

C. 研究結果および考察

1, 2) WT, KO 由来 GM, M 型 Mφ の機能解析

ヒトにおける報告と同様に、WT mice 由来の GM 型 Mφ は腸内細菌刺激により Th1 型免疫応答を誘導する炎症性サイトカイン IL-12p70 を高産生する炎症性マクロファージ、M-CSF により分化誘導される M 型 Mφ は IL-12p70 を産生せず、抑制性サイトカインである IL-10 を高産生する抑制性マクロファージであった (図 1)。一方、IL-10 KO 由来 Mφ では、炎症性の GM 型 Mφ では IL-12p70 産生能に有意な差は認められなかったのに対し、本来抑制性に働いている M 型 Mφ において腸内細菌抗原刺激による過剰な IL-12p70 の産生が認められた (図 2)。

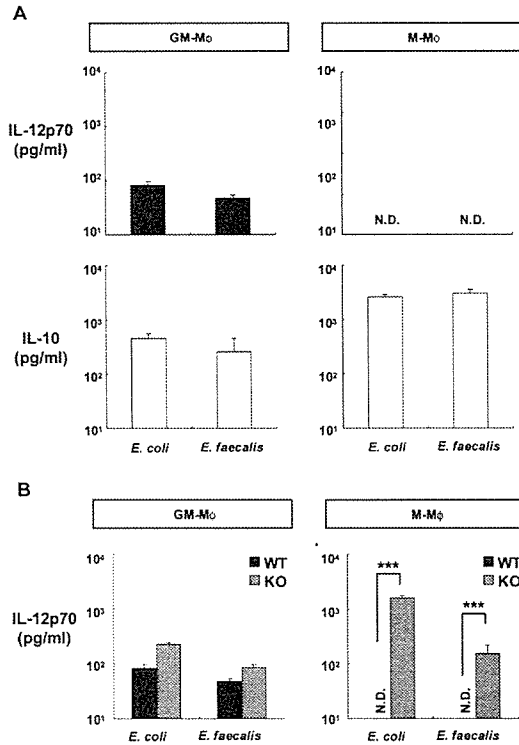


図 1

3) 腸管 Mφ の機能解析

WT mice の腸管 Mφ は腸内細菌抗原刺激により IL-12p70 を産生せず IL-10 を高産生すること、また腸管局所においては M-CSF の発現が GM-CSF に比して優位であることが明らかになった。これは即ち、腸管局所では抑制性のマクロファージである M 型 Mφ が優位に分化誘導され、腸内細菌に対する過度の免疫反応を抑制していることを意味している。一方で、IL-10 ノックアウトマウスにおいて、腸管 Mφ は腸内細菌刺激に対し過剰な IL-12p70 産生を引き起こした (図 2)。

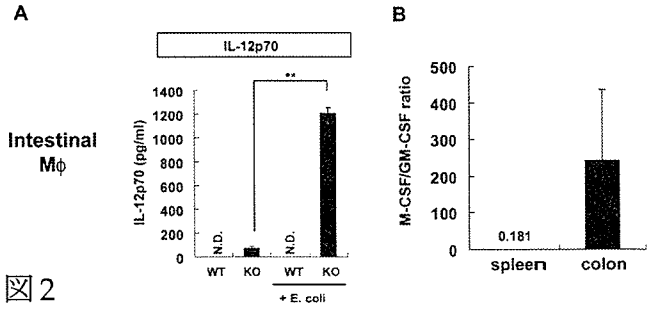


図 2

4) IL-10 の抑制性 Mφ 分化に対する影響

IL-10 KO mice M 型 Mφ の分化段階で外因的に IL-10 を加えることにより、腸内細菌刺激に対する過剰な IL-12p70 産生は抑制された (図 3)。

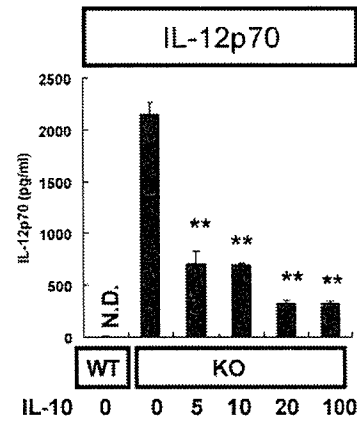


図 3

D. 結論

以上の結果から、炎症性腸疾患のモデルである IL-10 ノックアウトマウスでは内因性の IL-10 産生を欠くため、本来、腸内細菌刺激に対し抑制性に働く腸管マクロファージが IL-12 や IL-23 を過剰産生する炎症性のマクロファージへと異常分化し、Th1 型の慢性腸炎の発症に寄与していることが示唆された。

E. 研究発表

Kamada N et al. Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. J. Immunol. 2005; 175: 6900-6908

腸管上皮幹細胞の純化と機能解析

分担研究者 岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学 教授

研究要旨：Wnt シグナルを可視化したマウス，TOP-GFP マウスを作成し，腸管上皮幹細胞の純化を行った。さらに，これらの細胞を網羅的遺伝子解析を行うことにより新規腸管上皮幹細胞マーカーを同定した。

共同研究者

松崎有未¹⁾ 工藤 明²⁾ 佐藤俊朗³⁾ 伊達昌一³⁾

所属

慶應義塾大学生理学¹⁾

東京工業大学大学院生命理工学²⁾

慶應義塾大学消化器内科³⁾

A. 研究目的

腸管上皮幹細胞を純化し，その機能を解析する

B. 研究方法

腸管上皮幹細胞において Wnt シグナルが特異的に活性化していることを利用し，腸管上皮幹細胞の純化を試みた。具体的には，Wnt により活性化する Tcf4 の結合領域に GFP レポーターを過剰発現させた TOP-GFP マウスを利用した。TOP-GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーにより純化し，細胞表面抗原の発現，リアルタイム PCR による発現遺伝子解析，gene chip array による網羅的遺伝子解析を行った。

(倫理面への配慮)

当大学 遺伝子組み換え，動物実験センターの規定に従って，研究を行った。

C. 研究結果

TOP-GFP は陰窩の幹細胞部位を中心に発現が認められ，活性化型 β -catenin 陽性細胞に強発現していた。フローサイトメトリーにて TOP-GFP 強陽性細胞集団を純化したところ，musashi-1 などの幹細胞マーカーが非常に多く発現していることを確認した。さらに，TOP-GFP 強陽性細胞は多臓器における幹細胞マーカーである，integrin β 1, CD24 などの細胞表面抗原を高発現していた。また，GFP 蛋白の長い半減期のため，GFP をキャリアオーバーした細胞が認められ，これらには 4 系統の上皮細胞（杯細胞，吸収上皮細胞，内分泌細胞，Paneth 細胞）が含まれることから，TOP-GFP 陽性細胞は多分化能をもつことが示唆された。TOP-GFP 強陽性細胞に対して網羅的遺伝子解析を行

い，複数の新規腸管上皮幹細胞マーカー，正常腸管上皮における Wnt 誘導遺伝子を同定した。

D. 考察

Wnt シグナルに注目して，腸管上皮幹細胞の純化を行った。腸管上皮細胞の培養は困難であり，純化した細胞の in vivo, in vitro における増殖・分化能については検討できなかったが，既知の幹細胞マーカーと一致すること，GFP 蛋白のキャリアオーバーによる多分化能を有することが推察されたことから，幹細胞を純化したと考えている。網羅的遺伝子解析により得られた遺伝子は Wnt シグナル抑制因子や癌抑制遺伝子を多く含んでおり，腸管上皮幹細胞の恒常性に関与していると考えられた。また，APC 変異マウスにおいて発現が亢進する遺伝子群も多く含まれており，これらの遺伝子は腸管上皮幹細胞から腺腫，癌化への molecular signature になると考えられる。今後，ノックアウトマウス等を用いてこれらの遺伝子の機能解析を行う予定である。

E. 結論

TOP-GFP マウスを用いることにより，新しい腸管上皮幹細胞の純化システムを構築した。また，TOP-GFP 細胞の解析より正常腸管上皮細胞における Wnt 誘導遺伝子，新規幹細胞マーカーを同定できた。

F. 文献

- 1) Sakatani T, et al. Science 307: 1976-1978, 2005.
- 2) Suzuki K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 328: 348-352, 2005.
- 3) Akasaka Y, et al. Histopathology 47: 348-356, 2005.
- 4) Matsuda Y, et al. Development 132: 2783-2793, 2005.
- 5) Asai R, et al. Dev. Growth Diff. 47: 501-510, 2005.
- 6) Matsumoto T, et al. Gastroenterology. 128:1851-1867,

2005.

