

課題番号 : 26指110

研究課題名 : 摂食応答を標的とした消化管炎症の制御法の開発研究

主任研究者名 : 河村 由紀

分担研究者名 : 鈴木 春巳、高木 智

キーワード : 炎症性腸疾患、栄養シグナル、肥満、粘膜免疫

研究成果 :

炎症性腸疾患(IBD)では成分栄養療法が有効であり、腸内環境がその病因・病態形成に重要である事は明確である。本研究ではIBDの臨床検体とマウス腸炎モデルを用いて、栄養状態が消化管炎症に及ぼす影響を、免疫細胞、炎症再生上皮の遺伝子発現・エピゲノム修飾の網羅的解析によって分子レベルで解明する。更にその成果を基に、IBDの新たな診断・治療法を開発することを目的とする。

免疫細胞への影響については、本年度はマウスを36時間の絶食後に再摂食を行うモデルを用い、消化管二次リンパ組織の細胞数と細胞構成の変化を調べた。初年度に絶食により粘膜免疫担当細胞の数が減少することを見出したが、再摂食の6時間後には約50%程度に、48時間後には100%に回復することが分かった。このメカニズム解明のため、自由摂食中、絶食中、あるいは絶食-再摂食中のドナーマウスより分離した免疫担当細胞を蛍光ラベルしたのち、レシピエントマウスに移植し、18時間後に腸管関連リンパ組織中の蛍光ラベル細胞数をフローサイトメトリーで算定した。ドナーが食事中/絶食中に関わらず、レシピエントが絶食中であるとパイエル板へのホーミングが顕著に減少することが明らかとなった。この現象は、空腸、回腸いずれのパイエル板でも見られた。パイエル板におけるケモカインとケモカイン受容体の発現について調べた結果、特定のケモカイン産生が絶食によって減少することが明らかとなった。これらは管腔内の栄養源からのシグナルによりパイエル板ストローマ細胞のケモカイン産性能が変化し、その結果として消化管二次リンパ組織中の免疫担当細胞構成や分布異常が引き起こされることを示唆する結果であり、炎症反応にも大きく影響すると予測される。

肥満の影響については、初年度に見出した高脂肪食摂取マウスの20~30%に認められる胃の形態的变化を、本年度は時系列にそって組織学的に検討し、胃粘膜における細胞配置異常の詳細を明らかにした。すなわち、壁細胞の減少が初期に起こり始め、それに続いて異所性粘液の産生が見られることが分かった。この病変部より上皮細胞を酵素的に分離後、ソーティングにより壁細胞以外の細胞を採取し、フリュイダイトsingle cell analysis system (C1およびBiomark)を用いて、単一細胞で96種類の遺伝子発現を解析した結果、高脂肪食群の病変では、そのほとんどが異所性粘液を産生するSPEM (Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia)という胃癌の前癌病変であった。電顕観察では、壁細胞にストレスがかかっていると考えられる状態を示す所見を見出した。

ヒト検体を用いた検討では、これまでに解析したIBDのトランスクリプトームおよびプロモーター領域のエピゲノム修飾プロファイルの統合解析を試みたが、特にDNAメチル化パターンとIBDの特異的遺伝子発現は一致しなかった。網羅的解析の結果からは症例間の個人差が予想以上に大きいことが分かり、IBD特異的变化を有する遺伝子の絞り込みの条件をさらに検討している。肥満または糖尿病手術症例及び対照非合併症例の検体の収集も引き続き行っている。

Subject No. : 26-110

Title : Identification and regulation of nutritional stimuli-inducing signaling pathways in gastrointestinal inflammation

Researchers : Yuki I. Kawamura, Harumi Suzuki, Satoshi Takaki

Key word : Inflammatory Bowel Diseases, nutrient signal, obesity, mucosal immunology

Abstract :

As elemental diets are effective therapy for inflammatory bowel disease (IBD), intraluminal environment including ingested food, indigenous flora, bacterial component, microbial metabolites and fermentation products closely related to the etiology and pathophysiology of IBD. The aim of this project is to identify the nutritional stimuli-inducing signaling pathways related to gastrointestinal inflammation, and eventually to apply the result to the development of remedies against IBD.

