

厚生労働科学研究費委託事業
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業）
「難治性小腸潰瘍の診断法確立と病態解明に基づいた治療法探索」
分担研究報告書

SLCO2A1の機能解析の現状

研究分担者 久松 理一 慶應義塾大学医学部消化器内科 准教授

研究要旨：家族発症例の検討とエクソームシーケンス解析の両アプローチから非特異性多発性小腸潰瘍症がプロスタグランジン輸送蛋白であるSLCO2A1遺伝子の変異による常染色体劣性遺伝病であることが明らかとなった。患者に認められるSLCO2A1変異では*in vitro*の機能解析ではプロスタグランジンの輸送能が喪失していた。現在、マウスモデルの作成、質量分析を用いたプロスタグランジン代謝解析を計画しており本疾患の病態解明と治療法開発に向けて研究を推進する。

A. 研究目的

非特異性多発性小腸潰瘍症の原因遺伝子であるSLCO2A1変異の機能解析を行い病態を明らかにし治療法開発につなげる。

B. 研究方法

1. 患者に認められた変異型SLCO2A1をHEK細胞に強制発現させ、放射性同位元素でラベルしたプロスタグランジンEを用いて細胞内への取り込みを検討する。
2. 患者小腸組織を用いたRt-PCRによるSLCO2A1遺伝子発現の検討と抗SLCO2A1抗体を用いて患者小腸組織の免疫染色を行う。
3. Cre/loxP系を用いて血管内皮特異的SLCO2A1欠損マウスを作成し疾患モデルを樹立する。
4. 質量分析法を用いて小腸粘膜におけるプロスタグランジン代謝産物の測定系を確立する。
(倫理面への配慮)

患者小腸組織生検については文書による同意を得て行う。マウスモデル動物の作成は施設の動物実験および遺伝子組み換え実験の承認を得て行う。

C. 研究結果

1. HEK細胞強制発現系を用いた検討では患者で認められた変異型SLCO2A1はプロスタグランジン輸送能を喪失していた。
2. SLCO2A1変異を認めた患者小腸組織においてはmRNAレベルでも変異型が発現していた。SLCO2A1の局在は小腸粘膜の血管内皮細胞であるが、変異型患者では正常蛋白の発現を認めなかった。
3. 現在、Cre/loxP系を用いて血管内皮特異的SLCO2A1欠損マウスを作成中であり、平成27年夏ごろに樹立予定である。
4. 研究分担者杉浦らの協力を得て、まずインドメタシン小腸潰瘍モデルを用いて小腸組織におけるプロスタグランジン代謝産物の測定系樹立を試みている。

D. 考察

*In vitro*のHEK細胞強制発現系を用いた検討では患者で認められた変異型SLCO2A1はプロスタグランジン輸送能を喪失していた。いっぽう組織中の正常SLCO2A1の発現は小腸粘膜内血管内皮細胞表面に認められ、患者ではその発現が確認できなかった。これらの事実は本疾患の病態の本質

は小腸組織におけるプロスタグランジン輸送障害にあることを示唆するものである。またNSAID小腸潰瘍症と類似の内視鏡像を取ることもこれを示唆している。これまで全く病態が不明で治療法も存在しなかった本疾患であるが、今回の発見によりモデル動物の確立や質量分析法を用いた代謝産物の測定により病態に迫り、治療法開発につながられる可能性が期待できる。

E. 結論

患者に認められた各変異型ではHEK細胞強制発現系においてプロスタグランジン輸送能は喪失していた。免疫染色の結果*SLCO2A1*の局在は小腸粘膜の血管内皮細胞であり、局所のプロスタグランジン輸送障害が病態に関与している可能性が示唆された。現在、動物モデルの作成と組織中のプロスタグランジン代謝産物測定系の確立にむけて研究を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 久松理一、島村克好、細江直樹、緒方晴彦、小崎健次郎、梅野淳嗣、松本主之、金井隆典 難治性小腸疾患に対する治療の工夫 非特異性多発性小腸潰瘍症の病態からみた小腸粘膜prostaglandin代謝の重要性 第52回小腸研究会 東京 2014.11.15
- 2) 久松理一、細江直樹、金井隆典 希少消化管疾患の臨床像と問題点 *SLCO2A1*遺伝子変異による家系内発症非特異性多発性小腸潰瘍症 第56回日本消化器病学会大会 (JDDW 2014) 神戸 2014.10.23

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委託事業
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業）
「難治性小腸潰瘍の診断法確立と病態解明に基づいた治療法探索」
分担研究報告書

非特異性多発性小腸潰瘍症の内視鏡像とアトラス作成の試み

研究分担者 緒方 晴彦 慶應義塾大学医学部内視鏡センター 教授
研究協力者 細江 直樹 慶應義塾大学医学部内視鏡センター 助教

研究要旨：非特異性多発性小腸潰瘍症は、回腸中～下部に浅い多発性の潰瘍と潰瘍瘢痕の混在した病変を認め、潜在性あるいは顕性出血による高度な貧血を特徴とする小腸潰瘍症で、原因は不明である。本研究は、多施設共同により、非特異性多発性小腸潰瘍症の内視鏡像の特徴を解析するとともに、アトラスを作成し、広く啓蒙することを目的とする。平成27年4月中に各施設での倫理申請を行い、画像収集を平成27年5月より開始、画像検討委員会を、平成27年7月、10月に予定、最終的に本研究の目的であるアトラス作成を行う。

