

厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

デキストラン硫酸大腸炎モデルと *Yersinia enterocolitica* Hsp60 大腸炎
モデルにおける CD25⁺CD4⁺抑制性 T 細胞

研究協力者 八木田 旭邦 近畿大学 腫瘍免疫等研究所 教授

研究要旨: SCID マウスに CD25⁺CD4⁺細胞を移入したとき起きる大腸炎を CD25⁺CD4⁺T 細胞が抑制する。CD25⁺CD4⁺細胞は炎症などを抑制する細胞群であるといわれている。しかし、CD25⁺CD4⁺細胞は IBD 患者局所で増えていると報告されている。

今回、デキストラン硫酸大腸炎モデルの大腸 IEL で CD25⁺CD4⁺細胞を検討した。血便無しの非活動期個体で CD25⁺CD4⁺細胞が増加していたが血便ありの活動期個体で CD25⁺CD4⁺細胞は control 個体と同レベルであった。*Yersinia enterocolitica* Hsp60 大腸炎モデルの大腸 IEL で、CD25⁺CD4⁺ CD69⁺細胞が減少していた。デキストラン硫酸投与といった炎症性ストレスを制御するために大腸 IEL に CD25⁺CD4⁺抑制性細胞が増加するが、CD25⁺CD4⁺抑制性細胞比率が下がると活動期に突入する、もしくは活動期には CD25⁺CD4⁺抑制性細胞比率を維持できないとの仮説が考えられた。

共同研究者

助川 寧¹⁾、丸山正二¹⁾、山口博之²⁾、神谷 茂²⁾
所属 近畿大学腫瘍免疫等研究所¹⁾
杏林大学医学部感染症学²⁾

今回、DSS 大腸炎モデル(11)と *Yersinia enterocolitica* Hsp60 大腸炎モデル(12)で脾臓と大腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) の CD25⁺CD4⁺細胞をフローサイトで検討し、なぜ IBD モデルで CD25⁺CD4⁺抑制性 T 細胞が増加しているのかを考える上で有用な知見を得たので報告する。

A. 研究目的

CD25 (IL-2R α) は活性化マーカーとして知られていたが、SCID マウスに CD25-CD4⁺T 細胞を移入すると腸炎が発症するが同時に CD25⁺CD4⁺T 細胞を移入すると腸炎が発症しない、と坂口らが報告して以来、CD25⁺CD4⁺抑制性 T 細胞は免疫学のホットな話題のひとつに浮上している (1-5)。IL-10 Transgenic マウスの小腸 IEL は WT (野生型マウス) に比べて CD25⁺CD4⁺細胞比率が高く、IL-10 Transgenic マウスは WT に比べてデキストラン硫酸(DSS)大腸炎を誘導しにくくなるとの報告もあり(6)、CD25⁺CD4⁺細胞が腸炎を抑制すると考えられる。

しかし、新潟大 3 内などは、CD25⁺CD4⁺細胞は IBD 患者局所で増えていると本班会議などで報告している (7-9)。DSS 3 クールの慢性大腸炎で、投与中止 5 日後のマウス mesenteric lymph node の CD25⁺CD4⁺陽性率は、DSS 群 > control 群との報告もある (10)。

B. 研究方法

材料: デキストラン硫酸(DSS) (Lot. M90317) は塩水港精糖 (横浜) から購入した。精製 *Yersinia enterocolitica* Hsp60 は、大腸菌に *Yersinia enterocolitica* Hsp60 遺伝子を導入して製造し、8M 尿素を用いて精製した(12, 16-17)。マウスは日本 SLC (浜松) から雄性 B10A/SgSn を購入して用いた。抗体はいずれも BD PharMingen から購入した。Percoll は Amersham biosciences から購入した。

DSS 大腸炎モデル: マウスを 7 週齢で購入し、CE-2 飼料 (CLEA, Tokyo) を自由に摂食させた。2 週後より、5%DSS 水を自由に摂取させ、5 日後に犠死せしめ、大腸と脾臓を採取した。同じ期間、CE-2 を自由に摂食させた無処置マウスを普通食 control とした。

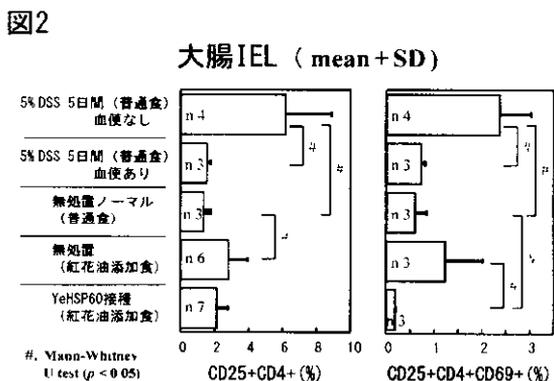
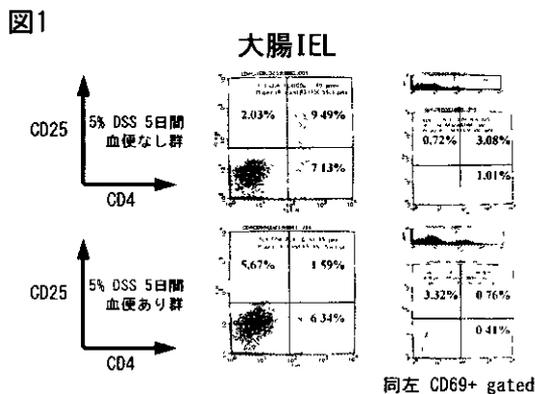
Yersinia enterocolitica Hsp60 大腸炎モデル: マウスを 3 週齢で購入し、5%紅花油添加 CE-2 を自由に摂食させた。1 週後より、精製 *Yersinia enterocolitica* Hsp60 を PBS に溶解して週に 1 回、3 μ g/回腹腔接種し、計 9 回接種

した3日後に犠死させ、大腸と脾臓を採取した(13)。同じ期間、5%紅花油添加 CE-2 を自由に摂食させ PBS を腹腔接種したマウスを紅花食 control とした。

フローサイトメトリー：脾臓はホモジナイザーペッセルですりつぶし、40 μm のメッシュを通して Free cell とし塩化アンモニウムで溶血処理した。大腸は腸管反転後に培地中で振盪し 40 μm のメッシュを通して Free cell とし、比重遠心法で 44% と 70% Percoll の境界を大腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) として採取した(18)。脾細胞と大腸 IEL は抗マウス CD16/32 (FcBlock) で処理後、抗マウス CD4 (clone L3T4) -FITC, 抗マウス CD25 (clone PC61) -APC, 抗マウス CD69 (clone HI.2F3) -PE で染色した。使用機器は BD FACS Calibur。死細胞除去には Propidium Iodide (PI) を用いた。

C. 研究結果

DSS 大腸炎モデル大腸 IEL: DSS 投与で肉眼的血便が見られなかった個体では、CD25+CD4+細胞が増えていた。しかし、肉眼的血便が見られた個体では CD25+CD4+細胞が増加せず、普通食 Control 群と同じ水準であった。この傾向は活性化マーカーの CD69 を加えた CD25+CD4+CD69+ の解析でも同様であった(図 1, 大腸 IEL dot plot、図 2, 大腸 IEL 棒グラフ)。

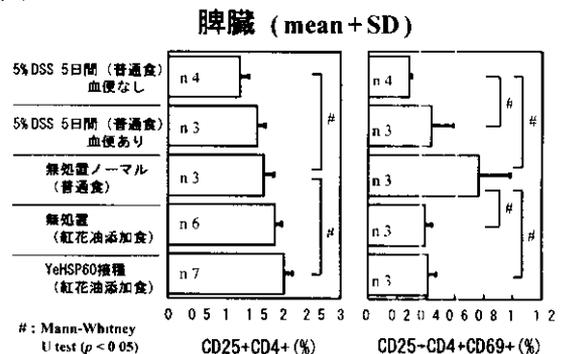


Yersinia enterocolitica Hsp60 大腸炎モデル大腸 IEL: 普通食に比べて紅花油添加食で飼育するだけで CD25+CD4+細胞が増加した。Yersinia enterocolitica Hsp60 を接種すると、紅花食 control に比べて有意に CD25+CD4+CD69+細胞が減少した(図 2, 大腸 IEL 棒グラフ)。

DSS 大腸炎モデル脾臓: DSS 投与により、普通食 Control 群に比べて CD25+CD4+細胞は肉眼的血便が見られなかった個体で、大腸 IEL とは逆に減少していた。この傾向は CD25+CD4+CD69+細胞でより顕著であった(図 3, 脾臓棒グラフ)。

