

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し、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した。

絶食-再摂食が上皮傷害やその再生にどのような影響を及ぼすかを、マウス腸炎モデルを用いて検討した。マウスに2%デキストラン硫酸(DSS)を5日間飲水内投与し、一部のマウスではday 7-8まで36時間の絶食とし、その後通常飼料CE2あるいはグルコースと塩の粉末混合物ORSを再摂食させた。Day 9に組織を採取し解析を行った結果、体重変化には3群の間に有意差は認められなかったが、絶食-CE2再摂食群では体重の回復傾向が認められた。絶食-CE再摂食群は、絶食-ORS再摂食群や非絶食群より大腸長が長く、組織所見でも潰瘍形成が軽度であり、単位腸管あたりのクリプト数と比較した上皮細胞の修復は他群に比べ有意に高かった。すなわち、大腸炎の回復期に適切な絶食時期をもうけるだけで、炎症の緩和と修復を促進することが可能という驚くべき結果が得られた。この際の大腸粘膜におけるサイトカイン発現を定量RT-PCRによって測定すると、DSS腸炎の誘導によりIL-1 β 、IL-17、IL-6の発現が亢進していたが、絶食群でIL-1 β とIL-17の発現が顕著に低下していた。絶食-ORS再摂食群でもIL-1 β とIL-17の低下傾向は見られたが、絶食-CE2再摂食群の方が有意に低下していた。一方、TNF- α はいずれの群でも大きな変化は認められなかった。このことから、絶食による腸炎からの回復の促進効果は、栄養シグナルの低下による炎症の抑制と、再摂食時の上皮細胞増殖による修復の亢進の両方のメカニズムが考えられた。また、再摂食時の細胞増殖亢進には腸内細菌由来の乳酸が重要な働きをしていることを既に明らかにしているため、乳酸を含む短鎖脂肪酸の注腸実験を行なった結果、絶食後の乳酸、酪酸の注腸により腸炎が改善し、上皮細胞の細胞回転が亢進する傾向が見られた。これらの結果より、消化管急性炎症の特定の時期に間欠的絶食期間を設けることで、炎症反応の低下と、上皮細胞修復促進効果が認められることが明らかとなった。これらの成果については論文としてまとめてJ. Clin. Biochemistry and Nutritionに投稿し、受理されている。

免疫細胞への影響については、マウスを36時間の絶食後、消化管二次リンパ組織の細胞数と細胞構成を調べた。絶食後に細胞数は約半数から30%程度まで減少し、小腸を長軸方向に3等分した部位別に見ると、中間部に存在するパイエル板の細胞減少が最も顕著であった。一方でcecal patch及びcecal follicleの大きさが増大していた。盲腸管腔内環境はもともと食物由来の栄養素に乏しく、腸内細菌とその代謝産物で占められることを考慮すると、パイエル板、cecal patchなど消化管二次リンパ組織の細胞数が、管腔内の栄養源からのシグナルに依存することを示唆する結果であった。さらに、小腸下

部に存在するパイエル板では、絶食によりB220陽性B細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞のいずれもが減少していたが、特にB細胞が自由摂食時の25-30%までが減少していることが明らかとなった。組織学的には濾胞の扁平化と、CD11c陽性樹状細胞の局在変化も観察された。また、絶食後の再摂食により6時間後には細胞数は約50%程度に回復し、48時間後には100%に回復していた。これら免疫担当細胞分布の変化は炎症反応にも大きく影響すると予測される。そこで、パイエル板からの細胞の減少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パイエル板細胞を分離し、これを蛍光ラベルしたのち、自由摂食中、絶食中、あるいは絶食-再摂食中のマウスに移植を行った。移植18時間後にレシピエントマウスからパイエル板、cecal patch、腸間膜リンパ節を採取し、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事によって、細胞のホーミングを解析した。その結果、ドナーが絶食中/摂食中に関わらず、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事がわかった。この現象は、空腸、回腸のいずれのパイエル板でも見られた。また、絶食中と再摂食中のドナー由来のパイエル板細胞にそれぞれ異なる蛍光ラベルを施し、1:1の割合で混合して自由摂食中のレシピエントマウスに移植しても、ホーミングする細胞数は同等であった。この事から、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事が予想された。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、定量RT-PCRにより自由摂食時と絶食時と比較解析を行なった。その結果、自由摂食時の発現と比較すると、主にB細胞のケモタキシスを誘導する3種類のケモカイン産生が絶食によって低下することが明らかとなったことから、パイエル板ストローマ細胞のケモカイン産生能が、栄養シグナルによって変化していると考えられた。さらに再摂食時のリンパ球の動態を詳細に調べた結果、絶食時の細胞数の減少はアポトーシスにはよらないこと、B細胞の減少が顕著であることが明らかになった。さらに、再摂食によって、パイエル板の総細胞数及びナイーブB細胞数は自由摂食時レベルに戻るが、IgA陽性B細胞や、胚中心B細胞の数は再摂食後108時間経過しても回復しないことが分かった。これらの結果から、1) 絶食により、パイエル板におけるケモカインの産生が低下するため、主にB細胞がパイエル板から流出する。2) 絶食-再摂食により、パイエル板B細胞はナイーブB細胞に置き換わり、パイエル板リンパ球のrenewalが起こることが明らかとなった。これらの成果は現在投稿準備中である。

