

## IL18 遺伝子プロモーター領域多型と炎症性腸疾患との相関

研究協力者 田村 和朗 兵庫医科大学先端医学研究所家族性腫瘍部門 助教授

研究要旨：IL18 遺伝子のプロモーター領域の多型と炎症性腸疾患およびその病態との関連を検討した。Interleukin-18 遺伝子 (11q22.2-q22.3) のプロモーター領域の多型 (-607C/A, -137G/C) および 3 種類のハプロタイプと炎症性腸疾患の関連を検討した (潰瘍性大腸炎患者 205 例、クローン病患者 210 例、健常対照者 212 名)。-607A アレルは有意に潰瘍性大腸炎 (UC) 患者群に多く ( $P_c=0.04^*$ )、さらに直腸炎型の UC 患者は-137C を有意に高頻度に保有していた ( $P_c=0.0068^*$ )。ハプロタイプ 2 (-60A, -137C) は直腸炎型 UC に ( $P_c=0.01^*$ ,  $OR=2.65$ ,  $95\%CI=1.32-5.32$ , Fig. 1)、ハプロタイプ 3 (-60A, -137G) は全大腸炎型 UC に相関する ( $P_c=0.05$ ,  $OR=1.97$ ,  $95\%CI=1.08-3.59$ ) ことが明らかとなった。したがって、IL-18 遺伝子プロモーター領域多型は UC の易罹患性やその病変範囲に関連する結果を得た (\*:Bonferroni correction)。

### 共同研究者

高川哲也<sup>1)</sup> 福田能啓<sup>1)</sup> 松本誉之<sup>1)</sup>  
池内浩基<sup>2)</sup> 山村武平<sup>2)</sup>

### 所属

兵庫医科大学下部消化管内科学講座<sup>1)</sup>  
兵庫医科大学外科学第 2 講座<sup>2)</sup>

### A. 研究目的

難治性の炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease:IBD) には潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis:UC) とクローン病 (Cohn's disease:CD) が知られ、その病態解明と根治的治療の開発が切望されているが、未だ原因不明である<sup>1)</sup>。遺伝的要因として個体に備わった易罹患性と生下後の無数の環境要因が加わり、それらの相互作用の結果によって発症することが考えられている。UC と CD は腸管局所の免疫異常により発症し、慢性化した疾患と考えられ、遺伝的要因と環境要因による多因子病の一つとして認識されている。

IL-18 は  $IFN-\gamma$  を強力に誘導し、また Th2 サイトカインも制御する多様な働きを持つサイトカインである<sup>2)</sup>。炎症性腸疾患 (IBD) における IL-18 の働きはまだ不明な点が多いが、近年クローン病 (CD) において病変部粘膜で IL-18 が増加し<sup>3-5)</sup>、IL-12 と共に働き  $IFN-\gamma$  の誘導、Th1 優位の病態形成に重要であり<sup>6)</sup>、また潰瘍性大腸炎 (UC) においても血清 IL-18 値と重症度が相関するとの報告がなされている<sup>7)</sup>。以前、IL18 遺伝子のエキソン内に存在する多型と CD との相関を報告した<sup>8)</sup>。今回の研究目的は IL-18 産生の制御に関わる IL18 遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型

と UC、CD 患者およびその病態との相関を明らかにすることである。

### B. 研究方法

潰瘍性大腸炎患者 205 例、クローン病患者 210 例の病態調査を行うとともに、インフォームドコンセントを得た上で、末梢血から DNA 抽出を行った。健康成人を対照群 (212 名) とし、同様に核酸試料を抽出し、遺伝子多型解析に供した。

IL18 遺伝子の 3 種類のハプロタイプ (-607C/A, -137G/C) 解析は DNA シークエンス法によった。対立遺伝子およびハプロタイプの頻度を基に  $\chi^2$  検定を行い、Bonferroni correction を使用し、 $P_c=P \times 2$  で補正を行った。 $P_c < 0.05$  を有意差ありと評価した。オッズ比、95%信頼区間においては Mantel-Haenszel method を用いた。

(倫理面への配慮)

研究計画書、説明書、意思確認書等とともに兵庫医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する専門小委員会に申請し、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(平成 13 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に沿って審査を経た後、同大学倫理委員会で最終的な承認を得た。研究の内容や方法等を十分説明した後、研究協力依頼をする。個人の自由意思を尊重し、「意思確認書」に書面で意思を記載してもらい同意を得られた場合は、試料採取等を行った。試料や臨床情報は個人情報分担管理者のもと、連結可能匿名化し個人情報保護に努める。解析はネットワークから遮断されたコンピューターを用いた。

### C. 研究結果

IL-18 遺伝子プロモーター領域-607A の頻度は UC 患者で有意に高く ( $P=0.024$ ,  $P_c=0.048$ ,  $OR=1.38$ ,  $95\%CI=1.04-1.83$ )<sup>9)</sup>. また-137C の頻度は UC 直腸炎型の患者で有意に高かった ( $P=0.0034$ ,  $P_c=0.0068$ ,  $OR=2.39$ ,  $95\%CI=1.32-4.33$ , Table 1)<sup>9)</sup>. -607C/A, -137G/C 多型を基に 3 種類のハプロタイプに分類されることがすでに報告されている<sup>10)</sup>. その中で最も低いプロモーター活性をもつと報告されているハプロタイプ 2 (-607A, -137C) のキャリアーは、健常対照群に比べ UC 直腸炎型の患者で有意に高かった ( $P=0.0051$ ,  $P_c=0.01$ ,  $OR=2.65$ ,  $95\%CI=1.32-5.32$ , Fig 1)<sup>9)</sup>. さらに、ハプロタイプ 2 より優位に高いプロモーター活性をもつと報告されているハプロタイプ 3 (-607A, -137G) のキャリアーは、健常対照群に比べ UC 全大腸炎型の患者で多い傾向にあった ( $P=0.025$ ,  $P_c=NS$ ,  $OR=1.97$ ,  $95\%CI=1.08-3.59$ )<sup>9)</sup>. CD においては Vienna 分類に基づいて階層化し、詳細に検討したが、有意差は得られなかった。

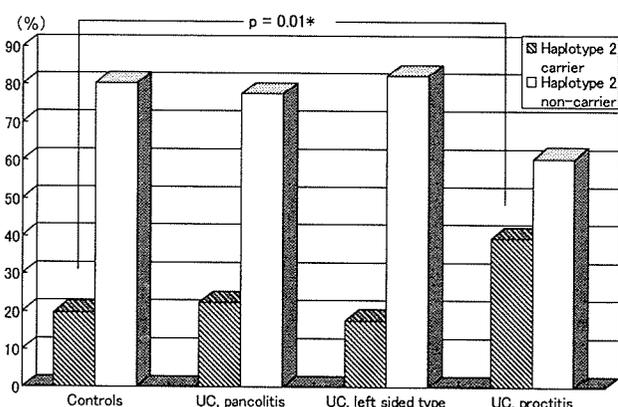


Fig1. Frequency of the IL18 haplotype 2

### D. 考察

IL-18 と様々な炎症性疾患との関連が報告されているとともにまた IL-18 遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型と 1 型糖尿病, 壊死性腸炎, サルコイドーシス, 関節リウマチ, 慢性 B 型肝炎, 成人発症ステイル病, 気管支喘息, アトピー性皮膚炎などの疾患との関連が報告されている。

炎症性腸疾患, とりわけ CD の病態形成における IL-18 の役割が注目され, またマウスクローン病モデルの 1 つである Sampl/YitFc マウスにおいてその責任領域が IL18 遺伝子近傍であるとの報告もあり<sup>11)</sup>, 今回解析を行ったが, CD においては関連を認められなかった。

UC においては活性型 IL-18 が病変部に発現し, また血清 IL-18 値と重症度との関連が報告されている<sup>7)</sup>. UC においては Th2 優位の炎症とされるものの特に重症時には IL-12 や IFN- $\gamma$  の上昇も報告され, IL-18

が IL-12 と共に働き IFN- $\gamma$  の産生に関与する事も考えられる. しかし, IL-18 は腸上皮障害において防御的な効果があるとの報告もあり, UC また CD においても IL-18 の病態における役割は病期によって変わることも推測されている<sup>12)</sup>.

