

## 熱ショック蛋白質に着目した顆粒球・単球吸着療法の作用機序

分担研究者 松本誉之 兵庫医科大学内科下部消化管 教授

研究要旨：クローン病 (CD) に対する顆粒球・単球吸着療法 (GMA) の作用発現機序として、我々は熱ショック蛋白質 70 (HSP70) に着目、*in vitro* の系で他のサイトカインとともに検討し、末梢血 HSP70 の抑制は CD の病態の一部を反映し、GMA は即時的にその分泌を誘導することを証明した。

### 共同研究者

福永 健 戸澤勝之 上小鶴孝二  
所属  
兵庫医科大学内科下部消化管

### A. 研究目的

CD に対する GMA の作用発現機序として、我々は末梢血 HSP70 に着目、他のサイトカインとともに GMA の臨床条件を模した *in vitro* で健常対照と比較・検討した。

### B. 研究方法

健常成人 (HV) 10 名、CD 患者 6 名の末梢血を GMA 担体に室温で 15 分間接触、血漿 HSP70, IL-1ra, IL-2, IL-6 分泌を測定、対照群と比較・検討した。

(倫理面への配慮)

十分なインフォームド・コンセントの後文書で同意を得た上で検体を採取した。

### C. 研究結果

CD 群は HV 群と比較して有意に HSP70 分泌が減弱 ( $P < 0.05$ )。また CD 群 ( $P < 0.03$ )、HV 群 ( $P < 0.01$ ) とともにビーズ接触群の HSP70 分泌は対照群より有意に高値であった。IL-1ra も同様の傾向であった。

### D. 考察

HSP70 はストレス下の生物における細胞レベルの応答として一時的に誘導され細胞保護に働く。本研究の結果、末梢血 HSP70 が CD の病態の一部を反映し、GMA は即時的にその分泌を誘導することが示唆され、同治療の新たな作用機序を表現している可能性があると考えられた。

### E. 結論

今回証明された末梢血 HSP70 の分泌亢進能は、免疫担当細胞や炎症性サイトカインの抑制といった攻撃因子の減弱の面に着目したこれまでの GMA の作用機序理解とは異なるアプローチである。

### F. 文献

Crit Care Med 2002;30:S89-95.  
Human Immunology 2003;64:575-585.

### 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  
特記事項なし

## 一酸化炭素による腸管炎症制御に関する実験的検討

研究協力者 吉川敏一 京都府立医科大学大学院医学研究科生体機能制御学 教授

研究要旨：マウスならびにラットを用いた、2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 腸炎モデルを用いて一酸化炭素 (CO) 投与による腸炎発症抑制効果を検討した。その結果、CO の全身投与のみならず、腸管局所暴露 (注腸投与) によっても腸炎の進展を抑制し、抗炎症効果が発揮されることが確認された。今後さらなる検討を行いヒト炎症性腸疾患における新規治療標的分子としての可能性に関して調査研究していきたい。

### 共同研究者

内藤裕二<sup>1)</sup> 高木智久<sup>2)</sup>

### 所属

京都府立医科大学生体機能分析医学講座<sup>1)</sup>

京都府立医科大学生体安全医学講座<sup>2)</sup>

実験動物取り扱い規約を遵守して施行された。

### C. 研究結果

マウス TNBS 腸炎に対する CO 全身暴露では腸炎の発症が抑制され、亢進した大腸粘膜脂質過酸化、MPO 活性、炎症性サイトカイン (KC) は有意に抑制され抗炎症効果が確認された。ま

た、ラット TNBS 腸炎に対する CO 局所暴露においても腸炎の発症が抑制された。

### D. 考察

CO は化学窒息性の有毒ガスとして知られているが、近年、様々な動物実験モデルにおいて低濃度 CO ガス吸入による抗炎症効果が報告されている。本検討においても、低濃度 CO 吸入によってマウス TNBS 腸炎の発症は抑制されることが確認された。一方、ラット TNBS 腸炎を用いた CO の腸管局所暴露によっても抗炎症効果が発揮されることが明らかとなった。低濃度とはいえ、全身性の CO 吸入は臨床応用の面では安全性に問題があり、CO 局所暴露によるこの抗炎症効果は注目されるべきものと考えられた。

### E. 結論

窒息性ガスである CO の全身投与・局所暴露により大腸炎の発症は有意に抑制された。CO は消化管炎症における新たな治療分子として期待されるとともに、炎症局所に対する CO 暴露療法は革新的な新規治療法としての可能性が示唆された。

### E. 文献

- 1) Takagi T, Naito Y, Tsuboi H, et al. Increased intestinal luminal carbon monoxide gas in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006 Dec;24 Suppl 4:233-8.
- 2) Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for

### A. 研究目的

我々はこれまでに炎症性腸疾患患者における炎症大腸粘膜ではストレス応答蛋白である Heme oxygenase-1 (HO-1) の発現が亢進しており<sup>1)</sup>、マウス Dextran Sodium Sulfate (DSS) 腸炎モデルを用いてこの発現亢進する HO-1 が炎症制御に重要な役割を担っていることを確認し、報告してきた。HO-1 は Heme を分解する酵素であり、その生成物として鉄、ビリベルジン、一酸化炭素 (Carbon monoxide: CO) があげられる<sup>2)</sup>。近年、この生体内で産生される CO による炎症制御機構が注目されており<sup>3)</sup>、また、生体外から投与される CO による抗炎症効果の検討もなされている。そこで今回我々は、マウスならびにラット 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 腸炎モデルを用いて CO の全身、ならびに局所暴露による抗炎症効果を検討した。

### B. 研究方法

7 週齢雄性 C57BL/6 マウスならびに 7 週齢雄性 Wistar ラットを用い、既報に従い 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 腸炎を作成した。マウス TNBS 腸炎における検討では、CO ガス 200ppm を全身投与し、ラット TNBS 腸炎においては CO ガス 200ppm を 1 日 2 回経肛門的投与し、腸管炎症を評価した。評価項目は潰瘍面積、組織学的所見、大腸湿重量、大腸粘膜脂質過酸化、好中球浸潤の指標として MPO 活性の測定、炎症性サイトカイン (KC/Cinc-1) の測定 (ELISA、RealTime-PCR) を行った。本実験に関しては本学内実

- inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2004 Jul;20 Suppl 1:177-84.
- 3) Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, et al. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. J Exp Med. 2005 Dec 19;202(12):1703-13.
- E. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
取得なし
  2. 実用新案登録  
登録なし
  3. その他  
特記事項なし

## エビデンスに基づく炎症性腸疾患の診療ガイドライン開発 医療提供者と一般社会への普及・啓蒙

分担研究者 上野文昭 大船中央病院 特別顧問

研究要旨：潰瘍性大腸炎の診療の支援を目的として開発された診療ガイドラインの医療社会への広い普及を図った。既存のガイドラインを電子化し、より使いやすく認知されやすいインターネット版を作成し公表した。また理解しやすい解説を加え、再構築した一般向け解説集を作成し、患者側の利用も可能とした。クローン病の診療ガイドラインは、当初から患者の視点を十分に意識した臨床上の疑問を出発点として開発中である。

### 共同研究者

|                      |                      |                      |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| 尾藤誠司 <sup>1)</sup>   | 小林健二 <sup>2)</sup>   | 井上 詠 <sup>3)</sup>   |
| 古宮憲一 <sup>4)</sup>   | 五十嵐正広 <sup>5)</sup>  | 伊藤裕章 <sup>6)</sup>   |
| 正田良介 <sup>7)</sup>   | 杉田 昭 <sup>8)</sup>   | 野口善令 <sup>9)</sup>   |
| 樋渡信夫 <sup>10)</sup>  | 福島恒男 <sup>11)</sup>  | 松井敏幸 <sup>12)</sup>  |
| 松本誉之 <sup>13)</sup>  | 棟方昭博 <sup>14)</sup>  | 小林清典 <sup>15)</sup>  |
| 鈴木康夫 <sup>16)</sup>  | 渡邊聡明 <sup>17)</sup>  | 中山健夫 <sup>18)</sup>  |
| 吉田雅博 <sup>19)</sup>  | 山口直人 <sup>19)</sup>  | 高橋奈津子 <sup>19)</sup> |
| 八重ゆかり <sup>19)</sup> | 西山可南子 <sup>19)</sup> |                      |

