

炎症性腸疾患に対する薬剤の内視鏡的消化管粘膜下注入療法の開発

分担研究者 鈴木 健司 新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野 助手

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

次に、我々は既存の薬剤を新しいコンセプトで IBD 治療法とすることを目的として、マスト細胞の安定化剤であるトラニラストの内視鏡下大腸粘膜下注腸療法を試みた。rhHGF の大腸粘膜下注入療法の場合と同様に、極細径内視鏡を用いてトラニラストの大腸粘膜下注入を DSS 腸炎ラットに行い、本療法が DSS 腸炎に対して腸炎予防効果を有することを示した。

我々が開発した薬剤の内視鏡的消化管粘膜下注入手技は、種々の薬剤を腸管局所に効率よく到達・作用させる理想的な治療法となる可能性が示唆された。今後は新規薬剤と本治療手技を用いて、炎症性腸疾患に対する画期的な治療法開発を進める予定である。

共同研究者 河内裕介、孫曉梅
新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野

本年度は上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立を目指したプロジェクトの一環として、rhHGF の腸炎予防効果および治療効果を検討した。

また、既存の薬剤を新しいコンセプトで IBD 治療法とするプロジェクトの一環として、トラニラストの大腸粘膜下注入療法の可能性についても検討した。

A. 研究目的

炎症性腸疾患に対する既存の治療法に限界がみられることから、従来の治療法とは異なった画期的な治療法の開発が求められている。特に粘膜再生療法が従来の治療法を補う新規治療法として期待されている。多くの細胞増殖因子の内、とりわけ本邦で発見された肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) を用いた粘膜再生療法が注目されている。

我々はこれまで HGF の遺伝子ベクターあるいは遺伝子組み換え型ヒト HGF (rhHGF) による腸炎治療効果を示し¹⁾、さらにこれら薬剤の内視鏡的消化管粘膜下注入療法が炎症性腸疾患の画期的な治療法となり得ることを示してきた。

F. 研究方法

1). 大腸内視鏡下 rhHGF 注入実験

20 週齢オス Wistar/ST ラットに 5%DSS を 7 日間自由飲水させ腸炎を惹起した。予防実験では実験開始後 0 日に、治療実験では腸炎惹起後 3 日に、経肛門的に挿入した極細径内視鏡より局注針を用いて 4 箇所(遠位大腸粘膜下)に、rhHGF を注入した。注入後より 7 日まで経過観察し腸炎治療効果を判定した。

対照には無治療ラットを用いた。経時的に症状、大腸腸管長を観察し、定量 RT-PCR による大腸組織のサイトカイン発現解析、HE 染色標本の光学顕微鏡観察に

よる組織学的解析、免疫蛍光法による大腸浸潤細胞のフェノタイプ解析とそのサイトカイン発現の解析、Ki67 染色による上皮細胞の増殖期解析、TUNEL 法によるアポトーシス解析を行った。

2). 大腸内視鏡下トラニラスト注入実験

20 週齢オス Wistar/ST ラットに 5%DSS を 7 日間自由飲水させ腸炎を惹起した。予防実験として実験開始後 0 日に、経肛門的に挿入した極細径内視鏡より局注針を用いて 4 箇所の大腸粘膜下に、トラニラスト溶液を注入した。注入後より 7 日まで経過観察し、rhHGF 治療実験同様の解析を加え腸炎治療効果を判定した。

(倫理面への配慮)

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

G. 研究結果

1). 大腸内視鏡下 rhHGF 注入実験

DSS 腸炎ラットに対する極細径内視鏡を用いた rhHGF の大腸粘膜下注入療法は、腸炎予防効果が得られることが明らかとなった。すなわち rhHGF 治療ラットは、無治療ラットに比べ、臨床重症度、大腸腸管長、組織学的病変の強さ、浸潤細胞数、炎症性サイトカイン産生の抑制と抗炎症性サイトカイン産生、いずれにおいても有意差をもって予防効果が示された。さらに、Ki67 陽性の増殖細胞の増加と TUNEL 陽性のアポトーシス細胞の減少が、大腸腸上皮細胞において認められた。また、DSS 腸炎発症ラットに対する rhHGF 治療実験も、予防投与実験結果と同様に有意差を持って有効であった。

2). 大腸内視鏡下トラニラスト注入実験

大腸内視鏡下トラニラスト注入を、腸炎惹起と同時に予防的に加えた場合、治療ラットは、無治療ラットに比べ、臨床重症度、大腸腸管長、組織学的病変の強さ、浸潤細胞数、炎症性サイトカイン産生の抑制と抗炎症性サイトカイン産生、いず

れにおいても有意差をもって予防効果が示された。

H. 考察

rhHGF の内視鏡による腸管局所投与治療法は、標的臓器へ直接薬剤を到達させることができ、全身への薬剤移行は殆ど生じない。本治療法は HGF の副作用発現の危険性を最小限に留め、現時点で臨床応用可能な治療法となりうると考えられた。現在、劇症肝炎に対して rhHGF による臨床治験が行われており、炎症性腸疾患に対しても rhHGF による粘膜再生療法の治験が近日中に開始されることが期待されている。今後は rhHGF の大腸粘膜下注入療法も一つの投与経路として検討していきたい。

また、トラニラストはアレルギー性疾患や手術後ケロイド治療のための確立されたしかも安価な薬剤である。トラニラストの内視鏡的腸管粘膜下注入療法は、実験的に腸炎予防効果を有することが今回明らかとなり、既存の安価な薬剤であるトラニラストが新たな IBD 治療法となりうる可能性が示唆された。今後は、本治療法の腸炎予防効果のみならず治療効果に対する検討と、その作用機序の解明が必要である。