A. 研究目的

非特異性多発性小腸潰瘍症は、回腸中～下部に浅い多発性の潰瘍と潰瘍瘢痕の混在した病変を認め、潜在性あるいは顕性出血による高度な貧血を特徴とする小腸潰瘍症で原因は不明である。非特異性多発性小腸潰瘍症の内視鏡像は、腸管軸に対し、斜走、輪走する潰瘍といわれているが、一部の専門医にしか知られておらず、その詳細も不明な点が多い。そこで本研究は、非特異性多発性小腸潰瘍症の内視鏡像の特徴を解析するとともに、アトラスを作成し、広く啓蒙することを目的とする。

B. 研究方法

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業（日比班、渡辺班）で行った、非特異性多発性小腸潰瘍のアンケート結果をもとに、下記の26施設（旭川医科大学病院、埼玉医科大学病院、仙台厚生病院、東京医科歯科大学病院、自治医科大学附属病院、福岡大学筑紫病院、藤田保健衛生大学病院、北里大学東病院、NTT東日本関東病院、慶應義塾大学病院、滋賀医科大学病院、京都大学

医学部附属病院、東北大学病院、兵庫医科大学病院、大阪大学医学部附属病院、秋田赤十字病院、三重大学病院、名古屋大学医学部附属病院、東京慈恵医科大学病院、名古屋市立大学病院、新潟大学病院、京都府立医科大学病院、大阪医科大学附属病院、大阪市立大学病院、千葉大学病院、金沢大学附属病院）より、非特異性多発性小腸潰瘍症の画像（内視鏡画像、X線造影画像）を集積し、画像の特徴を解析する。同時に、臨床データ（性別、年齢、発症年齢、既往歴、家族歴、採血データ、罹患部位）を集積する。その後、画像検討会を行い、最終的に画像アトラスを作成する。

（倫理面への配慮）

各施設で倫理委員会の承認を得たのちに画像を収集する。本研究における個人情報の匿名化は施設内で行い、かつ個人識別情報は施設内において管理し、本試験に関わる研究者は個人情報保護のために最大限の努力を払う。研究協力者には被験者識別コードをつけることで匿名化を行う（連結可能匿名化）。登録、症例報告書の取り扱いは被験者識別コードで特定し、イニシャル、生年月日等の個人特定可能な情報は用いない事とする。符号

化されたIDと個人名の対応表は、個人情報管理者が施錠できる部屋にて管理する。

C. 研究結果

平成26年7月第1回班会議にて本研究の概念、方法、評価項目などについて提示を行った。平成27年1月、第2回班会議にて、収集データ、収集方法を決定し、各施設のコンセンサスを得た。平成27年4月中に各施設での倫理申請を行い、画像収集を平成27年5月より開始、画像検討委員会を、平成27年7月、10月に予定、本研究の目的であるアトラス作成は平成27年の12月までには終了予定である。

D. 考察

本研究は、非特異性多発性小腸潰瘍症の画像を集積し、その特徴を広く啓蒙するためのアトラスを作成する。そのアトラスにより、本疾患の早期発見、早期治療が可能になることが予想される。

E. 結論

平成26年度は、試験のアウトラインの作成から、プロトコール作成までを行い、各施設のコンセンサスを得た。平成27年度は倫理申請、画像収集を開始し、アトラスを作成する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) UW Denzer, T Rösch, B Hoytat, M Abdel-Hamid, X Hebuterne, G Vanbiervliet, J Filippi, H Ogata, N Hosoe, K Ohtsuka, N Ogata, K Ikeda, H Aihara, T Hibi, SE Kudo, H Tajiri, A Treszl, K Wegscheider, M Greff, JF Rey. Magnetically Guided Capsule Versus Conventional Gastroscopy for Upper Abdominal Complaints A Prospective Blinded Study. J Clin

Gastroenterol 49(2): 101-7, 2015

- 2) Hosoe N, Naganuma M, Ogata H. Current status of capsule endoscopy through a whole digestive tract. Dig Endosc. 27(2): 205-15, 2015
- 3) Naganuma M, Hisamatsu T, Kanai T, Ogata H. Magnetic resonance enterography of Crohn's disease. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 9(1): 37-45, 2015
- 4) Miyoshi J, Hisamatsu T, Matsuoka K, Naganuma M, Maruyama Y, Yoneno K, Mori K, Kiyohara H, Nanki K, Okamoto S, Yajima T, Iwao Y, Ogata H, Hibi T, Kanai T. Early intervention with adalimumab may contribute to favorable clinical efficacy in patients with Crohn's disease. Digestion. 90(2): 130-6, 2014
- 5) Yoneno K, Hisamatsu T, Matsuoka K, Okamoto S, Takayama T, Ichikawa R, Sujino T, Miyoshi J, Takabayashi K, Mikami Y, Mizuno S, Wada Y, Yajima T, Naganuma M, Inoue N, Iwao Y, Ogata H, Hasegawa H, Kitagawa Y, Hibi T, Kanai T. Risk and management of intra-abdominal abscess in Crohn's disease treated with infliximab. Digestion. 89(3): 201-8, 2014

