月、東京)
4. Ishida T, Yoshida M, Arita M, Takagawa T, Serhan CN, Azuma T: Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid protects in dexitran sulfate sodium induced colitis. DDW2008 (2008年5月、サンディエゴ)
5. 石田 司、吉田 優、東 健:マウスクローン病モデルを用いた不飽和脂肪酸由来生理的活性物質の有効性の検討, JDDW2007 (2007年10月、神戸)
6. Ishida T, Yoshida M, Masuda A, Arita M, Serhan CN, Azuma T: Omega-3 fatty acid-derived lipid mediators, Resolvin E1 protects against murine colitis model. ICMI2007 (2007年7月、東京)
7. Ishida T, Yoshida M, Masuda A, Arita M, Serhan CN, Azuma T : New therapy for Crohn' s disease with anti-inflammatory lipid mediator from eicosapentaenoic acid. DDW2007 (2007年5月、ワシントン)
8. 石田 司、吉田 優、井口秀人、東 健:不飽和脂肪酸由来生理活性物質を用いたクローン病の新規治療法の開発. 第3回消化管学会総会学術集会 (2007年2月、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許出願中

名称: USE OF RESOLVINS TO TREAT GASTROINTESTINAL DISEASE

特願番号:06717497.9-2123-US200600030

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

炎症性腸疾患モデルにおける骨髄間葉系幹細胞治療

研究分担者　今井　浩三　札幌医科大学　学長

研究要旨：GVHD 患者の消化管にドナー由来骨髄細胞が存在するが，これらの細胞の由来，役割やその転帰は明らかではない．DSS 腸炎に対する骨髄間葉系幹細胞（MSC）治療は，腸上皮細胞のアポトーシス抑制，細胞回転促進に加えてタイトジャンクション（TJs）再構成によるバリア機能の回復に寄与した．さらに，AOM/DSS 腸炎関連癌に対する MSC 全身投与は，b-カテニン発現抑制を介してその発癌のイニシエーションを抑制する傾向を認めた．以上より，炎症性腸疾患に対する MSC 治療の臨床応用は有望である．

共同研究者：矢花 崇，田中浩紀，後藤 啓，渡邉秀平，中垣 卓，細川雅代，永石歓和，山本博幸，有村佳昭，本谷 聡，篠村恭久
所属：札幌医科大学第一内科

A．研究目的

骨髄間葉系幹細胞（MSC）は，再生医療の細胞のソースとして有力視されている．DSS 腸炎モデルに対する MSC 治療の有用性およびその機序を粘膜再生から検討した．さらに腸炎関連癌モデルに対する MSC 治療の影響を検討し，臨床応用を目指した．

B．研究方法

ブスルファン(BU)誘発骨髄不全ラット，あるいは正常ラットに DSS 腸炎を誘発し，その 2 日目に GFP 標識ドナーMSC を $2x10^4/g$ 尾静脈より静注し，治療効果および生着を経時的に検討した．また腸上皮のバリア機能に関与するタイトジャンクション構成蛋白，Claudin（CL)の発現変化を検討した．腸上皮再生における MSC の作用機序について，MSC とラット小腸上皮培養細胞(IEC-6)の共培養系により検討した．さらに AOM/DSS 腸炎関連癌モデルに対する MSC 治療の影響を検討した．

（倫理面への配慮）

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

C．研究結果

BU 誘導骨髄不全ラットに誘導した DSS 腸炎では，MSC 移植により腸炎急性期における重症化が抑制され，ドナーMSC の腸上皮への engraft を少数認めた．ラット正常大腸組織に発現する CL-2，3，7，12，15 のうち，CL-2，12，15 は腸炎の重症度に依存してその発現が低下したが，MSC 投与により発現が回復した．

正常ラットに誘導した DSS 腸炎では，MSC 移植は腸炎の回復期において有意に治癒を促進した．その際，MSC はクリプト底部に近い位置で上皮細胞間や間質に少数生着し，aSMA，vimentin，desmin を発現し筋線維芽様細胞へ分化した．

IEC-6 との共培養の検討では，MSC 培養上清は，TNFa による上皮細胞障害（アポトーシス）を抑制し，さらに細胞増殖を促進した．上皮細胞障害により発現低下した CL-12，CL-15 および ZO-1 の回復を認めた．

AOM/DSS 腸炎関連癌モデルでは，MSC 治療により発癌数が減少する傾向を認め，b-カテニンの発現抑制とパラレルであり，MSC の WNT シグナル抑制作用が示唆された．

D．考察

MSC 治療は，骨髄不全下では，腸炎の重症化を抑制し，正常骨髄機能下で，腸炎の回復を促進した．しかし，いずれも腸管組織に engraft された細胞が少なく，その治療効果発現には，移植細胞の分化や細胞癒合による局所生着のほか，MSC の細胞接着あるいは液性因子による上皮再生効果が示唆された．

さらに *in vivo* および *in vitro* 両者において，TJs構成タンパクの発現回復を指標としたMSCの効果が示された．また，腸炎関連癌に対するMSC治療の安全性が示唆された．

E．結論

MSCは，ラットDSS腸炎に対する治療効果を有した．その機序として，生着したMSCが腸上皮幹細胞のnicheとして機能し，粘膜再生を促進する可能性が示唆された．同時に腸炎関連癌に対するMSC治療の安全性が示めされた．

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1．論文発表

Yabana T, Arimura Y, Tanaka H, Goto A, Tanaka M, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Adachi Y, Isobe M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y

Enhancing epithelial engraftment of rat mesenchymal stem cells restores epithelial barrier integrity

Journal of Pathology 218; 350-359, 2009

2．学会発表

1) Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Naishiro Y, Yamashita K, Yamamoto H, Murata M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y

Enhancing mucosal reparative response in rat DSS colitis by Mesenchymal Stem Cell therapy

The 4th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium 東京 2010年1月23日

2) 田中浩紀，有村佳昭，矢花崇，田中道寛，後藤啓，篠村恭久，今井浩三

ラット実験腸炎において骨髄間葉系幹細胞は腸上皮幹細胞取って代わる

第44回 日本消化器免疫学会総会

東京 2007年7月8日，9日

H．知的所有権の取得状況

1．特許取得

1）特願2007-141147「間葉系幹細胞による難治性腸炎の治療」(平成19年5月28日 特許出願中)

2）特願2007-194910 「同上追加データ分」(平成19年7月26日 特許出願中)

2．実用新案登録

なし．

3．その他

なし．

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

炎症性腸疾患における上皮再生機構の解明と治療応用

研究代表者　　渡辺　守　東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野　教授

研究要旨：本研究では炎症性腸疾患の病変部に於ける上皮分化異常の分子メカニズムの解明を契機とした粘膜再生シグナル解析に焦点をあて、粘膜再生促進を達成し得る分子シグナル系の解明・同定及び治療応用への基盤整備を目指し、研究を推進した。ヒト腸管上皮由来培養細胞株を用いた独自の網羅的解析と炎症性腸疾患患者粘膜の組織学的解析を行った結果、炎症性腸疾患における上皮分化異常を担う主たる分子シグナルとしてNotchシグナルを同定した。同シグナルは炎症性腸疾患における上皮分化を決定するのみならず、同時に細胞増殖を介した粘膜再生に必須の役割を担っており、同シグナル活性化が即ち粘膜再生につながり得る事を明確に示した。これらの成果は炎症性腸疾患における「粘膜治癒」を達成するにあたり、治療標的となるべき分子シグナルを明確に示した画期的知見であり、「分子標的治療」を「粘膜再生治療」へと展開することを可能にする重要な分子基盤を提供するものである。

