

課題番号 : 23指101
研究課題名 : 炎症性腸疾患の新規診断マーカー及び治療標的の開発
主任研究者名 : 河村 由紀
分担研究者名 : 櫻井 俊之

キーワード : 炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、Wnt/Notch シグナル、レクチン

研究成果 :

概要

研究の背景

炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）は、近年著しい増加傾向にある若年発症の重篤な慢性炎症性疾患である。消化管局所の免疫応答異常を特徴とするが、根治療法がない。慢性化した患者の予後を左右する最も重大な因子は大腸癌の合併であり、実際にこれらの疾患に罹患した患者は、非罹患患者と比べて高い発癌リスクを有している。そのため、長期にわたり発癌のスクリーニングのため定期的に内視鏡検査を受けているが、患者及び医療費負担の面から検査の頻度にも限界があり、また検査には早期の粘膜病変を検出するための高い技術が要求される。このため、より簡便で客観的なマーカー開発が急務である。また、発癌高危険群だけでなく、治療抵抗性で、重症化により手術適応に至るような患者を事前に選別し、予防対策を講じるためには、炎症の重篤化を予測する分子マーカーの同定とこれに基づく予防法の開発が急務である。そこで本研究では、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）の臨床検体を用いて、新しい予後サーベイランスマーカーや治療標的となる分子の探索を行った。

研究の実施内容

炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）の新しい予後サーベイランスマーカーとして、より簡便な検査法への応用を目指し、炎症局所で見られる変化を反映する、末梢血中のマーカーを探索した。治療標的となる分子の探索としては、炎症・傷害粘膜の修復過程で見られる細胞増殖の亢進と、糖鎖産生を担う杯細胞の消失過程の制御に重要であることがマウスモデルで示されている Wnt/Notch シグナルに着目して研究を行った。

炎症性腸疾患の遷延化診断のための末梢血マーカーの探索

潰瘍性大腸炎手術症例 26 例の、摘出病変部の炎症粘膜において、上皮に発現する糖鎖の変化を組織免疫染色により検討した。その結果、正常消化管上皮に発現する血液型糖鎖 Sd^a 抗原および 6 スルホシアリルルイス x 糖鎖が広範に消失していることが明らかになった。自然免疫細胞（マクロファージや樹状細胞）は、これらの正常上皮細胞に発現する糖鎖を認識するレクチン分子（セレクトリン、ガレクチン、シグレック等）を発現している。従って、末梢血中のマクロファージ/樹状細胞が炎症に伴う消化管局所の糖鎖発現変化を反映し、受容体レクチン分子の発現パターンに変化を生じていれば、消化管局所の糖鎖発現変化を調べる方法と比較して、末梢血中のマクロファージ/樹状細胞の細胞表面分子の解析という、より簡便な検査法により消化管病変部の炎症状態を知ることが出来る。そこで、末梢血中の自然免疫細胞を解析対象として、正常上皮細胞に発現する糖鎖を認識するレクチン分子の発現を検討した。クローン病 22 例（21-57 歳、平均年齢 41.5 歳）、潰瘍性大腸炎 41 例（20-91 歳、平均年齢 47.0 歳）の炎症性腸疾患症例と、対照非炎症性腸疾患症例としてベーチェット病 3 例、腸結核患者 3 例の末梢血を解析した。解析症例の臨床情報は、本研究に特化した Case Report Form を作成し、これを用いて収集した。CD33 陽性マクロファージ/樹状細胞における糖鎖認識レクチンの発現を、健常人ボランティア（26-54 歳、平均年齢 34.0 歳）と比較した結果、シグレック陽性頻度が潰瘍性大腸炎症例で 8 倍、クローン病症例で 5 倍以上有意に高かった。クローン病症例と潰瘍性大腸炎症例との間ではマーカーの発現頻度に有意差は無かった。また、ベーチェット病および腸結核症例と健常人ボランティアとの間にもマーカーの発現頻度に有意差は認められなかった。以上より、本マーカーの発現ではクローン病と潰瘍性大腸炎の鑑別は困難であるが、炎症性腸疾患特異的变化であると考えられた。潰瘍性大腸炎症例において、検査値との関連を更に検討した結果、CRP 値、ALB 値、Hb 値、ESR 値、

白血球数、好中球数、血小板数と CD33 陽性マクロファージ/樹状細胞におけるシグレック陽性頻度には相関は認められなかったことから、炎症程度のみを反映する変化ではないことが明らかとなった。症状（発熱、腹痛、血便）、病変範囲による病型、臨床的重症度（pUCDAI スコア）との関連では、腹痛と有意に関連し、全大腸型の重症例で陽性となる傾向が見られた。そこで、治療介入の前後や、再燃/寛解等病勢に変化が見られた場合には再解析を行うこととし、更に有用性を評価した。現時点での前向き検討例が 11 例と少ないため有意差は無かったが、陽性症例では陰性症例よりも通院間隔が短く、ステロイド治療に依存性または抵抗性を示すことが明らかとなった。以上より、本マーカー発現が再燃の予知、治療反応性の予知に有用である可能性が示唆された。今後も本研究への症例の登録と、前向き解析登録症例の経過追跡を継続して行うことで、統計学的解析においても本マーカーの有用性を示すことが出来ると考えている。