2. 学会発表

- 1) Ogata H, Yamamoto T, Kunisaki R, Ishida K, Hibi T. Efficacy, safety, and demographics factor of oral Tacrolimus Therapy in 666 Japanese patients with refractory Ulcerative Colitis. 22nd United European Gastroenterology Week, Vienna, Austria October 21, 2014,
- 2) 細江直樹、緒方晴彦、金井隆典 潰瘍性大腸炎患者に対する大腸カプセル内視鏡の前処置法 第87回日本消化器内視鏡学会総会 福岡 2014.5.16

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委託事業
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業）
「難治性小腸潰瘍の診断法確立と病態解明に基づいた治療法探索」
分担研究報告書

全エクソームシーケンスによる非特異性多発性小腸潰瘍症の原因遺伝子の同定

研究分担者 江崎 幹宏 九州大学大学院病態機能内科学 講師
研究協力者 梅野 淳嗣 九州大学大学院病態機能内科学 助教

研究要旨：非特異性多発性小腸潰瘍症は、潰瘍による貧血と低蛋白血症を特徴とする、まれな消化管疾患の一つである。本症の原因や病態については不明な点が多いが、家系内に血族結婚を認める症例や同胞発症例があることから常染色体劣性遺伝病である可能性が示唆されている。本研究では、全エクソームシーケンスを用いて本症の原因遺伝子を同定し、疾患概念を確立することを目的とした。4家系6症例（患者5例、非発症者1例）において全エクソームシーケンスを行った。dbSNP135データベースの情報および家系情報を用いて候補遺伝子の絞り込みを行ったところ、*SLCO2A1*遺伝子のみ絞り込まれた（4ヶ所の変異部位）。日本人コントロール検体747例では、3例においてイントロン7のスプライス部位の変異をヘテロ接合型で有していたが、他3ヶ所の変異は全くみられなかった。他の非特異性多発性小腸潰瘍症患者12例について同遺伝子内のエクソン領域の変異を検索したところ、12例中11例にタンパクの機能変化をきたしうる遺伝子変異をホモ接合型もしくはコンパウンドヘテロ接合型変異として有していた。以上より非特異性多発性小腸潰瘍症の原因として*SLCO2A1*遺伝子を同定した。

A. 研究目的

非特異性多発性小腸潰瘍症は、小腸の潰瘍に伴う高度の貧血と低蛋白血症を特徴とする、まれな消化管疾患の一つである。治療法は確立されておらず、腸管狭窄に対し外科的切除が必要となるなど難治性の経過をたどる。¹⁾原因は不明であるが、家系内に血族結婚を認める症例や同胞発症例があることから常染色体劣性遺伝を示すメンデル遺伝性疾患である可能性が示唆されている。²⁾

本研究は、本症患者および家系内非発症者のゲノム検体を用いた全エクソームシーケンスを行うことで本症の原因遺伝子を同定し、疾患概念を確立することを目的とした。

B. 研究方法

① 非特異性多発性小腸潰瘍症患者および同一家

系内非発症者の同意取得および採血検体収集

② 全エクソームシーケンスによる候補遺伝子の絞り込み

1. タンパク質コード領域の抽出・濃縮 (Illumina® TruSeq Exome Enrichment Kit)
2. 次世代シーケンサーを用いた大量シーケンス (Illumina® HiSeq2000)
3. リファレンス配列へのマッピング (BWA)
4. 塩基多型のコール (GATK)
5. dbSNP135などの公開データベースを用いたフィルタリング (非同義変異もしくはスプライス部位変異)
6. 家系情報を用い候補遺伝子を絞り込む
7. سانガー法による確認

③ 日本人コントロールでの確認

コントロール症例において同定した変異の頻

度がまれであることをサンガー法で確認する。

④ 別症例における検証、原因遺伝子の同定
サンガー法で候補遺伝子のエクソン領域のダイレクトシーケンスを行い、再現性を検証する。

⑤ クローン病と診断された患者において遺伝学的に非特異性多発性小腸潰瘍症と診断すべき症例が存在しているか調査する。

過去にクローン病と診断された患者由来のDNA検体を用いて同定した遺伝子変異を常染色体劣性遺伝形式で有する症例がないかタイプングを行う。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学病院の倫理委員会の承認を得たうえで行う。全ての試料についてはインフォームド・コンセントを行い、文書での同意を得た上で採取または使用する。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って遺伝子解析を行う。

C. 研究結果

当科もしくは共同研究施設に通院中の患者および家族のうち、同胞発症2家系を含む15家系25例から書面による同意が得られ、血液の採取を行った(非特異性多発性小腸潰瘍症発症者17例、非発症者8例)。DNAを抽出し、4家系6検体(発症者5例、非発症者1例)について全エクソームシーケンスを行った(下図)。