I. 結論

rhHGF およびトラニラストの内視鏡的消化管粘膜下注入療法は、臨床応用可能な炎症性腸疾患の画期的治療法となりうる可能性が示された。

我々が開発した薬剤の内視鏡的消化管粘膜下注入手技は、種々の薬剤を腸管局所に効率よく到達・作用させる理想的な治療法となる可能性が示唆された。今後は新規薬剤と本治療手技を用いて、炎症性腸疾患に対する画期的な治療法開発を進める予定である。

J. 参考文献

1) Hanawa T, Suzuki K, Kawauchi Y,

Takamura M, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Asakura H, Miyazaki J, Maruyama H, Aoyagi Y: Attenuation of mouse acute colitis by hepatocyte growth factor gene transfer into the liver. *J Gene Med* 8:623-635, 2006.

K. 健康危険情報
該当なし。

L. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hanawa T, Suzuki K, Kawauchi Y, Takamura M, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Asakura H, Miyazaki J, Maruyama H, Aoyagi Y: Attenuation of mouse acute colitis by hepatocyte growth factor gene transfer into the liver. *J Gene Med* 8:623-635, 2006.
- 2) Han GD, Suzuki K, Koike H, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, Shimizu F, Kawachi H: IFN-inducible protein-10 plays a pivotal role in maintaining slit-diaphragm function by regulating podocyte cell-cycle balance. *J Am Soc Nephrol.* 17, 442-453, 2006.
- 3) Kawauchi Y, Suzuki K, Watanabe S, Yamagiwa S, Yoneyama H, Han GD, Palaniyandi SS, Veeraveedu PT, Watanabe K, Kawachi H, Okada H, Shimizu F, Asakura H, Aoyagi Y, Narumi S. Role of IP-10/CXCL10 in the progression of pancreatitis-like injury in mice after murine retroviral infection. *Am J Physiol Gastroenterol Liver Physiol* 291:345-354, 2006.
- 4) Takamura M, Matsuda Y, Yamagiwa

S, Tamura Y, Honda Y, Suzuki K, Ichida T, Aoyagi Y: An inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, SP600125, protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic failure by modulating BH3-only proteins. *Life Sci.* Published Online:20 Jan 2007.

2. 学会発表

- 1) Palaniyandi SS, Suzuki K, Kawauchi Y, Veeraveedu PT, Fujii M, Yamagiwa S, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Okada Y, Shimizu F, Watanabe K, Hosono M, Asakura H, Aoyagi Y, Narumi S. Blockade of IFN-g-inducible protein-10 ameliorates chronic experimental colitis by blocking cellular trafficking and protecting intestinal epithelial cells. Falk Symposium 151, Sydney, 2006年3月24-25日.
- 2) Palaniyandi SP, Watanabe K, Ma M, Veeraveedu PT, Kamal FK, Suzuki K, Kawauchi Y, Fujii M, Hosono M. Role of mast cells in acute colitis. Falk Symposium 151, Sydney, 2006年3月24-25日.
- 3) Kawauchi Y, Suzuki K, Takamura M, Yoneyama H, Maruyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Miyazaki J, Asakura H, Aoyagi Y. Attenuation of mouse DSS colitis by naked hepatocyte growth factor gene transfer into the liver. DDW2006, Los Angeles 2006年5月22日
- 4) 孫曉梅, 鈴木健司, 河内裕介, Veeraveedu PT, SureshPS, 藤井庄人, 馬梅蕾, 河内裕, 細野正道, 朝倉均, 青柳豊, 渡辺賢一. 実験腸炎における肥満細胞の役割. 第43回日本消化器免疫学会, 弘前, 2006年8月4日.

5) 河内裕介, 鈴木健司, 孫曉梅, 韓基東, 河内 裕, 宮崎純一, 朝倉 均, 青柳 豊. 内視鏡を用いたラット DSS 腸炎に対する HGF 遺伝子導入の試み. 第 43 回日本消化器免疫学会, 弘前, 2006 年 8 月 4 日.

6) 鈴木健司, 河内裕介, 青柳豊. 肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発: 遺伝子治療と遺伝子組み換え型ヒト HGF 治療法開発の現状. 日本消化器病学会大会 2006, 札幌, 2006 年 10 月 13 日

M. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得: 該当なし。
2. 実用新案登録: 該当なし。
3. その他: 該当なし。

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発生工学分野 教授

研究要旨：腸管免疫系において重要な役割を果たすことが近年明らかになってきた TLR を介した自然免疫系の活性化の制御機構を解析した。その結果、TLR を介した NF- κ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子が存在し、遅期誘導型遺伝子の発現を核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が抑制することを見出した。さらに、早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子の発現誘導機構を解析した。早期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が常に開いており転写制御因子が刺激後迅速にアクセスしやすい構造となっている。一方、遅期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激により構造変換を受けて開き、転写制御因子がアクセスできるようになる。このことが、遺伝子発現に時間を要する原因であることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子のプロモーターのクロマチン構造変換に関わる分子として、I κ BNS と同じ I κ B 分子 I κ Bzeta を同定した。今後も、自然免疫系の活性制御機構を解析し、新規アジュバントの開発に向けた基礎的基盤を提供したい。

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しぼることにより、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過程で、大腸に局在する自然免疫担当細胞は、TLR 刺激に不応答になっていることを見出し、さらにこれら細胞に選択的に発現している遺伝子として I κ BNS を同定した。そして、I κ BNS の機能解析から、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型と遅期誘導型があり、I κ BNS は遅期誘導型の遺伝子発現の

