

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、免疫担当細胞、エピゲノム、TNF、シグナル伝達、メタボローム

研究成果 :

本研究は、炎症性腸疾患 (IBD) 患者およびマウス腸炎モデルで、局所の遺伝子発現・エピゲノム修飾の網羅的解析により得られたデータにメタボローム解析を加えて、全ての結果を治療抵抗性という観点から再解析し、標的となる分子やエピゲノム修飾、代謝経路を見いだす。その成果を基に難治症例に対する治療法を開発することを目的とする。

IBD に対する、様々な生物製剤や化合物による治験が行われてきたが、現状では、有効ではあっても既存の抗 TNF 抗体の寛解導入率を越えるものが見いだされていない。その抗 TNF 抗体にも抵抗性を示す症例が存在し、治療の過程でも有効性が次第に失われることが問題となっている。一方、消化管では、一旦粘膜障害が起こりバリアが傷害されると腸内細菌叢由来物質による自然免疫刺激が持続し、これが腸内細菌に由来する抗原物質に対する獲得免疫応答を遷延化・増悪するために、炎症が持続し、粘膜治癒が得られないことが治療抵抗性の大きな因子と考えられる。一方、代謝経路の変化は腸炎の病態と深く関わり、UC 粘膜で報告のあるアミノ酸低栄養は上皮再生障害や菌叢変化をもたらし、炎症を増悪する。さらにエピゲノム修飾は細胞や細菌の代謝産物である有機酸がトリガーとなる。そこで、粘膜免疫、粘膜修復、メタボロームの各面から IBD 粘膜の病的変化を評価することが必要である。

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く、治療抵抗性克服のための標的の探索

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。

潰瘍性大腸炎手術症例の病変部粘膜、大腸がん摘出症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た。これらについて、Avadis NGS ソフトウェアを用い我々の手で大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。しかし、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な状態であり、この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解析委託を行っている。

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。

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、予想される相加以上の効果を持つことが明らかとなった。そのメカニズム解析のために、マイクロアレイによる遺伝子発現解析も行い詳しい解析中である。この結果により、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が明らかとなった。

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

解析を行う共同研究先の神戸大学では、潰瘍性大腸炎と診断された患者から、生検によって得られた組織(非炎症部位と炎症部位のペアサンプル)及び血清メタボローム解析を開始している。これまでに 20 mg の生検組織由来の組織ホモジネートおよび血清 0.05mL から液液抽出により低分子を得て、Gas chromatography-Mass Spectrometry (GCMS-QP2010plus)を用いて、アミノ酸及び TCA サイクル関連代謝産物などの定量を行う系を確立した。現在、まず臨床的寛解状態にある患者と健常人とを比較する目的で症例を集積している。

C. 治療抵抗性克服のための標的候補項目の検証

本年度は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、症例集積を開始している。検体提供先および共同研究先施設での承認を得て、症例集積を開始している。

Subject No. : 25-104

Title : Pathophysiology of treatment-resistant inflammatory bowel diseases

Researchers : Taeko Dohi, Harumi Suzuki, Satoshi Takaki

Key word : Inflammatory Bowel Diseases, Immune cell, Epigenetics, tumor necrosis factor, signal transduction, metabolome

Abstract :

The aim of this project is to find out the pathways related to the pathophysiology of treatment-resistant inflammatory bowel disease (IBD) by means of in silico integrated analysis of global gene expression analysis, epigenetic analysis as well as metabolome analysis of local mucosa, and eventually to apply the result to the development of remedies against treatment-resistant diseases.