Yersinia enterocolitica Hsp60 大腸炎モデル脾臓: 普通食に比べて紅花油添加食で飼育するだけで CD25+CD4+CD69+細胞が減少した。Yersinia enterocolitica Hsp60 を接種すると、紅花食 control に比べて CD25+CD4+細胞が増加した。(図 3, 脾臓棒グラフ)。

図3



D. 考察

Singh B らは SCID マウスに germ free (無菌) の系で CD4+CD25- を移入しても腸炎が発症しないと報告している (2)。デキストラン硫酸(DSS)大腸炎モデル(11) はもっとも汎用される潰瘍性大腸炎モデルであり、Yersinia enterocolitica Hsp60 大腸炎モデル(12-15) は本班会議などでわれわれが報告してきたモデルであるが、いずれも無菌マウスで発症し難い(15)ことから腸内細菌の関与があると考えられる。これが、CD25+CD4+抑制性 T 細胞を検討するにあたり DSS 大腸炎モデルと Yersinia enterocolitica Hsp60 大腸炎モデルを選択した理由である。

大腸 IEL で、DSS 投与で肉眼的血便が見られなかった個体では、CD25+CD4+細胞が増えていた。これは IBD の臨床報告や DSS 腸炎 mesenteric lymph node の報告と同様である(7-10)。しかし、肉眼的血便が見られた個体では CD25+CD4+細胞が増加せず、普通食 Control 群と同じ水準であった。この実験事実より、DSS 投与といった

炎症性ストレスを制御するために大腸 IEL に CD25+CD4+抑制性細胞が増加するが、CD25+CD4+抑制性細胞比率が下がると活動期に突入する、もしくは活動期には CD25+CD4+抑制性細胞比率を維持できないとの仮説が考えられる。

CD25+CD4+抑制性細胞は、Th1 → Th2 方向への調節もおこなっているとの報告がある(19)。ヒト潰瘍性大腸炎や DSS 大腸炎モデルが Th2 型疾患の要素を持つのは、非活動期に腸管局所に CD25+CD4+細胞が増加することが原因のひとつかもしれない。

大腸 IEL で、紅花油添加食で飼育するだけで CD25+CD4+細胞が増加した。過剰な n6 不飽和脂肪酸といった炎症性ストレスを制御するために大腸 IEL に CD25+CD4+抑制性細胞が増加するのかもしれない。*Yersinia enterocolitica* Hsp60 を接種すると、紅花食 control に比べて CD25+CD4+CD69+細胞が減少しており、このことが *Yersinia enterocolitica* Hsp60 大腸炎の発症に関与していると考えられた。

今回、大腸 IEL と脾臓では CD25+CD4+細胞が全く異なったパターンを示した。今回の DSS 大腸炎は 5 日間という DSS 大腸炎としては比較的短期間のモデルであるため、DSS 大腸炎血便無し個体の大腸 IEL に CD25+CD4+が動員されたために脾臓の CD25+CD4+が減少したとの解釈もありえる。いずれにせよ、大腸炎の解析のためには脾臓でなく大腸を材料とすることの重要性がここでも示されたものと思われる。

CD25+CD4+細胞と、活性化マーカーの CD69 を加えた CD25+CD4+CD69+細胞は、大腸 IEL では同じパターンであったが脾臓では異なったパターンを示した。CD25+CD4+細胞と、その分画である CD25+CD4+CD69+細胞は、少し挙動が異なる可能性が示唆された。

脾臓の CD25+CD4+CD69+細胞は、紅花油添加食で飼育すると有意に低下しており、n6 不飽和脂肪酸過剰食で全身的に炎症が起きやすくなっている状態を反映しているのかもしれない。

E. 結論

今回の結果から、「紅花油添加食飼育やデキストラン硫酸投与といった炎症性ストレスを制御するために大腸 IEL に CD25+CD4+抑制性細胞が増加するが、活動期には CD25+CD4+CD69+細胞比率が下がっている。」との仮説が考えられた。

F. 文献

- 1) 高橋武司, 坂口志文. CD4+/CD25+T 細胞と自己免疫疾患. *BIO Clinica* 2002 ; 17(4) : 368-372.
- 2) Singh B et al. *Immunol Rev* 2001;182:190-200.
- 3) Read S et al. *J Exp Med* 2000;192:295-302.
- 4) Willerford DM et al. *Immunity* 1995;3:521-530.
- 5) Poussier P et al. *Gastroenterology* 2000;118:880-891.
- 6) IL-10 Transgenic マウスはデキストラン硫酸大腸炎を誘導しにくくなる
- 7) Sasakawa S et al. *Digestion* 1995;56:516-522.
- 8) Schreiber S et al. *Gastroenterology* 1991;101:1020-1030.
- 9) Choy MY et al. *Gat* 1990;31:1365-1370.
- 10) Siegmund B et al. *ProcNatlAcadSci USA* 2001;98(23):13249-13154.
- 11) Okayasu I et al. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.
- 12) Sukegawa Y et al. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1188-1193.
- 13) Yagita A et al. *Dig Dis Sci* 1999;44:445-451.
- 14) 八木田旭邦ら. *臨床科学* 1998 ; 34 : 1645-1652.
- 15) 助川寧ら. *消化器と免疫* 1997 ; 34 : 92-94.
- 16) Yamaguchi H et al. *Microbiol Immunol* 1994;38:483-487.
- 17) Yamaguchi H et al. *J Med Microbiol* 1999;48:927-933.
- 18) 藤浦康良, 石川博通. *実験医学別冊 免疫研究の基礎技術* 羊土社 1995;62-67.
- 19) Stephens LA et al. *Eur J Immunol* 2001;31:2147-2154.

厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

Hypoxia inducible factor (HIF)-1 の腸管免疫制御機構への 関与に関する研究

分担研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部 医化学 教授

研究要旨：腸管免疫制御機構に関しては、従来サイトカインを介した免疫担当細胞間の相互作用などが重点的に研究されている。しかし、炎症局所の微小環境が免疫機構に与える影響に関しては、ほとんど研究されていない。そこで、われわれは、細胞が低酸素環境へ順応するために必要な生体反応に関わる分子群の発現を広く制御している転写因子である Hypoxia inducible factor (HIF)-1 の T cell conditional knock-out mouse を作製し、CD45Rb^{fl/fl} model を用いて、局所微小環境による免疫制御機構を解析する予定である。

A. 研究目的

腸粘膜免疫機構に関しては、免疫担当細胞間のサイトカインを介した相互作用などが重点的に研究されているが、微小環境、特に低酸素環境が局所免疫応答に与える影響については、これまでにほとんど研究がなされていない。腸粘膜に炎症が惹起された場合、腸粘膜内のリンパ球は、1) 粘膜内に homing することにより局所酸素濃度の低い血管外組織に移動すること、2) サイトカインや抗原刺激により増殖することで相対的に酸素利用度が限定されることなどにより、常に低酸素環境に曝されていると考えられている。実際、これまでに低酸素刺激によって誘導される vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現が、炎症性腸疾患 (IBD) 患者の腸粘膜内炎症性細胞で亢進していることが報告されており [Am J Gastroenterol. 96, 822-828, 2001]、低酸素環境が腸粘膜での局所免疫反応の制御および IBD の病態形成に大きく関わっている可能性が示唆されている。そこで、我々は、血管新生・エネルギー代謝・apoptosis など細胞が低酸素へ順応するために必要な生体反応に関わる分子群の発現を広く制御している転写因子である Hypoxia inducible factor (HIF)-1 に注目し、局所微小環境の IBD の病態への関与を検討することを目的とした。

B. 研究方法

HIFDF/LckCre mouse の作製：HIF-1 α の general

knock-out mouse は胎生致死のため、共同研究者である米国カリフォルニア大学サンディエゴ校生物学 Randall S Johnson 教授らが作成した Cre-loxP 系による HIF-1 α conditional knock-out mouse と Lck promoter 下に Cre recombinase を発現することのできる Transgenic mouse との交配により、HIF-1 α の T 細胞特異的な knock-out mouse (HIFDF/LckCre mouse) を作製した

HIF-1 遺伝子欠失の確認：胸線および脾臓細胞より Genomic DNA を抽出、PCR 法にて遺伝子の knock-out を確認した。

FACS 解析：胸線・脾臓より細胞を採取、FITC もしくは PE 標識の抗体を用いて染色、FACS caliber を用いて解析した。

倫理的配慮：実験動物に関しては、頸椎脱臼にて安楽死させ、必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

C. 研究結果

(1) HIFDF/LckCre mouse の胸線細胞では、ほぼ 100% の HIF-1 α 遺伝子の欠失を認めた。また脾臓細胞においては、T 細胞の割合 (約 30%) に相当する欠失を認め、中枢および末梢ともに T 細胞特異的に HIF-1 α 遺伝子が欠失されることが明らかになった。

