

課題番号 : 25指104
研究課題名 : 炎症性腸疾患における治療抵抗性メカニズムの解明とその診断・治療への応用
主任研究者名 : 土肥 多恵子
分担研究者名 : 鈴木 春巳、高木 智
キーワード : 炎症性腸疾患 大腸、炎症シグナル、エピゲノム
研究成果 :

A. 患者検体およびマウスモデルを用いた遺伝子発現およびエピゲノム網羅的解析の成果に基づき、治療抵抗性克服のための標的の探索

A-1. UC手術摘出標本のトランスクリプトーム解析および網羅的エピゲノム解析に基づく新規治療標的の探索。

【方法】IBD患者試料で行ってきた網羅的解析の結果を利用し、特に治療抵抗性という観点から新規治療標的をin silicoで選定した。まず、トランスクリプトーム解析結果より、病変部で発現が著変している遺伝子をピックアップし、次にPathway解析等により、周辺遺伝子の発現パターンを確認し、整合性のあるPathwayを絞り込んだ。絞った対象に対して網羅的エピゲノム解析結果を統合し、遺伝子発現に影響を及ぼすエピゲノム変化を有している遺伝子を新規治療標的候補とした。上皮細胞で産生される分子、TNF- α の産生や活性化、TNF- α 下流のシグナル作用を増幅・遷延に関連する分子/シグナル経路/エピゲノム変化を優先しておこなった。

【成果と考察】UC手術症例3例の病変部粘膜、大腸がん摘出症例2例の健常粘膜から樹状細胞/マクrophage分画であるCD33+細胞、CD3+T細胞を分離精製し、epigenome網羅的解析(活性化マーカーH3K4me3、発現抑制マーカーH3K27me3に対する抗体を用いたChIP-seqおよび、DNAメチル化解析MeDIP)及びトランスクリプトーム解析(SAGE)の生データが得られている。これらについて、我々の手でおおまかな統合解析を行った。その結果、H3K4me3+H3K27me3のいわゆる二価修飾と疾患との関連がみいだされた。これはUCにおいては特定の遺伝子の発現制御領域にエピゲノム異常が生じるというより、エピジェネティック修飾機構そのものが病的であること示唆する新規な結果である。より正確な統合解析を進めるためには、バイオインフォマティクスの協力が必要となったため統合解析プラットフォーム構築としてバイオインフォマティクスは解析委託した。統計解析により、Non-IBD症例とUC症例またはCD症例との間で発現に有意差が認められるエピジェネティック修飾関連18遺伝子を抽出した。これらを用いてクラスター解析を行った結果、Non-IBD症例とIBD症例(UC症例+CD症例)は異なるクラスターに分類されたが、UC症例とCD症例の違いは認められなかった。IBD症例では特にH3K4me3 writers、H3K27me3 writersの発現亢進と、一部のH3K27me3 erasersの発現低下が顕著であり、IBD症例で見られた病的エピジェネティック修飾機構の原因と考えられた。これらのエピジェネティック修飾機構の破綻をin vitroで再現するため、エピジェネティック修飾関連遺伝子計84遺伝子の発現を、次世代簡易シーケンサーIon Protonを用いたAmpli-seq法にて測定する系を確立し、新たに非IBD例7例、UC5例、クローン病2例の測定を行った。

A-2マウス腸炎モデルの網羅的解析に基づく抗TNF療法の治療効果を高める新規治療標的の選択。

【方法】腸炎モデルでsuboptimal doseによる不完全なTNF- α 中和療法をTNFスーパーファミリー分子TWEAKやIL-13中和療法で補完した時の効果と網羅的遺伝子発現解析によって、それぞれ単独の効果と混合治療の効果をもたらしている遺伝子発現変化を同定した。これにより、TNFスーパーファミリー分子TWEAKとその受容体Fn14、IL-13によるTNF炎症シグナルの増幅機構を調べた。

【成果と考察】マウスIBDモデルであるトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)注腸投与による、急性腸炎誘導時に、suboptimal doseのTNF中和剤および抗TWEAK抗体投与、またはその併用を行った。その結果、それぞれの単独ではほとんど治療効果が得られないのに対して、併用によって相以上の効果がみられた。そのメカニズム解析のために、大腸より上皮細胞および粘膜固有層細胞を分離し、TNF中和剤と抗TWEAK抗体、及び併用したときのマウス大腸の遺伝子発現網羅的比較解析を行った。その結果、同じ投与量のTNF中和剤、TWEAK中和剤単独では見られない遺伝子発現変化が併用療法では見られることが明らかとなった。パスウェイ解析の結果、特にLPS、NF- κ B関連シグナル経路の抑制が著しいことがわかった。この結果を基に、NF- κ Bシグナル経路に関連する遺伝子発現、タンパク発現変化

を詳細に解析した結果、非古典的経路(p100/RelB)の寄与は低く、併用時には古典的経路(p50/RelA)の活性化が顕著に抑制されていた。TWEAK受容体であるFn14は上皮細胞にのみ発現していたことから、上皮細胞におけるTWEAK-Fn14およびTNF- α による古典的NF- κ B活性化経路を同時に抑制することが炎症制御に重要であることが示された。これは、TWEAKによる非常に強いTNFシグナル増強機構が存在することのエビデンスである。さらに消化管上皮傷害の機構解明を進めるため、IL-13-EGFレポーターマウス、IL-13ノックアウトマウスを入手し、さらに、CRISPR/Casシステムを用いたゲノム編集によりIL-13受容体 α 1欠損BALB/cマウスを作製した。これらを用いてin vivoにおける消化管上皮細胞傷害におけるTWEAK/Fn14, TNF- α とIL-13との相互作用について検討した結果、TWEAK/Fn14はinnate lymphoid cell などによる消化管でのIL-13産生を増強する働きを持つとともに、筋線維芽細胞における内因性IL-13 中和活性分子IL-13 受容体 α 2の発現を阻害する事により、IL-13活性を維持、増強する作用をもつことが明らかとなった。以前の研究で我々はTNF- α による上皮細胞傷害も部分的にTWEAK/Fn14経路に依存している事を明らかにしている。In vivoでの上皮細胞傷害の臨床症状である下痢は、IL-13とTNF- α のそれぞれ単独の作用でも誘導されるという結果が得られているが、Fn14遺伝子欠損あるいはTWEAKの中和抗体によるシグナル遮断によって、両方の経路が遮断され、下痢が軽減した。さらに我々はヒトIBDの局所粘膜においてTWEAK/Fn14とIL-13のmRNAが、病勢に相関して発現亢進している事も見いだした。27年度にはIBDにおける抗IL-13抗体の治験結果が発表され、有効とは言えないという結論が出ている。しかし、我々の以上の結果からは、IL-13は単独での傷害作用をもつだけでなく、TNF- α 及びTWEAK/Fn14経路と複雑に相互作用しつつ、positive feedback loopを形成していることがあきらかとなり(PPTの図)、特に治療困難となった症例で有効な結果を得るには、これら三者のシグナル全体を遮断する必要があるのではないかと考えられる。ヒト抗TWEAK抗体は既にループス腎炎に用いられており、単独でこのループを遮断するにはもっとも有力な候補と考えられるので、難治性のIBDにおいては単独、あるいは抗TNF- α 、抗IL-13抗体との併用を提案したい。

B. メタボローム解析による治療抵抗性克服のための標的探索

B-1. UC、クローン病手術症例について、その粘膜、血清を採取し健常粘膜との比較を行うとともに、遺伝子・タンパク発現、エピゲノム修飾を同一検体で測定出来るように試料を集積する。