- 7) Nagata H, et al. FEBS Lett. 580: 27-33, 2006
- 8) Okano H, et al. Exp. Cell Res. 306: 349-356
(2005)

粘膜再生治療-基礎面から T ヘルパー2 型サイトカイン優位の炎症における再生傷害と大腸発癌

分担研究者 土肥 多恵子 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 部長

研究要旨：消化管の恒常性を保つためには、消化管粘膜特有な細胞回転機構が正常に働くことが重要である。この機構を解明することによって、炎症性腸疾患における組織の荒廃や発癌に対する予防及び診断・治療法を開発することが本研究の目的である。本年度は azoxymethane (AOM) 大腸発癌マウスモデルを用いて、デキストラン硫酸 (DSS) 飲水内投与による大腸炎合併による大腸発癌への影響について検討した。Th2 型サイトカインの発現が亢進している潰瘍性大腸炎のモデルとして IFN- γ ノックアウトマウス (IFN- $\gamma^{-/-}$) マウスを用いた。その結果 AOM+DSS 腸炎による炎症発癌モデルにおいて、野生型マウスに比して Th2 優位である IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスで腫瘍発生頻度の優位な上昇が認められた。浸潤傾向のある腫瘍の発生頻度は野生型マウス 5%、IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスで 17%にとどまり、群間の有意差は認められなかった。免疫組織染色において β -catenin の核移行の頻度は Th2 マウスで優位に高かった。この結果、IL-13 など Th2 型サイトカインが発癌及び腫瘍の進展を促進する可能性が強く示唆された。

共同研究者

中島 淳

所属

横浜市立大学医学部分子消化管内科

A. 研究目的

これまでの研究において我々は過剰な Th2 型サイトカインの存在が、マウス腸炎モデルで上皮再生を障害し、組織再構築の原因となることを示してきた。そこで、Th2 型の免疫応答が特徴となっている潰瘍性大腸炎での発癌機構には、Th2 型サイトカインによる再生傷害が関わっていると推測し、マウスモデルを作成してきた。前年度までに、Th2 型応答優位の IFN- $\gamma^{-/-}$ マウス において、化学発がん物質アゾキシメタン (AOM) 投与に加えてトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 腸炎を誘導することによる炎症発癌は野生型 (WT), Th1 型優位の IL-4 $^{-/-}$ マウスに比して有意に高い頻度を示すことが明らかとなった。Th1 型大腸炎に併発した腫瘍のほとんどが高分化型腺癌であったのに対して Th2 優位のマウスに発生した腫瘍は中分化型腺癌であり、Th2 型大腸炎に併発した腫瘍では、 β -カテニンの核移行の頻度が高いことも明らかとなった。本年度は、短期間で腫瘍形成がみられ、浸潤性の腫瘍の発生も報告されている炎症発癌モデル AOM 投与+デキストラン硫酸 (DSS) 誘導腸炎での検

証を行った。

B. 研究方法

C57BL/6 バックグラウンドの WT, IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスを用いた。AOM (10 mg/kg) を腹腔内投与後、一週間から飲水を7日間3.5%DSSとした。さらに9週後、3.5%DSSを5日間投与し、20週後に大腸摘出して病理学的検索を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は施設の規則に基づき動物愛護を考慮した計画とし、委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

20週後の腫瘍発生頻度は、WT マウス 5.6 \pm 2.9 個/マウス (N=9) に対して IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスでは 16.5 \pm 6.7 個/マウス (N=8) と優位に高かった (P<0.05)。腫瘍サイズには優位差は認められなかった。腫瘍病変のうち、粘膜筋板をこえて浸潤傾向のある腫瘍の発生頻度は野生型マウス 5% (2/40)、IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスで 17% (7/42) であったが、群間の有意差は認められなかった (P=0.08)。組織型では Wt マウス腫瘍の 42% が高分化型であったのに対し、IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスでは 83% の腫瘍が低分化型であった。さらに、 β -カテニン染色を行った結果 WT マウスに発生した腫瘍では膜と核内の両方が染色されるもの、膜のみ染色され

るもの、及び陰性ものが大半で、核のみ染色されるものは、30%であった。これに対して、IFN- γ ^{-/-} マウスの腫瘍では、核のみが染色されるものが73%をしめた。

D. 考察

TNBS 腸炎と同様、DSS 腸炎の誘導によって、Th2 優位なマウスにおける AOM 発癌は著しく促進された。抗 IFN- γ 抗体を用いた実験結果および in vitro の実験に等により、IFN- γ の欠損による腫瘍サーベイランス機能の欠陥ではではなく、Th2 型サイトカインの一つ IL-13 が特に上皮細胞の回転や β -カテニンの細胞内分布に影響していると考えられる。

E. 結論

大腸の炎症発癌機構においては、IL-13 など Th2 型サイトカインにが発癌及び腫瘍の伸展促進に働いている可能性が強く示唆された。

F. 文献

1. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, Dohi T.

Predominant T Helper Type 2-Inflammatory Responses Promote Murine Colon Cancers. *Int J Cancer* 2006;118:2232-2236.

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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許出願中 1件

IL-13 シグナリング阻害による消化管粘膜傷害治療法

特願 2005-18694 (2005年6月24日), 2005-243429 (2005年8月24日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

粘膜再生治療-基礎面から アクチビンCの機能に関する検討

協力研究者 小島 至 群馬大学生体調節研究所 教授

研究要旨：アクチビンにはA、AB、B、C、Eなど多くのサブタイプがあるが、中でもアクチビンCの機能については不明な点が多い。そこでアクチビンCが多く発現している肝臓における機能を明らかにする目的で、アデノウイルス・ベクターを用いてアクチビン β cサブユニットを肝臓に発現させ、肝再生に与える影響を検討した。その結果、 β cサブユニットの過剰発現により肝再生が促進されることが明らかになった。

A. 研究目的

TGF- β スーパーファミリーに属する活性因子アクチビンは上皮細胞・間葉系細胞の機能を調節し、上皮細胞の増殖・分化を調節するだけでなく、間葉系細胞の活性化を通じて臓器の線維化に関与している。アクチビンはインヒビン β サブユニットの二量体であり、 β サブユニットには β A、 β B、 β C、 β Eの4種類があることから、その組み合わせにより様々なアクチビンが存在することになる。中でも β Cは主に肝臓に発現している。正常肝における β Cの発現は高いが、肝再生の際には発現が低下し、再生が終了すると再び発現が増加する。この発現パターンは肝再生を抑制的に調節することが知られている β Aサブユニットと鏡像的であり、 β Cが β Aとは異なる機能をもつのではないかと推測される。実際、我々は β Cのホモ二量体であるアクチビンCが肝細胞の増殖促進作用をもつこと¹⁾を報告しているが、一方これとは逆にアクチビンCが肝細胞の増殖を抑制するという報告²⁾もあり、意見の一致を見ていない。そこで、この点をさらに明らかにするとともに、肝再生におけるアクチビンCの意義を明らかにする目的で、アデノウイルスベクターを用いて β Cサブユニットを肝臓に過剰発現し、肝再生に対する影響を検討した³⁾。

