

厚生科学研究費補助金
特定疾患研究事業

炎症性腸疾患の予後改善を目指した
消化管上皮細胞回転の研究

平成13年度 総括研究報告書

主任研究者 土肥多恵子

平成14年（2002）3月

目次

I. 総括研究報告書

炎症性腸疾患の予後改善を目指した消化管上皮細胞回転の研究 _____	3
土肥 多恵子	

II. 分担研究報告書

マウス腸炎モデルにおける消化管上皮再生の解析 _____	9
土肥 多恵子	

上皮細胞の増殖と分化の解析 _____	12
小島 至	

マウス腸炎モデルにおける発癌機構の解析 _____	14
中島 淳	

炎症性腸疾患における増殖・分化及び発癌因子の解析 _____	17
小西 文雄	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____	19
---------------------------	----

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総合研究報告書

炎症性腸疾患の予後改善を目指した消化管上皮細胞回転の研究

主任研究者 土肥多恵子

国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部・部長

研究要旨：炎症性腸疾患組織にはそれぞれに特徴的な組織再生・修復に異常をきたすメカニズムがあり、クローン病（CD）における裂溝潰瘍や、潰瘍性大腸炎（UC）を母地とした大腸癌が発生すると考えられる。本研究では炎症性腸疾患粘膜の特殊な細胞分化増殖機構を明らかにすることにより、組織の荒廃と発癌に対する予防及び診断・治療法を開発することを目的としている。まず、上皮細胞の産生するアクチビン及びフォリスタチンの発現調節と意義について細胞レベルで解析を行ったところ、上皮細胞ではオートクリン因子アクチビンは増殖にブレーキをかけるとともに分化能を高めるように機能していることが明らかになった。マウス腸炎モデルにおいては Th1 優位となる急性期の腸粘膜にアクチビンが発現しており、フォリスタチンは Th2 型応答が加わる慢性期の粘膜固有層細胞に発現していた。よってアクチビン・フォリスタチン系はサイトカイン応答による制御を受けつつ、消化管上皮細胞の再生分化に関与していることが示された。また、炎症+発癌実験においては UC モデルで前癌病変である ACF の数が減り、より発癌過程の進んだ腺種が多く見られた。さらに、UC 手術切除固定標本を対象とし、DNA を抽出して 6 種類の microsatellite marker を用いて MSI の検索を行ったところ、非腫瘍性粘膜については、MSI は、炎症の程度が高い症例に、また、炎症が長期間に及んだ症例に高度に認められた。一方、dysplasia や癌においては、MSI は、18%（3/17）に認められた。UC においては、炎症の程度や持続期間が MSI を生じる原因となっている可能性が高いと考えられた。これらの結果から、本研究で用いた細胞・動物モデルはヒトの疾患でおこっていることを再現しているものと考えられ、さらに解析を進める予定である。

分担研究者

小島 至・ 群馬大学生体調節研究所・調節機構部門
細胞調節分野・教授

中島 淳・ 横浜市立大学医学部第3内科・講師/外
来医長

小西文雄・ 自治医科大学附属大宮医療センター外
科・教授

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎(UC)患者は大腸癌発生の高危険群とされており、一般の大腸癌に比べて浸潤傾向の強い癌が多い傾向にあるため早期での発見が必要とされ、また粘膜の dysplasia を母地として多発する傾向にあるために診断が難しく、UC に特異的な前癌病変の指標が必要とされている。クローン病(CD)における裂

溝潰瘍は瘻孔・狭窄の原因となるため、急性炎症寛解後も繰り返し再手術が必要となり患者の quality of life を悪化させている。消化管粘膜の特殊な細胞回転機構をかんがみると、消化管免疫に異常をきたしている UC/CD 腸炎組織にはそれぞれに特徴的な組織再生・修復に異常をきたすメカニズムがあり、これを解明することが上記の問題を解決するために必須である。本年度は 1)上皮の再生・分化に関与することが最近明らかになった アクチビン-フォリスタチン系分子のマウス腸炎モデルにおける発現解析, 2)アクチビン-フォリスタチン系分子細胞レベルでの機能解析, 3)T helper (Th)1-dominant マウス(CD モデル)または Th2-dominant マウス (UC モデル) における発癌モデルの作成と発癌機構の解析, 4)Th1/Th2-dominant マウスにおける上皮再生の解

析, 5)UC に発生する大腸癌における microsatellite instability(MSI)解析, を目標として研究を行なった.

B. 研究方法

B-1 炎症モデル : マウスに trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) を注腸して腸炎を誘導し, 経時的に大腸組織を採取した. また, 大腸組織より上皮細胞, 上皮間リンパ球をそれぞれ分離したのち, collagenase 消化を 2 回繰り返す, さらに, percoll 分配法により, 粘膜固有層単核細胞を得た. 粘膜固有層の細胞は adherent/ non-adherent cell に分離し, それぞれの細胞分画でのアクチビン, フォリスタチンの発現を RT-PCR で解析した.

B-2. アクチビン・フォリスタチンの細胞レベルでの機能解析 培養上皮細胞 MDCK をモデル系として用い, この細胞におけるアクチビンサブユニットの発現, I 型および II 型アクチビン受容体の発現, さらにアクチビン・アンタゴニストであるフォリスタチンの発現を RT-PCR 法および免疫組織化学法により検討した. また細胞増殖過程におけるそれらの発現変化についても検討した. 次にこの細胞にドミナントネガティブ型の変異アクチビン受容体を過剰発現させ, 内因性のアクチビン作用をブロックし, その増殖や分化に対する効果を検討した.

B-3. 腸炎発癌モデル : TNBS 腸炎を IFN- γ 欠損マウスと IL-4 欠損マウスに誘導し, アゾキシメタン (AOM) 投与により発癌実験を行った. 3 ヶ月後に大腸前癌病変である Aberrant Crypt Focus (ACF) の解析を, 14 ヶ月後の解析で大腸癌の解析を行った. 今年度は前癌病変までの段階で, 来年度に発癌の結果が得られる予定である.