【方法】神戸大学大学院医学研究科病因病態解析学（疾患メタボロミクス）分野長 吉田優准教授との共同研究により、血清、バイオプシー試料の集積を開始してUC血清および粘膜のメタボローム解析を行う。神戸大学で既に得られている結果を基盤としてアミノ酸、有機酸、脂質に関する解析をすすめる、重症症例、治療困難例での特徴を探した。また、一部の外科切除症例については当センター研究所の脂質シグナリングプロジェクトとの共同研究を行なった。

【成果と考察】本研究では、はじめに、動物検体やヒト検体を分析するための代謝物分析系を構築した。生体内には、約4,000種類の代謝物が存在するとされていることから、できるだけ幅広い代謝物群を測定できる必要がある。そこで、ガスクロマトグラフ質量分析計、あるいは、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた4種類の分析系の最適化を行った。その結果、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いることで、アミノ酸やTCAサイクル関連分子などの水溶性代謝物を分析できる系を構築できた。また、液体クロマトグラフ質量分析計によるホスファチジルコリンなどの脂質分析系、アミノ酸や塩基などのカチオン性分子分析系、糖リン酸などのアニオン性分子分析系を構築した。続いて、構築したガスクロマトグラフ質量分析計、あるいは、液体クロマトグラフ質量分析計による代謝物分析系を用いて、IBD患者検体の分析、ならびに、腸炎モデルマウス検体の代謝物分析を行った。UC患者血清と健常者血清の代謝物分析結果を比較したところ、複数の代謝物の有意な変動が確認され、これらの代謝物には、TCAサイクル関連分子や尿素回路関連分子、アミノ酸群が含まれるが、その多くがUC患者群で有意な減少を示した。さらに、UC患者の活動期、寛解期に依存した代謝物も存在することが明らかとなった。また、腸炎モデルマウスであるIL-10ノックアウトマウスから血漿、腸組織を採取し、ガスクロマトグラフ質量分析計、あるいは、液体クロマトグラフ質量分析計を用いて血漿、腸組織中代謝物を分析して、対照野生型マウスとの比較検討を行った。その結果、デキストラン硫酸ナトリウム誘発性腸炎マウス血漿やUC患者、クローン病患者血清中で減少していたグルタミンレベルが、IL-10ノックアウトマウス血漿でも減少していることが確認できた。さらに、グルタミンレベルは、デキス

トラン硫酸ナトリウム誘発性腸炎マウス、UC患者の病変腸組織でも減少していることを明らかにできた。さらに、IL-10ノックアウトマウスの病変腸組織では、PC18:0p-20:4などの抗酸化作用を有するプラズマローゲン類が低下していた。また、多くの遊離脂肪酸、リン脂質が減少している傾向を確認できた。これらの結果から、IBDの発症と脂質プロファイルとの関連性も示唆することができた。これらの結果より、病勢及び予後に関連するメタボライトとして、脂質プロファイリングが重要と考え、特に脂質メディエーターの網羅的解析をまず手術検体で開始し、次の段階で血清の解析結果を統合して行うこととした。この目的のため非IBDの健常粘膜、UC病変部(大腸)を収集して脂質メディエーターの解析を行った。

C. 治療抵抗性克服のための標的候補項目の検証

C-1.A, Bで選定した項目について、臨床検体を用いた標的分子／エピゲノム修飾／代謝物の検出・測定法確立を開始

【成果と考察】Aの統合パイオインフォマティクス解析により見出したエピジェネティック修飾機構の破綻を、多数の臨床検体について同時に評価するために、エピジェネティック修飾関連遺伝子計84遺伝子の発現を、次世代簡易シーケンサーIon Protonを用いたAmpli-seq法にて測定する系を確立した。更に、生検検体を用いて活動度や治療抵抗性との関連を検討するために、解析項目を非IBD症例とUC症例またはクローン病症例との間で発現に有意差が認められるエピジェネティック修飾関連18遺伝子にまで絞り込んだ。一方、Bにより見出された代謝物の変化は、本研究で確立したGC-MSやLC-MS解析系を用いて多数の臨床検体の測定が可能である。現在、生検については目標の20例の収集を行なった。

C-2. C-1で検出・測定法を確立した新規治療標的項目の患者試料での検証。UCにおける寛解維持症例、ステロイド抵抗性または離脱不能例、CD症例における同一症例の治療前治療後の血清および病変組織を収集し、臨床情報と遺伝子あるいは特定の蛋白質発現、あるいは特定の遺伝子のエピゲノム修飾との関連を解析した。

【成果と考察】25年度に共同研究によって本研究を開始すべく倫理申請を行い、承認された。検体提供先および共同研究先施設での承認を得て、症例集積を開始した。活動度、治療応答性との関連を検討するために、同一症例の、年に一度の内視鏡検査時の生検検体を経時的に蓄積した。定期的に受診する患者は寛解維持症例が殆どであったが、研究期間中に寛解から増悪に転じた症例、検査時炎症から寛解へ転じた症例の検体などを収集した。

D. 治療抵抗性克服のための標的項目の機能・メカニズム解析と治療薬シーズの探索

【方法】新規治療標的項目の機能について、メカニズム解析を行なった。

この際確立するin vitro実験系を利用して、阻害剤としての低分子化合物の試験を行った。LPS刺激時のヒト末梢血TNF分泌を抑制する低分子ライブラリーから標的分子などの阻害剤として働くものをスクリーニングした。

【成果と考察】TWEAK/Fn14経路の炎症の増悪、遷延化における重要性に関して十分なエビデンスが得られたとともに、そのメカニズムの一部も明らかにすることができた。また我々は以前の研究で、マウスマクロファージでLPS刺激によるTNF- α 産生を阻害する低分子化合物R243を見いだした。この活性はケモカイン受容体など多数のシグナル系を介していることがわかっており、TNF- α 経路による腸管炎症の増幅機構の遮断に有用であると考えられた。そこで、本研究において、健常ボランティアのヒト末梢血単核球細胞を、LPS刺激後したときの高いTNF- α 産生に対する影響を調べた所、R243はヒト細胞においてもTNF- α 産生阻害することがわかった。R243の構造関連低分子を新たに探索し、22種類の低分子化合物を入手して試験を行った所、いずれの化合物も、短期細胞毒性を発揮する事なくTNF- α 産生を抑制する事が示された。更に、そのうち8個は対照の30%以下まで抑制された。本研究成果はIBD患者の細胞でも有効かどうかなど、別のあらたな研究計画として進める予定である。

Subject No. : 25-104

Title : Intractable inflammatory bowel diseases- its mechanism, diagnosis and treatments

Researchers : Taeko Dohi, Harumi Suzuki, Satoshi Takaki

Key word : Inflammatory bowel disease, colon, inflammatory signaling pathway, epigenetic changes

Abstract :

The aim of this project is to clarify the mechanism of intractable types inflammatory bowel disease (IBD) and eventually develop remedies to treat IBD or prevent disease progression to severe refractory type of disease.

Exploration of targets to overcome in intractable disease based on the result of global gene expression analysis and epigenetic analysis using tissue derived from patients and disease model mice. :-

We have done global study of gene expression and epigenetic changes using mucosal tissues from IBD patients. Based on these data, we selected genes with altered expression in the lesions. Then examined related genes to identify particular pathways. On these selected genes, those that may affect the expression of selected genes were set as the initial targets. As a result we focused on the TNF activation and its down stream pathway, which sustain and amplify the TNF signal. We purified CD33+ macrophage/DC fraction and CD3+ T cell fraction from the surgically resected colon tissues from the patients treated for ulcerative colitis or colorectal cancer, and performed global epigenetic analysis including ChIP-seq for H3K4me3, H3K27me3, DNA methylation analysis (MeDIP) and transcriptome (SAGE) analysis. As a result, so-called bivalent modification of H3K4me3 plus H3K27me3 was found to related to the disease. Cluster analysis resulted in the different clustering of non-IBD and IBD, but there was no difference between ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). In IBD cases, enhanced expression of H3K4me3 writers, H3K27me3 writers and attenuated expression of some H3K27me3 erasers was obvious, which was assumed to pathological epigenetic changes found in IBD cases. To confirm the effect of these abnormal epigenetic changes, expression of 84 genes related to epigenetic changes were analyzed using a NGS using Ampli-seq with Ion Proton in 7 non-IBD, 5UC and 2CD cases.

