

#### G. 参考文献

1. 棟方昭博：潰瘍性大腸炎診断基準改訂案. 厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班 平成9年度研究報告書 96-99, 1998.
2. Field MJ, Lohr KN (eds). Clinical practice guideline. National Academy Press. Washington DC, 1990.
3. Eddy DM: Designing a practice policy: Standards, guideline and options. JAMA 263:3077-3082, 1990.
4. Shiffman RN, Schekelle P, Overhage M et al: Standardized reporting of clinical practice guidelines: A proposal from the conference on guideline standardization. Ann Intern Med 139:493-498, 2003.
5. Lohr KN, Field MJ: A provisional instrument for assessing clinical practice guidelines. In: Field MJ, Lohr KN (eds).

Guideline for clinical practice. From development to use. National Academy Press. Washington DC, 1992.

#### H. 研究発表

1. 上野文昭, 岩男泰, 小林健二. 腸管ベーチェット病・単純性潰瘍の診療に関するコンセンサス・ステートメント：デルファイ法とエキスパート・パネルを用いた公式的合意形成の試み. 第12回日本消化器関連学会週間（第46回日本消化器病学会大会）・シンポジウム. 2004年10月, 福岡.

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし.

## サイトメガロウイルス感染を伴った 潰瘍性大腸炎に対する抗ウイルス剤の治療効果

研究協力者 松井 敏幸 福岡大学筑紫病院消化器科 助教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎（以下 UC）におけるサイトメガロウイルス（以下 CMV）感染例の臨床経過とガンシクロビル（以下 GCV）の治療効果について明らかにすることを目的とした。中等症以上の重複例を除いた連続例の UC128 例中、CMV 感染と診断され GCV 投与された時点で活動期にあった 28 例を対象とした。GCV 投与前後で臨床症状 (UCDAI) と内視鏡スコアを比較した。また、臨床経過で GCV の効果を著効、有効、併用有効、無効の 4 段階に分類し、その有効性を検討した。GCV 著効 4 例、有効 9 例、併用有効 5 例、無効 10 例で、著効、有効、併用有効をあわせると全体の 64.3%であった。GCV 投与前後で有意に UCDAI スコアは低下し、内視鏡スコアも低下していた。有効例と無効例の C7-HRP 陽性細胞数の比較では、両者に差はなく、組織学的 CMV の有無でも効果に差はみられなかった。CMV 感染を合併した UC に対して GCV の有効性が確認された。治療に難渋した症例に対しては積極的に同剤を投与する必要がある。

### 共同研究者

和田陽子 平井郁仁 八尾恒良

### 所属

福岡大学筑紫病院消化器科

### A. 研究目的

潰瘍性大腸炎（以下 UC）の難治化、重症化の要因としても注目されているが、抗ウイルス剤であるガンシクロビル（以下 GCV）の治療効果についての多数例で検討した論文は少なく、その効果について疑問視する報告もあり、GCV 投与の必要性についての結論は依然でない。そこで我々は GCV の有効性と、どのような症例に対して GCV を投与する必要があるかを明らかにすることを検討した。

### B. 研究方法

2000年9月から2002年12月までに福岡大学筑紫病院消化器科に入院した中等症以上の重複例を除いた連続例の UC128 例中、一度でも antigenemia (C7-HRP または C10.11) により、または免疫染色を含めた組織学的によりサイトメガロウイルス（以下 CMV）が証明できた症例を CMV 感染例と診断した。上記基準に合致する 42 例のうち GCV 投与時に UCDAI スコアが 6 点以上であった 28 例を対象とした。

### 検討項目：

1) GCV の治療効果；著効（GCV 投与前後で治療を変えずに 2 週間後に症状、内視鏡所見ともに著明な改善

がみられた症例）、有効（GCV 投与で明らかに症状が改善し、GCV 終了後に他治療を加えることで緩解しえた症例）、併用有効（GCV 投与中に他の治療を併用しているためどちらの効果かは不明であるが症状が改善した症例）、無効（症状、内視鏡ともに改善がみられなかった症例）の 4 段階に分類し有効性を検討した。

- 2) スコアによる GCV の有効性；臨床症状では UCDAI スコアを内視鏡では Matts 分類と Blackstone 分類をスコア化して用い GCV 投与前と終了直後を比較した。
- 3) 有効例と無効例の比較；著効、有効、併用有効を有効例として無効例と antigenemia の細胞数、生検組織での核内封入体の有無を含めた CMV 感染の有無を比較した。

### C. 研究結果

- 1) 著効 4 例、有効 9 例、併用有効 5 例、無効 10 例で、著効、有効、併用有効をあわせると全体の 64.3%、併用有効を除外しても 56.5% で高い有効率であった (Table1)。
- 2) GCV 投与前後の UCDAI スコアを検討可能な 26 例で比較した。GCV 投与前後で有意に UCDAI スコアは低下していた (Table2)。内視鏡スコアの比較は Matts、Blackstone の両スコアとも GCV 投与後に有意に低下していた (Table3)。
- 3) 陽性細胞数での治療効果については C7-HRP 陽性 22 例を対象に有効例と無効例の陽性細胞数を比較したが両者に有意差はなく、組織学的 CMV の有無

についても有意差はみられなかった。

Table1 CMV感染例に対するGCVの有効性

著効	4例	(14.3%)	56.5% (13/23)	64.3%
有効	9例	(32.1%)		
併用有効	5例	(17.9%)		
無効	10例	(35.7%)		

Table 2 GCV投与前後のUC-DAIスコアの比較 (n=26\*)

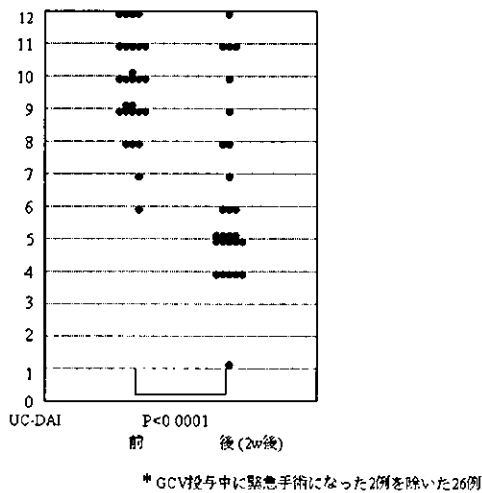
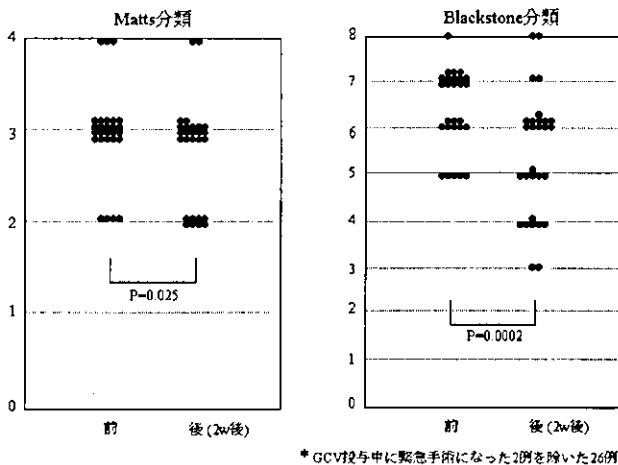


Table3 GCV投与前後の内視鏡スコアの比較 (n=26\*)



#### D. 考察

我々はUCにおけるCMV感染例の臨床像について検討1)してきたが、ステロイド抵抗例にCMV感染を多く認めるため抗ウイルス剤による早期治療の必要性を論じてきた。しかし、治療についての論文は少なく、その対象例数も不十分である。これらの報告では投与例の半数以上にGCV投与が有効または緩解したと報告2)3)されている一方でSaussureら4)の報告のように3例中1例のみに効果があったとGCV投与の有効性について否定的な報告もある。今回の結果で、GCV投与追加により臨床所見、内視鏡所見が著明に改善した著効4例を含めGCV投与により緩解しえた症例は18例におよびその比率は64.3%となり、GCVの有効性が高かった。しかし、どのような症例に対してGCVを投与すべきかという検討ではantigenemiaの陽性細胞数や組織学的CMVの有無で治療効果については有意差がなく、いずれも治療開始の指標にはなりえず、現時点では治療に難渋するCMV感染例に対しては積極的に投与する必要があると考えられた。

