

厚生科学研究研究費補助金特定疾患対策研究事業
粘膜上皮再生を目指した新しい炎症性腸疾患治療法
の開発に関する研究
平成13年度 総括研究報告書

平成14年（2002年）3月

主任研究者 日比 紀文
慶應義塾大学医学部内科

序

原因不明の難治性慢性腸疾患である炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）は本邦においても増加の一途をたどり、潰瘍性大腸炎は6万人強、クローン病は2万人弱の患者数に達している。その病態形成に何らかの免疫学的機序が関与していることは明らかであるが、いまだに原因不明の難治性疾患である。厚生労働省の特定疾患に指定され、「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班」として25年余にわたる、歴代の班長、班員の先生方の日夜たゆまぬ努力により、標準的な治療指針が策定され、副腎皮質ステロイドをはじめとする抗炎症剤投与、経管栄養療法により多くの患者は緩解状態を得られるにいたっている。しかし、中等症以上の患者において、局所の炎症反応が抑えられているにもかかわらず上皮が被覆せずに潰瘍の治癒が遷延したり、潰瘍治癒の過程で高度の線維化が生じて狭窄を来して、治療に難渋することも少なくない。こうした難治性潰瘍は、患者の多くが青少年者であり、仕事、学業や生活に支障を来してQOLが低下することが多く社会問題となっている。こうした現状に鑑み、「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班」における研究事業を補完する意味で、粘膜上皮の再生・修復を目的とした新しい治療法を開発するために、今年度より本研究事業が開始された。

分担研究者・研究協力者として、炎症性腸疾患の臨床のみならず、消化管上皮細胞生物学、腸管粘膜免疫学など幅広い分野から専門の先生方に加わっていただいた。初年度にもかかわらず、実りある研究業績を発表していただいた分担研究者・研究協力者の先生方のご協力に感謝申し上げます。最後に、各方面から本研究事業をサポートしていただいた、「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班」班長、下山孝先生にこの場を借りて感謝の意を表します。

平成14年3月

主任研究者 日比 紀文

目 次

研究班構成	7
研究報告	
I. 総括研究報告書	
粘膜上皮再生を目指した新しい炎症性腸疾患治療法の開発	13
主任研究者 日比紀文 慶應義塾大学医学部内科	
II. 分担研究報告書	
1. デキストラン硫酸誘発大腸炎に対する肝細胞増殖因子の治療効果に関する検討	21
分担研究者 坪内博仁 宮崎医科大学第2内科	
2. HGFを用いた粘膜上皮再生に関する研究	22
分担研究者 下山 孝 兵庫医科大学消化器内科	
3. 粘膜上皮再生におけるMatrix Metalloproteinaseの役割 Micorarray Analysis of Genetic Reprogramming During Epithelial Restitution	23
分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学第1内科	
4. n-酪酸の粘膜上皮再生に及ぼす影響	25
分担研究者 下山 孝 兵庫医科大学消化器内科	
5. マウスDSS腸炎におけるIL-18の粘膜修復に対する効果の検討	27
主任研究者 日比紀文 慶應義塾大学医学部内科	
6. クニッツ型セリンプロテアーゼインヒビターによる増殖因子活性調節に 関する研究 (特に Hepatocyte Growth Factor (HGF), HGF Activator (HGFA) と そのインヒビター (HAI) について)	29
研究協力者 片岡寛章 宮崎医科大学第2病理	
7. 腸管粘膜内IL-7/IL-7レセプターシグナルを標的とした慢性大腸炎に 対する粘膜上皮再生療法の開発	31
分担研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学消化・代謝内科	
8. 粘膜再生機構に及ぼす白血球除去療法の効果 (今後の展望)	33
分担研究者 下山 孝 兵庫医科大学消化器内科	
9. 潰瘍性大腸炎に対するスターリーミルクの粘膜修復効果	35
主任研究者 日比紀文 慶應義塾大学医学部内科	
研究成果の刊行に関する一覧表	37
学会発表に関する一覧表	41
研究事業報告	45

「粘膜上皮再生を目指した新しい炎症性
腸疾患治療法の開発」研究班構成

平成13年度研究班構成

(平成14年3月現在)