肥満の影響については、高脂肪食摂取マウスの消化管組織を観察した結果、形態的に明らかな変化が胃に見られた。20~30%の頻度で粘液産生細胞の胃粘膜における配置異常が認められ、その一部は経口抗生剤による細菌叢除去の影響を受けることがわかった。癌の疫学的リスク要因を考慮しアルコール投与を加えたが、胃・食道の表層性の急性炎症誘導にとどまった。塩酸+胆汁酸の飲水内投与でも高脂肪食で誘導される変化の程度や頻度は亢進しなかった。従って、肥満における細胞動態・分化能の異常においてこれらは重要な因子ではないと考えられる。これらの結果に基づき、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調べた。その結果、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。血清中の炎症性サイトカイン濃度を測定したが、この病理学的変化と関連するサイトカインは

見出されなかった。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、フレューダイン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。また、高脂肪食摂取マウスで発現が上昇していた遺伝子の一部はヒトの食道胃接合部癌でも高発現していることを免疫組織染色で確認した。さらに高脂肪食摂取マウスの胃粘膜病変の電顕観察を行い、壁細胞にミトコンドリア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。このため、胃内容物中の脂質及び胆汁酸組成の解析を行った。その結果、高脂肪食摂取マウスの胃内には、食事由来のトリグリセリド及びfree fatty acidが存在しており、マウスが肥満となるにつれてその含量が増加していた。更に、胃内容物から胆汁酸も検出されたことから、肥満マウスの胃内には十二指腸液が逆流しており、そこに含まれるリパーゼや胆汁酸その他の消化酵素の作用によりfree fatty acidが増加し、これがミトコンドリアに富む壁細胞において脂質毒性を発揮したと考えられた。この仮説に基づき、分離した胃粘膜上皮細胞の一次培養系及び壁細胞を含む胃オルガノイドの三次元培養系に、種々のfree fatty acidを加えた所、特に不飽和脂肪酸によって、壁細胞にミトコンドリア機能障害に引き続く細胞死が誘導された。そこで、高脂肪食のラードをリノール酸（不飽和脂肪酸）またはステアリン酸（飽和脂肪酸）に置き換えた餌を作製し、マウスに19週摂食させた結果、リノール酸食投与群では胃体部metaplasia が90%(9/10)のマウスに誘導されたのに対し、ステアリン酸食投与群では20%(2/10)であった。以上の結果より、本実験系では高脂肪食に含まれる脂質より胃内で遊離脂肪酸が生成し、肥満がさらにそれを促進し、壁細胞に対して細胞傷害をもたらした結果、前癌病変/metaplasiaの形成に至ったと結論づけた。現在、欧米では食道腺癌、食道・胃接合部癌、胃体部癌が急増しており、肥満との相関が指摘されている。本研究により我々は、このような上部消化管に発生する癌について、食物そのものが粘膜上皮細胞の分化・増殖に影響を及ぼす可能性を新たに示した。この成果の一部は2015年11月に開催された日本免疫学会（平田有基、瀬崎拓人、土肥多恵子、河村由紀）および2016年11月に開催された日本消化器関連学会週間JDDWにて報告を行い（平田有基ほか、高脂肪食が引き起こすマウス上部消化管病変）、後者では優秀演題（570演題中top 2.5%）に選ばれた。また、論文としてまとめてJ. Gastroenterologyに投稿し、受理された（doi: 10.1007/s00535-016-1291-0）。