New therapeutic targets to enhance the effect of anti-TNF biologics based on the global analysis murine colitis models:-

We performed global gene expression analysis of the murine colonic tissues obtained from colitis models and in this study. We treated mice with colitis with tumor necrosis factor (TNF)- α neutralizing reagents at suboptimal dose to mimic treatment-resistant or refractory patients in anti-TNF therapy. We also treated mice with a neutralizing reagent of one of TNF superfamily molecules TWEAK and nati-IL-13 therapy. They were used with a single therapy, or combination. Global gene expression analysis demonstrated the effect of each single therapy and combination therapy. Acute colitis was induced by rectal injection of trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), with administration of control IgG, TNF receptor (TNFR)-Ig chimeric protein, anti-TWEAK monoclonal antibody, or the combination of TNFR-Ig and anti-TWEAK antibody. On day 4, disease severity

was evaluated and gene expression profiling was analyzed using whole colon tissue. NF- κ B activation was investigated with Western blot. Since protein extract from whole colon tissue might mask cell type specific inflammatory responses, we investigated inflammatory responses at the cellular level. For this purpose, we obtained highly purified live colonic ECs with flow cytometry. Levels of transcript of TWEAK, Fn14 and NF- κ B-related molecules were measured in purified colon epithelial cells (ECs). As a result, colitis induced upregulation of Fn14 only in ECs but not in other cell types. As a tool for TNF or TWEAK inhibition in the mouse system, we used suboptimal dose of TNFR-Ig fusion protein and anti-TWEAK monoclonal antibody, respectively. We found that combination treatment resulted in a more than additive protective effect from acute colitis as compared to single agent treatment. Administration of either single agent, 0.3 mg/kg of TNFR-Ig or 10 mg/kg anti-TWEAK mAb, showed limited or no efficacy with respect to the body weight, colon length, and macroscopic/histological analysis. The TNFR-Ig-, anti-TWEAK mAb- and control Ig-treated groups each showed a trend of better recovery of body weight as compared to the untreated group, with no significant difference between the three treated groups on day 4. In marked contrast, treatment with the combination of TNFR-Ig and anti-TWEAK mAb resulted in significantly less weight loss and more rapid recovery of body weight than any of the other groups. In addition, the colon was significantly longer in the combination-treatment group than any of other experimental groups. Combination treatment of TNFR-Ig and anti-TWEAK antibody synergistically reduced disease severity in comparison with the control antibody or single agent treatment. Many mice treated with the combination exhibited minimal open ulcers with only redness of the mucosal surface. And the area of open ulcer was significantly less in the combination treated as compared to all other groups. In a global gene expression analysis, a total of 781 genes changed more than 2-fold in both the control immunoglobulin G (Ig)-treated and untreated mice as compared to naïve mice. We investigated whether any of these genes were specifically changed as a result of monotherapy. However, in a comparison of the TNFR-Ig treated vs. untreated or control Ig-treated group, no such genes were found. Using this list of 62 downregulated genes, we searched the possible upstream pathways that were affected by combination treatment using the Upstream Regulator Analysis Software, leading to a list of possible upstream pathways. In addition to TNF- α , TNFRSF1A (TNF receptor 1), TWEAK, lipopolysaccharide (LPS) and innate sensors like Toll-like receptor (TLR), were identified as potential as upstream regulators. Of note, IKBKG (IKK-c/NEMO) and NFKBIA (I κ B α) were also included as upstream regulators, suggesting that the canonical pathway of NF- κ B was significantly downregulated. Further gene expression analysis and Western blot analysis confirmed that activation of the canonical (p50/RelA), but not noncanonical (p100/RelB)-mediated pathway was the hallmark of inflammatory responses in this model. In conclusion, our study indicates that TNF- α and TWEAK/Fn14 pathways mutually support activation of NF- κ B canonical pathway in a significant synergistic manner, which is critical in the tissue damage of acute inflammation. This result also indicates the presence of TNF-signal-enhancing system mediated by TWEAK. Thus, TWEAK is very likely to be involved in the mechanism of severe relapsing colitis. Next, to further investigate the mechanism of intestinal epithelial cell damage,

we obtained IL-13-EGF reporter mice and also generated IL-13 receptor $\alpha 1$ gene disrupted mice, and IL-13 receptor $\alpha 2$ gene disrupted mice with the method of genome editing using CRIPR-Cas system. Using these gene manipulated mice, we investigated the interaction of TWEAK/Fn14, TNF- α and IL-13. As a result, we found that TWEAK/Fn14 signaling pathway enhances the IL-13 secretion by lamina propria innate lymphoid cells and CD4+ T cells. TWEAK/Fn14 also inhibited the expression of IL-13 receptor $\alpha 2$ in intestinal myofibroblast and fibroblast, resulting the aggravating and maintaining the devastating action of IL-13 to epithelial cells. We previously found that cell-damaging effect of TNF- α is also supported by TWEAK/Fn14 pathway. These results suggest that IL-13 itself is not only epithelial cell-damaging, but also interacts with TNF- α and TWEAK/ Fn14 pathway to form a positive feedback loop leading further tissue damage. When we analyzed gene expression in the human colonic mucosa of ulcerative colitis, TWEAK, Fn14 and IL-13 were all upregulated along with the severity of the disease. Although it was reported in 2015 that anti-IL-13 singly therapy was not effective in the patient with ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, we like to propose the possibility of combination therapy of anti-TWEAK antibody and anti-IL-13 antibody with anti-TNF reagents, especially in cases with treatment-resistant or secondary refractory patients to anti-TNF- α reagents.

Metabolome analysis searching for targets to overcome treatment-resistance was performed in collaboration with Dr. M. Yoshida in Kobe University Graduate School of Medicine. We established a metabolome analysis system and applied to sera from IBD patients or IBD mouse models. We found some metabolites changing their levels along with disease severity and relapse. Especially an amino acid glutamine was decrease in patients' sera as well as sera from IL-10 knockout mice with colitis. Further, decrease in free fatty acids, and phospholipid was observed, which suggested the importance of lipid metabolism in colitis. We performed lipid profiling in colonic mucosal specimens obtained from ulcerative colitis patients in collaboration with Lipid Signaling Project in our Research Institute, and found deviation fatty acid metabolism pathways in affected mucosa,

