

組換えヒト HGF に大腸発癌促進作用は認められなかったが、増殖因子である HGF の発癌の可能性を完全に否定することは困難であるため、被験者に十二分にインフォームドコンセントを行うことが必要と考えられた。

一方、組換えヒト HGF は人体に投与実績のない新規有効成分であるため、その倫理性、正当性からまずは劇症肝炎を対象とした第 I/II 相治験を本邦初の開発型医師主導治験として開始するところに到達した。このように治験の枠組みで実施することは、本臨床試験における安全性及び科学性が確保され、さらにその成績が国際的な評価に耐えうることが考えられ、学術的、社会的意義は大きいと考えられる。即ち、治験の枠組みで承認臨床サンプルの臨床試験を実施する、様々なノウハウを蓄積した。劇症肝炎を対象とした臨床試験において重篤な有害事象が認められなければ、ステロイド抵抗性の潰瘍性大腸炎に対する臨床試験を医師主導治験として実施すべく、治験計画届に向けた準備を早急に開始する見通しである。

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tahara Y, Yamamoto S, Miyata Y, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H: Hepatocyte growth factor facilitates colonic mucosal repair in experimental ulcerative colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 307: 146-151, 2003
- 2) Hori T, Ido A, Uto H, Hasuike S, Moriuchi A, Hayashi K, Nakagawa S, Miyazawa K, Kitamura N, Tsubouchi H: Activation of hepatocyte growth factor in monkey stomach following gastric mucosal injury. *J Gastroenterol.* 39: 133-139, 2004
- 3) Ido A, Moriuchi A, Kim I-D, Numata M, Nagata-Tsubouchi Y, Hasuike S, Uto H, Tsubouchi H: Pharmacokinetic study of

recombinant human hepatocyte growth factor administered in a bolus intravenously or via portal vein. *Hepatol Res.* 30: 175-181, 2004

- 4) Uto H, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Yamagishi T, Gohda E, Tsubouchi H: Development of a rapid semi-quantitative immunochromatographic assay for serum hepatocyte growth factor and its usefulness in acute liver failure. *Hepatol Res.* 33: 272-276, 2005
- 5) Ido A, Numata M, Kodama M, Tsubouchi H: Mucosal repair and growth factors: recombinant human hepatocyte growth factor as an innovative therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 40: 925-931, 2005
- 6) Hasuike S, Ido A, Uto H, Moriuchi A, Tahara Y, Nagata K, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H: Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation and differentiation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 20: 1753-1761, 2005
- 7) Numata M, Ido A, Moriuchi A, Kim I, Tahara Y, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Miyata Y, Uto H, Tsubouchi H: Hepatocyte growth factor facilitates the repair of large colonic ulcers in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis.* 11: 551-558, 2005
- 8) Kim ID, Azuma T, Ido A, Moriuchi A, Numata M, Teramukai S, Okamoto J, Tsutsumi Sm Tanaka K, Tsubouchi H: Navigator-echo-based MR provides high resolution images and precise volumetry of swine livers without breath holding or injection of contrast media. *Liver Transplant.* 12: 72-77, 2006
- 9) Kusumoto K, Ido A, Moriuchi A, Katsura T, Kim ID, Takahama Y, Numata M, Kodama M, Hasuike S, Nagata K, Uto H, Inui K, Tsubouchi H: Repeated intravenous injection of recombinant human hepatocyte growth factor ameliorates liver cirrhosis but causes albuminuria in rats. *Int J Mol Med.* 17: 503-509, 2006
- 10) Nakanishi C, Moriuchi A, Ido A, Numata M, Kim ID, Kusumoto K, Hasuike S, Abe H, Nagata K, Akiyama Y, Uto H, Kataoka H, Tsubouchi H: Effect of hepatocyte growth factor on endogenous hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Oncol Rep.* (in press)
- 11) 井戸章雄、森内昭博、蓮池悟、宇都浩文、坪内博仁：肝疾患の分子生物学—治療への応用—HGF を用いた肝再生療法。最新医学 58, 2023-2029, 2003.

- 12) 井戸章雄、田原良博、山本章二郎、沼田政嗣、宮田義史、坪内博仁：炎症性腸疾患に対する HGF を用いた新しい治療法の開発。臨床消化器内科 18, 797-802, 2003
- 13) 井戸章雄、森内昭博、金一徳、沼田政嗣、宇都浩文、坪内博仁：ウイルス性肝疾患とサイトカイン-HGF による病態制御を中心に。臨床消化器内科 20: 295-302, 2005
- 14) 井戸章雄、森内昭博、金一徳、宇都浩文、坪内博仁：HGF による劇症肝炎の治療-トランスレショナルリサーチの現況-。最新医学 60: 830-836, 2005
- 15) 井戸章雄、宇都浩文、坪内博仁：肝細胞増殖因子 HGF を用いた最新の臨床展開。バイオサイエンスとインダストリー 63: 167-170, 2005
- 16) 井戸章雄、沼田政嗣、児玉眞由美、坪内博仁：再生医学的アプローチからの新規治療法の開発-組換えヒト HGF を用いた傷害粘膜再生・修復療法-。日本消化器病学会雑誌 102: 1139-1145, 2005

## 2. 学会発表

- 1) 井戸章雄、森内昭博、坪内博仁：難治性の消化器疾患に対する肝細胞増殖因子 (HGF) の臨床応用。第 90 回日本消化器病学会総会，仙台，2004. 4. 22
- 2) 沼田政嗣、井戸章雄、坪内博仁：傷害粘膜の再生修復を目的とした肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた新規治療法の開発。第 46 回日本消化器病学会大会，福岡，2004. 10. 21
- 3) 沼田政嗣、井戸章雄、坪内佳子、森内昭博、金一徳、山本章二郎、宮田義史、宇都浩文、坪内博仁：TNBS 腸炎モデルにおける肝細胞増殖因子の傷害粘膜修復促進作用の検討。第 46 回日本消化器病学会大会，福岡，2004. 10. 22
- 4) 井戸章雄、森内昭博、坪内博仁：劇症肝炎、肝不全治療のあり方-診断から治療へ-：劇症肝炎に対する組換えヒト肝細胞増殖因子による第 I・II 相臨床試験への取り組み。第 9 回日本肝臓学会大会，神戸，2005. 10. 5
- 5) 井戸章雄、森内昭博、金一徳、坪内博仁：肝再生と再生医療：組み換え型ヒト HGF の臨床応用-医師主導型治験としての取り組み。第 41 回日本肝臓学会総会，大阪，2005. 6. 17
- 6) 沼田政嗣、中西千尋、宇都浩文、安倍弘生、上村修司、黒木穰二、森内昭博、児玉眞由美、林克裕、井戸章雄、坪内博仁：ラット大腸発癌モデルの腫瘍発生に及ぼす HGF の影響。第 16 回日本消化器癌発生学会総会，鹿児島，2005. 10. 14

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御機構に関する研究

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所教授

研究要旨:その異常活性化が慢性炎症性腸疾患を引き起こす自然免疫系の活性制御機構を解析した。大腸粘膜固有層に局在するマクロファージは、脾臓など他の組織由来のマクロファージと異なり、TLR リガンドに応答しない。しかし、慢性大腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウス由来の細胞は TLR リガンドに反応した。このメカニズムを解析するため、DNA microarray により両細胞間での遺伝子発現の差を解析した。その結果、正常の大腸粘膜固有層に局在する細胞特異的遺伝子として IκBNS を同定した。IκBNS をマクロファージ系細胞に発現させると、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に阻害された。RNAi によるノックダウンでは、逆に IL-6 産生が特異的に上昇した。さらに、IκBNS の生理機能を解析するためノックアウトマウスを作製したところ、IκBNS ノックアウトマウス由来のマクロファージでは、TLR 刺激により誘導される遺伝子の中で、IL-6 などの NF-κB 依存性に 3 時間以降に遅れて誘導されてくる遺伝子の発現が有意に上昇していた。また TLR 刺激による NF-κB の活性が遷延化し、刺激後 3 時間でも NF-κB の活性が残存していた。さらに、dextran sodium sulfate の経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていた。以上の結果から、核に発現する IκB 分子 IκBNS が、NF-κB の活性を抑制することにより自然免疫系の活性を制御し、個体レベルで腸管炎症抑制に関与していることが明らかになった。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、現在その病因・病態が明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない難治性の疾患である。マクロファージの活性を負に制御することが知られているサイトカイン IL-10 の遺伝子欠損マウスが慢性腸炎を発症することから、このマウスはヒトの慢性炎症性腸疾患のモデル動物としてよく利用され、病態の詳細な解析が行われてきた。また、種々の薬剤による腸炎誘導モデルにおける IL-10 の作用が、IL-10 の発現上昇や、抗 IL-10 抗体によるブロック実験などにより解析され、また、IL-10 遺伝子の発現誘導による慢性腸炎の治療効果も実験動物で確かめられてきた。このように、IL-10 が慢性腸炎の発症を抑制することは明らかになっている。しかし、IL-10 がいかなる分子機構で生体において慢性腸炎を抑制するかは全く理解されていない。慢性炎症性腸疾患は、現代増加の一途をたどる疾患のひとつで、その病因・病態の解明、さらにその治療法の確立が待ち望まれている。

