

への局所導入いずれにおいても、DSS 腸炎に対して腸炎発症阻止効果を持つことが明らかとなった。

HGF 遺伝子を肝臓へ導入し、血中 HGF 濃度を上昇させる方法は動物モデルでは、腸炎治療の簡便で有効な方法ではあるが、ひとでは実際の臨床応用が問題である。さらに、血中の HGF 濃度を上昇させ続けることは全身諸臓器へ及ぼす副作用の危険性を有している。また、腸炎治療効果を見た場合、陰窩腸の増進に見られた大腸上皮の過形成傾向は、炎症性腸疾患に合併する colitic cancer の発生の危険性を考えると注意すべき所見と考えられた。

一方、注腸投与による大腸局所投与は、上記の問題点を改善した、ヒトへも応用可能な方法と考えられた。ただし、発ガンの危険性は十分検討する必要がある。

今後は腸管局所へ HGF 遺伝子を直接導入する方法をより重点的に検討することで、炎症性腸疾患に対する HGF 遺伝子治療法の開発を進めることが必要と考えられた。

#### E. 結論

HGF 遺伝子治療は粘膜再生に基づいた炎症性腸疾患の新規治療法となりうる可能性が示唆された。今後は、より副作用の少ない腸管局所への遺伝子導入法を中心に検討を進め、発ガンの危険性の有無に対しても十分な検討を加える必要があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 河内裕介、鈴木健司、埴孝泰、渡辺史郎、米山博之、河内裕、清水不二雄、青柳豊：マウス DSS 腸炎の抗 IP-10 抗体注腸投与による治療効果の検討。消化器と免疫, 61-64, マイライフ社, 2004. 7

##### 2. 学会発表

1) Kawauchi Y, Suzuki K, Hanawa T, Yoneyama H, Maruyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Miyazaki J, Asakura H, Aoyagi Y: Treatment of acute colitis of mice by hepatocyte growth factor gene transfer to the liver via tail vein. DDW 2004, New Orleans, Louisiana, USA, 2004. 5. 17.

2) Suzuki K, Kawauchi Y, Baba Y, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Narumi S, Shimizu F, Asakura H,

Aoyagi Y: Amelioration of acute colitis of mice by enema of anti-interferon-inducible-protein 10 (IP-10)-antibody. DDW 2004, New Orleans, Louisiana, USA, 2004. 5. 17.

3) 河内裕介、鈴木健司、青柳豊：マウス DSS 腸炎に対する HGF 遺伝子導入療法を検討。第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004. 4. 22

4) 河内裕介、鈴木健司、埴孝泰、韓基東、河内裕、清水不二雄、青柳豊：マウス DSS 腸炎に対する HGF 遺伝子治療の検討。第 41 回日本消化器免疫学会, 大津, 2004. 7. 15.

5) 鈴木健司、河内裕介、青柳豊：炎症性腸疾患の粘膜再生に基づく新規治療法としての HGF 遺伝子治療法の開発。DDW-Japan 2004, 福岡, 2004. 10. 21.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1 特許取得

なし

##### 2 実用新案登録

なし

##### 3 その他

特になし

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

分担研究者 浅香正博 北海道大学大学院消化器内科学分野 教授

研究要旨：炎症性腸疾患に対する HSP70 の役割を明らかにするために、マウス DSS 腸炎および TNBS 腸炎に対し HSP70 の誘導剤である geranylgeranyl acetone (GGA) の投与をおこなった。GGA の経口投与はマウスの大腸組織の HSP70 を増加させ、実験腸炎に対して抑制効果を示したことから、GGA は HSP70 の誘導を介して腸炎を抑制する可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまで我々は、macrophage migration inhibitory factor (MIF)に対する中和抗体の投与が、炎症性腸疾患の動物モデルである DSS 腸炎に対し予防および治療効果を示すことを報告してきた。炎症性腸疾患における MIF の役割を更に明らかにし、治療の標的となる新しい分子を見出す目的で MIF<sup>-/-</sup>マウスを用いた解析を行ったところ、MIF<sup>-/-</sup>マウスでは DSS 腸炎が全く惹起されないこと、その機序として heat shock protein 70 (HSP70) の関与が示唆された。本研究では、HSP70 の誘導剤である geranylgeranyl acetone (GGA) の投与が、DSS 腸炎に対し予防効果を示すか否かを検討した。

B. 研究方法

DSS 腸炎および TNBS 腸炎は、それぞれ Balb/c マウスに対し 3% DSS 水溶液を 7 日間自由飲水にて投与、TNBS 3mg/body を注腸投与することにより作成した。GGA は腸炎誘発直前およびその後隔日に経口投与した。各群の生存率、臨床症状（下痢、血便、体重減少）、組織学的炎症スコア、大腸組織 myeloperoxidase (MPO)、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  を検討した。また、大腸組織 HSP70 の発現は、ウエスタンブロットおよび免疫組織学的により検討した。

（倫理面への配慮）

実験動物の取り扱い、北海道大学医学部“動物実験に関する指針”に基づいた。

C. 研究結果

DSS 腸炎および TNBS 腸炎において GGA 投与群は下痢・血便・体重減少が抑制された。組織学的には炎症細胞の浸潤、腸上皮の破壊が抑制された。大腸組織 myeloperoxidase (MPO)、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  は、GGA 投与群で低下していた。ウエスタンブロットおよび免疫組織学的により HSP70 の発現を検討したところ、

GGA 投与群では HSP70 の発現が増強し、特に腸上皮での発現増加が顕著であった。

D. 考察

GGA は生体内で HSP70 を誘導し、様々な傷害から細胞を保護することが報告され、心臓、脳、腎臓などの虚血もしくは虚血・再灌流モデルにおいて予防効果を示すことが明らかにされている。本研究においても、GGA の経口投与は大腸組織に HSP70 を誘導するとともに、DSS 腸炎および TNBS 腸炎を有意に抑制した。MIF<sup>-/-</sup>マウスの検討から、腸管粘膜における HSP70 の増加が DSS 腸炎に対し抑制的に働く可能性が示唆されており、GGA は HSP70 の誘導を介して腸炎を抑制した可能性が高い。さらに、本研究結果は GGA の経口投与がヒトの炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる可能性を示すものである。

E. 結論

GGA の経口投与はマウスの実験腸炎に対して抑制効果を示したことから、GGA は HSP70 の誘導を介して腸炎を抑制した可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inagaki H, Nakamura T, Li C, Sugiyama T, Asaka M, Kodaira J, Iwano M, Chiba T, Okazaki K, Kato A, Ueda R, Eimoto T, Okamoto S, Sasaki N, Uemura N, Akamatsu T, Miyabayashi H, Kawamura Y, Goto H, Niwa Y, Yokoi T, Seto M, Nakamura S: Gastric MALT Lymphomas Are Divided Into Three Groups Based on Responsiveness to Helicobacter Pylori Eradication and Detection of API2-MALT1 Fusion.

