

200400794A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渡 辺 守

平成17(2005)年3月

序

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎およびクローン病は主として21世紀を担う、進学、就職、出産といった希望に満ちた若年者を襲い、生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる未だ原因不明の難病である。既存のfirst line治療に抵抗性の難治症例や頻回に再燃を繰り返す例が存在すること、あるいは副作用の問題などから、鼻管・中心静脈栄養・薬物経動脈投与などきわめて侵襲性の高い治療がしばしば必要とされ、繰り返す入退院や時に手術を余儀なくされるなど、患者QOLの点を考慮しても、画期的治療法開発が急務である。これまで無数の免疫に主眼をおいた新規治療の試行にも関わらず、既存の治療を凌駕するものがない理由は全身性免疫制御を標的とする治療法が腸粘膜局所に特異的な免疫応答制御に必ずしも有効でない可能性があげられる。さらに、この問題を克服するためには同時に発想の転換が必須である。

本研究班は難治性炎症性腸疾患に対しこれまで26年余りに渡って大きな成果を挙げてきた特定疾患対策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班（主任研究者：日比紀文慶應義塾大内科教授）に加えて、これまでとは異なる発想による病態遷延機構の解析を行い、それに基づく画期的治療法の開発とその臨床応用を目指す目的で平成15年11月に発足した新しい研究班である。3年後の臨床応用を目指して、4つのプロジェクトに絞り、分担研究者も厳選して開始された。本年度は分担研究者の見直しも行った。

本研究班はプロジェクト開始後2年間という短期間で、多くの社会的インパクトの高い論文発表が可能であったのみならず、臨床応用の点でも4件のプロジェクトが分担研究者の施設で臨床試験としてすでに承認あるいは承認間近となるなど、十分な成果が挙げられつつある。

短期間で実りある研究成果を挙げていただいた分担研究者の諸先生に深謝致したい。また、この研究班を遂行して行くにあたり、貴重なご助言、ご協力をいただいている日比紀文先生、朝倉均新潟大名誉教授にこの場を借りて感謝致したい。

平成17年3月

主任研究者 渡 辺 守

目 次

I. 研究班構成	1
II. 総括研究報告	
炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究 (渡辺 守)	3
III. 分担研究報告	
【上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立】	
1. ヒト腸管上皮の分化・再生機構の解析 (渡辺 守) ー炎症性腸疾患に対する多面的再生治療法の開発を目指してー	7
2. HGF を用いた傷害粘膜再生・修復治療の開発 (坪内博仁) ー組み換え型ヒト HGF の臨床応用の問題点ー	12
3. 炎症性腸疾患に対する HGF 遺伝子治療法開発に関する研究 (鈴木健司)	15
【腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発】	
4. MIF (macrophage migration inhibitory factor)の制御による炎症性腸疾患の 新しい治療法の開発 (浅香正博)	17
5. 腸の粘膜免疫機構を応用した新規炎症性腸疾患治療法開発 (高後 裕)	20
6. $\gamma\delta$ 型腸管上皮細胞間 T 細胞 ($\gamma\delta$ -IEL) の胸腺外発達分化局所の追究 (石川博通)	23
7. 自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御機構に関する研究 (竹田 潔)	25
【選択的細胞除去・移入療法の開発】	
8. 遠心分離法による血球成分除去療法時の制御性 T 細胞移入療法に関する研究 (中村和彦)	30
【分子デリバリーシステムを用いた治療法確立】	
9. 潰瘍性大腸炎患者におけるデキサメサゾン含有ポリ乳酸マイクロカプセルの 有用性に関する研究 (岡崎和一)	32
【新しいコンセプトによる治療法開発】	
10. 好中球エラスターゼ阻害剤を用いた潰瘍性大腸炎急性期における治療法の開発 (日比紀文)	35
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
V. 学会発表に関する一覧表	45
VI. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	51
VII. 社会活動報告	53
VIII. 研究事業報告	55
IX. 研究成果の刊行物・別刷	61