### 所属

国立病院機構本部研究課臨床疫学推進室<sup>1)</sup>  
東海大学総合内科<sup>2)</sup>  
慶應義塾大学包括先進医療センター<sup>3)</sup>  
国立病院東京医療センター消化器科<sup>4)</sup>  
癌研有明病院内視鏡診療部<sup>5)</sup>  
北野病院消化器内科・炎症性腸疾患センター<sup>6)</sup>  
国立国際医療センター総合外来部<sup>7)</sup>  
横浜市立市民病院外科<sup>8)</sup>  
名古屋第2赤十字病院総合内科<sup>9)</sup>  
いわき市立総合磐城共立病院<sup>10)</sup>  
松島病院<sup>11)</sup> 福岡大学筑紫病院消化器科<sup>12)</sup>  
兵庫医科大学下部消化管科<sup>13)</sup>  
弘前大学第1内科<sup>14)</sup> 北里大内科<sup>15)</sup>  
東邦大佐倉病院内科<sup>16)</sup> 帝京大外科<sup>17)</sup>  
京都大健康情報学<sup>18)</sup>  
日本医療機能評価機構・医療技術評価総合  
研究医療情報サービスセンター<sup>19)</sup>

インターネットを介した情報提供を計画した。また医療提供者向けに開発されたPGに一般向け解説を加えることにより、患者側への適切な診療情報の提供を図った。さらにクローン病の診療ガイドライン開発に着手し、ここでは患者側の疑問に立脚したガイドライン開発を目指した。

### B. 研究方法

1. インターネットによる情報提供：信頼できるインターネット情報の送信元として、財団法人日本医療機能評価機構・Minds 医療情報サービスを選択し、公表済みの診療ガイドラインの評価を依頼した。その上で、適切な電子情報となるよう、若干の組み換え作業を依頼し、作成された情報の妥当性を開発グループが再検討した。

2. 診療ガイドラインの一般向け解説：一般向け解説の作成についても前述の Minds 医療情報サービスの協力を得た。医療者向けPGの表題と推奨ステートメントより、患者の視点に立った疑問文を作成した。推奨ステートメント文中の医学用語や難解な用語につき、Minds ワーキンググループが解説を加え、PG作成グループがその適切性を検討し、必要に応じた修正を加えた。またPG作成グループにより、疑問文に対する一般向けのコメントを作成した。最終案をPG作成グループが校閲した。

3. クローン病の診療ガイドライン：クローン病のPGは日本消化器病学会との共同開発となった。患者の視点を重視したPGの開発を目指し、それを十分に意識した疑問の作成を図った。また作成委員の診療現場で、多数の患者から直接疑問を抽出した。抽出された疑問を整理し、作成委員が吟味した上で、これらに対する文献情報の検索を開始した。

### A. 研究目的

本研究班のプロジェクト研究として開発した潰瘍性大腸炎（以下UCと略す）の診療ガイドライン（以下PGと略す）は平成18年1月に公表された。

本年度はさらに一般医家への普及を図るために、

## C. 研究結果

1. インターネットによる情報提供：公表済みの診療ガイドラインが Minds 医療情報サービスセンター内の診療ガイドライン選定委員会の評価を受けた。AGREE Instrument に準じた Minds 評価項目を基に吟味され、適切な PG として認定された。その結果を受けて、Minds 医療情報サービス内のワーキンググループにより、電子化のための作業が、作成グループとの意見交換の基に行われた。電子媒体であることを利用して、引用文献へのリンク、ガイドライン内の検索が可能になるなど、より使いやすい PG が完成し、平成 18 年 6 月に Minds 医療情報サービスのウェブ上で公開となった。

2. 診療ガイドラインの一般向け解説：PG の原本より、一般向けとして必要な 47 項目の疑問が抽出された。それぞれに対する推奨ステートメントは原文のままとし、推奨グレードも付記された。推奨ステートメント文中の専門用語についてはその都度解説が加えられた。それぞれの疑問文に対して、ガイドライン作成班から一般に理解しやすいコメントが付記された。現在この一般向け解説集は最終校正中であり、近日 Minds 医療情報サービスのウェブ上で公開予定である。

3. クロウン病の診療ガイドライン：クロウン病の診療における主項目 9、副項目 57 のカテゴリーが設定され、これに対応した臨床上的疑問を、患者の視点を意識しながら作成した。また直接患者から抽出した疑問の中には、医師が想定し得なかった疑問も 28 項目に及んだ。これらに対して文献情報と専門家の意見の双方を基に推奨文を作成準備中である。

## D. 考察

昨年度当研究班のプロジェクト研究グループは、厳密な開発基準に準拠しながら、専門家の意見を十分に汲み入れた透明性の高い推奨基準を有する UC の PG を開発し公表した。また、昨今わが国においても各種疾患に対する EBM 的手法を用いた科学的妥当性の高い PG が相次いで公表されている。

これらの PG が直面している問題点は、期待したほど十分な利用コンプライアンスが獲得できていないことであろう。いかに適切な PG が存在しようと、診療現場で利用されなければその意義は薄い。PG 遵守不良の原因は多々あるが、認知度不足、内容の理解困難、使い勝手の悪さなどが大きな理由としてあげられる。

すでに公表されている UC の PG に電子情報を加え

ることにより、認知度を向上し、よりわかりやすく使いやすい PG となるべき改良を試みた。Minds 医療情報サービスの全面的な協力を得て作成したインターネット版により、これらの目的はほぼ達成されたと考えられる。期待される UC の診療への浸透状況を、今後何らかの形で検証することが必要であろう。

PG の利用対象として、本来医療提供者だけではなく、患者側も含むべきである。UC という疾患の特殊性を鑑み、PG 開発当初から利用対象を医師に限定していた。しかし一般への適切な診療情報提供も重要な課題である。元々医師向けに開発された PG を一般向けに書き換えるのは困難な作業である。そこで PG 原文はそのままに、一般向けの疑問を作成し、難解な専門用語の解説や項目ごとの解説文を加えた一般向け解説集を作成した。現在ウェブ上で公開準備の最終段階にあり、印刷物も診療現場から患者へ配布する予定である。適切かつ標準的な診療を患者側が理解することにより、医療の質の向上が期待される。

PG は医療提供者のみならず患者側に対する有用な情報源であることを考慮し、クロウン病の PG 開発にあたっては、患者の視点を重視した臨床上的疑問を出発点とした。まだ開発の初期段階で、克服しなければならない問題点も多いと考えられるが、より健全な PG を目指して継続中である。

## E. 結論

公表された UC の PG を電子情報化し、より広い普及を図った。またわかりやすい解説を加えて、一般向けに情報を提供した。クロウン病の PG については、患者の視点を重視した臨床上的疑問を出発点として開発が進行中である。

## F. 今後の展望

電子情報化や一般向け情報の及ぼす効果については未検討ある。UC の診療の質の向上や患者アウトカムの改善に貢献への期待は検証の必要があろう。開発初期段階のクロウン病の PG は、当初から患者の視点を意識しているが、果たしてより優れた PG となるかどうかは完成まで待たなければならない。

## G. 参考文献

本報告書作成にあたって直接引用した文献はない。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

## 粘膜再生治療—基礎面から IL-13 及びその受容体の消化管粘膜再生における役割

分担研究者 土肥多恵子 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 部長

研究要旨：これまでに我々は、消化管炎症における過剰な Th2 型サイトカイン IL-4, IL-13 の存在により、絨毛萎縮、粘液産生細胞の増加が見られることなどから、消化管の病理学的変化や tissue remodeling における IL-4, IL-13 の重要性を指摘してきた。本研究では、腸管上皮修復・再生過程においての IL-4, IL-13 の役割を明らかにすることを目的として解析を行った。Wild Type (WT) マウスおよび IL-4 受容体欠損 (IL-4R<sup>-/-</sup>) マウスに、放射線の全身照射 (3Gy) を行って小腸粘膜傷害を誘導し、小腸粘膜傷害モデルにおける修復・再生過程を比較検討した。WT マウス小腸において、盛んな上皮細胞分裂を伴う組織修復が照射後 3 日目に観察されるが、IL-4R<sup>-/-</sup> マウスでは上皮再生に遅延が生じた。WT マウスでは、IL-13 のおとり受容体と考えられている IL-13 Receptor  $\alpha 2$  (IL-13R $\alpha 2$ ) が、線維芽細胞および筋線維芽細胞において一過性に強く発現した。一方、組織修復に遅れが生じる IL-4R<sup>-/-</sup> マウスにおいては、IL-13R $\alpha 2$  発現の上昇が見られないことを発見した。さらに我々は、腸管組織培養法により、IL-13 が上皮細胞傷害を引き起こしていることを明らかにした。そこで、可溶性キメラ蛋白 IL-13R $\alpha 2$ -Ig を IL-4R<sup>-/-</sup> マウスに投与することにより IL-13 細胞傷害性の中和を試みたところ、組織修復が WT マウスと同程度まで改善された。また、この IL-13R $\alpha 2$  治療は、WT マウスにおける重度の上皮細胞傷害からの回復に対しても効果を発揮した。IL-13R $\alpha 2$  による IL-13 シグナリングの阻害が、腸管上皮細胞の再生を調節する新たな作用機序であることが明らかとなった。