申請者は、マクロファージにおいて IL-10 のシグナル伝達に Stat3 が必須であることを見出

し、Stat3 をマクロファージ特異的に欠損させると、マクロファージが異常に活性化され、IL-10 欠損マウスと同様の慢性腸炎を発症することを見出した。このことは、生体における慢性炎症性腸疾患の発症には、マクロファージの異常活性化が直接関与しており、IL-10 が生体で炎症抑制に働く主要な標的細胞はマクロファージであることを示している。これらの事実から、IL-10 および自然免疫系に属するマクロファージ系細胞の活性調節機構に標的をのぼることにより、慢性炎症性腸疾患の発症機序を解明できるものと考えている。

そこで、生体で慢性炎症性腸疾患の誘因となるマクロファージをはじめとする自然免疫系の細胞の活性がいかなる分子機構で制御されているかを明らかにしていくことを目的とする。この分子機構を解明することにより、自然免疫系細胞の活性抑制機構からみた慢性炎症性腸疾患の病因の解明をめざす。この成果は、自然免疫系の細胞の機能制御を可能にするばかりでなく、クローン病や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性腸疾患の病因・病態の解明、さらには画期的な治療対策の考案にも役立つことが期待される。

## B. 研究方法

自然免疫系の活性制御機構を解析するためのモデルとして、自然免疫系の活性制御機構の破綻により慢性大腸炎を発症する、自然免疫系特異的 Stat3 欠損マウス、IL-10 ノックアウトマウスを用いた。正常マウスの大腸の粘膜固有層には少数のマクロファージや樹状細胞が存在している。これらの細胞を大腸組織より単離することは極めて困難であった。これらの細胞の機能解析ができなかった。われわれは、この細胞群の単離法を確立し、高純度のマクロファージや樹状細胞を培養できるようになった。正常マウスの大腸の粘膜固有層由来の細胞は、IL-12 などの炎症性サイトカインを産生しない。一方、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや Stat3 変異マウスの大腸の粘膜固有層では、たとえば慢性腸炎を発症する前の若いマウスでも、マクロファージや樹状細胞の数が極めて増加しており、さらにこれらの細胞は IL-6, IL-12 などの炎症性サイトカインを産生することを明らかにした。この結果は、正常マウス大腸の粘膜固有層に存在するマクロファージや樹状細胞は、何らかの分子機構により不応答性になっていて過剰な炎症反応を抑制していることを示唆している。そこで、この分子機構を正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの細胞間で遺伝子発現の差を DNA microarray で解析する。そして得られた候補遺伝子をマクロファージに導入し、サイトカイン産生の変化を解析する。

その結果、核に発現する I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ BNS が、正常マウスの細胞に選択的に発現していることを見いだした。I $\kappa$ BNS をマクロファージ系細胞株に発現させると、LPS 刺激による TNF- $\alpha$  産生は抑制しないが、IL-6 産生を抑制することを見いだした。そこで、I $\kappa$ BNS の生理機能を明らかにし、この個体レベルでの役割を明らかにするため、ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

## C. 研究結果

これまでに STAT3 をマクロファージで特異的に欠失させたマウスを作製し、STAT3 がマクロファージでの IL-10 シグナルに必須であり、マクロファージの

機能抑制、さらには生体レベルで慢性炎症の抑制に必須であることを明らかにした。そして、病原体構成成分を認識する Toll-like receptor (TLR) ファミリーが、STAT3 非存在下でマクロファージの異常活性化による慢性腸炎の発症のトリガーとなることを、TLR4/STAT3 二重変異マウスの解析により明らかにした。さらに、IL-10 刺激によりマクロファージで誘導される Bcl-3 が、TLR 刺激依存性の TNF- $\alpha$  産生を特異的に抑制していることを明らかにした。さらに、大腸粘膜固有層に存在するマクロファージの機能を解析した。その結果、正常マウスの大腸粘膜固有層マクロファージは、TLR 刺激依存性の炎症性サイトカインの産生が認められないが、慢性腸炎を発症する IL-10 ノックアウトマウスや STAT3 変異マウス由来の細胞は TLR 刺激依存性に炎症性サイトカインを産生した。そこで正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの大腸粘膜固有層マクロファージ間で TLR 応答性が異なる分子機構を解析するため、両者間で遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイで解析した。その結果、Bcl-3 と同じ I $\kappa$ B ファミリーに属する I $\kappa$ BNS が Bcl-3 とともに正常大腸粘膜固有層マクロファージに特異的に発現していることを見出した。I $\kappa$ BNS をマクロファージに発現させると、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に減少していた。さらに I $\kappa$ BNS を発現した細胞では、NF- $\kappa$ B の DNA 結合能に障害が認められた。さらに、I $\kappa$ BNS は IL-6 プロモーターに p50 NF- $\kappa$ B サブユニットと共に恒常的に会合していることがクロマチン免疫沈降法の解析から明らかになった。さらに、RNAi による I $\kappa$ BNS のノックダウンマクロファージでは、LPS 刺激依存性の IL-6 産生が特異的に増加していた。

さらに、I $\kappa$ BNS の生理機能を解析するため、I $\kappa$ BNS ノックアウトマウスを作成した。I $\kappa$ BNS ノックアウトマウスは正常に出生し、外見上異常は認めなかった。I $\kappa$ BNS ノックアウトマウスより腹腔マクロファージを単離、あるいは骨髄由来樹状細胞を分化させ、TLR 刺激による TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 産生を解析した。その結果、I $\kappa$ BNS ノックアウトマウスでは、TNF- $\alpha$  産生に変化はないが、IL-6, IL-12 産生が有意に亢進していた。次にこれら遺伝子の mRNA の発現誘導を real time RT-PCR 法で解析した。TNF- $\alpha$  mRNA の誘導は刺激後 1 時間以内に認められるが、この誘導パターンには正常マウスと I $\kappa$ BNS ノックアウトマウス間で変化はなかった。IL-6 mRNA は刺激後 3 時間から誘導がみられるが、3 時間までは両マウス間で差はなかった。正常マウスでは 3 時間以降 mRNA の発現量は低下するが、I $\kappa$ BNS ノックアウトマウスで

は mRNA 量は高いままであった。他の遺伝子にも刺激後 1 時間以内の早期に誘導されてくる遺伝子 (IL-1beta, IL-12p19 など) と遅れて時間以後に誘導される遺伝子 (IL-12p40, IL-18 など) があるが、早期に誘導される遺伝子群の発現誘導パターンは両マウス間で差がないが、遅れて誘導されてくる遺伝子群は 5 時間以降 IkbNS ノックアウトマウスで有意に発現が高かった。次に、TLR 刺激によるまた TLR 刺激による NF-kB の活性化をゲルシフト法、および NF-kB p65 の細胞内局在により解析した。その結果、IkbNS ノックアウトマウスでは NF-kB の活性が遷延化し、刺激後 3 時間でもまだ NF-kB の活性が残存していることが明らかになった。次に、TNF-a, IL-6 プロモーターへの NF-kB p65 の会合をクロマチン免疫沈降法で解析した。TNF-a プロモーターへの p65 の会合は刺激後 1 時間をピークに観察され、これは正常マウスと IkbNS ノックアウトマウスの間で差は認められなかった。一方 IL-6 プロモーターへの p65 の会合は刺激後 3 時間をピークに正常マウスでは認められた。IkbNS ノックアウトマウスでも 3 時間までは正常マウスと同様に p65 の会合が誘導されたが、3 時間以降正常マウスでは p65 の会合が減少していくのに対し、IkbNS ノックアウトマウスでは持続したままであった。これらの結果から、IkbNS は刺激後遅れて誘導されてくる遺伝子のプロモーターにおいて選択的に NF-kB の活性を抑制することにより、遺伝子発現を抑制していることが明らかになった。さらに個体レベルでも、LPS 投与によるエンドトキシンショックに対する感受性が高くなり、また dextran sodium sulfate の経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていった。

#### D. 考察

以上の結果から、大腸粘膜固有層に局在する自然免疫担当細胞は、通常過剰な炎症反応を抑制するため、TLR 刺激に不応答になっていること、そしてそのメカニズムの一端として、核に発現する IkbNS が、自然免疫系の細胞において NF-kB の活性を抑制することにより、あるサブセットの遺伝子発現を抑制し、個体レベルで炎症抑制に関与していることが明らかになった。