区 分	氏 名	所属・所在地	職名	連絡先
主任研究者	日比紀文	慶應義塾大学医学部内科 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35	教授	TEL 03-3353-1211 FAX 03-3357-6156
分担研究者	今井浩三	札幌医科大学第1内科 〒060-0853 札幌市中央区南一条西16丁目	教授	TEL 011-611-2111 FAX 011-613-1241
	下山 孝	兵庫医科大学消化器内科 〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町1-1	教授	TEL 0798-45-6660 FAX 0798-45-6661
	坪内博仁	宮崎医科大学第2内科 〒889-1692 宮崎県清武町大字木原5200	教授	TEL 0985-85-0987 FAX 0985-85-5194
	渡辺 守	東京医科歯科大学大学院消化・代謝内科 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35	教授	TEL 03-5803-5973 FAX 03-5803-0262
研究協力者	片岡寛章	宮崎医科大学第2病理 〒889-1692 宮崎県清武町大字木原5200	教授	TEL 0985-85-2809 FAX 0985-85-6003
事務局	井上 詠	慶應義塾大学医学部内科 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35	助手	TEL 03-3353-1211 FAX 03-3357-2778

研 究 報 告

総括研究報告

粘膜上皮再生を目指した新しい炎症性腸疾患治療法の開発

主任研究者 日比紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授

研究要旨

炎症性腸疾患をはじめとする難治性の潰瘍性腸疾患に対して、粘膜上皮の再生・修復を促進させることを目的として、肝細胞増殖因子（HGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）などの潰瘍治癒に対する有効性を *in vivo* において検討した。ラット DSS 腸炎モデルにおいては HGF の持続腹腔内投与で腸炎の改善が認められたが、注腸投与では有意差は見られなかつ、drug delivery system の検討が重要であると考えられた。また、HGF を活性化する HGFA が潰瘍治癒に対して有効である可能性が示唆された。さらに、粘膜上皮再生には、IL-18 や matrix metalloproteinase、n-酪酸などさまざまな因子が関与していることが明らかとなった。

【分担研究者】

今井浩三（札幌医大第1内科・教授）

下山 孝（兵庫医大消化器内科・教授）

坪内博仁（宮崎医大第2内科・教授）

渡辺 守（東京医科歯科大消化代謝内科・教授）

A. 研究目的

増加の一途をたどる炎症性腸疾患患者の多くは若年期に発症し、慢性かつ難治性であるために勤務制限や日常生活の制限、場合によっては長期入院や外科手術が必要となり、労働可能年齢層における生産性の低下、QOL の低下が社会問題となっている。慢性期の難治性潰瘍に対しては、抗炎症療法のみでは組織の上皮による被覆が不十分で間質組織増生が主体の治癒形態をとり、線維化が著明で、潰瘍治癒の質が低下することが多く、腸管狭窄を来したり、長期経過例での癌化が問題となり、外科的治療法が必要となることも少なくない。こうした現状を鑑み、線維化をきたさない良質な潰瘍治癒のためには、炎症細胞や炎症細胞から放出されるケミカルメディエーターを標

的とした治療法と同時に、粘膜上皮の再生を促進させ粘膜修復を図る治療法の開発が急務と考えられる。

本研究は慢性炎症性腸疾患をはじめとする難治性腸潰瘍性病変に対する粘膜修復・上皮の再生を目指した治療法の開発と実用化を目的とし、消化管上皮細胞に対して増殖作用を有する肝細胞増殖因子（HGF）、線維芽細胞増殖因子（FGF）などの増殖因子に着目して、腸管内で分解されやすいこれらの増殖因子を潰瘍病変部局所へ効率的に送達する全く新しい drug delivery system (DDS) の開発と臨床試験を実施することにより、安全かつこれまでにない粘膜修復による治療法の確立を目指すものである。

本研究の初年度である今年度は、臨床応用可能な増殖因子を用いた治療法の基礎的検討を、主として *in vitro* および動物実験に焦点を絞って行った。動物実験では、動物愛護精神に則り、各施設における動物実験ガイドラインに沿い、動物実験委員会の承認を得た上で行った。患者検体を用いた研究においては、対象患者に研究の目的・

必要性を説明し、同意を得た上で行った。

B. 研究成果

粘膜上皮の再生・修復に関与する因子の基礎的検討として、上皮細胞に対して増殖効果を持つ HGF の活性化のメカニズムを検討し、HGF activator (HGFA) およびそのインヒビターである HAI-1 により、損傷部位特異的に HGF が活性化し、かつネガティブフィードバックを有する制御機構が明らかとなった。このことにより、HGF のみならず、HGFA も粘膜修復療法に有望な因子となりうると考えられた。