共同研究者
岡本隆一、土屋輝一郎、中村哲也
東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

A. 研究目的

本研究は研究代表者独自の視点・手法に立脚した炎症性腸疾患に於ける上皮細胞分化の制御機構の解析を通し、粘膜再生の分子機構を解明し、最終的には難治性炎症性腸疾患に対する画期的粘膜再生療法の確立を目指すものである。我が国において炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）の罹患者数は増加の一途を辿っており、従って標準的治療に不応である治療抵抗例や外科治療を要する難治例もまた増加している。同疾患に対する従来の治療戦略は、持続する粘膜の炎症を如何に収束させ、これを維持するか、というコンセプトの下に治療の工夫や新規治療薬の開発が進められてきた。しかしながら難治例の多くは一見炎症の収束が得られても粘膜上皮の再生が滞り、その結果再燃・増悪という経過をとる事が明らかとなり、近年「粘膜治癒」の重要性が急速に高まっている。同疾患治療における「粘膜治癒」の達成は患者の疾病増悪・再燃抑制に有効であるのみならず、疾病の自然史そのものを変える可能性があり、従って従来の治療法に加え「粘膜再生・治癒」を主たる標的とした新規治療法の確立が急務である。

研究代表者らは大腸炎粘膜に於ける上皮分化機構に着目し、分子生物学的手法を用いた解析から、重要な知見を提供して来た。研究代表者らは、骨髄由来細胞による炎症粘膜修復支援機構が存在することを世界に先駆けて明らかとし（Nat Med 2002)、腸管粘膜再生における全く新しい制御機構を解明した成果として世界的に高い評価を獲得してきた。研究代表者らは、その後も腸管上皮細胞の分化機構に一貫して着目し解析を推進しており、その結果、粘膜再生過程における杯細胞の重要性(Gastroenterology 2005)、杯細胞分化を制御するマスター遺伝子の機能の解明（Gastroenterology 2007, BBRC 2008)、吸収上皮細胞分化における特異的マイクロRNA発現制御機構の存在（RNA 2008）等の画期的成果を示して来た。即ち、腸管粘膜の恒常性のみならず、再生・修復における上皮分化制御機構の重要性に着目し、炎症性腸疾患に於け

る再生・修復治療の確立を目指すという、独自の視点に立脚した研究を推進してきた。本研究ではこれまでの研究成果を更に発展させ、1)炎症性腸疾患局所にみられる上皮細胞分化異常を制御する分子機構の解明 2) 上皮再生・修復を促進する分子シグナル系の同定 3)同シグナル制御による粘膜再生治療の可能性を追求した。

B. C. 方法・結果

1)潰瘍性大腸炎病変部において病勢に応じて出現する「杯細胞の減少」と「異所性パネート細胞」という上皮分化の異常と、大腸上皮細胞の主たる分化制御経路の一つであるNotchシグナルの活性化との関係について、免疫組織学的に解析を行った。その結果、a) 正常ヒト大腸粘膜では、Notchシグナルの活性化は陰窩底部の上皮細胞に限局しており、同部位の上皮細胞に限局してNotchシグナルの標的遺伝子である Hes1 の発現も確認された。b)潰瘍性大腸炎病変部の粘膜上皮において、Notch シグナルは陰窩内の広範な上皮細胞で活性化が確認された。同部位では杯細胞の著しい減少、上皮細胞増殖の促進に加え、抗菌ペプチドであるPLA2G2A の異所性発現が示された。

2)ヒト大腸上皮由来培養細胞株を用いて薬剤誘導性に活性型 Notch1 を発現する独自の細胞系を樹立し、これを用いて、腸管上皮細胞におけるNotch シグナル活性化が細胞内遺伝子発現に与える影響について、マイクロアレイ法を用いて網羅的な解析を行った。その結果、a)ヒト大腸上皮由来細胞においてNotchシグナル活性化を誘導する事により、杯細胞の特異的形質であるMUC2のmRNAおよびタンパク発現のみならず、粘液分泌能にも著しい低下が確認された。b)これと相反してヒト大腸上皮由来細胞株におけるNotchシグナル活性化の誘導は、パネート細胞特異的遺伝子であり、抗菌ペプチドであるPLA2G2Aの発現及び分泌を促進した。

3)潰瘍性大腸炎病変部における広範な上皮細胞内Notchシグナルの活性化が、大腸炎の臨床転帰及び粘膜上皮の再生に果たす機能的な役割を明らかとするため、大腸炎モデルマウス(デキストラン硫酸投与による大腸炎誘導モデル)に対し Notch シグナル阻害薬を投与し、その臨床的効果を解析した。その結果、a) Notch シグナル阻害薬投与により、デキストラン硫酸誘導腸炎における著しい体重減少・臨床症状の増悪に加え、腸炎に起因すると考えられる死亡率の上昇が誘導された。即ち臨床経過の明らかな増悪が誘導された。 b) 正常大腸粘膜に於いて、Notch シグナル阻害薬投与により、著しい杯細胞の増加(杯細胞化生)を誘導した。一方、炎症部腸管に於いては細胞増殖を著しく抑制し、その結果、潰瘍による粘膜欠損部に於いて粘膜再生応答を著しく阻害した。 c) 炎症部腸管上皮に於いて、JAG1を含むNotchリガンド分子の発現誘導が見られた。

4)腸管上皮細胞に於いてNotchシグナル活性化を制御する外的因子の探索を行う為、内因性 Notch シグナルの活性化に応じてレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)を産生する恒常発現細胞株を作製し、既存薬物による活性化誘導能を検討した。その結果、高用量5-ASAはNotch活性化を促進するのに対し高用量デキサメサゾンはNotch活性化を抑制した。

以上の結果から、潰瘍性大腸炎病変部において特異的に出現する「杯細胞の減少」と「異所性パネート細胞」はいずれも上皮内Notchシグナルの活性化に制御されており、炎症粘膜上皮に於いて同機能を有するNotchシグナルの活性化が誘導される事は、粘膜再生に必須である事が示された。炎症性腸疾患に用いられる代表的な薬物である5-ASA は同シグナルを介して粘膜治癒に貢献している可能性が示された。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1)倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2)意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3)個人のプライバシーの保護を厳密に行う。

4)希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5)研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。

D. 考察

1) 本研究の成果は、Notchシグナルがヒト腸管に於いて機能を有し、粘膜恒常性維持及び損傷粘膜の再生という両局面に於いて上皮細胞分化を制御する重要な機能を担っていることを世界に先駆けて示した画期的なものである。具体的にはa)ヒト腸管の陰窩上皮に於いて同シグナル経路が活性化していること b)同シグナル活性化によりヒト腸管上皮細胞の分化形質が転換し得ること c)潰瘍性大腸炎の病変部における分化異常がNotchシグナルの活性化によりin vitroで再現され、同疾患からの回復・粘膜修復に重要な機能を担っていること、を明らかとした。さらに、これまでその意義が全く未知であった炎症性腸疾患における上皮分化異常が、粘膜修復応答の一局面として出現するという独自の画期的な概念を創出した。

2) 本研究ではヒト腸管上皮細胞におけるNotchシグナル活性化によって誘導される遺伝子発現変化の網羅的解析から、同シグナルが潰瘍性大腸炎の粘膜に於いて担う機能的意義を個体レベルで明確に示すことに成功した。即ち、同シグナルが単に上皮分化制御を行うのみならず、同時に細胞増殖を制御し、腸管粘膜の再生・修復応答における主たる分子シグナルとして機能していることを明らかとした。さらに大腸炎粘膜において出現する杯細胞の減少は、むしろ粘膜再生応答の一端を見ているに過ぎないことを初めて明確に示した。これらの成果はNotchシグナルが炎症性腸疾患における上皮再生応答に不可欠の重要なシグナル経路である事を明示したのみならず、同シグナルの活性化が粘膜再生の起点となっており、上皮細胞内Notch活性化の誘導が即ち粘膜再生促進に直結する可能性を明確に示した。

3)上記結果に基づき、Notch受容体を分子標的とする粘膜再生治療の確立に向け、本研究ではNotch活性化誘導因子の探索系の構築を達成している。同探索系を用いた評価に於いて,炎症性腸疾患における粘膜治癒効果を有する薬剤として唯一臨床的エビデンスが示されている5-ASAではNotch活性化が誘導される一方、潰瘍治癒の遷延因子として認知されているステロイド剤はNotch活性化を抑制することから、既存薬の評価においても腸管上皮細胞におけるNotch活性化と粘膜治癒の密接な関連が示された。今後同探索系を用い、Notch活性化誘導因子を幅広く探索する事により、粘膜治癒に特化した新規候補薬剤の創出につながる事が期待される。

E. 結論

炎症性腸疾患における粘膜再生・修復を制御する上皮細胞内分子シグナル系としてNotchシグナルを同定した。同シグナルは正常腸管粘膜及び炎症性腸疾患の炎症粘膜に於いて、上皮分化・増殖に重要な機能を有しており、特に杯細胞・パネート細胞特異的遺伝子の発現調節を介して炎症性腸疾患の病態形成に重要な役割担っていることが示された。これらの成果から、炎症性腸疾患における粘膜再生・修復機構に於ける主たる分子機構が明確に示され、粘膜再生促進を達成し得る分子標的を同定した。さらに同シグナルを標的とした分子標的治療薬開発の基盤整備も達成し得たことから、いずれの成果も上皮再生不全を伴う難治性炎症性腸疾患に全く新しい治療戦略を創出する画期的成果であると言える。

F. 健康危険情報　なし

G. 研究発表

1.論文発表

1.Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. Am J Physiol GI & Liver. 296:G23-G35, 2009.