(2) 胸腺細胞および脾臓細胞の表面マーカーを FACS に

て解析した。Table 1 に示す通り、T 細胞分化に異常を認めなかった。

B220+	47.6 %	42.8 %
CD4/CD8	0.62	0.60

Table.1

		HIFDF/LckCre	HIFDF
Thymus	CD4-CD8-	2.4 %	2.1 %
	CD4+CD8-	7.0 %	8.7%
	CD4-CD8+	1.8 %	3.4%
	CD4+CD8+	66.7%	63.4%
Spleen	CD3+	26.0 %	35.9 %

D. 結論

- (1) T 細胞特異的に HIF-1 α 遺伝子を欠失するマウスを作製した。
- (2) HIFDF/LckCre mouse では T 細胞分化に異常は認めなかった。

厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

炎症性腸疾患患者血中クリオフィブリノーゲンの臨床的意義

分担研究者 福田 能啓 兵庫医科大学 消化器内科 助教授

研究要旨：炎症性腸疾患（IBD）患者血液中に高頻度にクリオフィブリノーゲン（CFG）が出現すること（活動期潰瘍性大腸炎患者の 90.2%、活動期クローン病患者 65.7%に陽性）が判り、その臨床的意義をみつけるため、潰瘍性大腸炎、（活動期、緩解期、術後）、クローン病（CDAI という活動期、緩解期）、急性腸炎・自己免疫疾患を主にした disease control、健康成人を normal control とし、その出現頻度、濃度と重症度との関連を調べた。また、CFG を精製し、フィブリノーゲン以外にどのような物質が巻き込まれて CFG を形成しているのかを検討した。結果：CFG 量（定量）は、潰瘍性大腸炎の clinical activity index、クローン病の CDAI に正の相関を示すことが判ったが、白血球数や C-reactive protein (CRP) のような急性炎症マーカーとは相関しなかった。ただし、血沈との相関はあった。また、精製した CFG 中には、フィブロンectin、少量のアルブミンや免疫グロブリンのような非特異的物質が含まれているが、それ以外に、UTI (urinary trypsin inhibitor)、抗 UTI 抗体、MMP (matrix metalloproteinases) 8 と 9 が高率に含まれていることが判った。また、IBD 患者での UTI と抗 UTI 抗体の関係は逆相関しており、disease control や normal control の中にも少数にその存在を認める例はあったが、その両者に相関関係はなかった。結論：UTI はサイトカインや活性酸素の産生を抑制するため、炎症沈静化に関与する蛋白として認識されており、その UTI に対する抗 UTI 抗体の存在は粘膜再生に不利に働いていると考えられる。また、MMP8 と 9 は粘膜再構築のための粘膜破壊や白血球の炎症局所への浸潤を促進させる蛋白であるため、MMP8 と 9 が高濃度に存在する高 CFG 血症は、炎症の沈静化を妨げてしまい、慢性炎症の継続・治癒の遅延をもたらしている可能性が示唆された。

共同研究者

澤田康史、大西国夫、福永 健、
所属 兵庫医科大学消化器内科

ロネクチン、局所の治癒過程に関係すると報告のある尿中トリプシン抑制物質 urinary trypsin inhibitor (UTI) とその抗体、さらに組織の再構築と白血球の炎症局所への浸潤を促進させると報告されている matrix metalloproteinases (MMP) の陽性率と陽性であった場合その種類について検討した。

A. 研究目的

目的は、クリオフィブリノーゲン（CFG）の出現率、CFG 量と炎症性腸疾患の重症度の関係を検討し、また、CFG 中の特異的物質存在の有無を検討すること。

3) 研究組織：兵庫医科大学消化器内科、特殊治療研究グループ。

B. 研究方法

1) CFG の発生率は CFG 定性法で確認し、陽性であった症例はさらに定量法にてその濃度を測定した。潰瘍性大腸炎 (UC) は、その重症度（重症、中等症、軽症を clinical activity index で分類）との関係を検討し、クローン病 (CD) は Crohn's disease activity index (CDAI) との関係を検討した。

4) 対象患者とコントロール：UC または CD で、当院消化器内科入院中か消化器内科または第 2 外科外来通院中の緩解・軽症・中等症・重症、全大腸摘出術・回腸肛門吻合術 (IAA) 後患者を対象に、IBD 患者の年齢と性にマッチした disease control と normal control を選びコントロールとした。169 名の UC 患者、55 名の CD 患者を対象に、95 名の disease control と 20 例の正常コントロールを対照とした。対象患者は消化器内科入院中または外来通院治療中の UC、CD 患者で、対照患者は入院中または外

2) 精製した CFG に含まれるフィブリノーゲン以外の因子を分析。アルブミン、免疫グロブリン、フィブ

来通院治療中の急性腸炎患者、当院入院中の自己免疫疾患患者、癌患者を disease control として選び、当院のスタッフでC型肝炎、B型肝炎、梅毒、HIVの感染症がなく、肝臓・腎臓障害の認められない健康成人を normal control として治療研究を行った。

- 5) 検査方法: まず、患者同意のもとスクリーニング検査として4ml採血でCGFとクリオグロブリンの定性法を行った。定性法で陽性となった患者からは、さらに25mlの採血をさせて頂き、37℃のコンディションでACD液を抗凝固剤として血漿に分離した。その血漿0.5mlより冷却する前のフィブリノーゲン濃度を測定し、1.5mlで血漿中のUTI、抗UTI抗体、血中MMPを測定した。残りの血漿を二分し、その半分を4℃の冷蔵庫に24時間、もう半分を72時間放置し、CGFを形成させた後、再度遠心分離し、上澄みを取って4℃でのフィブリノーゲン濃度を測定した。37℃と4℃でのフィブリノーゲン濃度をCGF濃度とした。クリオグロブリンが陽性になった患者からは、上記の25mlに加え、抗凝固剤を加えない5mlの採血を加え、クリオグロブリンのさらなる解析を付け加えた。精製したCGF中の蛋白を分析し、また、UCの病状が難治である原因の一つと考えた抗UTI抗体を測定し、UTIと抗UTI抗体との関係を検討した。また、組織のremodelingに関係するMMPの存在を検討してみた。MMPが陽性的場合は、さらに、どのMMP分画であるか検討した。UTI、抗UTI抗体はELISA法にて、MMPは、Gelatin-Zymographyとfluorogenic substratesにて同定した。
- 6) Disease control: Disease controlは、腸の急性炎症である細菌性、(またはウイルス性と思われる)急性腸炎患者、CFGの出現が比較的高値と言われている悪性腫瘍患者と自己免疫・膠原病患者、そしてそれ上記以外の患者の年齢・性をマッチさせた患者を対象に比較検討した。
- 7) 正常コントロール: また、血液生化学検査でC型肝炎ウイルス抗体、B型肝炎ウイルス抗原・抗体、梅毒、人免疫不全ウイルス抗体、リウマチ因子、抗核抗体、肝臓・腎臓障害がなく、末梢血液検査で貧血、白血球数・血小板数、凝固系の異常がない年齢・性をマッチさせた病院スタッフを正常コントロールとした。

(倫理面への配慮)

患者への負担を少なくするため、CFG陽性になった

患者のみ25mlの採血をさせて頂き、本研究結果をすべての患者にお知らせした。CFGの臨床的意義はまだはっきりしないが、濃度が高いとUC、CD共に重症・難治傾向があることを伝え、それぞれの疾患における日常の注意点を守って頂くことをお願いした。

C. 結果

- 24時間冷却と72時間冷却で析出してくるCFG濃度に有意な変化はなかった。
- Disease controlは、急性炎症性腸疾患として20名、内訳は10名が細菌性の急性腸炎、ウイルス性腸炎を疑わせる(便中細菌培養陰性)の急性腸炎が10名であった。自己免疫・膠原病患者の患者が30名。その内訳は自己免疫性肝炎患者が11名、慢性関節リウマチが9名、原発性胆汁性肝硬変が5名、ベチェット病患者が2名、全身性エリトマトーデス患者が2名、多発性筋炎患者が1名であった。悪性腫瘍患者は21名で、その内訳は肝臓癌患者10名(抗C型肝炎ウイルス抗体陽性患者6名、抗B型肝炎ウイルス抗原HbsAg陽性でHB-DNA/TMA法陽性患者4名)、胃癌患者6名、大腸癌患者5名で、その他の病気の患者24名、その内訳は、慢性C型肝炎患者8名、高脂血症患者6名、胃または十二指腸潰瘍患者5名(すべてヘリコバクターピロリ陽性)、大腸ポリープ患者5名、であった。
- 疾患患者血液中に高頻度にCFGが出現し、活動期潰瘍性大腸炎患者の87.8%、活動期クローン病患者の65.7%に陽性だった。その陽性率は潰瘍性大腸炎の緩解期で55.6%に、大腸全摘術・Jポウチ形成術・回腸肛門吻合術(IAA)後の患者では33.3%に減少した。CDAI150点未満をクローン病緩解状態とすると、CFGは35.0%まで低下した。
- Disease controlでは、急性腸炎患者にCFGは認められず、急性炎症マーカーが高くてもCFGとは関連しなかった。Autoimmune & collagen diseaseではクローン病の活動期に相当するCFGの出現率(66.7%:20/30例)を認めた。それぞれの疾患病態の悪化時に採取したものであるが、後経過を終えた20例において、病状の改善に伴いCFG陽性率は低下(35.0%:7/20)した。この値もクローン病の緩解時と同様であった。
- 正常のコントロールでの検討では、検索できた40例中1例(2.5%)に低濃度ではあるが陽性を認めた。