一方、マウス DSS 腸炎を用いた系で、粘膜上皮再生・修復に interleukin-18 や matrix metalloproteinase が重要な役割を果たしていることが示された。今後さらに検討を重ねて、これらの因子が粘膜上皮再生療法における有用性を探っていききたい。

in vivo における増殖因子の投与による粘膜上皮の再生・修復に対する治療効果を検討する目的で、ラット腸炎モデルに対して、二つの投与方法により HGF を投与した。TNBS 腸炎に対する HGF の注腸投与は肉眼的、組織学的に有意な治療効果は認められなかった。一方、DSS 腸炎に対して、浸透圧ポンプを用いて HGF の持続腹腔内投与を行ったところ、腸炎の程度が軽減し、組織学的にも粘膜再生像が認められた。今後、粘膜上皮再生治療として HGF を臨床応用する際にも、腸局所の粘膜損傷部位に有効に deliver する、DDS の開発が重要と考えられた。

増殖因子とは全く異なった機序により粘膜修復を促進する物質として、今回の研究により腸内細菌より産生される n-酪酸が見いだされた。n-酪酸は腸内の他の有機酸と異なり、活性酸素産生作用など炎症惹起生を認めず、腸内細菌叢をコントロールすることにより傷害粘膜の修復再生が促進さ

れる可能性が示唆された。

今回、腸内細菌をコントロールすることを目的として、各種細菌で免疫した牛から得られたミルク（スターリーミルク）を、軽症から中等症の潰瘍性大腸炎患者に対して投与するパイロットスタディーを行った。内視鏡的に粘膜所見の改善を認め、組織学的にも粘膜上皮の被覆化が認められ、今後、腸内細菌叢の検討などにより、その治療効果の機序を検討していく必要があると考えられた。

個々の分担研究に関する結果については、それぞれの分担研究報告書において詳述する。

C. 今後の課題、目標

本年度の成績により、HGF は炎症部粘膜に対して再生・修復効果があることが示され、十分に臨床応用可能な因子であると考えられた。ヒト炎症性腸疾患に対して投与する際の DDS として、肛門即優位の病変であれば、注腸剤の投与、大腸全般の病変に対しては、腸内細菌により大腸で崩壊するキトサンカプセルに包含させる投与方法を計画している。

一方、HGF 以外の因子として basic FGF が消化管上皮細胞に対する増殖遊走作用を有していることが明らかとなっており、すでに臨床では褥瘡による皮膚潰瘍に対して使用されている。今後、basic FGF 製剤を用いて、マウス腸炎モデルおよびヒト炎症性腸疾患に対する粘膜修復効果の検討を行っていききたい。

また、その他の interleukin-7、interleukin-18、matrix metalloproteinase などに関して、粘膜上皮に対する再生・修復機序の追究を基礎実験を通じて行いつつ、腸炎モデル動物に対する有効性を検討し、臨床応用可能な因子を今後見いだしていく。

今日、炎症性腸疾患に対して行われてい

る治療の中で、粘膜修復に対してよい効果を持つものも阻害するものもあると考えられる。副腎皮質ステロイドは粘膜修復を阻害することが明らかにされている物質のひとつであるが、その他の薬剤、治療法に関しても、粘膜修復という観点からどういった影響を持っているのかを評価し、実際に臨床で治療していく上で、免疫・炎症反応を抑制する作用と粘膜修復に対する影響のバランスによる総合的な治療効果を考えていきたい。

D. 結論

今年度に始まった研究が成果をあげ、炎症性腸疾患に対する新しい粘膜修復療法が開発されれば、日常生活を制限される多くの若年層患者の QOL の向上をもたらすのみならず、長期入院ならびに線維性狭窄による外科手術例の減少が見込まれ、患者数に比例して今後ますます増加が予想される医療費の抑制にも貢献できる可能性があると期待される。

分 担 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

デキストラン硫酸誘発大腸炎に対する肝細胞増殖因子の治療効果に関する検討

分担研究者 坪内博仁 宮崎医科大学第二内科 教授

研究要旨

デキストラン硫酸大腸炎モデルを用いて、肝細胞増殖因子（HGF）の粘膜修復促進効果を検討した。HGF 投与群では、統計学的有意差をもって体重減少と大腸の短縮が軽度でびらん面積も縮小しており、病理学的にも強い粘膜再生像が認められた。以上の結果から、炎症性腸管障害に対する HGF を用いた新しい治療法の可能性が示唆された。

