

合成 ECP ポリペプチドを抗原とし、ウサギに免疫することによって、ECP1 と ECP

は 6 週後に、ECP3 と ECP4 は 16 週後にタイターの上昇を認め、ウサギ血清の 1/10000 希釈でも合成 ECP ポリペプチドと反応する抗ヒト ECP 抗体を作成することができた。

2. 免疫組織学的染色性の結果

抗ヒト ECP 抗血清の染色性の至適希釈倍率は 100 倍希釈であった。抗ヒト ECP 2 抗血清と抗ヒト ECP 3 抗血清は良好にヒットしたが、抗ヒト ECP 1 抗血清はやや弱く、抗ヒト ECP 4 抗血清の染色性はほとんど認められなかった。ヒットした細胞の同定は、今回、困難であったが、好酸球細胞の他に単球細胞にもヒットしている可能性が認められた。

D. 考察

ECP は、1974 年、Olsson と Venge³⁾ によって命名された好酸球顆粒蛋白の一つである。ECP には、①殺菌作用、②殺寄生虫作用、③細胞・組織傷害作用、④神経毒性、⑤リンパ球増殖抑制作用、⑥ヒスタミン遊離促進作用、⑦血液凝固および線維素溶解作用、⑧ribonuclease 活性作用などがあることが報告されているが、まだ不明な点が多く、とくに、UC の炎症性粘膜に浸潤する好酸球が遊離する ECP の作用については殆ど解明されていない。したがって、本研究では ECP ポリクロナール抗体の作成を試み、先ず、免疫学的反応性と生物学的活性を予測させる ECP のアミノ酸配列を同定することを目的とした。4 種類の合成 ECP ポリペプチドを抗原として 6 週目と 16 週目にタイターの上昇を示し、抗ヒト ECP 抗体として十分量を作成することができた。また 4 種類の抗ヒト ECP 抗体のうち抗ヒト ECP 2 と抗ヒト ECP 3 抗血清は好酸球あるいは単球と考えられる細胞に明らかにヒットした。したがって、少なくとも合成ポリペプチド ECP2 と ECP3 のアミノ酸配列領域はヒト ECP の免疫学的反応性と生物学的活性をもった領域であることが示唆された。

近年、Louahed ら⁴⁾ は、IL-5 によって促進される局所の好酸球増多に IL-9 が関与していること、また、Bystrom ら⁵⁾ は、単球も ECP 産生細胞であることを示唆し、Sugihara ら⁶⁾ は、ECP に筋線維あるいは細胞体質蛋白の減成生作用を認め、Maeda ら⁷⁾ は、ECP が哺乳動物の癌と白血病培養細胞株の成長を抑制することを報告している。このように、ECP は気管支喘息とアレルギー疾患の病因としてだけでなく、その他、多くの炎症性疾患の病因と病態形成に関与している重要な糖蛋白で

あることを再認識すべきである。したがって、UC においても ECP の組織あるいは細胞傷害への関与を明らかにすることはきわめて重要であり、そのためには、より簡便で恒常的に、質的・量的に十分な pure-ECP を精製できる方法の開発が、今後必要である。Nakajima ら⁸⁾ は、ラット好酸球関連リボ核酸酵素 rat EAR-1/rat ribonuclease 7 と rat EAR-2/rat ribonuclease 4 をクローニングし、recombinant pre-EAR-1 と pre-EAR-2 を細菌に発現させ生成している。さらにこれらは細菌感染に対し宿主の防御因子として作用していると報告しているが、EAR-1 と EAR-2 または ECP2 と ECP3 あるいはそれぞれの抗体を実験動物の腸炎発症実験に、あるいは、逆に、動物腸炎モデルの抑制実験へ応用することも、好酸球の UC 炎症形成過程への役割を明らかにする方法になるかも知れない。

E. 結論

UC の炎症形成過程における活性化好酸球の役割を明確にする目的で好酸球顆粒蛋白の一つである ECP に着目し、合成 ECP ポリペプチドの作成とこれを抗原とした抗ヒト ECP 抗体の作成を試みた。さらに作成した抗 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、以下の結果を得た。

(1) ヒト ECP アミノ酸配列をもとに、ECP1 : CRYADRPGRRFVVA、ECP2 : CDNRDPRDSRYPV、ECP3 : CTIAMRAINNYRWRC、ECP4 : TRAQWFALQHI SLNPPR の 4 箇所のアミノ酸配列を選択、合成した。(2) 合成 ECP ポリペプチドを抗原としてウサギに免疫し、ウサギ血清の 1/10000 希釈でも合成 ECP ポリペプチドと反応する抗ヒト ECP 抗体を作成することができた。(3) 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。以上の結果から、合成ポリペプチド ECP2 と ECP3 のアミノ酸配列領域はヒト ECP のアミノ酸配列のなかで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。

F. 文献

- 1) Makiyama K, Kanzaki S, Yamasaki K, et al.: Activation of eosinophils in the pathophysiology of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 30: 64-69, 1995.
- 2) Barker RL, Loegering DA, Ten RM, et al.: EOSINOPHIL CATIONIC PROTEIN cDNA: Comparison with other toxic cationic proteins and

- ribonucleases. *J Immunol* 143:952-955, 1989.
- 3) Olsson I, Venge P : Cationic proteins of human granulocytes. Separation of the cationic proteins of the granules of leukemic cells. *Blood* 44: 235-246, 1974.
- 4) Louahed J, Zhou Y, Maloy WL, et al: Interleukin 9 promotes influx and local maturation of eosinophils. *Blood* 97:1035-1042, 2001.
- 5) Bystrom J, Tenno T, Hakansson L, et al. : Monocytes, but not macrophages, produce the eosinophil cationic protein. *APMIS* 109: 507-516. 2001.
- 6) Sugihara R, Kumamoto T, Ito T, et al. : Human muscle protein degradation in vitro by eosinophil cationic protein (ECP). *Muscle Nerve* 24:1627-1634, 2001.
- 7) Maeda T, Kitazoe M, Tada H, et al. : Growth inhibition of mammalian cells by eosinophil cationic protein. *Eur J Biochem* 296:307-316. 2002.
- 8) Nakajima M, Hirakata M, Nittoh T, et al. : Expression and purification of recombinant rat eosinophil-associated ribonucleases, homologues of human eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin, and their characterization. *Int Arch Allergy Immunol* 125:241-249, 2001.