#### E. 結論

大腸の粘膜固有層に局在する自然免疫系細胞は、TLR 刺激に不応答しない。そしてその不応答機構の破綻が慢性炎症性腸疾患の発症のトリガーとなりうる。正常では、核に発現する Ikb 分子 IkbNS が選択

的に TLR 刺激依存性のサイトカイン産生を負に制御し、過剰な炎症の誘導を抑制している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### 1. 論文発表

1. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: IkbNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
2. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe, T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105-113 (2006).
3. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
4. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.: Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087-1095 (2005).
5. Yukawa, K., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Bai, T., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S., and Iso, H.: Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 16, 673-675 (2005).
6. Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., and Ito, T.: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of

- inflammatory response. *J. Immunol.* 175, 3354-3359 (2005).
7. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28 (2005).
  8. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., and Moreno, E.: MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 73, 5137-5143 (2005).
  9. Yang, S., Takahashi, N., Yamashita, T., Sato, N., Takahashi, M., Mogi, M., Uematsu, T., Kobayashi, Y., Nakamichi, Y., Takeda, K., Akira, S., Takada, H., Udagawa, N., and Furusawa, K.: Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1b, and TNF- $\alpha$  through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956-1964 (2005).
  10. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T.: Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J. Immunol.* 175, 1177-1183 (2005).
  11. Kitching, A. R., Turner, A. L., Wilson, G. R., Semple, T., Odobasic, D., Timoshanko, J. R., O'sullivan, K. M., Tipping, P. G., Takeda, K., Akira, S., and Holdsworth, S. R.: IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2023-2033 (2005).
  12. Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B.: B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J. Immunol.* 174, 7912-7919 (2005).
  13. Yang, R., Wheeler, C. M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D. V., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79, 6741-6750 (2005).
  14. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S.: PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115, 951-958 (2005).
  15. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: Down-regulation of dopamine transporter and abnormal behavior in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15, 819-825 (2005).
  16. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., and Kikutani, H.: Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22, 305-316 (2005).
  17. Hirotsani, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear I $\kappa$ B protein I $\kappa$ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650-3657 (2005).
  18. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T.,

- Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M.: Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23, 252-263 (2005).
19. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang, X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira, S.: STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 225-230 (2005).
20. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 352-361 (2005).
21. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
22. Yokozeki, H., Wu, M. H., Sumi, K., Awad, S., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., Kaneda, Y., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of transcription 6 (STAT6)-binding site ameliorates IgE-mediated late-phase reaction in an atopic dermatitis mouse model. *Gene Ther.* 11, 1753-1762 (2004).
23. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem. AIAA.* 4, 3-11 (2005).
24. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
25. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
26. Hokuto, I., Ikegami, M., Yoshida, M., Takeda, K., Akira, S., Perl, A. T., Hull, W. M., and Whitsett, J. A.: Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 113, 28-37 (2004).
27. Into, T., Kiura, K., Yasuda, M., Kataoka, H., Inoue, N., Hasebe, A., Takeda, K., Akira, S., and Shibata, K.: Stimulation of human Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR6 with membrane lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* induces apoptotic cell death after NF- $\kappa$ B activation. *Cell. Microbiol.* 6, 187-199 (2004).
28. Akazawa, T., Masuda, H., Saeki, Y., Matsumoto, M., Takeda, K., Tsujimura, K., Kuzushima, K., Takahashi, T., Azuma, I., Akira, S., Toyoshima, K., and Seya, T.: Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Res.* 64, 757-764 (2004).
29. Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., and Raz, E.: Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528 (2004).
30. Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Hiramatsu, R., Leroith, D., Takeda, K., Akira, S., and Kasuga, M.: Role of Stat3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* 10, 168-174 (2004).
31. Liu, B., Mori, I., Hossain, M. J., Dong, L., Takeda, K., and Kimura, Y.: Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Gen. Virol.* 85, 423-428 (2004).
32. Robben, P. M., Mordue, D. G., Truscott,

- S. M., Takeda, K., Akira, S., and Sibley, L. D. : Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J. Immunol.* 172, 3686-3694 (2004).
33. Yukawa, K., Hoshino, K., Kishino, M., Mune, M., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Tanaka, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira S. : Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates renal tubular cell apoptosis in chronic obstructive uropathy. *Int. J. Mol. Med.* 13, 515-520 (2004).
34. Weiss, D. S., Raupach, B., Takeda, K., Akira, S., and Zychlinsky, A. : Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* 172, 4463-4469 (2004).
35. Li, Y., Ishii, K., Hisaeda, H., Hamano, S., Zhang, M., Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Hemmi, H., Takeda, K., Akira, S., Iwakura, Y., and Himeno, K. : IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in Leishmania major-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther.* 11, 941-948 (2004).
36. Ikushima, H., Nishida, T., Takeda, K., Ito, T., Yasuda, T., Yano, M., Akira, S., and Matsuda, H. : Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is down-regulated after operation. *Surgery* 135, 376-385 (2004).
37. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Miyagi, K., Kinjo, T., Yara, S., Koguchi, Y., Miyazato, A., Shibuya, K., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A. : Interferon- $\gamma$  production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes. Infect.* 6, 339-349 (2004).
38. Gorogawa, S., Fujitani, Y., Kaneto, H., Hazama, Y., Watada, H., Miyamoto, Y., Takeda, K., Akira, S., Magnuson, M. A., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y., and Hori, M. : Insulin secretory defects and impaired islet architecture in pancreatic beta-cell-specific STAT3 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 1159-1170 (2004).
39. Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., and Akira, S. : The roles of two I $\kappa$ B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199, 1641-1650 (2004).
40. Kishino, M., Yukawa, K., Hoshino, K., Kimura, A., Shirasawa, N., Otani, H., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Maeda, M., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Mune, M. : Deletion of the kinase domain in death-associated protein kinase attenuates tubular cell apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 1826-1834 (2004).
41. Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Yamamoto, S., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saito, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Muta, T., Takeda, K., and Akira, S. : Regulation of Toll/IL-1 receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein I $\kappa$ B $\zeta$ . *Nature* 430, 218-222 (2004).
42. Okamoto, M., Furuichi, S., Nishioka, Y., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S. U., Takeda, K., Akira, S., Ryoma, Y., Moriya, Y., Saito, M., Sone, S., and Sato, M. : Expression of Toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a Streptococcal preparation. *Cancer Res.* 64, 5461-5470 (2004).
43. Yang, R., Murillo, F. M., Lin, K.-Y., Yutzy IV, W. H., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., and Roden, R. B. S. : Human papillomavirus type-16 virus-like particles activate complementary defense responses in key



- dendritic cell subpopulations. *J. Immunol.* 173, 2624-2631 (2004).
44. Sato, N., Takahashi, N., Suda, K., Nakamura, M., Yamaki, M., Ninomiya, T., Kobayashi, Y., Takada, H., Shibata, K., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., Noguchi, T., and Udagawa, N.: MyD88 but not TRIF is essential for osteoclastogenesis induced by lipopolysaccharide, diacyl lipopeptide, and IL-1 $\alpha$ . *J. Exp. Med.* 200, 601-611 (2004).
  45. Nakasone, C., Kawakami, K., Hoshino, T., Kawase, Y., Yokota, K., Yoshino, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Limited role for interleukin-18 in the host protection response against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Infect. Immun.* 72, 6176-6180 (2004).
  46. Yang, R., Murillo, F. M., Cui, H., Blosser, R., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., and Roden, R. B.: Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J. Virol.* 78, 11152-11160 (2004).
  47. Vossenkämper, A., Went, T., Alvarado-Esquivel, C., Takeda, K., Akira, S., Pfeffer, K., Alber, G., Lochner, M., Förster, I. and Liesenfeld, O: Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii* but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur. J. Immunol.* 34, 3197-3207 (2004).
  48. Sumi, K., Yokozeki, H., Wu, M. H., Satoh, T., Kaneda, Y., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K.: In vivo transfection of a cis element 'decoy' against signal transducers and activators of the transcription 6 (STAT6) binding site ameliorates the response of contact hypersensitivity. *Gene Ther.* 11, 1763-1771 (2004).
  49. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
  50. Yamamoto, M., Takeda, K., and Akira, S.: TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* 40, 861-868 (2004).
  51. Takeda, K., and Akira, S.: TLR signaling pathway. *Semin Immunol.* 16, 3-9 (2004).
  52. Takeda, K., and Akira, S.: Microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34, 73-82 (2004).
  53. Akira, S., and Takeda, K.: Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511 (2004).
  54. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors: ligands and signaling. *Innate Immune Response to Infection* 257-270 (2004).
  55. Takeda, K., and Akira, S.: Biological roles of the STAT family in cytokine signaling. *Handbook of Experimental Pharmacology* 166, 97-121 (2004).
  56. Akira, S., and Takeda, K.: Functions of Toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* 327, 581-589 (2004).
2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, 2005.5-20-25, San Diego, USA
  2. Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40<sup>th</sup> Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2005.7.28-30, Seattle,