I. 研究班構成

「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」研究班

〈区分〉	〈氏名〉	〈所属〉	〈職名〉
主任研究者	渡辺 守	東京医科歯科大学医学部消化器内科	教授
分担研究者	日比 紀文	慶應義塾大学医学部消化器内科	教授
	浅香 正博	北海道大学医学部第3内科	教授
	坪内 博仁	宮崎大学医学部第2内科	教授
	高後 裕	旭川医科大学第3内科	教授
	岡崎 和一	関西医科大学第3内科	教授
	石川 博通	慶應義塾大学医学部微生物・免疫学	教授
	中村 和彦	九州大学大学院病態制御内科	助手
	鈴木 健司	新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学	助手
	竹田 潔	九州大学生体防御医学研究所発生工学分野	教授
事務局	伊藤 裕子	東京医科歯科大学医学部消化器内科 〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 TEL 03-5803-5973 FAX 03-5803-0262 E-mail yito.gast@tmd.ac.jp	

Ⅱ. 総括研究報告

炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究

主任研究者 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：本研究班は、難治性炎症性腸疾患に対しこれまでと異なる発想による病態遷延機構の解析を行い、それに基づく画期的治療法の開発とその臨床応用を目標とした。この目的のため、「粘膜局所免疫調節」および「組織再生誘導」を促す新規治療法開発を目指し、1) 上皮細胞再生のための分子療法、細胞移植療法の確立、2) 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法開発、3) 選択的細胞除去療法開発、および4) 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立、の4プロジェクトを設定し研究を進めた。1)では腸炎モデルマウスを用い HGF 投与の効果を検討しその有効性を明らかにした。また、急激な上皮傷害を起こしたヒト腸管上皮において骨髄由来細胞が未分化上皮細胞、および多様な上皮機能を持った成熟した腸管上皮細胞の両者へ分化し、腸管上皮機能の回復に貢献することを示した。2)では、基礎研究レベルにおいて、自然免疫制御分子あるいは $\gamma\delta$ 型 IEL の IBD への関与、小腸パネート細胞が有する抗菌活性に関する知見、および研究代表者による粘膜 IL-7 機構に関わる新しい知見など、大きな進展が得られた。3)では、潰瘍性大腸炎に対する血球除去療法に関わる臨床研究の推進とともに、制御性 T リンパ球の選択的除去を導入した改変型白血球除去療法の開発が進められた。4)については、高分子バイオマテリアルを用いた免疫調節剤封入マイクロカプセルを作成し、モデル動物においてその安全性と有効性が確認された。本研究プロジェクト開始後、社会的インパクトの高い論文発表が可能であったのみならず、臨床応用の点でも4件のプロジェクトが分担研究者の施設で臨床試験としてすでに承認あるいは承認間近となるなど、十分な成果が挙げられつつある。これら成果は、基礎研究の先進性を確保しつつ、かつ既存の炎症性腸疾患治療を凌駕し患者 QOL の改善にも有効な画期的治療開発を可能にすることが予想され、国際的にも評価に耐え得る研究であると考えられる。

分担研究者

日比紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授
浅香正博 北海道大学分子病態制御学 教授
坪内博仁 宮崎大学第二内科 教授
高後 裕 旭川医科大学第三内科 教授
岡崎和一 関西医科大学第三内科 教授
石川博通 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 教授
中村和彦 九州大学大学院病態制御内科 助手
鈴木健司 新潟大学医学部消化器内科 助手
竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所発生工学分野 教授

A. 研究目的

本邦において増加の一途をたどる炎症性腸疾患は若年者を襲い、生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる未だ原因不明の難病である。さらに既存の first line 治療に抵抗性の難治症例や頻回に再燃を繰り返す例が存在すること、あるいは鼻管・中心静脈栄養・薬物経動脈投与などきわめて侵襲性の高い治療がしばしば必要とされ、繰り返す入院やときに手術を余儀なくされることなど、患者 QOL の点を考慮しても画期的治療法開発が急務である。

