

炎症性腸疾患に対する組換えヒト肝細胞増殖因子の臨床応用

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：肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)は傷害消化管粘膜の重要な再生・修復因子である。本研究では、炎症性腸疾患に対する組換えヒト HGF による新たな傷害粘膜再生・修復療法の開発を目指して種々の非臨床試験を実施してきた。今回、増殖因子である HGF の大腸発癌に及ぼす影響を検討するために、二種の大腸発癌モデルに組換えヒト HGF を反復投与し、その大腸発癌に及ぼす影響を検討した。組換えヒト HGF は、大腸炎を伴ったまたは伴わない二種の大腸発癌モデル、いずれにおいても発癌を促進しなかった。しかし、増殖因子である HGF の発癌性に関しては十分なインフォームドコンセントが必要と考えられた。一方、組換えヒト HGF は製薬会社から供給される人体に投与実績のない未承認臨床サンプルである。従って、その倫理性、正当性から、まずは生命予後不良の劇症肝炎を対象とした第 I/II 相治験を、本邦初の開発型医師主導治験として開始した。この医師主導治験の準備を通して、治験の枠組みで未承認臨床サンプルの臨床試験を実施する、様々なノウハウを蓄積した。劇症肝炎を対象とした臨床試験において重篤な有害事象が認められなければ、ステロイド抵抗性の潰瘍性大腸炎に対する臨床試験を医師主導治験として実施すべく、治験計画届に向けた準備を早急に開始する見通しである。

共同研究者

井戸 章雄	京都大学医学部附属病院 探索医療センター 助教授
金 一徳	京都大学医学部附属病院 探索医療センター 助手
森内 昭博	京都大学医学部附属病院 探索医療センター 助手
宇都 浩文	宮崎大学医学部 内科学第二講座 講師
児玉 眞由美	宮崎大学医学部 内科学第二講座 助手
沼田 政嗣	宮崎大学医学部 内科学第二講座 助手

A. 研究目的

肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)は肝細胞の増殖を促進する因子として劇症肝炎患者血漿から単離された増殖因子である。HGF は肝細胞のみならず種々の上皮系細胞に対して、増殖促進作用のみならず遊走能促進、アポトーシス抑制作用を誘導し、消化管においても傷害粘膜の重要な再生・修復因子と考えられている。一方、炎症性腸疾患は若年者に多く発症する難治性疾患で、これまで

抗炎症、免疫抑制に主眼をおいた治療法がなされているが、再燃を繰り返し、治療に難渋する症例も多い。我々は、組み換えヒト HGF が実験大腸炎モデルにおける大腸障害粘膜の修復を促進することを報告した。本研究の目的は、医薬品化が進められている組換えヒト HGF による傷害粘膜の再生・修復を目的とした新たな治療法を開発することである。

B. 研究方法

1. 大腸発癌モデルに及ぼす組換えヒト HGF の影響
 - 1) 6 週齢の Wistar ラットに 1,2-dimethylhydrazine (DMH) を週 1 回、4 週間皮下投与した。8 週目から組換えヒト HGF (0.5 mg/kg) または生食を週 5 日間、計 4 週間静脈内投与した。投与終了(12 週)時の aberrant crypt foci (ACF) の発生を検討した。
 - 2) 6 週齢の Wistar ラットに 1% 硫酸デキストラン (DSS) を 2 週間 (第 1-2 週) 自由飲水させ、この間、DMH を週 3 回皮下投与した。DSS および DMH 投与と平行して、組換えヒト HGF (0.5 mg/kg) または生食を週 5 日間、4 週間 (第 1-4 週) 静脈内投与し、26 週目に ACF、腺腫及び大腸癌の発生を検討した。
2. 組換えヒト HGF の医師主導治験の準備
組換えヒト HGF は製薬会社から供給される人体に

投与実績のない未承認臨床サンプルである。従って、その臨床試験は承認申請を目的とした「治験」として実施する必要がある。一方、改正薬事法により、2003年7月より医師・医療機関が主導する治験が実施可能となった。このような状況から、組換えヒトHGFの臨床応用を「医師主導治験」の枠組みで実施するため、その準備を開始した

(倫理面への配慮)

非臨床試験における実験動物を用いた実験に関して、国際社会がヒトの健康のためといえども、実験及び飼育管理の過程において動物に対して不必要な苦痛を与えないように努めるという人道的な配慮を求めていることを十分認識し、大学の動物実験ガイドラインに沿って実施した。また、医師主導治験の実施計画に関しては、(1)倫理審査委員会及び医薬品等臨床研究審査委員会(IRB)で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。(2)被験者の自由意志に基づいて同意を得られた場合にのみ治験参加とする。治験参加の有無により、治療などの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い、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。

C. 研究結果

1. 大腸発癌モデルに及ぼす組換えヒトHGFの影響
 - 1) ACFの発生数は、HGF群 71.3±34.8個、PBS群 68.3±23.6個で、両群間に有意差はみられなかった。
 - 2) 4個以上のcryptが複合したACFの発生数は、HGF群 6.0±4.7個で、PBS群 14.0±5.7個に比して有意に減少した(p<0.05)。腺腫または大腸癌の発生数は、HGF群 6.9±5.8個、PBS群 2.9±3.1個で、両群間に有意差は認められなかった。
2. 組換えヒトHGFの医師主導治験の準備

国内外で人体に投与実績のない新規有効成分を対象とした開発型の医師主導治験は本邦初の事例である。従って、まずは内科的治療による救命率が約30%と生命予後不良の劇症肝炎の肝移植非実施例を対象疾患とした治験の準備を進め、2005年5月医薬品医療機器総合機構に治験計画届を行い、9月より治験を開始した。