共同研究者  
中島 淳  
所属

横浜市立大学医学部分子消化管内科

### A. 研究目的

これまでの研究において我々は過剰な Th2 型サイトカインの存在が、マウス腸炎モデルで上皮再生を障害し、組織再構築の原因となることを示してきた。また、潰瘍性大腸炎では粘膜再生に異常を来すことが、発癌機構にも関与しているのではないかと考えた。すなわち、IL-13 等のサイトカインによる再生傷害が関わっていると推測し、マウスモデルを作成した。前年度までに、化学発がん物質アゾキシメタン (AOM) 投与に加えてトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 腸炎やデキストラン硫酸 (DSS) 腸炎を誘導することによる炎症発癌は野生型 (WT), Th1 型優位の IL-4<sup>-/-</sup> マウスに比して Th2 型応答優位のが、有意に高い腫瘍発生頻度を示すことが明らかとなった。さらに Th2 優位マウスでは癌のステージも進行してい

ることが明らかとなった。この結果に基づき本年度は、Th2 型サイトカインが放射線障害後の上皮再生にどのような影響を持つかを検討した。非血球系細胞 (間質細胞及び上皮細胞) に発現している IL-14 及び IL-13 のシグナル伝達性受容体は IL-4R $\alpha 1$  と IL-13R $\alpha 1$  のヘテロダイマーである。さらに IL-13R $\alpha 2$  は IL-13 とのみ強い親和性をもって結合するが、細胞内ドメインが短く、シグナル伝達能を持たないと考えられて来た。そこで、我々は、IL-4R $\alpha 1$  の受容体欠損 (IL-4R<sup>-/-</sup>) マウスを用いて、野生型マウス (WT) と比較検討した。

### B. 研究方法

Wild Type (WT) マウスおよび IL-4 受容体欠損 (IL-4R<sup>-/-</sup>) マウスに、放射線の全身照射 (3Gy) を行って小腸粘膜傷害を誘導し修復・再生過程を比較検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は施設の規則に基づき動物愛護を考慮した計画とし、委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

WT マウス小腸において、盛んな上皮細胞分裂を伴う組織修復が照射後3日目に観察されるが、IL-4R<sup>-/-</sup>マウスでは上皮再生に遅延が生じた。1日目から3日目に放射線耐性のNK細胞によりIL-13産生が上昇していた。WTマウスでは、IL-13のおとり受容体と考えられているIL-13 Receptor  $\alpha$  2 (IL-13R $\alpha$ 2)が、線維芽細胞および筋線維芽細胞において一過性に強く発現した。一方、組織修復に遅れが生じるIL-4R<sup>-/-</sup>マウスにおいては、IL-13R $\alpha$ 2発現の上昇が見られないことを発見した。さらに我々は、腸管組織培養法により、IL-13が上皮細胞傷害を引き起こしていることを明らかにした。そこで、可溶性キメラ蛋白IL-13R $\alpha$ 2-IgをIL-4R<sup>-/-</sup>マウスに投与することによりIL-13細胞傷害性の中和を試みたところ、組織修復がWTマウスと同程度まで改善された。また、このIL-13R $\alpha$ 2治療は、WTマウスにおける重度の上皮細胞傷害からの回復に対しても効果を発揮した。IL-13R $\alpha$ 2によるIL-13シグナリングの阻害が、腸管上皮細胞の再生を調節する新たな作用機序であることが明らかとなった。さらにWTマウスに13Gy放射線照射を行い、4日後に小腸及び大腸の再生上皮コロニーを算定したところ、IL-13R $\alpha$ 2-Ig投与群で再生が促進されていることがわかった。

### D. 考察

消化管上皮の再生過程においてIL-13は再生を妨げる方向にはたらくことがわかった。その際にIL-13R $\alpha$ 2の一過性発現によってIL-13の作用は調節されていた。IL-13の再生傷害作用はIL-4R<sup>-/-</sup>マウスだけでなく、WTマウスにも見られた。

### E. 結論

IL-13は消化管上皮再生の傷害作用があり、IL-13の中和により粘膜再生が促進される可能性がある。

### F. 文献

Kawashima, R, Kawamura YI, Kato R, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, and Dohi T, IL-13 receptor  $\alpha$ 2 promotes epithelial cell regeneration from radiation-induced small intestinal injury in mice. *Gastroenterology*, 131:130-141, 2006

### G. 知的所有権の取得状況

なし

## 血管新生におけるアクチビンの役割に関する検討

研究協力者 小島 至 群馬大学生体調節研究所 教授

研究要旨：アクチピンは細胞増殖・分化誘導をはじめとした多彩な機能をもつことが知られている。血管においても平滑筋細胞などに様々な作用を発揮するが、これまでの検討から血管内皮細胞では VEGF のもつ管腔形成作用に必須であることが判明している。そこで VEGF とともに血管新生の重要なメディエーターである FGF-2 の作用にもアクチピンが関与しているかどうかを検討した。その結果、FGF-2 が管腔形成を促進する場合にも、内皮細胞のオートクリン因子アクチピンが必須であることが明らかになった。

### A. 研究目的

TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する活性因子アクチピンは上皮細胞・間葉系細胞の機能を調節し、上皮細胞の増殖・分化を調節するだけでなく、上皮・間葉転換や間葉系細胞の活性化を通じて臓器の線維化にも関与している。アクチピンは臓器・組織の発生、再生、線維化などを調節する重要なメディエーターである。アクチピンの標的臓器の一つに血管があげられる。一般に TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する因子は血管の発生・分化において必須で、血管新生にも重要であることが認識されている。一方、これまでの研究から、アクチピンが管腔性臓器の発生課程で、管腔形成を制御していることが知られている。そこで我々はアクチピンが血管内皮細胞の管腔形成に関与しているかどうかを検討した。その結果、アクチピン A が内皮細胞のオートクリン因子であること、内皮細胞増殖因子 (VEGF) によりアクチピン A の発現および受容体発現が誘導されること、さらにアクチピン A の作用がブロックされると VEGF は管腔形成を誘導できないことなどが判明し、アクチピン A が VEGF の管腔形成誘導作用を発揮する上で必須の因子であることを見いだした<sup>1)</sup>。VEGF と並んで重要な血管新生調節因子に線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) がある。今回、アクチピン A が FGF-2 の血管新生促進作用にも関与しているかを検討した。

### B. 研究方法

ウシ大動脈由来の培養血管内皮細胞 (BAEC) を用いて実験を行った。この細胞がアクチピン A を産生することやアクチピン受容体を発現していることはすでに確認している<sup>1)</sup>。内皮細胞の管腔形成はコラーゲンゲル内に培養し、FGF-2 などを添加した後の形態変化を測定することにより検討した。実際に管腔が形

成されているかは、ゲルを固定後 HE 染色を行い確認した。遺伝子発現は定量的 PCR 法により、また蛋白発現はウエスタンブロット法により測定した。FGF-2 の産生は ELISA 法により測定した。遺伝子導入はアデノウイルスベクターを用いて行った。

(倫理面への配慮)

