

炎症性腸疾患発症進展における自然免疫系とくに内因性抗菌ペプチドの役割とその賦活による治療

(分担研究者：高後 裕)

[背景]

- ・牛の腎臓上皮を用いて内因性抗菌ペプチドの一つである β -defensin を誘導する物質の検索が行われ、L-isoleucine が少量で強く β -defensin を誘導するという報告がなされた。
- ・マウスに対し経鼻的にL-isoleucine を投与し、 β -defensin の発現を継続的に検討した所、投与後30分、3時間後などに強い発現が認められた。
- ・これまで、当科ではインフォームドコンセントの元にクローン病患者の小腸から生きたパネート細胞を採取してきたが、それに対し、isoleucine を添加(0, 5, 50, 500 μ g/ml)したところ、用量相関的にパネート細胞からの分泌が増強されることが確認された。
- ・また、健常人と比べクローン病患者におけるパネート細胞の抗菌ペプチドの産生量は有意に低下していることが示された。

[方法・結果]

- ・予備試験としてCD患者9例に対しisoleucine 4g/日(分2)を1週間投与し、Lactobacillus に変化があるか、腸内細菌叢に影響を与えるかについて検討を行ったところ、有意にLactobacillus の増加が確認された。
- ・Pilot study としてCD12例、UC5例に対し、isoleucine 4g/日(分2)を4週間服用していただき、投与2週間前から、投与終了後2週間後までにおける活動性の変化を検証したところ、1週後のCDの便回数において有意な低下が認められ、UC、CDにおいては活動性の有意な低下が観察された。

[まとめ]

- ・Isoleucine による自然免疫機能賦活化：
 1. β -defensin promoter を用いた reporter assay で β -defensin 活性を誘導 (Zasloff ら)
 2. マウスで、気道粘膜の β -defensin 発現を誘導 (Hasegawa ら)
 3. ヒト小腸 Paneth 細胞からの抗菌活性放出を誘導
 4. パイロット試験において、炎症性腸疾患患者の腸内細菌叢を変化させ、下痢を減少

→In vitro で抗菌物質産生・分泌を誘導する Isoleucine は、小腸自然免疫構成の低下を示すクローン病患者で腸内細菌を変化させ、病態の改善をもたらす可能性がある。

HGF および HGF 遺伝子大腸粘膜下注入療法の開発

(分担研究者：鈴木健司)

[これまでの報告より]

・マウスに対し HGF の遺伝子を Hydrodynamic 法にて肝臓に遺伝子導入することによって、HGF を産生させ、血清中から大量に全身に分泌させたところ、腸管上皮において、上皮の再生や抗炎症効果などが確認された。
→しかし、ヒトに対する応用を考えた場合の現実的な治療法について検討を行った

[DSS 腸炎モデルに対する注腸投与による HGF 遺伝子導入試験]

・1日目、3日目に注腸投与にて HGF 遺伝子導入を試みたところ、活動度改善、腸管短縮抑制、組織学的にも改善が認められた。
→HGF 注腸投与においても炎症の改善が認められることがわかったが、深部大腸や小腸に到達させる幸威事に関しては困難と考えられた。

[HGF 遺伝子プラスミドを用いた炎症性腸疾患 (UC, CD) の遺伝子治療臨床研究の可能性]

- ・臨床研究のための課題
 1. 対象疾患の選択：潰瘍性大腸炎、クローン病
 2. HGF 遺伝子：AMG-0001 の供与
 3. 投与方法：単独投与 or 5-ASA との併用、全身投与 or 局所投与（経口、注腸、内視鏡下粘膜注）
 4. 治験計画
 5. 治療臨床試験研究体制
- ・作用機序・安全性確認：動物実験による確認
 1. 局所投与による HGF 遺伝子導入・効果発現機序解析
 2. 発癌の危険性確認

[DSS 腸炎モデルに対する内視鏡下での粘膜下注入]

- ・便性状、腸管長、内視鏡所見、組織所見をはじめ腸炎の改善が認められた
- ・DSS 腸炎モデルに対する内視鏡下での粘膜下注入による有効性が認められた。ラットにおいて内視鏡下での粘膜下注入が可能であったことから、人での応用も可能ではないかと考えられた。

※末梢血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症・ビュルガー病）での治験状況

⇒対象となる条件が厳しいため、思うように患者が集まっていない

[DSS 腸炎モデルに対する内視鏡下での rh-HGF の粘膜下注]

- ・上記と同様の方法で DSS 腸炎マウスモデルに対し、Day0 に rh-HGF を内視鏡下で主に左側結腸に粘膜下注を行い、3日後に評価を行ったところ、内視鏡像の改善、腸管短縮の抑制、組織所見の改善が認められた。
- ・副作用として、細胞の異常増殖による癌化が危惧されていた為、Ki67 染色で確認したところ、クリプトには認められず、浸潤している細胞に Ki67 陽性の細胞が認められ、その数は DSS 腸炎モデルで多く、rh-HGF 群では少ないという結果であった。

[まとめ]

- ・rh-HGF の内視鏡下粘膜注入でも DSS 腸炎マウスモデルに対して遺伝子導入法と同様の治療結果が認められたことから、rh-HGF の全身投与ではなく、小腸や局所に対して大腸ファイバーやダブルバルーン内視鏡ファイバーによる、病変部への粘膜下注が臨床応用の手段となり得るのではないかと検討を進めている

組換えヒト HGF の非臨床試験と臨床応用への問題点

(分担研究者：坪内博仁)

[背景]

・医師主導型治験

～「治験とは」、医薬品などの承認申請のために必要な臨床試験。従来は、企業が主体となって治験を計画し、実施医療機関に対して依頼する治験のみであった。

しかし、薬物の中には企業がその開発に積極的でないもの、先端的な製品などの開発に当たり、医師、医療機関が主体となって臨床試験を実施するものがある。

～薬事法の改正に伴い、2003年7月から医療機関・意思が主体となって行ういわゆる「医師主導型治験」が実施可能となった。

- 臨床研究のうち一定の条件を満たすものについて「治験」として取り扱う
- 「自ら治験を実施する者」が治験計画書を医薬品医療機器総合機構に届出る

[劇症肝炎および遅発性肝不全に対する組換え型ヒト肝細胞増殖因子の第Ⅰ・Ⅱ相試験]

・試験デザイン

1. 試験の相 : 第Ⅰ・Ⅱ相
2. デザインの特徴 : コホート単位用量漸増試験
3. 対象の種類 : 用量対象、歴史対象
4. ランダム化の有無 : 無し
5. 盲検化のレベル : 非盲検

・経過

- | | | |
|-------|--------|--|
| 2003年 | 12月 | 薬事法下では製薬企業からのHGF供給は不可能
製薬企業とのHGF供給に関する折衝開始 →不成功 |
| 2004年 | 5月 | プロトコル、概要書、説明・同意文書の作成開始 |
| | 8月 | 医師主導型治験として実施することに決定 |
| | 9月 | 医薬品医療機器総合機構への相談(計2回 ～05年4月) |
| | 10-12月 | 製薬企業との安全性および製剤化ミーティング、機密保持等の契約締結 |
| | 11-1月 | 安全性薬理試験、単回投与毒性試験を追加 |
| 2005年 | 3月 | 概要書、プロトコル、説明・同意書、症例報告書の完成 |
| | (4月) | 医の倫理委員会承認) |
| | 5月 | 治験審査委員会承認
医薬品医療機器総合機構に治験提出(5/31受付) |