ヒト検体を用いた検討については、ヒトIBD検体を用いて施行したトランスクリプトーム解析、網羅的エピゲノム解析の結果を用い、バイオインフォマティクス解析を施行した。絞り込み条件を変えて詳細に検討した結果、IBD特異的エピゲノム変化を抽出した。さらに遺伝子発現プロファイルとプロモーター領域のエピゲノム修飾との統合解析を試みたが、特にDNAメチル化解析結果とIBD特異的遺伝子発現には一致が見られず、IBD特異的エピゲノム変化は遺伝子発現に変化を及ぼさないことが明らかとなった。これらの成果をまとめて現在投稿準備中である。

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 a previous study, we showed that fasting-refeeding in mice induces transient hyperproliferation of colonic epithelial cells, which is dependent on the lactate produced as a metabolite of commensal bacteria (Okada T, *et. al. Nat Commun*, **4**, 1654, 2013). In this project, we attempted to manipulate colonic epithelial cell turnover with intermittent fasting to prompt recovery from acute colitis. Acute colitis was induced in mice by administration of 2% dextran sulfate sodium in the drinking water for 5 days. From day 6, mice were fasted for 36 h and refed with normal diet (CE2), glucose powder, or lactylated high-amylose starch. On day 9, mice refed with CE-2 showed a trend to gain more body weight than other groups, but this difference was not statistically significant. Histologically, the fasting group (refed CE-2) showed higher numbers of regenerating crypts. When expression of inflammatory cytokines was evaluated at mRNA levels, the fasting group showed dramatically decreased levels of IL-1 β and IL-17. The fasting group (refed glucose) showed lower levels of these cytokines compared with the *ad libitum*-fed group but this did not reach statistical significance. In contrast, TNF- α levels did not change. These results indicated that intermittent fasting suppressed the crypt loss as well as inflammatory cytokines. Based on our previous result, we next investigated whether increase in intracolonic lactate is beneficial to reduce colitis. For this purpose, an enema of lactate, acetate, or butyrate was performed in the mice refed with glucose. Intrarectal administration of lactate or butyrate, but not acetate, induced crypt regeneration, suggesting that fasting followed by the high concentration of lactate in the colon induced a beneficial effect in the resolution phase of DSS colitis (Okada T, *et. al. J Clin Biochemistry & Nutrition*, in press).

In this project, we also 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. We found that the level of some chemokines related to B cell retention 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 (Nagai M, *et. al.*, in preparation for submission).

Researchers には、分担研究者を記載する。

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. We performed blood biochemical tests and measured cytokine levels, but there was no significant difference between mice developed macroscopically distinct metaplastic lesions in stomach and mice without macroscopically distinct lesion. To characterise further this metaplastic patchy lesion, we purified HK-ATPase-negative non-parietal cells from the gastric corpus by flow cytometry and performed RT-PCR with single epithelial cells by using Fluidigm single cell analysis system (C1 and Biomark). In total, we analyzed 93 genes from 165 control cells and 156 cells isolated from metaplastic lesion of HFD-fed mice. Evidently, different patterns of gene expression between the control mucosa and the metaplastic lesion were revealed. In the control mucosa, differentiated cell types were easily identified, which included Muc5ac (gastric type mucin)-positive epithelial cells, Pgc (pepsinogen)-positive chief cells, Hdc (histidine decarboxylase)-positive enterochromaffin-like cells, a few Atp4a and Atp4b (HK-ATPase subunit)-positive parietal cells, and Gif (gastric intrinsic factor)-positive cells. In sharp contrast, the cells isolated from metaplastic lesion were almost homogenous. The majority of them expressed Pigr, Gkn3, Vil1, Wfdc2, PCNA, and CD44, all of which were difficult to detect in any cells from the normal mucosa. In addition, the majority of cells isolated from metaplastic lesion strongly expressed Tff2, Tff1, Muc6, and Pgc. A few of them, but none of the control cells, expressed the stem-cell marker Lgr5. These results indicated that metaplastic cells that ectopically expressed genes normally expressed by enterocytes and stem/progenitor cells with proliferation potential replaced most of the epithelial cells in the metaplastic lesion of HFD-fed mice and this lesion was similar to previously reported precancerous lesion, spasmolytic polypeptide expressing metaplasia (SPEM). Immunohistology confirmed the enhanced expression of metaplastic-specific proteins such as VIL1, PIGR, and GKN3 in surgically resected human gastric adenocarcinoma as compared with background mucosa. To further characterize the changes in the stomachs of HFD-fed mice, we performed morphological analysis using electron microscopy. In control mice, the gastric corpus pits were mostly occupied by parietal cells containing cytoplasmic tubulovesicles and numerous mitochondria. In contrast, HFD-fed mice displayed a decrease in the frequency of parietal cells in the corpus mucosa. Furthermore, the parietal cells of HFD-fed mice, but not those of the control mice, contained abnormal mitochondria with dense crystalline inclusions. These pathological changes suggest the presence of mitochondrial stress in HFD-fed parietal cells. To investigate the possibility that components of the diet are toxic to gastric parietal cells, we compared the composition of the HFD with the gastric contents of the HFD-fed mice. We measured triacylglycerides (TGs), FFAs, and bile acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). FFAs were present with the reflux of duodenal juice in the stomachs of HFD-fed mice, and their levels increased as the mice became obese. Bile acids, which were not detected in the HFD, were detected in the stomachs of HFD-fed mice. In addition, the higher concentrations of TGs were detected in obese mice. These results indicate that FFAs are liberated from TGs in the gastric lumen of HFD-fed mice, possibly causing stress signal from the mucosal surface. To test whether FFAs affected cell viability *in vitro*, we isolated epithelial cells from the gastric corpus mucosa by flow cytometry and performed short culture with a mixture of fatty acids that mimics the fatty acid composition of the HFD. The addition of a concentrated mixed fatty acid solution to the culture medium induced