炎症性腸疾患の新規診断マーカーの探索

末梢血マーカーの解析より、CD33 陽性マクロファージ/樹状細胞細胞において糖鎖認識分子の発現異常が認められたため、潰瘍性大腸炎、クローン病および健常人ボランティアの末梢血由来 CD33 陽性マクロファージ/樹状細胞、潰瘍性大腸炎の摘出標本、クローン病の手術組織、ないし非炎症性腸疾患患者の炎症粘膜固有層より分離した CD33 陽性マクロファージ/樹状細胞細胞を対象として、更なる新規マーカー分子の探索を行った。次世代シーケンサーを用いた網羅的解析には通常 10^7 - 10^8 細胞が必要とされるが、臨床情報との統合を行うためには各検体の個別解析を行う必要が有るため、SAGE-seq (serial analysis of gene expression sequencing) による網羅的な mRNA 発現解析と、MeDIP-seq (methylated DNA immunoprecipitation sequencing) による網羅的な DNA メチル化解析を、 10^5 細胞を用いて同時に行う方法を開発した。本法を用いて得られたシーケンシング結果において、CD33 およびマクロファージ/樹状細胞特異的分子の mRNA 発現は確認出来ており、次世代シーケンサーを用いた免疫細胞の小スケール解析法を確立出来た。バイオインフォマティクス解析により、CD33 陽性マクロファージ/樹状細胞細胞においては、特定領域(遺伝子)における DNA メチル化異常よりも、反復配列におけるゲノムワイドな低メチル化が顕著であることが明らかとなった。

炎症粘膜で見られる再生上皮における Notch/Wnt シグナル異常の解析

炎症・傷害粘膜の修復過程で見られる細胞増殖の亢進と、糖鎖産生を担う杯細胞の消失過程の制御において Wnt/Notch シグナルが重要であることがマウスモデルで示されているので、Wnt/Notch シグナル強度を調節するチューニング分子 (NLK、Nrp、Numb 等) に着目して検討を行った。その結果、両シグナルに抑制的に作用するレオスタット分子 Nemo-like kinase の発現が潰瘍性大腸炎組織において有意に低下していることを見出した。この分子をコードする遺伝子の転写制御部には、DNA メチル化による発現抑制を受ける CpG アイランド領域が存在するため、パイロシーケンシング法によりメチル化状態を検討した結果、潰瘍性大腸炎組織において顕著なメチル化亢進が見られた。この分子を発現していない大腸癌細胞株を DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine 処理すると mRNA 発現が回復し、また、DNA メチル基転移酵素 (DNMT1 および DNMT3b) のダブルノックダウンによりゲノムワイドに殆ど DNA メチル化が認められない大腸癌細胞株においても、親株と比べて著しい発現が認められた。以上より、本分子の発現は DNA メチル化による制御を受けていることが示され、これまで不明であった炎症性腸疾患における Wnt/Notch シグナル破綻の分子機構が明らかとなった。

炎症粘膜で異常が見られる Notch/Wnt シグナル調節分子の機能解析

本研究で見出した潰瘍性大腸炎における Wnt/Notch シグナル調節分子の発現低下が、細胞機能に影響を及ぼす変化か否かを *in vitro* で評価した。散发性大腸癌の切除大腸粘膜の正常部より単離したヒト由来大腸上皮細胞を、我々が確立した大腸上皮細胞の三次元培養法を用いて培養し、siRNA を導入することで Wnt/Notch シグナル調節分子の発現抑制を試みたが、ゲル培養等の特殊な条件下のためか、siRNA 導入そのものがうまくいかなかった。そこで、Wnt/Notch シグナル調節分子の発現が低下している潰瘍性大腸炎の切除組織より再生上皮細胞を単離して同様に三次元培養し、DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine を添加することで Wnt/Notch シグナル調節分子の発現回復を試みた。

5-aza-2'-deoxycytidine 処理するとゲル培養中でも転写制御部位に存在する CpG アイランド領域の DNA メチル化が解除された。ゲル培養液中に EdU を添加し、その取り込みにより細胞増殖能を同時に評価した結果、DNA のメチル化解除に伴い細胞増殖も抑制された。DNA メチル化阻害剤により再生上皮で見られる過増殖が抑制されたことから、Wnt/Notch シグナル調節分子の転写制御部位を含む DNA メチル化異常の是正が、炎症性腸疾患の治療標的となる可能性が示された。