B-4 再生モデル : IFN- γ 欠損マウスおよび IL-4 受容体欠損マウスに放射線照射を行ない H&E 染色観察し, また BrdU 取り込み細胞の検出によって消化管上皮の再生を観察できる条件を検討した.

B-5 潰瘍性大腸炎の MSI 解析 ; UC に癌あるいは dysplasia が発生して手術された 5 例と, 腫瘍性変化が存在せず手術された 11 例の手術切除固定標本を対象とした. DNA を抽出し, 6 種類の microsatellite marker を用いて MSI の検索を行った.

(倫理面への配慮)

動物実験はそれぞれの施設の動物実験施設の規定に従い動物愛護に配慮した方法で行なった. 患者標本を用いた研究は施設の倫理委員会の承認の下で, 個人情報を知ることができない仕組みとし, 個人情報の秘匿には十分な配慮がなされた.

C. 研究結果

C-1. 炎症モデル : TNBS 腸炎においては day1-3 の急性期の大腸粘膜に アクチビン β A, アクチビン β B が発現していた. さらに細胞成分を分離したところ粘膜固有層単核球から分離された付着細胞で, 特にアクチビン産生の高いことがわかった. フォリスタチンは, 急性期には発現しておらず, 慢性期 (day 10) の粘膜固有層細胞に発現していた.

C-2. アクチビン/フォリスタチンの細胞レベルの機能解析 : 上皮細胞 MDCK はアクチビンの β A サブユニットを発現していた. この発現は静止期には少なく, 増殖因子や血清の添加により細胞増殖が刺激されると発現が亢進した. また, この細胞には I 型および II 型アクチビン受容体が発現しており, 免疫組織化学法により細胞膜での発現が確認された. 受容体発現は細胞周期による変化は認められなかった. 一方, アクチビン・アンタゴニストであるフォリスタチンの発現を認めたもののその発現量はごくわずかで, アクチビン作用に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた. 変異アクチビン受容体の導入およびフォリスタチン投与することにより, オートクリン因子であるアクチビンの作用をブロックすると, 増殖のスピードが加速した. また分化マーカーである刷子縁蛋白の発現が減少し, 未分化細胞に発現する転写因子 Pax2 の発現が増加した. これらの結果から, オートクリン因子アクチビンは細胞増殖を負に調節するとともに分化能を高めるように作用していることが考えられた.

C-3. 腸炎発癌モデル : IL-4 欠損マウスにおいては, 前癌病変である ACF は有意に増加した. IFN- γ 欠損マウスにおいては腸炎誘発によって対照より ACF 数は有意に減少したが, 大腸粘膜に異常な扁平腺管を多数認めた. 以上の結果は従来の Th1/Th2 を区別しな

いモデルでは得られなかった新しい知見であり、さらに分子病理学的解析が必要であると思われた。来年度中には時間のかかる発癌実験の結果も得られる予定である。

C-4. 再生モデル: 3Gy の照射が wild type, サイトカインノックアウトマウスのいずれの生存にも影響を与えることなく消化管粘膜の障害が見られ、実験に相当であることが明らかとなった。また、IL-4 受容体欠損マウスでは放射線障害からの上皮再生が遅れることが明らかとなり、このサイトカインが上皮細胞回転に直接関わっていることが明らかになった。

C-5. 潰瘍性大腸炎の MSI 解析: 非腫瘍性粘膜については、MSI は、炎症の程度が高い症例に、また、炎症が長期間に及んだ症例に高頻度に認められた。一方、dysplasia や癌等の腫瘍性変化の認められた組織においては、MSI は、18% (3/17) に認められた。炎症によって MSI が生じている可能性が高いと考えられ、発癌過程を解明する手がかりを得ることができた。

D. 考察

アクチビン・フォリスタチン系の上皮細胞レベルでの実験結果により、オートクリン因子であるアクチビンは細胞増殖を負に調節するとともに分化能を高めるように作用していることが考えられる。多くの上皮細胞がアクチビンを発現していることが知られているが、恐らくそれらの細胞においても同様な機能を発揮していることが推定される。腸炎の急性期にマクロファージのアクチビン産生がみられたことから、アクチビン・フォリスタチン系が組織障害とその修復に関与している可能性が示唆された。従ってアクチビン・フォリスタチン系を制御することにより、上皮細胞の増殖・分化・再生を制御する方法を開発すれば、炎症による消化管組織の荒廃に対する治療への応用に期待が持てる。

また、一般の自然発症大腸癌と比べて UC における大腸癌はその形態学な差異、予後の悪さを考えると全く別なものと考えられる。今回の前癌病変の解析では UC に近いモデルである IFN- γ 欠損マウスにおいて前癌病変である ACF の数が減り、より

Promotion 過程の進んだ腺種が多く見られたことは、我々のモデルが人の疾患でおこっている現象を良く再現しているものと考えられる。したがって本モデルにおける発癌のメカニズム解析が、IBD における特異な発癌のメカニズムの解明と治療法につながる知見が得られると期待される。また今回、UC 患者で炎症によって MSI が生じることが明らかになったが、さらに、これが発癌にどのように関与してくるかを検索することが次の課題である。今後は我々の開発しているモデルを用いて本疾患に伴う大腸癌特異的遺伝子変異の同定と、創薬の標的となる標的分子の同定を目指す。

E. 結論

上皮細胞の産生するアクチビン及びフォリスタチンの発現調節と意義について細胞レベル及び腸炎動物モデルで明らかにした。UC の発癌モデルマウスの前癌病変において、その数の有意な減少と通常みられる前癌病変とは異なる病変を見いだした。上皮再生への IL-4 の関与が明らかになった。また、UC においては、炎症の程度や持続期間が MSI を生じる原因となっている可能性が高いと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y.I., Browning, J.L., McGhee, J.R.: Elimination of colonic patches with lymphotoxin β receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. *J. Immunol.* 167: 2781-2790, 2001.
2. Fujihashi, K., Dohi, T., Rennert, P.D., Yamamoto, M., Koga, T., Kiyono, H., McGhee, J.R.: Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 3310-3315, 2001.
3. Hashimoto, M., Kirikae, F., Dohi, T., Kusumoto, S., Suda, S., Kirikae, T.: Structural elucidation of