#### F. 参考文献

- 1) Wada Y, Matsui T, Mataka H, Sakurai T, Yamamoto J, Kikuchi Y, et al. Intractable ulcerative colitis caused by cytomegalovirus infection; A prospective study on prevalence, diagnosis and treatment. *Dis Colon Rectum* 2003;suppl 46:s59-s65.
- 2) Vega R, Bertran X, Menacho M, Domenech E, Vega VM, Hombrados M, et al. Cytomegalovirus infection in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1053-6.
- 3) Papadakis KA, Tung JK, Binder AW, et al. Outcome of cytomegalovirus infection in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2137-42.
- 4) Saussure P, Lavergne-Slove A, Mazon MC, et al. A prospective assessment of cytomegalovirus infection in active inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 ;20:1323-7

## 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及び炎症と大腸発癌モデル

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：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、マウス腸炎において発現亢進が見られるため、その天然阻害物質フォリスタチン投与による腸炎治療効果を評価した。その結果、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 腸炎・デキストラン硫酸 (DSS) 腸炎においては投与群で大腸上皮細胞の分裂促進効果とともに腸炎治療効果が見られた。DSS 腸炎においては回復期に投与することにより体重回復の促進効果と大腸上皮の過形成がみられた。また、フォリスタチン投与により IL-10 遺伝子欠損マウス大腸炎の改善もみられた。異常の結果より、フォリスタチンは上皮の修復促進作用により大腸における炎症反応を軽減していると考えられた。また、azoxymethane (AOM) 大腸発がんマウスモデルを用いて、TNBS 腸炎誘導による大腸発がんへの影響について検討した。潰瘍性大腸炎のモデルとして IFN $\gamma$  ノックアウトマウス、Crohn 病モデルとして IL-4 ノックアウトマウスを用いて、形成した腫瘍の病理学的差異をみいだした。

### 共同研究者

中島 淳 横浜市立大学 助教授  
小島 至 群馬大学生体調節研究所 教授

### 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。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、炎症時にもその産生が上昇する。我々はこれまでの研究で、アクチビンの天然阻害剤であるフォリスタチン前投与により、マウスモデル腸炎の発症が抑えられることを示してきたが、本年度は DDS 腸炎モデルの回復期フォリスタチン投与における影響と、IL-10 遺伝子欠損マウス大腸炎における抗炎症効果を評価した。

炎症性腸疾患の中でも潰瘍性大腸炎患者 (UC) では若年に大腸癌が高頻度に発生するが、平坦型で浸潤傾向の強い比較的低下分化型の癌が多いため、より早期での発見が必要と考えられる。また UC 合併大腸癌は遺伝子変異の時期、パターンが非 UC 大腸癌とは異なっており、発生母地が異なる可能性が示唆されている。炎症局所のサイトカイン応答について UC では Th2 優位、

Crohn 病では Th1 優位と異なることが報告されている。我々はこれまでに AOM 発癌と TNBS 腸炎を組み合わせる事により、UC モデルである IFN $\gamma$  遺伝子欠損マウスにおいては野生型、IL-4 遺伝子欠損マウスに比して有意に大腸腫瘍が頻発することを示した。本年度は形成された大腸腫瘍における p53、 $\beta$  カテニンの発現を解析した。

### B. 研究方法

- ① BALB/c マウスに 5% DSS の飲水内投与を 7 日間継続し、腸炎を確立した後、DSS 投与を中止し、フォリスタチン 5 $\mu$ g 隔日腹腔内投与を 3 回行い、13 日目に効果を判定した。
- ② IL-10 遺伝子欠損マウスを SPF 環境から conventional 環境に移し、4 週後に腸炎の発症を確認した後、フォリスタチン 5 $\mu$ g を 3 日ごとに 3 回腹腔内投与した。最終投与から 3 日後に組織学的解析を行った。
- ③ UC モデルとして Th2-dominant マウス (IFN $\gamma$  遺伝子欠損マウス)、Crohn 病のモデルとして Th1-dominant マウス (IL-4 遺伝子欠損マウス) 8 週令を用い TNBS 腸炎を誘導するとともに発癌物質である AOM を投与し、さらに TNBS 腸炎誘導を隔週に 6 回行い 32 週後で発生した大腸腫瘍の組織学的解析を H&E 染色、p53、 $\beta$  カテニン染色を行った。(倫理面への配慮)

本研究における動物実験計画は動物愛護に配慮し、動物実験委員会の審査を経て行われた。

### C. 研究結果

① DSS 腸炎から体重の回復は、フォリスタチン投与群で優位に促進された (図1)。

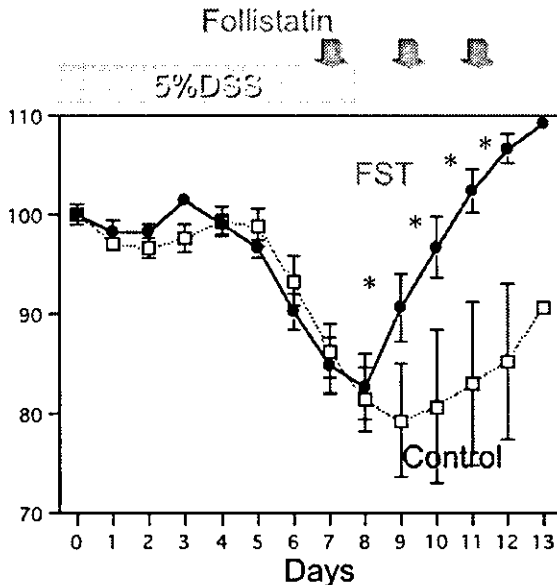


図1 DSS 腸炎回復期におけるフォリスタチンの効果  
また、フォリスタチン投与群の大腸上皮は過形成を示したが、核異型などは認められなかった。(図2)



図2 DSS 腸炎回復期フォリスタチン投与にみられる大腸上皮の過形成

- ② フオリスタチン投与を行った IL-10 遺伝子欠損マウスでは、非投与群に比べ大腸壁厚および大腸組織における IFN- $\gamma$  mRNA の発現が優位に減少し、さらに所属リンパ節の重量も優位に低かった。
- ③ 発生した腫瘍の形態及び組織学的特徴は野生型、IL-4 遺伝子欠損、IFN- $\gamma$  遺伝子欠損マウスの間で相違は認められなかった。P53 染色は、IFN- $\gamma$  遺伝子欠損マウスでやや強い傾向があった。 $\beta$  カテニン染色は IL-4 遺伝子欠損マウスでは細胞-細胞接着面の上

皮細胞膜に強く発現していたが、IFN- $\gamma$  遺伝子欠損マウスでは核が染色された。野生型のマウスに発生した腫瘍にはこの 2 つのタイプの細胞内分布を示すものが混在していた。

### D. 考察

アクチビンAは定常状態においても大腸上皮細胞の増殖を抑制しているため、フォリスタチンの抗炎症効果は上皮の分裂促進により発揮されていると考えられる。IL-10 遺伝子欠損マウスの腸炎においてはT細胞の活性化が重要であるが、フォリスタチン投与により上皮の迅速な修復が起こり、腸内細菌の translocation が阻害されたために、大腸及び所属リンパ節での炎症応答を軽減したと考えている。

また、 $\beta$  カテニン染色に違いが見られたことから、腸管局所での免疫学的環境の差異が、腫瘍発生に影響を及ぼすだけでなく、腫瘍における遺伝子変異にも影響している事が示唆された。病態を反映したモデルとして、今後このモデルを用い炎症からの発癌メカニズムや有効な chemoprevention の開発が期待される。

### E. 結論

フォリスタチン投与により、ハプテン TNBS による免疫誘導と組織傷害、DSS による上皮傷害、IL-10 欠損による T 細胞活性化と、異なったメカニズムによるマウスの腸炎が緩和された。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。また、Th2 型に傾いたマウスの大腸では癌遺伝子変異が野生型のマウスとは異なる事が示唆され、UC 発癌モデルとして有用であると考えられる。

### F. 文献

1. Dohi, T., Ejima, C., Kato, R., Kawamura, Y. I., Kawashima, R., Mizutani, N., Tabuchi, Y., and Kojima, I. Therapeutic potential of follistatin for colonic inflammation in mice. *Gastroenterology*, 128:411-423, 2005.

