

部もみる病理診断との間で乖離してくることがある。さらに一見 I 型 pit pattern を呈する dysplasia の存在がある。これらの点が、今後の検討課題としてあげられる。

E. 結論

今回提案された、拡大観察の方法に基づいて、さらに症例の集積と解析をすすめ、より腫瘍性が疑われ

る病変を絞り込むことによって、盲目的な step biopsy による発見ではなく、効率的な UC 関連腫瘍の検出になってくるものと考えられる。

F. 文献

工藤進英, 日比紀文, 松本譽之, 他: 炎症性腸疾患の拡大内視鏡所見 (2) dysplasia, 癌の NPUC 所見. 早期大腸癌 10;255-258, 2006

潰瘍性大腸炎の癌化における Smad のリン酸化シグナル伝達の解析

研究協力者 岡崎和一 関西医科大学第3内科 教授

研究要旨：TGF- β は多岐にわたる生物活性を有するサイトカインである。正常上皮細胞では増殖抑制作用やアポトーシスを起こし腫瘍抑制因子として、一方、癌化過程においては TGF- β の産生が増加し活性化され腫瘍増殖因子として作用する。我々はこれまでヒト散発性大腸癌の癌化過程において TGF- β のシグナルがC末部をリン酸化したシグナル伝達因子 Smad3 (pSmad3C) を介するシグナルから JNK 依存性のリンカー部リン酸化 Smad3 (pSmad3L) に偏向している事象を報告してきた。潰瘍性大腸炎における発癌過程 (colitic cancer) においては散発性大腸癌と異なる発癌過程が考えられており慢性炎症性粘膜から dysplasia が発生しその後癌に進行し、炎症 (繊維化) が発癌にかかわっていると推測される。本件休では colitic cancer における Smad のリン酸化シグナル伝達機構を解析する事で炎症 (繊維化) と発癌の関連について検討した。

共同研究者

川股聖二¹⁾ 松崎恒一¹⁾ 内田一茂¹⁾
松下光伸¹⁾ 日比紀文²⁾ 松岡克善²⁾
岩男 泰³⁾

所属

関西医科大学消化器肝臓内科¹⁾
慶應義塾大学消化器内科²⁾
同 包括先進医療センター³⁾

対照群として12症例の正常大腸粘膜を使用し免疫染色にて検討を行った。

尚、比較検討するにあたり Immuno-stained index (SI) を定義した。抗 pSmad3C 抗体、抗 pSmad3L 抗体、抗 P53 抗体を用い免疫染色を施行した normal、colitis、dysplasia、cancer と診断される細胞を HPF (x400) で 1000 個計数し染色された核のパーセンテージを SI とした。

C. 研究結果

①対応のない群間比較 (正常大腸粘膜 12 例、colitis 10 例、dysplasia 8 例、cancer 11 例)

i) Smad3C 末部リン酸化 (pSmad3C)
正常粘膜と colitis/dysplasia/cancer 間においては有意差を認めた。又、colitis→dysplasia→cancer と進行するにつれ減少傾向にあった。

ii) Smad3 リンカー部リン酸化 (pSmad3L)
正常粘膜と colitis/dysplasia/cancer 間においては有意差を認めた。又、colitis→dysplasia→cancer と進行するにつれ増加傾向にあった。

iii) P53 染色
colitis と dysplasia、colitis と cancer 間において有意差を認めた。又、colitis→dysplasia→cancer と進行するにつれ増加傾向にあった。

②続いて対応のある 8 症例 (colitis、dysplasia、cancer 各 8 例) に対し Wilcoxon 検定で検定。

i) Smad3C 末部リン酸化 (pSmad3C)
colitis と dysplasia、colitis と cancer において有意差を認めた。

ii) Smad3 リンカー部リン酸化 (pSmad3L)

A. 研究目的

colitic cancer は散発性大腸癌と異なる発癌過程 dysplasia-carcinoma-sequence が考えられている。前癌病変 dysplasia を有する潰瘍性大腸炎は発癌高危険群に属し dysplasia の早期発見診断が必要であるが現状では色々な点で困難な事が多い。今回 colitic cancer における非腫瘍性粘膜 (colitis)、dysplasia、cancer 病変における Smad のリン酸化シグナル伝達機構を解析する事で癌化シグナルの分子機構を理解し、又、Smad3 リンカー部リン酸化は早期発見診断のバイオマーカーと期待される。

B. 研究方法

TGF- β は I 型レセプターを介する Smad3 C 末部のリン酸化だけでなく JNK/p38 を介してリンカー部をリン酸化しそのシグナルを伝達する。リン酸化されるリンカー部位 (pSmad3L) と C 末部位 (pSmad3C) に対して特異的な抗 Smad3 リン酸化抗体を 2 種類作成した。(Hepatology 38: 879-889, 2003, Oncogene 23: 7416-29, 2004) 上記 2 種類の抗体及び抗 P53 抗体を用い手術が施行された colitic cancer 11 症例及び

colitis と dysplasia、colitis と cancer において有意差を認めた。

iii) P53 染色

colitis と dysplasia、colitis と cancer において有意差を認めた。

③抗 pSmad3L 抗体及び抗 P53 抗体による免疫蛍光 2 重染色

リンカー部リン酸化抗体で染まる細胞は p53 染色で染まる細胞数より多く p53 陽性細胞は、リンカー部リン酸化抗体陽性細胞と一致していた。

D. 考察

①P53 においては dysplasia から染色陽性となり徐々に増強していた。一方、Smad3 においては dysplasia 以前よりリンカー部のリン酸化がおり dysplasia 以降さらに著明となっていた。

②増殖抑制効果として Smad3C 末部リン酸化は dysplasia→cancer と進行するにつれ低下傾向にあり、リンカー部リン酸化と相補的關係にあった。

③Smad3 リンカー部リン酸化は、colitic cancer 合併の colitis において有意に上昇認める為、早期発見のバイオマーカーとして期待される。

④正常上皮細胞と colitis 間においては I 型受容体を介する C 末部リン酸化シグナルによって増殖抑制作用やアポトーシスの腫瘍抑制因子として可逆性の關係を保っていると推測される。

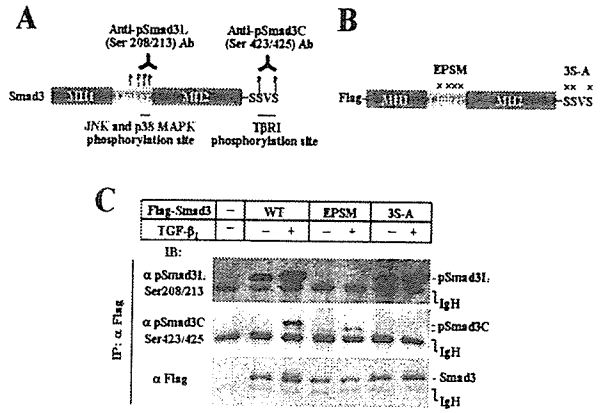
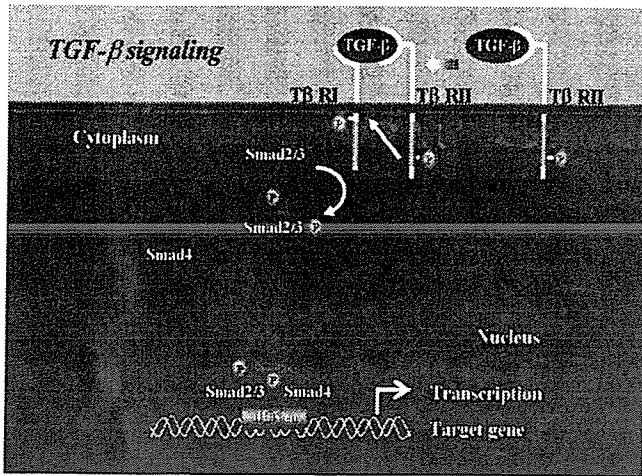
E. 研究発表

