

IL-10^{-/-}マウスにおけるロキシスロマイシン (Roxithromycin) の 腸炎軽減効果

協力研究者 伊藤壽記 大阪大学大学院臓器制御外科 助教授

研究要旨: マクロライド抗生物質ロキシスロマイシン (roxithromycin) の長円形原稿化を慢性腸炎自然発症マウスである IL-10^{-/-}マウスを用いて検証した。既に重症腸炎を有するマウスに対する治療的短期投与、若年マウスにおける予防的長期投与、いずれにおいても腸炎軽減を認めた。これはロキシスロマイシンの抗菌作用に加え、免疫抑制作用によるものと考えられた。

共同研究者

水島桓和, 玉川浩司, 安政啓吾, 松田 宙
(大阪大学大学院 臓器制御外科)
甲斐康之
(大阪労災病院外科)

A. 研究目的

マクロライド系抗生物質はその抗菌活性ばかりでなく、免疫抑制作用を有するものがある。既に呼吸器系の慢性炎症に対しては有用性が認められており、マクロライドの免疫抑制作用によるものと考えられている。このたび、マクロライドに属するロキシスロマイシン (roxithromycin: RXM) を用い、IL-10 欠損マウス (IL-10^{-/-}) 腸炎に対する効果を検証した。

B. 研究方法

- 1) 治療効果の検証: 脱肛を有する IL-10^{-/-}マウス (16 週齢) に RXM20mg/kg/日 10 日間経口投与。
- 2) 予防効果の検証: 腸炎が無～軽度の若齢 IL-10^{-/-}マウス (5 週齢) に RXM20mg/kg/日 20 週間経口投与。薬剤投与終了後、病理学的検索と免疫学的検索 (IFN- γ , IL-4 産生) および糞便の細菌培養を行った。何れの群においても PBS 投与 IL-10^{-/-}マウスを対照とした。

C. 研究結果

- 1) RXM 群では非投与群に比して病理学的炎症像の軽減と急性期炎症性蛋白 (血清アミロイド A) の低下を認

めた。糞便細菌培養では非投与群と有意な変化を認めなかった。腸管粘膜固有層のリンパ球数には有意差を認めなかったが、IFN- γ , IL-4 産生能は低下傾向にあった。

- 2) RXM 群では非投与群に比して、脱肛発生率に有意な低下を認め、組織学的にも炎症の軽減と血清アミロイド A の低下を認めた。糞便細菌培養では RXM 群において *Bacteroides* の減少を認めた。腸管粘膜固有層由来リンパ球 (LPL) によるサイトカイン産生を検討したところ、RXM 群に IFN- γ の低下傾向と IL-4 の著明な産生抑制を認めた。

D. 考察

IL-10^{-/-}マウスに対する RXM 短期投与では、腸内細菌に有意な変化を与えることなく腸炎が軽減された。一方、長期投与においては腸内細菌の変化とサイトカイン産生抑制が認められた。これらより短期投与においては抗菌作用よりは免疫抑制作用が、また長期投与においては RXM の抗菌作用と免疫抑制作用によるものと考えられた。

E. 結論

マクロライド系薬剤 RXM は、IL-10^{-/-}マウスの重症腸炎の軽減作用、および腸炎発症抑制作用があることが示された。

Probiotics の腸管上皮 toll-like receptor 発現に対する効果の検討

協力研究者 鈴木康夫 東邦大学医学部付属佐倉病院内科 助教授

研究要旨: Probiotics 製剤成分である *Bacillus mesentericus* (BM), *Streptococcus faecalis* (SF), *Clostridium butyricum* (CB) の 3 種類の菌体により、自然免疫発現に重要な toll-like receptor (TLR) の一つ TLR4 のヒト大腸癌細胞株 HT29 における発現に対する作用を検討したところ、CB の培養上清添加によって発現は有意に抑制された。また、 $\text{INF}\gamma$ 添加によって増強した TLR4 の発現も同時に抑制された。また、CB 培養上清の有機酸解析によって酪酸が主成分であり、酪酸添加によっても TLR4 発現抑制が再現された。以上より、probiotics 製剤有効性発揮の機序の一つとして、酪酸産生を介した腸管上皮 TLR4 発現抑制による抗炎症作用が考えられた。

共同研究者

磯野貴史、勝野達朗、齋藤康
(千葉大学大学院医学研究院細胞治療学)

A. 研究目的

遺伝子操作によって作製された各種炎症性腸疾患類似動物モデルに於いて無菌状態では腸炎を発症しないことが証明されたこと、抗菌剤投与が炎症性腸疾患患者に有効との報告がなされたことなど炎症性腸疾患の病因病態において腸内細菌叢の重要性が認識されつつある。一方、炎症性腸疾患類似腸炎発症動物モデルや炎症性腸疾患患者に対して probiotics の投与によって腸炎の改善効果を認めたとの報告がなされている。Probiotics とは宿主に保健効果を示す生きた微生物を含む食品であることを考えると、probiotics の投与効果は腸内細菌叢の腸炎発症に果たす役割に影響を及ぼして治療効果を発揮していることが推測されるが、未だ詳細な機序は不明のままである。最近、リンパ球を中心として成立している獲得免疫に対して病原体構成成分の特異的分子パターンを認識する限られた数の受容体によって成立する自然免疫の存在が明らかにされ、その中でも特に重要な役割を果たす toll-like receptor (TLR) ファミリーが発見され注目されている。TLR ファミリーは主にマクロファージなど顆粒球系細胞表面に発現し 10 種類存在することが確認されているが、腸管上皮にも発現することや炎症性腸疾患患者の腸

管粘膜で TLR 発現の亢進が報告された。そこで炎症性腸疾患に対する probiotics 有効性発現機序解明を目的として、腸管上皮表面に発現する TLR、特に腸内細菌叢の中で重要なグラム陰性桿菌の病原体構成成分リポポリサッカライド (LPS) に対する受容体である TLR4、発現に対する効果を検討することにした。

B. 研究方法

ヒト大腸癌細胞株 HT29 における TLR4 mRNA 発現量の変化を real time RT-PCR 法によって測定した。Probiotics としては、生菌製剤として臨床投与されている *Bacillus mesentericus* (BM), *Streptococcus faecalis* (SF), *Clostridium butyricum* (CB) の 3 種類の菌体を用いた。HT29 (2×10^5 cell) を直径 6cm の culture-well に sub-confluent で 24 時間培養後更に (1): BM, SF, CB 菌の培養上清を各々添加した場合 (2): BM, SF, CB 死菌体を各々添加した場合 (3): BM, SF, CB 各々の培養上清と $\text{INF}\gamma$ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を同時添加した場合 (4): BM, SF, CB 各々の死菌体と $\text{INF}\gamma$ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を同時添加した場合、以上の 4 条件下で 6 時間培養後 total RNA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を抽出し real time RT-PCR 法 (ABI PRISM7000 Sequence Detection System) によって TLR4 mRNA 発現量を測定した。(5): 菌体培養上清中の有機酸成分を HPLC にて分析した。

C. 研究結果

HT29 を培養液のみで培養した時の TLR4 mRNA/GAPDH

mRNA を 100%として以下の結果を示す。(1): CB の培養上清添加により TLR4 mRNA 発現量は $16 \pm 8\%$ と有意に減少した。BM と SF の上清添加時には有意な変化を認めなかった。(2): 3 種類の死菌体添加時にはいずれの場合も TLR4 mRNA 発現量は有意な変化を認めなかった。