- capsular polysaccharide from a clinical isolate of *Bacteroides vulgatus* from a patient with Crohn's disease. *Eur. J. Biochem.* 268: 1-7, 2001.
4. Dohi, T. Essential roles for Th2-type responses in chronic intestinal inflammation. *Trends in Gastroenterology and Hepatology: Millennium 2000*, Ed. H Asakura, Y Aoyagi and S Nakazawa, Springer-Verlag (Tokyo) 193-196, 2001.
 5. 土肥多恵子: Th1/Th2型粘膜免疫応答と消化管炎症. *医学のあゆみ*. 199: 75-78, 2001
 6. Ichikawa, T., Zhang, Y.Q., Kogure, K., Hasegawa, Y., Takagi, H., Mori, M. and Kojima, I. Transforming growth factor- β and activin tonically inhibit DNA synthesis in the liver. *Hepatology* 34: 918-925. 2001
 7. Maeshima, A., Zhang, Y.Q., Nojima, Y. and Kojima, I. Involvement of the activin-follistatin system in tubular regeneration after renal ischemia in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1685-1695, 2001.
 8. Zhang, Y.Q., Mashia, H. and Kojima, I. Changes in the expression of transcription factors in AR42J cells during differentiation into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50: S10-S14, 2001
 9. Maeshia, A., Nojima, Y. and Kojima, I. Role of the activin-follistatin system in the developmental and regeneration processes of the kidney. *Cytokine Growth Fact. Rev.* 12: 289-298 2001
 10. Kojima, I., Maeshima, A. and Zhang, Y.Q. Role of the activin-follistatin system in the morphogenesis and regeneration of the renal tubules. *Mol. Cell. Endocrinol.* 180: 179-182, 2001
 11. Nakajima A, Wada K., Miki H., Kubota N., Nakajima N., Terauchi Y., Ohnishi S., Kadowaki T., Blumberg R.S., Nagai R., Matsuhashi N. Endogenous PPAR γ mediates anti-inflammatory activity in a model of ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 120:460-469, 2001
 12. Matsuhashi N., Nakajima A., Watanabe K, Komeno Y., Suzuki A., Ohnishi S., Omata M, Kondo K., Usui Y., Iwadare J., Watanabe T., Nagawa H., Muto T. Tacrolimus in corticosteroid-resistant ulcerative colitis. *J Gastroenterol* ;35:635-640. 2001
 13. Osawa E., Nakajima A., Sekihara H. Chemoprevention of precursors to colon cancer by Dehydroepiandrosterone (DHEA) *Life Sciences*, in press.
 14. Nakajima A., H Iijima, MF Neurath, T. Nagaishi, E.E.S. Nieuwenhuis, R. Raychowdhury, J. Glickman, D.M. Blau, S. Russell, K. Holmes, R. Blumberg. Activation-Induced Expression of carcinoembryonic Antigen-Cell Adhesion Molecule 1 regulates Mouse T lymphocyte Function. *J. Immunol*;168:1028-1035, 2002
 15. Nakajima A., Aburatani H. Gene profiling in Colitis mouse. *J Gastroenterology*. 2002 in press.
 16. Wada K., Nakajima A. PPAR γ and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease *Trends in Mol. Med.*:7(8): 329-331, 2001
 17. 中島 淳・和田孝一郎 PPAR γ を用いた炎症性腸疾患治療戦略 *Pharma Medica.*:19:67-70, 2001
 18. 中島 淳 PPAR γ と大腸癌医学の歩み: *198(11): 763-764, 2001*
 19. T. Ishitsuka, H. Kashiwagi, F. Konishi Microsatellite instability in inflamed and neoplastic epithelium in ulcerative colitis. *J. Clin Path* 54:526-532, 2001
 20. 柏木宏, 小西文雄 大腸癌専門医のための消化器外科学レビュー2001 145-149 2001
 21. 小西文雄 大腸癌の外科治療 *プラクティカル内科シリーズ* 12 大腸疾患 68-73, 2001
 22. Kazuhisa Shitoh, Fimio Konishi, *et al.* Frequent activation of the β -catenin-Tcf signaling pathway in nonfamilial colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Genes, Chromosomes & Cancer* 30:32-37, 2001