- Am J Surg Pathol. 28 : 1560-1567, 2004.
2. Shimizu Y, Kato M, Yamamoto J, Nakagawa S, Komatsu Y, Tsukagoshi H, Fujita M, Hosokawa M, Asaka M: Endoscopic clip application for closure of esophageal perforations caused by EMR. Gastrointest Endosc. 60 : 636-639, 2004.
  3. Sugiyama T, Asaka M: Helicobacter pylori infection and gastric cancer. Med Electron Microsc. 37 :149-157, 2004
  4. Asaka M, Dragosics BA: Helicobacter pylori and gastric malignancies. Helicobacter. 9 :35S-41S, 2004.
  5. Kato M, Asaka M, Shimizu Y, Nobuta A, Takeda H, Sugiyama T: Multi-Centre Study Group.: Relationship between Helicobacter pylori infection and the prevalence, site and histological type of gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther. 20 :85S-89S, 2004.
  6. Nobuta A, Asaka M, Sugiyama T, Kato M, Hige S, Takeda H, Kato T, Ogoshi K, Keida Y, Shinomura J: Helicobacter pylori infection in two areas in Japan with different risks for gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther. 20 :1S-6S, 2004.
  7. Kato M, Saito M, Fukuda S, Kato C, Ohara S, Hamada S, Nagashima R, Obara K, Suzuki M, Honda H, Asaka M, Toyota T: 13C-Urea breath test, using a new compact nondispersive isotope-selective infrared spectrophotometer: comparison with mass spectrometry. J Gastroenterol. 39 : 629-364, 2004.
  8. Kondo T, Kobayashi M, Tanaka J, Yokoyama A, Suzuki S, Kato N, Onozawa M, Chiba K, Hashino S, Imamura M, Minami Y, Minamino N, Asaka M: Rapid degradation of Cdt1 upon UV-induced DNA damage is mediated by SCFSkp2 complex. J Biol Chem. 279 : 27315-27319, 2004.
  9. Tanaka J, Toubai T, Tsutsumi Y, Miura Y, Kato N, Umehara S, Kahata K, Mori A, Toyoshima N, Ota S, Kobayashi T, Kobayashi M, Kasai M, Asaka M, Imamura M: Cytolytic activity and regulatory functions of inhibitory NK cell receptor-expressing T cells expanded from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. Blood. 104 :768-74, 2004.
  10. Shimizu Y, Kato M, Yamamoto J, Nakagawa S, Tsukagoshi H, Fujita M, Hosokawa M, Asaka M: EMR combined with chemoradiotherapy: a novel treatment for superficial esophageal squamous-cell carcinoma. Gastrointest Endosc. 59 :199-204, 2004.
  11. 浅香正博 : H. pylori 除菌により萎縮性胃炎は改善するのか 両論文に対するコメント Frontiers in Gastroenterology 9: 312, 2004.
  12. 加藤元嗣、清水勇一、武田宏司、浅香正博: 胃がんの化学予防 最新医学 59: 2415-2423, 2004.
  13. 加藤元嗣、清水勇一、小松嘉人、武田宏司、杉山敏郎、浅香正博: 胃潰瘍の大規模臨床試験とエビデンス 最新医学 59: 1481-1491, 2004.
  14. 浅香正博: H. pylori 感染の診断と治療のガイドライン-2003年改訂版 Medical Technology 32: 782-785, 2004.
  15. 加藤元嗣、中川宗一、清水勇一、小路えり子、津田弓子、杉山敏郎、浅香正博: H. pylori 感染診断法 尿素呼気試験 Medical Technology 32: 813-817, 2004.
  16. 武田宏司、浅香正博 : GERD と Helicobacter pylori 感染 JOHNS 20: 943-946, 2004.
2. 学会発表
    1. 寺野 彰、浅香正博 : H. pylori 除菌後の長期経過 第90回日本消化器病学会総会, 仙台, 2004. 4. 21
    2. 浅香正博: 除菌による胃癌予防は可能か? 第43回日本消化器集団検診学会, 札幌, 2004. 5. 20
    3. 河原崎暢、浅香正博、加藤元嗣 : 鑑別困難な炎症性腸病変に対する内視鏡的アプローチ 骨髄移植後のGVHD 腸炎とサイトメガロウイルス感染の鑑別 第67回日本消化器内視鏡学会総会, 京都, 2004. 5. 26
    4. 中川宗一、加藤元嗣、浅香正博 : EMRにおける切開非剥離法 vs 切開剥離法 第67回日本消化器内視鏡学会総会, 京都, 2004. 5. 27
    5. 加藤元嗣, 杉山敏郎, 浅香正博: H. pylori 除菌後長期の諸問題 除菌後5年以上の経過観察症例における逆流性食道炎の推移 第68回日本消化器内視鏡学会総会, 福岡, 2004. 10. 22
  - H. 知的財産権の出願・登録状況
    - 1 特許取得
      - 炎症性腸疾患の予防・治療剤

国内出願番号：2003-192514(2003/7/7)

国際出願番号：PCT/JP2004/09657(2004/7/7)

- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
特になし

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

分担研究者 高後 裕 旭川医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨 小腸粘膜から陰窩を単離して確立した内因性抗菌ペプチド分泌アッセイ系を用いた検討により、活動性のクローン病患者では健常対照者に比べて小腸上皮由来の殺菌活性が低下することを示した。さらに、クローン病患者では Paneth 細胞にあるデフェンシンの発現が低下していることを示唆した。腸管粘膜免疫に関するこれらの研究成果は、炎症性腸疾患に対する新たな治療法の臨床応用につながるものと考えられた。

A. 研究目的

感染刺激に反応して内因性抗菌ペプチドを分泌する Paneth 細胞の自然免疫機構を解析し、内因性抗菌ペプチドによる腸管免疫制御療法開発の可能性を検討した。

B. 研究方法

クローン病患者および非炎症性腸疾患対照者からインフォームド・コンセントの下に切除小腸粘膜または内視鏡的回腸生検粘膜材料を得て、Ayabe らの方法に準じて単離小腸陰窩を回収した。なお、クローン病患者の材料は活動性病変近傍から得た。得られた単離小腸陰窩と *S. typhimurium* を *ex vivo* 曝露した群、および *S. typhimurium* に曝露しない群を 37℃で、30 分間培養後に上清を回収した。得られた分泌物またはコントロール上清の defensin-sensitive *S. typhimurium* に対する殺菌活性を既報 (*Nat Immunol* 2000) に準じて検討した。Acid-urea ゲルと抗 alpha-defensin 抗体を用いて western blot 解析を施行した。また、上記のようにして得た単離小腸陰窩分画から単離腸上皮細胞を分離して、単離 Paneth 細胞における alpha-defensin の発現について蛍光抗体法で共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究においては、試料等の提供者、その家族・血縁者その他の関係者の人権及び利益の保護には格段の配慮を行った。具体的には、本研究で試料を得る場合には文書によるインフォームド・コンセントを提供者、提供者が未成年の場合には保護者から得た。また、本研究で得られた結果の公表の際には、提供者、その家族・血縁者その他の関係者の人権及び利益の保護を十分に配慮することを旨とした。

C. 研究結果

位相差顕微鏡観察下で、クローン病患者および対照者の小腸陰窩は、容易に判別、単離し得た。クローン病患者の小腸陰窩には対照者にはみられない陰窩の伸長や陰窩内腔の拡張等の形態異常を高頻度に認めた。クローン病患者の活動性病変近傍の Paneth 細胞における alpha-defensin 発現は対照者に比べて低下するものが多かった。対照者の Paneth 細胞は、*S. typhimurium* への *ex vivo* 曝露によって、殺菌活性を放出した。これに対して、クローン病患者では、同条件の細菌曝露による殺菌活性放出が有意に低下していた。Western blot 解析で、クローン病患者では分泌された a-defensin が対照者に比べて低下していることが示唆された。これらの結果から、クローン病患者の小腸活動性病変近傍では、感染刺激に反応して Paneth 細胞から放出される殺菌活性が低下していることが示唆された。

D. 考察

Paneth 細胞は小腸陰窩の最基底部に位置し、その顆粒中に内因性抗菌ペプチド (alpha-defensins) を有する。マウスやヒトの Paneth 細胞 alpha-defensins は、細菌感染刺激によって分泌され、小腸感染防御機能を担っているものと考えられる。すなわち、Paneth 細胞は腸の自然免疫担当細胞と位置づけられる。本研究では、新たな炎症性腸疾患治療法開発をめざして、炎症性腸疾患患者の腸上皮の自然免疫機能を非炎症性腸疾患患者と比較して評価した。今回、クローン病患者において、腸上皮の自然免疫の主要な作用因子である内因性抗菌ペプチドの機能低下を認めたことから、自然免疫を正常化することによってクローン病の新治療法開発につながると考えられた。また今後、クローン病患者における Paneth 細胞 alpha-defensins の活性化機構や