今回解析した IL18 遺伝子のプロモーター領域多型 (-607, -137) はそれぞれ転写因子 CREB 及び HATF-1 の結合部位とされ, そこに SNP が存在することによりプロモーター活性が変化すると考えられる. それがハプロタイプ 2 (-607A, -137C) ではプロモーター活性が優位に低くなり, またハプロタイプ 1 及び 3 においてはハプロタイプ 2 より優位にプロモーター活性が優位に高くなる原因と考えられている. 今回の解析ではプロモーター活性が低いハプロタイプを持つ UC 症例は, 直腸炎型に代表される小範囲の病変にとどまる可能性が示唆された<sup>9)</sup>.

### E. 結論

IL18 遺伝子プロモーター領域多型 (-607C/A, -137G/C) において-607A アレルは UC と関連を認めた. また, ハプロタイプ 2 は UC の病変範囲に影響を与える因子の一つである可能性が示唆された.

### F. 文献

- 1) Podolsky DK: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1997; 325: 928-937, 1008-1016.
- 2) Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324: 84-88, 1991.
- 3) Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature* 378: 88-91, 1995.
- 4) Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF Jr, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 162: 6829-6835, 1999.
- 5) Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F: Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 163: 143-147, 1999.
- 6) Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, Nakamaru K, Okamoto M, Naganuma M, Ishii H, Ikeda M, Kurimoto M, Hibi T: Interleukin 18 is a potent

- proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterol* 119: 1514-1523, 2000.
- 7) Chikano S, Sawada K, Shimoyama T, Kashiwamura
  - 8) IFN-gamma dependent manner. *Gut*. 47: 779-786, 2000.
  - 9) Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Jaroszewicz J, Prokopowicz D. Plasma interleukin-18 reflects severity of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 11: 605-608, 2005.
  - 10) Tamura K, Fukuda Y, Sashio H, Takeda N, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Fukuda Y, Tamura K, Satomi M, Yamada T, Yamamura T, Yamamoto Y, Furuyama J, Okamura H, Shimoyama T: IL18 polymorphism is associated an increased risk of Crohn's disease. *J. Gastroenterol*. 37 (Supple XIV): 111-116, 2002.
  - 11) Takagawa T, Tamura K, Takeda N, Tomita T, Ohda Y, Fukunaga K, Hida N, Ohnishi K, Hori K, Kosaka T, Fukuda Y, Ikeuchi H, Yamamura T, Miwa H, Matsumoto T. Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Inflamm Bowel Dis*. 11: 1038-1043, 2005.
  - SI, Sugihara A, Sekikawa K, Terada N, Nakanishi K, Okamura H. IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an
  - 12) Giedraitis V, He B, Huang W-X, Hillert J: Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J. Neuroimmunol*. 112: 146-152, 2001.
  - 13) Kozaiwa K, Sugawara K, Smith MF Jr, Carl V, Yamschikov V, Belyea B, McEwen SB, Moskaluk CA, Pizarro TT, Cominelli F, McDuffie M. Identification of a quantitative trait locus for ileitis in a spontaneous mouse model of Crohn's disease: SAMP1/YitFc. *Gastroenterology*. 125: 477-490, 2003.
  - 14) Reuter BK, Pizarro TT. Commentary: the role of the IL-18 system and other members of the IL-1R/TLR superfamily in innate mucosal immunity and the pathogenesis of inflammatory bowel disease: friend or foe? *Eur J Immunol*. 34: 2347-2355, 2004.

Table1. Allele and genotype frequencies of patients with Ulcerative colitis and Crohn's disease

Patients and controls	Total numbers	Allele Locus-607			Allele Locus-137			Genotype Locus-607				Genotype Locus-137			
		C (%)	A (%)	P <sub>c</sub> Value (vs controls)	G (%)	C (%)	P <sub>c</sub> Value (vs controls)	CC (%)	CA (%)	AA (%)	P <sub>c</sub> Value (vs controls)	GG (%)	GC (%)	CC (%)	P <sub>c</sub> Value (vs controls)
Controls	212	42.0	58.0		89.4	10.6		18.9	46.2	34.9		80.2	18.4	1.4	
Ulcerative colitis	205	34.4	65.6	0.048*1	86.8	13.2	NS	10.2	48.3	41.5	NS*2	75.1	23.4	1.5	NS
Crohn's disease	210	36.4	63.6	NS	88.8	11.2	NS	15.2	42.4	42.4	NS	79.6	18.6	1.9	NS

NS means not significant

\*1 p = 0.024, p<sub>c</sub> = 0.048, OR = 1.38, 95%CI = 1.04-1.83

\*2 p = 0.037, p<sub>c</sub> = NS

## 潰瘍性大腸炎の腸内細菌 T-RFLP プロファイル解析

分担研究者 藤山 佳秀 滋賀医科大学消化器内科 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎 (UC) 患者 43 人と健常人 5 名より便を採取し、既報の方法に準じて 16S rDNA を PCR 法により増幅し、制限酵素 MspI を用いて T-RFLP を解析した。UC の腸内細菌叢の T-RFLP パターンは大きく 2 つのクラスターに分けられた。直腸炎型および大腸全摘後の患者が多く含まれるクラスター II は、健常人の腸内細菌叢に近いパターンを示した。

### 共同研究者

坂田慎治 辯野義己

### 所属

理化学研究所バイオリソースセンター

### A. 研究目的

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は、原因不明の慢性非特異的腸炎で、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) とクローン病 (Crohn's disease: CD) がその代表疾患である。これまでの基礎的、臨床的研究から、食事抗原や腸内細菌叢に対する免疫応答の異常が重要な役割を担っていると考えられている。本研究では、UC における腸内細菌叢の変化について、Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) パターンの変化として検討した。

### B. 研究方法

滋賀医科大学付属病院消化器内科の外来受診中もしくは入院中の患者 43 人より便を採取した。健常人 5 名より同様に便を採取した。サンプルより DNA を抽出し、既報の方法に準じて 16S rDNA を PCR 法により増幅した (1, 2)。さらに、増幅した PCR 産物を制限酵素 MspI を用いて処理し、T-RF を ABI PRISM 310 を用いて解析した (1, 2)。

(倫理面への配慮)

滋賀医科大学倫理委員会の承認のうえ、書面により同意を得た。

### C. 研究結果

UC の腸内細菌叢の T-RFLP パターンは大きく 2 つのクラスターに分けられた。直腸炎型および大腸全摘後の患者が多く含まれるクラスター II は、健常人の腸内細菌叢に近いパターンを示した。

### D. 考察

光岡によると、ヒトの腸内細菌叢は嫌気性菌が優位で、科や属に分けると 15 群、種に分けると 70-80 種類、多いヒトでは 100 種類、100 兆個もの細菌から成るとされる (3)。上部消化管 (空腸まで) には、胃酸、胆汁や膵液が存在するため、存在できる細菌は非常に限られた種類をごくわずかに認めるにすぎない。空腸では、上部消化管のバリアーを通過した限られた乳酸桿菌や連鎖球菌などが認められる。ところが、回腸に至ると、腸内容の中和などにより、急に細菌数の増加が認められる。腸内容 1g 当たり 10 万から 1000 万個の細菌が認められ、回腸の下部ではさらに増加する (3)。大腸に入ると、盲腸でさらに増え、内容 1g 当たり 100 億個から 1 兆個の細菌が存在する (3)。

出生時には腸内は無菌状態で、胎便にも細菌は認められない。しかし、生後 24 時間以内に細菌の定着、増殖が認められ、便中に大腸菌、腸球菌、ブドウ球菌、クロストリジウムなどが出現し、さらに、生後 3-4 日後には乳酸桿菌属 (Lactobacillus) やビフィズス菌属 (Bifidobacterium) が増えてくる (3)。これらの乳酸桿菌やビフィズス菌は、経口的に摂取され、胃酸や胆汁酸に耐えて生きたまま腸内に達するものと考えられている。これらの菌は優性な増殖とその代謝産物によって有害菌を排除し、腸を適度に刺激して便通を整える作用を発揮する。さらに、離乳期になるとバクテロイデス (Bacteroidaceae)、ユウバクテリウム (Eubacterium)、嫌気性連鎖球菌などの嫌気性菌群が最優位となり、腸内細菌は成人型に安定する。これらの腸内細菌叢は、人種や食習慣により若干異なる。

