

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)

[背景]

- ・我々のグループは炎症性腸疾患に対する新しい治療戦略として、従来の治療戦略である「抗炎症療法」に、新しい治療戦略である「分化再生療法」を加えることを考えている。そこで、増殖因子の中でも坪内先生らが初めて発見された HGF を臨床応用できないか検討を行ってきた。
- ・初めに試みたのは HGF 遺伝子療法が応用できないかを調べるために、HGF 遺伝子ベクターを Hydrodynamics 法にて DSS マウス腸炎モデルの肝臓に導入したところ、無治療群に比べ症状の改善が認められたものの、この方法はヒトに応用することが困難と考えられた。
- ・また、HGF の腸炎改善効果の機序について検討したところ、遺伝子治療群において BrdU 陽性細胞の増加が認められたことから、腸管上皮の分裂を促進していることが考えられ、またアポトーシス抑制効果、抗炎症効果も認められた。
- ・なお、AMG0001-HGF 遺伝子プラスミドは末梢血血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症・ピュルガー病）に対し、既に臨床治験が開始されている。

[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]

- ・投与3日目で便性状、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
- ・3%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。
- HGF 遺伝子治療はパテントなどの問題もあり、より早期に臨床応用できるよう、Recombinant の HGF の有用性について検討を行った。

[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、3,7 日後に評価を行ったところ、臨床症状は 2~5 日目まで有意な改善が認められ、3 日目では内視鏡像の改善、腸管短縮の抑制、組織所見の改善が認められた。また、Ki67 染色で確認したところ、腸管上皮に Ki67 陽性の細胞が認められ、分裂を促進していることが認められた。

[Recombinant human-HGF 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. rh-HGF の供与（鹿児島大学坪内教授）
 3. 投与方法：単独投与 or 5-ASA との併用、局所投与（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 rh-HGF 遺伝子の効果発現機序解析
 2. 発癌の危険性確認

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)

[大腸発癌に及ぼす組換えヒト HGF の影響]

- ・発癌性を検討するために以下の2つのモデルで実験を行った
 - 1,2-dimethylhydrazine (DMH) によって誘導される大腸前癌病変 aberrant crypt foci (ACF) の発生に及ぼす rh-HGF の影響を検討
 - 6週齢の F344 ラットに DMH 20mg/kg を週1回、4週間皮下投与した。8週目から PBS もしくは rh-HGF (500 μg/kg) を各 n=6、週5日間、計4週間静脈内投与し、12週後に大腸の ACF 発生について比較検討
→HGF 群は肝重量の有意に増加が認められたが、ACF の発生数については Control 群と同等であった。
 - DSS と DMH の併用投与によって大腸癌を誘導するモデルを用いて rh-HGF の発癌に及ぼす影響を検討
 - 6週齢の F344 ラットに DMH 40mg/kg を週3回、2週間連日で皮下投与し、同時に、1%DSS を自由飲水にて2週間経口投与した。この間、PBS もしくは rh-HGF (500 μg/kg) を週5週間、4週間静脈投与し、26週間後に両群間の ACF (各 n=6)、大腸腺腫と大腸癌の発生 (PBS 群 n=8、HGF 群 n=9) について検討
→生存率、体重、肝重量、腸管長のいずれも、両群間に差は認められなかった。ACF のトータルの発生率に差は認められなかったが4 crypt 以上の複合した ACF の発生率は有意に抑制されるという結果が得られた。また、腫瘍数の比較では両群に差は認められなかった。

→これらの結果から HGF は大腸癌を促進しないという結果が得られたと考えており、本結果にて治験を行う予定である。しかし、増殖因子である以上、発癌促進の危険性は否定できないので、その部分を含めインフォームドコンセントを十分に行う予定である。

[医師主導治験の問題点]

- ・組換えヒト HGF の臨床試験は治験の枠組みで実施される
 - ～組換えヒト肝細胞増殖因子 (rh-HGF)
 - 期待される効果：肝再生促進作用、抗アポトーシス効果 (抗肝炎症効果)、抗線維化作用
 - 製薬企業から提供される
 - 人体への投与実績のない未承認臨床サンプル (新規有効成分)
- 製薬企業から臨床試験 (≠治験) への供給は薬事法外となるため、組換えヒト HGF の臨床試験は「治験」として実施しなければならない
- 開発型の医師主導治験として実施する。

※人体への投与実績のない未承認臨床サンプルという部分が非常にハードルの高い部分であり、この新規有効成分をどのような対象に使用するかは倫理的、また人道的な部分も踏まえ、最初に命にかかわる疾患かつ有効な内科的治療法がない疾患である劇症肝炎および遅発性肝不全に対する治験を試みた。

・治験実施へのハードル

- 1) GMP レベルの治験薬 (製剤・原薬) →製薬企業の協力が必要となる
- 2) データ・資料 : a) 製造データ (GMP)、b) 非臨床試験データ (GLP/準 GLP)
- 3) IRB 承認および機構審査 : a) 届出資料準備 (プロトコール、概要書など)、b) 折衝、応答
- 4) GCP 監査 : a) 治験実施、b) 文書管理、c) 有害事象・法的報告
- 5) 診療部門の協力 : a) 治験責任/分担医師、b) 診療体制
- 6) 補償・賠償
- 7) 資金
- 8) 契約

- ・ 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
～医師主導治験への道のり
 - 2004年 5月 プロトコール、概要書、説明・同意文書の作成開始（プロトコール委員会）
 - 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3回 ～05年4月）
 - 10-12月 製薬企業との非臨床（安全性および製剤GMP）ミーティング（計4回）
 - 2005年 5月 医薬品など臨床試験審査委員会（IRB） →承認
医薬品医療機器総合機構に治験提出
 - 6月 医薬品医療機器総合機構 30日調査 ⇔ 照会事項への回答
 - 7月 治験薬納入
IRB：実施計画変更申請 →承認
 - 7-8月 CCP 監査終了
IRB：治験実施について承認
 - 9月 治験開始（9/1）
 - 12月 医薬品医療機器総合機構に治験計画変更届

→このようなノウハウを元に炎症性腸疾患への応用について検討を行った

- ・ 潰瘍性大腸炎に対する組換え型ヒトHGFの臨床応用
 - ・ 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、無作為化（+）、盲検化（+）
 - 投与方法 : 注腸投与
 - 治験薬投与 : 2週間（14日間）
 - 追跡期間 : 12週間
 - エンドポイント : 有害事象の有無、薬物動態
臨床効果～症状、内視鏡所見、病理所見、緩解導入
- ※過去のEGF注腸の文献を参考にした

※問題点

1. 診療体制の構築（マンパワーの不足など）
2. 企業との折衝、再契約
3. 注腸製剤化（GMP）及びその安全性：協力企業が必要
4. 資金の調達

[まとめ]

1. 二種の大腸発癌モデルにおいて、組換えヒトHGFは前癌病変、線種および癌音発生に影響を及ぼさなかった。
2. a) 組換えヒトHGFの臨床試験は、薬事法上治験の枠組みで実施せねばならない。
b) 医師主導治験として、まず劇症肝炎を対象とした第I/II相治験を開始した。本治験準備を通して、治験計画届への準備及び審査体制、GCPを遵守した治験実施体制を構築した。
c) 潰瘍性大腸炎を対象とした治験には、診療体制の構築、追加非臨床試験、GMP製剤化（協力企業）、資金調達が必要と考えられた。

[質疑応答]

- ・ IBDに対する臨床応用への時間的な見込みは？
→もし、注腸製剤にした場合、新たな安定性試験（年単位）を行う必要があるため、現状ではバイアルに入れたものを生食などに希釈して注腸する方法を考えている。また、今後の課題として、注腸投与時の血中へのleakがあり、それ次第で時期が変わる可能性もある。

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)

[背景・目的]

- ・ Stat3 mutant マウスでは Mφ における IL-10 のシグナルが無くなり、異常な活性化が認められる。そして、その Mφ は LLR4 を発現しており、腸内細菌を認識して炎症性サイトカインを異常に産生すると考えられている。とくに IL-12 を産生することで Th1 系の腸炎を起こすことがわかっている。
- ・ 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し、この機構を解析する為に、実際に大腸局所に存在する Mφ を採取し、その機能を LPS に対する刺激性から調べたところ、正常大腸のものは炎症性サイトカインを産生しなかった。従って、通常の Mφ は炎症性サイトカインを抑制する機構があるだろうと推測し、通常の大腸粘膜固有層に局在している Mφ に特異的に発現している遺伝子を解析したところ、いくつかの遺伝子が見つかり、これらは正常マウスの腹腔内 Mφ や腸炎の大腸における Mφ では認められなかった。
- ・ これらの特異的に発現している遺伝子の中から IκBNS に注目し、Mφ 系の細胞株に導入したところ、IL-6 の産生を抑制することがわかった。そこで、IκBNS がどのようにして自然免疫系の中での制御を行っているか解析を行った。

[方法・結果 1]