In this project, we elucidated the influence of starvation and refeeding on immune cells using murine models. Starvation for 36 h dramatically decreased the number of cells in Peyer's patches (PP). In addition, we found the significant decrease in the number of B cells and the change in the localization of CD11c⁺ dendritic cells in PP located in the lower part of small intestine after starvation. After starvation of 36 h, mice were refed with normal diet (CE2). After refeeding of 48 h, starvation-induced reduction of the number of cells in PP was recovered to the basal level. To clarify dietary-inducing mechanisms to maintain the number of immune cells in gut-associated lymphoid tissues, the expressions of chemokines and their receptors were examined in starved or refed mice. The level of some chemokines normally expressed in PP was strikingly decreased during starvation. These results indicate that the nutritional stimuli-inducing signaling pathways affect production of chemokines by stromal cells in PP, resulting the changes of the number of immune cells in gut-associated lymphoid tissues.

We also analyzed the gastrointestinal tract of mice with high fat diet (HFD)-induced obesity. During ~8-20 weeks of HFD feeding, totally 35% of mice developed macroscopically distinct metaplastic patchy lesions in stomach. This metaplastic patchy lesion was histologically characterized by severe loss of parietal cells expressing HK-ATPase, a parietal cell marker, and the expression of ectopic Alcian blue-positive mucin. The decrease of the number of parietal cells was clearly observed as early as 8 weeks after starting HFD. To find out early changes of the parietal cells in HFD-fed stomachs, morphological analysis using electron microscopy (EM) was performed. In control mice, gastric corpus pits were mostly occupied with parietal cells containing cytoplasmic tubulovesicles and numerous mitochondria. After 4 weeks of HFD feeding, decrease of the number of parietal cell was frequently observed in corpus mucosa. Further, abnormal mitochondria in parietal cells with dense crystalline inclusions were seen in HFD-fed mice. These results suggest the presence of mitochondrial stress in HFD-fed parietal cells. Single-cell gene expression analysis by using Fluidigm C1 and Biomark HD system indicated that this lesion was similar to previously reported precancerous lesion, spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM). These results indicate that HFD alone could induce atrophic changes and metaplasia of proximal gastric mucosa in mice.

We have done global study of gene expression and epigenetic changes using mucosal tissues from IBD patients and have tried to establish the method of *in silico* integrated analysis by using these data to find out the nutritional stimuli-inducing signaling pathway related to gastrointestinal inflammation. Bioinformatics is now underway.