図

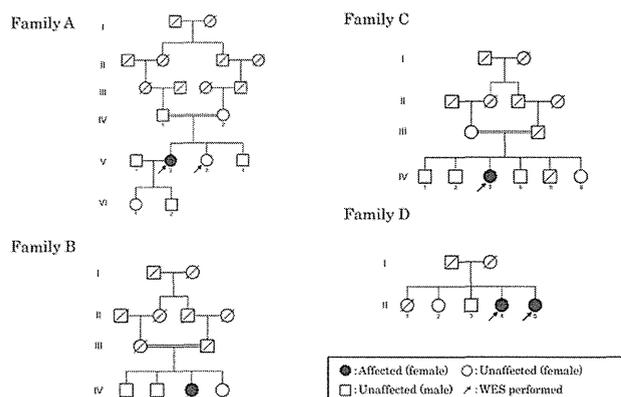


表1. 全エクソームシーケンスの結果

Subjects	A-V-2	B-IV-3	C-IV-3	D-II-4	D-II-5	A-V-3 (Unaffected)
Mapping						
Total number of sequenced reads passing QC ($\times 10^6$)	103.5	111.0	93.1	117.6	97.9	111.6
Total number of mapped reads ($\times 10^6$)	103.1	110.4	92.4	117.2	97.5	110.8
Mean target coverage	66.7	71.2	55.8	82.8	65.1	71.8
% targets with 10x coverage	91.7%	93.5%	92.7%	92.7%	91.7%	92.9%
Number of identified variants						
SNV/indel	107,406	112,602	105,357	110,880	107,840	104,545
NS/SS	9,436	9,477	9,095	9,544	9,285	8,937

QC, quality control; SNV, single nucleotide variant; indel, insertion/deletion; NS, non-synonymous mutation; SS, splice-site mutation.

表2. 変異を有する遺伝子数

	A-V-2		B-IV-3		C-IV-3		D-II-4		D-II-5		A-V-3 (Unaffected)	
	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero
NS/SS	2,731	3,227	2,797	3,253	2,775	3,023	2,727	3,367	2,659	3,343	2,754	2,921
Not in dbSNP135	27	286	25	265	29	257	18	294	16	265	22	159

NS, non-synonymous mutation; SS, splice-site mutation

4家系6検体の全エクソームシーケンスの結果は、平均 105.8×10^6 リード(QC後)、全ターゲット領域における平均被覆度68.9、全ターゲット領域中の被覆度10以上の領域が占める平均の割合92.5%であった。表1にGATKを用いてコールした変異数及び非同義変異/スプライス部位の変異数を示す。表2にdbSNP135に登録されていない非同義変異もしくはスプライス部位の変異を有する遺伝子数を示す。まず、常染色体劣性遺伝形式をとることから血族結婚を有する3家系3症例(A-V-2、B-IV-3、C-IV-3)に注目した。dbSNP135に未登録の非同義的もしくはスプライス部位の変異が3症例に共通してホモ接合型にみられる遺伝子は9個のみであった。さらにA-V-3は非発症者であることを考慮すると候補遺伝子はSLCO2A1のみに絞り込まれた。家系Dの同胞発症2症例は、ともに同遺伝子内にコンパウンドヘテロ変異を有していた。同定された4ヶ所の変異はいずれもタンパクの機能に変化をきたすと推測される変異であった(表3)。

表3. 全エクソームシーケンスで同定した変異

No	Exon	Variants		Methods
1	5	c.664G>A	Gly222Arg	Sanger sequencing
2	7	c.940+1G>A	Splice site	RFLP(<i>HpyCHAIIV</i>)
3	10	c.1461+1G>C	Splice site	RFLP(<i>BsrI</i>)
4	13	c.1807C>T	Arg603X	Sanger sequencing

全エクソームシーケンスを行った5症例についてSLCO2A1遺伝子内に上記変異があることをダイレクトシーケンス法で確認した。

次に日本人コントロール747検体を用いて4ヶ所についてダイレクトシーケンスもしくは制限酵素断片長多型を用いてタイピングを行ったところ3例においてイントロン7に存在するc.940+1G>A変異をヘテロ接合型で有していた。

他非特異性多発性小腸潰瘍症12例においてSLCO2A1遺伝子の全エクソン領域における変異を検索したところ、12例中11例にタンパクの機能変化をきたしうる変異をホモ接合型またはコンパウンドヘテロ接合型変異として有していた。以上の結果より、非特異性多発性小腸潰瘍症の原因はSLCO2A1遺伝子の変異によるものと断定した。

次にクローン病患者と過去に診断された603例の検体を用いてSLCO2A1遺伝子内の変異を検索したところ、2例においてタンパクの機能変化をきたしうる変異をコンパウンドヘテロ接合型変異として有していた。上記2症例は、非特異性多発性小腸潰瘍症と考えられた。

以上の通り、計18例の非特異性多発性小腸潰瘍症患者において原因と考えられるSLCO2A1遺伝子内の7ヶ所の変異部位を同定した。

SLCO2A1遺伝子は、プロスタグランジン輸送体をコードする遺伝子であり、肥厚性皮膚骨膜炎の原因遺伝子として知られている。肥厚性皮膚骨膜炎は、ばち指、長管骨などの骨膜性骨肥厚、皮膚肥厚性変化を3主徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患であり、臨床徴候は血中などのプロスタグランジン濃度上昇による二次的な変化と考えられている。18例の非特異性多発性小腸潰瘍症患者における消化管外の臨床徴候を調査したところ、ばち指や骨膜炎は7例にみられた。うち3例は肥厚性皮膚骨膜炎の3主徴を全て有していた。