### 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  
出願中 1 件

## 骨髄間葉系幹細胞を用いた炎症性腸疾患の治療法の開発

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学 学長

研究要旨：炎症性腸疾患では若年罹患，慢性経過により，患者 QOL の低下は重大である。骨髄幹細胞分化における可塑性が報告され，消化管組織においても，その修復過程は消化管特異的成人幹細胞のみならず骨髄由来細胞の関与が示唆されるようになった。骨髄間葉系幹細胞は分離培養が容易であり，免疫原性が最小限であることが最大の特徴である。そこで骨髄間葉系幹細胞を用いた炎症性腸疾患の治療法の開発を目的とした。

### A. 研究目的

骨髄由来細胞分化における可塑性が報告され，消化管組織においても，その修復過程は消化管特異的成人幹細胞のみならず骨髄由来細胞の関与が示唆されるようになった。そこで骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を用いた炎症性腸疾患の治療法の開発を目的とした。

### B. 研究方法

- (1) ラットの大腿骨および脛骨より骨髄細胞を単離し，15%FCS 添加  $\alpha$ -MEM にて培養。3 日後に 1 回目の培地交換，その後 2~3 回/週で培地交換し付着系細胞を採取した。
- (2) FACS により培養単離された MSC の表面マーカーを検討した。
- (3) ラットに 3% DSS を 7 日間自由飲水させ腸炎を誘発。MSC 投与群では DSS 投与開始後 day2 から day5 に MSC  $2 \times 10^4$  cell/g/day を尾静脈より投与。Day6 に屠殺し大腸を摘出した。
- (4) GFP および LacZ 導入 F/RGD 変異アデノウイルスを MSC に感染させ，その形質導入効率を検討した。

### C. 研究結果

- (1) 未分化細胞マーカー CD90 陽性，血球系マーカーである CD11b, CD31, CD43, CD44, CD45 はいずれも陰性であり培養単離された骨髄由来細胞は MSC と考えられた。
- (2) 体重変化は，day4 までは明らかな差がなくその後 MSC 非投与群では減少，MSC 投与群では増加傾向を認めた。摘出した腸管のマクロ所見上，非投与群では，腸

管内は多量の血液で満たされ，泥状を呈した。一方，MSC 投与群では，腸管内容物は有形であり，明らかに腸炎の増悪が抑制された。

- (3) F/RGD 変異型ウイルスを用いることにより，野生型に比較して高い形質導入効率を得られた。
- F/RGD 変異ウイルスを用いて GFP 遺伝子を導入した場合 100% の導入効率であった。

### D. 考察

ラットの MSC は容易に培養単離可能であった。DSS 誘発ラット実験的腸炎モデルにおいて異種 MSC 移植はその腸炎の誘発を予防できた。ファイバー変異型 (F/RGD) アデノウイルスを用いることにより MSC に対して高い形質導入効率を得られた。今後，GFP 標識 MSC を用いて，生体内での MSC の運命の検討 (分布と分化)，MSC の腸炎抑制における作用機序の解明，変異型アデノウイルスを用いた MSC をベクターとした遺伝子治療の可能性を検討予定である。

### E. 結論

MSC 移植は有望な炎症性腸疾患の治療法であることが示唆された。本研究は，消化管修復過程における骨髄由来細胞の役割を解明するのみならず，即座の臨床応用が可能でありその成果が期待される。

### F. 研究発表

- 1) Causal Role of Stromelysins in Experimental Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium. (Submitted)
- 2) Inflammatory Gene Signature in UC with cDNA Macroarray Analysis. (AP&T in press)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。

## 実験大腸炎モデルにおける HGF の作用機序の解明

分担研究者 坪内 博仁 宮崎医科大学第2内科 教授

研究要旨：肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) を用いた炎症性腸疾患の粘膜再生治療が期待されており、臨床応用に向けて、炎症性腸疾患に対する HGF の作用機序を明らかにする必要がある。今までに、硫酸デキストラン (DSS) 腸炎ラットに対して、遺伝子組み換え型ヒト HGF (rhHGF) を腹腔内持続投与及び尾静脈投与すると病理学的に病態進展は軽減され、その効果は消化管粘膜細胞の増殖促進作用と抗炎症作用によることを明らかにしている。本年度はその作用機序をさらに詳細に検討するために、DNA マイクロアレイ解析とプロテオーム解析を用いて検討した。DNA マイクロアレイ解析では DSS 腸炎で発現が増強もしくは低下し、その発現が rhHGF 投与により明らかに改善する遺伝子群が存在すること、さらのその中には細胞増殖関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子が含まれていることを明らかにした。また、rhHGF 投与にて変動する血清蛋白をプロテオーム解析装置を用いて検討し、DSS 腸炎ラットに rhHGF を投与すると、DSS 腸炎ラットに比較して、明らかに発現が亢進するピークを認めた。本研究により、rhHGF 投与による病態改善に関与する可能性のある遺伝子、及び蛋白の候補を見出した。今後さらにその解析をすすめたい。

### 共同研究者

井戸章雄<sup>1)</sup> 宇都浩文<sup>2)</sup> 沼田政嗣<sup>2)</sup>  
安倍弘生<sup>2)</sup> 上村修司<sup>2)</sup>

### 所属

京都大学医学部<sup>1)</sup>  
宮崎大学医学部第2内科<sup>2)</sup>

### A. 研究目的

DNA マイクロアレイと SELDI (=Surface Enhanced Laser Desorption/ Ionization) プロテインチップシステムは網羅的に遺伝子発現もしくは蛋白発現プロファイルを検討できる。本研究では、炎症性腸疾患に対する HGF 治療の確立を目指して DSS 腸炎ラットに rhHGF を静脈投与し、その効果と作用機序を明らかにするために DNA マイクロアレイおよびプロテインチップシステムを用いて検討した。

### B. 研究方法

①7 週齢の Wistar ラット (雄) に 5% DSS 溶液を 4 日間自由飲水させ、腸炎を誘発した。②DSS 投与開始日から、rhHGF を 0.5mg/kg/日、尾静脈より投与し、コントロール群には PBS を投与した。③DSS 投与開始 4 日目に両群の大腸粘膜から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。④DSS 投与 4 日目に両群の血清を用いてプロテオーム解析を行った。

### C. 研究結果

③DSS 投与 4 日後のラット大腸組織より抽出した RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、健常ラットに比べて発現が変動する遺伝子は、2 倍以上の発現が認められるものが 2542 個、5 倍以上の発現が認められるものが 134 個、1/2 倍以下に発現が抑制されるものが 2076 個、1/5 倍以下に発現が抑制されるものが 634 個であった。また、HGF 投与、PBS 投与、健常ラットの 3 群間でクラスター解析を行い、DSS で発現が亢進し、HGF 投与でその亢進が抑制されている遺伝子は 59 個、DSS で発現が低下し HGF 投与で発現低下が回復している遺伝子は 27 個であった。その中には、細胞増殖関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子も含まれていた。④DSS 投与 4 日後のラット血清を用いてプロテオーム解析を行い、HGF 投与群で約 5000M/Z、約 8000M/Z にピークを認めた。

### D. 考案

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, HGF) は種々の上皮細胞に対する増殖促進作用のみならず、抗アポトーシス作用、抗線維化作用など多くの生理活性を有している。炎症性腸疾患では HGF 投与が腸粘膜上皮細胞に対して増殖を促進し、粘膜修復を促進するのみならず、抗アポトーシス作用を介した病態進展阻止などの効果をもたらすことが期待される。このように HGF は多彩な

作用を有することから、HGF の作用機序、薬効及び副作用の検討には網羅的な遺伝子・蛋白発現解析が有用と考えられる。我々は今までに DSS 腸炎ラットにおいて、rhHGF を腹腔内に持続投与及び経静脈半回連日投与で、腸粘膜上皮細胞の増殖促進作用と HGF による抗炎症作用、Bcl-xL の発現促進を介した抗アポトーシス作用を明らかにした。また、本年度は、DSS 腸炎ラットに対して HGF の投与で確認された効果の作用機序を明らかにするために DNA マイクロアレイ解析及びプロテオーム解析を導入し、病態進展や HGF の作用に関する遺伝子や蛋白の候補を見出した。今後は更に詳細な解析を行い、効果発現に関与する可能性のある個々の遺伝子および蛋白について解析を行う予定である。また、遺伝子組み換え型ヒト HGF には明らかな発癌促進作用はみられていないが、その可能性は否定できないため、大腸癌モデルに対する HGF の影響についても検討を開始している。これらのモデルや DSS 腸炎モデルを用いて DNA マイクロアレイ解析による発癌関連遺伝子群についても検討する必要がある。

#### E. 結論

DSS 腸炎に対する HGF の効果は、上皮細胞増殖促進および抗アポトーシス作用を介することを明らかにし、その効果には多くの遺伝子発現が関与している可能性が考えられた。また、その効果発現に重要な蛋白の候補を見出した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ido A, Moriuchi A, Kim H, et al. Pharmacokinetic study of recombinant human hepatocyte growth factor administered in a bolus intravenously or via portal vein. *Hepatol Res* 30, 175-181, 2004.