A. 研究目的

大腸炎モデルを用いて、大腸炎および粘膜修復過程における増殖因子のかかわりを解析すると共に肝細胞増殖因子（HGF）による粘膜修復促進効果を検討する。

B. 研究方法

Wistar ラットに 5%デキストラン硫酸（DSS）溶液を 7 日間自由飲水させて腸炎を誘発、その後 4 日間 1%DSS 溶液にて維持し、DSS 飲水 5 日目より浸透圧ポンプを用いて HGF200mg/日を持続腹腔内投与した。DSS 飲水 11 日目に屠殺し、体重、大腸全長、びらん面積、病理組織所見にて治療効果を検討した。また、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対する免疫組織化学的検討とウエスタンブロット法による大腸粘膜 c-Met のチロシンリン酸化を確認した。

C. 研究成果

HGF 群では非投与群と比較して、統計学的有意差をもって体重減少が軽度で、大腸全長の短縮も軽く、びらん面積も縮小していた。また、病理組織学的には HGF 群において強い粘膜再生像が認められた。免疫組織学的検討では再生粘膜の増殖帯における PCNA 陽性細胞数の増加が

認められ、ウエスタンブロット法では HGF 群において c-Met のリン酸化がより強く認められた。

D. 考察

HGF 投与によって、大腸炎の粘膜修復が促進された。今後条件を検討してさらに投与実験を行う一方、粘膜修復過程における他の増殖因子およびサイトカインのプロフィールを明らかにする。

E. 結論

粘膜修復促進という観点から、炎症性腸管障害に対する HGF を用いた新しい治療法の可能性が示唆された。今後、臨床応用に向け、腸管粘膜修復過程の分子機構およびそれにおける HGF の関わりを明らかにしたい。

F. 研究発表

田原良博、井戸章雄、宮田義史、山本章二郎、堀剛、弘野修一、林克裕、坪内博仁：硫酸デキストラン実験腸炎に対する肝細胞増殖因子（HGF）の治療効果（第 43 回日本消化器病学会大会、2001 年 10 月）

G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

HGF を用いた粘膜上皮再生に関する研究

分担研究者 下山 孝 兵庫医科大学 消化器内科 教授

研究要旨

Hepatocyte growth factor (HGF) は、肝細胞のみならず腸上皮細胞に対しても増殖因子として機能している。そこで炎症性腸疾患における HGF の治療効果について、動物モデルを用いて検討した。すなわち trinitrobenzenesulfonic acid/ethanol を Sprague-Dawley ラットに注腸し腸炎を惹起させ、5 日目に HGF を注腸、10 日目に屠殺、肉眼所見、組織学的所見、Ki-67 免疫染色、Myeloperoxidase 活性について検討した。いずれの検討においても HGF の治療効果はみられなかった。今後、異なる投与経路での検討を試みる必要がある。

A. 研究目的

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎およびクローン病は、潰瘍の再発を繰り返すため、質の高い粘膜上皮を再生させる治療法が望まれている。Hepatocyte growth factor (HGF) は肝

再生因子として同定されたが、腸粘膜上皮に対しても増殖因子として機能している。そこで HGF が炎症性腸疾患治療薬として臨床応用が可能かどうか、動物モデルに投与し検討することを目的とした。

B. 研究方法

120 mg/ml trinitrobenzenesulfonic acid/50% ethanol 溶液 0.25 ml を、190-210 g オス Sprague-Dawley ラットに注腸し、腸炎を惹起させた。注腸後 5 日目に HGF を 0 μ g/kg (コントロール)、10 μ g/kg、100 μ g/kg、1000 μ g/kg 注腸した。注腸後 10 日目に屠殺、大腸を摘出し、Morris らの方法で肉眼所見を 6 段階にスコア化した。Hematoxylin-eosin 染色を施し、組織学的障害度を 10 段階にスコア化した。上皮細胞増殖能を評価するために Ki-67 免疫染色を施し、Ki-67 labeling index (LI) を算出した。粘膜炎症の指標として、粘膜 Myeloperoxidase (MPO) 活性を o-dianisidine 法を用いて測定した。結果は Kruskal-Wallis test で統計解析を行った。なお動物は、兵庫医科大学動物実験施設のガイドラインに基づいて扱った。