(3): INF γ 添加により $191 \pm 18\%$ に増加した TLR4 mRNA 発現量は、CB 菌培養上清の同時添加で $21 \pm 6\%$ と著明に抑制された。(4): INF γ 添加により $191 \pm 18\%$ に増加した TLR4 mRNA 発現量は、3 種類の死菌体同時添加ではいずれの場合も有意な変化を生じなかった。(5): CB 菌培養上清中有機酸成分を HPLC にて分析した結果、主成分は

Acetate (8.33mM), Butyrate (13.62mM), Formate (4.34mM) であった。これらの有機酸を単独あるいは組み合わせて HT29 に添加したところ、Butyrate 含有時のみ CB 菌培養上清添加時とほぼ同等の TLR4 mRNA 発現抑制効果を示した。

D. 考察

宿主に保健効果を果たす生きた微生物製剤 probiotics が各種疾患に対して副作用がなく安全で有効性を発揮することから注目されている。炎症性腸疾患においては以前から Lactobacillus や Bifidobacterium などを含む probiotics の有用性が報告されていたが最近、VSL#3 という probiotics 製剤¹⁾や非病原性大腸菌 Nissle19172) を投与し有効との報告がなされ新たに注目されている。しかしながら、probiotics 製剤がいかに有効性を発揮するか詳細な機序の解明は十分になされてはいない。顆粒球系細胞が果たす自然免疫作用に重要な受容体 TLR ファミリーが同定されると共に腸管上皮にも TLR ファミリーの発現が報告され、腸内細菌の TLR を介した腸管免疫炎症反応が注目されている。特に、TLR4 は腸内細菌叢の中で重要なグラム陰性桿菌構成成分 LPS によって NF κ B 活性亢進による各種炎症性サイトカイン産生に働き、Cario 等の報告では炎症性腸疾患腸管上皮の発現増強が示された³⁾。そこで probiotics 製剤有効性発現機序解明としてまず腸管上皮 TLR4 発現に対する作用の検討を目的として、既に広く一般臨床投与がなされている probiotics 製剤含有生菌である Bacillus mesentericus (BM), Streptococcus faecalis (SF), Clostridium butyricum (CB) の 3 菌体による作用を検討した。その結果、CB 培養上清添加時のみ有意に TLR4 発現が抑制された。また重要な炎症起因

性サイトカインで TLR4 発現亢進作用を有することが示されている IFN- γ 添加時に於いても、CB 培養上清は TLR4 発現亢進を有意に抑制した。IFN- γ の添加が炎症亢進状態の反映と想定すると、CB 培養上清は炎症増悪時 TLR4 発現抑制を介した抗炎症作用を発揮する可能性が示された。CB 培養上清有機酸分析によって酪酸が主成分であり、培養上清中と同濃度酪酸添加によって TLR4 発現抑制が再現されたことから、CB 培養上清による TLR4 の発現抑制作用は主に酪酸によると推測された。酪酸は以前から潰瘍性大腸炎注腸投与による治療効果や、各種粘膜保護作用や抗炎症効果が報告されている⁴⁾。今回の実験結果から、酪酸菌を含む probiotics 製剤が酪酸による腸管上皮 TLR4 発現抑制を介して有効性の一部を発揮していることが明らかにされた。今後は酪酸による腸管上皮 TLR4 発現抑制機序を明らかにする必要があると思われる。

E. 結論

酪酸菌を含む probiotics 製剤は、腸管上皮における TLR4 の発現抑制を介した抗炎症効果によって有効性の一端を担っていることが推測された。

F. 参考文献

- 1) Gionchetti P. et al. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119:305-309 2000
- 2) Kruis W. et al. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 11:853-858 1997
- 3) Cario E et al. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68:7010-7017 2000
- 4) Kinoshita M. et al. Butyrate reduces colonic paracellular permeability by enhancing PPAR γ activation. *Biochem Biophys Res Commun* 293:827-831 2002

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服対策研究事業
「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

チオレドキシンの炎症性腸疾患の病態への関与

分担研究者 千葉 勉 京都大学大学院消化器内科 教授

研究要旨：炎症性腸疾患の腸管粘膜局所における活性酸素と抗酸化分子の産生の間の不均衡が病態に関与するとされている。チオレドキシシン (Thioredoxin : TRX) は、reactive oxygen species (ROS) の還元・産生低下をはじめとして細胞防御反応の増強作用を有するとされている。そこで、炎症性腸疾患患者の血清 TRX の測定および TRX transgenic (TRX-Tg) マウスを用いて dextran sulfate sodium 投与による腸炎モデルを作成し、TRX の腸炎に及ぼす影響を検討した。その結果、TRX の強発現は、DSS によって誘発された急性腸炎を抑制することが証明された。さらに、腸炎の病態形成に重要な役割を果たす MIF 発現は、TRX により制御されている可能性が示された。以上より TRX の腸炎抑制効果は、その抗酸化作用のみならず MIF 産生の抑制を介した免疫作用が関与していると考えられた。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease : IBD) は、緩解・増悪を繰り返す難治性疾患である。その原因として自己免疫異常や腸内細菌等の関与が想定されているものの、未だに明らかにされてはいない。一方、腸炎を含む様々な炎症反応には、活性酸素による酸化ストレスが関係していることが知られている。活性酸素はその産生と消去によって細胞内シグナル伝達機構を制御するレドックス制御と呼ばれる一連の細胞内シグナル伝達制御機構を形成しており、このレドックス制御を担う主要分子のひとつに、チオレドキシシン (Thioredoxin : TRX) があげられる。TRX は、成人 T 細胞白血病由来因子としてクローニングされた、Cys-Gly-Pro-Cys 配列によるチオール・ジスルフィド反応を介した酸化還元反応制御能を持つ多機能分子である。その機能は、reactive oxygen species (ROS) の還元・産生低下に加え NF- κ B や Rel1 などの転写因子活性化や ASK-1 の不活性化による MAPK へのシグナル伝達の抑制などを介したアポトーシスの抑制・細胞防御反応の増強など様々な報告がなされている。

IBD の粘膜組織内では ROS の産生が亢進しているにもかかわらず Cu/Zn-SOD や還元型チオールなどの抗酸化分子の産生が低下している。それゆえ IBD における粘膜病変局所では ROS と抗酸化分子の産生に不均衡が生じていると考えられる。

そこで今回我々は炎症性腸疾患患者の血清 TRX の測定および TRX transgenic (TRX-Tg) マウスを用いて dextran sulfate sodium (DSS) 投与による腸炎モデルを作成し、TRX の腸炎に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1. 健常人を対照として、炎症性腸疾患患者の血清 TRX 値を測定し、病態の疾患活動性と血清 TRX 値との相関を検討する。
2. TRX-Tg マウスにおける DSS 腸炎の臨床・組織学的検討
9-11 週齢、体重 20-22g の雌 C57BL/6 マウスをコントロール及び DSS 腸炎モデル作成に用いた。B6 由来の TRX-Tg マウスおよび recombinant hTRX は味の素製薬株式会社より供給された。
C57BL/6 マウス (Wt-DSS 群、n=10) および TRX-Tg マウス (Tg-DSS 群、n=10) に 3% (w/v) DSS (MW 36,000-50,000) を 7 日間自由飲水にて連日投与した。DSS 投与直前 (0 日目) から投与終了直前 (7 日目) まで連日体重を測定し、DSS 投与終了後エーテル麻酔下にと殺した後、全大腸を摘出し、腸炎の評価を行った。
(a) 体重は、各日における変化を 0 日目の体重に対する変化率を%で示した。
(b) および摘出した大腸の全長を計測し、さらに糞便中の血液含有を Bloody stool score に従って評価した。
(c) 肛門側 1.5cm の大腸を 10%ホルマリン溶液にて固定し、パラフィン固定後薄切標本を作製した後ヘマトキシリン・エオジン染色を行って光学顕微鏡にて観察した。組織