健常人の腸内細菌叢についての検討がさまざまな形で報告されているが、実際培養可能な腸内細菌は、全体の数十パーセントにすぎないとされている。すなわち、我々が現在知り得る腸内細菌に関する情報

から炎症性腸疾患の病因、病態を解析検討することは、未だ十分とは言えない段階である。16S rRNA を標的にした分子生物学的手法などにより腸内細菌叢の変化の全容が明らかにされ、病態に関連している細菌を標的とした抗生剤やプロバイオティクスの選択など、新たな治療戦略の展開が可能と考えられる。今回の検討からも、UC における腸内細菌叢の変化が明らかとなった。今後、さらなる症例の蓄積が必要と考えられた。

#### E. 結論

16S rDNA を標的とした腸内細菌叢の解析により、IBD における変化が明らかにできる。

#### F. 文献

1. Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J Med Microbiol.* 52:79-89, 2003.
2. Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for analysis of complex bifidobacterial communities. *Microbiol Immunol.* 47:133-42, 2003.
3. 光岡知足. ミクロの住人たち：腸内細菌の世界を探る. ヤクルト本社、1988

## 潰瘍性大腸炎患者における血清 IP-10 値測定と GCAP による変動

研究協力者 押谷 伸英 大阪市立大学大学院消化器器管制御内科学 助教授

研究要旨：活動期潰瘍性大腸炎患者において、Th1 type のリンパ球を遊走させるケモカインである IP-10 の血清中濃度の上昇が認められ、GCAP 治療の前後で血清 IP-10 値の低下と白血球の IP-10 産生能の低下が認められた。潰瘍性大腸炎の病態に IP-10 が関与し、治療の標的と成り得る可能性が示唆された。

### 共同研究者

野口篤志 渡辺憲治

### 所属

大阪市立大学大学院消化器器管制御内科学

### A. 研究目的

Interferon- $\gamma$  inducible protein 10kDa (IP-10) はそのレセプターである CXCR3 を介して Th1 type のリンパ球を遊走化させるケモカインとして知られ潰瘍性大腸炎の大腸粘膜や回腸囊炎の炎症粘膜にも発現が報告されている。今回我々は、潰瘍性大腸炎の病態における IP-10 の関連を調べるため、UC 患者における血清 IP-10 値を測定し、GCAP 治療前後でのその変動と白血球の産生能の変化について検討した。

### B. 研究方法

- ①UC 患者 (活動期 31 人・緩解期 12 人) と健常人 (16 人) で血清 IP-10 値を ELISA 法 (R&D DIP-100) を用いて測定した。
- ②UC 患者 30 人において GCAP 治療初回の治療前後において血清 IP-10 値を ELISA 法で測定した。
- ③白血球の IP-10 産生能の GCAP 前後での変化を検討するため、UC 患者 20 人において GCAP 前、GCAP 開始 60 分後のカラム流入前、カラム流出後の 3 点のヘパリン化血 100  $\mu$ l を 1  $\mu$ g/ml の LPS を含む RPMI1640 1ml に加え、37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 18 時間培養し培養上清の IP-10 値を測定した。

### C. 研究結果

- ①活動期潰瘍性大腸炎患者においては血清 IP-10 値は 250.3pg/ml と緩解期 (120.9pg/ml)、健常人 (56.2pg/ml) と比較し有意に高値を示した。(p=0.003 UC 活動期 vs. UC 緩解期, p=0.01 UC 緩解期 vs. 健常人)
- ②GCAP 初回治療前 (207.1pg/ml) に比べ、血清 IP-10 値は治療後 (184.5pg/ml) に有意に低下した。(p=0.04)

- ③全血培養法による白血球 IP-10 産生能は GCAP 前 (152.9pg/ml) に比べ GCAP 後カラム流入部 (65.6pg/ml)・流出部 (41.8pg/ml) で有意に低下した。(p<0.01)

### D. 考察

潰瘍性大腸炎の病態に IP-10 の過剰産生により誘導される Th-1 反応の関与が示唆された。また、GCAP の治療効果発現の一機序として IP-10 産生白血球の除去が要因となると推測された。

### E. 結論

潰瘍性大腸炎患者では IP-10 の過剰発現がみられ、これが治療の標的と成り得る可能性が示唆された。

### F. 文献

1. Ugucioni M, Gionchetti P, Marco Baggiolini et al.: Increased Expression of IP-10, IL-8, MCP-1, MCP-3 in Ulcerative Colitis. Am. J. Pathol. 1999. 155:331-336
2. Kashiwagi N, Sugimura K, Shimoyama T et al.: Immunomodulatory Effects of Granulocyte and Monocyte Adsorption Apheresis as a Treatment for Patients with Ulcerative Colitis. Dig. Dis. Sci. 2002. 47:1334-1341

## 潰瘍性大腸炎患者の虫垂粘膜リンパ球 サブセット・サイトカインプロファイルの検討

研究協力者 岡崎 和一 関西医科大学第3内科 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎 (UC) における虫垂の役割が、最近注目されている。今回の研究目的は、UC 患者の虫垂における免疫担当細胞の不均衡を明らかにし、UC 発症における虫垂の役割を解明する事である。方法：リンパ球サブセット：UC86 例 (活動性全結腸型 (A-Pan) 15 例、活動性左結腸型 (A-Lt) 25 例、更に虫垂開口部に炎症を認めるもの (A-Lt/Ap) 10 例、非活動性全結腸型 (I-Pan) 14 例、非活動性左結腸型 (I-Lt) 22 例) とコントロール 27 例において、虫垂開口部・横行結腸・直腸の内視鏡下生検標本を用いた。粘膜内 T 細胞を分離した後、CD4/CD8 比と活性化 T 細胞の割合をコントロール群と比較検討した。リンパ球サイトカインプロファイル：UC6 例 (A-Lt4 例と I-Pan2 例) と、コントロール 6 例において、虫垂切除標本を用いた。虫垂粘膜内 T 細胞が産生するサイトカインを比較検討した。結果：リンパ球サブセット：活動性 UC、特に左結腸型における虫垂の CD4/CD8 比は有意に高値であった。直腸では活動期だけでなく非活動期においても CD4/CD8 比の有意な高値を認めた。活性化初期 CD4+T 細胞の割合は、UC の病型に関係なく虫垂で有意な増加を認めた。活性化晩期 CD4+T 細胞の割合は、A-Pan 群の直腸でのみ有意な増加を認めたが、横行結腸や虫垂では UC の病型に関係なく有意な増加を認めなかった。リンパ球サイトカインプロファイル：UC 患者の虫垂においては IL-5 が有意に高値であった。結論：UC の発症において虫垂は、Th2 型免疫反応の誘導に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

### 共同研究者

松下光伸 内田一茂

### 所属

関西医科大学第三内科

考えられるものの、ヒトにおける虫垂の免疫学的意義については不明である。

以前より我々は、UC 患者の虫垂粘膜リンパ球サブセットの解析を報告してきたが (7, 8)、今回はそれに加え、UC 患者の虫垂粘膜リンパ球サイトカインプロファイルを検討する事により、UC の病態生理における虫垂の意義を理解する事を目的とする。

### A. 研究目的

近年の大腸内視鏡検査の発達により、潰瘍性大腸炎 (UC) 患者、特に左結腸型において主病変と離れて虫垂開口部に炎症を伴う症例を経験するようになり、潰瘍性大腸炎における虫垂の役割が注目されている (1)。

一方、従来より虫垂は退化した臓器と考えられているが (2)、虫垂切除歴のあるヒトでは UC の発症率が有意に低く、虫垂切除により UC 発症だけでなく、病変の進展や重症化あるいは再発の抑制される可能性が考えられている (3, 4)。更に UC のモデル動物である TCR $\alpha$  ノックアウトマウスでは、虫垂切除により腸炎発症の抑制や腸炎の改善が認められ (5)、また UC 患者においても虫垂切除により UC の寛解する例も報告されている (6)。しかしながら、このように UC の発症や病態生理において虫垂は、何らかの関連性が