23. T. Ishitsuka, F. Konishi, *et al.* . Microsatellite instability in inflamed and neoplastic epithelium in ulcerative colitis *Journal Of Clinical Pathology* 54 526-532, 2001
 24. 大平猛, 小西文雄, その他 びまん湿潤型大腸癌における湿潤・転移関連因子の発現性の検討 *日本大腸肛門病学会雑誌* 54, 2001
 25. 古川泰司, 小西文雄, その他 特殊な大腸癌(2) Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) *Early Colorectal Cancer* 5:263-268, 2001
 26. 小西文雄 大腸がん背景粘膜におけるDNA replication error, 遺伝子変異および細胞増殖動態に関する研究 *がん治療のあゆみ* 第20巻別冊, 2001
 27. Y. Miyakura, K. Sugano, F. Konishi, A. Ichikawa, M. Maekawa, K. Shitoh, S. Igarashi, K. Ktake, Y. Koyama, H. Nagai. Extensive methylation of hmlh1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability *Gastroenterology* 121: 1300-1309, 2001
2. 学会発表
1. 白井裕子, 橋本雅仁, 加藤理恵, 河村由紀, 切替照雄, 土肥多恵子: Distinct responses of human colonic lamina propria cells from peripheral blood mononuclear cells toward lipopolysaccharide of resident microflora. 第31回日本免疫学会総会, 2001年12月13日
 2. 土肥多恵子, 藤橋浩太郎, 恵谷ゆり, 吉野直人, 白井裕子, 河村由紀, 清野宏, McGhee, J.R.: Adoptive transfer of IL-4 deficient CD4⁺CD45RB^{hi} T cells to T cell receptor $\beta^{-/-}\delta^{-/-}$ (TCR^{-/-}) mice induced gastritis. 第31回日本免疫学会総会, 2001年12月13日
 3. 河村由紀, 白井裕子, 濱端崇, 古川鋼一, 土肥多恵子: Effect of mutant cholera toxin on bone marrow derived dendritic cells. 第31回日本免疫学会総会, 2001年12月12日
 4. 白井裕子, 土肥多恵子: ヒト大腸粘膜固有層内単各細胞の腸管内常在菌由来リポ多糖(LPS)に対する応答. 第87回日本消化器病学会総会, 2001年4月19日, 東京
 5. 土肥多恵子: Treatment with lymphotoxin- β receptor-immunoglobulin fusion protein prevented murine experimental colitis. 第87回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション, 2001年4月19日, 東京
 6. Zhang,Y.Q., Furukawa,M., Miyagawa,J., Kojima,I. (2001) Expression of β A and β B subunits of activin in pancreatic duct. 61-st Annual Meeting of the American Diabetes Association
 7. A Nakajima, K Wada, T Miki, T Kubota, N Nakajima, M Terauchi Novel anti-inflammatory pathway mediated by PPAR γ in ischemia-reperfusion injury *アメリカ消化器病学会 サテライトシンポジウム (於サンディエゴ)* 平成12年5月
 8. 中島 淳 炎症性腸疾患におけるPPAR γ の役割とそれに基づいた治療方法の指針 (シンポジウム; 炎症性腸疾患の新たな治療戦略) 第42回日本消化器病学会大会 シンポジウム平成12年10月
 9. 大澤映美 中島淳 関原久彦 東京大学第三内科 松橋信行 落合雅子 中釜斉 PPAR γ の大腸発癌に対するchemoprevention - PPAR γ ligand投与, ノックアウトマウスを用いた検討 - 日本癌学会平成13年9月
 10. 中島 淳 炎症性腸疾患におけるBRMとしてのPPAR γ の作用機序と網羅的遺伝子解析によるバイオセラピーの新たな標的分子の検索 第43回日本消化器病学会大会 ワークショップ12 IBDのバイオセラピーとBiological response modifier (BRM) 平成13年10月
 11. 小島正幸, 小西文雄, その他 腹腔鏡補助下手術を施行した潰瘍性大腸炎の5例 第8回東日本IBD病因・病態フォーラム 2001.3.17
 12. 宮倉安幸, 小西文雄, その他 非遺伝性大腸癌におけるhMLH1プロモーター領域のメチ

- ル化の解析 第7回家族性腫瘍研究会学術集会
2001.6.15
13. 古川泰司, 小西文雄, その他 家族歴陽性大腸癌症例におけるミスマッチ修復遺伝子変異の解析
 14. 第7回家族性腫瘍研究会学術集会 2001.6.15
 15. 宮倉安幸, 小西文雄, その他 hMLH1プロモーター領域のメチル化の解析と大腸癌発癌予知への可能性 第56回日本消化器外科学会総会 2001.7.27
 16. 石塚恒夫, 小西文雄, 永井秀雄 潰瘍性大腸炎発癌の早期診断における遺伝子変化の有用性 第87回日本消化器病学会総会 2001.4.18
 17. 宮倉安幸, 小西文雄, その他 マイクロサテライト陽性大腸癌の臨床病理学的特徴と悪性度評価 第87回日本消化器病学会総会 2001.4.18
 18. 古川泰司, 小西文雄, その他 MSI陽性非家族性大腸癌症例におけるhMLH1 promoter hypermethylation の検討 第101回日本外科学会総会 2001.4.11-
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

マウス腸炎モデルにおける消化管上皮再生の解析

主任研究者 土肥多恵子

国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部・部長

研究要旨：マウス腸炎モデルを用いて炎症性腸疾患における細胞回転機構の異常を解明するためアクチビン/フォリスタチン系分子のマウス腸炎モデルにおける発現解析， T helper (Th)1/Th2-dominant マウスにおける上皮再生の解析を行なった。TNBS 腸炎では Th1 優位となる急性期の大腸粘膜にアクチビンが発現していた。フォリスタチンは、急性期には発現しておらず、Th2 型応答が加わる慢性期の粘膜固有層細胞に発現していた。さらに、Th2 優位である IFN- γ 欠損マウスおよび Th1 優位である IL-4 受容体欠損マウスに放射線照射を行ない上皮再生を観察したところ、IL-4 受容体欠損マウスでは上皮再生の時期が遅れることが明らかとなり、アクチビン・フォリスタチン系及びサイトカインが、上皮細胞再生に直接関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

消化管粘膜には特殊な細胞回転機構があるが、消化管免疫に異常をきたしている潰瘍性大腸炎（UC）やクローン病（CD）腸炎組織にはそれぞれに特徴的な組織再生・修復異常をきたすメカニズムがあると考えられる。本研究の目的は、マウス腸炎モデルにおける細胞回転機構の異常を解明することによって、UC における発癌の問題や CD における難治性の裂溝潰瘍に対する対策を講じることである。本年度は上皮の再生・分化に関与することが最近明らかになったアクチビン・フォリスタチン系分子のマウス腸炎モデルにおける発現解析と、Th1/Th2-dominant マウスにおける上皮再生の比較解析を行なった

B. 研究方法

1. 炎症モデル：マウスに trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) を注腸して腸炎を誘導し、経時的に大腸組織を採取した。また、大腸組織より上皮細胞、上皮間リンパ球をそれぞれ分離したのち、collagenase 消化を2回繰り返す。さらに、percoll 分配法により、粘膜固有層単核細胞を得た。粘膜固有層の細胞は adherent/ non-adherent cell に分離し、それぞれの細胞分画でのアクチビン、フォリスタチンの発現を RT-PCR で解析した。
2. 再生モデル：IFN- γ 欠損マウスおよび IL-4 受容体欠

損マウスに放射線照射を行ない H&E 染色観察し、また BrdU 取り込み細胞の検出によって消化管上皮の再生を観察できる条件を検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験にあたっては施設の規定に従い動物愛護に十分考慮して行なった。

