

炎症性腸疾患病態形成への  
腸内細菌叢由来二次胆汁酸の関与と腸管上皮細胞 UGT 発現

14570462

平成14年度～平成16年度科学研究補助金  
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 藤山佳秀  
滋賀医科大学医学部教授



2004013017

## <はしがき>

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患の原因は不明であるが、遺伝的素因を背景に諸種要因による粘膜バリアの破綻により常在腸内細菌叢に対する消化管粘膜における異常な免疫反応が惹起されることが病態と考えられている。本研究では、粘膜バリア破綻機序として腸内細菌由来二次胆汁酸に着目し、その機構を明らかにするとともに、そのグルクロン酸抱合酵素である UGT1A3 強制発現による細胞障害防御の可能性を見出し、さらに潰瘍性大腸炎の腸内細菌叢の全貌を tRFLP により特徴付けた。

## 研究組織

研究代表者 藤山佳秀 (滋賀医科大学医学部教授)

## 交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	1,500	0	1,500
平成15年度	900	0	900
平成16年度	600	0	600
総計	3,000	0	3,000

## 研究発表

### (1) 学会誌等

Yamamoto K., Kushima R., Kisaki O., Fujiyama Y., Okabe H., Combined effect of hydrogen peroxide induced oxidative stress and IL-1 alpha on IL-8 production in CaCo-2 cells. *Inflammation* Vol 27, June 2003

Araki Y., Andoh A., Bamba H., Yoshikawa K., Doi H., Komai Y., Higuchi A., Fujiyama Y., The cytotoxicity of hydrophobic bile acids is ameliorated by more hydrophilic bile acids in intestinal cell lines IEC-6 and Caco-2. *Oncology Report* Vol 10, Nov.-Dec., 2003

Araki Y., Katoh T., Ogawa A., Bamba S., Andoh A., Koyama S., Fujiyama Y., Bamba T., Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the Caco-2 cell line. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol 39, Sep. 2005

### (2) 口頭発表

藤山佳秀、シンポジウム「見えてきた腸内細菌の全貌と機能—炎症性腸疾患に迫る腸内細菌研究」、第78回日本細菌学会総会、平成17年4月4日

Fujiyama Y., "A novel aspects of intestinal microflora profile in ulcerative colitis." *International Symposium on Recent Advances in IBD*, Feb. 18, 2006

## 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

<緒言>

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患の病因は未だ不明であるが、症例数は我が国においても急速な増加をみており、両疾患をあわせて罹患者数は10万人を越えている。最近の分子・遺伝生物学的なアプローチから、その病態には遺伝的素因が背景として存在し、諸種要因による粘膜バリアの破綻により、腸内環境要因とくに常在腸内細菌叢に対する消化管粘膜における異常・過剰な免疫反応が惹起されることがその病態であるとのコンセンサスが世界的に得られるようになってきている。すなわち、免疫応答に関与する様々な遺伝子改変動物で腸管に慢性炎症が惹起されること、そしてその多くのモデル動物で腸管炎症の発症に腸内細菌の存在が必須であることが明らかにされている。われわれの研究室では、腸内細菌由来二次胆汁酸による腸管上皮細胞障害を明らかにし (Araki Y et al., Hydrophilic and hydrophobic bile acids exhibit different cytotoxicities through cytolysis, Interleukin-8 synthesis and apoptosis in the intestinal epithelial cell lines, IEC-6 and Caco-2 cells. *Scand J Gastroenterol*, Vol 36, 2001、Araki Y et al., Alterations in intestinal microflora, fecal bile acids and short chain fatty acids in dextran sulphate sodium-induced experimental acute colitis in rats. *Eur J Gastroenterol & Hepatol.*, Vol 13, 2001)、また、従来の培養法による炎症性腸疾患における病変粘膜付着細菌叢の解析を行い、これら細菌に対する免疫応答が本症患者で成立していることを液性免疫応答の面から明らかにしてきた (Matsuda H et al., Characterization of antibody responses against rectal mucosa-associated bacterial flora in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*, Vol 15, 2000)。一方で、胆汁酸をはじめとする生体内活性物質あるいは薬剤の肝での second line 代謝系である UGT (uridine diphosphate glucuronosyltransferase) の日本人における polymorphism から体質性黄疸、薬剤性肝障害の発症機序を明らかにしてきた (Itoh M et al., Effect of a conserved mutation in uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 on glucuronidation of a metabolite of flutamide. *Eur J Clin Pharmacol*. Vol 58, 2002、Ito M et al., Inhibitory effect of troglitazone on glucuronidation catalyzed by human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A6. *Eur J Clin Pharmacol*, Vol 56, 2001、Yamamoto K et al., Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochim Biophys Acta*, Vol 28, 1998、Yamamoto K et al., Analysis of bilirubin uridine 5'-diphosphate (UDP) glucuro nosyltransferase gene mutations in seven patients with

Crigler-Najjar syndrome type II. J Hum Genet, Vol 43, 1998)。

このような研究成果を背景として、本研究では炎症性腸疾患の発症トリガーとしての腸管粘膜バリアの破綻への腸内細菌叢由来二次胆汁酸の関与と機序を明らかにし、その産生母地としての炎症性腸疾患における腸管内常在細菌叢の特性を明らかにする手法を開発し、さらには胆汁酸による腸管上皮細胞障害に対する胆汁酸グルクロン酸抱合酵素である UGT1A3 強制発現による防御作用を明らかにすることにより、新たな炎症性腸疾患治療法開発を試みた。

## (I) 炎症性腸疾患（とくに潰瘍性大腸炎）腸内細菌叢解析手法の開発

本症の病態に常在腸内細菌叢が関与することは先に述べたとおりであるが、われわれの検討を含め従来の培養法による検討からは、どのような菌属・菌種・菌株が関わっているのか、ひいては本症の腸内細菌叢にどのような特性があるのかについてはブラック・ボックスの域を出ていないのが現状である。本研究においても、当初は、腸管内環境を模した培養条件を種々工夫することによってその克服を試みたが、満足すべき成果を得ることはできなかった。一方で、分子生物学的な手法の開発が進歩する中で、従来の培養法で同定しうる腸内細菌叢が 30%程度に止まることが明らかにされた。すなわち、腸内細菌叢の全貌をみることによりその炎症性腸疾患の病態への関与を解析し得る新たな腸内細菌叢解析手法の開発が本研究遂行の課題となった。

このことから、理化学研究所微生物材料開発室との共同研究（研究協力者：坂田慎治、辨野義己）により、terminal Restriction enzyme Fragment Length Polymorphism analysis による潰瘍性大腸炎腸内細菌叢解析を行った。

方法の概要を図 1 に示した。すなわち、20mg の便試料を材料とし、ビーズフェノール法により DNA を Soil DNA kit (MoBio) にて抽出。16S rRNA code gene を 6-FAM 標識した 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) あるいは 529F (ACGTGCCAGCAGCCGCGG) と 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) をプライマーとして増幅。制限酵素 HhaI、HaeIII、MspI、AluI 等で処理後、キャピラリー電気泳動 (ABI PRISM 310、Genetic Analyzer) を行い、得られた RFs プロファイルを Pearson-UPGMA (BioNumeric) あるいは Jaccard-Wards にて統計解析を行った。対象症例は潰瘍性大腸炎 44 例と健常人 45 例（男性 21 例、女性 24 例）である。