学的評価はHistological scoring systemに従って0.5cmごと3ヵ所で行い、それぞれの部位における点数の平均にて決定した。

3. 大腸組織における Macrophageinhibitoryfactor (MIF) の発現の検討：大腸組織から抽出した蛋白を用いて、western blot 法により行った。
4. マクロファージ由来のMIF発現に対するTRXの影響：人マクロファージ細胞株であるTHP-1をPMAで刺激後、TRXによる前処置を行う。さらに、これらの細胞をIFNおよびLPSにより刺激し、TRXのMIF発現に対する影響をwestern blot 法にて検討する。
5. これを用いてクローン病をはじめ種々の腸疾患患者の血清の抗体価を測定した。

C. 研究結果

1. 血清TRXは健常人に比べて炎症性腸疾患患者群（クローン病および潰瘍性大腸炎）で有意に高値を示し、その疾患活動性と相関関係を示した。

2. TRX-TgマウスにおけるDSS腸炎の評価

DSS投与開始後6日目、7日目の体重減少はTg-DSS群でWt-DSS群に比して有意に軽度であった。また大腸の全長を計測したところその計測値はTg群でWt-DSS群に比して有意に長く、Bloody stool scoreはWt-DSS群に比して有意に低値であった。HE染色標本による組織学的検討では、Wt-DSS群で遠位大腸を中心に炎症細胞浸潤とクリプトの損傷、びらん・潰瘍形成を認めたがTg-DSS群ではこれらの所見の改善が認められた。Histological scoring systemによる評価では、Inflammation extent・Crypt damage・Total colitisの各項目においてTg群で有意な改善を認めた。

3. 大腸組織におけるMIF発現

大腸組織におけるMIF産生はWt-DSS群でコントロール群に比して有意に増加しており、いずれもTg-DSS群ではWt-DSS群に比して有意に減少していた。また、コントロール群とDSS未投与のTRX-Tgマウス群の間でMIF産生を比較したところ、TRX-Tgマウス群ではコントロール群に比して有意にその産生が低下していた。

4. TRXのMIF発現におよぼす影響

THP-1からのMIF発現はTRXの濃度依存性に抑制された。

D. 考察

今回、血清TRX値が健常人に比べて炎症性腸疾患患

者で高値を示し、またその活動性と相関関係が認められたことから、TRXが炎症性腸疾患の病態に関与していることが示された。次に、TRX-Tgマウスを用いたDSSによる腸炎モデルの作製では、コントロール群に比べて有意に腸炎が抑制されることが証明された。さらに、腸炎の病態に関与しているとされているMIFの発現がin vivo およびin vitroの実験結果からTRXにより制御されている可能性が示唆された。

TRXには好中球・単球・T細胞凝集抑制や消化管上皮細胞の増殖に関する報告がみられ、我々の結果からは抗酸化ストレス作用のみならず免疫系への関与や粘膜修復を介した腸炎抑制効果が想定される。

MIFはマクロファージや活性化T細胞を中心にubiquitousに産生され、TNF- α やIL-6、IL-8、iNOS、NOなどの炎症メディエーターの産生を促進する分子である。臨床的には敗血症、肺炎、リウマチ性関節炎などの炎症性疾患で産生が増加しており、腸炎でもクローン病患者血清で病勢を反映して産生が増加することが知られている。実験腸炎モデルでは抗MIF抗体の腸炎抑制効果が報告されており、炎症性腸疾患の病態形成に重要な役割を持つと考えられている。今回我々はMIFがTRXによりレドックス制御されている可能性に注目し、その産生がDSS腸炎モデルにおいてのみならずDSS未投与の状態においてもTRX-Tgマウスで抑制されていることを示した。これはTRXの腸炎抑制効果とその抗酸化作用のみならずMIFのレドックス制御による免疫作用を介して発揮されていることを示唆する所見である。今回TRX-Tgマウスを用いた検討で腸炎抑制に関するTRXの重要性が確認され、さらにその作用機序は抗酸化作用のみならず免疫系の抑制を介することが示唆された。これらの結果はTRXが潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患に対する治療薬として新しいオプションになり得ることを示唆するものである。

E. 結論

1. チオレドキシン(TRX)のIBDに及ぼす効果を検討したところ、TRXトランスジェニックマウスではDSS腸炎の発症が抑制された。その際腸炎の病態形成に重要なMIFの発現がTRXにより制御されていた。
2. 活動期UC患者の直腸粘膜にはCD4+CD45RO+memory cellが認められ、またそのうちCD62L+細胞が増加していた。さらにこれらは末梢血中の数とも相関関係をしめした。以上よりUCはTh2ドミナントな病態であることが確認されると同時に、UCの末梢血中の細胞動態が病勢を反映する可能性も示された。

3. DSS 腸炎の成立において、hemoxygenase-1 (HO-1) の発現が亢進していたが、この HO-1 の亢進はサイトカインバランスの維持に貢献していた。
DSS 腸炎マウスにおいて MIF 発現の増強が認められ、抗 MIF 抗体投与により腸炎が抑制されたことにより、

MIF が IBD の発症に関与する可能性が示唆された。

F. 知的所有権の取得状況

特許取得、実用新案登録は現在のところおこなっていない。

潰瘍性大腸炎における Macrophage migration inhibitory factor (MIF) に関する研究

分担研究者 棟方昭博 弘前大学医学部第1内科 教授

研究要旨：難治性潰瘍性大腸炎におけるステロイド抵抗性の炎症性サイトカイン産生について、MIF の関与ならびにその関連転写因子活性について検討した。MIF は AP-1 の抑制因子であることが UC においても示された。MIF はステロイド抵抗例で反応例よりも高値であり、AP-1 の高値はステロイド反応性と関連していた。ステロイド抵抗例における IL-8 産生には MIF/p38- MAPK pathway が関与していたが、AP-1 の直接的な関与は否定的であった。

共同研究者

石黒 陽¹⁾、櫻庭裕丈¹⁾、山形和史¹⁾、平賀寛人¹⁾、
蝦名佐都子¹⁾、藤田 均¹⁾、中 明夫²⁾

所属

- 1) 弘前大学医学部第一内科、
- 2) 弘前大学医学部細菌学

抗 MIF 抗体はステロイド抵抗性 IL-8 産生を有意に低下させた。

⑦RelA は難治例で有意に低下していた。

⑧p38-MAPK は UC で有意に増加しており、抗 MIF 抗体は難治例において p38-MAPK を低下させた。⑨ p38-MAPK antagonist は難治例における IL-8 産生を低下させた。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎 (UC) における難治性には、ステロイド抵抗性の炎症性サイトカイン産生が関与していることが示唆されている。Macrophage migration inhibitory factor (MIF) はステロイド存在下で炎症性サイトカイン産生を増強させるが、一方で Activator Protein-1 (AP-1) を抑制することが報告されている。ステロイド抵抗性における炎症性サイトカイン制御機構について明らかにする目的で、MIF とその関連転写因子について UC 難治例および反応例について検討した。

B. 対象

健常 Control として大腸癌手術例と難治性 UC およびステロイド反応例の手術標本から、lamina propria mononuclear cell (LPMC) を分離。細胞質内 MIF および p38- MAPK、核内 AP-1、p65 subunit of nuclear factor (NF)- κ B (RelA) について検討した。IL-8 産生量については培養上清について検討した。

C. 研究結果

③④抗 MIF 抗体は UC において AP-1 を増加させた。

D. まとめ

MIF は未知のレセプター及び CD74 との結合を介した経路と、レセプターを介さない細胞内への取り込みが想定されている。MIF は ERK1/2 の活性化を介して AP-1 の発現、ETS 活性化による TLR4 の発現亢進、PGE₂ の産生、p53 の阻害作用を示す。一方、MIF は JAB1 と結合し JAB1 の種々の作用を阻害する。

今回の検討から、MIF は AP-1 の抑制因子であることが確認された。MIF はステロイド抵抗例で反応例よりも高値であり、AP-1 の高値はステロイド反応性と関連していた。ステロイド抵抗例における IL-8 産生には MIF/p38- MAPK pathway が関与していたが、AP-1 の直接的な関与は否定的であった。

E. 参考文献

- 1) Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. Crit Rev Immunol 1997;17:77.
- 2) Leng L, Metz CN, Fang Y, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. J Exp Med 2003;197:1467.