統合解析により治療抵抗性克服のための標的を探索—動物モデルから

マウス腸炎モデルを用いてTWEAKによるTNFシグナル増強作用をみいだした



TWEAKによるTNFシグナル増強作用では古典的NF- κ B経路活性化が重要であることをみいだした



TWEAK、TNF α 、IL-13の相乗的シグナル増強作用が腸炎の重症化に働く事を見出した

GC-MS, LC-MSによるメタボローム測定系の確立と症例の集積継続



IBD症例とマウス腸炎モデルに共通する変化を見出した

治療薬の探索

リウマチやループス腎炎にすでに用いられている抗TWEAK抗体の、IBDにおける有用性について、メカニズム解明を含むエビデンスを蓄積した

ヒト末梢血単核球細胞によるTNF α 産生を抑制する低分子化合物をみいだした

臨床検体の統合解析による治療抵抗性克服のための標的を探索
標的候補の検証

潰瘍性大腸炎epigenome
網羅的解析及びトランスクリプトーム解析統合解析



H3K4me3+H3K27me3のいわゆる二価修飾と疾患との関連を見出した



潰瘍性大腸炎においてはエピジェネティック修飾機構そのものが病的である

GC-MS, LC-MSによるメタボローム測定系の確立と症例の集積



IBD症例とマウス腸炎モデルに共通する変化を見出した



IBD大腸の脂質プロファイリング

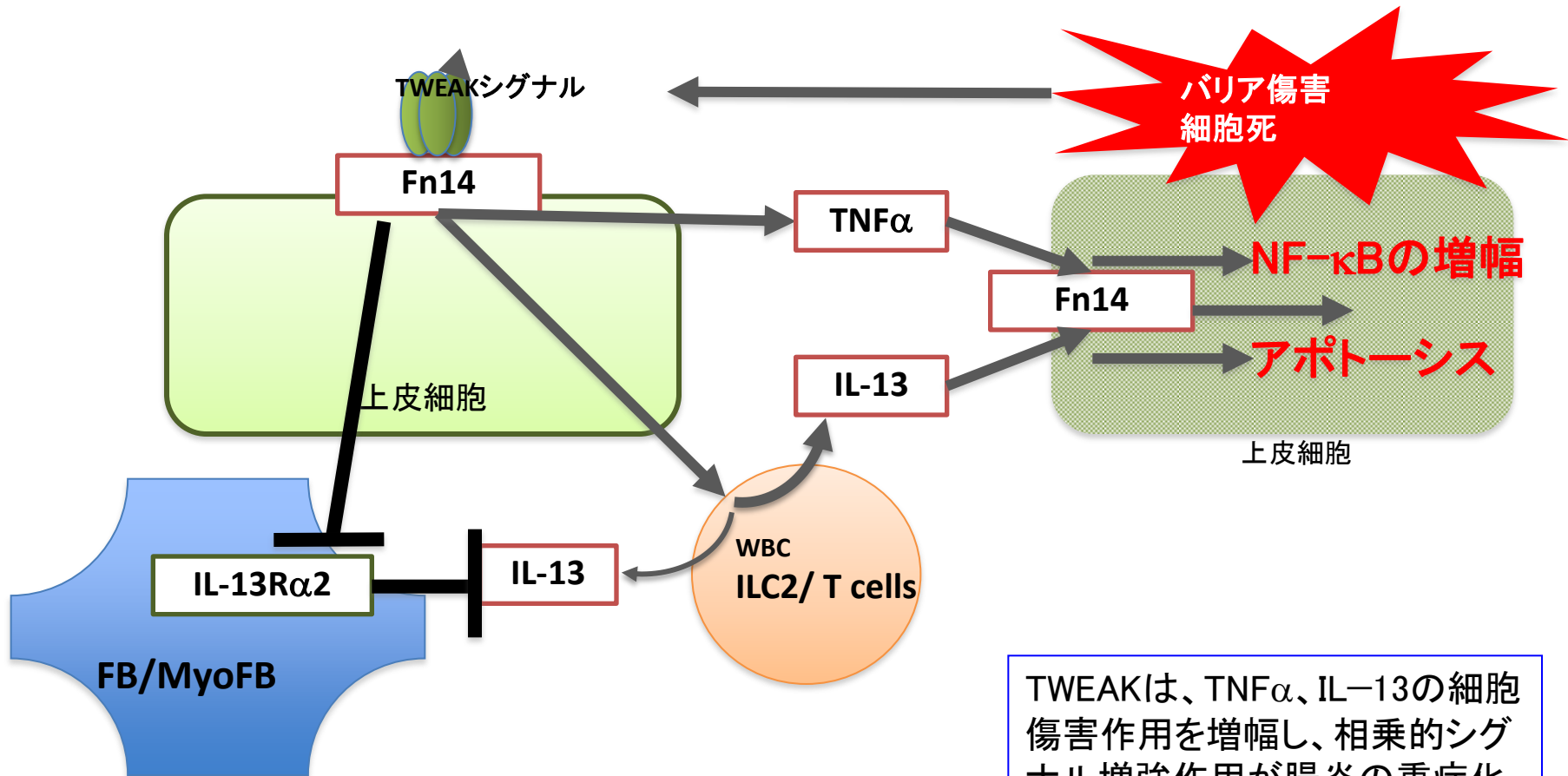
神戸大学大学院医学研究科病因病態解析学(疾患メタボロミクス)研究室 及び、NCGM脂質シグナリングプロジェクトとの共同研究による

簡易次世代シーケンサーを用いた多検体のエピジェネティック修飾機構評価系を確立



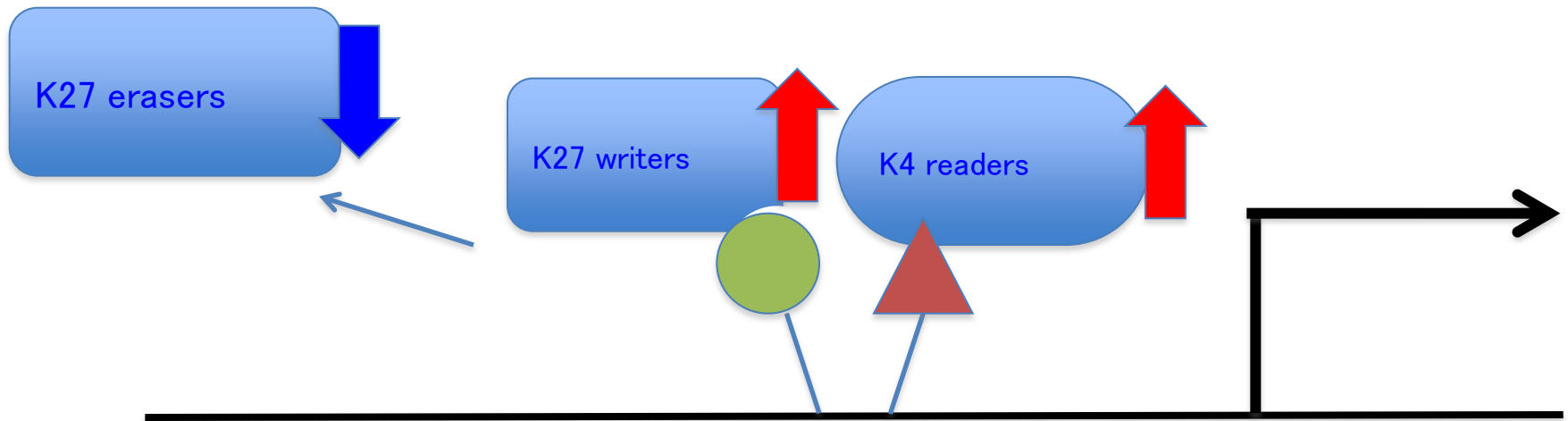
IBDとnonIBDとの間に差のあるエピジェネティック関連18遺伝子を同定

本研究成果によって明らかとなったTWEAK/Fn14経路の活性化とTNF α , IL-13の相互作用による消化管上皮細胞傷害のpositive feedback loop



TWEAKは、TNF α 、IL-13の細胞傷害作用を増幅し、相乗的シグナル増強作用が腸炎の重症化に働く

本研究成果によって明らかとなったIBD重症化に関わる エピゲノム修飾



- IBDにおけるH3K4me3+H3K27me3修飾異常は、エピジェネティック修飾関連遺伝子の発現異常により生じる
- IBDでみられるH3K4me3+H3K27me3修飾異常は、いわゆるバイバレント修飾とは異なり遺伝子発現には影響しない

課題番号 : 25指104
研究課題名 : IBD治療抵抗性に関わる炎症シグナル研究
主任研究者名 : 土肥 多恵子
分担研究者名 : 鈴木 春巳
キーワード : 炎症性腸疾患 大腸、組織幹細胞、炎症シグナル、エピゲノム
研究成果 :