図 2 に制限酵素 HhaI による RFs profile を示したが、潰瘍性大腸炎の糞便腸内細菌叢は健常人と異なるプロファイルを示し、健常人では認められない特徴的なピークが検出された。図 3 は Pearson-UPGMA を用いたデンドログラムであり、プロファイルの類似性から明らかに健常人クラスターと潰瘍性大腸炎クラスターに識別される。ちなみに健常人クラスターに類別された潰瘍性大腸炎症例は 12 例であり、寛解期全大腸炎症例あるいは左側結腸炎型症例であった。一方、潰瘍性大腸炎クラスター (Cluster 2~6) に類別された健常人は 2 例のみであった。しかし、潰瘍性大腸炎クラスター内での病型・病期・治療内容については一定の傾向は見られなかった。

図 4 には、Jaccard-Wards 解析法による潰瘍性大腸炎症例におけるデンドログラムを示している。先の Pearson-UPGMA 解析法では RFs peak と各 peak の面積 (AUC) から解析するのに対して Jaccard-Wards 解析法では RFs peak

の有無のみでの解析となっている。ここでは、潰瘍性大腸炎は大きく二つのクラスターに類別される。これを、病型・病期・治療内容で検討すると、クラスターIには全大腸炎型（19例中12例）、左側大腸炎型（17例中11例）が類別される傾向があり、一方、直腸炎型ならびに結腸全摘後回腸嚢炎症例はすべてクラスターIIに類別された。また、治療内容別にはステロイド剤使用例がクラスターIに類別される傾向（13例中10例）を認めしたが、5-ASA製剤、アザチオプリン投与例でのクラスター類別には一定の傾向は認めなかった。

本研究より、潰瘍性大腸炎の腸内細菌叢は健康人と異なる腸内細菌プロファイルを持つことが明らかとなり、このような特性が本症の病態を修飾していることが容易に推察される。しかし、一方で、このような特性が本症の遺伝的素因、すなわち腸内細菌叢に対する腸管粘膜免疫異常と直接的に関与しているのか、あるいは単に病態によって腸内細菌叢が修飾されているのかについてのさらなる検討が課題として残る。

図5は、代表的な6例の潰瘍性大腸炎症例のPFsを重ね合わせ、各々のpeakについて Ribosomal Database Project (Michigan State University) と現在構築中の InfoCom t-RFLP Database & Analysis Software から、既知の菌種との相同性をコンピューター・シミュレーションを行ったものである。ここからも分かるように、培養法を主体として同定される菌種では既定することのできないpeakが本症で認められる。このような観点から、比較的共通性の高い18peakについて病型（図6、図7）あるいは病期（図8、図9）との関連を検討したものであり、図7、図9では35%以上の症例で陽性を示すpeakを○で、また35%以上陽性でかつ10%以上のAUCを占めるものを●で示した。しかしながら、特徴的なpeakを抽出することができるものの、ここには難培養性細菌が多く含まれており、今後、direct sequence あるいは胆汁酸代謝に標的を絞った (Kitahara M, Benno Y et al., Comparison among fecal secondary bile acid levels, fecal micorbiota and *Clostridium scinedens* cell numbers in Japanese. Microbiol Immunol, Vol 48, 2004、共同研究者ら) 性格付けが必要であり、現在、解析を進めているところである。

## (2) 二次胆汁酸による腸粘膜上皮細胞障害機序に関する検討

炎症性腸疾患の発症には腸管粘膜バリアの何らかの破綻が誘因となると考えられている。そこで、本研究では酸化ストレスに焦点をあて、実験的に腸管上皮細胞株 CaCo-2 あるいはヒト正常腸管上皮細胞株 (ACBR1519) に IL-1 存在下による酸化ストレスを与えることによる IL-8 mRNA 発現を検討した。その結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 単独あるいは IL-1 微量 (0.1ng/ml) での IL-8 mRNA 誘導は惹起されないが、両者共存下には IL-8 mRNA の誘導が惹起され、これは N-acetylcystein 存在下に抑制された。このことは、軽微な炎症反応が腸管粘膜に誘導されている条件下では、酸化ストレスによって容易に腸管炎症の増幅に繋がることを示唆している。(Yamamoto K et al., Combined effect of hydrogen peroxide induced oxidative stress and IL-1 alpha on IL-8 production in CaCo-2 cells ( a human colon carcinoma cell line) and normal intestinal epithelial cells. Inflammation, Vol 27, 2003)

このことから、胆汁酸による腸管粘膜上皮細胞障害の機序を検討したところ、その障害機序が酸化ストレスが主要な要因となっていることが明らかとなった。すなわち、実験的に CaCo-2 細胞株培養において transepithelial electrical resistance (TEER) を指標として cholic acid の粘膜バリア障害機序を検討したところ、reactive oxygen species (ROS) の産生が phospholipase A2、cyclooxygenase、protein kinase C、NADH dehydrogenase 活性化に加えて key factor となっており、この際、xanthine oxidase は ROS 誘導の上流シグナルとして、また extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)、p38 mitogen activated protein kinase (p38MAPK) と myosin light chain kinase (MLCK) が下流シグナルとして関与していることが明らかとなった。(Araki Y et al., Bile acid modulates transepithelial permeability via the generation of reactive oxygen species in the CaCo-2 cell line. Free Radical Biology & Medicine, Vol 39, 2005)

(3) 腸管上皮細胞への胆汁酸グルクロン酸抱合酵素 uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A3 強制発現による胆汁酸起因性細胞障害防御  
—炎症性腸疾患の新たな分子遺伝学的背景の考察と新規治療法開発の可能性—

上記の研究結果に基づき、胆汁酸グルクロン酸抱合酵素 uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A3 を腸管上皮細胞に強制発現させることにより、胆汁酸により誘導される細胞障害性を抑制できるかを検討した。(Manuscript in preparation) すなわち、CaCo-2 細胞株を用い、lithocholic acid、hyodeoxycholic acid、deoxycholic acid、cholic acid、chenodeoxycholic acid による IL-8 mRNA 発現誘導を検討したところ、lithocholic acid が最も IL-8 mRNA 発現誘導が強かったことから、CaCo-2 cell に UGT1A3 を transfection site して強発現させ検討を行った。UGT 1A3 の transfection には UGT 1A3 cDNA を PCR にて増幅し、pcDNA3.1 expression vector にクローニングし、CaCo-2 cell に lipofectin 法にて一過性に強発現させた。

その結果、lithocholic acid による IL-8 mRNA の発現は有意に抑制された。このことは、炎症性腸疾患の遺伝的背景素因として UGT の polymorphism による活性低下が関与している可能性を示唆するとともに、本症の新規治療の可能性として UGT の腸管粘膜細胞での発現誘導による、本症発症トリガーの制御の可能性を示唆するものと考えている。

しかし、一方で共同研究者らの検討から UGT 1A3 の日本人における polymorphism は、未だ少数例 (n=200) の検討ではあるものの、Q6R (SNP frequency 0.055)、W11R (0.28)、E27E (silent; 0.28)、R45W (0.11)、V47A (0.125)、A159A (silent; 0.28) で、wild type に対する非活性は W11R 121%、Q6R-W11R 86%、W11R-V47A 369%、R45W 70%との結果 (Iwai M et al., Six nove UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A3) polymorphisms with varying activity. J Hum Genet, Vol 49, 2004) であり、本症の遺伝的背景を UGT1A3 の polymorphism のみから考察するには尚早であり、今後、UGT2B7をはじめ胆汁酸代謝に関わると想定される isoform に関する検討を含めた展開が課題として残っている。