- USA
3. Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear I $\kappa$ B proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005. 9. 28-10. 2, Heidelberg, Germany
  4. Kiyoshi Takeda, Toll-like receptors for mucosal immunity (Invited) 2004 KOSEF-JSPS Asian Science Seminar, Development of Mucosal Vaccines, 2004. 10. 24-27, Seoul, Korea
  5. Kiyoshi Takeda, Role of TIR domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling pathways. International Workshop on The Immune System; Development, Activation, and Manipulation, 2004. 2. 16-17, Tokyo
  6. Kiyoshi Takeda, Regulation of chronic intestinal inflammation by innate immune cells. (invited) 13<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 2004. 7. 2, Osaka
  7. Kiyoshi Takeda, Innate immune recognition by Toll-like receptors (Organizer) Surface Barrier Immunology Study Group (SBARIS) 1<sup>st</sup> Meeting 「Innate Immunity at Mucosal Surface」 2004. 7. 9-10, Tokyo
  8. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses by Toll-like receptors (Invited) The 3<sup>rd</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2004. 8. 29-9. 2, Hyogo, Japan
  9. Kiyoshi Takeda, Evolution and integration of innate immune recognition systems: The Toll-like receptors (Symposium; Invited) The 8<sup>th</sup> conference of the International Endotoxin Society, 2004. 11. 15-18, Kyoto, Japan
  10. Kiyoshi Takeda, Involvement of Toll-like receptor-mediated activation of innate immunity in mycobacterial infection. 40<sup>th</sup> anniversary of Japan-US, Program for Tuberculosis and Leprosy panel, 2004. 12. 9, Kyoto, Japan
  11. 竹田潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第78回日本細菌学会総会、2005. 4. 4-6、東京
  12. 竹田潔, Toll-like receptor と結核感染 (シンポジウム) 第80回日本結核病学会、2005. 5. 12-13、埼玉
  13. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構 (ワークショップ、招待講演) 第5回日本蛋白質科学会年会、2005. 7. 1、福岡
  14. 竹田潔, Toll-like receptor を介した自然免疫系の制御 (特別講演) 第45回日本リンパ網内系学会総会、2005. 7. 14-15、福岡
  15. 竹田潔, 自然免疫系と炎症性腸疾患 (シンポジウム、招待講演) 第42回日本消化器免疫学会総会、2005. 8. 4-5、東京
  16. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium) 第35回日本免疫学会学術集会、2005. 12. 13-15、横浜
  17. 桑田啓貴、竹田潔, Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear I $\kappa$ B protein I $\kappa$ BNS. 第35回日本免疫学会学術集会、2005. 12. 13-15、横浜
  18. 古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、久枝一、審良静男、姫野國介、竹田潔, Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005. 12. 13-15、横浜
  19. 松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、吉開泰信、竹田潔, The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005. 12. 13-15、横浜
  20. 竹田潔, Toll-like receptor による自然免疫応答の制御, 第2回九州大学生体防御医学研究所・東京大学医科学研究所, 「感染・免疫・ゲノム」合同シンポジウム, 2004. 7. 6、東京
  21. 山本雅裕、竹田潔、審良静男, Toll-like receptor を介した細胞内シグナル伝達機構と遺伝子発現制御, 第25回日本炎症・再生医学会, 2004. 7. 13、東京
  22. 竹田潔, Toll-like receptor による自然免

疫系の活性化機構(シンポジウム、招待講演)  
第 17 回日本バイオセラピー学会学術集会総  
会、2004. 11. 25、北九州

23. 竹田潔, 遺伝子改変による免疫系シグナル  
伝達機構の解析(免疫学会受賞講演) 第 34  
回日本免疫学会学術集会、2004. 12. 1-3、札  
幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

MIF (macrophage migration inhibitory factor)の制御による炎症性腸疾患の新しい治療法の開発

分担研究者 浅香正博 北海道大学大学院消化器内科学分野 教授

研究要旨

炎症性腸疾患における macrophage migration inhibitory factor (MIF)の役割を明らかにし、その制御により新しい治療法を開発することを目的として以下の研究をおこなった。1) MIF-Tg マウス、MIF-KO マウスに DSS 腸炎を作成した。MIF-Tg マウスでは腸炎の増悪が認められ、MIF-KO マウスでは腸炎は全く認められなかった。MIF-KO マウスの大腸組織では HSP70 の著明な増加が認められた。2) HSP70 の誘導剤である geranylgeranyl acetone (GGA) が実験腸炎に対して抑制効果を示した。3) MIF に対する DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) が DSS 腸炎に対して抑制効果を示した。以上より MIF が炎症性腸疾患の病態に深く関与すること、MIF の制御が炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまで我々は、macrophage migration inhibitory factor (MIF) に対する中和抗体の投与が、炎症性腸疾患の動物モデルである DSS 腸炎に対し予防および治療効果を示すことを報告してきた (Gastroenterology 123: 256-270, 2002)。MIF の制御をヒトの炎症性腸疾患へ応用する方法としては、抗 MIF ヒト化抗体やキメラ抗体の開発があげられるが、別な戦略として抗 MIF 抗体の作用機序や炎症性腸疾患における MIF の役割を詳細に検討する事で、新しい治療の標的を見いだすことも有用な方法と考えられる。そこで本研究では炎症性腸疾患における MIF の役割を明らかにするために、MIF-Tg マウス、MIF-KO マウスを用いた検討を行った。またその過程で MIF による炎症の制御に、heat shock protein 70 (HSP70) の関与が示唆されたため、HSP70 の誘導剤である geranylgeranyl acetone (GGA) の効果を検討した。さらに、最近われわれが開発した、免疫活性化ペプチド (Th エピトープ) を MIF 蛋白に融合し、効率よく高親和性抗体を誘導することができる高機能 DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) をマウスに接種、実験腸炎に対する効果を検討した。

B. 研究方法

DSS 腸炎および TNBS 腸炎は、それぞれ Balb/c マウスに対し、3% DSS 水溶液を 7 日間自由飲水にて投与、TNBS 3mg/body を注腸投与することにより作成した。GGA は腸炎誘発直前およびその後隔日に経口投与した。MIFTh エピトープ DNA ワクチンは、Th エピトープ遺伝子を MIF 遺伝子に挿入したプラスミド DNA を 4-5 週齢の BALB/c マウスの皮下または筋肉内にエレクトロポレーション法をもちいて接種した。各群の生存率、臨床症状スコア (下痢、血便、体重減少)、組織学的炎症スコア、大腸組織 myeloperoxidase (MPO)、TNF- $\alpha$ 、

IFN- $\gamma$  を検討した。また、大腸組織 HSP70 の発現は、ウェスタンブロットおよび免疫組織学的により検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱い、北海道大学医学部“動物実験に関する指針”に基づいた。

C. 研究結果

MIF-Tg マウスでは臨床症状、病理所見ともに腸炎の増悪が認められた。一方、MIF-KO マウスにおいては炎症所見は全く認められなかったが、リコンビナント MIF 蛋白の単回投与にて腸炎が発症した。表面プラズモン共鳴を用いた *in vitro* の検討にて、MIF が HSP70 と結合することを見いだしたため、DSS 腸炎における HSP70 の発現を検討したところ、MIF-KO マウスにおいて腸管上皮細胞内 HSP70 蛋白の著明な増加が認められた。GGA 投与により腸上皮での HSP70 蛋白の発現が増強し、DSS 腸炎および TNBS 腸炎の臨床症状および組織学的スコア、大腸組織 MPO、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  レベルが低下した。MIFTh エピトープ DNA ワクチン投与をおこなったマウスでは、野生型に比べ DSS 腸炎が有意に抑制された。

D. 考察

MIF-/-マウスにおいて DSS 腸炎が誘発されない理由として、腸管粘膜における HSP70 の著明な増加が関与している可能性が考えられた。また、MIF は HSP70 の制御および HSP70 との相互作用により炎症過程を修飾している可能性が示唆される。GGA は生体内で HSP70 を誘導し、様々な傷害から細胞を保護することが報告され、心臓、脳、腎臓などの虚血もしくは虚血・再灌流モデルにおいて予防効果を示すことが明らかにされている。本研究においても、GGA の経口投与は大腸組織に HSP70 を誘導するとともに、DSS 腸炎および TNBS 腸炎を有意に抑制した。MIF-/-マウスの検討から、腸