- ・ IκBNS KO マウスにおける大腸内 Mφ を LPS で刺激したところ、TNF-α 産生能に変化は認められなかったが、IL-6 産生能が高くなっていることが認められた。
 - ・ また、mRNA 発現の解析を行ったところ、TNF-α については 1h にピークを持ち WT と差は認められなかったが、IL-6 においては、WT は 3h 後にピークを持ち以後減少しているが、IκBNS KO マウスでは 5h 後でより高い発現を示していた。また、IκBNS の発現を調べると、WT では 1h 後にピークが認められた。
- このような結果から、IκBNS は IL-6 のような比較的遅れて発現してくるような炎症性サイトカインのブロックに関与しているのではないかと仮説を立てた

[方法・結果 2]

- ・ 各炎症性サイトカインについてその mRNA 発現について検討したところ、比較的早期 (1h) に発現のピークがあるもの (IL-1β、IL-32、IκBK) については WT と同様の結果が得られたが、遅く発現するようなもの (IL-12 p40、IL-16、G-CSP) については、IκBNS KO マウスは WT よりも高い発現を示した。
- IκBNS は、刺激後遅れて発現するものに対して特異的にブロックすると考えられた。

[方法・結果 3]

- ・ IκBNS は IκB ファミリーに属しており、NF-κB に associate していることから、実際に、IκBNS KO マウスにおける NF-κB の活性を調べたところ、LPS 刺激 1h 後には WT、IκBNS KO マウスともに DNA 結合能の誘導が観察され、WT はそれ以後 2, 3h 後にはその活性は低下したが、IκBNS KO マウスでは、その活性は維持されたままであった。つまり、IκBNS は NFκB の Activity を抑制する機能を持っており、その結果、刺激後遅れて発現するようなサイトカインを抑制するのではないかと考えられた。

[方法・結果 4]

- ・ WT、IκBNS KO マウスに対し 1.5%DSS 処理を行ったところ、WT でも mild な炎症は起きますが、IκBNS KO マウスではより重度の炎症がおき、大半が死亡してしまったことから、腸管炎症に対する感受性も高くなっていることがわかった。
- IκBNS というのは自然免疫系の細胞で、TLR の刺激で誘導される NF-κB によって誘導される分子の中でも特に遅れて発現するものに対して抑制効果を示し、そのことで、腸管の炎症を抑制していることがわかった。

[まとめ：自然免疫系の制御と炎症性腸疾患]

- ・自然免疫系の異常な活性化が炎症性腸疾患の発症を誘導することを明らかにした
(J. Clin Invest, 111, 1297-1308 2003; Net. Rev Immunol, 4, 499-511, 2004)
 - ・そのため、特に腸管に局在する自然免疫系細胞の活性は過剰な炎症反応を抑えるため、絶妙に制御されていることを明らかにした。
(Blood, 192, 4123-4129, 2003; J. Immunol, 174, 3656-3657, 2005)
 - ・その分子制御の一環として、核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が、あるサブセットの TLR 依存性の遺伝子発現をブロックし、さらに個体レベルでも腸管炎症を抑制することを明らかにした
(Immunology, 24, 41-51, 2005)
- 今後も、自然免疫系の活性機構については他にも存在すると考えられるので、このようなメカニズムを明らかにすることで、炎症性腸疾患の治療に対する基盤を提供したいと考えている。

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]

(マクロファージ遊走阻止因子：Macrophage migration inhibitory factor (MIF))

～1966年に、活性化 T リンパ球が分泌しマクロファージがランダムに遊走することを抑制し、病変部位へマクロファージを集積させるリンホカインとして初めて発見された。

1989年に、cDNA がクローニングされると、様々な細胞や組織での発現が解明され、また感染症、自己免疫疾患や炎症性腸疾患における役割が調べられた。

さらに、MIF はグルココルチコイドに対して拮抗するユニークな作用を持つタンパクであることも解明された。

(下部消化管炎症における MIF 研究)

- ・炎症性腸疾患患者において血中 MIF が上昇する。
 - ・その他の大腸炎患者でも MIF が上昇する。
 - ・UC 患者単球において MIF 刺激は IL-8 を著しく上昇させる。
 - ・ステロイド抵抗性 UC 患者 LPMC において抗 MIF 抗体は IL-8 産生を抑制する。
- MIF はケモカインに対する影響が強い物質と考えられる。
- ・抗 MIF 抗体は実験腸炎を抑制する。
 - ・MIF ノックアウトマウスで実験腸炎が抑制される。
 - ・MIF トランスジェニックマウスで実験腸炎が増悪する。またグルココルチコイドの上昇が強く抑制される。
 - ・MIF ノックアウトマウス腸管では TLR4 発現が低下している。

[MIF ワクチン]

～慢性関節リウマチなどの炎症を治療する目的で抗体を患者に投与する受動的抗体治療が行われ、効果が認められた、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、投与抗体に対する新たな抗体(抗-抗体)の産生が惹起される、コストが高いなどの課題も多い。

最近、能動的抗体治療として抗原として動物に投与し、自己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。

共同研究者は MIF について免疫原性を高める為に免疫活性化ペプチド(Th エピトープ)を抗原に融合し、効率よく抗親和性抗体を誘導する高機能 DNA ワクチンを開発した

本研究では Th エピトープ MIF DNA ワクチンを作成し動物に、実験腸炎の程度を研究する。

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)

[背景]

- ・末梢 CD4⁺CD25⁺T_R は活動性 IBD 患者で減少するということが最近報告されたことから、我々はその減少している CD4⁺CD25⁺T_R を本邦独自の治療法である血球成分除去療法を応用して戻すことを検討した。

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

- ・方法：Basiliximab-conjugated ClinEXVivo を作成し、In vitro での検証を行う。
※Basiliximab (Simulect) 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、欧米では臨床応用の認可を受けている
- ・結果：Basiliximab-conjugated ClinEXVivo で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。

→今後の予定

- ・班会議のバックアップとチェック機構
- ・倫理委員会申請中
- ・In Vitro 解析
- ・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
- ・用法特許申請検討
- ・In Vitrogen との技術交渉
- ・九州 Group との協力

[問題点]

- ・Beads がヒトの体に入ってしまう可能性を考え、Beads と Basiliximab を分離する技術開発が必要と考えられ、現在 In Vitrogen 社との連携で検討を進めている段階である

- ・Basiliximab Beads の安全性について確認をする必要があると考えられ、マウスに対し High dose (1.6x10⁷ beads)、Low dose (1.6x10⁵ beads) を投与したところ、リンパ球数、リンパ球数サブセットへの変化は及ぼさず、また血中 AST、ALT 値 (肝機能)、血中 Fe 値にも影響は及ぼさなかった。

→Beads が Carry-over されても問題ないことが示唆された。

→Basiliximab Beads の Carry-over における安全性はクリアーできるかもしれない
～無菌化の Beads 分離システムの開発

- ・また、末梢に大量の CD4⁺CD25⁺T_R を移入させた時にどのような影響があるかを検討するために、正常のマウスに対し CD4⁺CD25⁺細胞と CD4⁺CD25⁻細胞を移入し (各 2x10⁴) 検討したところ、体重には変化を及ぼさないことがわかり、また、大量末梢 CD4⁺CD25⁺移入は 4, 8 週間における末梢 CD4⁺細胞数、末梢リンパ節メモリーCD4⁺細胞数に変化をきたさないことがわかった。

→大量 CD4⁺CD25⁺移入の安全性はクリアーできるかもしれない

～若年良性疾患への適応にはさらなる安全性の確保が必要かもしれない

→HGF における治験のようによりシビアな症例を対象にした治験の実施が妥当かもしれない

※Reverse LART-25 の開発

→根治不能担癌患者に対する選択的 CD4⁺CD25⁺除去療法の開発

[質疑応答]

- ・IBD 患者における制御性 T 細胞は機能としては問題ないのか？

→機能の低下はないと考えられるので、従来の血球成分除去療法では除去してしまっていた制御性 T 細胞を戻すことは理にかなっていると考えられる。ただ、活動期 RA 患者における制御性 T 細胞は Suppression assay を見る限りでは正常だが、Cytokine assay などの手段では機能が落ちているという報告もなされているので、今後の検討課題の一つと考えられる。

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)

[コンセプト]

- 潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法（遠心分離法）産物
→磁気ビーズを用いた制御性 T 細胞分離：臨床応用可能なグレードの無菌的細胞分離法が必要
→制御性 T 細胞移入療法

[CliniMACS Cell Selection System を用いた制御性 T 細胞分離法]

- CliniMACS Cell Selection System (Miltenyi Biotec 社)
～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で臨床に用いられている。

[方法]

- 潰瘍性大腸炎患者に対する血球成分除去療法(遠心分離法:Hemonetics 社 CCS)を行い、CliniMACS CD8 Reagent, CliniMACS CD19 Reagent を用いた CD8⁺細胞、CD19⁺B 細胞の除去(negative selection)、その後 CliniMACS CD25 Reagent を用いた (CD4⁺) CD25⁺T 細胞を分離(positive selection)する。