parietal cell death in a dose-dependent manner. Among the individual fatty acids examined, linoleic acid and oleic acid decreased cell viability more than stearic acid and palmitic acid. These results indicated that unsaturated FFAs are more toxic than saturated ones to gastric epithelial cells. Based on this *in vitro* result, we performed *in vivo* study feeding linoleic acid-rich diet and stearic acid-rich one. After 19 weeks, nine out of 10 mice on the linoleic acid-rich diet developed macroscopically distinct metaplastic lesions. In contrast, increased mucin was seen only in two out of 10 mice on the stearic acid-rich diet. These results supported the notion that free linoleic acid derived from the diet facilitated the development of metaplasia (Hirata Y, *et. al. J Gastroenterology*, doi:10.1007/s00535-016-1291-0, 2016).

Using mucosal tissue samples from IBD patients, we have done global study of gene expression and epigenetic changes and have integrated these data to find out the nutritional stimuli-inducing signaling pathway related to gastrointestinal inflammation. Bioinformatics analysis identified IBD-specific patterns of histone modifications and DNA methylation.

26指110: 摂食応答を標的とした消化管炎症の制御法の開発研究

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

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

平成28年度

絶食-再摂食により変化するケモカインを同定、細胞の解析から絶食によるパイエル板細胞のリニューアル機構を発見

絶食で増加する短鎖脂肪酸が上皮細胞修復を促進する

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。一部には常在菌の関与も見られた

肥満マウスで胃粘膜前癌病変を見出し、遺伝子発現などを詳細に検討

食餌性の遊離脂肪酸が、ミトコンドリアに富む壁細胞に対して脂質毒性を発揮し、細胞傷害をもたらす→前癌病変の新規発生機構

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

炎症性腸疾患特異的エピゲノム変化を抽出した

エピゲノム変化は炎症性腸疾患特異的遺伝子発現には関連しない

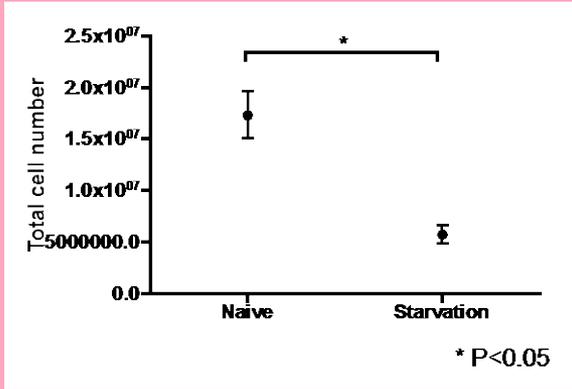
D. 新規標的分子のヒト検体を用いた検証ならびに機能・メカニズム解析

手術標本、生検、血清検体の収集

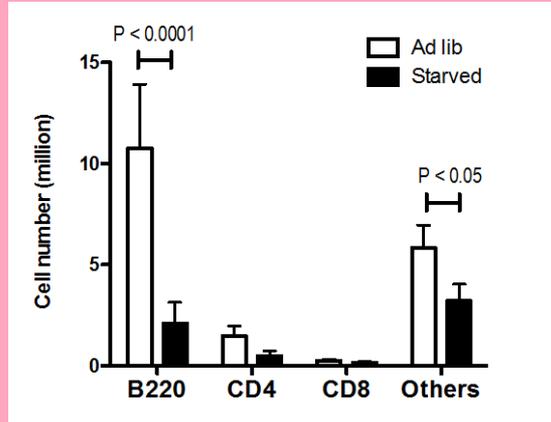
マウスモデルで見出された消化管粘膜における細胞増殖亢進、metaplastic cellsで発現亢進していた遺伝子発現が、ヒト検体でも認められることを確認した

栄養シグナルによる粘膜免疫制御

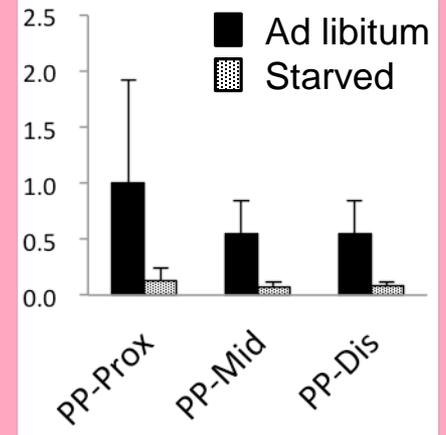
絶食-再摂食によるパイエル板内細胞数の変化



絶食-再摂食によるパイエル板内細胞の変化



絶食によるパイエル板におけるケモカイン発現の低下



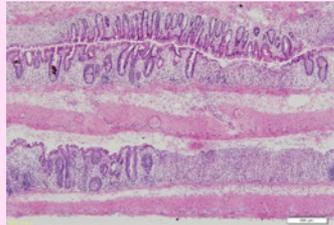
- 絶食により主にB細胞がパイエル板から流出する
- 絶食によるパイエル板からのB細胞流出は、パイエル板におけるケモカイン産生の低下による

- 消化管二次リンパ組織であるパイエル板の細胞数は、管腔内の栄養源からのシグナルに依存することを説明（投稿準備中）
- 絶食-再摂食によるパイエル板リンパ球renewalにより病態を修飾可能か

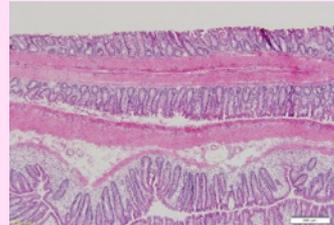
炎症性腸疾患における栄養シグナル

絶食による大腸炎の軽減

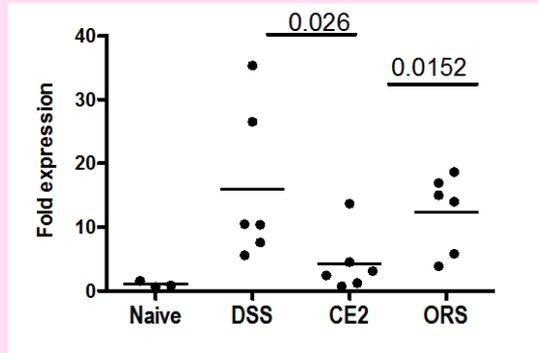
自由摂食



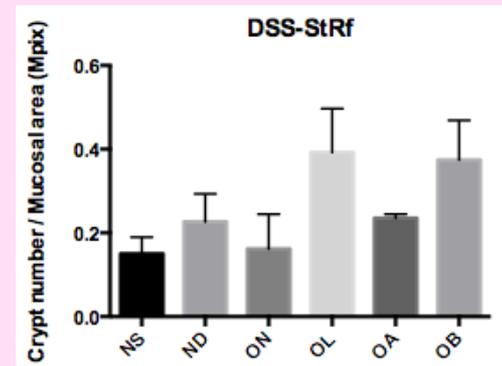
絶食期間有り



栄養シグナル依存性のサイトカイン産生減少



上皮修復への有機酸の関与



- 絶食による炎症シグナルの低下による炎症抑制
- 絶食一摂食時の上皮細胞増殖による修復の更新

- 消化管急性炎症の特定の時期に間欠的絶食期間を設けることで、腸炎からの回復を促進することを明らかにした (J Clin Biochemistry and Nutritionに論文報告済み)
- 絶食後の乳酸、酪酸の注腸により腸炎を改善可能か