2.Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Watanabe M: RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of

CD4+CD25+ regulatory T Cells in chronic colitis. J Immunol. 182: 6079-6087, 2009.

3. Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Shinohara T, Sakamoto N, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sudo T, Matsumoto S, Watanabe M: Long-Lived colitogenic CD4+ Memory T Cells residing outside the intestine participate in the perpetuation of chronic colitis. J Immunol. 183: 5059-5068, 2009.

4. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Akira S, Watanabe M: MyD88-dependent pathway in T cells directly modulates the expansion and survival of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. J Immunol. 180: 5291-5299, 2008.

5. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M: Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. J Immunol. 180: 383-390, 2008.

6. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. Gastroenterology. 132: 176-189, 2007.

7. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis J Immunol. 178: 4737-4748, 2007.

8. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, Kiyono H, Watanabe M: Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. J Immunol. 178: 4937-4946, 2007.

2. 学会発表

1. Tsuchiya K, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: GSK3 inhibitor induces the intestinal differentiation by the protein stabilization of Atoh1. DDW2009. Chicago, 2009年6月2日

2. Okamoto R: Notch1 activation promptes goblet cell depletion and expression of PLA2G2A in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. DDW2009. Chicago, 2009年6月1日

3. Totsuka T: Systemic, but not intersinal, IL-7 is essential for the development and persistence of Chronic Colitis. DDW2009. Chicago, 2009年5月31日

4. Watanabe M: Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: Current Understanding. Asia Pacific Working Group Inaugural Meeting on IBD. Chaina, 2009年3月7日

5. Tsuchiya K, Inoue K, Aragaki M, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Notch signaling suppresses the transcriptional activity of Hath1 Gene, resulting in the undifferentiated form of human intestinal epithelial cells. DDW 2008. San Diego, 2008年5月20日

6. 渡辺 守:炎症性腸疾患と発癌. 第106回 日本内科学会総会・講演会. 東京, 2009年4月10日

7. 渡辺 守:「消化器疾患のトピックス」IBD. 第51回 日本消化器病学会. 京都, 2009年10月17日

8. 渡辺 守: 炎症性腸疾患における Notch シグナル異常と分子標的の可能性. 第37回 日本臨床免疫学会総会. 東京, 2009年11月14日

9. 渡辺 守:炎症性腸疾患における粘膜免疫異常と上皮分化・再生障害の接点. 第29回 日本炎症・再生医学会. 東京, 2008年7月9日

10. 渡辺 守:Ulcerative colitis: A disorder of epithelial cell differentiation? 第93回 日本消化器病学会(4th Joint Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology and the American Gastroenterological Association). 青森, 2007年4月21日

11. 渡辺 守:Emerging issues in inflammatory bowel diseases. 神戸. 2007年10月15日-18日

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

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

宿主-微生物相互作用解析と治療応用
炎症性腸疾患における tRFLP 法による腸内細菌叢の特異性

研究分担者　　藤山　佳秀　滋賀医科大学内科学講座（消化器内科）　教授

研究要旨：炎症性腸疾患における腸内細菌叢の病因・病態への関与を検討する目的で、細菌由来 16S rDNA を用いた制限酵素断片長多型性（T-RFLP）法を用い、未知あるいは未同定難培養性細菌を含めた腸内細菌叢全体像をプロファイルとして解析を行った。その結果、潰瘍性大腸炎、クローン病ともに腸内細菌叢プロファイルは、デンドログラム上、健常人とは明らかに異なるクラスターを形成することが明らかとなった。

共同研究者
辨野義己　理化学研究所辨野特別研究室
松井敏幸　福岡大学筑紫病院消化器科
松本誉之　兵庫医科大学内科学・下部消化管科
鈴木康夫　東邦大学医療センター佐倉病院
　　　　　消化器内科
安藤　朗　滋賀医科大学大学院感染応答・免疫調
　　　　　節部門消化器免疫分野

A．研究目的

潰瘍性大腸炎およびクローン病の腸内細菌叢の特異性と病因・病態への関与を、T-RFLP 法による腸内細菌叢プロファイル解析により検討することを目的とした。

B．研究方法

潰瘍性大腸炎、クローン病症例および健常人の糞便より DNA を抽出し、細菌 16S rDNA の定常領域にプライマーを設定して得た PCR 産物を制限酵素処理し、その断片のキャピラリー電気泳動パターンをコンピューター解析する制限酵素断片長多型性（T-RFLP）解析法を実施した。

（倫理面への配慮）

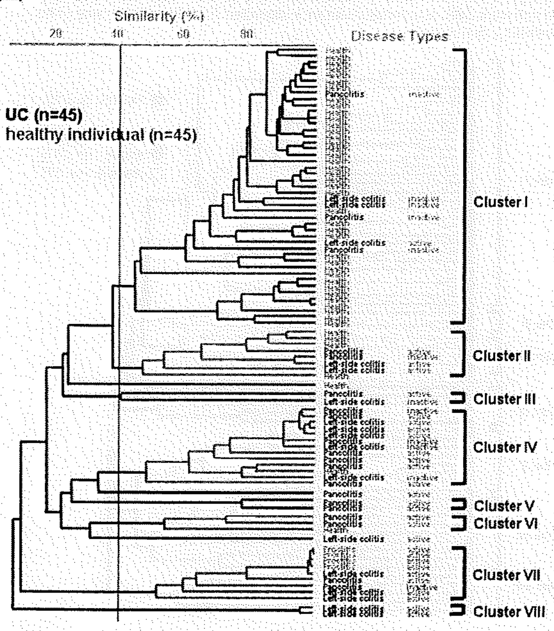
本研究の遂行にあたっては滋賀医科大学倫理委員会の承認を得て実施した。また、多施設共同研究においては当該医療機関倫理委員会の承認のお下に実施した。

C．研究結果

＜潰瘍性大腸炎の腸内細菌叢プロファイル＞

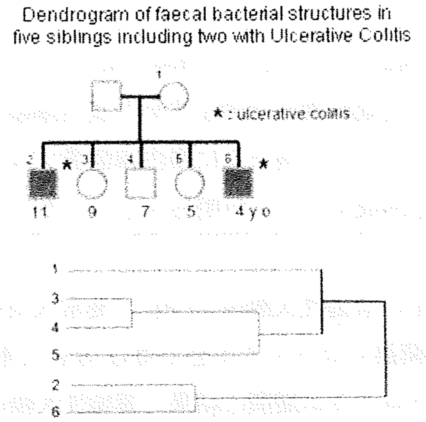
当科に通院中の潰瘍性大腸炎 45 例と、健常人対照 45 例の便中細菌叢プロファイルを T-RFLP 法にて解析した。デンドログラム展開の結果、潰瘍性大腸炎症例腸内細菌叢プロファイルは健常人クラスター（Cluster I）とは異なるクラスター（Cluster II ～VIII）を形成する（図 1）ことから、潰瘍性大腸炎の病態への腸内細菌叢プロファイルの関与が明らかとなった。一方、健常人クラスター群に属する潰瘍性大腸炎症例には緩解期症例が含まれる傾向はみられるものの、今回の検討からはその臨床的特徴に明らかな差異は見いだされなかった。また、活動期、緩解期でのクラスター上の異同に有意な差異は見いだされず、潰瘍性大腸炎の便中細菌叢は病期・治療内容にかかわらず一定のプロファイルが維持される可能性が示唆された[7]。