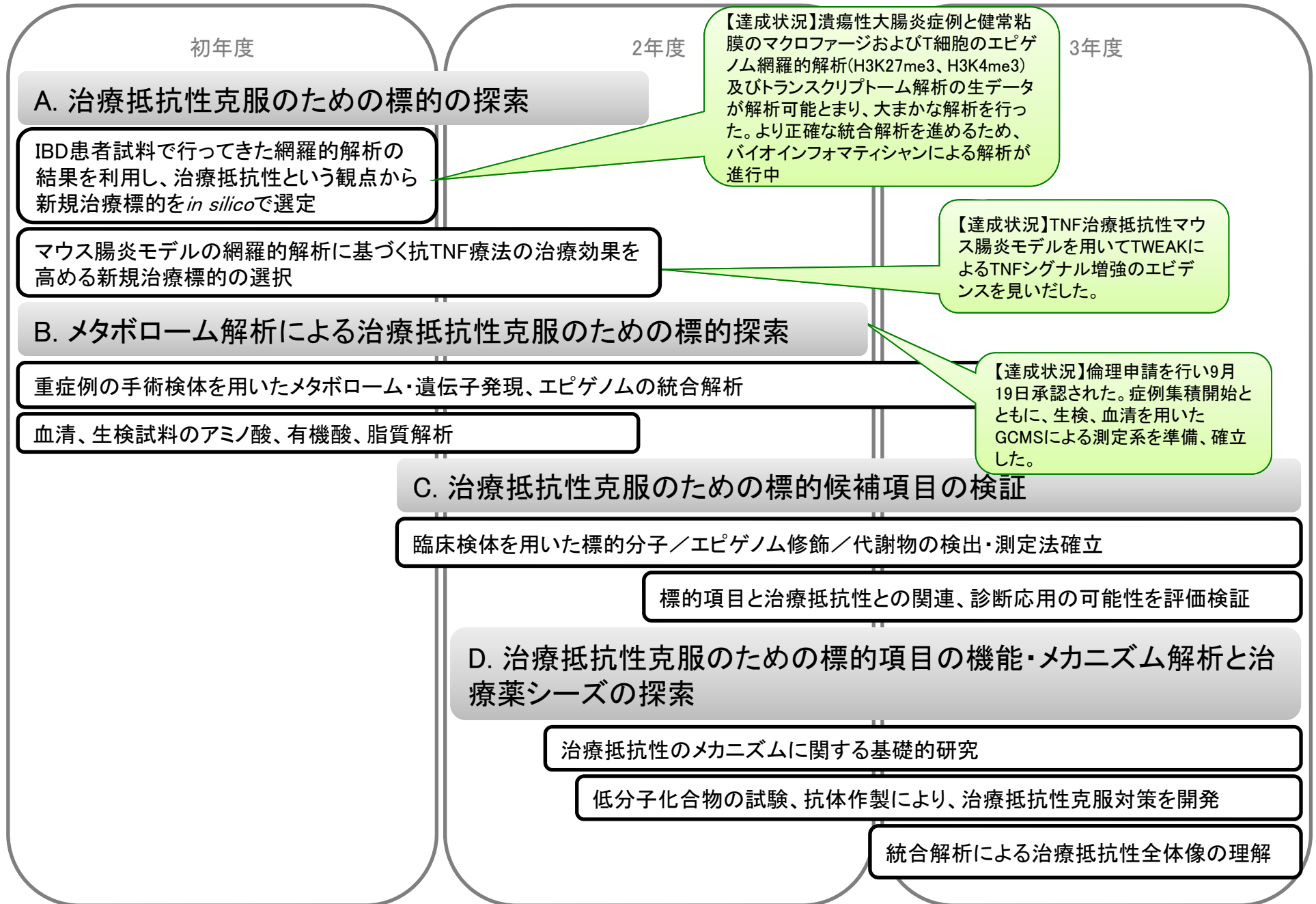
Anti-TNF- α biological has been major progress in the treatment of IBD. However, there is a population of patient who do not respond to anti-TNF- α biological, and even initial responders tend to need higher dose and frequency and become resistant in the course of treatment. To our knowledge, there is no other therapy that is superior to anti-TNF- α therapies, even if they have significant effectiveness. In case of ulcerative colitis, steroid-resistant/ dependent cases are difficult to control. In the intestinal tract, inappropriate innate immunity against microbiota has been reported to be the major factor of disease perpetuation. Further, changes in metabolic condition affects the epithelial repair and microbiota composition to aggravate inflammation. Therefore, understanding the IBD pathophysiology in the aspects of gene expression, epigenetic and metabolic changes are necessary.