新しい Th2 優位の腸炎モデル—WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) 欠損マウス

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：WASP 欠損マウスにおける腸炎の発症のためにはリンパ球が不可欠であり、本マウスの CD4 陽性 T リンパ球のみでも RAG-2 欠損マウスに腸炎を発症させることが可能であった。また WASP 腸炎の大腸粘膜リンパ球は Th2 優位であることを示した。

共同研究者

竹島史直¹⁾、水田陽平²⁾、河野 茂¹⁾、Nguyen D³⁾、
Snapper SB³⁾

所属

長崎大学医学部・歯学部附属病院 第2内科¹⁾
同 治験センター²⁾

Massachusetts General Hospital³⁾

A. 研究目的

WASP 欠損マウスは 1998 年に Scott B. Snapper ら¹⁾により、gene targeting にて作成されたヒト Wiskott-Aldrich 症候群のモデルマウスである。Wiskott-Aldrich 症候群は伴性劣性遺伝の免疫不全症の 1 つであり、炎症性腸疾患を含む自己免疫性疾患を合併することが知られている²⁾³⁾。ヒトと同様に本マウスも腸炎を発症することから、このマウスにおける腸炎発症のメカニズムを研究することはヒト炎症性腸疾患の病因の解明に大きく寄与すると考えられる。

B. 研究方法

1. WASP 欠損マウスと RAG-2 欠損マウスの交配によりリンパ球を持たない WASP 欠損マウスを作成し、腸炎の発症の有無を検討した。

2. WASP 欠損マウスの脾臓より CD4 陽性 T リンパ球を分離し、RAG-2 欠損マウスの腹腔内に投与。腸炎の発症の有無を検討した。

3. WASP 欠損マウスの大腸よりリンパ球を分離し、培養上清のサイトカインを分析した。

(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

づきマウスは愛護的に扱った。

C. 研究結果

1. WASP/RAG-2 欠損マウスでは腸炎の発症は認められなかった。2. WASP 欠損マウスの CD4 リンパ球を移入された RAG-2 欠損マウスは腸炎を発症した。3. WASP 欠損マウスの大腸より分離されたリンパ球上清のサイトカインは IL-4 高値、IL-2 低値であった。

D. 考察

1. 他のマウス腸炎発症モデル⁴⁾と同様に WASP 欠損マウスにおいても腸炎の発症のためにはリンパ球が必須である。WASP 欠損マウスでは T リンパ球の機能異常が認められており、リンパ球の機能異常が腸炎発症の主要因の 1 つである。

2. Th2 優位の腸炎モデルは数少ない。潰瘍性大腸炎は Th2 優位とも言われており、WASP 欠損マウスは潰瘍性大腸炎の貴重で有用なモデルとして今後用いられる可能性がある。

E. 結論

WASP 欠損マウスはリンパ球関与の明らかな Th2 腸炎モデルである。

F. 文献

1) Snapper SB, Rosen FS, Mizoguchi E, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity*. 1998 Jul;9(1):81-91.

- 2) Folwaczny C, Ruelfs C, Walther J, Konig A, Emmerich B. Ulcerative colitis in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. Endoscopy. 2002 Oct;34(10):840-1.
- 3) Hsieh KH, Chang MH, Lee CY, Wang CY. Wiskott-Aldrich syndrome and inflammatory bowel disease. Ann Allergy. 1988 May;60(5):429-31.
- 4) Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. Annu Rev Immunol. 2002;20:495-549.

潰瘍性大腸炎における虫垂の役割

研究協力者 岡崎和一 関西医科大学第3内科 教授

研究要旨：目的：潰瘍性大腸炎（UC）の虫垂における免疫担当細胞の検討を行った。方法：UC 患者群（活動性全結腸型（A-Pan）、活動性左側結腸型（A-Lt）、活動性左側結腸型で虫垂開口部に炎症を伴っている型（A-Lt/A）、非活動性全結腸型（I-Pan）、非活動性左側結腸型（I-Lt））の虫垂開口部・横行結腸・直腸粘膜内T細胞を分離した後、CD4/CD8比と活性化T細胞の割合を、コントロール群と比較検討した。結果：UC 患者は、有意にA-Lt 群よりもA-Lt/A 群で多く、A-Lt/A 群はA-Lt 群よりも早期の病態と思われた。A-Lt/A 群のCD4/CD8比は、有意に全部位で増加していた。A-Lt 群のCD4/CD8比は、有意に直腸と虫垂開口部で増加していた。両群のCD4+CD69+ T細胞の割合は、有意に虫垂開口部でのみ増加していた。A-Pan 群では、CD4/CD8比は有意に直腸でのみ増加し、直腸ではCD4+CD69+ T細胞とCD4+HLA-DR+ T細胞の割合は有意に増加していた。非活動性UC 群では、CD4/CD8比は有意に直腸でのみ増加していたが、直腸では活性化T細胞の有意な増加は見られなかった。結論：虫垂はUC 発症の最初の部位として重要な役割を持ち、UC 発症後には活動性の調節をしている。晩期UC における粘膜の炎症は局所の免疫反応に依存し、虫垂はそれに関与していない。

共同研究者

関西医科大学第三内科 松下光伸
天理よろづ相談所病院 消化器内科 高鉦 博

A. 研究目的

虫垂は退化した臓器と考えられてきたが(1)、潰瘍性大腸炎(UC)における虫垂の役割が最近注目されている。スキップ病変として、虫垂における炎症細胞の増加が、慢性UC患者の切除標本では15-86%(2, 3)、左側結腸型UC患者の内視鏡検査では12-75%(4-6)に観察されている。以前に虫垂切除をしたUC患者が有意に少ないことから、虫垂切除がUC発症を抑制する可能性があるが(7-13)、それは若年で虫垂切除をした患者に限定されると報告されている(9, 10)。また、過去に虫垂切除をしたUC患者は、UC発症が遅れるとともに(10, 11)、重症化や再発し難いと報告されている(10-13)。UCの実験動物であるTCR- α 欠損マウスでは、若年で虫垂切除をすると腸炎は発症しないが、それ以後で虫垂を切除すると腸炎を発症する(14)。さらに我々は、虫垂切除によりUCの寛解を認めた若年患者を最初に報告した(15)。これらの事より、虫垂はUC発症において密接に関与していると

考えられる。

UC患者の炎症粘膜では、広汎なリンパ球の浸潤、特にCD4+ T細胞の浸潤が見られるので(16, 17)、大腸粘膜における浸潤リンパ球の研究が注目されている。活性化CD4+ T細胞は、細胞障害能力を発揮し(18)、サイトカインを分泌して炎症を増強させ、組織障害をひき起こす(19, 20)。以前に、切除虫垂におけるT細胞サブセットについての報告はあるが、虫垂において活性化炎症細胞に注目した報告はない(21)。今回の研究目的は、UC患者の炎症粘膜と非炎症粘膜、特に虫垂粘膜においてCD4/CD8比と活性化T細胞の割合を検討する事により、UC患者の虫垂における免疫担当細胞の不均衡を明らかにし、UC発症のメカニズム解明に役立てる事である。

B. 研究方法

1997年5月から2001年4月まで、UC患者と正常コントロール者から得た大腸粘膜標本を用いた。研究前に、彼等からインフォームドコンセントを得た。UC患者は、活動性全結腸型(A-Pan)、活動性左側結腸型(A-Lt)、活動性左側結腸型で虫垂開口部に炎症を伴っている型(A-Lt/A)、非活動性全結腸型(I-Pan)、非活動性左側結腸型(I-Lt)、非活動性左側結腸型で虫垂開口部に炎症を

伴っている型 (I-Lt/A) に分類した。虫垂開口部・横行結腸・直腸の内視鏡下生検標本を用い、粘膜内リンパ球を分離した (22)。我々のパイロットスタディでは、粘膜内 T 細胞で CD4, CD8, CD69, HLA-DR を表現している細胞割合は、術前の虫垂開口部生検標本と虫垂切除標本では類似していたので、虫垂開口部の生検標本は、虫垂粘膜の免疫応答を反映していると判断した。