以上、本研究において、炎症性腸疾患の病態に関わる腸内細菌叢の全容を解析しうる手法が開発された。さらに、本症の発症トリガーに関わる腸管粘膜バリアの破綻への腸内細菌由来二次胆汁酸の作用機序と、これに対して生体側因子としての胆汁酸グルクロン酸抱合酵素 UGT の防御的な作用が明らかにされた。今後、未だブラック・ボックスにある腸内細菌叢の全貌を分子生物学的手法を駆使して解き明かす中で、本症の病態への腸内細菌由来二次胆汁酸の関与がより明確になると期待される。

以下に、本研究の期間中の我々の研究室における炎症性腸疾患に関する業績を参考までに記す。

1. Andoh A, Endo Y, Kushima R, Hata K, Tsujikawa T, Sasaki M, Mekata E, Tani T, Fujiyama Y. A case of Crohn's disease involving the gallbladder. *World J Gastroenterol* 2006 Feb;14(6):977-978
2. Andoh A, Yoshida T, Yagi Y, Bamba S, Hata K, Tsujikawa T, Kitoh K, Sasaki M, Fujiyama Y. Increased aggregation response of platelets in patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2006 Jan;41(1):47-54.
3. Andoh A, Bamba S, Fujiyama Y, Brittan M, Wright NA. Colonic subepithelial myofibroblasts in mucosal inflammation and repair: contribution of bone marrow-derived stem cells to the gut regenerative response. *J Gastroenterol*. 2005 Dec;40(12):1089-1099.
4. Matsumoto T, Iida M, Kohgo Y, Imamura A, Kusugami K, Nakano H, Fujiyama Y, Matsu T, Hibi T. Therapeutic efficacy of infliximab on active Crohn's disease under nutritional therapy. *Scand J Gastroenterol*. 2005 Dec;40(12):1423-1430.
5. Tsujikawa T, Andoh A, Sakaki M, Ishizuka I, Araki Y, Koyama S, Fujiyama Y. Operative indications for patients with refractory or severe ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology*. 2005 Sep-Oct;52(65):1470-3.
6. Akira Andoh, Zhuobin Zhang, Osamu Inatomi, Sanae Fujino, Yasuyuki Deguchi, Yoshio Akaki, Tomoyuki Tsujikawa, Katsuyuki Kitoh, Shokei Kim-Mitsuyama, Atsushi Takayanagi, Nobuyoshi Shimizu, Yoshihide Fujiyama. Interleukin-22, a Member of the IL-10 Subfamily, Induces Inflammatory Responses in Colonic Subepithelial Myofibroblasts. *Gastroenterology*. 2005 Sep;129(3):969-84.
7. Andoh A, Yasui H, Inatomi O, Zhang Z, Deguchi Y, Hata K, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor-alpha-induced granulocyte and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor release from human colonic myofibroblasts. *J Gastroenterol*. 2005 Aug;40(8):802-10.
8. Deguchi Y, Andoh A, Inatomi O, Araki Y, Hata K, Tsujikawa T, Kitoh K, Fujiyama Y. Development of dextran sulfate sodium-induced colitis is aggravated in mice genetically deficient for complement C5. *Int J Mol Med* 2005 Oct;16(4):605-608
9. Akira Andoh M.D., Tomoyuki Tsujikawa M.D., Kazunori Hata M.D., Yoshio Araki M.D., Katsuyuki Kitoh M.D., Masaya Sasaki M.D., Takashi Yoshida M.T., Yoshihide Fujiyama M.D. Elevated Circulating

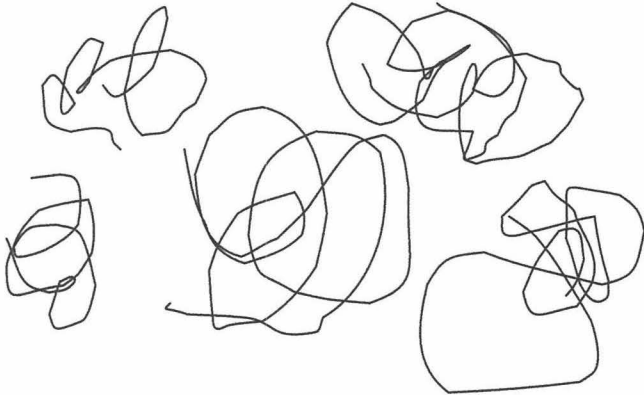
Platelet-Derived Microparticles in Patients with Active Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol.* 2005; 100:2042-2048

10. Andoh A, Tsujikawa T, Inatomi O, Deguchi Y, Sasaki M, Obata H, Mitsuyama K, [Fujiyama Y](#). Leukocytapheresis Therapy Modulates Circulating T cell Subsets in Patients With Ulcerative Colitis. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 2005 (3):270-276
11. Inatomi O, Andoh A, Kitamura K, Yasui H, Zhang Z, [Fujiyama Y](#). Butyrate blocks interferon-gamma-inducible protein-10 release in human intestinal subepithelial myofibroblasts. *J Gastroenterol.* 2005 May;40(5):483-9.
12. Andoh A, Hirashima M, Maeda H, Hata K, Inatomi O, Tsujikawa T, Sasaki M, Takahashi K, [Fujiyama Y](#). Serum selenoprotein-P levels in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrition.* 2005 May;21(5):574-9
13. Zhang Z, Andoh A, Inatomi O, Bamba S, Takayanagi A, Shimizu N, [Fujiyama Y](#). Interleukin-17 and lipopolysaccharides synergistically induce cyclooxygenase-2 expression in human intestinal myofibroblasts. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Apr;20(4):619-27.
14. Andoh A, Tsujikawa T, Inatomi O, Deguchi Y, Hata K, Kitoh K, Sasaki M, Mitsuyama K, [Fujiyama Y](#). Suppression of inflammatory cytokine secretion by granulocyte/monocyte adsorptive apheresis in active ulcerative colitis. *Ther Apher Dial.* 2005 Apr;9(2):123-7.
15. Zhang Z, Andoh A, Yasui H, Inatomi O, Hata K, Tsujikawa T, Kitoh K, Takayanagi A, Shimizu N, [Fujiyama Y](#). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha upregulate interleukin-23 subunit p19 gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med.* 2005 Jan;15(1):79-83.
16. Andoh A, Ogawa A, Kitamura K, Inatomi O, Fujino S, Tsujikawa T, Sasaki M, Mitsuyama K, [Fujiyama Y](#). Suppression of interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-induced inflammatory responses by leukocytapheresis therapy in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 2004 Dec;39(12):1150-7
17. Itoh A, Tsujikawa T, Yasuoka T, Nakahara T, Sasaki M, [Fujiyama Y](#). Natriuretic peptides up-regulate aquaporin 3 in a human colonic epithelial cell line. *Int J Mol Med.* 2004 Oct;14(4):621-6.
18. Araki Y, Katoh T, Urabe M, Kishi Y, Ishizuka I, [Fujiyama Y](#). The analysis of pyridylamino-dextran sulfate oligomers by high-performance liquid chromatography and a novel detection system for sulfated polysaccharides. *Oncol Rep.* 2004 Aug;12(2):363-7.
19. Furukawa A, Saotome T, Yamasaki M, Maeda K, Nitta N, Takahashi M, Tsujikawa T, [Fujiyama Y](#), Murata K, Sakamoto T. Cross-sectional Imaging in Crohn Disease. *Radiographics.* 2004 May-Jun;24(3):689-702.
20. Kanauchi O, Andoh A, [Fujiyama Y](#). Effect of dietary fiber on mineral utilization. Mar/April 2004 issue, *Agro FOOD Industry HiTech.*
21. Hanai H, Kanauchi O, Mitsuyama K, Andoh A, Takeuchi K, Takayuki I, Araki Y, [Fujiyama Y](#), Toyonaga A, Sata M, Kojima A, Fukuda M, Bamba T. Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis. *Int J Mol Med.* 2004 May;13(5):643-7.
22. Tsujikawa T, Nezu R, Andoh A, Saotome T, Araki Y, Ishizuka Y, Sasaki M, Koyama S, [Fujiyama Y](#). Inflixmab as a possible treatment for the hemorrhagic type of Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2004;39(3):284-7.
23. Araki Y, Andoh A, Takizawa J, Takizawa W, [Fujiyama Y](#). *Clostridium butyricum*, a probiotic derivative,