D. 考察

投与経路、投与回数、投与時期を検討する必要がある。投与経路および回数は、腹腔内または静脈内投与を考慮し、効果を得るために頻回に投与するか、ポンプを用いて持続投与する必要があるものと考えられる。投与時期は、HGF レセプターの発現が多いとされるより早期の時期に投与するべきかもしれない。これらの検討によって、炎症性腸疾患に対する HGF の治療効果についての真の結論が得られるものと考えられる。

C. 研究結果

HGF 投与量を増加しても、肉眼スコア、組織スコア、MPO 活性の有意な低下はみられず、また Ki-67 LI の有意な増加はみられなかった。

E. 結論

HGF の注腸投与は、本モデルにおいて治療効果を得ることはできなかった。今後、異なる投与経路での検討を試みる必要がある。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

粘膜上皮再生における Matrix Metalloproteinase の役割
Microarray Analysis of Genetic Reprogramming During Epithelial Restitution

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学 第1内科 教授

研究要旨

傷害腸管上皮修復・再生の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。MMPs は組織再構築に重要な分子とされ、粘膜傷害をきたすさまざまな病態において最終的な治療分子標的を提供するものと考えられる。炎症性腸疾患の傷害局所において MMPs 制御による上皮・ECM の破壊・再生のインバランス是正が粘膜上皮再生療法として新たな治療戦略となりうるか否か、Microarray を用いて総括的に検討する。

A. 研究目的

傷害腸管上皮修復再生の分子メカニズムは粘膜上皮がインテグリンの再配置を介して細胞外基質(ECM)とクロストークし、Matrix Metalloproteinase (MMPs)を de novo 発現して再上皮化にいたる一連の高度に統合、プログラムされた巧妙な機構である。MMPs は組織再構築に重要な分子とされ、粘膜傷害をきたすさまざまな病態において最終的な治療分子標的を提供するものと考えられる。炎症性腸疾患の傷害局所において MMPs 制御による上皮および ECM の破壊・再生のインバランスの是正が粘膜上皮再生療法として新たな治療戦略となりうるか否か基礎的検討を加える。

B. 研究方法

マウス DDS 腸炎モデルにおいて zymography 免疫組織化学、in situ hybridization、Real time PCR を駆使して上皮および ECM 再構築に重要な MMPs を同定し、その時間的空間的発現を定量的に明らかにする。次に MMPI (MMP inhibitor) 投与の治療効果に関して検討し、MMPI 介在による MMPs 制御の詳細を Microarray に

よって総括的に検討する。

C. 研究結果

BALB/c マウス急性腸炎モデル (5%DDS 大腸炎モデル) をもちいて Real time PCR 法によって MMPs (MMP-3、-7、-10、-13) および TIMP-1 の発現量を検討した。次に MMPI (GM6001) 介在による腸炎治療効果と MMPs 発現量に関して検討した結果以下の結果を得た。

(1) MMPs の発現は全体として亢進し、腸炎の経過に一致して亢進した。

(2) TIMP-1 発現との相対比でみるとその発現パターンは2群に大別された。すなわち、MMP-3、-10 はそれぞれ2倍、5倍発現量が亢進した。一方、MMP-7 および MMP-13 ではそれぞれ約 1/40 倍、1/20 倍に一旦低下しその後それぞれやや回復した。

(3) GM6001 (Ilomastat) には DDS マウスの体重減少抑制作用を認め、特に MMP-10 発現を抑制した。

D. 考察

今回の preliminary な基礎的検討におい

でもマウス DDS 腸炎の発症に MMPs が重要な役割を果たすことが示唆された。DDS 大腸炎における MMPs の空間的発現の検討は、免疫組織化学的には明らかではなかったが、MMP-3 は粘膜下の間質細胞にその発現が目立つ傾向が認められた。今後 *in situ hybridization* を用いて上皮 MMPs および ECM MMPs を同定すべくさらに検討を加える予定である。MMP-7、MMP-13 はそれぞれ上皮、間質の *integrin* 維持に寄与し腸炎発症に抑制的な作用が予想された。一方、MMP-3、MMP-10 は DDS 腸炎に *de novo* 発現し組織破壊の関連が疑われた。

E. 結論

MMPs 制御による上皮・ECM の破壊・再生のインバランスの是正が粘膜上皮再生療法として新たな炎症性腸疾患の治療戦略を提供する可能性が示唆された。

F. 研究発表

Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Fukushima H, Sasaki S, Mukaiya M, Hirata K, Imai K: Expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases in human adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 2001, 19: 1118-27.