- 3) Roger T, David J, Glauser MP, et al. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. Nature 2001;414:920.
- 4) Kleemann R, Hausser A, Geiger G, et al.

Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. Nature 2000;408:211.

ヒト大腸筋線維芽細胞からの MMPs および TIMPs の誘導における FGF-2 の役割

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：目的：今回我々は、大腸上皮細胞の基底膜直下に存在するヒト大腸筋線維芽細胞（subepithelial myofibroblasts:SEMFs）を使用して、Basic fibroblast growth factor(FGF-2) による Matrix metalloproteinases(MMPs)とその inhibitor である Tissue inhibitor of metalloproteinases(TIMPs)の産生誘導効果について検討しました。結果：MMP-1, MMP-3, TIMP1 の産生は、FGF-2 により誘導され、その発現には MAPkinase の MEK1/2、転写因子の AP-1 が関与していることがわかった。また、SEMFs は FGF-2 により FGF-2 の発現を誘導する auto crine 作用があることも示唆された。結語：ヒト大腸粘膜での ECM の turn over を担う MMPs や TIMPs の産生において、FGF-2 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎 (UC) やクローン病 (CD) を代表とする難治性の炎症性腸疾患は、未だ原因は不明であるが、消化管粘膜の局所免疫システムの何らかの異常が生じ、慢性の炎症を繰り返していると考えられています。また、消化管粘膜の受けた炎症や創傷からの治癒の過程に何らかの異常が生じることで慢性の炎症が継続すると考えられます。この組織修復の過程において ECM (extra cellular matrix) の turn over は、重要な役割を担っています。また、今回使用した SEMFs は ECM の turn over の調節において重要な因子の一つと考えられます。この turn over は、ECM の分解に関与する MMPs (Matrix metalloproteinases) とその阻害因子である TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) によって巧妙に調節されています。そして、FGF-2 (basic fibroblast growth factor) は、血管の新生の促進や繊維芽細胞の増殖を促進し組織修復の際の肉芽形成などに働き、ECM の turn over に重要な役割をしていると考えられます。今回我々は、大腸上皮細胞の基底膜直下に存在するヒト大腸筋線維芽細胞 (subepithelial myofibroblast:SEMFs) を使用して、FGF-2 による MMPs と TIMPs の産生誘導効果について検討しました。

B. 研究方法

1. Mahida らが報告した方法 (7) に従い、大腸癌患

者の手術標本より α -smooth muscle actin 陽性、vimentin 陽性のヒト大腸筋線維芽細胞を単離して使用した。

2. MMP-1, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2 の産生は ELISA にて、MMP-3 の産生は western blot 法にて検討しました。
3. mRNA の発現は northern blot 法にて検討しました。
4. 転写因子である AP-1 の活性は、EMSA (Electrophoretic gel mobility shift assays) 法にて検討しました。

(倫理面への配慮)

大腸筋線維芽細胞の単離を行う際の手術標本は、患者本人に術前に詳細を説明して承認を得た物を使用した。

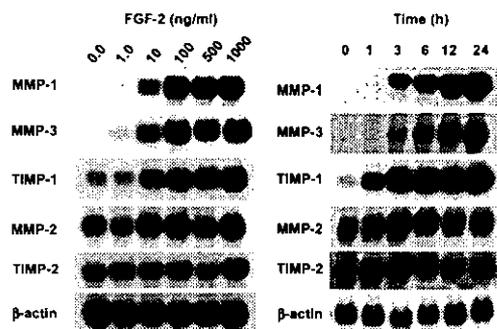
C. 研究結果

1. MMP-1, MMP-3, TIMP1 の産生は、FGF-2 により誘導された。(図 1)
2. MMPs は、APMA (Aminophenyl mercuric acetate) 処理にて誘導され、大部分が非活性型で産生されていた。
3. FGF-2 により AP-1 の DNA 結合活性が誘導された。(図 2)
4. AP-1 の阻害剤である Curcumin により MMP-1, MMP-3, TIMP1 の mRNA 発現が強く抑制された。

- MMP-1, MMP-3, TIMP1は、MAPkinase inhibitorであるPD098059, U0126により強く抑制された。
- FGF-2の刺激にてSEMFsからFGF-2のmRNAが誘導されauto crine作用が認められた。(図3)

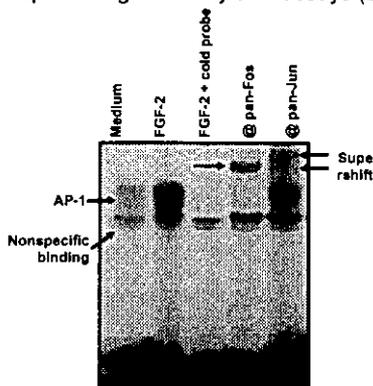
(図1)

FGF-2 stimulates the mRNA expression for MMPs and TIMPs in colonic SEMFs



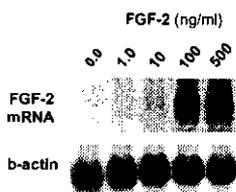
(図2)

Electrophoretic gel mobility shift assays (EMSA)



(図3)

Induction of FGF-2 mRNA expression by FGF-2 in colonic SEMFs



D. 考察

今回の我々の研究結果からヒト大腸の SEMFs において MMP-1, MMP-3, TIMP1 の発現が FGF-2 によって増強され

ることが示唆されました。また、臨床的に MMP-1, MMP-3, TIMP1 の発現は IBD 患者の大腸炎症粘膜において増強されていると報告がされています(4-6)。このことから、IBD 患者の炎症粘膜において MMPs や TIMPs の発現を増強させているのが FGF-2 である可能性が考えられます。そして、今回認めた FGF-2 の SEMFs における autocrine 作用は、組織修復の際の重要な鍵となりうる事を示唆していると考えられます。ただ今回の結果は、あくまでヒト大腸の SEMFs に限られた結果です。MMPs や TIMPs の発現は、SEMFs の他にマクロファージや血管平滑筋細胞でも増強されます(1-3)。今後 MMPs や TIMPs の発現において、他の growth factor との検討や nonmyofibroblast での検討をさらに追求する必要があると考えられます。

E. 結論

ヒト大腸粘膜での ECM の turn over を担う MMPs や TIMPs の産生において、FGF-2 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 文献

- Nagase H, Woessner JFJ: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:21491-21494
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: Biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18:1135-1149
- Vicenti MP: The Matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) genes: Transcriptional and post transcriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods Mol Bio* 2001; 151:121-148
- Stallmach A, Chan CC, Ecker KW, Feifel G, Herbst H, Schuppan D, Zeitz M: Comparable expression of Matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47:415-422
- von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S: Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47:63-73
- Louis E, Ribbens C, Godon A, Franchimont D, De Groote D, Hardy N, Boniver J, Belaiche J, Malaise

M: Increased production of matrix metallo proteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol 2000;120: 241-246

7. Mahida YR, Beltinger J, Makh S, Goke M, Gray T, Podolsky DK, Hawkey CJ: Ad-Ult human colonic subepithelial myofibroblasts. Am J Physiol 1999; 277:C183-201.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