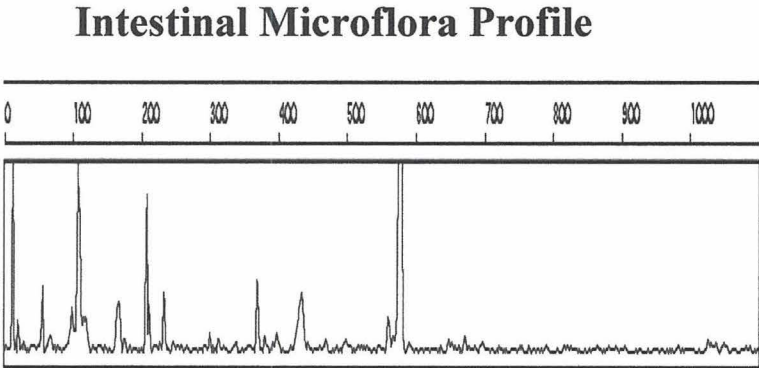
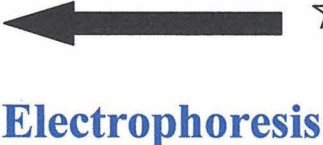
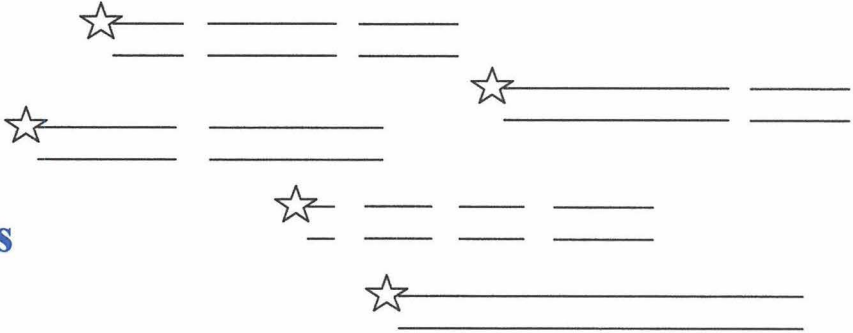
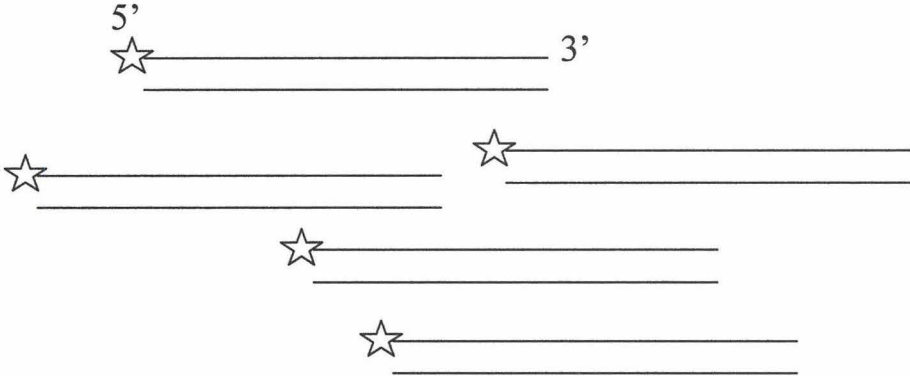
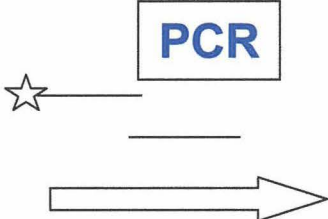
- suppresses dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Int J Mol Med.* 2004 Apr;13(4):577-80.
24. Andoh A, Fujiyama Y. Anti-inflammatory roles of dietary fiber and short-chain fatty acids as regards inflammatory bowel diseases. *Jan/Feb 2004 issue, Agro FOOD Industry HiTech.*
  25. Ogawa A, Andoh A, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Neutralization of interleukin-17 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Clin Immunol.* 2004 Jan;110(1):55-62.
  26. Yasui H, Andoh A, Bamba S, Inatomi O, Ishida H, Fujiyama Y. Role of fibroblast growth factor-2 in the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human intestinal myofibroblasts. *Digestion.* 2004;69(1):34-44.
  27. Andoh A, Fujino S, Hirai Y, Fujiyama Y. Epimorphin expression in human colonic myofibroblasts. *Int J Mol Med.* 2004 Jan;13(1):57-61.
  28. Andoh A, Tsujikawa T, Ishizuka I, Araki Y, Sasaki M, Koyama S, Fujiyama Y. N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. *Int J Mol Med.* 2003 Nov;12(5):721-5.
  29. Kanauchi O, Mitsuyama K, Homma T, Takahama K, Fujiyama Y, Andoh A, Araki Y, Suga T, Hibi T, Naganuma M, Asakura H, Nakano H, Shimoyama T, Hida N, Haruma K, Koga H, Sata M, Tomiyasu N, Toyonaga A, Fukuda M, Kojima A, Bamba T. Treatment of ulcerative colitis patients by long-term administration of germinated barley foodstuff: Multi-center open trial. *Int J Mol Med.* 2003 Nov;12(5):701-4.
  30. Araki Y, Andoh A, Takizawa J, Takizawa W, Fujiyama Y. The long-term oral administration of a product derived from a probiotic, *Clostridium butyricum* induced no pathological effects in rats. *Int J Mol Med.* 2003 Oct;12(4):571-5.
  31. Bamba S, Andoh A, Yasui H, Makino J, Kim S, Fujiyama Y. Regulation of Interleukin-11 Expression in Human Intestinal Myofibroblasts: Role of c-Jun AP-1 and MAP-kinase-Dependent Pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 285: G529-538
  32. Bamba S, Andoh A, Yasui H, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17. *J Gastroenterol.* 2003;38(6):548-54.
  33. Araki Y, Andoh A, Fujiyama Y. The free radical scavenger edaravone suppresses experimental dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Int J Mol Med.* 2003 Jul;12(1):125-9.
  34. Fukunaga T, Tsujikawa T, Sasaki M, Fujiyama Y, Bamba T, Fujimiya M. A novel diamino-pyridine derivative (IS-741) attenuates rat ileitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *J Gastroenterol.* 2003;38(5):451-9.
  35. Fukunaga T, Sasaki M, Araki Y, Okamoto T, Yasuoka T, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. Effects of the soluble fibre pectin on intestinal cell proliferation, fecal short chain Fatty Acid production and microbial population. *Digestion.* 2003;67(1-2):42-9.
  36. Kanauchi O, Serizawa I, Araki Y, Suzuki A, Andoh A, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Takaki K, Toyonaga A, Sata M, Bamba T. Germinated barley foodstuff, a prebiotic product, ameliorates inflammation of colitis through modulation of the enteric environment. *J Gastroenterol.* 2003;38(2):134-41.