2 色フローサイトメトリーでは、抗-CD4-PE/ 抗-CD8-FITC (コールター; 東京) を用い、3 色フローサイトメトリーでは、抗-CD45-PE-Cy5 (イムノテック; フランス), 抗-CD4-PE (ニチレイ; 東京), 抗-CD69-FITC (ペクトンデイキンソン; 東京), 抗-HLA-DR-FITC (イムノテック; フランス) を用いた。分離細胞は抗体にて 4°C、30 分間染色し、FACS バッファー (phosphate buffered saline, sodium azide 0.01%, and bovine serum albumin 0.1%, Sigma; St Louis, USA) で洗浄した。フローサイトメトリー (EPICS XL system II; Coulter) の結果、CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の割合から CD4/CD8 比を計算した。また、CD4/CD8 比が有意に増加している部位では CD4+CD69+ T 細胞 (初期活性化細胞) と CD4+HLA-DR+ T 細胞 (晩期活性化細胞) の割合を検討した。

C. 研究結果

UC 患者群 86 人 (A-Pan; 15, A-Lt; 25, A-Lt/A; 10, I-Pan; 14, I-Lt; 22, I-Lt/A; 0) とコントロール群 27 人を検討した。各 UC 群とコントロール群においては、年齢 (the Mann-Whitney test)、性 (the chi squared test or Fisher's exact test) に関して有意差はなかった。今回新たに診断された活動性 UC 患者 27 人と、非活動性 UC 患者 3 人は少なくとも過去 3 ヶ月間は無投薬であり、残りの 56 人は維持療法を受けていた。25 人はサラゾスルファピリジン (SASP) (1000-6000 mg/day)、12 人はメサラジン (5-ASA) (1000-2250 mg/day)、2 人はプレドニゾン (PDN) (10 mg/day)、12 人は PDN (5-20 mg/day) と SASP (1500-4500 mg/day)、5 人は PDN (5-20 mg/day) と 5-ASA (1000-2250 mg/day) であった。

通常、UC における粘膜の炎症は直腸に始まり、連続的に口側に進展していくので (1)、A-Pan は進展した病態であり、A-Lt と A-Lt/A は早期の病態である。新たに診断された UC 患者は、有意に A-Lt 群 (11/25) よりも A-Lt/A 群 (9/10) で多く ($p = 0.0220$, Fisher's exact test)、A-Lt/A 群は A-Lt 群よりもさらに早期の病態と判断した。A-Lt/A 群では、CD4/CD8 比は直腸 ($p < 0.0001$) と虫垂開口部 ($p = 0.0445$) で有意に増加していたが、非炎症部位の横行結腸でも有意に増加していた (p

$= 0.0374$)。A-Lt 群では、CD4/CD8 比は直腸で有意に増加していた ($p < 0.0001$) が、非炎症部位の虫垂開口部でも有意に増加していた ($p = 0.0166$)。A-Pan 群では、CD4/CD8 比は直腸でのみ有意に増加していた ($p = 0.0102$)。I-Lt 群では、CD4/CD8 比は直腸でのみ有意に増加していた ($p = 0.0046$)。I-Pan 群では、CD4/CD8 比は直腸でのみ有意に増加していた ($p = 0.0109$) (表 1)。

表 1. 大腸粘膜における CD4/CD8 比

	A-Pan	A-Lt	A-Lt/A	I-Pan	I-Lt	Controls
横行結腸	1.5 (0.7)	1.1 (0.4)	1.8 (0.4)*	0.9 (0.5)	1.3 (0.9)	1.2 (0.8)
虫垂	3.2 (1.3)	3.5 (1.3)*	3.9 (0.9)*	2.9 (1.9)	2.6 (1.4)	2.6 (1.1)
直腸	2.3 (2.0)*	3.6 (1.6)**	4.9 (2.2)**	1.8 (1.1)*	2.4 (2.0)*	1.0 (0.6)

Values are presented as mean (\pm SD).

* $p < 0.05$ as compared with the controls.

** $p < 0.01$ as compared with the controls.

2) CD4/CD8 比が有意に増加した部位における、活性化 CD4+ T 細胞の割合

I/A 群と A-Lt 群では、CD4+CD69+ T 細胞の割合は虫垂開口部でのみ有意に増加していたが (A-Lt/A; $p = 0.0245$, A-Lt; $p = 0.0042$)、CD4+HLA-DR+ T 細胞の割合はどの部位でも有意な増加は見られなかった。A-Pan 群では、CD4+CD69+ T 細胞と CD4+HLA-DR+ T 細胞の割合は直腸で有意に増加していた ($p = 0.0497$ and $p = 0.0299$, respectively)。I-Lt 群と I-Pan 群では、活性化 T 細胞の有意な増加は見られなかった (表 2)。

CD4+CD69+ T 細胞	A-Pan	A-Lt	A-Lt/A	I-Pan	I-Lt	Controls
横行結腸	29.7 (4.6)*	23.2 (5.0)	24.0 (7.6)	24.5 (6.2)	28.2 (8.6)	23.1 (4.1)
虫垂			23.4 (4.3)			21.0 (9.1)
直腸		28.0 (7.0)**	26.0 (4.0)*			19.6 (4.1)

Values are presented as mean (\pm SD).

* $p < 0.05$ as compared with the controls.

** $p < 0.01$ as compared with the controls.

D. 考察

UC 発症に関しては、異常な粘膜内の免疫反応が重要な役割を演じていると考えられているが (1-3)、UC 患者、特に左側結腸型 UC 患者の虫垂における免疫担当細胞に関してはあまり研究されていない。大部分の研究は切除標本からの検討であるが (2, 3)、大腸切除は通常、全結腸型の重症例や難治例で行なわれるので、全ての UC 患者の病態把握をしていない欠点がある (23)。そのため我々は、様々な活動性の UC 患者において、内視鏡下の

生検標本を用いて、粘膜内免疫担当細胞を分離して検討した。通常、虫垂の粘膜は生検できないが、虫垂粘膜の免疫応答を反映していると考えられる虫垂開口部の生検標本を代りに用いた。

今回の臨床像から、A-L1/A 群は A-L1 群よりもさらに早期の病態と判断した。A-L1/A 群では、CD4/CD8 比は直腸と虫垂開口部で有意に増加していたが、非炎症部位の横行結腸でも有意に増加していた。CD4+CD69+ T 細胞の割合は虫垂開口部でのみ有意に増加していたが、CD4+HLA-DR+ T 細胞の割合はどの部位でも有意な増加は見られなかった。TCR- α 欠損マウスでは、活性化 T 細胞は最初に虫垂に集まり (24)、遠位大腸の免疫応答を調節している (14, 25-27)。また、IL-2 欠損マウスでは CD4+ T 細胞は再循環して、腸炎の発症前に腸管に現れる事が報告されている (18, 28)。今回の結果からも、CD4+ T 細胞は最初に虫垂で活性化され、再循環して UC 発症以前に腸管に現れ、直腸からびまん性の炎症が生じると考えられる。炎症が直腸から始まる理由は不明であるが、虫垂は免疫応答の最初の部位として重要な役割を持っていると考えられる。

A-L1 群では、CD4/CD8 比は直腸と非炎症部位の虫垂開口部で有意に増加していたが、CD4+CD69+ T 細胞の割合は虫垂開口部でのみ有意に増加していた。また、CD4+HLA-DR+ T 細胞の割合はどの部位においても有意な増加はなかった。この事より、A-L 群の虫垂開口部には炎症所見は見られないが、虫垂粘膜内で初期活性化された CD4+ T 細胞が直腸の炎症を調節していると考えられる。A-Pan 群では、CD4/CD8 比は直腸でのみ有意に増加し、直腸の CD4+CD69+ T 細胞と CD4+HLA-DR+ T 細胞の割合は有意に増加していた。この段階では、虫垂は大腸の免疫応答にあまり関与しておらず、粘膜の炎症は局所の免疫反応に依存していると考えられる。