NF- κ B の活性を制御することにより抑制していることを見出している。

そこで、自然免疫系の活性制御機構をさらに解析するため、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。まず、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、TRIF 依存性のシグナルが入る状況で早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子発現を解析した。さらに、早期誘導型遺伝子として MIP2 遺伝子、遅期誘導型遺伝子として Lcn2 遺伝子を代表とし、各遺伝子プロモーターへの転写制御因子群のリクルートをクロマチン免疫沈降法で解析した。また、各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。

また、同じ核に発現する I κ B 分子 I κ Bzeta の遅期誘導型遺伝子の発現誘導における役割を解析した。

(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

MyD88 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子の発現は障害されている。しかし、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 刺激すると TRIF 依存性の一見無意味なシグナルが活性化される。そこで、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、早期誘導型と遅期誘導型の各遺伝子の mRNA の発現誘導をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、遅期誘導型の遺伝子は MyD88 欠損マクロファージでは全く誘導されないが、早期誘導型の遺伝子はかなり減弱しているもののかすかに誘導された。このかすかな早期誘導型遺伝子の発現は、MyD88/TRIF 二重欠損マクロファージでは全く認められなかった。このように、早期誘導型遺伝子は、極めて発現誘導されやすく、一見無意味なシグナルが入ることによって、かすかに誘導されることが明らかになった。次に、早期誘導型、遅期誘導型遺伝子としてそれぞれ MIP2, Lcn2 遺伝子を代表として取り上げ、各遺伝子プロモーターへの、NF- κ Bp65 サブユニット、RNA polymerase II, TBP のリクルートをクロマチン免疫沈降法により解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターへのこれら転写制御因子群のリクルートは刺激後 180 分より認められ、MyD88

欠損マクロファージでは全く認められない。一方、早期誘導型遺伝子のプロモーターへは、刺激後 15 分ときわめて早い時間から認められ、さらに MyD88 欠損マクロファージでも有意に認められた。この結果から、早期誘導型遺伝子のプロモーターは、転写制御因子がきわめてアクセスし易い状態であることが明らかになった。

そこで、次に各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターではヒストン H3 のメチル化は認められず、TLR 刺激 180 分から観察された。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターでは、メチル化が刺激以前から常に見られた。この結果から、早期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が常に開いた状況にあり、その結果転写制御因子がアクセスし易く、遺伝子発現が早期に誘導されることが明らかになった。一方、遅期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激によって構造変換を受け、転写制御因子がアクセスされやすくなること、そしてこのことが、遺伝子発現が遅れるメカニズムであることが明らかになった。

次に、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造変換に関与する分子について解析を行った。これまでに I κ BNS と同じ核に発現する I κ B 分子である I κ Bzeta が遅期誘導型遺伝子の発現に関与していることを示したきた。実際、I κ Bzeta 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現が障害されている。I κ Bzeta は TLR 刺激により早期に誘導される遺伝子の一つである。そこでマクロファージに I κ Bzeta を常時発現させ、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現を解析した。I κ Bzeta を発現させたマクロファージでは、遅期誘導型遺伝子の発現誘導が早く観察されるようになった。また、遅期誘導型遺伝子プロモーターへの転写制御因子のリクルート、メチル化の誘導も早く観察されるようになった。これらの結果から、I κ Bzeta は、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造を変換させることにより遺伝子発現の誘導に関与していることが明らかになった。

D. 考察

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類される。遅期誘導型の遺伝子プロモーターはクロマチン構造が閉じていて、TLR 刺激により構造変換を受け、転写制御因子がアクセスする。一方、

早期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造は常に開いている。このことが、早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子群に分けられるメカニズムであることが考えられる。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IκBzeta が関与することも明らかになった。しかし、IκBzeta 自身には、クロマチン構造を変換させる酵素活性はない。IκBzeta と相互作用し、クロマチン構造を変換させる分子の同定をさらに行っていきたい。このように、自然免疫系の活性制御機構を解析し、その制御技術基盤を確立し、慢性炎症性腸疾患に対する画期的治療法の創出に寄与したい。

E. 結論

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF-κB 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類されるが、この相違は各遺伝子プロモーターのクロマチン構造の違いによることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IκBzeta が関与することも明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.: TLR-dependent induction of IFN- β mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059-7066 (2006).
2. Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* in press
3. Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7, 962-970 (2006).
4. Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S.: Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c⁺ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7, 868 - 874 (2006).
5. Yoshimatsu, T., Kawaguchi, D., Oishi, K., Takeda, K., Akira, S., Masuyama, N., and Gotoh, Y.: Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33, 2553-2563 (2006).
6. Miyatsuka, T., Kaneto, H., Shiraiwa, T., Matsuoka, T. A., Yamamoto, K., Kato, K., Nakamura, Y., Akira, S., Takeda, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Sandgren, E. P., Kawaguchi, Y., Wright, C. V., and Fujitani, Y.: Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20, 1435-1440 (2006).
7. Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., and Kikutani, H.: Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 615-622 (2006).
8. Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Fujita, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adachi, Y., Ohno, N., Takeda, K., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M. and Kawakami, K.: Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol.*

Med. Microbiol. 47, 148-154 (2006).

9. Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K. and Yoshikai, Y.: MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8 $\alpha\alpha$ and TCR β intestinal intraepithelial T lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 6180-6185 (2006).
10. Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Notohara, K., Katayose, K., Okamura, H., Kahn, C. R., Noda, T., Takeda, K., Akira, S., Inui, A. and Kasuga, M.: Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3, 267-75 (2006).
11. Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S. and Matsumoto, M.: Essential role of I κ B kinase α in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176, 3995-4002 (2006).
- Santos, L. L., Milenkovski, G. P., Hall, P. H., Leech, M., Sharma, L., Takeda, K., Akira, S., Kitching, A. R., and Morand, E. F.: IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 84, 166-173 (2006).
12. Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Takeda, K., Fukai, F., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* 176, 2773-2780 (2006).