2. Hori T, Ido A, Uto H, Hasuike S, Moriuchi A, Hayashi K, Nakagawa S, Miyazawa K, Kitamura N, Tsubouchi : Activation of hepatocyte growth factor in monkey stomach following gastric mucosal injury. *Journal of Gastroenterology* 39. 2, 133-139, 2004
3. Hasuike S, Ido A, Uto H, et al. Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation and differentiation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol* (in press).

##### 2. 学会発表

1. 井戸章雄、森内昭博、坪内博仁. 難治性の消化器疾患に対する肝細胞増殖因子 (HGF) の臨床応用. 第 90 回日本消化器病学会総会 2004 年 4 月 22 日
2. 山本章二郎、宇都浩文、安部弘生、中西千尋、楠元寿典、蓮池悟、井戸章雄、林克裕、坪内博仁. 肝細胞増殖因子 (HGF) によるラット硫酸デキストラン実験腸炎に対する有効性の検討. 第 90 回日本消化器病学会大会 2004 年 4 月 21 日
3. 沼田政嗣、井戸章雄、坪内博仁. 傷害粘膜の再生修復を目的とした肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた新規治療法の開発. 第 46 回日本消化器病学会大会 2004 年 10 月 21 日
4. 沼田政嗣、井戸章雄、坪内佳子ら. TNBS 腸炎モデルにおける肝細胞増殖因子の傷害粘膜修復促進作用の検討. 第 46 回日本消化器病学会大会 2004 年 10 月 21 日
5. 井戸章雄、蓮池悟、坪内博仁. 肝再生を目的とした肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた新規治療法の開発. 第 46 回日本消化器病学会大会 2004 年 10 月 21 日 (福岡)

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし



## 炎症性腸疾患に対する新しい再生誘導療法の開発

分担研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：腸管上皮に備わる特異的分化・再生機構に関する独自の知見を集約し、本研究では腸管上皮細胞分化の分子機構、および骨髄細胞による上皮再生メカニズムを解析した。その結果、Notch シグナルによる腸管上皮の分化・再生機構に関し、新規シグナル伝達経路の存在を見出した。また、骨髄細胞による上皮再生に分泌型細胞への偏位を伴う特殊な分化機構が備わる可能性が示された。これらの成果は、重篤な組織再生障害を伴う難治性炎症性腸疾患に対し、細胞内シグナル伝達分子を標的とした新たな分化誘導療法、および骨髄由来細胞を利用する新たな細胞療法など、他面的再生療法の開発につながるものとして期待される。

### 共同研究者

岡本隆一 松本智子 山崎元美 土屋輝一郎  
中村哲也 金井隆典  
東京医科歯科大学大学院消化器病態学

### A. 研究目的

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）や骨髄移植後移植片対宿主反応による難治性慢性腸疾患は、その発症と病態維持に傷害粘膜上皮の再生不全が深く関わるが、その詳細はいまだ明らかでなく、従って標的細胞・分子を明確に定めた特異的再生療法はない。本研究は代表者らが独自に見いだしたところの、腸管上皮に備わる特殊な再生機構をさらに追究し、最終的には、組織再生誘導を促す新規治療法を目指すものである。すなわち、これまで申請者らは、傷害後の腸管上皮再生に骨髄細胞による組織修復機構が関わることを明らかにし（Nat Med 2002）、腸管上皮再生研究において世界的にも評価の高い成果をあげてきた。また一方、腸管上皮細胞でのサイトカイン発現調節に Interferon Regulatory Factor (IRF) ファミリー転写因子群によるきわめてユニークな転写制御機構が関与し、中でも特に IRF-1 分子がある特定の分化形質を有する上皮細胞に強く発現する事実を明らかにするなど（Mol Cell Biol 2004）、細胞内シグナル伝達機構を上皮細胞分化との関与という視点でとらえる独創的な成果をあげてきた。本研究ではこれを発展させ、1) 腸管上皮細胞分化に関わる Notch シグナルの新しい機能の探索、および 2) 傷害後腸管上皮組織修復に骨髄細胞が機能する詳細なメカニズムの検討、をおこなうことを目的とした。

### B. 研究方法・結果

1) ヒト内視鏡下生検組織検体およびヒト大腸癌由来培

養細胞を用い、上皮細胞分化と Notch シグナルの影響を解析した。その結果、a) 杯細胞消失、パネート細胞化生など分化異常を呈する慢性大腸炎において、Notch シグナル構成分子の発現異常が存在することを見出した。b) また、培養細胞を用いた強制発現実験とマイクロアレイ解析の組み合わせにより、Notch シグナルの活性化が種々の大腸上皮分化マーカー発現をアップレギュレートもしくはダウンレギュレートすることを見出した（いずれも未発表データ）。

2) 男性ドナーより同種骨髄移植を受けた女性レシピエントから経時的に採取した内視鏡下生検組織検体を用いた。Y 染色体 FISH 法と免疫染色法を組み合わせた連続切片による検討、もしくは同一切片を用いた二重染色法をおこない、ドナー骨髄由来腸管上皮細胞を同定した。さらに上皮再生時の骨髄由来上皮細胞の変化および分布を、幹細胞マーカー、増殖マーカー、および上皮細胞分化形質マーカーとの対比において検討した。その結果、a) 消化管全長（食道、胃、十二指腸、回腸、大腸）にわたり、ドナー骨髄由来腸管上皮細胞を認めた。b) 骨髄由来腸管上皮細胞は GVHD の回復期小腸において 9-10 倍の頻度の上昇を認めた。c) 骨髄由来上皮細胞は頻度が上昇した腸管上皮中において patchy に分布し、上皮幹細胞マーカーである Msi-1 の発現は稀であった。d) 一方上皮傷害後の骨髄由来上皮細胞は、上皮 Crypt 内増殖帯における Ki-67 陽性骨髄由来細胞中に有意な増加を認めた。e) GVHD からの再生過程では、正常検体との比較において、骨髄細胞由来の杯細胞、神経内分泌細胞、パネート細胞の著明な増加が認められた。

### （倫理面への配慮）

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1) 倫理審査委員会で研究の適

否などを議論・審査し承認を得る。2) 意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。

### C. 考察

1) 大腸上皮細胞の分化・再生過程に Notch シグナルが重要な役割をになうこと、および慢性炎症による上皮障害時には、Notch シグナル機能異常を伴う可能性が示唆された。さらに、Notch シグナル下流で制御される遺伝子群が明らかになり、杯細胞、パネート細胞、あるいは神経内分泌細胞など特異的分化形質発現に対する Notch シグナルの促進的あるいは抑制的作用が示された。

2) 腸管上皮細胞分化のメカニズムに関し、骨髄由来腸管上皮細胞の関与を明確にした。そして、正常時に比し傷害後の上皮再生過程で骨髄由来上皮細胞の増加が認められることから、この transdifferentiation 機構が急激な傷害を起こした腸管上皮の再生過程をレスキューする役割を果たすものと考えられた。また、骨髄由来上皮細胞は上皮性幹細胞としてではなく、Crypt 内増殖帯に存在する比較的未熟な細胞として分布すること、および実際これら細胞が腸管上皮のいずれの細胞系列へも分化を遂げ機能細胞となりうることを示された。さらに、腸管上皮の再生時に骨髄由来の杯細胞、神経内分泌細胞、パネート細胞数が増加することから、上皮再生過程において未知の分化調節機構がこれら分泌型上皮細胞群への細胞分化に働き、早期の腸管上皮機能の回復に貢献するものと考えられた。