### B. 研究方法

リンパ球サブセットの対象患者は UC86 例と、コントロール群として大腸憩室やポリープなど非炎症性患者の 27 例である。UC 患者はマッツの分類 2 以上を活動性とし、活動性全結腸型 (A-Pan) 15 例、活動性左結腸型 (A-Lt) 25 例、更に虫垂開口部に炎症を認めるもの (A-Lt/Ap) 10 例、非活動性全結腸型 (I-Pan) 14 例、非活動性左結腸型 (I-Lt) 22 例に分類した。また、リンパ球サイトカインプロファイルの対象患者は A-Lt4 例と I-Pan2 例の UC6 例とコントロール群 6 例である。

リンパ球サブセット解析の方法は、虫垂開口部、横行結腸、直腸の各粘膜の 4 個の生検材料から分離された主に粘膜固有層のリンパ球を使用した。トリ

パンブルー染色で 90%以上のバイアピリチーを確認後、抗-CD4-PE/ 抗-CD8-FITC 抗体 (コルター; 東京) で染色した。また、抗-CD45-PE-Cy5 抗体 (イムノテック; フランス) でゲーティング後、抗-CD4-PE 抗体 (ニチレイ; 東京) と活性化初期抗原である CD69 に対する抗-CD69-FITC 抗体 (ベクトンデイキンソン; 東京) や活性化晚期抗原の HLA-DR に対する抗-HLA-DR-FITC 抗体 (イムノテック; フランス) でも三重染色した。そしてフローサイトメトリー (EPICS XL system II; Coulter) にて解析し、CD4/CD8 比や活性化 CD4+T 細胞と病型との関連性について検討した。

我々のパイロットスタディでは、粘膜内 T 細胞で CD4, CD8, CD69, HLA-DR を表現している細胞割合は、術前の虫垂開口部生検標本と虫垂切除標本では類似していたので、虫垂開口部の生検標本は、虫垂粘膜の免疫応答を反映していると判断した。

リンパ球サイトカインプロファイル解析の方法は、虫垂切除材料から分離された主に粘膜固有層のリンパ球を使用した。10<sup>5</sup>個のリンパ球を抗 CD3 抗体で刺激し、産生されるインターファロンガンマ (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン 4 (IL-4)、インターロイキン 5 (IL-5) を ELISA アッセイで測定し、Th1・Th2 バランスをコントロール群と比較検討した。

結果は平均  $\pm$  標準偏差で表し、Student's t-test にて各 UC 群とコントロール群を比較検討した。p 値は 0.05 (two-tailed) 未満を統計学的に有意と判断した。

### C. 研究結果

リンパ球サブセットの解析結果: 活動性 UC、特に左結腸型における虫垂の CD4/CD8 比はコントロール群に比し有意に高値であった (A-Pan; p = 0.1654, A-Lt; p = 0.0166, and A-Lt/Ap; p = 0.0445) (表 1)。

表 1. 大腸粘膜における CD4/CD8

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

Values are presented as mean ( $\pm$  SD).

\* p < 0.05 as compared with the controls.

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

興味深いことに虫垂の CD4/CD8 比が増加するにしたがって、直腸の CD4/CD8 比にも増加傾向が見られ、虫垂と直腸における何らかの関連性が示唆される。また A-Lt/Ap 群では正常粘膜像を呈する横行結腸で

も CD4/CD8 比がコントロール群に比し有意に高値であった (p = 0.0374)。また、直腸では他の結腸部位と異なり非活動期においても CD4/CD8 比の有意な高値を認めた (A-Pan; p = 0.0102, A-Lt; p < 0.0001, A-Lt/Ap, p < 0.0001, I-Pan; p = 0.0109, and I-Lt; p = 0.0046)。

活性化初期抗原である CD69 陽性の CD4+ T 細胞の割合は、コントロール群に比し UC の病型に関係なく、虫垂では有意な増加を認めた (A-Pan; p = 0.0013, A-Lt; p = 0.0042, A-Lt/Ap; p = 0.0245, I-Pan; p < 0.0001, and I-Lt; p = 0.0357) が、横行結腸では有意な増加を認めなかった (表 2)。

表 2. 大腸粘膜における活性化 T 細胞の割合

A-Pan	A-Lt	A-Lt/Ap
I-Pan	I-Lt	
CD4+CD69+T 細胞		
直腸 29.7 (4.6) *	23.2 (5.0)	24.0 (7.6)
24.5 (6.2)	28.2 (8.6)	
横行 25.0 (5.7)	20.4 (7.8)	23.4 (4.3)
21.5 (7.3)	22.1 (6.2)	
虫垂 26.6 (3.0) *	28.0 (7.0) *	26.0 (4.0) *
28.9 (3.9) *	25.4 (7.3) *	
CD4+HLA-DR+T 細胞		
直腸 15.2 (6.2) *	10.1 (3.8)	7.3 (2.4)
11.6 (4.1)	11.1 (6.0)	
横行 13.2 (5.0)	7.9 (4.0)	9.1 (4.9)
9.5 (3.7)	14.9 (6.7)	
虫垂 8.9 (2.4)	9.9 (4.1)	9.9 (2.4)
10.9 (4.3)	12.6 (2.8)	

Values are presented as mean ( $\pm$  SD).

\* p < 0.05 as compared with the controls.

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

またその割合はコントロール群に比し、直腸では A-Pan 群 (p = 0.0497) でのみ有意な増加を認めた。以上より、UC の発症において虫垂は、腸管内抗原の最初の認識部位として重要な役割を演じている可能性が示唆される。

一方、活性化晚期抗原である HLA-DR 陽性の CD4+ T 細胞の割合は、コントロール群に比し直腸では A-Pan 群でのみ有意な増加を認めたが (p = 0.0299)、横行結腸や虫垂では UC の病型に関係なく有意な増加を認めなかった (表 2)。

リンパ球サイトカインプロファイルの解析結果: UC 患者の虫垂においては IFN- $\gamma$  と IL-4 はコントロール群に比し有意差はなかったが、Th2 型免疫が関わっている IL-5 のみがコントロール群に比し有意に高値であった (p < 0.05) (表 3)。

表3. 虫垂粘膜におけるサイトカインの産生

	Ulcerative colitis	Controls
虫垂		
IFN- $\gamma$ 142 (33)		120 (18)
IL-4 28 (10)		18 (16)
IL-5 152 (18) *		32 (10)

Values are presented as mean ( $\pm$  SD) (pg/ml).

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

#### D. 考察

UC 発症に関しては、異常な粘膜内の免疫反応が重要な役割を演じていると考えられているが(2)、UC 患者、特に左側結腸型 UC 患者の虫垂における免疫担当細胞に関してはあまり研究されていない。大部分の研究は切除標本からの検討であり、大腸切除は通常、全結腸型の重症例や難治例で行なわれるので、全ての UC 患者の病態把握をしていない欠点がある(9)。そのため我々は、様々な活動性の UC 患者において、内視鏡下の生検標本を用いて粘膜内免疫担当細胞を分離して検討した。通常、虫垂の粘膜は生検できないが、虫垂粘膜の免疫応答を反映していると考えられる虫垂開口部の生検標本を代りに用いた。

CD4/CD8 比は免疫学的活動性の最も有用なマーカーの一つであり、今回の研究では虫垂の CD4/CD8 比は、コントロール群に比較し A-Lt 群と A-Lt/Ap 群において有意に増加していた。また、A-Pan 群においても増加傾向を認めた。興味深いことに虫垂の CD4/CD8 比が増加するにしたがって、直腸の CD4/CD8 比にも増加傾向が見られ、虫垂と直腸における何らかの関連性が示唆された。