B. 研究方法

β CおよびコントロールとしてLacZ遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作製した。ウィスター系雄ラット尾静脈からアデノウイルスベクターを注入し、肝臓に発現させた。ウイルス注入の4日後常法に従い70%肝切除を行った。様々な時間の後に残存肝および血清を採取し、その残存肝重量、組織像、BrdU染色、生化学的パラメーターの測定を行った。肝組織抽出物を用いて、アクチビンサブユニ

ット蛋白の発現をウエスタンブロット法により測定した。

(倫理面への配慮)

群馬大学生体調節研究所動物実験倫理規定に基づいて行われた。

C. 研究結果

アデノウイルスベクターを尾静脈から注入することにより主として肝臓に遺伝子を導入できた。注入3日後には約20%の肝細胞が導入遺伝子の蛋白を発現し、7日後には40%以上の肝細胞が陽性像を示した。そこで、遺伝子導入の4日に70%肝切除を行った。

β C遺伝子およびコントロールとしてLacZ遺伝子を導入し、70%肝切除を行い、肝再生を比較した。 β C導入群ではコントロール群に比較してBrdU陽性細胞数が切除後24時間後および48時間後にほぼ2倍と著明に増加していた。また残存肝重量およびFishbackの肝再生率も切除後96時間後および120時間後に有意に増加していた。肝切除24時間後に採取した組織においてBrdU陽性細胞と β C蛋白の発現を検討すると、BrdU陽性細胞の多くは β C蛋白を発現しているかあるいは隣接する細胞が β c蛋白を発現していた。ウエスタンブロット法により、導入した β Cサブユニットはホモ二量体すなわちアクチビンC、あるいは β Aとヘテロ二量体すなわちアクチビンACを形成していた。

D. 考察

アクチビンA(β Aのホモ二量体)は肝細胞に発現するオートクリン因子で、肝再生を抑制する因子として機能している。 β Cサブユニットの発現は β Aとは鏡像的であり、その機能は β Aとは異なるのではないかと推定される。今回、 β C遺伝子をアデノウイルスベクターを用いて肝臓に導入し、その肝再生に対する

影響を検討した。 β C 遺伝子を導入した肝臓においては、LacZ 遺伝子を導入したコントロール群に比較して、肝細胞の DNA 合成が促進され、肝再生率も増加し、残存肝重量も増加を示した。実際、BrdU 陽性細胞が β C 遺伝子導入肝細胞やそれに隣接する肝細胞に観察されたことから、 β C サブユニットがホモ二量体アクチビン C を形成し、オートクリン因子あるいはパラクリン因子として機能している可能性が示唆される。一方、ヘテロ二量体であるアクチビン AC の形成も認められたことから、一部の作用は、 β C 過剰発現によりアクチビン A の形成が阻害されることにより発現されている可能性も考えられた。

E. 結論

今回、アクチビン C の肝臓とくに肝再生における機能を明らかにする目的で、もっとも一般的である 70% 肝切除ラットにアデノウイルスベクターを用いて β C サブユニットを導入し、その効果を検討した。アクチビン C はアクチビン A とは異なり、肝再生に促進的な役割を果たしていることが示唆された³⁾。

F. 文献

- 1) Wada, W., Maeshima, A., Zhang, Y. Q., Hasegawa, Y., Kuwano, H., Kojima, I. (2004) Assessment of the function of the \cdot c subunit of activin in cultured hepatocytes. *Am J. Physiol.* 287: E247-E254.
- 2) Chavikovski, M., Herkner, K., Rosmanith, W. (2003) Overexpression of activin \cdot C or \cdot E in the liver inhibited regenerative deoxyribonucleic acid synthesis of hepatic cells. *Endocrinology* 144:3497-3504.
- 3) Wada, W., Medina, J., Hasegawa, Y., Kuwano, H., Kojima, I. (2005) Adenovirus-mediated overexpression of the activin \cdot C subunit accelerates liver regeneration in partially hepatectomized rats. *J. Hepatol.* 43:823-828.

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

DSS 腸炎における骨髄間葉系幹細胞治療

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学 学長

研究要旨：急性 GVHD を発症した患者の消化管には，ドナー由来の骨髄細胞が存在すると報告されている。しかし，これらの細胞の由来，役割やその転帰は明らかではない。DSS 腸炎モデルにおける，細胞治療としての MSC の効果を検討し，腸管におけるドナー由来の MSC の有無を検討することを目的とした。

共同研究者

矢花 崇 有村佳昭 後藤 啓 中原生哉
田中道寛 篠村恭久

所属

札幌医科大学第一内科

ものと考えられた。

E. 結論

DSS 腸炎においてもドナー由来 MSC は腸管局所に動員されにもかかわらず，明らかな治療効果を認めなかった。今後，動員された MSC の定量的検討，腸管内の分布を検討，他の腸炎モデルでの治療効果の検討などを合わせて行っていく。

F. 文献

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

A. 研究目的

間葉系幹細胞 (MSC) は，再生医療の細胞のソースとして有力視されている。DSS 腸炎モデルにおける，細胞治療としての MSC の効果を検討し，腸管におけるドナー由来の MSC の有無を検討した。

B. 研究方法

ラット MSC を分離・培養した。Balb/c マウスに 10%DSS を自由飲水させ致死的腸炎を誘発。day1, day2, day3 に，MSC を $10^4/g$ を静注し，その治療効果をみた。次に gender mismatch MSC を 5%DSS 腸炎マウスに予防投与し，sex determination region on the Y chromosome (sry) 特異的 PCR 法を用いて経時的に検討した。

(倫理面への配慮)

札幌医科大学動物実験の指針に則り行われた。

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

C. 研究結果

10%DSS 腸炎モデルに対する MSC の治療効果 (体重変化，生存率) は得られなかった。腸炎発症直後の day4 の腸管では，DSS 非投与群に比べて，投与群において sry 遺伝子の発現が著明に認められた。Day8 では，DSS 投与群の腸管では発現が低下し，逆に非投与群では亢進した。

D. 考察

ドナー由来 MSC は腸炎発症直後の腸管にレスキュー細胞として動員された。しかし，DSS 腸炎では，MSC は長く生着出来ずに消失し，その免疫能抑制効果を失うため，腸炎に対する治療効果が得られなかった

炎症性腸疾患患者のプロテオーム解析と 実験大腸炎モデルに対する HGF の作用機序解析

分担研究者 坪内 博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 健康科学専攻人間環境学講座
消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨：現在、難治性肝疾患、特に劇症肝炎患者に対して遺伝子組み換え型ヒト肝細胞増殖因子（rhHGF）を用いた医師主導型治験が進められている。今後、炎症性腸疾患の腸粘膜再生治療を目的として、HGF の臨床応用も期待されており、炎症性腸疾患の動物モデルを用いた HGF の効果および作用機序の解明は臨床応用する上で極めて重要である。我々はこれまでに、実験大腸炎モデル（DSS 腸炎、TNBS 腸炎）ラットに対して、rhHGF を腹腔内持続投与もしくは尾静脈投与すると病理学的に病態進展は軽減され、その効果は消化管粘膜細胞の増殖促進作用と抗炎症作用によることを明らかにしている。本年度はその作用機序をさらに詳細に明らかにするために、DNA マイクロアレイ解析を行い、特に抗アポトーシス関連遺伝子に着目して検討した。DNA マイクロアレイ解析では DSS 腸炎もしくは TNBS 腸炎ラットの大腸粘膜での遺伝子発現プロファイルは異なっているものの、発現が増強もしくは低下する遺伝子が多数検出され、その発現の一部は rhHGF 投与により改善した。さらにその中にはアポトーシス関連遺伝子が含まれていたが、2つのモデルで共通する遺伝子の発現変動はほとんどなく、抗アポトーシス関連遺伝子の発現と rhHGF 投与による病態改善との関連が示唆されるような変化は見出せなかった。さらに、本年度は炎症性腸疾患の診断マーカー、病態進展マーカーの探索を目的として、潰瘍性大腸炎患者の血清を用いてプロテオーム解析を行い、診断や病態進展マーカーとなる可能性がある蛋白質を同定した。症例を蓄積し、マーカーとしての有用性や病態との関連性をさらに検討する予定である。