→本来ならば7月1日から治験を開始できる事になっているが、疾患の特徴上、担当する消化器内科だけではなく、集中治療部や人工腎臓部などの様々な診療科・部門との連携を取るという意味で院内の最終的な調整を行っている段階であり、実際には8月の中旬よりスタートする予定である。

【組み換え型ヒト HGF の非臨床試験 - 静脈(全身)投与 - 】

・薬物動態：

- 単回静脈内投与：ラット、ミニプタ～半減期短い、主たる標的臓器は肝臓

・安全性試験のまとめ

※「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床試験における安全性評価」ガイドラインの項目

- 単回投与毒性試験：マウス(非GLP) ～毒性なし、致死量>40mg/kg
- 反復投与毒性試験：ラット4w、サル13w (GLP) ～可逆性の蛋白尿 無毒性量0.03mg/kg
- 免疫毒生試験 : 未実施 ～反復投与毒性試験(GLP)で問題なし
- 生殖・発生毒性試験：未実施 ～雄は反復投与毒性試験(GLP)で代用可
- 遺伝毒性試験 : 未実施 ～タンパク製剤には不要
- 局所刺激性試験 : 未実施 ～静脈内に確実に投与
- 安全性薬理試験 : ミニプタ(非GLP) ～血圧低下(+)/心毒性(-)
- 発癌性試験 : ラット、マウス(非GLP) ～ラット3mg/kgで発癌促進の可能性

[炎症性腸疾患への臨床応用（治験）における問題点]

(投与方法)

1. 動注投与

- ・ 血中（全身）曝露（+）→より重症例を対象（中毒性巨大結腸症？）
- ・ 侵襲的な処置（カテーテル挿入が必要）→反復投与困難？
- ・ 薬物動態（組織分布）の再評価が必要

2. 粘膜下局注または注腸投与

- ・ 薬物動態試験：血中（全身）曝露の有無（粘膜下局注→試験中）
- ・ 安全性試験：がん原生試験（静注）、局注部の病理学的評価
- ・ 薬効薬理試験
- ・ 治験薬の品質：安定性試験、吸着試験→剤経の決定
：注腸＝溶媒（キャリアー）の選定（使用実績のあるもの）

[難治性の潰瘍性大腸炎に対する組換え型ヒト HGF の第 I・II 相試験]

・ プロトコールコンセプト（案）

- 対象：直腸炎型および左側大腸炎型の潰瘍性大腸炎のうちステロイド抵抗例の者
- 試験デザイン：第 I・II 相、用量漸増デザイン？プラセボ群（+）
- 投与方法：注腸投与（または粘膜下局注）
- 治験薬投与：2 週間（14 日間）
- 追跡期間：2 週間（または 10 週間）
- エンドポイント：有害事象の有無、薬物動態
臨床効果～内視鏡所見（生検）、DAI スコア、再発の有無（12 週）

※安全性への対応

1. 血中曝露の有無（薬物動態試験）→血中曝露があれば静注投与の成績が必要
 2. 大腸発癌への影響 →しかし、発癌性は否定できないとスタンス
追跡調査、発癌後 10 年以内の症例に限定？
 3. 用量の設定根拠 →無毒性量、有効性データの有無
- ※過去の EGF 注腸の文献を参考にした

[質疑応答]

- ・ HGF は anti-fibroty の効果もあり、粘膜下局注も可能であることから、クローン病の狭窄部への応用（ダブルバルーン内視鏡などを用いて）も試みてはどうか？

腸管特異的免疫調節機構を応用した治療法の開発

自然免疫系による炎症性腸疾患の制御機構の解析

(分担研究者：竹田 潔)

[背景・目的]

・ Stat3 という分子を KO させたマウスから採取したマクロファージや樹状細胞を LPS で刺激したところ、炎症性サイトカインが 10 倍以上の著明な産生増加を示した。その原因はこれらの細胞には IL-10 の効果が全く無くなっていた結果であった。また、このマウスは慢性大腸炎の症状を呈するものとなり、このモデルは IL-10 欠損マウスと類似した症状を呈していた。このような結果から、Stat3 は自然免疫系の細胞において IL-10 のシグナルに必須であり、IL-10 の効果を発揮するのに必須であると考えられ、これが自然免疫系の異常な活性化につながり慢性大腸炎を発症するということがわかってきた。

→このような異常に活性化した自然免疫系の細胞はどのようにして腸炎を発症させるのかについて、様々な KO モデルの検討を行ったところ、これらの細胞が発現している TLR4 が腸内細菌を認識し、様々な炎症性サイトカインが過剰に産生され、その中の IL-12 が生体を強く Th1 系に傾け、Th1 依存性の慢性大腸炎を発症させるという段階的なメカニズムが示唆された。

実際には、腸管内に局在する自然免疫系の細胞はこのような異常な活性を抑えるための機構が存在することが推定される。そこで、この機構を解析する為に、実際に大腸局所に存在するマクロファージを採取し、その機能を LPS に対する刺激性から調べた

[方法・結果 1]

・ 正常マウス、IL-10KO マウス (大腸炎を発症していない 4~5 週齢) から CD11b⁺細胞を採取し、LPS で刺激後、TNF- α 、IL-6 などの産生を測定したところ、正常マウスから採取したものからは炎症性サイトカインの産生は認められなかったものの、IL-10KO マウスのマクロファージは TNF- α 、IL-6、IL-12 等の著明な産生の増加が認められた。これは、LPS や TLR リガンドへの応答性が残っているということであり、これが慢性大腸炎の発症に深く関わっているのではないかと推察された。

→それでは、正常マウスにおけるマクロファージが LPS に対して不応答になる理由はなぜかという点について解析を試みた。

[方法・結果 2]

・ 正常マウス大腸内、腹腔内、IL-10KO マウス大腸内 (大腸炎を発症していない 4~5 週齢) から CD11b⁺細胞を採取し、それらの遺伝子発現の違いについて DNA マイクロアレイにて解析を行ったところ、正常マウスの大腸内 CD11b⁺細胞にのみ特異的に発現している遺伝子がいくつか認められた。代表的なものには I κ BNS、Bcl3、マクロファージスカベンジャー 2、CD163 などであった。すなわち、これらの遺伝子の中に LPS などの刺激に対し不応答にさせるものがあるのではないかと推察され、これらの遺伝子の機能解析を行ったところ、特に注目したのは I κ BNS、Bcl3 であり、これらは同じファミリーであり、核内に特異的に発現している I κ B タンパク群である。

・ そこで、I κ BNS、Bcl3 を発現していない正常マウスの腹腔内マクロファージに対し、I κ BNS、Bcl3 を over expression させたところ、I κ BNS の場合は IL-6 産生を抑制したものの、TNF- α に違いは認められなかった、また、Bcl3 の場合は TNF- α 産生を抑制したものの、IL-6 に違いは認められなかった。このように核に発現する I κ B タンパク群が differential に TLR、TPS に応答したサイトカインを制御するということが細胞レベルでの実験からわかってきた。また、その分子機構、生化学的解析からは I κ B タンパク群は NF κ B の転写因子の中でこれらのサイトカイン遺伝子の産生を Negative regulate している p50 ホモダイマーと選択的に会合し、それが I κ BNS の場合は IL-6 の Promoter に選択的に recruit し、Bcl3 の場合は TNF- α の Promoter に選択的に recruit されていることが分かってきており、活性を持たない NF κ B のホモダイマーが Promoter を占拠する事で、LPS の応答性をブロックしているということが細胞レベルで明らかとなった。