A-Lt/Ap 群では正常粘膜像を呈する横行結腸でも CD4/CD8 比がコントロール群に比し有意に高値であった。Matsumoto らも A-Lt 群に比較し A-Lt/Ap 群の全結腸において組織学的炎症の程度が強い傾向があり、特に炎症部位の虫垂開口部と非炎症部位の上行結腸で有意に強いと報告している(1)。これらの事より、CD4/CD8 比は各大腸粘膜における炎症の程度を表していると思われる。また、直腸粘膜では他の結腸部位と異なり非活動期においても CD4/CD8 比の有意な高値を認め、有意な免疫不均衡が非活動性の直腸粘膜でも持続し、この免疫不均衡が持続している限り UC の再燃が起こると考えられる。

種々の遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究により、UC の発症には腸内細菌などの腸内抗原に対する免疫寛容の破綻などの可能性が考えられているが(5)、大腸における腸管内抗原の認識部位は明らかになっていない。そのため、我々は活性化初期抗原である CD69 と活性化晚期抗原である HLA-DR を用いて検討した。虫垂では UC の病型に関係なく CD4+CD69+ T 細胞の割合はコントロール群に比し有意な増加を認

めたが、CD4+HLA-DR+ T 細胞の割合は有意な増加を認めなかった。

また、UC 患者の虫垂粘膜におけるリンパ球サイトカインプロファイルの検討では、Th1 型免疫が関わっている IFN- $\gamma$  はコントロール群に比し有意差はなかったが、Th2 型免疫が関わっている IL-5 のみが有意に高値であった。一般に UC の病態生理には、主に活性化 CD4 陽性細胞による Th2 型免疫が関わっていると考えられ(10)、その傾向は虫垂において優位であった。

#### E. 結論

UC の発症において虫垂は、腸管内抗原の最初の認識部位として重要な役割を演じている可能性が示唆される。

#### F. 文献

1. Matsumoto T, et al. : Significance of appendiceal involvement in patients with ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 55 : 180-85, 2002.
2. Panaccione R, et al. : The appendix in ulcerative colitis: a not so innocent bystander. *Gastroenterology* 117 : 272-73, 1999.
3. Andersson RE, et al. : Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *N Engl J Med* 344 : 808-14, 2001.
4. Naganuma M, et al. : Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis and reduces its recurrence: results of a multicenter case-controlled study in Japan. *Am J Gastroenterol* 96 : 1123-6, 2001.
5. Mizoguchi A, et al. : Role of appendix in the development of inflammatory bowel disease in TCR- $\alpha$  mutant mice. *J Exp Med* 184 : 707-15, 1996.
6. Okazaki K, et al. : A patient with improvement of ulcerative colitis after appendectomy. *Gastroenterology* 119 : 502-6, 2000.
7. 松下光伸, 他 : 潰瘍性大腸炎の虫垂粘膜リンパ球サブセットの解析。 *消化器と免疫* 41 : 118-121, 2004.
8. Matsushita M, et al. : Appendix is a priming site in the development of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 11 : 4869-74, 2005.
9. Haruta J, et al. : Phenotypic and functional analysis of lamina propria mononuclear cells from colonoscopic biopsy specimens in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 87 : 448-54, 1992.
10. 岡崎和一, 他 : 炎症性腸疾患とサイトカインネッ

トワーク。Medical Practice 22 : 797-803, 2005.

1. 論文発表

1. Yamagata H, Matsuzaki K, Mori S, Yoshida K, Tahashi Y, Furukawa F, Sekimoto G, Watanabe T, Uemura Y, Sakaida N, Yoshioka K, Kamiyama Y, Seki T, Okazaki K. Acceleration of Smad2 and Smad3 phosphorylation via c-Jun NH(2)-terminal kinase during human colorectal carcinogenesis. Cancer Res. 2005;1;65(1):157-65
2. Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Chiba T, Okazaki K. Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2006;12(1):62-9.
3. Matsuura M, Okazaki K, Nishio A, Nakase H, Tamaki H, Uchida K, Nishi T, Asada M, Kawasaki K, Fukui T, Yoshizawa H, Ohashi S, Inoue S, Kawanami C, Hiai H, Tabata Y, Chiba T. Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis. Gastroenterology. 2005;128(4):975-86.
4. Matsushita M, Takakuwa H, Matsubayashi Y, Nishio A, Ikehara S, Okazaki K. Appendix is a priming site in the development of ulcerative colitis. World J Gastroenterol. 2005; 21:11(31):4869-74.

## IBDにおける adiponectin の役割

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学 学長

研究要旨： adiponectin は、adipokine の一種であり多彩な作用をもつが、注目すべきはその抗炎症作用であろう。Crohn 病 (CD) の Hypertrophied mesenteric adipose tissue (HMAT) では、adiponectin 産生が亢進しており、病態との関連が示唆されている。しかし、その役割は明らかではない。adiponectin T45G および G276T SNPs と CD の関連を検討したところこれらの SNPs と CD 表現型に関連を認めた。

### 共同研究者

田中道寛 有村佳昭 後藤 啓 中原生哉  
矢花 崇 篠村恭久

### 所属

札幌医科大学第一内科

意な関連を認めた。

### E. 結論

adiponectin T45G SNP GG 遺伝子型および G アリルは Terminal ileum type と G276T SNP TT 遺伝子型および T アリルは Penetrating type と有意な関連を認めた。

### A. 研究目的

adiponectin SNPs の T45G および G276T は、血中 adiponectin 濃度および メタボリック症候群に関連すると報告されており、これらの SNPs と CD の関連を検討することを目的とした。

### F. 文献

Le Blanc K, Ramusson I, Sundberg B, et al. Lancet 2004;363:1439-1441.

### B. 研究方法

健常人コントロール 112 名および CD85 名の末血単核球より DNA を抽出し direct sequence 法により目的の SNPs を解析した。CD 表現型にはウィーン分類を用いた。統計解析は、 $\chi$  二乗, Fisher exact test, Pearson の正確 P 検定あるいはモンテカルロ法を用いた。

### 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

(倫理面への配慮)

札幌医科大学倫理委員会の験の承認および被検者への文書によるインフォームド・コンセントを取得し行われた。

### C. 研究結果

- 1) 健常人コントロールとの比較においてこれらの SNPs のアリル頻度に有意差は認められなかった。
- 2) adiponectin T45G SNP GG 遺伝子型および G アリルは Terminal ileum type と有意な関連を認めた。
- 3) G276T SNP TT 遺伝子型および T アリルは Penetrating type と有意な関連を認めた。

### D. 考察

adiponectin SNPs と CD の疾患感受性との関連は認めなかった。adiponectin SNPs と CD の表現型に有

## 潰瘍性大腸炎におけるリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素発現

研究協力者 三浦 総一郎 防衛医科大学校第2内科 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎における PGD2 の関与を大腸粘膜における PGD 合成酵素発現の面から検討した。リポカリン型 PGD 合成酵素の大腸粘膜発現と、潰瘍性大腸炎患者大腸粘膜における発現亢進を認め、病態への関与が考えられた。

### 共同研究者

高本俊介 渡辺千佳子 都築義和 穂苅量太

### 所属

防衛医科大学校第二内科

### F. 文献

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997

23;94 (26) :14689-94.

Prostaglandins Other Lipid Mediat.

2002;68-69:375-82.

J Immunol. 2002;168 (3) :981-5.