非活動性 UC (I-L1 群と I-Pan 群) においても、CD4/CD8 比は直腸でのみ有意に増加していたが、直腸の CD4+CD69+ T 細胞や CD4+HLA-DR+ T 細胞の割合には、有意な増加はなかった。この事より、有意な免疫不均衡が非活動性直腸粘膜で持続しており、活性化 T 細胞が有意に増加した場合に再燃が起こると考えられる。また、非活動性 UC でも、粘膜の炎症は局所の免疫反応に依存し、虫垂はそれに関与していないと考えられる。

E. 結論

虫垂は UC 発症の最初の部位として重要な役割を持ち、UC 発症後には活動性の調節をしている。晩期 UC における粘膜の炎症は局所の免疫反応に依存し、虫垂はそれに

関与していない。

F. 文献

1. Panaccione R, Sandborn WJ. The appendix in ulcerative colitis: a not so innocent bystander. *Gastroenterology* 1999;117:272-273.
2. Scott IS, Sheaff M, Coumbe A, et al. Appendiceal inflammation in ulcerative colitis. *Histopathology* 1998;33:168-173.
3. Kroft SH, Stryker SJ, Rao MS. Appendiceal involvement as a skip lesion in ulcerative colitis. *Mod Pathol* 1994;7:912-914.
4. D'Haens G, Geboes K, Peeters M, et al. Patchy cecal inflammation associated with distal ulcerative colitis: a prospective endoscopic study. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1275-1279.
5. Matsumoto T, Nakamura S, Shimizu M, et al. Significance of appendiceal involvement in patients with ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 2002;55:180-185.
6. Horie H, Konishi F, Togashi K, et al. Significance of periappendiceal inflammation in the patients with distal ulcerative colitis. *Dig Endosc* 1999;11:119-124.
7. Rutgeerts P, D'haens G, Hiele M, et al. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994;106:1251-1253.
8. Russel MG, Dorant E, Brummer RJM, et al. Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: results of a large case-control study. *Gastroenterology* 1997;113:377-382.
9. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, et al. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2001;344:808-814.
10. Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, et al. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2002;51:808-813.
11. Selby WS, Griffin S, Abraham N, et al. Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis but not affect its course. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2834-2838.
12. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, et al.

- Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut* 2002;51:803-807.
13. Naganuma M, Iizuka B, Torii A, et al. Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis and reduces its recurrence: results of a multicenter case-controlled study in Japan. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1123-1126.
 14. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, et al. Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR- α mutant mice. *J Exp Med* 1996;184:707-715.
 15. Okazaki K, Onodera H, Watanabe N, et al. A patient with improvement of ulcerative colitis after appendectomy. *Gastroenterology* 000;119:502-506.
 16. Müller S, Lory J, Corazza N, et al. Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 1998;152:261-268.
 17. Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, et al. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998;43:48-55.
 18. Simpson SJ, Mizoguchi E, Allen D, et al. Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur J Immunol* 1995;25:2618-2625.
 19. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
 20. Bhan AK, Mizoguchi E, Smith RN, et al. Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 1999;169:195-207.
 21. Jo Y, Matsumoto T, Yada S, et al. Histological and immunological features of appendix in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2003;48:99-108.
 22. Meenan J, Spaans J, Grool TA, et al. Altered expression of $\alpha 4\beta 7$, a gut homing integrin, by circulating and mucosal T cells in colonic mucosal inflammation. *Gut* 1997;40:241-246.
 23. Haruta J, Kusugami K, Kuroiwa A, et al. Phenotypic and functional analysis of lamina propria mononuclear cells from colonoscopic biopsy specimens in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1992;87:448-454.
 24. Takahashi I, Kiyono H, Hamada S. CD4+ T-cell population mediates development of inflammatory bowel disease in T-cell receptor α chain-deficient mice. *Gastroenterology* 1997;112:1876-1886.
 25. Bjerke K, Brandtzaeg P, Rognum TO. Distribution of immunoglobulin producing cells is different in normal human appendix and colon mucosa. *Gut* 1986;27:667-674.
 26. Kawanishi H. Immunocompetence of normal human appendiceal lymphoid cells: in vitro studies. *Immunology* 1987;60:19-28.
 27. Mayer L, Eisenhardt D. Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1990;86:1255-1260.
 28. Shanahan F, O'sullivan GC. Appendectomy, mucosal immunity, and colitis. *Gastroenterology* 1997;112:1766-1767.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okazaki K, Nakase H, Watanabe N, Tabata Y, Ikada Y, Chiba T. Intestinal drug delivery systems with biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells for chronic inflammatory colitis *J Gastroenterol.* 2002 Nov;37 Suppl 14:44-52
- 2) Watanabe N, Ikuta K, Okazaki K, Nakase H, Tabata Y, Matsuura M, Tamaki H, Kawanami C, Honjo T, Chiba T Elimination of local macrophages in intestine prevents chronic colitis in interleukin-10-deficient mice *Dig Dis Sci* 48: 408-14, 2003
- 3) Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Chiba T. Biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells: new approach for treatment of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2003 15:59-62
- 4) Nishi T, Okazaki K, Kawasaki K, Fukui T, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Watanabe T, Uchida K, Watanabe N, Nakase H, Ohana M, Hiai H, Chiba T Involvement of myeloid dendritic cells in the development of gastric secondary lymphoid

- follicles in *Helicobacter pylori*-infected neonatally thymectomized BALB/c mice *Infect Immun* 71: 2153-62, 2003
- 5) 岡崎和一 免疫異常からみたクローン病の病因・病態—クローン病における腸粘膜リンパ球の役割— *G. I. Research* Vol. 11no. 6 19-25, 2003
- 6) 岡崎和一 ドラッグデリバリーシステムと粘膜ワクチンの進歩 遺伝子医学別冊 生物医学研究・先進医療のための最先端テクノロジー ドラッグデリバリーシステム DDS 技術の新たな展開とその活用法メディカルドゥ (大阪) 98-103, 2003
2. 学会発表
- 1) Matsuura M, Okazaki K, Tabata Y, Ohana M, Uchida K, Chiba T. Therapeutic Effects of Basic Fibroblast Growth Factor in Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis. *Gastroenterology* April 2003 Vol. 124 No. 4 suppl 1 A-494, 2003
- 2) Kawasaki K, Okazaki K, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T. Overexpression of Thioredoxin-1 in Transgenic Mice Prevents *Helicobacter felis* Induced Gastritis *Gastroenterology*. April 2003 Vol. 124 No. 4 suppl 1 A-590, 2003
- 3) 河南知晴、八隈秀二郎、岡崎和一 当院で経験した原発性硬化性胆管炎症例における大腸・膵疾患の合併 *日本消化器病学会雑誌* vol. 100 suppl. March A-118 (W5-01)
- 4) 松浦 稔、千葉 勉、岡崎和一 basic FGFによる粘膜再生を治療戦略とした炎症性腸疾患の治療法の基礎的検討 (消化器病学会・消化器吸収学会合同：シンポジウム—炎症性腸疾患治療の新しい展開—) *DDW-J* 2003
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得：番号 2000-143538
 2. 実用新案登録：なし
 3. その他：なし