1. 論文発表

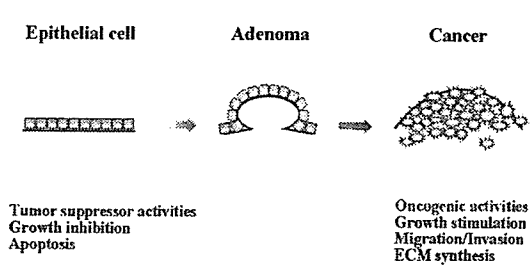
1. Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Chiba T, Okazaki K. Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12 (1) :62-9.
2. Matsuzaki K, Seki T, Okazaki K. TGF-beta during human colorectal carcinogenesis: the shift from epithelial to mesenchymal signaling. *Inflammopharmacology.* 2006;14 (5-6) :198-203.
- Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T. Human thioredoxin-1 ameliorates experimental murine colitis in association with suppressed macrophage inhibitory factor production. *Gastroenterology.* 2006 Oct;131 (4) :1110-21

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

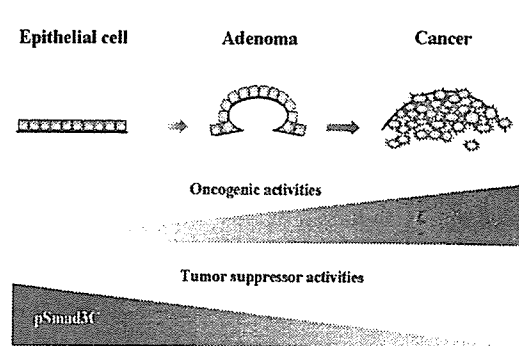
1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



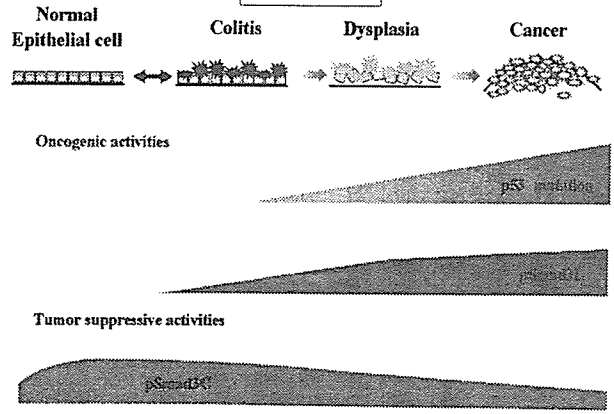
TGF- β function during human sporadic colorectal carcinogenesis



Conclusion 1



Conclusion 2



Colitic cancer, dysplasia の遺伝子不安定性 (MSI) の検討

分担研究者 味岡洋一 新潟大学医歯学総合研究科 教授

研究要旨：潰瘍性大腸の癌 (colitic cancer) および dysplasia の発生に、ミスマッチ修復遺伝子の異常による遺伝子不安定性 (MSI) が関与しているかどうかを、5 つのマイクロサテライトマーカーを用いて検索した。MSI-H (2 つ以上のマーカーが陽性) の頻度は、colitic cancer (11.1%, 2/18)、dysplasia (4.4%, 2/45) と低頻度であり、遺伝子不安定性は潰瘍性大腸癌の発癌過程には重要な役割を果たしてはいないと考えられた。

共同研究者

渡辺聡明

所属

帝京大学医学部外科学教室

A. 研究目的

大腸癌の発生と生長に関わる遺伝子異常には、replication signaling pathway (APC, K-ras, p53 等の異常) と replication error pathway (ミスマッチ修復遺伝子の異常) の 2 つがある¹⁾。本研究は、潰瘍性大腸炎の炎症発癌におけるミスマッチ修復遺伝子異常 (遺伝子不安定性、MSI: microsatellite instability) の頻度を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

インフォームドコンセントを取得後、潰瘍性大腸炎に合併した Colitic cancer 18 例、dysplasia 45 例から DNA を抽出した。蛍光ラベルプライマーを用い、PCR 法で D2S123、D5S346、D17S250、BAT25、BAT26 の 5 つのマイクロサテライトマーカーを増幅し、その異常を検索した。対照として同一症例の非腫瘍部粘膜を用いた。5 つのマーカーのうち、2 つ以上に異常バンドが検出されたものを MSI-H (MSI high)²⁾ とし、MSI 陽性と判定した。

C. 研究結果

MSI-H の頻度は、colitic cancer で 11.1% (2/18)、dysplasia で 4.4% (2/45) であった。

D. 考察

ミスマッチ修復遺伝子の異常による遺伝子不安定性 (MSI) は、マイクロサテライトマーカーの異常バンドの出現 (RER: replication error) とし表現され

る。

これまでの報告では colitic cancer/dysplasia における MSI 陽性率は 19%-85%³⁾⁴⁾ と幅があるが、1 つのマイクロサテライトマーカーのみに異常を認めるもの (MSI-L) の頻度が高い⁵⁾。本研究結果では、colitic cancer / dysplasia の MSI-H (2 つ異常のマーカーに異常あり) の頻度は 11.1% と 4.4% に過ぎず、ミスマッチ修復遺伝子の異常が潰瘍性大腸炎の炎症発癌に寄与する頻度は低いと考えられた。

E. 結論

ミスマッチ修復遺伝子の異常が潰瘍性大腸炎の炎症発癌に寄与する頻度は低いと考えられた。

F. 参考文献

- 1) Pohl C, Hombach A, Kruis W: Chronic inflammatory disease and cancer. *Hepatogastroenterology* 47: 57-70, 2000
- 2) Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al: A National Cancer Institute Workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition. *Cancer Res* 58: 5248-5257, 1998
- 3) Suzuki H, Harpaz N, Tarmin L, et al: Microsatellite instability in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasias and cancer. *Cancer Res* 54: 4811-4844, 1994
- 4) Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, et al: Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res* 56: 1237-1240, 1996
- 5) Cawkwell L, Sutherland F, Murgatroyd H, et al: Defective hMSH2/hMLH1 protein expression is seen infrequently in ulcerative colitis associated colorectal cancers. *Gut* 46: 367-369, 2000

G. 知的所有権取得状況
なし

遺伝子多型を用いた炎症性腸疾患感受性・疾患修飾遺伝子の検討

分担研究者 木内喜孝 東北大学大学院消化器病態学分野 助教授
杉村一仁 新潟大学医歯学総合病院第3内科 講師

研究要旨：炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎・クローン病）発症・病態には遺伝的要因が強く関与することが指摘されている。2005年に炎症性腸疾患感受性遺伝子として TNFSF15 が報告されたことより、その遺伝子多型について解析を行った。その結果、日本人クローン病との TNFSF15 遺伝子多型との相関が再確認されたが、日本人潰瘍性大腸炎との関連は認めなかった。また臨床表現型との関連について解析したところ、肛門部病変を有するクローン病群により強い相関を認めている。また長期経過と多型との関連では、リスクホモクローン病群は、それ以外の遺伝子型クローン病群に比較し、再燃しやすいことが示された。