C. 研究結果

TNBS 腸炎においては day 1-3 の急性期の粘膜にアクチビン β A、アクチビン β B が発現していた。さらに細胞成分を分離したところ粘膜固有層単核球から分離された付着細胞で、特にアクチビン産生が高いことがわかった。フォリスタチンは、急性期には発現しておらず、慢性期（day 10）の粘膜固有層細胞に発現していた。

再生モデル実験では 3 Gy の照射がマウスの生存に影響を与えることなく消化管粘膜の障害が見られ、実験に相当であることが明らかとなった。また、IL-4 受容体欠損マウスでは放射線障害からの上皮再生が遅れることわかり、このサイトカインが上皮細胞回転に直接関わっていることが明らかになった。

D. 考察

炎症性腸疾患におけるアクチビンの関与は少数ながら報告が見られる。しかしながら、産生細胞やア

クチピンの natural antagonist であるフォリスタチンがどのように関与しているかはいまだ不明である。本年度のマウスモデルの実験結果からは、腸炎の急性期にマクロファージの産生するアクチピンが、組織障害に関与している可能性が示唆された。腸炎のこの時期は自然免疫及び Th1 型免疫応答が中心であることからアクチピンも組織障害に関与していると考えられる。一方、フォリスタチンは組織修復がさかんとなり、Th2 型免疫応答が出現する時期に一致してその発現が高くなることから、組織の修復に関与している可能性が示唆された。その mRNA が粘膜固有層単核球にも検出されたことは興味深い、さらに細胞を純化して産生細胞を確認すると共に、組織切片上での局在を解析する必要がある。また放射線照射実験から、Th1 型免疫応答優位の IL-4 受容体欠損マウスでは組織修復に遅れが出るのが明らかになり、これらの実験系を組み合わせた結果から炎症性腸疾患の病変治癒を促す新しい治療ターゲットを探索できると考えている。

E. 結論

マウス炎症モデルにおけるアクチピン及びフォリスタチンの発現について解析し、病期とサイトカイン応答との関連を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y.I., Browning, J.L., McGhee, J.R.: Elimination of colonic patches with lymphotoxin b receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis. *J. Immunol.* 167: 2781-2790, 2001.
2. Fujihashi, K., Dohi, T., Rennert, P.D., Yamamoto, M., Koga, T., Kiyono, H., McGhee, J.R.: Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 3310-3315, 2001.

3. Hashimoto, M., Kirikae, F., Dohi, T., Kusumoto, S., Suda, S., Kirikae, T.: Structural elucidation of capsular polysaccharide from a clinical isolate of *Bacteroides vulgatus* from a patient with Crohn's disease. *Eur. J. Biochem.* 268: 1-7, 2001.
4. Dohi, T.: Essential roles for Th2-type responses in chronic intestinal inflammation. *Trends in Gastroenterology and Hepatology: Millennium 2000*, Ed. H Asakura, Y Aoyagi and S Nakazawa, Springer-Verlag (Tokyo) 193-196, 2001.
5. 土肥多恵子: Th1/Th2型粘膜免疫応答と消化管炎症. *医学のあゆみ.* 199: 75-78, 2001

2. 学会発表

1. 白井裕子, 橋本雅仁, 加藤理恵, 河村由紀, 切替照雄, 土肥多恵子: Distinct responses of human colonic lamina propria cells from peripheral blood mononuclear cells toward lipopolysaccharide of resident microflora. 第31回日本免疫学会総会, 2001年12月13日, 大阪
2. 土肥多恵子, 藤橋浩太郎, 恵谷ゆり, 吉野直人, 白井裕子, 河村由紀, 清野宏, McGhee, J.R.: Adoptive transfer of IL-4 deficient CD4⁺CD45RB^{hi} T cells to T cell receptor $\beta^{-/-}$ $\alpha\delta^{-/-}$ (TCR^{-/-}) mice induced gastritis. 第31回日本免疫学会総会, 2001年12月13日, 大阪
3. 河村由紀, 白井裕子, 濱端崇, 古川鋼一, 土肥多恵子: Effect of mutant cholera toxin on bone marrow derived dendritic cells. 第31回日本免疫学会総会, 2001年12月12日, 大阪
4. 白井裕子, 土肥多恵子: ヒト大腸粘膜固有層内単各細胞の腸管内常在菌由来リポ多糖(LPS)に対する応答. 第87回日本消化器病学会総会, 2001年4月19日, 東京
5. 土肥多恵子: Treatment with lymphotoxin-b receptor-immunoglobulin fusion protein prevented murine experimental colitis. 第87回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション, 2001年4月19日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

上皮細胞の増殖と分化の解析

分担研究者 小島 至

群馬大学生体調節研究所調節機構部門・細胞調節分野・教授

研究要旨：上皮細胞のオートクリン因子アクチビンの意義について MDCK 細胞をモデルとして検討した。この細胞はアクチビンの βA サブユニットを発現するとともに、I 型および II 型アクチビン受容体を発現していた。 βA サブユニットの発現は静止期には低い、G1 中・後期に増加した。受容体発現は細胞周期により変化しなかった。アクチビンのアンタゴニストであるフォリスタチンの投与や変異アクチビン受容体遺伝子導入により内因性アクチビン作用をブロックすると MDCK 細胞の増殖は促進され、オートクリン因子であるアクチビンが増殖にブレーキをかけていることが判明した。さらに MDCK の分化マーカーである刷子縁蛋白の発現の検討から、アクチビン作用をブロックすることにより脱分化が起こることが判明した。以上の結果から、オートクリン因子アクチビンは増殖にブレーキをかけるとともに文化度を保つように機能していることが明らかになった。

A. 研究目的

上皮細胞の増殖と分化の調節におけるアクチビン・フォリスタチン系の役割を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

培養上皮細胞 MDCK をモデル系として用い、この細胞におけるアクチビンサブユニットの発現、I 型および II 型アクチビン受容体の発現、さらにアクチビン・アンタゴニストであるフォリスタチンの発現を RT-PCR 法および免疫組織化学法により検討した。また細胞増殖過程におけるそれらの発現変化についても検討した。次にこの細胞にドミナントネガティブ型の変異アクチビン受容体を過剰発現させ、内因性のアクチビン作用をブロックし、その増殖や分化に対する効果を検討した。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

