

ヒト腸管上皮の分化/再生制御機構を応用した粘膜再生療法の開発

分担研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：骨髄由来細胞が腸管上皮に分化しうるとの独自の成果を発展させ、本研究ではその機構の詳細および腸管上皮細胞分化の分子機構を解析し、粘膜再生療法への応用を追求した。その結果、ヒト骨髄由来上皮細胞は急激な上皮傷害を起こした腸管上皮において、増殖能が著しく賦活されるとともに、多様な上皮機能を持った成熟した腸管上皮細胞として分布し、これにより速やかな腸管上皮機能の回復に貢献していると考えられた。さらに、ヒト腸管上皮の再生過程において、骨髄由来分泌型腸管上皮細胞への分化誘導を促進する分化調節機構が存在し得る可能性が示された。このような腸管上皮細胞の分化制御に必須の分子機構として Notch シグナルが存在すること、上皮再生過程において活性型 Notch が果たす分子機能を明らかとした。これら一連の研究成果により、重篤な組織再生障害を伴う難治性炎症性腸疾患に対し、骨髄由来細胞を利用する新たな細胞療法、および細胞内シグナル伝達分子を標的とした新たな分化誘導療法など、多面的なアプローチによる画期的な粘膜再生療法の開発につながるものとして期待される。

共同研究者

岡本隆一、大島 茂、松本智子、山崎元美、
土屋輝一郎、中村哲也、金井隆典

東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

矢島知治、日比紀文

慶應義塾大学医学部消化器内科

A. 研究目的

炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）や骨髄移植後移植片対宿主反応による難治性慢性腸疾患は、その発症と病態維持に腸管免疫機構の破綻および傷害粘膜上皮の再生不全が深く関わるが、その詳細はいまだ明らかでなく、従って標的細胞・分子を明確に定めた特異的治療法はない。これまで腸管組織における「免疫応答」と「分化・再生」が、分離・独立した研究領域としてとらえられてきたことから、両機構の人為的制御を難治性慢性腸疾患治療戦略において表裏一体である「成因の抑止」と「修復の促進」という統合的視点で治療法開発へ応用する試みはきわめて少ない。しかしながら、これまで申請者

らは、傷害後の腸管上皮再生に骨髄細胞による組織修復機構が関わることを明らかにし (Nat Med 2002)、腸管上皮再生研究において世界的にも評価の高い成果をあげてきた。さらに、腸管上皮細胞でのサイトカイン発現調節に Interferon Regulatory Factor (IRF) ファミリー転写因子群によるきわめて独特で腸管独自の転写制御機構が関与し、特に IRF-1 分子が特定の分化形質を有する上皮細胞に於いて強く発現し、機能している可能性を示した (Mol Cell Biol 2004)。このように上皮細胞分化と炎症性サイトカイン等による細胞内シグナルを統合し、同一の視点でとらえる独創的な成果をあげてきた。本研究は両領域において研究代表者らが独自に見いだしてきた知見、すなわち腸組織における特殊な免疫調節機構および再生機構の追究を目的とし、また、正常腸管組織の恒常性維持には局所における免疫調節と上皮再生の連鎖・協調が必須であり、その不均衡が病態形成を担う本質であるという発想に基づき、最終的には両者を統合制御し、局所免疫調節および組織再生誘導を促す新規治療法を目指す萌芽的研究である。

本研究ではこれを発展させ、1)腸管上皮の組織修復過程における骨髄細胞動員の詳細なメカニズムの検討、2) 腸管上皮細胞の分化制御における Notch シグナルの新規機能の探索、をおこなうことを目的とした。

B. 方法・結果

1) 男性ドナーより同種骨髄移植を受けた女性レシピエントより経時的に採取した内視鏡生検組織検体の解析を行った。Y 染色体 FISH 法と免疫染色法を組み合わせた連続切片による解析法、および同一切片を用いた二重染色による解析法を併用しドナー骨髄由来腸管上皮細胞をより厳密に同定する独自の解析法を樹立した。さらに同法を用いて上皮再生時の骨髄由来上皮細胞の形質および分布を、幹細胞マーカー、増殖マーカー、および上皮細胞分化形質マーカーと対比し、検討した。その結果、a) 全消化管（食道、胃、十二指腸、回腸、大腸）にわたり、ドナー骨髄由来上皮細胞の分布を認めた。b) 骨髄由来腸管上皮細胞は GVHD の回復期小腸において全上皮細胞における頻度が 9-10 倍上昇した。c) 骨髄由来上皮細胞は腸管上皮中において散在する分布形態を示し、上皮幹細胞マーカーである *Msi-1* の発現は極めて稀であった。d) 上皮再生過程の腸管において骨髄由来上皮細胞は、上皮 Crypt 内増殖帯における全 Ki-67 陽性上皮細胞に占める頻度が有意に増加した。e) GVHD からの再生過程の腸管においては、正常検体と比較し、骨髄細胞由来杯細胞、骨髄細胞由来神経内分泌細胞、骨髄細胞由来パネート細胞の著しい頻度の上昇を認めた。

2) ヒト大腸癌由来培養細胞およびヒト内視鏡下生検組織を用い、上皮細胞分化形質と Notch シグナル活性化の関連を解析した。その結果、a) 杯細胞消失、パネート細胞化生など特に分泌型上皮細胞の分化形質制御の異常を呈する慢性大腸炎病変部に一致して、Notch シグナル構成分子の異常発現が局在していた。b) 我々が独自に樹立した培養細胞系において、恒常的な Notch シグナル活性化を誘導し、その経時的かつ網羅的な遺伝子発現の変化をマイクロアレイを用いて解析することにより、Notch シグナルの恒常的

な活性化が種々の腸管上皮分化マーカーの発現を mRNA レベルで制御していることを見出した（いずれも未発表データ）。

（倫理面への配慮）

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

C. 考察

1) 腸管上皮細胞分化のメカニズムに関し、骨髄由来腸管上皮細胞の関与を明確にした。定常状態の腸管上皮に比べ、傷害後の再生過程の上皮では骨髄由来上皮細胞の著しい増加が再現され、骨髄由来細胞が腸管上皮の再生過程を促進する役割を果たすものと考えられた。さらに、骨髄由来細胞は腸管上皮幹細胞との形質は獲得せず、むしろ増殖が活発な Crypt 内の上皮前駆細胞として分布し、腸管上皮のいずれの細胞系列へも分化を遂げ機能細胞となりうることであり腸管修復と機能回復を促進し得ていることが示された。さらに、腸管上皮の再生時に骨髄由来の杯細胞、神経内分泌細胞、パネート細胞の著しい増加が見られることから、上皮再生過程において機能する未知の分化調節機構が存在し、骨髄細胞の分泌型上皮細胞群への細胞分化に働き、早期の腸管上皮機能の回復に極めて重要な役割を果たしていると考えられた。

2) 大腸上皮細胞の分化・再生過程に Notch シグナルが重要な役割をになうこと、および慢性炎症による上皮障害時には、Notch シグナル機能異常を伴う可能性が示唆された。さらに、Notch シグナルの活性化により制御される標的遺伝子群が明らかとなり、

杯細胞、パネート細胞、あるいは神経内分泌細胞など特異的分化形質発現に対する Notch シグナルの促進的あるいは抑制的作用という分子機能をヒト腸管に於いて有することが示された。

D. 結論

迅速な細胞増殖により数的供給を受け、組織の恒常性を保持する腸管上皮において、特定の機能細胞への分化バランスが秩序正しく連動し進行するためのメカニズムとして複数の制御、すなわち骨髄細胞からの分化による細胞レベルでの制御機構、Notch シグナルによる腸管特異的標的遺伝子の誘導という分子レベルでの制御機構が存在することを示した。急激な上皮傷害の際に、腸管上皮の再生と早期の機能回復の為に骨髄細胞の動員が有効である可能性、さらに適切な系列細胞への分化誘導の為に Notch シグナルの人為的制御が有効であることが期待され、上皮再生不全を伴うヒト疾患に関わる分子機構研究に全く新しい視点を創出するとともに、腸管上皮の早期の再生と機能回復を図る多面的かつ多段階のアプローチが可能となり、細胞療法と分子療法を統合した新規治療法開発につながる研究基盤を確立したものと考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Okamoto R, Hibi T, Tezuka K, Azuma M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Ameliorating effect of anti-inducible co-stimulator monoclonal antibody in a murine model of chronic colitis. *Gastroenterology*. 124 : 410-421, 2003.
2. Watanabe M, Yamazaki M, Kanai T: Mucosal T Cells as a target for treatment of IBD. *J Gastroenterol*. 38 : 48-50, 2003.
3. Tsuchiya K, Kawano Y, Kojima T, Nagata K, Takao

T, Okada M, Shinohara H, Maki K, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka N, Watanabe M, Karasuyama H: Molecular cloning and characterization of TPP36 and its isoform TPP32, novel substrates of Abl tyrosine kinase. *FEBS Lett*. 537 : 203-209, 2003.