腸管上皮細胞分化機構と転写因子 IRF-1・IRF-2 機能 —炎症性腸疾患における上皮分化異常と免疫制御破綻の接点

分担研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化・代謝内科 教授

研究要旨:腸管上皮細胞による IL-7 産生が特定の分化系列細胞すなわち杯細胞に強く見られる現象であることに注目し、腸管上皮による IL-7 産生の分子機構の詳細、およびこれにかかわる分子群の上皮細胞形質との関連を検討した。その結果、IL-7 遺伝子発現に IRF-1/IRF-2 による優れた調節システムが関わると同時に、IRF-1 が杯細胞に有意に発現することが示され、上皮細胞分化が IL-7 産生と連動し粘膜免疫応答を調節することが示唆された。さらに、重篤な腸管炎症局所においては、たとえば杯細胞消失などの形態的分化異常が免疫調節機能の破綻と関わる可能性を提示した。

共同研究者

大島茂、並木伸、岡本隆一、松本智子、山崎元美、
中村哲也、金井隆典

所属

東京医科歯科大学大学院 消化・代謝内科学

共同研究者

矢島知治、日比紀文

所属

慶應義塾大学医学部内科

知見、すなわち腸組織における特殊な免疫調節機構をさらに追究し、また、正常腸管組織の恒常性維持には局所における免疫調節と上皮再生の連鎖・協調が必須であり、その不均衡が病態形成を担う本質であるという発想に基づき、最終的には両者を統合制御し、局所免疫調節および組織再生誘導を促す新規治療法を目指す萌芽的研究である。

研究代表者はこれまでに、腸管上皮細胞、なかでも特定の分化形質を有する細胞より多く産生されるサイトカイン IL-7 が IL-7 レセプター陽性局所リンパ球に作用する「粘膜 IL-7 ネットワーク」を独自に提唱し、このネットワークが粘膜免疫応答に不可欠な機能を果たすこと、さらにはその破綻が腸管炎症惹起に密接に関わること、を明らかにするなど国際的にも評価の高い研究を展開してきた。本研究ではこれをさらに発展させ、腸管上皮細胞、中でも杯細胞に強く発現するサイトカイン IL-7 の産生機構を詳細に解析することで、上皮細胞の分化形質獲得が免疫制御分子発現と密接に関わる可能性を追求することを目的とした。

A. 研究目的

腸管上皮組織は、陰窩底部の上皮性幹細胞を由来とし長軸方向を一単位とした細胞系列から構築され、その構築過程において陰窩内の種々の細胞系列(吸収上皮細胞、杯細胞、神経内分泌細胞など)の分化調節がきわめて厳密な制御をうけることにより機能的恒常性が維持される。そして潰瘍性大腸炎・クローン病など炎症性腸疾患の発症には、腸管免疫機構の破綻のみならず傷害粘膜上皮細胞の分化障害も深く関与することが予想されている。しかしながら腸管上皮組織の分化・再生機構の詳細はいまだ明らかではなく、さらに腸管免疫および上皮分化機構の両者の人為的制御を、難治性慢性腸疾患に対する「成因の抑止」と「修復の促進」という統合的視点で治療戦略へ応用する試みはきわめて少ない。本研究は両領域において研究代表者らが独自に見いだしてきた

B. 研究方法

1) ヒト腸管上皮細胞株を用いて、IL-7 蛋白発現は培養上清の ELISA 法で、mRNA 発現は Northern blot 法で解析した。2) ヒト IL-7 遺伝子の転写開始点の同定は、RNA ligase-mediated RACE 法でおこなった。3) IL-7 遺伝子転写活性化領域をレポーターアッセイで解析した。

4) 転写制御領域への結合蛋白は EMSA 法および Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 法により検討した。5) IRF-1 および IRF-2 の強制発現による IL-7 産生解析は、テトラサイクリン誘導性蛋白発現システムを用いて、また、IRF-1 および IRF-2 の発現抑制による解析には siRNA を用いた遺伝子ノックダウン解析で検討した。6) 大腸上皮組織における IRF 分子の発現は健常ヒト組織および潰瘍性大腸炎組織の免疫染色法による解析をおこない検討した。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、マウスの実験に関しても国際社会がヒトの健康のためとはいえども、実験および飼育管理の過程において動物に対して不必要な苦痛を与えないように努めるという人道的な配慮を求めていることを十分認識し、東京医科歯科大学および慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに沿って実施した。

C. 結果

1) ヒト腸管上皮細胞が構成的、すなわち刺激非依存性に IL-7 を産生することを明らかにした。IL-7 産生は IFN γ 刺激でさらなる誘導を受けたが、TNF α 、IL-1、および TGF β では影響を受けなかった。2) 構成的および刺激誘導性 IL-7 発現は異なる転写開始点からの mRNA 発現機構が関わること、しかしながらこれら両者に対し遺伝子上流の IRF-E (Interferon Regulatory Factor-Element) を介する調節が重要であることが示された。3) IRF-E には、転写因子 IRF-1 と IRF-2 が各々刺激誘導性、および構成的に結合することが *in vitro* および *in vivo* の両者において示された。4) IRF-1 および IRF-2 の強制発現あるいはノックダウン解析により、これら両者が IL-7 産生を正に制御することが示されると同時に、IRF-1 は IFN γ 依存性に、一方 IRF-2 は構成的に機能する IL-7 誘導転写因子であることが明確になった。5) ヒト大腸組織においても IRF-1 および IRF-2 の両者が発現するものの、各々が異なる分布をとることが示された。すなわち IRF-2 が広い範囲の腸管上皮細胞に発現するのに対し、IRF-1 は上皮細胞層において点在して発現すること、またこの IRF-1 発現は特に有意に杯細胞にみられることが明確になった。さらに、潰瘍性大腸炎患者組織においては、杯細胞消失の所見と連動し IRF-1 蛋白の発現が減少する可能性が示唆された。

D. 考察

我々は外界に対する生体防御の最前線として消化管における粘膜免疫制御機構が重要な機能を担うことを報告してきた。これまで胸腺や骨髄など中枢免疫器官においてのみ未熟な細胞の増殖・分化を司るとされてきた IL-7 が腸管上皮細胞からも産生され、IL-7 受容体を発現する腸管粘膜内 T 細胞の増殖を調節する機構の存在を明らかとし、腸管上皮細胞と腸管粘膜内 T 細胞のクロストークが一つの機能単位として腸管粘膜免疫の維持に最も重要な役割を果たしている事を証明した。本研究においてはこの過程で得られた知見、すなわち腸管上皮細胞が広く IL-7 を産生すること、そして中でもこの IL-7 発現が特定の分化形質すなわち杯細胞に強く見られる現象であることに注目し、腸管上皮分化機構が免疫調節機能と密接に関わる可能性を検討した。その結果、ヒト腸管上皮細胞に構成的に発現する IRF-2 と IFN γ 依存性に誘導される IRF-1 の両者の機能的協調が IL-7 産生に重要であることが示され、ヒト由来細胞における IL-7 産生機構が初めて明らかとなった。また本研究の成果により、IRF-1 および IRF-2 の新しい様式の協調機構が提示され、基礎発現および刺激依存性発現の両者が精緻に調節されるべき遺伝子転写に IRF ファミリー分子による優れた調節システムが関わることを示された。さらに、IRF-1 が杯細胞に有意に発現するとの知見は、IL-7 が杯細胞において強く発現・産生されるとのわれわれの報告を支持すると同時に、腸管上皮細胞の分化が密接に免疫制御機構と関わる事実を示すものと考えられた。さらに重篤な腸管炎症局所においては、たとえば杯細胞消失などの形態的分化異常が免疫調節機能の破綻と直接関わる可能性を提示した。