共同研究者

角田洋一¹⁾ 松浦真樹¹⁾ 土佐正規¹⁾
野村栄樹²⁾ 高橋成一¹⁾ 根来健一¹⁾
高木 承¹⁾ 下瀬川徹¹⁾ 井上 詠²⁾

所属

東北大学大学院消化器病態学分野¹⁾
慶應義塾大学医学部内科²⁾

た後、検体採取時にインフォームドコンセントを得て研究を行った。なお、臨床表現型・予後との解析は retrospective study であり、情報が収集できない症例は、その解析の対象からは除外して検討している。

2) 解析 SNPs: Table 1 に今回解析対象とした SNP について記載した。

3) 遺伝子タイピング: PCR-RFLP を用いて施行した。

A. 研究目的

炎症性腸疾患（クローン病・潰瘍性大腸炎）の発症に遺伝因子が関与していることは既に定説となり、欧米においては複数の感受性遺伝子座位（IBD1-9）や感受性遺伝子 NOD2 が同定されていた。疾患感受性遺伝子が同定されることにより、本疾患の病因・病態の解明、診断・治療法の進歩への大きな貢献が予想されている。2005年新たに tumor necrosis factor superfamily 15 (TNFSF15) 遺伝子多型と炎症性腸疾患との関連が報告された。そこで、TNFSF15 と日本人炎症性腸疾患との関連を、①日本人クローン病と TNFSF15 遺伝子多型との関連について、再現性が認められるか、②日本人潰瘍性大腸炎との関連が認められるか、③臨床表現型と多型との関連について、④長期予後と多型との関連について、以上4点を目的に研究を行った。

B. 研究方法

1) 対象:クローン病 286 例、潰瘍性大腸炎患者 263 例、健常対照者 (HC) 277 例である。なお、3 省庁合同指針「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い計画書・患者説明文書・同意書・マニュアル書を作成し、東北大学倫理委員会にて承認され

Table 1 解析対象となった TNFSF15 遺伝子の多型

| SNP | dbSNP | Location | Allele 1/2 |
|------------|-----------|-------------|------------|
| tnfsf15_36 | rs7848647 | 5'-flanking | G/A |
| tnfsf15_35 | rs6478109 | 5'-flanking | C/T |
| tnfsf15_33 | rs6478108 | Intron 1 | A/G |
| tnfsf15_31 | rs4979462 | Intron 1 | A/G |
| tnfsf15_28 | - | Intron 3 | C/T |
| tnfsf15_26 | rs3810936 | Exon 4 | G/A |

SNP, single nucleotide polymorphism

4) 解析方法

① Allelic association test: 各マーカーの対立遺伝子頻度について $2 \times 2 \chi^2$ 検定を行い、両群間の差を検定した。

② 病型別検討: クローン病については、診断時年齢、病型、病態、手術の有無、肛門部病変の有無にて階層化して解析した。

③ 長期予後との関連: 累積非再燃率、累積非手術率について、Kaplan-Meier 法にて表し、Log-rank 検定を用いて解析した。なお、解析には tnfsf15_35 の SNP を代表として用いた。

C. 研究結果

1) 日本人クローン病との相関について (Table 2): 解析した SNP すべてにおいて相関を認めた。

2) 日本人潰瘍性大腸炎との関連について (Table 2) : 解析したすべての SNP において相関を確認できなかった。

3) 日本人クローン病の臨床表現型別解析 (Figure 1) : 解析した臨床表現型のうち、肛門部病変の有無による解析にて有意な差を認めた。risk allele である *tnfsf15_35* allele 1 を代表して示したが、肛門部病変を有するクローン病群が、有しないクローン病群と比較して、より強い相関を示した。

Table 2 TNFSF15 対立遺伝子頻度

| SNP | Frequency of allele 2 (%) /OR/p-value | | |
|-------------------|---------------------------------------|---|-------------|
| | HCs n=277 | CD n=286 | UC n=263 |
| <i>tnfsf15_36</i> | 39.0 | 25.7 (OR=1.85, p=1.84X10 ⁻⁶) | 36.3 (NS) |
| <i>tnfsf15_35</i> | 39.0 | 25.7 (OR=1.85, p=1.84X10 ⁻⁶) | 36.3 (NS) |
| <i>tnfsf15_33</i> | 51.8 | 37.6 (OR=1.78, p=1.60X10 ⁻⁶) | 52.3 (NS) |
| <i>tnfsf15_31</i> | 39.5 | 26.2 (OR=1.84, p=1.98X10 ⁻⁶) | 36.5 (NS) |
| <i>tnfsf15_28</i> | 53.1 | 38.8 (OR=1.78, p=1.58X10 ⁻⁶) | 52.3 (NS) |
| <i>tnfsf15_26</i> | 40.3 | 26.9 (OR=1.83, p=2.15X10 ⁻⁶) | 36.3 (NS) |

HCs, healthy controls; CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; NS, no significant; OR, odds ratio

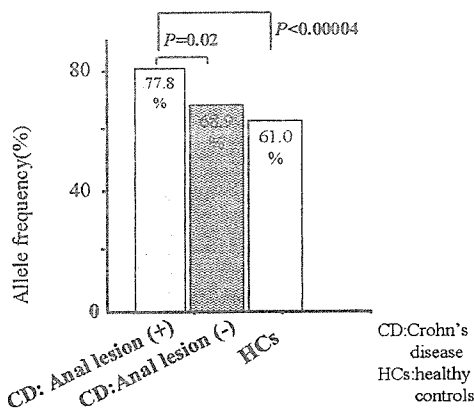


Figure 1. *tnfsf15_35* allele 1 における、肛門部病変有無による subgroup 解析について示した。

4) 長期予後との関連について (Figure 2) : 解析は、risk allele ホモ群とそれ以外 (ヘテロ或いは non-risk allele ホモ) の 2 群に分けて検討した。累積非手術率については、特に 2 群間で差を認めなかったが、累積非再燃率については、risk allele ホモ群において、それ以外の群よりも有意に再燃しやすいという結果であった。

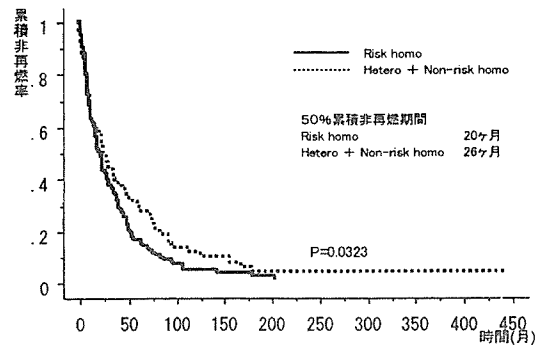


Figure 2. TNFSF15 遺伝子型と累積非再燃率との関連について示した。

D. 考察

本研究では、2005 年に報告のあった炎症性腸疾患感受性遺伝子 TNFSF15 について解析した結果、①日本人クローン病との相関が確認された。②日本人潰瘍性大腸炎との関連を示唆する証拠は得られなかった。③肛門部病変を有するクローン病群に、より強い相関を示した。④risk allele ホモ群はそれ以外の遺伝子型群と比較して、再燃しやすいことを示した。

TNFSF15 遺伝子は、2005 年の Yamazaki らが炎症性腸疾患との関連を報告したのが最初である。今回、その報告と同様に、TNFSF15 遺伝子多型が日本人クローン病と相関することを確認できた。このことは、TNFSF15 遺伝子或いはその近傍に日本人クローン病感受性遺伝子が存在することが、あらためて確認されたことになる。一方、最初の報告では、欧米人の潰瘍性大腸炎との相関が報告されていたが、日本人潰瘍性大腸炎とはまったく相関しないことを初めて示した。このことは、少なくとも日本人においては、TNFSF15 遺伝子は、炎症性腸疾患の感受性遺伝子というより、クローン病の感受性遺伝子であることが示されたと考えている。