6. 次に CFG 濃度を測定したところ、潰瘍性大腸炎の活動期患者で最も高く、続いて潰瘍性大腸炎緩解期患者とクローン病活動期患者、三番目に disease control の中の自己免疫・膠原病患者、そして四番目に潰瘍性大腸炎術後患者、クローン病緩解期患者と disease control のその他の患者であった。最後は disease control 中の急性腸炎患者と normal control であった。
7. CFG/フィブリノーゲン比を検討したところ、潰瘍性大腸炎で活動期・緩解期とも 17~18%と他の疾患と比べて高値で、続いてクローン病の活動期患者 (9%)、三番目に disease control の中の自己免疫・膠原病患者 (7%) と disease control のその他の患者 (6%)、四番目に潰瘍性大腸炎術後患者 (4%)、クローン病緩解期患者 (4%)、最後に disease control 中の急性腸炎患者 (0%) と normal control (3.5% for only one patient) であった。
8. 潰瘍性大腸炎患者の中で、病状の重症度と CFG の濃度との関係を見ると、重症つまり、lichtiger clinical activity index (L-CAI)が上がれば上がるほどその濃度が高くなることが判った。L-CAI が 1 以上で CFG 陽性率が 90%以上であったが、軽症では 72.7%となり、緩解期、術後では 55.6%、33.3%に下がっている。また、罹患年数と CFG の間にも正の相関があり、長くなればなるほどその濃度は高くなることが判った。
9. 軽症患者では、50mg 以上の高い CFG 量を持つ患者は認められなかったが、緩解期で、CFG が 50mg 以上ある患者が 63 人中 6 名 (9.5%) 存在した。
10. クローン病においても、CFG 濃度と CDAI で代表とする CD の重症度分類との関係は、CDAI が高くなればなるほど CFG 濃度は高くなる正の相関があった。CDAI300 点以上ではほぼ 100%、CFG が陽性になり、CDAI が 150~300 点の間では 55.6%、150 点未満なら 35%と低下していた。また、潰瘍性大腸炎と同様、罹患期間が長くなればなるほど CFG 濃度は上昇する正の相関があることが判った。

UTI と抗 UTI 抗体について

1. 炎症性腸疾患患者の CFG 中には UTI と抗 UTI 抗体の両方の蛋白が高率に存在し、UTI と抗 UTI 抗体の関係は、逆相関していた。

2. 少数ながら他の diseased control 患者や normal control 患者中の CFG 中にも UTI と抗 UTI 抗体は存在するが、両者に相関関係はなかった。
3. Disease control、normal control の血漿中より、検出できる MMP はなかったが (感度以下)、IBD 患者の血中より CFG が少量の検出され、CFG 中より高濃度の MMP8 と MMP9 が検出された。Disease control の CFG 中の MMP も同様に MMP8、MMP9 であった。

D. 考察

1. CFG 濃度が、血沈を除いた白血球数、CRP などの急性炎症マーカーと相関しないことは、CFG が単なる急性炎症マーカーではないことを意味している。また、CFG 濃度が高いと UC では CAI、CD では CDAI が高く、CFG が IBD の重症度に相関していることは、CFG が IBD の病状に悪影響を及ぼしていることに他ならない。
2. UTI は蛋白分解酵素阻害作用の他に、サイトカインや活性酸素産生を抑制する働きがあることが知られている。また、MMP は組織の remodeling、白血球の組織浸潤に関与すると言われているので、IBD 患者の CFG 中に見つかった抗 UTI 抗体は、病状を改善しようと働く UTI の作用をブロックしている可能性がある。また、抗体に結合された UTI は分子量が大きくなってフィブリノーゲンにより結合しやすくなり、CFG の一部を形成しているのではないだろうか？また、白血球よりでた余分な MMP は炎症近辺の正常組織までも破壊してしまう可能性があり、それを含んでいる CFG は、慢性炎症マーカーとして参考になるものと思われる。

E. 結論

CFG は IBD における慢性炎症の増悪因子、または、慢性炎症継続に重大な作用を持っている蛋白である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文投稿中
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

炎症性腸疾患病変粘膜におけるインターロイキン(IL)-17 発現細胞に
関する検討

分担研究者 藤山 佳秀 滋賀医科大学 消化器内科 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎（UC）やクローン病（CD）に代表される炎症性腸疾患の病因は未だ特定されていないが、T細胞由来の炎症性サイトカイン、インターロイキン(IL)-17について、炎症性腸疾患病変粘膜における発現について検討した。正常大腸粘膜、虚血性大腸炎、感染性腸炎において、IL-17 発現細胞は、ほとんど認められなかった。一方、UC および CD 患者病変粘膜では、IL-17 陽性細胞の優位な数的増加が認められた。特に、活動期 UC および活動期 CD 患者の病変粘膜において IL-17 陽性細胞の増加が著しかった。NF- κ B の活性誘導などを考えると、IL-17 の発現増強は、炎症性腸疾患の病因に関与しているものと考えられる。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎（UC）やクローン病（CD）に代表される炎症性腸疾患の病因は未だ特定されていないが、大腸炎の持続、再燃に、全身性および腸管粘膜局所における免疫制御の異常が関与していることが明らかにされつつある。急性炎症や慢性炎症の急性増悪においては、主に単球/マクロファージに由来するモノカイン（IL- 1β 、IL-6、TNF- α など）が急性反応蛋白の誘導などを介して重要な役割を果たしている。一方、T細胞に由来するサイトカインIL-2やインターフェロン(IFN)- γ の急性反応蛋白の誘導などに対する直接作用は概して弱い。この研究では、比較的最近見いだされ、その生物活性が徐々に明らかにされつつあるT細胞由来の炎症性サイトカイン、インターロイキン(IL)-17について、炎症性腸疾患病変粘膜における発現について検討した。

B. 研究方法

十分な説明のうえ同意の得られた UC(n=20)および CD(n=20)患者の内視鏡下生検および手術材料を用いて免疫組織化学的検討を加えた。対象として、正常粘膜 (n=15)、感染性腸炎 (n=5)、虚血性大腸炎(n=5)を用いた。組織は、パラフィン固定後、クエン酸緩衝液中でオートクレーブ加熱し、抗原を賦活した。一次抗体としてサンタクルーズ社のヤギ抗ヒト IL-17 抗体を用い、二次抗体としてベクター社ビオチン化ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を用い、ABC を用いて発色した。さらに、抗 CD 3

抗体および抗 CD68 抗体を用いて、IL-17 発現細胞を同定した。

C. 結果

正常大腸粘膜、虚血性大腸炎、感染性腸炎において、IL-17 発現細胞は、ほとんど認められなかった。一方、UC および CD 患者病変粘膜では、IL-17 陽性細胞の優位な数的増加が認められた。特に、活動期 UC および活動期 CD 患者の病変粘膜にて IL-17 陽性細胞の増加が著しかった。一方、抗 CD3 抗体および抗 CD68 抗体との二重染色では、粘膜内の IL-17 発現細胞は、T細胞だけでなく、単球/マクロファージでの発現も認められた。

D. 考察

IL-17 は CD4⁺ T細胞に特異的に発現しているとされるが、我々の検討では、単球/マクロファージにも発現が認められた。IL-17 は、皮膚線維芽細胞、関節滑膜細胞、血管内皮細胞、気管上皮細胞に作用して、IL-6、IL-8、MCP-1 などの炎症性サイトカイン産生を誘導する。また、骨髄 CD34⁺細胞に作用して G-CSF の産生を誘導する。これらの作用には、転写因子 NF- κ B の活性化が関与している(6)。消化器の分野における IL-17に関する研究は、現在までほとんど報告がないのが現状である。T細胞に富む腸管の炎症、特に炎症性腸疾患の病態における IL-17 の関与についてもほとんど明らかにされていない。ハーバード大学の Reinecker らのグループのラット腸管