炎症性サイトカイン誘導性エピジェネティック異常の Notch/Wnt シグナルへの影響の解明

潰瘍性大腸炎およびクローン病の組織サンプルおよびマウス腸炎モデルを用い、炎症局所において発現亢進が著明な因子について検討した。その結果、炎症性サイトカイン IL-6 が炎症の重症度ならびに DNA メチル化レベルと相関することを見出した。また、IL-6 は上皮における DNMTs の発現を誘導した。散发性大腸癌の切除大腸粘膜の正常部より単離したヒト由来大腸上皮細胞のゲル培養中に IL-6 を添加しても NLK 転写領域の DNA メチル化亢進は認められなかった。一方、潰瘍性大腸炎の切除組織より単離した再生上皮のゲル培養中に IL-6 中和抗体を添加すると、NLK 転写領域の DNA メチル化レベルが低下し、細胞増殖は亢進した。これらの結果は、IL-6 阻害剤は再生上皮で見られる DNA メチル化を介した過増殖を抑制するという点からも、炎症性腸疾患の治療として有効であることを示している。一方で、IL-6 は潰瘍性大腸炎でみられる傷害上皮の修復に必須であり、他にも複数の因子が関与していることが示唆されている。病態に関連する分子機構の更なる全貌解明を目指して、潰瘍性大腸炎の摘出標本およびマウスモデルより分離した再生上皮細胞を対象として、網羅的トランスクリプトーム解析（マイクロアレイ解析、SAGE-seq 解析）ならびに網羅的メチローム解析（メチル化アレイ解析、MeDIP-seq 解析）を施行した。現在、バイオインフォマティクス解析中であるが、炎症粘膜に特徴的なムチン産生性杯細胞の消失と関連する、ムチン型糖鎖合成遺伝子、MUC2 ムチン、TFF2 等に加えて、Wnt/Notch 標的遺伝子、エピゲノム修飾編集因子の DNA メチル化亢進による発現抑制が見出されており、今後さらにバイオインフォマティクス解析を進めていくことで、潰瘍性大腸炎の病態および炎症遷延化に関連する分子機構を解明し、IL-6、Wnt/Notch シグナル異常の重要性を明らかに出来ると考えている。

サーベイランスマーカーとしての有用性をヒト消化器疾患において検証する

潰瘍性大腸炎およびクローン病の手術組織、生検標本を用い、炎症消化管粘膜で発現変化が見られた糖鎖の生合成に関わる分子、Wnt/Notch シグナル関連分子とその強度を調節するチューニング分子、エピゲノム修飾編集因子の発現と炎症の重症度、dysplasia や癌合併との相関を解析した結果、潰瘍性大腸炎において、ムチン型糖鎖合成遺伝子 *B4GALNT2* の DNA メチル化が、疾患活動度、癌合併と有意に相関し、ステロイド治療後の内視鏡的粘膜治癒と関連する傾向が認められた。現時点で前向きに解析可能であった治療介入例で、治療効果が判定出来た症例数が 8 例と少ないため、今後も本研究への症例の登録を継続して行うことで、統計学的解析においても本解析がサーベイランスマーカーとして有用であることを示すことが出来ると期待される。

Subject No. : 23-101

Title : A search for novel diagnostic markers and molecular targets for therapeutic approach of inflammatory bowel disease

Researchers : Yuki Kawamura and Toshiyuki Sakurai

Key word : inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, Crohn's disease, Wnt/Notch signals, lectin

Abstract :

Background and Aim

Inflammatory bowel disease (IBD), such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), are characterized by relapsing/remitting nature of the inflammatory process. While some cases with IBD are relatively stable and controllable by means of medical treatment, we encounter many cases with recurrent deterioration of disease which necessitates intensive treatment like high dose of steroid therapy, immunosuppressant or even surgery. In damaged intestinal mucosa of IBD, the mucus layer, which covers intestinal epithelial cell surface with heavily glycosylated mucin, is deteriorated and abnormally glycosylated. Recently, we reported that colonic immune cells express sialic acid-binding Ig-like lectins, which recognize cell surface glycans preferentially expressed in normal colonic epithelium. We have speculated that the interaction of these lectins with these glycans might be involved in immune tolerance in the mucosal tissue. However, differential expression of these lectins and its regulation in the peripheral immune cells, as well as their function in these cells, has been largely unknown. The goal of this project is to develop novel surveillance markers and molecular targets for therapeutic approach of IBD. The specific aim of this study is to clarify whether these lectin expressions of peripheral blood mononuclear cells may reflect the condition of damaged/unhealed mucosa with abnormal glycosylation, and moreover, predict exacerbation of the disease.

1. A search for novel diagnostic and surveillance markers for IBD

Methods and Results

In inflamed mucosa, the aberrant glycosylation on epithelial cells was observed, including the loss of 6-sulfo-Lewis x carbohydrate antigen, which is abundantly expressed in normal gastrointestinal mucosa. Since innate immune cells express sialic acid-binding Ig-like lectins that can recognize cell surface glycans preferentially expressed in normal colonic epithelium, we examined the expression of these lectins in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by flow cytometric analysis. We isolated PBMCs from 63 IBD patients (22 CD and 41 UC) as well as 3 patients with Behcet's disease and 3 patients with intestinal tuberculosis as non-IBD controls. Flow cytometric analysis revealed that the frequency of lectin-positive cells in CD33⁺ PBMCs isolated from UC (mean age, 47.0 years, range 20-91) and CD (mean age, 41.5 years, range 21-57) was significantly higher than that of non-IBD subjects (mean age, 34.0 years, range 26-54), however; there was no difference between UC and CD. High frequency of lectin-positive CD33⁺ cells was not observed in intestinal tuberculosis nor Behcet's disease blood, even at active stage. In IBD patients, the incidence of lectin-positive cells in CD33⁺

PBMCs correlated with abdominal pain, but not CRP, ALB, Hb, ESR, the number of WBC, neutrophils, and platelets. These results suggest that inflammation is not essentially parallel to the expression of lectins. In contrast, the expression of lectins in CD33⁺ PBMCs tended to correlate with pUCDAI score, which reflects disease severity, but it did not reach statistical significance due to few numbers of lectin-positive patients. In fact, the incidence of lectin-positive cells in CD33⁺ PBMCs was decreased in some UC patients with remission after steroid therapy, while other patients with remission have kept high frequency of lectin-positive cells, aggravated later.