D. 考察

1. 大腸発癌モデルに及ぼす組換えヒトHGFの影響
組換えヒトHGFの発癌性試験として、大腸発癌に及ぼす影響を、1)大腸炎を伴わない または 2)大腸炎を伴った、二種の大腸発癌モデルを用いて検討した。組換えヒトHGFは、いずれの大腸発癌モデルにおいても発癌を促進しなかったが、増殖因子である

組換えヒトHGFが発癌を促進する可能性を完全に否定することは困難であるため、その臨床応用に際しては、発癌を促進する可能性は否定できないというスタンスで、十二分に被験者にインフォームドコンセントを行うことが必要と考えられた。

2. 組換えヒトHGFの医師主導治験の準備

組換えヒトHGFは人体に投与実績のない新規有効成分であるため、その倫理性、正当性からまずは劇症肝炎を対象とした第I/II相治験を本邦初の開発型医師主導治験として開始した。本臨床試験を治験の枠組みで実施することは、その安全性及び科学性が確保され、さらにその成績が国際的な評価に耐えることが考えられる。また、この医師主導治験の準備を通して、治験の枠組みで未承認臨床サンプルの臨床試験を実施する、様々なノウハウを蓄積した。劇症肝炎を対象とした臨床試験において重篤な有害事象が認められなければ、ステロイド抵抗性の潰瘍性大腸炎に対する臨床試験を医師主導治験として実施すべく、治験計画届に向けた準備を早急に開始する見通しである。

E. 結論

炎症性腸疾患に対する組換えヒトHGFの臨床応用を目指して、その発癌性試験を行った。また、非臨床試験成績から安全性の論理構築を行い、本邦初の開発型医師主導治験である劇症肝炎に対する第I/II相治験を開始した。本治験の準備を通して、未承認臨床サンプルの臨床試験を医師主導治験の枠組みで実施するノウハウを蓄積した。劇症肝炎に対する治験において安全性が確保されれば、炎症性腸疾患に対する医師主導治験を実施すべく、治験計画届に向けた準備を早急に開始する見通しである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 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
 - 2) 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

- 3) 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
- 4) 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
- 5) Kim ID, Azuma T, Ido A, Moriuchi A, Numata M, Teramukai S, Okamoto J, Tsutsumi Sm Tanaka K, Tsubouchi H: Navigator-echo-based MR provides high resolution images and precise volumetry of swine livers without breath holding or injection of contrast media. Liver Transplant. 12: 72-77, 2006
- 6) Kusumoto K, Ido A, Moriuchi A, Katsura T, Kim ID, Takahama Y, Numata M, Kodama M, Hasuike S, Nagata K, Uto H, Inui K, Tsubouchi H: Repeated intravenous injection of recombinant human hepatocyte growth factor ameliorates liver cirrhosis but causes albuminuria in rats. Int J Mol Med. 17: 503-509, 2006
- 7) Nakanishi C, Moriuchi A, Ido A, Numata M, Kim ID, Kusumoto K, Hasuike S, Abe H, Nagata K, Akiyama Y, Uto H, Kataoka H, Tsubouchi H: Effect of hepatocyte growth factor on endogenous hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. Oncol Rep. (in press)
- 8) 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
- 9) 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 - トランスレーショナルリサーチの現況 -。最新医学。60: 830-836, 2005
- 10) 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
- 11) 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) 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, 神戸, 2005.10.5

- 2) 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, 大阪, 2005.6.17
- 3) 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, 鹿児島, 2005.10.14

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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:その異常活性化が慢性炎症性腸疾患を引き起こす自然免疫系の活性制御機構を解析した。特に、腸管粘膜免疫系の自然免疫系の活性制御機構を解析するため、正常マウスと慢性大腸炎を発症する 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、I κ B ファミリーに属する I κ BNS が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 κ BNS の生理機能を解析するためノックアウトマウスを作製したところ、I κ BNS ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、TLR 刺激により誘導される遺伝子の中で、IL-6 などの NF- κ B 依存性に 3 時間以降に遅れて誘導されてくる遺伝子の発現が有意に上昇していた。また TLR 刺激による NF- κ B の活性が遷延化し、刺激後 3 時間でも NF- κ B の活性が残存していた。さらに、dextran sodium sulfate の経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていた。以上の結果から、核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が、NF- κ B の活性を抑制することにより自然免疫系の活性を制御し、個体レベルで腸管炎症抑制に関与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。そこで、正常マウスの細胞がサイトカイン産生を示さない分子機構を、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で解析し、核に発現するI κ B分子I κ BNSが、正常マウスの細胞に選択的に発現していることを見いだした。I κ BNSをマクロファージ系細胞株に発現させると、LPS刺激によるTNF- α 産生は抑制しないが、IL-6産生を抑制することを見いだした。そこで、I κ BNSの生理機能を明らかにし、この個体レベルでの役割を明らかにするため、ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。(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

I κ BNSノックアウトマウスは正常に出生し、外見上異常は認めなかった。I κ BNSノックアウトマウスより腹腔マクロファージを単離、あるいは骨髄由来樹状細胞を分化させ、TLR刺激によるTNF- α 、IL-6、IL-12産生を解析した。その結果、I κ BNSノックアウトマウスでは、TNF- α 産生に変化はないが、IL-6、IL-12産生が有意に亢進していた。次にこれら遺伝子のmRNAの発現誘導をreal time RT-PCR法で解析した。TNF- α mRNAの誘導は刺激後1時間以内に認められるが、この誘導パターンには正常マウスとI κ BNSノックアウトマウス間で変化はなかった。IL-6 mRNAは刺激後3時間から誘導がみられるが、3時間までは両マウス間で差はなかった。正常マウスでは3時間以降mRNAの発現量は低下するが、I κ BNSノックアウトマウスではmRNA量は高いままであった。他の遺伝子にも刺激後1時間以内の早期に誘導されてくる遺伝子(IL-1 β , IL-12p19など)と遅れて時間以後に誘導される遺伝子(IL-12p40, IL-18など)があるが、早期に誘導される遺伝子群の発現