### A. 研究目的

1. 大腸粘膜における PGD 合成酵素発現を検討すること。
2. 潰瘍性大腸炎の粘膜の PGD 合成酵素を活動性に分けて測定し、病態との関与を評価する。

### B. 研究方法

潰瘍性大腸炎患者大腸粘膜生検組織より mRNA を抽出し、定量 RT-PCR 法で PGD 合成酵素発現を測定する。内視鏡的活動度と相関を比較する。

(倫理面への配慮)

防衛医科大学校倫理委員会承認。

### C. 研究結果

- ・大腸粘膜で PGD 合成酵素の mRNA 発現を確認した。Phenotype は L-PGDS 主体であった。
- ・潰瘍性大腸炎で L-PGDS は病変の活動性ととも増加した。

### D. 考察

大腸粘膜では L 型-PGD 合成酵素が存在する。潰瘍性大腸炎の活動性に L-PGD 合成酵素が相関したことから PGD2 が疾患の病態に影響を与えている可能性がある。

### E. 結論

原因不明の潰瘍性大腸炎の病態に係わる可能性のある新たな分子を報告した。今後のさらなる検討が期待される。

## 潰瘍性大腸炎腸管局所における Thrombospondin-1 の発現に関する研究

分担研究者 棟方 昭博 弘前大学医学部内科学第1講座 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎 (UC) 腸管局所における Thrombospondin-1 (TSP-1) の発現と Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) シグナル伝達異常について解析し、ステロイド治療抵抗性 UC との関わりについて検討した。ステロイド治療抵抗性 UC では TGF- $\beta$  受容体のシグナルを伝達する p-smad2, 3 の発現と TSP-1 の発現がステロイド治療反応性 UC と比較して低値であった。ステロイド治療抵抗性 UC では、TSP-1 の発現低下により、TGF- $\beta$ /Smad 系のシグナル伝達障害が生じ、また一方で、TGF- $\beta$ /Smad 系のシグナル伝達障害が TSP-1 の発現低下に関与し、炎症の持続する病態を形成している可能性が示唆された。

### 共同研究者

島谷孝司 石黒 陽 山形和史 櫻庭裕丈  
藤田 均 平賀寛人 山口佐都子

### 所属

弘前大学医学部内科学第一講座

TSP-1 の発現は、蛋白レベルでは反応例 ( $4.47 \pm 1.05$ ) と比し、抵抗例 ( $1.66 \pm 0.59$ ) で有意に ( $P < 0.05$ ) 低値であった。TSP-1 mRNA の発現は、反応例 ( $0.023 \pm 0.008$ ) と比し、抵抗例 ( $0.0024 \pm 0.0015$ ) で有意に ( $P < 0.05$ ) 低値であった。

### A. 研究目的

Thrombospondin-1 (TSP-1) は、血小板  $\alpha$  顆粒、血管内皮細胞、線維芽細胞などから産生、分泌される糖蛋白質で、細胞増殖抑制や抗炎症作用を有し<sup>1)</sup>、また、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の活性調節を介し、炎症の制御や組織の修復に関与している<sup>2)</sup>。一方、潰瘍性大腸炎 (UC) の慢性炎症持続の病態に Smad を介した TGF- $\beta$  のシグナル伝達の異常が関与している<sup>3)</sup>。UC 腸管局所における TSP-1 の発現と TGF- $\beta$  シグナル伝達異常について解析し、ステロイド治療抵抗性 UC との関わりについて検討した。

### B. 対象

健常 Control として大腸癌手術例と、ステロイド治療抵抗性 UC および反応性 UC の手術標本より、蛋白および RNA を抽出し、TSP-1、Smad2, 3、p-Smad2, 3 の蛋白量について Western blot を、TSP-1 の mRNA 発現量は real-time PCR を用い検討した。

### C. 研究結果

蛋白レベルで p-Smad2, 3 と Smad2, 3 の発現の比 (p-Smad2, 3/Smad2, 3) は、Control ( $1.82 \pm 0.33$ ) に比し、抵抗例 ( $0.14 \pm 0.02$ )、反応例 ( $0.45 \pm 0.08$ ) ともに有意に ( $P < 0.01$ ) 低値であった。また、抵抗例と反応例との比較では、抵抗例で有意に ( $P < 0.01$ ) 低値であった。

### D. まとめ

ステロイド治療抵抗性 UC では、TGF- $\beta$  受容体のシグナルを伝達するリン酸化 Smad2, 3 の発現が、治療反応性 UC と比較して有意に低値であった。また、ステロイド治療抵抗性 UC では TGF- $\beta$  の活性化能をもつ TSP-1 の発現が、ステロイド治療反応性 UC と比較して有意に低値であった。このことから、ステロイド治療抵抗性 UC では TSP-1 の発現低下により、TGF- $\beta$ /Smad 系のシグナル伝達障害が生じ、また一方で、TGF- $\beta$ /Smad 系のシグナル伝達障害が TSP-1 の発現低下に関与し、炎症の持続する病態を形成している可能性が示唆された。

### E. 文献

- 1) Crawford SE, Stellmach V, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- $\beta$ 1 in vivo. Cell 1998 Jun 26;93 (7):1159-70.
- 2) Breitkopf K, Sawitza I, et al. Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor  $\beta$  effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. Gut. 2005 May;54 (5):673-81.
- 3) Monteleone G, Kumberova A, et al. Blocking Smad7 restores TGF- $\beta$ 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. J Clin Invest. 2001 Aug;108 (4):601-9.

F. 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

## 潰瘍性大腸炎患者における血漿 Osteopontin (OPN) 値の検討

協力研究者 牧山 和也 長崎大学医学部・歯学部附属病院光学医療診療部 助教授

研究要旨：オステポンチン(以下 OPN)は Th1 サイトカイン誘導に関与し、サルコイドーシスや肺結核において血中 OPN が上昇することが報告されている。また、炎症性腸疾患においても Th1 の炎症に起因する Crohn 病(以下 CD)との関連が示唆されている。一方、Th2 の炎症によって生じると考えられている潰瘍性大腸炎(以下 UC)においても組織中 OPN の発現頻度が高くなっているとの報告もあり、UC 成立への OPN の関与も注目される。今回我々は、ELISA 法を用い炎症性腸疾患患者および健常人の血漿 OPN 濃度を測定し OPN と炎症性腸疾患、特に UC との関連について検討した。結果は、CD 患者における血漿 OPN 濃度は健常人のそれと比し有意に高値であり、UC 患者における血漿 OPN 濃度も健常人のそれと比し有意に高値であった。また UC において血漿 OPN 濃度と臨床的活動指数 (clinical activity index) は有意な正の相関関係を示し、UC における治療前および治療後の血漿 OPN 濃度の比較では 8 症例中 6 例に治療後の血漿 OPN 濃度の低下が認められた。以上より OPN は UC においてもその炎症成立に関与している可能性があると考えられた。

### 共同研究者

三嶋 亮介<sup>1)</sup> 竹島 史直<sup>2)</sup>

### 所属

長崎大学医学部・歯学部附属病院第 2 内科<sup>1)</sup>

長崎大学医学部・歯学部附属病院総合診療科<sup>2)</sup>

除去のため 10mM クエン酸緩衝液 (pH 6) 中にて 120°C で 15 分間オートクレーブを行い、その後、Anti-Human Osteopontin 10A16 Mouse IgG MoAb (IBL Co.) にて 200 倍に希釈し室温にて 1 時間インキュベートを行った。

### A. 研究目的

OPN は Th1 サイトカイン誘導に関与し、サルコイドーシスや肺結核において血中 OPN が上昇することが報告されている。また、炎症性腸疾患においても Th1 の炎症に起因する CD との関連が示唆されている。一方、Th2 の炎症によって生じると考えられている UC においても組織中 OPN の発現頻度が高くなっているとの報告もあり、UC 成立への OPN の関与も注目される。今回我々は、ELISA 法を用い炎症性腸疾患患者および健常人の血漿 OPN 濃度を測定し OPN と炎症性腸疾患、特に UC との関連について検討した。

### B. 研究方法

#### サイトカインの測定

血漿 OPN 濃度は Human Osteopontin 測定キット (IBL Co.) を用い酵素免疫法にて測定した。IL-12 および IFN- $\gamma$  は ELISA 法にて測定した。