有村佳昭、後藤啓、小林歆和、山本博幸、伊藤文生、今井浩三：Matrix Metalloproteinase 制御による粘膜上皮再生療法（第 39 回日本消化器免疫学会総会、2002 年 3 月）

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

n-酪酸の粘膜上皮再生に及ぼす影響

分担研究者 下山 孝 兵庫医科大学消化器内科 教授

研究要旨

ヒト糞便中の n-酪酸（以下、酪酸）濃度は潰瘍性大腸炎活動期の重症例では健常人に比し減少している。酪酸の大腸粘膜に対する有用性を、酪酸の起炎性の面と再生・増殖の面から検討した。ラット大腸内に注入した酪酸は糞便内に存在する他の低分子有機酸であるこはく酸や乳酸と異なり、スーパーオキシド産生を惹起しなかった。ヒト末梢血中の多核白血球に対して酪酸はこはく酸や乳酸と同様、直接にはスーパーオキシド産生を引き起こさなかったが、fMLP 刺激ではこはく酸や乳酸が priming effect を有していたのに対して、酪酸では priming effect はみられなかった。乳酸で惹起されたラット大腸炎に対して酪酸注腸が 5 日後に生食注腸に比し有意に改善を示し、BrDU による腺窩細胞の増殖は酪酸注腸では 24 時間後から有意な発現がみられた。以上のことより酪酸が炎症を惹起することなく、大腸粘膜上皮の再生・増殖に作用することが示唆された。

A. 研究目的

酪酸は短鎖脂肪酸のひとつであり、大腸内では主に偏性嫌気性菌の *Clostridium* 属より産生される。短鎖脂肪酸は大腸粘膜より吸収されてβ-酸化を受けエネルギー源となる。ヒト糞便中の酪酸濃度は潰瘍性大腸炎活動期の重症例では $1 \mu\text{mole/g}$ 前後で健常人の $20 \mu\text{mole/g}$ に比し有意に減少している。臨床的には活動期の潰瘍性大腸炎に対して酢酸やプロピオン酸とともに注腸療法の報告があり、有用性が述べられている。本研究では酪酸が大腸粘膜や炎症の組織学的指標である多核白血球に対する起炎性をスーパーオキシド産生の面から検討を加え、さらに実験大腸炎に対して酪酸注腸が組織学のおよび腺窩細胞の増殖の面からその有用性について評価した。

B. 研究方法

1. 体重が 250~300g の雄性 SD ラットをペントバルビタール麻酔下に左側大腸内腔に生食、10mM 酪酸または 100mM 酪酸を注入し腸管表面から産生するスーパーオキシドをウミホタルルシフェリン誘導体（CLA）を用いた化学発光法で 120 分間測定した。
2. Hanks 液にヒト末梢血中の 5×10^4 個の

多核白血球を加え、ウミホタルルシフェリン誘導体（MCLA）と $10^{-1} \sim 10^{-5} \text{mM}$ 酪酸または Hank 液を加え、化学発光法でスーパーオキシドの産生を測定した。引き続き、fMLP を加えてスーパーオキシドの産生を測定した。

3. 体重が 250~300g の雄性 SD ラットをペントバルビタール麻酔下に 1 M 乳酸を注腸し、大腸炎を作成したのち 24 時間後に生食、10mM 酪酸または 100mM 酪酸を注腸した。酪酸注腸後 1 日、3 日、5 日、7 日、14 日後に大腸を摘出し、ヘマトキシリンエオジン染色で MacPherson-Pfeiffer の炎症の grade を用いて評価した。

4. 上記と同様に処置を行い酪酸注腸後、1 日、3 日、5 日、7 日、14 日後に BrDU を静注し大腸腺窩細胞の増殖期細胞を計数した。

C. 研究結果

1. 生食、酪酸（10mM、100mM）投与では大腸粘膜からのスーパーオキシド産生はみられなかった。
2. 酪酸（ $10^{-1} \sim 10^{-5} \text{mM}$ ）では直接スーパーオキシド産生を惹起せず、fMLP 刺激においても酪酸は Hanks 液と同様、priming effect はみられなかった。