→それでは、I κ BNS の生理機能について解析を行った。

[方法・結果 3]

・ I κ BNS 欠損マウスを作成したところ、正常に生まれてきたので、その腹腔内マクロファージの LPS に対する応答性を調べたところ、TNF- α は正常マウスと同様であったが、IL-6 については正常マウスに比べ非常に高い産生を示した。これは、先ほどの細胞レベルでの解析結果と同様の結果が得られた。また、樹状細胞について解析したところ、IL-6、IL-12 p40 の高産生が認められた。

→これらの結果から、 $I\kappa$ BNS は TNF などの産生制御には関わっていないが、IL-6 や IL-12 の産生を負に制御する機能を有することがわかってきた。

[今後の予定]

- ・ $I\kappa$ BNS による TLR 依存性の遺伝子発現制御機構を更に詳細に解析
- ・ 自然免疫系の活性制御機構とその破綻による炎症性腸疾患の発症とのかかわりを明らかにする

[質疑応答]

・ Stat3KO マウスでは IL-10 が異常産生されるが、その IL-10 は M ϕ や DC がターゲットであって、effector T 細胞に対しては抑制的に、いわゆる Tr1 の産生する IL-10 のように作用しないものなのか？
→実際に抑制的な作用はあると考えられるが、実際にこのモデルでは大腸炎を発症し、IL-10 も高い。つまりはバランスとして IL-10 は自然免疫系に作用する方が大きいのではないかと考えている。

- ・ Stat3KO マウスにおける TLR の発現は？

→正常マウスと差はない

・大腸に存在する細胞と、その他の細胞と異なるという事であるが、両者ともに骨髄由来のものがあると思うが、どのようにして LPS への反応が劇的に変わると考えているか？

→これまでの結果から、IL-10 が何かしらの作用を持っているのかもしれないと考えている。しかし、大腸に存在する M ϕ などに特異的に発現している遺伝子が全て IL-10 で誘導されるかといえば、そうではない。従って、それとは異なるものも考えられるが、半分以上の遺伝子が IL-10 で誘導されるので、それらの結果からと考えられる。

- ・ 海外のグループでは TGF- β との関連について研究しているが、本研究で関連は調べられているか？

→TGF によって遺伝子が誘導される可能性もあるが、まだ解析は行っていない。

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)

[背景]

- ・ DSS 腸炎モデルに対し抗 MIF ポリクローナル抗体を腹腔内投与したところ、腸炎が抑制されることが示されており、モノクローナル抗体では、効果は若干落ちるが有効である事が認められている。しかし、本件に関連する特許が全てアメリカにて取得されており、様々なメーカーと交渉はしてみたが、現状では困難であるという結論に至っている。
- ・ そこで、MIF がどこに作用しているかを調べ、別なアプローチができないか検討を行った。
- ・ 近年、MIF に結合している蛋白の一つとして Heat shock protein 70 が発見された、

[方法・結果 1]

- ・ 正常マウスと MIF^{-/-}マウスに対し DSS 処理した後に HSP70 の発現を調べたところ、正常マウスでは若干の増加しか認められなかったが、MIF^{-/-}マウスでは顕著な増加が認められた。また、同時期に肝障害モデルにおいても同様の結果が示され、肝臓に対しても防御的に働いているのではないかと考えられている。

→この結果から、単純に HSP70 が治療効果を発揮したとは考えにくいですが、HSP70 を Up regulate することが腸炎の改善につながらないか検討を行った。

[方法・結果 2]

- ・ 現在、胃潰瘍に使用されている Geranylgeranylacetone (GGA) が、HSP を誘導する作用があり、ヒトへの安全性の観点からも、最も容易に検証ができるのではないかと考えられた。
- ・ 3%DSS 腸炎マウスモデルに対し、GGA と Vehicle を投与して HSP25, 40, 70, 90 の発現を検証したところ、GGA 群において HSP70 の上皮を中心に強い誘導が確認された。
- ・ そこで、実際に DSS 腸炎マウスモデルに対し、GGA 0, 50, 100, 300, 500mg/kg を単回投与し 7 日目における臨床症状を観察したところ、100mg/kg 以上から下痢・血便や体重減少などの改善が認められ、500mg/kg ではほぼ完全に治ったという結果が得られた。

※GGA 450mg/kg で現在の人への投与量の約 150 倍

従って、高用量であれば、重度の炎症も改善できるのではないかと考えられたが、ヒトへの応用が可能かという点が問題点として挙げられた。

- ・ HSP が GGA によって誘導される量は $1\mu\text{M}$ と言われており、その為に必要な GGA 血中濃度は約 $0.33\mu\text{g/mL}$ とされている。そこで、販売メーカーの報告による通常量の 3 倍である GGA 150mg の単回投与試験における血中濃度の推移をみると、HSP $1\mu\text{M}$ を保てる GGA $0.33\mu\text{g/mL}$ 以上となるのは投与後 4~8 時間後の約 4 時間弱であったことから、1 日 3 回投与すれば半日程度は必要な HSP 濃度は保てると考えられた。
- ・ 単回投与時における安全性は販売メーカーの方で確認しているため、長期投与時の安全性などの検証が今後の課題となると考えられた。
- ・ 健常ボランティア 3 例に対し、GGA450mg/日を 7 日間服用していただいた後の PBMC 内 HSP mRNA 量を測定したところ、HSP70 で約 2 倍、HSP90 は約 3 倍の増加が認められた。また、実際の HSP70 蛋白量は平均 $1.40\rightarrow 2.04\text{ng}/\mu\text{g protein}$ と増加が確認された。
- ・ 危惧される点としては HSP70 にはアポトーシスを抑制する効果があり、癌患者で高値になりやすいことが知られていることから、癌促進の可能性についても検討をしなければならないと考えられた。

[今後の方針]

- ・ ボランティアによる検討
 - 至適投与量、長期安全性の確認
- ・ 潰瘍性大腸炎への臨床応用
 - 軽症、中等症を対象とした小規模の pilot study
 - プラセボを対照とした RCT

選択的細胞除去・移入療法の開発

細胞治療としての炎症性腸疾患における免疫抑制性 T 細胞移入療法 -第 3 報- (分担研究者: 渡辺 守)

[背景]

- ・実績面: Science 総説への掲載

～元来、ヒトで lamina propria に存在する CD25(+)細胞は病的な細胞と考えられていたが、その中でも CD25^{bright}な細胞は制御性 T 細胞だと言うことを証明した。また UC, CD の活動期における粘膜上では CD25^{bright}な細胞が有意に増加しており、これらも制御性機能を有していることを初めて明らかにした。

→なぜ、IBD 患者の LP T_R は増加にも関わらず、手術を余儀なくされたのか?