Conclusion

The emergence of lectin-positive cells in the peripheral CD33⁺ PBMCs reflects presence of the mucosal damage in an IBD-specific manner, which may be clinically cryptic without apparent sign of inflammation. It may predict exacerbation or relapse in IBD patients.

2. A search for novel molecular targets for therapeutic approach of IBD

Methods and Results

Using murine colitis models, it has been reported the significance of Wnt/Notch signals to regulate cell proliferation and differentiation in the regenerative process of inflamed mucosa. In this project, we found that the expression of nemo-like kinase, which is a negative regulator of Wnt/Notch signals, was dramatically decreased in UC mucosa as compared with that in non-IBD colonic mucosa. Since DNA methylation of CpG islands, clustered around the regulatory region, has been shown to be associated with gene inactivation and the promoter region of *nemo-like kinase* gene contains a CpG island, we examined the methylation status of *nemo-like kinase* gene by bisulfite-pyrosequencing. In UC mucosa, the methylation frequency of *nemo-like kinase* was significantly higher than that in non-IBD colonic mucosa. When human colon cancer cell lines were treated with 5-aza-2'-deoxycytidine, an inhibitor of DNA methyltransferases, the transcription of nemo-like kinase was induced. In the human colorectal cancer cell line HCT116 with genetic disruption of both DNA methyltransferase 1 (*DNMT1*) and 3b (*DNMT3b*), in which genomic DNA methylation was nearly eliminated, the expression of *nemo-like kinase* was rescued. These results collectively suggest that DNA hypermethylation may contribute to gene silencing of Wnt/Notch modulators. To investigate the relation between DNA hypermethylation-mediated gene silencing of Wnt/Notch modulators and accelerated epithelial cell turnover during inflammation, we isolated epithelial cells from inflamed colon of patients with UC and examined the methylation status of *nemo-like kinase* by pyrosequencing as well as their potential of growth *in vitro* 3D-culture using Matrigel. In epithelial cells isolated from UC mucosa, the methylation frequency of *nemo-like kinase* was significantly higher than those from non-IBD colonic mucosa. In our culture condition, epithelial cells separated from UC mucosa were able to survive and proliferate, however; the addition of 5-aza-2'-deoxycytidine inhibited this unusual potential along with the concomitant loss of the *nemo-like kinase* methylation.

Conclusion

DNA hypermethylation may contribute to promotion of rapid epithelial cell turnover during inflammation and it may be a therapeutic target of IBD.

23指101：炎症性腸疾患の新規診断マーカー及び治療標的の開発
主任研究者：河村由紀（研究所 消化器疾患研究部 消化器病態生理研究室）

研究の概要

炎症性腸疾患の病変組織を用いた解析

炎症による傷害上皮の
増殖・分化シグナル異常（河
村・土肥）

炎症による上皮変化を反映す
る免疫細胞異常
（河村・後藤田・櫻井俊之）

末梢血解析

末梢血における
免疫細胞異常
（櫻井・小島・前屋舗）

異常を惹起するメカニズム解析
影響を受ける分子の機能解析

異常細胞の同定・機能解析
網羅的ゲノム・エピゲノム解析

病態の分子メカニズム解明

新規マーカー分子の探索

診断マーカーとしての有用性評価
（河村・土肥・櫻井俊之・秋山・小島・前屋舗・櫻井恵）
臨床情報との関連性
同一患者の生検を用いた経時的・比較解析

炎症性腸疾患患者の予後改善

1. 炎症性腸疾患の遷延化診断のための末梢血マーカーの探索

対象

潰瘍性大腸炎	41例
クローン病	22例
ベーチェット病	3例
腸結核	3例
健常者	15例



3例
15例

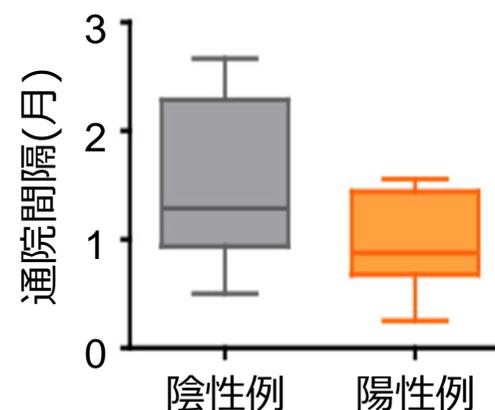
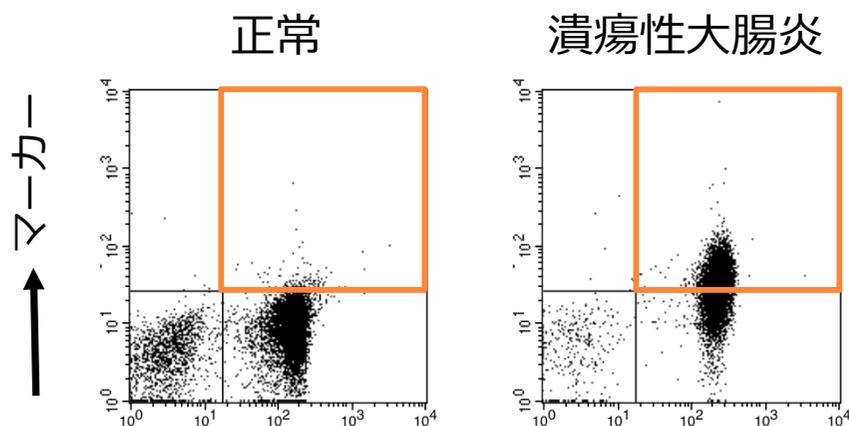
- ❖ 末梢血中のマクロファージ/樹状細胞における細胞表面マーカー(糖鎖認識レクチン)発現のフローサイトメトリー解析
- ❖ Case Report Formによる臨床情報収集と、マーカー発現との関連解析