4. Totsuka T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Yamazaki M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF- α MAbs in a murine model of chronic colitis. *Am J Physiol*. 284: G595-G603, 2003.
5. Iiyama R, Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Nakamura T, Miyata T, Yagita H, Tezuka K, Watanabe M: The role of Inducible Co-stimulator (ICOS)/B7 related protein-1 (B7RP-1) interaction in the germinal center formation in Peyer's patches. *Immunol Lett*. 88: 63-70, 2003.
6. Ishikura T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Makita S, Totsuka T, Yamazaki M, Sawada T, Nakamura T, Miyata T, Kitahora T, Hibi T, Hoshino T, Watanabe M: Interleukin-18 overproduction exacerbates the development of colitis with markedly infiltrated macrophages in interleukin-18 transgenic mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 18: 960-969, 2003.
7. Watanabe M, Yamazaki M, Okamoto R, Ohoka S, Araki A, Nakamura T, Kanai T: Therapeutic approaches to chronic intestinal inflammation by specific targeting of mucosal IL-7/IL-7R signal pathway. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2: 119-123, 2003.
8. Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Okazawa A, Hibi T, Oshima S, Miyata T, Nakamura T, Watanabe M: Macrophage-derived IL-18 targeting for the treatment of Crohn's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2: 131-136, 2003.
9. Okamoto R, Watanabe M: Prospects for regeneration of gastrointestinal epithelia using bone-marrow cells. *Trends Mol Med*. 9:

- 286-290, 2003.
10. Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T, Watanabe M: Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25-CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol.* 171: 708-716, 2003.
 11. Ezaki T, Watanabe M, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Ishii H, Hibi T: A specific genetic alteration on chromosome 6 in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. *Cancer Res.* 63: 3747-3749, 2003.
 12. Iiyama R, Kanai T, Uraushihara K, Ishikura T, Makita S, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Miyata T, Yoshida H, Takeuchi O, Hoshino K, Takeda K, Ishikawa H, Akira S, Watanabe M: Normal development of the gut-associated lymphoid tissue except Peyer's patch in MyD88-deficient mice. *Scand J Immunol.* 58: 620-627, 2003.
 13. Yamazaki M, Yajima T, Tanabe M, Fukui K, Okada E, Okamoto R, Oshima S, Nakamura T, Kanai T, Uehira M, Takeuchi T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M: Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis. *J Immunol.* 171: 1556-1563, 2003.
 14. Dan N, Kanai T, Totsuka T, Iiyama R, Yamazaki M, Sawada T, Miyata T, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Ameliorating effect of anti-Fas ligand Mab on wasting disease in a murine model of chronic colitis. *Am J Physiol.* 285: G754-G760, 2003.
 15. Makita S, Kanai T, Matsumoto S, Iiyama R, Uraushihara K, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Ishikawa H, Watanabe M: The role of cryptopatch-derived intraepithelial lymphocytes in the development of chronic ileocaetitis. *Scand J Immunol.* 58: 428-435, 2003.
 16. Takagi H, Kanai T, Okazawa A, Kishi Y, Sato T, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Hoshino K, Takeda K, Akira S, Watanabe M, Ishii H, Hibi T: Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. *Scand J Gastroenterol.* 38: 837-844, 2003.
 17. Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Machida U, Iwai H, Azuma M, Chen L, Watanabe M: Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J Immunol.* 171: 4156-4163, 2003.
 18. Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Okada E, Tsuchiya K, Okamoto R, Yamazaki M, Yokota T, Aida M, Yamaguchi Y, Kanai T, Handa H, Watanabe M: Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of interleukin-7 in human intestinal epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 24: 6298-6310, 2004.
 19. Sato T, Kanai T, Watanabe M, Sakuraba A, Okamoto S, Nakai T, Okazawa A, Inoue N, Totsuka T, Yamazaki M, Kroczeck RA, Fukushima T, Ishii H, Hibi T: Hyperexpression of inducible costimulator and its contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 126: 829-839, 2004.
 20. Okamoto R, Watanabe M: Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol.* 39: 1-6, 2004.
 21. Ishii K, Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Ishikura T, Yamazaki M, Okamoto R, Araki A, Miyata T, Tezuka K, Nakamura T, Watanabe M: Hyperexpression of inducible costimulator (ICOS) on lamina propria mononuclear cells in rat dextran sulfate sodium (DSS) colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 19: 174-181, 2004.

22. Kawamura T, Kanai T, Dohi T, Uraushihara K, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Nakamura T, Higuchi T, Aiba Y, Tsubata T, Watanabe M: Ectopic CD40 ligand expression on B cells triggers intestinal inflammation. *J Immunol.* 172: 6388-6397, 2004.
23. Okazawa A, Kanai T, Nakamaru T, Sato T, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Ikeda M, Kawamura T, Makita S, Uraushihara K, Okamoto R, Yamazaki M, Kurimoto M, Ishii H, Watanabe M, Hibi T: Human intestinal epithelia-derived IL-18 is a proliferative factor for intraepithelial lymphocytes synergistically with IL-2, IL-7 and IL-15. *Clin Exp Immunol.* 136: 269-276, 2004.
24. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Iiyama R, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M: CD4⁺CD25^{bright} T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol.* 173: 3119-3130, 2004.
25. Matsuoka K, Inoue N, Sato T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kishi Y, Sakuraba A, Hitotsumatsu O, Fukushima T, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T: T-bet up-regulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for the induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut.* 53: 1303-1308, 2004.
26. Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, Iiyama R, Totsuka T, Takeda K, Akira S, Watanabe M: MyD88 deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterology.* 40: 16-23, 2005.
27. Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Mori T, Okamoto S, Ikeda Y, Mukai M, Yamazaki M, Oshima S, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Okano H, Inazawa J, Hibi T, Watanabe M: Increase of bone marrow-derived secretory lineage epithelial cells during regeneration in the human intestine. *Gastroenterology.* 128: 1851-1867, 2005.
28. Okada E, Yamazaki M, Tanabe M, Takeuchi T, Nanno M, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Hibi T, Watanabe M: IL-7 exacerbates chronic colitis with expansion of memory IL-7^{high} CD4⁺ mucosal T cells in mice. *Am J Physiol.* 288: G745-G754, 2005.
29. Namiki S, Nakamura T, Oshima S, Yamazaki M, Sekine Y, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: IRF-1 mediates upregulation of LMP7 by IFN-gamma and concerted expression of immunosubunits of the proteasome. *FEBS Lett.* 579: 2781-2787, 2005.
30. Totsuka T, Kanai T, Makita S, Fujii R, Nemoto Y, Oshima S, Okamoto R, Koyanagi A, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Watanabe M: Regulation of murine chronic colitis by CD4⁺CD25⁻ programmed death-1⁺ T cells. *Eur J Immunol.* 18: 1773-1785, 2005.
31. Okamoto R, Watanabe M: Cellular and molecular mechanisms of epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci.* 50: S34-S38, 2005.
32. Kanai T, Watanabe M: Clinical application of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 5: 451-462, 2005.
33. Tahara T, Inoue N, Hisamatsu T, Kashiwagi K, Takaishi H, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T: Clinical significance of microsatellite instability in the inflamed mucosa for the prediction of colonic neoplasms in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 20: 710-715, 2005.
34. Matsukawa H, Kanai T, Naganuma M, Kamada N, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Mukai M, Ishii H, Mimori T, Watanabe M, Hibi T: A novel apoptosis-inducing monoclonal antibody (anti-LHK) against a cell surface antigen on colon cancer cells. *J Gastroenterol.* 40: 945-955, 2005.