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。

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た結果、形態的に明らかな変化が見られるのは胃であることがわかった。すなわち、高脂肪食摂取マウスでは、20～30%の頻度で粘液産生細胞の胃粘膜における配置異常が認められた。高脂肪食摂取マウスにさらに抗生剤を経口投与することで細菌叢除去を行ったところ、高脂肪食摂取による粘液産生細胞の配置異常は細菌叢除去の影響を受けることが明らかとなった。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、食道・胃粘膜の変化を組織学的に解析した。アルコール投与では胃・食道の表層性の急性炎症誘導にとどまった。また、塩酸+胆汁酸の飲水内投与においても高脂肪食で誘導される変化の程度や頻度は亢進しなかった。従って、肥満における細胞動態・分化能の異常においてこれらは重要な因子ではないと考えられる。これらの結果に基づき、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調べた。その結果、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。血清中の炎症性サイトカイン濃度を測定したが、この病理学的変化と相関するサイトカインは見出されなかった。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、フリユイタイム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。また、高脂肪食摂取マウスで発現が上昇していた遺伝子の一部はヒトの食道胃接合部癌でも高発現していることを免疫組織染色で確認した。さらに高脂肪食摂取マウスの胃粘膜病変の電顕観察を行い、壁細胞にミトコンドリア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。このため、胃内容物中の脂質及び胆汁酸組成の解析を行った。その結果、高脂肪食摂取マウスの胃内には、食事由来のトリグリセリド及びfree fatty acidが存在しており、マウスが肥満となるにつれてその含量が増加していた。更に、胃内容物から胆汁酸も検出されたことから、肥満マウスの胃内には十二指腸液が逆流しており、そこに含まれるリパーゼや胆汁酸その他の消化酵素の作用によりfree fatty acidが増加し、これがミトコンドリアに富む壁細胞において脂質毒性を発揮したと考えられた。この仮説に基づき、分離した胃粘膜上皮細胞の一次培養系及び壁細胞を含む胃オルガノイドの三次元培養系に、種々のfree fatty acidを加えた所、特に不飽和脂肪酸によって、壁細胞にミトコンドリア機能障害に引き続く細胞死が誘導された。そこで、高脂肪食のラードをリノール酸（不飽和脂肪酸）またはステアリン酸（飽和脂肪酸）に置き換えた餌を作製し、マウスに19週摂食させた結果、リノール酸食投与群では胃体部metaplasia が90%(9/10)のマウスに誘導されたのに対し、ステアリン酸食投与群では20%(2/10)であった。以上の結果より、本実験系では高脂肪食に含まれる脂質より胃内で遊離脂肪酸が生成し、肥満がさらにそれを促進し、壁細胞に対して細胞傷害をもたらした結果、前癌病変/metaplasiaの形成に至ったと結論づけた。現在、欧米では食道腺癌、食道・胃接合部癌、胃体部癌が急増しており、肥満との相関が指摘されている。本研究により我々は、このような上部消化管に発生する癌について、食物そのものが粘膜上皮細胞の分化・増殖に影響を及ぼす可能性を新たに示した。この成果の一部は2015年11月に開催された日本免疫学会および2016年11月に開催された日本消化器関連学会週間JDDWにて報告を行い、後者では優秀演題（570演題中top 2.5%）に選ばれた。また、論文としてまとめてJ. Gastroenterologyに投稿し、受理された（doi: 10.1007/s00535-016-1291-0）。

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。そこで本研究ではマウスに絶食-再摂食などの摂食状態の変化を起こすモデルを用いることで、栄養関連シグナルが消化管粘膜免疫系に及ぼす影響を詳細に解析した。