群馬大学生体調節研究所動物実験倫理規定に基づいて行われた。

### C. 研究結果

コラーゲンゲル内に培養した BAEC は、血清存在下に培養しても管腔を形成しなかったが、そこに FGF-2 を添加すると管腔形成が観察された。一方、アクチピン A の添加によっても管腔形成が認められた。FGF-2 とアクチピン A の両者を添加すると、管腔形成は相加的であった。一方、内因性アクチピンの作用をブロックするフォリスタチンを添加すると、アクチピン A の管腔形成作用が消失するとともに、FGF-2 による管腔形成作用もほぼ完全に抑制された。フォリスタチンの作用がアクチピン作用の抑制を介したものを確認する目的で、ドミナントネガティブ型の変異アクチピン受容体をアデノウイルスベクターを用いて BAEC に過剰発現した。その場合にも FGF-2 の管腔形成作用は消失した。この結果から、FGF-2 による管腔形成誘導作用には、内因性のアクチピン A の作用が必須であることが判明した。FGF-2 とアクチピン A がどのような相互作用をするかを検討したところ、FGF-2 の添加によりアクチピン A の産生は変化しなかったが、アクチピン受容体の発現は増加した。一方、アクチピン A を添加すると、FGF-2 の発現が増加するとともに FGF-2 受容体の発現も増加した。以上の結果から、アクチピン A は FGF-2 のもつ管腔形成促進作用に必須の因子として関与していることが明らかになった。



#### D. 考察

アクチビン A は血管内皮細胞においてオートクリン因子として働くことが既に明らかになっている<sup>1)</sup>。今回 VEGF だけでなく、FGF-2 による管腔形成においてもアクチビン A がきわめて重要な役割を果たしていることが明らかになった。FGF-2 は強力な血管新生促進因子であり、管腔形成を促進するが、重要なことは内皮細胞においてアクチビンシグナルを停止させると FGF-2 はその作用を発揮できないという事実である。アクチビン A は、実質的に VEGF や FGF-2 の作用を規定するオートクリン因子となっている。今後血管新生を伴う様々な疾患の治療にアクチビン A またはそのアンタゴニストであるフォリスタチンが有用であると考えられる。

#### E. 結論

今回、アクチビン A が FGF-2 のもつ血管内皮細胞の管腔形成促進作用において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

#### F. 文献

1) Maeshima K, Maeshima A, Hayashi Y, Kishi S, Kojima I. Crucial role of activin A in tubulogenesis of endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 145:3739-3745, 2004

#### E. 研究発表

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## Wnt 活性化腸上皮細胞の解析

分担研究者 岡野栄之 慶應義塾大学医学部生理学教室 教授

研究要旨：Wnt シグナルは胚性幹細胞及び体性幹細胞の自己複製や分化に重要である。我々は Wnt シグナル活性化細胞が腸上皮幹細胞ではないか？という作業仮説のもと、Wnt シグナル依存的に GFP を発現するマウスを用いて解析を行った。GFP 発現細胞は crypt に存在し、細胞周期が活性化しており、Msi1 を高く発現していた。腸上皮幹細胞との同一性を検討したところ GFP 発現細胞の多くは Msi1 と共局在し、Label retaining cell を含むことが明らかとなった。これらのことから GFP 発現細胞は腸上皮幹細胞を含む未分化な細胞集団であると考えられた。また、GFP 発現細胞特異的に発現している遺伝子の網羅的解析を行い腸上皮幹細胞マーカーの候補遺伝子を得た。

### 共同研究者

伊達昌一<sup>1)</sup> 佐藤俊郎<sup>1)</sup> 江崎俊彦<sup>1)</sup>  
矢島知治<sup>1)</sup> 松崎有未<sup>2)</sup> 工藤 明<sup>3)</sup>  
日比紀文<sup>1)</sup>

### 所属

慶應義塾大 消化器内科<sup>1)</sup>  
慶應義塾大 生理学<sup>2)</sup>  
東京工業大 生命理工学<sup>3)</sup>

き腸上皮のみを採取、single cell 化し、FACS により GFP 発現細胞の表面抗原解析と、DNA、RNA 染色による細胞周期解析を行った。アデノウイルス Dkk1 発現ベクター (ad-Dkk1)  $1 \times 10^9$  puf をマウスに尾静脈注射し 3 日後、7 日後に腸切片を作成し、切片上で GFP を発現している crypt をカウントした。

### ② GFP 発現細胞における遺伝子の網羅的解析

FACS により腸上皮細胞を CD29 と GFP で展開、単離し、各細胞群から total RNA を回収、RT-PCR により Fabp、Msi1 の発現を、また GeneChip assay により網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、Gene Ontology (GO) analysis により GFP 細胞特異的に発現している遺伝子がどのような特徴を持つのかを調べた。

### ③ GFP 発現細胞と腸上皮幹細胞の同一性の検討

LRC assay はマウスに 6.5 Gy 放射線照射後、BrdU (1 mg/3 times/day) を三日間腹腔内投与し、その 10 日後に、BrdU を染色して FACS を行った。また Immunohistochemistry (IHC) により幹細胞マーカー (Msi1、リン酸化 PTEN) と GFP (もしくは Gal) との局在を検討した。

### C. 研究結果

①小腸において GFP (もしくは Gal) を観察したところ腸上皮の crypt で散在して発現しているのが観察された。さらに、GFP 発現細胞の表面抗原を FACS により解析したところ、GFP 発現細胞では CD29、CD24、CD71 が発現しているのが明らかとなった。CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>、CD29<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>、CD29<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup>の細胞周期を比較したところ CD29<sup>-</sup>GFP<sup>-</sup>の 98%は G0-G1 期、CD29<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>の 30%が S-G2-M 期 CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>の 76%の細胞が S-G2-M 期であった。Dkk1

### A. 研究目的

Wnt シグナルは胚性幹細胞及び体性幹細胞の自己複製や分化に重要であり<sup>1)</sup>、腸上皮においても未分化細胞の増殖を促進することが知られている<sup>2)</sup>。腸上皮幹細胞においては label retaining cell (LRC) の知見が主であり、近年特異的なマーカーとして Msi1<sup>3)</sup>、sfrp5<sup>4)</sup> などが報告されているがその細胞の単離、機能解析は行われていない。機能解析を行うためには目的とする細胞の表面抗原同定や、GFP などの蛍光蛋白を発現させ細胞を単離することが必要である。我々は Wnt を活性化している細胞を可視化できれば腸上皮幹細胞を単離、解析できるのではないかと考え、Wnt シグナル可視化マウスの解析を行った。

### B. 研究方法

プロモーターに tk、エンハンサーに Wnt シグナル下流の転写因子 Tcf/Lef の結合配列を持つ GFP (もしくは Gal) 発現ベクターを導入したトランスジェニックマウス<sup>5)</sup>の解析を行った。

#### ① GFP 発現部位および発現細胞の解析

GFP と Gal の発現部位を、凍結切片を作成し免疫染色、Gal 染色により解析した。また、間質を取り除

は分泌型の蛋白で、Wnt シグナルの抑制因子である。ad-Dkk1 投与群では投与から 3 日、7 日目でコントロール群に比べ GFP を発現している crypt が 1/4 程度に減少していた。

②CD29-GFP<sup>+</sup>、CD29-GFP<sup>-</sup>、CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>の細胞群では、吸収上皮マーカーである Fabp の発現は CD29-GFP<sup>-</sup>>CD29<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>>CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>であり、腸上皮幹細胞マーカー Msil の発現は CD29-GFP<sup>-</sup><CD29<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup><CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>であった。GeneChip assay、GO analysis から CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>の細胞では既知の Wnt シグナルのターゲット遺伝子、細胞周期、発生に重要な遺伝子が多く発現していた。

③各細胞群に含まれる BrdU 保持細胞 (LRC) は CD29-GFP<sup>-</sup> (0%)、CD29<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> (0.29%)、CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> (2%) であった。また IHC により GFP と Msil、Gal とリン酸化 PTEN の共局在を確認した。

#### D. 考察

Wnt に応答して GFP もしくは Gal を発現するマウスの解析を行った結果、GFP (もしくは Gal) の発現は Crypt で強く発現しているのが観察された。そこで我々は GFP 発現細胞に対して詳細な解析を行った。GFP 発現細胞は細胞周期活性が高く、既知の Wnt シグナル-ターゲット遺伝子を特異的に発現していた。また Wnt シグナルの抑制因子である分泌蛋白 Dkk1 をマウス体内で発現させることにより、GFP の発現は抑制された。以上のことから、作成したマウスにおいて GFP の発現は Wnt シグナル依存的と考えられた。また吸収上皮マーカー Fabp、幹細胞マーカー Msil の遺伝子発現解析と細胞周期解析から CD29-GFP<sup>-</sup>は分化し細胞周期が停止している吸収上皮細胞、CD29<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup>は crypt 内の細胞分裂の盛んな未分化細胞群、CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>細胞群は中でもさらに未分化な細胞群であった。