35. Kanai T, Kawamura T, Dohi T, Makita S, Nemoto Y, Totsuka T, Watanabe M: Th1/Th2-mediated colitis induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{high} T lymphocytes into nude mice. *Inflamm Bowel Dis.* 12: 89-99, 2006.
36. Kanai T, Tanimoto K, Nemoto Y, Fujii R, Totsuka T, Watanabe M: Naturally arising CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress the expansion of colitogenic CD4⁺CD44^{high}CD62L⁻ effector-memory T cells. *Am J Physiol.* (in press), 2006.
37. Fujii R, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Watanabe M: FTY720 suppresses CD4⁺CD44^{high}CD62L⁻ effector memory T cell-mediated colitis. *Am J Physiol.* (in press), 2006.
38. Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Nemoto Y, Fujii R, Kawamura T, Makita S, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Ameliorating effect of saporin-conjugated anti-CD11b monoclonal antibody in a murine T-cell-mediated chronic colitis. *J Gastroent Hepatol.* (in press), 2006.
2. 学会発表
1. 渡辺 守: 炎症性腸疾患の病因・病態と治療—潰瘍性大腸炎の病因と病態. 第26回日本医学会総会, 福岡, 2003. 4. 5
2. 岡本隆一、矢島知治、渡辺 守: 骨髄由来腸管上皮細胞による腸管上皮の維持・再生機構. 第89回日本消化器病学会, 大宮, 2003. 4. 24
3. Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Interferon Regulatory Factor-2 (IRF-2) Positively Regulates The Gene Expression of IL-7 in Intestinal Epithelial Cells. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 18
4. Nakamura T, Oshima S, Namiki S, Tsuchiya K, Okamoto R, Hibi T, Kanai T, Watanabe M: Interferon (IFN)- γ Induces IL-7 Gene Expression in Intestinal Epithelial Cells Via Upregulation of Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1). DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 19
5. Okamoto R, Yajima T, Matsumoto T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M: Bone Marrow-Derived Cells Regenerate Damaged Epithelia in the Human Gastrointestinal Tract. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 20
6. 中村哲也、大島 茂、並木 伸、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1/IRF-2による IL-7 産生調節機構, 第2回 GIFM (Gut Inflammation Front Line Meeting), 東京, 2003. 7. 12
7. 松本智子、岡本隆一、中村哲也、金井隆典、渡辺 守、矢島知治、日比紀文: 骨髄由来細胞による炎症性腸疾患に対する上皮再生治療への試み. 厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成15年度第1回総会, 東京, 2003. 7. 31
8. 中村哲也、大島 茂、並木 伸、土屋輝一郎、岡本隆一、岡田英理子、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1・IRF-2 機能とサイトカイン IL-7 産生調節機構. 第10回消化管分子機構研究会, 東京, 2003. 8. 9
9. Watanabe M: Mucosal IL-7/IL-7 receptor dependent signals in the development of chronic intestinal inflammation. The Awaji Inter-national Forum on Infection and Immunity, Awajishima, 2003. 8. 27
10. 大島 茂: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1/IRF-2 機能と IL-7 産生調節機構. 第4回 IBD 基礎検討会, 東京, 2003. 10. 12
11. 岡本隆一、松本智子、矢島知治: 骨髄由来細胞による炎症性腸疾患に対する上皮再生治療への試み. 第45回日本消化器病学会, 大阪, 2003. 10. 15
12. Watanabe M: ICOS pathways regulate murine colitis. The MGH Annual Workshop of the Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease,

- Boston, Massachusetts, USA, 2003.11.13
13. 大島 茂、中村哲也、並木 伸、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1・IRF-2 機能とサイトカイン IL-7 産生調節機構. 第 33 回日本免疫学会, 福岡, 2003.12.10
 14. 山崎元美、岡田英理子、矢島知治、田邊将信、中村哲也、金井隆典、日比紀文、竹内 勤、石川博通、渡辺 守: 腸管粘膜内浸潤 IL-7 レセプター高発現細胞の選択的除去による慢性大腸炎治療. 第 33 回日本免疫学会, 福岡, 2003.12.1
 15. 中村哲也、大島 茂、並木 伸、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1/IRF-2 による協調的 IL-7 産生調節機構. 第 11 回浜名湖シンポジウム, 浜松, 2003.12.20
 16. 渡辺 守: 消化管粘膜免疫の特殊性を応用した腸管免疫機構の統御療法. 科学研究費補助金「特定領域研究」感染の成立と宿主応答の分子基盤, 平成 15 年度第 2 回全体班会議, 東京, 2004.1.9
 17. 岡本隆一、渡辺 守: 骨髄由来細胞による炎症性腸疾患に対する上皮再生治療への試み. 第 22 回 Cytoprotection 研究会, 京都, 2004.2.27
 18. 中村哲也、大島 茂、渡辺 守: 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1/IRF-2 による協調的 IL-7 産生調節. 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004.4.21
 19. 蒔田 新、金井隆典、戸塚輝治、浦牛原幸治、河村貴広、谷本佳奈美、澤田泰輔、中村哲也、福島恒男、渡辺 守: ヒト腸粘膜内 CD4+CD25bright 制御性 T 細胞の存在と機能. 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004.4.21
 20. 岡本隆一、松本智子、渡辺 守: 骨髄由来細胞を利用した腸管上皮再生治療の検討. 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004.4.22
 21. 岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: Notch シグナルによるヒト小腸上皮細胞の分化調節機構の解析. 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004.4.22
 22. Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T, Watanabe M: A New Model of Chronic Colitis in SCID Mice Induced by Adoptive Transfer of CD4+ GITR- T Lymphocytes. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004.5.18
 23. Makita S, Kanai T, Matsumoto S, Uraushihara K, Totsuka T, Nakamura T, Watanabe M: The Role of Cryptopatch-Derived Intraepithelial Lymphocytes in the Development of Chronic Ileocaetitis. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004.5.18
 24. Matsumoto T, Okamoto R, Yajima T, Nakamura T, Kanai T, Hibi T, Watanabe M: Increase of Bone Marrow-Derived Secretory Lineage Cells During Epithelial Regeneration Following Graft-Verses-Host Disease in the Human Intestinal Epithelia. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004.5.18
 25. Okada E, Yamazaki M, Nakamura T, Kanai T, Tanabe M, Takeuchi T, Watanabe M: The Pivotal Role of IL-1/IL-7r Dependent Signaling Pathway for Expansion of Highly IL-7r Expressing Mucosal T Cells and Development of Chronic Colitis. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004.5.18
 26. Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Kanai T, Watanabe M: IRF-1 and IRF-2 Distinctively Up-Regulate Gene Expression and Production of IL-7 in Human Intestinal Epithelial Cells. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004.5.18
 27. Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Nakamura T, Watanabe M: Regulation of Murine Chronic Colitis by CD25- GITR+ CD4+ Regulatory T Cells. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004.5.18
 28. Totsuka T, Kanai T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Fukushima T, Yagita H, Azuma M, Chen L, Watanabe M: Blockade of B7-H1 Suppresses the Development of Chronic Intestinal Inflammation. DDW 2004, New Orleans, USA, 2004.5.19
 29. 大島 茂、中村哲也、並木 伸、山崎元美、金井隆典、渡辺 守: IL-7 産生機構異常による潰瘍性大腸炎発症. 第 3 回 GIFM (Gut Inflammation Front Line Meeting), 東京, 2004.7.10
 30. 金井隆典、渡辺 守: 慢性大腸炎を制御する