A. マウスモデルを用いた遺伝子発現およびエピゲノム網羅的解析の成果に基づき、治療抵抗性克服のための標的の探索-マウス腸炎モデルの網羅的解析に基づく抗TNF療法の治療効果を高める新規治療標的の選択。

【方法】 これまでに行ったマウス腸炎大腸組織の遺伝子発現の網羅的解析データを利用した。また、腸炎モデルでsuboptimal doseによる不完全なTNF中和療法をTWEAKやIL-13中和療法で補完した時の効果と網羅的遺伝子発現解析によって、それぞれ単独の効果と混合治療の効果をもたらしている遺伝子発現変化を同定した。これにより、TWEAKやIL-13によるTNF炎症シグナルの増幅機構を調べた。

【結果】 マウスIBDモデルであるトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)腸炎誘導時にsuboptimal doseのTNF中和剤および抗TWEAK抗体投与、またはその併用を行った。その結果、それぞれの単独ではほとんど治療効果が得られないのに対して、併用によって、相以上の効果がみられた。そのメカニズム解析のために、大腸より上皮細胞および粘膜固有層細胞を分離し、TNF中和剤と抗TWEAK抗体、及び併用したときのマウス大腸の遺伝子発現網羅的比較解析を行った。その結果、同じ投与量のTNF中和剤、TWEAK中和剤単独では見られない遺伝子発現変化が併用療法では見られることが明らかとなった。この結果を基に、NF- κ Bシグナル経路に関連する遺伝子発現、タンパク発現変化を詳細に解析した結果、非古典的経路(p100/RelB)の寄与は低く、併用時には古典的経路(p50/RelA)の活性化が顕著に抑制されていた。TWEAK受容体であるFn14は上皮細胞にのみ発現していたことから、上皮細胞におけるTWEAK-Fn14およびTNF α による古典的NF- κ B活性化経路を同時に抑制することが炎症制御に重要であることが示された。これは、TWEAKによる非常に強いTNFシグナル増強機構が存在することのエビデンスである。さらに消化管上皮傷害の機構解明を進めるため、IL-13-EGFレポーターマウス、IL-13ノックアウトマウスを入手し、さらに、CRISPR/Casシステムを用いたゲノム編集によりIL-13受容体 \cdot 1欠損BALB/cマウスを作製した。これらを用いてin vivoにおける消化管上皮細胞傷害におけるTWEAK/Fn14, TNF \cdot とIL-13との相互作用について検討した結果、TWEAK/Fn14はinnate lymphoid cell などによる消化管でのIL-13産生を増強する働きを持つとともに、筋線維芽細胞における内因性IL-13 中和活性分子IL-13 受容体 α 2の発現を阻害する事により、IL-13活性を維持、増強する作用をもつことが明らかとなった。以前の研究で我々はTNF- α による上皮細胞傷害も部分的にTWEAK/Fn14経路に依存している事を明らかにしている。In vivoでの上皮細胞傷害の臨床症状である下痢は、IL-13とTNF- α のそれぞれ単独の作用でも誘導されるという結果が得られているが、TWEAKの遺伝子欠損あるいは中和抗体によるシグナル遮断によって、両方の経路が遮断され、下痢が軽減する。さらに我々はヒト炎症性腸疾患の局所粘膜においてTWEAK/Fn14とIL-13のmRNAが、病勢に相関して発現亢進している事も見いだした。27年度には炎症性腸疾患における抗IL-13抗体の治験結果が発表され、有効とは言えないという結論が出ている。しかし、我々の以上の結果からは、IL-13は単独での傷害作用をもつだけでなく、TNF- α 及びTWEAK/Fn14経路と複雑に相互作用しつつ、positive feedback loopを形成していることがあきらかとなり(PPTの図)、特に治療困難となった症例で有効な結果を得るには、これら三者のシグナル全体を遮断する必要があるのではないかと考えられる。ヒト抗TWEAK抗体は既にループ腎炎に用いられており、単独でこのループを遮断するにはもっとも有力な候補と考えられるので、難治性の炎症性腸疾患においては単独、あるいは抗TNF、抗IL-13抗体との併用を提案したい。

B. 治療抵抗性克服のための標的項目の機能・メカニズム解析と治療薬シーズの探索

【方法】 新規治療標的項目の機能について、メカニズム解析を行なった。この際確立するin vitro実験系を利用して、阻害剤としての低分子化合物の試験を行った。LPS刺激時のヒト末梢血TNF分泌を抑制する低分子ライブラリーから標的分子などの阻害剤として働くものをスクリーニングした。

【結果】TWEAK/Fn14経路の炎症の増悪、遷延化における重要性に関して十分なエビデンスが得られたとともに、そのメカニズムの一部も明らかにすることができた。また我々はマウスマクロファージでLPS刺激によるTNF- α 産生を阻害する低分子化合物R243を見いだした。R243は健常ボランティアのヒト末梢血単核球細胞においてもLPS刺激後のTNF- α 産生を阻害することがわかった。これの構造関連低分子を新たに探索し、22種類の低分子化合物で試験を行った所、いずれの化合物もTNF産生を抑制する傾向をしめし、そのうち8個は対照の30%以下まで抑制された。本研究成果はIBD患者の細胞でも有効かどうかなど、別のあらたな研究計画として進める予定である。

課題番号 : 25指104

研究課題名 : IBD 治療抵抗性に関わる組織傷害・修復因子の研究

主任研究者名 : 土肥 多恵子

分担研究者名 : 高木 智

キーワード : 炎症性腸疾患 大腸、組織幹細胞、炎症シグナル、エピゲノム

研究成果 :

A. 患者検体を用いた遺伝子発現およびエピゲノム網羅的解析の成果に基づく、治療抵抗性克服のための標的の探索

A-1. UC手術摘出標本のトランスクリプトーム解析および網羅的エピゲノム解析に基づく新規治療標的の探索。

【方法】IBD患者試料で行ってきた網羅的解析の結果を利用し、特に治療抵抗性という観点から新規治療標的をin silicoで選定した。まず、トランスクリプトーム解析結果より、病変部で発現が著変している遺伝子をピックアップし、次にPathway解析等により、周辺遺伝子の発現パターンを確認し、整合性のあるPathwayを絞り込んだ。絞った対象に対して網羅的エピゲノム解析結果を統合し、遺伝子発現に影響を及ぼすエピゲノム変化を有している遺伝子を新規治療標的候補とした。上皮細胞で産生される分子、TNFの産生や活性化、TNF下流のシグナル作用を増幅・遷延に関連する分子/シグナル経路/エピゲノム変化を優先しておこなった。

【結果】潰瘍性大腸炎手術症例3例の病変部粘膜、大腸がん摘出症例2例の健常粘膜から樹状細胞/マクロファージ分画であるCD33+細胞、CD3+T細胞を分離精製し、epigenome網羅的解析(活性化マーカーH3K4me3、発現抑制マーカーH3K27me3に対する抗体を用いたChIP-seqおよび、DNAメチル化解析MeDIP)及びトランスクリプトーム解析(SAGE)の生データが得られている。これらについて、我々の手でおおまかな統合解析を行った。その結果、H3K4me3+H3K27me3のいわゆる二価修飾と疾患との関連がみいだされた。これは潰瘍性大腸炎においては特定の遺伝子の発現制御領域にエピゲノム異常が生じるといふより、エピジェネティック修飾機構そのものが病的であること示唆する新規な結果である。より正確な統合解析を進めるためには、バイオインフォマティクスの協力が必要となったため統合解析プラットフォーム構築としてバイオインフォマティクスは解析委託した。統計解析により、Non-IBD症例とUC症例またはCD症例との間で発現に有意差が認められるエピジェネティック修飾関連18遺伝子を抽出した。これらを用いてクラスター解析を行った結果、Non-IBD症例とIBD症例(UC症例+CD症例)は異なるクラスターに分類されたが、UC症例とCD症例の違いは認められなかった。IBD症例では特にH3K4me3 writers、H3K27me3 writersの発現亢進と、一部のH3K27me3 erasersの発現低下が顕著であり、IBD症例で見られた病的エピジェネティック修飾機構の原因と考えられた。これらのエピジェネティック修飾機構の破綻をin vitroで再現するため、エピジェネティック修飾関連遺伝子計84遺伝子の発現を、次世代簡易シーケンサーIon Protonを用いたAmpli-seq法にて測定する系を確立し、新たにnon-IBD例7例、UC5例、CD2例の測定を行った。