結果

- ❖ 末梢血中のCD33⁺細胞における細胞表面マーカー発現は炎症性腸疾患で有意に高いが、潰瘍性大腸炎とクローン病の鑑別は困難
- ❖ CRP、ALB、Hb、ESR、白血球数、好中球数、血小板数とは相関しない
- ❖ 腹痛、全大腸型の重症例で陽性傾向有り
- ❖ 陽性例では陰性例よりも通院間隔が短く、ステロイド治療依存性・抵抗性を示す



解析時点での炎症程度を反映するマーカーではないが、再燃・治療応答性の予知に有益な可能性があり、前向き解析を継続予定

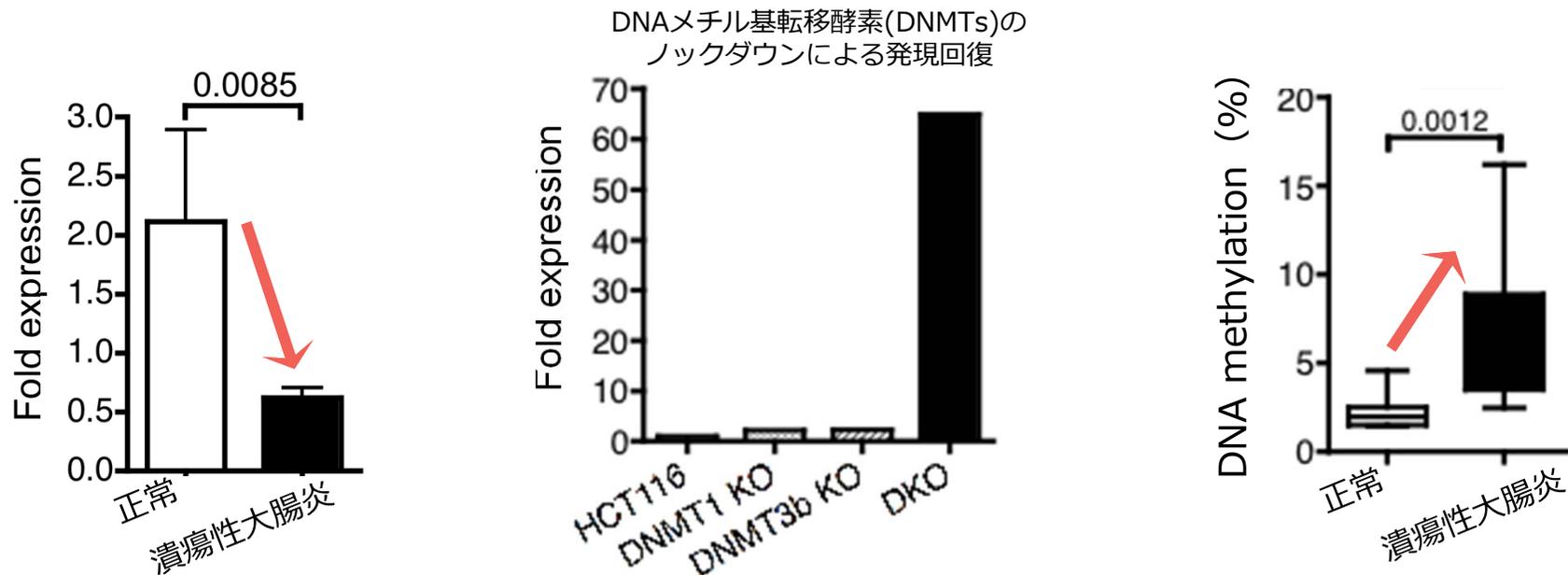


2. 炎症再生上皮で見られるWnt/Notchシグナル異常

結果

- ❖ 潰瘍性大腸炎組織において、Wnt/Notch両シグナルに抑制的に作用するレオスタット分子の発現は有意に低下した
- ❖ 潰瘍性大腸炎組織において、Wnt/Notchシグナル抑制分子の転写制御部位におけるDNAメチル化が有意に亢進した
- ❖ DNAメチル化阻害剤処理またはDNAメチル基転移酵素のノックダウンにより発現は回復した
- ❖ DNAメチル化解除、またはDNAメチル基転移酵素誘導活性を有するIL-6の中和により再生上皮の細胞増殖は抑制された

潰瘍性大腸炎におけるWnt/Notchシグナル破綻の分子機構(過剰なIL-6により誘導されたDNAメチル基転移酵素が、Wnt/Notchシグナル抑制分子発現を転写制御部位のDNAメチル化亢進を介して抑制し、細胞増殖を亢進させる)を解明した。