臨床表現型別検討では、肛門部病変との関連が示されたが、なぜ関連するかについては現段階ではまったく不明であり、今後の解析が待たれるところである。

日本人炎症性腸疾患に関連する遺伝子多型との関連について報告は数多く存在するが、その長期予後との関連を示した研究は存在しなかった。今回初めて、TNFSF15 遺伝子型が、再燃率と関連することが示され、TNFSF15 遺伝子は、その発症を促進するとともに、再燃にも影響を与える可能性が高いことを示した。

E. 結論

①日本人クローン病との相関が確認された。②日本人潰瘍性大腸炎との関連を示唆する証拠は得られなかった。③肛門部病変を有するクローン病群に、よ

り強い相関を示した。④risk allele ホモ群はそれ以外の遺伝子型群に比較して、再燃しやすいことを示した。

F. 文献

Kakuta Y, Kinouchi Y, Negoro K, Takahashi S, Shimosegawa T. Association study of TNFSF15 polymorphisms in Japanese patients with inflammatory bowel disease. Gut. 2006 ;55

(10) :1527-8.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

IBD の病態解明に向けて：
難治性潰瘍性大腸炎における大腸生検組織 PCR 法を用いた
サイトメガロウイルス感染症の早期診断

分担研究者 千葉 勉 京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座 教授

研究要旨：難治性潰瘍性大腸炎（以下 UC）の増悪にサイトメガロウイルス (cytomegalovirus; CMV) 感染の関与が注目されている。UC 患者における CMV 感染の診断は、主として血中 CMV 抗原測定、および生検材料を用いた病理学的診断（核内封入体の有無）により行われてきた。しかし、大腸内視鏡検査にて CMV 感染の合併が疑われるにも関わらず、上記検査結果が陰性のため治療方針の決定に難渋する症例がしばしば存在する。今回我々は、UC 患者における CMV 感染の早期診断に real-time PCR 法を応用した腸管粘膜内の CMV-DNA を検出する方法に着目し、その臨床的有用性を検討した。対象はステロイド剤や免疫抑制剤による治療抵抗性の難治性潰瘍性大腸炎の患者 30 名。(1) 30 名中 17 名 (56.7%) で real-time PCR 法にて炎症粘膜部位のみで CMV-DNA 陽性であった。(2) CMV-DNA 陽性患者 17 名のうち、血中 CMV 抗原または核内封入体が陽性を示した患者は 4 名 (23.5%) のみであった。(3) CMV-DNA 陽性群と陰性群間で、各種内視鏡スコア (DAI, Matt's, CAI score) における有意差は認められなかった。(4) CMV-DNA 陽性患者 17 名のうち 12 名 (70.6%) は抗ウイルス剤投与による治療を行い、9 名 (75%) は CMV-DNA が陰性化し症状の改善を認めた。内視鏡所見のみでは難治性 UC 患者に合併した CMV 感染の診断は困難であり、real-time PCR 法を応用した腸管粘膜内の CMV-DNA 診断は、CMV 感染の早期かつ正確な診断および治療方針の決定に有用であると考えられる。

A. 研究目的

サイトメガロウイルス (cytomegalovirus; CMV) は日本人の大多数が周産期に初感染し、大多数は不顕性感染の経過をたどり、主に免疫不全患者において再活性化され重篤な合併症を来す。近年、難治性潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, 以下 UC) における増悪因子として CMV 感染が注目されている。その理由として、難治例においてはステロイドを含めた免疫抑制剤を使用することが多く、このような状況下でしばしば CMV が再活性化し、UC の病態を悪化させ、中毒巨大結腸症や穿孔などの合併症を生じるからである。

消化管 CMV 感染の診断方法については報告例のほとんどが病変部の生検標本の HE 染色や免疫組織化学で核内封入体の存在を確認するものであった。

近年、血中の CMV 抗原 (CMV antigenemia) を用いた診断法が CMV 感染の診断に有用とされている。CMV antigenemia 陽性の意味するところは、CMV に感染した血管内皮細胞や組織の感染細胞などで産生された CMV 抗原を核内に取り込んだものと考えられており、すなわち CMV 抗原血症は、体内のどこかに活動的な CMV 感染巣が存在することを示している。

また、CMV 核酸診断法としての Polymerase chain

reaction (PCR) の有用性も報告されている。しかしながら、組織に潜伏感染している CMV ゲノムの存在により、症状に関係なく PCR の結果が陽性になり、結果の解釈が困難な場合がある。

CMV が増殖する際には、前初期遺伝子 (immediate early:IE), 初期 (early:E), 後期 (late:L) の順序で段階的に、また相互依存的に転写、翻訳される。

そこで今回我々は、(1) CMV 感染をできるだけ早期に診断することを目的として、IE 遺伝子を特異的に検出する PCR プライマーを設定した。(2) 大腸粘膜から生検を行い、炎症部位および非炎症部位の CMV-DNA の存在を比較検討することで、我々の開発した PCR 法が単なる存在診断ではなく、CMV が UC の病態増悪に関与しうるか否かを検討した。さらに、(3) 内視鏡重症度が CMV 感染合併 UC 患者の診断に有用であるか否かを検討した。

B. 研究方法

1. 対象

2003 年 10 月から 2006 年 10 月まで、京都大学消化器内科で初発および再燃を来し加療を受け中等度以上の活動性を有し、ステロイド剤や免疫抑制剤による治療抵抗性の難治性潰瘍性大腸炎の患者 30 名。対

象の内訳は男性 14 名、女性 16 名。平均年齢は 40.8±17.6 歳。病変の広がりによる病型は、全大腸炎型 22 例 (73.3%)、左結腸型 7 例 (23.3%)、直腸炎型 1 例 (3.3%) であった。

2. 方法

1. CMV 感染診断法

対象全例に対し、(1) ペルオキシダーゼ標識抗 CMV ヒトモノクローナル抗体 (C7-HRP, C10, C11) を用いた免疫染色で CMV antigenemia の検索を測定した。

(2) 同時期に無前処置下で大腸内視鏡を施行した。観察可能であった部位までに存在する炎症部位 (潰瘍辺縁や潰瘍底を含む) から組織生検を行い、HE 染色で核内封入体 (Cytomegalic inclusion body; CIB) を検索するとともに抗 CMV モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学で陽性細胞を検索した。(3) real-time PCR 法による腸管粘膜内の CMV-DNA により CMV 感染の有無を検索した。具体的には、色素散布および拡大内視鏡を使用し、大腸粘膜炎症部位および非炎症部位を判別し生検を行った。生検組織より DNA を抽出し、両部位の CMV-DNA の存在を比較検討した。CMV-DNA の検出には IE 遺伝子に特異的であるプライマーを設定し real-time PCR 法を行い、10copy 以上を陽性と判定した。

上記の 3 つの検索方法のうちいずれか 1 つで CMV の存在が確認された場合を陽性例として取り扱った。

1. 臨床像の比較

対象全例の CMV 陽性率を求め、感染例と非感染例の臨床像、内視鏡的重症度を比較検討した。

C. 研究結果

1. CMV 感染合併率と臨床像の比較。CMV 感染陽性と診断された頻度は、全対象例 30 例中の 17 例、感染率は 56.7% であった。診断方法の内訳は大腸生検組織 PCR 法で陽性 17 例。この内 3 例で CMV antigenemia 陽性であり、1 例が生検組織免疫染色にて CMV 陽性細胞が検出された。生検組織 PCR 法で CMV-DNA 陰性の患者においては、CMV antigenemia、生検組織における CIB はいずれも陰性であった。