Researchers には、分担研究者を記載する。

摂食応答を標的とした消化管炎症の制御法の開発研究

27年度の達成状況

平成26年度

A. マウス絶食-再摂食モデルを用いた栄養シグナルによる免疫・炎症機構の解明

絶食によるパイエル板細胞数と細胞構成の変化を見いだした。

適切な絶食の誘導により消化管炎症を緩和出来ることを見いだした。

B. 肥満マウスモデルを用いた栄養シグナルによる免疫・炎症機構の解明

肥満マウスでの消化管粘膜の異常を見いだした。一部は常在菌の関与も見られた。

C. ヒト炎症性腸疾患検体を用いた栄養シグナル異常の探索

トランスクリプトーム、網羅的エピゲノム解析結果の統合解析中

D. 新規標的分子のヒト検体を用いた検証ならびに機能・メカニズム解析

手術標本、生検、血清検体の収集

順調に検体を集積している

平成27年度

絶食によるパイエル板細胞数減少メカニズムの一部解明～

絶食の誘導により病変部でのIL-1 β 、IL-17の減少を見いだした

肥満マウスで胃粘膜前癌病変を見だし、遺伝子発現などを詳細に検討

平成28年度

摂食応答に関連する代謝シグナル関連分子の機能解析

粘膜免疫、炎症におけるメカニズム解析

栄養シグナル攪乱が病態(腸炎・胃食道炎)に及ぼす影響

肥満により消化管粘膜および免疫系に異常を来す原因の解明

マウスモデルで見出された栄養シグナル関連分子の変化が、ヒト検体でも見られるか否かを検証

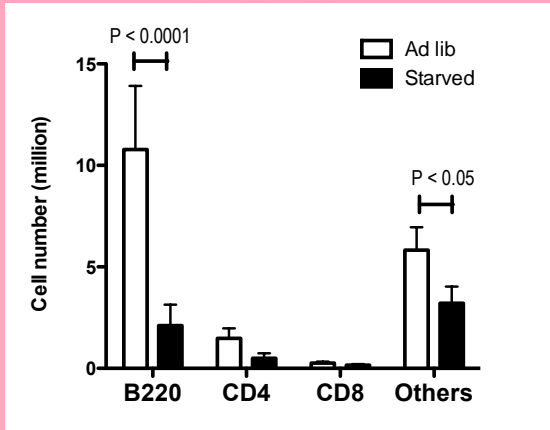
新規標的分子の*in vitro*、*in vivo*メカニズム解析

新規標的分子発現ならびに関連するエピゲノム変化の病勢・治療応答性との関連を検証

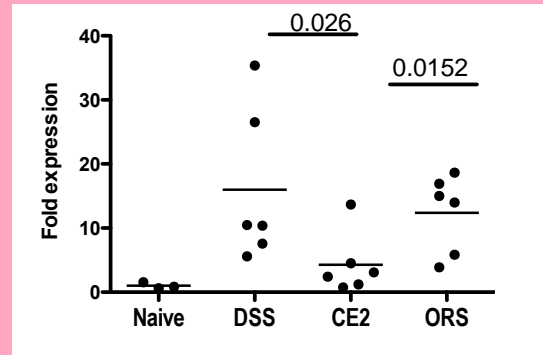
研究の経過

27年度の主な成果

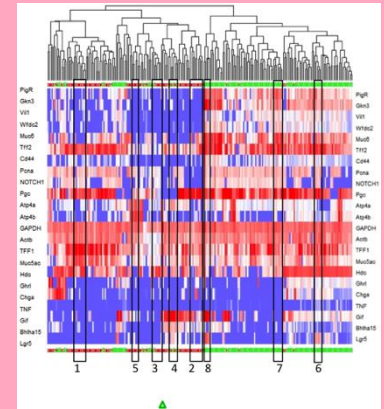
絶食-再摂食によるパイエル板内細胞の変化



～絶食による大腸炎の軽減～
栄養シグナル依存性のサイトカイン
産生減少



高脂肪食摂取により肥満マウス
に誘導される胃粘膜の変化



- 消化管の炎症に関連する栄養シグナル経路の同定
絶食-再摂食、高脂肪食、成分栄養の比較
抗生剤投与、無菌マウスを用いた腸内細菌層、菌代謝物関与の検討
- ヒト検体(潰瘍性大腸炎、クローン病)における異常の検証
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

In silico 解析中

臨床検体集積中

- 新規標的分子の機能・メカニズム解明
- 分子メカニズムに基づく診断・治療法の開発

課題番号 : 26指110

研究課題名 : 消化管の炎症病理における栄養シグナルの関与

主任研究者名 : 河村 由紀

分担研究者名 : 鈴木 春巳

キーワード : 炎症性腸疾患、栄養シグナル、炎症病理

研究成果 :