上皮細胞 IEC-6 を用いた検討によると、IL-17 は NF- κ B の活性化を介してケモカイン CINC (ヒト IL-8 の homologue), MCP-1 の産生分泌を誘導する。ヒト腸上皮細胞でも IL-17 は濃度依存性に IL-8 および MCP-1 蛋白の産生を誘導した。また、Kinugasa らは、大腸癌細胞株 T84 細胞を用いて、IL-17 が tight junction の構成蛋白 claudin-2 の発現を誘導することにより腸管上皮の barrier 機能を増強することを示している。

今回の検討で、IL-17 の発現が炎症性腸疾患の病変粘膜に置いて増強していることが明らかになった。NF- κ B の活性化誘導などを考えると、IL-17 の発現増強は、炎症性腸疾患の病因に関与しているものと考えられる。ただ、tight junction 蛋白の発現誘導作用など、抗炎症性に作用している可能性も否定できない。今後、IL-17KO マウスや動物大腸炎モデルなどに抗 IL-17 中和抗体を投与してその効果について検討する予定である。

E. 結論

IL-17 は T 細胞に由来するサイトカインであるが、IL-1 β や TNF- α と共通する proinflammatory cytokine としての性格を示す点が興味深い。今後、炎症性腸疾患の病態への関与が明らかにされていくものと考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003 ;52:65-70.
- 2) Andoh A, Fujino S, Okuno T, Fujiyama Y, Bamba T. Intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14:33-37.
- 3) 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;10:631-634.
- 4) Andoh A, Shimada M, Bamba S, Okuno T, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 participate in interleukin-17 plus tumor necrosis factor-alpha-induced stabilization of interleukin-6 mRNA in human pancreatic myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2002;1591: 69-74.
- 5) Hata K, Andoh A, Shimada M, Fujino S, Bamba S, Araki Y, Okuno T, Fujiyama Y, Bamba T. IL-17 stimulates inflammatory responses via NF- κ B and MAP kinase pathways in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G1035-1044.
- 6) Andoh A, Fujino S, Bamba S, Araki Y, Okuno T, Bamba T, Fujiyama Y. IL-17 selectively down-regulates TNF- α - induced RANTES gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *J Immunol* 2002 15;169: 1683-1687

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

腸管上皮幹細胞の純化と機能解析

分担研究者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部 生理学教室 教授

研究要旨：腸管上皮幹細胞は腸管粘膜の再生において中心的な役割を担っているのにも拘わらず、その純化、機能解析に関しては全く検討されていない。今回我々は画期的な幹細胞純化技術を用いることにより、これまでの方法では全く成し得なかった腸管上皮幹細胞の純化を報告する。

A. 研究目的

腸管上皮幹細胞は全ての腸管上皮細胞に分化する多分化能を有しており、また、体内の中でも非常に増殖能の高い細胞の一つである。抗癌剤治療や炎症性腸疾患などの腸管粘膜障害時において、腸管上皮幹細胞の増殖・分化能はその治癒に必須のものとして知られているが、腸管上皮幹細胞を制御する因子が全く解明されていないため、治療に難渋する症例が多く存在する。このことは、腸管上皮幹細胞の研究は精力的に行われてきたにも拘わらず、その存在部位が腸管陰窩であることを除き、純化、機能解析が困難であったことに起因する。近年、造血細胞や筋細胞において DNA 結合色素 hoechst33342 の排出能を特徴とする SP (side population) 細胞に幹細胞が濃縮されることが報告され、普遍的な組織幹細胞純化法として注目されている。今回、我々はこの hoechst3332 染色を用いることにより、腸管上皮幹細胞の純化を試みた。

B. 研究方法

マウス腸管より採取した腸管上皮細胞より SP 細胞を解析した。また、腸管上皮をさらに絨毛上皮と陰窩上皮に分離し、SP 細胞の解析を行った。SP 細胞において、幹細胞マーカーと考えられる c-kit, Sca-1, ABCG2, β -catenin, musashi-1 の発現を RT-PCR, western blot, flow cytometry, 免疫染色にて解析した。

(倫理面への配慮)

本実験のうち動物を用いた実験に関しては、慶應義塾大学医学部動物実験センターの動物実験における指針に則り研究を行った。

C. 研究結果

腸管上皮において SP 細胞の存在が確認された。腸管上皮幹細胞の多く存在する陰窩上皮では SP 細胞が高率に認められたことに対し、絨毛上皮では SP 細胞は認められなかった。ABCG2 の発現は SP 細胞と MP (main population) 細胞の間に有意な差を認めなかった。また、c-kit, Sca-1 は腸管上皮細胞では発現が認められなかった。腸管上皮幹細胞の増殖・分化に重要とされる β -catenin, 神経幹細胞マーカーである musashi-1 の発現は SP 細胞において増加していることを見出した。

D. 考察

SP 分画を用いることにより、これまで困難とされてきた腸管上皮幹細胞の純化の可能性が示唆された。また、腸管上皮幹細胞において、Wnt シグナルの下流にある β -catenin, Notch シグナルの制御因子である musashi-1 の発現が増強していることよりこれらのシグナルの協調作用が腸管上皮幹細胞の増殖、分化にとって重要であることが示唆された。

E. 結論

これまで、特異的なマーカーがないため、純化が困難とされてきた腸管上皮幹細胞の純化の可能性を示した。今後、我々はこの方法を用いることにより、腸管上皮 SP 細胞の in vivo, in vitro における機能的な解析を施行し、これらの細胞による粘膜障害に対する粘膜再生治療を検討したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakakibara S, Nakamura Y, Koike M, Takano H, Uchiyama Y, Noda T, Okano H: RNA-Binding Protein Musashi Family, Roles for CNS Stem Cells and a Subpopulation of Ependymal Cells Revealed by Targeted Disruption and Antisense Ablation. **Proc Natl Acad Sci USA** 99: 15194-15199, 2002

Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke G, Sakakibara S, Okano H: Identification of a putative intestinal stem cell marker and early lineage marker; Musashi1. **Differentiation** 71: 28-41, 2003

Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H, Chiba T: Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. **FEBS Lett** 535:

131-135, 2003

Okano H, Imai T, Okabe M: Musashi: a translational regulator of cell fate. **J Cell Sci.** 115: 1355-1359, 2002

他 22 編

2. 学会発表

岡野栄之：「再生医学」第 19 回消化器血流研究会（東京）2002 年 10 月 12 日

岡野栄之：幹細胞システムを用いた中枢神経の再生医学 第 30 回日本実験潰瘍学会（東京）2002 年 11 月 30 日

他 多数

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許所得 出願準備中（1 件）
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

厚生省科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

粘膜再生治療－基礎面から－実験動物モデル

分担研究者 土肥 多恵子 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部 部長

研究要旨：研究要旨：本研究では消化管粘膜の特殊な細胞分化増殖機構を明らかにすることにより、炎症性腸疾患における組織の荒廃や発癌に対する予防及び診断・治療法を開発することを目的としている。上皮細胞のオートクリン因子として知られるアクチビンAは消化管上皮細胞の再生分化に関与しているが、本研究により、急性期の大腸マクロファージ系統細胞によっても産生されることが明らかとなった。さらに、アクチビン作用阻害物質フォリスタチン投与により、マウスハプテン誘導腸炎を抑制することができた。これはフォリスタチンの上皮細胞分裂促進作用によると考えられた。また、アクチビンAとその受容体は血管内皮細胞にも発現しており、血管内皮増殖因子(VEGF)による管腔形成促進作用のあることが明らかとなった。消化管粘膜上皮の再生修復において大きな役割を果たしている肝細胞増殖因子(HGF)の活性化因子HGF activator (HGFA)のノックアウトマウスを作成したところ、腸の実験潰瘍モデルで粘膜上皮の再生が遅延する傾向を示した。このことから、組織障害後の消化管粘膜上皮再生にはHGFAによる局所でのHGFの活性化が大変重要な役割を果たしていることが示唆され、難治性消化管潰瘍性病変の治療にHGFAが活用できる可能性が考えられた。マウスハプテン誘導腸炎にアゾキシメタンによる発癌実験を組み合わせ、潰瘍性大腸炎における特異な発癌モデル作成を試みた。

A. 研究目的

消化管の恒常性を保つためには、消化管粘膜特有な細胞回転機構が正常に働くことが重要である。この機構を解明することによって、炎症性腸疾患における組織の荒廃や発癌に対する予防及び診断・治療法を開発することが本研究の目的である。本年度は、研究協力者である小島 至(群馬大学生体調節研究所・調節機構部門細胞調節分野・教授)、中島 淳(横浜市立大学医学部第三内科・助教授)、片岡 寛章(宮崎医科大学第二病理・教授)らの研究協力を得て、以下の目的を定めて研究を実施した。