2. CMV-DNA は炎症粘膜部位のみで検出された。

3. CMV-DNA 陽性群と陰性群間で、各種内視鏡スコア (DAI, Matt's, CAI score) における有意差は認められなかった。

4. CMV-DNA 陽性患者 17 名のうち 12 名 (70.6%) は抗ウイルス剤投与による治療を行い、9 名 (75%) は CMV-DNA が陰性化し症状の改善を認めた。CMV-DNA 陰性患者 13 人中 12 人が免疫抑制剤の投与を増加させることで、緩解導入可能であった。

D. 考察

今回、我々が開発した大腸粘膜生検を用いた PCR

法は CMV antigenemia 法、生検標本を用いた診断法に比べ、早期に CMV 感染の診断が可能となることが示唆された。炎症性腸疾患患者における CMV 再活性化の機序は以下の 3 つの段階に分けられる。第 1 段階 inflammatory stage: さまざまな炎症性サイトカインが増加し、局所腸管炎症が引き起こされる (CMV-DNA 陰性、CMV antigenemia 陰性)。第 2 段階 replication stage: CMV は潜伏感染状態において、ウイルスゲノムは単球に存在する。しかしながら、潜伏感染では感染性ウイルス粒子は原則検出以下である。サイトカインの刺激により、マクロファージ、樹状細胞をはじめとする細胞に分化するとともに CMV ウイルスはこれらの細胞内で増殖する (CMV-DNA 陽性、CMV antigenemia 陰性)。第 3 段階 Consolidation stage: 免疫抑制剤などが投与されていると CMV 感染が増悪し、血管内皮細胞などで感染が生じる。その結果、血管炎から消化管粘膜に潰瘍が生じ、出血などの合併症が生じる (CMV-DNA 陽性、CMV antigenemia 陽性)。従って、我々の PCR 方法では replication stage (第 2 段階) で CMV 感染が検出可能であると推測される。この方法による CMV の早期診断により、適切な治療法を決定するのに有効であることが示された。今回の検討では CMV 陽性、陰性症例間で内視鏡重症度についての有意な差は認められなかった。これについては、我々の PCR 方法では比較的早期に CMV 感染が診断可能となっている可能性が大きい。そのため第 3 段階で認められるような円形潰瘍、地図状潰瘍、全周性の巨大潰瘍などの典型例に至る前に診断していると考えられた。

E. 結論

内視鏡所見のみでは難治性 UC 患者に合併した CMV 感染の診断は困難であった。Real-time PCR 法を応用した腸管粘膜内の CMV-DNA 診断は、CMV 感染の早期かつ正確な診断および治療方針の決定に有用であると考える。

F. 研究発表

1. 刊行・論文発表

1. Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Chiba T, Okazaki K: Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 12:62-69:2006.
2. Uza N, Nakase H, Nishimura K, Yoshida S, Kawabata K, Chiba T: Solitary rectal ulcer syndrome associated with ulcerative colitis. Gastrointest Endosc 63: 355-6: 2006.
3. Kawada M, Seno H, Uenoyama Y, Sawabu T, Kanda

- N, Fukui H, Shimahara Y, Chiba T: Signal transducers of transcription 3 activation is involved in nuclear accumulation of β -catenin in colorectal cancer. *Cancer Res* 66:2913-2917:2006.
4. Kou T, Nakase H, Tamaki H, Kudo T, Nishio A, Chiba T: Cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis diagnosed by quantitative real-time PCR analysis. *Dig Dis Sci* 51:1052-1055:2006.
 5. Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T: Human Thioredoxin-1 Ameliorates Experimental Murine Colitis in Association with Suppressed MIF Production. *Gastroenterology* 131:1110-1121:2006.
 6. Uza N, Nakase H, Kuwabara H, Fujii S, Chiba T: Cecal cancer associated with long-standing Crohn's disease. *Lancet* 368 (9549) :1842:2006.
 7. Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Mikami S, Tamaki H, Kasahara K, Chiba T: Open label trial of Clarithromycin therapy in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 (in press)
 8. Mikami S, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Sakurai T, Chiba T: The involvement of cytomegalovirus infection in the ileal lesions of the patient with Behcet's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 (in press)
2. 学会発表
1. 玉置敬之、仲瀬裕志、千葉 勉: Thioredoxin-1 の IBD への関与と Dextran sodium sulfate 腸炎抑制効果の検討: 第 92 回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 2006. 4. 20.
 2. 上野 哲、仲瀬裕志、千葉 勉: 免疫抑制剤治療によるクローン病患者の脂質摂取量及び栄養状態の改善: 第 92 回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 2006. 4. 20.
 3. 井上聡子、仲瀬裕志、千葉 勉: 急性膵炎の重症度とコルチゾール値についての rapid ACTH 負荷試験を用いた検討: 第 92 回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 2006. 4. 20.
 4. 北村 浩、仲瀬裕志、千葉 勉: 慢性腸管炎症に伴う線維化における Hsp47 は治療標的分子になりうるか: 第 92 回日本消化器病学会総会・ワークショップ, 2006. 4. 20.
 5. Minoru Matsuura, Hiroshi Nakase, Satohiro Masuda, Masanori Asada, Satoru Ueno, Hiroshi Kitamura, Satoko Inoue, Norimitsu Uza, Katsuhiro Kasahara, Yasuhiko Tabata, Ken-Ichi Inui, Tsutomu Chiba: Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Multidrug Resistance 1 Expression Plays An Important Role in the Protective Effect On Intestinal Epithelial Injury: Digestive Disease Week and the 107th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute · oral sessions, 2006. 5. 20.
 6. Sakae Mikami, Hiroshi Nakase, Takashi Nagasawa, Tsutomu Chiba: Critical Role of CXCL12-CXCR4 Interaction in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Digestive Disease Week and the 107th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, 2006. 5. 20.
 7. Hiroshi Nakase, Hiroyuki Tamaki, Minoru Matsuura, Satoko Inoue, Mitsunori Uza, Satoru Ueno, Hiroshi Kitamura, Katsuhiro Kasahara, Tsutomu Chiba: Maintenance Therapy with Tacrolimus in Patients with Crohn's Disease Refractory to Azathiopurine: 2 Years Trial: Digestive Disease Week and the 107th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, 2006. 5. 20.
 8. 三上 栄、仲瀬裕志、笠原勝宏、宇座徳光、上野 哲、井上聡子、北村 浩、松浦 稔、千葉 勉: 炎症性腸疾患の病態における CXCL12/CXCR4 系の役割: 第 43 回日本消化器免疫学会総会, 2006. 8. 3.
 9. H. Fukui, A. Sekikawa, T. Fujimori, T. Chiba: Expression of REG IV gene in ulcerative colitis and colitic cancer: The 16th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP' 06), 2006. 8. 30.
 10. Mikami S, Nakase H, Nagasawa T, Chiba T: Critical Role of CXCL12-CXCR4 Interaction in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease (poster session): Japan-Korea IBD Symposium, 2006. 9. 23.
 11. 宇座徳光、仲瀬裕志、千葉 勉: SP-PSOX/CXCL16 制御による炎症性腸疾患に対する新規治療開発: 第 48 回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 2006. 10. 13.
 12. 井上聡子、仲瀬裕志、千葉 勉: Bifidobacterium longum (BB-536) の潰瘍性大腸炎に対する治療効果と腸管上皮バリア機能に対する影響: 第 48 回日本消化器病学会大会・パネルディスカッション, 2006. 10. 12.