～In vitro のシステムで炎症性サイトカインの代表的なものを添加したところ、多くに対しては LP CD25^{bright} はそれらを制御する作用が認められるが、IL-2 や IL-15 を添加すると、それらの機能がキャンセルされてしまう現象が観察された。すなわち、活動性の粘膜において炎症性サイトカインが増えることが、制御性 T 細胞の数が見かけ上増えてしまうことになっているのではないかと推察した。

- ・また、最近 IBD の活動期における末梢血内の制御性 T 細胞は減少していると報告された

→これらの報告から、IBD の活動期の患者においては末梢血中の制御性 T 細胞の減少が Primary であると推察した。この結果、腸管に移入する制御性 T 細胞の比率が少なくなり、effector T 細胞の方が比率として多く移入する。そこで、免疫系のバランスが崩れ、effector T 細胞の方が増加・活性化し、IL-2 や IL-15 が局所で産生され、制御性 T 細胞を増加させることが IBD のメカニズムではないかと推察した。

→なぜ、末梢血内の制御性 T 細胞は減少するかという点について考えた場合、可能性として考えられるのは、胸腺に異常があり、制御性 T 細胞の供給が減っている場合、そしてもう一つは Activation される腸間膜リンパ節において制御性 T 細胞の比率が減っており、それが末梢に出てきている制御性 T 細胞の割合の減少につながっている場合である。また、リンパ球は一旦腸に移入すると外に出てこないとも言われているので、末梢における比率は変わらないと考える。

[Leukocytapheresis-assisted Re-transfusion of CD4⁺CD25⁺ T_R Cells : LART-25]

- ・概念

～血球成分除去療法で除去されたリンパ球の中から、制御性 T 細胞を戻し、バランスを是正するというコンセプトである。

※ハザードコントロールなどの観点からも制御性 T 細胞を生体外で培養増殖させ移入させると言う方法は避けたいと考えていた。

- ・方法: Basiliximab-conjugated ClinEXVivo を作成し、In vitro での検証を行う。

※Basiliximab は抗 CD25 抗体であり、既に腎移植の適応にて承認されている。また、UC に対する Phase II 試験での有効性が報告されている。

※ClinEXVivo は Dynal 社により開発された Beads であり、ヨーロッパでは FDA に相当する機関での承認を受けており、米の FDA にも申請中のものである。

- ・結果: Basiliximab-conjugated ClinEXVivo によって採取された細胞は制御性 T 細胞の機能を有することがわかった。

[今後の方針: 潰瘍性大腸炎白血球除去療法補助制御性 T 細胞移入療法 (LART-25)]

- ・班会議のバックアップとチェック機構

- ・用法特許申請検討

- ・倫理委員会申請中

- ・In Vitrogen との技術交渉

- ・In Vitro 解析

- ・九州 Group との協力

- ・目標: 2 年間で 5 例の UC パイロットトライアル (安全性、有効性)

→多施設無作為二重盲検試験

潰瘍性大腸炎に対する白血球除去・制御性 T 細胞移入療法の開発

(分担研究者：中村和彦)

[背景・目的]

- ・ CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞は広範な免疫反応を制御し、自己免疫疾患や腸管障害などを抑制する。
 - ・ 潰瘍性大腸炎における白血球除去療法に白血球が除去される際、大腸炎を誘導する細胞に加えて制御性 T 細胞も除去されているものと考えられる。
- 血球成分除去療法時に除去された白血球より制御性 T 細胞を分離・体内に移入する事で潰瘍性大腸炎のより有効な制御を目指す。

[除去白血球からの制御性 T 細胞の分離]

- ・ 遠心分離法による血球成分除去療法との組み合わせで行う。
 - ・ 磁気細胞分離システム (MACS) を用いる。
- ※CliniMACS Cell Selection System：閉鎖回路で無菌的に大量の細胞分離が可能。CD34⁺幹細胞移植などで既にヨーロッパなどで臨床に実績がある。

[ヒト末梢血制御性 T 細胞の同定方法]

- ・ CD4⁺CD25^{high}：制御性 T 細胞 CD4⁺CD25^{low}：非制御性 T 細胞
- ～これが現在最も良く用いられている同定法だが、CD25^{high}とCD25^{low}の境界が不明瞭であり、分離には FACS sorting が必要であることから、本開発における細胞療法には適さないと考えられた
- 磁気ビーズを用い CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺を指標に制御性 T 細胞を分離することとした。

[これまでの検討の結果]

- ・ 活動期潰瘍性大腸炎において末梢血中の CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺制御性 T 細胞の割合が低下していた
- ・ 健康人末梢血 (buffy coat) より磁気細胞分離システム (MACS) を用いて CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺T 細胞を高純度に分離可能であった。
- ・ 分離された CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺T 細胞は制御性 T 細胞機能を有し、特異的マーカーを強発現していた。

[今回の検討]

- ・ 潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法にて得られた白血球より免疫制御活性を持つ制御性 T 細胞が分離可能かどうかを検討した。

[潰瘍性大腸炎患者末梢白血球からの制御性 T 細胞の分離]

- ・ 潰瘍性大腸炎患者に Heamonetics 社の成分採血装置 (CCS) を用いて遠心分離法による血球成分除去療法施行
 - ・ 除去された白血球より Ficoll gradient により単核球を分離
 - ・ MACS beads (CD4⁺ T cell Isolation Kid) を用いて CD4⁺細胞を negative selection
 - ・ MACS beads (CD45RA Microbeads) を用いて CD45RA⁺細胞 (≒CD45RO⁺) を negative selection
 - ・ MACS beads (CD25 Microbeads) を用いて CD25⁺細胞を positive selection
- D4⁺CD45RA⁻CD25⁺細胞 ≒ CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺細胞

※1x10⁹の細胞から 5x10⁶の細胞が採取可能であった

- ・ この細胞は T 細胞 (CD4) 抑制効果を示し、FOXP3 の発現も認められた

[まとめ]

- 1) 潰瘍性大腸炎患者より血球成分除去療法 (遠心分離法) にて除去された白血球から、磁気細胞分離システム (MACS) を用いて、CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺制御性 T 細胞が高純度に分離可能である。
 - 2) 潰瘍性大腸炎より分離された制御性 T 細胞は、免疫制御機能 (T 細胞増殖抑制効果) を有し、制御性 T 細胞の特異的マーカーである FOXP3 を強発現する
- 遠心分離法による血球成分除去療法との組み合わせで制御性 T 細胞の分離、移入が可能

[今後の方針]

- ・ 臨床応用可能な細胞分離法の確立
 - GMP 基準に準拠した制御性 T 細胞の確立
 - CliniMACS CD25 beads (GMP grade) は、欧米で research 目的に使用可能
 - ～Millenyl Biotec 社に、CliniMACS reagent (GMP grade) の提供を九州大学知的財産法部を通じて打診中

分子デリバリーシステムを用いた治療法確立

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)

[粘膜免疫担当細胞を標的とした経口ドラッグデリバリーシステムの開発研究の経過]

- 1) 高分子バイオマテリアルのポリ-L-D 乳酸を用いた免疫抑制剤封入マイクロカプセルの開発
(ステロイドホルモン・免疫抑制剤・生理活性物質など)
→特許番号：2000-143538
- 2) マウス・ラット腸炎モデルに対するデキサメタゾン封入ポリ-L-D 乳酸マイクロカプセル (DxMS) の治療効果が認められた
- 3) 経口投与による薬剤の血中移行・腸管傷害などは殆ど認められない (マウス・ラット)

(デキサメタゾン含有マイクロスフィア (Dx-MS) の長期経口投与による毒性試験)