誘導パターンは両マウス間で差がないが、遅れて誘導されてくる遺伝子群は5時間以降I κ BNSノックアウトマウスで有意に発現が高かった。次に、TLR刺激によるまたTLR刺激によるNF- κ Bの活性化をゲルシフト法、およびNF- κ B p65の細胞内局在により解析した。その結果、I κ BNSノックアウトマウスではNF- κ Bの活性が遷延化し、刺激後3時間でもまだNF- κ Bの活性が残存していることが明らかになった。次に、TNF- α 、IL-6プロモーターへのNF- κ B p65の会合をクロマチン免疫沈降法で解析した。TNF- α プロモーターへのp65の会合は刺激後1時間をピークに観察され、これは正常マウスとI κ BNSノックアウトマウスの間で差は認められなかった。一方IL-6プロモーターへのp65の会合は刺激後3時間をピークに正常マウスでは認められた。I κ BNSノックアウトマウスでも3時間までは正常マウスと同様にp65の会合が誘導されたが、3時間以降正常マウスではp65の会合が減少していくのに対し、I κ BNSノックアウトマウスでは持続したままであった。これらの結果から、I κ BNSは刺激後遅れて誘導されてくる遺伝子のプロモーターにおいて選択的にNF- κ Bの活性を抑制することにより、遺伝子発現を抑制していることが明らかになった。さらに個体レベルでも、LPS投与によるエンドトキシンショックに対する感受性が高くなり、またdextran sodium sulfateの経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていた。

D. 考察

以上の結果から、核に発現するI κ BNSが、自然免疫系の細胞においてNF- κ Bの活性を抑制することにより、あるサブセットの遺伝子発現を抑制し、個体レベルで炎症抑制に関与していることが明らかになった。今後も、自然免疫系の活性制御機構を解析し、その制御技術基盤を確立し、有効なアジュバントの創出に寄与したい。

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 κ B分子I κ BNSが選択的に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

1. 論文発表

1. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: IkBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
2. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe, T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105-113 (2006).
3. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
4. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.: Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087-1095 (2005).
5. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
6. Yukawa, K., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Bai, T., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S., and Iso, H.: Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 16, 673-675 (2005).
7. Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., and Ito, T.: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175, 3354-3359 (2005).
8. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28 (2005).
9. Ohkawara, T., Takeda, H., Nishihira, J., Miyashita, K., Nihiwaki, M., Ishiguro, Y., Takeda, K., Akira, S., Iwanaga, T., Sugiyama, T., and Asaka, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 412-421 (2005).
10. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., and Moreno, E.: MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 73, 5137-5143 (2005).
11. Yang, S., Takahashi, N., Yamashita, T., Sato, N., Takahashi, M., Mogi, M., Uematsu, T., Kobayashi, Y., Nakamichi, Y., Takeda, K., Akira, S., Takada, H., Udagawa, N., and Furusawa, K.: Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1 β , and TNF- α through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956-1964 (2005).
12. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T.: Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J. Immunol.* 175, 1177-1183 (2005).

- (2005).
13. Kitching, A. R., Turner, A. L., Wilson, G. R., Semple, T., Odobasic, D., Timoshanko, J. R., O'sullivan, K. M., Tipping, P. G., Takeda, K., Akira, S., and Holdsworth, S. R.: IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2023-2033 (2005).
 14. Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H. 4th, Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B.: B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J. Immunol.* 174, 7912-7919 (2005).
 15. Yang, R., Wheeler, C. M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D. V., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79, 6741-6750 (2005).
 16. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S.: PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115, 951-958 (2005).
 17. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15, 819-825 (2005).
 18. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., and Kikutani, H.: Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22, 305-316 (2005).
 19. Hirotsani, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650-3657 (2005).
 20. Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M.: MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* 40, 16-23 (2005).
 21. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M.: Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23, 252-263 (2005).
 22. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang, X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira, S.: STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 225-230 (2005).
 23. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 352-361 (2005).
 24. 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., and 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).
25. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I. and 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).
26. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and 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).
27. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and 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).
28. 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., and 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).
29. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Curr. Med. Chem. AIAA.* 4, 3-11 (2005).
30. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
31. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, 2005.5-20-25, San Diego, USA
 2. Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2005.7.28-30, Seattle, USA
 3. Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear IκB proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005.9.28-10.2, Heidelberg, Germany
 4. 竹田 潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第78回日本細菌学会総会、2005.4.4-6、東京
 5. 竹田 潔, Toll-like receptor と結核感染 (シンポジウム) 第80回日本結核病学会、2005.5.12-13、埼玉
 6. 竹田 潔, 自然免疫シグナルの制御機構 (ワークショップ、招待講演) 第5回日本蛋白質科学会年会、2005.7.1、福岡
 7. 竹田 潔, Toll-like receptor を介した自然免疫系の制御 (特別講演) 第45回日本リンパ網内系学会総会、2005.7.14-15、福岡
 8. 竹田 潔, 自然免疫系と炎症性腸疾患 (シンポジウム、招待講演) 第42回日本消化器免疫学会総会、2005.8.4-5、東京
 9. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium) 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
 10. 桑田啓貴、竹田 潔, Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear IκB protein IκBNS. 第35回日本免

疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜

11. 古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、久枝一、
審良静男、姫野國介、竹田潔、Involvement of
Toll-like receptor-dependent activation of
innate immunity in *Trypanosoma cruzi*
infection. 第35回日本免疫学会学術集会、
2005.12.13-15、横浜
12. 松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、
吉開泰信、竹田潔、The role of Toll-like
receptor signaling in mycobacterial
infection. 第35回日本免疫学会学術集会、
2005.12.13-15、横浜