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）は腹痛・発熱などを繰り返し、病状の寛解・再燃は長期にわたり患者を苦しめる。内科的治療として5アミノサリチル酸製剤、ステロイド、TNF- α 中和生物製剤、免疫調節剤が用いられているが、長期間の治療中にこれらのいずれにも応答しない、あるいは次第に応答性を失っていく症例が多く、現時点で根治療法はない。一方で、炎症性腸疾患の治療として成分栄養療法が有効であり、栄養療法からの離脱が病勢再燃の引き金となることから、栄養状態が炎症性腸疾患の病因・病態形成に重要である事は明確であるが、栄養シグナルが消化管の炎症病理をどのように修飾しているのか、その分子メカニズムは明らかとなっていない。消化管の炎症に関連する栄養シグナルを同定することが出来れば、攪乱されている栄養シグナルの是正を標的とする、既存の治療法とは異なる分子機構に基づく予防・治療法の開発に繋がる事が期待されるため、消化管の炎症病理に関連する栄養シグナルの同定は喫緊の課題である。本研究ではマウスに高脂肪食摂取またはカロリー制限を行うモデルを用いることで、摂食状態が消化管の炎症病理を修飾する分子メカニズムを解明する。

初年度は、C57BL/6マウスに高脂肪食（60% kcal% fat）を8~20週間自由摂取させた後、消化管組織を観察し、高脂肪食摂取マウスの20~30%で、胃に形態的に明らかな変化が見られることを見出した。食道癌や、胃噴門部癌の疫学的リスク要因も考慮し、高脂肪食摂取マウスにさらにアルコール投与、または塩酸+胆汁酸の投与を加えたが、胃粘膜における細胞配置異常の程度や頻度は亢進しなかった。したがって、肥満における胃粘膜細胞の動態・分化能の異常は、表層からの物理的な傷害刺激よりは代謝異常による細胞内シグナルの変化が原因で惹起されると推測されたため、本年度は高脂肪食摂取マウスの胃粘膜を時系列にそって組織学的に検討し、胃粘膜における細胞配置異常の詳細を明らかにした。すなわち、壁細胞の減少が初期に起こり始め、それに続いて異所性粘液の産生が見られることが分かった。そこで、この病変を更に詳細に検討するため、胃粘膜上皮細胞から酵素的に分離後、ソーティングにより壁細胞以外の細胞を採取し、単一細胞で96種類の遺伝子発現を解析する実験を、フリユイダイムsingle cell analysis system (C1およびBiomark)を用いて行った。健常胃粘膜と病変部胃粘膜細胞の結果を比較したところ、高脂肪食群の病変では、殆どが異所性粘液を産生するSPEM (Spasmolytic polypeptide expressing metaplasia)という胃癌の前癌病変であるmetaplasia cellsに置きかわっていることが明らかとなった。更に電顕観察を行った結果、壁細胞にストレスがかかっていると考えられる状態を示す所見を見出した。本研究において肥満マウスモデルを用いて見出した、栄養シグナルにより惹起される胃粘膜細胞の動態・分化能の異常について、結果をまとめて現在論文投稿中である。

課題番号 : 26指110

研究課題名 : 栄養シグナルによる粘膜免疫制御

主任研究者名 : 河村 由紀

分担研究者名 : 高木 智

キーワード : 炎症性腸疾患、栄養シグナル、免疫制御

研究成果 :

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）は、若年発症の重篤な慢性炎症性疾患である。炎症性腸疾患は近年著しい増加傾向にあり、生活様式の変化（食生活の欧米化、特に肉食の増加、衛生状態の改善など）がその一因と考えられている。しかしながら、食事内容の欧米化や衛生状態の改善に伴う腸内環境の変化が、炎症性腸疾患の発症・遷延化をどのように修飾しているのか、その分子メカニズムは明らかとなっていない。炎症性腸疾患の治療として成分栄養療法が有効であることも栄養シグナルの病因・病態形成における重要性を示唆しているが、一方で長期にわたる栄養療法のコンプライアンスは低く、QOLの改善にもつながらない。また、栄養療法からの離脱が病勢再燃の引き金となることも多い。炎症性腸疾患に関連する栄養シグナル異常が同定され、既存の治療法とは異なる分子機構に基づく予防・治療法開発により栄養シグナル異常がコントロール可能となれば、患者は厳格な食事制限から解放されることが期待される。QOLの著しい改善という点でも、摂食刺激により炎症応答が引き起こされるメカニズムの解明が急務である。