分泌機序等を解析することによって、クローン病の発症に微生物感染に対する自然免疫の異常が関与している可能性について明らかにしたい。

#### E. 結論

本研究により、クローン病患者では少なくとも活動性病変近傍において、Paneth細胞由来の殺菌活性が対照者に比べて低下しており、alpha-defensins異常の可能性が示唆された。クローン病に対して、内因性抗菌ペプチドを用いて自然免疫機能を正常化する新たな治療法開発をめざしている。

#### F. 健康危惧情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kohgo Y: Why is leukocytapheresis effective in inflammatory bowel diseases? *J Gastroenterol.* 39: 1226-1227, 2004.
2. Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y, Kono T: The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol.* 12: 394-398, 2004.
3. Ebisawa Y, Kono T, Yoneda M, Asama T, Chisato N, Sugawara M, Ishikawa K, Iwamoto J, Ayabe T, Kohgo Y, Kasai S: Direct evidence that induced nitric oxide production in hepatocytes prevents liver damage during lipopolysaccharide tolerance in rats. *J Surg Res.* 118:183-189, 2004.
4. Watari J, Saitoh Y, Fujiya M, Shibata N, Tanabe H, Inaba Y, Okamoto K, Maemoto A, Ohta T, Yasuda A, Ayabe T, Ashida T, Yokota K, Obara T, Kohgo Y: Reduction of syndecan-1 expression in differentiated type early gastric cancer and background mucosa with gastric cellular phenotype. *J Gastroenterol.* 39:104-112, 2004.
5. Kono T, Chisato N, Ebisawa Y, Asama T, Sugawara M, Ayabe T, Kohgo Y, Kasai S, Yoneda M, Takahashi T: Impaired nitric oxide production of the myenteric plexus in colitis detected by a new bioimaging system. *J Surg Res.* 117:329-38, 2004.
6. 河野 透、野村昌史、綾部時芳、蘆田知史、高後 裕、葛西真一：私の工夫 — Topical Therapy — ガストロームの潰瘍性大腸炎への臨床応用 症

例から学ぶ IBD の臨床一問題症例にどう対応するか— メディカルレビュー社 2004. 4.

7. 綾部時芳、蘆田知史、河野 透、高後 裕：腸粘膜上皮における Paneth 細胞の自然免疫機能と病原体認識機構 *Annual Review 免疫* 2005 81-87, 中外医学社 2004. 12.
- #### 2. 学会発表
1. 岡本耕太郎、綾部時芳、蘆田知史、高後 裕：サイトフェレンシスによる新たな治療戦略—潰瘍性大腸炎に対する遠心分離式白血球除去療法の位置づけ 第 20 回日本医工学治療学会総会学術大会, 広島, 2004. 4. 23
  2. 綾部時芳、河野 透、高後 裕：機能マーカーを用いたヒト腸上皮幹細胞の同定 第 2 回幹細胞シンポジウム, 東京, 2004. 4. 26
  3. Ayabe T, Ashida T, Kobayashi S, Ito T, Tanabe H, Saitoh Y, Kono T, Maemoto A, Ouellette AJ, Kohgo Y: Up-regulation of Toll-like receptor-2 expression in intestinal Paneth cells in patients with Crohn's disease *DDW 2004, New Orleans, Luisiana, USA, 2004. 5. 16*
  4. Ashida T, Ayabe T, Inaba S, Sakamoto J, Ito T, Okamoto K, Maemoto A, Moriyama M, Zasloff MA, Kohgo Y: Effect of oral administration of Isoleucine, stimulant of innate immunity, in IBD patients *DDW 2004, New Orleans, Luisiana, USA, 2004. 5. 18*
  5. 綾部時芳、高後 裕：感染症 パネート細胞による腸内細菌の認識および殺菌機構の解析 第 93 回日本病理学会総会, 札幌, 2004. 6. 9
  6. Ayabe T, Ito T, Tanabe H, Ashida T, Kohgo Y: Innate immunity stimulated by the crosstalk between bacteria and intestinal Paneth cells 9th US-Japan GI & Liver meeting in 21st century 東京 2004. 6. 11
  7. Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y: The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate intestinal host defense 1st. International Meeting on Innate Immunity at Mucosal Surface 東京 2004. 7. 9
  8. Ayabe T, Ito T, Tanabe H, Kobayashi S, Maemoto A, Ashida T, Kohgo Y: Innate host defense stimulated by the crosstalk between intestinal bacteria and Paneth cells 4th Awaji International Forum on Infection & Immunity 淡路島 2004. 8. 30
  9. 綾部時芳、河野 透、高後 裕：再生医工学的ア

アプローチによるヒト腸上皮幹細胞の分離・培養の可能性 第46回日本消化器病学会大会, 福岡, 2004.10.21

10. 綾部時芳、河野 透、高後 裕: 再生医工学的アプローチによるヒト腸上皮幹細胞の分離・培養の可能性 第46回日本消化器病学会大会, 福岡, 2004.10.21

11. 伊藤貴博、綾部時芳、高後 裕: 単離小腸陰窩を用いたパネート細胞の自然免疫機能診断 第46回日本消化器病学会大会, 福岡, 2004.10.21

12. 綾部時芳、岡本耕太郎、蘆田知史、高後 裕: 遠心分離式白血球除去療法の治療効果と適応 第24日本アフレスシス学会, 舞浜, 2004.11.19

13. 綾部時芳、高後 裕: 腸上皮の自然免疫機構—感染刺激の受容と殺菌 第32回細胞情報伝達系北海道研究会, 札幌, 2004.11.24

14. Ayabe T, Ashida T, Kono T, Tanabe H, Maemoto A, Kohgo Y: Roles of antimicrobial peptides secreted by Paneth cells in response to bacteria in innate intestinal host defense 第34回日本免疫学会総会学術集会, 札幌, 2004.12.1

15. 田邊裕貴, 綾部時芳, 前本篤男, 蘆田知史, 高後 裕: クローン病における Paneth 細胞の自然免疫機構 国際科学振興財団 第12回浜名湖シンポジウム, 浜松, 2004.12.23

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1 特許情報

なし

##### 2 実用新案登録

なし

##### 3 その他

特になし

γδ型腸管上皮細胞間 T 細胞 (γδ-IEL) の胸腺外発達分化局所の追究

分担研究者 石川博通 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 教授

研究要旨：管上皮細胞間には膨大な数の腸管上皮細胞間 T 細胞 (intestinal intraepithelial T cells: IEL) が分布し、いわゆる胸腺由来の T 細胞とは性質の異なった T 細胞であることが分かっている。マウス IEL にはαβ型 TCR を保持するαβ-IEL とγδ型 TCR を保持するγδ-IEL が存在し、約半数のαβ-IEL とほぼすべてのγδ-IEL は胸腺を欠如するヌードマウスにも十分みられる。これらの IEL、特にγδ-IEL 前駆細胞が集積する新しいリンパ組織“クリプトパッチ”をマウス小腸粘膜細胞の陰窩に同定した。近年、ヌードマウスの T 細胞が腸間膜リンパ節 (MLN) やパイエル板 (PP) で発達分化することが報告 (JEM 193 :333, 2003) されたので、本研究はこれの検証を目指した。

A. 研究目的

胸腺を欠如するヌード (nu/nu) マウスにみられる γδ-IEL の発達分化に MLN や PP が必須であるか否かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

胸腺が存在する nu/+雌マウスと胸腺を欠如する nu/nu 雄マウスを交配し、妊娠 13 日目と 16 日目の nu/+雌マウスに 200μg の LTβ-R-Ig と TNFR-55-Ig 融合蛋白質を投与し、全身のリンパ節や PP を欠損する nu/nu マウス (nu/nu LNP<sup>-</sup>) マウスを得た。さらに nu/nu マウスと aly/aly (aly:alymphoplasia) マウスから nu/nu aly/aly マウス (胸腺、すべてのリンパ節、PP 及び腸管粘膜に分布する孤立リンパ小節を欠損するミュータントマウス) を作製して、γδ-IEL とクリプトパッチの有無を精査した。