共同研究者

沼田政嗣¹⁾ 宇都浩文¹⁾ 児玉眞由美¹⁾ 安倍弘生¹⁾

上村修司¹⁾ 井戸章雄²⁾

所属

宮崎大学医学部内科学第二講座¹⁾
京都大学医学部附属病院探索医療センター²⁾

A. 研究目的

DNA マイクロアレイと SELDI (=Surface Enhanced Laser Desorption/ Ionization) プロテインチップシステムは網羅的に遺伝子発現もしくは蛋白発現プロファイルを検討できる。本研究では、炎症性腸疾患に対する HGF 治療の確立を目指して DSS および TNBS 腸炎ラットに rhHGF を静脈投与し、その作用機序を明らかにするために DNA マイクロアレイ解析を行った。また、炎症性腸疾患の新規診断マーカー、病態進展マーカーの探索を目的としてプロテインチップシステムを用いて患者血清を解析した。

B. 研究方法

1. 消化管粘膜再生における HGF の作用機序の解明。
 - 1-① A) 7 週齢の Wistar ラット（雄）に 5% DSS 溶液を 4 日間自由飲水させ、腸炎を誘発した。B) 7 週齢の Wistar ラット（雄）に TNBS を経肛門的に注入し、腸炎を誘発した。
 - 1-② A) DSS 投与開始日から、rhHGF を 0.5mg/kg/日、尾静脈より投与し、コントロール群には PBS を投与した。B) TNBS 腸炎誘発 5 日後より、rhHGF を 1.0mg/kg/日、尾静脈より投与し、コントロール群には PBS を投与した。
 - 1-③ A) DSS 投与開始 4 日目に両群を屠殺し、大腸粘膜から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。B) TNBS 投与開始 6 日目に両群を屠殺し、大腸粘膜から RNA を抽出した。
 - 1-④ DNA マイクロアレイ解析では、抗アポトーシスに関連する遺伝子群に着目して、HGF 投与群と PBS 投与群で比較した。また、DSS 腸炎モデルと TNBS 腸炎モデルにおける抗アポトーシス関連遺伝子の発現を比較検討した。

2. 炎症性腸疾患の新規診断マーカー及び病態進展マーカーの探索

- 2-① 潰瘍性大腸炎患者 4 名、健常者 4 名の血清を用いてプロテオーム解析を行った。
- 2-② 免疫沈降反応法などを用いてピーク蛋白の同定を行った。
- 2-③ 上記で同定した蛋白質 A の患者血漿濃度（治療前、治療後）を、ELISA 法を用いて検討した。

C. 研究結果

1. 消化管粘膜再生における HGF の作用機序の解明。
今までに、DSS 腸炎モデルにおいて、HGF 投与により、Bcl-xL の発現が増強されることを Western Blot 法にて確認しており、HGF の粘膜修復の作用機序のひとつに大腸粘膜のアポトーシス抑制が関与している可能性が考えられた。これらのことから、DSS 腸炎と TNBS 腸炎について、抗アポトーシス関連遺伝子に着目して、DNA マイクロアレイ解析を行った。DSS 腸炎モデルと TNBS 腸炎モデルでは、遺伝子発現が増強もしくは減弱する遺伝子は異なっていた。また、HGF 投与群、PBS 投与群間に発現の差が認められた遺伝子群のうち、抗アポトーシス関連遺伝子は大きく変動せず、また、2つのモデルで共通して発現変動する遺伝子は見出せなかった。

2. 炎症性腸疾患の新規診断マーカー及び病態進展マーカーの探索。

潰瘍性大腸炎患者血清と健常者血清を用いてプロテオーム解析を行い、2群間に有意差のある 5 種類の蛋白質ピークを認めた。有意差の見られた蛋白質のうち 1 つの蛋白質は免疫沈降法などを用いて同定した。同定した蛋白質 A について、潰瘍性大腸炎患者の緩解導入前、導入後の血漿中濃度を ELISA 法で測定したところ、緩解導入前の潰瘍性大腸炎患者では、健常者と比較して有意に濃度が上昇していた。また、蛋白質 A の血漿中濃度は、緩解導入後には低下する傾向が認められた。

D. 考察

肝細胞増殖因子（HGF）は上皮細胞に対する増殖促進作用のみならず、抗アポトーシス作用など多くの生理活性を有している。炎症性腸疾患では HGF 投与が腸粘膜上皮細胞に対して増殖を促進し、粘膜修復を促進するのみならず、抗アポトーシス作用を介した病態進展阻止などの効果をもたらすことが期待される。また、臨床応用に際しては HGF の作用機序、薬効及び副作用の詳細な解析が必要であり、そのような検討には網羅的な遺伝子・蛋白発現解析が有用と考えられる。我々は今までに DSS 腸炎ラットにおいて、rhHGF を腹腔内に持続投与もしくは経静脈単回連日投与し、腸粘膜上皮細胞の増殖促進作用と HGF による抗炎症作用、Bcl-xL の発現促進を介した抗ア

ポトーシス作用の可能性を明らかにした。そこで、今年度は抗アポトーシスに関連した遺伝子群について、前年度に引き続き、DNA マイクロアレイ解析を用いて検討した。DSS 腸炎ラット及び TNBS 腸炎ラットを用いて検討したが、抗アポトーシスに関連した遺伝子群の遺伝子発現は 2 つのモデル間で異なり、HGF 投与により大きく変動せず、HGF の作用と抗アポトーシス作用の関連性を十分明らかに出来なかった。しかし、DSS 腸炎と TNBS 腸炎における腸粘膜の遺伝子発現プロファイルは異なっており、炎症性腸疾患の病態や HGF の作用機序を解明する上では興味ある結果と考えられ、今後も検討を継続する予定である。

また、本年度から炎症性腸疾患の新規診断マーカー、病態進展マーカーの探索を目的としてプロテオーム解析を行った。解析数が少ないものの潰瘍性大腸炎患者血清中に、健常者と比較して有意差のある蛋白質ピークを数種類認めた。さらに 1 つの蛋白質ピークについては蛋白質の同定を行い、潰瘍性大腸炎の診断及び病態評価のマーカーとして有用である可能性が示唆された。今後、更に症例を蓄積し、検討を重ねていく予定である。

E. 結論

2 つの大腸炎モデルに対して HGF 投与群、PBS 投与群間に発現の差が認められた遺伝子群のうち、抗アポトーシス関連遺伝子は大きく変動せず、HGF の作用と抗アポトーシス作用の関連性を十分明らかに出来なかった。また、炎症性腸疾患の新規診断マーカー、病態進展マーカーの探索を目的としてプロテオーム解析を行い、蛋白質の同定を行い、潰瘍性大腸炎の診断及び病態評価のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

F. 文献

1. 論文発表

- 1) Numata M, Ido A, Moriuchi A, Kim II, Tahara Y, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Miyata Y, Uto H, Tsubouchi H: Hepatocyte growth factor facilitates the repair of large colonic ulcers in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis.* 11: 551-558, 2005.
- 2) Uto H, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Yamagishi T, Gohda E, Tsubouchi H: Development of a rapid semi-quantitative immunochromatographic assay for serum hepatocyte growth factor and its usefulness in acute liver failure. *Hepatol Res.* 33: 272-276, 2005.
- 3) Ido A, Numata M, Kodama M, Tsubouchi H: Mucosal repair and growth factors: recombinant human