上皮細胞 MDCK はアクチビンの βA サブユニットを発現していた。この発現は静止期には少なく、増殖因子や血清の添加により細胞増殖が刺激されると発現が亢進した。またこの細胞には I 型および

II 型アクチビン受容体が発現しており、免疫組織化学法により細胞膜での発現が確認された。受容体発現は細胞周期による変化は認められなかった。一方、アクチビン・アンタゴニストであるフォリスタチンの発現を認めたもののその発現量はごくわずかで、アクチビン作用に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。変異アクチビン受容体の導入およびフォリスタチンを投与することにより、オートクリン因子であるアクチビンの作用をブロックすると、増殖のスピードが加速した。また分化マーカーである刷子縁蛋白の発現が減少し、未分化細胞に発現する転写因子 Pax2 の発現が増加した。

D. 考察

MDCK 細胞はアクチビンの βA サブユニットを発現するとともに、その受容体を発現しており、アクチビンがこの細胞においてオートクリン因子として機能していることが考えられた。アンタゴニストであるフォリスタチンの添加やドミナント・ネガティブ型変異受容体の導入により、増殖のスピードが加速するとともに分化マーカーの発現低下が認められたことから、オートクリン因子であるアクチビンは細胞増殖を負に調節するとともに

分化能を高めるように作用していることが考えられる。多くの上皮細胞がアクチビンを発現していることが知られているが、恐らくそれらの細胞においても同様な機能を発揮していることが推定される。

E. 結論

本研究では上皮細胞の産生するアクチビン及びフォリスタチンの発現調節と意義について明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichikawa, T., Zhang, Y.Q., Kogure, K., Hasegawa, Y., Takagi, H., Mori, M. and Kojima, I. (2001) Transforming growth factor- β and activin tonically inhibit DNA synthesis in the liver. *Hepatology* 34: 918-925.
2. Maeshima, A., Zhang, Y.Q., Nojima, Y. and Kojima, I. (2001) Involvement of the activin-follistatin system in tubular regeneration after renal ischemia in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1685-1695.
3. Zhang, Y.Q., Mashia, H. and Kojima, I. (2001) Changes in the expression of transcription factors in AR42J cells during differentiation into insulin-secreting cells. *Diabetes* 50: S10-S14.
4. Maeshia, A., Nojima, Y. and Kojima, I. (2001) Role of the activin-follistatin system in the developmental and regeneration processes of the kidney. *Cytokine Growth Fact. Rev.* 12: 289-298.
5. Kojima, I., Maeshima, A. and Zhang, Y.Q. (2001) Role of the activin-follistatin system in the morphogenesis and regeneration of the renal tubules. *Mol. Cell. Endocrinol.* 180: 179-182.

2. 学会発表

1. Zhang, Y.Q., Furukawa, M., Miyagawa, J., Kojima, I. (2001) Expression of β A and β B subunits of activin in pancreatic duct. 61-st Annual Meeting of the American Diabetes Association

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

マウス腸炎モデルにおける発癌機構の解析

中島 淳

分担研究者 横浜市立大学第3内科・講師/外来医長

研究要旨:クローン病には大腸癌が少なく潰瘍性大腸炎には発病後10年をこえると大腸癌が発生してくるという臨床上的の問題に欧米はもとより我が国も直面しつつある。潰瘍性大腸炎は発症後10年をこえると大腸癌のハイリスクグループとなり、内視鏡検査による頻回のサーベイランスが必要となり、本疾患に起因する大腸癌は浸潤傾向が強く予後はあまり良くない。本研究では潰瘍性大腸炎とクローン病を区別したモデルを用いてその発癌の差異とメカニズムをマウス腸炎モデルを用いて発癌実験を行い解析したものである。潰瘍性大腸炎に近いモデルである IFN- γ 欠損マウスでの発癌実験において前癌病変である ACF の数が減り、より発癌過程の進んだ腺種が多く見られた。一方クローン病により近いモデルである IL-4 欠損マウスでの発癌実験において前癌病変である ACF が多く見られた。このことは我々のモデルがヒトの疾患でおこっていることを再現しているものと考えられる。このようにクローン病と潰瘍性大腸炎に区別したモデルでの発癌実験の知見は世界的に見ても皆無である。したがって本モデルにおける発癌のメカニズム解析が、ヒト炎症性腸疾患における特異な発癌メカニズムの解明と治療法につながる知見が得られる可能性があると思われ、今後は我々の確立した潰瘍性大腸炎における発癌モデルを用いて発癌過程の詳細な解析を行う予定である。

A. 研究目的

マウス腸炎モデルにおける発癌機構の解析。

炎症性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎）は若年発症の慢性疾患で、寛解と増悪を繰り返すことが多い難病である。米国では推定150万人の患者がおり日本でも近年患者数が増加している。潰瘍性大腸炎は発症後10年をこえると大腸癌のハイリスクグループとなり、内視鏡検査による頻回のサーベイランスが必要となり、本疾患に起因する大腸癌は浸潤傾向が強く予後はあまり良くない。以上のような背景のもと、本研究においては研究代表の土肥らが世界に先駆けて開発した Th1 と Th2 を区別した腸炎モデルマウスを用いて、マウス腸炎モデルにおける発癌モデルの作成と発癌機構の解析を目的とした。

B. 研究方法

TNBS 腸炎を IFN- γ 欠損マウス（潰瘍性大腸炎に近いモデル）と IL-4 欠損マウス（クローン病により近いモデル）に作成し、アゾキシメタン(AOM)投

与により発癌実験を行った。3ヶ月後の解析で大腸前癌病変である Aberrant Crypt Focus (ACF)の解析を、14ヶ月後の解析で大腸癌の解析を行った。今年度は前癌病変までの段階で、来年度に発癌の結果が得られる予定。

（倫理面への配慮）

動物実験にあたっては施設の規定に従い動物愛護に十分考慮して行なった。

C. 研究結果

IL-4 欠損マウスにおいては、前癌病変である ACF は有意に増加したが、IFN- γ 欠損マウスにおいては腸炎誘発によって対照より ACF 数は有意に減少し、大腸粘膜に異常な微小腺腫を多数認めた。以上の結果は従来 Th1/Th2 を区別しないモデルでは得られなかった新しい知見であり、さらに分子病理学的解析が必要であると思われた。