(倫理面への配慮)

実験動物取扱い規定に従って行った。

C. 研究結果

nu/nu LNP<sup>-</sup> 及び nu/nu aly/aly マウスにも CD8αα<sup>+</sup> サブセットを主とする γδ-IEL が十分発達分化することや、クリプトパッチが存在することが明らかとなった。

D. 考察

nu/nu マウスの γδ-IEL と比較して nu/nu LNP<sup>-</sup> 及び nu/nu aly/aly マウスの γδ-IEL 数はやや減少していた。この事実から MLN や PP が γδ-IEL の発達分化局所の一部である可能性は否定出来ない。

E. 結論

nu/nu マウスの γδ-IEL 発達分化に MLN や PP が必須でないことが明らかになるとともに、クリプトパッチが発達分化に必要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shikina T, Hiroi T, Iwatani K, Ho Jang M, Fukuyama S, Tamura M, Kubo T, Ishikawa H, Kiyono H: IgA class switch occurs in the organized nasopharynx- and gut- associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut J Immunol. 172: 6259-6264, 2004.
2. Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo Y, Kinjo T, Ishikawa H, Saito A: Accumulation of gamma-delta T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. J Immunol. 172: 7629-7634, 2004.
3. Matsuo K, Galson D.L, Zhao C, Peng L, Laplace C, Wang K. Z.Q, Bachler M. A, Amano H, Aburatani H, Ishikawa H, Wagner E. F: Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. J Biol Chem. 279: 26475-26480, 2004.
4. Nonaka S, Naito T, Chen H, Yamamoto M, Moro K, Kiyono H, Hamada H, Ishikawa H: Intestinal γδ T Cells Develop in Mice Lacking Thymus, All Lymph Nodes, Peyer's Patches and Isolated Lymphoid Follicles. J Immunol. 174: 1906-1912, 2005.



5. Ishikawa H, Kanamori Y, Hamada H, Kiyono H: Development and Function of Organized Gut-Associated Lymphoid Tissues. In *Mucosal Immunology*. Ogra P.L, Mestecky J, Lamm M.E, Strober W, Bienenstock J, McGhee J.R, eds: Academic Press, San Diego, 385-405, 2005.
6. Kai Y, Takahashi I, Ishikawa H, Hiroi T, Mizushima T, Kishi D, Hamada H, Tamagawa H, Ito T, Yoshizaki K, Kishimoto T, Matsuda H, Kiyono H: Absence of common cytokine receptor  $\gamma$  chain results in the development of colitis by IL-6-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *Gastroenterology*. 2005(in press).
7. 南野昌信、石川博通: 腸管粘膜における孤立リンパ小節とクリプトパッチの発生と機能 実験医学(増刊 免疫研究のフロンティア) 22(5):184(750)-188(754), 2004.
8. 村井政子、石川博通: 腸管免疫の特殊性とGVHD 分子消化器病 1(2): 6(98)-10(102), 2004.
9. 石川博通: 腸管粘膜免疫とアレルギーの制御 日本医学会シンポジウム記録集: 68-75, 2004.
10. 南野昌信、石川博通: 腸管リンパ組織の形成機構 アレルギー科 18(6): 476-482, 2004.
2. 学会発表
1. 木邊量子、野中聡史、坂本光央、保坂奈美、横田博、石川博通、辨野義己: 腸管上皮間T-cellによる腸内細菌叢の統御. 第77回日本細菌学会総会・学術集会, 大阪, 2004. 4. 1-3
2. 松尾光一、後藤真一、石川博通、松井秀則: サルモネラのマクロファージ内増殖機構の解析. 第77回日本細菌学会総会・学術集会, 大阪, 2004. 4. 1-3
3. 石川博通: 腸管粘膜免疫とアレルギーの制御 第126回日本医学会シンポジウム, 東京, 2004. 6. 24
4. 茂呂和世、陳昊、村井政子、石川博通: 胸腺欠損マウスにおけるT細胞抗原受容体(TCR)遺伝子再構成の場の追究. 第16回日本比較免疫学会・学術集会, 沖縄, 2004. 8. 25-27
5. Ishikawa H: <symposium ; Mucosal Immune System> Functional Development of Intestinal Immune Surveillance. Korean Immunology Conference, Seoul, Korea, 2004. 10. 22-23
6. Ishikawa H: Functional Development of Intestinal Immune Surveillance . 2004 KOSEF-JSPS Asian Science Seminar, Seoul, Korea, 2004. 10. 24-27
7. 石川博通: 腸管粘膜免疫防御の特殊性. 第2回 Pfizer Science and Research Symposium, 名古屋, 2004. 11. 11
8. 石川博通: 腸管粘膜の生体防御機構. 第9回 SIRS/sepsis研究会, 東京, 2004. 11. 27
9. 木邊量子、保坂奈美、石川博通、辨野義己: 腸管上皮間T細胞の違いによる腸内細菌叢の変化. 第34回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004. 12. 1-3
10. 陳昊、南野昌信、金成安慶、内藤智昭、石川博通: T細胞抗原受容体(TCR)  $\alpha$ 鎖欠損マウスの炎症性腸疾患における $\gamma\delta$ -T細胞の役割. 第34回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004. 12. 1-3
11. 茂呂和世、森美穂、廣田真衣、石川博通: 腸管上皮間 $\gamma\delta$ T細胞( $\gamma\delta$ -IEL)の胸腺外発達分化機構の追究. 第34回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004. 12. 1-3
12. Neelanjan R, Sano G, Ishikawa H, Matsuo K: c-Fos suppresses systemic inflammatory response to endotoxin. 第34回日本免疫学会総会・学術集会, 札幌, 2004. 12. 1-3
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
特になし

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

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨：大腸粘膜固有層に局在するマクロファージの機能を解析した。この細胞は、脾臓など他の組織由来のマクロファージと異なり、TLR リガンドに応答しない。しかし、慢性大腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウス由来の細胞は TLR リガンドに反応した。このメカニズムを解析するため、DNA microarray により両細胞間での遺伝子発現の差を解析した。その結果、正常の大腸粘膜固有層に局在する細胞特異的遺伝子として IkbNS を同定した。IkbNS をマクロファージ系細胞に発現させると、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に阻害された。RNAi によるノックダウンでは、逆に IL-6 産生が特異的に上昇した。これらの結果から、IkbNS は大腸粘膜に局在する自然免疫系の細胞において IL-6 産生と選択的に阻害していることが明らかになった。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、現在その病因・病態が明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない難治性の疾患である。マクロファージの活性を負に制御することが知られているサイトカイン IL-10 の遺伝子欠損マウスが慢性腸炎を発症することから、このマウスはヒトの慢性炎症性腸疾患のモデル動物としてよく利用され、病態の詳細な解析が行われてきた。また、種々の薬剤による腸炎誘導モデルにおける IL-10 の作用が、IL-10 の発現上昇や、抗 IL-10 抗体によるブロック実験などにより解析され、また、IL-10 遺伝子の発現誘導による慢性腸炎の治療効果も実験動物で確かめられてきた。このように、IL-10 が慢性腸炎の発症を抑制することは明らかになっている。しかし、IL-10 がいかなる分子機構で生体において慢性腸炎を抑制するかは全く理解されていない。慢性炎症性腸疾患は、現代増加の一途をたどる疾患のひとつで、その病因・病態の解明、さらにその治療法の確立が待ち望まれている。

申請者は、マクロファージにおいて IL-10 のシグナル伝達に Stat3 が必須であることを見出し、Stat3 をマクロファージ特異的に欠損させると、マクロファージが異常に活性化され、IL-10 欠損マウスと同様の慢性腸炎を発症することを見出した。このことは、生体における慢性炎症性腸疾患の発症には、マクロファージの異常活性化が直接関与しており、IL-10 が生体で炎症抑制に働く主要な標的細胞はマクロファージであることを示している。これらの事実から、IL-10 および自然免