※CliniMACS Cell Selection

～CD8 depletion：分離前 18.6%→分離後 0%、B cell depletion：分離前 7.31%→分離後 0.01%

CD25 enrichment：分離前 CD4⁺CD25^{hi} 2.75%→分離後 CD25 enrichment 41.5%、CD25-depletion 0.19%

FOXP3 染色を行ったところ、CD25-depletion における FOXP3 は 1.5%であり、一方 CD25 enrichment では 79.3%であった。

[結果]

- 各分画段階における CD4⁺CD25^{hi} 細胞数

| | Total cells (x10 ⁹) | CD25 ^{hi} (%) | Total CD25hi (x10 ⁶) |
|-------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Apheresis product | 3.98 | 2.75 | 109 |
| CD8/19-depleted | 1.9 | 2.76 | 52.4 |
| CD25-enriched | 0.055 | 41.9 | 22.6 |

[平成 15～17 年度のまとめ]

- 活動期潰瘍性大腸炎において末梢血制御性 T 細胞の割合が疾患活動性と逆相関し低下することを示し、制御性 T 細胞移入療法の理論的根拠を示した
- 潰瘍性大腸炎患者血球成分除去療法産物より、健常人と同様に磁気ビーズを用いて免疫制御機能を有した制御性 T 細胞が分離可能である事を示した。
- CliniMACS Cell Selection System を用いて潰瘍性大腸炎患者血球成分除去療法産物より、制御性 T 細胞が臨床応用可能なグレードで無菌的に効率よく分離可能である事を示した。

<結論>

- 試薬(磁気ビーズ)の安全性が確認されれば、潰瘍性大腸炎に対して血球成分除去療法(遠心分離法)との組み合わせで制御性 T 細胞移入療法が施行可能であると考えられた

<発表論文>

- Takahashi et al. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. Dig Dis Sci, in press

<臨床応用に関する現状>

(試薬に関して)

- CliniMACS CD19：CE
- CliniMACS CD25、CliniMACS CD8：Miltenyi 社より安全性に関する臨床試験進行中、4 月には CE 申請予定(当施設における倫理委員会申請状況)

・「潰瘍性大腸炎患者末梢血制御性 T 細胞の免疫制御機構研究」：平成 17 年 3 月 31 日承認

- 試薬の CE 取得を待ち、潰瘍性大腸炎患者への制御性 T 細胞移入療法施行に関して倫理委員会申請予定(今後の方針)

- CliniMACS Cell System を用いて分離された制御性 T 細胞の機能、投機的マーカーの発現を数例の患者で検討、確認する。
- 倫理委員会の承認を経て、血球成分除去療法・制御性 T 細胞移入療法の安全性に関する臨床研究を開始する

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 (試験番号：2000UK364、伊那リサーチ)
- ・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、関西医科大学附属枚方病院内臨床研究審査委員会承認)

[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 (10 μ g/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。

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)

[背景]

- レバミピド注腸の潰瘍性大腸炎に対する治療成績
 - 牧山ら（長崎大）（日本消化器病学会誌 2002）：有効率 87.5%（7/8）内ステロイド離脱症例 5 例（62.5%）
 - 宮田ら（愛知医大）（日本消化器病学会誌 2002）：有効率 70.0%（7/10）内ステロイド離脱症例 2 例（20.0%）
 - 野畑ら（名大）（日本消化器病学会誌 2002）：有効率 100.0%（3/3）内ステロイド離脱症例 0 例
- 組織修復による難治性 UC 治療の可能性

[今回のパイロット試験のポイント]

- 上記 3 種類のデータはステロイド依存例もしくは難治性にたいするステロイド減量もしくは離脱を目標とした試験であり、薬剤は 1 日 60mL（150mg/ Rebamipide）×2 回の投与期間は 4, 8, 16 週投与である。
- 本パイロット試験では、直腸炎及び左側型で、軽症から中等症の活動期を対象とし、血便があり、CAIスコアが 5 以上（開発試験を意識した選択基準）で行い、1 日 60mL（150mg/ Rebamipide）×1 回投与（緩解導入療法薬剤としての実用化を意識した投与回数）であり、投与期間は 4 週間（他の注腸製剤を意識した投与期間）で行った。また、同一基準で 5-ASA 注腸と比較した無作為化試験である。

[潰瘍性大腸炎に対する Rebamipide 注腸剤と 5-ASA 注腸剤の有用性の検討]

(目的)

- 厚生労働省・難治性腸管障害調査研究班の診断基準（平成 17 年 2 月 14 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、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 注腸の有効性及び安全性を比較検討する

(試験デザイン)

- Rebamipide 注腸および 5-ASA 注腸のオープンラベル多施設共同比較無作為試験
(試験薬剤&投与期間)
- Rebamipide または 5-ASA 注腸を 4 週間投与する
(薬剤の名称、含量及び剤型)
- Rebamipide 注腸 : (1 容器中に 150mg のレバミピドを含有する注腸容器製剤、注入量 60mL)
- 5-ASA 注腸 : (1 容器中に 1g のメサラジン含有する注腸容器製剤、注入量 100mL)
- (評価項目)
- DAI、EAI、組織所見、患者日誌、患者の全体評価、安全性評価

※2 月中には全例終了予定

[結果（途中経過）]

- Rebamipide 群：緩解 3/7 例、改善 4/7 例
- 5-ASA 群 : 緩解 3/9 例、改善 5/9 例 有効性に差なし
- 両群とも明らかな有害事象は認められなかった

以上よりレバミピド注腸療法は 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。

[質疑応答]

- このタイプの治療法の開発はどのくらいの期間で実用化できるか？
- 既存の薬剤の適応追加は比較的楽と考えられる。後はメーカーの積極性になるかもしれない

VIII. 研究成果の刊行物・別刷

Increase of Bone Marrow-Derived Secretory Lineage Epithelial Cells During Regeneration in the Human Intestine

TOMOKO MATSUMOTO,* RYUICHI OKAMOTO,* TOMOHARU YAJIMA,† TAKEHIKO MORI,† SHINICHIRO OKAMOTO,† YASUO IKEDA,† MAKIO MUKAI,[§] MOTOMI YAMAZAKI,* SHIGERU OSHIMA,* KIICHIRO TSUCHIYA,* TETSUYA NAKAMURA,* TAKANORI KANAI,* HIDEYUKI OKANO,^{||} JOHJI INAZAWA,[¶] TOSHIFUMI HIBI,[†] and MAMORU WATANABE*

*Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo; †Department of Internal Medicine, ‡Department of Diagnostic Pathology, and §Department of Physiology, School of Medicine, Keio University, Tokyo; and ¶Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Background & Aims: We have previously reported that bone marrow (BM)-derived cells contribute to the regeneration of the human intestinal epithelium. To analyze further how these cells arise, proliferate, and differentiate as epithelial cells, histologic analysis was conducted using endoscopic specimens. **Methods:** Thirty biopsy specimens from 14 female, sex-mismatched BM-transplantation recipients were examined. BM-derived cells were identified by fluorescent in situ hybridization (FISH) for the Y chromosome and immunohistochemistry. Multicolor FISH was used to exclude cell fusion. These cells were further analyzed for various differentiation or proliferation markers. **Results:** No evidence of cell fusion was detected. BM-derived cells did not distribute within the crypt as stem cells and rarely expressed Musashi-1. However, BM-derived epithelial cells frequently expressed Ki-67, and some of these cells appeared as pairs of adjacent cells. These cells also expressed markers of all 4 lineages of terminally differentiated cells. During regeneration following graft-vs-host disease, the number of BM-derived cells was substantially increased within Ki-67-positive cells. Interestingly, the number of cells expressing markers for secretory lineage cells was significantly increased within BM-derived cells. This change was unique for BM-derived cells, resulting in a significantly increased proportion of BM-derived cells among secretory lineage cells. **Conclusions:** BM-derived epithelial cells arise via a mechanism other than cell fusion and rarely give rise to stem cells. However, a small proportion of these cells express proliferation markers, and a majority reside as terminally differentiated cells. During regeneration BM-derived cells increase as secretory lineage cells, thereby contributing to restore epithelial functions.

The gastrointestinal (GI) epithelial cells arise from the intestinal stem cells residing in the lower part of the crypt. The intestinal stem cell provides daughter cells, which proliferate and in turn give rise to the 4 main

lineages of terminally differentiated cells, namely, absorptive cells, goblet cells, enteroendocrine cells, and Paneth cells.^{1,2} The terminally differentiated intestinal epithelial cells function not only as mechanical barriers, but they also perform lineage-specific functions, such as nutrition absorption and production of mucin, neuropeptides, or antibiotic peptides. Therefore, a considerable number of functional, terminally differentiated cells in each lineage must be continuously generated to maintain the proper function of the intestinal epithelium.

Much remains unknown, however, about the precise molecular mechanism by which epithelial cells arise, proliferate, and differentiate within the intestinal epithelium.^{3,4} Recent studies have drawn attention to the importance of Wnt signaling in the regulation of the differentiation of immature intestinal epithelial cells.^{5,6} Also, a stepwise differentiation model of intestinal epithelial cells has been proposed, in which differentiation is regulated by a series of transcription factors downstream of Notch signaling.^{7,8} In this model, goblet cells, enteroendocrine cells, and Paneth cells arise from a shared progenitor cell expressing *Math1* and are categorized as secretory lineage cells. In contrast, absorptive cells arise from a distinct progenitor cell expressing *Hes1*.