現在SLCO2A1遺伝子の機能解析の情報を加えた論文が完成し、英文雑誌に投稿中である。

D. 考察

本研究から非特異性多発性小腸潰瘍症はSLCO2A1遺伝子変異を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患であることが明らかとなった。

SLCO2A1遺伝子はプロスタグランジントランスポーターをコードしている。³⁾ プロスタグランジントランスポーターは細胞膜に発現し、プロスタグランジンE2などの細胞内への取り込みと細胞内からの排出に関与している。同遺伝子は肥厚性皮膚骨膜炎の原因遺伝子の一つとして報告されている。⁴⁾

SLCO2A1遺伝子を原因とする肥厚性皮膚骨膜炎は本症と同様に常染色体劣性遺伝形式を示すが、男性に多いという特徴を有する。患者の尿中のプロスタグランジンE2および尿中/血漿中のプロスタグランジン代謝産物が高濃度であることから、プロスタグランジンE2の細胞内への取り込みの異常とプロスタグランジンE2の代謝障害によって皮膚や骨膜での細胞の増殖が促進されるという機序が推測されている。同一遺伝子の変異を原因とするにもかかわらず、非特異性多発性小腸潰瘍症には肥厚性皮膚骨膜炎様の臨床徴候を伴わない症例が存在する。非特異性多発性小腸潰瘍症は女性に多いことから、性関連遺伝子もしくは性ホルモンがこれらの疾患の発症に関与している可能性が示唆される。またプロスタグランジンE2は、EP受容体を介して消化管粘膜保護作用を有することが知られており、⁵⁾ 血中プロスタグランジン濃度が高値と考えられる非特異性多発性小腸潰瘍症患者で小腸潰瘍が発生するメカニズムは不明である。今後、これらの疑問点について更なる機能解析が必要と思われる。

E. 結論

われわれは全エクソームシーケンスを用いて非特異性多発性小腸潰瘍症の原因遺伝子がSLCO2A1遺伝子であることを明らかにした。

参考文献

腸潰瘍症の原因遺伝子の同定 第56回日本
消化器病学会大会 神戸 2014.10.24

1. Endoscopic features of chronic nonspecific multiple ulcers of the small intestine: comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy. Matsumoto T, Nakamura S, Esaki M, Yada S, Koga H, Yao T, Iida M .Dig Dis Sci, 51:1357-63, 2006
2. Chronic nonspecific multiple ulcer of the small intestine segregates in offspring from consanguinity. Matsumoto T, Kubokura N, Matsui T, Iida M, Yao T.J Crohns Colitis, 5:559-65, 2011
3. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. Kanai N, Lu R, Satriano JA, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL. Science, 268:866-9, 1995
4. Exome sequencing identifies SLCO2A1 mutations as a cause of primary hypertrophic osteoarthropathy. Zhang ZL, Xia W, He J, Zhang Z, Ke Y, Yue H, Wang C, Zhang H, Gu J, Hu W, Fu W, Hu Y, Li M, Liu Y.Am J Hum Genet, 90:125-32, 2012
5. Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isozymes in healing of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. Hatazawa R, Ohno R, Tanigami M, Tanaka A, Takeuchi K.J Pharmacol Exp Ther,318:691-9, 2006

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 江崎幹宏、松本主之、梅野淳嗣 エクソームシーケンスを用いた非特異性多発性小

厚生労働科学研究費委託事業
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業）
「難治性小腸潰瘍の診断法確立と病態解明に基づいた治療法探索」
分担研究報告書

患者検体のプロスタグランジン濃度測定法の確立

研究分担者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学教室 教授
研究協力者 杉浦 悠毅 慶應義塾大学医学部医化学教室 講師

研究要旨：SLCO2A1遺伝子変異が高頻度に認められる非特異性多発性小腸潰瘍症の实地診療では、診断/疾患モニタリングに患者検体プロスタグランジン（PG）濃度測定が必須となる。そのため患者血清、尿、組織中の正確なPG測定系を確立する。検討の結果、質量分析法を用いたメタボロミクスの手法により、PGを含む微量脂質メディエーター群を網羅的に測定することに成功した。

A. 研究目的

非特異性多発性小腸潰瘍症の診断/疾患モニタリングに資する正確なPG濃度測定系を構築する。

B. 研究方法

1. 質量分析法を用いたメタボロミクスの手法を応用し、PGを含む微量脂質メディエーター群を網羅的に測定する系を構築する。

2. 確立した測定系を用いて、マウス小腸粘膜における微量脂質メディエーター群の濃度を網羅的に測定する。

（倫理面への配慮）

動物実験の実施については、施設の動物実験および遺伝子組み換え実験の承認を得て行う。

C. 研究結果

1. 三連四重極型質量分析計を用いて脂質メディエーター群の定量系の構築を行った。その結果、アラキドン酸カスケードに由来する脂質メディエーターやその関連物質158成分の一斉分析を、わずか1回の分析で、また20分の短時間でモニターできる測定系を構築する事に成功した。

2. 研究分担者久松らの協力を得て、Non-

Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAID)