37. Tsujikawa T, Kanauchi O, Andoh A, Saotome T, Sasaki M, Fujiyama Y, Bamba T. Supplement of a Chitosan and ascorbic acid mixture for Crohn's disease. A pilot study. *Nutrition*. 2003 Feb;19(2):137-9.
38. Tsujikawa T, Itoh A, Yasuoka T, Fukunaga T, Satoh J, Uda K, Ihara T, Sasaki M, Fujiyama Y. Mucosal permeability regulates receptor binding of luminal epidermal growth factor in the adult rat intestine. *Int J Mol Med*. 2003 Mar;11(3):349-52.
39. Itoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. Enhancement of aquaporin-3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell line. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003 Feb;18(2):203-210.
40. Fujino S, Andoh A, Hata K, Fujiyama Y, Bamba T. Increased expression of interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003 Jan;52(1):65-70.
41. Tsujikawa T, Andoh A, Fujiyama Y. Enteral and parenteral nutrition therapy for Crohn's disease. *Curr Pharm Design* 2003 9(4):323-332.
42. Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr Pharm Design* 2003 9(4):347-358.
43. Andoh A, Fujino S, Okuno T, Fujiyama Y. Intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*. 2002;37(Suppl XIV):33-37
44. Kanauchi O, Suga T, Tochiwara M, Hibi T, Naganuma M, Homma T, Asakura H, Nakano H, Takahama K, Fujiyama Y, Andoh A, Shimoyama T, Hida N, Haruma K, Koga H, Mitsuyama K, Sata M, Fukuda M, Kojima F, Bamba T. Treatment of ulcerative colitis by feeding with germinated barley foodstuff: first report of a multicenter open control trial. *J Gastroenterol*. 2002;37(Suppl XIV):57-72
45. Andoh A, Hata K, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. Interleukin (IL)-4 and IL-17 synergistically stimulate IL-6 secretion in human colonic myofibroblasts. *Int J Mol Med*. 2002 Nov;10(5):631-4
46. Araki Y, Andoh A, Sasaki A, Shimada M, Bamba S, Fujino S, Fujiyama Y. Dietary bile acids inhibit potentially elemental diet-induced small intestinal atrophy in rats. *Int J Mol Med*. 2002 Nov;10(5):623-6
47. Andoh A, Fujino S, Bamba S, Araki Y, Okuno T, Bamba T, Fujiyama Y. IL-17 Selectively Down-Regulates TNF-alpha-Induced RANTES Gene Expression in Human Colonic Subepithelial Myofibroblasts. *J Immunol*. 2002 Aug 15;169(4):1683-7.
48. Makino J, Andoh A, Hata K, Yotsuya S, Shikama H, Imamura M, Fujiyama Y, Bamba T. Inhibitory effects of the new anti-inflammatory agent, IS-741, on spontaneous colitis in HLA-B27/beta2-microglobulin transgenic rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Aug;17(8):854-60.
49. Bamba T, Kanauchi O, Andoh A, Fujiyama Y. A new prebiotic from germinated barley for nutraceutical treatment of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Aug;17(8):818-24.
50. Hata K, Andoh A, Shimada M, Fujino S, Bamba S, Araki Y, Okuno F, Fujiyama Y, Bamba T. IL17 stimulates inflammatory responses via NF-kappa B and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002 June;282(6):G1035-44

# Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis of Intestinal Microbiota derived 16S rRNA gene

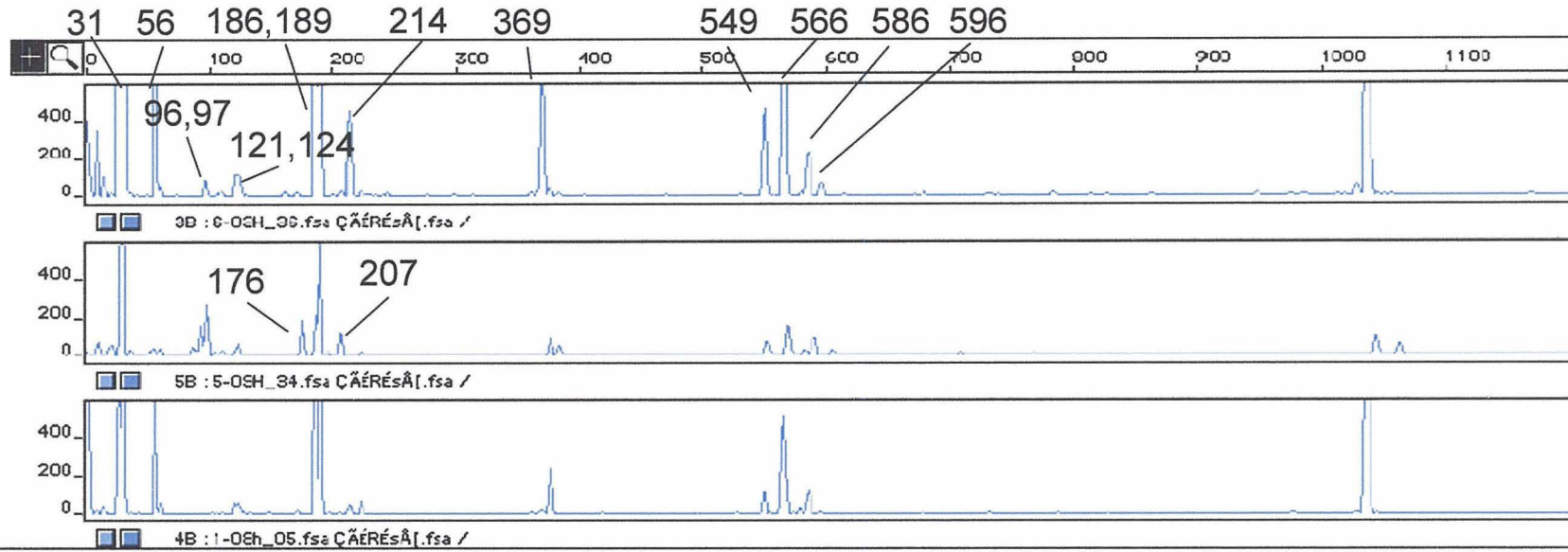


Fecal Bacteria derived DNA



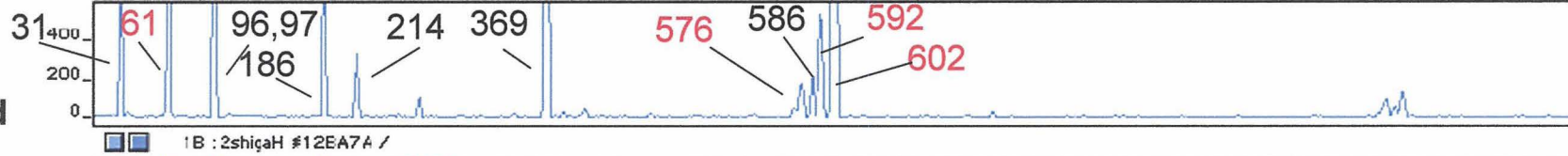
# Representative fecal Microbiota T-RFLP (*Hha* I) Profile of Patients with Ulcerative colitis