- ・試験目的：Dx-MS の週2回経口反復投与による毒性試験
- ・使用動物：ラット (各群35匹)
- ・投与量：Dx-MS 100, 1000mg/kg (実験腸炎での有効量と10倍量)
- ・投与期間：8週、6ヶ月
- ・成績：腸管重量、組織所見、尿・血液検査に異常を認めない

[研究計画]

～腸管M細胞および免疫担当細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患の治療
(関西医科大学臨床研究承認 第40611号、京都大学学内倫理委員会承認)

[目的] 潰瘍性大腸炎患者における Dexamethasone-Microsphere 製剤の有用性を検討する

[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

- 1) ステロイド依存例 (PSL: 10~25mg/日)
- 2) 難治性の中等症、重症の活動期症例
- 3) 相対的手術適応
- 4) 説明文と同意書による同意取得

[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) に対し腸溶カプセルに封入した DEX-MC を 1mg/kg を4週間隔日注腸投与
- ・臨床評価 (前、2週、4週)
 - 臨床症状 (厚生労働省重症度、他)
 - 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)

[現状]

- ・現在登録待ちの状態であるが、対象患者が少ない為、対象の幅を広く (軽症例を含めるなど) するなどの追加申請なども検討している。

新しいコンセプトによる治療法開発

Crohn 病における核内受容体 LXR の発現と機能解析, 治療標的としての検討 (分担研究者: 日比紀文)

[背景]

- ・PPAR γ やステロイドレセプターに代表される核内受容体の一つである LXR はコレステロールのセンサーの役目を果たすものであり、コレステロールが増加すると LXR に結合し、排泄に誘導するという機能を持っている。これは主に動脈硬化において研究が進められているが、近年 LXR に対するアゴニストが炎症を抑制するという報告がなされたことから、この部位を標的とした治療法がないか検討を行った。

[方法・結果]

- ・UC, CD と健常人における LXR の発現がどのようになっているか調べたところ、健常人ではほとんど発現していなかったが、UC, CD 患者におけるマクロファージで高率に発現しているのが認められた。
- ・また、CD 患者の小腸パネート細胞内にも LXR が高率に発現している事が認められた。

※近年、NOD2 のリガンドとなる MDP をマウスに投与したところ、LXR が上昇することが報告されている

- ・ヒトマクロファージに MDP を添加すると LXR 発現が上昇することが認められたことから、細胞内寄生菌や MDP などのシグナルが非常に重要であり、パネート細胞や NOD2 という MDP のレセプターを有する細胞で LXR が発現してくると考えられた。

→現在、MDP の添加による LXR 発現の上昇の機構について検討を行っている

- ・LXR のアゴニストである物質が既に開発されており (GW3965)、炎症性腸疾患患者から採取してきた LPMC に添加したところ、炎症性サイトカイン産生の抑制が認められた。
- ・DSS マウスモデルにて GW3965 投与群、非投与群で効果を比較したところ、体重、組織学的所見、肉眼所見の改善、炎症性サイトカインの産生抑制が GW3965 投与群において認められた。

[まとめ]

- ・マクロファージやパネート細胞では、なんらかの MDP のような刺激が加わるによって LXR の発現が亢進し、そこにアゴニストが来ることでそれが抑制されることから、これが、治療のターゲットとなり得るのではないかと検討を進めている段階である。

[質疑応答]

- ・GW3965 の現状は？

～動物モデルに対する動脈硬化抑制効果が認められたが、脂肪肝などの副作用も認められたため、開発は中断されている状況であるが、現在リポキシネーションの起こりにくい物質が開発されつつあり、将来的にはそちらに移行する予定である。

厚生科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」
平成 17 年度第 2 回総会プログラム

(敬称略)

開会 (14 : 00)

I. 厚生労働省健康局疾病対策課御挨拶 牧野友彦先生

II. 主任研究者挨拶・研究の進め方 班長：渡辺 守

III. 研究報告

◎ 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立 (14 : 20～15 : 20)

1) 腸管上皮の分化制御シグナルの解明と腸管粘膜修復治療への応用 (分担研究者：渡辺 守)

○岡本隆一、土屋輝一郎、大島 茂、新垣美郁代、吉岡篤史、村山巖一、金井隆典、渡辺 守

(東京医科歯科大学大学院消化器病態学)

2) 自然免疫制御による炎症性腸疾患の治療法開発 (分担研究者：高後 裕)

○綾部時芳¹⁾、前本篤男^{1,2)}、田邊裕貴²⁾、蘆田知史²⁾、高後 裕¹⁾

(¹⁾ 旭川医科大学消化管再生修復医学、²⁾ 旭川医科大学第三内科)

3) HGF および HGF 遺伝子大腸粘膜下注入療法の開発 (分担研究者：鈴木健司)

○鈴木健司、河内裕介、朝倉 均、青柳 豊 (新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学)

4) 炎症性腸疾患に対する組換えヒト HGF の臨床応用 (分担研究者：坪内博仁)

坪内博仁¹⁾、○井戸章雄²⁾、沼田政嗣³⁾、児玉眞由美³⁾、宇都浩文³⁾、森内昭博²⁾

(¹⁾ 鹿児島大学消化器疾患・生活習慣病学、²⁾ 京都大学病院探索医療センター、³⁾ 宮崎大学第二内科)

◎ 腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発 (15 : 20～15 : 50)

5) 自然免疫系の制御と炎症性腸疾患 (分担研究者：竹田 潔)

○竹田 潔 (九州大学生体防御医学研究所発生工学)

6) 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)

○大川原辰也、武田宏司、浅香正博 (北海道大学大学院医学研究科消化器内科学)

◎ 選択的細胞除去・移入療法の開発 (15 : 50～16 : 20)

7) 細胞治療としての炎症性腸疾患における免疫抑制性 T 細胞移入療法の実現化に向けて
(分担研究者 : 渡辺 守)

○金井隆典、蒔田 新、根本泰宏、伊藤ゆみ、鬼澤道夫、戸塚輝治、渡辺 守
(東京医科歯科大学大学院消化器病態学)

8) 潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法の開発 : 臨床応用可能な
制御性 T 細胞分離法に関して (分担研究者 : 中村和彦)

○中村和彦、隅田頼信、金山兼司、本田邦臣、水谷孝弘、秋穂裕唯、樋口奈緒美、吉永繁高、
板場壮一、高柳涼一 (九州大学大学院病態制御内科学)

◎ 分子デリバリーシステムを用いた治療法確立 (16 : 20～16 : 35)

9) 潰瘍性大腸炎患者におけるデキサメサゾン含有ポリ乳酸マイクロカプセルの有効性に
関する臨床研究 (分担研究者 : 岡崎和一)

○岡崎和一¹⁾、松下光伸¹⁾、内田一茂¹⁾、川股聖二¹⁾、安藤佑吾¹⁾、廣田育彦²⁾、仲瀬裕志³⁾、
西尾彰功³⁾、千葉 勉³⁾ (¹⁾ 関西医科大学消化器内科、²⁾ 関西医科大学薬剤部、³⁾ 京都大学消化器内科)

◎ 新しいコンセプトによる治療法開発 (16 : 35～16 : 50)

10) 遠位型潰瘍性大腸炎に対するレバミピド注腸療法の検討 -無作為抽出法による
Pilot study の成績より (分担研究者 : 日比紀文)