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
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 MIF の役割を明らかにするために、MIF に対する自己抗体を産生する DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) を開発した。このワクチンを接種したマウスでは、変異 MIF 蛋白に対する抗体が産生され、DSS 腸炎が有意に抑制された。MIFTh エピトープ DNA ワクチンによる抗 MIF 療法は、炎症性腸疾患の新しい治療法となりう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^{-/-}マウスを用いた解析を行ったところ、MIF^{-/-}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) の関与を示唆した。さらに 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ことを明らかにした。

最近能動的抗体療法としてサイトカインに対する自己抗体を誘導しサイトカインの活性を抑える方法が考えられている。最近われわれは MIF の免疫原性を高めるために免疫活性化ペプチド (Th エピトープ) を MIF 蛋白に融合し、効率よく高親和性抗体を誘導することができる高機能 DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) を開発した。本研究では Th エピトープ MIF DNA ワクチンをマウスに接種、実験腸炎の程度を検証した。

B. 研究方法

Th エピトープ遺伝子を MIF 遺伝子に挿入したプラスミド DNA を調製した。この MIFTh エピトープ DNA ワクチンを、MHC の適合した 4~5 週齢の BALB/c マウスの皮下または筋肉内にエレクトロポレーション法をもちいて接種した。DNA ワクチンを接種したマウスおよび野生型マウスに対し DSS 腸炎を作成し、各群の臨床症状スコア (下痢、血便、体重減少) を比較した。DSS 腸炎は 3% DSS 水溶液を 7 日間自由飲水にて投与して作成した。

(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

MIFTh エピトープ DNA ワクチン投与をおこなったマウスでは、野生型に比べ、下痢・血便・体重減少が抑制され、臨床症状スコアは有意に低値であった。

D. 考察

近年、サイトカインなどに対する抗体を、クローン病をはじめとする炎症性腸疾患患者に投与する受動的抗体療法が行われ、顕著な効果が認められている。しかし投与された抗体が速やかに消失し持続性に欠けること、投与抗体に対する新たな抗体の産生が惹起されること、コストが高いなど課題も多い。本研究でもちいた DNA ワクチンは、MIF 蛋白と免疫活性化ペプチドの融合蛋白を作りだすように設計されたプラスミド DNA であり、これをマウスに投与すると、Th エピトープを有する変異 MIF が体内で産生され、この変異蛋白に対する抗体が効率よく産生される。この DNA ワクチンを接種したマウスでは、従来の蛋白ワクチンと異なり、アジュバントや担体を必要とせずに抗 MIF 抗体が産生された。MIFTh エピトープ DNA ワクチンによる能動的抗 MIF 抗体療法は、従来の受動的抗体療法に比較し、簡便性、コスト面など優位な点が多く、今後の臨床応用が期待される。

E. 結論

MIFTh エピトープ DNA ワクチンを投与したマウスでは、DSS 腸炎が有意に抑制された。MIFTh エピトープ DNA ワクチンによる能動的抗体療法が炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる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) Ohkawara T, Takeda H, Kato K, Miyashita K, Kato M, Iwanaga T, Asaka M. : Polaprezinc (N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc) ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Scand J Gastroenterol* 40: 1321-1327, 2005
- 2) Ohkawara T, Takeda H, Miyashita K, Nishiwaki M, Nakayama T, Taniguchi M, Yoshiki T, Takana J, Imamura M, Sugiyama T, Asaka M., Nishihira J.: Regulation of Toll-like receptor 4 expression in mouse colon by macrophage migration inhibitory factor. *Histochem Cell Biol* 7: 1-8, 2005
- 3) Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Miyashita K, Kato K, Kato M, Sugiyama T, Asaka M. : Geranylgeranylacetone protects mice from dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* 40: 1049-1057, 2005
- 4) Ohkawara T, Takeda H, Nishihira J, Miyashita K, Nishiwaki M, Ishiguro Y, Takeda K, Akira S, Iwanaga T, Sugiyama T, Asaka M. : Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin Exp Immunol* 141: 412-421, 2005
- 5) Tanaka J, Toubai T, Iwao N, Tsutsumi Y, Kato N, Miura Y, Shigematsu A, Hirate D, Ota S, Asaka M., Imamura M. : The immunosuppressive agent FK506 enhances the cytolytic activity of inhibitory natural killer cell receptor (CD94/NKG2A)-expressing CD8 T cells. *Transplantation* 80: 1813-1815, 2005
- 6) Zhao W, Darmanin S, Fu Q, Chen J, Cui H, Wang J, Okada F, Hamada J, Hattori Y, Kondo T, Hamuro J, Asaka M., Kobayashi M. : Hypoxia suppresses the production of matrix metalloproteinases and the migration of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 35: 3468-3477, 2005
- 7) Ohkawara T, Miyashita K, Nishihira J, Mitsuyama K, Takeda H, Kato M, Kondo N, Yamasaki Y, Sata M, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M. : Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 140 : 241-248, 2005
- 8) Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Asaka M., Sugiyama T : Pathophysiological roles of macrophage migration inhibitory factor in gastrointestinal, hepatic, and pancreatic disorders. *J Gastroenterol* 40 :117-122, 2005
- 9) Tanaka J, Asaka M., Imamura M. : Potential role of natural killer cell receptor-expressing cells in immunotherapy for leukemia. *Int J Hematol* 81: 6-12, 2005
- 10) Toubai T, Tanaka J, Ota S, Fukuhara T, Hashino S, Kondo T, Kasai M, Kakinoki Y, Masauzi N, Morioka M, Kawamura T, Iwasaki H, Asaka M., Imamura M. : Minimal residual disease (MRD) monitoring using rearrangement of T-cell receptor and immunoglobulin H gene in the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia patients. *Am J Hematol* 80: 181-187, 2005
- 11) Kuwatani M, Ikarashi Y, Mineishi S, Asaka M., Wakasugi H. : An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model: importance of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning. *Transplantation* 80: 1145-1152, 2005
- 12) Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Katsurada T, Kato K, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M. : Protective effect of geranylgeranylacetone on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Int J Mol Med* 17: 229-234, 2006
- 13) Ohkawara T, Takeda H, Nishiwaki M, Nishihira J, Asaka M. : Protective effects of heat shock protein 70 induced by geranylgeranylacetone on oxidative injury in rat intestinal epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 41: 312-317, 2006