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た。腸管関連リンパ組織としては小腸のパイエル板（小腸の部位別に採取）、盲腸のcecal patchおよびリンパ濾胞を採取し、その細胞数を算定するとともに、フローサイトメトリーにより細胞構成を解析した。その結果、36時間の絶食後に細胞数は約半数から30%程度まで減少することが明らかとなった。小腸を長軸方向に3等分した部位別に見ると、中間部に存在するパイエル板における細胞の減少が最も顕著であった。一方で、Cecal patchおよびcecal follicleの大きさは絶食後に増大していた。盲腸管腔内の環境はもともと食物由来の栄養素に乏しく、腸内細菌とその代謝産物で占められることを考慮すると、パイエル板、cecal patchなどの消化管二次リンパ組織の細胞数が、管腔内の栄養源からのシグナルに依存することを示唆していると考えられる。細胞構成の変化としては、小腸下部に存在するパイエル板において、絶食によりB細胞の減少が認められた。組織学的には濾胞の扁平化と、CD11c⁺樹状細胞の局在変化も観察された。続いて、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。これら免疫担当細胞分布の変化は炎症反応にも大きく影響すると予測される。そこで、パイエル板からの細胞の減少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からパイエル板、cecal patch、腸間膜リンパ節を採取し、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。また、絶食中と再摂食中のドナー由来のパイエル板細胞にそれぞれ異なる蛍光ラベルを施し、1：1の割合で混合して自由摂食中のレシピエントマウスに移植しても、ホーミングする細胞数は同等であった。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、定量RT-PCRにより自由摂食時と絶食時で比較解析を行った。その結果、自由摂食時の発現と比較すると、主にB細胞のケモタキシスを誘導する3種類のケモカイン産生が絶食によって低下することが明らかとなったことから、パイエル板ストローマ細胞のケモカイン産生能が、栄養シグナルによって変化していると考えられた。さらに再摂食時のリンパ球の動態を詳細に調べた結果、絶食時の細胞数の減少はアポトーシスにはよらないこと、B細胞の減少が顕著であることが明らかになった。また、再摂食によって、パイエル板の総細胞数及びナイーブB細胞数は自由摂食時レベルに戻るが、IgA陽性B細胞や、胚中心B細胞の数は再摂食後108時間経過しても回復しないことが分かった。これらの結果から、1) 絶食により、パイエル板におけるケモカインの産生が低下するため、主にB細胞がパイエル板から流出する。2) 絶食-再摂食により、パイエル板B細胞はナイーブB細胞に置き換わり、パイエル板リンパ球のrenewalが起こることが明らかとなった。これらの成果は現在投稿準備中である。

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
Intermittent fasting prompted recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in mice	Okada, T., Otsubo, T., Hagiwara, T., Inazuka, F., Kobayashi, E., Fukuda, S., Inoue, T., Higuchi, K., Kawamura, Y. I., Dohi, T.	J Clin Biochemistry and Nutrition	in press	2017
Fatty acids in high-fat diet potentially induce gastric parietal-cell damage and metaplasia in mice	Hirata Y, Sezaki T, Tamura- Nakano M, Oyama C, Hagiwara T, Ishikawa T, Sezaki T, Fukuda S, Yamada K, Higuchi K, Dohi T, Kawamura YI.	J Gastroenterology	doi: 10.1007/s00535- 016-1291-0	2016
Induction of IFN13 as an additional effect of nucleotide, not nucleoside, analogues: a new potential target for HBV infection	Murata K, Asano M, Matsumoto A, Sugiyama S, Nishida N, Tanaka E, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N, Shirasaki T, Honda M, Kaneko S, Gatanaga H, Oka S, Kawamura YI, Dohi T, Syuno Y, Yano H, Mizokami M.	Gut	doi: 10.1136/gutjnl- 2016-312653	2016
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

研究発表及び特許取得報告について

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
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
The epigenetic regulator Uhrf1 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
Human thymoproteasome variations influence CD8 T cell selection	Nitta T, Kochi Y, Muro R, Tomofuji Y, Okamura T, Murata S, Suzuki H, Sumida T, Yamamoto K, Takayanagi H.	Science Immunol	in press	2017
T cell activation RhoGTPase-activating protein (TAGAP) plays an important role in TH17 cell differentiation	Tamehiro N, Nishida K, Yanabu-Takanashi R, Goto M, Okamura T, Suzuki H.	Immunol Cell Biol	doi:10.1038	2017