図 1



同胞発症例での検討においても発症例の2児の便中細菌叢プロファイルは母、非発症同胞に比してデンドログラム上極めて近似しており（図2）、このことは乳児期に構築された腸内細菌叢が本症の発症に関与している可能性を示唆している[2]。

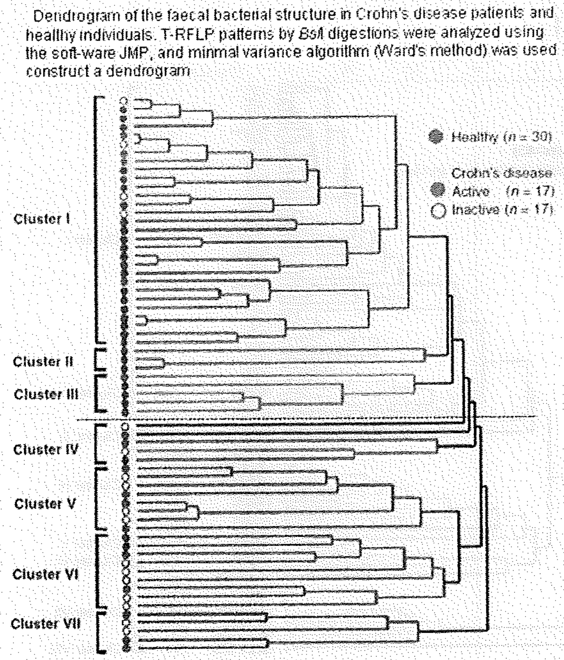
図2



＜クローン病の腸内細菌叢プロファイル＞

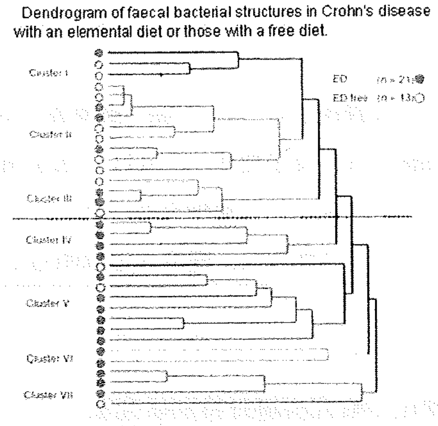
当科通院中のクローン病症例34例と、性・年齢をマッチさせた健常人対照34例について、同様にT-RFLP法による便中細菌叢プロファイルを検討した。デンドログラム解析では、潰瘍性大腸炎と同様に大きく健常人クラスター（Cluster I～III）とクローン病クラスター（Cluster IV～VII）に分類された（図3）。健常人クラスター群には9例のクロン病症例が含まれるが、活動期5例、緩解期4例で臨床病態含めクローン病クラスター群の症例と特徴的な差異は見いだされなかった[4]。

図3



一方、治療内容別に検討すると、成分栄養療法実施の有無によりクラスター分類に偏りがみられ、（図4）成分栄養療法はクローン病便中細菌プロファイルを修飾し得る可能性が示唆された[4]。

図4

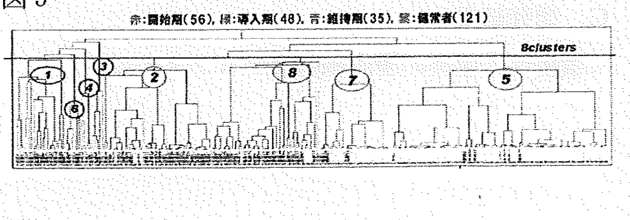


上記の結果を踏まえ、地域性を考慮した多施設共同研究にてT-RFLP法を用いた便中細菌叢プロファイル解析を行った。エントリーされた活動期クローン病症例のうち、CDAI≧220かつ腸管切除術・腸瘻造設術の施行歴がなく、エントリー時にTPNが実施されていない56例を対象とし、寛解導入時・維持期においてはCDAI<150を満足するものとして計139検体を解析対象とした。対照には地域・性・年齢がマッチした健常人より採便した試料を用いた。

健常対照のT-RFLPデンドログラム解析によるクラスター分布の独立性検定から、腸内細菌叢プロファイルに関東・近畿・北九州間の地域差は認められなかった。

クローン病症例におけるT-RFLP便中細菌叢プロファイルは、図5に示すデンドログラムの通り健常人とは異なるクラスターに集積することが多施設共同研究によっても明らかとなった（図中；各健常者はドット状に、個々クローン病症例はバー状に提示されている）。この内、クラスター①③④⑥はクローン病症例のみよりなり、他のクラスターとは系統樹上もっとも隔たった近似性位置で枝分れし、クローン病に特異なクラスター群と考えられた。

図5



D．考察

炎症性腸疾患における腸内（便中）細菌叢プロファイルは、潰瘍性大腸炎、クローン病ともに健常人とは異なる特異なプロファイルを呈することが明らかとなり、クローン病においては多施設共同研究においても確認された。また、クローン病では健常人腸内細菌叢プロファイルとは樹形図上近似性がもっとも隔たったクローン病特異クラスター群の存在が見いだされた。今後、このような炎症性腸疾患に特異的なクラスター群を特徴づける制限酵素断片ピーク(OUT)を抽出し解析することにより、本症の病因・病態への腸内細菌叢の関与の解明、さらには病態のバイオマーカ開発に繋がることが期待される。また、本症に対するプレバイオティクス・プロバイオティクスの開発における評価指標を提供するものと思われる。

しかしながら、T-RFLP 法による本研究は未知あるいは未同定難培養性細菌を含めた腸内細菌叢をプロファイルの形で一体としてとらえて病因・病態への関与を論じようとするものであり、自ずとその限界を踏まえた解析結果の解釈が必要である。細菌（微生物）由来 16S rDNA ライブラリーも NEW PAD-HCM（理化学研究所辨野特別研究室）など急速に充実されつつあり、分子生物学的 Clostritium Cluster 分類（Techno-Suruga Laboratory Co,.Ltd）による同定が進歩すると思われるものの、それは個々細菌（微生物）の生理生化学的性状を特徴づけるものではない。

したがって、宿主-微生物相互作用解析による炎症性腸疾患の病態解明と治療法の開発の今後の課題としては、腸内細菌叢メタゲノム解析と融合させた方向性が求められる。

E．結論

T-RFLP 法による便中細菌叢プロファイルの解析により、潰瘍性大腸炎、クローン病の腸内細菌叢プロファイルの特異性を明らかにした。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表（本研究課題に直接関係するもの）

1. Araki Y, Mukaisho K, Sugihara H, Fujiyama Y, Hattori T. Proteus mirabilis sp. intestinal microflora grow in a dextran sulfate sodium-rich environment. Int J Mol Med. 2010 Feb;25(2):203-8. Andoh A, Ida S, Tsujikawa T, Benno Y, Fujiyama Y. Terminal restriction fragment polymorphism analyses of fecal microbiota in five siblings including two with ulcerative colitis. Clin J Gastroenterol. [published online 19 Sep 2009]
2. Andoh A, Benno Y, Kanauchi O, Fujiyama Y. Recent advances in molecular approaches to gut microbiota in inflammatory bowel disease. Curr Pharm Des. 2009;15(18):206673.
3. Andoh A, Tsujikawa T, Sasaki M, Mitsuyama K, Suzuki Y, Matsui T, Matsumoto T, Benno Y, Fujiyama Y. Fecal microbiota profile of crohn's disease determined by terminal restriction fragment length polymorphism (t-rflp) analysis. Aliment Pharmacol Ther. 2009 Jan; 29(1): 75-82
4. Araki Y, Mukaisyo KI, Sugihara H, Fujiyama Y, Hattori T. Detection of N-nitroso-bile acids at 285 nm in reverse-phase HPLC. J Sep Sci. 2008 Aug;31(15):2827-30
5. Fujiyama Y, Sakata S, Andoh A, Benno Y. Novel aspects of intestinal microflora in ulcerative colitis. in "Recent Advances in Inflammatory Bowel Disease", Hibi T ed., 2007, pp43-7
6. Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, Mitsuyama K, Fujiyama Y, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis. 2007 Aug;13(8):955-62