次に我々は GFP 発現細胞が腸上皮幹細胞か否かを LRC assay、IHC により検討した。LRC assay により一部の GFP 発現細胞が BrdU を保持しており、CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>の細胞画分に BrdU 保持細胞が濃縮されたこと、さらに GFP と Msil が共局在したことから、GFP 発現細胞は幹細胞を含む未分化な細胞群であると考えられた。

CD29<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>細胞特異的に発現している遺伝子群は GO 解析により、細胞周期に重要な遺伝子群が抽出されており、これは細胞周期解析の結果と一致している。また、興味深いことに発生に重要な遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。これらの遺伝子

は他の組織幹細胞で発現するものも含んでおり、腸上皮細胞幹細胞のマーカーとなる可能性がある。

#### E. 結論

Wnt signal 依存的に GFP もしくは Gal を発現するマウスを用いて腸上皮の解析を行った。GFP (もしくは Gal) は crypt で発現しており、GFP 発現細胞は腸上皮細胞幹細胞を含む非常に未分化な細胞群であることが明らかとなった。また、網羅的遺伝子発現解析により GFP 発現細胞特異的に発現している遺伝子群を得た。この遺伝子群には発生に重要な遺伝子が多数含まれており、腸上皮幹細胞の新たなマーカーとなりうる。

#### F. 文献

1. Reya T, Clevers H: Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434: 843-850, 2005
2. Sancho E, Battle E, Clevers H: Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 695-723, 2004
3. Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H: Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 71: 28-41, 2003.
4. Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H: Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 129: 626-38, 2005
5. Moriyama A, Kii I, Sunabori T, Kurihara S, Takayama I, Shimazaki M, Tanabe H, Oginuma M, Fukayama M, Matsuzaki Y, Saga Y, Kudo A: GFP transgenic mice reveal active canonical Wnt signal in neonatal brain and in adult liver and spleen. *Genesis* 45: 90-100, 2007

#### G. 知的所有権の取得状況

- 無し
- 1. 特許取得  
無し
- 2. 実用新案登録  
無し
- 3. その他  
無し

## 上皮細胞の再生と分化における肝細胞増殖因子活性化関連因子の役割

研究協力者 片岡寛章 宮崎大学医学部病理学講座腫瘍・再生病態学分野 教授

研究要旨：消化管粘膜の再生修復において、肝細胞増殖因子 (HGF) が重要な役割を果たすことが示唆されている。HGF は間葉系の細胞から分泌され、傷害組織において HGF 活性化酵素 (HGF activator) によって非活性型から活性型へ効率良く変換される。HGF activator による HGF の活性化は細胞膜結合型インヒビターである HGF activator inhibitor type 1 (HAI-1) および HAI-2 による調節を受けており、これらの HAI も消化管上皮に強く発現している。HGF activator および HAI-1 の生体内意義を検討するために、これらの遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス) を作成し、解析をおこなってきた。その結果、炎症を伴う強い組織傷害後の再生初期段階において HGF activator が重要な役割を有すること、HAI-1 は細胞分化や形態形成において予想外の重要な機能を有している可能性があることなどを見出した。また HAI-2 の遺伝子構造について研究する過程で見出した新規ペプチド、H2RSP (HAI-2-related small peptide) の発現と機能解析を行った。H2RSP は消化管粘膜上皮細胞に強く発現しており、分子内に核移行シグナルを有していた。大腸粘膜上皮の分化・増殖停止に伴って H2RSP は核に移行した。粘膜傷害後の再生上皮細胞においては H2RSP の核移行が認められず細胞質内にとどまっており、大腸癌においては発現が有意に低下するにも関わらず、浸潤先端部で強い間質浸潤を示す癌細胞において逆に強発現しており、その局在は細胞質内に強かった。これらのことから、H2RSP の核移行は大腸粘膜上皮細胞の分化と関連しており、遊走、浸潤している上皮細胞ではその核移行が阻害されていることが分かった。

### A. 研究目的

消化管粘膜上皮の再生修復において、HGF が上皮細胞の遊走、増殖、分化に大きな役割を果たしていることが明らかになってきた。しかし、HGF は非活性型蛋白として分泌されており、傷害粘膜局所で酵素によって活性化される必要がある。我々はこれまで、血中の強力な HGF 活性化酵素である HGF activator と、その内因性阻害蛋白である HAI-1 および HAI-2 の生体内機能を明らかにするために、遺伝子改変マウスを作製し、検討してきた。また HAI-2 を研究する過程で見出した新規の核移行ペプチドである H2RSP (HAI-2-related small peptide) の大腸粘膜における発現と機能の解析も行った。

### B. 研究方法

HGF activator ノックアウトマウスおよび HAI-1 ノックアウトマウスを作成し、その解析を行った。HGF activator ノックアウトマウスにおいては、急性腸潰瘍モデル、部分肝切除モデルおよび四塩化炭素による急性肝障害モデルを作成し、組織再生における HGF activator の意義を解析した。HAI-1 ノックアウトマウスは胎盤ラビリンス形成不全で胎生致

死となったことから、HAI-1<sup>-/-</sup>ES 細胞を作成し、それを初期胚の内部細胞塊に注入することにより野生型胎盤を有し、高キメリズムの (すなわちほぼ HAI-1 がノックアウトされた) マウス胎仔を作成することを試み、これを解析した。

H2RSP の機能解析のために抗 H2RSP 抗体を作成し、正常大腸粘膜、IBD 症例の大腸粘膜、および大腸癌組織の免疫組織学的検討を行った。また、H2RSP 強制発現プラスミドおよび HAI-2 発現抑制 shRNA 発現プラスミドを作成し、培養細胞に導入してそれらの影響を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては施設の規定に従い機関承認を得た上で、動物愛護に十分考慮して行なった。また、組み換え DNA 実験に関しては、指針・法令に従い、機関承認を得たうえで規定に従って行なった。人体材料を用いた遺伝子発現検討は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、宮崎大学医学部倫理委員会の審査と承認のもとに行なった。

### C. 研究結果

HGF activator ノックアウトマウスにおいて、傷害

大腸粘膜の初期再生が遅延することはすでに報告した。今回、部分肝切除実験を行ない、その再生に対する影響を検討した。その結果、再生初期に軽度の肝再生遅延は認められるものの、コントロールマウスと比較して有意な差は見いだされなかった。しかし、四塩化炭素を用いた急性肝障害モデルを作成したところ、HGF activator ノックアウトマウスでは致死率が有意に高く、それは recombinant HGF によって改善可能であった。

HAI-1 ノックアウトマウスが胎盤機能不全により胎生致死となることから、胎盤機能のレスキューを試みた。その結果、ほぼ HAI-1 を欠損したキメラマウスが出生しうることが分り、HAI-1 ノックアウトマウスの胎生致死要因が胎盤機能不全であることが明らかとなった。しかし、生まれてきた HAI-1 欠損高キメラマウスは生後約 2 週間以内に致死となった。このことは、HAI-1 には重要な生体内機能があることを強く示唆している。今後、腸管特異的コンディショナルノックアウトマウスを作成する予定であり、現在その作業を進めている。

HAI-2 の遺伝子構造を解析する過程で見出した H2RSP は、核移行ペプチドであり、消化管上皮に強く発現し、上皮細胞の分化に伴い核に移行した。更に、H2RSP の強制発現は細胞増殖能を低下させた。IBD 大腸粘膜において再生中の上皮においては、この核移行は観察されなかった。一方で大腸癌細胞では H2RSP の発現そのものが低下していた。しかし浸潤先端部の癌細胞においては、特に sprouting を示す細胞で H2RSP 発現が亢進しており、その局在は再生上皮細胞と同様に主に細胞質に認められた。更に大腸癌浸潤先端部における H2RSP 陽性細胞の数が多い症例では、有意にリンパ節転移が多かった。

#### D. 考察

強い炎症や組織傷害後の上皮細胞再生には HGF activator が大きな役割を果たしていることが消化管粘膜のみならず、肝再生モデルでも確認できた。海外他施設との共同研究では肺障害後の再生にも関与している可能性を示唆する結果も得られており、これらのことは、recombinant HGF activator の治療応用に希望をいだかせるものである。