3. 乳酸による大腸炎は 100mM 酪酸投与で5日後に生食投与に比し、炎症が有意に改善した。

4. 大腸腺管の増殖期細胞は 100mM 酪酸投与で 24 時間後に生食投与に比し、有意に発現した。

D. 考察

酪酸が大腸粘膜の再生のエネルギー源であり、臨床的にも潰瘍性大腸炎の局所療法として有用であることが示されている。著者らは酪酸の大腸粘膜に対する直接炎症を起こす可能性と多核白血球に対する作用について、スーパーオキシド産生の面から検討し、他の大腸粘膜を傷害する糞便内低分子有機酸である乳酸やこはく酸と異なり、炎症の惹起に関与していないことが示された。また、実験大腸炎において酪酸の粘膜

再生を亢進することが示され、臨床的有用性を支持する結果が得られた。

E. 結語

酪酸には炎症を惹起することなく大腸粘膜上皮の再生増殖に作用することから、炎症性腸疾患をはじめとする粘膜傷害に対する今後の治療の選択肢のひとつとして、酪酸に関する臨床的知見の集積が必要と考えられる。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

マウス DSS 腸炎における IL-18 の粘膜修復に対する効果の検討

主任研究者 日比紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授

研究要旨

マウス慢性 DSS 腸炎の系において、IL-12^{-/-}マウスでは腸炎の軽減を認めたのに対して、IL-18^{-/-}マウス、IL-18R^{-/-}マウスでは wild type マウスより腸炎は重症化した。DSS 腸炎の発症に IL-12 がより直接的に関与し、IL-18 はむしろ粘膜防御的に作用している可能性が示唆された。

A. 研究目的

IL-18 は IL-12 と協調的に作用して IFN- γ 産生を誘導するサイトカインとして知られており、これまで我々は、クローン病の病態にマクロファージ由来の IL-18 ならびに IL-12 が深く関わることを報告してきた。また TNBS 腸炎をはじめとする実験腸炎モデルにおいては、抗 IL-12 抗体投与により炎症が改善することが報告されている。今回、IL-18^{-/-}、IL-18R^{-/-}ならびに IL-12^{-/-}マウスを用いて硫酸デキストラン（DSS）腸炎における重症度を比較し、腸炎発症機序とサイトカインの関連性につき検討した。

B. 方法

8-10 週齢の C57/BL6 IL-18^{-/-}マウス、IL-18R^{-/-}マウス、IL-12^{-/-}マウスおよび wild type マウスに 1.2%DSS を 7 日間自由飲水させた後、純水に換えて 14 日間観察し、これを 3 サイクル反復して慢性腸炎モデルを作成した。期間中の便の性状、体重変化に基づく臨床スコアの推移、および 3 サイクル終了後の組織学的スコアについて比較検討した。また粘膜固有層内単核球（LPMC）および脾細胞を単離し、フローサイトメトリーにより細胞表面マーカーの発現を解析した。

C. 結果

wild type マウスでは激しい下痢・血便、体重減少を認め、組織学的にも大腸粘膜に著明な炎症を認めた。これに対し IL-12^{-/-}マウスでは下痢と体重減少はわずかで、組織学的にもクリプトの脱落や炎症性細胞浸潤は軽度にとどまった。一方、IL-18^{-/-}マウス、IL-18R^{-/-}マウスでは、腸炎の重症度は wild type マウスよりむしろ悪化する傾向があった。LPMC および脾細胞の表面抗原（CD4, CD8, CD25, CD69, IL-18R）発現にはいずれのマウスの間にも明らかな差を認めなかった。

D. 考察

DSS 腸炎の発症は、IL-12^{-/-}マウスでは wild type に比べて明らかに抑制され、IL-12 がより直接的に作用しその発症に関与していることが考えられた。一方、IL-18^{-/-}マウス、IL-18R^{-/-}マウスにおいては、サイトカインネットワークのなかで何らかの代償機転の存在や他の増悪因子の関与が示唆された。