疫系に属するマクロファージ系細胞の活性調節機構に標的をしぼることにより、慢性炎症性腸疾患の発症機序を解明できるものと考えている

そこで、生体で慢性炎症性腸疾患の誘因となるマクロファージをはじめとする自然免疫系の細胞の活性がいかなる分子機構で制御されているかを明らかにしていくことを目的とする。この分子機構を解明することにより、自然免疫系細胞の活性抑制機構からみた慢性炎症性腸疾患の病因の解明をめざす。この成果は、自然免疫系の細胞の機能制御を可能にするばかりでなく、クローン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患の病因・病態の解明、さらには画期的な治療対策の考案にも役立つことが期待される。

B. 研究方法

正常マウスの大腸の粘膜固有層には少数のマクロファージや樹状細胞が存在している。これらの細胞を大腸組織より単離することは極めて困難であって、これらの細胞の機能解析ができなかった。われわれは、この細胞群の単離法を確立し、高純度のマクロファージや樹状細胞を培養できるようになった。正常マウスの大腸の粘膜固有層由来の細胞は、IL-12 などの炎症性サイトカインを産生しない。一方、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや Stat3 変異マウスの大腸の粘膜固有層では、たとえ慢性腸炎を発症する前の若いマウスでも、マクロファージや樹状細胞の数が極めて増加しており、さらにこれらの細胞は IL-12 などの炎症性サイトカインを産生することを明らかにした。この結果は、正常マウス大腸の粘膜固有層に存在するマクロファージや樹状

細胞は、何らかの分子機構により不応答性になっていて過剰な炎症反応を抑制していることを示唆している。そこで、この分子機構を正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの細胞間で遺伝子発現の差を DNA microarray で解析する。そして得られた候補遺伝子をマクロファージに導入し、サイトカイン産生の変化を解析する。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

### C. 研究結果

これまでに STAT3 をマクロファージで特異的に欠失させたマウスを作製し、STAT3 がマクロファージでの IL-10 シグナルに必須であり、マクロファージの機能抑制、さらには生体レベルで慢性炎症の抑制に必須であることを明らかにした。そして、病原体構成成分を認識する Toll-like receptor (TLR) ファミリーが、STAT3 非存在下でマクロファージの異常活性化による慢性腸炎の発症のトリガーとなることを、TLR4/STAT3 二重変異マウスの解析により明らかにした。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- $\alpha$  産生を特異的に抑制していることを明らかにした。今年度は、大腸粘膜固有層に存在するマクロファージの機能を解析した。その結果、正常マウスの大腸粘膜固有層マクロファージは、TLR 刺激依存性の炎症性サイトカインの産生が認められないが、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや STAT3 変異マウス由来の細胞は TLR 刺激依存性に炎症性サイトカインを産生した。そこで正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの大腸粘膜固有層マクロファージ間で TLR 応答性が異なる分子機構を解析するため、両者間で遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイで解析した。その結果、Bcl-3 と同じ I $\kappa$ B ファミリーに属する I $\kappa$ BNS が Bcl-3 とともに正常大腸粘膜固有層マクロファージに特異的に発現していることを見出した。I $\kappa$ BNS をマクロファージに発現させると、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に減少していた。さらに I $\kappa$ BNS を発現した細胞では、NF- $\kappa$ B の DNA 結合能に障害が認められた。さらに、I $\kappa$ BNS は IL-6 プロモーターに p50 NF- $\kappa$ B サブユニットと共に恒常的に会合していることがクロマチン免疫沈降法の解析から明らかになった。さらに、RNAi による I $\kappa$ BNS のノックダ

ウンマクロファージでは、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に増加していた。

### D. 考察

以上の結果から、正常大腸粘膜固有層マクロファージに恒常的に発現している I $\kappa$ BNS がマクロファージ系細胞において、IL-6 産生の抑制に特異的に関与していることが明らかになった。Bcl-3 も大腸粘膜固有層マクロファージに恒常的に発現していることから、この細胞では、I $\kappa$ BNS, Bcl-3 の核に発現する I $\kappa$ B ファミリー分子が、TLR 応答性をそれぞれ負に制御していることが明らかになった。

### E. 結論

大腸の粘膜固有層に局在する自然免疫系細胞は、TLR 刺激に応答しない。そしてその不応答機構の破綻が慢性炎症性腸疾患の発症のトリガーとなりうる。正常では、核に発現する I $\kappa$ B ファミリー分子 Bcl-3, I $\kappa$ BNS がそれぞれ特異的に TLR 刺激依存性のサイトカイン産生を負に制御し、過剰な炎症の誘導を抑制している。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Hokuto, I, Ikegami, M, Yoshida, M, Takeda, K, Akira, S, Perl, A. T, Hull, W. M, Whitsett, J. A: Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J Clin Invest.* 113: 28-37, 2004.
2. Into, T, Kiura, K, Yasuda, M, Kataoka, H, Inoue, N, Hasebe, A, Takeda, K, Akira, S, Shibata, K: Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- $\kappa$ B activation. *Cell Microbiol.* 6: 187-199, 2004.
3. Akazawa, T, Masuda, H, Saeki, Y, Matsumoto, M, Takeda, K, Tsujimura, K, Kuzushima, K, Takahashi, T, Azuma, I, Akira, S, Toyoshima, K, Seya, T: Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64: 757-764, 2004.
4. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinius C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee

- J, Takabayashi K, Raz E: Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*. 126: 520-528, 2004.
5. Inoue H, Ogawa W, Ozaki M, Haga S, Matsumoto M, Hashimoto N, Kido Y, Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Hiramatsu R, Leroith D, Takeda K, Akira S, Kasuga M: Role of Stat3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat Med*. 10: 168-174, 2004.
  6. Liu B, Mori I, Hossain M. J, Dong L, Takeda K, Kimura Y: Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Gen Virol*. 85: 423-428, 2004.
  7. Robben P. M, Mordue D. G, Truscott S. M, Takeda K, Akira S, Sibley L. D: Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol*. 172: 3686-3694, 2004.
  8. Yukawa K, Hoshino K, Kishino M, Mune M, Shirasawa N, Kimura A, Tsubota Y, Owada-Makabe K, Tanaka T, Ichinose M, Maeda M, Takeda K, Akira S: Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy. *Int J Mol Med*. 13: 515-520, 2004.
  9. Weiss D. S, Raupach B, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A: Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J Immunol*. 172: 4463-4469, 2004.
  10. Li Y, Ishii K, Hisaeda H, Hamano S, Zhang M, Nakanishi K, Yoshimoto T, Hemmi H, Takeda K, Akira S, Iwakura Y, Himeno K: IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in Leishmania major-infected BALB/c mice is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther*. 11: 941-948, 2004.
  11. Ikushima H, Nishida T, Takeda K, Ito T, Yasuda T, Yano M, Akira S, Matsuda H: Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is down-regulated after operation. *Surgery*. 135: 376-385, 2004.
  12. Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Miyagi K, Kinjo T, Yara S, Koguchi Y, Miyazato A, Shibuya K, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Saito A: Interferon-g production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes Infect*. 6: 339-349, 2004.
  13. Gorogawa S, Fujitani Y, Kaneto H, Hazama Y, Watada H, Miyamoto Y, Takeda K, Akira S, Magnuson M. A, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Hori M: Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 319: 1159-1170, 2004.
  14. Hemmi H, Takeuchi O, Sato S, Yamamoto M, Kaisho T, Sanjo H, Kawai T, Hoshino K, Takeda K, Akira S: The roles of two I $\kappa$ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med*. 199: 1641-1650, 2004.
  15. Kishino M, Yukawa K, Hoshino K, Kimura A, Shirasawa N, Otani H, Tanaka T, Owada-Makabe K, Tsubota Y, Maeda M, Ichinose M, Takeda K, Akira S, Mune M: Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 15: 1826-1834, 2004.
  16. Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Kuwata H, Yamamoto S, Takeuchi O, Takeshige K, Saito T, Yamaoka S, Yamamoto N, Muta T, Takeda K, Akira S: Regulation of Toll/IL-1 receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ Bz. *Nature*. 430: 218-222, 2004.
  17. Okamoto M, Furuichi S, Nishioka Y, Oshikawa T, Tano T, Ahmed S. U, Takeda K, Akira S, Ryoma Y, Moriya Y, Saito M, Sone S, Sato M: Expression of Toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a Streptococcal preparation. *Cancer Res*. 64: 5461-5470, 2004.
  18. Yang R, Murillo F. M, Lin K. -Y, Yutzy IV W. H, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Viscidi R. P, Roden R. B. S: Human papillomavirus type-16 virus-like particles activate complementary defense responses in key dendritic cell subpopulations. *J Immunol*. 173: 2624-2631, 2004.