HAI-1 ノックアウトマウスの胎生致死要因は、胎盤機能不全によるものであることが今回の胎盤レスキュー実験で明白となった。しかしながら出生した HAI-1 欠損キメラマウスは出生後発育遅延を呈し、生後約 2 週間で致死となった。現在その要因を検索中である。しかし、今回のモデルでは腸管における HAI-1 の機能を詳細に検討することは不可能であり、腸管特異的 HAI-1 conditional KO マウスの作成作業をすすめている。

H2RSP は核移行蛋白質であり、腸管上皮細胞の分化

と共に核に移行することが示された。また、H2RSP の強制発現が細胞増殖を抑制したことから、H2RSP は粘膜上皮細胞の増殖と分化に関与していることが強く示唆される。IBD 患者における再生大腸粘膜においては H2RSP の上皮細胞への核移行が抑制されており、今後、H2RSP の機能解明をすすめる必要がある。

#### E. 結論

HGF activator は、強い傷害をうけた組織の再生において重要な役割をもつ。今後、recombinant HGF activator の治療への応用を図っていく必要がある。

HAI-1 は生体において、まだよく理解されていない重要な役割を有している可能性がある。今後の解明のために、conditional KO マウスの作成が必要である。

H2RSP の核移行は消化管上皮の分化と増殖の制御に関与する可能性がある。

#### F. 文献

Uchinokura S, Miyata S, Fukushima T, Itoh H, Nakano S, Wakisaka S, Kataoka H: Role of hepatocyte growth factor activator (HGF activator) in invasive growth of human glioblastoma cells in vivo. *Int. J. Cancer*, 118:583-92 (2006).

Naganuma S, Itoh H, Uchiyama S, Nagaïke K, Tanaka H, Akiyama Y, Chijiwa K, Kataoka H: Nuclear translocation of H2RSP is impaired in regenerating intestinal epithelial cells of murine colitis model. *Virchows Archiv*, 448:354-360 (2006).

Marchand-Adam S, Fabre A, André Mailleux A, Marchal J, Quesnel C, Kataoka H, Aubier M, Dehoux M, Soler P, Crestani B: Defect of pro-hepatocyte growth factor activation by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J. Respr. Crit. Care Med.*, 174:58-66 (2006).

Akiyama Y, Nagai M, Komaki W, Marutsuka K, Asada Y, Kataoka H: Expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in endothelial cells. *Hum Cell*, 19:91-97 (2006).

Hallikas OT, Aaltonen JA, von Koskull H, Lindberg L-A, Valmu L, Kalkkinen N, Washlstro T, Kataoka H, Andersson L, Lindholm D, Schroer J: Identification of antibodies against HAI-1 and integrin  $\alpha 6 \beta 4$  as immunohistochemical markers of human villous cytotrophoblast. *J. Histochem Cytochem.*, 54:745-752 (2006).

Sasaki M, Ikeda H, Kataoka H, Nakanuma Y: Augmented expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in intrahepatic small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Virchows Arch.*, 449(4):462-471 (2006)

Uchiyama S, Itoh H, Naganuma S, Nagaïke K, Fukushima T, Tanaka H, Hamasuna R, Chijiwa K, Kataoka H: Enhanced expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2-related small peptide (H2RSP) at the invasive front of colon cancers. Gut, 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  
なし

## 骨髄不全ラット DSS 腸炎における骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 治療

分担研究者 今井浩三 札幌医科大学 学長

研究要旨：本研究は、外因性 MSC が、骨髄不全実験腸炎モデルの傷害腸管において、腸上皮細胞に取って代わることを初めて直接証明した。同モデルにおける DSS 感受性および腸炎の発症、修復過程に MSC が密接な関わりをもつことを初めて明らかにした。以上より、外因性 MSC は、抗炎症作用というよりは、本来の腸上皮細胞が有する腸上皮統合性維持に何らかの重要な役割を果たすことが示唆された

### 共同研究者

矢花 崇 有村佳昭 後藤 啓  
中原生哉 田中道寛 篠村恭久

### 所属

札幌医科大学第1内科

*tnf $\alpha$* , *il1 $\beta$* , *inf $\gamma$* , *il10* mRNA 発現量には有意差が認められなかった。さらに、レシピエント大腸組織を抗 eGFP 蛍光抗体で免疫染色した結果、腸上皮細胞に、eGFP の発現が認められた。

### D. 考察

本研究は、外因性 MSC が、骨髄不全実験腸炎モデルの傷害腸管において、腸上皮細胞に取って代わることを初めて直接証明した。この際、本来 MSC が有する強力な免疫抑制機能を喪失していることが、Th1 サイトカイン mRNA 測定から示唆された。このことより、生着した MSC は、腸上皮細胞に分化、もしくは腸上皮細胞と細胞融合することによって、新たに腸上皮細胞として再プログラム化され、腸上皮細胞機能を獲得する一方で、MSC 本来の免疫抑制機能を喪失したものと推測された。

次に、同モデルにおける DSS 感受性および腸炎の発症、修復過程に MSC が密接な関わりをもつことを初めて明らかにした。以上より、外因性 MSC は、抗炎症作用というよりは、本来の腸上皮細胞が有する腸上皮統合性維持に何らかの重要な役割を果たすことが示唆された。

### E. 結論

実験腸炎モデルにおける MSC の治療効果が初めて確認され、さらに、外因性 MSC が腸上皮細胞に直接取って代わることを証明した。その機序として、MSC の腸上皮細胞への分化、もしくは腸上皮細胞との細胞融合が考えられた。MSC が腸上皮細胞に取って代わり、MSC 本来の機能を失い、新たに腸上皮細胞としての機能を獲得するという興味深い現象の機序解明が、腸管修復過程における骨髄の役割の解明への第一歩となると考えられた。

またドナー由来 (外因性) MSC が骨髄不全状況下における実験腸炎モデルに対して、治療効果を認めたこ

### A. 研究目的

間葉系幹細胞 (MSC) は、再生医療の細胞のソースとして有力視されている。骨髄不全ラット DSS 腸炎モデルにおける、細胞治療としての MSC の効果を検討し、腸管におけるドナー由来の MSC の有無を検討した。

### B. 研究方法

ラット MSC を分離・培養した。Balb/c マウスおよび Lewis ラットにブスルファン (BU) 単回投与による急性骨髄不全モデルを作成し 1%DSS を自由飲水させ腸炎を誘発。後者では day7 に、MSC を  $10^4/g$  を静注し、その治療効果を生存期間、体重変化、腸管長、組織学的スコア、*tnf $\alpha$* , *il1 $\beta$* , *inf $\gamma$* , *il10* mRNA 発現量などにより判定した。次に eGFP トランスジェニックラットより分離培養した MSC (以下 eGFP-labeled MSC) 移植を施行。ドナー由来 MSC は、レシピエントの大腸組織切片を用いた抗 eGFP 蛍光抗体による免疫染色法により同定した。

(倫理面への配慮) 札幌医科大学動物実験の指針に則り行われた。

### C. 研究結果

BU 誘導急性骨髄不全モデルにおいては、DSS 腸炎に対する感受性が亢進した。急性骨髄不全モデルに惹起した 1%DSS 腸炎に対し eGFP-labeled MSC を移植した結果、体重変化、腸管長、組織学的評価において、MSC 投与群の治療効果は有意であった。しかし、

とにより、今後 MSC 治療が炎症性腸疾患に対する、新たな可能性を秘めた治療法となることが期待された。

F. 文献

1) Le Blanc K, Ramusson I, Sundberg B, et al. Lancet 2004;363:1439-1441.

