどの DSS 誘発腸炎における表現形態に有意な差は認められなかった。しかし、day 8 以降では野生型マウスの腸管上皮再生が経時的に認められるのに対し、*Cadm1* 欠損マウスでは継時的な陰窩の再生が少数であり、腸管上皮再生の遅延が考えられた (図 14A)。Williams らが提唱した DSS 腸炎病理組織評価基準でスコア化すると(図 14B)、総腸炎スコア(total colitis score)では day 10 において *Cadm1* 欠損マウスの腸炎が有意に強いことが示された。その内訳として、炎症重症度(inflammation severity score)、炎症深達度(inflammation extent score)の 2 項目では *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスとで有意な差は認められず、陰窩損傷度(crypt damage score)で day 8、day 10 において *Cadm1* 欠損マウスが有意に高値であることが原因であることが判明した。よって DSS 誘発腸炎が *Cadm1* 欠損マウスで重症化する要因として、腸管上皮の再生の遅延が考えられ、CADM1 は腸管上皮の再生に関与する可能性が考えられた。

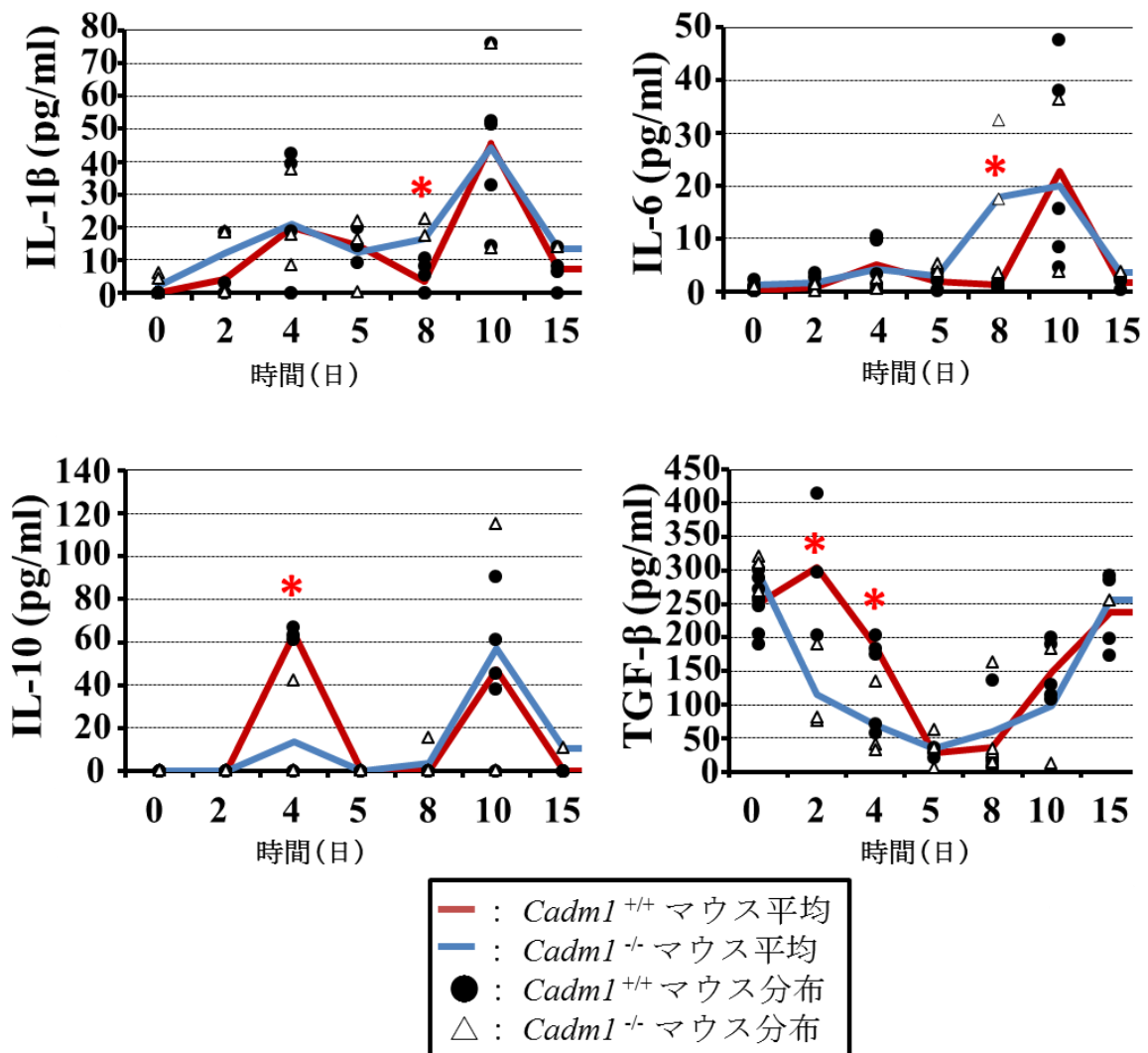
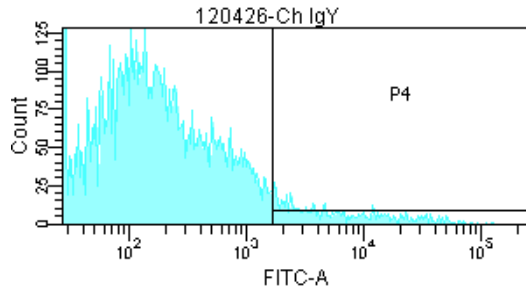


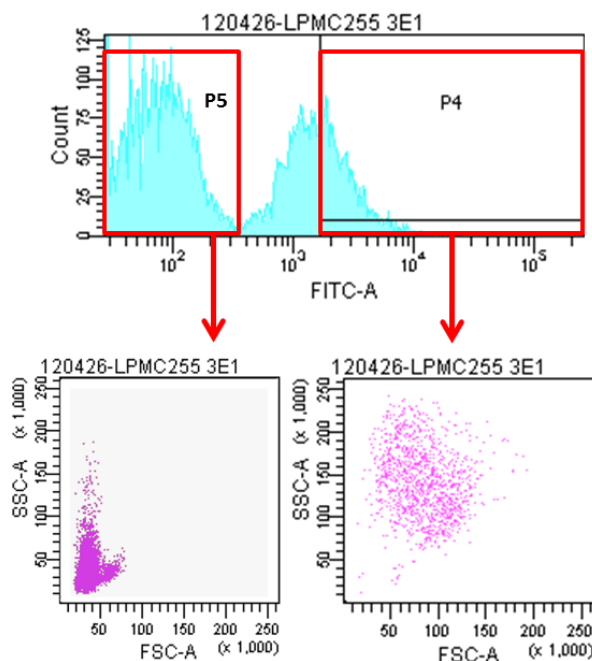
図 10. *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの DSS 誘発腸炎による血清サイトカインの推移の比較

腸炎誘発 *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの血清について、炎症性サイトカイン 10 項目(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-12p70、IL-23p19、IFN- γ 、TGF- β 、TNF- α)を Procarta Immunoassay Kit (VERITAS 社)を使用して計測した。これらのサイトカインは Th1 系(IFN- γ 、IL-12p70)、Th2 系(IL-4、IL-10)、T-reg 系(IL-10、TGF- β)、Th17 系(IL-6、IL-23p19、TGF- β)、T 細胞活性(IL-2)、早期炎症/自然免疫(TNF- α 、IL-1 β)の指標となる(図 3 参照)ここには有意差が認められたサイトカインを掲載した。炎症抑制に関わる IL-10、TGF- β が day 4 において *Cadm1* 欠損マウスで有意に低値であり、自然免疫に関わる IL-1 β 、IL-6 が day 8 において *Cadm1* 欠損マウスで有意に高いことが分かった。各 day 毎に野生型マウス: n=3、*Cadm1* 欠損マウス: n=3 で施行した。*, p<0.05

A



B



C

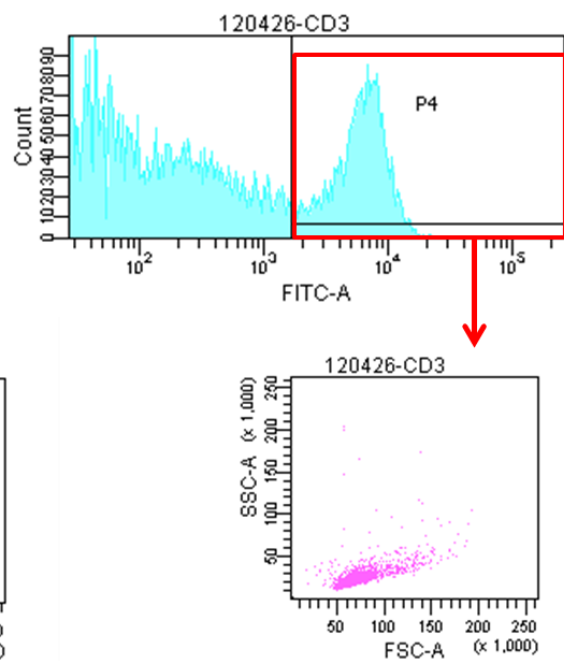


図 11. 抗 CADM1 抗体による野生型マウス大腸腸管粘膜固有層の単核細胞の FACS 解析

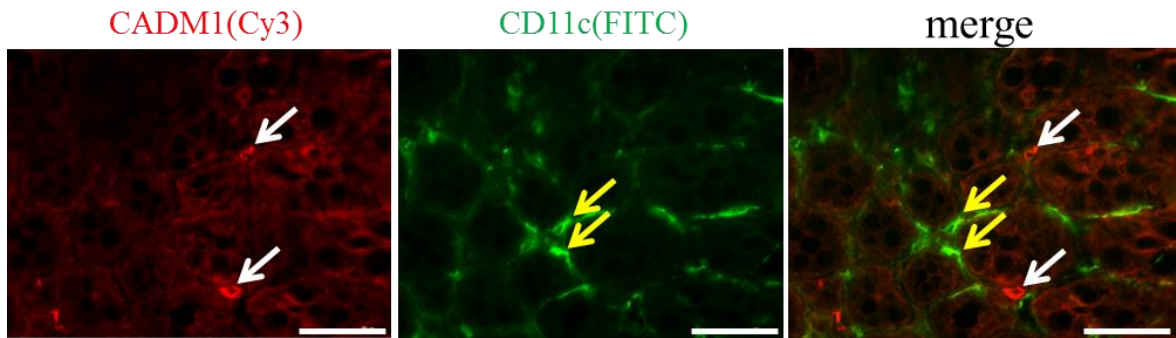
野生型マウスの DSS 誘発腸炎後 day8 の大腸より単離した粘膜固有層内単核細胞を、一次抗体として抗 CADM1 抗体(3E1)または Chicken IgY、FITC 標識抗 CD3 ϵ 抗体、2次抗体として anti-chicken IgY Ab conjugated FITC を使用して蛍光免疫染色し、FACS 解析を行った。

A) Chicken IgY によるネガティブコントロール。

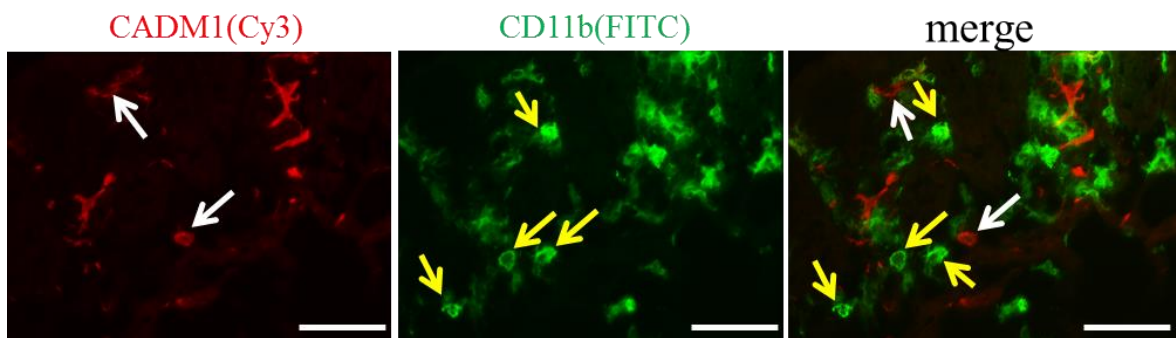
B) 抗 CADM1 抗体(3E1)陽性細胞(P4)と陰性細胞(P5)の側方散乱光(side scatter: SSC-A)、前方散乱光(forward scatter: FSC-A)分布。CADM1 陽性細胞は表面積の大きく顆粒を含む構造を持つ細胞であることが示唆され、陰性細胞との分布の違いが示唆された。

C) T リンパ球全般のマーカーである CD3 ϵ 陽性細胞(P4)の同分布。CADM1 陽性細胞と分布の違いが示唆された。

A



B



C

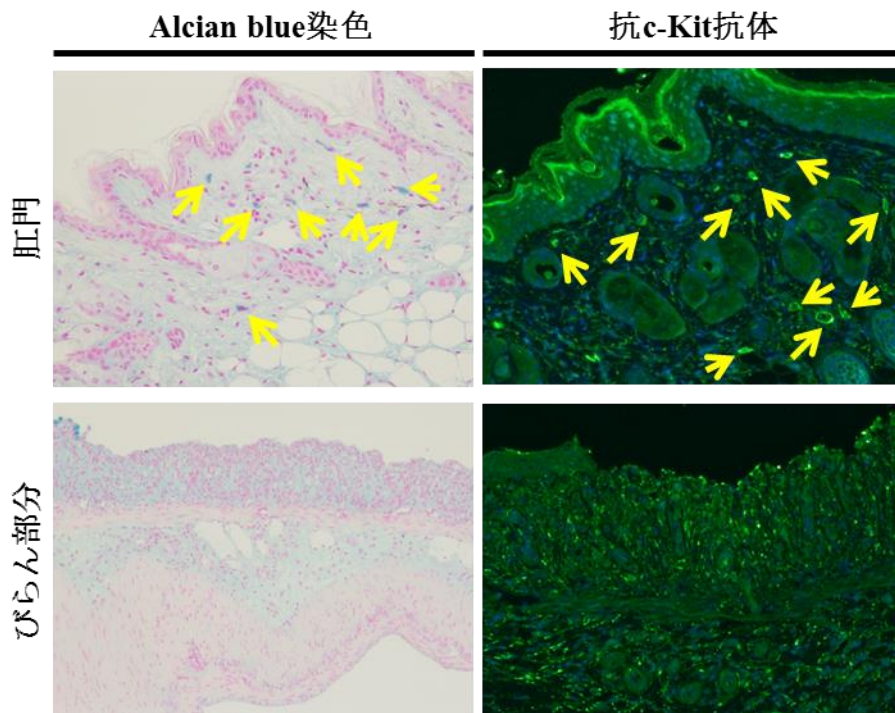


図 12. 野生型マウスの DSS 誘発腸炎の大腸における樹状細胞、マクロファージ、肥満細胞と CADM1 陽性細胞との局在

A) day 8 野生型マウスの大腸凍結切片における抗 CADM1 抗体(3E1) (Cy3 : 左)と抗 CD11c 抗体(FITC : 中央)の蛍光二重染色。抗 CADM1 抗体(3E1)陽性細胞(白矢印)

と抗 CD11c 抗体陽性細胞(黄矢印)が merge(右)では共局在を示さない。スケールバー：50 μ m

B) day 8 野生型マウスの大腸凍結切片における抗 CADM1 抗体(3E1) (Cy3：左)と抗 CD11b 抗体(FITC：中央)の蛍光二重染色。抗 CADM1 抗体(3E1)陽性細胞(白矢印)と抗 CD11b 抗体陽性細胞(黄矢印)が merge(右)では共局在を示さない。スケールバー：50 μ m

C) day 8 野生型マウスの大腸ホルマリン切片における Alcian blue 染色(左)と抗 c-Kit 抗体(Alexa 488:右)による免疫染色。肛門周囲(上段)には Alcian blue 染色でも抗 c-Kit 抗体でも肥満細胞(黄矢印)は確認されるが、びらん部位(下段)には両染色にて肥満細胞は認められなかった。