### D. 結論

迅速な細胞増殖により数的供給を受ける腸管上皮において、特定の機能細胞への分化バランスが秩序正しく連動し進行するためのメカニズムとして複数の制御、すなわち Notch シグナルによる腸管特異的標的遺伝子の誘導という分子レベルでの制御機構、および骨髄細胞による transdifferentiation という細胞レベルでの制御機構、が存在することを示した。これらより、Notch シグナルの人為的制御により適切な系列細胞への分化誘導を可能とするアプローチ、あるいは急激な上皮傷害の際に骨髄細胞の動員を促進することで腸管上皮の再生と早期の機能回復を図るアプローチの可能性が期待され、上皮再生不全を伴うヒト疾患に関わる分子機構研究に全く新しい視点を創出するとともに、新しい細胞療法・分子療法の開発のための展望が開かれたと考えられる。

### E. 健康危険情報 なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Okamoto R, Watanabe M: Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* 39: 1-6, 2004.
2. 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.
3. 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.
4. Kawamura T, Kanai T, Dohi T, Uraushihara K, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Nakamura T, Higuchi T, Aiba Y, Tsubata T, Watanabe M: Ectopic CD40 ligand expression on B cells triggers intestinal inflammation. *J Immunol*. 172: 6388-6397, 2004.
5. Okazawa A, Kanai T, Nakamaru T, Sato T, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Ikeda M, Kawamura T, Makita S, Uraushihara K, Okamoto R, Yamazaki M, Kurimoto M, Ishii H, Watanabe M, Hibi T: Human intestinal epithelia-derived IL-18 is a proliferative factor for intraepithelial lymphocytes synergistically with IL-2, IL-7 and IL-15. *Clin Exp Immunol*. 136: 269-276, 2004.
6. Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Okada E, Tsuchiya K, Okamoto R, Yamazaki M, Yokota T, Aida M, Yamaguchi Y, Kanai T, Handa H, Watanabe M: Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of interleukin-7 in human intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 24: 6298-6310, 2004.
7. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Iiyama R, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol*. 173: 3119-3130, 2004.
8. Matsuoka K, Inoue N, Sato T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kishi Y, Sakuraba A, Hitotsumatsu O, Fukushima T, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T: T-bet up-regulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for the induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut*.

- 53: 1303-1308, 2004.
9. Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, Iiyama R, Totsuka T, Takeda K, Akira S, Watanabe M: MyD88 deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterology*. 40: 16-23, 2005.
  10. Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Mori T, Okamoto S, Ikeda Y, Mukai M, Yamazaki M, Nakamura T, Kanai T, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M: Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine. *Gastroenterology*. (in press), 2005.
  11. Okada E, Yamazaki M, Tanabe M, Takeuchi T, Nanno M, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Hibi T, Watanabe M: IL-7 exacerbates chronic colitis with expansion of memory IL-7Rhigh CD4+ mucosal T cells in mice. *Am J Physiol*. (in press), 2005.
  12. Okamoto R, Watanabe M: Cellular and molecular mechanisms of epithelial repair of IBD. *Dig Dis Sci*. (in press), 2005.
2. 学会発表
1. 中村哲也、大島 茂、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. 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004. 4. 21
  2. 蒔田 新、金井隆典、戸塚輝治、浦牛原幸治、河村貴広、谷本佳奈美、澤田泰輔、中村哲也、福島恒男、渡辺 守: ヒト腸粘膜内 CD4+CD25bright 制御性 T 細胞の存在と機能. 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004. 4. 21
  3. 岡本隆一、松本智子、渡辺 守: 骨髄由来細胞を利用した腸管上皮再生治療の検討. 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004. 4. 22
  4. 岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: Notch シグナルによるヒト小腸上皮細胞の分化調節機構の解析. 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004. 4. 22
  5. Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T, Watanabe M: A New Model of Chronic Colitis in SCID Mice Induced by Adoptive Transfer of CD4+ GITR- T Lymphocytes. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 18
  6. Makita S, Kanai T, Matsumoto S, Uraushihara K, Totsuka T, Nakamura T, Watanabe M: The Role of Cryptopatch-Derived Intraepithelial Lymphocytes in the Development of Chronic Ileocolitis. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 18
  7. Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Nakamura T, Kanai T, Hibi T, Watanabe M: Increase of Bone Marrow-Derived Secretory Lineage Cells During Epithelial Regeneration Following Graft-Versus-Host Disease in the Human Intestinal Epithelia. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 18
  8. Okada E, Yamazaki M, Nakamura T, Kanai T, Tanabe M, Takeuchi T, Watanabe M: The Pivotal Role of IL-1/IL-7r Dependent Signaling Pathway for Expansion of Highly IL-7r Expressing Mucosal T Cells and Development of Chronic Colitis. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 18
  9. Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Kanai T, Watanabe M: IRF-1 and IRF-2 Distinctively Up-Regulate Gene Expression and Production of IL-7 in Human Intestinal Epithelial Cells. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 18
  10. Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Nakamura T, Watanabe M: Regulation of Murine Chronic Colitis by CD25- GITR+ CD4+ Regulatory T Cells. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 18
  11. Totsuka T, Kanai T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Fukushima T, Yagita H, Azuma M, Chen L, Watanabe M: Blockade of B7-1 Suppresses the Development of Chronic Intestinal Inflammation. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 19
  12. 大島 茂、中村哲也、並木 伸、山崎元美、金井隆典、渡辺 守: IL-7 産生機構異常による潰瘍性大腸炎発症. 第 3 回 GIFM (Gut Inflammation Front Line Meeting), 東京, 2004. 7. 10
  13. 金井隆典、渡辺 守: 慢性大腸炎を制御する GITR+CD4+CD25- regulatory T cells. 第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 2004. 7. 14
  14. 河村貴広、金井隆典、土肥多恵子、浦牛原幸治、戸塚輝治、油井 薫、藤井 玲、谷本佳奈美、飯山稜一、澤田泰輔、中村哲也、鏑田武志、渡辺 守: B 細胞 CD4 リガンド過剰発現による慢性腸炎モデルの検討. 第 41 回日本消化器免疫学会, 大津, 2004. 7. 15
  15. 松本智子、岡本隆一、矢島知治、山崎元美、土屋輝一郎、並木 伸、中村哲也、金井隆典、日比紀文、稲澤稜治、渡辺 守: 骨髄由来細胞による炎症性疾患に対する上皮再生治療の試み. 第 41 回日本消化器免疫学会, 大津, 2004. 7. 15
  16. 金井隆典、戸塚輝治、八木田秀雄、渡辺 守: マウス炎症性腸疾患モデルを用いた B7-1 分子を標的とした新規治療法の開発. 第 41 回日本消化器免疫学会, 大津, 2004. 7. 16
  17. 岡本隆一、松本智子、川村央信、土屋輝一郎、中村哲也、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮細胞の分化制御による上皮修復治療への試み. 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 16 年度第 1 回総会, 東京, 2004. 7. 29
  18. 谷本佳奈美、金井隆典、河村貴広、戸塚輝治、渡辺 守: 制御性 T 細胞による病的粘膜内 Memory T 細胞制御機構. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 16 年度第 1 回総会, 東京, 2004. 7. 30
  19. 大島 茂、中村哲也、並木 伸、山崎元美、金井隆