これまで炎症性腸疾患に対する新規の画期的治療開発が不十分であった理由として、全身性免疫システムの延長として腸管局所免疫を理解するのみでは腸管特異的炎症惹起機構の制御が困難である可能性があげられる。また近年「再生医療」をキーワードに傷害臓器の再生誘導を目指す治療研究が活発であるが、消化管領域においては組織再生機構を理解する基盤としての細胞分化機構もいまだ詳細は不明のままである。本研究成果は、腸管上皮細胞による IL-7 産生の発見とその機能解析、および腸管上皮分化・再生機構の解析をいずれも独自の視点で展開してきた研究代表者がここまで得た独自の知見にもとづきさらに発展させたものであり、炎症性腸疾患を含む重篤な腸管組織傷害に対し機能的腸管上皮修復の加速を誘導する治療法開発の理論基盤を創出するものと考えられる。

E. 結論

腸管上皮細胞によるサイトカイン IL-7 産生機構を解析した結果、杯細胞形質が転写因子 IRF-1 の発現と密接に関わり IL-7 の誘導性発現に関わることを明らかにし、腸管上皮分化機構が免疫調節機能と関わることを明らかにした。さらに、重篤な腸管炎症局所においては杯細胞分化異常が免疫調節破綻と密接に関わる可能性を示した。今後本研究成果をさらに追求することで、腸管上皮分化を免疫機能再構築という視点でとらえ、きわめて疾患特異性の高いかたちで機能的腸管上皮再生を誘導する治療法開発への展望が開かれるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Okamoto R, Hibi T, Tezuka K, Azuma M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Ameliorating effect of anti-inducible co-stimulator monoclonal antibody in a murine model of chronic colitis. *Gastroenterology*. 124 : 410-421, 2003.
- 2) Watanabe M, Yamazaki M, Kanai T: Mucosal T Cells as a target for treatment of IBD. *J Gastroenterol*. 38 : 48-50, 2003.
- 3) Tsuchiya K, Kawano Y, Kojima T, Nagata K, Takao T, Okada M, Shinohara H, Maki K, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka N, Watanabe M, Karasuyama H: Molecular cloning and characterization of TPP36 and its isoform TPP32, novel substrates of Abl tyrosine kinase. *FEBS Lett*. 537 : 203-209, 2003.
- 4) Totsuka T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Yamazaki M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF- α MAbs in a murine model of chronic colitis. *Am J Physiol*. 284: G595-G603, 2003.
- 5) Iiyama R, Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Nakamura T, Miyata T, Yagita H, Tezuka K, Watanabe M: The role of Inducible Co-stimulator (ICOS)/B7 related protein-1 (B7RP-1) interaction in the germinal center formation in Peyer's patches. *Immunol Lett*. 88: 63-70, 2003.
- 6) Ishikura T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Makita S, Totsuka T, Yamazaki M, Sawada T, Nakamura T, Miyata T, Kitahora T, Hibi T, Hoshino T, Watanabe M: Interleukin-18 overproduction exacerbates the development of colitis with markedly infiltrated macrophages in interleukin-18 transgenic mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 18: 960-969, 2003.
- 7) Watanabe M, Yamazaki M, Okamoto R, Ohoka S, Araki A, Nakamura T, Kanai T: Therapeutic approaches to chronic intestinal inflammation by specific targeting of mucosal IL-7/IL-7R signal pathway. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2: 119-123, 2003.
- 8) Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Okazawa A, Hibi T, Oshima S, Miyata T, Nakamura T, Watanabe M: Macrophage-derived IL-18 targeting for the treatment of Crohn's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2: 131-136, 2003.
- 9) Okamoto R, Watanabe M: Prospects for regeneration of gastrointestinal epithelia using bone-marrow cells. *Trends Mol Med*. 9: 286-290, 2003.
- 10) Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T, Watanabe M: Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25-CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol*. 171: 708-716, 2003.
- 11) Ezaki T, Watanabe M, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Ishii H, Hibi T: A specific genetic alteration on chromosome 6 in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. *Cancer Res*. 63: 3747-3749, 2003.
- 12) Iiyama R, Kanai T, Uraushihara K, Ishikura T, Makita S, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Miyata T, Yoshida H, Takeuchi O, Hoshino K, Takeda K, Ishikawa H, Akira S, Watanabe M: Normal development of the gut-associated lymphoid tissue except Peyer's patch in MyD88-deficient mice. *Scand J Immunol*. 58: 620-627, 2003.
- 13) Yamazaki M, Yajima T, Tanabe M, Fukui K, Okada E, Okamoto R, Oshima S, Nakamura T, Kanai T, Uehira M, Takeuchi T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M: Mucosal T cells expressing high

- levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis. *J Immunol.* 171: 1556-1563, 2003.
- 14) Dan N, Kanai T, Totsuka T, Iiyama R, Yamazaki M, Sawada T, Miyata T, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Ameliorating effect of anti-Fas ligand Mab on wasting disease in a murine model of chronic colitis. *Am J Physiol.* 285: G754-G760, 2003.
- 15) Makita S, Kanai T, Matsumoto S, Iiyama R, Uraushihara K, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Ishikawa H, Watanabe M: The role of cryptopatch-derived intraepithelial lymphocytes in the development of chronic ileocaetitis. *Scand J Immunol.* 58: 428-435, 2003.
- 16) Takagi H, Kanai T, Okazawa A, Kishi Y, Sato T, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Hoshino K, Takeda K, Akira S, Watanabe M, Ishii H, Hibi T: Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. *Scand J Gastroenterol.* 38: 837-844, 2003.
- 17) Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Machida U, Iwai H, Azuma M, Chen L, Watanabe M: Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J Immunol.* 171: 4156-4163, 2003.
- 18) Sato T, Kanai T, Watanabe M, Sakuraba A, Okamoto S, Nakai T, Okazawa A, Inoue N, Totsuka T, Yamazaki M, Kroczeck RA, Fukushima T, Ishii H, Hibi T: Hyperexpression of inducible costimulator and its contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 126: 829-839, 2004.
- 19) Ishii K, Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Ishikura T, Yamazaki M, Okamoto R, Araki A, Miyata T, Tezuka K, Nakamura T, Watanabe M: Hyperexpression of inducible costimulator (ICOS) on lamina propria mononuclear cells in rat dextran sulfate sodium (DSS) colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 19: 174-181, 2004.
- 20) Kanai T, Kawamura T, Uraushihara K, Dohi T, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Higuchi T, Aiba Y, Okumura K, Tsubata T, Watanabe M: Ectopic CD40 ligand expression on B cell triggers intestinal inflammation. *J Immunol.* (in press), 2004.
- 21) Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Okada E, Tsuchiya K, Okamoto R, Yamazaki M, Yokota T, Kanai T, Watanabe M: IRF-1 and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of IL-7 in human intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol.* (in press), 2004.
2. 学会発表
- 1) 渡辺 守: 炎症性腸疾患の病因・病態と治療—潰瘍性大腸炎の病因と病態. 第26回日本医学会総会, 福岡, 2003. 4. 5
- 2) 岡本隆一, 矢島知治, 渡辺 守: 骨髄由来腸管上皮細胞による腸管上皮の維持・再生機構. 第89回日本消化器病学会, 大宮, 2003. 4. 24
- 3) Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Interferon Regulatory Factor-2 (IRF-2) Positively Regulates The Gene Expression of IL-7 in Intestinal Epithelial Cells. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 18
- 4) Nakamura T, Oshima S, Namiki S, Tsuchiya K, Okamoto R, Hibi T, Kanai T, Watanabe M: Interferon (IFN)- γ Induces IL-7 Gene Expression in Intestinal Epithelial Cells Via Upregulation of Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1). DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 19
- 5) Okamoto R, Yajima T, Matsumoto T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M: Bone Marrow-Derived Cells Regenerate Damaged Epithelia in the Human Gastrointestinal Tract. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 20
- 6) 中村哲也, 大島 茂, 並木 伸, 金井隆典, 渡辺 守: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1/IRF-2 による IL-7 産生調節機構. 第2回 GIFM (Gut Inflammation Front Line Meeting), 東京, 2003. 7. 12
- 7) 松本智子, 岡本隆一, 中村哲也, 金井隆典, 渡辺 守, 矢島知治, 日比紀文: 骨髄由来細胞による炎症性腸疾患に対する上皮再生治療への試み. 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」平成15年度第1回