In the previous studies, we demonstrated that bone marrow (BM)-derived cells contribute to the regeneration of damaged intestinal epithelium as epithelial cells.^{9,10} This suggested that BM-derived cells could be a potential source for epithelial tissue regeneration. However, little is known about how these cells arise or whether they could proliferate and differentiate into

Abbreviations used in this paper: BMT, bone marrow transplantation; GVHD, graft-vs-host disease; FISH, fluorescent in situ hybridization.

© 2005 by the American Gastroenterological Association
0016-5085/05/\$30.00
doi:10.1053/j.gastro.2005.03.085

functional, tissue-specific, terminally differentiated cells. Several studies suggest cell fusion between BM cells and tissue-specific cells as one mechanism by which BM-derived nonhematopoietic cells arise,¹¹⁻¹⁵ whereas other studies suggest other mechanisms, including transdifferentiation of BM cells into tissue-specific stem cells.¹⁶⁻²¹ Further studies have reported that an increased proportion of BM-derived cells could improve the function of nonhematopoietic organs,^{17,18,22,23} suggesting that BM-derived cells could possibly express a tissue-specific function within the organ of residence.

In the present study, we demonstrate that BM-derived epithelial cells observed in the human intestine arise via a mechanism other than cell fusion and rarely give rise to intestinal stem cells. Our results show that a small number of these cells express markers of proliferation, but a majority express markers of functional, terminally differentiated epithelial cells within the human intestinal epithelium. During regeneration following epithelial damage, BM-derived epithelial cells increased as secretory lineage cells, thereby supporting both the regeneration and the essential functions of the intestinal epithelium. These results not only provide further support for the use of BM-derived cells to regenerate human intestinal epithelium but also suggest the existence of a unique regulatory system exclusive for BM-derived cells, which changes their differentiation pattern at the site of intestinal inflammation.

Materials and Methods

Bone Marrow Transplant Recipients

We studied total of 14 female recipients who had received sex-mismatched bone marrow transplantation (BMT). All patients were subjected to allogeneic BMT for the treatment of severe hematologic disorders: acute myeloblastic leukemia, aplastic anemia, and acute lymphoblastic leukemia. Three patients developed GI inflammation because of graft-vs-host disease (GVHD). Control of Y-fluorescent in situ hybridization (FISH) staining was provided from 2 males and 2 females (not undergoing transplantation). The details of the patients are summarized in Table 1.

GI Endoscopic Biopsy Specimens

All samples were taken at the Keio University Hospital. We obtained written informed consent from each patient in the formal style after explaining the nature and possible consequences of the studies. The ethics committees of Keio University and Tokyo Medical and Dental University both approved this study. We took endoscopic specimens of the GI tract because patients developed clinical symptoms such as nausea, vomiting, abdominal pain, or diarrhea and were suspected of chronic GVHD, acute GVHD, or other intestinal inflammation. A total of 30 biopsy specimens obtained from

Table 1. Characteristics of Patients

| Case | Reason for Transplantation ^a | Time from BMT to sampling (days) | Location of samples ^b | Histologic diagnosis |
|------|---|----------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| 1 | ALL | 26 | E, S, D | Acute GVHD |
| | | 51 | E, S, D | Acute GVHD |
| | | 77 | E, S, D | Acute GVHD |
| 2 | MDS | 26 | E, S, D | n.p. |
| | | 161 | E, S, D | Chronic GVHD |
| | | 381 | C | n.p. |
| | | 45 | E, S, D | n.p. |
| 3 | Aplastic anemia | 182 | E, S, D | n.p. |
| | | 288 | E, S, D | n.p. |
| | | 32 | E, S, D | n.p. |
| 4 | AML | 21 | E, S, D | n.p. |
| 5 | AML | 40 | E, S, D | Gastric polyp |
| 6 | ALL | 30 | E, S, D | n.p. |
| 7 | AML | 33 | E, S, D | n.p. |
| 8 | NHL | 39 | E, S, D | n.p. |
| 9 | AML | 23 | E, S, D | n.p. |
| 10 | AML | 39 | E, S, D | n.p. |
| 11 | MDS | 27 | E, S, D | Acute GVHD |
| | | 96 | S, D | Acute GVHD |
| | | 27 | E, S, D | Esophagitis |
| 12 | MM | 63 | E, S, D | Esophageal ulcer |
| | | 77 | E, S, D | Esophageal granulation |
| | | 28 | E, S, D | n.p. |
| 13 | MDS | 28 | E, S, D | n.p. |

n.p., no particular finding.

^aALL, acute lymphoblastic leukemia; MDS, myelodysplastic syndromes; AML, acute myelogenous leukemia; NHL, non-Hodgkin lymphoma; MM, multiple myeloma.

^bE, esophagus; S, stomach; D, duodenum; C, colon.

14 female patients were examined and analyzed retrospectively. Details of the specimens examined are also summarized in Table 1.

FISH for Human Chromosomes

FISH for chromosomes 1, 18, and Y using formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy specimens has already been described.⁹ Paraffin-embedded tissue samples were cut into either 6- μ m- or 3- μ m-thick serial sections and subjected to FISH analysis. The specific DNA probes used were as follows: clone pUC 1.77²⁴ for chromosome 1 (purchased from HSRBB, Osaka, Japan), clone L 1.84²⁵ for chromosome 18, and clone pHY10²⁶ for the Y chromosome. The probes were labeled by nick translation either with biotin-dUTP or DIG-dUTP (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) and detected by incubation with either avidin-FITC or anti-DIG-rhodamine (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). FISH images were captured using a Nikon epifluorescence microscope (Eclipse 800, Tokyo, Japan) coupled to a Sensys CCD camera and analyzed with QUIPS image software (Vysis, Downers Grove, IL). One section per course of endoscopy, containing 1-3 biopsy specimens of the GI tract, was used for the subsequent FISH analysis.

Histology and Immunoperoxidase Staining

Formalin-fixed, paraffin-embedded biopsy specimens were used unless otherwise mentioned. For anti-Musashi-1 antibody (Ab), cryosections prefixed in 4% paraformaldehyde were used. Immunohistochemistry using anti-human cytokeratin Ab (AE1/AE3, DAKO-USA, Carpinteria, CA), anti-human LCA (CD45) Ab (DAKO, Glostrup, Denmark), anti-human chromogranin A Ab (DAKO), anti-human CD10 Ab (clone 56C6, Serotec, United Kingdom), anti-human Ki-67 antigen Ab (ZYMED, San Francisco, CA), and anti-Musashi-1 Ab (14H1) was done as described elsewhere.⁹ Briefly, paraffin-embedded tissue samples were cut into 6- μ m- or 3- μ m-thick serial sections, placed on coated slides, and deparaffinized through a series of xylene and ethanol. Slides were then incubated with primary antibodies at 4°C overnight, followed by biotin-conjugated anti-mouse IgG antibody (E0433, DAKO-USA), biotin-conjugated anti-rabbit IgG antibody (E0435, DAKO-USA), or biotin-conjugated anti-rat IgG antibody (BA4000, Vectastain, Burlingame, CA). The following steps were done using the standard ABC method (Elite ABC kit, Vectastain). Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) was used as the substrate for the peroxidase reaction (Vectastain). All slides were counterstained with hematoxylin and observed under a microscope (CH40, Olympus, Tokyo, Japan).

Detection of Y-FISH-Positive Epithelial Cells

Y-FISH-positive epithelial cells were confirmed and quantified as described elsewhere.⁹ Y-FISH-positive, CD45-positive cells did not always show complete lack of cytokeratin staining because of its too intense staining. Therefore, all CD45-positive cells were counted as intraepithelial lymphocytes throughout the study, following exactly the same criteria used in our previous report.⁹ Expression of lineage-specific markers or Ki-67 antigen within the Y-FISH-positive epithelial cells was determined using serial sections. For detection of BM-derived enteroendocrine cells, immunohistochemical staining of chromogranin A was used as a specific marker. For detection of BM-derived goblet cells, alcian blue staining and Y-FISH were performed using a single section. Paneth cells were identified after H&E staining by their eosinophilic granules. Thus, for detection of BM-derived Paneth cells, H&E staining and Y-FISH were performed using a single section. BM-derived absorptive cells were determined as cells with negative staining for lineage markers of the other 3 lineages, negative staining for Musashi-1 or Ki-67 by immunohistochemical analysis and columnar shaped morphology consistent with the differentiated absorptive cells, and positive staining for CD10 in the serial section with Y-FISH. Regenerative epithelium in the sections was identified by the microscopic features of the epithelial cells, such as dense cytoplasm, nuclear swelling, or hyperchromatin.