- 典、渡辺 守: IL-7 産生調節因子 IRF 蛋白発現異常による潰瘍性大腸炎発症. 第11回 消化管分子機構研究会, 東京, 2004. 8. 8
20. Watanabe M, Oshima S, Nakamura T, Kanai T: IRF-1 and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of IL-7 in human intestinal epithelial cells. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, 2004. 8. 31
21. Watanabe M: Crossing between mucosal immunity and epithelial regeneration / differentiation in the human intestine. 第9回国際生殖免疫学会 (9th International Congress of Reproductive Immunology), 箱根, 2004. 10. 14
22. 岡本隆一, 中村哲也, 渡辺 守: Notch Signal を介するヒト腸管上皮細胞の分化制御による上皮再生. 第46回日本消化器病学会, 福岡, 2004. 10. 21
23. 河村貴広, 金井隆典, 土肥多恵子, 戸塚輝治, 飯山稜一, 浦牛原幸治, 蒔田 新, 谷本佳奈美, 油井 薫, 澤田泰輔, 中村哲也, 鏑田武志, 渡辺 守: B細胞 CD リガンド過剰発現による慢性腸炎の発症. 第46回日本消化器病学会, 福岡, 2004. 10. 22
24. Watanabe M: IL-7 による粘膜免疫および腸上皮分化の制御. 第2回 Pfizer Science and Research Symposium, 名古屋, 2004. 11. 11
25. Watanabe M: Bone Marrow-Derived Secretory Lineage Epithelial Cells in the Human Intestine. The MGH Annual Workshop of the Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease, Boston, 2004. 11. 13
26. 大島 茂, 中村哲也, 並木 伸, 岡田英理子, 山崎元美, 金井隆典, 渡辺 守: 慢性大腸炎発症におけるサイトカイン IL-7 の役割とその産生調節機構. 第34回日本免疫学会, 札幌, 2004. 12. 1
27. 戸塚輝治, 金井隆典, 蒔田 新, 河村貴広, 飯山稜一, 秋葉久弥, 岩井秀之, 東みゆき, 八木田秀雄, 奥村 康, CHEN Lieping, 渡辺 守: 炎症性腸疾患および慢性大腸炎モデルにおける Co-stimulatory B7-H1 分子の関与. 第34回日本免疫学会, 札幌, 2004. 12. 2
28. 並木 伸, 中村哲也, 大島 茂, 山崎元美, 金井隆典, 渡辺 守: Interferon Regulatory Factor (IRF)-1 による IFN- $\gamma$  依存性 LMP7 発現調節機構. 第34回日本免疫学会, 札幌, 2004. 12. 2
29. 中村哲也, 並木 伸, 関根裕子, 大島 茂, 山崎元美, 岡本隆一, 土屋輝一郎, 金井隆典, 渡辺 守: 腸管上皮における IRF-1 標的遺伝子の網羅的解析と免疫プロテアソーム発現に対する IRF-1 分子機能. 第12回浜名湖シンポジウム, 浜松, 2004. 12. 23
30. 岡本隆一, 松本智子, 川村央信, 大島 茂, 土屋輝一郎, 中村哲也, 金井隆典, 渡辺 守: 細胞の分化機構を利用した腸管上皮再生治療の試み. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成16年度第2回総会, 東京, 2005. 1. 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

## 細菌、ウイルス抗原の Toll like receptor を介した 腸上皮細胞創傷治癒に及ぼす影響

研究協力者 渡辺 純夫 秋田大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：小腸上皮細胞創傷治癒過程における、Toll-like receptor (TLR) リガンドである細菌やウイルス抗原の関与について検討を行った。大腸菌由来 LPS やウイルス二本鎖 RNA 刺激により、ラット小腸上皮細胞 (IEC-6) に各種サイトカイン、増殖因子の産生が誘導されるとともに、これらの TLR リガンドは IEC の創傷治癒に多彩な影響を及ぼすことが明らかにされた。

### A. 研究目的

腸粘膜上皮細胞は常に細菌、ウイルスなどの抗原に暴露されており、これらの抗原に対するバリアーの役割を担っているものと考えられている。細菌やウイルス抗原の認識に Toll like receptor (TLR) が重要な役割を果たしていることが明らかにされつつあるが、最近ヒトの腸上皮細胞も TLR を発現し、腸管の自然免疫に関与している可能性が報告されている。われわれは、TLR のリガンドである細菌やウイルス抗原が、TLR を介し腸上皮細胞の創傷治癒にどのように関与しているのかをラット小腸上皮細胞 (IEC-6) を用いて検討を行った。

### B. 研究方法

(1) サイトカイン・増殖因子の誘導：IEC-6 細胞を TLR2 リガンド；黄色ブドウ球菌菌体成分 Lipoteichoic acid (LTA)、TLR3 リガンド；ウイルス二本鎖 RNA の合成アナログ polyinosine-polycytidylic acid (Poly IC) およびロタウイルス RNA、TLR4 リガンド；大腸菌またはサルモネラ菌細胞壁構成成分 lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、1、2 時間後のサイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6、IFN- $\beta$ )、増殖因子 (TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、COX-2) mRNA の発現を RT-PCR にて測定した。(2) シグナル伝達経路の活性化：IEC-6 細胞を、(1) と同様の TLR リガンドで刺激し、刺激後 15 分、30 分、1 時間における I $\kappa$ B- $\alpha$ 、p44/42 MAPK、SAPK/JUNK MAPK タンパクのリン酸化を Western blot で調べた。(3) Wound Assay：コンフルエントに達した IEC-6 細胞に wound 形成後、各種 TLR リガンドを加え、24 時間培養後 wound area に集積した migration 細胞数を算定した。また、apoptosis 誘導の有無も検討した。

(倫理面への配慮) 細胞株を使用した研究であり、ヒトサンプルは使用していない。

### C. 研究結果

(1) Poly IC、ロタウイルス RNA 刺激によりすべてのサイトカインの発現誘導が認められ、また LPS 刺激により各種増殖因子の発現が誘導された。(2) Poly IC、ロタウイルス RNA、LPS 刺激により、I $\kappa$ B- $\alpha$ 、p44/42 MAPK のリン酸化を認めた。(2) Wound area における migration 細胞数は、LTA 刺激後は無刺激と差がなかったが、Poly IC、ロタウイルス RNA 刺激後それぞれ 0.6 倍、0.06 倍に減少、LPS 刺激後は逆に 1.24 倍に増加を示した。また、Poly IC、ロタウイルス RNA は IEC に apoptosis を誘導したが、この作用は TLR3 抗体、caspase 阻害剤により抑制された。

### D. 考察

小腸上皮細胞株 IEC-6 は各種細菌菌体成分やウイルス RNA に反応し、細胞内シグナル伝達経路が活性化されるとともにサイトカインの産生が誘導された。さらに、各種細菌菌体成分やウイルス RNA は、腸上皮細胞の創傷治癒にそれぞれ異なった作用を示すことが明らかになった。また、ウイルス RNA、特にロタウイルス RNA は腸上皮細胞に強い apoptosis を誘導したが TLR3 抗体により抑制されたことより、これらの作用は TLR を介しているものと考えられた。これらの結果より、腸内細菌叢の変化、ウイルス感染など腸内環境の変化は、実際の生体においても腸上皮細胞の創傷および創傷治癒に影響を及ぼしている可能性が高いものと考えられた。

### E. 結論

各種細菌菌体成分やウイルス RNA は、TLR を介し腸上皮細胞の創傷治癒に影響を及ぼすものと考えられた。

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

臓器線維化におけるアクチビンの関与

研究協力者 小島 至 群馬大学生体調節研究所 教授

研究要旨：アクチビンの臓器線維化における意義をさらに明らかにするために肺線維症モデルラットを用いて検討を行った。培養肺線維芽細胞において、アクチピンは筋線維芽細胞への分化を促進しコラーゲン産生を促進した。TGF- $\beta$ も同様な作用をもつが、TGF- $\beta$ は線維芽細胞においてアクチピン産生を誘導する。アクチピン作用を抑制するとTGF- $\beta$ は作用をほとんど発揮することができない。実際プレオマイシン誘発肺線維症ラットにアクチピン・アンタゴニストであるフォリスタチンを投与すると、肺線維化が著明に抑制された。

A. 研究目的

TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する活性因子アクチピンは上皮細胞・間葉系細胞の機能を調節し、上皮細胞の増殖・分化を調節するだけでなく、間葉系細胞の活性化を通じて臓器の線維化に関与していることが明らかになりつつある。本研究では肺線維化の病態におけるアクチビンの意義を明らかにすることを目的として *in vitro* および *in vivo* で検討を行った。

B. 研究方法

*In vitro* の検討は培養肺線維芽細胞を用いて行った。筋線維芽細胞への分化は抗 $\alpha$ 平滑筋アクチン( $\alpha$ -SMA)の発現を指標とし、コラーゲンの産生に対するアクチピン、TGF- $\beta$ の作用を検討した。オートクリン産生されるアクチビンの意義を明らかにする目的でアクチピンアンタゴニストであるフォリスタチンを用いてその効果を検討した。*In vivo* の検討は、ラットにプレオマイシンを投与して肺線維症を誘発し、同時にフォリスタチンを投与してその急性期(7日後)および慢性期(28日後)の効果を検討した。

(倫理面への配慮)