本研究は、難治性炎症性腸疾患に対し、これまでとは異なる発想による病態遷延機構の解析を行い、それに基づく画期的治療法の開発とその臨床応用を

目指すものである。主任研究者が独自に見いだしてきた知見、即ち、炎症性腸疾患の病態維持機構には「腸管免疫機構の破綻」および「傷害粘膜上皮の再生不全」の両者が深く関わる新しい考え方を基盤とし、分担研究者が個々に明らかとしてきた腸組織における特殊な免疫調節機構および分化・再生機構の知見を集約させ、腸粘膜局所での免疫調節と上皮再生の連鎖・協調を人為的に統合制御し、粘膜局所免疫調節および組織再生誘導を促す新規治療法開発を目指す萌芽的研究を行い、患者のQOL向上に直結する治療様式を開発することを目的とする。この実現のために、以下の4のプロジェクト(p)を設定して、班員と協力者が一体となって調査、研究を進めた。

p-1: 上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立

p-2: 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発

p-3: 選択的細胞除去療法の開発

p-4: 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立

(倫理面への配慮)

プロジェクトの遂行に当たっては、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。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ふ人道的な配慮を求めていることを十分認識し、各大学の動物実験ガイドラインに沿って実施する。

B. 研究成果

本研究の成果をプロジェクトごとに報告する。

p-1: 上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立

生体分子を用いた再生療法のアプローチとして hepatocyte growth factor (HGF) の解析を継続した。マウス trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 腸炎モデルを用いて遺伝子組み換え型ヒト肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) の有効性試験を行い、HGF 投与群では有意に大腸びらん、潰瘍面積が縮小し、大腸短縮が抑制されることを明らかとした (坪内)。またデキストラン硫酸大腸炎 (DSS) モデルに対するラット HGF 遺伝子の投与実験については、昨年度の成果をさらに発展させ、HGF 遺伝子の繰り返し導入の腸炎治療効果と、HGF 遺伝子の注腸投与による局所遺伝子導入による腸炎治療効果の検討をおこない、いずれもが十分な腸炎発症阻止効果を持つことを明らかにした (鈴木)。研究代表者によるヒト骨髄由来細胞の解析においても、本年度さらに研究の進展があり、ヒト骨髄由来上皮細胞が傷害後腸管上皮において増殖能をもつ未熟細胞および多様な上皮機能を保持する高分化上皮細胞の両者として機能し、これらバランスのとれた transdifferentiation 機構による腸管上皮再生のメカニズムが明らかとされた。さらに、腸管上皮細胞分化の分子機構解析にも着手し、Notch シグナル分子機能の重要性の一端が明らかとなった (渡辺)。

p-2: 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発

分担研究者・竹田らは、これまでマクロファージで IL-10 シグナルに関わる STAT3 が慢性大腸炎症抑制に必須であること、Toll-like receptor (TLR) ファミリー分子が慢性腸炎発症のトリガーとなること、さらに、IL-10 刺激によりマクロファージで誘導される Bcl-3 が、TLR 刺激依存性の TNF- α 産生を特異的に抑制していることなどを報告してきた。今年度は、マクロファージにおける機能分子を探索し、正常大腸粘膜固有層マクロファージに特異的に発現する IKBNS が IL-6 産生に関与することで腸炎発症に重要な機能をもつことを明らかにした。分担研究者・石川は本年度、腸管局所免疫調節に重要な $\gamma\delta$ -IEL

の発達分化機構を詳細に解析し、この過程に腸管特異的リンパ装置クリプトパッチが重要であることを、ヌードマウスを用いた一連の実験により明らかにした。高後は独自の小腸陰窩単離技術を用い、本年度はクローン病患者の活動性病変の Paneth 細胞で alpha-defensin 発現が低下し細菌曝露による殺菌活性放出が有意に低下することを明らかにし、自然免疫機能の制御が有効な炎症性腸疾患治療法となりうる可能性を提示した。代表研究者・渡辺は、IL-7 受容体を介する刺激が粘膜リンパ球、特に慢性大腸炎局所の粘膜リンパ球に強い増殖活性を有することを見だし、IL-7 が慢性大腸炎発症に密接に関わる可能性を示すとともに、IL-7 レセプター高発現粘膜リンパ球がヒト炎症性腸疾患の新規治療標的となりうる可能性を示した。また、腸管上皮細胞を用いて IL-7 産生機構をヒト細胞で初めて明らかにするなど、粘膜 IL-7 機構に関する独自の研究を進展させ、一定の評価を得ることとなった。