13. 仲瀬裕志、松浦 稔、千葉 勉：難治性クローン病に対する Tacrolimus を用いた緩解維持効果の検討：第 48 回日本消化器病学会大会・ワークショップ，2006. 10. 12.
- G. 知的所有権の取得状況
特許取得、実用新案登録は現在のところおこなっていない。

炎症性腸疾患と Th17 細胞

分担研究者 藤山佳秀 滋賀医科大学 消化器内科 教授

研究要旨: ヘルパーT細胞はそのサイトカイン産生パターンから Th1 細胞と Th2 細胞に分類されてきた。最近、これらの Th1、Th2 細胞と分化の過程を異にする細胞集団の存在が明らかにされ、Th17 細胞と呼ばれている。Th17 細胞はナイーブ T 細胞が IL-6、TGF- β の存在下分化が誘導され、IL-23 存在下に維持される。Th17 細胞の炎症性腸疾患病変粘膜における存在を、免疫組織学的方法で検討した。活動期の炎症性腸疾患病変粘膜では、Th17 細胞の数が健康人に比較して有意に増加していた。Th17 細胞は、炎症性腸疾患の病態形成に重要な役割を担っている。

共同研究者

安藤 朗

所属

滋賀医科大学 消化器内科

A. 研究目的

炎症性腸疾患の病態への IL-17 産生ヘルパーT細胞 (Th17 細胞) の関与を追求する。

B. 研究方法

手術と内視鏡下生検により得られた組織を抗 IL-17 抗体 (サンタクルーズ社) を用いて染色し、陽性細胞数を顕微鏡下に計測した。

C. 研究結果

IL-17 陽性細胞は、健常粘膜、虚血性大腸炎病変粘膜、感染性腸炎病変粘膜では認められなかった。潰瘍性大腸炎 (UC) 病変粘膜、クローン病 (CD) 病変粘膜では有意な増加が認められた。特に UC および CD の活動期粘膜で有意な増加が認められた。

D. 考察

炎症性腸疾患病変粘膜では、Th17 細胞の浸潤が認められた。IL-17 の発現は CD3 陽性 T 細胞を中心にみられたが、CD3 陰性細胞にも認められた。最近の報告

では、IL-17 は T 細胞に限らず単球/マクロファージ細胞も発現するとされ、炎症性腸疾患病変粘膜でもこれらの細胞からの発現があるものと考えられた。また、Th17 細胞は、種々の好中球を標的としたケモカイン産生を誘導することから、innate immunity を刺激することにより、炎症の増悪に関与しているものと考えられた。

E. 結論

炎症性腸疾患の病態形成に Th17 細胞が重要な役割を担っている。

F. 文献

1. Bi Y, Liu G, Yang R. Th17 cell induction and immune regulatory effects. J Cell Physiol. 2007;211 (2):273-278.
2. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. Annu Rev Immunol. 2007;25 (in press)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし、
3. その他

炎症性腸疾患の新しい診断・病態進展マーカーの探索 ～プロテオーム解析を用いて～

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：クローン病、潰瘍性大腸炎をはじめとする難治性炎症性腸疾患は、本邦では 10 数万人にのぼり、増加の一途をたどっている。しかし、その原因は未だ不明であり、診断に際しては、臨床症状と内視鏡検査、X 線検査所見を複合的に検討して行っているのが現状である。本研究では、難治性炎症性腸疾患の血清学的な補助診断となりうるマーカー探索を目的とし、血清中の蛋白発現を網羅的に解析した。SELDI TOF/MS プロテインチップシステムを用いて解析すると、炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎患者で発現の亢進する蛋白ピークを少なくとも 5 種類検出し、そのうちの 1 つを同定した (蛋白 A)。さらに、ELISA 法で測定した蛋白 A の血清中濃度は、クローン病、健常者、大腸ポリープ患者と比較し、潰瘍性大腸炎患者で有意に上昇していた。また、白血球除去療法が有効であった患者血清中の蛋白 A 濃度は、治療後に低下傾向を示した。これらのことから、SELDI TOF/MS プロテインチップシステムを用いた解析は炎症性腸疾患の診断や治療効果判定マーカーの探索に有用である可能性が示唆された。

共同研究者

井戸章雄¹⁾ 沼田政嗣¹⁾ 宇都浩文²⁾
藤田 浩²⁾ 児玉真由美³⁾ 上村修司³⁾

所属

京都大学医学部附属病院 探索医療センター¹⁾
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・
生活習慣病学²⁾
宮崎大学医学部消化器・血液学³⁾

A. 研究目的

クローン病、潰瘍性大腸炎をはじめとする難治性炎症性腸疾患は、本邦では 10 数万人にのぼり、増加の一途をたどっている。しかし、その原因は未だ不明であり、診断に際しては、臨床症状と内視鏡検査、X 線検査所見を複合的に検討して行っているのが現状である。今回、難治性炎症性腸疾患の新しい診断および病態進展マーカー探索を目的とし、血清プロテオーム解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

- 潰瘍性大腸炎 (活動期) 23 例、クローン病 (活動期) 18 例と診断された患者血液を用いて検討した。対照群として健常者 13 例、大腸ポリープ 5 例の血液を使用した。
- 血清中の蛋白質発現を SELDI (Surface Enhanced

Laser Desorption/Ionization) プロテインチップシステムを用いて網羅的に解析した。

- 上記で同定した蛋白 A の患者血漿濃度を ELISA 法を用いて検討した。

C. 研究結果

まず、潰瘍性大腸炎患者血清と健常者血清を用いてプロテオーム解析を行い、2 群間に有意差のある 5 種類の蛋白質ピークを検出した。有意差の見られた蛋白質ピークのうち 1 つの蛋白質は免疫沈降法などを用いて同定した。

同定した蛋白 A の血漿中濃度を ELISA 法で測定したところ、クローン病、健常者と比較し、潰瘍性大腸炎では血漿中濃度が有意に上昇していた。また、蛋白 A は臨床重症度で比較すると、有意差は見られなかったが病勢に応じて上昇する傾向が認められた。さらに、治療効果によって比較すると治療 (血球除去療法) 有効群では、無効群に比べて治療後に蛋白 A 濃度が有意に低下していた。

D. 考察

炎症性腸疾患の新規診断マーカー、病態進展マーカーの探索を目的としてプロテオーム解析を行った。潰瘍性大腸炎患者血清中に、健常者と比較して有意差のある蛋白質ピークを少なくとも 5 種類認めた。

さらに 1 つの蛋白質ピークについては蛋白質の同定を行い、潰瘍性大腸炎の診断及び病態評価のマーカーとして有用である可能性が示唆された。今後、更に解析検体数を増やし、炎症性腸疾患の血清学的早期診断法を確立するとともに、炎症性腸疾患における目的蛋白質の分子機構を検討する必要がある。

E. 結論

炎症性腸疾患の新規診断マーカー、病態進展マーカーの探索を目的としてプロテオーム解析を行い、同定した蛋白 A は潰瘍性大腸炎の診断及び病態評価のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

F. 文献

論文発表

1. Kusumoto K, Ido A, Moriuchi A, et al. Repeated intravenous injection of recombinant human hepatocyte growth factor ameliorates liver cirrhosis but causes albuminuria in rats. *International Journal of Molecular Medicine* 17:503-509, 2006
2. Nakanishi C, Moriuchi A, Ido A, et al: Effect of hepatocyte growth factor on endogenous hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Oncology Reports* 16:25-31, 2006