群馬大学生体調節研究所動物実験倫理規定に基づいて行われた。

C. 研究結果

1) *in vitro* での検討

培養肺線維芽細胞を用いて検討を行った。培養肺線維芽細胞において、アクチピンは $\alpha$ -SMAの発現を増加させるとともにコラーゲン産生を促進した。一方、TGF- $\beta$ もアクチピンと同様の作用を示した。TGF- $\beta$ は肺線維芽細胞におけるアクチビンの産生を促進した。アクチピン作用をブロックするフォリスタチンを添加するとTGF- $\beta$ による $\alpha$ -SMAの発現誘導やコラーゲン産生促

進作用は著しく抑制され、フォリスタチンがアクチピン作用だけでなくTGF- $\beta$ の作用をも抑制しうることが判明した。

2) *in vivo* での検討

そこで肺線維化におけるアクチビンの意義を明らかにするために、プレオマイシンにより誘発される肺線維症モデルラットを用いて検討を行った。まずプレオマイシン投与後のアクチビンの発現変化を調べるとともに、フォリスタチンの効果を検討した。プレオマイシン投与により肺内に急性炎症が起こり炎症細胞の浸潤が見られたが、この際アクチビンの発現が増加した。組織学的にはおもに肺胞内に浸潤するマクロファージに強いアクチピン発現を認めた。アクチピン受容体の発現レベルは変化しなかった。慢性期においては線維芽細胞の増生が著明であるが、アクチピンは線維芽細胞とマクロファージに強く発現していた。次にプレオマイシン投与後にフォリスタチンを隔日投与してその効果を検討した。フォリスタチン投与により組織学的には炎症細胞の浸潤が著明に抑制された。急性炎症の程度を定量的に把握するため肺胞洗浄液を採取して各種パラメーターを測定した。肺胞洗浄液中の好中球やマクロファージの数はフォリスタチン投与により著減し、また組織障害を反映する蛋白量やLDH濃度も有為に減少しフォリスタチンが急性炎症をヒドロキシプロリン抑制することが明らかになった。プレオマイシン投与後28日後の慢性期においては、プレオマイシンにより著明な肺線維化が認められたが、フォリスタチンを投与した群においては線維化は大きく抑制されていた。線維化の程度を定量化するため、コラーゲンの代謝産物である肺組織のヒドロキシプロリンを測定したところ、ヒドロキシプロリン含量はフォリスタチン投与により有為に減少していた。

#### D. 考察

アクチピンは肺線維芽細胞で産生されその筋線維芽細胞への分化、さらにはコラーゲン産生を調節するオートクリン因子である。TGF- $\beta$ もまた肺線維芽細胞の活性化因子で肺線維化に中心的な役割を果たしているが、その作用にはオートクリン因子アクチピンが大きく関与している。TGF- $\beta$ がアクチピン産生を亢進させることから、産生されたアクチピンが TGF- $\beta$ 作用を増強して強いコラーゲン産生能を発揮しているものと考えられる。フォリスタチンを投与することによりアクチピンのみならず TGF- $\beta$ の作用をも抑制することができるため、強い抗線維化作用が発揮されるものと考えられた。

#### E. 結論

アクチピンは肺線維芽細胞で産生されるオートクリン因子で、単独で肺線維芽細胞を分化させてコラーゲン産生を促進するだけでなく、TGF- $\beta$ の作用にも深く関わっており、肺線維化の病態においてもきわめて重要な役割を果たしていると推測される。そのアンタゴ

ニストであるフォリスタチンは線維化の治療に有効であると考えられる。

#### F. 文献

Wada, W., Kuwano, H., Hasegawa, Y., Kojima, I. (2004) The dependence of TGF- $\beta$ -induced collagen production on an autocrine factor activin A in stellate cells. *Endocrinology* 145:2753-2759.  
Aoiki, F., Kurabayashi, M., Hasegawa, Y., Kojiima, I. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by follistatin. (submitted for publication)

#### 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

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

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

研究協力者 片岡 寛章 宮崎大学医学部第二病理 教授

研究要旨: 消化管粘膜の再生修復において、肝細胞増殖因子 (HGF) が重要な役割を果たすことが示唆されている。HGF は間葉系の細胞から分泌され、傷害組織において HGF activator (HGFA) によって非活性型から活性型へ効率良く変換される。この HGFA による HGF 活性化は細胞膜結合型インヒビターである HGFA inhibitor type 1 (HAI-1) によって調節されており、HAI-1 も消化管上皮に強く発現している。これらの HGF 活性化関連分子の消化管粘膜再生における意義を検討するために、HGFA および HAI-1 遺伝子を欠損したマウス (ノックアウトマウス) を作成した。この結果、組織障害直後の消化管粘膜上皮再生において HGFA による局所での HGF 活性化が重要な役割を果たしていることが示され、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。一方、HAI-1 ノックアウトマウスは胎生致死であり、その致死要因は胎盤ラビリンス層の形成不全であることを見出した。すなわち、HAI-1 は細胞分化・形態形成において予想外の重要な機能を有している可能性がある。また HAI-1 類似のインヒビターである HAI-2 について研究する過程で、HAI-2 遺伝子の下流に存在する新規ペプチド遺伝子を同定し、H2RSP (HAI-2-related small peptide) と名付けた。H2RSP は消化管粘膜に強く発現し、分子内に核移行シグナルを有し、消化管粘膜上皮の分化・増殖停止に伴って核に移行することを見出した。

A. 研究目的

消化管粘膜上皮の再生修復において、肝細胞増殖因子 (HGF) が上皮細胞の遊走、増殖、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分泌されており、傷害粘膜局所で酵素 (HGF activator: HGFA) によって活性化される必要がある。我々はこれまで、HGFA が傷害消化管組織で活性化され、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。また、この HGFA 活性が上皮細胞の細胞膜結合型プロテアーゼインヒビターである HGFA inhibitor type 1 (HAI-1) によって調節されていることを明らかにしてきた。これらの HGF 活性化関連蛋白質の腸管粘膜再生における意義をさぐるために HGFA と HAI-1 のノックアウトマウスをそれぞれ作製し、その解析を行った。また HAI-1 類似のインヒビターである HAI-2 を研究する過程で見出した新規の核移行ペプチドの発現と機能解析に関する検討も行った。

B. 研究方法

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置換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。また、HAI-1 遺伝子のエクソン 3-10 の領域をネオマイシン耐性遺伝子におきかえたターゲットベク

ーを作成し、上記と同様の方法で HAI-1 ノックアウトマウスを作成した。

マウスの実験腸潰瘍モデルは、マウスに 3% デキストラン硫酸水を飲ませること (DSS colitis モデル) と直腸に 5% 酢酸を注入すること (酢酸潰瘍モデル) で作成した。H2RSP の機能解析のために抗 H2RSP 抗体を作成し、消化管粘膜の免疫組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては施設の規定に従い動物愛護に十分考慮して行なった。

C. 研究結果

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ことが既に報告されている。一方、HGFA ノックアウトマウスは正常に生まれ、正常の生殖能を有していた。マウスの血清中にみられた HGF 活性化能はノックアウトマウス血清中には存在しなかったことから、血清中の HGF 活性化酵素は HGFA であることが明らかとなった。DSS colitis モデルでは、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、上皮細胞による再被覆 (restitution) がほぼ完了しているのに対し、ノックアウトマウスでは、投与中止後の restitution が遅延し、粘膜上皮の再生が遅れることが判明した。同様の結果は酢酸潰瘍モデルでも得られ、これらの障害モデルにおいて、マウスの生存率もノックアウトマウスに



において有意に低下した。

一方で、HAI-1 ノックアウトマウスは胎生約 10.5 日で致死であった。胎仔を詳細に検討したところ、HAI-1 ノックアウトマウスにおいては胎盤ラビリンス層が選択的に形成されていなかった。この表現形は HGF および c-Met ノックアウトマウスと類似していたが、これらのノックアウトマウスより更に重篤で、かつ致死にいたる時期も 2-4 日ほど早い。

HAI-2 の遺伝子構造を解析する過程で、HAI-2 遺伝子の下流に存在する新規の核移行ペプチドを見出し、H2RSP と名づけた。H2RSP は消化管上皮に発現しており、免疫組織学的に上皮細胞の分化に伴い核に移行する可能性が示唆された。傷害粘膜において再生中の上皮においては、この核移行は観察されず、粘膜上皮細胞における H2RSP の核移行は、細胞の再生・増殖や分化となんらかの関係があることが示唆された。