A-1: アクチビン-フォリスタチン系分子のマウス腸炎モデルにおける意義(担当; 土肥)。

これまでアクチビン-フォリスタチン系分子は上皮細胞のオートクリン分化増殖調節因子として知られてきたが、炎症時にもその産生が上昇する。マウス腸炎モデルにおけるフォリスタチン投与の効果を解析することにより、消化管の炎症における意義を検討した。

A-2: アクチビン-フォリスタチン系分子の細胞レベルでの機能解析(担当; 小島)

アクチビンはTGF- β スーパーファミリーに属する因子であるが、最近の研究により膝管、尿細管、気管など管腔性臓器の臓器形成・再生過程において管腔形成の制御

因子として機能していることが明らかになってきている。一方、アクチビンは血管においても発現しているがその意義は十分に明らかになってはいない。血管は管腔性の組織であり、血管形成・血管新生において管腔形成は重要なステップであることから、アクチビンが血管の管腔形成に関与しているかは興味深い点である。そこで血管内皮細胞の管腔形成におけるアクチビンの意義について検討を行った。

A-3: 腸管粘膜上皮再生における肝細胞増殖因子活性化因子の役割(担当; 片岡)

消化管粘膜上皮の再生修復において、肝細胞増殖因子(HGF)が上皮細胞の増殖、遊走、分化に大きな役割を果たしていることが明らかになってきた。しかし、HGFは非活性型蛋白として間葉系の細胞から分泌されており、傷害粘膜局所でどうやって活性化され、どのように働くかについてはまだ不明である。我々はこれまで、肝臓で主に発現していると考えられていたFactor XII類似の蛋白であるHGF activator (HGFA)が、消化管粘膜上皮細胞でも強発現しており、傷害組織でトロンピンによって活性化され、HGFを非活性型から活性型へ効率良く変換していることを報告してきた。今回、このHGFの活性化酵素であるHGFAノックアウトマウスを作製し、その解析をおこなったので報告する。

A-4: 潰瘍性大腸炎 (UC) における発癌の動物モデル作成 (担当; 中島、土肥)

UC においては、発症後 10 年をこえると大腸癌のハイリスクグループとなり、内視鏡検査による頻回のサーベイランスが必要である。

本疾患に起因する大腸癌は浸潤傾向が強く予後はあまり良くない。以上のような背景のもと、消化管免疫に異常をきたしている UC 組織には特徴的な組織再生・修復異常のメカニズムがあると考えられるため、本研究においてはマウス腸炎モデルにおける発癌モデルの作成と発癌機構の解析を目的とした。

B. 研究方法

B-1: 炎症モデル マウスにフォリスタチンをマウスに腹腔内投与し、上皮細胞の増殖分裂を BrdU の取り込みで解析した。また TNBS 腸炎に対するフォリスタチンの効果について検討した。

B-2: アクチビン・フォリスタチンの機能解析 ウシ大動脈由来の血管内皮細胞 (BAEC) を用いて実験を行った。BAEC をコラーゲンゲル内に培養し、血管内皮増殖因子 (VEGF) を添加すると管腔形成が誘導されることが知られている。アクチビン、アクチビン受容体、VEGF、VEGF 受容体の発現は RT-PCR、ウエスタンブロット法、免疫組織化学により検討した。アクチビン作用を抑制するためにフォリスタチンの添加およびアデノウイルスベクターを用いた変異アクチビン受容体遺伝子の導入を行った。

B-3: 肝細胞増殖因子活性化因子の役割 HGFA 遺伝子のエクソン 2-4 の領域をネオマイシン耐性遺伝子におきかえることで不活化したターゲットベクターを、常法どおり ES 細胞に遺伝子導入し、生まれたキメラマウスを交配させることによって HGFA ノックアウトマウスを作製した。

B-4: 腸炎発癌モデル TNBS 腸炎を wild type、IFN- γ 欠損マウス、IL-4 欠損マウスに誘導し、同時にアゾキシメタン (AOM) を繰り返し投与して発癌実験を行った。3 ヶ月後に大腸前癌病変である Aberrant Crypt Focus (ACF) の解析を、8 ヶ月後の解析で大腸癌の解析を行った。本年度は一部の実験群で発癌の結果が得られた。

(倫理面への配慮)

動物実験はそれぞれの施設の動物実験施設の規定に従い動物愛護に配慮した方法で行なった。

C. 研究結果

C-1: 炎症モデル フォリスタチン腹腔内投与後の消化管上皮の BrdU 取り込みを免疫組織学的に解析したところ、回腸及び大腸上皮で投与後 3 時間から上皮細胞増殖

の亢進が観察された。特に大腸では投与後 3 時間ですでに分裂細胞数が約 2 倍となっており、大腸ではアクチビンの作用により、定常状態で細胞増殖が抑制されていると考えられた。フォリスタチン投与 30 分後に TNBS 腸炎を誘導した群においては非投与群に比べて 24 時間後の潰瘍形成が少なく、組織学的スコアが優位に低かった。また、腸炎誘導後 24 時間での血中アミロイド A、IL-6 の値も低く、腸炎誘導後 3 日目における生存率はフォリスタチン投与群で優位に高かった。

C-2: アクチビン・フォリスタチンの機能解析 BAEC はアクチビン A およびアクチビン受容体を発現しており、アクチビン A がオートクリン因子として機能していることが示唆された。コラーゲンゲル内に培養した BAEC にアクチビン A を添加すると管腔形成が誘導された。アクチビン A の作用は VEGF と比較した場合、同程度かむしろやや強かった。またアクチビン A と VEGF の両者を添加することにより相加的な効果が認められた。BAEC はアクチビン A を発現していることから、内因性のアクチビン A の機能を評価するためにアクチビン作用を抑制するフォリスタチンを添加した結果、フォリスタチンはアクチビン A による管腔形成を抑制しただけでなく、VEGF による管腔形成をも著明に抑制した。変異アクチビン受容体遺伝子を導入してアクチビン作用をブロックした場合にも、やはり VEGF による管腔形成は完全に抑制された。VEGF とアクチビン A の作用の相互関係を明らかにするため、それぞれの発現に対する作用を検討した。アクチビン A の添加により VEGF の発現は増加し、同時に VEGF 受容体の発現も増加した。また VEGF の添加によりアクチビン A およびアクチビン受容体の発現が増加した。一方、フォリスタチンを添加して内皮細胞が産生する内因性のアクチビン作用を抑制すると VEGF 受容体の発現は大きく抑制された。

C-3: 肝細胞増殖因子活性化因子の役割 HGF ノックアウトマウスは肝臓及び胎盤の形成不全により胎生致死であるが、HGFA ノックアウトマウスは正常に生まれ、正常に生殖能も持っていた。HGF の活性化能はノックアウトマウス血清中には認められないので、HGFA の機能は完全に欠損していた。実験的にデキストラン硫酸を経口投与して作製した大腸炎では、コントロールマウスは投与中止後 3 日目には一部うっ血や浮腫が認められるもののほぼ粘膜上皮の再生が完了しているのに対し、ノックアウトマウスでは、投与中止後もまだ炎症が引き続いており、粘膜上皮の再生が遅延する傾向にあることが判明した。

C-4: 腸炎発癌モデル 長期の観察を要するため最終的な結果は本年度中には判定できなかったが、AOM 単独投与群よりも AOM 投与+TNBS 腸炎群において、早い時期から出血・腫瘍形成が観察されている。また、Th2 優位の免疫状態にある IFN- γ ノックアウトマウスにおいても同様の傾向が見られている。

D. 考察

D-1: 炎症モデル フォリスタチンによるアクチビン作用のブロックにより、TNBS腸炎を軽減することができた。大腸では定常的にアクチビンにより上皮細胞分裂が抑制されていると考えられる。腸炎急性期にはマクロファージの産生するアクチビンが加わって、上皮の再生を阻害している可能性がある。フォリスタチン投与により上皮の速やかな再生を促し、潰瘍形成を防ぐことによってTNBS腸炎による菌血症に陥るのを妨げ、マウスの致死率を下げたのではないかと考えられる。