管粘膜における HSP70 の増加が DSS 腸炎に対し抑制的に働く可能性が示唆されており、GGA は HSP70 の誘導を介して腸炎を抑制した可能性が高い。さらに、本研究結果は GGA の経口投与がヒトの炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる可能性を示すものである。近年、サイトカインなどに対する抗体を、クローン病をはじめとする炎症性腸疾患患者に投与する受動的抗体療法が行われ、顕著な効果が認められている。しかし投与された抗体が速やかに消失し持続性に欠けること、投与抗体に対する新たな抗体の産生が惹起されること、コストが高いなど課題も多い。本研究で用いた DNA ワクチンは、MIF 蛋白と免疫活性化ペプチドの融合蛋白を作りだすように設計されたプラスミド DNA であり、これをマウスに投与すると、Th エピトープを有する変異 MIF が体内で産生され、この変異蛋白に対する抗体が効率よく産生される。MIF<sup>Th</sup> エピトープ DNA ワクチンによる能動的抗 MIF 抗体療法は、従来の受動的抗体療法に比較し、簡便性、コスト面など優位な点が多く、今後の臨床応用が期待される。

#### E. 結論

MIF<sup>-/-</sup>マウスにおいて DSS 腸炎が誘発されないことから、DSS 腸炎の発症において MIF の存在が必須であることが明らかとなった。また MIF は HSP70 の制御および HSP70 との相互作用により、炎症過程を修飾している可能性が示唆された。GGA の経口投与は HSP70 の誘導を介してマウスの実験腸炎を抑制したことから、GGA が炎症性腸疾患の新しい治療薬として期待できる可能性が示唆された。さらに、MIF<sup>Th</sup> エピトープ DNA ワクチンによる能動的抗体療法が炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nagasako T, Sugiyama T, Mizushima T, Miura Y, Kato M, Asaka M: Upregulated Smad5 mediates apoptosis of gastric epithelial cells induced by Helicobacter pylori infection. *J Biol Chem* 278:4821-4825, 2003
- 2) Umehara S, Higashi H, Ohnishi N, Asaka M, Hatakeyama M: Effects of Helicobacter pylori CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* 22: 8337-8342, 2003
- 3) Izumiya K, Nakagawa M, Yonezumi M, Kasugai Y, Suzuki R, Suzuki H, Tsuzuki S, Hosokawa Y, Asaka M,

Seto M: Stability and subcellular localization of API2-MALT1 chimeric protein involved in t(11;18) (q21;q21) MALT lymphoma. *Oncogene* 22:8085-8092, 2003

- 4) Saito N, Konishi K, Takeda H, Kato M, Sugiyama T, Asaka M: Antigen Retrieval Trial for Post-embedding Immunoelectron Microscopy by Heating with Several Unmasking Solutions. *J Histochem Cytochem* 51:989-994, 2003
- 5) Sato F, Saito N, Konishi K, Shoji E, Kato M, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M: Ultrastructural observation of Helicobacter pylori in glucose-supplemented culture media. *J Med Microbiol* 52:675-679, 2003
- 6) Saito N, Konishi K, Sato F, Kato M, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M: Plural Transformation-Processes from Spiral to Coccoid Helicobacter pylori and its Viability. *J Infect* 46:49-55, 2003
- 7) Torii N, Nozaki T, Masutani M, Nakagawa H, Sugiyama T, Saito D, Asaka M, Sugimura T, Miki K. Spontaneous mutations in the Helicobacter pylori rpsL gene *Mutat Res* 535:141-145, 2003
- 8) Nakagawa S, Kato M, Shimizu Y, Nakagawa M, Yamamoto J, Luis PA, Kodaira J, Kawarasaki M, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M: Relationship between histopathologic gastritis and mucosal microvascularity: Observations with magnifying endoscopy. *Gastrointest Endosc* 58:71-75, 2003
- 9) Asaka M, Kato M, Sugiyama T, Satoh K, Kuwayama H, Fukuda Y, Fujioka T, Takemoto T, Kimura K, Shimoyama T, Shimizu K, Kobayashi S: Follow-up survey of a large-scale multicenter, double-blind study of triple therapy with lansoprazole, amoxicillin, and clarithromycin for eradication of Helicobacter pylori in Japanese peptic ulcer patients. *J Gastroenterol* 38:339-347, 2003
- 10) Fujioka T, Arakawa T, Shimoyama T, Yoshikawa T, Itoh M, Asaka M, Ishii H, Kuwayama H, Sato R, Kawai S, Takemoto T, Kobayashi K: Effects of rebamipide, a gastro-protective drug on the Helicobacter pylori status and inflammation in the gastric mucosa of patients with gastric ulcer: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther* 18 Suppl 1:146-152, 2003
- 11) Sugiyama T, Asaka M: Eradication of Helicobacter pylori infection in patients with intractable gastric ulcer. *Aliment Pharmacol Ther* 18:

- 544-545, 2003
- 12) Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, Hirohashi S: Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 37:198-207, 2003
- 13) Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, Hirohashi S.: Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology*. 37: 528-533, 2003
- 14) Ishikawa T, Chen J, Wang J, Okada F, Sugiyama T, Kobayashi T, Shindo M, Higashino F, Katoh H, Asaka M, Kondo T, Hosokawa M, Kobayashi M.: Adrenomedullin antagonist suppresses in vivo growth of human pancreatic cancer cells in SCID mice by suppressing angiogenesis. *Oncogene*. 22: 1238-1242, 2003
- 15) Hatanaka K, Ohnami S, Yoshida K, Miura Y, Aoyagi K, Sasaki H, Asaka M, Terada M, Yoshida T, Aoki K.: A simple and efficient method for constructing an adenoviral cDNA expression library. *Mol Ther*. 8:158-166, 2003
- 16) Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, Aoki K, Suzuki K, Kanai Y, Haga K, Asaka M, Ramirez F, Yoshida T.: Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Kruppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 308:251-256, 2003
- 17) 浅香正博: ヘリコバクター・ピロリ感染の診断と治療のガイドライン(日本ヘリコバクター学会) 日本臨床増刊. 新世紀の感染症学 703-708, 2003年2月.
- 18) 浅香正博: 消化器疾患. H. pylori 感染の診断と治療のガイドライン. からだの科学増刊 EBM 診療ガイドライン解説集 192-197, 2003年7月.
- 19) 浅香正博: 胃・十二指腸潰瘍. 下条文武, 斉藤 康編 ダイナミックメディスン. 14-57-61, 西村書店 2003年7月.
- 20) 大川原辰也, 加藤元嗣, 浅香正博: 欧米における Colitic Cancer 診療の現状. *Modern Physician* 23:103-105, 2003.
- 21) 浅香正博編: ヘリコバクター・ピロリ診断除菌実践マニュアル. 文光堂、2003年
- 22) 浅香正博: H. pylori 感染症の本邦疫学統計. 日本臨床 61:19-24, 2003
- 23) 浅香正博: Helicobacter pylori 研究の新しい展開. *BIO Clinica* 18:296-297, 2003
- 24) Yamamoto F, Nakada K, Zhao S, Satoh M, Asaka M, Tamaki N.: Gastrointestinal uptake of FDG after N-butylscopolamine or omeprazole treatment in the rat. *Ann Nucl Med*. 2004 Oct;18(7):637-40.
- 25) Inagaki H, Nakamura T, Li C, Sugiyama T, Asaka M, Kodaira J, Iwano M, Chiba T, Okazaki K, Kato A, Ueda R, Eimoto T, Okamoto S, Sasaki N, Uemura N, Akamatsu T, Miyabayashi H, Kawamura Y, Goto H, Niwa Y, Yokoi T, Seto M, Nakamura S.: Gastric MALT Lymphomas Are Divided Into Three Groups Based on Responsiveness to Helicobacter Pylori Eradication and Detection of API2-MALT1 Fusion. *Am J Surg Pathol* 28 : 1560-1567, 2004
- 26) Chiba K, Zhao W, Chen J, Wang J, Cui HY, Kawakami H, Miseki T, Satoshi H, Tanaka J, Asaka M, Kobayashi M.: Neutrophils secrete MIP-1beta after adhesion to laminin contained in basement membrane of blood vessels. *Br J Haematol*. 127 : 592-597, 2004
- 27) Tanaka J, Toubai T, Miura Y, Tsutsumi Y, Kato N, Umehara S, Toyoshima N, Ohta S, Asaka M, Imamura M.: Differential expression of natural killer cell receptors (CD94/NKG2A) on T cells by the stimulation of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells with anti-CD3 monoclonal antibody and cytokines: A study in stem cell donors. *Transplant Proc*. 36 : 2511-2512, 2004
- 28) Yamamoto F, Tsukamoto E, Nakada K, Takei T, Zhao S, Asaka M, Tamaki N.: 18F-FDG PET is superior to 67Ga SPECT in the staging of non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Nucl Med*. 18 : 519-526, 2004.
- 29) Shimizu Y, Kato M, Yamamoto J, Nakagawa S, Komatsu Y, Tsukagoshi H, Fujita M, Hosokawa M, Asaka M.: Endoscopic clip application for closure of esophageal perforations caused by EMR. *Gastrointest Endosc* 60 : 636-639, 2004
- 30) Sugiyama T, Asaka M.: Helicobacter pylori infection and gastric cancer. *Med Electron Microsc* 37 :149-157, 2004
- 31) Asaka M, Dragosics BA.: Helicobacter pylori and gastric malignancies. *Helicobacter* 9 :35S-41S, 2004
- 32) Kato M, Asaka M, Shimizu Y, Nobuta A, Takeda H, Sugiyama T; Multi-Centre Study Group.: Relationship between Helicobacter pylori infection and the prevalence, site and histological type of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 20 :85S-89S, 2004
- 33) Nobuta A, Asaka M, Sugiyama T, Kato M, Hige S,