#### D. 考察

強い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。

一方で、HAI-1 ノックアウトマウスは胎生約 10.5 日で致死であり、それは胎盤ラビリンス層形成不全にともなう胎盤機能不全によるものであった。HAI-1 類似の蛋白である HAI-2 も胎生早期に致死であること、HGF ノックアウトマウスが胎生 12.5-14.5 日で致死であることから、HAI-1 と HAI-2 は互いに代償し得ない、極めて重要な機能があり、それは HGF の活性化調節とは別のものである可能性が高い。HAI-1 が消化管上皮に強く発現していることから、この蛋白質の新たな機能を解明することは、消化管粘膜再生の分子機構を理解するうえで、重要なことであると考えられる。

また、新たに見出した核移行ペプチド H2RSP も消化管粘膜上皮細胞に強く発現しており、細胞の分化と共に核に移行する。このペプチドの機能解明もやはり、消化管粘膜再生の分子機構を理解するうえで重要であると考えられる。

#### E. 結論

HGFA と HAI-1 の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 の活性化が重要であることを明らかにした。現在、マウスリコンビナント HGFA を粘膜再生治療に応用する可能性を検討中である。一方で HAI-1 は胎盤の branching morphogenesis に必須であることが明らかとなり、これは HGF の活性調節とは別の機序によるものであると考えられた。HAI-1 の機能については今後の検討が必要である。HAI-1 は消化管上皮細胞に強く発現しており、これらの細胞において、予想外の重要な役割を有していることが想定できる。また、消化管上

皮の分化に関与する可能性のある核移行ペプチド (H2RSP) を見出した。今後、このペプチドの機能を解析していく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Tjin EPM, Derksen PWB, Kataoka H, Spaargaren, M, Pals ST: Multiple myeloma cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation by secreting the serine protease HGF-activator. *Blood*, 104:2172-2175 (2004).

(2) Nagaike K, Kohama K, Uchiyama S, Tanaka H, Chijiwa K, Itoh H, Kataoka H: Paradoxically enhanced immunoreactivity of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in cancer cells at the invasion front. *Cancer Sci.*, 95:728-735 (2004).

(3) Itoh H, Naganuma S, Takeda N, Miyata S, Uchinokura S, Fukushima T, Uchiyama S, Tanaka H, Nagaike K, Shimomura T, Miyazawa K, Yamada G, Kitamura N, Kono M, Kataoka K: Regeneration of Injured Intestinal Mucosa Is Impaired in Hepatocyte Growth Factor Activator-Deficient Mice. *Gastroenterology*, 127:1423-1435 (2004).

(4) Inoue, T., Kataoka, H., Goto, H., Nagaike, K., Igin, K., Naka, D., Kitamura, N., Miyazawa, K.: Activation of c-Met (hepatocyte growth factor receptor) in human gastric cancer tissue. *Cancer Sci.*, 95:803-808 (2004)

(5) 伊藤浩史、長沼誠二、内山周一郎、長池幸樹、田中弘之、片岡寛章: 消化管粘膜上皮再生における肝細胞増殖因子活性化因子 (HGFA) の役割 (ノックアウトマウスを用いた解析)。消化器と免疫 40:12-21 (2004)。

##### 2. 学会発表

(1) 片岡寛章、伊藤浩史: 癌細胞周囲微小環境における肝細胞増殖因子 (HGF) 活性化調節機構とその癌細胞浸潤における意義。第 63 回日本癌学会学術総会 (2004)

(2) 小濱和代、長池幸樹、田中弘之、福島 剛、内山周一郎、長沼誠二、伊藤浩史、片岡寛章: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1) は胎盤形成に必須である: ノックアウトマウスを用いた解析。第 27 回日本分子生物学会年会 (2004)

(3) Fukushima T, Nagaike K, Tanaka H, Kohama K, Itoh H, Kataoka H: Roles of Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in vivo. 5th 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) (2005)

H. 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

## 潰瘍性大腸炎での dysplasia, colitic cancer の pit pattern の検討

研究協力者 工藤 進英 昭和大学横浜市北部病院消化器センター 教授

研究要旨：大腸腫瘍性病変の診断において拡大内視鏡観察による pit pattern 診断は極めて有効であるが、潰瘍性大腸炎 (UC) に伴う dysplasia や colitic cancer の初期像が十分に明らかにされていないために早期発見は容易ではない。そこで UC での dysplasia, colitic cancer の pit pattern を検討した。pit pattern はⅢs型、ⅢL型、Ⅳ型、Ⅴ型が多く、特にⅣ型 pit (脳回様、絨毛様、小結節集簇様) が、腫瘍性隆起の表面構造の主体と考えられた。sm 以深癌にはVN型が多かった。

### A. 研究目的

大腸腫瘍性病変の診断において拡大内視鏡観察による pit pattern 診断は極めて有効である。これについて厚生労働省がん研究助成金「大腸腫瘍性病変における腺口開口部の診断的意義の解明に関する研究」班において、解析が進められ、潰瘍性大腸炎非合併大腸については腫瘍・非腫瘍の鑑別、さらに癌においては深達度診断ができることが明らかになってきた。一方、潰瘍性大腸炎 (UC) に伴う colitic cancer の発見にはサーベイランスコロノスコーピーが有効であるが、dysplasia や colitic cancer の初期像が十分に明らかにされていないために早期発見は容易ではない。今回、我々は拡大内視鏡観察や実体顕微鏡観察での所見と病理学的所見を比較し、UC での dysplasia, colitic cancer の pit pattern を検討した。

### B. 研究方法

拡大内視鏡観察や実体顕微鏡観察での所見と病理学的所見を比較し、UC での dysplasia, colitic cancer の pit pattern を検討した。

### C. 研究結果

内視鏡所見としては、隆起のほか、発赤、表面の凹凸が発見の契機となっていた。pit pattern はⅢs型、ⅢL型、Ⅳ型、Ⅴ型が多かった。特にⅣ型 pit (脳回様、絨毛様、小結節集簇様) が、腫瘍性隆起の表面構造の主体と考えられた。また、sm 以深癌にはVN型が多かった。

### D. 考察

dysplasia や colitic cancer の診断では、pit pattern 観察によってⅢL、Ⅳ、Ⅴ型などの腫瘍性 pit pattern を呈する箇所より生検することにより、効率よく検出が可能となることが期待された。

問題点として、孤発性腫瘍の場合と異なり、炎症性腸疾患並存腫瘍の診断において背景粘膜は単純に pit pattern がⅠ型と診断できないことがあった。また腫瘍においても serrated pattern との鑑別が問題となるといったことがあげられる。

### E. 結論

pit pattern 診断の確立により病変の早期発見が容易となり、random biopsy による過剰な生検ではなく targeted biopsy の時代が近づいたといえる。現時点では pit pattern 診断の困難な場合もあり、さらなる症例の蓄積が必要であると考えられた。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 倉橋利徳、工藤進英、他：大腸腫瘍に対する拡大内視鏡観察と深達度診断  
箱根シンポジウムにおけるⅤ型亜分類の合意。  
胃と腸, 39: 748-752, 2004  
大塚和朗、檜田博史、竹内司、伊藤治、工藤進英：Dysplasia (m 癌を含む) と癌 (sm 以上浸潤癌) の画像診断。早期大腸癌, 9: 21-25, 2005

#### 2. 学会発表

- 工藤進英 (2004) 箱根 pit pattern シンポジウ

ムの結果報告 -V型の箱根合意について-,  
第14回大腸IIc研究会, 9.19, 横浜

工藤進英(2004) Colitic cancer の内視鏡診  
断と治療, DDW-Japan2004, シンポジウム 8,  
10.22, 福岡

工藤進英(2004) The Chromo and magnifying  
endoscopy, International Workshop on Diagnostic and  
Operative Digestive Endoscopy, 11.4, Italy

工藤進英(2004) Growing Patterns of Colonic  
Cancers :ADENOMA-CARCINOMA SEQUENCE AND  
DENOVO, International Workshop on Diagnostic and  
Operative Digestive Endoscopy, 11.6, Italy

工藤進英(2004) Flat and depressed lesion, 1st  
AGA/JSCE joint meeting <Endoscopic Imaging and  
Therap:at the Cutting Edge>, 12.2, U.S.A

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