小腸潰瘍モデルマウス腸管および血清サンプルを本法により解析した。その結果、アラキドン酸由来酸化代謝物（PG）のみならず、Docosahexaenoic acid (DHA)、eicosapentaenoic acid (EPA)、さらにリノレイン酸から代謝生成する脂質メディエーターに関しても疾患に特徴的な減弱を示す事が明らかになった。

D. 考察

本年度は質量分析計を用いた脂溶性メタボローム解析、なかでも脂質メディエーター（生理活性脂質）群に焦点を当てた網羅的解析系の確立を行った。これは本事業対象の難治性小腸潰瘍の原因遺伝子がプロスタグランジン輸送体であることに鑑みて、病態機序の解明と、さらに臨床検体を用いた診断に資する代謝物マーカー同定の為に必須なものであると考えたからである。

実際には、このような脂質メディエーター分子はピコモルオーダーで存在する微量微量の生理活性分子であり、高度な前処理法/測定技術が要求されたが、我々は、この脂質メディエーター分子群（158種類）を網羅的に測定できる実験系を確立/導入し、生体試料の解析を行う基盤を整えた。

バイオマーカー候補因子としての脂質メディエーター分子は、これらが健常人の生体内で重要な生理機能を発揮していると共に、難治性小腸潰瘍惹起のメカニズムにも直接に関与する。従ってProof of conceptが容易でありそのバイオマーカーとしての価値は高い。実際、NSAID小腸潰瘍モデルマウス腸管および血清においては、従来から知られているアラキドン酸-酸化代謝物 (PG) のみならず、DHA、EPA、リノレイン酸から代謝生成する微量脂質メディエーターに関しても疾患に特徴的な挙動を示す事が明らかになった。平成27年度は病態モデルマウスおよび臨床検体の解析対象を増やし、特異的脂質マーカー同定を目指す。

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

E. 結論

微量脂質メディエーター158成分の一斉分析を、1回20分の分析でモニターできる測定系を構築した。NSAID小腸潰瘍モデルマウス腸管および血清においては、PGに加えDHA、EPA、リノレイン酸から代謝生成する微量脂質メディエーターが疾患に特徴的な挙動を示した。今後は病態モデルマウスおよび臨床検体の解析対象を増やし、特異的脂質マーカー同定を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

IV. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表（書籍）

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・月
藤谷 幹浩 高後 裕	Cronkhite-Canada症候群.	渡辺 守 田中 信治	画像で見ぬく消化器疾患vol. 2大腸	医学出版	東京	191-193	2014
	(書籍全体の編集)	Matsui T Matsumoto T Aoyagi K	Endoscopy in the diagnosis of small intestine diseases	Springer	Japan	1-283	2014・4

研究成果の刊行に関する一覧表（論文）

掲載した論文 (発表題目)	発表者氏名	学会誌・雑誌名	出版年・月	外国 の内 別・	巻(号)	ページ
Internet-orientated assessment of QOL and actual treatment status in Japanese patients with inflammatory bowel disease. The 3I survey.	<u>Matsumoto T</u> Yanai S Toya Y Nakamura S	J Crohn Colitis	2015	国外	in press	
Contribution of susceptibility variants at FCGR2A and 13q12 to the risk of relapse among Japanese patients with ulcerative colitis.	Asano K Esaki M Umeno J Hirano A Maehata Y Moriyama T Nakamura S <u>Matsumoto T</u> Kitazono T	J Gastroenterol	2015	国外	in press	
International consensus guidelines on surveillance and management of dysplasia in inflammatory bowel disease.	Laine L Kaltenbach T Barkun A McQuaid KR Subramanian V Soetikno R East JE Farraye FA Feagan B Ioannidis J Kieasslich R Krier M <u>Matsumoto T</u> McCabe R Mökemüller K Odze R Picco M Rubin DT Rubin M Rubio CA RUTter MD Sanchez-YagueA Sanduleanu S Shergill A Ullman T Velayos F Yakich D Yang YX	Gastroinetst Endosc	2015・2	国外	in press	
Low-dose aspirin and NSAIDs increases the risk of bleeding in patients with gastroduodenal ulcer. A single center, case-control study.	Kawasaki K Kurahara K Yanai S Kochi S Fuchigami T <u>Matsumoto T</u>	Dig Dis Sci	2014・12	国外	in press	
Feasibility of a novel colonoscope with extra-wide angle view. A clinical study.	Urakoka T Tanaka S Oka S Matsuda T Saito Y Moriyama T Higashi R <u>Matsumoto T</u>	Gastrointest Endosc	2014・12	国外	in press	