Healthy individuals

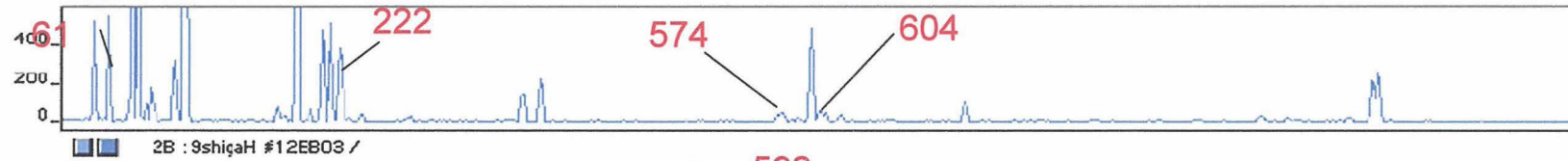


Ulcerative colitis

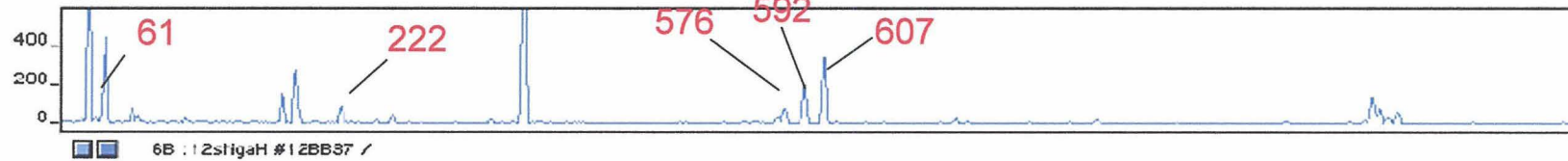
Left-sided colitis



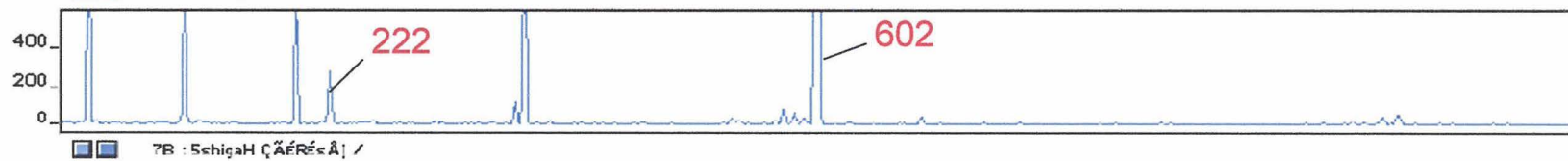
Pan-colitis



Proctitis



Pouchitis



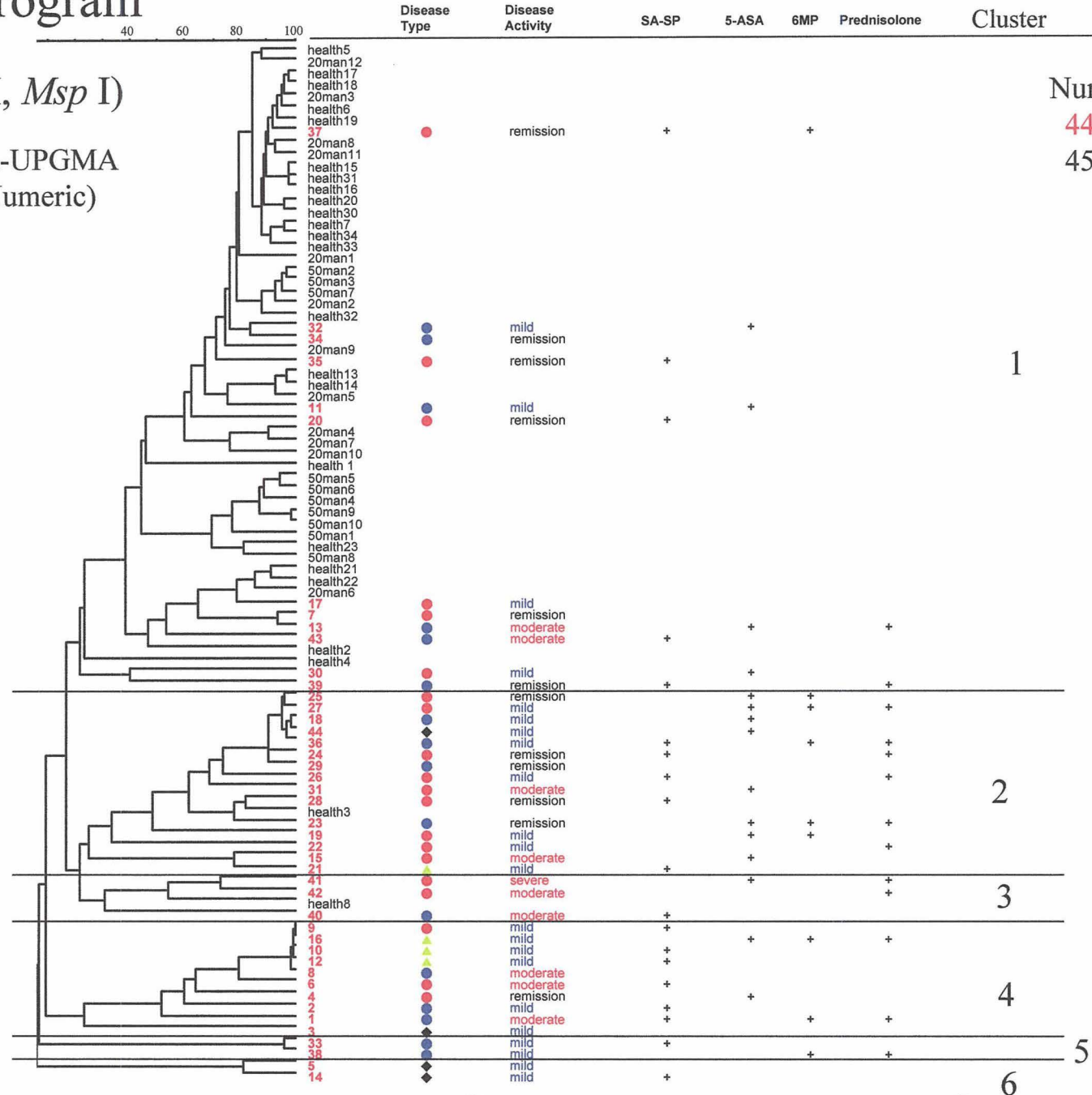
31, 186, 187, 566, 586: unclatured bacteria  
213, 214: *Enterococcus*, 369: *Bifidobacterium*

T-RFs unique to UC are indicated by red number (bp).