- 総会, 東京, 2003. 7. 31
- 8) 中村哲也、大島 茂、並木 伸、土屋輝一郎、岡本隆一、岡田英理子、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1・IRF-2 機能とサイトカイン IL-7 産生調節機構. 第 10 回消化管分子機構研究会, 東京, 2003. 8. 9
 - 9) Watanabe M: Mucosal IL-7/IL-7 receptor dependent signals in the development of chronic intestinal inflammation. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, 2003. 8. 27
 - 10) 大島 茂: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1/IRF-2 機能と IL-7 産生調節機構. 第 4 回 IBD 基礎検討会, 東京, 2003. 10. 12
 - 11) 岡本隆一、松本智子、矢島知治: 骨髄由来細胞による炎症性腸疾患に対する上皮再生治療への試み. 第 45 回日本消化器病学会, 大阪, 2003. 10. 15
 - 12) Watanabe M: ICOS pathways regulate murine colitis. The MGH Annual Workshop of the Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease, Boston, Massachusetts, USA, 2003. 11. 13
 - 13) 大島 茂、中村哲也、並木 伸、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1・IRF-2 機能とサイトカイン IL-7 産生調節機構. 第 33 回日本免疫学会, 福岡, 2003. 12. 10
 - 14) 山崎元美、岡田英理子、矢島知治、田邊将信、中村哲也、金井隆典、日比紀文、竹内 勤、石川博通、渡辺 守: 腸管粘膜内浸潤 IL-7 レセプター高発現細胞の選択的除去による慢性大腸炎治療. 第 33 回日本免疫学会, 福岡, 2003. 12. 10
 - 15) 中村哲也、大島 茂、並木 伸、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1/IRF-2 による協調的 IL-7 産生調節機構. 第 11 回浜名湖シンポジウム, 浜松, 2003. 12. 20
 - 16) 渡辺 守: 消化管粘膜免疫の特殊性を応用した腸管免疫機構の統御療法. 科学研究費補助金「特定領域研究」感染の成立と宿主応答の分子基盤, 平成 15 年度第 2 回全体班会議, 東京, 2004. 1. 9
 - 17) 岡本隆一、渡辺 守: 骨髄由来細胞による炎症性腸疾患に対する上皮再生治療への試み. 第 22 回 Cytoprotection 研究会, 京都, 2004. 2. 27
- G. 知的所有権の出願・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
特になし

DSS 腸炎における Macrophage migration inhibitory factor (MIF) の役割の検討および炎症性腸疾患への臨床応用の可能性

協力研究者 浅香正博 北海道大学大学院消化器内科 教授

研究要旨：炎症性腸疾患における macrophage migration inhibitory factor (MIF) の役割を明らかにするためマウス DSS 腸炎に対する抗 MIF 抗体の効果を検討した。抗 MIF 抗体の投与により、臨床症状、組織学的スコアのいずれも有意な抑制効果が認められ、また IFN- γ 、TNF- α の産生が抑制された。また MIF-/-マウスでは DSS 腸炎の所見は認められなかった。以上より、MIF は腸炎発症の Key mediator である可能性が示唆された。

A. 研究目的

Macrophage migration inhibitory factor (MIF) は最初、macrophage の遊走を阻止する因子として発見されたサイトカインであり、最近では様々な生理機能が報告されており、単に炎症性サイトカインだけではなく多彩な機能を有するタンパクと考えられている。MIF は慢性関節リウマチ、糸球体腎炎など様々な炎症性疾患に大量に発現し、炎症性サイトカインとして機能していることが報告されているが、炎症性腸疾患に対する役割は明らかではない。本研究では実験腸炎モデルであるデキストラン硫酸誘発腸炎 (DSS 腸炎) マウスにおける MIF の機能を解析することでヒト炎症性腸疾患への臨床応用の可能性を検討する。

B. 研究方法

Balb/c マウスに 3~10% DSS 水溶液を 7 日間自由飲水させて腸炎を作成し、生存率、臨床症状 (下痢、血便、体重減少)、組織学的炎症スコアを検討した。大腸粘膜の MIF mRNA および MIF 蛋白は、それぞれ Northern blot および Western blot、免疫染色にて検討した。また、大腸粘膜内サイトカインを ELISA により測定した。抗 MIF 抗体は DSS 投与前および腸炎発症後に 48 時間おきに腹腔内投与した。また Balb/c 由来の MIF-/-マウスを用いて同様の検討を行った。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱い、北海道大学医学部“動物実験に関する指針”に基づいた。

C. 研究結果

DSS 投与後、大腸粘膜の MIF mRNA および MIF 蛋白は経時的に増加した。免疫染色では、MIF 蛋白は大腸上皮および粘膜内炎症細胞に発現していた。抗 MIF 抗体投与により臨床症状 (下痢、血便、体重減少)、組織学的炎症スコアは有意に改善した。大腸粘膜内サイトカインの検討では、DSS 投与後、IFN- γ 、TNF- α が増加し IL-4 が減少したが、抗 MIF 抗体の投与によりこれらの変化はいずれも有意に抑制された。MIF-/-マウスでは 3%DSS 投与後も腸炎の臨床症状を認めず、組織学的にも炎症所見を認めなかった。また、MIF-/-マウスにリコンビナントマウス MIF を 1 回のみ前投与したところ、腸炎の発症が確認された。

D. 考察

TNF- α などの pro-inflammatory cytokine がヒトの炎症性腸疾患に関与することは、最近の抗 TNF- α 抗体の臨床効果からみても明らかである。本研究から、MIF は DSS 腸炎において、TNF- α よりさらに上位に位置する炎症性メディエーターである可能性が示唆された。また抗 MIF 抗体をはじめとする MIF の制御がヒトの炎症性腸疾患に対する新しい治療法となることが期待される。