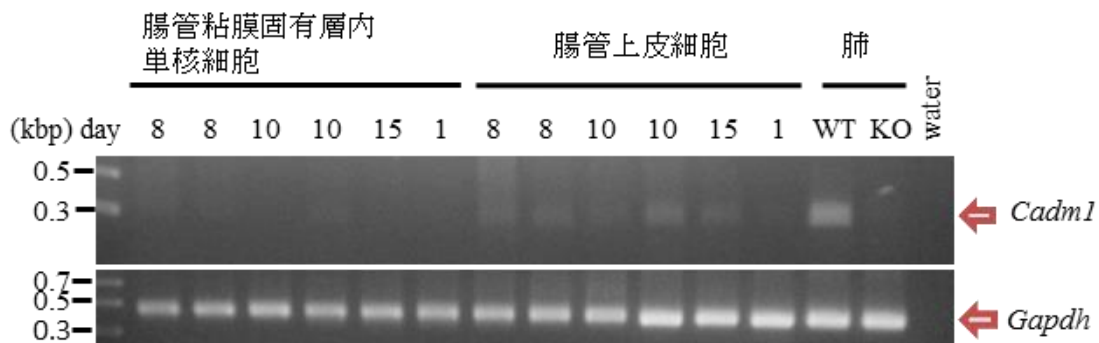
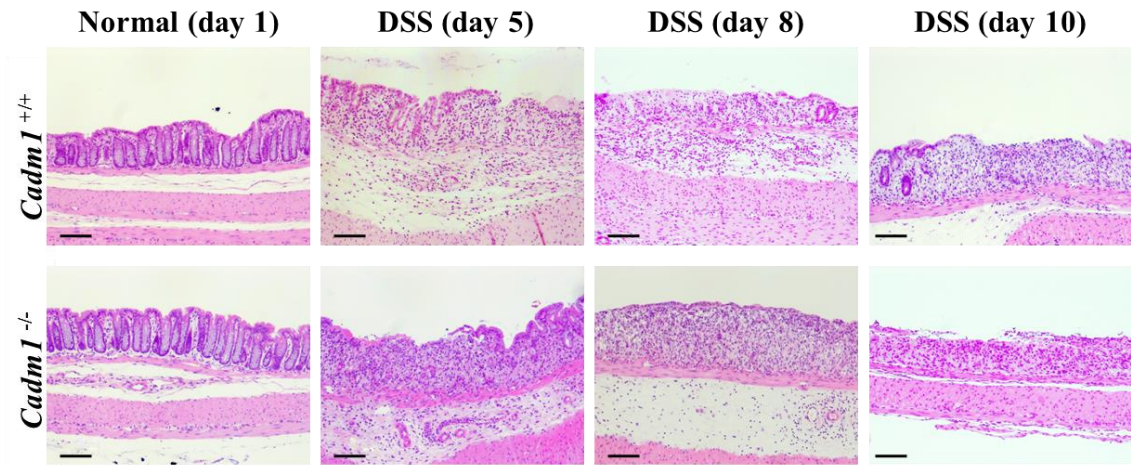


図 13. DSS 誘発腸炎野生型マウスの大腸粘膜固有層内単核細胞と大腸粘膜上皮細胞における mRNA レベルの *Cadm1* の発現

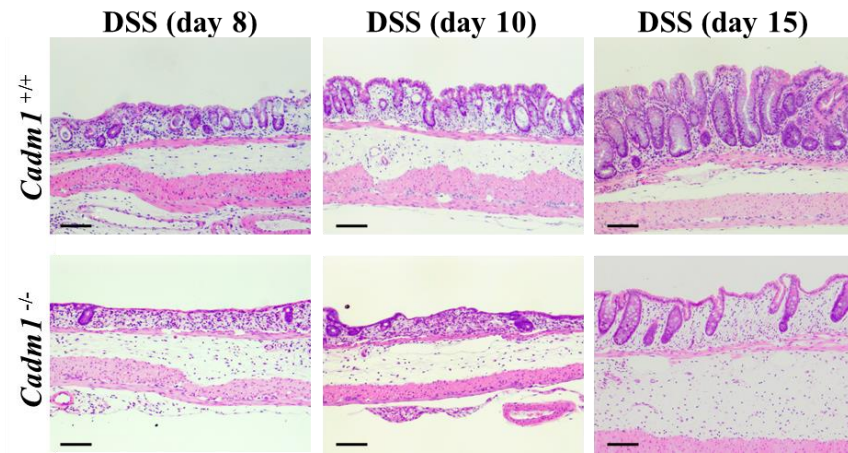
DSS 腸炎誘発野生型マウスの day 1(DSS 投与前)、day 8、day 10、day 15 の大腸粘膜固有層内単核細胞と大腸粘膜上皮細胞から mRNA を調製し、RT-PCR により *Cadm1* の発現を検出した(上段)。下段は *Gapdh* 発現を検出したもの。day 8、day 10 は 2 個体ずつ使用した。ポジティブコントロールとして野生型マウスの肺、ネガティブコントロールとして *Cadm1* 欠損マウスの肺より調製した mRNA を使用した。

A

a)

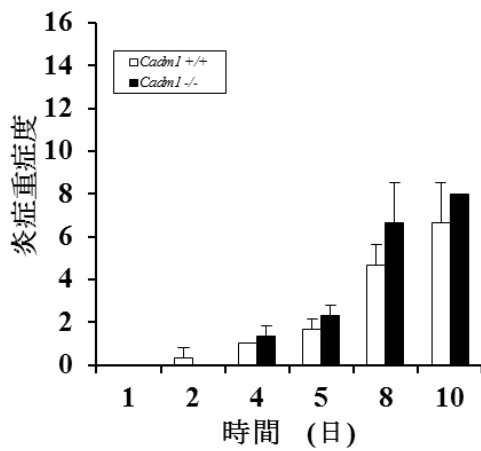


b)

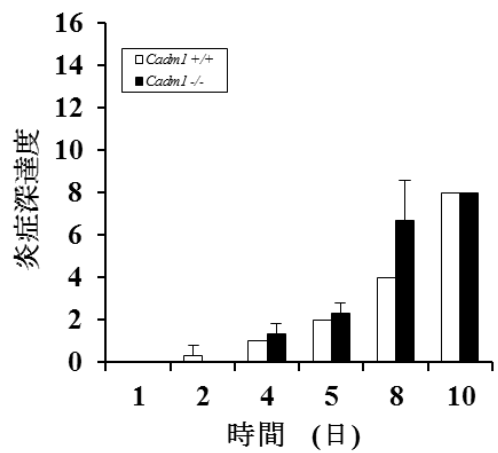


B

a)



b)



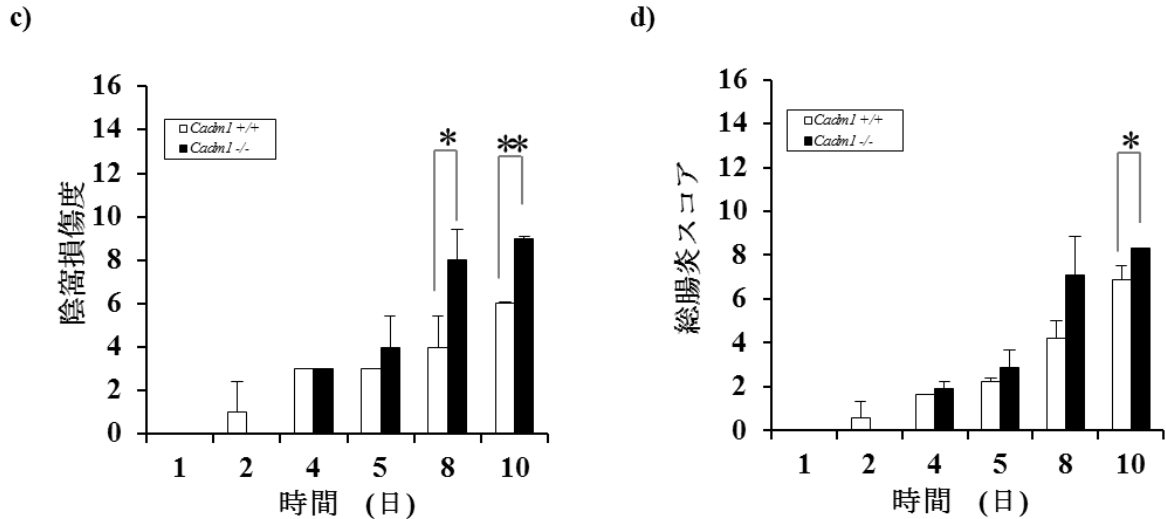


図 14. *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの DSS 誘発腸炎の病理組織学的比較(腸管)

A) DSS 誘発腸炎の大腸切片のヘマトキシリン・エオジン染色 a) 炎症部位、b) 再生部位(上段: 野生型マウス、下段: *Cadm1* 欠損マウス)。スケールバー: 100 μ m
 B) Williams らが提唱した DSS 腸炎病理組織評価基準での比較。a) 炎症重症度 (inflammation severity score)、b) 炎症深達度 (inflammation extent score)、c) 陰窩損傷度 (crypt damage score)、d) 総腸炎スコア (total colitis score)。 $(a + b + c) / 3 = d$ となる。総腸炎スコア (total colitis score) の day 10 において *Cadm1* 欠損マウスが有意に高値であるのは陰窩損傷度 (crypt damage score) の結果が影響していることがわかる。各 day 毎に野生型マウス: n=3、*Cadm1* 欠損マウス: n=3 で施行した。エラーバー: 標準偏差 * , $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$

3. CADM1 は DSS 誘発腸炎後の再生上皮の増殖を促進する

潰瘍性大腸炎の病因に関わる腸管上皮の機能としては腸管上皮バリア機能の破綻と再生機能不全の 2 つが主に考えられる。そこで CADM1 が上皮機能のどちらに関与しているかを検討した。

まず CADM1 がバリア機能に関与しているか否かを腸管上皮透過性試験にて検討した。腸管上皮のバリア機能は主にタイトジャンクションにより制御され、健常

状態において腸管上皮では隣接する細胞同士が強固に密着結合することによりバリア機能が発揮される。FITC 標識 dextran を経口投与することにより腸管上皮のバリア機能を *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスとで比較検討した(図 15)。dextran は腸管上皮バリア機能が正常であれば上皮下に浸潤することはなく、肛門より排泄されるが、バリア機能が低下している場合は上皮下に浸潤し、粘膜下層以下の毛細血管から吸収されるため、血清内に FITC が認められるようになる[142]。その濃度を比較することでバリア機能の相違を検討した。DSS 誘発腸炎 day 8 の野生型マウスについて血清 FITC-dextran 濃度を測定した結果、血清中に FITC が認められることから野生型マウスは DSS 投与により腸管上皮のバリア機能が失われることが示された。これに対して DSS 投与前の *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスとで腸管上皮バリア機能に有意差は認められず、また値としても DSS 誘発腸炎 day 8 の野生型マウスと比較して低値であったことからバリア機能の破綻は認められなかった。従って、CADM1 は腸管上皮バリア機能の破綻による炎症惹起には関与していないことが示唆された。

次に CADM1 が上皮再生機能に関与しているか否かを検討した。上皮再生には上皮細胞の増殖とアポトーシスが関係する。よって増殖能を細胞増殖と細胞周期のマーカーとして用いられる抗 Ki-67 抗体による免疫組織染色にて比較し(図 16)、アポトーシスの細胞の割合をアポトーシスにおける中心的酵素であり非特異的反応の少ない抗 cleaved caspase-3 抗体による免疫染色にて比較した(図 17)。抗 Ki-67 抗体

による免疫染色では、*Cadm1* 欠損マウスは野生型マウスと比較して day 8、day 10 において陰窩内の腸管上皮における Ki-67 陽性細胞の割合が有意に低いことが明らかとなった。一方、抗 cleaved caspase-3 抗体による免疫染色では、day 8 以降で炎症によるアポトーシスの細胞の増加がみとめられたが、*Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスとで明らかな差は認められなかった。よって CADM1 は DSS 誘発腸炎後の腸管上皮細胞の増殖を促進し、上皮再生の一因になることが示唆された。

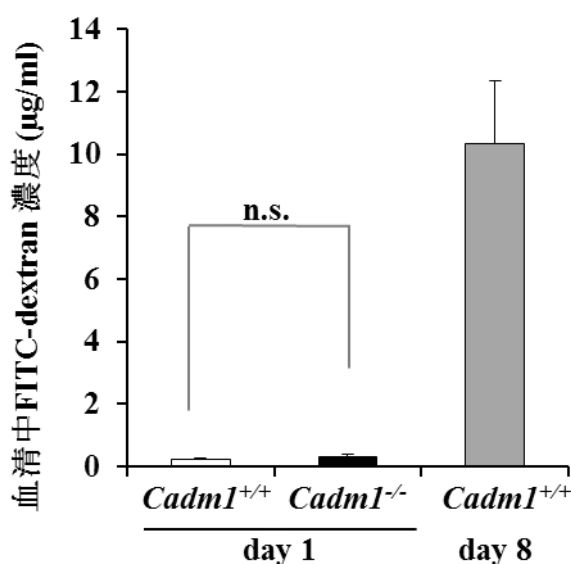
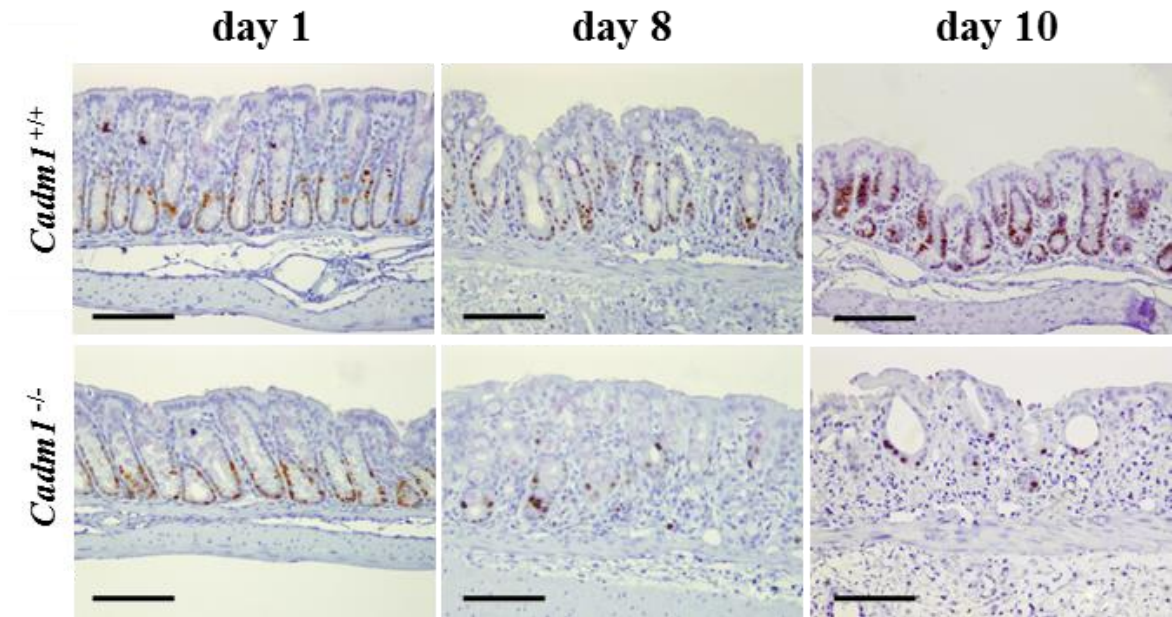


図 15. *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの腸管バリア機能の比較

FITC ラベルした dextran を経口投与して 4 時間後に採取した血清中の FITC 濃度の比較。*Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスとで FITC 濃度に有意差は認めらず、腸管上皮バリア機能の有意な差は認められなかった。野生型マウス: n=3、*Cadm1* 欠損マウス: n=3、DSS 誘発腸炎 day 8 の野生型マウス: n=3 で施行した。