D. 考察

クローン病には大腸癌が少なく潰瘍性大腸炎には

発病後10年をこえると大腸癌が発生してくるといふ臨床上の問題に欧米はもとより我が国も直面しつつある。本研究では潰瘍性大腸炎とクローン病を区別したモデルを用いてその発癌の差異と、メカニズムを解析するもので、当該分野の研究では世界最先端に位置するものである。また、若年者に多くアジアの中で特に日本で増加している本疾患の現状を考えると社会的に大変重要度の高いものと考えられる。

今回の前癌病変の解析では潰瘍性大腸炎に近いモデルである IFN- γ 欠損マウスにおいて前癌病変である ACF の数が減り、より Promotion 過程の進んだ腺種が多く見られたことは、我々のモデルが人の疾患でおこっていることを良くあらわしているものと考えられる。したがって本モデルにおける発癌のメカニズム解析が、ヒト炎症性腸疾患における特異な発癌のメカニズムの解明と治療法につながる知見が得られる可能性があると思われる。

一般の自然発症大腸癌と比べて潰瘍性大腸炎における大腸癌はその形態学な差異、予後の悪さを考えると全く別なものと考えられる。今後は我々の開発しているモデルを用いて本疾患に伴う大腸癌特異的遺伝子変異の同定と、創薬の標的となる標的遺伝子の同定を目指す。

E. 結論

潰瘍性大腸炎の発癌モデルマウスにおいて前癌病変において、その数の有意な減少と通常みられる前癌病変とは異なる病変を見いだした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi S, Kadowaki T, Blumberg RS, Nagai R, Matsuhashi N. Endogenous PPAR γ mediates anti-inflammatory

activity in a model of ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 2001;120:460-469

2. Matsuhashi N, Nakajima A, Watanabe K, Komeno Y, Suzuki A, Ohnishi S, Omata M, Kondo K, Usui Y, Iwadare J, Watanabe T, Nagawa H, Muto T. Tacrolimus in corticosteroid-resistant ulcerative colitis. *J. Gastroenterol* 2000;35:635-640.
3. Osawa E, Nakajima A, Sekihara H. Chemoprevention of precursors to colon cancer by Dehydroepiandrosterone (DHEA) Life Sciences, in press.
4. A Nakajima, H Iijima, MF Neurath, T Nagaishi, EES Nieuwenhuis, R Raychowdhury, J Glickman, DM Blau, S Russell, K Holmes, R Blumberg. Activation-induced expression of carcino-embryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. *J. Immunol.* 2002; 168:1028-1035
5. Nakajima A, Aburatani H. Gene profiling in Colitis mouse. *J Gastroenterology.* 2002 in press.
6. Wada K, Nakajima A. PPAR γ and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease *Trends in Mol. Med.* 2001;7(8): 329-331 (総説)
7. 中島 淳・和田孝一郎 PPAR γ を用いた炎症性腸疾患治療戦略 *Pharma Medica.* 2001;19:67-70
8. 中島 淳 PPAR γ と大腸癌 *医学の歩み* 2001; 198(11): 763-764

2. 学会発表

1. A Nakajima, K Wada, T Miki, T Kubota, N Nakajima, M Terauchi Novel anti-inflammatory pathway mediated by PPAR γ in ischemia-reperfusion injury アメリカ消化器病学会 サテライトシンポジウム (於サンディエゴ) 平成12年5月.
2. 中島 淳 炎症性腸疾患におけるPPAR γ の役割とそれに基づいた治療方法の指針 (シンポジウム; 炎症性腸疾患の新たな治療戦略) 第

42回日本消化器病学会大会 シンポジウム平成12年10月

3. 大澤映美 中島 淳 関原久彦 東京大学第三内科 松橋信行 落合雅子 中釜斉 PPAR γ の大腸発癌に対するchemoprevention-PPAR γ ligand投与, ノックアウトマウスを用いた検討
— 日本癌学会 平成13年9月
4. 中島 淳 炎症性腸疾患におけるBRMとしてのPPAR γ の作用機序と網羅的遺伝子解析によるバイオセラピーの新たな標的分子の検索

第43回日本消化器病学会大会 ワークショップ12 IBDのバイオセラピーとBiological response modifier (BRM) 平成13年10月

- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

炎症性腸疾患における増殖・分化及び発癌因子の解析

分担研究者 小西 文雄

自治医科大学附属大宮医療センター外科・教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎に発生する大腸癌は、一般の大腸癌の発生と異なる遺伝子変化が関与している可能性が考えられる。本研究では、特に microsatellite instability(MSI)についての検討を行った。潰瘍性大腸炎手術切除固定標本を対象とした。DNA を抽出し、6 種類の microsatellite marker を用いて MSI の検索を行った。非腫瘍性粘膜については、MSI は、炎症の程度が高い症例に、また、炎症が長期間に及んだ症例に高度に認められた。一方、dysplasia や癌においては、MSI は、18% (3/17) に認められた。潰瘍性大腸炎においては、炎症の程度や持続期間が MSI を生じる原因となっている可能性が高いと考えられた。これが可逆的変化であるのか、発癌とどのように関連しているのかについて、今後さらに検討を行う必要がある。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎に発生する大腸癌は、一般の大腸癌の発生と異なる遺伝子変化が関与している可能性が考えられる。本研究では、特に microsatellite instability(MSI)についての検討を行った。

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎に癌あるいは dysplasia が発生して手術された 5 例と、11 例の腫瘍性変化が存在せず手術された 11 例の手術切除固定標本を対象とした。DNA を抽出し、6 種類の microsatellite marker を用いて MSI の検索を行った。

（倫理面への配慮）

個人情報を知ることができない仕組みとし、個人情報の秘匿には十分な配慮がなされた。

C. 研究結果

非腫瘍性粘膜については、MSI は、炎症の程度が高い症例に、また、炎症が長期間に及んだ症例に高頻度に認められた。一方、dysplasia や癌等の腫瘍性変化の認められた組織においては、MSI は、18% (3/17) に認められた。