- GITR+CD4+CD25- regulatory T cells. 第 25 回日本炎症・再生医学会, 東京, 2004. 7. 14
31. 河村貴広、金井隆典、土肥多恵子、浦牛原幸治、戸塚輝治、油井 薫、藤井 玲、谷本佳奈美、飯山稜一、澤田泰輔、中村哲也、鏝田武志、渡辺 守: B 細胞 CD4 リガンド過剰発現による慢性腸炎モデルの検討. 第 41 回日本消化器免疫学会, 大津, 2004. 7. 15
32. 松本智子、岡本隆一、矢島知治、山崎元美、土屋輝一郎、並木 伸、中村哲也、金井隆典、日比紀文、稲澤穰治、渡辺 守: 骨髄由来細胞による炎症性疾患に対する上皮再生治療の試み. 第 41 回日本消化器免疫学会, 大津, 2004. 7. 15
33. 金井隆典、戸塚輝治、八木田秀雄、渡辺 守: マウス炎症性腸疾患モデルを用いた B7-H1 分子を標的とした新規治療法の開発. 第 41 回日本消化器免疫学会, 大津, 2004. 7. 16
34. 岡本隆一、松本智子、川村央信、土屋輝一郎、中村哲也、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮細胞の分化制御による新規治療法開発への試み. 厚生労働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 16 年度第 1 回総会, 東京, 2004. 7. 30
35. 金井隆典、河村貴広、蒔田 新、浦牛原幸治、戸塚輝治、渡辺 守: 細胞治療としての炎症性腸疾患における免疫抑制性 T 細胞移入療法実現に向かって. 厚生労働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 16 年度第 1 回総会, 東京, 2004. 7. 30
36. 大島 茂、中村哲也、並木 伸、山崎元美、金井隆典、渡辺 守: IL-7 産生調節因子 IRF 蛋白発現異常による潰瘍性大腸炎発症. 第 11 回 消化管分子機構研究会, 東京, 2004. 8. 8
37. Watanabe M, Oshima S, Nakamura T, Kanai T: IRF-1 and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of IL-7 in human intestinal epithelial cells. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, 2004. 8. 31
38. Watanabe M: Crossing between mucosal immunity and epithelial regeneration / differentiation in the human intestine. 第 9 回国際生殖免疫学会 (9th International Congress of Reproductive Immunology), 箱根, 2004. 10. 14
39. 岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: Notch Signal を介するヒト腸管上皮細胞の分化制御による上皮再生. 第 46 回日本消化器病学会, 福岡, 2004. 10. 21
40. 河村貴広、金井隆典、土肥多恵子、戸塚輝治、飯山稜一、浦牛原幸治、蒔田 新、谷本佳奈美、油井 薫、澤田泰輔、中村哲也、鏝田武志、渡辺 守: B 細胞 CD リガンド過剰発現による慢性腸炎の発症. 第 46 回日本消化器病学会, 福岡, 2004. 10. 22
41. Watanabe M: IL-7 による粘膜免疫および腸上皮分化の制御. 第 2 回 Pfizer Science and Research Symposium, 名古屋, 2004. 11. 11
42. Watanabe M: Bone Marrow-Derived Secretory Lineage Epithelial Cells in the Human Intestine. The MGH Annual Workshop of the Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease, Boston, 2004. 11. 13
43. 大島 茂、中村哲也、並木 伸、岡田英理子、山崎元美、金井隆典、渡辺 守: 慢性大腸炎発症におけるサイトカイン IL-7 の役割とその産生調節機構. 第 34 回日本免疫学会, 札幌, 2004. 12. 1
44. 戸塚輝治、金井隆典、蒔田 新、河村貴広、飯山稜一、秋葉久弥、岩井秀之、東みゆき、八木田秀雄、奥村 康、CHEN Lieping、渡辺 守: 炎症性腸疾患および慢性大腸炎モデルにおける Co-stimulatory B7-H1 分子の関与. 第 34 回日本免疫学会, 札幌, 2004. 12. 2
45. 並木 伸、中村哲也、大島 茂、山崎元美、金井隆典、渡辺 守: Interferon Regulatory Factor (IRF)-1 による IFN- γ 依存性 LMP7 発現調節機構. 第 34 回日本免疫学会, 札幌, 2004. 12. 2
46. 中村哲也、並木 伸、関根裕子、大島 茂、山崎元美、岡本隆一、土屋輝一郎、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮における IRF-1 標的遺伝子の網羅的

- 解析と免疫プロテアソーム発現に対する IRF-1 分子機能. 第 12 回浜名湖シンポジウム, 浜松, 2004. 12. 23
47. 岡本隆一、松本智子、川村央信、大島 茂、土屋輝一郎、中村哲也、金井隆典、渡辺 守: 腸管上皮の分化制御による上皮再生治療の可能性. 厚生労働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 16 年度第 2 回総会, 東京, 2005. 1. 26
48. 金井隆典、河村貴広、蒔田 新、浦牛原幸治、戸塚輝治、渡辺 守: 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 2 報-. 厚生労働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 16 年度第 2 回総会, 東京, 2005. 1. 26
49. 土屋輝一郎、中村哲也、渡辺 守: 転写因子 Math-1 活性化の分子機構と腸管上皮分化制御. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
50. 岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: 活性型 Notch の発言調節によるヒト腸管上皮再生の可能性. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
51. 根本泰宏、金井隆典、蒔田 新、藤井 玲、河村貴広、戸塚輝治、渡辺 守: マウス腸管粘膜内 CD4+T 細胞は制御性 T 細胞として慢性大腸炎発症を抑制する. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
52. 蒔田 新、金井隆典、戸塚輝治、河村貴広、根本泰宏、大島 茂、小金井一隆、福島恒男、渡辺 守: ヒト腸粘膜内 CD4+CD25bright 制御性 T 細胞の存在と機能. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
53. 戸塚輝治、金井隆典、根本泰宏、蒔田 新、浦牛原幸治、飯山稜一、八木田秀雄、渡辺 守: 慢性大腸炎モデルにおける CD4+PD-1+制御性 T 細胞の役割. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 14
54. 渡辺 守: 治療抵抗性の炎症性腸疾患に対する治療戦略. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 15
55. 金井隆典、河村貴広、渡辺 守: 腸内細菌から TLR9+B220+B 細胞をトリガーとした慢性腸炎発症機序. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 15
56. 金井隆典、蒔田 新、渡辺 守: 制御性 T 細胞からみた炎症性腸疾患の病態と治療応用. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005. 4. 15
57. Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Kanai T, Watanabe M: IRF-1 and IRF-2 Distinctively Up-Regulate Gene Expression and Production of IL-7 in Human Intestinal Epithelial Cells. DDW 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 15
58. Namiki S, Nakamura T, Oshima S, Yamazaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Identification of Novel IRF-1-Regulated Genes and the Role of IRF-1 in Immuno Proteasome Subunit Expression in Intestinal Epithelial Cells. DDW 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 15
59. Totsuka T, Kanai T, Makita S, Fujii R, Nemoto Y, Watanabe M: Regulation of Murine Chronic Colitis by CD4+CD25- PD-1+ Regulatory T Cells. DDW 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 16
60. Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: The Bhlh Transcription Factor Math-1 is Posttranslationally Regulated by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in the Intestine-Specific Mechanism. DDW 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 16
61. Kawamura T, Kanai T, Kodama H, Totsuka T, Makita S, Nemoto Y, Watanabe M: Leukocytapheresis Therapy for Ulcerative Colitis; Extracorporeal Anti-TNF-A Therapy for Selective Elimination of TNF-A-Producing CD14+CD16+ Monocytes. DDW 2005 Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 18
62. Kanai T, Makita S, Oshima S, Totsuka T, Fukushima T, Watanabe M: Regulation of intestinal immune homeostasis by human lamina propria CD4+ CD25bright regulatory T cells. 12th International Congress of Mucosal

Immunology, Boston, Massachusetts, USA, 2005. 6. 25-30

63. Makita S, Kanai T, Watanabe M: Control of intestinal homeostasis by human intestinal lamina propria CD4+CD25bright T cells. 12th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, Massachusetts, USA, 2005. 6. 25-30

64. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Totsuka T, Fujii R, Kawamura T, Watanabe M: Murine lamina propria CD4+ T cells suppress the development of chronic colitis. 12th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, Massachusetts, USA, 2005. 6. 25-30

65. Okada E, Yamazaki M, Tanabe M, Takeuchi T, Nanno M, Nakamura T, Kanai T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M: IL-7 exacerbates chronic colitis with expansion of memory IL-7Rhigh CD4+ mucosal T cells in mice. 12th International Congress of Mucosal Immunology, Boston, Massachusetts, USA, 2005. 6. 25-30

66. 蒔田 新, 金井隆典, 戸塚輝治, 根本泰宏, 伊藤ゆみ, 藤井 玲, 渡辺 守: 制御性 T 細胞を用いた炎症性腸疾患治療の可能性. 第47回日本消化器病学会, 神戸, 2005. 10. 6

67. 根本泰宏, 金井隆典, 蒔田 新, 藤井 玲, 伊藤ゆみ, 戸塚輝治, 渡辺 守: マウス腸管粘膜内 CD4+T 細胞の免疫トレンランスへの関与. 第47回日本消化器病学会, 神戸, 2005. 10. 6

68. 岡本隆一, 渡辺 守: 骨髄由来細胞による小腸粘膜防御機構の再生. 第36回日本消化吸収学会・第47回日本消化器病学会合同, 神戸, 2005. 10. 8

69. 渡辺 守: ヒト腸管上皮細胞由来 IL-7 による粘膜免疫および上皮分化・再生の制御. 第33回日本臨床免疫学会, 京都, 2005. 10. 28

70. Yoshioka A, Oshima S, Tsuchiya K, Namiki S, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Functional roles of intestinal epithelial cells through transcription factor IRF-1. 第35回日本免疫学会, 横浜, 2005. 12. 15

71. Kanai T, Makita S, Nemoto Y, Totsuka T,

Watanabe M: Regulation of intestinal inflammation by lamina propria CD4+ CD25+/bright T cells. 第6回 Colloquium for the Study of Gastrointestinal Defense System (日本消化器免疫学会サテライトシンポジウム), 大阪, 2006. 1. 14

G. 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

腸管特異的自然免疫調節機構を標的とした治療法の開発

分担研究者 高後 裕 旭川医科大学医学部内科学第三講座 教授

研究要旨

感染に反応して内因性抗菌ペプチドを分泌する小腸パネート細胞の自然免疫機構を解析し、内因性抗菌ペプチドを標的とする新たな腸管免疫制御療法開発の可能性を検討した。パネート細胞の自然免疫における有用性を明らかにし、クローン病患者ではパネート細胞由来の殺菌活性が低下していることを示した。Isoleucine 等を用いて自然免疫機能を賦活化させる新たな自然免疫療法を開発し、炎症性腸疾患患者を対象としたパイロット臨床試験を施行したところ、自然免疫誘導・賦活物質に治療効果を認めた。