p-3: 選択的細胞除去療法の開発 本年度は分担研究者・中村により、これまでの血球成分除去療法の改変型とし、除去された白血球より制御性 T 細胞を分離し体内に戻す「制御性 T 細胞移入療法」の試みがおこなわれ、活動性潰瘍性大腸炎に対するより効果の高い新規治療として方法論的および理論的妥当性が示された。本法はすでに分担研究者の所属施設における倫理委員会承認に向けた準備が進みつつあり、当該研究期間内の成果の評価を目指している。

p-4: 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立

分担研究者・岡崎は、高分子バイオマテリアルの一種であるポリ-L-D 乳酸(PDLLA)マイクロカプセルを用いた免疫調節剤封入マイクロカプセルの作成を試み、マウス腸炎モデルを用いた実験で、経口投与による粘膜免疫の選択的制御の有用性を検討してきたが、本年度は更に臨床応用を目的として、ラットを用いた慢性毒性実験を行い、本剤の安全性について確認をおこなった。

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

C. 今後の課題、目標

上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立：本年度の検討により、上皮細胞の再生に対する HGF の有効性がさらに確認された。実際、組み換え HGF による腸管粘膜再生治療は臨床試験として分担研究施設ですでに承認されている。今後、詳細な効果発現機序の解明と安全な投与経路の確立などの検討と平行し、ヒト投与への準備をさらに進めたい。骨髄由来細胞による粘膜上皮の再生を目指した治療法は、欧米においては既に病的 T 細胞を除去する目的でヒトクローン病に対する自家骨髄移植、末梢血幹細胞移植が始まっており、これを上皮再生というこれまで異なる視点からも解析を進めることにより、骨髄細胞を上皮再生にも利用し得る治療法につながるものと考えられる。

腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発：腸管免疫調節機構の解明を目指す本プロジェクトでは、むしろ慢性大腸炎症に潜む免疫学的異常の基礎知見を明らかとすることに主眼をおいたが、分担研究者との共同により、世界的にも注目されるインパクトの高い研究成果が得られている (Science. 301:640, 2003) (Nat Immunol. 4:1144, 2003) (Nature. 430:218, 2004) (Nat Immunol. 4:154, 2003) (J Immunol. 171:5507, 2003) (Mol Cell Biol. 24:6298, 2004) (J Immunol. 173:3119, 2004) (J Immunol. 172: 6388, 2004) (J Immunol. 171:4156, 2003) (J Immunol. 171:1556, 2003) (J Immunol. 171:708, 2003)。今後は、これら基礎知見に基づく画期的治療戦略の確立を念頭におき、多方向からのアプローチでの研究を継続する予定である。

選択的細胞除去療法の開発：血球成分除去療法の有効性と安全性に関する詳細な臨床研究の継続により、炎症性腸疾患治療におけるこれら治療法の位置付けが示されるものと考えられる。さらに、改変型血球除去療法として位置づけられる「制御性 T 細胞移入療法」の考えは、免疫学の進展により最近急速に理解が深まりつつある制御性 T 細胞の機能解析と平行することで、活動性潰瘍性大腸炎における有望な治療として期待されるものであり、研究代表者・分担研究者の両組織において技術基盤を確立するための

研究を継続中である。

分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立：ラットに於ける慢性毒性試験においてDx-M Sの長期投与の安全性が確認され、有効なドラッグデリバリーシステムとして分担研究施設での臨床試験として承認間近となっている。さらなる基礎的データの蓄積とともに、ヒトへの臨床応用が期待される。

D. 結論

研究代表者および分担研究者の協調的研究体制により、早期の臨床応用を目指した成果を確実に挙げられている。次年度以降も、これらの個々の研究成果の進展とともに、上皮再生、腸管免疫の調節および選択的細胞療法と腸管細胞への独自のデリバリーシステムといったプロジェクト相互の活発な交流と知見の融合を促進することにより、これらを統合した治療法の開発が可能になるものと期待される。これにより、日常生活を制限される多くの若年層患者に対して QOL の向上を伴う炎症性腸疾患の画期的治療法の開発が早期に可能になるものと考えられる。