19. Sato N, Takahashi N, Suda K, Nakamura M, Yamaki M, Ninomiya T, Kobayashi Y, Takada H, Shibata K, Yamamoto M, Takeda K, Akira S, Noguchi T, Udagawa N: MyD88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1 $\alpha$ . *J Exp Med*. 200: 601-611, 2004.
20. Nakasone C, Kawakami K, Hoshino T, Kawase Y, Yokota K, Yoshino K, Takeda K, Akira S, Saito A: Limited role for interleukin-18 in the host protection response against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect Immun*. 72: 6176-6180, 2004.
21. Yang R, Murillo F. M, Cui H, Blosser R, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Viscidi R. P, Roden R. B: Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J Virol*. 78: 1152-1160, 2004.
22. Vossenkämper A, Went T, Alvarado-Esquivel C, Takeda K, Akira S, Pfeffer K, Alber G, Lochner M, Förster I, Liesenfeld O: Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur J Immunol*. 34: 3197-3207, 2004.
23. Yokozeki H, Wu M. H, Sumi K, Awad S, Satoh T, Katayama I, Takeda K, Akira S, Kaneda Y, Nishioka K: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther*. 11: 1753-1762, 2004.
24. Sumi K, Yokozeki H, Wu M. H, Satoh T, Kaneda Y, Takeda K, Akira S, Nishioka K: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther*. 11: 1763-1771, 2004.
25. Yukawa K, Kishino M, Hoshino K, Shirasawa N, Kimura A, Tsubota Y, Owada-Makabe K, Bai T, Tanaka T, Ueyama T, Ichinose M, Takeda K, Akira S, Maeda M: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int J Mol Med*. 15: 73-78, 2005.
26. Yamamoto M, Takeda K, Akira S: TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol*. 40: 861-868, 2004.
27. Takeda K, Akira S: TLR signaling pathway. *Seminar Immunol*. 16: 3-9, 2004.
28. Takeda K, Akira S: Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci*. 34: 73-82, 2004.
29. Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*. 4, 499-511, 2004.
30. Takeda K, Akira S: Toll-like receptors: ligands and signaling. *Innate Immune Response to Infection*. 257-270, 2004.
31. Takeda K, Akira S: Biological roles of the STAT family in cytokine signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 166: 97-121, 2004.
32. Akira S, Takeda K: Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice. *CR Biol*. 327: 581-589, 2004.
33. Takeda K, Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 17: 1-14, 2005.
2. 学会発表
1. Takeda K: Regulation of chronic intestinal inflammation by innate immune cells. 13<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 大阪, 2004. 7. 2
2. Takeda K: Innate immune recognition by Toll-like receptors. Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 1<sup>st</sup> Meeting 「Innate Immunity at Mucosal Surface」, 東京, 2004. 7. 9-10
3. Takeda K: Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors. The 3<sup>rd</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, 兵庫, 2004. 8. 29-9. 2
4. Takeda K: Toll-like receptors for mucosal immunity. 2004 KOSEF-JSPS Asian Science Seminar, Development of Mucosal Vaccines, Seoul, Korea, 2004. 10. 24-27,
5. Takeda K: Regulation of innate immunity by Toll-like receptors. International

Mini-Symposium : Advanced Research on Innate Immunity, 熊本, 2004.11.12

6. Takeda K: Evolution and integration of innate immune recognition systems: The Toll-like receptors. The 8<sup>th</sup> conference of the International Endotoxin Society, 京都, 2004.11.15-18
7. Takeda K: Involvement of Toll-like receptor-mediated activation of innate immunity in mycobacterial infection. 40<sup>th</sup> anniversary of Japan-US, Program for Tuberculosis and Leprosy panel, 京都, 2004.12.9
8. 竹田 潔: Toll-like receptor による自然免疫応答の制御 第2回九州大学生体防御医学研究所・東京大学医科学研究所. 「感染・免疫・ゲノム」合同シンポジウム, 東京, 2004.7.6
9. 山本雅裕、竹田 潔、審良静男: Toll-like receptor を介した細胞内シグナル伝達機構と遺伝子発現制御. 第25回日本炎症・再生医学会, 当東京, 2004.7.13
10. 竹田 潔: Toll-like receptor による自然免疫系の活性化機構. 第17回日本バイオセラピー学会学術集会総会, 北九州, 2004.11.25
11. 竹田 潔: 遺伝子改変による免疫系シグナル伝達機構の解析. 第34回日本免疫学会学術集会, 札幌, 2004.12.1-3

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
特になし

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

分担研究者 中村和彦 九州大学大学院病態制御内科 助手

研究要旨：D4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞は広範な免疫抑制作用を持ち、炎症性腸疾患や自己免疫疾患などの種々の疾患への治療への応用が期待される。血球成分除去療法は活動期潰瘍性大腸炎の緩解導入に用いられ効果をあげているが、大腸炎を誘導する細胞に加えて制御性 T 細胞も同時に除去していると考えられる。我々は、遠心分離法による血球成分除去療法時に得ら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」が、血球成分除去療法の治療効果を促進するのではないかと考え、施行可能か検討した。

ヒト末梢血における制御性 T 細胞分画を CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>分画に存在すると考え、健常人パフィーコートより同分画を磁気細胞分離システムを用いて分離した。目的の細胞分画は高純度に分離可能であり、機能解析および特異的転写因子発現より制御性 T 細胞であることが確認された。

炎症性腸疾患患者末梢血中の CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞の割合を解析した。活動期潰瘍性大腸炎では制御性 T 細胞の割合が健常人対照や非活動期潰瘍性大腸炎に比べて有意に低下していたが、活動期クローン病ではむしろ高い傾向にあった。潰瘍性大腸炎においては疾患活動性および内視鏡的スコアと逆相関を認めた。

以上より、遠心分離法による血球成分除去療法との組み合わせで「制御性 T 細胞移入療法」は施行可能であり、また、潰瘍性大腸炎では活動期において末梢血制御性 T 細胞が低下していることより、「制御性 T 細胞移入療法」は血球成分除去療法の効果をより高める事が期待される。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法時に除去された白血球より制御性 T 細胞を分離し体内へ移入する「制御性 T 細胞移入療法」の開発が可能かを検討する。

B. 研究方法

(1) 健常人パフィーコートより磁気細胞分離システム(Magnetic Cell Sorting: MACS, Miltenyi Biotec社)を用いて、ネガティブセレクションにより CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離、更に CD45RA ビーズによるネガティブセレクション、CD25 ビーズによるポジティブセレクションを行い、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>分画(CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>分画とほぼ同じと考えられる)を分離し、目的とする分画の割合、T 細胞増殖抑制機能、制御性 T 細胞特異的転写因子 FoxP3 の発現を RT-PCR 法で解析した。

(2) 炎症性腸疾患患者(潰瘍性大腸炎、クローン病)および健常人末梢血白血球を CD4、CD45RO、CD25 に対する蛍光標識抗体で染色しフローサイトメトリーにて解析した。