SAMP1/Yit 回腸炎マウスモデル小腸粘膜における免疫担当細胞 migration 動態の生体観察および接着分子発現の検討

協力研究者 三浦総一郎 防衛医科大学校第2内科 教授

研究要旨：クローン病類似回腸炎を自然発症する SAMP1/Yit マウスの回腸末端における生体観察では、微小血管において T リンパ球および単球 migration の増加を認めた。また、組織学的に MadCAM-1、VCAM-1、P-selectin 陽性血管、CD68、PSGL-1 陽性細胞の増加を認めた。免疫担当細胞の migration は抗接着分子抗体投与により抑制され、特に抗 MadCAM-1 抗体、抗 PSGL-1 抗体による T リンパ球および単球抑制効果が有意であった。抗接着分子抗体の定期投与は回腸炎を抑制した。SAMP1/Yit マウスの腸炎発症において接着分子の発現増加を伴う免疫担当細胞の migration 増加の関与が示唆された。

A. 研究目的

クローン病類似回腸炎を自然発症する SAMP1/Yit マウスを用いて腸炎発症腸管における T リンパ球および単球の migration の生体観察を行い、さらに血管内皮接着分子、ケモカインの発現を組織学的に検討し、腸炎の発症進展における関与につき検討した。

B. 研究方法

AKR/J (コントロール) マウスの脾臓および腸間膜リンパ節から T リンパ球は分離カラムで単球は CD14 陽性細胞として MACS を用いて単離し、AKR/J および約 30 週齢の SAMP1/Yit マウスに尾静脈から投与した。生体顕微鏡を用いて回腸末端部パイエル板 PCV (postcapillary venule)、絨毛微小血管、粘膜下細静脈での migration を観察した。また、AKR/J および SAMP1/Yit マウスから回腸を採取し、CD4、CD8、PSGL-1、CD68、MadCAM-1、VCAM-1、P-selectin、MCP-1 の発現を免疫組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)

防衛医科大学校の動物実験規定に基づき計画書を提出し承認された。

C. 研究結果

SAMP1/Yit マウスの回腸末端では腸管壁の肥厚および CD4、CD8 陽性細胞の増加を認め、回腸炎の発症が確認された。同部位における生体観察では SAMP1/Yit マウ

スのパイエル板 PCV、絨毛微小血管、粘膜下細静脈において T リンパ球の接着および単球 rolling、接着の増加を認めた。免疫組織学的検討では SAMP1/Yit マウス回腸粘膜での MadCAM-1、P-selectin、VCAM-1 陽性血管、CD68 陽性細胞、PSGL-1 陽性細胞、MCP-1 発現の増加を認めた。T リンパ球の rolling および接着は抗 MadCAM-1 抗体投与により、単球の rolling は抗 PSGL-1 抗体、接着は抗 PSGL-1 抗体および抗 VCAM-1 抗体投与により有意に抑制され、特に抗 PSGL-1 抗体による抑制効果が著明であった。抗 MadCAM-1 抗体または抗 PSGL-1 抗体の週 2 回投与は回腸炎を抑制した。

D. 考察

回腸炎を自然発症するマウスモデルを用いて腸炎発症に関与する免疫担当細胞 migration の関与を検討した。その結果、T リンパ球、単球が各々 MadCAM-1、PSGL-1-P-selectin interaction を介して炎症腸管に浸潤し、腸炎の進展に関与することが示唆された。また、これらに対する抗体投与が慢性腸炎に対する治療として可能性があると考えられた。

E. 結論

SAMP1/Yit マウスの腸炎発症において細胞および血管内皮接着分子の発現増加を伴う免疫担当細胞の migration 増加の関与が示唆された。

F. 参考文献

- (1) Matsumoto, S., Okabe, Y., Setoyama, H., Takayama, K., Ohtsuka, J., Funahashi, H., Imaoka, A., Okada, Y., Umesaki, Y. (1998) Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* 43, 71-8.
- (2) Kosiewicz, M.M., Nast, C.C., Krishnan, A., Rivera-Nieves, J., Moskaluk, C.A., Matsumoto, S., Kozaiwa, K., Cominelli, F. (2001) Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. *J Clin Invest* 107, 695-702.
- (3) Ishii, N., Tsuzuki, Y., Matsuzaki, K., Miyazaki, J., Okada, Y., Hokari, R., Kawaguchi, A., Nagao, S., Itoh, K., Miura, S. (2004) Endotoxin stimulates monocyte-endothelial cell interactions in mouse intestinal Peyer's patches and villus mucosa. *Clin Exp Immunol* 135, 226-32.
- (4) McEver, R.P., Cummings, R.D. (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 100, S97-103.
- (5) Kato, S., Hokari, R., Matsuzaki, K., Iwai, A., Kawaguchi, A., Nagao, S., Miyahara, T., Itoh, K., Ishii, H., Miura, S. (2000) Amelioration of murine experimental colitis by inhibition of mucosal addressin cell adhesion molecule-1. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 183-9.
- (6) Burns, R.C., Rivera-Nieves, J., Moskaluk, C.A., Matsumoto, S., Cominelli, F., Ley, K. (2001) Antibody blockade of ICAM-1 and VCAM-1 ameliorates inflammation in the SAMP-1/Yit adoptive transfer model of Crohn's disease in mice. *Gastroenterology* 121, 1428-36.
- (7) Haddad, W., Cooper, C.J., Zhang, Z., Brown, J.B., Zhu, Y., Issekutz, A., Fuss, I., Lee, H.O., Kansas, G.S., Barrett, T.A. (2003) P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 are major determinants for Th1 cell recruitment to nonlymphoid effector sites in the intestinal lamina propria. *J Exp Med* 198, 369-77.

IL-10^{-/-} マウスにおける腸管上皮アポトーシス抑制の効果

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：IBD 類似の慢性腸炎を自然発症するモデルマウス（IL-10^{-/-} マウス）と腸管上皮に抗アポトーシス性タンパクのひとつであるヒト Bcl-2 を過剰発現する Bcl-2 トランスジェニックマウス（Bcl-2 Tg マウス）を交配させることにより IL-10^{-/-} Bcl-2 Tg マウスを作成し腸管上皮アポトーシス抑制の効果を検討した。腸管上皮アポトーシスの抑制により慢性腸炎の発症抑制が得られた。

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

腸管粘膜固有層リンパ球やマクロファージによるサイトカイン産生の異常がヒトの炎症性腸疾患（IBD）において病因として重要であると考えられている。これらの炎症性サイトカインは腸管上皮細胞のアポトーシスを誘導することが知られており、その結果として生じる腸管上皮バリアの破綻が IBD の病態機序に関与していると考えられる。

IBD 類似の慢性腸炎を自然発症するモデルマウス IL-10^{-/-} マウスにおける腸管上皮アポトーシス抑制による発症抑制効果について検討した。

B. 研究方法

IL-10^{-/-} マウスと Bcl-2-Tg マウスを交配させることにより IL-10^{-/-} Bcl-2-Tg マウスを作成し病態への影響、その機序につき粘膜免疫学的手法を用いて検討した。

1. IL-10^{-/-} Bcl-2-Tg マウスと IL-10^{-/-} マウスを同一環境下に飼育し腸炎発症の有無を検討した。
2. IL-10^{-/-} Bcl-2-Tg マウス, IL-10^{-/-} マウス腸管粘膜固有層より得られたリンパ球画分, サイトカイン (IFN- γ , IL-4) 産生を検討した。