Ⅲ. 分担研究報告

ヒト腸管上皮の分化・再生機構の解析

～炎症性腸疾患に対する多面的再生治療法の開発を目指して～

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：骨髄由来細胞が腸管上皮に分化しうるとの独自の成果を進展させ、本研究ではその機構の詳細および腸管上皮細胞分化の分子機構を解析した。その結果、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。さらに、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。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、骨髄由来細胞を利用する新たな細胞療法、および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分野

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。本研究ではこれを進展させ、1) 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、2) 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、をおこなうことを目的とした。

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に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)、

B. 方法・結果

1) 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。

2) 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)。

(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した。

C. 考察

1) 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 trans-differentiation 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が示された。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。

2) 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。

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、すなわち骨髄細胞による transdifferentiation という細胞レベルでの制御機構、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が存在することを示した。また、急激な上皮傷害の際には、骨髄細胞の動員が腸管上皮の再生と早期の機能回復に利用され得る可能性、および 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が可能となることが期待され、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⁺CD25^{bright} 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-7R^{high} 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 Cryptospatch-Derived Intraepithelial Lymphocytes in the Development of Chronic Ileocaetitis. 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-Verses-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-H1 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、鏗田武志、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、稲澤穰治、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-H1 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新規治療法開発への試み. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」平成 16 年度第 1 回総会, 東京, 2004. 7. 30
 18. 金井隆典、河村貴広、蒔田 新、浦牛原幸治、戸塚輝治、渡辺 守: 細胞治療としての炎症性腸疾患における免疫抑制性 T 細胞移入療法実現に向

- かって。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」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、鏗田武志、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 Secretary 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- γ 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オ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：腸管上皮の分化制御による上皮再生治療の可能性。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」平成16年度第2回総会，東京，2005.1.26
31. 金井隆典、河村貴広、蒔田 新、浦牛原幸治、戸塚輝治、渡辺 守：細胞治療としての炎症性腸疾患における免疫抑制性T細胞移入療法 -第2報-。厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」平成16年度第2回総会，東京，2005.1.26
- 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

HGF を用いた傷害粘膜再生・修復治療の開発
～組み換え型ヒト HGF の臨床応用の問題点～

分担研究者 坪内博仁 宮崎大学医学部内科学第二講座 教授

研究要旨：組み換え型ヒト HGF の臨床試験を目的として、静脈内投与における非臨床試験（安全性試験）を行った。急性毒性試験では致死量 >40.0 mg/kg で、特に問題となる毒性所見はみられなかった。2 週間反復投与毒性および 2 週間回復試験では、可逆性の蛋白尿が認められたが、尿中微量アルブミン測定でモニタリング可能であり、腎機能障害をきたす個体はみられなかった。一方、安全性薬理試験では、循環動態に影響を及ぼす可能性が示唆された。炎症性腸疾患を対象とした臨床試験には、投与方法に応じた非臨床試験（薬物動態試験、安全性試験、薬効薬理試験）の追加が必要と考えられた。

共同研究者

井戸章雄、金 一徳、森内昭博

京都大学医学部付属病院探索医療センター

宇都浩文、沼田政嗣

宮崎大学医学部内科学第二講座

A. 研究目的

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) は肝細胞の増殖を促進する因子として劇症肝炎患者血漿から単離された増殖因子である。HGF は肝細胞のみならず種々の上皮系細胞に対して、増殖促進作用のみならず遊走能亢進、アポトーシス抑制作用を発揮し、傷害組織の重要な再生・修復因子と考えられている。一方、炎症性腸疾患は若年者に多く発症する難治性疾患で、これまで抗炎症、免疫抑制に主眼を置いた治療法がなされているが、再燃を繰り返し、治療に難渋する症例も多い。我々は傷害粘膜の再生・修復を目的とした新たな治療法の開発を目的として組み換え型ヒト HGF の薬効薬理試験を行い、硫酸デキストラン腸炎および trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 大腸炎モデルに対する有効性を報告した。本研究では組み換え型ヒト HGF の臨床試験を目指して、「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」のガイドラインに基づいた安全性試験を行った。