A. 研究目的

本研究は、感染に反応して内因性抗菌ペプチドを分泌する小腸パネート細胞の自然免疫機構を解析し、腸管由来の内因性抗菌ペプチドを標的とする新たな腸管免疫制御療法開発の可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

クローン病患者および非炎症性腸疾患対照者からインフォームド・コンセントの下に切除小腸粘膜または内視鏡的回腸生検粘膜材料を得て、Ayabeらの方法 (*Nat Immunol* 1:113, 2000) に準じ単離小腸陰窩を回収した。得られた単離小腸陰窩と *S. typhimurium* を 37℃で、30分 *ex vivo* 曝露して分泌物を得て、defensin-sensitive *S. typhimurium* に対する殺菌活性を検討した。抗 α -defensin 抗体を用いて Acid-urea Western blot 解析を施行した。さらに、小腸陰窩から腸上皮細胞を分離し、単離パネート細胞における α -defensin の発現検討、及び DAF を用いて Nitric Oxide の局在解析を共焦点レーザー顕微鏡で施行した。

インフォームド・コンセントを得た健常ボランティア及び炎症性腸疾患患者に対して、defensin 誘導作用を有する Isoleucine 4g/day を経口投与し、臨床症状、CDAI 等の推移を検討するパイロット臨床試験を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行に当たっては、意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合のみ検体提供またはパイロット臨床試験を実施した。検体採取、臨床試験に当たって、および本研究結果公表の際には、試料等の提供者および被試験者、その家族・血縁者その他の関係者の人権、利益及びプライバシーの保護に配慮した。

C. 研究結果

位相差顕微鏡観察下で、小腸陰窩は容易に判別、単離し得た。クローン病患者の小腸陰窩には対照者にはみられない陰窩伸長、内腔拡張等の形態異常を高頻度に認めた。健常対照者のパネート細胞は、*S. typhimurium* への *ex vivo* 曝露によって、殺菌活性を放出した。これに対して、クローン病患者では、細菌曝露による殺菌活性放出が有意に低下した。Western blot 解析で、クローン病患者では分泌された α -defensin が対照者に比して低下する傾向を認めた。すなわち、クローン病患者ではパネート細胞から放出される殺菌活性の低下が示された。さらに、小腸陰窩における α -defensin および Nitric Oxide 発現の検討により、パネート細胞に近接する幹細胞と推定される細胞群を検出した。

パイロット臨床試験の結果、isoleucine は健常者および炎症性腸疾患患者の腸内細菌叢を変化させ、炎症性腸疾患患者の下痢回数を有意に減少させた。また、CDAI の低下を認めた。これにより、*in vitro* でデフェンシン産生・分泌を誘導する isoleucine は、小腸自然免疫機能低下を示す炎症性腸疾患患者の病態改善をもたらす可能性があることを示した。

D. 考察

本研究により、小腸パネート細胞の自然免疫機能の有用性を明らかにした。さらに、この成果を基にして炎症性腸疾患患者を対象としたパイロット臨床試験を行って、自然免疫誘導・賦活物質の治療効果をはじめ検討した。これらは、腸管特有の免疫機構解明と、それを利用した新たな治療法の確立に直結する成果であると考えられる。また、本研究で腸上皮幹細胞の同定・分離に関する知見を得たことにより、今後、従来困難であった腸管の再生医療の展開が期待できる。

腸管上皮の自然免疫機構はこれまで考えられていたような受動的で弱いシステムではなく、強力で制御されたシステムであると考えられる。本研究に

より、腸管における自然免疫のはたらきを炎症性腸疾患患者に対して臨床応用する具体的な戦略を示すことができた。

E. 結論

本研究により、クローン病患者ではパネート細胞由来の殺菌活性が低下していることが明らかになった。Isoleucine 等を用いた内因性抗菌ペプチド産生誘導による炎症性腸疾患に対する新たな自然免疫療法開発の可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kohgo Y, Ashida T, Maemoto A, Ayabe T. Leukocytapheresis for treatment of IBD. *J Gastroenterol* 38 Suppl 15: 51-54, 2003
2. Mirza ZK, Das KK, Slate J, Mapitigama RN, Amenta PS, Griffel LH, Ramsundar L, Watari J, Yokota K, Tanabe H, Sato T, Kohgo Y, Das KM. Gastric intestinal metaplasia as detected by a monoclonal antibody is highly associated with gastric adenocarcinoma. *Gut* 52: 807-812, 2003
3. Kono T, Chisato N, Ebisawa Y, Asama T, Sugawara M, Ayabe T, Kohgo Y, Kasai S, Yoneda M, Takahashi T. Impaired nitric oxide production of the myenteric plexus in colitis detected by a new bioimaging system. *J Surg Res* 117: 329-338, 2004.
4. Watari J, Saitoh Y, Fujiya M, Shibata N, Tanabe H, Inaba Y, Okamoto K, Maemoto A, Ohta T, Yasuda A, Ayabe T, Ashida T, Yokota K, Obara T, Kohgo Y. Reduction of syndecan-1 expression in differentiated type early gastric cancer and background mucosa with gastric cellular phenotype. *J Gastroenterol* 39: 104-112, 2004.
5. Kohgo Y. Why is leukocytapheresis effective in inflammatory bowel diseases? *J Gastroenterol* 39: 1226-1227, 2004
6. Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y, Kono T. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol* 12: 394-398, 2004.
7. Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, Suzuki Y, Saito H, Kohgo Y, Okumura T. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 215-222, 2005.

8. Matsumoto T, Iida M, Kohgo Y, Imamura A, Kusugami K, Nakano H, Fujiyama Y, Matsu T, Hibi T. Therapeutic efficacy of infliximab on active Crohn's disease under nutritional therapy. *Scand J Gastroenterol* 40: 1423-1430, 2005
 9. Motomura W, Tanno S, Takahashi N, Nagamine M, Fukuda M, Kohgo Y, Okumura T. Involvement of MEK-ERK signaling pathway in the inhibition of cell growth by troglitazone in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 332: 89-94.
 10. Watari J, Saitoh Y, Fujiya M, Nakamura K, Inaba Y, Okamoto K, Tanabe H, Yasuda A, Miyokawa N, Kohgo Y. Spontaneous remission of primary diffuse large B-cell gastric lymphoma. *J Gastroenterol* 2005, 40: 414-420.
 11. Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Zukerberg LR, Kohgo Y, Lynch MP, Rueda BR, Chung DC. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med* 11: 992-997, 2005.
- ##### 2. 学会発表
- ###### 海外
1. Ayabe T, Maemoto A, Miyoshi Y, Ashida T, Saitoh Y, Kono T, Ebisawa Y, Ouellette AJ, Kohgo Y. The role of human intestinal Paneth cell-expressing Toll-like receptors in innate host defense. (Forum) DDW 2003 Orlando, USA, 2003. 5. 18
 2. Ashida T, Orii F, Ayabe T, Maemoto A, Fujiya M, Saitoh Y, Imai S, Kohgo Y. IL18 induces β isoform of human corticoid receptor in leukocytes to lead the glucocorticoid unresponsiveness in ulcerative colitis. DDW 2003 Orlando, USA 2003. 5. 19.
 3. Ayabe T, Kono T, Miyoshi Y, Ito T, Tanabe H, Maemoto A, Ashida T, Kohgo Y. Expression and function of Toll-like receptors in intestinal Paneth cells in innate host defense. 3rd Awaji International Forum on Infection & Immunity. Awajishima, Japan, 2003. 8. 25
 4. Ayabe T, Ashida T, Maemoto A, Kohgo Y. Functional analysis of intestinal Paneth cells in innate immunity in patients with Crohn's disease. 33rd Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Fukuoka, Japan, 12. 8. 2003
 5. Ayabe T, Kohgo Y. Secretion of microbial peptides by human intestinal Paneth cells that express Toll-like receptors in innate immunity