Statistical Analysis

The results were expressed as the mean \pm standard error of mean (SE). Groups of data were compared by the

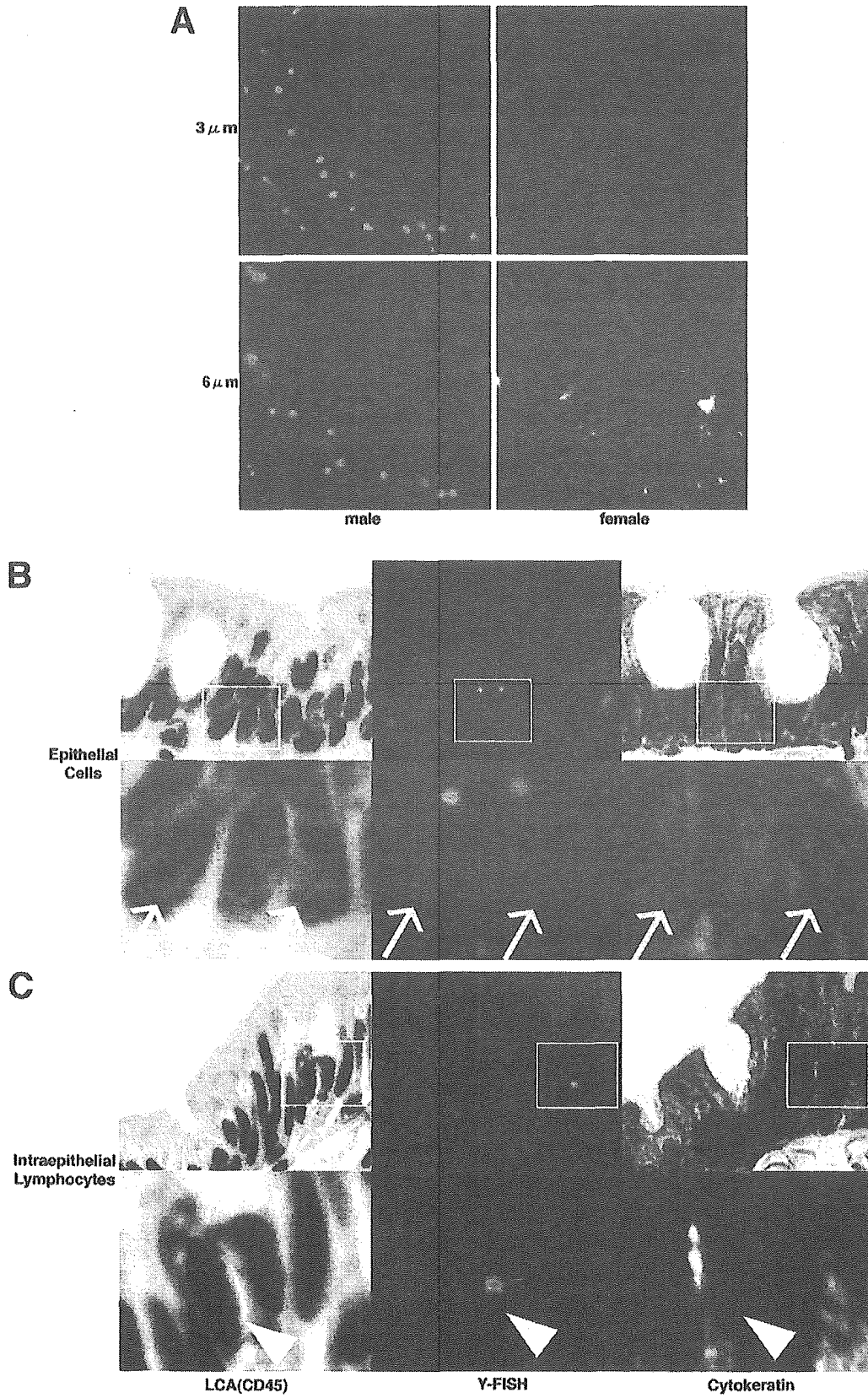
Mann-Whitney *U* test. *P* values less than .05 were considered statistically significant.

Results

BM-Derived Epithelial Cells Are Distributed in the Human Intestine as Euploid Cells With no Evidence of Cell Fusion

We have previously demonstrated the presence of BM-derived epithelial cells in every part of the human GI tract.⁹ In the present study, we attempted to characterize further the BM-derived epithelial cells. For this purpose, we refined our experimental procedure of Y-FISH analysis in this study. In our previous report, we used 6- μ m-thick sections to identify BM-derived epithelial cells. We confirmed that Y chromosomes were also clearly detectable in 3- μ m-thick sections (Figure 1A). We also confirmed that Y chromosome-positive epithelial cells within a female BMT recipient were clearly distinguishable from Y chromosome-positive lymphocytes by the analysis of 3- μ m-thick serial sections (Figure 1B). Therefore, we used 3- μ m-thick sections throughout this study to obtain strict and definite characterization of the BM-derived cells. The results obtained from 3- μ m-thick serial sections were further confirmed by double staining with Y-FISH and specific markers in single sections, as previously described. A total of 330 BM-derived cells were analyzed by this method, and 239 cells (72.4%) were identified as BM-derived epithelial cells and the remainder as BM-derived intraepithelial lymphocytes.

We then examined whether BM-derived epithelial cells detected by the present method arise via the mechanism of cell fusion. Cells generated by cell fusion *in vivo* are reported to form polyploid cells named *heterokaryons*.^{13,14,27} To reveal the ploidy of BM-derived epithelial cells, we performed multicolor FISH using specific DNA probes for chromosomes 1, 18, and Y. If BM-derived epithelial cells are generated by cell fusion, they will be aneuploid, and, therefore, probes for a single somatic chromosome will be targeted against at least 4 potential target chromosomes within the nucleus of these cells. Thus, we first examined the sensitivity of our FISH method by detecting 4 potential target chromosomes within a single nucleus (Figure 2A). Using probes for chromosomes 1 and 18, we confirmed that our FISH method could detect at least 3 fluorescent signals from 4 potential target chromosomes in a single nucleus at a sensitivity of around 70% (Table 2). Under the same experimental conditions, we examined tissue samples from nor-