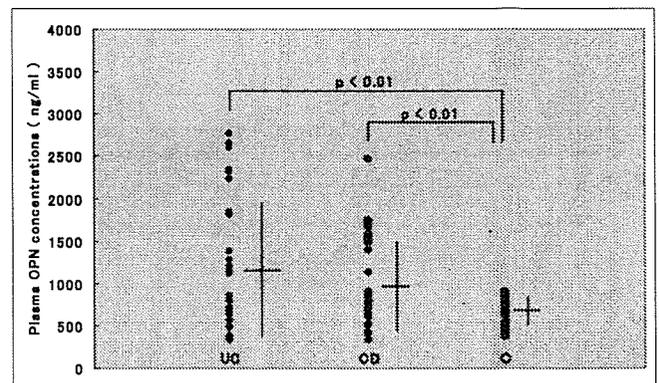
#### 免疫染色

炎症性腸疾患の小腸および大腸での OPN 発現の局在を調べるため、UC および CD 患者それぞれ 7 人の手術標本を用い免疫染色を行った。方法としては、抗原

### C. 研究結果

#### ① UC、CD、健常人における血漿 OPN 値の比較

UC 群および CD 群では健常人群と比し血漿 OPN 値は有意に高値であった。



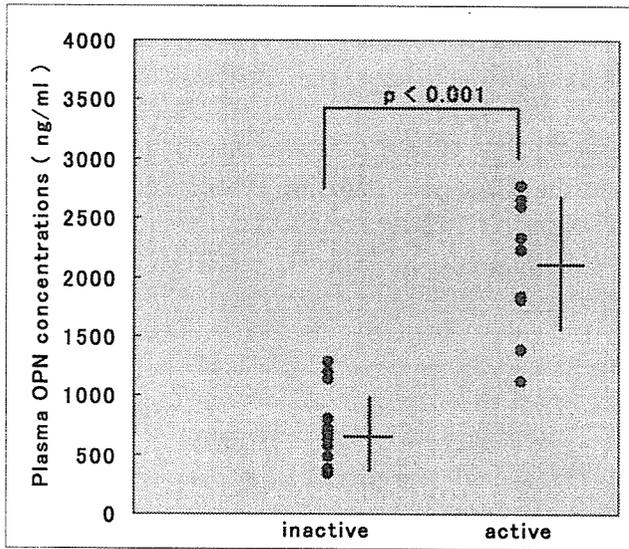
UC : Ulcerative colitis

CD : Crohn's disease

C : control

② UC における緩解期および活動期の血漿 OPN 値の比較

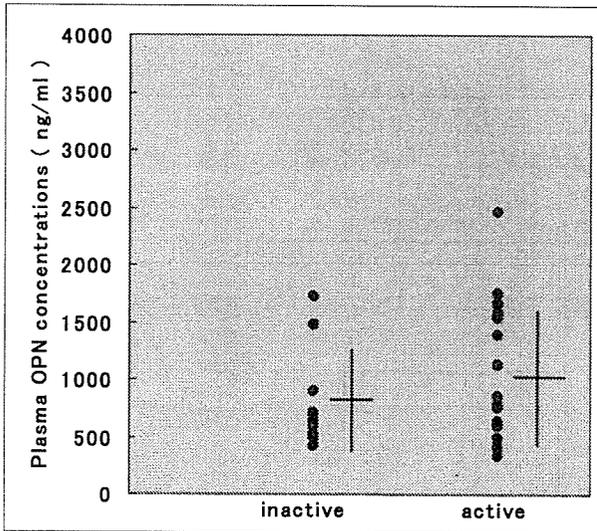
活動期の血漿 OPN 値は緩解期のそれと比し有意に高値であった。



active : CAI  $\geq$  6  
inactive : CAI < 6

③ CD における緩解期および活動期の血漿 OPN 値の比較

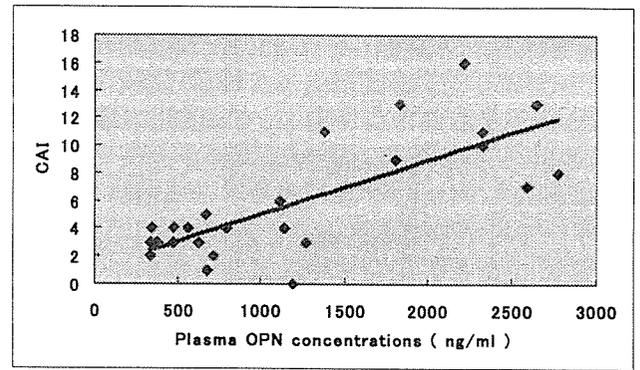
活動期、緩解期の血漿 OPN 値に有意な差は認めなかった。



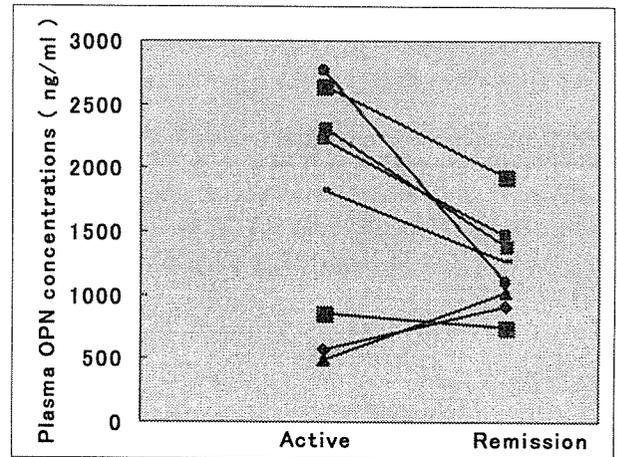
active : CDAI  $\geq$  150  
inactive : CDAI < 150

④ UC における血漿 OPN 値と clinical activity index (CAI) との相関

血漿 OPN 値と CAI との間に有意な正の相関関係を認めた



⑤ UC における治療前後での血漿 OPN 濃度の推移  
8 症例中 6 例に治療後の血漿 OPN 値の低下が認められた。



⑥ 免疫染色による OPN の局在の検討

UC、CD ともに腸上皮細胞に著明な OPN の発現を認めた。

UC では粘膜、粘膜下層のマクローファージ様の大円形細胞に OPN の発現が認められ、また粘膜内に OPN 発現を有する少数のリンパ球が散見された。

CD では肉芽腫およびマクローファージ様細胞に OPN の発現を認めた。

D. 考察

OPN は骨芽細胞より産生される骨の基質に含まれる高度にリン酸化された糖蛋白として発見された。その後、T 細胞において活性化シグナルが入ると発現する、B 細胞を持続的に活性化する分子として、カンターらが Eta-1 (Early T-cells activation-1) とした。現在、Th1 の炎症の形成に重要であること、細胞性感染や肉芽腫性反応において T 細胞から早期より産生されること、リウマチなどの自己免疫性疾患の成立に不可欠であることなどが知られている。また、肉芽腫を形成する結核やサルコイドーシスにおいても

疾患成立への OPN の関与が示唆されている。Th1 サイトカインとしての作用は、① $\alpha v \beta 3$  インテグリンや CD44 などを通して細胞の遊走能や接着能を促進させる ②IL12 の発現を促進し IL10 の発現を抑制する、などが知られている。炎症性腸疾患においても Th1 の炎症に起因する CD との関連が示唆される一方 Th2 の炎症によって生じると考えられている UC においても組織中 OPN の発現頻度が高くなっているとの報告もあり、UC 成立への OPN の関与も注目される。

我々は今回の研究で CD のみならず UC においても血漿 OPN 値が有意に上昇することを示した。それに加え UC においてはその活動性と血漿 OPN 値との間に有意な正の相関関係を認め、また多くの UC 患者で治療に伴う血漿 OPN 値の低下が観察された。これらの結果は OPN が UC の成立に関与している可能性があることを示唆していると考えられる。また血漿 OPN 値測定による活動性の評価や治療効果の判定など臨床応用への可能性も期待される。

#### E. 結論

UC において血漿 OPN 値は有意に高値であり、UC の活動性との間に有意な正の相関関係を認めた。OPN は UC においてもその炎症成立に関与している可能性があると考えられた。

#### F. 文献

1. Cantor H. The role of Eta-1/osteopontin in the pathogenesis of immunological disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760:143-50.

2. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31:92-102.
3. Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early T-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol* 1993; 13:225-46.
4. Nau GJ, Guilfoile P, Chupp GL et al. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:6414-9.
5. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000; 287:860-4.
6. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001; 294:1731-5.
7. Jansson M, Panoutsakopoulou V, Baker J et al. Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice. *J Immunol* 2002; 168:2096-9.
8. Ohshima S, Yamaguchi N, Nishioka K et al. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. *J Rheumatol* 2002; 29:2061-7.