エラーバー：標準偏差 n.s. = no significant difference

A



B

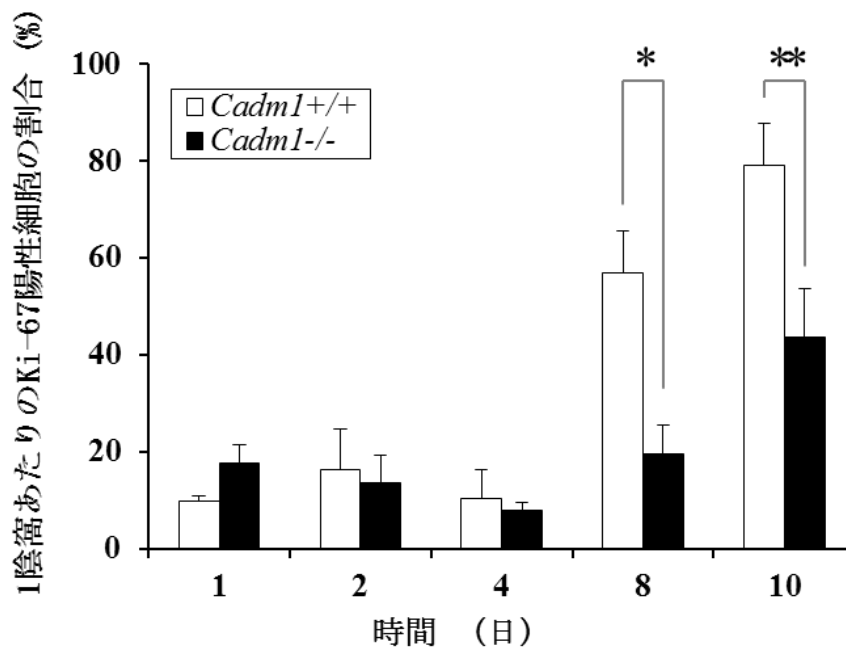
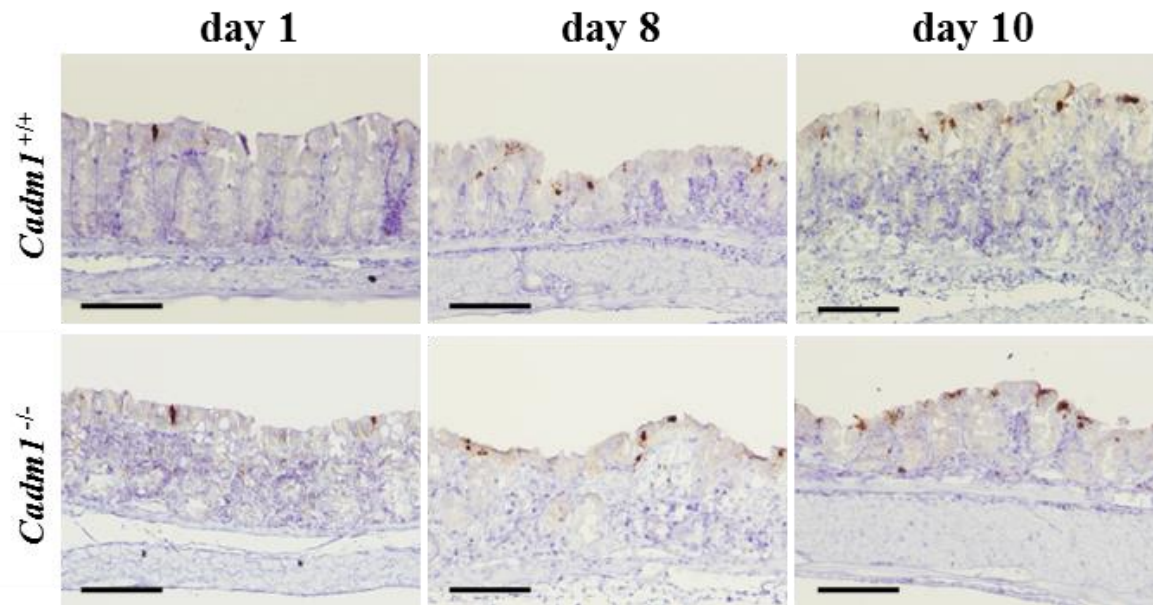


図 16. *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの腸管上皮における細胞増殖能の比較

A) 抗 Ki-67 抗体による免疫組織染色の比較(上段：野生型マウス、下段：*Cadm1* 欠損マウス)。day 8 以降で野生型マウスに比べて *Cadm1* 欠損マウスの Ki-67 陽性細胞数が少ないことがわかる。スケールバー：100 μ m

B) 1 陰窩の腸管上皮細胞あたりの Ki-67 陽性細胞の割合。各 day 毎に野生型マウス：n=3、*Cadm1* 欠損マウス：n=3 で施行した。エラーバー：標準偏差 *、 $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

A



B

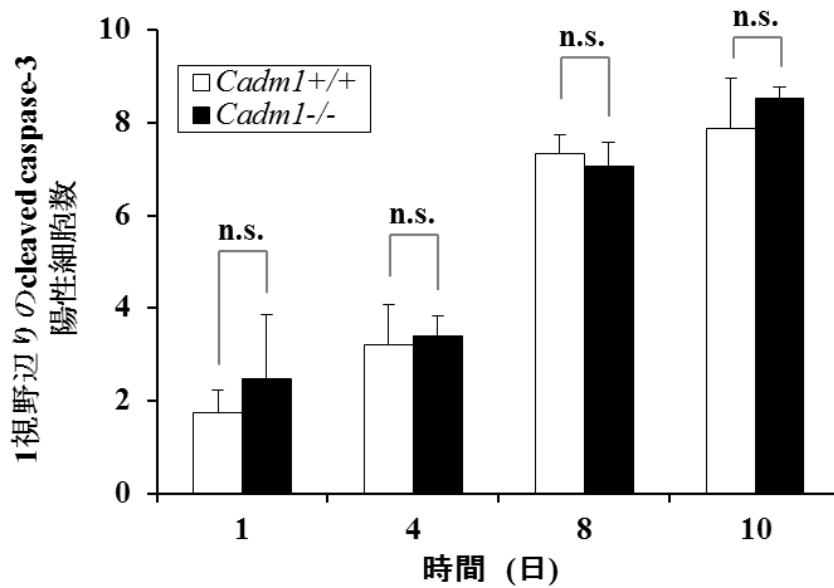


図 17. *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスの腸管上皮細胞のアポトーシスの比較

A) 抗 cleaved caspase-3 抗体による免疫組織染色の比較(上段:野生型マウス、下段: *Cadm1* 欠損マウス)。野生型マウスと *Cadm1* 欠損マウスで cleaved caspase-3 陽性細胞数が変わらないことわかる。スケールバー: 100 μ m

B) 1 視野毎の腸管上皮細胞あたりの cleaved caspase-3 陽性細胞数。各 day 毎に野生型マウス: n=3、*Cadm1* 欠損マウス: n=3 で施行した。エラーバー: 標準偏差 n.s. = no significant difference

4. CADM1 は DSS 腸炎後の腸管上皮再生時に一時的に陰窩上皮に高発現する

2007年に伊藤らは胆管上皮の発生もしくは再生の段階で CADM1 が細胞膜に一時的に高発現することを報告している[71]。よって腸管上皮の場合においても発生もしくは再生の過程で CADM1 の一時的な高発現がみられる可能性が考えられた。さらにこれが *Cadm1* 欠損マウスで DSS 誘発腸炎後の腸管上皮の再生の遅延に関連するのではないかと考え、DSS 誘発腸炎の腸管粘膜における CADM1 の発現を検討した。

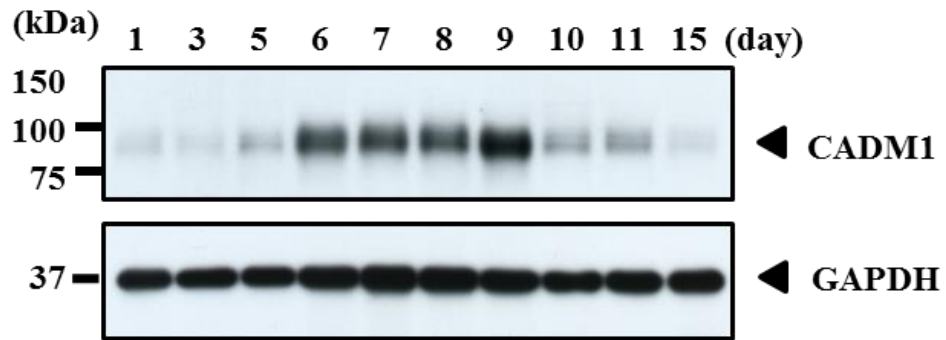
DSS 誘発腸炎の野生型マウスのうち day 1(DSS 投与前)、day 3、day 5-11、day 15 の大腸から細胞抽出液を調整し、抗 CADM1 抗体(C18)を用いてウェスタンブロットを施行した(図 18A)。DSS 腸炎大腸において CADM1 タンパク質の発現が day 6 から day 9 で上昇し、day 10 以降で低下していることが判明した。また、DSS 腸炎大腸切片を抗 CADM1 抗体(CC3)を用いて免疫組織染色を行った結果(図 18B)、day 1 では管腔側の上皮にのみ CADM1 の染色がみられ陰窩上皮には認められなかったが(図 18B-a)、DSS 投与後の day 8、day 9 では陰窩上皮の細胞膜上に CADM1 の発現がみられた(図 18B-bc)。day 10 では陰窩上皮での CADM1 染色が減少し(図 18B-d)、day 15 では管腔側の上皮には染色が認められるが陰窩上皮には認められず、day 1 と同様の染色像であった(図 18B-f)。ウェスタンブロットで見られた CADM1 タンパク質の発現上昇は陰窩上皮における CADM1 の一時的な発現によると考えられた。

以上から野生型マウスの DSS 誘発腸炎において、再生上皮の陰窩に CADM1 が

一時的に発現することが示され、タンパク質レベルでの制御であることが示された。

次に、発生における **CADM1** の発現を検討した。マウス腸管の発生において胎生 14 日目 (E14) までは腸管上皮の増殖・分化は進んでおらず重層上皮を形成する [121]。E14 以降で上皮の増殖・分化が進み、出生 1 日目 (P1) 付近において単層腺管上皮に分化した絨毛が形成される。さらに増殖・分化がすすみ、出生 7 日目 (P7) に陰窩が形成される。この腸管上皮の発生過程で **CADM1** の発現の変移がみられないか免疫組織染色とウェスタンブロットにより検討した (図 19)。E14、P1-7 の出生前後の野生型マウスの腸管切片を抗 **CADM1** 抗体を用いて免疫組織染色した結果、E14 マウスでは上皮において **CADM1** の染色はみられなかったが、P1-3 マウスでは腸管上皮の陰窩まで **CADM1** の染色を認め、P4 マウス以降は腸管上皮の管腔側でのみ **CADM1** の染色がみられた (図 19A 矢印)。また、ウェスタンブロットの結果、P1 において **CADM1** のバンドが認められた (図 19B)。従って、腸管発生の過程において出生直後の陰窩形成の時期に **CADM1** が一時的に発現することが示された。以上のことから、胆管上皮と同様に腸管上皮においても発生および再生の過程で **CADM1** が陰窩上皮に一時的に発現することが明らかとなった。

A



B

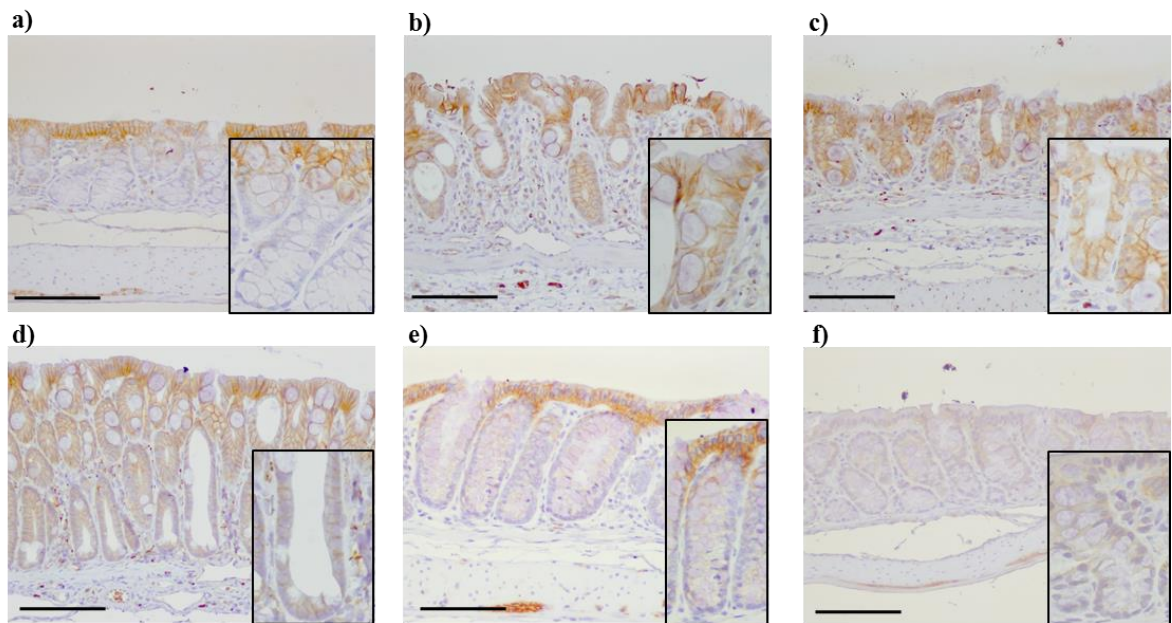


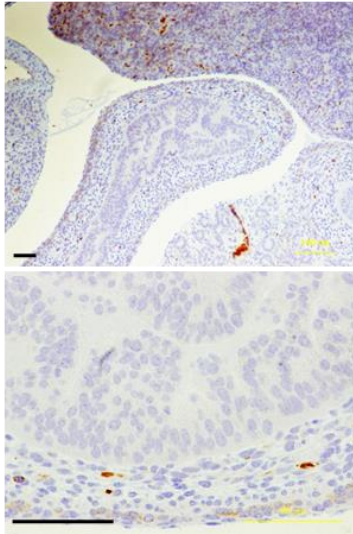
図 18. DSS 誘発腸炎における野生型マウスの CADM1 発現の推移

A) DSS 誘発腸炎野生型マウスの大腸細胞抽出液を使用した抗 CADM1 抗体(C18)によるウェスタンブロット(上段)。DSS 腸炎誘発野生型マウスの day 1(DSS 投与前)、day 3、day 5-11、day 15 の大腸における CADM1 の発現を検出した。下段は抗 GAPDH 抗体によるウェスタンブロット。

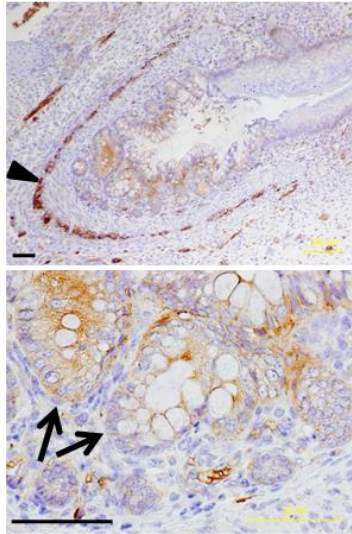
B) DSS 誘発腸炎マウスの大腸切片を使用した抗 CADM1 抗体(CC3)による免疫組織染色。野生型マウス a) day 1(DSS 投与前)、b) day 8、c) day 9、d) day 10、e) day 15 の大腸切片と、陰性コントロールとして *Cadm1* 欠損マウス f) day 1(DSS 投与前)を用いた。スケールバー：100 μ m