- hepatocyte growth factor as an innovative therapy for inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 40: 925-931, 2005. (review)
- 4) Hasuike S, Ido A, Uto H, Moriuchi A, Tahara Y, Nagata K, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H: Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation and differentiation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. J Gastroenterol Hepatol. 20: 1753-1761, 2005.
 - 5) Toyama T, Ido A, Sasaki H, Maeda K, Yamashita K, Kubuki Y, Suzuki M, Matsuoka H, Tsubouchi H: Possible involvement of neutrophils in a serum level increase of hepatocyte growth factor in non-Hodgkin's lymphoma. Oncol Rep. 13: 439-44, 2005.
 - 6) 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, 2005.
 - 7) 井戸章雄、森内昭博、金一徳、宇都浩文、坪内博仁: HGFによる劇症肝炎の治療-トランスレーションリサーチの現況-. 最新医学. 60: 830-836, 2005.
 - 8) 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: 167-170, 2005.
 - 9) 井戸章雄、沼田政嗣、児玉眞由美、坪内博仁: 再生医学的アプローチからの新規治療法の開発-組換えヒトHGFを用いた傷害粘膜再生・修復療法-. 日本消化器病学会雑誌. 102: 1139-1145, 2005.
2. 学会発表
 - 1) Numata M, Ido A, Tahara Y, Sasaki F, Kanmura S, Tsubouchi N, Abe H, Nakanishi C, Yamamoto S, Miyata Y, Moriuchi A, Kim I, Uto H, Tsubouchi H: Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental rat models of colitis. Digestive Disease Week 2005
 - 2) 井戸章雄、森内昭博、坪内博仁: 劇症肝炎、肝不全治療のあり方-診断から治療へ-: 劇症肝炎に対する組換えヒト肝細胞増殖因子による第I・II相臨床試験への取り組み. 第9回日本肝臓学会大会 2005年
 - 3) 井戸章雄、森内昭博、金一徳、坪内博仁: 肝再生と再生医療: 組み換え型ヒトHGFの臨床応用-医師主導型治験としての取り組み. 第41回日本肝臓学会総会 2005年
 - 4) 沼田政嗣、中西千尋、宇都浩文、安倍弘生、上村修司、黒木穰二、森内昭博、児玉眞由美、林克裕、井戸章雄、坪内博仁: ラット大腸発癌モデルの腫瘍発生に及ぼすHGFの影響. 第16回日本消化器癌発生学会総会 2005年
 - 5) 安倍弘生、森内昭博、宇都浩文、山本章二郎、沼田政嗣、中西千尋、上村修司、楠元寿典、宮田義史、林 克裕、井戸章雄、坪内博仁: 肝細胞増殖因子(HGF)の硫酸デキストラン実験腸炎に対する作用機序の検討. 第47回日本消化器病学会大会 2005年
 - 6) 金 一徳、井戸章雄、森内昭博、沼田政嗣、坪内佳子、田中紘一、坪内博仁: ミニプタ肝切除モデルを用いたHGF持続門脈内投与法の検討. 第9回日本肝臓病学会大会 2005年

粘膜再生治療-基礎面から 腸管粘膜上皮再生における肝細胞増殖因子活性化因子の役割

協力研究者 片岡 寛章 宮崎大学医学部病理学講座 腫瘍・再生病態学分野 教授

研究要旨：消化管粘膜の再生修復において、肝細胞増殖因子 (HGF) が重要な役割を果たすことが示唆されている。HGF は間葉系の細胞から分泌され、傷害組織において HGF 活性化酵素によって非活性型から活性型へ効率良く変換される。この HGF 活性化酵素による HGF の活性化は細胞膜結合型インヒビターである HGF activator inhibitor type 1 (HAI-1) による調節を受けており、HAI-1 も消化管上皮に強く発現している。HAI-1 の生体内意義を検討するために、HAI-1 遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス) を作成した。この結果、HAI-1 ノックアウトマウスは胎生致死であり、その致死要因は胎盤ラビリンス層の形成不全であることを見出した。すなわち、HAI-1 は細胞分化・形態形成において予想外の重要な機能を有している可能性がある。また HAI-1 類似のインヒビターである HAI-2 の遺伝子構造について研究する過程で、HAI-2 遺伝子の下流に存在する新規ペプチド遺伝子を同定し、H2RSP (HAI-2-related small peptide) と名付けた。H2RSP は消化管粘膜上皮細胞に強く発現しており、分子内に核移行シグナルを有していた。H2RSP に対する特異的な抗体を用いた検討により、H2RSP は大腸粘膜上皮の分化・増殖停止に伴って核に移行すること、そして粘膜傷害後の再生上皮細胞においては H2RSP の核移行が認められず細胞質内にとどまることを見出した。また大腸癌においては発現が有意に低下するにも関わらず、浸潤先端部において強い間質浸潤を示す癌細胞において強発現していた。

A. 研究目的

消化管粘膜上皮の再生修復において、肝細胞増殖因子 (HGF) が上皮細胞の遊走、増殖、分化に大きな役割を果たしていることが明らかになってきた。しかし、HGF は非活性型蛋白として分泌されており、傷害粘膜局所で血中の酵素 (HGF activator: HGFA) や上皮細胞膜上の酵素 (matriptase や hepsin) によって活性化される必要がある。我々はこれまで、血中の HGFA 前駆体蛋白が傷害消化管粘膜組織で活性型 HGFA へ変換され、傷害局所において HGF を効率良く活性化し、粘膜再生に重要な役割を發揮することを報告してきた。

これらの HGF 活性化酵素は、上皮細胞の細胞膜結合型プロテアーゼインヒビターである HGFA inhibitor (HAI) によって調節されている。これらの HGF 活性化酵素 (HGFA, matriptase, hepsin) には共通の内因性インヒビターが存在しており、それは HAI (HGFA inhibitor) と呼ばれる細胞膜結合クニッツ型プロテアーゼインヒビターである。これまでに 2 種類の HAI 蛋白 (HAI-1 および HAI-2) が同定されている。共に大腸をはじめとする消化管粘膜上皮に高発現しており、HAI は粘膜上皮細胞周囲微小環境における HGF 活性化調節において中心的な役

割を担っている可能性が高い。なお細胞膜上において実際に HGFA と結合するのは HAI-1 であり、また生体内における matriptase のインヒビターも HAI-1 であると考えられている。一方、hepsin に対する抑制効果は HAI-1 よりも HAI-2 の方が強い。

本研究では HAI-1 の生体内意義を明らかにするために、HAI-1 ノックアウトマウスを作成し解析した。また HAI-2 を研究する過程で見出した新規の核移行ペプチドである H2RSP (HAI-2-related small peptide) の大腸粘膜における発現と機能の解析も行った。

B. 研究方法

HAI-1 遺伝子のエクソン 5-11 の領域をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを作成し、常法どおり ES 細胞に遺伝子導入し、生まれたキメラマウスを交配させることによって HAI-1 ノックアウトマウスを作成した。この方法では HAI-1 の主要なドメイン (2 個のクニッツインヒビタードメイン、LDL 受容体様ドメイン、細胞膜貫通ドメイン) がすべて破壊され、機能的 HAI-1 は欠損する。

H2RSP の機能解析のために抗 H2RSP 抗体を作成し、正常大腸粘膜、IBD 症例の大腸粘膜、および大腸癌組

織の免疫組織学的検討を行った。また、H2RSP 強制発現プラスミドを作成し、培養細胞に導入してその影響を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては施設の規定に従い機関承認を得た上で、動物愛護に十分考慮して行なった。また、組み換え DNA 実験に関しては、指針・法令に従い、機関承認を得たうえで規定に従って行なった。人体材料を用いた遺伝子発現検討は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従い、宮崎大学医学部倫理委員会の審査と承認のもとに行なった。