E. 結論

今回の成績により、IL-12 が腸炎発症に

直接関与する一方、IL-18 が粘膜上皮の傷害に対して、protective に作用している可能性が示唆された。

F. 研究発表

高木英恵、金井隆典、岡沢啓、佐藤俊朗、岸祐介、新井潤、一松収、長沼誠、緒方晴彦、石井裕正、渡辺守、審良静男、井上詠、岩男泰、日比紀文：IL-18^{-/-}、IL-18R^{-/-}ならびに IL-12^{-/-}マウスにおける実験腸炎発症機序の検討（第 43 回日本消化器病学会大

会、2001 年 10 月）

高木英恵、金井隆典、岡沢啓、佐藤俊朗、岸祐介、新井潤、一松収、緒方晴彦、渡辺守、審良静男、石井裕正、日比紀文：IL-18^{-/-}、IL-18R^{-/-}ならびに IL-12^{-/-}マウスにおける慢性腸炎発症機序の検討（第 39 回日本消化器免疫学会総会、2002 年 3 月）

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

クニッツ型セリンプロテアーゼインヒビターによる増殖因子活性調節に関する研究
（特に Hepatocyte Growth Factor (HGF), HGF Activator (HGFA) とそのインヒビター(HAI)について）

研究協力者 片岡寛章 宮崎医科大学第2病理 教授

研究要旨

肝細胞増殖因子 (HGF) は上皮細胞に対しても修復的な作用を有し、粘膜傷害に際して重要な役割を果たしている。HGF の活性化の制御には、肝細胞増殖因子活性化因子 (HGFA) およびその活性調節因子である HGF activator inhibitor (HAI) が関与している。HAI-1 は傷害を受けた上皮細胞に高発現し、HGFA をトラップして組織修復に重要な役割を果たしており、癌では HAI-1 の発現低下により、HGFA 活性が相対的に上昇し、HGF の活性化が亢進するということが示唆された。

A. 研究目的

肝細胞増殖因子活性化因子 (hepatocyte growth factor activator, HGFA) は肝細胞増殖因子 (HGF) を特異的に活性化させるセリンプロテアーゼとして発見された蛋白で、構造的に Factor XIIa や u-PA と相同性がある。その活性調節因子である HGF activator inhibitor (HAI) は、これまで HAI-1, HAI-2 の二種類が報告され、ともにこの HGFA を特異的に強く阻害することが明らかにされた。興味深いことに、HAI-1, HAI-2 は Kunitz 型と呼ばれるタイプのセリンプロテアーゼインヒビターで、PAI-1, PAI-2 や血清中の α_1 -ntitrypsin, antiplasmin, antithrombin-III などの Serpin と呼ばれるタイプのセリンプロテアーゼインヒビターが一旦プロテアーゼと反応すると失活するのに対し、プロテアーゼと可逆的に結合できるのが特徴である。したがって Kunitz 型インヒビターは本来のインヒビターとしての働きより、プロテアーゼ結合蛋白として細胞表面への結合は HGFA の活性基を介していることがわかった。クロスリンカーを用いた実験では細胞表面に結合した HGFA は膜型 HAI-1 と特異的に結合し、膜型 HAI-2 とは結合していないことが判明した。さらに CHO 細胞に HAI-1 もしくは HAI-2 を強制発現させると、HAI-1 を発現させた細胞のみが外から添加した HGFA を細胞表面に保持することができることか

プロテアーゼの運搬や保護の役割を果たしたり、レセプターとしてプロテアーゼの細胞膜上への凝集の役割を果たしている可能性がある。事実、HAI-1, HAI-2 は膜結合型のインヒビターであり、HAI は uPA レセプターのように、肝臓で特異的に産生される HGF activator を細胞表面に留めて HGF を細胞膜上で活性化することが推察された。

B. 方法・結果

膜型 HAI が細胞膜上で実際に HGFA のインヒビターとして働いているかどうかを確認するために、HAI-1 及び HAI-2 を共に発現している大腸癌細胞株に HGFA を添加すると、活性型 HGFA のみ細胞表面に結合し、非活性型 HGFA は結合しないことが判明した。また、活性型 HGFA をあらかじめ低分子量の合成セリンプロテアーゼインヒビターで処理しておくことにより、活性型 HGFA は細胞表面の膜型 HAI-1 と特異的に結合することが判明した。すなわち膜型 HAI-1 は活性型 HGFA の特異的細胞表面インヒビターであることが証明できた。

生体内での HAI-1 の局在について免疫組織学的に検討したところ、主として粘膜表面や管腔の内面を覆う単層円柱上皮の Basolateral surface にその発現が認められた。