B. 治療抵抗性克服のための標的候補項目の検証

C-1. Aで選定した項目について、臨床検体を用いた標的分子/エピゲノム修飾/代謝物の検出・測定法確立を開始

【結果】Aの統合バイオインフォマティクス解析により見出したエピジェネティック修飾機構の破綻を、多数の臨床検体について同時に評価するために、エピジェネティック修飾関連遺伝子計84遺伝子の発現を、次世代簡易シーケンサーIon Protonを用いたAmpli-seq法にて測定する系を確立した。更に、生検検体を用いて活動度や治療抵抗性との関連を検討するために、解析項目をNon-IBD症例とUC症例またはCD症例との間で発現に有意差が認められるエピジェネティック修飾関連18遺伝子にまで絞り込んだ。一方、Bにより見出された代謝物の変化は、本研究で確立したGC-MSやLC-MS解析系を用いて多数の臨床検体の測定が可能である。現在、生検については目標の20例の収集を行なった。

C-2. C-1で検出・測定法を確立した新規治療標的項目の患者試料での検証。UCにおける寛解維持症例、ステロイド抵抗性または離脱不能例、CD症例における同一症例の治療前治療後の血清および病変組織を収集し、臨床情報と遺伝子あるいは特定の蛋白質発現、あるいは特定の遺伝子のエピゲノム修飾との関連を解析した。

【結果】25年度に共同研究によって本研究を開始すべく倫理申請を行い、9月19日に承認された。検体提供先および共同研究先施設での承認を得て、症例集積を開始した。活動度、治療応答性との関連を検討するために、同一症例の、年に一度の内視鏡検査時の生検検体を経時的に蓄積した。定期的に受診する患者は寛解維持症例が殆どであったが、研究期間中に寛解から増悪に転じた症例、検査時炎症から寛解へ転じた症例の検体などを収集した。

D. 治療抵抗性克服のための標的項目の機能・メカニズム解析と治療薬シーズの探索

【結果】新規治療標的項目の機能について、メカニズム解析を行なった。この際ヒト末梢血TNF分泌を抑制する低分子化合物のスクリーニングを行なうための*in vitro*実験系を確立した。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：25指104

研究課題名：炎症性腸疾患における治療抵抗性メカニズムの解明とその診断・治療への応用

主任研究者名：土肥多恵子

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Microbiota derived lactate accelerates colon epithelial cell turnover in starvation-refed mice.	Okada T, Fukuda S, Hase K, Nishiumi S, Izumi Y, Yoshida M, Hagiwara T, Kawashima R, Yamazaki M, Oshio T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Kakimoto K, Higuchi K, Kawamura YI, Ohno H, Dohi T.	Nature Communications	4	2013
TWEAK/Fn14 pathway promotes a T helper 2-type chronic colitis with fibrosis in mice.	Son A, Oshio T, Kawamura YI, Hagiwara T, Yamazaki M, Inagaki-Ohara K, Okada T, Wu P, Iseki M, Takaki S, Burkly LC, Dohi T.	Mucosal Immunology	6	2013
Oral treatment with a novel small molecule alpha 4 integrin antagonist, AJM300, prevents the development of experimental colitis in mice.	Sugiura T, Kageyama S, Andou A, Miyazawa T, Ejima C, Nakayama A, Dohi T, Eda H.	J Crohns Colitis	7	2013
Dysbiosis of Salivary Microbiota in Inflammatory Bowel Disease and Its Association With Oral Immunological Biomarkers.	Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K, Kim S, Kimura R, Iraha A, Ishida H, Fujita J, Mano S, Morita H, Dohi T, Oota H, Hattori M.	DNA Research	21	2014
Pathological activation of canonical nuclear-factor κ B by synergy of tumor necrosis factor α and TNF-like weak inducer of apoptosis in mouse acute colitis.	Dohi T, Kawashima R, Kawamura YI, Otsubo T, Hagiwara T, Amatucci A, Michaelson J, Burkly LC.	Cytokine	69	2014
Chemokine receptor CCR8 is required for lipopolysaccharide-triggered cytokine production in mouse peritoneal macrophages	Oshio T, Kawashima R, Kawamura YI, Hagiwara T, Mizutani N, Okada T, Otsubo T, Inagaki-Ohara K, Matsukawa A, Haga T, Kakuta S, Iwakura Y, Hosokawa S and Dohi T	PLOS ONE	9	2014
The epigenetic regulator Uhrfl facilitates functional expansion of colonic regulatory T cells.	Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Ohara O, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K.	Nature Immunology	15	2014
Therapeutic adenoviral gene transfer of a glycosyltransferase for prevention of peritoneal dissemination and metastasis of gastric cancer.	Kawamura YI, Adachi Y, Curiel DT, Kawashima R, Kannagi R, Nishimoto N and Dohi T.	Cancer Gene Ther	21	2014
Retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 is associated with colitis but not tumors in a murine colitic cancer model	Otsubo T, Hagiwara T, Okamura T, Ishizaka Y, Kawamura YI, Dohi T	PLOS ONE	10	2015
Aberrant DNA hypermethylation reduces the expression of the desmosome-related molecule periplakin in esophageal squamous cell carcinoma.	Otsubo T, Hagiwara T, Tamura-Nakano M, Sezaki T, Miyake O, Hinohara C, Shimizu T, Yamada K, Dohi T and Kawamura YI.	Cancer Medicine	4	2015
Zfat-deficiency results in a loss of CD3 ζ phosphorylation with dysregulation of ERK and Egr activities leading to impaired positive selection.	Ogawa M, Okamura T, Ishikura S, Doi K, Matsuzaki H, Tanaka Y, Ota T, Hayakawa K, Suzuki H, Tsunoda T, Sasazuki T, Shirasawa S.	PLoS One	008	2013
Differential requirement for RhoH in development of TCRab CD8 $\alpha\alpha$ IELs and other types of T cells.	Hiroyo Oda, Norimasa Tamehiro, Michael S Patrick, Kunihiko Hayamakwa, Harumi Suzuki .	Immunol. Lett	151	2013
Complete genomic DNA sequence of the East Asian spotted fever disease agent Rickettsia japonica.	Matsutani M, Ogawa M, Takaoka N, Hanaoka N, Toh H, Yamashita A, Oshima K, Hirakawa H, Kuhara S, Suzuki H, Hattori M, Kishimoto T, Ando S, Azuma Y, Shirai M.	PLoS One	009	2013
Differential function of Themis CABIT domains during T cell development.	Okada T, Nitta T, Kaji K, Takashima A, Oda H, Tamehiro N, Goto M, Okamura T, Patrick MS, Suzuki H.	PLoS One	009	2014