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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

なし

炎症性腸疾患に対する血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法開発に関する研究

分担研究者 中村和彦 九州大学大学院医学研究院病態制御内科学 助手

研究要旨

潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法はステロイド抵抗例などに用いられる有用な治療法であるが、無効例も少なからず存在する。現行の血球成分除去療法では大腸炎を誘導するエフェクター細胞に加えて、大腸炎を抑制・制御する CD4⁺CD25⁺免疫制御性 T 細胞も同時に除去していると考えられ、この事が有効率を低下させている可能性がある。そのため血球成分除去療法を施行した患者に、除去された白血球より分離した制御性 T 細胞を移入する事により、より高い有効率が得られる事が期待される。我々は、新規治療法として血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法を考案し開発を進めてきた。

今年度我々は、まず、患者末梢血制御性 T 細胞の機能を検討した。磁気ビーズを用いて分離された患者制御性 T 細胞分画は、制御性 T 細胞特異的転写因子 FOXP3 を強発現しており、*in vitro* で CD4⁺ T 細胞の増殖を抑制した。よって、潰瘍性大腸炎患者制御性 T 細胞は健常人の細胞と同様に免疫制御機能を有する事が示された。

次に、実際に潰瘍性大腸炎患者からの血球成分除去療法産物より臨床応用に適したグレードで、制御性 T 細胞分離が可能であるかを検討した。Miltenyi Biotec 社の臨床使用グレードの細胞分離システム ClinMACS を用いて、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞が高い割合で分離可能であった。分離された制御性 T 細胞は、今後、試薬の臨床使用における安全性が確立されれば、細胞移入療法に使用可能であり潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法は施行可能であると考えられた。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法はステロイド抵抗例などに用いられる有用な治療法であるが、内視鏡的重症度の高い症例を中心に無効例も少なからず存在し、また、緩解維持効果に問題が残る。現行の血球成分除去療法では大腸炎を誘導するエフェクター細胞に加えて、大腸炎を抑制・制御する CD4⁺CD25⁺免疫制御性 T 細胞も同時に除去していると考えられ、この事が有効率を低下させている可能性が考えられる。そのため血球成分除去療法を施行した患者に、除去された白血球より制御性 T 細胞を分離・移入する事により、より高い有効率が得られる事が期待される。本研究では、血球成分除去療法の効果を更に高めた新規治療法の開発を目的として、血球成分除去療法後に制御性 T 細胞を分離・移入する血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法が施行可能であるかを検討した。

B. 研究方法

(1) <潰瘍性大腸炎患者制御性 T 細胞分離と機能解

析>潰瘍性大腸炎患者に対する遠心分離法 (Hemonetics 社)による血球成分除去療法産物より、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⁺ T 細胞を分離した。更に、CD45RA⁺分画が CD45RO⁺分画とほぼ同一であることを利用して、CD45RA に対するビーズを用いて CD45RA⁺細胞を除去し、次に CD25 に対するビーズを用いて CD25⁺細胞をポジティブセレクションし、CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺細胞を分離した。(昨年度までの検討で、この分画に制御性 T 細胞が存在する事を確認している。)分離された細胞中の CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺細胞の割合をフローサイトメトリーで、T 細胞増殖抑制能を ³H-Thymidine 取り込みアッセイで、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) <血球成分除去療法産物からの臨床使用グレードでの制御性 T 細胞分離実験>潰瘍性大腸炎患者に対する遠心分離法による血球成分除去療法産物より、臨床使用を目的とした細胞分離システムおよび試薬 (CliniMACS, Miltenyi Biotec 社)を用いて細胞

を分離した。まず、CD8 に対する磁気ビーズ、CD19 に対する磁気ビーズを用いて CD8⁺細胞、B 細胞を除去した。次に CD25 に対する磁気ビーズを用いて CD25⁺細胞をポジティブセレクションした。ヒト制御性 T 細胞は CD4⁺CD25⁺分画中 CD25^{hi/eh}分画に存在するため、分離された細胞分画中の CD4⁺CD25^{hi/eh}細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。また、FOXP3 の細胞内染色を行い、FOXP3⁺細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

(倫理面への配慮)

患者検体の研究目的の使用にあたっては、研究内容を説明し文書での同意を得ている。尚、本研究は平成 17 年 3 月 31 日に九州大学医学研究院等倫理委員会より承認を得ている。

C. 研究結果

(1) 磁気ビーズを用いて分離された細胞の約 75%が CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺ T 細胞であり、RT-PCR にて FOXP3 mRNA を強発現していた。また、CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺ T 細胞分画は、通常の CD4⁺ T 細胞と比較して抗 CD3 抗体刺激による増殖が約 20%と刺激に対して低反応であり、また、共培養にて CD4⁺ T 細胞の増殖を約 50%抑制した。

(2) CliniMACS システムを用いて分離された細胞は、CD8⁺細胞、CD20⁺細胞共にほぼ 0%であり、CD8⁺ T 細胞、B 細胞はほぼ完全に除去されていた。分離後の細胞の 42%が CD4⁺CD25^{hi/eh}であり、また、79%が FOXP3⁺であった。