- ty. AGA, AcademicSkills Workshop. Washington DC, USA, 2004. 3. 18
6. Ayabe T, Ashida T, Kobayashi S, Ito T, Tanabe H, Saitoh Y, Kono T, Maemoto A, Ouellette AJ, Kohgo Y. Up-regulation of Toll-like receptor-2 expression in intestinal Paneth cells in patients with Crohn's disease. (Forum) DDW 2004 New Orleans, USA, 2004. 3. 17
 7. Ashida T, Ayabe T, Inaba S, Sakamoto J, Ito T, Okamoto K, Maemoto A, Moriyama M, Zslofff M A, Kohgo Y. Effect of oral administration of Isoleucine, stimulant of innate immunity, in IBD patients. DDW 2004 New Orleans, USA, 2004. 3. 18
 8. Ayabe T, Ito T, Tanabe H, Kobayashi S, Maemoto A, Ashida T, Kohgo Y. Innate host defense stimulated by the crosstalk between intestinal bacteria and Paneth cells. 4th Awaji International Forum on Infection & Immunity. Awajishima. Japan, 2004. 8. 30
 9. Ayabe T, Ashida T, Kono T, Tanabe H, Maemoto A, Kohgo Y. Roles of antimicrobial peptides secreted by Paneth cells in response to bacteria in innate intestinal host defense. (Symposium) 34th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Sapporo, Japan, 2004. 12. 1
 10. Ayabe T, Kobayashi S, Ito T, Tanabe H, Ashida T, Kono T, Watanabe T, Kohgo Y. Innate intestinal immunity stimulated by the crosstalk between bacteria and Paneth cells. 5th Gordon Research Conference on Antimicrobial Peptides. Ventura, USA, 2005. 3. 7
 11. Ito T, Ayabe T, Kono T, Tanabe H, Maemoto A, Watari J, Ashida T, Hira Y, Watanabe T, Ouellette AJ, Kohgo Y. Innate Intestinal Immunity Stimulated By the Crosstalk Between Bacteria and Paneth Cells Which Express Toll-Like Receptors. DDW/AGA 2005 Chicago, USA 2005. 5. 17
 12. Ayabe T, Tanabe H, Kono T, Ito T, Maemoto A, Watari J, Ashida T, Ouellette AJ, Kohgo Y. The Innate Intestinal Immunity By Paneth Cells and Their Alpha-Defensins in Patients With Crohn's Disease DDW/AGA 2005 Chicago, USA 2005. 5. 17
 13. Tanabe H, Ayabe T, Maemoto A, Ito T, Ashida T, Kohgo Y. Paneth cell defensin deficiency in Crohn's disease. 11th. US-Japan GI&Liver Meeti ng Tokyo, Japan 2005. 6. 24
 14. Maemoto A, Ito T, Tanabe H, Ashida T, Kohgo Y, Ayabe T Down-regulation of Paneth cell alpha-defensin expression and function in patients with Crohn's disease. 35th. Japan Society for Immunology Annual Meeting, Yokohama, Japan. 2005. 12. 15.
- 国内
1. 綾部時芳、高後 裕. 腸粘膜上皮におけるパネート細胞の自然免疫機能と病原体認識機構. 第6回北海道生体防御研究会. 札幌 2003年4月19日
 2. 河野 透、綾部時芳、高後 裕. 機能マーカーによる腸粘膜幹細胞の同定・単離と分化誘導因子の解析. 第89回日本消化器病学会(シンポジウム) 東京 2003年4月24日
 3. 綾部時芳、前本篤男、高後 裕. クロウン病にみられる腸管自然免疫機能異常. 第89回日本消化器病学会(ワークショップ) 東京 2003年4月24日
 4. 綾部時芳、蘆田知史、高後 裕. 炎症性腸疾患における小腸パネート細胞の自然免疫学的解析. 第40回消化器免疫学会(シンポジウム) 東京 2003年8月8日
 5. 蘆田知史、綾部時芳、高後 裕. クロウン病における腸管自然免疫機能異常とその賦活化. 第45回日本消化器病学会大会 大阪 2003年10月15日
 6. 岡本耕太郎、綾部時芳、蘆田知史、高後 裕. サイトフェレシスによる新たな治療戦略—潰瘍性大腸炎に対する遠心分離式白血球除去療法の位置づけ. 第20回日本医工学治療学会総会学術大会(ワークショップ) 広島 2004年4月23日
 7. 綾部時芳、河野 透、高後 裕. 機能マーカーを用いたヒト腸上皮幹細胞の同定. 第2回幹細胞シンポジウム 東京 2004年4月26日
 8. 綾部時芳、高後 裕. 感染症: パネート細胞による腸内細菌の認識および殺菌機構の解析. 第93回日本病理学会総会(ワークショップ) 札幌 2004年6月9日
 9. 綾部時芳、河野 透、高後 裕. 再生医工学的アプローチによるヒト腸上皮幹細胞の分離・培養の可能性. 第46回日本消化器病学会大会(DDW-Japan) (シンポジウム) 福岡 2004年10月21日
 10. 伊藤貴博、綾部時芳、高後 裕. 単離小腸陰窩を用いたパネート細胞の自然免疫機能診断. 第46回日本消化器病学会大会 (DDW-Japan) (ワークショップ) 福岡 2004年10月21日
 11. 綾部時芳、岡本耕太郎、蘆田知史、高後 裕. 遠心分離式白血球除去療法の治療効果と適応. 第24回日本アフェレシス学会 舞浜 2004年11月19日
 12. 綾部時芳、高後 裕. 腸上皮の自然免疫機構—

感染刺激の受容と殺菌. 第 32 回細胞情報伝達系
北海道研究会 (シンポジウム) 札幌 2004 年 11
月 24 日

13. 田邊裕貴, 綾部時芳, 前本篤男, 蘆田知史, 高
後 裕. クロウン病における Paneth 細胞の自然
免疫機構. 国際科学振興財団 第 12 回浜名湖シン
ポジウム浜松 2004 年 12 月 23 日
14. 河野 透, 綾部時芳, 高後 裕. ヒト腸上皮幹
細胞の同定、分離から 培養へのプロセス. 第 91
回日本消化器病学会総会シンポジウム 東京
2005 年 4 月 14 日
15. 綾部時芳, 蘆田知史, 高後 裕. Innate
immunity からみた炎症性腸疾患の病態と最新の
治療の評価 - 炎症性腸疾患における内因性抗菌
ペプチドの病態への関与 -. 第 91 回 日本消化器
病学会総会シンポジウム 東京 2005 年 4 月 15 日
16. 伊藤貴博, 綾部時芳, 高後 裕. 消化管疾患に
おける腸管内細菌叢の攪乱と Biotherapy の意義
- クロウン病患者における抗菌ペプチドによる
腸内細菌制御の攪乱の可能性 -. 第 91 回 日本消
化器病学会総会ワークショップ 東京 2005 年 4 月
15 日
17. 前本篤男, 綾部時芳, 伊藤貴博, 田邊裕貴, 蘆
田知史, 高後 裕. クロウン病における Paneth
細胞とその抗菌 ペプチドによる innate
immunity の破綻. 第 42 回日本消化器免疫学会
総会シンポジウム東京 2005 年 8 月 5 日

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
なし

炎症性腸疾患に対する HGF および HGF 遺伝子を用いた粘膜再生療法の開発

分担研究者 鈴木健司 新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野 助手

研究要旨

炎症性腸疾患に対する粘膜再生療法が従来の治療法を補う新規治療法として期待されている。多くの細胞増殖因子の内、とりわけ肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF）を用いた粘膜再生療法が注目されている。まず、われわれは HGF 遺伝子による炎症性腸疾患に対する遺伝子導入療法の開発を試みた。デキストラン硫酸ナトリウム（dextran sodium sulfate: DSS）腸炎モデルマウスに対し HGF 遺伝子治療が有効であることを明らかにした。HGF naked DNA を hydrodynamics 法による肝臓への導入、また大腸への注腸による導入、さらに内視鏡下の粘膜下注入、いずれの方法によっても有効に遺伝子導入が達成され、発現 HGF 蛋白による腸上皮細胞の再生促進とアポトーシス抑制作用、さらに免疫抑制作用に基づき、腸炎治療効果が得られることを示した。これより、HGF 遺伝子療法は炎症性腸疾患に対する新規治療法となる可能性が考えられた。

次に、現在劇症肝炎に対して臨床治験が行われている遺伝子組み換え型ヒト HGF を用いた、炎症性腸疾患に対する臨床応用可能な治療法の開発を試みた。すなわち、DSS 腸炎ラットに対し、極細径内視鏡を用いて遺伝子組み換え型ヒト HGF の大腸粘膜下注入療法を行い、HGF 遺伝子治療同様の治療効果が得られることを示した。遺伝子組み換え型ヒト HGF の内視鏡による局所投与治療法は、標的臓器へ直接薬剤を到達させることができ、全身への薬剤移行は殆ど生じない。本治療法は HGF の副作用発現の危険性を最小限に留め、現時点で臨床応用可能な治療法となりうると考えられた。

A. 研究目的

炎症性腸疾患に対する新規治療法としての粘膜再生療法の開発が、従来の治療法を補う重要な治療法として期待されている。多くの細胞増殖因子の内、とりわけ鹿児島大学の坪内教授らが発見した肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF）を用いた粘膜再生療法が注目されている。