7. 安藤朗、藤山佳秀。炎症性腸疾患における腸内細菌叢の変化—兄弟発症 UC 家系での解析を含めて。「大腸疾患 NOW 2010」、武藤徹一郎編、日本メディカルセンター（東京）、p206-211、2010
8. 安藤朗、藤山佳秀。炎症性腸疾患—最新知見—、発症に関わる腸内細菌と治療標的としての可能性。最新医学、64(9):1795-1799、2009
9. 安藤朗、藤山佳秀。潰瘍性大腸炎をめぐる最近の話題、潰瘍性大腸炎の病態。Medico 40(9):339-341、2009
10. 藤山佳秀。炎症性腸疾患—診断と治療の進歩—、炎症性腸疾患をめぐる動向。日本内科学会雑誌、98(1):1-4、2009
11. 安藤朗、藤山佳秀。炎症性腸疾患—診断と治療の進歩—、腸内細菌叢の役割。日本内科学会雑誌、98(1):25-30、2009
12. 安藤朗、藤山佳秀。潰瘍性大腸炎の LCAP 前後における腸内細菌叢の T-RFLP 法による解析。「大腸疾患 NOW 2009」、武藤徹一郎監修、日本メディカルセンター（東京）、156-161、2009
13. 安藤朗、藤山佳秀。IBD の衛生仮説と腸内細菌を標的とした治療法開発。IBD Research、2(4):287-291、2008
14. 安藤朗、藤山佳秀。腸内細菌叢・プロバイオティクスと腸管免疫。栄養—評価と治療、25(1)24-27、2008
15. 藤山佳秀、安藤朗。腸内細菌叢への薬物介入と腸疾患。Medicina、44(9):1739-1742、2007
16. 安藤朗、藤山佳秀。炎症性腸疾患と腸内細菌。臨床消化器内科、22(9):1203-1208、2007
17. 藤山佳秀。プロバイオティクスによる腸疾患治療。日本医師会雑誌、136(3):484-485、2007
18. 安藤朗、藤山佳秀。消化器疾患に対するサプリメントを科学する、プレバイオティクス、G. I. Research、15(3)222-226、2007

2. 学会発表

1. Bamba S, Shioya, M, Nishida A, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Fujiyama Y, Andoh A, Expression of interleukin-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. GASTRO 2009 UEGW/WCOG (London, UK) , Nov 25, 2009
2. Bamba S, Tsujikawa T, Inatomi O, Nakahara T, Koizumi Y, Saitoh Y, Sasaki M, Fujiyama Y, Andoh A. Factors affecting the efficacy of cyclosporin a therapy for refractory ulcerative colitis GASTRO 2009 UEGW/WCOG (London, UK), Nov 25, 2009
3. Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, Fujiyama Y, BennoY. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. 13th International Congress of Mucosal Immunology (Tokyo) , July 10, 2007
4. Yagi Y, Andoh A, Nishida A, Shioya M, Nishimura T, Hashimoto T, Ogawa A, Fujiyama Y. Interleukin-31 stimulates production of inflammatory mediators from human colonic subepithelial myofibroblasts. 13th International Congress of Mucosal Immunology (Tokyo) , July 10, 2007
5. Bamba S, Shioya M, Nishida A, Yagi Y, Ogawa A, Andoh A, Fujiyama Y, Bamba T. Epithelial overexpression of interleukin-32α in inflammatory bowel disease.15th United European Gastroenterology Week2007 (Paris) ,Oct 29, 2007
6. Andoh A., Fujiyama Y. Interleukin-32 and IBD – A new molecule interacting with nod proteins –. The 2nd Korea-Japan IBD Symposium (Tokyo), Nov 30, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

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

DNA マイクロアレイを用いた潰瘍性大腸炎合併癌と一般大腸癌の網羅的遺伝子発現の解析、および発癌早期病変(dysplasia)の p53 蛋白過剰発現と遺伝子異常

研究分担者　味岡　洋一　新潟大学大学院医歯学総合研究科　教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎(UC)の炎症粘膜を母地とする大腸癌（炎症性発癌）の発生機序を解明するため、①UC 合併進行大腸癌（UC 群）と一般進行大腸癌（Sporadic 群）の DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析、②発癌早期病変(dysplasia)の p53 蛋白過剰発現と遺伝子変異との関係の検討、を行った。網羅的遺伝子発現解析では、UC 群と Sporadic 群とで発現の異なる 273 遺伝子が同定され、これらを用いて各群のクラス予測が可能であった。今後はこれら遺伝子の機能解析が必要である。dysplasia では p53 蛋白過剰発現の有無に関わらず、72%～88.9%で p53 遺伝子異常が認められ、同遺伝子異常は炎症性発癌の早期段階から関与していることが確認された。

共同研究者　渡辺聡明[1)]、小武内尚[1)]、池内浩基[2)]、松本誉之[3)]、樋田信幸[3)]、渡辺憲治[4)]、大毛宏喜[5)]
1）帝京大学外科、2）兵庫医科大学外科、
3）兵庫医科大学下部消化器科、
4）大阪市立大学消化器内科、
5）広島大学第一外科

A．研究目的

潰瘍性大腸炎の炎症粘膜を母地とする大腸癌（炎症性発癌）の発生機序については、発癌早期段階で p53 遺伝子変異が関与しているとされているが、それ以外の遺伝子変異や発癌メカニズムの詳細は解明されていない。また、p53 遺伝子変異は免疫組織学的に蛋白過剰発現として表現されるが、炎症性発癌早期病変では p53 蛋白過剰発現がみられないものも存在する。本研究は以下の２点を目的とした。①DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、UC 合併大腸癌と一般大腸癌の発現遺伝子の相違点を明らかにすること。②炎症性発癌早期病変(dysplasia)における p53 蛋白過剰発現と遺伝子変異との関係を明らかにすること。

B．研究方法

①網羅的遺伝子発現解析：UC 合併進行大腸癌 19 例（UC 群）と一般進行大腸癌 160 例（Sporadic 群）を対象とした。外科切除材料から癌部の凍結生標本を採取し、Affymetrix 社の GeneChip（U133 plus2.0）により、癌組織における 54,675 個の遺伝子および transcript の発現解析を行った。
2 群間で発現の異なる遺伝子群を同定し、Support Vector Machine（SVM 法）でクラス予測を行った。
②p53 蛋白過剰発現と遺伝子異常：ホルマリン固定 UC 合併大腸癌 15 例に随伴する dysplasia25 病変 55 領域を対象とし、同部の p53 免疫染色(mAb-PAb1801)を行い、microdissection により DNA を抽出し、exon 5-8 を PCR により増幅の後、ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit と ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてシークエンス解析を行った。
（倫理面への配慮）
当該施設の倫理委員会により審査を受け、承認されている。

C．研究結果

①網羅的遺伝子発現解析：UC 群および Sporadic 群間で発現レベルの異なる遺伝子を見いだすため、Benjamin & Hochberg 法により多重性を調整した t-検定を行い、273 遺伝子を抽出した。この遺伝子セットを用いた 3-fold cross validation の結果、SVM

法で96.7%の精度でUC群とSporadic群の選別が可能であった。選別された273遺伝子の中には、細胞増殖、アポトーシス、接着因子などに関連する遺伝子が含まれていた。

②p53蛋白過剰発現と遺伝子異常：p53蛋白過剰発現は、陽性30/55(55%)、陰性25/55(45%)であったが、遺伝子変異はそれぞれ88.9% (24/27)と72.0% (18/25)に認められ。遺伝子変異パターンはp53蛋白過剰発現陽性群と陰性群とで異なり、前者は1塩基置換を伴うmissence mutationが89%、wild typeが11%であったのに対し、後者ではmissence mutationが32%、nonsense mutationが12%、deletionが20%、insertionが8%、wild typeが28%であった。