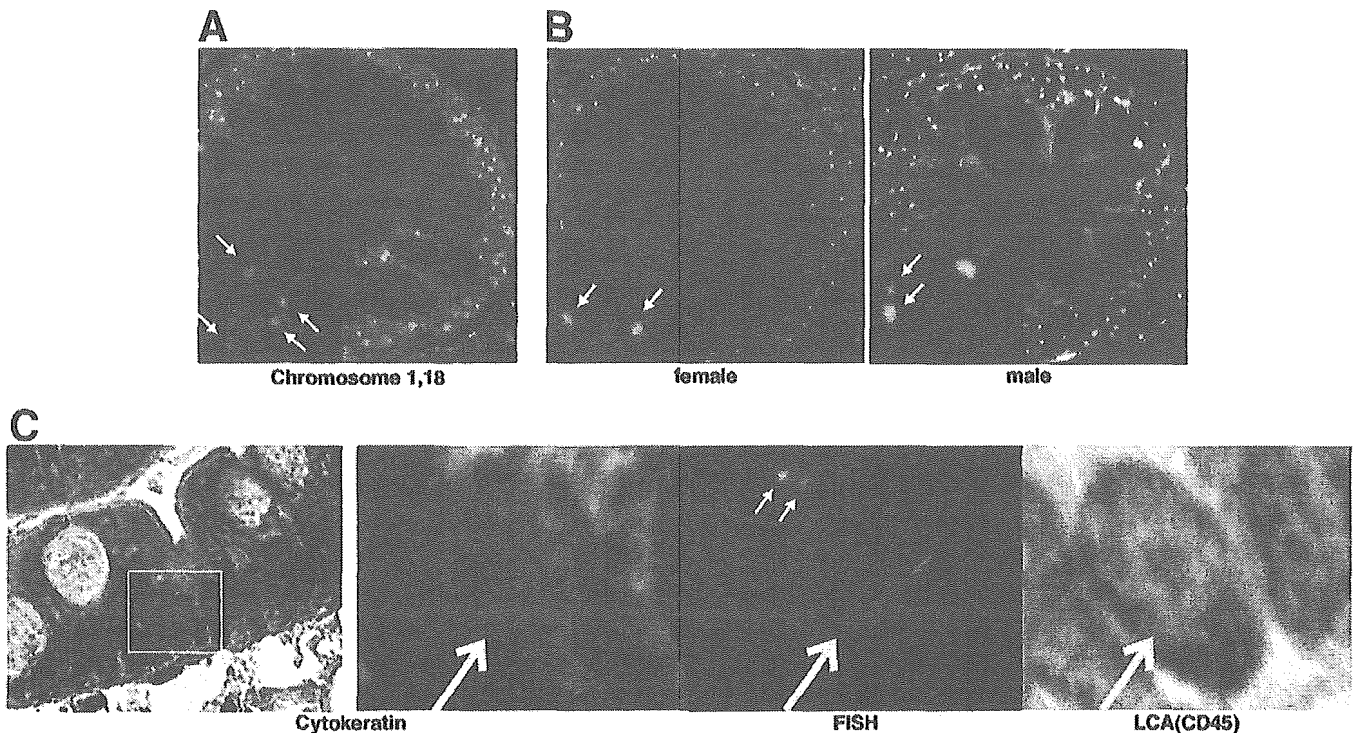


Figure 2. BM-derived epithelial cells show no evidence of heterokaryons. (A) Single-color FISH using centromere probes for both chromosomes 1 and 18 was performed to evaluate the sensitivity of detecting 4 chromosomes within a single nucleus. Analysis of 578 cells using a female colon section revealed that, when 4 potential target chromosomes for FISH are present within a single nucleus, 68.4% of cells show as cells containing at least 3 signals (*inset*) within a single nucleus (original magnification, $\times 800$). (B) Multicolor FISH was performed using male or female colon sections. Probes for chromosome 1 were labeled by FITC (*green dots*), and probes for the Y chromosome were labeled with rhodamine (*red dots*). In the female section, 0–2 green signals from chromosome 1 only were detected within a nucleus (*inset, left*). In the male section, 0–2 green signals from chromosome 1 with a single red signal of the Y chromosome were detected (*inset, right*). Analysis of 220 epithelial cells in male section and 298 epithelial cells in female section revealed that 85.2%–87.6% of epithelial cells showed as cells containing 1 or 2 green signals within a nucleus, both in Y chromosome-negative and Y chromosome-positive cells. No cell showed 3 or more green signals within a nucleus (original magnification, $800\times$). (C) Multicolor FISH was performed using small intestinal section from a post-BMT female recipient. Probes for chromosome 1 were labeled by FITC (*green dots*), and probes for Y chromosome were labeled with rhodamine (*red dots*). Up to 2 green signals from chromosome 1 were detected in the nucleus of a Y chromosome-positive epithelial cell (*yellow arrow*) but never more (*right 3 panels*; original magnification, $12,800\times$). *Right 3 panels* represent the magnified view of the area indicated by the *yellow square* in the *left end panel* showing the lower magnification view of cytokeratin staining (original magnification, $3200\times$). Analysis of 177 Y chromosome-positive and 421 Y chromosome-negative epithelial cells revealed no difference in the number of green signals seen in a nucleus between the 2 groups (1.06 ± 0.713 vs. 1.13 ± 0.703 , respectively, $P = .134$).

mal male, normal female, and female BMT recipients, using specific probes for chromosomes 1 and Y (Figure 2B). Results of multicolor FISH in normal male or female samples showed that up to 2 discrete signals were detected in each nucleus of epithelial cells,

whether or not a signal of the Y chromosome was present (Table 2). Surprisingly, results of multicolor FISH using tissue samples from BMT recipients showed that Y-FISH-positive as well as Y-FISH-negative epithelial cells observed in female BMT recipient

Figure 1. Detection of BM-derived cells by Y-FISH. (A) Y-FISH was performed using paraffin-embedded sections of human male or female colon biopsy specimens. Signals from FITC-labeled DNA probes (*green*) were detected in the DAPI-stained nucleus (*blue*) of both 3- μm -thick and 6- μm -thick sections from a male, but no signal was detected in sections from a female (original magnification, $\times 1600$). (B) Serial section analysis using Y-FISH and immunostaining for CD45 or cytokeratin was performed to detect BM-derived epithelial cells. In 3- μm -thick paraffin-embedded sections of small intestine biopsy specimens obtained from a female post-BMT recipient, male donor BM cell-derived epithelial cells were clearly exhibited as cells positive for both Y-FISH and cytokeratin but negative for CD45 (*arrows*; original magnification, $\times 12,800$). Male donor BM-derived intraepithelial lymphocytes were also clearly observed as cells positive for both Y-FISH and CD45 (*arrowheads*; original magnification, $\times 12,800$). As Y-FISH positive, CD45-positive cells did not always show complete lack of cytokeratin staining, all CD45 positive cells were counted as intraepithelial lymphocytes. A total of 330 BM-derived cells were analyzed, and 239 cells (72.4%) were determined to be BM-derived epithelial cells. *Panels* in rows 2 and 4 represent the magnified view of the area indicated by the *yellow square* in the *panels* above (original magnification, $\times 3200$).

Table 2. Results of Multi color FISH

| Number of FITC-positive chromosomes in a single nucleus | Normal female epithelial cells | | Normal male epithelial cells | Female BMT recipient Y chromosome positive epithelial cells | Female BMT recipient Y Chromosome negative epithelial cells |
|---|--------------------------------|---------------------|------------------------------|---|---|
| | Chromosome 1 (FITC) | Chromosome 1 (FITC) | Chromosome 1 (FITC) | Chromosome 1 (FITC) | Chromosome 1 (FITC) |
| | Chromosome 18 (FITC) | Y (rhodamine) | Y (rhodamine) | Y (rhodamine) | Y (rhodamine) |
| 0 | 12/578 (2.1%) | 44/298 (14.8%) | 27/220 (12.3%) | 40/177 (22.6%) | 79/421 (18.8%) |
| 1 | 38/578 (6.5%) | 129/298 (43.3%) | 86/220 (39.0%) | 87/177 (49.2%) | 206/421 (48.9%) |
| 2 | 132/578 (22.8%) | 125/298 (41.9%) | 107/220 (48.6%) | 50/177 (28.2%) | 136/421 (32.3%) |
| 3 | 241/578 (41.6%) | 0/298 (0.0%) | 0/220 (0.0%) | 0/177 (0.0%) | 0/421 (0.0%) |
| 4 or more | 155/578 (26.8%) | 0/298 (0.0%) | 0/220 (0.0%) | 0/177 (0.0%) | 0/421 (0.0%) |
| Average \pm SD | 2.84 \pm 0.961 | 1.27 \pm 0.703 | 1.36 \pm 0.692 | 1.06 \pm 0.713 | 1.13 \pm 0.703 |

NOTE. Table reflects examined cell population by probe fluorescence. Values indicate number of cells positive for the indicated number of fluorescent signals/total cells examined.

FITC, fluorescein-isothiocyanate.

tissue showed no more than 2 discrete signals within a single nucleus (Figure 2C). Analysis of 177 Y chromosome-positive and 421 Y chromosome-negative epithelial cells revealed no significant difference between the 2 groups in the number of green signals seen in a nucleus (1.06 ± 0.713 vs 1.13 ± 0.703 signals/nucleus, respectively, $P > .1$, Table 2). These results suggest that BM-derived epithelial cells are euploid cells and are not heterokaryons generated by cell fusion. However, because of the limitation of this method, we cannot totally exclude the possibility of cell fusion followed by cytoreductive division.

BM-Derived Epithelial Cells Rarely Give Rise to Intestinal Stem Cells

First, we attempted to determine whether BM-derived epithelial cells reside within the intestinal epithelium as intestinal stem cells. Cells arising from a single intestinal stem cell form continuous, clustered columns of daughter cells along the crypt-villus axis.³ If BM-derived epithelial cells reside in the intestinal epithelium as intestinal stem cells, one would expect to see a single crypt of cells all expressing the Y chromosome marker. By our Y-FISH staining, this is easily demonstrated in a male crypt but never in a female crypt (Figure 3A, left panel). However, crypts of female BMT recipients showed patchy and rarely clustered distributions of Y-FISH-positive cells, even when the population of BM-derived cells was increased because of epithelial regeneration following GVHD (Figure 3A, right panel).

Another distinctive feature of intestinal stem cells is their long lifetime; they remain within the crypt at

least for several years.^{28,29} Therefore, we next attempted to examine whether any BM-derived epithelial cells remain within the intestinal crypt for an extended period. One of our female BMT recipients underwent BMT twice: the first time from a male donor and the second time from a female donor. If any BM-derived epithelial cells do remain within the intestinal crypt for a period of years, Y-FISH-positive epithelial cells should be detected long after the second BMT in this patient. Therefore, we examined GI biopsy specimens taken from this patient at different time points following the first BMT by Y-FISH (Figure 3B). At 45 days after the first BMT, Y-FISH-positive epithelial cells were detected within the small intestinal tissue. However, Y-FISH-positive epithelial cells could not be detected after the second BMT (182 days after first BMT). This suggests that BM-derived epithelial cells do not remain within the crypt for longer than 182 days and therefore lack one of the essential features of intestinal stem cells.