D-2: アクチビン-フォリスタチンの機能解析 今回の検討の結果、アクチビンAが血管内皮細胞のオートクリン因子として機能していることが明らかになった。アクチビンAは自身が管腔形成作用をもつだけでなく、内皮細胞の管腔形成を制御するもっとも重要な因子であるVEGFの作用初現においてもきわめて重要な機能を果たしている。すなわちVEGFの作用によりアクチビンの発現が誘導され、その結果、VEGFの産生やVEGFの受容体を誘導して作用を増強させる。さらに内因性のアクチビンがないとVEGFはもはや作用を発現することができない。したがってオートクリンアクチビンは血管内皮細胞の管腔形成、すなわち毛細管血管形成において必須な因子であることが明らかになった。VEGFは糖尿病性網膜症、癌などの様々な病態に関与しており、その作用を抑制することがこれらの病態の治療に有効であることが知られている。一方、閉塞性動脈硬化症などの治療にはVEGFの投与が有効であることも知られている。これらの病態の治療に、アクチビンやそのアンタゴニストであるフォリスタチンが有効である可能性がある。

D-3: 肝細胞増殖因子活性化因子の役割 正常な成長時のHGFの活性化にはHGFAは関与していないか、あるいは他の酵素で代償されている可能性が考えられるが、炎症や組織障害後の消化管粘膜上皮再生にはHGFAによる局所でのHGFの活性化が大きな役割を果たしていることが示唆され、難治性消化管潰瘍性病変の治療に、活性化型HGFの投与と共に、内在性HGFの活性化を促すHGFAが活用できる可能性が考えられる。

D-4: 腸炎発癌モデル 一般の自然発症大腸癌と比べてUCにおける大腸癌はその形態学な差異、予後の悪さを考えると全く別なものと考えられる。したがって本研究における発癌+腸炎モデルでのメカニズム解析が、IBDにおける特異な上皮細胞回転の異常による発癌のメカニズムの解明と治療法につながる知見が得られると期待される。

E. 結論

1. フォリスタチンに消化管上皮増殖促進と腸炎の抑制効果のあることが明らかになった。
2. アクチビンAは血管内皮細胞のオートクリン因子として機能し、その管腔形成を制御している。
3. HGFAノックアウトマウスを作製した。正常な成長には、HGFAは大きな影響を及ぼさないが、炎症や組織

障害後の消化管粘膜上皮再生にはHGFAによる局所でのHGFの活性化が大変重要で大きな役割を果たしていることが示唆された。現在さらに実験数を増やしてこの結果を確認するとともに、マウスリコンビナントHGFAを作製し、治療に応用できるかどうか検討中である。

4. 潰瘍性大腸炎における発癌の実験モデルを作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato, H, Fujihashi, K, Kato, R, Dohi, T, McGhee, JR: Lack of oral tolerance in aging is due to sequential loss of T cell responses in Peyer's patches. *International Immunology*. 15: 145-158 (2003)
2. Dohi, T, Fujihashi, K, Koga, T, Shirai, Y, Kawamura, Yi, Ejima, C, Kato, R, Saitoh, K, McGhee, Jr: T Helper Type-2 Cells Induce Ileal Villus Atrophy, Goblet Cell Metaplasia And Wasting Disease In T Cell-Deficient Mice. *Gastroenterology*. in press: (2003)
3. Hashimoto, M, Kirikae, F, Dohi, T, Adachi, S, Kusumoto, S, Suda, Y, Fujita, T, Naoki, H, Kirikae, T: Structural study on lipid A and the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from a clinical isolate of *Bacteroides vulgatus* from a patient with Crohn's disease. *Eur J Biochem*. 269: 3715-21 (2002)
4. Maeshima, K., Maeshima, A., Kishi, S., Kojima, I. Critical role of activin A in the branching morphogenesis of vascular endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor. (submitted for publication).
5. Kataoka, H., Itoh, H., Nuki, Y., Hamasuna, R., Naganuma, S., Kitamura, N., and Shimomura, T. Mouse hepatocyte growth factor (HGF) activator inhibitor type 2 lacking the first Kunitz domain potently inhibits the HGF activator. *Biochem. Biophys Res Commun.*, 290: 1096-1100 (2002).
6. Yamauchi, M., Itoh, H., Naganuma, S., Koono, M., Hasui, Y., Osada, Y., and Kataoka, H. Expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2 (HAI-2) in human testis: Identification of a distinct transcription start site for the HAI-2 gene in testis. *Biol. Chem.*, 388: 1953-1957 (2002)
7. Katayama K, Wada K, Nakajima A, Yoshida S, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawa S, Kadowaki T, Nagai R, Kamisaki Y, R.S.Blumberg, Mayumi T, A novel PPAR γ -gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model, *Gastroenterology*, (2003) in press
8. Osawa E, Nakajima A, Wada K, Ishimine S, Fujisawa N, Kawamori T, Matsushashi N, Kadowaki T, Ochiai M, Sekihara H, Nakagawa H., Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Ligands Suppress Colon Carcinogenesis Induced by Azoxymethane in Mice, *Gastroenterology*, 124, 361-367, (2003)

9. Nagase H, Nakajima A, Sekihara H, D.A.York, G. A.Bray, Regulation of feeding behavior, gastric emptying, and sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue by galanin and enterostatin: the involvement of vagal-central nervous system interactions, *Journal of Gastroenterology*, 37, 118-127, (2002)
 10. Matsuhashi N, Akahane M, Nakajima A, Barium Impaction Therapy for Refractory Colonic Diverticular Bleeding., *AJR*, 180, 490-492, (2003)
 11. Matsuhashi N, Nishi Y, Nagoshi D, Kanemoto H, Nakajima A., Epidemic Enterocolitis Possibly as a Result of Norwalk Virus Infection Presenting as Ischemic Colitis., *Digestive Endoscopy* (2003) in Press
 12. Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsuhashi N, Nagai R, Blumberg RS., Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonist Ligands Stimulate a Th2 Cytokine Response and Prevent Acute Colitis., *Inflamm Bowel Dis* 8(5), 330-9, (2002)
 13. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, Saito T, Sekihara H, Oral Administration of Lactoferrin Reduces Colitis in Rats Via Modulation of the Immune System and Correction of Cytokine Imbalance, *J Gastroenterol Hepatol* , 17(12), 1291-8, (2002)
 14. Zhu X, Peng J, Raychowdhury R, Nakajima A, Lencer WI, Blumberg RS., The Heavy Chain of Neonatal Fc Receptor for IgG is Sequestered in Endoplasmic Reticulum by forming Oligomers in the Absence of Beta2-microglobulin Association., *Biochem J* , 367, 703-14, (2002)
 15. Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadowaki T, Niwa H, Kamisaki Y. Nitration of PPAR γ inhibits ligand-dependent translocation into nucleus in macrophage-like cell line, RAW 264 cells., *FEBS LETT*, 525, 43-47., (2002)
 16. Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, Kadowaki T, Mayumi T, Yura Y, Kamisaki Y .PPAR γ ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice, *European J Pharmacology*, 448, 231-238, (2002)
 17. Nakajima A, Wada A, Katayama K, Saubermann L, Yoshida S, Osawa E, Nagase H, Ueno N , Matsuhashi N, Aburatani H. Gene Expression Profile After Peroxisome Proliferator Activator Reseptor- Ligand Administration in Dextarn Sodium Salfate Mice., *J Gastroenterol*, 37, 62-66, (2002)
 18. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Umezawa T, Nakajima A, Naito M, Sato S, Saito T, Sekihara H. Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance., *Am J Physiol.*, 238, 187-195, (2002)
 19. Nakajima A, Iijima H, Neurath MF, Nagaishi T, Nieuwenhuis EE, Raychowdhury R, Glickman J, Blau DM, Russell S, Holmes KV, Blumberg RS. Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. *J Immunol.* 168 1028-1035 (2002)
 20. Osawa E, Nakajima A, Yoshida S, Omura M, Nagase H, Ueno N, Wada K, Matsuhashi N, Ochiai M, Nakagama H, Sekihara H Chemoprevention of precursors to colon cancer by dehydroepiandrosterone (DHEA). *Life Sci.* 70 2623-2630 (2002)
 21. Wada, K., Nakajima. A, Blumberg, RS. PPAR and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Trends Mol. Med.* 7 329-377, (2001)
 22. Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi, S, Kadowaki T, Blumberg R.S, Nagai R, and Matsuhashi N. Novel anti-inflammatory pathway mediated by PPAR γ in ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology.* 120 460-469 (2001)
 23. Naganuma, S., Itoh, H., Uchiyama, S., Tanaka, H., Nagaike, K., Miyata, S., Uchinokura, S., Nuki, S., Akiyama, Y., Chijiwa, K., and Kataoka, H. Characterization of transcripts generated from mouse hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2 (HAI-2) and HAI-2-related small peptide (H2RSP) genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2003) in press.
 24. Kataoka, H., Itoh, H., and Koono, M. Emerging multifunctional aspects of cellular serine proteinase inhibitors in tumor progression and tissue regeneration. *Pathol. Int.*, 52: 89-102 (2002).
 25. Itoh, H. and Kataoka, H. Roles of hepatocyte growth factor activator (HGFA) and its inhibitor HAI-1 in the regeneration of injured gastrointestinal mucosa. *J. Gastroenterol.*, 37 (Supple 14): 15-21 (2002)
2. 学会発表
1. 河村由紀, 白井裕子, 加藤理恵, 濱端崇, 山本正文, 古川鋼一, Kohtaro, F, McGhee, JR, 土肥多恵子: GM1 ganglioside functions as a receptor for pathogen-associated molecular patterns (PAMP). 第32回日本免疫学会総会・学術集会, 2002, 東京
 2. 河村由紀, 白井裕子, 濱端崇, 古川鋼一, 土肥多恵子: コレラ毒素によるマウス骨髄由来樹状細胞の分化誘導機構. 第13回日本樹状細胞研究会, 2002, 岡山
 3. 加藤理恵, 河村由紀, 白井裕子, 土肥多恵子: IL-4 receptor signal regulates intestinal regeneration and differentiation in vivo. 第32回免疫学会総会, 2002, 東京
 4. Dohi, T: IBD in GALT minus mice. Lymphotoxin in the mucosal immune system and in B cell biology, 2002, Birmingham
 5. Dohi, T, Fujihashi, K, Shirai, Y, Kawamura, YI, Kato, R, McGhee, JR: Small intestinal transformation and wasting disease induced in T cell deficient mice by adoptive transfer of CD45RBhi Th2 cells. AGA Research Forum, Epithelial cell-immune cell interactions, Digestive Disease Week Annual Meeting, 2002 San Fransisco
 6. Dohi, T, Kato, R, Fujihashi, K, McGhee, JR, Shirai, Y, Kawamura, YI: Dysregulated Cytokine Network Alters Turnover Of Intestinal Epithelial Cells. *Keystone*