D. 考察

昨年度までの検討で、我々は CD4⁺CD25⁺ T 細胞中 CD45RO⁺分画に制御性 T 細胞が存在する事を示し、炎症性腸疾患患者での末梢血制御性 T 細胞の割合の解析や磁気ビーズを用いた制御性 T 細胞分離にこの表面マーカーを利用してきた。今年度の検討で潰瘍性大腸炎患者末梢血中の CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺ T 細胞は、制御性 T 細胞に特異的なマーカー FOXP3 を発現し、T 細胞増殖抑制能を有する事より、潰瘍性大腸炎患者制御性 T 細胞が健常人の細胞と同様に免疫制御機能を有する事を示した。この免疫制御機能を有する制御性 T 細胞は血球成分除去療法時にエフェクター細胞と共に除去されていると考えられるので、血球成分除去療法産物より分離した自己の制御性 T 細胞を患者へ返す血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法は、理論的に潰瘍性大腸炎の治療として有効である事が十分に期待できる。

潰瘍性大腸炎患者に対する血球成分除去療法産物

より臨床使用目的の磁気細胞分離システム CliniMACS を用いて、制御性 T 細胞を分離した。CliniMACS システムは末梢血幹細胞移植における CD34⁺細胞の分離などで既に欧州では臨床に使用されている。CliniMACS システムでは試薬の関係上、それまでの我々の検討のように CD45RA⁺細胞の除去が行えないが、分離された細胞の 42%が CD4⁺CD25^{hi/eh}であり、また、79%が FOXP3⁺である事より、十分に制御性 T 細胞が濃縮できていると考えられる。今後は検討症例数を増やし、CliniMACS を用いた方法で安定して高い割合の制御性 T 細胞が分離可能である事と、分離された細胞分画が免疫制御活性を有する事を確認する予定である。今回用いた CliniMACS 試薬のうち、CD8 と CD25 に対する CliniMACS ビーズは、まだ、CE マークが取得されていないが、近日中に申請される予定である。試薬の臨床応用における安全性等の必要条件が満たされれば、血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法は施行可能であると考えられた。

E. 結論

安全性等の必要条件が満たされれば、潰瘍性大腸炎患者に対して血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法が施行可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Honda K, Nakamura K, Matsui N, Takahashi M, Kitamura Y, Mizutani T, Harada N, Nawata H, Hamano S, Yoshida H: Th1-inducing property of IL-27/WSX-1 signaling is required for the induction of experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 11: 1044-1052, 2005

2) Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H: An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci in press*

2. 学会発表

1) Nakamura K, Honda K, Matsui N, Takahashi M, Mizutani T, Yoshinaga S, Akiho H, Harada N, Nawata H, Hamano S, Yoshida H: Role of WSX-1 (IL27 receptor) in dextran sulfate sodium induced colitis. *Digestive Disease Week 2005*,

Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 15

- 2) Somada S, Muta H, Podack ER, Honda K, Nakamura K, Nakagawa S, Nawata H, Tani K: Defining the role of CD30 signals in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine. Digestive Disease Week 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 15
- 3) Takahashi M, Nakamura K, Kitamura Y, Mizutani T, Honda K, Yoshinaga S, Matsui N, Akiho H, Araki Y, Harada N, Kabemura T, Chijiwa Y, Nawata H: Analysis of human peripheral blood regulatory T (Treg) cell frequency in inflammatory bowel disease: Reverse correlation between Treg cell frequency and disease activity of ulcerative colitis. Digestive Disease Week 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 17
- 4) 秋穂裕唯, 水谷孝弘, 高橋 誠, 本田邦臣, 吉永繁高, 松井謙明, 中村和彦, 名和田 新, Collins SM : 感染後過敏性大腸炎モデル-Transforming Growth Factor(TGF) β と Cyclooxygenase(COX)-2 の役割-. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 15
- 5) 本田邦臣, 中村和彦, 柚田真一, 牟田浩実, 松井謙明, 高橋 誠, 水谷孝弘, 吉永繁高, 秋穂裕唯, Eckhard R, Podack, 谷 憲三郎, 名和田 新: CD30 ligand(CD30L)の DSS 腸炎における役割の検討. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 15

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臨床研究

分担研究者 岡崎和一 関西医科大学内科学第三講座（消化器肝臓内科） 教授

研究要旨

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：

松下光伸、内田一茂、川股聖二、安藤佑吾
関西医科大学内科学第三講座(消化器肝臓内科)
廣田育彦 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4μのPDLLAマイクロスフェアを京都大学再生医科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, γ-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審査を経て承認されている。
・関西医科大学付属病院臨床研究承認番号 第40611号
・京都大学医学部倫理審査委員会 承認済

C. 研究結果

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 MC1000mg/kg, Dx-MC 1000mg/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臨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臨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-MS 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) 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.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得：番号2000-143538

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

新しいコンセプトによる治療法開発 — 遠位型潰瘍性大腸炎に対する Rebamipide 注腸療法に関する研究 —

分担研究者 日比紀文 慶應義塾大学医学部消化器内科 教授

研究要旨

2003年に5-ASAの注腸剤が本邦でも承認され、臨床使用可能となったが、注腸製剤としては5-ASAの他にはステロイドがあるのみで、治療選択の幅としてはいまだ十分とはいえない。近年、長崎大学牧山らは、胃潰瘍・胃炎治療薬であるムコスタを注腸剤として院内調製を行い、潰瘍性大腸炎患者に投与した治療結果を、厚生労働省の班研究において報告している。臨床的有用性を8例中7例で認め、ステロイド投与患者6例中6例でステロイドの減量または離脱に成功したという内容である。そこで今回、ムコスタ注腸がもう一つの選択肢となり得るのかという可能性を5-ASA注腸と無作為抽出法により探索的に比較検討することにした。