学会発表

1. Numata M, Kodama M, Uto H, et al: Hepatocyte growth factor may not accelerate neoplastic development in two experimental models. *Digestive Disease Week 2006* (2006. 5) Los Angeles
2. Kanmura S, Uto H, Kurogi J, et al: Identification of candidate marker of hepatocellular carcinoma using a ProteinChip system. *57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease* (2006. 10) Boston
3. 児玉真由美、沼田政嗣、宇都浩文
中西千尋、上村修司、安倍弘生、三池忠、楠元寿典、山本章二郎、井戸章雄、坪内博仁：ラット大腸発癌モデルにおける遺伝子組換え型ヒト肝細胞増殖因子 (rhHGF) の及ぼす影響。日本消化器病学会総会 (2006. 4) 北九州市
4. 上村修司、宇都浩文、高濱由香、安倍弘生、黒木讓二、蓮池悟、永田賢治、林克裕、井戸章雄、坪内博仁：B型肝炎ウイルス関連・C型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の血清プロテオーム解析。日本肝臓学会総会 (2006. 5) 京都市

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

潰瘍性大腸炎腸管局所における Transforming growth factor- β 受容体の検討

分担研究者 棟方昭博 弘前大学医学部内科学第1講座 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎 (UC) 腸管局所における Transforming growth factor- β (TGF- β) 受容体の発現と TGF- β シグナル伝達異常について解析し、ステロイド治療抵抗性 UC との関わりについて検討した。ステロイド治療抵抗性 UC では、TGF- β 受容体の発現と TGF- β 受容体のシグナルを伝達する p-smad2, 3 の発現がステロイド治療反応性 UC と比較して低値であった。ステロイド治療抵抗性 UC では、TGF- β 受容体の発現の低下により、TGF- β /Smad 系のシグナル伝達を障害し、炎症の持続する病態を形成している可能性が示唆された。

共同研究者

島谷孝司 石黒 陽 山形和史 櫻庭裕丈
藤田 均 平賀寛人 山口佐都子

所属

弘前大学医学部内科学第一講座

A. 研究目的

Transforming growth factor- β (TGF- β) は消化管粘膜上皮において、細胞の増殖、炎症および組織の修復などの作用を有しており、活動期 UC の腸管局所では、TGF- β の発現亢進が示されている¹⁾。また、TGF- β ノックアウトマウスでは消化管粘膜を含めた全身性炎症から早期に死亡するといわれ²⁾、一方で、UC の慢性炎症持続の病態に Smad を介した TGF- β のシグナル伝達の異常が関与していることが報告されている³⁾。今回、UC 腸管局所における TGF- β receptor の発現と TGF- β シグナル伝達異常について解析し、ステロイド治療抵抗性 UC との関わりについて検討した。

B. 対象

健常 Control として大腸癌手術例 (4 例) と、ステロイド治療抵抗性 UC (6 例) および反応性 UC (4 例) の手術標本より、蛋白および RNA を抽出し、TGF- β receptor1 (TGF-R1)、TGF- β receptor2 (TGF-R2)、Smad7、Smad2, 3 およびリン酸化 Smad2, 3 の蛋白量について Western blot を、TGF-R1、TGF-R2 の mRNA 発現量は real-time PCR を用い検討した。

C. 研究結果

蛋白レベルで p-Smad2, 3 と Smad2, 3 の発現の比 (p-Smad2, 3/Smad2, 3) は、Control (1.82 \pm 0.33) に比し、抵抗例 (0.14 \pm 0.02)、反応例 (0.45 \pm 0.08) とも

に有意に ($P < 0.01$) 低値であった。また、抵抗例と反応例との比較では、抵抗例で有意に ($P < 0.01$) 低値であった。また、Smad7 の発現は Control (4.13 \pm 0.97) と比較し、治療抵抗例 (2.75 \pm 0.48)、反応例 (5.91 \pm 0.45) ともに差を認めず、治療抵抗例と反応例との比較では、抵抗例で低値だった。TGF-R1、TGF-R2 は、蛋白レベルで治療抵抗例 (0.587 \pm 0.105、1.07 \pm 0.383) は、治療反応例 (1.89 \pm 0.670、5.02 \pm 1.66) と比較し有意に ($P < 0.05$ 、 $P < 0.05$) 低値だった。mRNA レベルでも同様に治療抵抗例 (0.106 \pm 0.0334、0.185 \pm 0.0465) は治療反応例 (1.12 \pm 0.352、1.82 \pm 0.877) と比較し有意に ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$) 低値だった。

D. まとめ

ステロイド抵抗性 UC では、TGF-R1 および TGF-R2 発現がステロイド反応性 UC と比較して有意に低値で、またステロイド抵抗性 UC では、TGF- β receptor のシグナルを伝達するリン酸化 Smad2, 3 の発現が、ステロイド反応性 UC と比較して有意に低値だった。

今回我々の用いた大腸切除標本での検討では、ステロイド抵抗性 UC では、TGF- β receptor の発現の低下が、TGF- β /Smad 系のシグナル伝達を障害し、炎症の持続する病態を形成していることが示唆された。

E. 参考文献

- 1) Babyatsky NW, et al. Expression of Transforming Growth Factors a and b in Colonic Mucosa in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 1996 110:975-984.
- 2) Shull MM, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992 Oct 359:693-699.

- 3) Monteleone G, Kumberova A, et al. Blocking Smad7 restores TGF- β 1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. J Clin Invest. 2001 Aug;108(4):601-9.

SAMP1/Yit 小腸炎における IL-6 trans-signaling 抑制剤の効果

研究協力者 光山慶一 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 助教授

研究要旨：炎症性腸疾患における IL-6 trans-signaling の役割を明らかにするために、このシグナルを抑制する可溶性 gp130-Fc を自然発症小腸炎モデルである SAMP1/Yit マウスに投与した。その結果、STAT3 活性化の抑制とともに腸炎の改善がみられた。sgp130Fc を用いた IL-6 trans-signaling の抑制が IBD の新たな治療法として応用しうる可能性が示唆された。

共同研究者

富安信夫¹⁾ 増田淳也¹⁾ 山崎 博¹⁾
佐田通夫²⁾ 松本 敏²⁾ Stefan Rose-John³⁾

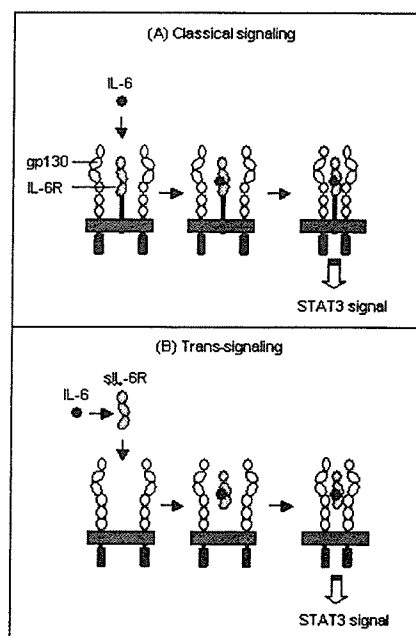
所属

久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門¹⁾
ヤクルト中央研究所²⁾
Christian Albrecht University Kiel³⁾