桜庭 篤、矢島知治、中澤 敦、久松理一、岡本 晋、井上 詠、○緒方晴彦、
岩男 泰、日比紀文 (慶應義塾大学医学部消化器内科)

事務局連絡

閉会の挨拶

(17 : 00 終了予定)

平成17年度第2回総会出席者名簿

平成18年2月15日(水)

参加者57名(敬称略)

班 長
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)
坪内博仁(鹿児島大学消化器疾患・生活習慣病学)
高後 裕(旭川医科大学第3内科)
岡崎和一(関西医科大学第3内科)
中村和彦(九州大学大学院病態制御内科)
鈴木健司(新潟大学消化器内科)
竹田 潔(九州大学生体防御医学研究所発生工学分野)

参加協力者

井上 詠、緒方晴彦、鎌田信彦(慶應義塾大学消化器内科)
武田宏司(北海道大学医学部第3内科)
井戸章雄(京都大学医学部附属病院探索医療センター)
沼田政嗣(宮崎大学医学部第2内科)
児玉眞由美(宮崎大学医学部第2内科)
綾部時芳、前本篤男(旭川医科大学消化管再生修復医学)
内田一茂(関西医科大学第3内科)
隈田頼信、金山兼司(九州大学第3内科)
大川原辰也(北海道大学第3内科)
河内裕介(新潟大学消化器内科)
田中浩紀(札幌厚生病院第1消化器科)
高山哲治(札幌医科大学第4内科)
千葉俊美(岩手医科大学第一内科)
土肥多恵子(国立国際医療センター研究所)
工藤進英(昭和大学横浜市北部病院消化器センター)
小島 徹(東京大学医学部外科)
宮田充樹(愛知医科大学消化器内科)
森田英次郎(大阪医科大学第2内科)
伊藤壽記(大阪大学生体機能補完医学)
高川哲也、應田義雄(兵庫医科大学下部消化管科)
人見麻子(旭化成メディカル)
小柳勝義(アステラス製薬)
星野信男、神田徳雄、小路利治、チュアエバン(大塚製薬)
細井栄治、笠原貴志(JIMRO)
岡本正人、辻井勝哉(田辺製薬)
中丸幸一、藤井克典、池淵 悟、川村織恵(日清キョーリン製薬)
酒巻善春(ユーシービージャパン)
牧野友彦(厚生労働省疾病対策課)
金井隆典、戸塚輝治、岡本隆一、蒔田 新、野崎賢吾、富田貴之
(東京医科歯科大学大学院消化器病態学)

事 務 局

山崎元美、辻 泰子、伊藤裕子(東京医科歯科大学大学院消化器病態学)

厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業
「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」
平成17年度第2回総会議事録

(敬称略)

主任研究者 渡辺 守 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学)

期日:平成18年2月15日(水)14:00~17:00

場所:味の素(株)本社 B1大会議室(東京都中央区京橋1-15-1)

I. 厚生労働省健康局疾病対策課ご挨拶 課長補佐:牧野友彦 2

II. 主任研究者挨拶・研究の進め方 班長:渡辺守 2-4

III. 研究報告

【上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立】

- ・腸管上皮の分化制御シグナルの解明と腸管粘膜修復治療への応用
分担研究者:渡辺 守 4-5
- ・自然免疫制御による炎症性腸疾患の治療法開発
分担研究者:高後 裕 5-6
- ・HGF および HGF 遺伝子大腸粘膜下注入療法の開発
分担研究者:鈴木健司 7
- ・炎症性腸疾患に対する組換えヒト HGF の臨床応用
分担研究者:坪内博仁 8-9

【腸管特異的免疫調節機構を応用した治療法の開発】

- ・自然免疫系の制御と炎症性腸疾患
分担研究者:竹田 潔 10-11
- ・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 11

【選択的細胞除去・移入療法の開発】

- ・細胞治療としての炎症性腸疾患における免疫抑制性 T 細胞移入療法の実現化に向けて
分担研究者:渡辺 守 12
- ・潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法の開発: GMP 基準に準拠した
制御性 T 細胞分離法に関して
分担研究者:中村和彦 13

【分子デリバリーシステムを用いた治療法確立】

- ・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 14

【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レバミピド注腸療法の検討 -無作為抽出法による Pilot study の成績より
分担研究者:日比紀文 15

I. 厚生労働省健康局疾病対策課ご挨拶 課長補佐：牧野友彦

- ・ 難病に対する事業について簡単にご紹介させていただきますと、昭和47年から始まり、患者数が少なく治療法が無い、いわゆる難病について研究をして頂いているもので、実際には大きく3つのセクションに分けて行われています。一つ目は調査研究と呼ばれている、疫学情報やガイドラインの作成などを連綿と続けて頂いている部門、そして2つ目は社会学的な領域横断的な部門で疫学や免疫学的なアプローチからの原因解明や感染症の観点からの解析から、医療費の構造解析まで行っていただいております。そして3つ目は本研究班のように重点研究として行って頂いているもので、基本は3年単位でデータを出していただくと言うことで行っております。
- ・ 炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究班では、日本初のIBD治療法である血球成分除去療法を更に応用した考えのものや、免疫学的なアプローチといった、非常に興味深い内容であり期待させていると言う状況です。
- ・ 難病事業には総額20億程度の予算であります。それに加えて患者様の負担を補助する事業も行っています。これは、より絞り込んだ疾患について患者様の医療費について保険を使った後の自己負担をサポートするというものですが、現在こちらに非常に多くの金額がかかってしまっているという状況です。実際には国から200億、地方自治体から500億円という金額が支出されているというのが現状です。今後は本来のようにより研究部門にシフトしていきたいと考えております。
- ・ 現在、難病事業の見直しについても検討を行っており、難病とは何かについても検討しており、H14年に専門家から頂いたご意見では、患者数が少ない、原因が不明である、治療法が無い、長期に渡り生活に障害が及ぶということであり、例えば潰瘍性大腸炎では患者数が7~8万人と急増しており、このような部分についてどのようにしていこうかと検討している状況ですので、みなさま専門医のご意見も頂けたらと思っております。

II. 主任研究者挨拶・研究の進め方 班長：渡辺守

〔「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」班〕

～炎症性腸疾患難治例の治療法に直結する全く新規な概念による基礎的研究を行い実際の臨床応用まで

- ・ 何故、画期的治療法が必要なのか？
 ～患者数の増加は難治例の増加（3万人）に結びついており、70%は軽症・中等症で適切な治療が行われれば緩解導入できるが、30%は難治例（UC：2万人+CD：1万人）で、内15%以上が手術になる
 ～現在の難治例治療は患者のQOLを著しく悪化させてしまい、UCの場合は手術が必要となり、術後の平均便回数は6~7回で漏便もある。CDの場合は栄養療法が施行されるもののコンプライアンスの低下から再燃が多いということが指摘されている。
 ～現在の難治例治療である免疫抑制療法には限界があり、抗TNF- α 抗体ですら緩解導入率は60%、緩解維持率28%である。また、難治例は炎症が良くなっても、潰瘍が良くならず再燃してしまうという現状がある。

→全く新しい考え方の治療法がぜひとも必要

〔本研究班が立てた目標〕

- 1) 患者の治療法開発に直結する研究
- 2) これまでとは異なる概念の新しい治療法開発
- 3) 3年以内に、臨床応用への見込みが立つ
- 4) 患者のQOL向上に役立つ治療法開発
- 5) 医療経済に貢献するための既存の安価な薬剤による治療
- 6) Quality Journalへの発表、社会的インパクトも必要