C. 研究結果

1. IL-10^{-/-} Bcl-2-Tg マウスは IL-10^{-/-} マウスに比し、有意に良好な体重増加を認め、脱肛の発生率は有意に低率であった。
20 週齢マウスの大腸組織所見では単核球浸潤、壁肥厚、腸陰窩の伸展、杯細胞減少の軽減が認められた。
2. IL-10^{-/-} Bcl-2-Tg マウス, IL-10^{-/-} マウス腸管粘膜固有層リンパ球の画分, サイトカイン (IFN- γ , IL-4) 産生パターンには有意差を認めなかった。

D. 考察

IL-10^{-/-} Bcl-2-Tg マウスにおいて腸管粘膜固有層リンパ球は IL-10^{-/-} マウスと同様 Th1 優位のサイトカインパターンを呈したが、腸管上皮アポトーシス抑制の結果、慢性腸炎の発症が抑制された。

E. 結論

腸管上皮におけるアポトーシスを抑制することにより、IBD の病態を改善しうると考えられた。

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

協力研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学 教授

研究要旨：腸粘膜免疫機構の中心的役割を演じる炎症性担当細胞は、オートクラインあるいはパラクラインにより局所で産生される様々なサイトカインの影響を受けその生物機能を劇的に変化させることで腸粘膜免疫システムの恒常性を維持している。しかし一方で、このような免疫担当細胞の生物機能の発現は細胞を取り巻く微小環境に大きく依存している可能性が考えられる。そこで我々は、生体が有する低酸素応答を制御する核内転写制御因子である hypoxia-inducible factor (HIF)-1 に注目し、腸管微小酸素環境が腸管局所免疫システムに及ぼす生物学的意義について検討を行った。本研究遂行のために、まず Cre-loxP system を用いて T 細胞特異的な HIF-1 α 遺伝子欠損マウス (HIFDFLckCre) を作製した。その結果、今回作成した HIFDFLckCre は HIF-1 α 遺伝子完全欠損マウスと異なり胎生致死に至らず正常に発育することが分かった。また、このマウスから摘出した様々な臓器由来の genomic DNA を用いた southern blotting 解析により HIF-1 α 遺伝子の T 細胞特異的な欠失が確認された。HIFDFLckCre マウスの脾臓より CD4 陽性細胞を分離し、固相化した抗 CD3/28 抗体で刺激し IFN- γ 産生および増殖能を *in vitro* で検討した結果、HIF-1 α 欠損 T 細胞は低酸素下での IFN- γ 産生が低下していることが明らかになった。以上の結果より、HIF-1 を介して低酸素微小環境が腸粘膜での炎症を制御している可能性を示唆していると考えられた。

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¹⁾、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) 粘膜固有層に homing することにより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 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²⁾、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³⁾、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

1) HIFDFLckCre マウスの作製

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 HIF-1 α exon2 の両端に loxp site を導入したマウス (HIFDF) と Lck promoter 下に Cre recombinase を発現することのできる transgenic マウス (LckCre) との交配により、HIF-1 α の T 細胞特異的な欠損マウス (HIFDFLckCre) を作製した。

2) HIF-1 α 遺伝子欠失の確認

HIFDFLckCre マウスより胸線を含めた様々な臓器と脾臓より分離した T 細胞から genomic DNA を抽出した。この DNA を用いて PCR 法および southern blotting にて遺伝子の欠損効率を確認した。

3) FACS 解析

HIFDFLckCre マウスの胸線および脾臓より細胞を採

取後、FITC および PE 標識されたリンパ球表面抗原に対する様々な抗体を用いて染色し FACS calibur を用いてその発現を解析した。

4) T 細胞における低酸素応答による HIF-1 発現解析

正常および HIFDFLckCre マウスの脾臓より分離した CD4 陽性細胞を 20%あるいは 0.5%酸素環境下で培養後、細胞より total RNA を抽出した。この RNA を用いて、HIF-1 により低酸素下にて制御されることが知られている遺伝子 PGK と iPFK の遺伝子発現を Real time PCR 法により解析した。

5) In vitro T 細胞機能解析

脾臓より CD4 陽性細胞を分離、固相化した抗 CD3/28 抗体で刺激し、interferon (IFN)- γ 産生および細胞の増殖能を検討した。

(倫理的配慮) 実験動物に関しては、十分な麻酔下にて実験を試行し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. 研究結果および考察

1) HIFDFLckCre マウスにおける HIF-1 α 遺伝子欠損効率の解析

Southern blotting (図 1 上) および PCR (図 1 下) にて解析した結果、HIFDFLckCre マウスの胸腺細胞および脾臓 T 細胞では、ほぼ 100% の HIF-1 α 遺伝子の欠損を認めた。一方、脳、心臓などの他臓器においては HIF-1 α 遺伝子欠損は全く認められなかった。以上の結果より、今回我々が用いた Cre-loxp system による gene targeting は、HIF-1 α 遺伝子を中枢および末梢ともに T 細胞特異的に欠損することができることが明らかになった (図 1)。

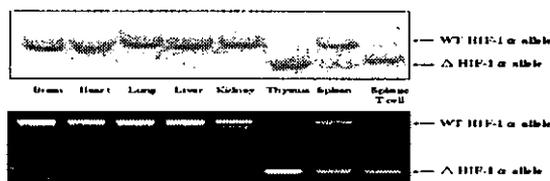


図 1. HIFDFLCK マウスにおける HIF-1 α 遺伝子欠損効率

2) HIFDFLckCre マウスにおける T 細胞分化・成熟に関する解析

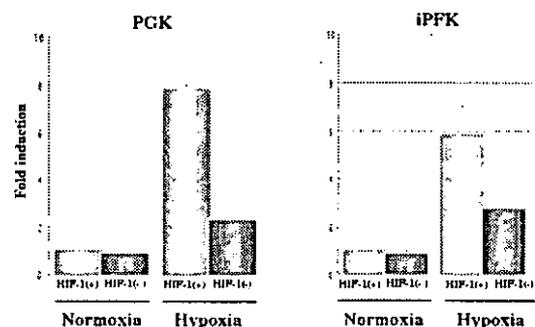
		HIF+/+	HIF-/-
Thymus	CD4+CD8+	63.4	66.7
	CD4+CD8-	8.7	7.0
	CD4-CD8+	3.4	1.8
	CD4-CD8-	2.1	2.4
Spleen	CD3	35.9	26.0
	B220	42.8	47.6
	CD4/CD8	0.6	0.62

T 細胞の分化・成熟に対する HIF-1 α 遺伝子欠損の影響について

胸腺細胞および脾細胞の表面マーカーを FACS にて解析した。その結果、正常マウスと比較し HIFDFLckCre マウスにおける T 細胞の分化・成熟の程度は HIF-1 α 遺伝子欠損の影響を受けないことが明らかになった (表)。

3) T 細胞における低酸素刺激による HIF-1 応答の解析

成熟 T 細胞が低酸素刺激に反応し HIF-1 蛋白を発現できるか否かを解析するために、低酸素刺激により HIF-1 を介して発現誘導されることが知られている遺伝子の発現を定量的に解析した。その結果、HIF-1+/+ T 細胞は低酸素刺激に反応し PGK や iPFK の有意な発現誘導を認めた (図 2)。一方、HIF-1 α 遺伝子欠損 T 細胞は低酸素刺激に対してこれらの遺伝子発現が有意に抑制されていることが明らかになった。以上の結果より、T 細胞は低酸素刺激に反応し HIF-1 蛋白の発現を誘導する