3. サーベイランスマーカーの探索とヒト検体を用いた検証

切除炎症粘膜より
再生上皮を分離



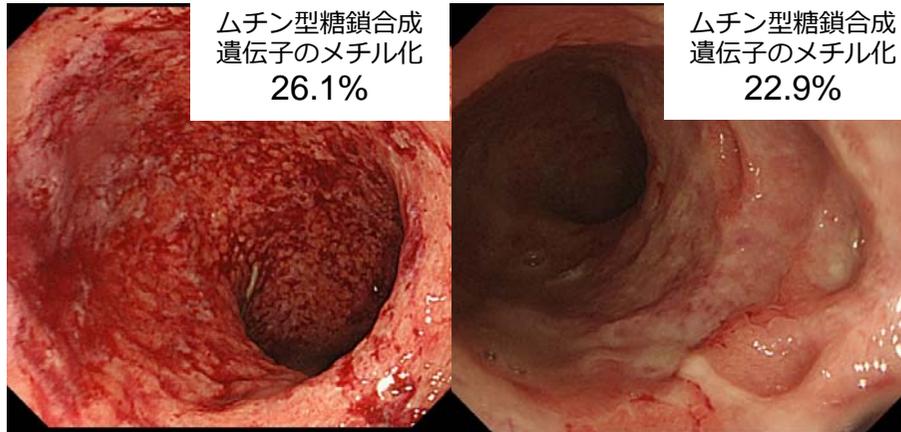
- ❖ SAGE(Serial Analysis of Gene Expression)-seqによる網羅的トランスクリプトーム解析
- ❖ MeDIP-seqによる網羅的メチローム解析



重症化・遷延化と相関する因子を
探索
ヒト生検検体を用いて検証

治療前

治療後



ムチン型糖鎖合成
遺伝子のメチル化
26.1%

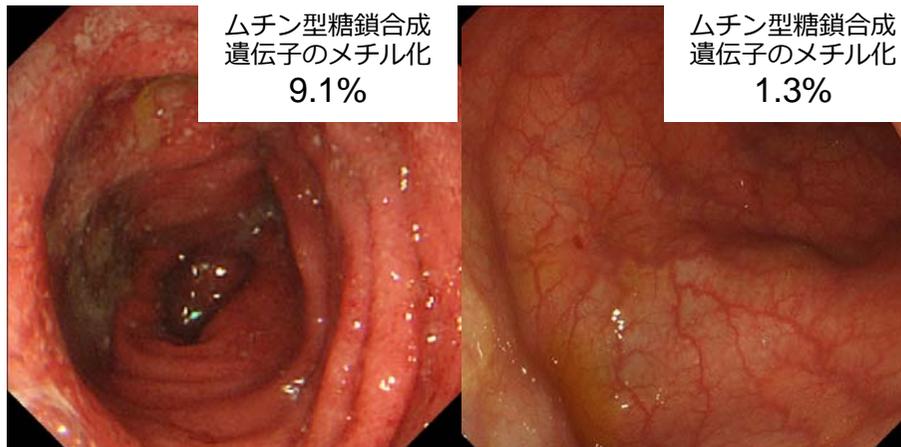
ムチン型糖鎖合成
遺伝子のメチル化
22.9%

結果

- ❖ ムチン型糖鎖合成酵素遺伝子のDNAメチル化が、潰瘍性大腸炎の疾患活動度、癌合併と有意に相関した
- ❖ ステロイド治療奏効例では治療後にDNAメチル化レベルは低下したが、不応答例では治療前後でDNA化レベルは変わらなかった

難治例

奏効例



ムチン型糖鎖合成
遺伝子のメチル化
9.1%

ムチン型糖鎖合成
遺伝子のメチル化
1.3%

DNAメチル化異常の蓄積が発癌の母地となる
可能性が示唆された
⇒DNAメチル化是正は治療標的として有用

課題番号 : 23指101
研究課題名 : 炎症性腸疾患の新規診断マーカーの開発
主任研究者名 : 河村 由紀
分担研究者名 : 櫻井 俊之

キーワード : 炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病、自然免疫細胞、レクチン

研究成果 :