We established a method to purify DC/macrophages and T cells from surgically resected colon mucosa of patients with IBD or colon cancer. Lamina propria cells were obtained and CD33+Epcam- CD3- cells (DC/macrophages) and CD33-CD3+Epcam- cells (T cells) were purified with flow cytometry. Cells were subjected to global analysis including ChIP-seq using anti-H3K4me3 and anti-H3K27me3 antibodies, serial analysis of gene expression (SAGE)-seq, Methylation analysis (MeDIP). As a result, we found that increase of double marked gene with both H3K4me3 and H3K27me3 in ulcerative colitis mucosa, which suggest the pathological epigenetic modification is one of the feature of IBD mucosa. Integrated analysis of gene expression, histone modification and DNA methylation is now in progress with the help of experts of bioinformatics.

We also searched the pathways, which support and enhance the downstream of TNF- α for continuous efficacy of anti-TNF treatment. Previously we found that a TNF superfamily molecule, TWEAK and its receptor Fn14, is highly expressed in the inflamed IBD mucosa, and plays significant role in the perpetuation and aggravation of mouse colitis model. In this study, mouse colitis was treated with suboptimal dose of TNF inhibitor or anti-TWEAK antibody, or their combination. In contrast to that each monotherapy showed minimal beneficial effect, combination treatment resulted in the dramatic reduction of inflammation and tissue damage. These results indicated that TWEAK pathway is a potent enhancer of TNF induced tissue damage. To know the mechanism in detail, global gene expression analysis has now performed.

For metabolome analysis, we established a method using 20 mg tissue or 0.05 ml of serum to analyze amino acid and metabolites of TCA-cycle with a Gas chromatography-Mass Spectrometry. We obtained permission from the ethics committee to integrate metabolome analysis to our IBD project. Now recruitment of cases has started.

Researchers には、分担研究者を記載する。



方法と結果の流れ図

申請者らがIBD患者試料及びマウスモデルで行ってきた網羅的解析結果

メタボローム解析を実施
神戸大学のデータとも統合

初年度の成果

epigenome網羅的解析及びトランスクリプトーム解析統合解析

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

GC-MSによる測定系の確立と症例の集積開始

H3K4me3+H3K27me3のいわゆる二価修飾と疾患との関連

倫理審査の申請、承認を得た

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

より正確な統合解析を進めるために、バイオインフォマティクスによる解析を進めている

次年度以降の計画

統合解析により治療抵抗性克服のための標的を選別 → 検出・測定法を確立

症例収集、標的候補の検証とメカニズム解析

治療抵抗性を示す症例の生検、末梢血標本の収集、候補項目の測定

治療抵抗性との関連、応用の可能性を評価検証

メカニズム解明のための *in vitro*, *in vivo* 基礎研究

治療薬シーズの探索

低分子化合物ライブラリーの試験、抗体作製により、治療抵抗性克服対策を開発

統合解析による治療抵抗性メカニズムの全体像の理解

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 : TNF、シグナル伝達
研究成果 :

抗TNF- α 抗体療法の導入により一時的寛解の得られるIBD患者数は増加した。しかし寛解例の大半も、長期持続投与の後には治療応答性を失ってゆくことが多い。これは抗TNF- α 抗体の血中濃度が維持されないことによるとされている。このことから、IBD治療のための新規標的の探索に加えて、TNF- α 作用の増幅・持続機構を標的とする治療の開発が治療抵抗性克服のために重要かつ現実的なアプローチであるといえる。主任研究者の土肥らは上皮細胞において、TNFスーパーファミリー分子TWEAKとその受容体Fn14による、TNFによる細胞死シグナルが増幅されることを見いだしており、本研究ではこれを重要な手がかりとして研究を進めた。

ハプテンであるトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)をマウス大腸内に投与すると、急性腸炎を誘導することができる。この急性腸炎はTNF- α の中和によって予防出来ることが既にわかっていたので、抗炎症効果がほとんど見られないsuboptimal doseのTNF中和剤を使用することで、血中の抗TNF- α 抗体の減少による治療応答性の低下を再現するモデルとした。抗TWEAK抗体投与によるTNBS腸炎抑制効果は、BALB/cマウスでは明確に認められるが、C57BL/6マウスでは、同じ投与量でも腸炎抑制効果が比較的弱い。これを利用し、TNF中和剤と抗TWEAK抗体を併用投与したときの効果を調べた。その結果、TNF中和剤の単独投与では、組織学的炎症スコアの改善傾向があったが、体重減少や潰瘍形成にほとんど影響が見られなかった。また、抗TWEAK抗体投与では潰瘍面積にやや改善が認められたが、体重や組織学的変化には効果が認められなかった。一方、TNF中和剤と抗TWEAK抗体併用によって、体重減少は著しく抑制され、腸管長、潰瘍面積、肉眼および組織学的所見にも優位差をもって改善が見られた。すなわち、併用によって、予想された相加効果以上の抗炎症効果がえられることが明らかとなった。そのメカニズム解析のために、TNF中和剤と抗TWEAK抗体を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ところ、同じ投与量のTNF, 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。すなわち、腸炎モデルに置いても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が得られた。遺伝子発現やシグナル経路をさらに詳しく調べ、このメカニズム解析を進めている。

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、免疫担当細胞、
研究成果 :

抗TNF- α 抗体療法の導入により一時的寛解の得られる炎症性腸疾患(IBD)患者数は増加した。しかし寛解例の大半も、長期持続投与の後には治療応答性を失ってゆくことが多い。この対策としてT細胞活性化に関わる免疫関連分子を標的とした新薬開発が世界的に試みられ、様々な生物製剤や化合物による治験が行われてきたが、現状では、有効ではあっても既存の抗TNF抗体の寛解導入率を越えるものが見いだされていない。一方、腸管内容は細菌叢で満たされているため、一旦粘膜障害が起こり、バリア能が傷害されると管腔からの菌叢由来物質による自然免疫刺激が持続し、これが腸内細菌に由来する抗原物質に対する獲得免疫応答を遷延化・増悪するために、炎症が持続し、粘膜治癒が得られないことが治療抵抗性の大きな因子となっていると考えられる。すなわち、自然免疫、獲得免疫の両面から炎症細胞機能の病的変化を評価することが必要である。そこで、本研究においては、炎症性腸疾患重症例における病変部粘膜の次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析を開始した。

IBD症例の手術摘出大腸粘膜の病変部および非IBD手術摘出大腸粘膜の肉眼的正常粘膜を採取し、EDTAおよびコラゲナーゼ処理によって粘膜固有層細胞分画を得た。細胞種を確実に規定することが必要と考え、粘膜固有層細胞分画よりフローサイトメトリー(MoFlo, Beckman Coulter, Inc)を用いてEpCAM陽性の上皮細胞を除き、自然免疫を担当する樹状細胞/マクロファージ分画であるCD33⁺細胞、獲得免疫を担当するCD3⁺T細胞を分離精製した。それぞれの分画よりRNAを抽出し、serial analysis of gene expression (SAGE)-Seqによりトランスクリプトーム解析を行った(SOLiD4およびSoLiD5500)。シーケンスの生データからAvadis NGS ソフトウェアを用いて、IBD及び非IBD細胞の大まかな比較解析を行い変化のある遺伝子群を抽出した。さらにこれらの遺伝子ネットワークに関してインシリコパスウェイ解析を行った。現在、エピジェネティック修飾の網羅的解析と合わせてバイオインフォマティクスの専門家による統合解析をすすめている。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 25-104

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
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
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
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
Zfat-deficiency results in a loss of CD3ζ 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	8	2013
Differential requirement for RhoH in development of TCRab CD8αα 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	9	2013
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.	18	2013
Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin αvβ3.	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

研究発表及び特許取得報告について

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
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
Fukasaki 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.	1301	2013

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.	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
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	2013/9/12
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
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

研究発表及び特許取得報告について

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
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

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。