→患者を診ている臨床系の基礎研究者8+基礎研究者1の9グループに限定

【本研究班の主な成果】

(目的：上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立)

- ・骨髄由来の上皮細胞による腸管粘膜の再生・修復 (東京医科歯科大) (慶応大) (*Nature Med* 2002)
 - 難治性 CD 患者への末梢血幹細胞移植 (慶応大)
 - 活動期 CD 患者への GM-CSF 治験 (全大学)
- ・腸管分泌型上皮細胞による腸管粘膜の修復 (東京医科歯科大) (慶応大) (*MCB* 2004) (*Gastroenterology* 2005)
 - ~腸炎マウスモデルにおける HGF の治療効果 (宮崎大) (新潟大)
 - HGF のヒトへの投与 (京大/鹿児島大/宮崎大)
 - ~分泌型上皮細胞の機能異常 (旭川医大) (東京医科歯科大)
 - 難治性 UC 患者への粘膜修復剤レパミピド投与 (慶応大)
 - 難治性 UC 患者へのイソロイシン投与 (旭川医大)

(目的：腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発)

- ・自然免疫統制による炎症抑制機構 (九大) (旭川医大) (北大)
(*Nature* 2004) (*Nature Med* 2005) (*Gastroenterology* 2002)
 - ~腸炎マウスモデルにおける MIF/HSP70 を介した免疫機構 (北大)
 - 難治性 UC 患者への HSP 誘導剤テブレノン投与 (北大)
 - ~パネート細胞/ディフェンシンの機能異常 (旭川医大)
 - 難治性 UC 患者へのイソロイシン投与 (旭川医大)
- ・腸管炎症における制御性 T 細胞の役割 (九大) (東京医科歯科大) (*J Exp Med* 2003) (*JL* 2004) (*JL* 2004)
 - 制御性 T 細胞 細胞分離システム (九大) (東京医科歯科大)

(目的：マイクロカプセルを用いた分子/薬剤デリバリー)

- ヒトにおける薬剤デリバリー (関西医大)

(本研究班の3年間の成果)

- ・43編のインパクトファクター7以上の論文
~*Nature* 1, *Nat Med* 3, *Nat Immunol* 1, *Immunity* 3, *J Exp Med* 3, *J Immunol* 6, *Gastroenterology* 7, *Mol Cell Biol* 1

- ・10件の臨床応用 (1件治験)

~9件各大学の倫理委員会/IRB委員会への申請：申請済5件、申請予定4件 (本年3月末までに)

→各分担研究者の研究計画達成度：80~100%、班全体としての研究計画達成度：90%

- ・臨床応用一覧

- 1) 難治性クローン病を対象とした CD34 陽性細胞移植
慶應義塾大学倫理委員会 2003年2月6日承認
- 2) 潰瘍性大腸炎患者に対するムコスタ注腸剤とペンタサ注腸剤の有用性の検討
慶應義塾大学院内 IRB 2005年1月5日承認
- 3) 潰瘍性大腸炎患者末梢血制御性 T 細胞の免疫制御機能の研究
九州大学医学部研究試験等倫理委員会 2005年3月31日承認
- 4) 腸管 M 細胞および免疫組織細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患治験
関西医科大学附属病院内 IRB 2005年6月15日承認
- 5) 劇症肝炎および遅発性肝不全に対する組換えヒト肝細胞増殖因子の第 I・II 相治験
京都大学 RB 2005年8月24日承認
- 6) 炎症性腸疾患に対する L-iodosin による自然免疫賦活治療
旭川医科大学倫理委員会 2006年2月10日申請予定
- 7) 活動性潰瘍性大腸炎に対する好中球エラストラーゼ阻害剤による新規治療
慶應義塾大学倫理委員会 2006年2月末頃申請予定
- 8) 潰瘍性大腸炎に対する白血球除去・細胞移入療法に関する研究
東京医科歯科大学倫理委員会 2006年3月頃申請予定
- 9) 活動期潰瘍性大腸炎を対象とした分子シャペロン阻害剤による臨床試験
北海道大学医学部倫理委員会 2006年3月頃申請予定
- 10) 活動期クローン病を対象とした GM-CSF 治験
製薬メーカー 2006年6月開始予定

(本研究班から倫理委員会/IRB 委員会に申請済/予定の臨床研究の相互関連)

- ・上皮細胞の再生・修復
～末梢血幹細胞移植、GM-CSF、HGF、レパミピド、イソロイシン、 γ -セクレターゼ阻害剤
- ・腸管特異的免疫調節
～テプレノン、シベレスタット、イソロイシン
- ・遠心法白血球除去療法＋制御性 T 細胞移入、2 分離システム
→既存薬剤、治療法の適応追加、改良にて臨床応用の短期化を図る
→分子デリバリーシステム：マイクロカプセル、注腸

(本研究班からの難治例に対する画期的治療法の提案)

→「既存の治療法」＋「上皮細胞の再生・修復」

(今後の本研究班の展開) ～同一の研究体制の維持 →同一の目標：基礎的研究を基盤にした早期の臨床応用

- ・臨床試験の有効性に関する EBM の確立
更なる安全性の確認
更なる患者の QOL 向上
- ・上皮の再生・分化制御、組織修復と腸管特異的免疫調節との相互調節機構の解明

→展望：医療経済に貢献～既存の安価な薬剤の適応拡大、新規治療法により手術/入院を減らす

Ⅱ. 研究報告

上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立

腸管上皮の分化制御シグナルの解明と腸管粘膜修復治療への応用

(分担研究者：渡辺 守)

[背景]

- ・腸管上皮はクリプトに存在する上皮幹細胞が(自己)増殖し中間前駆細胞となり、それが特定の機能を持った腸管上皮(吸収上皮、杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞)へと分化することがわかっている。特に小腸においては大半が吸収上皮に分化することが知られている。その一方で大腸では多くが粘液を産生するといわれている杯細胞に分化すると言われている。
- ・この大腸粘膜における杯細胞はリンパ球の増殖調節を行う IL-7、上皮表層のバリアーとなる粘液(MUC2)、また、損傷粘膜を修復する TFF3 などを産生するという、粘膜防御と修復に重要な役割を果たしていることが知られている。
- ・しかしながら、潰瘍性大腸炎の病変部では杯細胞が減少するという病理学的な特徴が知られているが、動物実験の解析から、Math1 は杯細胞への分化を促進している遺伝子、Hes1 は杯細胞への分化を抑制している遺伝子として特定された。
- ・これらの遺伝子はマウス腸管上では Notch シグナルにより制御されているということが考えられており、すなわち、分化の段階にて Notch シグナルがない場合は Math1 遺伝子の発現により杯細胞に分化し、Notch シグナルがある場合は Hes1 遺伝子が発現し、吸収上皮細胞に分化するのではないかと考えられている。

→「マウスの腸管で杯細胞の分化を制御している」と考えられている Notch の活性化が

- ヒト腸管上皮で同様の機能を持って働いているか?
- 潰瘍性大腸炎でみられる杯細胞の減少に関わっているか?