A

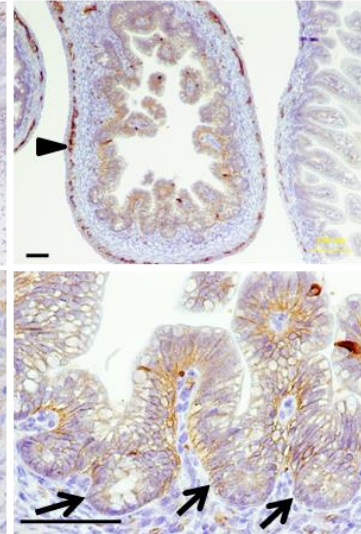
a) E14



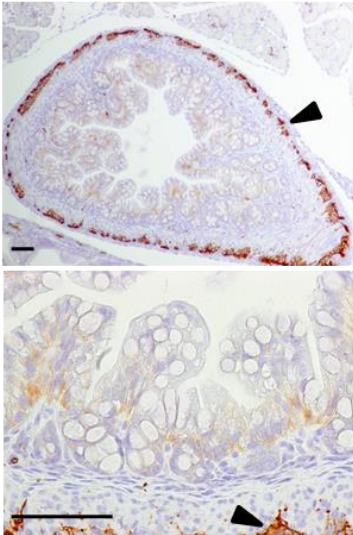
b) P1



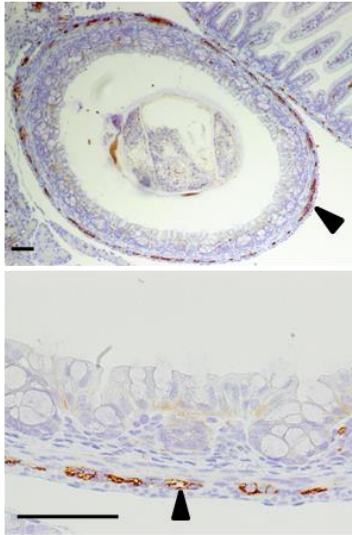
c) P2



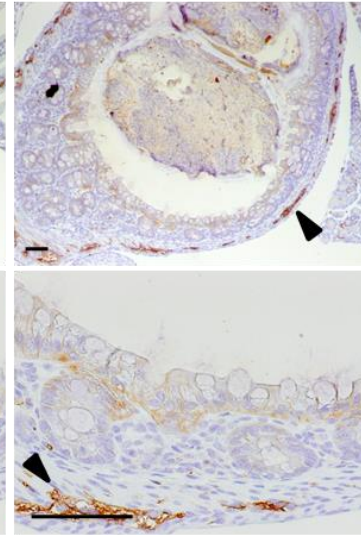
d) P3



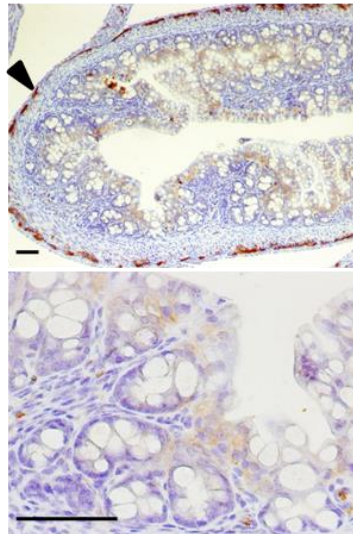
e) P4



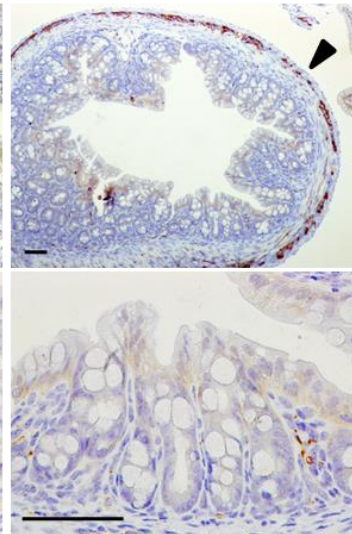
f) P5



g) P6



h) P7



B

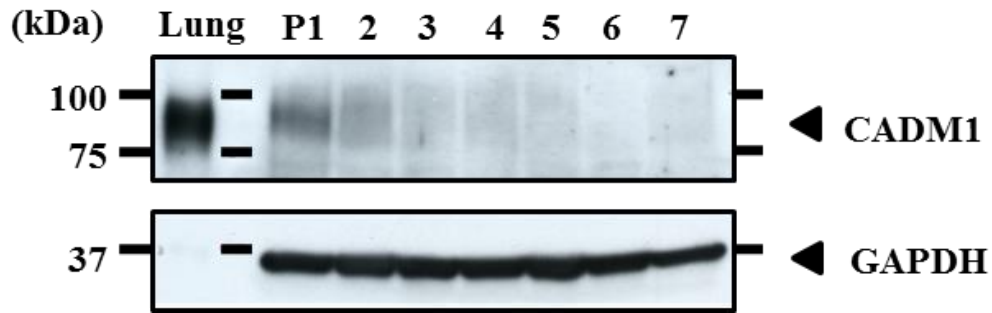


図 19. 野生型マウスの腸管発生過程での CADM1 発現の推移

A) 野生型仔マウス(E14, P1-7)の腸管切片を使用した抗 CADM1 抗体(CC3)による免疫組織染色。野生型仔マウス a) E14、b) P1、c) P2、d) P3、e) P4、f) P5、g) P6、h) P7 の腸管切片である。矢印：CADM1 陽性陰窩 矢頭：Auerbach 神経叢 スケールバー：50 μ m

B) 野生型仔マウス(P1-7)の腸管細胞抽出液を使用した抗 CADM1 抗体(C18)によるウェスタンブロット(上段)。下段は抗 GAPDH 抗体によるウェスタンブロット。

5. DSS 腸炎後の腸管上皮再生において CADM1 は Akt のリン酸化や β -catenin の核移行と関連する

次に DSS 腸炎後の腸管上皮再生時に CADM1 が一時的に発現することで細胞増殖が促進されるメカニズムを検討した。腸管の陰窩上皮増殖には Wnt/ β -catenin シグナル経路が重要であることは報告されており [59, 122]、近年ではさらに PI3K/ Akt/ β -catenin シグナル経路も炎症後の腸管上皮再生に関与していることが報告されている [63]。また当研究室の村上成文らにより CADM1 は PI3K とタンパク質複合体を形成し、Akt の活性化を促すことが示唆されているため、CADM1 が DSS 腸炎後の上皮再生において PI3K/ Akt/ β -catenin シグナル経路経由での細胞増殖に関与している可能性が考えられた。そこで抗 β -catenin 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体を用いて免疫組織染色し、*Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスとで発現を比較した(図 20)。

day 1(DSS 投与前)では β -catenin は *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスにおいて全て腸管上皮細胞の細胞膜に染色が認められ(図 20A 中央)、リン酸化 Akt は *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスにおいて一部核に染色が認められたが、大部分が細胞膜に染色が認められた(図 20A 右)。*Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスについてそれぞれ day 6、day 7、day 8、day 9、day 10、day 15 の大腸切片で抗 β -catenin 抗体の免疫組織染色を行ったところ、day 9 以外では細胞膜に染色が認められたが、day 9 の野生型マウスの再生上皮の陰窩では β -catenin の染色が核にみられ(図 20B 左から 2 列目)、リン酸化 Akt の染色も核に認められた(図 20B 右から 2 列目)。 β -catenin とリン酸化 Akt が核に局在する陰窩では Ki-67 陽性細胞も認められた(図 20B 一番右)。一方、day 9 の *Cadm1* 欠損マウスの β -catenin とリン酸化 Akt の染色は、一部核に染色が見られたが細胞膜に染色されるものが多い傾向にあった。 β -catenin、リン酸化 Akt が核に局在する割合をそれぞれ比較した結果、野生型マウスと比べて *Cadm1* 欠損マウスで有意に低い結果となった(図 20C,D)。

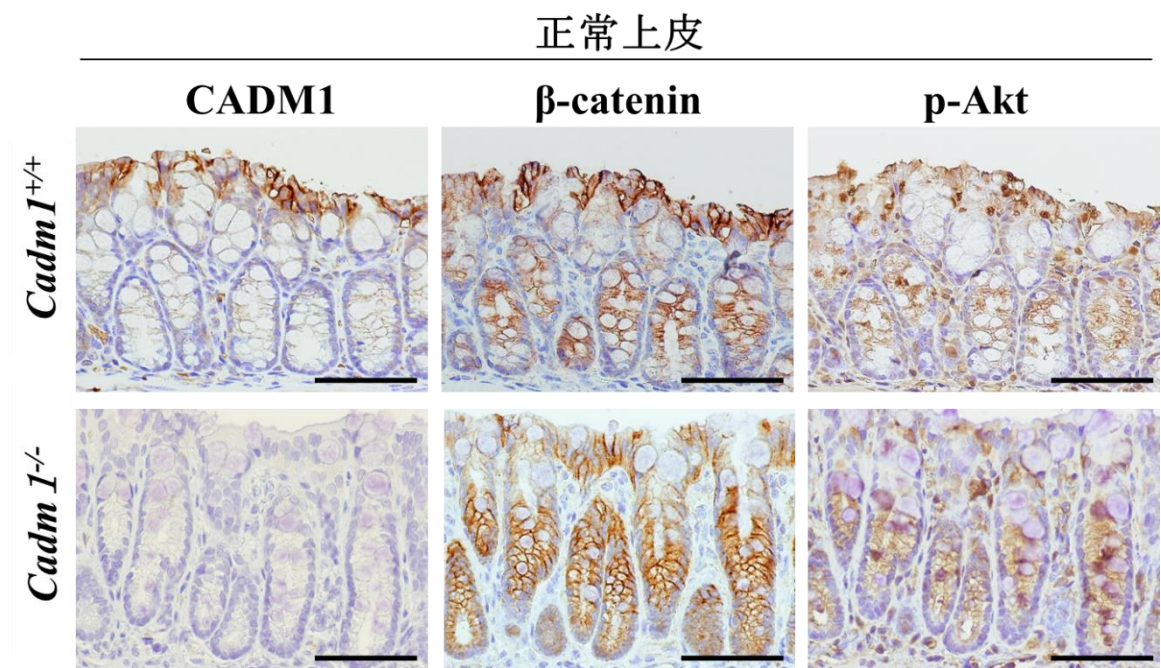
β -catenin は一般的に細胞膜に局在して細胞間接着に関与する[123]。正常細胞では主に細胞膜に局在するが、癌などの増殖の強い細胞では β -catenin の核への局在がみられる[124]。 β -catenin の核への局在は β -catenin が活性化して核へ移行し、細胞増殖を促進することを示すと報告されている[125]。 β -catenin の核への移行は癌症例に限らず炎症後の再生過程でも認められる報告がある[63, 126]。

Akt はセリン/スレオニンキナーゼであり、アポトーシス、細胞増殖、細胞分化、

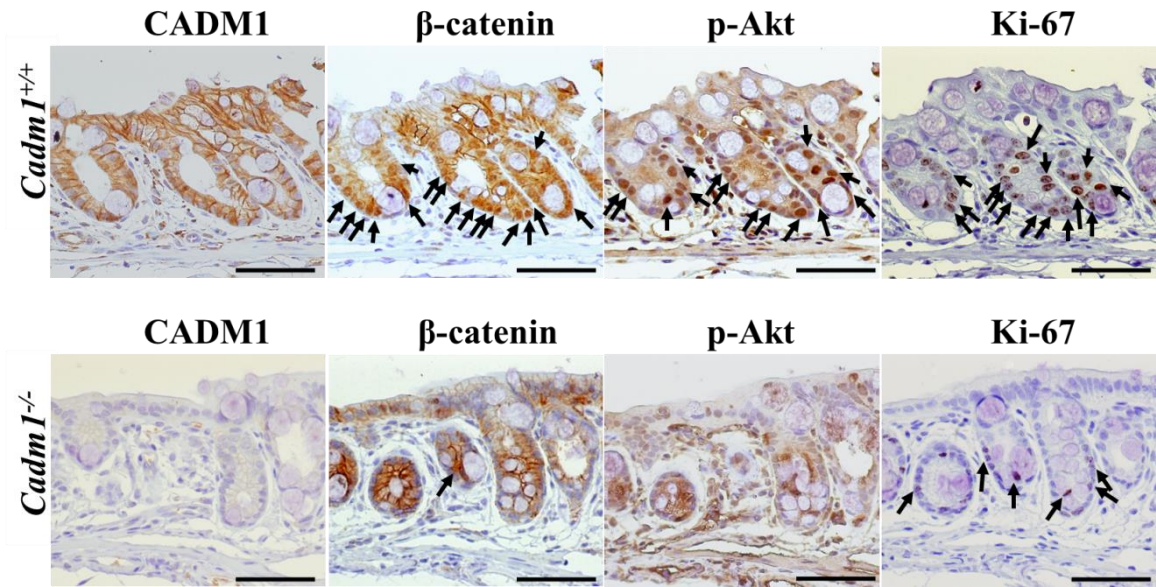
細胞周期の制御に関わるとされ[127-129]、主に PI3K シグナル伝達のエフェクター分子として知られている。Akt の活性化には Thr308 と Ser473 の 2 ヶ所のリン酸化が必要であり、このリン酸化はともに PI3K の下流で制御されている[130, 131]。抗リン酸化 Akt(Thr308)抗体による腸管上皮の免疫組織染色では活性化 Akt は陰窩上皮の細胞質や核に局在することが示されている[63]

以上から CADM1 の DSS 誘発腸炎後の再生陰窩上皮における発現上昇は、 β -catenin の核移行や Akt の活性化と相関することが示された。

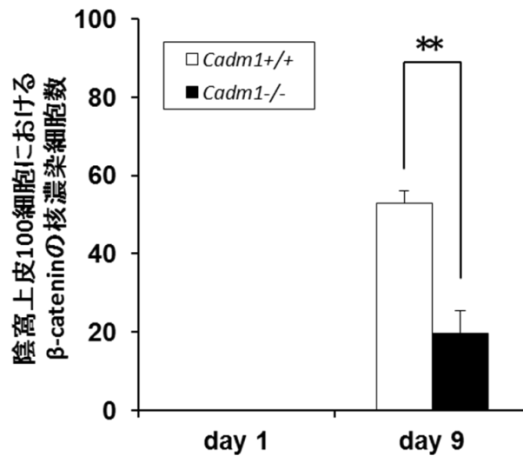
A



B



C



D

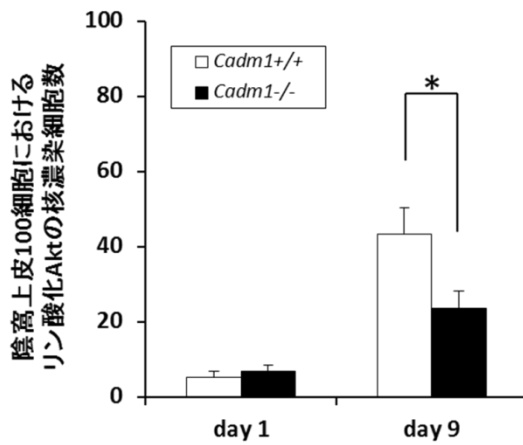


図 20. DSS 誘発腸炎における CADM1 発現と β -catenin の核局在の比較

A) DSS 投与前マウス day 1 の大腸連続切片を使用した抗 CADM1 抗体(CC3)、抗

β -catenin 抗体と抗リン酸化 Akt(Thr308)抗体による免疫組織染色(上段：野生型マウス、下段：*Cadm1* 欠損マウス)。CADM1 が腸管上皮の管腔側に局在するのに対し、 β -catenin とリン酸化 Akt(Thr308)は腸管上皮全体の細胞膜に染色されている。スケールバー：50 μ m

B) DSS 誘発腸炎マウス day 9 の大腸連続切片を使用した抗 CADM1 抗体(CC3)、抗 β -catenin 抗体、抗リン酸化 Akt(Thr308)抗体と抗 Ki-67 抗体による免疫組織染色(上段：野生型マウス、下段：*Cadm1* 欠損マウス)。野生型マウスでは CADM1 が腸管陰窩上皮の細胞膜に染色され、 β -catenin とリン酸化 Akt(Thr308)は核に染色される細胞が認められる(矢印)。 β -catenin とリン酸化 Akt(Thr308)が核に濃染する細胞は Ki-67 でも陽性となる傾向にあった。スケールバー：50 μ m

C) 陰窩上皮 100 細胞における β -catenin の核濃染細胞数。野生型マウス: n=3、*Cadm1* 欠損マウス: n=3 で施行した。エラーバー：標準偏差 **, $p < 0.01$

D) 陰窩上皮 100 細胞におけるリン酸化 Akt(Thr308)の核濃染細胞の割合。野生型マウス: n=3、*Cadm1* 欠損マウス: n=3 で施行した。エラーバー：標準偏差 **, $p < 0.01$

6. ヒト潰瘍性大腸炎の腸管再生上皮の CADM1 発現と β -catenin の核移行は相関する

DSS 潰瘍性大腸炎誘発モデルマウス実験において、CADM1 は再生陰窩上皮に一時的に発現し、Akt のリン酸化や β -catenin の核移行と相関するという結果を踏まえ、潰瘍性大腸炎の患者検体でも同様に再生上皮の陰窩上皮における CADM1 の発現と β -catenin の相関関係の有無を検証した。検体は 2009 年から医科学研究所附属病院にて採取された検体で、大腸癌と診断された大腸手術検体 1 例と潰瘍性大腸炎と診断された大腸手術検体 16 例を使用した。これらを抗 CADM1 抗体(CC3)と抗 β -catenin 抗体を用いて染色し、観察した(図 21)。