B. 研究方法

1. 単回投与毒性試験：BALB/c マウスに組み換え型ヒト HGF (0, 4.0, 40.0 mg/kg) を単回静脈内投与し、14 日間一般状態を観察した後に屠殺、剖検および病理組織学的検討を行った。
2. ラット 2 週間反復投与毒性及び 2 週間回復試験：Wistar ラットに組み換え型ヒト HGF (0.4, 1.0, 4.0 mg/kg/day) を 2 週間反復静脈内投与した後 2 週間休薬した。HGF 投与 14 日目および 28 日目 (休薬後 14 日目) に屠殺し、血液生化学検査および病理学的検査を行った。
3. 安全性薬理試験：クラウン系ミニブタに、吸入麻酔 (セボフルラン・笑気) 下に中心静脈カテーテルを右内頸静脈内に、動脈カテーテルを右総頸動脈内に留置した後、静脈麻酔 (プロポフォール) に変更した。組み換え型ヒト HGF 0 (溶媒)、1, 4 mg/kg を中心静脈カテーテルから 20 分で投与し、呼吸器系および循環器系に及ぼす影響を検討した。

C. 研究結果

1. 単回投与毒性試験：ラット単回投与毒性試験において、いずれの群にも死亡する個体は認めなかった。一般状態の観察では、4.0, 40.0 mg/kg 投与群では特に変化を認めなかった。また、体重にも変化はみられなかった。剖検では、雌の子宮が水腫様に腫大した個体が 4.0, 40.0 mg/kg 投与群に各 4 匹みられた。子宮の内容物は無色透明で非粘張性の液体であった。これら個体の病理組織学

的検査では、卵巣で卵胞の増加および子宮・膈の上皮の増殖がみられたが、これらの変化は発情に伴う変化と考えられた。

2. ラット2週間反復投与毒性及び2週間回復試験：死亡する個体はみられなかった。器官重量では、肝臓の重量は有意に増加したが、腎臓の重量に変化はみられなかった。血液生化学検査では、投薬中にアルブミン、総コレステロールが増加したが、回復期には改善傾向を示した。また、尿素窒素、クレアチニンには変化を認めなかった。1.0 mg/kg 投与群では10-14日後に軽度の蛋白尿が出現し、0.4 mg/kg 投与群では明らかな蛋白尿のピークはみられなかった。蛋白尿は用量依存性に増加し、ピークは投与14日目であった。一方、尿中微量アルブミンはHGF投与4日目から出現し、蛋白尿に先行して増加した。また、投与終了後2週間の観察期間において、0.4、1.0および4.0 mg/kg 群で蛋白尿は回復または改善した。糸球体濾過量は投与終了時には変化を認めなかったが、2週間の回復期終了時には4.0 mg/kg 群において低下していた。腎臓の病理組織学的検査では、0.4 mg/kg 群では糸球体の肥大が生じ、1.0 mg/kg 以上の群では糸球体内のメサンギウム領域や内皮下にPAS陽性物質の沈着が出現した。また、一部にメサンギウム融解を生じ、28日後には高用量群で巣状に硬化病変を残した。
3. 安全性薬理試験：いずれの群においても死亡はみられなかった。また、検査翌日の一般状態観察ではいずれの個体も異常所見を認めなかった。呼吸数および動脈血ガス分析に影響はみられなかった。心拍数は、麻酔深度によって溶媒投与群においても試験後期に減少する傾向がみられた。4 mg/kg を投与すると、投与中に心拍数は漸減(71→62/分)、投与終了1分後から56~70/分で推移した。心電図検査では、溶媒およびHGF投与群、いずれにも異常を認めなかった。収縮期血圧は自動血圧計を用いて測定した。溶媒投与群では血圧低下はみられなかった。4 mg/kg を投与すると、投与中から収縮期血圧は低下し(113→92 mmHg)、投与終了後も80~95 mmHgで推移した。一方、1 mg/kg 投与群においては、収縮期血圧が投与中に15~18 mmHg減少した。