D．考察

進行癌を対象としたマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析では、UC群とSporadic群とで発現の異なる273遺伝子が同定され、これらを用いて各群のクラス予測が可能である。今後は、これらの遺伝子の機能に関する研究が必要である。一方、炎症性発癌早期病変ではp53蛋白過剰発現の有無にかかわらず70%以上でp53遺伝子の変異があり、同遺伝子異常が発癌早期段階に関与していることが確認された。しかし、同遺伝子の変異パターンには、過剰発現陽性と陰性とで違いと多様性がある。これらが発癌早期病変の異型度や浸潤癌へのprogressionのポテンシャルと関連しているかどうかが今後の検討課題である。

E．結論

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により明らかにされた、UC合併大腸癌と一般大腸癌で異なる発現を示した遺伝子の機能解析が、炎症性発癌の機序解明に寄与するものと考えられた。p53遺伝子異常は、同蛋白過剰発現の有無にかかわらず、炎症性発癌の早期段階から関与していることが確認された。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表

1) 味岡洋一、岩永明人、渡辺　順、他：coliticcancer診療update. I 発生 (1) 潰瘍性大腸炎合併腫瘍の発生－炎症性発癌と一般大腸腫瘍との差異について. INTESTINE 13: 233-240、2009

2) 味岡洋一、岩永明人、渡辺　順、他：炎症性腸疾患における癌化・発育進展. 潰瘍性大腸炎における大腸癌の組織発生. 胃と腸 43: 1935-1946、2008

3) 味岡洋一、松本誉之、日比紀文: 症例検討 colitic cancer/dysplasia の病理組織診断の現状と実際. 胃と腸 43: 1343-1368、2008

4) 味岡洋一：IBDを基にする炎症性発癌のメカニズムと病態－潰瘍性大腸炎の発癌メカニズムと病理学的特徴－. IBD Research、2: 120-126、2008

5) Watanabe T, Kobunai T, Toda E, Kanazawa T, Tanaka J, Tanaka T, Yamamoto Y, Hata K, Kojima T, Yokoyama T, Konishi T, Okayama Y, Sugimoto Y, Oka T, Sasaki S, Ajioka Y, Muto T, Nagawa H: Gene expression signature and the prediction of ulcerative colitis-associated colorectal cancer by DNA microaray. *Clin Cancer Res* 13: 415-420、2007

2. 学会発表

1) 横山純二、青柳　豊、味岡洋一: 潰瘍性大腸炎関連腫瘍の内視鏡像の検討－ｻｰﾍﾞｲﾗﾝｽにおける内視鏡検査の有用性と問題点. 第78回日本消化器内視鏡学会総会、京都、2009年10月15日.

2) 味岡洋一：Colitic cancer の病理. 日本消化器内視鏡学会第24回重点卒後教育セミナー、東京、2008年9月23日

H．知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

潰瘍性大腸炎におけるDNAメチル化を介した糖鎖合成不全

研究協力者　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：潰瘍性大腸炎の粘膜固有層細胞からCD33+細胞を分離し、Toll like receptor-4, MD-2といったLPS受容体分子の異常に高い発現を確認した。これによりマクロファージが細菌成分に応答した結果、過剰な炎症性サイトカインの産生がおこって病態を形成していると考えられる。また、潰瘍性大腸炎粘膜の半数以上と、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌においてSd^a糖鎖の発現低下がみられた。これはSd^a合成酵素のDNAメチル化によるサイレンシングによるものであった。一方、癌胎児性糖鎖抗原で、β1,4GalNAcT2のサイレンシングによって発現が亢進するシアリルルイスxは、散発性大腸癌や潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌癌組織だけでなく潰瘍性大腸炎粘膜においても発現が見られることがわかった。。このような糖鎖不全は炎症性サイトカイン産生に伴っておこり、発癌のリスク因子であるかもしれない。

共同研究者
国立国際医療センター研究所：河村　由紀、川島　麗、萩原　輝記
札幌医科大学：豊田　実、今井　浩三
自治医科大学さいたま医療センター：河村　裕、小西　文雄
国立国際医療センター戸山病院：斉藤　幸夫
慶應義塾大学：矢島　知治、日比　紀文
兵庫医科大学：松本　譽之

A．研究目的

正常大腸粘膜から分離した単核球細胞は、末梢血単核球細胞と異なり、通常腸内細菌叢菌体成分に対して炎症性サイトカインを産生しない。このメカニズムとして、我々は以前より大腸マクロファージ細胞にリポポリサッカライド（LPS）受容体の一つでありシグナル伝達に必須の分子MD-2が発現していないことを見いだしている。一方、潰瘍性大腸炎では過剰な炎症性サイトカインの産生が認められる。我々は、潰瘍性大腸炎においてマクロファージが腸内細菌の菌体成分に対して異常に応答するために炎症性サイトカインが産生されると考え、マクロファージ画分におけるLPS受容体の発現を検討した。また、潰瘍性大腸炎では大腸癌が最も深刻な合併症であり、その特徴を明らかにすることは発癌の予防法・早期診断法開発の基盤となる。消化管悪性腫瘍にみられるSd^a血液型糖鎖糖鎖発現低下は、転移能にも関連し、癌悪性形質の一端を担っていると考えられる。その発現低下の機構として我々は、Sd^a糖鎖合成酵素b1, 4GalNAcT2プロモーター領域のDNAメチル化が重要であることを見いだした。そこで、潰瘍性大腸炎粘膜および潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌、散発性大腸癌における糖鎖の発現を比較した。

B．研究方法

潰瘍性大腸炎の手術摘出粘膜から、粘膜固有層細胞を分離した。さらに磁気による自動細胞分離装置AUTOMACSを用いてCD33陽性細胞分画をマクロファージとして精製した。これよりTLR4, MD-2の発現を定量RT-PCRにより解析した。結果は健常粘膜（大腸癌摘出標本の非病変部）1症例を基準としたときの相対比として算出した。
また、b1, 4GalNAcT2プロモーター領域荷あるCpGアイランドのDNAメチル化をCOBRA法、bisufite sequence法、pyrosequence法を用いて解析した。さらに、凍結切片を用いてSd^a糖鎖，シアリルルイスx糖鎖の発現を特異抗体による免疫染色で比

較した。
（倫理面への配慮）
本研究計画は当該施設の倫理委員会により審査を受け、承認されている。

C．研究結果

大腸粘膜固有総細胞のうちCD33陽性細胞(マクロファージ)が占める画分は健常粘膜において3.6 ± 1.0 % (average ± standard error)であったのに対し、潰瘍性大腸炎では12.5 ± 1.3 %と優位に増加していた。TLR4トランスクリプトレベルの相対値は健常大腸粘膜由来CD33+細胞における1.81 ±1.47に対して、潰瘍性大腸炎粘膜由来のCD33+細胞では127.1 ± 180.5と高い上昇率を示した(P=0.0248)。MD-2の発現は健常粘膜由来CD33+細胞で1.9 ± 1.9であったのに対して潰瘍性大腸炎粘膜由来のCD33+細胞では28.99 ± 34.34と、これも優位な増加を示していた(P=0.04)。
潰瘍性大腸炎粘膜の半数以上で、上皮細胞におけるSd^a糖鎖の発現低下がみられた。潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌においてもSd^a糖鎖の発現低下がみられた。散発性大腸癌における、潰瘍性大腸炎症例およびcolitic cancer症例におけるSd^a合成酵素遺伝子b1,4GalNAcT2のプロモーター領域のメチル化陽性率は、約１０%であったのに対し、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌では有意に高かった。シアリルルイスxは正常粘膜には陽性例はなく、散発性大腸癌全例に陽性であったが、潰瘍性大腸炎粘膜においてもSd^aと相補的なde novo発現が見られた。

D．考察

健常粘膜には決してみられないLPS受容体の異常な発現が、潰瘍性大腸炎のマクロファージにみられた。したがって、潰瘍性大腸炎粘膜のマクロファージは、腸内細菌由来のLPSによる刺激に十分応答して炎症性サイトカインを分泌する能力を獲得している。従って、腸内細菌が炎症の持続機転及び再発増悪のトリガーになっている可能性が大きい。大腸におけるSd^a合成酵素遺伝子のプロモーター領域のメチル化は炎症に関連したエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の一部であると考えられる。潰瘍性大腸炎炎症粘膜に見られる、Sd^a糖鎖消失 とシアリルルイスx糖鎖発現といった糖鎖不全は、糖転移酵素のDNAメチル化によるサイレンシン機構によると考えられる。糖鎖不全は炎症性サイトカイン産生に伴っておこり、潰瘍性大腸炎における炎症発癌のリスク因子であるかもしれない。