大腸癌手術検体の非癌部・非炎症部位の大腸切片において CADM1 は、管腔側の腸管上皮には染色が認められ、陰窩上皮には染色は認められなかった(図 21A)。

β -catenin は細胞膜に染色が認められた。これは野生型マウスの DSS 非投与の正常粘膜の染色傾向と同じであった。

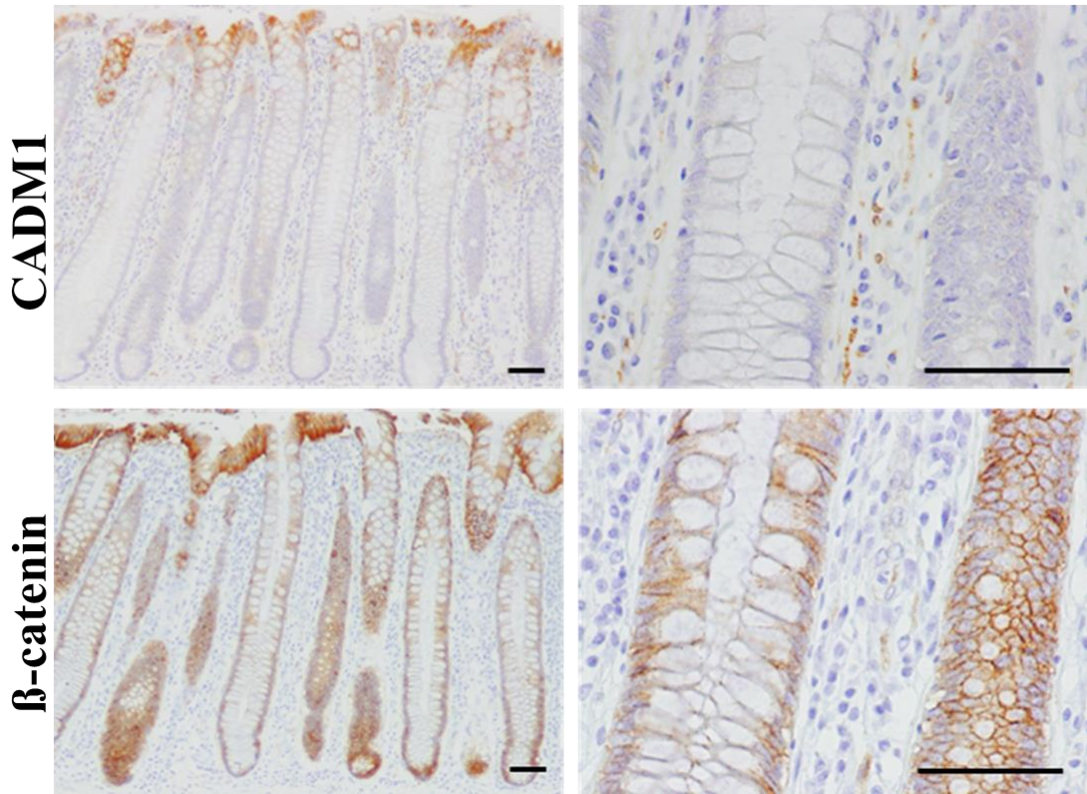
潰瘍性大腸炎の検体において、びらんが目立ち、好中球が多い部分の深部の陰窩には CADM1 の発現は見られず、 β -catenin も大部分が細胞膜に局在していた(図 21B)。潰瘍性大腸炎の検体の大部分の陰窩上皮に CADM1 の染色が認められなかったが、潰瘍性大腸炎の表層が再生上皮でおおわれている部分の深部の陰窩には一部 CADM1 が陰窩上皮の細胞膜に染色される陰窩もあり、そのような陰窩上皮には β -catenin の核の濃染がみられる傾向にあった(図 21C)。

潰瘍性大腸炎の陰窩上皮における CADM1 の染色は、管腔側から陰窩の底まですべて染まるか、管腔側のみの染色で陰窩は染色されないかのどちらかであった。これらの染色の違いと β -catenin の核の濃染の割合に関連があるかどうか、1 症例につき CADM1 陽性陰窩と陰性陰窩を 10 個ずつ計 20 個観察し、1 陰窩あたりの β -catenin の核濃染率をそれぞれ算出し、ヒストグラムを作成した(図 21D)。Mann-Whitney U 検定にて p 値が 0.001 未満と求められたことより、CADM1 が発現している陰窩と発現していない陰窩とでは β -catenin の核陽性細胞の割合は有意に異なることが示された。

以上より、潰瘍性大腸炎検体において陰窩における CADM1 の発現と β -catenin の核移行に相関関係があることが示唆された。

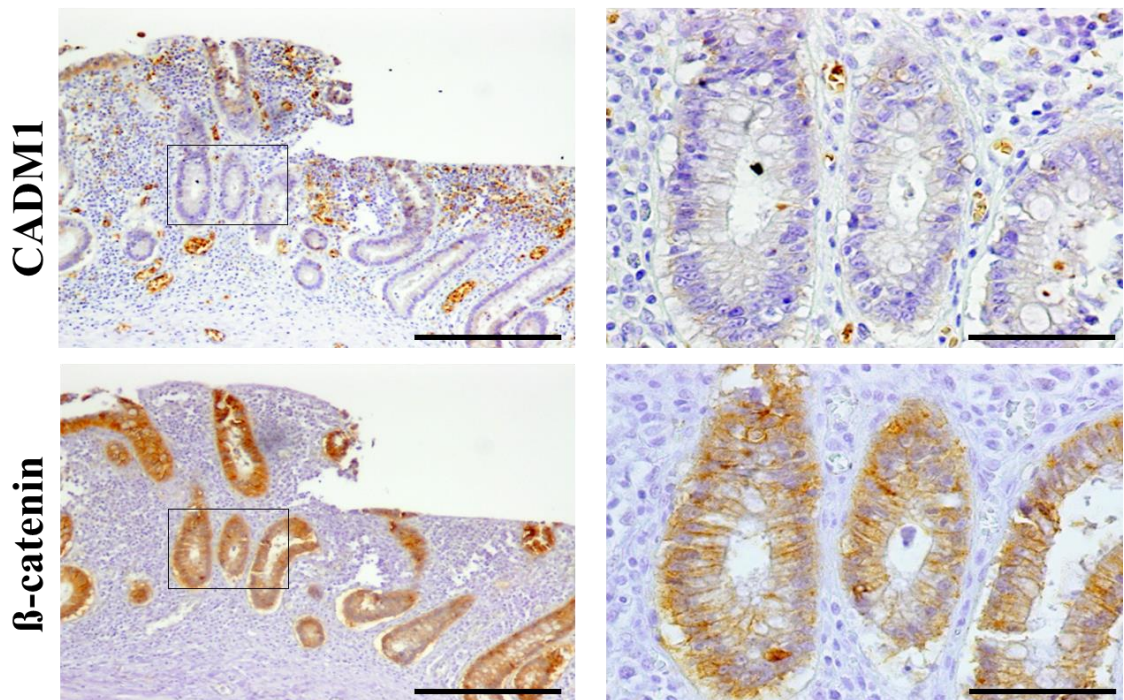
A

非癌部・非炎症部位



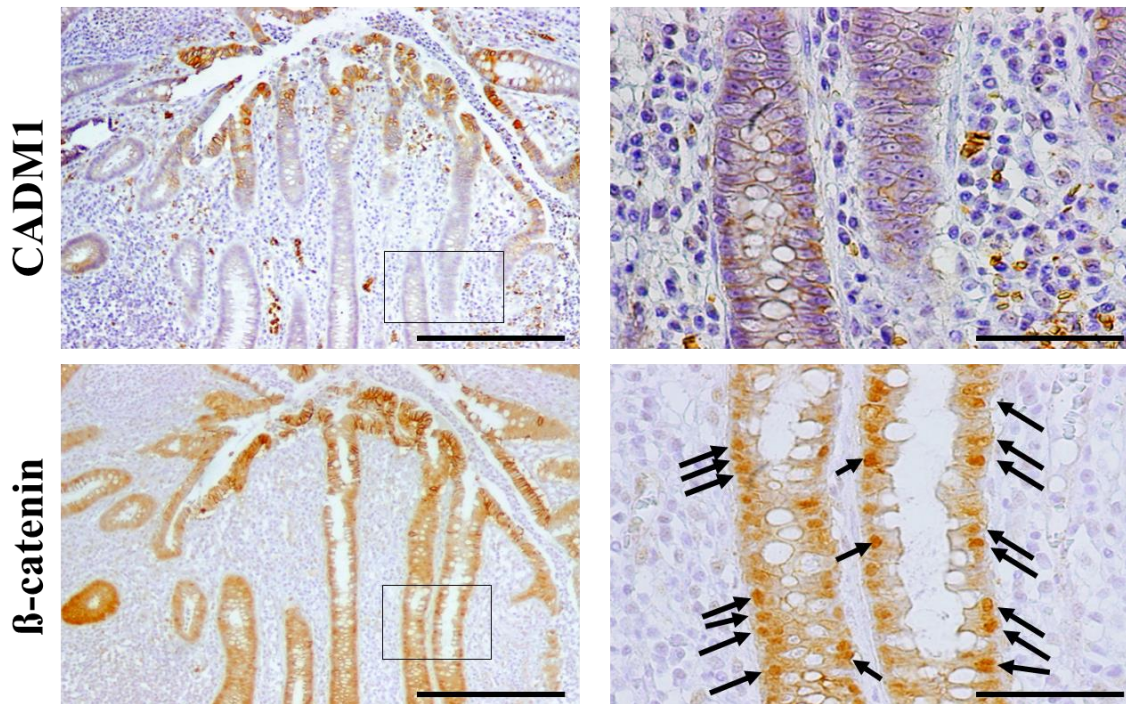
B

CADM1陰性陰窩



C

CADM1陽性陰窩



D

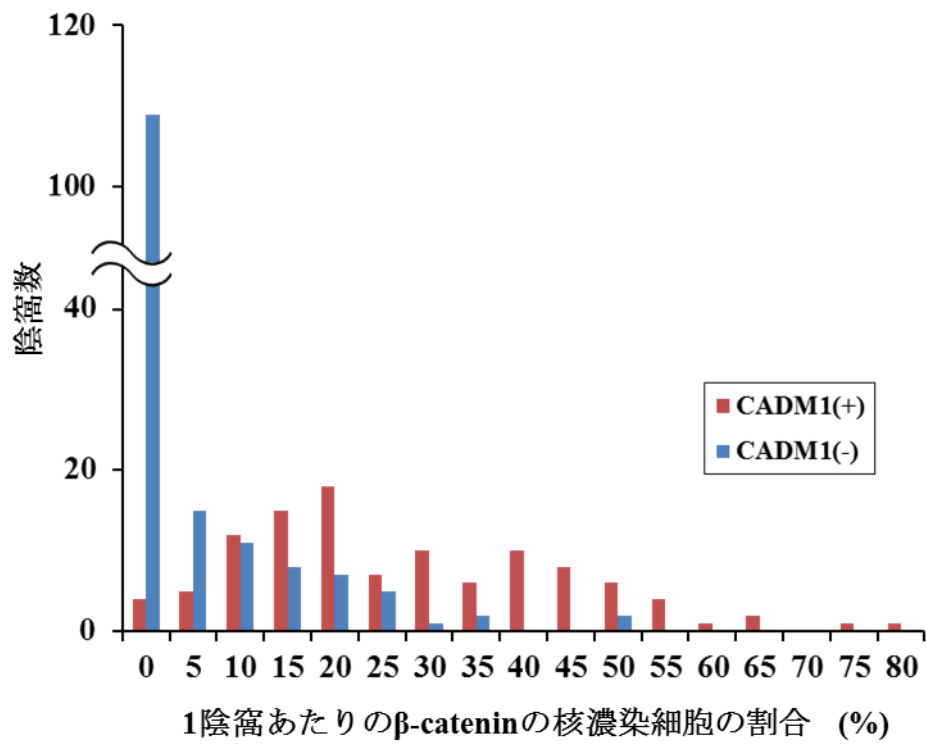


図 21. 潰瘍性大腸炎検体における CADM1 発現と β-catenin 発現の関連

A)大腸癌検体の非癌部・非炎症部位の抗 CADM1 抗体(CC3) (上段)と抗 β-catenin 抗

体(下段)による免疫組織染色の代表的な写真。CADM1 の染色は管腔側の腸管上皮に認められ、陰窩上皮には染色は認めず。β-catenin の染色は細胞膜に染色が認められた。スケールバー：50μm

B) 潰瘍性大腸炎検体の抗 CADM1 抗体(CC3) (上段)と抗 β-catenin 抗体(下段)による免疫組織染色で、びらん部分の深部陰窩の代表的な写真。炎症部位の β-catenin は細胞膜に局在し、CADM1 の染色は陰窩細胞には認められない。スケールバー：50μm

C) 潰瘍性大腸炎検体の抗 CADM1 抗体(CC3) (上段)と抗 β-catenin 抗体(下段)による免疫組織染色で、表層が再生上皮でおおわれている部分の深部陰窩の代表的な写真。再生上皮 β-catenin は核に濃染する細胞(矢印)が散在し、CADM1 は陰窩細胞全体の細胞膜に染色される像が認められた。スケールバー：50μm

D) 潰瘍性大腸炎における CADM1 陽性陰窩(赤：n=110)と陰性陰窩(青：n=160)の1陰窩あたりの β-catenin の核濃染率毎のヒストグラム。Mann-Whitney U 検定にて $p<0.001$

7. CADM1 発現が β-catenin の核移行を促進する

CADM1 が β-catenin の核移行を促進するか否かを、ルシフェラーゼアッセイにて β-catenin/TCF 複合体依存的な転写活性を測定することにより検討した(図 22)。核移行した β-catenin は転写因子である TCF と結合し、この β-catenin/TCF 複合体が標的遺伝子のプロモーター領域に結合して転写活性を促す。本実験では β-catenin/TCF 複合体が TCF 結合配列に結合した際にルシフェラーゼ遺伝子の転写が誘導されるレポータープラスミドを使用した。

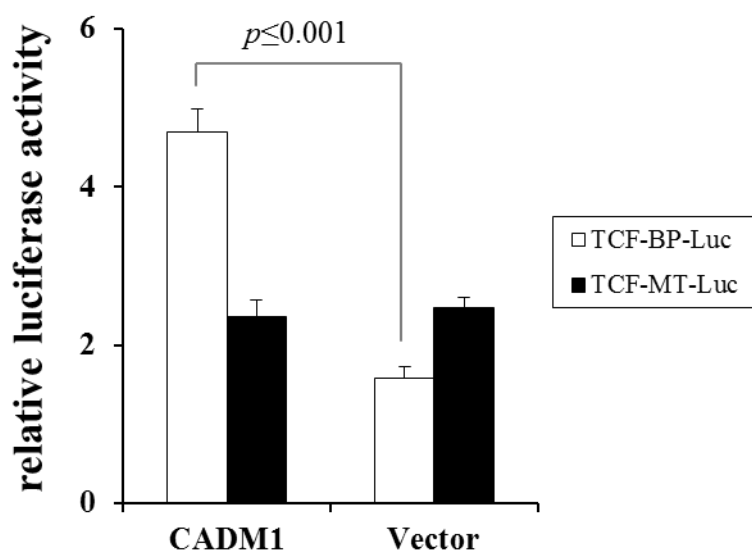
CADM1 タンパク質を発現していないヒト大腸がん細胞株である HCT116 細胞と HT29 細胞に CADM1 発現ベクターあるいはコントロールベクターと共に TCF 結合配列を持つホタルルシフェラーゼレポータープラスミド(pTCF-BP-Luc ベクター)と ウミシイタケルシフェラーゼ内部標準プラスミド(pRL-TK ベクター)を導入しルシ

フェラーゼ活性を測定した。ネガティブコントロールとして pTCF-BP-Luc ベクターの Tcf-motif に変異を導入した pTCF-MT-Luc ベクターを使用した。

HCT116 細胞においては pTCF-BP-Luc を導入した場合はコントロールと比較して CADM1 発現細胞の方がルシフェラーゼ活性が有意に高値であることが認められた。pTCF-MT-Luc ベクターを導入した場合は CADM1 発現細胞とコントロールとで変化がなく、ルシフェラーゼ活性の上昇が β -catenin/TCF 複合体依存的であることが示された。HT29 細胞に関しても、CADM1 発現細胞とコントロールとで有意差は認められなかったが、HCT116 細胞と同様の傾向がみられた。

これらの結果は CADM1 発現細胞において β -catenin が核に局在することを示している。従って、CADM1 が一過性に発現することにより β -catenin の核移行が促進されることが示唆された。