研究発表及び特許取得報告について

Overexpression of RhoH permits to bypass the pre-TCR checkpoint	Tamehiro N, Hiroyo Oda H, Shirai M, Suzuki H	PLoS ONE	10	2015
The thymic cortical epithelium determines the TCR repertoire of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells.	Nitta T, Muro R, Shimizu Y, Nitta S, Oda H, Ohte Y, T Goto M, Yanobu R, Narita T, Takayanagi H, Yasuda H, Okamura T, Murata S, Suzuki H.	EMBO Rep	16	2015
The Ras GTPase-activating protein Rasal3 supports survival of naive T cells.	Muro R, Nitta T, Okada T, Ideta H, Tsubata T, Suzuki H.	PLoS ONE	10	2015
An epistatic effect of apaf-1 and caspase-9 on chlamydial infection.	Rhaman MA, Shirai M, Aziz MA, Ushirokita R, Kubota S, Suzuki H, Azuma Y.	Apoptosis	20	2015
Thymic stromal cell subsets for T cell development.	Nitta T, Suzuki H.	Cell Mol Life Sci	73	2016
Adipose natural regulatory B cells negatively control adipose tissue inflammation.	Nishimura S, Manabe I, Takaki S, Nagasaki M, Otsu M, Yamashita H, Sugita J, Yoshimura K, Eto K, Komuro I, Kadowaki T, Nagai R.	Cell Metabolism.	018	2013
Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha\beta$ 3.	Ishihara J, Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Takaki S, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Kitamura T, Okano T.	Int J Hematol.	099	2014
Lnk prevents inflammatory CD8+ T-cell proliferation and contributes to intestinal homeostasis.	Katayama H, Mori T, Seki Y, Anraku M, Iseki M, Ikutani M, Iwasaki Y, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S.	Eur J Immunol.	2014 Feb 17. doi: 10.1002/eji.201343883	2014
Lnk/Sh2b3 controls the production and function of dendritic cells and regulates the induction of IFN- γ -producing T cells.	Mori T, Iwasaki Y, Seki Y, Iseki M, Katayama H, Yamamoto K, Takatsu K, Takaki S.	J Immunol	193	2014
Lnk prevents inflammatory CD8+ T-cell proliferation and contributes to intestinal homeostasis.	Katayama H, Mori T, Seki Y, Anraku M, Iseki M, Ikutani M, Iwasaki Y, Yoshida N, Takatsu K, Takaki S	Eur J Immunol	44	2014
Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha\beta$ 3	Ishihara J, Umemoto T, Yamato M, Shiratsuchi Y, Takaki S, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Kitamura T, Okano T	Int J Hematol	99	2014
Lymphocyte adaptor protein LNK deficiency exacerbates hypertension and end-organ inflammation.	Saleh MA, McMaster WG, Wu J, Norlander AE, Funt SA, Thabet SR, Kirabo A, Xiao L, Chen W, Itani HA, Michell D, Huan T, Zhang Y, Takaki S, Titze J, Levy D, Harrison DG, Madhur MS.	J Clin Invest	125	2015
Interferon- γ constrains cytokine production of group 2 innate lymphoid cells.	Kudo F, Ikutani M, Seki Y, Otsubo T, Kawamura Y, Dohi T, Oshima K, Hattori M, Nakae S, Takatsu K, Takaki S.	Immunology	147	2016
Fukusaki E, Bamba T. Supercritical fluid chromatography/Orbitrap mass spectrometry based lipidomics platform coupled with automated lipid identification software for accurate lipid profiling.	Yamada T, Uchikata T, Sakamoto S, Yokoi Y, Nishiumi S, Yoshida M,	J Chromatogr A.	013-01	2013
A novel gas chromatography mass spectrometry-based serum diagnostic and assessment approach to ulcerative colitis.	Kohashi M, Nishiumi S, Ooi M, Yoshie T, Matsubara A, Suzuki M, Hoshi N, Kamikozuru K, Yokoyama Y, Fukunaga K, Nakamura S, Azuma T, Yoshida M.	J Crohns Colitis.	doi: 10.1016/j.crohns.2014.01.024.	2014
Metabolome analysis for discovering biomarkers of gastroenterological cancer.	Suzuki M., Nishiumi S., Matsubara A., Azuma T., Yoshida M.	Journal of chromatography	966	2014
Metabolomics for Biomarker Discovery in Gastroenterological Cancer.	Nishiumi S., Suzuki M., Kobayashi T., Matsubara A., Azuma T., Yoshida M.	Metabolites	4	2014
Supercritical fluid extraction as a preparation method for mass spectrometry of dried blood spots.	Matsubara A., Izumi Y., Nishiumi S., Suzuki M., Azuma T., Fukusaki E., Bamba T., Yoshida M	Journal of Chromatography B	969	2014

研究発表及び特許取得報告について

Multi-Component Profiling of Trace Volatiles in Blood by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Dynamic Headspace Extraction	Kakuta S., Yamashita T., Nishiumi S., Yoshida M., Fukusaki E., Bamba T	Mass Spectrometry	4	2015
Interferon- γ -producing B cells induce the formation of gastric lymphoid follicles after Helicobacter suis infection	Yang L., Yamamoto K., Nishiumi S., Nakamura M., Matsui H., Takahashi S., Dohi T., Okada T., Kakimoto K., Hoshi N., Yoshida M., Azuma T	Mucosal Immunology	8	2015
Profiling of volatile compounds in APCMin/+ mice blood by dynamic headspace extraction and gas chromatography/mass spectrometry	Kakuda S., Nishiumi S., Yoshida M., Fukusaki E., Bamba T.	Journal of Chromatography B	1003	2015
(特集 I. 感染・炎症・免疫とメタボローム) 医学におけるメタボローム研究の現状	那賀川 峻、西海 信、東 健、吉田 優	臨床免疫・アレルギー科	63	2015
LC-MS/MS-based metabolome analysis detected changes in the metabolic profiles of small and large intestinal adenomatous polyps in ApcMin/+ mice	Suzuki M., Nishiumi S., Kobayashi T., Azuma T., Yoshida M.	Metabolomics	12	2016

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Involvement of L1 retrotransposition in murine experimental colitis-cancer model.	Otsubo T, Kawamura YI, Ishizaka Y, Dohi T. Involvement of L1 retrotransposition in murine experimental colitis-cancer model.	DDW2013	Orlando	2013/5/20
TWEAK/Fn14 pathway promotes chronic colitis and fibrosis mediated by IL-13-TSLP axis.	Dohi T, Kawamura YI, Kawashima R, Son A, Oshio T, Wu P, Burkly LC.	Immunology 2013	Honolulu	2013/5/7
Cell type-specific, genome-wide epigenetic analysis for lamina propria cells isolated from the colon with ulcerative colitis.	Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T.	第42回日本免疫学会学術集会.	千葉	2013/12/1
消化管炎症の重症化・慢性化機構を担う因子.	土肥多恵子	第50回日本消化器免疫学会	東京	2013/8/1
Sialic-acid-binding Ig-like lectins, potential peripheral markers for mucosal damage of inflammatory bowel disease.	Kawamura YI, Maeyashiki C, Hagiwara T, Otsubo T, Akiyama J, Dohi T.	United European Gastroenterology 2014	Vienna	2014年10月
食道扁平上皮癌におけるデスモゾーム関連分子のDNAメチル化異常.	萩原輝記, 大坪武史, 中野(田村)美和, 山田和彦, 日野原千速, 三宅大, 清水利夫, 土肥多恵子, 河村由紀.	第87回日本生化学会大会	京都	2014年9月
Intestinal mucosal injury induced by anti-cancer agents is mediated by TWEAK/Fn14 and IL-13.	Sezaki T, Hirata Y, Kawamura YI, Dohi T.	第43回日本免疫学会総会	京都	2014年12月
Integrative analysis of DNA methylome and transcriptome detected loss of a desmosome protein in esophageal squamous cell carcinoma.	Kawamura YI, Otsubo T, Hagiwara T, Tamura-Nakano, Sezaki T, Hirada Y, Igari T, Yamada K, Dohi T	DDW2015	Washington D.C.	2015年5月
5-Fluorouracil-induced intestinal injury is mediated by TWEAK/Fn14 and IL-13	Sezaki T, Hirata Y, Burkly LC, Kawamura YI, Dohi T.	DDW2015	Washington D.C.	2015年5月
潰瘍性大腸炎における粘膜固有層免疫細胞のエピゲノム異常 シンポジウム2-炎症性腸疾患・腸内環境と免疫の基礎と臨床-	河村由紀, 大坪武史, 大島健志朗, 豊田哲郎, 萩原輝記, 河村裕, 小西文雄, 矢野秀朗, 斎藤幸雄, 服部正平, 土肥多恵子.	第52回消化器免疫学会	東京	2015年7月
Fn14 disruption suppresses 5-Fluorouracil-induced-diarrhea by enhancing IL-33 and IL-13Ra2 expression	Sezaki T, Hirata Y, Kawamura YI, Dohi T	第44回日本免疫学会学術集会	札幌	2015年11月
Cortical thymic epithelial cells control conventional and innate T cell development	Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Hiroyo Oda, Shigeo Murata, Harumi Suzuki	第42回日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
An altered T cell repertoire in mice lacking cortical thymic epithelial cells.	Ryunosuke Muro, Takeshi Nitta, Harumi Suzuki	第42回日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
Differential function of two CABIT domains in Themis.	Toshiyuki Okada, Takeshi Nitta, Hiroyo Oda, Michael S Patrick, Harumi Suzuki	第42回日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
A non-synonymous SNP variant of RhoH reduces TCR mediated signal transduction via proteasomal degradation	Norimasa Tamehiro, Hiroyo Oda, and Harumi Suzuki	第42回日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月