## 実験腸炎における Heme oxygenase 誘導による病変阻止効果

研究協力者 吉川 敏一 京都府立医科大学大学院医学研究科生体機能制御学 教授

研究要旨：我々はこれまでにマウス Dextran Sodium Sulfate (DSS) 腸炎モデルを用いて、その腸炎の発生過程において大腸粘膜内に Hemoxygenase-1 (HO-1) 発現が亢進し、この HO-1 が生体防御に関与していることを示してきた。今回、強力な HO-1 inducer である Hemin を本モデルに投与し、大腸粘膜に HO-1 が発現誘導されることを確認するとともに、Hemin の投与により DSS 腸炎の発症・進展が抑制され、この効果が発現誘導された HO-1 を介してもたらされることを確認した。今後さらなる検討を行いヒト炎症性腸疾患における新規治療標的分子としての可能性に関して調査研究していきたい。

### 共同研究者

内藤裕二<sup>1)</sup> 高木智久<sup>2)</sup>

### 所属

京都府立医科大学生体機能分析医学講座<sup>1)</sup>  
同 生体安全医学講座<sup>2)</sup>

蛋白発現の増加が認められた。

2) Hemin を 1 回投与することにより正常大腸粘膜における HO-1 発現が著明に亢進した。

3) Hemin 投与により DSS 腸炎の発症が有意に抑制された。

4) Hemin の投与とともに HO-1 阻害剤である ZnPP を投与することにより、Hemin の腸炎発症・進展抑制効果は消失した。

### A. 研究目的

ストレス応答タンパクとして知られている Hemoxygenase-1 (HO-1) が炎症抑制的に働くことが報告されている。我々はこれまでに、本研究事業においてマウス Dextran Sodium Sulfate (DSS) 腸炎モデルにおいて HO-1 が炎症制御に重要な役割を担っていることを報告してきた。そこで、本年度研究事業において HO-1 を腸管粘膜に誘導することによる腸炎発症・進展抑制効果に関して検討した。

### B. 研究方法

7 週齢雄性 BALB/c マウスを用いて、8% DSS (分子量 8000) の自由飲水により炎症性腸疾患モデルを作製した。Disease Activity Index (DAI) Score を疾患活動度の指標として用いた。また、同モデルを用いて強力な HO-1 inducer である Hemin (50mg/kg, 1 回投与) を腹腔内投与することによる病態への修飾に関して検討を加えた。

(倫理面への配慮)

本実験に関しては京都府立医科大学の実験動物取り扱い規約を遵守して施行された。

### C. 研究結果

DSS 腸炎では大腸粘膜層を中心に著明な炎症細胞浸潤を伴う腸炎が発生し、

1) DSS 腸炎では経時的に大腸粘膜における HO-1 mRNA、

### D. 考察

DSS 腸炎の発症に伴い大腸粘膜において HO-1 発現が誘導されてきた。これまでに我々は、HO-1 阻害剤 ZnPP 投与により腸炎の有意な増悪を認めたことから、この HO-1 の発現は組織保護的もしくは修復的に働いている可能性が考えられた。今回の検討では大腸粘膜にあらかじめ HO-1 を誘導することにより腸炎発症が阻止されることが確認された。このことは腸炎の進展において発現してくる HO-1 を過剰に発現誘導することにより腸炎を制御しうる可能性を示唆するものであると考えられた。

今後、炎症性腸疾患患者における HO-1 の新規治療標的分子としての可能性を探るべく、腸炎治癒促進効果などの治療効果に対しても検討を行っていく予定である。

### E. 結論

DSS の成立とともに発現の亢進する HO-1 は生体防御に関与し、また、腸炎の発症に際し大腸粘膜に HO-1 発現を誘導することにより腸炎の発症・進展が抑制された。

### F. 文献

Heme oxygenase-1 (Hsp32) is involved in the

protection of small intestine by whole body mild hyperthermia from ischemia/reperfusion injury in rat. Sakamoto N, Kokura S, Okuda T, Hattori T, Katada K, Isozaki Y, Nakabe N, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T. Int J Hyperthermia. 2005. 21. 603-14.

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

## IL-10 ノックアウトマウスにおける腸内細菌認識異常と IL-12 過剰産生

主任研究者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授

研究要旨：炎症性腸疾患 (IBD) の病態への腸内細菌の関与は以前より報告されている。正常腸管では腸管マクロファージ (M $\phi$ ) 等の免疫担当細胞は腸内細菌に対して過剰な免疫反応が起らない様制御されているが、一方で IBD では、免疫制御機構が破綻し、腸内細菌に対し過剰な免疫反応が誘導されることにより病態が形成されると考えられる。しかしながら、腸内細菌認識が腸炎を惹起する機構は明確になっておらず、さらなる研究が求められている。今回、我々は、IBD モデル動物である IL-10 ノックアウトマウスを用い、腸管 M $\phi$  の腸内細菌認識と腸炎誘導機構について検討を行なった。

### 共同研究者

鎌田信彦<sup>1)</sup> 久松理一<sup>1)</sup> 岡本 晋<sup>1)</sup>  
赤川清子<sup>2)</sup>

### 所属

慶應義塾大学医学部消化器内科<sup>1)</sup>  
国立感染症研究所免疫部<sup>2)</sup>

### A. 研究目的

炎症性腸疾患の病態形成に腸内細菌が関与していることは動物モデルでの検討や臨床的知見から以前より強く疑われている。しかしながら、そのメカニズムについては不明であり、更なる研究が求められている。

マクロファージは細菌等の外来抗原に対する自然免疫の主な担当細胞であり感染防御において重要な役割を果たしている。しかしながら、腸管局所では常に多数の腸内細菌が存在しているため、マクロファージはそれら腸内細菌に対して過剰な免疫反応を引き起こさないように、何らかの機構によって制御されている必要がある。一方で、炎症性腸疾患では腸管マクロファージの腸内細菌に対する免疫制御機構が破綻し、腸内細菌に対し過剰な免疫反応が誘導されることにより病態が形成されると考えられる。

近年、マクロファージは分化誘導因子の違いにより相反する機能を持った 2 つのサブセットに分化することが明らかになった。GM-CSF により分化誘導される GM 型 M $\phi$  は Th1 型免疫応答を誘導する炎症性サイトカイン IL-12、IL-23 を高産生する炎症性マクロファージ、一方で、M-CSF により分化誘導される M 型 M $\phi$  は抑制性サイトカインである IL-10 を産生し抗炎症的に働く抑制性マクロファージであり、各々細菌感染等の外来抗原刺激に対し Th1 免疫反応を誘導す

ることや、免疫反応を抑制することで、感染防御や免疫制御に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、これらのマクロファージサブセットによる腸内細菌認識が炎症性腸疾患の病態にどのように関与しているのかは不明である。我々は、Th1 型の腸炎を自然発症する、抑制性サイトカイン IL-10 の遺伝子欠損マウスを用い、マクロファージによる腸内細菌認識と腸炎誘導メカニズムについて検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1) Wild-type mice 由来 GM, M 型 M $\phi$ の機能解析

Wild-type (WT) mice の骨髄単球より GM-CSF, M-CSF を用い GM, M 型 M $\phi$  を各々分化誘導した。分化した M $\phi$  を LPS, peptidoglycan 等の pathogen associated molecular patterns (PAMPs) および Escherichia coli, Enterococcus faecalis 加熱死菌抗原により刺激し、IL-12, IL-23, IL-10 の産生について検討した。

#### 2) IL-10 knockout (KO) mice 由来 GM, M 型 M $\phi$ の機能解析

IL-10 KO mice 骨髄単球より 1) と同様の方法で M $\phi$  を分化誘導し、PAMPs, 死菌抗原により刺激を行った。

#### 3) 腸管 M $\phi$ の機能解析

WT, KO mice 大腸粘膜固有層より腸管 M $\phi$  を分離し、腸内細菌抗原によるサイトカイン産生について検討した。

#### 4) IL-10 の抑制性 M 型 M $\phi$ 分化に対する影響

IL-10 KO mice の抑制性 M 型 M $\phi$  の分化時に外因的に IL-10 を加える分化誘導を行った。分化誘導後培地中より IL-10 を完全に除去後、腸内細菌に対するサイトカイン産生について検討を行った。