研究発表及び特許取得報告について

A histone methyltransferase ESET is critical for T cell development	Takikita S, Muro R, Takai T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Oda H, Kitajima M, Oshima K, Hattori M, Endo TA, Toyoda T, Weis J, Shinkai Y, Suzuki H.	J Immunol	197	2016
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
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	9	2014
IL-10 production in murine IgM+CD138hi cells is driven by Blimp-1 and downregulated in class-switched cells	Suzuki-Yamazaki N, Yanobu-Takanashi R, Okamura T, Takaki S.	Eur J Immunol	47	2017
Specific disruption of Lnk in murine endothelial progenitor cells promotes dermal wound healing via enhanced vasculogenesis, activation of myofibroblasts, and suppression of inflammatory cell recruitment	Lee JH, Ji ST, Kim J, Takaki S, Asahara T, Hong YJ, Kwon SM.	Stem Cell Res Ther	7	2016

研究発表及び特許取得報告について

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
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
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 $\alpha\text{v}\beta\text{3}$	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

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
高脂肪食が引き起こすマウス上部消化管病変	平田 有基、瀬崎 拓人、樋口 和 秀、河村 由紀、 土肥 多恵子.	第58回日本消化器 病学会大会 (ワーク ショップ)	神戸	2016年11月

研究発表及び特許取得報告について

デスモゾーム関連分子であるperiplakinの発現は予後不良因子になる。-DNAメチル化と免疫染色での検討-	山田 和彦、河村由紀、萩原 輝記、土肥 多恵子、山田 純、野原 京子、山下智、橋本 政典、矢野 秀朗。	第71回日本消化器外科学会	徳島	2016年7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、斉藤幸雄、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
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
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
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

研究発表及び特許取得報告について

Aberrant DNA methylation of a desmosome-related molecule in esophageal squamous cell carcinoma	Hagiwara T, Otsubo T, Tamura-Nakano M, Yamada K, Hinohara C, Miyake O, Shimizu T, Dohi T, Kawamura YI.	第87回日本生化学会大会	京都	2014年9月
The distinct roles of proximal TCR kinase regulate gdT cell development	Muro R, Nitta T, Takayanagi H, Suzuki H.	第45回 日本免疫学会学術集会	那覇	2016年12月
NAD(P)H:quinone oxidoreductase (Nqo1) regulates irritant contact dermatitis through homeostasis of epidermal gd T cells	Kitajima M, Kimura A, Suzuki H.	第45回 日本免疫学会学術集会	那覇	2016年12月
Differential requirement of ZAP/Syk kinases for the early development of gdT cells in the thymus	Muro R, Nitta T, Tamehiro N, Oda H, Kitajima M, Takayanagi H, Suzuki H.	ThymUS2016	Hawaii	2016年6月
The critical roles of RhoH for development of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cell	Muro R, Nitta T, Tamehiro N, Oda H, Takayanagi H, Suzuki H.	Gamma/Delta T Cell Conference	London, UK	2016年6月
Irritant contact dermatitis is regulated by antioxidative enzyme NAD(P)H:quinone oxidoreductase (Nqo1)	Kitajima M, Kimura A, Suzuki H.	AAI Meeting	Seattle, USA	2016年5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
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

研究発表及び特許取得報告について

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
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
Themis regulates cytokine production in mature naïve T cells	Okada T, Nitta T, Oda H, Tamehiro N, Patrick MS, Suzuki H.	7th ThymOZ meeting	Helon Island, Australia	2014年4月
IL-10 derived from IgM+CD138hi cells support the antigen-specific antibody production	Yamazaki N, Takaki S.	第45回 日本免疫学会学術集会	宜野湾	2016年12月
Lnk/Sh2b3, an autoimmune disease-associated gene, prevents adipose tissue inflammation by controlling IL-15-dependent cell functions	Mori T, Yamazaki N, Takaki S.	第45回 日本免疫学会学術集会	宜野湾	2016年12月
Chronic IL-33 treatment results in pulmonary arterial hypertrophy mediated by ILC2s and eosinophils.	Ikutani M, Tsuneyama K, Kudo F, Takatsu K, Takaki S.	第45回 日本免疫学会学術集会	宜野湾	2016年12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.	The 16th International Congress of Immunology.	Melborne, Australia	2016年8月
Interferon- γ negatively regulates cytokine production of group 2 innate lymphoid cells	Kudo F, Takaki S.	The 16th International Congress of Immunology.	Melborne, Australia	2016年8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
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

研究発表及び特許取得報告について

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
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

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