我々は肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF）の遺伝子治療による、炎症性腸疾患の粘膜再生療法開発の基礎的な検討を進めた。まず最初に、安定して遺伝子発現の得られる肝臓を遺伝子導入標的臓器として、HGF 遺伝子の肝臓への導入により腸炎治療効果が得られるかを検証し、さらに HGF 遺伝子の繰り返し導入により治療効果が高まるかを検討した。また、HGF 遺伝子の注腸投与による局所遺伝子導入が肝臓への遺伝子導入同様の腸炎治療効果を示すかを検討した。

次に、出来るだけ早く臨床応用可能な HGF を用いた炎症性腸疾患に対する粘膜再生治療法を開発するために、DSS 腸炎ラットに対し、極細径内視鏡を用いて、遺伝子組み換え型ヒト HGF および HGF 遺伝子の粘膜下注入療法を検討した。

B. 研究方法

1). HGF 遺伝子治療実験

8 週齢メス C57BL/6 (B6) マウスに 5% DSS を 7 日間自由飲水させ腸炎を惹起した。ラット HGF 遺伝子発現プラスミドを実験開始後 0 日の一回か、0 日と 2 日の 2 回静注群に分けて、尾静脈より hydrodynamics 法に基づいた急速大量静注法により肝細胞に遺伝子導入し、腸炎治療効果を判定した。

また、ラット遺伝子発現プラスミドをカルボキシメチルセルロース (CMC) に溶解し、実験開始後 1 日、3 日と 5 日に注腸投与により腸管局所へ遺伝子導入した。静注および注腸両実験で、対照にはコントロールプラスミド導入マウスを用いた。経時的に症状、大腸腸管長を観察し、定量 RT-PCR による大腸組織のサイトカイン発現解析、HE 染色標本の光学顕微鏡観察による組織学的解析、免疫蛍光法による大腸浸潤細胞のフェノタイプ解析とそのサイトカイン発現の解析、プロモデオキシウリジン (BrdU) 染色による上皮細胞の増殖期解析、TUNEL 法によるアポトーシス解析を行った。

2). 大腸内視鏡下 rhHGF および HGF 遺伝子注入実験

20 週齢オス Wistar/ST ラットに 5% DSS を 7 日間自

由飲水させ腸炎を惹起した。ラット HGF 遺伝子発現プラスミドを実験開始後 0 日に、経肛門的に挿入した極細径内視鏡より局注針を用いて 4 箇所の大腸粘膜下に、組み換えヒト HGF および HGF 遺伝子を注入した。注入後より 7 日まで経過観察し腸炎治療効果を判定した。

HGF 遺伝子および遺伝子組み換え型ヒト HGF 注入両実験で、対照には無治療ラットを用いた。経時的に症状、大腸腸管長を観察し、定量 RT-PCR による大腸組織のサイトカイン発現解析、HE 染色標本の光学顕微鏡観察による組織学的解析、免疫蛍光法による大腸浸潤細胞のフェノタイプ解析とそのサイトカイン発現の解析、Ki67 染色による上皮細胞の増殖期解析、TUNEL 法によるアポトーシス解析を行った。

(倫理面への配慮)

以上の実験は新潟大学大学院医歯学総合研究科の動物実験倫理規定マニュアルに沿って行われた。

B. 研究結果

1). HGF 遺伝子治療実験

HGF 二回導入マウスでは、一回導入マウスに比べ、臨床重症度、大腸腸管長、組織学的病変の強さ、浸潤細胞数、炎症性サイトカイン産生の抑制と抗炎症性サイトカイン産生、いずれにおいても有意差をもってよりよい治療効果が示された。さらに、BrdU 陽性の増殖細胞の増加と TUNEL 陽性のアポトーシス細胞の減少が、大腸腸上皮細胞において認められた。

HGF 遺伝子の肝臓への導入法では、組織病変の改善は、BrdU 陽性細胞増殖上皮細胞の増加とアポトーシス上皮細胞の減少による、大腸陰窩構造の保持、糜爛・潰瘍の減少、大腸陰窩腸の増加が特徴であった。

一方、HGF 遺伝子プラスミドの注腸投与による腸管局所発現では臨床重症度、大腸腸管長、組織学的病変の強さ、浸潤細胞数などで、コントロールプラスミド注腸群に比べて腸炎治療効果が有意差を持って認められた。この、遺伝子導入法では、大腸組織病変は大腸陰窩の増加はあまり目立たず、むしろ大腸陰窩構造の保持と、糜爛・潰瘍の減少、大腸への浸潤細胞の減少が特徴であった。

2). 大腸内視鏡下 rhHGF および HGF 遺伝子注入実験

HGF 遺伝子導入ラットは、無治療ラットに比べ、臨床重症度、大腸腸管長、組織学的病変の強さ、浸潤細胞数、炎症性サイトカイン産生の抑制と抗炎症性サイトカイン産生、いずれにおいても有意差をもって治療効果が示された。さらに、Ki67 陽性の増殖細胞の増加と TUNEL 陽性のアポトーシス細胞の減少が、大腸腸上皮細胞において認められた。

遺伝子組み換え型ヒト HGF 粘膜下注入ラットにおいても、無治療ラットに比べ、臨床重症度、大腸腸管長、組織学的病変の強さ、浸潤細胞数、炎症性サイトカイン産生の抑制と抗炎症性サイトカイン産生、いずれにおいても有意差をもって治療効果が示された。さらに、Ki67 陽性の増殖細胞の増加と TUNEL 陽性のアポトーシス細胞の減少が、大腸腸上皮細胞において認められた。

D. 考察

HGF 遺伝子治療としてわれわれが実験した HGF naked DNA を hydrodynamics 法による肝臓への導入、また大腸への注腸による導入、さらに内視鏡下の粘膜下注入、いずれの方法によっても有効に遺伝子導入が達成され、発現 HGF 蛋白による腸上皮細胞の再生促進とアポトーシス抑制作用、さらに免疫抑制作用に基づき、腸炎治療効果が得られることを示した。これより、HGF 遺伝子療法は炎症性腸疾患に対する新規治療法となる可能性が考えられた。一方、HGF 遺伝子を肝臓へ導入し、血中 HGF 濃度を上昇させる方法は人には実際の臨床応用が不可能である。さらに、血中の HGF 濃度を上昇させ続けることは全身諸臓器へ及ぼす副作用の危険性を有している。また、腸炎治療効果を見た場合、陰窩腸の増進に見られた大腸上皮の過形成傾向は、炎症性腸疾患に合併する colitic cancer の発生の危険性を考えると注意すべき所見と考えられた。

そこで、今回われわれは内視鏡を用いた、HGF 遺伝子および遺伝子組み換え型ヒト HGF の大腸局所への投与法を開発し、上記の問題点を克服しようとした。HGF および HGF 遺伝子の内視鏡による局所投与治療法は、標的臓器へ直接薬剤を到達させることができ、全身への薬剤移行を介さない。本治療法は HGF の副作用発現の危険性を最小限に留め、現時点で臨床応用可能な治療法となりうると考えられた。本治療法はヒトへも応用可能な方法と考えられた。ただし、発ガンの危険性などの重大な副作用発現には細心の注意を払い、安全性確保を十二分に検討する必要がある。

E. 結論

HGF 遺伝子治療は粘膜再生に基づいた炎症性腸疾患の新規治療法となりうる可能性が示唆された。

ただし、HGF 遺伝子治療を実際に炎症性腸疾患に臨床応用するためには解決しなければならない障害が少なからず存在する。一方、遺伝子組み換え型ヒト HGF は劇症肝炎に対する治療が、現在京都大学で開始