D. 考察

静脈内投与における組み換え型ヒトHGFの非臨床試験として、急性毒性試験、2週間反復投与毒性および2週間回復試験、安全性薬理試験を行った。急性毒性試験では致死量>40.0 mg/kgで、HGF投与に

よって雌の発情期が持続的に惹起された可能性は否定できない。しかし、他の反復投与毒性試験では雌生殖器に変化を認めなかったことから偶発的に発情期の個体が多かった可能性も考えられる。一方、反復投与毒性および回復性試験では可逆性の蛋白尿が認められた。腎機能障害をきたす個体はみられないが、その回復性を確認するために2週間反復投与毒性および2週間回復性試験を行った。HGFの休薬によって蛋白尿は回復傾向を示し、腎臓の病理学的所見も全体的には可逆性の変化内と考えられ、0.4、1.0 mg/kg 投与群においては回復することが考えられた。一方、4.0 mg/kg 投与群では投与終了後2週間観察期間中に腎毒性は改善傾向を示すものの尿中微量アルブミンが検出され、糸球体濾過量も減少したことから、不可逆的な腎障害が惹起されている可能性が考えられた。しかし、全ての尿中微量アルブミンの増加がHGFによる蛋白尿の出現に先行することから、尿中微量アルブミンは腎毒性の有用なマーカーになることが考えられた。安全性薬理試験では、HGFは呼吸器系には影響を及ぼさないと考えられた。一方、循環器系においては、心電図には変化を認めなかったが、HGFによって心拍数および血圧が低下する可能性が考えられた。しかし、心拍数と血圧には静脈麻酔による不安定な麻酔深度の影響がみられたため、HGFの循環器系に及ぼす影響を確認するためには追加試験が必要と考えられた。

炎症性腸疾患を対象とした臨床応用では、組み換え型ヒトHGFの局所投与も可能である。しかし、局所投与においても組み換え型ヒトHGFの血中暴露の可能性は高く、静脈内投与における安全性試験は必須と考えられる。一方、局所投与における有効性、薬物動態および発癌性に関しては追加試験を実施する必要があると考えられた。

E. 結論

静脈内投与における組み換え型ヒトHGFの急性毒性試験では特に臨床応用時に問題となる所見はみられなかった。また、反復投与試験では可逆性の蛋白尿がみられたが、腎障害をきたす個体はなく尿中微量アルブミンでモニタリング可能であった。炎症性腸疾患を対象とした組み換え型ヒトHGFの臨床試験では局所投与も可能であるため、有効性、薬物動態、発癌性に関する追加試験の必要性が考えられた。

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 I, Numata M, Nagata-Tsubouchi Y, Hasuike S, Uto H, Tsubouchi H: Pharmacokinetic study of recombinant human hepatocyte growth factor administered in a bolus intravenously or via portal vein. *Hepatol Res.* 30, 175-181, 2004.
2. 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).
3. 井戸章雄、田原良博、沼田政嗣、坪内博仁：潰瘍性大腸炎モデルに対する肝細胞増殖因子を用いた傷害粘膜再生・修復療法. *最新医学* 59, 1044-1055, 2004.
4. 井戸章雄、森内昭博、金一徳、沼田政嗣、宇都浩文、坪内博仁：ウイルス性肝疾患とサイトカイン-HGF による病態制御を中心に. *臨床消化器内科* 20, 295-302, 2004.
5. 井戸章雄、宇都浩文、坪内博仁：肝細胞増殖因子 HGF を用いた最新の臨床展開. *バイオサイエンスとインダストリー* 63, 25-28, 2004.