Therapeutic strategy for Crohn's disease patients with loss of response to infliximab. A single center retrospective study.	Nagata Y Esaki M Umeno J Fuyuno Y Ikegami K Maehata Y Asano K Moriyama T Nakamura S Kitazono T Matsumoto T	Digestion	2015・1	国外	91(1)	50-56
Associations and epistatic interactions of HLA class I alleles in Japanese patients with Crohn's disease.	Oryoji D Hisamatsu T Tsuchiya K Umeno J Ueda S Yamamoto K Matsumoto T Watanabe M Hibi T Sasazuki T	Genes Immun	2015・1	国外	16(1)	54-56
Characteristics of Japanese inflammatory bowel disease susceptibility loci.	Arimura Y Isshiki H Onodera K Yamashita K Sonoda T Matsumoto T Takahashi A Takazoe M Yamazaki K Kubo M Fujimiya M Imai K Shinomura Y	J Gastroenterol	2014・8	国外	49(8)	1217-1230
Serum microRNA levels in patients with Crohn's disease during induction therapy by infliximab.	Fujioka S Nakamichi I Esaki M Asano K Matsumoto T Kitazono T	J Gastroenterol Hepatol	2014・7	国外	29(7)	1207-1214
Emergency endoscopy for acute gastrointestinal bleeding. Prognostic value of endoscopic hemostasis and the AIMS65 score in Japanese patients.	Nakamura S Matsumoto T Sugimori H Esaki M Kitazono T Hashizume M	Dig Endosc	2014・3	国外	26(3)	369-376
Patients' assessment of adalimumab self-injection for Crohn's disease. A multicenter questionnaire survey: The PEARL survey.	Hirai F Watanabe K Matsumoto T Iimuro M Kamata N Kubokura N Esaki M Yamagami H Yano Y Hida N Nakamura S Matsui T	Hepato-gastroenterol	2014・10	国外	61(10)	1654-1660

C-reactive protein is an indicator of serum infliximab level in predicting loss of response in patients with Crohn's disease.	Hibi T Sakuraba A Watanabe M Motoya S Ito H Sato N Yoshinari T Motegi K Kimouchi Y Takazoe M Suzuki Y <u>Matsumoto T</u> Kawakami K Matsumoto T Hirata I Tanaka S Ashida T Matsui T	J Gastroenterol	2014・2	国外	49(2)	254-262
Use of capsule endoscopy in patients with Crohn's disease in Japan. A multicenter survey.	Esaki M <u>Matsumoto T</u> Watanabe K Arakawa T Naito Y Chiba T Hibi T Matsumoto T Higuchi K Goto H Motoya S Watanabe M	J Gastroenterol Hepatol	2014・1	国外	29(1)	96-101
Macrophages and Dendritic Cells Emerge in the Liver during Intestinal Inflammation and Predispose the Liver to Inflammation.	Mikami Y Mizuno S Nakamoto N Hayashi A Sujino T Sato T Kamada N Matsuoka K Hisamatsu T Ebinuma H <u>Hibi T</u> Yoshimura A Kanai T	PLoS One	2014・9	国外	9(1)	e84619
Endoscopic imaging of parasites in the human digestive tract.	Hosoe N Ogata H <u>Hibi T</u>	Parasitol Int	2014・8	国外	63(1)	216-220
The 2nd edition of consensus statements for the diagnosis and management of intestinal Behcet's disease: indication of anti-TNF α monoclonal antibodies.	Hisamatsu T Ueno F Matsumoto T Kobayashi K Koganei K Kunisaki R Hirai F Nagahori M Matsushita M Kobayashi K Kishimoto M Takeno M Tanaka M Inoue N <u>Hibi T</u>	J Gastroenterol	2014・7	国外	49(1)	156-162

TGF- β 1 in Tumor Microenvironments Induces Immunosuppression in the Tumors and Sentinel Lymph Nodes and Promotes Tumor Progression.	Nakamura S Yaguchi T Kawamura N Kobayashi A Sakurai T Higuchi H Takaishi H <u>Hibi T</u> Kawakami Y	J Immunother	2014・2	国外	37(2)	63-72
Use of capsule endoscopy in patients with Crohn's disease in Japan: a multicenter survey.	Esaki M Matsumoto T Watanabe K Arakawa T Naito Y Matsuura M Nakase H <u>Hibi T</u> Matsumoto T Nouda S Higuchi K Ohmiya N Goto H Kurokawa S Motoya S Watanabe M	J Gastroenterol Hepatol	2014・1	国外	29(1)	96-101
Continuous low-dose irradiation by I-125 seeds induces apoptosis of gastric cancer cells regardless of histological origin.	Takabayashi K Kashiwagi K Kawata T Sato T Matsuoka K Hisamatsu T Takaishi H <u>Hibi T</u> Ogata H Yahagi N Kitagawa Y Shigematsu N Kanai T	Cancer Biol Ther	2014・1	国外	15(1)	81-88
Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice.	Tomita K Teratani T Suzuki T Shimizu M Sato H Narimatsu K Okada Y Kurihara C Irie R Yokoyama H Shimamura K Usui S Ebinuma H Saito H Watanabe C Komoto S Kawaguchi A Nagao S Sugiyama K Hokari R Kanai T Miura S <u>Hibi T</u>	Hepatology	2014・1	国外	59(1)	154-169