(倫理面への配慮)

患者からの検体採取にあたっては、研究内容を説明し文書での同意を得ている。

C. 研究結果

(1)磁気ビーズを用いて分離された CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>分画の約 90%が CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>であった。この細胞分画は、抗 CD3 抗体による刺激に対して低反応で、CD4<sup>+</sup> T 細胞との共培養にて容量依存的に T 細胞増殖を抑制した。CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>分画は、FoxP3 を強発現していたが、CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>、CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>分画には FoxP3 の発現を認めなかった。

(2) 末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞中 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞の割合は活動期潰瘍性大腸炎患者(n=17)で 1.3 ± 0.2%と健常人対照(n=10) 2.9 ± 0.4%、非活動期潰瘍性大腸炎患者(n=10) 2.3 ± 0.3%に比べて有意に低下していた。対照的に、活動期クローン病患者(n=8)においては 4.4 ± 0.7%と、健常人対照、非活動期クローン病(n=19)3.1 ± 0.3%に比べて高い傾向にあった。また、制御性 T 細胞の割合は、活動期潰瘍性大腸炎患者(n=12)において治療前(1.0 ± 0.2%)に比較して治療後(2.3 ± 0.3%)に有意に増加し、また、Rachmilewitz の Clinical Activity Index と Endoscopic Index に対して中等度の負の相関を示した。

#### D. 考察

ヒト末梢血中の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞はマウスと異なり CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>の全分画に存在するのではないとされる。その同定方法として現在、最も利用されているのが、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 強陽性分画を制御性 T 細胞とする方法である。しかしながら、その分離には蛍光標識抗体で染色しフローサイトメトリーで CD25 強陽性分画を分離する必要がある、この様にして得られた細胞は体内に移入する目的には適さない。そのため制御性 T 細胞移入療法には、他の同定・分離方法が必要であった。これまでに少数ではあるが制御性 T 細胞は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞中 CD45RO<sup>+</sup>分画に存在するとの報告があり検討した所、CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞は T 細胞増殖抑制能を有し FoxP3 を特異的に発現している事より、この細胞分画を制御性 T 細胞とする事は適当であると考えられた。この同定方法と CD45RO と CD45RA が相補的な発現様式をとることを利用する事により、制御性 T 細胞が磁気細胞分離システムを用いて高い純度で分離が可能であった。今回利用した MACS ビーズによる細胞分離は、骨髄幹細胞移植における CD34 陽性細胞の分離に用いられ、既に欧米では臨床応用されている。今回用いた磁気ビーズの中、CD25 に対するビーズは臨床での使用が可能なグレードの試薬が生産されている。その他の磁気ビーズは臨床使用が可能なグレードのものは作られておらず、今後の課題であるが、遠心分離法にて分離された白血球より制御性 T 細胞を、臨床応用可能な形で高純度に分離する事が理論的には可能であると考えられる。

#### E. 結論

遠心分離法による血球成分除去療法時に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」は施行可能であり、また、潰瘍性大腸炎では活動期において末梢血制御性 T 細胞が低下していることより、「制御性 T 細胞移入療法」は血球成分除去療法の効果をより高める事が期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) 高橋 誠、中村和彦、北村陽介、本田邦臣、吉永

繁高、松井謙明、原田直彦、荒木 諒、壁村哲平、名和田 新：炎症性腸疾患における末梢血制御性 T 細胞の役割の検討。第 46 回日本消化器病学会大会，福岡，2004. 10. 22

2) Takahashi M, Nakamura K, Kitamura Y, Mizutani T, Honda K, Akiho H, Araki Y, Harada N, Kabemura T, Chijiwa Y, Nawata H: Reduction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in peripheral blood of patients with ulcerative colitis. Science and Research Symposium, Nagoya, 2004. 11. 11

3) 高橋 誠、中村和彦、北村陽介、本田邦臣、吉永繁高、松井謙明、秋穂裕唯、荒木 諒、原田直彦、壁村哲平、千々岩芳春、名和田 新：炎症性腸疾患における末梢血制御性 T 細胞の割合の検討。第 2 回北部九州リサーチカンファレンス，福岡，2005. 1. 8

#### 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



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効性に関する研究

分担研究者 岡崎和一 関西医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨：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デキサメサゾン封入マイクロカプセルを作成した。経口投与による有用性と安全性に関してそれぞれ動物腸炎モデルを用いて確認した。潰瘍性大腸炎患者を対象に、共同研究施設における病院内・学内倫理委員会の承認を得て、今後臨床応用にむけて患者登録準備中である。

共同研究者

川股聖二、松下光伸

関西医科大学内科学第三講座

斎藤一文字 関西医科大学薬剤部

西尾彰功、仲瀬裕志、千葉 勉

京都大学消化器内科

乾 賢一 京都大学薬剤部

田畑泰彦 京都大学再生医学研究所

A. 研究目的

高分子バイオマテリアルであるポリ-L-D 乳酸(PDLLA)マイクロカプセルを用いたデキサメサゾン封入マイクロカプセルによる新しい炎症性腸疾患の治療法を開発した。また、臨床応用の前段階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検討してきた。本研究では、ヒト潰瘍性大腸炎患者を対象にその有用性について検討する。

B. 研究方法

1) デキサメサゾン封入ポリ-L-D 乳酸(PDLLA)マイクロカプセル(Dx-MC)の作成：直径4 $\mu$ のPDLLAマイクロスフェアを京都大学再生医学研究所と薬剤部で作成したのち、double emulsion法にてデキサメサゾンをマイクロカプセル内に封入する。経口腸溶カプセルは関西医科大学薬剤部で作成する。

2) ラットを用いた長期毒性実験

ラット50匹を用いて上記デキサメサゾンマイクロカプセル(Dx-MC)を用いた8週の長期毒性実験を施行する。投与群は臨床投与予定量であるDx-MS 10mg/kg/day(含有デキサメサゾン0.1mg/kg/day)の10倍量のDx-MC100mg/kg/day(含有デキサメサゾン1mg/kg)と100倍量のDx-MC 1000mg/kg/day(含有デキサメサゾン10mg/kg/day)相当量を隔日経口投与した。また蒸留水投与群とデキサメサゾンを含まないマイクロカプ

セル1000mg/kg/day投与群をコントロール群とした。1週間ごとに血中デキサメサゾンの薬物代謝、血球数、生化学検査(TP, 血糖, GOT, GPT,  $\gamma$ -GTP, LDH, ALP, BUN, Cr, CRP), 電解質、尿を検査すると共に、脳下垂体、甲状腺、副腎などの内分泌腺臓器、全消化管、肝、胆、膵、生殖器を病理組織学的に検討する。

3) 潰瘍性大腸炎患者における有用性に関する検討

①対象：中等・重症の活動期潰瘍性大腸炎患者(全結腸・左側結腸型)20例を目標とし、以下の条件を満たした患者を対象とする。

- ・ステロイド依存性(PSL:10~25mg/day)、
- ・難治性の中等症、重症の活動期患者、
- ・相対的手術適応
- ・説明文と同意書による同意取得

②方法

- ・同意の得られた左側型または全結腸型患者(n=10)に対し腸溶カプセルに封入したDEX-MCを1mg/kg(10mg/1mg Dex-MC)を4週間隔日経口投与。
- ・同意の得られた左側型患者(n=10)に対しDEX-MC1mg/kgを4週間隔日注腸投与。
- ・評価項目(前、2週、4週)
  - ・臨床症状(厚生労働省重症度、ほか)
  - ・血液・生化学、尿
  - ・大腸内視鏡検査(4週のみ)
  - ・組織中Dex濃度測定(HPLC)

(倫理面への配慮)