研究発表及び特許取得報告について

A missense mutation in Psmb11 impairs thymoproteasome assembly and T cell development”	Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Shigeo Murata, Harumi Suzuki	The 35th Naito Conference “The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles”	Sapporo, Japan	2013.7.9-12
Novel mutant mice lacking cortical thymic epithelial cells”	Takeshi Nitta, Ryunosuke Muro, Sachiko Nitta, Shigeo Murata, Harumi Suzuki	The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference	Kyoto, Japan.	2013.6.3-7
Differential function of Themis CABIT domains during T cell development	Toshiyuki Okada, Takeshi Nitta, Kentaro Kaji, Hiroyo Oda, Michael Patrick, Harumi Suzuki	The 6th International Workshop of Kyoto T Cell Conference	Kyoto, Japan	2013.6.3-7
Themis CABIT domains exert distinct functions in thymocyte positive selection	Toshiyuki Okada, Takeshi Nitta, Kentaro Kaji, Hiroyo Oda, Michael S Patrick and Harumi Suzuki	The 15th International Congress of Immunology	Milan	2013年8月
Themis regulates cytokine production in mature naive T cells	Okada T, Nitta T, Oda H, Tamehiro N, Patrick MS, Suzuki H	7th ThymOZ meeting	Helon Island, Australia	2014年4月
胸腺皮質上皮細胞による $\gamma\delta$ T細胞の分化制御	新田 剛、室 龍之介、新田 幸子、小田 浩代、鈴木 春巳	第24回 KTCC	京都	2014年6月
RhoH欠損マウスで認められる乾癬様皮膚炎の解析	爲廣紀正、小田浩代、鈴木春巳	第24回 KTCC	京都	2014年6月
Rasal3, a newly identified Ras GTPase activating protein is important for survival of naïve T cells in the periphery	Muro R, Nitta T, Okada T, Tubata T, Suzuki H	第43回日本免疫学会総会	京都	2014年12月
Overexpression of RhoH permits to bypass the pre-TCR checkpoint	Norimasa Tamehiro, Hiroyo Oda, and Harumi Suzuki	Venice Thymus Meeting 2015	Venice, Italy	2015年4月
IL-17産生型 $\gamma\delta$ T細胞の分化におけるRhoHの役割	室龍之介、新田剛、為広紀正、鈴木春巳	第25回KTCC	京都	2015年5月
Differential roles of TCR-proximal signaling adaptors in T cell development	SUZUKI Harumi, TAMEHIRO Norimasa, MURO Ryunosuke, ODA Hiroyo, NITTA Takeshi	The 44th JSI annual meeting (Symposium)	札幌	2015年11月
NAD(P)H:quinone oxidoreductase (Nqo1) regulates irritant contact dermatitis.	M Kitajima, A Kimura, H Suzuki:	The 44th JSI annual meeting	札幌	2015年11月
Identification of a novel factor on Th17 cell differentiation.	Norimasa Tamehiro and Harumi Suzuki	The 44th JSI annual meeting	札幌	2015年11月
AhR-Nqo1 axis selectively inhibits LPS-induced IL-6 production through degradation of I κ B α protein.	Akihiro Kimura, Akihiko Yoshimura, Harumi Suzuki.	The 44th JSI annual meeting	札幌	2015年11月
Lnk/Sh2b3, an intracellular adaptor associated with celiac disease and autoimmune diabetes, regulates accumulation of inflammatory T cells and prevents intestinal villous atrophy.	Mori T, Katayama H, Iwasaki Y, Seki Y, Iseki M, Ikutani M, Yoshida N, Takatsu K, <u>Takaki S</u> .	The 15th International Congress of Immunology	Milan	2013年8月
An autoimmune disease-associated gene, Lnk/SH2B3 controls production and functions of DC subsets and regulates inflammatory T cell differentiation.	<u>Mori T</u> , Seki Y, Iwasaki Y, Yamazaki-Suzuki N, Iseki M, Takaki S.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
IgE production and germinal center formation are regulated by the adaptor protein Aps/Sh2b2 in B cells.	<u>Iseki M</u> , Kudo F, Takaki S.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
Lnk/Sh2b3 adaptor protein prevents the accumulation of inflammatory CD8+ T cells and intestinal villous atrophy.	<u>Seki Y</u> , Katayama H, Mori T, Iseki M, Takaki S.	第42回 日本免疫学会学術集会	千葉	2013年12月
Lnk/Sh2b3 adaptor protein controls cytokine responses of dendritic cells, and regulates the induction of IFN- γ -producing T cells .	Mori T, Iseki M, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
IgM+ plasma cells contribute to the sufficient production of IgG by secreting IL-10 and IL-13.	Yamazaki N, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
Lnk/Sh2b family adaptor protein Aps/Sh2b2 in B cells contributes to germinal center B cell survival and optimal IgE production in vivo.	Iseki M, Kudo F, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月

研究発表及び特許取得報告について

Suppression of cytokine production from group 2 innate lymphoid cells by interferon- γ .	Kudo F, Seki Y, Takaki S.	第43回日本免疫学会学術集会	京都	2014年12月
Germinal center B cell survival and optimal IgE production are controlled by Lnk/Sh2b family adaptor protein Aps/Sh2b2.	Iseki M, Kudo F, Takaki S.	第44回 日本免疫学会学術集会	札幌	2015年11月
An autoimmune disease-associated gene, Lnk/Sh2b3 controls inflammation in adipose tissue and reduces the risk for onset of diabetes.	Mori T, Yamazaki N, Takaki S.	第44回 日本免疫学会学術集会	札幌	2015年11月
Inhibitory effects of interferon- γ on cytokine production in group 2 innate lymphoid cells.	Kudo F, Takaki S.	第44回 日本免疫学会学術集会	札幌	2015年11月
メタボロミクスの医療応用	吉田 優	第61回 日本質量分析総合討論会	茨城	2013
メタボロミクスの医学研究への応用	吉田 優	第25回日本消化器癌発生学生総会	福岡	2014
Metabolomics Analysis for medical Research	Masaru Yoshida	29th ISMAS International Symposium on Mass Spectrometry	インド	2015
メタボロミクスによる新しい臨床検査の展開	吉田優	日本臨床検査自動化学会第47回大会	神奈川	2015/10/1

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。