D. 考察

潰瘍性大腸炎における正常粘膜の MSI は、炎症の

持続期間に関連している可能性が考えられた。この炎症のある粘膜における MSI が、可逆性の変化であるのか、あるいは、発癌に関与する遺伝子変化に関連するものであるかを検討することが今後の課題であると考えられた。

E. 結論

潰瘍性大腸炎においては、炎症の程度や持続期間が MSI を生じる原因となっている可能性が高いと考えられた。これが可逆的変化であるのか、また、発癌とどのように関連しているのかについて、今後さらに検討を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Ishitsuka, H. Kashiwagi, F. Konishi
Microsatellite instability in inflamed and neoplastic epithelium in ulcerative colitis. J. Clin Path. 2001 54:526-532.
2. 柏木 宏, 小西文雄 大腸癌専門医のための消化器外科学レビュー2001 145-149 2001

3. 小西文雄 大腸癌の外科治療 プラティカル内科シ-ズ 12 大腸疾患 68-73 2001
4. Kazuhisa Shitoh, Fumio Konishi, et al. Frequent Activation of the β -catenin-Tcf Signaling Pathway in Nonfamilial Colorectal Carcinomas With Microsatellite Instability. *Genes, Chromosomes & Cancer* 30 32-37 2001
5. T. Ishitsuka, F. Konishi *et al.* Microsatellite instability in inflamed and neoplastic epithelium in ulcerative colitis *JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY* 54 526-532 2001
6. 大平 猛, 小西文雄, その他 びまん湿潤型大腸癌における湿潤・転移関連因子の発現性の検討 日本大腸肛門病学会雑誌 54 2001
7. 古川泰司, 小西文雄, その他 特殊な大腸癌 (2) Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) *Early Colorectal Cancer* 5 263-268 2001
8. 小西文雄 大腸がん背景粘膜におけるDNA replication error, 遺伝子変異および細胞増殖動態に関する研究 がん治療のあゆみ 第20巻別冊 2001
9. Y. Miyakura, K. Sugano, F. Konishi, A. Ichikawa, M. Maekawa, K. Shitoh, S. Igarashi, K. Ktake, Y. Koyama, H. Nagai Extensive methylation of hmlh1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability *Gastroenterology* 121 1300-1309 2001
1. 小島正幸, 小西文雄, その他 腹腔鏡補助下手術を施行した潰瘍性大腸炎の5例 第8回東日本IBD病因・病態フォーラム 2001.3.17
2. 宮倉安幸, 小西文雄, その他 非遺伝性大腸癌におけるhMLH1プロモーター領域のメチル化の解析 第7回家族性腫瘍研究会学術集会 2001.6.15
3. 古川泰司, 小西文雄, その他 家族歴陽性大腸癌症例におけるミスマッチ修復遺伝子変異の解析 第7回家族性腫瘍研究会学術集会 2001.6.15
4. 宮倉安幸, 小西文雄, その他 hMLH1プロモーター領域のメチル化の解析と大腸癌発癌予知への可能性 第56回日本消化器外科学会総会 2001.7.27
6. 石塚恒夫, 小西文雄, 永井秀雄 潰瘍性大腸炎発癌の早期診断における遺伝子変化の有用性 第87回日本消化器病学会総会 2001.4.18
7. 宮倉安幸, 小西文雄, その他 マイクロサテライト陽性大腸癌の臨床病理学的特徴と悪性度評価 第87回日本消化器病学会総会 2001.4.18
8. 古川泰司, 小西文雄, その他 MSI 陽性非家族性大腸癌症例におけるhMLH promoter hypermethylation の検討 第101回日本外科学会総会 2001.4.11-

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Dohi, T.	Essential roles for Th2-type responses in chronic intestinal inflammation	H Asakura, Y Aoyagi and S Nakazawa	Trends in Gastroenterology and Hepatology: Millennium 2000,	Springer-Verlag	Tokyo	2001	193-196
柏木宏, 小西文雄	大腸癌	柏木宏, 小西文雄	専門医のための消化器外科学レビュー2001	(株)総合医学社	東京都千代田区三崎町 1-1-4	2001	145-149
小西文雄	大腸癌の外科治療	多田正大	プラクティカル内科シリーズ 12 大腸疾患	(株)南江堂	東京都文京区本郷 3-42-6	2001	68-73

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Dohi, T., Rennert, P.D., Fujihashi, K., Kiyono, H., Shirai, Y., Kawamura, Y.I., Browning, J.L., McGhee, J.R.	Elimination of colonic patches with lymphotoxin β receptor-Ig prevents Th2 cell-type colitis	J. Immunol.	167	2781-2790	2001
Fujihashi, K., Dohi, T., Rennert, P.D., Yamamoto, M., Koga, T., Kiyono, H., McGhee, J.R.	Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	98	3310-3315	2001
Hashimoto, M., Kirikae, F., Dohi, T., Kusumoto, S., Suda, S., Kirikae, T.	Structural elucidation of capsular polysaccharide from a clinical isolate of <i>Bacteroides vulgatus</i> from a patient with Crohn's disease	Eur. J. Biochem.	268	1-7	2001
土肥多恵子.	Th1/Th2 型粘膜免疫応答と消化管炎 症	医学のあゆみ	199	75-78	2001
Ichikawa, T., Zhang, Y.Q., Kogure, K., Hasegawa, Y., Takagi, H., Mori, M. and Kojima, I.	Transforming growth factor- β and activin tonically inhibit DNA synthesis in the liver	Hepatology	34	918-925	2001
Maeshima, A., Zhang, Y.Q., Nijima, Y. and Kojima, I.	Involvement of the activin-follistatin system in tubular regeneration after renal ischemia in rats	Journal of American Society of Nephrology	12	1685-1695	2001
Zhang, Y.Q., Furukawa, M., Miyagawa, J., Kojima, I.	Changes in the expression of transcription factors in AR42J cells during differentiation into insulin- secreting cells	Diabetes	50	S10-S14	2001