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, 仙台, 2004. 4. 22
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総会, 仙台, 2004. 4. 22
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, 福岡, 2004. 10. 21
4. 沼田政嗣、井戸章雄、坪内博仁：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, 福岡, 2004. 10. 21
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, 福岡, 2004. 10. 21

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

特になし

炎症性腸疾患に対する HGF 遺伝子治療法開発に関する研究

分担研究者 鈴木健司 新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野 助手

研究要旨：炎症性腸疾患に対する粘膜再生療法が従来の治療法を補う新規治療法として期待されている。われわれは、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF）の遺伝子治療による炎症性腸疾患の粘膜再生療法開発に向けた基礎的検討を行った。デキストラン硫酸ナトリウム（dextran sodium sulfate: DSS）腸炎モデルに対して、肝臓への遺伝子導入による治療実験で腸炎治療効果が得られることを昨年度示した。今年度は、肝臓への遺伝子導入を繰り返し HGF 血中濃度を維持することが腸炎治療効果を高めることを示した。さらに、注腸による大腸局所への遺伝子導入も肝臓への導入同様の治療効果が得られることを示した。副作用発現の危険性を考えた場合、腸管局所への遺伝子導入による治療法の検討を今後十分進める必要性が考えられた。また、colitic cancer 発ガンの危険性などの遺伝子治療の安全性に対する検討も十分加える必要性が考えられた。

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。

我々は肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF）の遺伝子治療による、炎症性腸疾患の粘膜再生療法開発の基礎的な検討を進めた。前年度では HGF 遺伝子の肝臓への一回導入により腸炎治療効果が得られることを示した。

今年度は、HGF 遺伝子の繰り返し導入の腸炎治療効果の検討と、HGF 遺伝子の注腸投与による局所遺伝子導入による腸炎治療効果を検討した。

B. 研究方法

8週齢メス C57BL/6(B6)マウスに 5%DSS を 7日間自由飲水させ腸炎を惹起した。ラット HGF 遺伝子発現プラスミドを実験開始後 0日と 2日に、尾静脈より hydrodynamics 法に基づいた急速大量静注法により肝細胞に遺伝子導入し、腸炎治療効果を判定した。

また、ラット遺伝子発現プラスミドをカルボキシメチルセルロース(CMC)に溶解し、実験開始後 1日、3日と 5日に注腸投与により腸管局所へ遺伝子導入した。静注および注腸両実験で、対照にはコントロールプラスミド導入マウスを用いた。経時的に症状、大腸腸管長を観察し、定量 RT-PCR による大腸組織のサイトカイン発現解析、HE 染色標本の光学顕微鏡観察による組織学的解析、免疫蛍光法による大腸浸潤細胞のフェノタイプ解析とそのサイトカイン発現の解析、プロモデオキシウリジン(BrdU)染色による上

皮細胞の増殖期解析、TUNEL 法によるアポトーシス解析を行った。

（倫理面への配慮）

以上の実験は新潟大学大学院医歯学総合研究科の動物実験倫理規定マニュアルに沿って行われた。

C. 研究結果

HGF 二回導入マウスでは、一回導入マウスに比べ、臨床重症度、大腸腸管長、組織学的病変の強さ、浸潤細胞数、炎症性サイトカイン産生の抑制と抗炎症性サイトカイン産生、いずれにおいても有意差をもってよりよい治療効果が示された。さらに、BrdU 陽性の増殖細胞の増加と TUNEL 陽性のアポトーシス細胞の減少が、大腸腸上皮細胞において認められた。

HGF 遺伝子の肝臓への導入法では、組織病変の改善は、BrdU 陽性細胞増殖上皮細胞の増加とアポトーシス上皮細胞の減少による、大腸陰窩構造の保持、糜爛・潰瘍の減少、大腸陰窩腸の増加が特徴であった。

一方、HGF 遺伝子プラスミドの注腸投与による腸管局所発現では臨床重症度、大腸腸管長、組織学的病変の強さ、浸潤細胞数などで、コントロールプラスミド注腸群に比べて腸炎治療効果が有意差を持って認められた。この、遺伝子導入法では、大腸組織病変は大腸陰窩の増加はあまり目立たず、むしろ大腸陰窩構造の保持と、糜爛・潰瘍の減少、大腸への浸潤細胞の減少が特徴であった。

D. 考察

HGF 遺伝子治療は肝臓への遺伝子導入および大腸