A



B

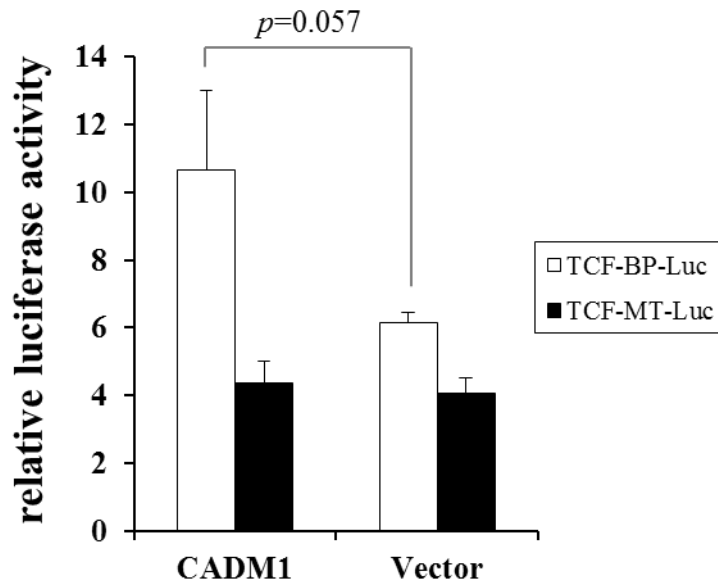


図 22. ヒト大腸がん細胞株における CADM1 遺伝子一過性導入による β -catenin の転写活性制御

A) HCT116細胞と B) HT29細胞に CADM1 発現プラスミドあるいはコントロールベクターおよび TCF 結合配列を持つホタルルシフェラーゼレポータープラスミド (pTCF-BP-Luc ベクター)およびウミシイタケルシフェラーゼ内部標準プラスミド (pRL-TK ベクター)を導入しルシフェラーゼ活性を測定した。ネガティブコントロールとして pTCF-BP-Luc ベクターの Tcf-motif に変異を導入した pTCF-MT-Luc ベクターを用いた。ホタルルシフェラーゼの活性値をウミシイタケルシフェラーゼの活性値で補正した値である Relative luciferase activity によってプロモーター活性を比較した。

考察

潰瘍性大腸炎は近年において患者数が急増しており、その原因の解明が待たれる疾患である。本研究では潰瘍性大腸炎における CADM1 の関与について追究した。

DSS 腸炎誘発マウスモデルを *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスを使用して比較実験した結果、*Cadm1* 欠損マウスに有意な死亡率、重度な症状が認められ、病理所見により腸管粘膜上皮・陰窩の再生の遅れが考えられた。炎症細胞浸潤は両者とも同等であり、腸炎制御に関わる腸管粘膜固有層内単核細胞よりも腸管上皮細胞に CADM1 の発現が認められたことから、CADM1 は主に腸管上皮に関与していると考えられた。次に DSS 誘発腸炎での腸管上皮細胞における CADM1 の機序を検討した。腸管粘膜透過性試験の結果により CADM1 はバリア機能の破綻による炎症惹起には関与しないことが示された。免疫組織染色により CADM1 の発現は腸管上皮細胞の増殖と相関し、アポトーシスには関与していないことが示された。さらに DSS 誘発腸炎後の腸管上皮再生の過程で CADM1 が一時的に陰窩上皮に発現することがウェスタンブロット、免疫組織染色で示され、CADM1 が DSS 誘発腸炎の粘膜治癒の促進に寄与していることが示唆された。上皮再生のメカニズムとして、リン酸化 Akt、 β -catenin の核移行と CADM1 の発現が相関することが DSS 誘発腸炎マウス検体の免疫組織染色で示され、ヒト潰瘍性大腸炎検体でも β -catenin の核移行と CADM1 の発現が相関することが免疫組織染色で示されたことから、CADM1 が PI3K/ Akt/ β -catenin シグナル経路を促進していることが考えられた。またヒト大腸

がん細胞株に **CADM1** を一過性に発現させることにより β -catenin の核移行が促進されていることが示唆された。以上から **CADM1** は潰瘍性大腸炎の粘膜治癒促進に寄与し、結果として炎症の遷延を抑制していることが考えられた。

粘膜治癒は潰瘍性大腸炎の病態を考慮する上で重要なポイントであり、治療のうえでも症状のコントロールだけでなく、早期に粘膜治癒が行われた症例の方が長期的な臨床的寛解維持率・非手術率が高いことが報告されている[132]。また、2011年にマウスの大腸上皮の初期培養が可能となり[65]、現在では大腸上皮再生医療も視野に入れた注目すべき研究分野となっている[66, 133]。よって本研究は潰瘍性大腸炎の粘膜治癒の解明に大きく貢献するものと考えられた。

Cadm1 欠損マウスの死亡率が高かった原因として、**DSS** による腸管上皮損傷と炎症後の粘膜治癒の遅れにより管腔内から粘膜固有層への抗原透過性が亢進して炎症細胞の活性が誘導されたこと、または腸管上皮からの栄養分・水分の吸収不良による低栄養・脱水が進んだことが考えられた。**DSS** 誘発腸炎 day 8 において *Cadm1* 欠損マウスの血清中の **IL1- β** 、**IL-6** が有意に高く、抗原透過性亢進による自然免疫の亢進が考えられたこと、また血清生化学の結果より低タンパク血症や **BUN/Cre** の乖離や下大静脈の虚脱の所見より脱水が考えられたことがその裏付けとして示される。

CADM1 が上皮再生に関与する報告は伊藤らがラットの肝切除後の胆管上皮の再生や仔マウスの胆管上皮発生過程で **CADM1** が一時的に強発現することを免疫

組織染色もしくはウェスタンブロットにより示唆している[71]。また、肝硬変患者の肝臓検体やヒト胎児検体を用いて胆管上皮再生や発生過程における CADM1 の一時的発現を免疫組織染色で示している。興味深いことに、本研究の結果、胆管上皮と同様に腸管上皮においても CADM1 が上皮再生に関与することが明らかとなった。DSS 誘発腸炎マウスの腸管上皮の再生や仔マウスの腸管発生において一時的に CADM1 の発現がみられ、ヒトの潰瘍性大腸炎検体からは再生上皮の陰窩に CADM1 の発現が認められる結果が得られた。従って CADM1 が様々な臓器の上皮再生や発生に関与することが示唆され、胆管上皮、腸管上皮以外の臓器の上皮に対しても注目すべき結果となった。

はじめに CADM1 が一時的に発現している陰窩上皮細胞について考察する。

腸管上皮細胞群は単層細胞で構成され、①自己増殖能と多分化能を有する幹細胞(stem cell)、②高い増殖能を有する未分化細胞(transit-amplifying cell: TA cell)、③分化細胞に分けられる(図 23)[134]。大腸は絨毛を持たず管腔に面した部分と陰窩で形成されている。幹細胞は陰窩底部に存在し、幹細胞から分裂して陰窩側壁に移動した TA 細胞がさらに分裂を繰り返しながら管腔側へと移動し分化を遂げる。腸管上皮の分化細胞としては吸収上皮細胞(enterocyte)、杯細胞(goblet cell)、腸管内分泌細胞(enteroendocrine cell)、パネート細胞(Paneth cell)の 4 種類が知られるが、生理的な状況では大腸にパネート細胞は存在しない。パネート細胞は陰窩底部に局在するのに対して他の 3 種類の細胞は管腔側に局在し、最終的にアポトーシスにより管腔内

に脱落する。

CADM1 の発現が細胞増殖と相関するという結果より、CADM1 発現細胞の候補として分裂・増殖能の強い腸管上皮幹細胞に注目したが、腸管上皮幹細胞は陰窩底部に限定されて局在しているのに対し、本研究結果における CADM1 の局在は陰窩側壁から底部まですべてに発現していたことから、局在範囲で比較すると一致しないことから否定的であった。局在部位から考慮すると CADM1 発現細胞は TA 細胞である可能性が考えられた。しかし TA 細胞の細胞内シグナル伝達経路などの詳細な機能はまだ明らかとなっていない。さらに TA 細胞マーカーも確定されていないことから CADM1 発現細胞が TA 細胞であるかは特定できなかった。今後 TA 細胞マーカーが確立された際は、FACS もしくは蛍光免疫二重染色にて CADM1 との共局在を検討したい。

次に腸管上皮再生における CADM1 の機能について考察する。

これまでに腸管の再生に Wnt シグナルの活性[60]、Notch シグナルの抑制[61]、BMP シグナルの抑制[62]が重要であることが報告されている。特に Wnt シグナルのリガンドである Lgr5 が腸管上皮幹細胞の特異的分化マーカーとして同定され、腸管上皮増殖における Wnt/ β -catenin シグナル経路の重要性が注目された[135]。Goo らは PI3K/ Akt/ β -catenin シグナル経路も炎症後の腸管上皮再生に関与していると報告しており[63]、腸管上皮における β -catenin の活性化には Wnt/ β -catenin シグナル経路と PI3k/ Akt/ β -catenin シグナル経路の 2 つの経路が重要であることが示さ

れた(図 24)[64]。

一方 CADM1 は、PI3K とタンパク質複合体を形成し Akt のリン酸化を促進することが村上成文らの研究で示唆されている[136]。以上のことから、炎症後の再生上皮の細胞膜に CADM1 が一時的に発現して PI3K とタンパク質複合体を形成し、Akt のリン酸化を促進し、 β -catenin の核移行を促していることが考えられた(図 23)。本研究の結果、DSS 誘発腸炎マウスの day 9 において β -catenin の核移行が野生型マウスに認められ、さらにその割合は *Cadm1* 欠損マウスよりも多く、リン酸化 Akt の割合も野生型マウスで有意に多いことが示された。そして day 9 は野生型マウスの DSS 誘発腸炎の陰窩上皮では一時的に CADM1 が発現する時期であることも示された。以上から上皮再生過程で CADM1 が一時的に発現することにより Akt を活性化して β -catenin の核移行を促進させ、その結果細胞増殖を促進することが考えられた。In vitro の系では CADM1 が β -catenin の転写活性を促進制御する結果となった。また、潰瘍性大腸炎患者の大腸検体においても CADM1 の発現と β -catenin の核移行が相関していることが示された。但し、これらの相関が潰瘍性大腸炎に特異的な現象であるかは他の腸炎モデルや虚血性腸炎や閉塞性腸炎などの他のヒト腸炎サンプルを使用して比較検討する必要がある。

CADM1 と β -catenin の発現の相関性は以前にも Naishiro らに報告されている[137]。ラット腸管細胞株の IEC-6 細胞をテトラサイクリン遺伝子発現調節システムにより β -catenin の核移行を促進した細胞と親細胞との DNA マイクロアレイの結果、

CADM1 は β -catenin の核移行とは逆相関した。一方、*Apc* 遺伝子変異をもち β -catenin の核移行の多い Min マウスの大腸腺腫においては CADM1 と β -catenin の発現は正相関することが qRT-PCR で示されている。その *in vitro* と *in vivo* の結果の相違に関し、原因は明らかにされなかったが、*in vivo* の系の腸管上皮において CADM1 は β -catenin の核移行と相関することが示されており、本研究結果と矛盾しない内容であった。

炎症性腸疾患に関連した発癌メカニズムは未だに十分解明はされていないが、 β -catenin の核移行による転写活性化が炎症性腸疾患に伴う発癌に関与することが報告されている[124, 138, 139]。本研究の結果からがん抑制遺伝子である *CADM1* は潰瘍性大腸炎の発癌リスク増加にも関連する可能性があり、大変興味深い。しかしホメオスタシスのための一時的な上皮再生増殖には関与している可能性も考えられ、慢性的に増殖を続ける大腸癌には関与していない可能性も考えられた。これまでに大腸癌における *CADM1* の発現はその悪性度と逆相関することが報告されているが[103, 104]、大腸の炎症性発癌に関して報告はない。*CADM1* が潰瘍性大腸炎の発癌に関わっているか否かを示すためには低濃度の DSS と発癌誘発剤である AOM (azoxymethan)による腸炎期と回復期の頻回サイクルを施行した実験が必要であり、今後の課題と考えられた。また、炎症後の一時的な上皮再生増殖のための *CADM1* 発現の on/off の機序に関しても現時点では明らかとされていないため、今後の課題と考えられた。

CADM1 と炎症細胞に関しては樹状細胞、T 細胞、肥満細胞に CADM1 の発現が報告されていたことから潰瘍性大腸炎にも関与するか否かを検討した。まず DSS 誘発腸炎の病理組織では *Cadm1* 欠損マウスと野生型マウスとで炎症細胞浸潤の著明な違いを認めなかった。また腸炎組織切片にて樹状細胞、肥満細胞とも CADM1 との共局在を認めず、FACS 解析の結果 CADM1 陽性細胞が T 細胞とは細胞形状が違うことが明らかとなった。そして腸管粘膜固有層内単核細胞において mRNA レベルで *Cadm1* の発現がほとんど認められなかったことから、本研究においては CADM1 は炎症細胞に関与しないと考えられた。粘膜固有層内の CADM1 陽性細胞はかなり少量ではあったが認められた。しかし何細胞であるかの特定は難しく、mRNA レベルで *Cadm1* 発現が粘膜固有層内単核細胞にほとんど認められないということからこれ以上の追究は行わなかった。

血清サイトカインに関しては、DSS 誘発腸炎 day 8 において *Cadm1* 欠損マウスの血清中の IL-1 β 、IL-6 が野生型マウスと比較して有意に高く、day 4 において IL-10 が、day 2、day 4 において TGF- β が有意に低値であった。IL-1 β 、IL-6 は腸管においては急性炎症にてマクロファージから分泌されるサイトカインであり、自然免疫を構成する[146]。本研究では DSS 投与により腸管上皮損傷が惹起され、自然免疫が亢進されて継時的に上昇傾向となり、IL-1 β 、IL-6 の値が day 10 で最大値となったと考えられた。day 8 で IL-1 β 、IL-6 が野生型マウスよりも *Cadm1* 欠損マウスの方が有意に高値であったのは、day 8 前後での腸管粘膜上皮の損傷範囲が *Cadm1* 欠

損マウスの方が広範囲であることから、*Cadm1* 欠損マウスでより抗原透過性亢進が起きていたことによる結果と考えた。day 10において *Cadm1* 欠損マウスが野生型マウスよりも IL-1 β 、IL-6 の値が高値となることが予想されたが、day 8以降で *Cadm1* 欠損マウスの死亡率が高いために day 10で生存している *Cadm1* 欠損マウスの IL-1 β 、IL-6 の値が野生型マウスと同程度になったのではないかと考えた。IL-10は活性化マクロファージと樹状細胞の抑制因子であり、自然免疫と細胞性免疫の制御に関与しており、また TGF- β も活性化マクロファージや T 細胞の増殖を抑制する働きをもつ[145]。よって IL-1 β 、IL-6 を含む炎症性サイトカインの最大値である day 10以降において野生型マウスでも *Cadm1* 欠損マウスでも IL-10、TGF- β が上昇しているのは、炎症抑制因子としての反応と考えられた。しかし、急性炎症の初期である day 4以前で野生型マウスの IL-10、TGF- β が高値であることに関しては、同様のデータがなく機序は不明である。TGF- β は腸管上皮修復に作用する報告があるため[48, 49]、*Cadm1* 欠損マウスの day 2、day 4で TGF- β の分泌が有意に低いことで粘膜修復の遅延に関わった可能性は考えられたが、CADM1 と TGF- β との関与は報告されておらず現時点では不明であった。

最後に本研究の結果から臨床現場において期待される役割について考察する。潰瘍性大腸炎の治療はこれまで症状改善、症状コントロールが治療目標であった。しかし近年、早期に粘膜治癒が行われた症例の方が長期的な臨床的寛解維持率・非手術率が高いことが報告されていることから[132]、主観的な症状の寛解だけでは不