E．結論

潰瘍性大腸炎粘膜ではマクロファージ数が増加しているとともに、健常粘膜ではみられない、LPS受容体の高い発現がみられた。潰瘍性大腸炎と大腸癌に共通する糖鎖不全現象を見いだした。この機序はSd^a 合成酵素のDNAメチル化によるサイレンシングであると考えられた。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表

1. 河村　由紀、豊田　実、土肥　多惠子　消化管癌における糖鎖不全現象のメカニズムとしてのDNA高メチル化　分子消化器病6 (1):99-101, 2009
2. Kawamura, YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, and Dohi T: DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer Gastroenterology 2008;135:142-151
3. Dohi, T and Kawamura YI: Incomplete synthesis of the Sd(a)/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer. Biochim Biophys Acta, 1780:467-471, 2008
4. 土肥多惠子、河村由紀：消化器癌の糖鎖不全

現象とエピジェネティックな遺伝子発現制御 医学のあゆみ 225：660-664, 2008

２．学会発表

1. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Saito Y, Kawamura YJ, Fumio, Konishi, Dohi T: Aberrant responses of human colonic macrophage-type cells to lipopolysaccharide in ulcerative colitis: upregulated expression of MD-2 and production of Inflammatory cytokines. Digestive Disease Week 2007. Washington D. C. 2007年5月22日
2. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Kawamura Y, Matsumoto T, Dohi T. DNA Hypermethylation Contributes to Incomplete Synthesis of the Sda Carbohydrate Antigen in Ulcerative Colitis-Associated Neoplasms But Not in Sporadic Colorectal Cancers. Digestive Disease Week 2009, Chicago, June 1, 2009
3. Dohi T, Borodovsky A, Kawashima R, Wu P, Kawamura YI, Burkly LC. Tweak/Fn14 Pathway: Role in the Intestinal Inflammation and Tissue Repair. Digestive Disease Week 2008, Selected as Poster of distinction, San Diego, U. S. A., May 18th, 2008
4. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Dohi T. Interleukin-13 Induces Tissue Damage with Relocation of β-Catenin and Modification of Cell-Cell Adhesion in the Epithelial Cells. Digestive Disease Week 2008, Selected as Poster of distinction, San Diego, U. S. A., May 20th, 2008
5. Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Kawamura Y, Dohi T. DNA Hypermethylation Causes Cancer-Associated Changes of Carbohydrate Determinants By Silencing 'Glyco-Genes' in Gastrointestinal Cancer. Digestive Disease Week 2008, San Diego, U. S. A., May 20th, 2008
6. Dohi T: Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine, 13th. US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century. Tokyo, June 13th, 2008

国内

1. Kawashima R, Kawamura YI, Mizutani N, Shirai Y, Saito Y, Toyama-Sorimachi N, Konishi F, Kawamura YJ, Dohi T. Aberrant respons to indigenous lipopolysaccharide in the colonic lamina propria mononuclear cells in ulceratvie colitis. The 4th Annual Meeting of JSIBD. Tokyo. 2007年12月1日
2. Kawamura YI, Toyota M, Kawamura YJ, Konishi F, Saito Y, Yajima T, Hibi T, Matsumoto T, Imai K, Dohi T. Epigenetic change causes aberrant glycosylation in ulcerative colitis and colitic cancer The 4th Korea-Japan IBD Symposium. 東京 2010年1月23日
3. 河村由紀、豊田 実、河村 裕、小西文雄、斉藤幸夫、松本 誉之、鈴木 拓、今井浩三、土肥多恵子：炎症関連大腸癌では散発性大腸癌と同じ糖鎖不全が異なるメカニズムによりおこる。第51回日本消化器病学会大会，京都、2009年10月15日
4. 河村由紀、豊田 実、河村 裕、小西文雄、斉藤幸夫、鈴木 拓、今井浩三、土肥多恵子：DNAメチル化により引き起こされるSd^{a}糖鎖発現抑制の炎症発癌における意義 第95回日本消化器病学会総会，札幌、2009年5月9日
5. Y I. Kawamura, M Toyota, R Kawashima, T Hagiwara, YJ. Kawamura, F Konishi, Y Saito, R Kannagi, K Imai, Dohi T. Inflammation-associated transcriptional

silencing of Sda carbohydrate-synthase gene by DNA hypermethylation in ulcerative colitis. Biochemistry and Molecular Biology (BMB) 2008, 神戸、2008年12月11日

6. Kawashima R, Kawamura IK. Toayama-Sorimachi N, Dohi T. IL-13 disrupts tight junction in the intestinal epithelial cells by modulating expression of ZO-1, occludin and claudin-2. 第38回日本免疫学会学術集会、京都、2008年12月2日
7. Vongsavanh P, Y I. Kawamura, R Kawashiama, and Dohi T : Comprehensive analysis of lectin-binding in the colitis and colitis-associated tumors in mice. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月28日
8. Y I. Kawamura, M Toyota, R Kawashima, Y J. Kawamura, F Konishi, Y Saito, T Yajima, T Hibi, T Matsumoto, R Kannagi, K Imai, and Dohi T : Transcriptional silencing of Sda carbohydrate-synthase gene by hypermethylation in ulcerative colitis and colitic cancer 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月29日
9. 土肥多惠子、河村由紀、豊田　実：消化管癌における糖鎖関連遺伝子のDNAメチル化によるサイレンシング　JDDW2008, 東京、2008年10月1日
10. 河村由紀、豊田　実、川島　麗、萩原輝記、鈴木　拓、篠村　恭久、時野　隆至、今井浩三、土肥多惠子：DNAメチル化異常により引き起こされる消化管の癌性糖鎖不全現象　日本分子臨床医学会　神戸、2008年7月23日
11. 土肥多惠子: 消化管病変における糖鎖発現の意義とそのエピジェネティックな制御機構　第12回GI Cell Biology研究会　東京、2008年6月19日