ことで下流の遺伝子群の発現を制御できることが明らかになった。

図 2. 低酸素刺激に対する T 細胞における HIF-1 蛋白発現誘導

4) T cell receptor 刺激に対する HIF-1 α 遺伝子欠損 T 細胞の応答

マウス脾臓より分離した CD4 陽性細胞を、in vitro で T cell receptor (TCR) 刺激を mimic する目的で固相

化した抗 CD3/28 抗体に暴露することで T 細胞の活性化を行い、培地中に分泌される IFN- γ 産生を ELISA により測定した。その結果、通常酸素環境 (20%) 下において HIF-1 $^{-/-}$ T 細胞は HIF+/+ 細胞と比較して IFN- γ 産生能の低下が認められた (図 3)。また、低酸素培養条件下では、HIF-1 遺伝子欠損に関係なく両者の細胞において IFN- γ 産生低下が認められたが、その産生量は HIF-1 $^{-/-}$ T 細胞の方が更に少なかった。

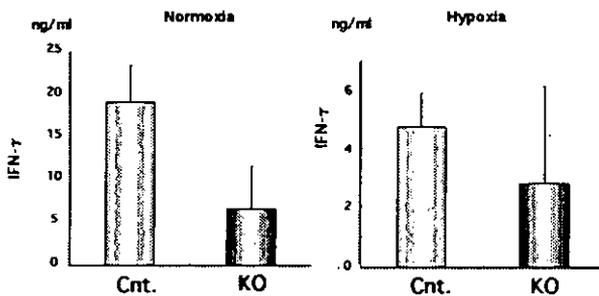


図 3. T 細胞における HIF-1 遺伝子発現有無による TCR 刺激に対する応答性の変化

D. 結論

T 細胞特異的に HIF-1 α 遺伝子を欠失するマウスを製作した。

(1) HIFDFLckCre mouse では T 細胞分化に異常は認めな

かった。

(2) HIF-1 $^{-/-}$ T 細胞では TCR 刺激による活性化能が酸素環境に関係なく低下していた。

E. 文献

- 1) Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182-205, 1998
- 2) Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, et. al. VEGF, basic-FGF, and TGF- β in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol.* 96, 822-828, 2001
- 3) Semanza G. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3, 721-732, 2003

F. 今後の予定

HIF-1 遺伝子を欠失した T 細胞の *in vivo* での機能を検討するため、CD45Rb^{high} colitis model を用いて、低酸素による免疫制御機構を解析する予定である。

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

炎症性腸疾患における Heme oxygenase の役割

協力研究者 吉川敏一 京都府立医科大学大学院生体機能制御学 教授

研究要旨：マウス Dextran Sodium Sulfate (DSS) 腸炎モデルを用いて Heme oxygenase-1 (HO-1) の役割を検討した。大腸粘膜において腸炎の発症とともに経時的に HO-1 発現が増強してきており、HO-1 阻害剤投与により腸炎の有意な増悪を認めたことから、この HO-1 発現は組織保護的に働いている可能性が考えられた。今後さらなる検討を行いヒト炎症性腸疾患における新規治療標的分子としての可能性に関して調査研究していきたい。

共同研究者

内藤裕二 京都府立医科大学消化器病態制御学
高木智久 京都府立医科大学生体機能制御学

A. 研究目的

急性炎症の場合においては Heme oxygenase-1 (HO-1) が急性期蛋白として誘導され、その炎症に介入し抑制的に働くことが知られている。しかしながら、炎症性腸疾患における HO-1 の役割に関しては不明な点が多い。そこで今回我々は、マウス Dextran Sodium Sulfate (DSS) 腸炎モデルを用いて HO-1 の役割を検討した。

B. 研究方法

7 週齢雄性 BALB/c マウスを用いて、8%DSS (分子量 8000) の自由飲水により炎症性腸疾患モデルを作製した。経時的に体重変化、腸管長、腸管内出血、炎症性サイトカイン蛋白量・mRNA 発現を検討し、組織学的に炎症像の評価を行った。さらに、HO-1 阻害剤 Zinc Protoporphyrin (ZnPP) を投与することによる病態の修飾についても検討を加えた。本実験に関しては本学内実験動物取り扱い規約を遵守して施行された。

C. 研究結果

DSS 腸炎では大腸粘膜層を中心に著明な炎症細胞浸潤を伴う腸炎が発生し、大腸粘膜における HO-1 蛋白量・mRNA 発現は経時的に増加が認められた。大腸粘膜における催炎症性サイトカイン IFN- γ 、TNF- α 、また、抗炎症性サイトカインである IL-4、IL-10 蛋白量・mRNA 発現の増加が認められた。ZnPP 投与により DSS 腸炎は有意に増悪し、サイトカインの発現にも影響を及ぼした。

D. 考察

DSS 腸炎の発症に伴い大腸粘膜における HO-1 の発現は経時的に誘導されてきた。HO-1 阻害剤 ZnPP 投与により腸炎の有意な増悪を認めたことから、この HO-1 の発現は組織保護的もしくは修復的に働いている可能性が考えられた。

HO-1 による腸炎抑制機序のひとつとしてサイトカインバランスの維持が関わっている可能性が示された。今後、HO-1 を大腸粘膜に強発現させることによる腸炎発症抑制効果、さらには、腸炎治療効果の検討を行っていく予定である。

E. 結論

DSS 腸炎の成立において、炎症の成立とともに発現の亢進する Hemoxygenase-1 はサイトカインバランスの維持を通じて生体防御に関与していることが示された。

F. 文献

特記事項なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
取得なし
2. 実用新案登録
登録なし
3. その他
特記事項なし

クローン病および潰瘍性大腸炎に関する疫学指標の検討

分担研究者 武林 亨 慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生 講師

研究要旨：クローン病および潰瘍性大腸炎について、疫学的あるいは政策的に把握すべき疫学指標の内容について検討した。また、これらの数値を正確に推定するために必要な要素についても検討を加えた。さらに、Medline 収載の論文を検索し、諸外国における疫学指標の評価方法とその報告値についてレビューを行った。

A. 研究目的と方法

わが国におけるクローン病および潰瘍性大腸炎の罹患率、緩解率、再発率など疫学指標を算出することは、これらの疾患の動態を正しく把握するのに必要であり、また難治性疾患克服対策研究事業の基礎資料としても欠かさない。本年は、臨床調査個人票のデータから作成可能な、疾患の動向把握を目的とした年次動態報告の内容について検討し、さらに海外における基礎疫学データ把握の現状について調査を行った。

B. 疾患の動向把握について

各都道府県を通じて、難治性疾患克服対策研究事業における臨床調査個人票の集計結果が報告されるようになると、年度単位で各疾患の動態を把握できるようになり、年度ごとにその変動を報告することが可能となる。その内容について疫学的見地から検討した。

(1) 含まれるべき内容

- ・推計患者数
- ・難治性疾患克服対策研究事業対象者数
- ・同事業から一旦除外される患者数
- ・罹患率、有病率、緩解率、再燃率
 - ・日本全体・都道府県別
 - ・男女別・年齢階級別
 - ・標準化（性、年齢）
- ・転帰
- ・予後

(2) 精度向上のために検討が必要と考えられる点

- ・調査個人票を提出しない患者数の把握・推定
- ・データの精度管理

- ・重複登録の可能性と把握
- ・登録患者を個別に追跡できる仕組み
- ・施設内登録との連携の可能性
- ・地域コホート（population-based cohort）との連携の可能性