A. 研究目的

厚生省特定疾患・難治性腸管障害調査研究班の診断基準改定案（平成10年2月16日）において潰瘍性大腸炎と診断された患者のうち、直腸炎型および左側型で、軽症から中等症の活動期を対象とし、Rebamipide注腸および5-ASA注腸4週間投与の有効性および安全性を多施設共同で比較検討した。

B. 研究方法

登録時のDAIスコアが5点以上の患者を対象に2群に割付し、Rebamipide注腸あるいは5-ASA注腸1容器を1日1回原則として就寝前に直腸内に注入投与することとした。製剤は、ムコスタ注腸は1容器中に150mgのRebamipideを含有する60mlの注腸溶液製剤で、5-ASA注腸は1容器中に1gのメサラジンを含有する100mlの注腸溶液製剤（日清キョーリン製薬株式会社販売）とした。投与期間は4週間とし、本試験前から継続している併用治療は試験期間中も一切変更しないこととした。

検討項目は、Disease Activity Index (DAI) スコア、Endoscopic Activity Index (EAI) スコア、Histological Grading、患者の全般評価、安全性評価とし両群を比較した。

（倫理面への配慮）

研究担当医師は試験の実施に先立ち被験者各人に説明文を用いて書面と口頭で説明し、自由意志による同意を文書にて得た。また、投与した薬の副作用などで健康被害が発生した場合には、保険診療範囲内で最善の治療を実施することとした。

C. 研究結果

中間報告時点でムコスタ群7例、5-ASA群9例の投薬が終了した。患者背景に関してはムコスタ群にproctitisが多かった(p<0.049)ものの、それ以外の項目に差は認められなかった。試験成績は、DAIスコアの平均値がRebamipide投与7例において5.2±0.4(mean±SD)が1.8±1.2に、5-ASA投与9例で5.4±0.7が2.7±1.3に減少し、両群とも良好な治療成績が得られた。また、血便に関してもRebamipide群は有意に改善することが示された。患者の全般評価もレバミピド投与7例において緩解3例(42.9%)、有効4例であった。一方5-ASA投与群では9例中緩解3例(33.3%)、有効5例であった。なお、両群ともに明らかな有害事象は認められなかった。

D. 考察

Rebamipide注腸を院内製剤として調製し、潰瘍性大腸炎(以下UC)患者に投与した報告は現在まで3施設からある。最初の報告は長崎大学の牧山らが、「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班分担研究報告書で報告したものであり、ステロイド抵抗性のUC患者8例に投与して4例に緩解、6例に有効以上の効果が見られたとしている。その後2002年の消化器病学会総会において、名古屋大学野畑らおよび愛知医大宮田らが、ステロイド抵抗性もしくは依存性のUC患者に対してRebamipide注腸を投与し、それぞれ50%もしくは70%の有効性が見られたと報告している。上記3研究は、いずれもステロイド抵抗性もしくは依存性であり、他剤でも十分な治療が得られないケースである。また、以上の試験は1日2回

の投薬で試みている。

今回我々は福岡大学筑紫病院消化器内科松井らとの共同研究で、直腸炎型および左側型で、軽症から中等症の活動期を対象とし、血便が持続する患者を対象に1日1回の使用で4週間という短期の治療効果を、対象薬において無作為で比較した。Rebamipideは胃炎・胃潰瘍で承認され臨床使用されている薬剤で、防御因子の増強作用や抗フリーラジカル作用の他に、組織修復促進作用や上皮細胞の透過性の改善作用を有すると言われている。これらの機序が潰瘍性大腸炎治療でも効果があることがわかれば、新しい治療の選択肢の一つになり得ると考えられた。

E. 結論

遠位型活動期潰瘍性大腸炎16例に対し、Rebamipide注腸および5-ASA注腸療法(1日1回投与)を4週間施行し、その有効性ならびに安全性を無作為抽出法により比較検討した。

その結果、Rebamipide投与7例において緩解3例(42.9%)、有効4例であった。一方5-ASA投与群では9例中緩解3例(33.3%)、有効5例であった。さらに、両群ともに明らかな有害事象は認められなかったことより、Rebamipide注腸療法は5-ASA注腸療法と同様、臨床症状ならびに病変粘膜修復に優れた効果を有することが示唆された。

F. 健康危険情報

レバミピド群、5-ASA群ともに治療による有害事象の発生はみられず、4週間という投与期間においては安全に使用できる薬剤であると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamada N, Inoue N, Hisamatsu T, Okamoto S, Matsuoka K, Sato T, Chinen H, Su Hong K, Yamada T, Suzuki Y, Suzuki T, Watanabe N, Tsuchimoto K, Hibi T: Nonpathogenic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 Prevents Murine Acute and Chronic Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 11(5): 455-463, 2005
- 2) 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(5): 710-715, 2005

- 3) Sawada K, Kusugami K, Suzuki Y, Bamba T, Munakata A, Hibi T, Shimoyama T: Leucocytapheresis in ulcerative colitis: results of a multicenter double-blind prospective case-control study with sham apheresis as placebo treatment. *Am J Gastroenterol* 100(6): 1362-1369, 2005
 - 4) Hitotsumatsu O, Hamada H, Naganuma M, Inoue N, Ishii H, Hibi T, Ishikawa H: Identification and characterization of novel gut-associated lymphoid tissues in rat small intestine. *J Gastroenterol* 40: 956-963, 2005
 - 5) Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Sato T, Matsuoka K, Arai K, Nakai T, Hasegawa A, Inoue N, Watanabe N, Akagawa K, Hibi T: 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 of Immunol*: 6900-6908, 2005
 - 6) Matsumoto T, Iida M, Kohgo Y, Imamura A, Kusugami K, Nakano H, Fujiyama Y, Matsui T, Hibi T: Therapeutic efficacy of infliximab on active Crohn's disease under nutritional therapy. *Scand J Gastroenterol* 40:1423-1430, 2005
 - 7) Hibi T and Sakuraba A: Is there a role for apheresis in gastrointestinal disorders? *Nat Clin Pract Gastroenterol & Hepatol* 2(5):200-202, 2005
 - 8) 岩上祐子、久松理一、日比紀文: インフリキシマブ抗TNF α 抗体療法. *G.I. Research* 13: 17-23, 2005
 - 9) 緒方晴彦、日比紀文: クロウン病に対する抗サイトカイン療法の今後の見通しは? *分子消化器病* 2(1): 6-12, 2005
 - 10) 日比紀文、芳沢茂雄: 抗TNF- α 抗体療法. *Mebio* 22: 108-113, 2005
 - 11) 久松理一、鎌田信彦、小林拓、知念寛、日比紀文: 炎症性腸疾患の病態と粘膜免疫-最近の動向-. *細胞* 38(1):7-10, 2006
- ### 2. 学会発表
- 1) Ogata H, Matsui T, Nakamura M, Iida M, Takazoe M, Suzuki Y and Hibi T: #489 Remission-Induction and Steroid-Sparing Efficacy By Oral Tacrolimus(FK506) Therapy