2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006. 9. 3-6, Hyogo, Japan
2. Kiyoshi Takeda, Innate immune responses against mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program, 41st Tuberculosis and leprosy

research conference, 2006. 7. 19-21, Kagoshima, Japan

3. Kiyoshi Takeda, Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting, 2006. 6. 1, San Francisco, USA
4. Kiyoshi Takeda, Nuclear I κ B protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium), 第 36 回日本免疫学会学術集会、2006. 12. 11-13、大阪
5. 香山尚子、竹田潔, Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第 36 回日本免疫学会学術集会、2006. 12. 11-13、大阪
6. 財賀大行、竹田潔, Lipocalin 2 mediates anti-mycobacterial immune responses. 第 36 回日本免疫学会学術集会、2006. 12. 11-13、大阪
7. 古賀律子、竹田潔, IFN- β -dependent innate immune response against *Trypanosoma cruzi*, 第 36 回日本免疫学会学術集会、2006. 12. 11-13、大阪
8. 竹田潔, 自然免疫系によるトリパノソーマ原虫の感染制御機構, 第 59 回日本寄生虫学会、2006. 10. 28、福岡
9. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構 (シンポジウム), 第 2 回食品免疫学会、2006. 10. 23、東京
10. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構 (特別講演), 第 43 回補体シンポジウム、2006. 8. 19、福岡
11. 竹田潔, 粘膜免疫の今後の展望 (イブニングセミナー), 第 43 回日本消化器免疫学会総会、2006. 8. 3-4、青森
12. 竹田潔, 自然免疫系による炎症制御, 日本動脈硬化学会、2006. 7. 13-14、東京
13. 竹田潔, I 型 IFN による細胞内寄生性原虫の感染防御機構, 第 71 回インターフェロンサイトカイン学会、2006. 7. 7-8、兵庫

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

炎症性腸疾患に対する MIF の役割を明らかにするために、MIF に対する自己抗体を産生する DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) を開発した。このワクチンを接種したマウスでは、変異 MIF 蛋白に対する抗体が産生され、DSS 腸炎が有意に抑制された。MIFTh エピトープ DNA ワクチンによる抗 MIF 療法は、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。炎症性腸疾患における MIF の役割を更に明らかにし、治療の標的となる新しい分子を見出す目的で MIF^{-/-}マウスを用いた解析を行ったところ、MIF^{-/-}マウスでは DSS 腸炎が全く惹起されないこと、その機序として heat shock protein 70 (HSP70) の関与を示唆した。さらに HSP70 の誘導剤である geranylgeranyl acetone (GGA) の投与が DSS 腸炎に対し予防効果を示すことを明らかにした。

最近能動的抗体療法としてサイトカインに対する自己抗体を誘導しサイトカインの活性を抑える方法が考えられている。最近われわれは MIF の免疫原性を高めるために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) を開発した。本研究では Th エピトープ MIF DNA ワクチンをマウスに接種、実験腸炎の程度を検証した。

今回は

B. 研究方法

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 を調製した。この MIFTh エピトープ DNA ワクチンを、MHC の適合した 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。DNA ワクチンを接種したマウスおよび野生型マウスに対し DSS 腸炎を作成し、各群の臨床症状スコア (下痢、血便、体重減少、腸管の長さおよび組織学的所見) を比較した。DSS 腸炎は 3% DSS 水溶液を 7 日間自由飲水にて投与して作成した。(倫理面への配慮)

実験動物の取扱いは、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

MIFTh エピトープ DNA ワクチン投与をおこなったマウスでは、4 週間より血中抗 MIF 抗体価の上昇がみられ、その後 8 週まで持続した。一方、野生型 MIF DNA ワクチンの投与では、抗 MIF 抗体価の上昇は認められなかった。MIFTh エピトープ DNA ワクチン投与をおこなった DSS 腸炎マウスでは、野生型 MIF ワクチン投与をおこなったマウスに比べ、下痢・血便・体重減少が抑制され、臨床症状スコアは有意に低値であった。また、腸管の短縮、組織学的スコアも有意に抑制されていた。

D. 考察

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。本研究でもちいた 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。この DNA ワクチンを接種したマウスでは、従来の蛋白ワクチンと異なり、アジュバントや担体を必要とせず抗 MIF 抗体が産生された。MIFTh 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

MIFTh エピトープ DNA ワクチンを投与したマウスでは、DSS 腸炎が有意に抑制された。MIFTh 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) Ohkawara T, Nishihira J, Ishiguro Y, Otsubo E, Nagai K, Takeda H, Kato M, Yoshiki T, Iwanaga T, Asaka M. : Resistance to experimental colitis depends on cytoprotective heat shock proteins in macrophage migration inhibitory factor null mice. *Immunol Lett* 107: 148-154, 2006
- 2) 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.
- 3) 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: 229-34, 2006
- 4) Ohkawara T, Nishihira J, Nagashima R, Takeda H, Asaka M. : Polaprezinc protects human colon cells from oxidative injury induced by hydrogen peroxide: Relevant to cytoprotective heat shock proteins. *World J Gastroenterol* 12: 6178-6181, 2006.
- 5) Yoshiuchi S, Yamamoto T, Sakane H, Kadota J, Mochida J, Asaka M, Tanaka K. : Identification of novel mutations in ACT1 and SLA2 that suppress the actin-cable-overproducing phenotype caused by overexpression of a dominant active form of Bni1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 173: 527-539, 2006.
- 6) Kobayashi T, Wang T, Maezawa M, Kobayashi M, Ohnishi S, Hatanaka K, Hige S, Shimizu Y, Kato M, Asaka M, Tanaka J, Imamura M, Hasegawa K, Tanaka Y, Brachmann RK. : Overexpression of the oncoprotein prothymosin alpha triggers a p53 response that involves p53 acetylation. *Cancer Res* 66: 3137-3144, 2006
- 7) Miseki T, Kawakami H, Natsuzaka M, Darmanin S, Cui HY, Chen J, Fu Q, Okada F, Shindo M, Higashino F, Asaka M, Hamuro J, Kobayashi M. : Suppression of tumor growth by intra-muscular