されている。今後は、本研究で動物実験に対して有効性を証明したように、遺伝子組み換え型ヒト HGF の内視鏡的粘膜下注入療法により、炎症性腸疾患に対する治療を計画し臨床応用を現実化させていくことが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hanawa T, Suzuki K, Kawauchi Y, Takamura M, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Asakua H, Miyazaki J, Maruyama H, Aoyagi Y: Attenuation of mouse acute colitis by hepatocyte growth factor gene transfer into the liver. *J Gene Medicine*. Published Online:14 Feb 2006
- 2) Han GD, Suzuki K, Koike H, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, Shimizu F, Kawachi H: IFN-inducible protein-10 plays a pivotal role in maintaining slit-diaphragm function by regulating podocyte cell-cycle balance. *J Am Soc Nephrol*. Published Online December 28, 2005
- 3) Watanabe S, Suzuki K, Kawauchi Y, Yamagiwa S, Yoneyama H, Kawachi H, Okada Y, Shimizu F, Asakura H, Aoyagi: Kinetic analysis of the development of pancreatic lesions in mice infected with a murine retrovirus. *Clin Immunol*109:212-223, 2003
- 4) Han GD, Koike H, Nakatsue T, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, Kobayashi N, Mandel P, Shimizu F, Kawachi H: IFN-inducible protein-10 has a differential role in podocyte during Thy 1.1 glomerulonephritis. *J Am Soc nephrol* 14:3111-26, 2003
- 5) 河内裕介, 鈴木健司, 塙孝泰, 米山博之, 河内裕, 韓基東, 清水不二雄, 青柳豊: マウス DSS 腸炎に対する HGF 遺伝子治療の検討. *消化器と免疫*, 143-146、マイライフ社、2005 年 7 月
- 6) 河内裕介, 鈴木健司, 塙孝泰, 渡辺史郎, 米山博之, 河内裕, 清水不二雄, 青柳豊: マウス DSS 腸炎の抗 IP-10 抗体注腸投与による治療効果の検討. *消化器と免疫*, 61-64、マイライフ社、2004 年 7 月

2. 学会発表

- 1) Kawauchi Y, Suzuki K, Hanawa T, Yoneyama H, Maruyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Miyazaki J, Asakura H, Aoyagi Y: The effect of local administration of HGF naked DNA by enema on DSS-induced acute colitis. DDW 2005, Chicago, Illinois, USA, 2005.5.15.
- 2) Suzuki K, Kawauchi Y, Hanawa T, Yoneyama H, Hiroki M, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Miyazaki J, Asakua H, Aoyagi Y: Treatment of acute colitis of mice by repeated hepatocyte growth factor gene transfer to the liver via tail vein. Chicago, Illinois, USA, 2005.5.15.
- 3) 鈴木健司、河内裕介、青柳豊: HGF 遺伝子導入による炎症性腸疾患に対する粘膜再生療法の開発. 第 91 回日本消化器病学会, 東京, 2005.4.14
- 4) 河内裕介、鈴木健司、塙孝泰、韓基東、河内裕、清水不二雄、青柳豊: マウス DSS 腸炎に対する HGF 遺伝子治療の検討. 第 42 回日本消化器免疫学会, 東京, 2005.8.4.
- 5) Kawauchi Y, Suzuki K, Hanawa T, Yoneyama H, Maruyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Miyazaki J, Asakura H, Aoyagi Y: Treatment of acute colitis of mice by hepatocyte growth factor gene transfer to the liver via tail vein. DDW 2004, New Orleans, Louisiana, USA, 2004.5.17.
- 6) Suzuki K, Kawauchi Y, Baba Y, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Narumi S, Shimizu F, Asakua H, Aoyagi Y: Amelioration of acute colitis of mice by enema of anti-interferon-inducible-protein 10 (IP-10)-antibody. DDW 2004, New Orleans, Louisiana, USA, 2004.5.17.
- 7) 河内裕介、鈴木健司、青柳豊: マウス DSS 腸炎に対する HGF 遺伝子導入療法 of 検討. 第 90 回日本消化器病学会, 仙台, 2004.4.22
- 8) 河内裕介、鈴木健司、塙孝泰、韓基東、河内裕、清水不二雄、青柳豊: マウス DSS 腸炎に対する HGF 遺伝子治療の検討. 第 41 回日本消化器免疫学会, 大津, 2004.7.15.
- 9) 鈴木健司、河内裕介、青柳豊: 炎症性腸疾患の粘膜再生に基づく新規治療法としての HGF 遺伝子治療法の開発. DDW-Japan 2004, 福岡, 2004.10.21.

- 10) Suzuki K, Kawauchi Y, Watanabe S, Yoneyama H, Kawachi H, Shimizu F, Aoyagi Y: Blockade of interferon-inducible protein-10 ameliorates chronic experimental colitis through blocking cellular trafficking and protecting intestinal epithelial cell. DDW2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.20.
- 11) Watanabe S, Suzuki K, Kawauchi Y, Yamagiwa S, Yoneyama H, Shimizu F, Kawachi H, Aoyagi Y: Treatment of autoimmune-like pancreatitis in MAIDS mice by a monoclonal antibody against interferon-inducible protein-10 (IP-10). DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.21.

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

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。一方、組換えヒト HGF は製薬会社から供給される人体への投与実績のない未承認臨床サンプルであるため、その臨床応用は治験の枠組みで実施されねばならない。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、その安全性に関する論理構築を行った。即ち、「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」ガイドラインに基づいて、基本的に GLP データによるげっ歯類、非げっ歯類の反復投与毒性試験成績で対応した。特殊毒性試験及び局所刺激性試験は、多くはこの GLP データで対応を試みた。遺伝毒性はタンパク製剤には不要であった。また、大腸発癌モデルにおいて、組換えヒト HGF に発癌促進作用はみられなかった。しかし、増殖因子である 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、被験者に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、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。この治験準備を通して、未承認臨床サンプルの臨床試験を治験の枠組みで実施する、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、傷害組織の重要な再生・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 が硫酸デキストラン(DSS)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. 組換えヒト HGF の非臨床試験

- (1) 単回投与毒性試験 : BALB/c マウスに組換えヒト HGF を単回静脈内投与し、14 日間一般状態を観察した後に屠殺し、剖検及び病理組織学的検査を行った。
- (2) ラット 2 週間反復投与及び 2 週間回復試験 : Wistar ラットに組換えヒト HGF を 2 週間反復静脈

内投与した後、2週間休薬し、血液生化学検査及び病理組織学的検査を行った。

- (3) 安全性薬理試験：クラウン系ミニブタに組換えヒト HGF を単回静脈内投与し、呼吸器系及び循環器系に及ぼす影響を検討した。
- (4) 発癌性試験：① 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 を 4 週間静脈内投与し、投与終了時の aberrant crypt foci (ACF) の発生を健闘した。② Wistar ラットに 1% DSS を自由飲水させ、DMH を週 3 回、2 週間皮下投与した。この間、組換えヒト HGF を 4 週間静脈内投与し、26 週目に ACF、腺腫及び大腸癌の発生を検討した。
- (5) 薬効薬理試験：trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 大腸炎ラットに組換えヒト HGF を静脈内投与し、その大腸潰瘍の修復に及ぼす影響を検討した。

2. 組換えヒト HGF の医師主導治験

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マウス、ラット及びミニブタを用いた実験に関して、国際社会がヒトの健康のためとはいえども、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ふ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. 組換えヒト HGF の非臨床試験

- 1) 単回投与毒性試験：死亡する個体はなく、致死量 40 mg/kg 以上であった。また明らかな急性毒性は見られなかった。
- 2) ラット 2 週間反復投与及び 2 週間回復試験：用量依存性に蛋白尿が出現し、病理組織学的な糸球体

の肥大、メサンギウム領域や内皮下に PAS 陽性物質の沈着が認められた。しかし、これらの変化は投与終了後 2 週間で回復または改善傾向を示した。また、尿素窒素、クレアチニンの上昇はみられなかった。

- 3) 安全性薬理試験：組換えヒト HGF 投与は呼吸数、血液ガス分析に影響を与えなかったが、末梢血管拡張による血圧低下が認められた。心毒性はなく、組換えヒト HGF の投与速度を低下させると血圧は緩徐に低下し、この血圧低下には輸液で対応可能であった。
- 4) 発癌性試験：① 化学発癌モデルにおいて組換えヒト HGF は ACF の発生数に影響を及ぼさなかった。② 大腸炎を背景にした発癌モデルにおいて、組換えヒト HGF は ACF、腺腫及び大腸癌の発生に影響を与えなかった。
- 5) 薬効薬理試験：組換えヒト HGF 投与によって大腸潰瘍の修復が促進され、病理組織学的にも改善が認められた。

2. 組換えヒト HGF の医師主導治験に向けた準備

- 1) 非臨床試験：「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」ガイドラインに基づいて、基本的に GLP データによるげっ歯類、非げっ歯類の反復投与毒性試験成績で対応した。特殊毒性試験及び局所刺激性試験は、多くはこの GLP データで対応を試みた。遺伝毒性はタンパク製剤には不要であった。
- 2) 組換えヒト HGF の発癌性：組換えヒト HGF が大腸癌の発生を促進する成績は得られていないが、増殖因子である HGF の発癌性を完全に否定することは困難である。従って、臨床応用の際には HGF が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とする。
- 3) 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

組換えヒト HGF の臨床応用を医師主導治験の枠組みで行うべく、非臨床試験を実施し、その成績から安全性に関する論理構築を行った。即ち、組換えヒト HGF の毒性として、血圧低下が考えられたが投与速度を緩徐にすることで対応可能であった。また、