A. 研究目的

原因不明の難治性疾患である炎症性腸疾患 (IBD) の病態に interleukin-6 (IL-6) が関与していることが知られている。IBD 患者の血中や腸粘膜中では IL-6 のみならず可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) が増加しており、両者は強い親和性により結合し IL-6/sIL-6R 複合体を形成している。IL-6 の細胞膜受容体にはリガンドと結合する IL-6R (IL-6R α , CD126) と、シグナル伝達に関与する gp130 (IL-6R β , CD130) の 2 種類が存在する。IL-6 は、IL-6R と結合した後に gp130 の重合化を促し、その結果細胞内の STAT3 を活性化させる (classical IL-6 signaling) (図 1A)。ところが IL-6 とともに sIL-6R が存在すると、両者は複合体を形成し、IL-6R を介さずに gp130 の重合化を促し STAT3 の活性化を引き起こす (IL-6 trans-signaling) (図 1B)。IBD 患者の末梢血や腸粘膜の T 細胞では、細胞表面には gp130 のみで IL-6R が欠如しているにもかかわらず STAT3 の活性化がみられることから、この活性化はおもに IL-6 trans-signaling に基づくものとされている。本研究では、IBD のモデルとして SAMP1/Yit マウスを用いることにより、慢性腸炎における IL-6 trans-signaling の関与と治療標的としての意義につき検討した。

図 1. IL-6 signaling



B. 研究方法

SAMP1/Yit マウスとコントロールである AKR/J マウスの腸組織での IL-6、STAT3 の発現を、免疫染色、RT-PCR、Western blotting、Northern blotting により検討した。腸粘膜 CD4⁺T 細胞での IL-6R、gp130 発現を FACS により解析した。IL-6 trans-signaling 促進剤である Hyper-IL-6 (IL-6/sIL-6R 融合蛋白) または抑制剤である可溶性 gp130 (sgp130)-Fc を SAMP1/Yit マウスに経静脈的に投与し、STAT3 の発現や腸炎の重症度の変化を観察した。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱い、久留米大学医学部“動物実験に関する指針”に基づいた。

C. 研究結果

AKR/J マウス腸組織での phospho-STAT3 の発現は軽度で一過性であるのに対し、SAMP1/Yit マウスでの発現は高度で持続性であった。この phospho-STAT3 の局在はおもに病変部粘膜 CD4⁺T 細胞にみられた。SAMP1/Yit マウスでは IL-6 の発現も亢進していた。SAMP1/Yit マウスの腸粘膜 CD4⁺T 細胞での IL-6R 発現は gp130 発現に比べて軽微であった。さらに、SAMP1/Yit マウスに Hyper-IL-6 を投与すると phospho-STAT3 の発現亢進に加えて腸炎の悪化がみられ、sgp130-Fc を投与すると phospho-STAT3 の発現低下とともに腸炎の改善がみられた。

D. 考察

IBD の病態における IL-6 の意義についてはすでに多数の報告があり、なかでも抗 IL-6R 抗体の投与がクローン病患者に有効であったとする Ito らの報告は、IL-6 が key cytokine の1つであることを直接証明したものと重要である。IBD 腸粘膜ではマクロファージ、T 細胞、腸上皮細胞から産生される IL-6 と、CRP やプロテアーゼなどの刺激によりマクロファージ、好中球から放出される sIL-6R とが結合して複合体を形成し、この複合体が trans-signaling の機序によって T 細胞を活性化し、アポトーシス抵抗性を増強させることで炎症が進展すると考えられている。IL-6 trans-signaling は、IL-6 が抗炎症的に作用する単球/マクロファージや肝細胞などではみられないことから、IL-6 trans-signaling 阻害剤は、IL-6 が催炎症的に作用する T 細胞で比較的特異的に効果を発揮することが予想される。今回の検討で、SAMP1/Yit マウスでは IL-6 trans-signaling を介した STAT3 の著明な活性化がみられた。さらに、sgp130-Fc の投与により腸炎の改善が認められた。これらの結果から、IL-6 trans-signaling が IBD の新たな治療標的となることが示唆された。最近、マウスの実験大腸癌モデルに対しても sgp130-Fc が有効なことが報告され、IL-6 trans-signaling は colitic cancer の治療標的としても興味深い。

E. 結論

sgp130Fc の投与により SAMP1/Yit 腸炎の改善がみられたことから、IL-6 trans-signaling の抑制が IBD の新たな治療法として応用しうる可能性が示唆された。

F. 健康危険状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mitsuyama K, Sata M, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:451-61.
- 2) Mitsuyama K, Tomiyasu N, Suzuki A, et al. A form of circulating interleukin-6 receptor component soluble gp130 as a potential interleukin-6 inhibitor in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2006;143:125-31.
- 3) Mitsuyama K, Matsumoto S, Rose-John S, et al. STAT3 activation via interleukin-6 trans-signaling contributes to ileitis in SAMP1/Yit mice. *Gut* 2006;55:1263-9.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願、登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

腸内細菌環境の変化がエンドトキシン惹起性Tリンパ球migrationに及ぼす影響

研究協力者 三浦総一郎 防衛医科大学校内科学 教授

研究要旨:小腸微小循環におけるTリンパ球 migration について腸内細菌の有無やエンドトキシン投与の影響を検討した。腸内細菌の存在はTリンパ球 migration の亢進をもたらした。菌体成分による刺激は migration を修飾し、投与経路により異なった。

共同研究者

竹林晃一 穂苅量太

所属

防衛医科大学校内科

明であった。一方、LPS 経口投与では GF マウスにおいて有意な接着分子発現を認め、TLR2、TLR4 の発現がともに亢進したが、SPF マウスでは接着分子発現亢進を認めず、TLR2 の発現は亢進したものの TLR4 の変化は認めなかった。

A. 研究目的

腸内細菌の有無によるエンドトキシン反応性が Tリンパ球 migration に及ぼす影響についての報告はみられない。今回、小腸微小循環における Tリンパ球 migration を germ free (GF) 環境と SPF 環境において比較し、さらにエンドトキシン投与の影響を検討した。

B. 研究方法

動物は GF または SPF 環境で飼育された IQ1 マウスを使用。SPF マウスの脾臓から Tリンパ球を分離し蛍光標識後、静脈より投与、生体顕微鏡下に小腸粘膜微小血管での Tリンパ球 migration を観察し、血管内皮との Tリンパ球の rolling、接着数を定量化した。エンドトキシン (LPS) は腹腔内または経口投与しその影響につき観察した。さらに、GF または SPF マウスから回腸を採取し、接着分子やサイトカインの発現を定量 PCR で検討した。

C. 研究結果

回腸末端部での Tリンパ球 migration 生体観察では、GF マウスに比較して SPF マウスで小腸へのリンパ球 migration が亢進し、接着分子 MAdCAM-1 の発現亢進を伴った。LPS 腹腔内投与は rolling、接着を有意に増加させたが SPF マウスにおいて増加がより著

D. 考察

SPF と GF の比較より腸内細菌の存在が接着分子発現の亢進を介して Tリンパ球 migration を亢進することが示された。LPS を経口投与した際の腸内細菌叢の有無による接着分子発現の相違には、TLR2、TLR4 の発現の違いが影響している可能性が考えられた。

E. 結論

腸内細菌の存在は MAdCAM-1 陽性血管の増加を伴う Tリンパ球 migration の亢進をもたらした。細菌菌体成分による刺激は Tリンパ球浸潤を修飾させたが、その効果は投与経路により異なった。

F. 文献

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2002 Dec;283 (6):G1379-87.
Clin Exp Immunol. 2004 Feb;135 (2):226-32.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他