Subcutaneous Golimumab Induces Clinical Response and Remission in Patients With Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis	Sandborn WJ Feagan BG Marano C Zhang H Strauss R Johanns J Adedokun OJ Guzzo C Colombel JF Reinisch W Gibson PR Collins J Jarnerot G <u>Hibi T</u> Rutgeerts P	Gastroenterology	2014・1	国外	146(1)	85-95
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 improves the intestinal injury by regulating apoptosis via trefoil factor 2 in mice with anti-CD3-induced enteritis.	Ando K Fujiya M Konishi H Ueno N Inaba Y Moriichi K Ikuta K Tanabe H Ohtake T <u>Kohgo Y</u>	Inflammatory Bowel Diseases	2015	国外	in press	
The production of coagulation factor VII by adipocytes is enhanced by tumor necrosis factor- α or isoproterenol.	Takahashi N Yoshizaki T Hiranaka N Kumano O Suzuki T Akanuma M Yui T Kanazawa K Yoshida M Naito S Fujiya M <u>Kohgo Y</u> Ieko M	International Journal of Obesity	2015	国外	in press	
Hepatic nerve growth factor induced by iron overload triggers defenestration in liver sinusoidal endothelial cells.	Addo L Tanaka H Yamamoto M Toki Y Ito S Ikuta K Sasaki K Ohtake T Torimoto Y Fujiya M <u>Kohgo Y</u>	BBA - Molecular Basis of Disease	2015	国外	in press	
Host-Microbe Interactions via Membrane Transport Systems.	Konishi H Fujiya M <u>Kohgo Y</u>	Environ Microbiol	2015	国外	in press	
Efficacy and adverse events of endoscopic mucosal resection (EMR) and submucosal dissection (ESD) for the treatment of colon neoplasms: A meta-analysis of studies comparing EMR and ESD.	Fujiya M Tanaka K Dokoshi T Tominaga M Ueno N Inaba Y Ito T Moriichi K <u>Kohgo Y</u>	Gastrointest Endoscopy	2015	国外	in press	

Decreased vessel networks and irregular vessel on narrow band imaging are useful findings to distinguish intestinal lymphoma from lymphoid hyperplasia.	Ando K Fujiya M Konishi H Ueno N Inaba Y Moriichi K Ikuta K Tanabe H Ohtake T <u>Kohgo Y</u>	Gastrointest Endoscopy	2014・12	国外	80(6)	1064-71
Non-transferrin-bound iron assay system utilizing a conventional automated analyzer.	Ito S Ikuta K Kato D Shibusa K Niizeki N Tanaka H Addo L Toki Y Hatayama M Inamura J Shindo M Sasaki K Iizuka N Fujiya M Torimoto Y <u>Kohgo Y</u>	Clin Chim Acta	2014・11	国外	437	129-35
microRNA-18a induces apoptosis in colon cancer cells via the autophagolysosomal degradation of oncogenic heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1.	Fujiya M Konishi H Kamel M. K. M Ueno N Inaba Y Moriichi K Tanabe H Ikuta K Ohtake T <u>Kohgo Y</u>	Oncogene	2014・10	国外	33(40)	4847-56
Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of nonalcoholic fatty liver disease in mice.	Sawada K Ohtake T Hasebe T Abe M Tanaka H Ikuta K Suzuki Y Fujiya M Hasebe C <u>Kohgo Y</u>	Hepatology Research	2014・7	国外	44	920-934
TU-100 (Daikenchuto) and Ginger Ameliorate Anti-CD3 Antibody Induced T Cell-Mediated Murine Enteritis: Microbe-Independent Effects Involving Akt and NF- κ B Suppression.	Ueno N Hasebe T Kaneko A Yamamoto M Wang Y Fujiya M <u>Kohgo Y</u> Kono T Musch MW Chang EB	PloS One	2014・5	国外	23;9(5)	e97456

Mucosal healing of ileal lesions is associated with long-term clinical remission after infliximab maintenance treatment in patients with Crohn's disease.	Beppu T Ono Y <u>Matsui T</u> Hirai F Yano Y Takatsu N Ninomiya K Tsurumi K Sato Y Takahashi H Ookado Y Koga A Kinjo K Nagahama T Hisabe T Takaki Y Yao K	Dig Endosc	2015	国外	27(1)	73-81
Second peak in the distribution of age at onset of ulcerative colitis in relation to smoking cessation.	Takahashi H <u>Matsui T</u> Hisabe T Hirai F Takatsu N Tsurumi K Kanemitsu T Sato Y Kinjyo K Yano Y Takaki Y Nagahama T Yao K Washio M	J Gastroenterol Hepatol	2014	国外	29(8)	1603-1608
Characterization of gut microbiota profiles by disease activity in patients with Crohn's disease using data mining analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms.	Andoh A Kobayashi T Kuzuka H Tsujiyama T Suzuki Y Hirai F <u>Matsui T</u> Nakamura S Matsumoto T Fujiyama Y	Biomed Rep	2014	国外	2(3)	370-373
Long-term outcome of endoscopic balloon dilation for small bowel strictures in patients with Crohn's disease.	Hirai F Beppu T Takatsu N Yano Y Ninomiya K Ono Y Hisabe T <u>Matsui T</u>	Dig Endosc	2014	国外	26(4)	545-551
Development and progression of colorectal cancer based on follow-up analysis.	Hisabe T Hirai F <u>Matsui T</u>	Dig Endosc	2014	国外	26 Suppl, 2	73-77
Impact of CYP3A5 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and short-term remission in patients with ulcerative colitis treated with tacrolimus.	Hirai F Takatsu N Yano Y Satou Y Takahashi H Ishikawa S Tsurumi K Hisabe T <u>Matsui T</u>	J Gastroenterol Hepatol	2014	国外	29(1)	60-66