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



## 腸管粘膜再生における上皮分化シグナル制御の解析

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：本研究では炎症性腸疾患病変部における特異的な上皮分化様式を端緒に、ヒト腸管上皮再生における分化調節を司る分子機構の解析を行なった。腸管上皮における特異的分子発現および発現制御機構に関する我々独自の解析手法と知見を駆使することにより、腸管上皮の分化制御と増殖調節を単一のシグナルが異なる分子のタンパク分解により相反的に制御する画期的事実を明らかとした。さらに同制御システムの中心的分化促進遺伝子 ATOH1 の発現調節に関わる Notch シグナルもまたヒト腸管上皮分化制御の中心的制御系である事を明らかとのみならず、炎症性腸疾患を特徴づける特異的分化様式を決定するシグナル経路である事を明らかとした。これらの成果は、難治性炎症性腸疾患における上皮再生不全を分子生物学的手法を用いて解明したのみならず、特定のシグナル分子を標的とした分化/増殖調節による上皮再生誘導療法など、従来の免疫調節を標的とした治療と全く異なるアプローチによる画期的な炎症性腸疾患治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 土屋輝一郎 金井隆典

### 所属

東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

Regulatory Factor (IRF) ファミリー転写因子群による極めてユニークな転写制御機構が関与することを明らかとした (Mol Cell Biol 2004)。このように腸管炎症を制御する細胞内シグナルと上皮細胞分化を統合する独創的な視点から、腸管における杯細胞機能の重要性に注目し、画期的な成果をあげてきた。本研究ではこれまでの研究成果を発展させ、1) 杯細胞の増殖および分化の調節を司る分子機構の解明 2) 炎症性腸疾患における杯細胞の分化調節異常の分子機構の解明、を行なうことを目的とした。

### B. 研究方法・結果

1) ヒト大腸癌由来培養細胞における強制発現系を用いて、杯細胞分化のマスター遺伝子 ATOH1 がユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解調節により制御されている事を明らかとした。さらに同分解機構は Wnt-GSK3 $\beta$  によるリン酸化により制御されており、GSK3 $\beta$  の既知の基質タンパクである  $\beta$ -catenin と相反的に分解制御されることにより、細胞内の遺伝子発現プロファイルを転写レベルで包括的に制御し、個々の細胞が増殖するか、杯細胞へと分化するか、いずれかの運命決定のスイッチングを行なっている事を示した。

2) 細胞分化制御シグナル系として知られる Notch シグナルの構成分子の発現を、ヒト腸管正常組織及び潰瘍性大腸炎患者の病変部組織を用いて免疫組織学的に解析した。さらにヒト大腸癌由来培養細胞株に於ける誘導発現系を用いて Notch シグナル活性化

### A. 研究目的

本研究は代表者らがこれまでの研究成果から確立した独自の解析手法を用い、腸管粘膜上皮に内在する上皮増殖/分化制御および炎症性腸疾患に於ける分化異常を司る分子機構の解明と、それを利用した難治性炎症性腸疾患に対する粘膜再生誘導療法の確立を目指すものである。炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）は我が国でも患者数が急速に増加しつつある疾患であり、症例数の増加とともに難治症例も急速に増加している。難治症例を特徴づける病態として、遷延する慢性腸管炎症の他に粘膜上皮再生機構の破綻が深く関与することが挙げられる。このような粘膜上皮の再生異常が遷延することは長期的には Colitic cancer の発症と密接に関わる事から、上皮再生機構の解明と再生修復を促進する治療法の開発は急務と考えられるが、その詳細な分子機構はいまだ全く解明されていない。しかしながら、代表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とし (Nat Med 2002)、腸管上皮再生研究において世界的に高い評価を獲得してきた。さらに、腸管上皮における杯細胞によるサイトカイン分泌調節機構の解析から Interferon

が大腸上皮細胞分化に与える影響を、杯細胞特異的遺伝子 MUC2 の mRNA およびタンパクレベルの発現を比較する事により解析した。その結果、a) ヒト小腸および大腸粘膜に於いて、活性型 Notch 及びその標的遺伝子 Hes1 は陰窩内の上皮細胞に局限して発現が確認された。b) 潰瘍性大腸炎病変部の陰窩においては杯細胞の著しい減少と一致して同部位の上皮における Notch の広範な活性化が確認された c) ヒト大腸癌由来細胞株に強制的に Notch 活性化を誘導する事により、杯細胞特異的遺伝子 MUC2 の mRNA およびタンパク発現の著しい現象が誘導されたのみならず、杯細胞の特異的機能である粘液分泌能に於いても著しい低下が確認された。

#### (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) ヒト腸管における杯細胞の分化/増殖の運命決定に Wnt-GSK $\beta$  経路の活性化が主たる役割を担っており、その下流で杯細胞分化を促進する ATOH1 遺伝子がタンパク分解機構により機能制御されていることが明らかとなった。このことは従来単に増殖促進に働くと考えていた Wnt-GSK $\beta$  経路が、腸管上皮細胞に於いては分化制御にも積極的に関与するのみならず、単一分子のキナーゼ活性を調節し、その基質タンパクの切り替えにより増殖と分化の分岐を制御するという、革新的な概念を提示し、実験的に示し得た。Wnt-GSK $\beta$  経路は大腸がんにおける機能のみならず、正常組織における上皮幹細胞形質維持に必須のシグナルとして近年急速に研究が進展しており、本研究の成果は Wnt-GSK $\beta$  経路が未分化性の維持だけでなく積極的な分化に細胞運命が転換する局面に於いても重要な機能を発揮し得る事も明らかとした。

2) Notch シグナルによる分化制御はマウス神経、血液、皮膚、内耳等で研究が進展しているものの、腸管に於ける機能の解明は未だわずかである。本研究による成果は a) ヒト腸管で同シグナル経路が存在し、かつ成熟過程の上皮細胞に於いて活性化している b) ヒト腸管疾患における特徴的な病理像の形成に中心的な機能を発揮し、病態形成に必須の機能を有する。

c) ヒト腸管上皮を構成する代表的細胞系譜である杯細胞に特異的な遺伝子発現と粘液再生能を調節する分子機能を有するという新たな知見をもたらしたのみならず、これまで全く明らかとされて来なかった炎症性腸疾患における上皮分化異常が、単一分子の活性化により再現し得る事を示したという点で画期的な成果を示し得た。これらの成果は Notch シグナルが炎症性腸疾患における上皮分化/再生機構を解析する上で重要なシグナル経路である事を明確にし、かつ同シグナルの調節が杯細胞分化に直結し得る事から、同シグナルを標的とした分子標的治療が粘膜再生治療に発展し得る可能性を示した。

#### D. 結論

極めて短期間に組織更新を続け、適切なタイミングにおける細胞増殖と分化の切り替えおよび細胞運命の決定に、Wnt-GSK $\beta$  経路および Notch 経路のいずれもがそれぞれ異なる分子機構により重要な機能を果たしている事を明らかとした。いずれの経路も炎症性腸疾患の病態と腸管粘膜の恒常性維持、局所免疫の調節に重要な細胞系譜である杯細胞の分化調節を担っており、特に Notch 経路に於いては炎症性腸疾患の病態形成に直接関与する可能性が示された。これらの成果から、炎症性腸疾患における上皮の増殖/分化制御機構が分子レベルで理解が可能となり、細胞の増殖促進と適切な系列細胞への分化誘導を人為的に制御し、腸管上皮の再生と早期の機能回復を図る粘膜再生治療の確立の基盤となる分子標的が明らかとなった。いずれの成果も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し、新規治療法の開発につながる病態の解明に著しく貢献し得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. 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<sup>high</sup>CD62L<sup>-</sup> effector-memory T cells. *Am J Physiol.* 290: G1051-G1058, 2006.
2. Fujii R, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Oshima S, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Watanabe M: FTY720 suppresses CD4+CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>-</sup> effector memory T cell-mediated colitis. *Am J Physiol.* 291: G267-G274, 2006.
3. Kanai T, Hibi T, Watanabe M: The Logics of leucocytapheresis as a natural biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Expert Opin*