E. 結論

MIF は腸炎発症の key mediator である可能性が示唆され、MIF の作用機序の更なる探求およびその制御が炎症性腸疾患の病態解明や治療応用に貢献すると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagasako T, Sugiyama T, Mizushima T, Miura Y, Kato M, Asaka M: Upregulated Smad5 mediates apoptosis of gastric epithelial cells induced by Helicobacter pylori infection. J Biol Chem 278:4821-4825, 2003
 - 2) Umehara S, Higashi H, Ohnishi N, Asaka M, Hatakeyama M: Effects of Helicobacter pylori CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. Oncogene 22: 8337-8342, 2003
 - 3) Izumiyama K, Nakagawa M, Yonezumi M, Kasugai Y, Suzuki R, Suzuki H, Tsuzuki S, Hosokawa Y, Asaka M, Seto M: Stability and subcellular localization of API2-MALT1 chimeric protein involved in t(11;18) (q21;q21) MALT lymphoma. Oncogene 22:8085-8092, 2003
 - 4) Saito N, Konishi K, Takeda H, Kato M, Sugiyama T, Asaka M: Antigen Retrieval Trial for Post-embedding Immunoelectron Microscopy by Heating with Several Unmasking Solutions. J Histochem Cytochem 51:989-994, 2003
 - 5) Saito F, Saito N, Konishi K, Shoji E, Kato M, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M: Ultrastructural observation of Helicobacter pylori in glucose-supplemented culture media. J Med Microbiol 52:675-679, 2003
 - 6) Saito N, Konishi K, Saito F, Kato M, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M: Plural Transformation-Processes from Spiral to Coccoid Helicobacter pylori and its Viability. J Infect 46:49-55, 2003
 - 7) Nakagawa S, Kato M, Shimizu Y, Nakagawa M, Yamamoto J, Luis PA, Kodaira J, Kawarasaki M, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M: Relationship between histopathologic gastritis and mucosal microvascularity: Observations with magnifying endoscopy. Gastrointest Endosc 58:71-75, 2003
 - 8) Asaka M, Kato M, Sugiyama T, Satoh K, Kuwayama H, Fukuda Y, Fujioka T, Takemoto T, Kimura K, Shimoyama T, Shimizu K, Kobayashi S: Follow-up survey of a large-scale multicenter, double-blind study of triple therapy with lansoprazole, amoxicillin, and clarithromycin for eradication of Helicobacter pylori in Japanese peptic ulcer patients. J Gastroenterol 38:339-347, 2003
 - 9) Fujioka T, Arakawa T, Shimoyama T, Yoshikawa T, Itoh M, Asaka M, Ishii H, Kuwayama H, Sato R, Kawai S, Takemoto T, Kobayashi K: Effects of rebamipide, a gastro-protective drug on the Helicobacter pylori status and inflammation in the gastric mucosa of patients with gastric ulcer: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre trial. Aliment Pharmacol Ther 18 Suppl 1:146-152, 2003
 - 10) Sugiyama T, Asaka M: Eradication of Helicobacter pylori infection in patients with intractable gastric ulcer. Aliment Pharmacol Ther 18: 544-545, 2003
- ### 2. 学会発表
- 1) Asaka M: Prevention of gastric cancer by eradication of H. pylori. 11th United European Gastroenterology Week, Madrid, Spain, 2003. 11. 3
 - 2) Asaka M: H. pylori infection and stomach cancer. Asia Pacific Digestive Week 2003, Singapore 2003. 9. 29
 - 3) Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M: Macrophage Migration Inhibitory Factor-Deficient Mice Are Resistant to Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. DDW2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 20
 - 4) Kawarasaki M, Kato M, Asaka M: Study on Magnification Endoscopy with Acetic Acid Spraying. DDW2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 20
 - 5) Nakagawa S, Kato M, Nakagawa M, Yamamoto J, Kawarasaki M, Perez Aldana L, Shimizu Y, Asaka M: Diagnosis of H. Pylori Infection After Eradication by Using Magnifying Endoscopy. DDW2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 20
 - 6) Kato M, Ohara S, Asaka M, Takane T: 13C-Urea Breath Test Using a New Compact Nondispersive Isotope-Selective Infrared Spectrophotometer: Comparison with Mass Spectrometry. DDW2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 18
 - 7) 河原崎暢, 加藤元嗣, 浅香正博: 回腸末端の拡大観察として骨髄移植後のGVHD腸炎とサイトメガロウイルス

- ルス感染の鑑別第66回日本消化器内視鏡学会総会、大阪、2003.10.18
- 8) 大川原辰也、宮下憲暢、加藤寛士、古川滋、武田宏司、加藤元嗣、杉山敏郎、浅香正博：DSS腸炎マウスにおける Macrophage migration inhibitory factor (MIF) の役割 -MIF KO マウスによる検討- 第45回日本消化器病学会大会、大阪、2003.10.16
- 9) 浅香正博：ヘリコバクター・ピロリ除菌と胃癌予防 第62回日本癌学会総会、名古屋、2003.9.26
- 10) 東秀明、堤良平、横山和之、中谷彰洋、倉島庸、藤井裕美子、東健、浅香正博、畠山昌則：Helicobacter pylori CagA による細胞内シグナル伝達系の脱制御 第62回日本癌学会総会、名古屋、2003.9.25
- 11) 浅香正博：胃炎、胃癌との関わりーシンポジウム”ヘリコバクター感染症の新しい展開” 第26回日本医学会総会、福岡、2003.4.4
- 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

合成 ECP ポリペプチドを抗原とした抗 ECP 抗体の 潰瘍性大腸炎炎症性細胞との反応

協力研究者 牧山和也 長崎大学光学医療診療部 助教授

研究要旨：我々は、これまでに潰瘍性大腸炎（以下、UC）の炎症形成過程に関与している炎症性細胞のなかで目立った浸潤を示す好酸球の役割すなわち好酸球の活性化と組織障害性機構の解明に着目し成果を報告してきた¹⁾。本研究では、好酸球が放出する eosinophil cationic protein（以下、ECP）に注目し、4種類の合成 ECP ポリペプチドの作成とこれらに対する抗ヒト ECP 抗体の作成を試み、さらに獲得した抗 ECP 抗体を用い UC の大腸粘膜組織の免疫組織学的染色性を検討した。結果は、ECP1：CRYADRPGRRFYVVA、ECP2：CDNRDPRDSPRYPVV、ECP3：CTIAMRAINNYRWRC、ECP4：TRAQWFAIQHISLNPPR と反応する抗ヒト ECP 抗体を作成することができた。さらに抗ヒト ECP2 抗体と抗ヒト ECP3 抗体は免疫組織学化学的染色で好酸球と単球にヒットした可能性が認められた。これらの結果から、合成ポリペプチド ECP2 と ECP3 のアミノ酸配列領域はヒト ECP の免疫学的反応性あるいは生物学的活性をもった領域であることが示唆された。

共同研究者
辻村範行
所属
坂本バイオ株式会社

ECP1：CRYADRPGRRFYVVA,
ECP2：CDNRDPRDSPRYPVV
ECP3：CTIAMRAINNYRWCK,
ECP4：TRAQWFAIQHISLNPPR

A. 研究目的

UC の炎症形成過程において活性化好酸球が放出する顆粒蛋白の一つである ECP の役割を明確にするために、すでに同定されているヒト ECP アミノ酸構成をもとに4箇所のアミノ酸配列領域を選択しポリペプチドを合成し、これをウサギに免疫することによって抗 ECP ポリクロナール抗体を作成し、免疫学的反応性あるいは生物学的活性をもった ECP の特異的アミノ酸配列を検索することを目的とした。

B. 研究方法

1. ポリペプチド合成のためのアミノ酸配列の選択

ポリペプチドは、Barker ら²⁾が明らかにしたヒト ECP アミノ酸配列をもとに、下記の4種類（ECP1～ECP4）のアミノ酸配列領域を決定し、ポリペプチドを合成した。次に、Hemocyanin Keyhole Limpet：KLH タンパクとのコンジュゲートを作製した。

2. ECP コンジュゲートのウサギへの免疫方法

合成ポリペプチドをウサギ 1羽につき 100 μg/0.5 ml に調整し、2週間おきに ECP1 と ECP2 は 3回、ECP3 と ECP4 は 8回免疫した。

3. 抗ヒト ECP 抗体のタイター測定法

タイターは、KLH タンパクとコンジュゲートさせていない ECP ポリペプチドを well 内に固相化し（コントロールは固相化していない well）、希釈した被免疫ウサギ血清との反応によって測定した。

4. 免疫組織学化学的染色法

UC 患者の大腸内視鏡下生検組織を材料に酵素抗体法によって染色した。

（倫理面への配慮）

国際実験動物委員会のガイドラインに基づきウサギは愛護的に取り扱った。

C. 研究結果

1. 抗ヒト ECP 抗体の作成結果