①動物毒性実験：

長期毒性実験を委託した株式会社イナリサーチの動物実験に関する社内倫理規定に準じた。

②臨床試験：参加施設のそれぞれの臨床研究に関する倫理委員会に申請し、その審査を経て承認されている。

・関西医科大学附属病院臨床研究承認番号

C. 動物の長期毒性試験結果

1) 一般状態

いずれの群の動物にも異常は認められなかった。

2) 体重

投与 4 日目以降において MC 1000mg/kg, Dx-MC1000mg/kg, 1000mg/kg 群において体重の増加の抑制傾向が認められた。

3) 尿検査では特記すべき異常を認めなかった。

4) 血液学的検査、血液生化学的検査 蒸留水投与群と比較して、MC の 1000mg/kg, Dx-MC 100, 1000mg/kg 投与群で中性脂肪の有意な低下が認められた。また、Dx-MC1000mg/kg 投与群で GPT 活性の有意な高値が認められたが、正常範囲内での変動であった。

5) 剖検、器官重量および病理組織学的検査において、Dx-MC の影響は認められなかった

6) デキサメサゾンの血中濃度測定ではいずれの動物にも検出されなかった。

D. 考察

近年、難病である潰瘍性大腸炎(UC)やクローン病(CD)などの炎症性腸疾患は増加の一途にある。その病因は不明であるものの、消化管粘膜免疫異常が病態に深く関わっていることが明らかにされ、治療においてはステロイドなどの有効性が認められている。しかしながら、若年者に好発すること、またその多くは長期投与を余儀なくされる為、ステロイド全身に及ぼす副作用が临床上大きな問題となることも多い。従って、薬剤の選択的効果に加え、副作用を抑制することは临床上極めて重要であり、新たな製剤・投与法の開発が強く望まれている。以上を背景にわれわれ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、経口投与による粘膜免疫の選択的制御の有用性をマウス腸炎モデルを用いてその有用性を報告した。本研究では、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できた。今後、臨床応用に向け計画中である。

E. 結論

1) 体重増加の抑制および血清中性脂肪の軽度低下が見られたが、Microsphere 自体による影響と考えられた。デキサメサゾンマイクロカプセル(Dx-MC)の無毒性量は 1000mg/kg/day を超える量と判断された。Dexamethasone の血中への移行は

認められなかった。

2) Dx-MC の臨床投与量の長期投与は安全と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, Furukawa F, Tahashi Y, Yamagata H, Sekimoto G, Seki T, Matsui H, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K. TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions Oncogene. 23(44):7416-29, 2004.

2. Fukui T, Okazaki K, Tamaki H, Kawasaki K, Matsuura M, Asada M, Nishi T, Uchida K, Iwano M, Ohana M, Hiai H, Chiba T. Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by Helicobacter pylori infection in neonatally thymectomized mice. Lab Invest. 84(4):485-92, 2004.

2. 学会発表

1. Nakase H, Okazaki K, Chiba T: Novel specific antibodies against insertion element 900 of mycobacterium paratuberculosis in Japan patients with Crohn's disease. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 16

2. Matsuura M, Nishio A, Kawanami C, Nakase H, Tamai H, Asada M, Kawasaki K, Fukui T, Yoshizawa H, Ohashi S, Inoue S, Kiriya K, Kitamura H, Okazaki K: Clinical significance of magnifying endoscopy in the remission stage of ulcerative colitis. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 16

3. Fukui T, Nishio A, Kitamura H, Inoue S, Kiriya K, Ohashi S, Yoshizawa H, Asada M, Matsuura M, Kawasaki K, Tamai H, Nakase H, Okazaki K, Chiba T: Gastric mucosal hyperplasia via upregulation of gastrin induced by chronic activation of gastric innate immunity. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004. 5. 19

4. 松下光伸、高鍛 博、岡崎和一: 潰瘍性大腸炎における虫垂粘膜リンパ球サブセットの解析 第41回日本消化器免疫学会総会, 大津, 2004. 7. 15

5. 玉置敬之、中村 肇、西尾彰効、岡崎和一、千葉勉、淀井淳司: Thioredoxin-1(TRX)投与は炎症性

腸疾患の分子標的治療の一つになりうるか第 41  
回日本消化器免疫学会総会, 大津, 2004. 7. 16

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1 特許取得  
    番号 2000-143538
- 2 実用新案登録  
    なし
- 3 その他  
    特になし

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

分担研究者 日比紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎は粘膜局所には陰窩膿瘍などの好中球の浸潤を認め、腸管粘膜炎症の機序に好中球が深く関与していると考えられている。そこで我々は細胞外基質蛋白の分解酵素であり、組織傷害において重要な働きをすると推定されている好中球エラスターゼに着目した。本研究において潰瘍性大腸炎患者の血漿および炎症局所にて好中球エラスターゼ活性が上昇していることを示した。また、Dextran sulfate sodium (DSS) 誘発腸炎モデルにおいても同様に好中球エラスターゼ酵素活性が上昇していることが明らかとなった。好中球エラスターゼ阻害剤である Sivelestat の投与により、DSS 誘発腸炎が有意に抑制された。これらの結果により、潰瘍性大腸炎に対する好中球エラスターゼを標的とした新規治療の可能性が示唆された。

共同研究者

諸星雄一、松岡克善、久松理一、岡本 晋<sup>1</sup>、

高石官均、井上 詠<sup>2</sup>、日比紀文<sup>1,2</sup>

慶應義塾大学消化器内科<sup>1</sup>

同 包括先進医療センター<sup>2</sup>

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎は粘膜局所に陰窩膿瘍などの好中球の浸潤を認め、腸管粘膜炎症の機序に好中球が深く関与していると考えられている。我々は既存の抗サイトカイン療法や、T細胞を抑制する免疫抑制剤療法とは視点をかえて、effector細胞である好中球の機能を抑制することで新たな治療法が開発できないかと考えた。そこで我々は細胞外基質蛋白の分解酵素であり、組織傷害において重要な働きをすると推定されている好中球エラスターゼに着目し、本邦で開発された好中球エラスターゼ阻害剤である Sivelestat（商品名エラスポール）に注目した。Sivelestat は本邦で開発され薬剤であり、好中球エラスターゼに非常に特異の高い阻害剤である。また、Sivelestat は、Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) に伴う急性肺障害に対してすでに保険適応されている薬剤である。本研究の最終的な目標は、Sivelestat の潰瘍性大腸炎急性期に対する臨床応用である。そのための基礎データの蓄積を目的として、1) 好中球エラスターゼの潰瘍性大腸炎の病態に対する役割、2) 実験腸炎モデルにおける Sivelestat の治療効果、の2点を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 潰瘍性大腸炎患者の血漿および炎症局所の好中球エラスターゼ活性

Clinical Activity Index (CAI) 8点以上の活動性潰瘍性大腸炎患者より血液および生検下に大腸粘膜を採取した。得られたサンプルに特異的な基質である N-methoxysuccinyl -Ala-Ala-Pro-Val-p-nitroanilide を用いて酵素基質反応を行い、分解産物である p-nitroaniline (pNA) の濃度を吸光度計で測定することで好中球エラスターゼ酵素活性を、測定した。

2) 動物実験腸炎モデルマウスにおける好中球エラスターゼ酵素活性

本研究では腸炎モデルとして、Dextran sulfate sodium (DSS) 誘発腸炎マウスを用いた。1.5%DSS を5日間自由飲水させ腸炎を惹起した。それぞれの病期における血漿と便中の好中球エラスターゼ活性を測定した。

3) DSS 誘発腸炎における好中球エラスターゼ阻害剤の治療効果

1.5%DSS 誘発腸炎マウスにおいて、Sivelestat を実験前日より 100mg/day 連続投与を行った。体重減少や下血などの臨床症状や病理組織学的所見から腸炎の重症度を評価し治療効果を判定した。また、各腸炎マウスの血漿や大腸粘膜炎症部位の好中球エラスターゼ活性を測定し、治療効果との相関を検討した。

C. 研究結果および考察

1) 潰瘍性大腸炎患者の血漿および炎症局所好中球エラスターゼ活性

図 1A に生検下大腸粘膜をホモジネートして局所