transfer of naked DNA encoding adrenomedullin antagonist. *Cancer Gene Ther* 14: 39-44, 2007.

- 8) Miura Y, Tanaka J, Toubai T, Tsutsumi Y, Kato N, Hirate D, Kaji M, Sugita J, Shigematsu A, Iwao N, Ota S, Masauzi N, Fukuhara T, Kasai M, Asaka M, Imamura M. : Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 37: 837-843, 2006.
- 9) Oridate N, Takeda H, Yamamoto J, Asaka M, Mesuda Y, Nishizawa N, Mori M, Furuta Y, Fukuda S. : Helicobacter pylori seropositivity predicts outcomes of acid suppression therapy for laryngopharyngeal reflux symptoms. *Laryngoscope* 116: 547-553, 2006.
- 10) Shimizu Y, Yamamoto J, Kato M, Yoshida T, Hirota J, Ono Y, Nakagawa M, Nakagawa S, Oridate N, Asaka M. : Endoscopic submucosal dissection for treatment of early stage hypopharyngeal carcinoma. *Gastrointest Endosc* 64: 255-259, 2006

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

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

抗菌ペプチドを用いた炎症性腸疾患の治療法開発

分担研究者 高後 裕 旭川医科大学消化器・血液腫瘍制御内科 教授

研究要旨：抗菌ペプチドであるヒト α -defensinのrecombinant peptideを炎症性腸疾患の新規治療法として用いる方法について、本年度は(1) recombinant HD-5(r-HD5)の作成、(2) マウスDSS腸炎モデルにおけるr-HD5の治療効果について研究を行った。その結果、経口投与で消化管内で活性を發揮するtrypsin抵抗性の殺菌活性を有するr-HD5が作成可能となり、マウスDSS腸炎での治療効果を示唆する結果が得られた。

共同研究者

旭川医科大学 消化管再生修復医学講座
前本篤男 田邊裕樹

A. 研究目的

これまでの研究により、小腸Paneth細胞が産生・分泌する α -defensinは、腸管微生物感染に対する自然免疫反応のeffector分子であることが明らかになっている。この分子と炎症性腸疾患の関係については、NOD2 mutationのあるクローン病患者腸管において α -defensinの産生の低下が報告され¹⁾、注目されるに至った。我々も独自の解析法を用い、クローン病患者小腸陰窩における抗菌活性物質の分泌低下を見出し報告してきた。これらのことから、クローン病は腸管の自然免疫不全が炎症の発症または進展に関与する疾患であることが明らかになってきているといえる。本研究では、ヒト型の活性型 α -defensinのrecombinant peptideを用いて障害された自然免疫反応をreconstituteすることでクローン病の治療を行いえるか否かを検討する目的として計画された。本報告書では(1)活性型ヒト α -defensinであるHD-5のrecombinant

peptideの作成、(2)マウスDSS腸炎モデルにおけるrecombinant HD-5の経口投与について研究を行った結果を報告する。

B. 研究方法

(1) recombinant HD-5(r-HD5)の作成
recombinant HD-5は、HD-5peptide 全長をコードしたcDNAをpET28a vectorに組み込み、E coliで発現させたのち、recombinant peptideを回収、その後活性分画をHPLCで精製した(現在投稿中)。

(2) マウスDSS腸炎モデルにおける recombinant HD-5の投与

6週齢・雌性BALB/Cマウスに4%DSSを6日間連日自由摂取させて腸炎を作成した。このモデルに対し、DSS投与前、DSS投与6日目に0.05 mg/bodyのr-HD5を投与し、マウスの生存率を観察した。

「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

(1) recombinant HD-5 (r-HD5) の作成
HD-5は図1に示した一次構造を有し、3つのシステインの分子内結合によりfoldされる構造を有する32個のアミノ酸からなるペプチドである。このHD-5の recombinant 蛋白を作成する上での問題点として、抗菌ペプチドであるため活性を有する形では細菌内での合成が困難であること、最終的には分子内架橋を再現することが活性発現に必要であることが挙げられた。詳細は省略するが、我々は pET28a vector で transfection した E. coli の lysate を HPLC で精製して活性分画を抽出したのち、還元を行い、緩徐に中和することで活性を保持した分子内架橋を形成した。分子内架橋形成された r-HD5 は trypsin に対して安定となり、経口投与により消化管内腔で活性を発揮する分子である条件をみることが明らかになった。図. 2 に結果を示す。今回作成した r-HD5 は、還元状態下で分子内架橋を消失させても (reduced HD5)、50 microg/ml 以上の濃度では HD-5 と同様の殺菌活性を示すが、trypsin の存在で活性は消失する。これに対し、分子内架橋を形成した HD-5 は trypsin によっても殺菌活性は保持され、蛋白分解酵素に対して抵抗性であることが示唆された。