本研究では、消化管の慢性炎症性疾患である炎症性腸疾患、クローン病の新しい予後サーベイランスマーカーとなる分子の探索を目指している。特に、より簡便な検査法への応用が期待できる、炎症局所で見られる変化を反映する、末梢血中のマーカーを見出すことを目的とし、臨床検体を用いた評価を行っている。消化管の炎症粘膜では上皮細胞上に発現する糖鎖変化が起こるが、この糖鎖を認識して結合するレクチン分子を自然免疫細胞（マクロファージや樹状細胞）は発現している。消化管の炎症に起因する上皮細胞側のリガンド糖鎖変化に伴い、マクロファージや樹状細胞側の受容体レクチン分子の発現異常が生じているか否かを、クローン病および潰瘍性大腸炎の炎症性腸疾患症例と、対照非炎症性腸疾患患者としてベーチェット病症例対象として検討を行った。大腸粘膜組織より粘膜固有層細胞を酵素的に分離し、自然免疫担当細胞（マクロファージや樹状細胞）における糖鎖認識レクチン分子の発現を、フローサイトメトリーを用いて解析した。対照非炎症性腸疾患患者の自然免疫担当細胞における糖鎖認識レクチン分子の発現パターンと比較して、クローン病症例で発現が増強している糖鎖認識レクチン分子を見出したが、このマーカー候補分子の発現が高値となっている症例は潰瘍性大腸炎では見られなかった。続いて、我々が炎症性腸疾患病変部の粘膜固有層細胞で見出した糖鎖認識レクチン分子の発現異常が、末梢血中のマクロファージや樹状細胞においても見られるか否かを検討した。末梢血中のマクロファージや樹状細胞においては、クローン病のみならず潰瘍性大腸炎症例においても糖鎖認識レクチン分子の発現に異常が生じていることを見出したが、当初予想していたよりも炎症性腸疾患症例におけるマーカー候補レクチン陽性者の頻度が低かったことため、研究開始後に、十分な症例数で末梢血自然免疫担当細胞における糖鎖認識レクチン分子の発現と疾患活動度を含む臨床所見との関連を詳細に検討することを目的とし、倫理委員会に変更申請を行い（予定集積症例数をクローン病 80 例、潰瘍性大腸炎 80 例に変更）、平成 24 年 6 月 14 日付けで承認された（承認番号 NCGM-A-000121-04）。また、本研究に特化した Case Report Form を作成し、統合解析のための臨床情報の収集の徹底を図った。最終的にクローン病 22 例（21-57 歳、平均年齢 41.5 歳）、潰瘍性大腸炎 41 例（20-91 歳、平均年齢 47.0 歳）の計 63 例の炎症性腸疾患症例と、対照非炎症性腸疾患症例としてベーチェット病 3 例、腸結核患者 3 例の末梢血解析を施行した。末梢血中の CD33 陽性マクロファージ並びに樹状細胞における上記糖鎖認識レクチン分子の発現頻度は、健常人ボランティア（26-54 歳、平均年齢 34.0 歳）と比べて、潰瘍性大腸炎症例で 8 倍、クローン病症例で 5 倍以上有意に高かった。クローン病症例と潰瘍性大腸炎症例との間ではマーカーの発現頻度に有意差は無かった。また、ベーチェット病および腸結核症例におけるマーカー陽性率は<1%で、健常人ボランティアとの間にも有意差は認められなかった。以上より、本マーカーの発現ではクローン病と潰瘍性大腸炎の鑑別は困難であるが、炎症性腸疾患特異的な変化であると考えられた。クローン病と潰瘍性大腸炎の鑑別に加えて、マーカー候補レクチン分子の発現と CRP 値、ALB 値、Hb 値、ESR 値、白血球数、好中球数、血小板数等の検査値、発熱、腹痛、血便の有無等の症状、直腸炎型、非直腸炎型等の病変範囲、pUCDAI で評価した臨床的重症度、ステロイド依存性やステロイド抵抗性の有無等、治療応答性や難治性について検討を行った。その結果、種々の検査値とマーカー分子の発現には相関が認められなかったことから、炎症程度のみを反映する変化ではないことが明らかとなった。一方で、腹痛有症例においてマーカー候補レクチン分子の発現は有意に高く、重症例が少ないため有意差は無かったが病変範囲では全大腸炎型、pUCDAI 評価で重症例においてマーカー分子の発現が高い傾向が見られた。健常人におけるマーカー候補レクチン分子の平均陽性率をカットオフ値としてマーカー陽性例と陰性例に分類した場合、陰性例と比較して陽性例の通院間隔が短く、ステロイド治療に依存性または抵抗性を示すことが明らかとなった。以上より、本マーカー発現が再燃の予知、治療反応性の予知に有用である可能性が示唆された。今後も本研究への症例の登録と、前向き解析登録症例の経過追跡を継続して行うこ

とで、統計学的解析においても本マーカーの有用性を示すことが出来ると考えている。炎症性腸疾患の再燃・治療反応性の予知マーカーとしての糖鎖認識レクチン分子の評価結果については、協力研究者の前屋舗（旧姓 平野）が第99回日本消化器病学会総会で報告した。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 23指101

研究課題名： 炎症性腸疾患の新規診断マーカー及び治療標的の開発

主任研究者名： 河村 由紀

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells	Yuuki Obata, Yukihiro Furusawa, Takaho A Endo, Jafar Sharif, Daisuke Takahashi, Koji Atarashi, Manabu Nakayama, Satoshi Onawa, Yumiko Fujimura, Masumi Takahashi, Tomokatsu Ikawa, Takeshi Otsubo, Yuki I. Kawamura, Taeko Dohi, Shoji Tajima, Hiroshi Masumoto, Osamu Ohara, Kenya Honda, Shohei Hori, Hiroshi Ohno, Haruhiko Koseki and Koji Hase	Nature Immunology	Vol.15 No.6	2014年
Enhancement of leptin receptor signaling by SOCS3 deficiency induces development of gastric tumors in mice	Kyoko Inagaki-Ohara, H Mayuzumi, S Kato, Y Minokoshi, Takeshi Otsubo, Yuki I. Kawamura, Taeko Dohi, G Matsumoto and A Yoshimura	Oncogene	Vol.33 No.1	2014年

研究発表及び特許取得報告について

<p>Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1 induces retrotransposition of long interspersed element-1</p>	<p>Kenta Iijima, Noriyuki Okudaira, Masato Tamura, Akihiro Doi, Yoshikazu Saito, Mari Shimura, Motohito Goto, Akihiro Matsunaga, Yuki I. Kawamura, Takeshi Otsubo, Taeko Dohi, Ahigeki Hoshino, Shigeyuki Kano, Shotaro Hagiwara, Junko Tanuma, Hiroyuki Gatanaga, Masanori Baba, Taku Iguchi, Motoko Yanagita, Shinichi Oka, Tadashi Okamura and Yukihito Ishizaka</p>	<p>Retrovirology</p>	<p>Vol. 10</p>	<p>2013年</p>
<p>Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9</p>	<p>Keiko Miyazaki, Keiichiro Sakuma, Yuki I. Kawamura, Mineko Izawa, Katsuyuki Ohmori, Motoaki Mitsuki, Toshiyuki Yamaji, Yasuhiro Hashimoto, Akemi Suzuki, Yukio Saito, Taeko Dohi and Reiji Kannagi</p>	<p>J Immunol</p>	<p>Vol. 188 No. 9</p>	<p>2012年</p>