- Against Refractory Ulcerative Colitis. DDW 2005, CHICAGO, 2005.5.14-19
- 2) Kamada N, Inoue N, Hirayama K, Itoh K, Yamada T, Suzuki T and Hibi T: Breakdown of the Intestinal Bacterial Balance Increases the Susceptibility To Intestinal Inflammatory Stimuli. DDW 2005, CHICAGO, 2005.5.14-19
 - 3) Yoshizawa S, Inoue N, Matsuoka K, Ogata H, Iwao Y, Fujita T, Kawakami Y and Hibi T: Clinical Importance of Serum p53 Antibodies in Surveillance Program for Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis. DDW 2005, CHICAGO, 2005.5.14-19
 - 4) Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Inoue N, and Hibi T: Dysfunction of anti-inflammatory macrophages polarized by M-CSF causes Th1 bias upon the enteric bacteria stimuli in interleukin-10 deficient mice. 12th International Congress-From Fundamental Biology to Human Disease, Boston, 2005.6.25-30
 - 5) Ogata H, Kumai K, Imaeda H, Aiura K, Hisamatsu T, Okamoto S, Iwao Y, Sugino Y, Kitajima M, Hibi T: The experience of a newly-developed capsule endoscope. World Congress of Gastroenterology 2005, Canada, 2005.9.10-14
 - 6) Sakuraba A, Inoue N, Kohgo Y, Terano A, Matsui T, Suzuki Y, and Hibi T: A Multicenter, randomized, controlled trial between weekly and semiweekly treatment with granulocyte and monocyte adsorption apheresis for active ulcerative colitis. 13th United European Gastroenterology Week, Copenhagen, 2005.10.15-19
 - 7) 鎌田信彦、井上詠、且比紀文: マウスモデルを用いたプロバイオティクス Nissle1917 の腸炎抑制メカニズムの解明. 第91回日本消化器病学会総会, 東京, 2005.4.14-16
 - 8) 小林拓、岩上祐子、久松理一、岡本晋、今井俊夫、且比紀文: 炎症性腸疾患における fractalkine/CX3CR1 の役割. 第91回日本消化器病学会総会, 東京, 2005.4.14-16
 - 9) 佐藤俊朗、且比紀文: 腸管上皮幹細胞の純化とその機能解析. 第91回日本消化器病学会総会, 東京, 2005.4.14-16
 - 10) 緒方晴彦、熊井浩一郎、且比紀文: 当院における国産新型カプセル内視鏡の使用経験. 第69回日本消化器内視鏡学会総会, 東京, 2005.5.26-28
 - 11) 久松理一、緒方晴彦、且比紀文: 難治性潰瘍性大腸炎に対する CsA 持続静注療法による緩解導入率および累積手術率と内視鏡スコアの関係. 第69回日本消化器内視鏡学会総会, 東京, 2005.5.26-28
 - 12) 鎌田信彦、久松理一、岡本晋、赤川清子、且比紀文: IL-10 ノックアウトマウスにおける抑制性マクロファージの分化異常と IL-12 過剰産生. 第42回日本消化器免疫学会総会, 東京, 2005.8.4-5
 - 13) 岩男泰、松岡克善、且比紀文: colitic cancer の内視鏡所見とサーベイランスの実際. 第70回日本消化器内視鏡学会総会, 神戸, 2005.10.5-8
 - 14) 矢島知治、渡辺守、且比紀文: ヒト同種骨髄移植後消化管粘膜における cell fusion の証明. 第47回日本消化器病学会大会, 神戸, 2005.10.5-7
 - 15) 桜庭篤、井上詠、且比紀文: 潰瘍性大腸炎に対する顆粒球単球除去療法の新しい治療展開—従来法との Randomized Control Study—. 第47回日本消化器病学会大会, 神戸, 2005.10.5-7
 - 16) 鎌田信彦、久松理一、岡本晋、新井久美子、赤川清子、且比紀文: IL-10 ノックアウトマウスにおける抑制性マクロファージの分化異常と Th1 誘導. 第47回日本消化器病学会大会, 神戸, 2005.10.5-7
 - 17) 芳沢茂雄、井上詠、松岡克善、高石官均、岡本晋、久松理一、緒方晴彦、岩男泰、藤田知信、河上裕、向井萬起男、且比紀文: 潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌の早期発見における抗 p53 抗体測定の有用性の検討. 第47回日本消化器病学会大会, 神戸, 2005.10.5-7
 - 18) 仲居貴明、佐藤俊朗、且比紀文: クロウン病腸管局所における LXR_α の発現と免疫調節作用についての検討. 第33回日本潰瘍学会, 東京, 2005.12.2-3
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 1 特許取得
なし
 - 2 実用新案登録
なし
 - 3 その他
特になし