初年度はマウスを36時間の絶食後、腸管関連リンパ組織を採取し、粘膜免疫担当細胞を分離した後、その細胞数、細胞構成、分布に及ぼす影響を検討し、管腔内の栄養源からのシグナルに依存した粘膜免疫担当細胞構成や分布の変化を見出した。本年度は絶食後に再摂食を行うモデルを用い、再摂食後に腸管関連リンパ組織を採取し、粘膜免疫担当細胞を分離した後、その細胞数、細胞構成、分布に及ぼす影響を検討した。絶食により減少した細胞数は再摂食の6時間後には約50%程度に回復し、48時間後には100%に回復していた。このメカニズム解明のため、自由摂食中、絶食中、あるいは絶食-再摂食中のドナーマウスより分離した免疫担当細胞を蛍光ラベルしたのち、自由摂食、絶食中、あるいは絶食-再摂食中のマウスに移植した。移植18時間後にレシピエントマウスの腸管関連リンパ組織から細胞を採取し、その中の蛍光ラベル細胞数をフローサイトメトリーで算定することによって、細胞のホーミングを解析した。その結果、ドナーが食事中/絶食中に関わらず、レシピエントが絶食中であるとパイエル板へのホーミングが顕著に減少することが明らかとなった。この現象は、空腸、回腸いずれのパイエル板でも見られた。以上の結果より、絶食中にはパイエル板のリンパ球以外の、おそらくストローマ細胞におけるケモカインやホーミング分子の発現が変わると予想された。そこで、パイエル板におけるケモカインとケモカイン受容体の発現について、自由摂食時と絶食時で比較解析を行った結果、特定のケモカイン産生が絶食によって減少することが明らかとなった。このことから、パイエル板ストローマ細胞のケモカイン産性能が、栄養シグナルによって変化していることが明らかとなった。ケモカイン産生細胞の同定に向けてさらに解析を進めている。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指110

研究課題名：摂食応答を標的とした消化管炎症の制御法の開発研究

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
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, Kawamura YI.	Cancer Medicine	4	2015
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
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

研究発表及び特許取得報告について

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Enhanced expression of doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) in the background mucosa of colon cancer	Hirata Y, Sezaki T, Hagiwara T, Edogawa S, Okada T, Inoue T, Yano H, Gohda Y, Suda R, Hirose Y, Kawamura YJ, Higuchi K, Dohi T, Kawamura YI	DDW2015	Washington D.C.	2015年5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
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、齊藤幸雄、服部正平、土肥多恵子	第52回消化器免疫学会 (Symposium)	東京	2015年7月
消化器疾患で見られる糖鎖異常とエピジェネティックな遺伝子サイレンシング	河村由紀	第34回糖質学会(招待講演)	東京	2015年7月
Overexpression of RhoH permits to bypass the pre-TCR checkpoint	Tamehiro N, Oda H, Suzuki H	Venice Thymus Meeting 2015	Venice, Italy	2015年4月
Differential roles of TCR-proximal signaling adaptors in T cell development	Suzuki H, Tamehiro N, Muro R, Oda H, Nitta T	第44回日本免疫学会学術集会	札幌	2015年11月
NAD(P)H:quinone oxidoreductase (Nqo1) regulates irritant contact dermatitis	Kitajima M, Kimura A, Suzuki H	第44回日本免疫学会学術集会	札幌	2015年11月
Identification of a novel factor on Th17 cell differentiation	Tamehiro N, Suzuki H	第44回日本免疫学会学術集会	札幌	2015年11月
AhR-Nqo1 axis selectively inhibits LPS-induced IL-6 production through degradation of I κ B α protein	Kimura A, Yoshimura A, Suzuki H	第44回日本免疫学会学術集会	札幌	2015年11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

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。