十分で、粘膜治癒という客観的な指標が潰瘍性大腸炎の治療目的となっている [141]。本研究では、潰瘍性大腸炎患者の大腸検体の免疫組織染色の結果、炎症があるほとんどの上皮が **CADM1** 陰性であり、一部再生している陰窩上皮にのみ **CADM1** の染色を認めた。臨床現場において、粘膜治癒は下部消化管内視鏡と生検にて判断しているが、**CADM1** 発現の有無で潰瘍性大腸炎の腸管上皮再生能が測定可能となり、長期予後のバイオマーカーとなる可能性が考えられた。**CADM1** 発現と長期予後の相関性に関しては、今後臨床サンプルを使用した前向き試験が必要となるが、治療過程の判断材料の一つになり得ると考えられた。また、潰瘍性大腸炎患者の大腸において **CADM1** 発現を誘導することにより粘膜治癒を促進できる可能性も考えられる。そのためには、レトロウイルスなどをベクターとした、**CADM1** の遺伝子治療に対する基礎研究が今後は必要と考えられる。また、近年注目されている腸管上皮細胞の初期培養と粘膜欠損部位への移植にも、**CADM1** が発現することで細胞増殖、粘膜治癒促進、欠損部への接着強化に寄与する可能性があることから、再生医療を担う可能性も考えられる。

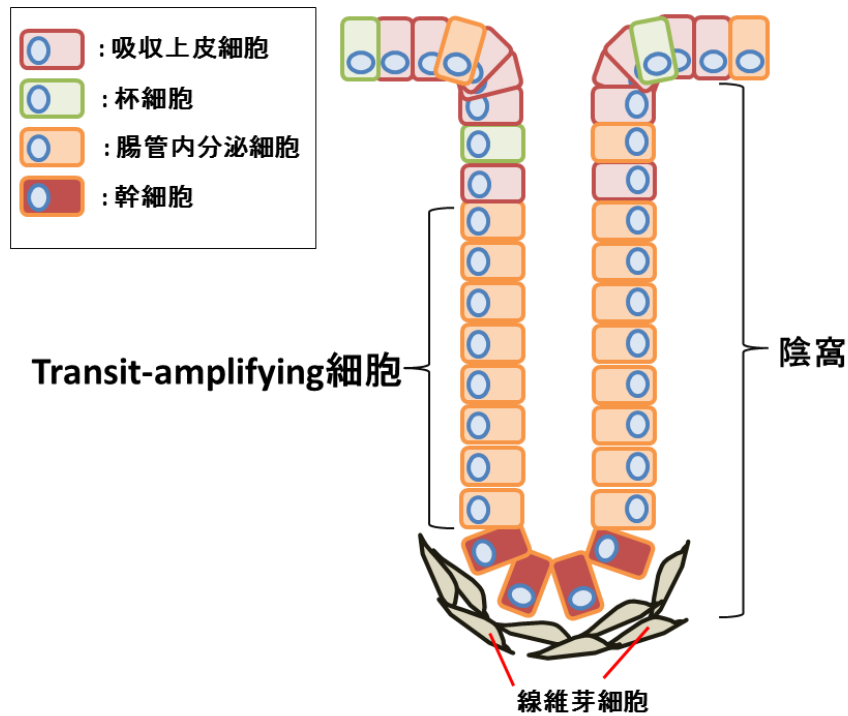


図 23. 腸管上皮を構成する細胞群

現在判明している大腸腸管上皮を構成する細胞の種類と存在部位の模式図。

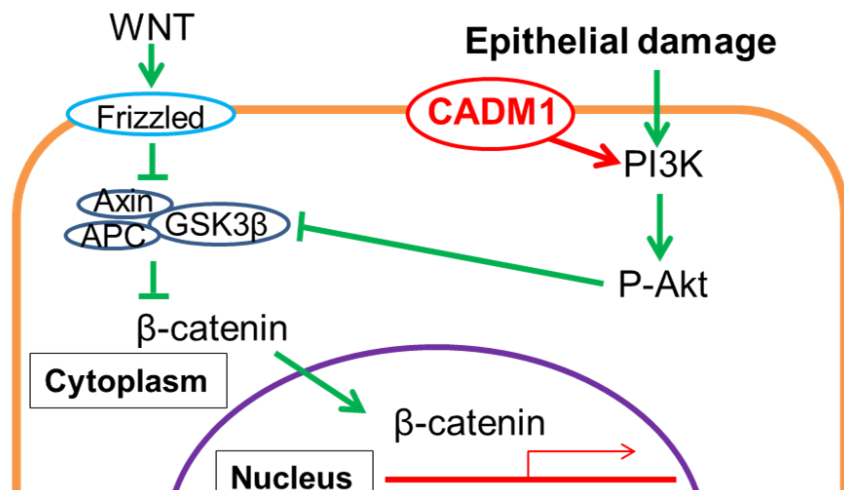


図 24. 腸管上皮再生における増殖シグナル伝達に対する CADM1 の関与

腸管上皮再生における β -catenin の核移行を促進する系として、Wnt/ β -catenin シグナル経路と PI3K/ Akt/ β -catenin シグナル経路が報告されている。細胞膜に発現する CADM1 が PI3K と複合体を形成し、Akt を活性化させ、 β -catenin の核移行を促進する可能性が考えられる。

結論

細胞接着分子 CADM1 は DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて、腸管上皮の再生を促進することで腸炎の遷延を抑制することが示唆された。その機構として CADM1 が β -catenin の核移行を促進し、細胞増殖を促していることが考えられた。また CADM1 発現と β -catenin の核移行との相関は潰瘍性大腸炎の検体においても示された。

謝辞

本研究をまとめるにあたり御指導御鞭撻を賜りました指導教官である東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の村上善則教授に深謝申し上げます。マウスやヒトの病理診断や方法等で多くの御指導御協力を賜りました東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の松原大祐講師に心より感謝を表します。坪井裕見博士には研究の基礎から丁寧な指導と研究者としてのあるべき姿勢、貴重なご助言を賜りましたことを心より御礼申し上げます。ヒトの病理検体の使用の際にご尽力いただきました東京大学医科学研究所附属病院外科の篠崎大科長、東京大学医科学研究所附属病院検査科の大田泰徳講師に謝意を表します。そして、5年間の研究生活において様々な面で御指導御協力頂いた東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野の伊藤彰彦先生(現・近畿大学医学部病理学講座教授)、後藤明輝先生(現・秋田大学医学部器官病態学講座教授)、櫻井美佳客員研究員、岩井美和子博士、斉藤杏里博士、増田智子氏、市原博美氏、岩田聖子氏、河本貴子氏、安藤朋子氏、河原元氏、串田佐登美氏、永田政義博士、高橋由佳博士、川合剛人博士、萩山満博士、見前隆洋博士、桑野秀規博士、中岡寛樹氏、伊東剛氏、許淑真氏、Wael Osman氏、IBRAHIM Reem氏、熊谷友紀氏、小粥浩之氏、明石健氏、金谷淳志氏、平郁氏、土屋武弘氏、顔暁珮氏、岡田悠衣氏、野口美咲氏、牧谷佳苗氏、室井正謙氏に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. 菅野健太郎, 上西紀夫, 井廻道夫. 消化器疾患 最新の治療 2013-2014. 長堀正和, 渡辺 守: 198-201, 2013.
2. 難病医学研究財団 難病情報センター. 潰瘍性大腸炎の年度別患者数の推移. edited by 厚生労働省. 難病医学研究財団 難病情報センター: 2011
3. 平井 孝、加藤知行、金光幸秀. 炎症性腸疾患と大腸癌：第55回大腸癌研究会アンケート結果. 胃と腸 37: 7, 887-893, 2002.
4. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, and Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 124: 1767-1773, 2003.
5. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, and Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 12: 3668-3672, 2006.
6. Nomura E, Kinouchi Y, Negoro K, Kojima Y, Oomori S, Sugimura M, Hiroki M, Takagi S, Aihara H, Takahashi S, Hiwatashi N, and Shimosegawa T. Mapping of a disease susceptibility locus in chromosome 6p in Japanese patients with ulcerative colitis. *Genes Immun* 5: 477-483, 2004.
7. Umeno J, Asano K, Matsushita T, Matsumoto T, Kiyohara Y, Iida M, Nakamura Y, Kamatani N, and Kubo M. Meta-analysis of published studies identified eight

additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis.

Inflamm Bowel Dis 17: 2407-2415, 2011.

8. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, Mathew CG, Schreiber S, and group Is. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 40: 1319-1323, 2008.
9. Asano K, Matsushita T, Umeno J, Hosono N, Takahashi A, Kawaguchi T, Matsumoto T, Matsui T, Kakuta Y, Kinouchi Y, Shimosegawa T, Hosokawa M, Arimura Y, Shinomura Y, Kiyohara Y, Tsunoda T, Kamatani N, Iida M, Nakamura Y, and Kubo M. A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nat Genet* 41: 1325-1329, 2009.
10. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, and Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142: 46-54.e42; quiz e30, 2012.
11. Birrenbach T, and Böcker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis*

- 10: 848-859, 2004.
12. Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18: 481-496, 2004.
 13. Berg DJ, Zhang J, Weinstock JV, Ismail HF, Earle KA, Alila H, Pamukcu R, Moore S, and Lynch RG. Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology* 123: 1527-1542, 2002.
 14. Vessey M, Jewell D, Smith A, Yeates D, and McPherson K. Chronic inflammatory bowel disease, cigarette smoking, and use of oral contraceptives: findings in a large cohort study of women of childbearing age. *Br Med J (Clin Res Ed)* 292: 1101-1103, 1986.
 15. Acheson ED, and True Love SC. Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls. *Br Med J* 2: 929-933, 1961.
 16. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, and Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 344: 808-814, 2001.
 17. Naganuma M, Iizuka B, Torii A, Ogihara T, Kawamura Y, Ichinose M, Kojima Y, Hibi T, and Club TG. Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis and reduces its recurrence: results of a multicenter case-controlled study in Japan. *Am J Gastroenterol* 96: 1123-1126, 2001.
 18. Weinstock JV, and Elliott DE. Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm*

Bowel Dis 15: 128-133, 2009.

19. Mosmann TR, and Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173, 1989.
20. 清野 宏. 臨床粘膜免疫学. 本田賢也, 竹田 潔: 293-302, 2010.
21. 清野 宏. 臨床粘膜免疫学. 永石宇司, 渡辺 守: 369-383, 2010.
22. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, and Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 157: 1261-1270, 1996.
23. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, and Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70, 2003.
24. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, and Fujiyama Y. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 129: 969-984, 2005.
25. Powrie JK, Watts GF, Smith GD, Sönksen PH, and Jones RH. Short-term effects of

- mepacrine on serum lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 43: 131-134, 1994.
26. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, and Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-342, 2003.
27. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, and Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* 3: 1034, 2012.
28. Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, Parkos CA, and Denning TL. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest* 121: 4787-4795, 2011.
29. Ueda Y, Kayama H, Jeon SG, Kusu T, Isaka Y, Rakugi H, Yamamoto M, and Takeda K. Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *Int Immunol* 22: 953-962, 2010.
30. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, and Kronenberg M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 10: 1178-1184, 2009.

31. Coombes JL, and Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8: 435-446, 2008.
32. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, and Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204: 1775-1785, 2007.
33. Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Förster R, and Agace WW. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 202: 1063-1073, 2005.
34. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134: 577-594, 2008.
35. Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, Ito S, Glickman JN, and Glimcher LH. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 131: 33-45, 2007.
36. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, and Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44-54, 2002.
37. Abraham C, and Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361: 2066-2078, 2009.
38. Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, and Sato N. Induction of

experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 52: 79-83, 2003.

39. Ohkusa T, Nomura T, Terai T, Miwa H, Kobayashi O, Hojo M, Takei Y, Ogihara T, Hirai S, Okayasu I, and Sato N. Effectiveness of antibiotic combination therapy in patients with active ulcerative colitis: a randomized, controlled pilot trial with long-term follow-up. *Scand J Gastroenterol* 40: 1334-1342, 2005.
40. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, and Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129: 550-564, 2005.
41. Blair SA, Kane SV, Clayburgh DR, and Turner JR. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. *Lab Invest* 86: 191-201, 2006.
42. Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, and Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56: 61-72, 2007.
43. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev*

- Immunol 9: 799-809, 2009.
44. Sturm A, and Dignass AU. Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14: 348-353, 2008.
 45. Qualtrough D, Smallwood K, Littlejohns D, and Pignatelli M. The actin-bundling protein fascin is overexpressed in inflammatory bowel disease and may be important in tissue repair. *BMC Gastroenterol* 11: 14, 2011.
 46. Dignass AU. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm Bowel Dis* 7: 68-77, 2001.
 47. Okamoto R, and Watanabe M. Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci* 50 Suppl 1: S34-38, 2005
 48. Dignass AU, and Podolsky DK. Interleukin 2 modulates intestinal epithelial cell function in vitro. *Exp Cell Res* 225: 422-429, 1996.
 49. McKaig BC, Makh SS, Hawkey CJ, Podolsky DK, and Mahida YR. Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF-beta3. *Am J Physiol* 276: G1087-1093, 1999.
 50. Sasaki H, Hirai K, Yamamoto H, Tanooka H, Sakamoto H, Iwamoto T, Takahashi T, Terada M, and Ochiya T. HST-1/FGF-4 plays a critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene* 23: 3681-3688, 2004.
 51. Ramsanahie AP, Perez A, Duensing AU, Zinner MJ, Ashley SW, and Whang EE.

- Glucagon-like peptide 2 enhances intestinal epithelial restitution. *J Surg Res* 107: 44-49, 2002.
52. Göke MN, Schneider M, Beil W, and Manns MP. Differential glucocorticoid effects on repair mechanisms and NF-kappaB activity in the intestinal epithelium. *Regul Pept* 105: 203-214, 2002.
53. Nishimura S, Takahashi M, Ota S, Hirano M, and Hiraishi H. Hepatocyte growth factor accelerates restitution of intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 33: 172-178, 1998.
54. Sinha A, Nightingale J, West KP, Berlanga-Acosta J, and Playford RJ. Epidermal growth factor enemas with oral mesalamine for mild-to-moderate left-sided ulcerative colitis or proctitis. *N Engl J Med* 349: 350-357, 2003.
55. Sandborn WJ, Sands BE, Wolf DC, Valentine JF, Safdi M, Katz S, Isaacs KL, Wruble LD, Katz J, Present DH, Loftus EV, Graeme-Cook F, Odenheimer DJ, and Hanauer SB. Repifermin (keratinocyte growth factor-2) for the treatment of active ulcerative colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Aliment Pharmacol Ther* 17: 1355-1364, 2003.
56. Zbar AP, Simopoulos C, and Karayiannakis AJ. Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution. *J Gastroenterol* 39: 413-421, 2004.

57. Strauch ED, Yamaguchi J, Bass BL, and Wang JY. Bile salts regulate intestinal epithelial cell migration by nuclear factor-kappa B-induced expression of transforming growth factor-beta. *J Am Coll Surg* 197: 974-984, 2003.
58. Rao JN, Li J, Li L, Bass BL, and Wang JY. Differentiated intestinal epithelial cells exhibit increased migration through polyamines and myosin II. *Am J Physiol* 277: G1149-1158, 1999.
59. Clevers H, and Batlle E. SnapShot: the intestinal crypt. *Cell* 152: 1198-1198.e1192, 2013.
60. de Lau W, Barker N, Low TY, Koo BK, Li VS, Teunissen H, Kujala P, Haegebarth A, Peters PJ, van de Wetering M, Stange DE, van Es JE, Guardavaccaro D, Schasfoort RB, Mohri Y, Nishimori K, Mohammed S, Heck AJ, and Clevers H. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476: 293-297, 2011.
61. Pellegrinet L, Rodilla V, Liu Z, Chen S, Koch U, Espinosa L, Kaestner KH, Kopan R, Lewis J, and Radtke F. Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology* 140: 1230-1240.e1231-1237, 2011.
62. Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, and Clevers H. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in

mouse intestine. *Science* 303: 1684-1686, 2004.

63. Lee G, Goretsky T, Managlia E, Dirisina R, Singh AP, Brown JB, May R, Yang GY, Ragheb JW, Evers BM, Weber CR, Turner JR, He XC, Katzman RB, Li L, and Barrett TA. Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis. *Gastroenterology* 139: 869-881, 881.e861-869, 2010.
64. Anderson EC, and Wong MH. Caught in the Akt: regulation of Wnt signaling in the intestine. *Gastroenterology* 139: 718-722, 2010.
65. Jung P, Sato T, Merlos-Suárez A, Barriga FM, Iglesias M, Rossell D, Auer H, Gallardo M, Blasco MA, Sancho E, Clevers H, and Batlle E. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 17: 1225-1227, 2011.
66. Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, and Watanabe M. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5⁺ stem cell. *Nat Med* 18: 618-623, 2012.
67. Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, and Murakami Y. TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 27: 427-430, 2001.

68. Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, and Murakami Y. The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 277: 31014-31019, 2002.
69. Gomyo H, Arai Y, Tanigami A, Murakami Y, Hattori M, Hosoda F, Arai K, Aikawa Y, Tsuda H, Hirohashi S, Asakawa S, Shimizu N, Soeda E, Sakaki Y, and Ohki M. A 2-Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2. *Genomics* 62: 139-146, 1999.
70. Ito A, Okada M, Uchino K, Wakayama T, Koma Y, Iseki S, Tsubota N, Okita Y, and Kitamura Y. Expression of the TSLC1 adhesion molecule in pulmonary epithelium and its down-regulation in pulmonary adenocarcinoma other than bronchioloalveolar carcinoma. *Lab Invest* 83: 1175-1183, 2003.
71. Ito A, Nishikawa Y, Ohnuma K, Ohnuma I, Koma Y, Sato A, Enomoto K, Tsujimura T, and Yokozaki H. SgIGSF is a novel biliary-epithelial cell adhesion molecule mediating duct/ductule development. *Hepatology* 45: 684-694, 2007.
72. Koma Y, Furuno T, Hagiwara M, Hamaguchi K, Nakanishi M, Masuda M, Hirota S, Yokozaki H, and Ito A. Cell adhesion molecule 1 is a novel pancreatic-islet cell adhesion molecule that mediates nerve-islet cell interactions. *Gastroenterology* 134: 1544-1554, 2008.
73. Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, Kavalali ET, and Südhof TC.

- SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297: 1525-1531, 2002.
74. Wakayama T, Koami H, Ariga H, Kobayashi D, Sai Y, Tsuji A, Yamamoto M, and Iseki S. Expression and functional characterization of the adhesion molecule spermatogenic immunoglobulin superfamily in the mouse testis. *Biol Reprod* 68: 1755-1763, 2003.
75. Galibert L, Diemer GS, Liu Z, Johnson RS, Smith JL, Walzer T, Comeau MR, Rauch CT, Wolfson MF, Sorensen RA, Van der Vuurst de Vries AR, Branstetter DG, Koelling RM, Scholler J, Fanslow WC, Baum PR, Derry JM, and Yan W. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J Biol Chem* 280: 21955-21964, 2005.
76. Ito A, Jippo T, Wakayama T, Morii E, Koma Y, Onda H, Nojima H, Iseki S, and Kitamura Y. SgIGSF: a new mast-cell adhesion molecule used for attachment to fibroblasts and transcriptionally regulated by MITF. *Blood* 101: 2601-2608, 2003.
77. Kim HR, Jeon BH, Lee HS, Im SH, Araki M, Araki K, Yamamura K, Choi SC, Park DS, and Jun CD. IGSF4 is a novel TCR ζ -chain-interacting protein that enhances TCR-mediated signaling. *J Exp Med* 208: 2545-2560, 2011.
78. Wakayama T, Ohashi K, Mizuno K, and Iseki S. Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic

- cells. *Mol Reprod Dev* 60: 158-164, 2001.
79. Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, Satoh K, Takeuchi M, Imai T, Monden M, and Takai Y. Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *J Biol Chem* 278: 35421-35427, 2003.
80. Fujita E, Kouroku Y, Ozeki S, Tanabe Y, Toyama Y, Maekawa M, Kojima N, Senoo H, Toshimori K, and Momoi T. Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking RA175/TSLC1/SynCAM/IGSF4A, a cell adhesion molecule in the immunoglobulin superfamily. *Mol Cell Biol* 26: 718-726, 2006.
81. Hui AB, Lo KW, Kwong J, Lam EC, Chan SY, Chow LS, Chan AS, Teo PM, and Huang DP. Epigenetic inactivation of TSLC1 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinog* 38: 170-178, 2003.
82. Lung HL, Cheng Y, Kumaran MK, Liu ET, Murakami Y, Chan CY, Yau WL, Ko JM, Stanbridge EJ, and Lung ML. Fine mapping of the 11q22-23 tumor suppressive region and involvement of TSLC1 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 112: 628-635, 2004.
83. Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, Murakami Y, and Imamura M. Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell

- carcinoma. *Cancer Res* 63: 6320-6326, 2003.
84. Honda T, Tamura G, Waki T, Jin Z, Sato K, Motoyama T, Kawata S, Kimura W, Nishizuka S, and Murakami Y. Hypermethylation of the TSLC1 gene promoter in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 93: 857-860, 2002.
85. Zhang W, Zhou L, Ding SM, Xie HY, Xu X, Wu J, Chen QX, Zhang F, Wei BJ, Eldin AT, and Zheng SS. Aberrant methylation of the CADM1 promoter is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma treated with liver transplantation. *Oncol Rep* 25: 1053-1062, 2011.
86. Jansen M, Fukushima N, Rosty C, Walter K, Altink R, Heek TV, Hruban R, Offerhaus JG, and Goggins M. Aberrant methylation of the 5' CpG island of TSLC1 is common in pancreatic ductal adenocarcinoma and is first manifest in high-grade PanINs. *Cancer Biol Ther* 1: 293-296, 2002.
87. Allinen M, Peri L, Kujala S, Lahti-Domenici J, Outila K, Karppinen SM, Launonen V, and Winqvist R. Analysis of 11q21-24 loss of heterozygosity candidate target genes in breast cancer: indications of TSLC1 promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 384-389, 2002.
88. Takahashi Y, Iwai M, Kawai T, Arakawa A, Ito T, Sakurai-Yageta M, Ito A, Goto A, Saito M, Kasumi F, and Murakami Y. Aberrant expression of tumor suppressors

CADM1 and 4.1B in invasive lesions of primary breast cancer. *Breast Cancer* 19: 242-252, 2012.

89. Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, and Snijders PJ. TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 96: 294-305, 2004.
90. Overmeer RM, Henken FE, Snijders PJ, Claassen-Kramer D, Berkhof J, Helmerhorst TJ, Heideman DA, Wilting SM, Murakami Y, Ito A, Meijer CJ, and Steenbergen RD. Association between dense CADM1 promoter methylation and reduced protein expression in high-grade CIN and cervical SCC. *J Pathol* 215: 388-397, 2008.
91. Yang N, Nijhuis ER, Volders HH, Eijssink JJ, Lendvai A, Zhang B, Hollema H, Schuurin E, Wisman GB, and van der Zee AG. Gene promoter methylation patterns throughout the process of cervical carcinogenesis. *Cell Oncol* 32: 131-143, 2010.
92. Fukuhara H, Kuramochi M, Fukami T, Kasahara K, Furuhashi M, Nobukuni T, Maruyama T, Isogai K, Sekiya T, Shuin T, Kitamura T, Reeves RH, and Murakami Y. Promoter methylation of TSLC1 and tumor suppression by its gene product in human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 93: 605-609, 2002.
93. Surace EI, Lusic E, Murakami Y, Scheithauer BW, Perry A, and Gutmann DH. Loss of tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) expression in meningioma correlates with increased malignancy grade and reduced patient survival. *J Neuropathol Exp*

Neurol 63: 1015-1027, 2004.

94. Zhiling Y, Fujita E, Tanabe Y, Yamagata T, Momoi T, and Momoi MY. Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 926-929, 2008.
95. Watabe K, Ito A, Koma Y, Wakayama T, Iseki S, Shinomura Y, and Kitamura Y. Distinct roles for the SgIGSF adhesion molecule and c-kit receptor tyrosine kinase in the interaction between mast cells and the mesentery. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 782-788, 2004.
96. Hagiwara M, Inoue T, Furuno T, Iino T, Itami S, Nakanishi M, Asada H, Hosokawa Y, and Ito A. Increased expression of cell adhesion molecule 1 by mast cells as a cause of enhanced nerve-mast cell interaction in a hapten-induced mouse model of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 168: 771-778, 2013.
97. Yang W, Kaur D, Okayama Y, Ito A, Wardlaw AJ, Brightling CE, and Bradding P. Human lung mast cells adhere to human airway smooth muscle, in part, via tumor suppressor in lung cancer-1. *J Immunol* 176: 1238-1243, 2006.
98. Arase N, Takeuchi A, Unno M, Hirano S, Yokosuka T, Arase H, and Saito T. Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8⁺ T cells. *Int Immunol* 17: 1227-1237, 2005.
99. Takeuchi A, Itoh Y, Takumi A, Ishihara C, Arase N, Yokosuka T, Koseki H,

- Yamasaki S, Takai Y, Miyoshi J, Ogasawara K, and Saito T. CRTAM confers late-stage activation of CD8⁺ T cells to regulate retention within lymph node. *J Immunol* 183: 4220-4228, 2009.
100. Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, Maruyama T, Shibuya M, and Murakami Y. Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* 62: 5129-5133, 2002.
101. Tran YK, Böglér O, Gorse KM, Wieland I, Green MR, and Newsham IF. A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer. *Cancer Res* 59: 35-43, 1999.
102. Fukuhara H, Masuda M, Yageta M, Fukami T, Kuramochi M, Maruyama T, Kitamura T, Murakami Y, and Masvuda M. Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of *Drosophila* tumor suppressor Dlg. *Oncogene* 22: 6160-6165, 2003.
103. Chen K, Wang G, Peng L, Liu S, Fu X, Zhou Y, Yu H, Li A, Li J, Zhang S, Bai Y, and Zhang Y. CADM1/TSLC1 inactivation by promoter hypermethylation is a frequent event in colorectal carcinogenesis and correlates with late stages of the disease. *Int J Cancer* 128: 266-273, 2011.
104. Zhang J, Ning J, Geng J, Cui B, and Dong X. Down-regulation of tumor suppressor in lung cancer 1 (TSLC1) expression correlates with poor prognosis in patients with

- colon cancer. *J Mol Histol* 43: 715-721, 2012.
105. Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, and Colonna M. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8⁺ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 106: 779-786, 2005.
106. Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama T, Ohta T, Nakae D, Maekawa A, Kitamura T, and Murakami Y. Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* 26: 3610-3624, 2006.
107. Ito T, Williams-Nate Y, Iwai M, Tsuboi Y, Hagiwara M, Ito A, Sakurai-Yageta M, and Murakami Y. Transcriptional regulation of the CADM1 gene by retinoic acid during the neural differentiation of murine embryonal carcinoma P19 cells. *Genes Cells* 16: 791-802, 2011.
108. Ohkusa T. [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. *Jpn J Gastroenterol* 82: 1327-1336, 1985.
109. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, and Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109: 1344-1367, 1995.
110. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, and Nakaya R. A novel

method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98: 694-702, 1990.

111. Waldner MJ, and Neurath MF. Chemically induced mouse models of colitis. *Curr Protoc Pharmacol Chapter 5: Unit 5.55*, 2009.
112. Koon HW, Shih DQ, Chen J, Bakirtzi K, Hing TC, Law I, Ho S, Ichikawa R, Zhao D, Xu H, Gallo R, Dempsey P, Cheng G, Targan SR, and Pothoulakis C. Cathelicidin signaling via the Toll-like receptor protects against colitis in mice. *Gastroenterology* 141: 1852-1863.e1851-1853, 2011.
113. Dirisina R, Katzman RB, Goretsky T, Managlia E, Mittal N, Williams DB, Qiu W, Yu J, Chandel NS, Zhang L, and Barrett TA. p53 and PUMA independently regulate apoptosis of intestinal epithelial cells in patients and mice with colitis. *Gastroenterology* 141: 1036-1045, 2011.
114. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, and Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 69: 238-249, 1993.
115. Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, and Calixto JB. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol* 187: 1957-1969, 2011.
116. Williams KL, Fuller CR, Dieleman LA, DaCosta CM, Haldeman KM, Sartor RB,

and Lund PK. Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone.

Gastroenterology 120: 925-937, 2001.

117. Weigmann B, Tubbe I, Seidel D, Nicolaev A, Becker C, and Neurath MF. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. Nat Protoc 2: 2307-2311, 2007.

118. 三浦裕士. 染色法のすべて. 羽山正義: 104-107, 1992.

119. Ito A, Hagiyaama M, Oonuma J, Murakami Y, Yokozaki H, and Takaki M.

Involvement of the SgIGSF/Necl-2 adhesion molecule in degranulation of mesenteric mast cells. J Neuroimmunol 184: 209-213, 2007.

120. Junker Y, Bode H, Wahnschaffe U, Kroesen A, Loddenkemper C, Duchmann R, Zeitz M, and Ullrich R. Comparative analysis of mononuclear cells isolated from mucosal lymphoid follicles of the human ileum and colon. Clin Exp Immunol 156: 232-237, 2009.

121. Crosnier C, Stamatakis D, and Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. Nat Rev Genet 7: 349-359, 2006.

122. McConnell BB, Bialkowska AB, Nandan MO, Ghaleb AM, Gordon FJ, and Yang VW. Haploinsufficiency of Krüppel-like factor 5 rescues the tumor-initiating effect of the Apc(Min) mutation in the intestine. Cancer Res 69: 4125-4133, 2009.

123. Valenta T, Hausmann G, and Basler K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J* 31: 2714-2736, 2012.
124. Hasselblatt P, Gresh L, Kudo H, Guinea-Viniegra J, and Wagner EF. The role of the transcription factor AP-1 in colitis-associated and beta-catenin-dependent intestinal tumorigenesis in mice. *Oncogene* 27: 6102-6109, 2008.
125. Sellin JH, Umar S, Xiao J, and Morris AP. Increased beta-catenin expression and nuclear translocation accompany cellular hyperproliferation in vivo. *Cancer Res* 61: 2899-2906, 2001.
126. Brown JB, Cheres P, Goretsky T, Managlia E, Grimm GR, Ryu H, Zadeh M, Dirisina R, and Barrett TA. Epithelial phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for β -catenin activation and host defense against *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun* 79: 1863-1872, 2011.
127. Franke TF, Kaplan DR, and Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88: 435-437, 1997.
128. Burgering BM, and Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376: 599-602, 1995.
129. Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, and Tschlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81: 727-736, 1995.

130. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, and Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15: 6541-6551, 1996.
131. Toker A, and Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 275: 8271-8274, 2000.
132. Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W, Esser D, Wang Y, Lang Y, Marano CW, Strauss R, Oddens BJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lichtenstein GR, Present D, Sands BE, and Sandborn WJ. Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 141: 1194-1201, 2011.
133. 中村哲也, 油井史郎, 渡辺 守. 上皮細胞移植は消化管を再生できるか. *分子消化器病* 9: 2, 113-118, 2012.
134. 油井史郎, 中村哲也, 渡辺 守. 腸管上皮幹細胞と大腸癌幹細胞. *医学のあゆみ* 230: 855-860, 2009.
135. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, and Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449: 1003-1007, 2007.
136. 村上成文 細胞伸長を抑制する低分子化合物の探索によるCADM1シグナル

伝達経路の解析 東京大学大学院医学系研究科博士論文 2012 (未公刊)

137. Naishiro Y, Yamada T, Idogawa M, Honda K, Takada M, Kondo T, Imai K, and Hirohashi S. Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic beta-catenin protein. *Oncogene* 24: 3141-3153, 2005.
138. Imai T, Fukuta K, Hasumura M, Cho YM, Ota Y, Takami S, Nakagama H, and Hirose M. Significance of inflammation-associated regenerative mucosa characterized by Paneth cell metaplasia and beta-catenin accumulation for the onset of colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 28: 2199-2206, 2007.
139. Yoshimi K, Tanaka T, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Mashimo T, Serikawa T, and Kuramoto T. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel *Apc* mutant rat. *Cancer Sci* 100: 2022-2027, 2009.
140. Krishnan K, Arnone B, and Buchman A. Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing. *Inflamm Bowel Dis* 17: 410-422, 2011.
141. 伊藤裕章.炎症性腸疾患に対する分子標的製剤と粘膜修復. *Parma Medica* 30: 9, 23-27, 2012
142. Tanaka-Okamoto M, Hori K, Ishizaki H, Itoh Y, Onishi S, Yonemura S, Takai Y and Miyoshi J. Involvement of afadin in barrier function and homeostasis of mouse

intestinal epithelia. *J Cell Sci* 124: 2231-2240, 2011.

143. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Efstathiou J, Valizadeh A, Noda M, Playford RJ, Kmiot W, and Pignatelli M. Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 185: 413-418, 1998.
144. Hanby AM, Chinery R, Poulson R, Playford RJ, and Pignatelli M. Downregulation of E-cadherin in the reparative epithelium of the human gastrointestinal tract. *Am J Pathol* 148: 723-729, 1996.
145. 松島綱治, 山田幸宏. 分子細胞免疫学. 遠田悦子, 山田幸宏: 261-321, 2011