(2) マウス DSS 腸炎モデルにおける recombinant HD-5 経口投与の効果について
4%DSS を 6 日間投与してマウスに DSS 腸炎を惹起し、これに対する r-HD5 の効果を生存率で解析した (図 3)。この量の DSS を投与されたマウスは腸炎を発症し、6 日間の投与終了後も wasting disease が

持続し、投与開始 12 日目にはすべての個体が死亡した (図 3, A 群, n=5)。DSS 開始前に 0.05 mg/body の r-HD5 を 1 回経口投与した群 (図 3, B 群, n=5) では、1/5 が生存し、DSS 投与 6 日間終了後に同量の r-HD5 を 1 回経口投与した群 (図 3, C 群, n=5) では 2/5 が生存した。少数の解析のため統計的有意差は検出できないが、r-HD5 の投与が致死的是重症 DSS 腸炎に対して効果を発揮した可能性が考えられた。今後、種々の条件下での解析を行う予定である。

D. 考察

今回の検討の結果、殺菌活性を有する r-HD5 は recombinant protein として作成可能で、一定の条件下では分子内架橋も再構成されて trypsin 非感受性の経口投与可能な分子として得られることが明らかとなった。また、この r-HD5 は、マウスに経口投与すると、DSS 腸炎による動物の死亡を妨げる可能性が示唆されている。これらの結果から、今後更に種々の条件下での治療効果について解析を行う予定である。

また、同様の方法により、他の α -defensin 群の recombinant peptide の作成も可能で、現在解析を進めている。

E. 結論

recombinant HD-5 (r-HD5) の作成、(2) マウス DSS 腸炎モデルにおける r-HD5 の治療効果について研究を行った。その結果、経口投与で消化管内で活性を発揮する trypsin 抵抗性の殺菌活性を有する r-HD5 が作成可能となり、マウス DSS 腸炎での治療効果を示唆する結果が得られた。

F. 参考文献

1) Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307: 731-4. 健康危険情報：該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Watari J, Tanaka A, Tanabe H, Sato R, Moriichi K, Zaky AH, Okamoto K, Maemoto A, Fujiya M, Ashida T, Das KM, Kohgo Y. K-ras mutations and cell kinetics in *Helicobacter pylori* associated gastric intestinal metaplasia: A comparison before and after eradication in patients with chronic gastritis and gastric cancer. *J Clin Pathol.* 2006

2) Shindo M, Torimoto Y, Saito H, Motomura W, Ikuta K, Sato K, Fujimoto Y, Kohgo Y. Functional role of DMT1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell, HLF. *Hepatol Res.* 2006 35(3):152-62.

3) Motomura W, Inoue M, Ohtake T, Takahashi N, Nagamine M, Tanno S, Kohgo Y, Okumura T. Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 24:340(4):1111-8.

4) Sun JH, Das KK, Amenta PS, Yokota K, Watari J, Sato T, Kohgo Y, Das KM. Preferential expression of

cyclooxygenase-2 in colonic-phenotype of gastric intestinal metaplasia: association with *helicobacter pylori* and gastric carcinoma. *J Clin Gastroenterol.* 2006 40(2):122-8.

5) 高後裕. 日本消化器がん検診学会雑誌 44巻5号 70(2006.09)

6) 小腸出血をきたしたクローン病(CD)の1例. 岡本耕太郎, 石川千里, 金野陽高, 村松司, 盛一健太郎, 高後裕 早期大腸癌10巻1号 58-59(2006.01)

7) 潰瘍性大腸炎(UC)の出血 佐藤龍, 石川千里, 金野陽高, 稲場勇平, 村松司, 高後裕 早期大腸癌10巻1号 56-57(2006.01)

2. 学会発表

1) 経鼻内視鏡検査の有用性に関する検討 田邊裕貴, 渡二郎, 今野陽高, 石川千里, 稲場勇平, 村松司, 佐藤龍, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 藤谷幹浩, 蘆田知史, 高後裕 日本消化器がん検診学会雑誌 44巻5号 153(2006.09)

2) 潰瘍性大腸炎治療後の予後予測における拡大内視鏡観察 微少粘膜欠損と粘膜再生修復異常との関連 前本篤男, 蘆田知史, 高後裕 *Gastroenterological Endoscopy* 48巻Suppl.2 1884

3) 炎症性腸疾患における *Helicobacter Pylori* 感染と高アマラーゼ血症との関連性 佐藤龍, 蘆田知史, 岡本耕太郎, 金野陽高, 石川千里, 稲場勇平, 村松司, 盛一健太郎, 田邊裕貴, 前本篤男, 渡二郎, 高後裕 日本消化器病学会雑誌 103巻臨増総会 A179(2006.03)

4) 担癌胃の腸上皮化生におけるゲノム不安定性の解析 渡二郎, 田邊裕貴, 高後裕
 日本消化器病学会雑誌103巻臨増総会 A138 (2006. 03)