# Dendrogram

(*Hha* I, *Msp* I)

Pearson-UPGMA  
(BioNumeric)

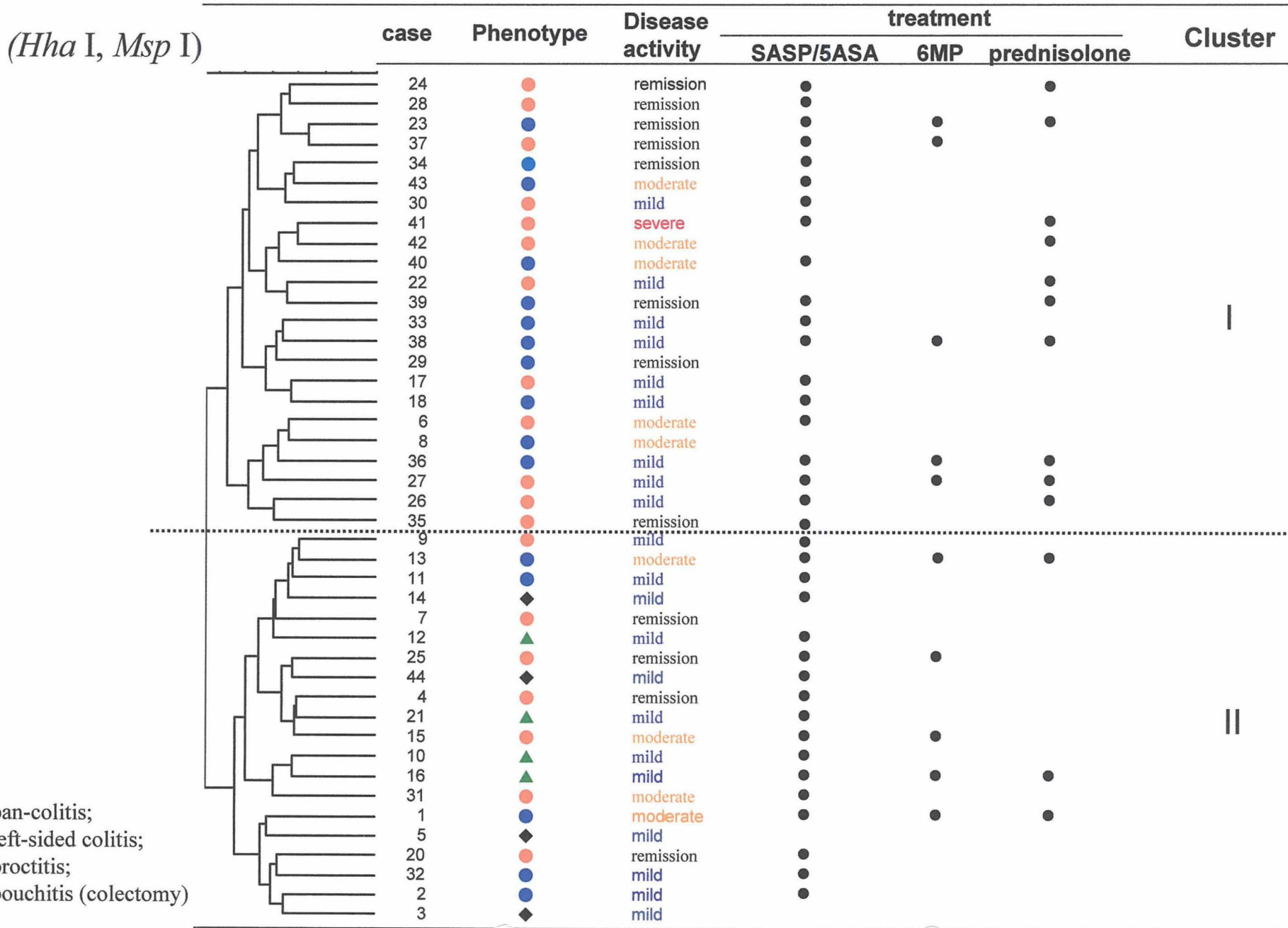


Number of fecal samples obtained;  
**44 from patients with ulcerative colitis**  
 45 from healthy individuals  
 24 female (aged 18-22 y.o.)  
 21 male (10 aged 18-22 & 11 aged 50s)

● pan-colitis; n=20  
 ● left-sided colitis; n=17  
 ▲ proctitis; n=4  
 ◆ pouchitis (colectomy); n=3



# T-RFLP Dendrogram (Jaccard-Wards method) among Patients with UC

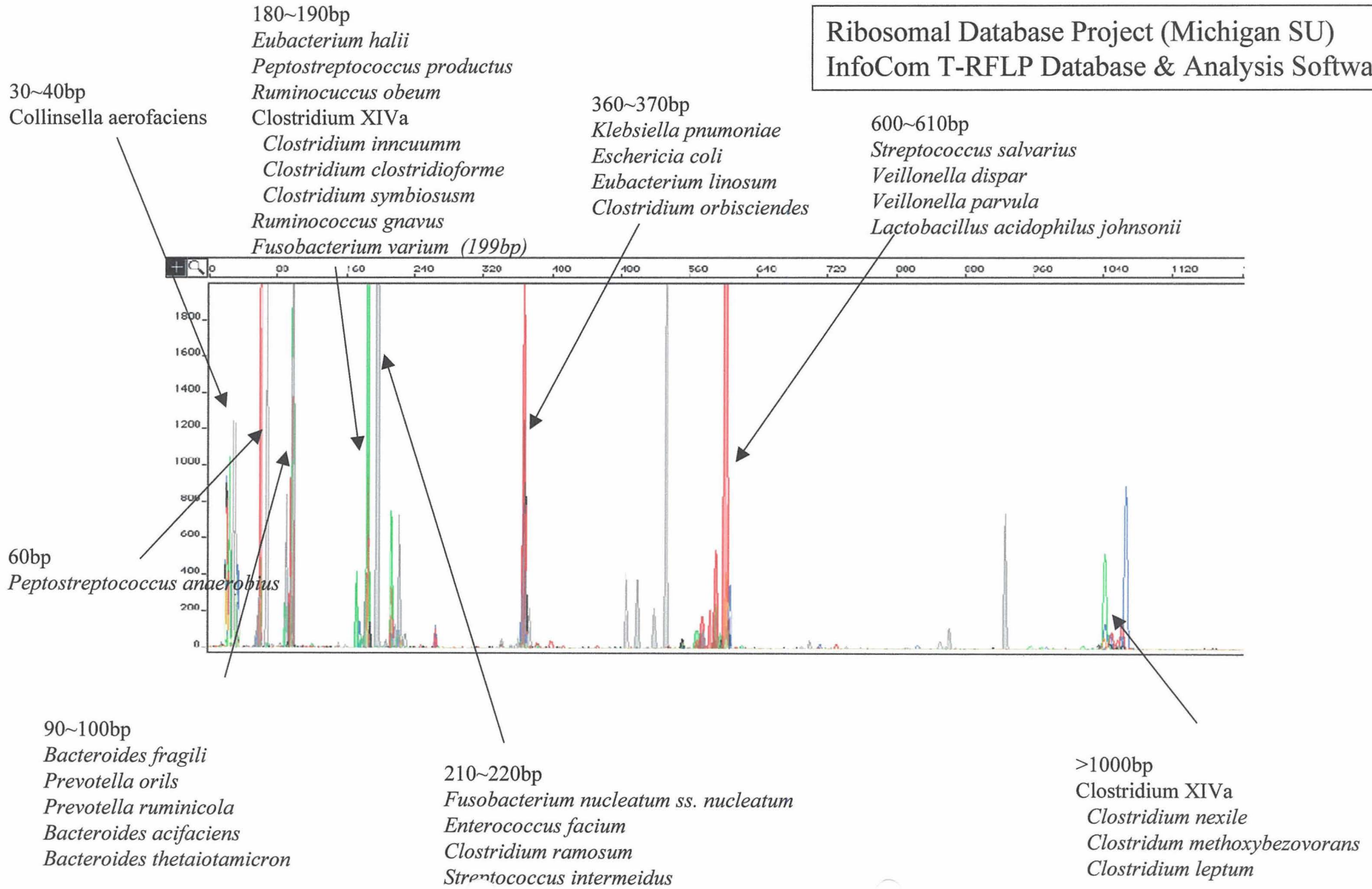


- pan-colitis;
- left-sided colitis;
- ▲ proctitis;
- ◆ pouchitis (colectomy)