We further sought to examine whether any of the BM-derived cells express a specific molecular marker for intestinal stem cells, although no definitive markers have been confirmed. One candidate for such a marker is Musashi-1, an RNA-binding protein initially identified in neural stem cells.³⁰ Recent studies have demonstrated that Musashi-1 is expressed exclusively in the stem cell region of the murine small intestine.^{31,32} However, little is known about the expression of Musashi-1 in the human intestine.³³ Therefore, we first sought to establish whether Musashi-1 could also be used as a molecular marker for

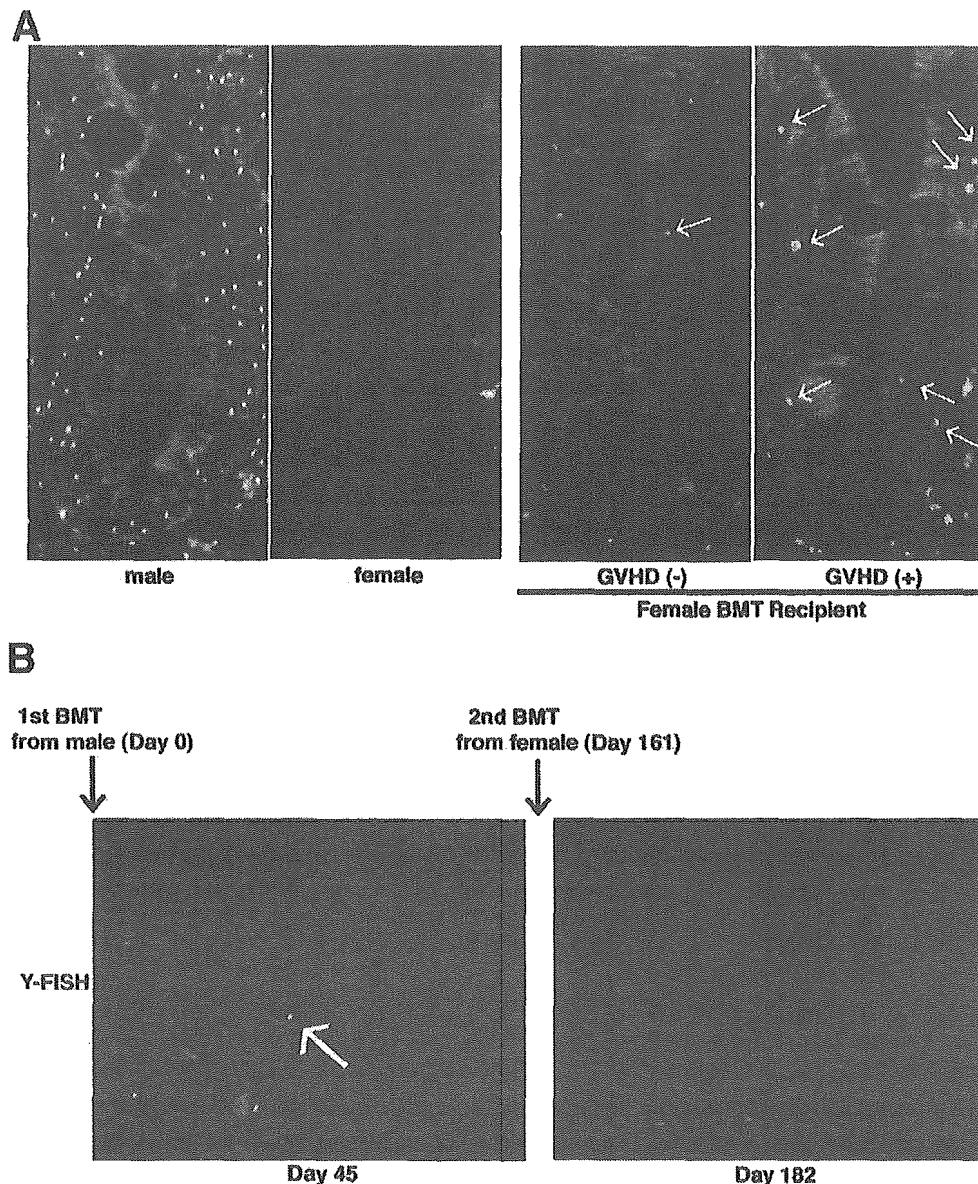


Figure 3. BM-derived epithelial cells rarely give rise to intestinal stem cells. (A) The distribution of Y-FISH-positive cells within the longitudinal section of a single crypt was examined in the human small intestine. Y-FISH-positive cells (green dots) dominated the crypt of a male, but no such cells were detected in the crypt of a female (original magnification, 1200 \times). The distribution of Y-FISH-positive epithelial cells (green dots) within the crypt of a female BMT recipient was patchy, both in sections with GVHD (+) (original magnification, 1200 \times) or without inflammation because of GVHD (GVHD (-) (original magnification, 1200 \times). (B) The presence of BM-derived cells within the intestinal epithelium during 2 courses of BMT in a female patient was examined by Y-FISH. After the first BMT, which was from a male donor, Y-FISH-positive cells (arrow) were observed within the small intestinal epithelium at 45 days post-BMT (left; original magnification, 1600 \times). However, after the second BMT, which was from a female donor and was performed at 161 days after the unsuccessful first BMT, Y-FISH-positive cells could no longer be found in the small intestinal section taken at 182 days after first BMT (right; original magnification, 1600 \times).

intestinal stem cells in humans. The results from immunohistochemical analysis of normal human small intestinal tissues showed that Musashi-1 protein is expressed in the human intestinal epithelial cells residing in the lowest part of the crypt (Figure 4A). Musashi-1-positive cells distributed up to several epithelial cells from the lowest part of the crypt, but Paneth cells were completely negative for the stain (Figure 4B). Immunostaining of the adjacent section

for Ki-67 revealed that the majority of Musashi-1-positive cells within a single crypt distributed beneath the lowest border of Ki-67-positive cells but left the possibility that few double-positive cells may exist (Figure 4A). These findings suggest that Musashi-1-positive epithelial cells distribute within the lowest part of the human crypt but are distinct from Paneth cells or the Ki-67-positive cells. This distribution coincides with the predicted stem cell region of the

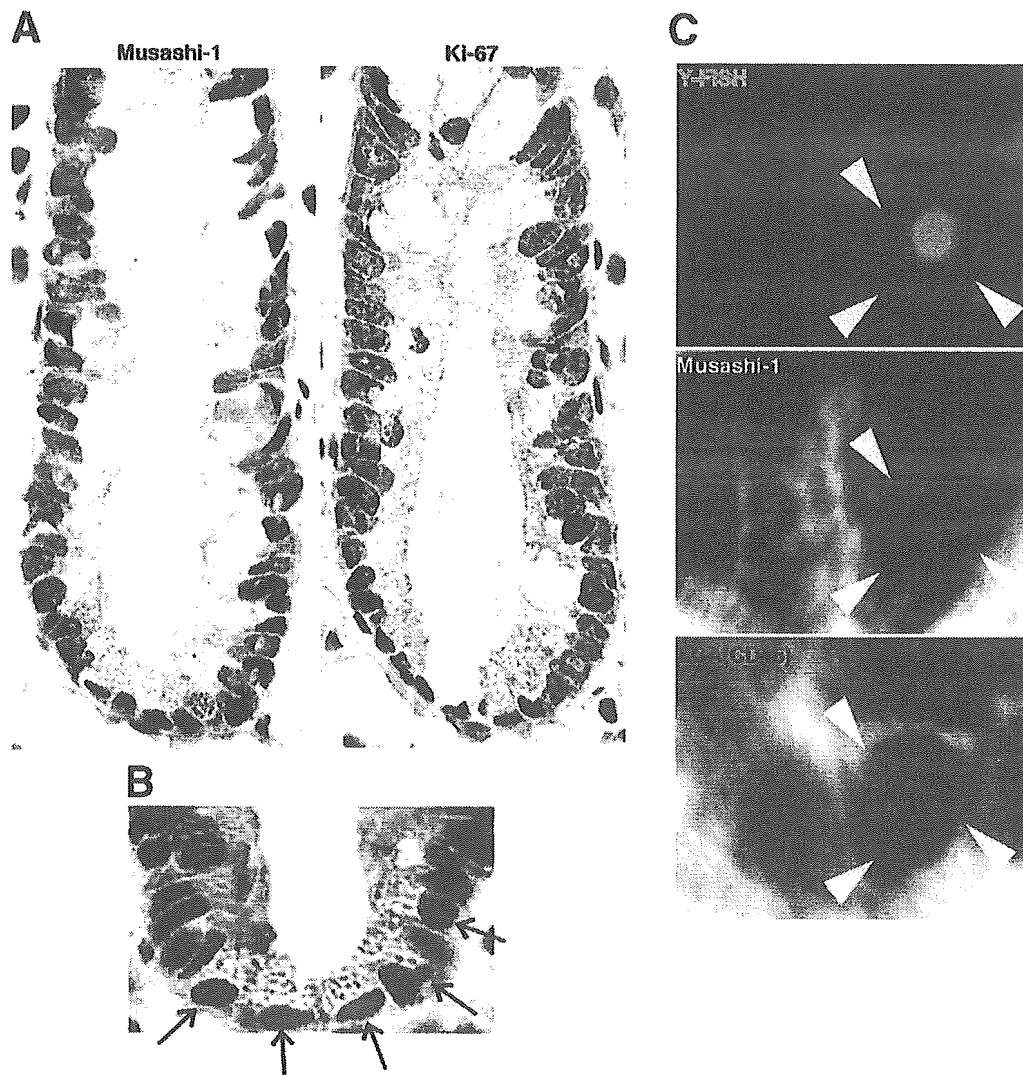


Figure 4. BM-derived epithelial cells rarely coexpress Musashi-1. (A) Distribution of the expression of Musashi-1 protein within a human small intestinal crypt was examined by an immunohistochemistry using a polyclonal antibody specific for human Musashi-1. Intense staining of epithelial cells residing in the lower part of the crypt was clearly demonstrated. Musashi-1-positive cells distributed over the predicted stem cell region but also appeared to include a few more cells other than just stem cells. Immunostaining of the adjacent section for Ki-67 further confirmed that Musashi-1-positive epithelial cells within a single crypt distribute beneath the lowest border of Ki-67-positive cells (original magnification, 1000 \times). (B) A magnified view of a human small intestinal crypt immunostained for Musashi-1. Paneth cells were clearly negative for Musashi-1 (arrow; original magnification, 1200 \times). (C) Serial section analysis of small intestinal sections taken from a female BMT recipient was performed to detect Musashi-1-positive BM-derived epithelial cells. Sections were examined by immunostaining for Musashi-1, CD45, and Y-FISH. A single cell was found to be double positive for Y-FISH and Musashi-1 (arrowhead) but negative for CD45 (original magnification, 12,800 \times). Of a total of 30,973 epithelial cells, 2346 cells were Musashi-1 positive, 239 cells were Y-FISH positive, but only 2 epithelial cells were double positive.