療効果

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

生存曲線

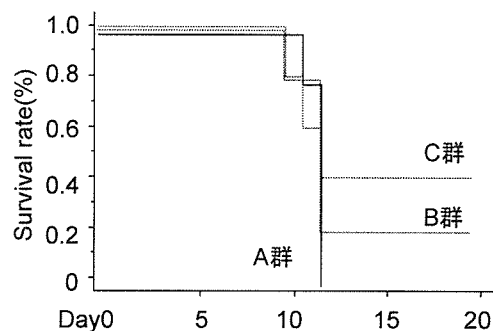


図 1. Figure 1 HD-5のアミノ酸配列

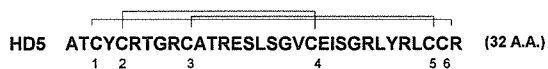


図 2. r-HD5 の殺菌活性と trypsin 感受性の解析

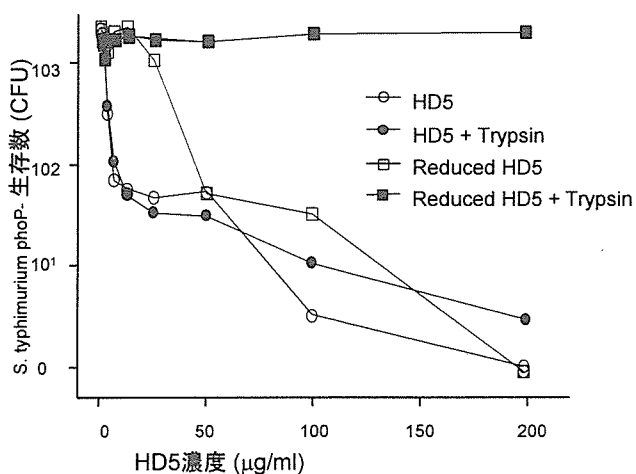


図 3. r-HD5 のマウス DDS 腸炎に対する治

ヒト組み換えチオレドキシンを用いた炎症性腸疾患に対する新しい治療の検討

主任研究者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座（消化器肝臓内科） 教授

研究要旨：難治性炎症性腸疾患（IBD）活動期の腸管粘膜ではこれらの増加が報告されており病態の発生・進展への関与が想定されている。TRX と MIF の相互作用に注目し、TRX の腸炎抑制効果に対する検討を行った。まず腸炎疾患における TRX の動態を把握するため潰瘍性大腸炎・クローン病・虚血性腸炎患者血清中の TRX 濃度と腸炎活動度との相関を検討した。その結果活動期潰瘍性大腸炎・クローン病・虚血性腸炎患者血清中では有意に TRX 値が高値であることを示し、さらにクローン病では血中 MIF 値と相関することを示した。続いて TRX 過剰発現マウスおよびリコンビナントヒト TRX (rhTRX)を用いて dextran sulfate sodium (DSS)投与による急性腸炎モデルにおける TRX の腸炎抑制効果を検討したところ、いずれの系でも野生型マウスに比して有意に腸炎が抑制された。TRX 過剰発現マウスを用いた DSS 腸炎モデルにおける大腸組織中の TNF- α 、IFN- γ 及び MIF 濃度はいずれも有意に低下していた。特に MIF 濃度は腸炎誘発前でも有意に低下していたため、TRX の過剰発現が MIF 産生低下に関与している可能性が示唆された。さらに腸炎における内因性 TRX の役割を検討するため抗マウス TRX 抗体を作成し野生型マウスを用いた DSS 腸炎モデルに投与したところ、有意に腸炎は増悪し血清 MIF 値は有意に増加していた。また、慢性腸炎における TRX の腸炎抑制効果を検討するため 9-10 週齢の IL-10 ノックアウトマウスに rhTRX を 14 日間連日腹腔内投与したところ、有意に腸炎は改善した。以上より 1) IBD をはじめとする腸炎疾患で血中 TRX 値が上昇していること、2) TRX は腸炎抑制効果をもつこと、3) TRX は単球からの MIF 産生を抑制することが示され、TRX の腸炎抑制効果には MIF 産生の抑制が関与していることが示唆された。

共同研究者

関西医科大学内科学第三講座：内田一茂、深田憲将、安藤祐吾、松下光伸

京都大学消化器内科：玉置敬之、西尾彰功、仲瀬裕志

京都大学再生医科学研究所：田畑泰彦

京都大学ウイルス研究所：淀井淳二

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎は原因不明の難治性炎症性腸疾患（IBD）である。局所に浸潤した炎症細胞によって産生される Reactive oxygen species (ROS) 及び ROS によって引き

起こされる酸化ストレスは直接的な組織障害を引き起こすことが知られているが、IBD 活動期の腸管粘膜ではこれらの増加が報告されておりその病態の発生・進展への関与が想定されている。

Thioredoxin (TRX) は淀井らにより成人 T 細胞白血病由来因子としてクローニングされた、Cys-Gly-Pro-Cys 配列によるチオール・ジスルフィド反応を介した酸化還元反応制御能を持つ多機能分子である¹⁾。その機能は多岐にわたり、reactive oxygen species (ROS) の還元・産生抑制に加え NF- κ B や Ref1 などの転写因子活性化¹⁾や ASK-1 の不活性化による MAPK へのシグナル伝達の抑制などを介したア

ポトシスの抑制が報告されている²⁾。また air pouch model を用いた検討では炎症局所への好中球浸潤を抑制することが報告されており³⁾、TRX は抗酸化ストレス、抗アポトーシス、及び抗炎症作用を有し生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている。実験動物モデルでは、トランスジェニック (TG) マウスにおけるインフルエンザウイルス感染に対する抵抗性の増強や⁴⁾ アドリアマイシン心筋障害の軽減⁵⁾ など生体防御能の増強に関する報告が数多くなされているが、消化管炎症における検討は行われていない。今回我々は IBD 患者血清中の TRX 濃度に関する検討に加え、TRX transgenic (TRX-TG) マウスおよびリコンビナントヒト TRX (rhTRX) を用いて dextran sulfate sodium (DSS) 投与による急性腸炎モデルにおける TRX の腸炎抑制効果を検討した。