- Biol Ther. 6:453-466, 2006.
4. Okamoto R, Matsumoto T, Watanabe M: Regeneration of the intestinal epithelia: Regulation of bone marrow-derived epithelial cell differentiation towards secretory lineage cells. *Human Cell*. 19:71-75, 2006.
  5. Kanai T, Kawamura T, Dohi T, Makita S, Nemoto Y, Totsuka T, Watanabe M: Th1/Th2-mediated colitis induced by adoptive transfer of CD4+CD45RBhigh T lymphocytes into nude mice. *Inflamm Bowel Dis*. 12:89-99, 2006.
  6. Kanai T, Watanabe M: Do fatty acids influence functions of intestinal dendritic cells? *J Gastroenterol*. 41:288-289, 2006.
  7. 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*. 21:1136-1142, 2006.
  8. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of Hath1 and  $\beta$ -catenin by Wnt-glycogen synthase kinase 3  $\beta$  in human colon cancer. *Gastroenterology*. 132:208-220, 2007.
  9. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology*. 132:176-189, 2007.
  10. Kanai T, Makita S, Kawamura T, Nemoto Y, Kubota D, Totsuka T, Watanabe M: Leukocytapheresis therapy for ulcerative colitis; extracorporeal anti-TNF- $\alpha$  therapy for the selective elimination of TNF- $\alpha$ -producing CD14dullCD16+ monocytes. *Inflam Bowel Dis*. (in press)
  11. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis running title: IL-7-dependent colitis. *J Immunol*. (in press)
  12. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Yamamoto M, Kiyono H, Watanabe M: Intestinal Lamina Propria Retaining CD4+CD25+ Regulatory T Cells Is A Suppressive Site of Intestinal Inflammation. *J Immunol*. (in press)
2. 学会発表
1. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of Hath1 and  $\beta$ -catenin by Wnt-GSK3 in colonocyte differentiation and proliferation. *Keystone symposia; Wnt signaling*. Salt Lake, UT, USA, 2006. 4. 10.
  2. Yoshioka A, Oshima S, Tsuchiya K, Namiki S, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: IRF-1 mediates innate immune response of intestinal epithelial cells by regulating the concerted expression of immunosubunits and TLR3. *DDW 2006*. Los Angeles, CA, USA, 2006. 5. 21.
  3. Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Kanai T, Watanabe M: Double-Balloon Enteroscopy: First one year experience and modified technique (double-over tube method). *DDW 2006*. Los Angeles, CA, USA, 2006. 5. 22.
  4. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of Hath1 and  $\beta$ -catenin by WntGsk3 in colonocyte differentiation and proliferation. *DDW 2006*. Los Angeles, CA, USA, 2006. 5. 22.
  5. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Fujii R, Okamoto R, Totsuka T, Watanabe M: Bone marrow latently retaining colitogenic CD4+T cells may be a pathogenic reservoir for lifelong chronic colitis. *DDW 2006*. Los Angeles, CA, USA, 2006. 5. 22.
  6. Okamoto R, Nakamura T, Oshima S, Tsuchiya K, Kanai T, Watanabe M: Constitutively activated notch signaling suppresses goblet cell phenotype in human intestinal epithelial cells. *DDW 2006*. Los Angeles, CA, USA, 2006. 5. 22.
  7. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Ito Y, Onizawa M, Totsuka T, Watanabe M: Regulation of intestinal inflammation by lamina propria CD4+CD25+/BrightT cells. *DDW 2006*. Los Angeles, CA, USA, 2006. 5. 23.
  8. Kanai T, Fujii R, Nemoto Y, Makita S, Totsuka T, Watanabe M: Fty720 suppresses CD4+CD44HighCD621-effector memory T cell-mediated colitis. *DDW 2006*. Los Angeles, CA, USA, 2006. 5. 23.
  9. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Yamazaki M, Makita S, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and persistence of chronic colitis. *DDW 2006*. Los Angeles, CA, USA, 2006. 5. 24.
  10. Watanabe M: Bone marrow-derived cells in the human intestinal epithelium. *AGA Stem Cells in Gastrointestinal Development, Regeneration and Neoplasia Symposium*. Washington, D. C. , USA, 2006. 9. 9.

11. Kanai T, Watanabe M: Uniqueness of colitogenic lamina propria CD4+ T cells for the perpetuation of colitis. First Japan - Korea IBD Symposium. Seoul, Korea, 2006. 9. 23.
  12. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Watanabe M: Bone marrow latently retaining colitogenic memory CD4+ T Cells may be a pathogenic Reservoir for Lifelong Chronic Colitis. First Japan - Korea IBD Symposium. Seoul, Korea, 2006. 9. 23.
  13. Watanabe M: Ulcerative colitis: A disorder of epithelial cell differentiation? Cleveland Clinic Foundation Special Combined Lecture. Cleveland, OH, USA, 2006. 11. 9.
  14. 渡辺 守: 炎症性免疫疾患に対する白血球除去療法. 第 103 回日本内科学会 講演会. 横浜, 2006. 4. 16.
  15. 久保田大輔, 金井隆典, 渡辺 守: 日本人 IBD 患者に対する 6-MP/AZA 投与の安全性の検討. 第 92 回日本消化器病学会. 小倉, 2006. 4. 20.
  16. 戸塚輝治, 金井隆典, 根本泰宏, 伊藤ゆみ, 蒔田新, 藤井 玲, 鬼澤道夫, 八木田秀雄, 渡辺 守: 慢性大腸炎における Regulatory T 細胞の RANK/RANKL 分子の役割. 第 92 回日本消化器病学会. 小倉, 2006. 4. 21.
  17. 蒔田 新, 金井隆典, 根本泰宏, 伊藤ゆみ, 戸塚輝治, 藤井 玲, 鬼澤道夫, 渡辺 守: 腸間膜リンパ節・パイエル板欠損マウスは慢性大腸炎を発症する. 第 92 回日本消化器病学会. 小倉, 2006. 4. 21.
  18. 金井隆典, 根本泰宏, 蒔田 新, 鬼澤道夫, 伊藤ゆみ, 富田貴之, 岡本隆一, 土屋輝一郎, 戸塚輝治, 渡辺 守: 慢性大腸炎の骨髄に存在する腸炎惹起性 CD4+T 細胞. 第 43 回日本消化器免疫学会総会. 青森, 2006. 8. 4.
  19. Tsuchiya K, Oshima 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. The 16th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP' 06). 箱根, 2006. 8. 31.
  20. Kanai T, Makita S, Nemoto K, Tsuchiya K, Totsuka T, Watanabe M: Intestinal lamina propria CD4+CD25+regulatory T cells suppress the development of colitis in lymphotoxin a deficient mice lacking mesenteric lymph nodes. The 16th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP' 06). 箱根, 2006. 8. 31.
  21. Watanabe M: Crossing between mucosal immunity and epithelial regeneration/differentiation in the human intestine. The 16th International Symposium on Regulatory Peptides (REGPEP' 06). 箱根, 2006. 9. 1.
  22. 渡辺 守: 腸管における上皮分化・再生と癌のスイッチ. 第 44 回日本癌治療学会総会. 東京, 2006. 9. 4.
  23. 土屋輝一郎, 岡本隆一, 渡辺 守: Hath1 を介した Wnt/Notch シグナルにおける腸管再生機構解析. 第 48 回日本消化器病学会・第 10 回日本肝臓学会合同. 札幌, 2006. 10. 11.
  24. 根本泰宏, 金井隆典, 蒔田 新, 岡本隆一, 戸塚輝治, 渡辺 守: 骨髄は慢性大腸炎モデルマウスにおいて病原性 T 細胞のリザーバーとして機能する. 第 48 回日本消化器病学会. 札幌, 2006. 10. 12.
  25. 蒔田 新, 金井隆典, 根本泰宏, 伊藤ゆみ, 鬼澤道夫, 戸塚輝治, 渡辺 守: CD4+CD25+制御性 T 細胞は腸間膜リンパ節欠損マウスに発症する慢性大腸炎を抑制する. 第 48 回日本消化器病学会. 札幌, 2006. 10. 12.
  26. 久保田大輔, 金井隆典, 渡辺 守: 潰瘍性大腸炎に対するシクロスポリン 静注療法の効果予測. 第 48 回日本消化器病学会・第 72 回日本消化器内視鏡学会合同. 札幌, 2006. 10. 12.
  27. 荒木昭博, 土屋輝一郎, 渡辺 守: オーバーチューブ把持装置を用いないダブルバルーン内視鏡一人法手技の開発. 第 48 回日本消化器病学会・第 72 回日本消化器内視鏡学会合同. 札幌, 2006. 10. 12.
  28. 岡本隆一, 土屋輝一郎, 渡辺 守: 上皮細胞の分化制御を利用した粘膜再生治療への試み. 第 48 回日本消化器病学会. 札幌, 2006. 10. 13.  
土屋輝一郎, 荒木昭博, 渡辺 守: 当院における小腸病変の内視鏡所見と潰瘍の形態からみた体系化への試み. 第 48 回日本消化器病学会・第 72 回日本消化器内視鏡学会合同. 札幌, 2006. 10. 13.
- 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