について検討を行った。

[方法・結果 1]

- ・ヒト大腸上皮由来培養細胞に対し、人工的な活性型 Notch タンパクを添加したものとしないものを比較したところ、活性型 Notch 蛋白を添加した方で Hes1 タンパクが増加することが確認された。すなわち、ヒト大腸上皮においても Notch の活性化により Hes1 タンパクが増加することがわかった。

- ・また、この Notch の活性化が生体で調べられるかどうか検討するために、抗-活性型 Notch1-抗体と抗-Hes1-抗体を用い、免疫染色をヒト小腸に対して行ったところ、ヒト小腸 Crypt 内の上皮では Notch が活性化していることが認められ、生体でも調べることが可能であることが確認された。
- ・そして、蛍光二重染色法を用いヒト大腸上皮における Notch 活性化と杯細胞との関係を検討したところ、Notch が活性化している上皮細胞は杯細胞に成れないことが確認された。
- ・また、Notch を過剰に活性化させると杯細胞が消失するという減少が認められ、これは潰瘍性大腸炎の病変部粘膜に類似した所見が観察された。
- ・そこで、実際に潰瘍性大腸炎の病変部において Notch が活性化されているのかを難治性患者の手術標本にて検討したところ、Notch が活性化していた事が確認された。

→これらのことから、潰瘍性大腸炎の病変部では過剰な Notch の活性化により杯細胞の減少が起こっていることから、Notch シグナルを阻害することで正常上皮構造への回復、杯細胞の回復が起きるのではないかと考えられ、これは、上皮再生の促進、局所防御能の早期回復が得られるのではないかと推測した。

[方法・結果 2]

- ・Notch の活性化を阻害する薬剤として γ -secretase inhibitor が知られており、これは Notch の切断を阻害し、活性化を阻害する薬剤であり、アルツハイマー病治療薬として国内外の製薬企業及び大学薬剤部での開発が進められている薬剤である。
- ・ γ -secretase inhibitor をマウスに投与することで腸管上皮の杯細胞が増加することが知られており、また、リンパ球分化制御をすることも知られており、自己免疫性のマウス脳髄炎モデルの炎症を抑制したことも報告された。

[Notch 阻害剤を用いた炎症性腸疾患の治療戦略]

- ・潰瘍性大腸炎病変部では杯細胞の減少や炎症細胞の浸潤共に、Notch シグナルの過剰な活性化が認められることから、Notch を阻害することで炎症細胞浸潤を抑制し、杯細胞を増加させることで、上皮再生能、防御機構を回復させることで、正常大腸への回復を促進できるのではないかと考えている。

自然免疫制御による炎症性腸疾患の治療法開発

(分担研究者：高後 裕)

[Paneth cell における α -defensin]

- ・抗菌ペプチドはヒトが生産している抗菌物質であり、耐性菌ができにくいという特性を持っている。我々はヒト小腸の Paneth cell に存在する抗菌ペプチドである α -defensins の HD5, 6 の抗体を作成し、実際にヒト小腸にて染色されることを確認した。また、HD5 の processing において HD-5 の前駆体が細胞内存在し、trypsin によって活性型 HD-5 として分泌されることを明らかになっている。
- ・Paneth cell の α -defensin は様々な腸内微生物に対し殺菌作用を持ち、In vitro ではエイズウィルスの殺菌作用もあることも確認した。また、このような分泌物が未熟樹状細胞や好中球、リンパ球に対しても何らかの働きがあるのではないかと報告してきた。
- ・そこで、健常人とクローン病患者における小腸陰窩を単離、比較したところ、クローン病患者における小腸陰窩は健常人と比べ、異常に長くなっていたり、内腔が広がっている陰窩が確認され、HD-5 の遺伝子発現量に非常にばらつきがあり、全く産生していない症例も確認された。そして、実際に細菌刺激による Paneth cell 細胞由来の殺菌活性を測定したところ、有意に低下していることが確認された。
- ・HD5 の立体構造による processing 異常を調べるために、Recombinant HD5 を作成し、DDT で還元した還元型 HD5 に対して trypsin 処理を行うと、分解されてしまうことが確認され、これはシステイン結合による折りたたみ構造が、trypsin によるペプチドの分解を防いでいるものと推測された。そこで、正常小腸粘膜、クローン病小腸粘膜を採取し、タンパクを注した後に trypsin 処理を行ったところ、正常小腸では活性型 HD5 の産生が確認されたが、クローン病小腸では著明な減少、あるいは無くなっている事が観察された。

→クローン病における Paneth 細胞では 1) HD5 mRNA の発現が低下しており、2) HD5 の立体構造異常による活性型 HD5 への processing 異常が認められ、3) 殺菌活性が低下しているのではないかとということが示唆された。

[Isoleucine による defensin 誘導能]

- ・ MDCK cell において、 β -defensin promoter を用いた reporter assay で β -defensin 活性を誘導
- ・ マウス気道粘膜の β -defensin 発現を誘導
- ・ ヒト小腸 Paneth 細胞の α -defensin 分泌を誘導

～上記の報告がなされており、予備試験において、CD 患者において投与1週間後で *Lactobacilli* の数を有意に増加させたという結果が得られた為、IBD 患者を対象とするパイロット臨床試験 (Isoleucine 4g/day) を実施した

[方法・結果]

- ・ Pilot study として CD12 例、UC5 例に対し、isoleucine 4g/日 (分2) を4週間服用していただき、投与2週間前から、投与終了後2週間後までにおける活動性の変化を検証したところ、1週後の CD の便回数において有意な低下が認められ、UC、CD においては活動性の有意な低下が観察された。

→Isoleucine による自然免疫機能賦活化

- パイロット試験において、クローン病患者の便中乳酸菌を有意に増加させた (4g/day, 1w)
- パイロット試験において、炎症性腸疾患患者の下痢を減少し、CDAI を有意に改善 (4g/day, 4w)

～In vitro で抗菌ペプチドの産生・分泌を誘導する Isoleucine は、自然免疫機能低下を示す炎症性腸疾患患者の病態の改善をもたらす可能性が高いと考えられた。

※旭川医科大学倫理審査委員会申請 (2006年2月) →臨床試験の実施する予定である。

[質疑応答]

- ・ CD 患者において活性型 HD5 産生が低下しているが、その原因は CD 患者の Paneth 細胞の分化異常なのか、それとも、HD5 特異的に産生異常が起きているのか？

→最近、NOD2 の mutation があるヒトでは HD5 の産生も低下しているとの報告もなされたが、日本人においては CD と NOD2 との関連は否定されている。しかし、日本人と欧米人が同様の strategy にて CD が発症していると考えた場合、自然免疫を認識する何かの分子が関連していると考えている。そして、HD5 産生低下の原因は不明であるが我々が最も知りたい部分であり、考えられるのは上述の2つに加え、分泌のメカニズムに何か問題がある場合ではないかと考えている。

- ・ Isoleucine が defensin を誘導する機序は？

→何らかのレセプターリガンド関係があると考え検討しているが、現在のところ不明である。

- ・ 大腸菌に difensine を組み込んで試験を行っているが、臨床応用は不可能か？

→本試験では特別な大腸菌を使っており、一般的な大腸菌ならば、difensine で殺菌されてしまう。

- ・ 臨床症状と HD5 の相関についての検討はされているか？

→今回は直接調べていないのでデータは無く、機序も不明である。しかし、印象としては患者の自覚症状が非常に改善している。また、安全性が非常に高いことがポイントであると考えており、今後更なる検討を進めていきたいと考えている。