# Computer-Simulated T-RF length of Bacteria digested with *HhaI*

Ribosomal Database Project (Michigan SU)  
InfoCom T-RFLP Database & Analysis Software



## Detection Rate of T-RFs (*HhaI*) in Ulcerative colitis and Healthy Control

T-RF size(bp)	Pouchitis		Pan-colitis		Left-sided colitis		Contol	
	% +ve	% AUC	% +ve	% AUC	% +ve	% AUC	% +ve	% AUC
57	0.0		29.4	3.6 ± 2.7	21.4	9.7 ± 7.6	18.2	3.0 ± 1.6
62	0.0		47.1	6.6 ± 5.1	42.9	4.5 ± 4.3	18.2	3.5 ± 3.1
98	0.0		23.5	7.3 ± 3.9	21.4	3.0 ± 1.0	22.7	2.8 ± 1.6
99	33.3	6.0	35.3	7.0 ± 4.4	28.6	4.8 ± 3.9	27.3	5.3 ± 2.0
185	0.0		29.4	3.2 ± 1.9	28.6	3.5 ± 1.7	18.2	3.0 ± 2.7
187	66.7	24.0 ± 25.5	88.2	16.0 ± 10.0	71.4	18.1 ± 14.5	86.4	36.5 ± 24.2
188	0.0		11.8	17.0 ± 11.3	14.3	25.5 ± 2.1	0.0	
190	0.0		35.3	11.5 ± 17.3	35.7	4.6 ± 3.1	50.0	10.9 ± 7.6
214	66.7	34.5 ± 46.0	11.8	2.8 ± 2.1	28.6	6.5 ± 6.5	0.0	
215	33.3	2	0.0	4.5 ± 2.1	21.4	5.7 ± 4.0	0.0	
223	0.0		23.5	2.8 ± 1.0	0.0		50.0	2.5 ± 1.4
368	33.3	2.0	11.8	5.0 ± 1.4	21.4	14.3 ± 6.4	0.0	
369	33.3	1.0	47.1	15.6 ± 21.5	35.7	13.6 ± 13.7	0.0	
370	33.3	11.0	47.1	10.9 ± 7.6	21.4	14.3 ± 7.5	9.1	1.0 ± 0.0
570	0.0		0.0		0.0		50.0	5.5 ± 2.7
595	0.0		23.5	22.8 ± 22.4	14.3	2.5 ± 2.1	0.0	
602	33.3	49.0	11.8	16.5 ± 16.3	0.0		0.0	
604	100.0	20.0 ± 15.7	23.5	13.0 ± 16.7	21.4	4.7 ± 3.2	0.0	



## Characteristic Appearance of T-RFs (*HhaI*) in Ulcerative Colitis and estimated bacterial species based on INFOCOM T-RFLP Analysis Database

RFs size (bp)	Bacteria from RDP and InfoCom TFLP analysis database	Pouchitis	Left-sided colitis	Pan- colitis	Control
57	uncultured bacteria				
62	uncultured bacteria, alphaproteobacteria		○	○	
98	uncultured bacteria, <i>Bacteroides</i>			○	
99				○	
185					
187	uncultured bacteria, <i>Ruminococcus</i> , <i>Eubacterium</i>	●	●	●	●
188					
190	uncultured bacteria, <i>Clostridia</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Ruminococcus</i>		○	●	●
214	oral uncultured bacteria, <i>Eubacteria</i> , <i>Fusobacteria</i>	○			
215	uncultured gamma proteo bacteria				
223	<i>Lactobacilli</i> , uncultured clostridia				○
368					
369	uncultured bacteria, <i>Bifidobacteria</i> , <i>Enterobacter</i> , gammaproteo bacteria		●	●	
370				●	
570	uncultured bacteroides, <i>Lactobacilli</i>				○
595	uncultured bacteroides, <i>Lactobacilli</i>				
602					
604	uncultured bacteria, uncultured lactobacilli	●			

○: RFs identified in more than 35% of cases    ●: RFs identified in >35% and proportion of AUC >10%

## Detection Rate of T-RFs (*Hhal*) in Ulcerative colitis and Healthy Control

T-RF size(bp)	Active stage			Remission			Contol		
	% +ve	%AUC		% +ve	%AUC		% +ve	%AUC	
57	21.7	6.4 ± 7.0		40.0	4.3 ± 2.6		18.2	3.0 ± 1.6	
62	39.1	4.9 ± 4.7		50.0	7.2 ± 5.0		18.2	3.5 ± 3.1	
98	13.0	4.0 ± 2.6		40.0	6.5 ± 4.2		22.7	2.8 ± 1.6	
99	26.1	6.0 ± 3.7		40.0	7.5 ± 4.2		27.3	5.3 ± 2.0	
185	21.7	3.2 ± 2.2		30.0	3.7 ± 1.5		18.2	3.0 ± 2.7	
187	82.6	15.9 ± 12.3		80.0	21.8 ± 12.9		86.4	36.5 ± 24.2	
188	13.0	21.3 ± 17.0		20.0	2.5 ± 2.1		0.0		
190	34.8	10.1 ± 14.9		40.0	3.0 ± 1.8		50.0	10.9 ± 7.6	
214	30.4	13.6 ± 24.1		30.0	2.7 ± 1.2		0.0		
215	13.0	5.7 ± 4.0		20.0	2.5 ± 0.7		0.0		
223				10.0	2.0		50.0	2.5 ± 1.4	
368	17.4	7.3 ± 7.9		20.0	11.5 ± 7.8		0.0		
369	43.5	13.9 ± 20.9		50.0	19.2 ± 14.4		0.0		
370	34.8	10.1 ± 7.7		40.0	15.0 ± 4.8		9.1	1.0 ± 0.0	
570	0.0			0.0			50.0	5.5 ± 2.7	
595	8.7	1.5 ± 0.7		20.0	21.5 ± 24.7		0.0		
602	13.0	23.3 ± 15.0		10.0	22.0		0.0		
604	13.0	4.7 ± 3.2		50.0	21.2 ± 15.4		0.0		



## Characteristic Appearance of T-RFs (*HhaI*) in Ulcerative Colitis and estimated bacterial species based on INFOCOM T-RFLP Analysis Database

T-RF size (bp)	Bacteria from RDP and InfoCom TFLP analysis database	Remission	Active stage	Control
57	Uncultured bacteria	○		
62	uncultured bacteria, alphaproteobacteria	○	○	
98	uncultured bacteria, bacteroides	○		
99	uncultured bacteria, bacteroides	○		
185	uncultured bacteria, Ruminococcus, Eubacterium	●	●	●
187				
188				
190	uncultured bacteria, clostridia, eubacterium, ruminococcus	○	○	●
214	oral uncultured bacteria, eubacteria, fusobacteria			
215	uncultured gamma proteo bacteria			
223	lactobacilli, uncultured clostridia			○
368	uncultured bacteria, bifidobacteria, enterobacter, gammaproteo bacteria	●	●	
369				
370				
570	uncultured bacteroides, lactobacilli			
595	uncultured bacteroides, lactobacilli			
602	uncultured bacteria, uncultured lactobacilli	●		
604				

○: RFs identified in more than 35% of cases    ●: RFs identified in  $\geq 35\%$  and proportion of AUC  $> 10\%$