C. 研究結果

HGF およびその受容体である MET のノックアウトマウスは共に肝臓及び胎盤の形成不全により胎生致死であることが既に報告されている。HAI-1 ノックアウトマウスもやはり胎生約 10.5 日で致死であった。胎仔を詳細に検討したところ、HAI-1 ノックアウトマウスにおいては胎盤ラビリンス層が選択的に形成されていなかった。HGF と MET のノックアウトマウスも胎盤迷宮層の形成異常を示すことが知られているが、致死期は E12.5 から E14.5 にかけてであり、明らかに HAI-1 ノックアウトマウスの方が早期に致死となる。また迷宮層形成障害の程度もより強いことから、HAI-1 には HGF の活性化調節以外の重要な生体内機能が存在すると考えられる。HGFA ノックアウトマウス、更には matriptase と hepsin のノックアウトマウスも胎盤には異常がみられないことも、HAI-1 の有する HGF 活性化調節以外の予想外の重要な生体内機能、ないしは想定外の標的酵素の存在を示唆している。

HAI-1 ノックアウトマウスが胎盤機能不全により胎生致死となることから、HAI-1 の消化管における機能を解析するためにはコンディショナルノックアウト系を構築するか、ホモマウスにおいて胎盤機能をレスキューする必要がある、現在これらの実験を行なっている。

HAI-2 の遺伝子構造を解析する過程で、HAI-2 遺伝子の下流に存在する新規の核移行ペプチドを見出し、H2RSP と名づけた。H2RSP は消化管上皮に発現しており、上皮細胞の分化に伴い核に移行することが示唆された。IBD 大腸粘膜において再生中の上皮においては、この核移行は観察されなかった。一方、大腸癌細胞では H2RSP の発現そのものが低下していた。しかし浸潤先端部の癌細胞においては、特に sprouting を示す細胞で H2RSP 発現が亢進しており、その局在は再生上皮細胞と同様に主に細胞質に認められた。更に大腸癌浸潤先端部における H2RSP 陽性細胞の数が多き症例では、有意にリンパ節転移が多い傾向が認められた。

D. 考察

強い炎症や組織障害後の消化管粘膜上皮再生には HGFA による局所での HGF の活性化が大きな役割を果たしていることをこれまでに証明してきた。HGFA をはじめとする HGF 活性化酵素は、細胞膜表面に存在している HAI (特に HAI-1) によって活性調節をうけていることから、本研究では HAI-1 の生体内機能の解明を目的として、HAI-1 ノックアウトマウスの作成とその解析を行った。また、HAI の研究の過程で見出した新規核移行蛋白質、H2RSP の第腸粘膜再生と癌における発現と機能の解析も行った。

HAI-1 ノックアウトマウスは胎生約 10.5 日で致死であり、それは胎盤ラビリンス層形成不全にともなう胎盤機能不全によるものであった。HAI-1 類似の蛋白質である HAI-2 も胎生早期に致死であること、HGF ノックアウトマウスが胎生 12.5-14.5 日で致死であることから、HAI-1 と HAI-2 は互いに代償し得ない、極めて重要な機能があり、それは HGF の活性化調節とは別のものである可能性が高い。HAI-1 が消化管上皮に強く発現していることから、この蛋白質の新たな機能を解明することは、消化管粘膜再生の分子機構を理解するうえで、重要なことであると考えられるが、今回のノックアウトマウスではその目的を達することができなかった。現在、胎盤機能をレスキューすることで、HAI-1 欠損マウスの消化管における機能を検討する実験を遂行中である。これまでのところ、胎盤機能をレスキューすることにより HAI-1 欠損マウスは出生することが分かり、ノックアウトマウスの胎生致死原因が胎盤機能不全であることが確認できた。興味深いことに、出生してきた HAI-1 欠損マウスは極めて発育が悪く、離乳前に致死となる。詳細は現在検討中である。

また、新たに見出した核移行蛋白 H2RSP も消化管粘膜上皮細胞に強く発現しており、細胞の分化と共に核に移行する。IBD 患者における再生大腸粘膜においては、H2RSP の上皮細胞への核移行が抑制されており、H2RSP の機能解明もやはり、消化管粘膜再生の分子機構を理解するうえで重要であると考えられる。

E. 結論

HAI-1 のノックアウトマウスを作製し、解析した。その結果、HAI-1 は胎盤の branching morphogenesis に必須であることが明らかとなり、これは HGF の活性調節とは別の機序によるものであると考えられた。HAI-1 の機能については今後の検討が必要である。HAI-1 は消化管上皮細胞に強発現しており、これらの細胞において、予想外の重要な役割を有していることが十分想定できる。今後の解析のためには、胎盤機能をレスキューした HAI-1 欠損マウスの作成と解析および腸上皮において選択的に HAI-1 が欠損した

コンディショナルノックアウト系の作成が必須である。また、消化管上皮の分化、再生、増殖に関与する可能性のある核移行蛋白質 (H2RSP) を見出した。

F. 文献

1. 論文発表

- 1) Tjin, E. P. M., Bebbe, R. J., Derksen, P. W. B., Van Huijstee, A-P., Kataoka, H., Spaargaren, M., Pals, S. T.: Follicular dendritic cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation in the germinal center microenvironment by secreting the serine protease HGF activator. *J. Immunology*, 175:2807-2813 (2005).
- 2) Tanaka, H., Nagaike, K., Takeda, N., Itoh, H., Kohama, K., Fukushima, T., Miyata, S., Uchinokura, S., Shimomura, T., Miyazawa, K., Kitamura, N., Yamada, G., Kataoka, H.: Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) is required for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Mol. Cell. Biol.*, 25:5687-5698 (2005).
- 3) Naganuma, S., Itoh, H., Uchiyama, S., Nagaike, K., Tanaka, H., Akiyama, Y., Chijiwa, K., Kataoka, H.: Nuclear translocation of H2RSP is impaired in regenerating intestinal epithelial cells of murine colitis model. *Virchows Archiv*, 448:354-360 (2006).

2. 学会発表

- (1) Nagaike, K., Tanaka, H., Kohama, K., Fukushima, T., Naganuma, S., Uchiyama, S., Itoh, H., Kataoka, H.: Roles of integral membrane Kunitz-type serine proteinase inhibitor,

HAI-1, in the invasive cell behavior. 96th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Anaheim, CA) (2005).

- (2) Uchiyama, S., Itoh, H., Naganuma, S., Nagaike, K., Tanaka, H., Chijiwa, K., Kataoka, H.: Expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2 related small peptide (H2RSP) in human gastrointestinal tissues including adenoma-carcinoma sequence. 96th Annual Meeting of American Association of Cancer Research (Anaheim, CA) (2005).
- (3) 福島 剛、田中弘之、長池幸樹、長井美由紀、秋山 裕、伊藤浩史、片岡寛章: HAI-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1) ノックアウトマウスの解析 (II): HAI-1 は胎盤の branching morphogenesis に必須である. 第 94 回日本病理学会総会 (横浜) (2005) .
- (4) 内山周一郎、伊藤浩史、千々岩一男、片岡寛章: Adenoma-carcinoma sequence を含めたヒト大腸組織における HAI-2 Related Small Peptide (H2RSP) の機能解析. 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌) (2005) .

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

粘膜上皮再生を標的とした炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発

分担研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：本研究では腸管上皮に備わる特異的な細胞分化調節機構、および骨髄細胞による上皮再生メカニズムを解析した。腸管上皮に備わる特異的な分化・再生機構に関する我々独自の知見を集約し、腸管上皮に備わる特異的な分化・再生機構に関する解析の結果、Notch シグナルによる腸管上皮細胞の分化制御機構の存在のみならず、上皮再生を制御する新規シグナル伝達経路の存在を見出した。さらに骨髄細胞による腸管外細胞の上皮再生機構の解析から、骨髄由来分泌型腸管上皮細胞への分化誘導を促進する腸管内分化調節機構が存在し得る可能性が示された。これらの成果は、重篤な組織破壊と再生機構の破綻を来す難治性炎症性腸疾患に対し、細胞内シグナル分子を標的とした分化/再生誘導療法、および骨髄由来細胞の動員を利用した細胞療法など、腸管特異的な細胞分化機構を集約した多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 大島 茂 山崎元美 土屋輝一郎
金井隆典

所属

東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

れまでの研究成果を発展させ、1) 腸管上皮細胞の分化制御における Notch シグナルの新規機能の探索、および 2) 腸管上皮の組織修復に関わる骨髄由来上皮細胞の分化誘導機構の解明、をおこなうことを目的とした。

B. 研究方法・結果

1) ヒト内視鏡下生検組織およびヒト大腸癌由来培養細胞を用い、上皮細胞分化形質と Notch シグナル活性化の関連を解析した。その結果、a) 杯細胞消失、パネート細胞化生など分化形質制御の異常を呈する慢性大腸炎病変部に一致して、Notch シグナル構成分子の異常発現が局在することを見出した。b) また、我々が独自に樹立した、培養細胞を用いた恒常的な Notch シグナル活性化の誘導系と、マイクロアレイ解析の併用により、Notch シグナルの恒常的な活性化が種々の腸管上皮分化マーカーの発現を mRNA レベルで制御していることを見出した（いずれも未発表データ）。

2) 男性ドナーより同種骨髄移植を受けた女性レシピエントより経時的に採取した内視鏡生検組織検体を解析した。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、および同一切片を用いた二重染色法を行い、ドナー骨髄由来腸管上皮細胞を同定する解析法を樹立した。さらに同法を用いて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) 全消化管（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の分布を認めた。b) 骨髄由来腸管上皮細胞は GVHD の回復期小腸

A. 研究目的

本研究は代表者らがこれまでの研究成果から独自に見いだした、腸管上皮のみに内在する特異的な再生機構の追究と、それを利用した組織再生誘導を促す炎症性腸疾患に対する新規治療法の確立を最終的に目指すものである。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、その発症と病態の維持に粘膜上皮の再生機構の破綻が深く関わるが、その詳細な分子機構はいまだ解明されていない。従って、従来腸管上皮再生を促進する標的細胞・分子を明確に定めた特異的な再生療法の確立は極めて困難であった。しかしながら、申請者らは傷害後の腸管上皮再生に骨髄細胞による組織修復機構が関わることを明らかにし（Nat Med 2002）、腸管上皮再生研究において世界的に高い評価を獲得してきた。一方、腸管上皮細胞でのサイトカイン発現調節の解析から Interferon Regulatory Factor (IRF) ファミリー転写因子群による極めてユニークな転写制御機構が関与し、中でも特に IRF-1 分子が特定の分化形質を有する上皮細胞に於いて選択的に強く発現する事実を明らかとするなど（Mol Cell Biol 2004）、腸管炎症を制御する細胞内シグナルと上皮細胞分化を統合する独創的な視点から、画期的な成果をあげてきた。本研究ではこ

において全上皮細胞におけ頻度が9-10倍上昇した。c) 骨髄由来上皮細胞は腸管上皮中において散在する分布形態を示し、上皮幹細胞マーカーである Msi-1 の発現は極めて稀であった。d) 上皮再生過程の腸管において骨髄由来上皮細胞は、上皮 Crypt 内増殖帯における全 Ki-67 陽性上皮細胞に占める頻度が有意に増加した。e) GVHD からの再生過程の腸管においては、正常検体との比較し、骨髄細胞由来の杯細胞、神経内分泌細胞、パネート細胞の著しい頻度の上昇を認めた。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1) 倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2) 意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。

C. 考察

1) 腸管上皮細胞の分化制御に Notch シグナルの恒常的な活性化が重要な役割を持っていること、およびヒト炎症性腸疾患における上皮の分化/再生機構の破綻には、Notch シグナルの異常な活性化が関わる可能性が示唆された。さらに、Notch シグナルの活性化により制御される標的遺伝子群が明らかとなり、杯細胞、パネート細胞、あるいは神経内分泌細胞など特異的分化形質発現に対する Notch シグナルの促進的あるいは抑制的作用が示された。

2) 傷害腸管の修復機構に関し、骨髄由来腸管上皮細胞の関与を明確にした。即ち、定常状態の腸管上皮に比べ、傷害後の再生過程の上皮では骨髄由来上皮細胞の著しい増加が再現され、骨髄由来細胞が腸管上皮の再生過程を促進する役割を果たすものと考えられた。さらに、骨髄由来細胞は腸管上皮幹細胞との形質は獲得せず、むしろ増殖が活発な Crypt 内の上皮前駆細胞として分布し、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により腸管修復を促進し得ていることが示された。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、パネート細胞の著しい増加が見られることから、上皮再生過程において機能する未知の分化調節機構が存在し、骨髄細胞の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極めて重要な役割を果たしていると考えられた。

D. 結論

極めて短期間に組織更新を続ける事が組織の恒常性と機能の維持に必須である腸管上皮において、特定の機能を持った成熟上皮細胞を質的、量的に秩序正しく供給するためのメカニズムとして複数の制御機構、すなわち Notch シグナルによる腸管特異的標的遺伝子の発現制御機構、および骨髄細胞による細胞レベルでの上皮機能の維持制御機構、が存在することを示した。これらの成果から、急激な上皮傷害の際に骨髄細胞の動員を促進し、かつ Notch シグナルの人為的制御により適切な系列細胞へ分化誘導することにより、腸管上皮の再生と早期の機能回復を図る多面的かつ多段階のアプローチが期待され、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、細胞療法と分子療法を統合した新規治療法開発につながる研究基盤を確立したものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Mori T, Okamoto S, Ikeda Y, Mukai M, Yamazaki M, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Okano H, Inazawa J, Hibi T, Watanabe M: Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine. *Gastroenterology*. 128: 1851-1867, 2005.
2. 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*. 288: G745-G754, 2005.
3. Namiki S, Nakamura T, Oshima S, Yamazaki M, Sekine Y, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: IRF-1 mediates upregulation of LMP7 by IFN-gamma and concerted expression of immunosubunits of the proteasome. *FEBS Lett*. 579: 2781-2787, 2005.
4. Totsuka T, Kanai T, Makita S, Fujii R, Nemoto Y, Oshima S, Okamoto R, Koyanagi A, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Watanabe M: Regulation of murine chronic colitis by CD4⁺CD25⁻ programmed death-1⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 18: 1773-1785, 2005.
5. Okamoto R, Watanabe M: Cellular and molecular mechanisms of epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci*. 50: S34-S38, 2005.
6. Kanai T, Watanabe M: Clinical application of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells for the treatment of inflammatory bowel diseases.