- Takeda H, Kato T, Ogoshi K, Keida Y, Shinomura J. : Helicobacter pylori infection in two areas in Japan with different risks for gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 20 :1S-6S, 2004
- 34) Kato M, Saito M, Fukuda S, Kato C, Ohara S, Hamada S, Nagashima R, Obara K, Suzuki M, Honda H, Asaka M, Toyota T. : 13C-Urea breath test, using a new compact nondispersive isotope-selective infrared spectrophotometer: comparison with mass spectrometry. J Gastroenterol 39 : 629-634, 2004
- 35) Kondo T, Kobayashi M, Tanaka J, Yokoyama A, Suzuki S, Kato N, Onozawa M, Chiba K, Hashino S, Imamura M, Minami Y, Minamino N, Asaka M. : Rapid degradation of Cdt1 upon UV-induced DNA damage is mediated by SCFSkp2 complex. J Biol Chem 279 : 27315-27319, 2004
- 36) Tanaka J, Toubai T, Tsutsumi Y, Miura Y, Kato N, Umehara S, Kahata K, Mori A, Toyoshima N, Ota S, Kobayashi T, Kobayashi M, Kasai M, Asaka M, Imamura M. : Cytolytic activity and regulatory functions of inhibitory NK cell receptor-expressing T cells expanded from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. Blood 104 :768-774, 2004
- 37) Shimizu Y, Kato M, Yamamoto J, Nakagawa S, Tsukagoshi H, Fujita M, Hosokawa M, Asaka M. : EMR combined with chemoradiotherapy: a novel treatment for superficial esophageal squamous-cell carcinoma. Gastrointest Endosc 59 :199-204, 2004
- 38) Nakaya H, Ishizu A, Ikeda H, Tahara M, Shindo J, Itoh R, Takahashi T, Asaka M, Ishikura H, Yoshiki T. : In vitro model of suicide gene therapy for alpha-fetoprotein-producing gastric cancer. Anticancer Res. 23 :3795-800, 2004.
- 39) 浅香正博: 胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍. 山口 徹、北原光夫編 今日の治療指針2004 医学書院、2004年
- 40) 浅香正博、加藤元嗣: Helicobacter pylori による胃・十二指腸病変. 林 紀夫、日比紀文、坪内博仁編標準消化器病学 医学書院、2004年
- 41) 加藤元嗣, 中川宗一, 清水勇一, 森康明, 小野尚子, 小野雄司, 中川学, 山本純司, 浅香正博: ヘリコバクター学会改訂ガイドラインはどこが変わったのか. 臨床消化器内科 20 : 55-64, 2004
- 42) 浅香正博: H. pylori 除菌により萎縮性胃炎は改善するのか 両論文に対するコメント. Frontiers in Gastroenterology 9: 312, 2004
- 43) 加藤元嗣, 清水勇一, 武田宏司, 浅香正博: 胃がんの化学予防. 最新医学 59 : 2415-2423, 2004
- 44) 加藤元嗣, 浅香正博: 治療をめぐる最近の進歩 消化性潰瘍の治療薬と臨床エビデンス. 医学のあゆみ 210 : 449-454, 2004
- 45) 加藤元嗣, 清水勇一, 小松嘉人, 武田宏司, 杉山敏郎, 浅香正博: 胃潰瘍の大規模臨床試験とエビデンス. 最新医学 59 : 1481-1491, 2004
- 46) 浅香正博: H. pylori 感染の診断と治療のガイドライン-2003年改訂版. Medical Technology32 : 782-785, 2004
- 47) 加藤元嗣, 中川宗一, 清水勇一, 小路えり子, 津田弓子, 杉山敏郎, 浅香正博: H. pylori 感染診断法 尿素呼吸試験. Medical Technology32 : 813-817, 2004
- 48) 武田宏司, 浅香正博: GERD と Helicobacter pylori 感染. JOHNS 20 : 943-946, 2004
- 49) 小平純一, 小野尚子, 森康明, 山本純司, 中川学, 河原崎暢, 武田宏司, 杉山敏郎, 浅香正博, 中川宗一, 清水勇一, 加藤元嗣: 低用量アスピリンによる胃粘膜障害 H. pylori 陰性健常者による前向き比較試験. 消化器科 38 : 466-470, 2004
- 50) 山本純司, 清水勇一, 加藤元嗣, 小野尚子, 森康明, 布施望, 結城敏志, 武居正明, 中川学, 小平純一, 中川宗一, 河原崎暢, 小松嘉人, 武田宏司, 杉山敏郎, 浅香正博: 内視鏡陰性逆流性食道炎に対する拡大内視鏡観察の有用性. 消化器科 38 : 172-176, 2004
- 51) 杉山敏郎, 浅香正博: 治療学の進歩 現状・評価と課題 H. pylori 感染潰瘍 一次除菌療法(LAC療法). 日本臨床 62 : 483-488, 2004
- 52) 加藤元嗣, 中川宗一, 清水勇一, 結城敏志, 布施望, 武居正明, 古川滋, Perez-Aldana LA, 鄭日男, 小松嘉人, 斎藤永仁, 武田宏司, 杉山敏郎, 浅香正博: 診断学の進歩 H. pylori 感染診断・評価 ガイドライン後の新しい検査法 免疫学的迅速ウレアーゼ試験法. 日本臨床 62 : 470-476, 2004
- 53) 小平純一, 結城敏志, 布施望, 武居正明, 小野尚子, 森康明, 山本純司, 中川学, 古川滋, 河原崎暢, 小松嘉人, 武田宏司, 杉山敏郎, 浅香正博, 中川宗一, 清水勇一, 加藤元嗣: H. pylori 陰性胃 MALT リンパ腫の治療方針. 消化器科 38 : 6-12, 2004
- 54) Ohkawara T, Takeda H, Kato K, Miyashita K, Kato M, Iwanaga T, Asaka M. : Polaprezinc (N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc) ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Scand J Gastroenterol 40: 1321-1327, 2005
- 55) Ohkawara T, Takeda H, Miyashita K, Nishiwaki M,