intestinal crypt, but, at the same time, it seems to indicate that Musashi-1-positive cells include a lot of cells other than the stem cells in the human intestine. The specificity of the staining was confirmed by the finding that preincubation of the antibodies with specific blocking peptides completely abrogated the observed immunoreactivities (data not shown). Under these experimental conditions, we examined whether BM-derived epithelial cells are distributed as Musashi-1-positive epithelial cells in the human in-

testine. Within the intestinal epithelium of BMT recipients, Musashi-1-positive BM-derived epithelial cells were detected at extremely low frequency (Figure 4C). Of 30,973 epithelial cells examined, 2346 cells were found to be Musashi-1 positive, and 239 cells were Y-FISH positive, but only 2 cells coexpressed both Musashi-1 and Y-FISH (0.08% of Musashi-1-positive epithelial cells).

These studies thus demonstrate that BM-derived epithelial cells show a patchy distribution within the

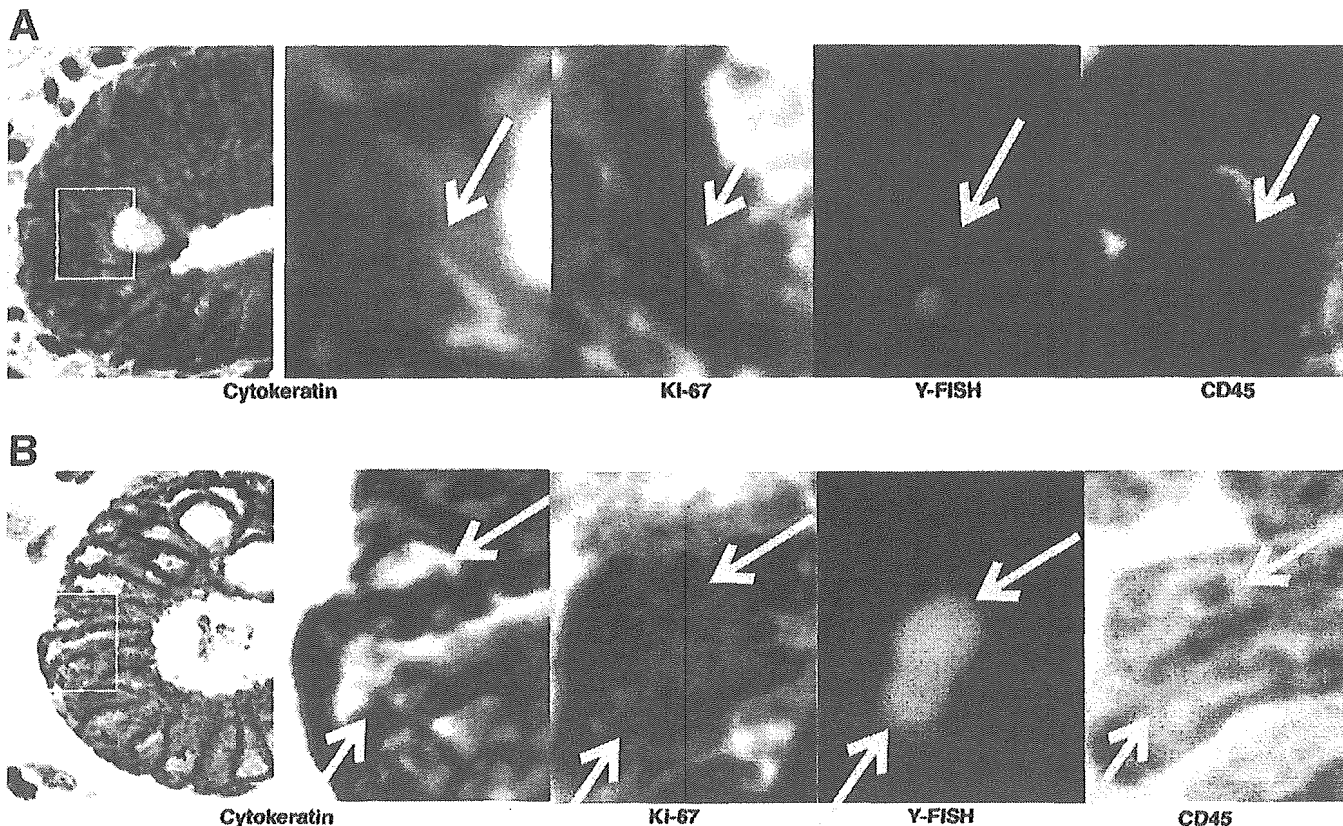


Figure 5. BM-derived epithelial cells distribute as Ki-67–positive cells and divide within the human intestinal epithelium. (A) Serial section analysis of small intestinal sections taken from a female BMT recipient was performed to detect Ki-67–positive BM-derived epithelial cells. Sections were examined by immunostaining for Ki-67, cytokeratin, CD45, and Y-FISH (yellow arrow). Of a total of 30,973 epithelial cells, 2098 cells were Ki-67 positive, and 26 cells were positive for both Ki-67 and Y-FISH (right 4 panels; original magnification, 12,800×). Right four panels represent the magnified view of the area indicated by the yellow square in the left end panel showing the lower magnification view of cytokeratin staining (original magnification, 3200×). (B) Serial sections analyzed for Ki-67–positive BM-derived epithelial cells were further examined for clustering of BM-derived epithelial cells, which would suggest cell division of these cells within the intestinal epithelium. A maximum of 2 adjacent cells were found to be positive for Y-FISH, Ki-67, and cytokeratin (yellow arrow) but negative for CD45 (right 4 panels; original magnification, 12,800×). Right 4 panels represent the magnified view of the area indicated by the yellow square in the left end panel showing the lower magnification view of cytokeratin staining (original magnification, 3200×).

crypt but do not continue to reside within the epithelium and rarely express Musashi-1 protein. Therefore, we conclude that BM-derived epithelial cells rarely distribute as intestinal stem cells.

BM-Derived Epithelial Cells Distribute as Ki-67-Positive Cells and Express Markers of Terminally Differentiated Functional Epithelial Cells Within the Human Intestine

The intestinal epithelium is composed of 4 main lineages of terminally differentiated cells and proliferative cells expressing Ki-67 antigen, along with stem cells.⁴ We examined whether BM-derived epithelial cells distribute as Ki-67–positive cells that proliferate within the epithelium. Serial section analysis using CD45, cytokeratin, and Ki-67 immunostaining along with Y-FISH revealed the presence of Ki-67–positive BM-

derived cells within the intestinal epithelium of BMT recipients (Figure 5A). Of 30,973 epithelial cells examined, 26 cells were determined to be Ki-67–positive BM-derived cells (10.9% of BM-derived epithelial cells, 1.2% of Ki-67–positive epithelial cells). However, Ki-67 also stains cells in G1,³⁴ and, therefore, the results show merely the proliferative potential of the BM-derived epithelial cells. If actively proliferating BM-derived epithelial cells exist, pairs of Ki-67–positive BM-derived epithelial cells should be found adjacent to one another. Within the intestinal epithelium of BMT recipients, such pairs of adjacent Ki-67–positive, Y-FISH–positive cells were indeed observed (Figure 5B). These results suggested that the BM-derived epithelial cells could express Ki-67 antigen and proliferate within the crypt. However, clusters of 3 or more BM-derived epithelial cells were not observed, and only 3 pairs of adjacent cells were found among the 30,973 epithelial cells examined.

We then attempted to determine whether BM-derived cells distribute as terminally differentiated epithelial cells that express lineage markers related to specific functions. When a single section was stained sequentially with alcian blue and Y-FISH, BM-derived goblet cells producing acidic mucin were observed within the intestinal epithelium of the BMT recipients (Figure 6A). When a single section was

stained sequentially with H&E and Y-FISH, BM-derived Paneth cells containing the characteristic eosinophilic granules were observed within the intestinal epithelium of the BMT recipients (Figure 6B). Serial section analysis using CD45, chromogranin A, and cytokeratin immunostaining with Y-FISH revealed the presence of BM-derived neuroendocrine cells expressing chromogranin A within the intestinal