- symposia: Microbial - Epithelial - Lymphocyte Interactions in Mucosal Immunity (F1), 2002 Brickenridge
7. 土肥多恵子, 河村由紀, 白井裕子, 加藤理恵, 江島智子: Activin-follistatin system: novel players in mucosal inflammation. 第32回日本免疫学会総会, 2002, 東京
 8. 土肥多恵子, 加藤理恵, 白井裕子, 河村由紀: Mucosal cytokine imbalance alters proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells. 第88回日本消化器病学会総会, 2002 旭川、
 9. 白井裕子, 加藤理恵, 河村由紀, 齊藤幸夫, 土肥多恵子: ヒト大腸粘膜固有層内単核細胞の腸管内常在菌LPSに対する応答. 第88回日本消化器病学会総会, 2002 旭川
 10. 前嶋京子, 前嶋明人, 岸章司, 小島至, オートクリン因子アクチビンによる血管新生の制御. 第6回日本免疫学会総会, 2002年 大阪
 11. 小島至, 前嶋京子, 前嶋明人. オートクリン因子アクチビンによる血管新生の制御 第25回日本分子生物学会シンポジウム, 2002 横浜
 12. 片岡寛章, 伊藤浩史, 長沼誠二, 秋山裕: 癌細胞浸潤先端部における膜型プロテアーゼインヒビター HAI-1 の高発現, 第91回日本病理学会総会 (2002) 横浜
 13. 伊藤浩史, 片岡寛章: 消化管上皮細胞に発現する Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor (HAI) type2-Related Small Peptide (H2RSP) 遺伝子の同定とその機能解析, 第88回日本消化器病学会総会 (2002) 旭川
 14. 片岡寛章, 長沼誠二, 内山周一郎, 長池幸樹, 田中弘之, 伊藤浩史: 癌細胞浸潤先端部における膜型プロテアーゼインヒビター HAI-1 の発現, 第61回日本癌学会総会 (2002) 東京
 15. 長沼誠二, 伊藤浩史, 内山周一郎 片岡寛章: マウス Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor (HAI) type 2-Related Small Peptide (H2RSP) 遺伝子の同定とその機能解析, 第25回日本分子生物学会年会 (2002) 横浜
 16. 田中弘之, 伊藤浩史, 長沼誠二, 長池幸樹, 片岡寛章: マウス Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor type 1 (HAI-1) 及び type 2 (HAI-2) 遺伝子のクローニングとマウス及びヒト HAI-1 遺伝子プロモーター領域の解析, 第25回日本分子生物学会年会 (2002) 横浜
 17. Naganuma, S., Itoh, H., Tanaka, H., Uchiyama, S., Nagaïke, K., and Kataoka, H.: Possible roles of a novel small nuclear peptide, hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2 (HAI-2)-related small peptide (H2RSP), on the differentiation and regeneration of gastrointestinal epithelial cells. 3rd Colloquium for the Study of Gastrointestinal Defense System 日本消化器免疫学会サテライトシンポジウム(2003) Osaka
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
特になし

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

粘膜再生における MMP の役割

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学 第一内科 教授

研究要旨：炎症性腸疾患における傷害腸管上皮修復・再生の分子機構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、組織傷害をきたすさまざまな病態において最終的な effector であり理想的な治療標的と考えられる。炎症性腸疾患の障害局所において 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再生療法として新たな治療戦略となりうるか否か検討する。

A. 研究目的

Matrix Metalloproteinase(MMP)は、様々な炎症性疾患において、組織の破壊や修復に直接関与すると報告されている。今回は腸管炎症における MMP の役割について明らかにするとともに、MMP 発現抑制による腸炎治療の可能性について検討した。

B. 研究方法

(1)Balb/c マウスに 3%DSS を 7 日間自由飲水させ腸炎を誘発。継時的(腸炎誘発期; day4, 7, 回復期; day 10)に屠殺し、大腸を摘出。Real time PCR により、MMP-2, 3, 7, 9, 10 および 13 の発現を定量した。

(2)上記 DSS 腸炎モデルにおいて、大腸組織を EDTA 処理により上皮と間質に分離し、各 MMP 発現の局在を検討した。

(3)マウス線維芽細胞 NIH 3T3 における非刺激および TNF- α 刺激(10ng/ml,24h)下における各 MMP の発現を検討した。

(4)上記細胞を用いて、TNF- α 下流のシグナル伝達阻害剤および MMP-3 特異的アンチセンスによる発現抑制を行った。使用した薬剤は MEK1/2 阻害剤 PD98059(40 μ M), p38 阻害剤 SB203580(10 μ M), proteasome 阻害剤 MG132(20 μ M)である。また MMP-3 アンチセンスオリゴは PS オリゴとし、翻訳開始領域と第一エクソン端を標的的部位として合計 3 種を設計し、使用した (10 μ M)。

C 研究結果

(1)DSS 7 日間投与により、day0 (正常)に比

して day7 では、MMP-3 (>200 倍)および MMP-10(100 倍)mRNA 発現が有意に上昇していた。MMP-3, 7 および MMP-10 について継時的に発現を検討したところ、MMP-3 および MMP-10 は day4 から day7 に直線的に増加し、DSS 投与中止後 3 日である day10 には低下が認められた。

一方 MMP-7 は day4 には上昇はなく、day7 から day10 に上昇を認めた。

(2)DSS 腸炎 day7 における MMP-3, 7 および 10 の発現を上皮と間質について検討すると、MMP-7 は上皮に、MMP-3 および MMP-10 は間質に局限した発現が認められた。

(3)NIH 3T3 において TNF- α 刺激下に MMP-3 の発現が誘導された。

(4)MMP-3 発現は PD98059, SB203580, MG132 によりそれぞれ 36%, 45%, 57%に抑制された。また MMP-3 アンチセンスにおいても約 20%に抑制された。

D. 考察

DSS 誘発マウス実験的腸炎モデルにおいてその炎症誘発期において、MMP-3 および 10 の発現が著増し、回復とともに低下することより腸管組織破壊への関与が示唆された。一方、MMP-7 は腸炎誘発早期には発現は増加せず、回復期に増加が認められた。MMP-7 の発現は上皮に局限し、上皮の修復に関与している事が示唆された。

MMP-3 の発現は、TNF- α により間質系細胞より産生され、TNF- α 下流の MAP キナーゼ、NF- κ b シグナル阻害により抑制された。また我々の設計したアンチセンスは効果的に MMP-3 の発現を抑制した。

E. 結語

MP は腸炎の発症や回復に密接に関係し、MMP を標的とした腸炎治療の可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. Yamamoto H, Imai K et al. Genes Chromosomes Cancer .

33:322,2002.

2. Matsuno K, Imai K et al. J. Gastroenterol. in press.

G. 知的所有権の取得状況

なし。