- Nakayama T, Taniguchi M, Yoshiki T, Takana J, Imamura M, Sugiyama T, Asaka M, Nishihira J : Regulation of Toll-like receptor 4 expression in mouse colon by macrophage migration inhibitory factor. *Histochem Cell Biol* 7: 1-8, 2005
- 56) Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Miyashita K, Kato K, Kato M, Sugiyama T, Asaka M : Geranylgeranylacetone protects mice from dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* 40: 1049-1057, 2005
- 57) Ohkawara T, Takeda H, Nishihira J, Miyashita K, Nishiwaki M, Ishiguro Y, Takeda K, Akira S, Iwanaga T, Sugiyama T, Asaka M : Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin Exp Immunol* 141: 412-421, 2005
- 58) Tanaka J, Toubai T, Iwao N, Tsutsumi Y, Kato N, Miura Y, Shigematsu A, Hirate D, Ota S, Asaka M, Imamura M : The immunosuppressive agent FK506 enhances the cytolytic activity of inhibitory natural killer cell receptor (CD94/NKG2A)-expressing CD8 T cells. *Transplantation* 80: 1813-1815, 2005
- 59) Zhao W, Darmanin S, Fu Q, Chen J, Cui H, Wang J, Okada F, Hamada J, Hattori Y, Kondo T, Hamuro J, Asaka M, Kobayashi M : Hypoxia suppresses the production of matrix metalloproteinases and the migration of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 35: 3468-3477, 2005
- 60) Ohkawara T, Miyashita K, Nishihira J, Mitsuyama K, Takeda H, Kato M, Kondo N, Yamasaki Y, Sata M, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M : Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 140 : 241-248, 2005
- 61) Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Asaka M, Sugiyama T : Pathophysiological roles of macrophage migration inhibitory factor in gastrointestinal, hepatic, and pancreatic disorders. *J Gastroenterol* 40 : 117-122, 2005
- 62) Tanaka J, Asaka M, Imamura M : Potential role of natural killer cell receptor-expressing cells in immunotherapy for leukemia. *Int J Hematol* 81: 6-12, 2005
- 63) Toubai T, Tanaka J, Ota S, Fukuhara T, Hashino S, Kondo T, Kasai M, Kakinoki Y, Masauzi N, Morioka M, Kawamura T, Iwasaki H, Asaka M, Imamura M : Minimal residual disease (MRD) monitoring using rearrangement of T-cell receptor and immunoglobulin H gene in the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia patients. *Am J Hematol* 80: 181-187, 2005
- 64) Kuwatani M, Ikarashi Y, Mineishi S, Asaka M, Wakasugi H : An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model: importance of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning. *Transplantation* 80: 1145-1152, 2005
- 65) Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Katsurada T, Kato K, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M : Protective effect of geranylgeranylacetone on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Int J Mol Med* 17: 229-234, 2006
- 66) Ohkawara T, Takeda H, Nishiwaki M, Nishihira J, Asaka M : Protective effects of heat shock protein 70 induced by geranylgeranylacetone on oxidative injury in rat intestinal epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 41: 312-317, 2006
2. 学会発表
- 1) Asaka M: Prevention of gastric cancer by eradication of H. pylori. 11th United European Gastroenterology Week, Madrid, Spain, 2003. 11.3
- 2) Asaka M: H. pylori infection and stomach cancer. Asia Pacific Digestive Week 2003, Singapore 2003. 9.29
- 3) Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M: Macrophage Migration Inhibitory Factor-Deficient Mice Are Resistant to Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. DDW2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5.20
- 4) Kawarasaki M, Kato M, Asaka M: Study on Magnification Endoscopy with Acetic Acid Spraying. DDW2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5.20
- 5) Nakagawa S, Kato M, Nakagawa M, Yamamoto J, Kawarasaki M, Perez Aldana L, Shimizu Y, Asaka M: Diagnosis of H. Pylori Infection After Eradication by Using Magnifying Endoscopy. DDW2003, Orlando, Florida, USA, 2003. 5.20
- 6) Kato M, Ohara S, Asaka M, Takane T: 13C-Urea Breath Test Using a New Compact Nondispersive Isotope-Selective Infrared Spectrophotometer: Comparison with Mass Spectrometry. DDW2003,



- Orlando, Florida, USA, 2003. 5. 18
- 7) Asaka M, Watanabe S: Etiology of gastric cancer. The 2nd Conference of Korea-Japan Joint Meeting on Helicobacter Infection, Shimoda, 2003. 4. 11
- 8) 浅香正博: 胃癌は予防できるのか? 第41回日本癌治療学会総会. 札幌, 2003. 10. 24
- 9) 加藤元嗣, 浅香正博: 早期胃癌内視鏡治療後の二次癌に対する H. pylori 除菌治療の意義. 第41回日本癌治療学会総会. 札幌, 2003. 10. 22
- 10) 浅香正博, 菅野健太郎: H. pylori 除菌により胃癌の予防は可能か?, 第41回日本癌治療学会総会. 札幌, 2003. 10. 22
- 11) 河原崎暢, 加藤元嗣, 浅香正博: 回腸末端の拡大観察として骨髄移植後のGVHD腸炎とサイトメガロウイルス感染の鑑別. 第66回日本消化器内視鏡学会総会, 大阪, 2003. 10. 18
- 12) 浅香正博, 藤岡利生: H. pylori 除菌療法の総括と新しい展開. 第45回日本消化器病学会大会, 大阪, 2003. 10. 16
- 13) 大川原辰也, 宮下憲暢, 加藤寛土, 古川滋, 武田宏司, 加藤元嗣, 杉山敏郎, 浅香正博: DSS 腸炎マウスにおける Macrophage migration inhibitory factor (MIF) の役割 -MIF KO マウスによる検討- 第45回日本消化器病学会大会, 大阪, 2003. 10. 16
- 14) 浅香正博: ヘリコバクター・ピロリ除菌と胃癌予防. 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 2003. 9. 26
- 15) 東秀明, 堤良平, 横山和之, 中谷彰洋, 倉島庸, 藤井裕美子, 東健, 浅香正博, 畠山昌則: Helicobacter pylori CagA による細胞内シグナル伝達系の脱制御. 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 2003. 9. 25
- 16) 浅香正博: H. pylori 感染と胃癌および予防. 第9回日本ヘリコバクター学会, 松本, 2003. 6. 27
- 17) 浅香正博: H. pylori 除菌後の胃粘膜像の変化とその意義. 第65回日本消化器内視鏡学会総会, 福岡, 2003. 5. 29
- 18) 浅香正博: 除菌治療の evidence とガイドライン; パネルディスカッション”胃潰瘍の診療ガイドライン”. 第88回日本消化器病学会総会, さいたま, 2003. 4. 24
- 19) 浅香正博, 菅野健太郎: 胃潰瘍の診療ガイドライン. 第88回日本消化器病学会総会, さいたま, 2003. 4. 24
- 20) 浅香正博: 胃炎, 胃癌との関わり”シンポジウム”ヘリコバクター感染症の新しい展開” 第26回日本医学会総会, 福岡, 2003. 4. 4
- 21) 浅香正博, 藤岡利生: ヘリコバクター感染症の新しい展開. 第26回日本医学会総会, 福岡, 2003. 4. 4
- 22) 山本純司, 清水勇一, 浅香正博: 症候性GERDの病態と治療戦略. 拡大内視鏡による内視鏡陰性GERD診断と治療効果の評価. 第68回日本消化器内視鏡学会総会, 福岡, 2004. 10. 21
- 23) 加藤元嗣, 杉山敏郎, 浅香正博: H. pylori 除菌後長期の諸問題. 除菌後5年以上の経過観察症例における逆流性食道炎の推移. 第68回日本消化器内視鏡学会総会, 福岡, 2004. 10. 22
- 24) 中川宗一, 加藤元嗣, 浅香正博: EMRにおける切開非剥離法 vs 切開剥離法. 第67回日本消化器内視鏡学会総会, 京都, 2004. 5. 27
- 25) 河原崎暢, 浅香正博, 加藤元嗣: 鑑別困難な炎症性腸病変に対する内視鏡的アプローチ. 骨髄移植後のGVHD腸炎とサイトメガロウイルス感染の鑑別. 第67回日本消化器内視鏡学会総会, 京都, 2004. 5. 26
- 26) 浅香正博: 除菌による胃癌予防は可能か? 第43回日本消化器集団検診学会, 札幌, 2004. 5. 20
- 27) 寺野 彰, 浅香正博: H. pylori 除菌後の長期経過. 第90回日本消化器病学会総会, 仙台, 2004. 4. 21
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
    - 炎症性腸疾患の予防・治療剤
    - 国内出願番号: 2003-192514 (2003/7/7)
    - 国際出願番号: PCT/JP2004/09657 (2004/7/7)
  2. 実用新案登録
    - なし
  3. その他
    - なし

炎症性腸疾患に対する血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法開発に関する研究

分担研究者 中村和彦 九州大学大学院医学研究院病態制御内科学助手

研究要旨

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

末梢血制御性 T 細胞の潰瘍性大腸炎患者における割合と機能を検討した。潰瘍性大腸炎患者末梢血白血球より磁気ビーズを用いて分離された制御性 T 細胞分画が、健常人から分離された制御性 T 細胞と同様に T 細胞増殖抑制機能を有し、制御性 T 細胞特異的転写因子 FOXP3 を強発現する事を示した。末梢血制御性 T 細胞の割合は活動期潰瘍性大腸炎患者では健常人、非活動期潰瘍性大腸炎患者と比べて有意に低下しており、疾患活動性と逆相関していた。以上より、潰瘍性大腸炎において制御性 T 細胞の免疫制御機能は保持されているが、末梢血制御性 T 細胞は活動期に減少しており、制御性 T 細胞を移入しその機能を強化する治療法の理論的根拠が示された。

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

(1) <潰瘍性大腸炎患者制御性 T 細胞分離と機能解析> 健常人および潰瘍性大腸炎患者の末梢血白血球より、磁気細胞分離システム (Magnetic Cell Sorting: MACS, Miltenyi Biotec 社) を用いてネガティブセレクションにより CD4<sup>+</sup> T 細胞を分離した。次に、CD45RA<sup>-</sup>分画が CD45RO<sup>+</sup>分画とほぼ同一であることを利用して、CD45RA に対するビーズを用いて CD45RA<sup>+</sup>細胞を除去し、更に CD25 に対するビーズを用いて CD25<sup>+</sup>細胞をポジティブセレクションし、CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を分離した。分離された細胞中の CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞の割合をフローサイトメトリーで、T 細胞増殖抑制能を <sup>3</sup>H-Thymidine 取り込みアッセイで、制御性 T 細胞特異的転写因子 FOXP3 の発現を RT-PCR 法で解析した。