- Expert Opin Biol Ther. 5: 451-462, 2005.
7. Tahara T, Inoue N, Hisamatsu T, Kashiwagi K, Takaishi H, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T: Clinical significance of microsatellite instability in the inflamed mucosa for the prediction of colonic neoplasms in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 20: 710-715, 2005.
 8. Matsukawa H, Kanai T, Naganuma M, Kamada N, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Mukai M, Ishii H, Mimori T, Watanabe M, Hibi T: A novel apoptosis-inducing monoclonal antibody (anti-LHK) against a cell surface antigen on colon cancer cells. *J Gastroenterol.* 40: 945-955, 2005.
 9. Kanai T, Kawamura T, Dohi T, Makita S, Nemoto Y, Totsuka T, Watanabe M: Th1/Th2-mediated colitis induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{high} T lymphocytes into nude mice. *Inflamm Bowel Dis.* 12: 89-99, 2006.
 10. Kanai T, Tanimoto K, Nemoto Y, Fujii R, Totsuka T, Watanabe M: Naturally arising CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress the expansion of colitogenic CD4⁺CD44^{high}CD62L⁻ effector-memory T cells. *Am J Physiol.* (in press), 2006.
 11. Fujii R, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Watanabe M: FTY720 suppresses CD4⁺CD44^{high}CD62L⁻ effector memory T cell-mediated colitis. *Am J Physiol.* (in press), 2006.
 12. Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Nemoto Y, Fujii R, Kawamura T, Makita S, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Ameliorating effect of saporin-conjugated anti-CD11b monoclonal antibody in a murine T-cell-mediated chronic colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* (in press), 2006.
2. 学会発表
 1. 土屋輝一郎, 中村哲也, 渡辺 守: 転写因子 Math-1 活性化の分子機構と腸管上皮分化制御. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
 2. 岡本隆一, 中村哲也, 渡辺 守: 活性型 Notch の発言調節によるヒト腸管上皮再生の可能性. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
 3. 根本泰宏, 金井隆典, 蒔田 新, 藤井 玲, 河村貴広, 戸塚輝治, 渡辺 守: マウス腸管粘膜内 CD4⁺T 細胞は制御性 T 細胞として慢性大腸炎発症を抑制する. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
 4. 蒔田 新, 金井隆典, 戸塚輝治, 河村貴広, 根本泰宏, 大島 茂, 小金井一隆, 福島恒男, 渡辺 守: ヒト腸粘膜内 CD4⁺CD25^{bright} 制御性 T 細胞の存在と機能. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
 5. 戸塚輝治, 金井隆典, 根本泰宏, 蒔田 新, 浦牛原幸治, 飯山稜一, 八木田秀雄, 渡辺 守: 慢性大腸炎モデルにおける CD4⁺PD-1⁺制御性 T 細胞の役割. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
 6. 渡辺 守: 治療抵抗性の炎症性腸疾患に対する治療戦略. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 15
 7. 金井隆典, 河村貴広, 渡辺 守: 腸内細菌から TLR9+B220+B 細胞をトリガーとした慢性腸炎発症機序. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 15
 8. 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 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 15
 9. Namiki S, Nakamura T, Oshima S, Yamazaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Identification of Novel IRF-1-Regulated Genes and the Role of IRF-1 in Immuno Proteasome Subunit Expression in Intestinal Epithelial Cells. DDW 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 15
 10. Totsuka T, Kanai T, Makita S, Fujii R, Nemoto Y, Watanabe M: Regulation of Murine Chronic Colitis by CD4⁺CD25⁺ PD-1⁺ Regulatory T Cells. DDW 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 16
 11. Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: The Bhlh Transcription Factor Math-1 is Posttranslationally Regulated by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in the Intestine-Specific Mechanism. DDW 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 16
 12. Kawamura T, Kanai T, Kodama H, Totsuka T, Makita S, Nemoto Y, Watanabe M: Leukocytapheresis Therapy for Ulcerative Colitis; Extracorporeal Anti-TNF- α Therapy for Selective Elimination of TNF- α -Producing CD14⁺CD16⁺ Monocytes. DDW 2005 Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 18
 13. Kanai T, Makita S, Oshima S, Totsuka T, Fukushima T, Watanabe M: Regulation of intestinal immune homeostasis by human lamina propria CD4⁺ CD25^{bright} regulatory T cells. 12th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, Massachusetts, USA, 2005. 6. 25-30
 14. Makita S, Kanai T, Watanabe M: Control of intestinal homeostasis by human intestinal lamina propria CD4⁺CD25^{bright} T cells. 12th International Congress of Mucosal Immunology,

- Boston, Massachusetts, USA, 2005. 6. 25-30
15. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Totsuka T, Fujii R, Kawamura T, Watanabe M: Murine lamina propria CD4+ T cells suppress the development of chronic colitis. 12th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, Massachusetts, USA, 2005. 6. 25-30
 16. Okada E, Yamazaki M, Tanabe M, Takeuchi T, Nanno M, Nakamura T, Kanai T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M: IL-7 exacerbates chronic colitis with expansion of memory IL-7Rhigh CD4+ mucosal T cells in mice. 12th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, Massachusetts, USA, 2005. 6. 25-30
 17. 蒔田 新, 金井隆典, 戸塚輝治, 根本泰宏, 伊藤ゆみ, 藤井 玲, 渡辺 守: 制御性 T 細胞を用いた炎症性腸疾患治療の可能性. 第 47 回日本消化器病学会, 神戸, 2005. 10. 6
 18. 根本泰宏, 金井隆典, 蒔田 新, 藤井 玲, 伊藤ゆみ, 戸塚輝治, 渡辺 守: マウス腸管粘膜内 CD4+ T 細胞の免疫トレンランスへの関与. 第 47 回日本消化器病学会, 神戸, 2005. 10. 6
 19. 岡本隆一, 渡辺 守: 骨髄由来細胞による小腸粘膜防御機構の再生. 第 36 回日本消化吸収学会・第 47 回日本消化器病学会合同, 神戸, 2005. 10. 8
 20. 渡辺 守: ヒト腸管上皮細胞由来 IL-7 による粘膜免疫および上皮分化・再生の制御. 第 33 回日本臨床免疫学会, 京都, 2005. 10. 28
 21. Yoshioka A, Oshima S, Tsuchiya K, Namiki S, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Functional roles of intestinal epithelial cells through transcription factor IRF-1. 第 35 回日本免疫学会, 横浜, 2005. 12. 15
 22. Kanai T, Makita S, Nemoto Y, Totsuka T, Watanabe M: Regulation of intestinal inflammation by lamina propria CD4+ CD25+/bright T cells. 第 6 回 Colloquium for the Study of Gastrointestinal Defense System (日本消化器免疫学会サテライトシンポジウム), 大阪, 2006. 1. 14
 23. Kanai T: Immune-Nonimmune Cell Interactions: the Other Cross Talk Between Innate and Adaptive Immunity. International Symposium on Recent Advances in Inflammatory Bowel Disease Tokyo 2006 (炎症性腸疾患国際シンポジウム), 東京, 2006. 2. 18

腸上皮細胞修復に及ぼすエカベトナトリウムの効果

研究協力者 渡辺 純夫 秋田大学医学部第1内科 教授

研究要旨： エカベトナトリウムは胃粘膜防御因子製剤として使用されているが、最近潰瘍性大腸炎に対する有用性が報告されている。本研究により、エカベトナトリウムは腸上皮細胞のアポトーシスを抑制し、創傷治癒を促進することが明らかにされた。

共同研究者

飯塚政弘

所属

秋田大学医学部第一内科

A. 研究目的

エカベトナトリウム (ES) の小腸上皮細胞創傷治癒における効果を明らかにするため本研究を行った。

B. 研究方法

小腸上皮細胞 (IEC-6) 培養液中に ES を添加し、シグナル蛋白の活性化、増殖因子の誘導を調べた。また、過酸化水素による IEC-6 細胞のアポトーシス誘導、創傷治癒の遅延に対する ES の効果についても検討を行った。

C. 研究結果

1. ES 添加により ERK1/2 MAPK, I κ B- α のリン酸化が認められた。2. ES 添加により COX-2, TGF- β mRNA の発現が誘導された。3. ES は過酸化水素により誘導される腸上皮細胞創傷治癒の遅延を有意に抑制した ($p < 0.01$)。4. ES は過酸化水素による腸上皮細胞アポトーシスの誘導を有意に抑制した ($p < 0.01$)。

D. 考察

ES は過酸化水素により引き起こされた腸上皮細胞創傷治癒の遅延、小腸上皮細胞アポトーシスの誘導をいずれも有意に抑制した。ES の小腸上皮細胞に対するこのような作用は MEK inhibitor, COX-2 inhibitor により著明に阻害された。すなわち、ES の小腸上皮細胞に対する抗酸化ストレス作用には MEK/ERK pathway の活性化、COX-2 の誘導が強く関与しているものと考えられた。これらの結果より、ES は潰瘍性大腸炎などの酸化ストレスの関与している腸炎に対して有効に作用しうる可能性があると考えられた。

E. 結論

エカベトナトリウムは、ERK1/2MAPK の活性化、COX-2 の誘導を介して腸上皮細胞の創傷治癒を促進しうる可能性があることが示唆された。

F. 文献

Sasaki K, Iizuka M, Konno S, et al. Ecabet sodium prevents the delay of wound repair in intestinal epithelial cells induced by hydrogen peroxidase. J Gastroenterol 2005; 40: 474-482.

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

研究成果の刊行に関する一覧