C. 海外における基礎疫学データ把握の現状

Medline の検索により、公表された論文に関する調査を行った。

(1) デンマーク

デンマークでは、National Registry of Patients (NRP) と呼ばれる患者登録システムが整備され運用されている。これは、public hospital からの退院患者を登録するものである。このシステムを用いたクローン病 (CD) および潰瘍性大腸炎 (UC) の罹患率 (1981 年～1992 年) が報告されている (Fonager K, et al. Change in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Denmark. A study based on the National Registry of patients, 1981-1992. Int J Epidemiol 1997;26:1003-1008.)。登録データから、ICD-8 コードによって対象 2 疾患患者を同定し、1992 年のデンマークの人口（およそ 510 万人）を標準集団とした性・15 歳年齢階級による標準化を行った。その結果、12 年間の退院数は、CD 10,953, UC 23,877, 同期間の新たなデータベース登録数は、CD 2,806, UC 8,125 であった。年齢調整罹患率 (per 100,000 person-years) は、1981～1984 の 3 年間平均罹患率 CD 男性 3.3 女性 4.6, UC 男性 14.1 女性 15.4, 1989～1992 の 3 年間平均罹患率 CD 男性 4.1 女性 6.2, UC 男性 12.6 女性 12.3 と、CD で経年的に増加する傾向が認められた。1994 年からは、

外来のデータも登録されるシステムが整備されており、今後は、より精度の高い数値の算出を行うとしている。

(2) アメリカ

アメリカに関しては、多くの地域コホート (population-based cohort) における患者登録データに基づく罹患率、有病率等の報告が行われている。LoftusらによるCDに関するsystematic review(Loftus EV, et al. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:51-60.)によれば、10の報告における性・年齢調整罹患率は3.1~14.6 (per 100,000 person-years), 4報告における性・年齢調整有病率は26.0~198.5 (per 100,000 person-years)であった。また、彼ら自身が追跡しているOlmsted countyのnatural historyに関するデータをまとめると、CD患

者診断後46.4年間の臨床経過は、緩解期23.9%、軽症期27.3%、重症期 (drug-responsive) 0.9%、重症期 (drug-dependent) 4.3%、重症期 (drug-refractory) 1.8%、外科1.1%、術後緩解40.7%であったという。

(3) 韓国

ソウルのIBD拠点病院であるAsan Medical Center (ソウル中央病院)を中心にSongpa-Kangdong district (ソウルの松坡区、江東区)のUCに関する患者把握・登録をhospital-basedに実施した結果が報告されている (Yang SK et al. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the Songpa-Kangdong district, Seoul, Korea, 1986-1997.). 1986~1997年の同地区のUC罹患数は94、性・年齢調整後の平均罹患率は0.68 (per 100,000 person-years)であったが、ポワッソン回帰分析によって、罹患率は0.20 (1986-88)から1.23 (1995-97)に増加する傾向があるという。

粘膜再生治療－基礎面から－実験動物モデル フォリスタチンによる腸炎治療効果

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：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。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、炎症時にもその産生が上昇する。マウス腸炎誘導後のアクチビンβA mRNA の発現を *in situ* hybridization により解析したところ、上皮細胞、浸潤マクロファージのいずれにも発現亢進が見られた。さらにマウスにデキストラン硫酸飲水内投与による腸炎を確立した後、フォリスタチン腹腔内投与を行った所、投与群で大腸上皮の分裂促進効果とともに腸炎治療効果が見られた。また、アクチビンは培養大腸上皮細胞株に対して炎症性ケモカイン産生を促す作用のあることが明かとなり、フォリスタチンは多彩なメカニズムにより抗炎症作用を発揮していると考えられた。

A. 研究目的

炎症性腸疾患に対する新規治療法としての粘膜再生療法の開発が、従来の治療法を補う重要な治療法として期待されている。我々は腸上皮障害修復再生においても重要な因子として明らかとなった肝細胞増殖因子(HGF)の遺伝子治療と、Th1細胞に遊走活性を示すケモカインであるCXCL10/IP-10の制御による炎症性腸疾患の粘膜再生に基づく新規治療法開発の基礎的検討を、デキストラン硫酸大腸炎(DSS)モデルを用いて行なった。

B. 研究方法

- ①TNBS 腸炎誘導 24 時間後のアクチビンβA mRNA の発現を *in situ* hybridization により解析した。
- ②BALB/c マウスに 5%デキストラン硫酸 (DSS) 飲水内投与を 7 日間継続し、腸炎を確立した後、フォリスタチン隔日腹腔内投与を 3 回行い、12 日目に効果を判定した。DSS は 12 日目まで投与を続けた。マウス大腸上皮細胞株 MVE301¹ 及びヒト大腸上皮細胞株 HT29 を用い、アクチビン、フォリスタチンを培養液に添加し、経時的に細胞数をカウントし、細胞増殖における影響を解析した。また、Monolayer を形成させたこれらの細胞株にアクチビンAを添加し、培養上清中の炎症性ケモカインMCP-1及びIL-8をELISAにて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験計画は動物実験委員会の審査を経て行われた。

C. 研究結果

TNBS 誘導腸炎モデルにおいてはアクチビン発現の亢進していることを mRNA レベルで確認した。In situ hybridization の結果、上皮細胞だけでなく、間質に浸潤している炎症性マクロファージにもアクチビン発現の上昇が認められた。

DSS 飲水内投与開始後 7 日で全てのマウスに血便が見られたが、フォリスタチン治療群では 12 日目まで便の性状、血便、病理組織スコア、腸管長の短縮が、いずれも改善された。いずれのモデルにおいてもフォリスタチン投与群では、BrdU 陽性分裂細胞が増加しており、上皮の増殖能亢進が顕著であった。さらに健常マウスにフォリスタチンを投与したところ、大腸上皮において、投与後 3 時間から BrdU を取り込む増殖細胞数が顕著に増加した。

マウス大腸上皮培養細胞株を用いた実験では、フォリスタチン添加により細胞増殖が更新した。また、メンブランフィルター上で培養し、極性を獲得させた大腸

上皮細胞株では、高濃度アクチビン添加により、MCP-1, IL-8 などの炎症性ケモカインの basal 側への分泌が増加した。

D. 考察

アクチビンAには定常状態から上皮細胞の増殖を抑制し、炎症性ケモカインの産生を促す作用があり、フォリスタチンの抗炎症効果はこれらの作用をブロックすることにより、発揮されていると考えられる。しかし、腸炎においてアクチビンの産生が劇的に上昇することの生物学的意義は未だ不明の部分も多く、線維化との関係など今後解明すべき点が残されている。

E. 結論

フォリスタチン投与により、既に発症した腸炎においても、上皮の再生を促し、上皮による炎症性ケモカインの産生を抑制することによって炎症が緩和された。このことからフォリスタチンによる腸炎治療の可能性が示された。フォリスタチンは多彩なメカニズムにより抗

炎症作用を発揮していると考えられる。

F. 文献

- 1) Tabuchi Y, Ohta S, Arai Y, Kawahara M, Ishibashi K, Sugiyama N, Horiuchi T, Furusawa M, Obinata M, Fuse H, Takeguchi N, Asano S: Establishment and characterization of a colonic epithelial cell line MCE301 from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. Cell Structure and Function 2000, 25:297-307

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
なし