(2) <炎症性腸疾患における末梢血制御性 T 細胞の割合の解析> 炎症性腸疾患患者(潰瘍性大腸炎、ク

ローン病)および健常人末梢血白血球を CD4、CD45RO、CD25 に対する蛍光標識抗体で染色し制御性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。

(3) <血球成分除去療法産物からの臨床使用グレードでの制御性 T 細胞分離実験> 潰瘍性大腸炎患者に対する遠心分離法(Hemonetics 社)による血球成分除去療法産物より、臨床使用を目的とした細胞分離システムおよび試薬(CliniMACS, Miltenyi Biotec 社)を用いて細胞を分離した。まず、CD8 に対する磁気ビーズ、CD19 に対する磁気ビーズを用いて CD8<sup>+</sup>細胞、B 細胞を除去した。次に CD25 に対する磁気ビーズを用いて CD25<sup>+</sup>細胞をポジティブセレクションした。ヒト制御性 T 細胞は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>分画中 CD25<sup>hi</sup>分画に存在するため、分離された細胞分画中の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。また、FOXP3 の細胞内染色を行い、FOXP3<sup>+</sup>細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

(倫理面への配慮)

患者検体の研究目的の使用にあたっては、研究内容を説明し文書での同意を得ている。尚、本研究内容は平成 15 年 3 月 3 日に九州大学医学部倫理委員会より、平成 17 年 3 月 31 日に九州大学医学研究院等倫理委員会より承認を得ている。

### C. 研究結果

(1) 磁気ビーズを用いて分離された細胞の 75~90%が CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞であった。健常人、潰瘍性大腸炎患者から分離された CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞分画は共に、通常の CD4<sup>+</sup> T 細胞と比較して抗 CD3 抗体刺激に対して低反応であり、また、CD4<sup>+</sup> T 細胞との共培養にてその細胞増殖を抑制した。また健常人、潰瘍性大腸炎患者より分離された CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞は FOXP3 mRNA を強発現していた。

(2) 末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞中 CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞の割合は活動期潰瘍性大腸炎患者(n=17)で 1.3 ± 0.2%と健常人対照(n=10) 2.9 ± 0.4%、非活動期潰瘍性大腸炎患者(n=10) 2.3 ± 0.3%に比べて有意に低下していた。対照的に、活動期クローン病患者(n=8)においては 4.4 ± 0.7%と、健常人対照、非活動期クローン病(n=19)3.1 ± 0.3%に比べて高い傾向にあった。また、制御性 T 細胞の割合は、活動期潰瘍性大腸炎患者(n=12)において治療前(1.0 ± 0.2%)に比較して治療後(2.3 ± 0.3%)に有意に増加し、また、Rachmilewitz の Clinical Activity Index と Endoscopic Index に対して中等度の負の相関を示した。

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

### D. 考察

制御性 T 細胞移入療法を臨床応用するにあたっては、細胞療法に使用可能なグレードでの細胞分離法が必要となる。ヒト CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>の全分画に存在するのではなく CD25<sup>hi</sup>分画にのみ存在するとされる。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>分画は FACS ソーティングを用いると分離可能であるが、これは臨床応用に適した分離法ではない。我々は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 細胞中制御性 T 細胞は CD45RO<sup>+</sup>分画に存在する事を示した。CD25 の輝度の高さによる制御性 T 細胞の同定は CD25<sup>hi</sup>と CD25<sup>low</sup>分画の境界が不明瞭である事が問題であるが、CD4、CD45RO、CD25 を用いた同定法は、制御性 T 細胞の識別が容易で、炎症性腸疾患患者での末梢血制御性 T 細胞の割合の解析に有用であった。また、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>分画より CD45RA<sup>+</sup>分画を除去する事により制御性 T 細胞がより濃縮されるため、磁気ビーズを用いた制御性 T 細胞分離に有用であった。

潰瘍性大腸炎患者において末梢血制御性 T 細胞の割合が活動期に低下し、疾患活動性と逆相関していた。また、*ex vivo*に取り出した潰瘍性大腸炎患者制御性 T 細胞は健常人のものと同様に免疫制御活性を示した。以上より生体において制御性 T 細胞が大腸炎の制御に重要であり、その不足が潰瘍性大腸炎の増悪に関与している事が示唆された。この免疫制御機能を有する制御性 T 細胞は血球成分除去療法時にエフェクター細胞と共に除去されていると考えられるので、血球成分除去療法産物より分離した自己の制御性 T 細胞を患者へ返す血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法は、理論的に潰瘍性大腸炎の治療として有効である事が十分に期待できる。

潰瘍性大腸炎患者に対する血球成分除去療法産物より臨床使用目的の磁気細胞分離システム CliniMACS を用いて、制御性 T 細胞を分離した。CliniMACS システムは末梢血幹細胞移植における CD34<sup>+</sup>細胞の分離などで既に欧州では臨床に使用されている。CliniMACS システムでは試薬の関係上、それまでの我々の検討のように CD45RA<sup>+</sup>細胞の除去が行えないが、分離された細胞の 42%が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>であり、また、79%が FOXP3<sup>+</sup>である事より、十分に制御性 T 細胞が濃縮できていると考えられる。今後は検討症例数を増やし、CliniMACS を用いた方法で安定して高

い割合の制御性 T 細胞が分離可能である事と、分離された細胞分画が免疫制御活性を有する事を確認する予定である。今回用いた ClinMACS 試薬のうち、CD8 と CD25 に対する ClinMACS ビーズは、まだ、CE マークが取得されていないが、近日中に申請される予定である。試薬の臨床応用における安全性等の必要条件が満たされれば、血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法は施行可能であると考えられた。

#### E. 結論

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

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W: Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated Interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- $\beta$ 1-mediated fibrosis. *J Exp Med* 198: 1179-1188, 2003
- 2) Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W: TGF- $\beta$ 1 plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 172: 834-842, 2004
- 3) Honda K, Nakamura K, Matsui N, Takahashi M, Kitamura Y, Mizutani T, Harada N, Nawata H, Hamano S, Yoshida H: Th1-inducing property of IL-27/WSX-1 signaling is required for the induction of experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 11: 1044-1052, 2005
- 4) Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H: An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* in press
- 5) 中村和彦: 新しいサイトカイン阻害薬 - 抗 IL-12/IL-18 抗体- *G. I. Research* 13: 43-48, 2005
2. 学会発表
  - 1) Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Nawata H, Strober W: Expression of cell surface-bound TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ -mediated immunosuppression by murine and human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Keystone Symposia*, Keystone, 2003. 4. 4
  - 2) Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Takahashi M, Honda K, Harada N, Nawata H, Strober W: Importance of TGF- $\beta$ 1 produced by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells for suppression of Th-1-mediated intestinal inflammation. *Digestive Disease Week 2003*, Orlando, Florida, 2003. 5. 18
  - 3) Nakamura K, Honda K, Matsui N, Takahashi M, Mizutani T, Yoshinaga S, Akiho H, Harada N, Nawata H, Hamano S, Yoshida H: Role of WSX-1 (IL27 receptor) in dextran sulfate sodium induced colitis. *Digestive Disease Week 2005*, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 15
  - 4) Somada S, Muta H, Podack ER, Honda K, Nakamura K, Nakagawa S, Nawata H, Tani K: Defining the role of CD30 signals in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine. *Digestive Disease Week 2005*, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 15
  - 5) Takahashi M, Nakamura K, Kitamura Y, Mizutani T, Honda K, Yoshinaga S, Matsui N, Akiho H, Araki Y, Harada N, Kabemura T, Chijiwa Y, Nawata H: Analysis of human peripheral blood regulatory T (Treg) cell frequency in inflammatory bowel disease: Reverse correlation between Treg cell frequency and disease activity of ulcerative colitis. *Digestive Disease Week 2005*, Chicago, Illinois, USA, 2005. 5. 17
  - 6) 中村和彦, 高橋 誠, 本田邦臣, 佐々木 達, 貞元洋二郎, 吉村理恵, 原田直彦, 木谷 敦, Fuss I, Strober W, 名和田 新: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T 細胞の大腸炎抑制作用における TGF- $\beta$ 1 の役割の検討. 第 89 回日本消化器病学会, さいたま, 2003. 4. 24
  - 7) Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Harada N, Nawata H, Strober W: Importance of TGF- $\beta$  expressed by regulatory T cells for immunosuppression at mucosal surface. 第 31 回日本臨床免疫学会 東京, 2003. 10. 10
  - 8) 高橋 誠, 中村和彦, 北村陽介, 本田邦臣, 吉永