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果に関する一覧

執筆者氏名	論文題名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
渡邊修平，有村佳昭，細川雅代，田中浩紀，篠村恭久，今井浩三	II．炎症性腸疾患の病理・病態生理　3．遺伝的背景	藤山佳秀	日本内科学会雑誌	日本内科学会	東京	18-24	2009
中垣卓，細川雅代，有村佳昭	第二部 炎症性腸疾患をめぐる最近の話題　5．炎症と発癌における骨髄の役割	武藤徹一郎	大腸疾患NOW 2009	日本メディカルセンター	東京	173-176	2009
永石歓和，QiaoShuo-Wang，吉田優，有村佳昭，篠村恭久，今井浩三，BlumbergRichard S.	消化器疾患における自然免疫・獲得免疫のクロストーク Flagellin特異的IgGはFcRn依存性にマウス腸炎を促進する	日比紀文　他	消化器と免疫	マイライフ社	東京	42-46	2009
那須野正尚，今井浩三	７章－10　炎症性腸疾患における癌化機序	日比紀文	炎症性腸疾患	医学書院	東京	校正中	2009
有村佳昭，今井浩三	炎症を母地とする発癌	渡辺　守	BIO Clinica	北隆館	東京	314-319	2008
中垣卓，後藤啓，有村佳昭，田中浩紀，細川雅代，山下健太郎，山本博幸，篠村恭久	大腸癌化学療法におけるbiomarkerの現状	（篠原ひとみ）	消化器科	科学評論社	東京	38-42	2008
田中道寛，後藤　啓，篠村恭久	炎症性腸疾患とアディポサイトカイン	松澤佑次　他	Adiposcience	フジメディカル出版	大阪	61-67	2007
田中道寛，有村佳昭，後藤啓，中原生哉，矢花崇，田中浩紀，篠村恭久，今井浩三	炎症性腸疾患におけるAdiponectin血中濃度とSNPs解析	日比紀文　他	消化器と免疫	マイライフ社	東京	37-39	2007
安藤朗、藤山佳秀	炎症性腸疾患における腸内細菌叢の変化—兄弟発症UC家系での解析を含めて。	武藤徹一郎編	大腸疾患NOW 2010	日本メディカルセンター	東京	206-211	2010
安藤朗、藤山佳秀	潰瘍性大腸炎のLCAP前後における腸内細菌叢のT-RFLP法による解析	武藤徹一郎監修	大腸疾患NOW 2009	日本メディカルセンター	東京	156-161	2008
大藤さとこ、福島若葉、廣田良夫、押谷　伸英、渡辺憲治、長堀　正和、渡辺守、The Japanese Case-Control Study Group for Ulcerative Colitis	潰瘍性大腸炎のリスク因子に関する症例対照研究	監修：武藤徹一郎、編集：杉原健一、藤盛孝博、五十嵐正広、渡邉聡明	大腸疾患NOW 2009	日本メディカルセンター	東京	177-182	2009
		Hibi T	Recent Advences in Inflammatory Bowel Disease	Elsevier Japan	Tokyo	2007	
Matsumoto, T., Fukunaga, K., Kamikozuru, K., Tozawa, K., Yokoyama, Y., Kusaka, T., Ohnishi, K., Miwa, H. and Nakamura, S	Cytapheresis as a nonphaermacological therapy for inflammatory bowel disease.	Rudiger E. Scharf ed.	Progress and challenges in Transfusion Medicine, Hemostasis, and Hemotherapy	Karger	Freiburg	113-122	2008
松本譽之	クローン病	山口　徹，北原光夫，福井次矢　編	今日の治療指針 2010年版	医学書院	東京	401-401	2010
戸澤勝之，松本譽之	Crohn病	菅野健太郎，上西紀夫，井廻道夫　編	消化器疾患最新治療 2009-2010	南光堂	東京	208-212	2009
横山陽子，松本譽之	顆粒球／リンパ球吸着療法	白鳥敬子，菅野健太郎，坪内博仁，日比紀文　編	消化器研修ノート	診断と治療社	東京	237-239	2009
飯室正樹，松本譽之	全大腸型の潰瘍性大腸炎に罹患した34歳女性	松末　智，田中　清，本田佳子　編	ケースで学ぶ栄養管理の思想プロセス	文光堂	東京	77-87	2009
松本譽之	IBDと生物学的製剤	林　紀夫，日比紀文，上西紀夫，下瀬川徹　編	Annual Review 消化器2008	中外医学社	東京	75-80	2008
松本譽之，斎藤恵子，豊田光子	潰瘍性大腸炎・クローン病の病態と治療	香川達雄　編	潰瘍性大腸炎・クローン病の人の食事	女子栄養大学出版部	東京	5-18	2008
吉田幸治，松本譽之	Crohn病	渡辺純夫，三輪洋人　編	専門医のための薬物療法Ｑ＆Ａ　消化器	中外医学社	東京	131-138	2008
松本譽之，應田義雄	診断を受ける前に…．	NPO法人日本炎症性腸疾患協会(CCFJ)，福島恒男　編	潰瘍性大腸炎　患者が本当にききたいこと－129のQ&A	弘文堂	東京	2-7	2008
松本譽之	IBDと生物学的製剤．	林　紀夫，日比紀文，上西紀夫，下瀬川徹　編	Annual Review 消化器2008	中外医学社	東京	75-80	2008

執筆者氏名	論文題名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	ページ	出版年
小金井一隆、木村英明、杉田　昭	Ｃｒｏｈｎ病に合併する肛門病変	杉田　昭	内科医にもわかる直腸肛門病変	日本メディカルセンター	東京	21-32	2009
杉田　昭、小金井一隆、木村英明、山田恭子、鬼頭文彦、福島恒男	クローン病と発癌	杉原健一、藤盛孝博、五十嵐正弘、渡邉聡明	大腸疾患ＮＯＷ2008	日本メディカルセンター	東京	169-175	2008
小金井一隆、杉田　昭、木村英明、山田恭子、鬼頭文彦、福島恒男	クローン病女性の妊娠・出産と手術	杉原健一、藤盛孝博、五十嵐正弘、渡邉聡明	大腸疾患ＮＯＷ2008	日本メディカルセンター	東京	189-195	2008
杉田　昭、小金井一隆、木村英明	炎症性腸疾患に伴う直腸肛門病変	寺本龍生	肛門部疾患診療最前線	診断と治療社	東京	102-113	2007
飯島英樹，林　紀夫	【グライコミクスの世界】 炎症性腸疾患と糖鎖	三善英知	医学のあゆみ	医歯薬出版	東京	637-641	2008
飯塚政弘、相良志穂	急性出血性直腸潰瘍	杉田　昭	内科医にもわかる直腸肛門病変	日本メディカルセンター	東京	53-56	2009
飯塚政弘	内科入院、他	福島恒男	クローン病　患者が本当に聞きたいこと -140のQ & A	弘文堂	東京	41-52	2008
池内浩基、内野　基、中村光宏、松岡宏樹	第2章　主として良性疾患に用いられる手術　回腸嚢肛門吻合術	笹子三津留	消化器外科手術ナビガイド　大腸･小腸	中山書店	東京	19-27	2009
池内浩基、内野　基、松岡宏樹、中村光宏	第2章　主として良性疾患に用いられる手術　S状結腸粘液瘻造設術、Hartmann手術	笹子三津留	消化器外科手術ナビガイド　大腸･小腸	中山書店	東京	39-45	2009
池内浩基、中埜廣樹、内野基	人工肛門造設の適応と管理	杉田　昭	内科医にもわかる直腸肛門病変	日本メディカルセンター	東京	125-132	2009
池内浩基	人工肛門	福島恒男	クローン病患者が本当にききたいこと 140のQ&A	弘文堂	東京	61-76	2008
石黒　陽、山形和史、佐藤裕紀、櫻庭　裕丈、福田真作、棟方　昭博	緩解維持効果	炎症性腸疾患におけるAZA/6-MPの役割	臨床消化器内科	日本メディカルセンター	東京	1573-1580	2007
山形　和史、石黒　陽、櫻庭　裕丈、川口　章吾、佐藤　裕紀、福田　真作、棟方　昭博	薬物療法を選択するとき　5-ASA/ステロイド/免疫抑制剤など	炎症性腸疾患の治療をどう行うかーQOLからみた治療の選び方ー	消化器の臨床	ヴァンメディカル	東京	565-572	2007
多田正大，大川清孝，三戸岡英樹，清水誠治		多田正大、大川清孝、三戸岡英樹、清水誠治	内視鏡所見のよみ方と鑑別診断　下部消化管第２版	医学書院	東京	全	2009
大川清孝，清水誠治，中村志郎，井谷智尚，青木哲也，他		大川清孝、清水誠治	感染性腸炎　A to Z	医学書院	東京	全	2008
大川清孝	潰瘍性大腸炎	清水誠治、斉藤裕輔、田中信治、津田純郎	腸疾患診療　プロセスとノウハウ	医学書院	東京	267-296	2007
板橋道朗	第３章病態別栄養剤の使い方 F 炎症性腸疾患	城谷典保	経腸栄養管理のすべて	南江堂	東京	134-139	2008
三木誓雄、荒木俊光、吉山繁幸、楠　正人	大腸全摘・回腸嚢肛門吻合術	渡邉昌彦	大腸全摘 Digestive Surgery NOW No.1　第２版 小腸・結腸外科標準手術　操作のコツとトラブルシューティング	メジカルビュー社	日本	146-164	2008
工藤進英	大腸がんでは死なせない			土屋書店	東京		2009
工藤進英	見えないがんを追う			新潮社	東京		2009
工藤進英	ステップアップ！消化器内視鏡トレーニング			中山書店	東京		2009
工藤進英	Color Atlas 大腸拡大内視鏡			日本メディカルセンター	東京		2009
清水誠治	腸炎（腸管感染症，細菌性食中毒を含む）	白鳥敬子，菅野健太郎，坪井博仁，日比紀文	消化器研修ノート	診断と治療社	東京	364-368	2009
清水誠治	下痢	山口　徹・北原光夫・福井次矢	今日の治療指針2009	医学書院	東京	381-382	2009