研究発表及び特許取得報告について

<p>The monoclonal antibody HCM31 specifically recognizes the Sd^a tetrasaccharide in goblet cell mucin</p>	<p>Daigo Tubokawa, Yukinobu Goso, Rei Kawashima, Hiroyoshi Ota, Takeshi Nakamura, Kazuo Nakamura, Noriko Sato, Makoto Kurihara, Taeko Dohi, Yuki I. Kawamura, Takafumi Ichikawa and Kazuhiko Ishihara</p>	<p>FEBS Open Bio</p>	<p>Vol.2</p>	<p>2012年</p>
<p>Comprehensive analysis of chemokines and cytokines secreted in the peritoneal cavity during laparotomy</p>	<p>Rei Kawashima, Yuki I. Kawamura, Tomoyuki Oshio, Noriko Mizutani, Toshihiko Okada, Yutaka J. Kawamura, Fumio Konishi and Taeko Dohi</p>	<p>J Immunoassay Immunochem</p>	<p>Vol.33 No.3</p>	<p>2012年</p>
<p>潰瘍性大腸炎と糖鎖不全現象</p>	<p>河村由紀 土肥多恵子</p>	<p>日本臨床</p>	<p>第70号</p>	<p>2012年</p>
<p>Interleukin-13 damages intestinal mucosa via TWEAK and Fn14 in mice - a pathway associated with ulcerative colitis</p>	<p>Rei Kawashima, Yuki I. Kawamura, Tomoyuki Oshio, Aoi Son, Motomi Yamazaki, Teruki Hagiwara, Toshihiko Okada, Kyoko Inagaki-Ohara, Suzanne Szak, Yutaka J. Kawamura, Fumio Konishi, Oki Miyake, Hideaki Yano, Yukio Saito, Linda C. Burkly and Taeko Dohi</p>	<p>Gastroenterology</p>	<p>Vol.141 No.6</p>	<p>2011年</p>

研究発表及び特許取得報告について

<p>The epithelia-specific membrane trafficking factor AP-1B controls gut immune homeostasis in mice</p>	<p>Daisuke Takahashi, Hoji Hase, Shunsuke Kimura, Fubito Nakatsu, Masumi Ohmae, Yasushi Mandai, Toru Sato, Yasuhiro Date, Masashi Ebisawa, Tamotsu Kato, Yuuki Obata, Shinji Fukuda, Yuki I. Kawamura, Taeko Dohi, Tatsuro Kasuno, Osamu Yokosuka, Satoshi Waguri, Hiroshi Ohno</p>	<p>Gastroenterology</p>	<p>Vol. 141 No. 2</p>	<p>2011年</p>
---	---	-------------------------	-----------------------	--------------

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
<p>Cell type-specific, genome-wide epigenetic analysis for lamina propria cells isolated from the colon with ulcerative colitis</p>	<p>大坪武史、河村由紀、土肥多恵子</p>	<p>第42回日本免疫学会総会</p>	<p>千葉</p>	<p>2013年12月</p>
<p>Involvement of L1 retrotransposition in murine experimental colitis-cancer model</p>	<p>Tajeshi Otusbo, Yuki I. Kawamura, Yukihito Ishizaka and Taeko Dohi</p>	<p>DDW2013</p>	<p>Orlando</p>	<p>2013年5月</p>
<p>末梢血白血球レクチン発現は炎症性腸疾患の病勢を反映するマーカーである</p>	<p>前屋舗千明</p>	<p>第99回日本消化器病学会総会</p>	<p>鹿児島</p>	<p>2013年3月</p>
<p>Genome-wide epigenetic analysis of lamina propria mononuclear cells isolated from patients with inflammatory bowel disease</p>	<p>河村由紀</p>	<p>第6回日米消化器病学会議</p>	<p>東京</p>	<p>2012年11月</p>
<p>DNA hypermethylation of the Sd^a carbohydrate synthase gene as a possible biomarker for the prognosis of ulcerative colitis</p>	<p>櫻井俊之</p>	<p>DDW2012</p>	<p>San Diego, USA</p>	<p>2012年5月</p>
<p>消化管でみられる癌性糖鎖不全とエピゲノム異常 ワークショップ2 癌のepigeneticsとmicroRNA</p>	<p>河村由紀、豊田実、橋本真一、萩原輝記、山崎元美、河村裕、小西文雄、斉藤幸夫、服部正平、土肥多恵子</p>	<p>第20回日本病態治療研究会</p>	<p>東京</p>	<p>2011年6月</p>

研究発表及び特許取得報告について

IL-6, a potential inducer of DNA hypermethylation and malignant-type glycosylation in ulcerative colitis	Yuki I. Kawamura, Minoru Toyota, Teruki Hagiwara, Hiromu Suzuki, Motomi Yamazaki, Toshihiko Okada, Yutaka J. Kawamura, Fumio Konishi, Hideaki Yano, Yukio Saito, and Taeko Dohi	DDW2011	Chicago, USA	2011年5月
--	---	---------	--------------	---------

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。