B. 研究方法

(1) IBD 患者血清中の TRX 濃度と腸炎活動度との相関の検討

既知の炎症性疾患、HCV 感染、悪性疾患罹患患者を除く潰瘍性大腸炎 (UC) 患者 11 人、クローン病 (CD) 患者 10 人、及び normal control として大腸腺腫症例 10 人の血中 TRX 濃度を ELISA にて測定した。各疾患の活動度は Ulcerative Colitis Disease Activity Index (UCDAI) 及び Crohn's Disease Activity Index (CDAI) にて評価した。

(2) TRX-TG マウスにおける DSS 腸炎改善効果の検討

C57BL/6 マウス (DSS 群、n=10) および TRX-TG マウス (TG-DSS 群、n=10) に 3% (w/v) DSS を 7 日間連日投与し、7 日目に腸炎を評価した。

(3) rhTRX 投与の DSS 腸炎改善効果の検討

C57BL/6 マウスに 3% (w/v) DSS を 5 日間連日投与し、6 日目から 10 日目まで純水投与に変更した。DSS 投与直前から 9 日目まで phosphate buffered saline (PBS) 100 · 1 (vehicle 群、n=10) または PBS100 · 1 に溶解した rhTRX 5mg/kg (TRX 群、n=10) を連日腹腔内投与し、10 日目に腸炎を評価した。

(4) 腸炎の総合評価

各日における体重変化は 0 日目の体重に対する変化率で示した。摘出した大腸の全長を計測し、TRX-TG マウスを用いた検討では糞便中の血液含有を Bloody stool score⁶⁾ に従って評価した。肛門側 1.5 cm の大腸組織を Histological scoring system⁷⁾ に従って組織学的に評価した。

(5) 大腸組織における TNF- α 、IFN- γ 、MIF 産生

TRX-TG マウスを用いた検討では大腸組織の colon fragment culture を行い、得られた medium 中の TNF- α 、IFN- γ 及び MIF 濃度を ELISA にて測定した。

(6) rhTRX の MIF 産生抑制効果の検討

ヒト単球培養細胞である THP-1 を PMA 16nM 存在下に 16 時間培養し、続いて 0.01, 0.1, 及び 1 nM の rhTRX 存在下で 24 時間培養した。更に LPS 1 μ g/ml 及び IFN- γ 10ng/ml 存在下に 12 時間培養し細胞蛋白中の MIF 産生を western blot 法で、培養液中の MIF 濃度を ELISA により測定した。

(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。5) 動物実験に関しては、動物実験倫理委員会の承認を得て、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

1) UC および CD 患者血清中 TRX 濃度はコントロール群に比して有意に高値を示し、血清 TRX 値は UCDAI・CDAI に相関していた (図 1)。

2) DSS 腸炎 TRX-TG マウスを用いた検討
DSS 投与開始後 6 日目・7 日目の体重減少は TG-DSS 群で DSS 群に比して有意に軽度であった (図 2)。大腸の全長は TG-DSS 群で DSS 群に比して有意に長く、Bloody stool score は有意に低値であった (図 3)。組織学的検討では DSS 群で遠位大腸を中心に炎症細胞浸潤、クリプトの損傷、びらん・潰瘍形成を認めたが TG-DSS 群ではこれらは軽減しており、Histological score は TRX-TG 群で有意に低値であった (図 4)。大腸組織における TNF- α ・IFN- γ ・MIF 産生はいずれも TG-DSS 群では DSS 群に比して有意に減少していた。DSS 未投与の TRX-TG マウス群ではコントロール群に比して有意に MIF 産生が低下していた。

3) ヒト組み換え rhTRX の治療効果

DSS 投与開始後 6 日目～10 日目の体重減少は vehicle 群に比して TRX 群で有意に軽度であった (図 5)。大腸の全長は vehicle 群に比し

て TRX 群で有意に長かった。組織学的変化は vehicle 群に比して TRX 群で軽度であり、histological score も有意に低値であった (図 6)。また、THP-1 細胞からの MIF 産生は rhTRX によって濃度依存性に抑制された。

D. 考察

IBD 患者血清中 TRX 濃度は normal control 群に比して高値を示し、病勢と有意に相関していた。また、DSS 腸炎は TRX の過剰発現及び rhTRX 投与によって有意に抑制され、TRX は消化管炎症に関与していることが強く示唆された。TRX は様々なストレスで誘導され、酸化・還元反応を制御することにより生体のホメオスターシスを維持することが知られているが、消化管炎症などの炎症性疾患では ROS 産生や酸化ストレスの増加を介して酸化・還元バランスの不均衡が起こり TRX 産生を増加させると考えられる。従って IBD における血清 TRX 産生の増加は一種の生体防御反応と考えられるが、量的に不十分であるため炎症の抑制に至らないと推測される。

以前より NO・H2O2・OCl⁻などの ROS によって惹起される酸化ストレスは炎症や虚血を惹起する結果 IBD の病態形成に関与すると考えられ、実験腸炎モデルでは Cu/Zn-SOD をはじめとする抗酸化因子の腸炎抑制効果が報告されてきた。今回我々は DSS 腸炎モデルにおける TRX の腸炎抑制効果を検討し、その治療効果を示した。

E. 結論

1) 潰瘍性大腸炎患者の血清チオレドキシシン値はクローン病よりも有意に高値であり、それぞれ病勢との間に相関を認めた。

2) チオレドキシシントランスジェニックマウスにおいて DSS 腸炎の有意な改善を認め、大腸組織における TNF α 、インターフェロン γ の

産生低下を認めた。

3) Recombinant human チオレドキシンは予防的、治療的いずれにおいても腸炎の抑制効果を発揮した。抗チオレドキシン抗体の投与はDSS 腸炎を増悪させた。

4) 今後、ドラッグデリバリーシステムを用いてゼラチンマイクロスフェアに封入した Recombinant human チオレドキシンの有効性を検討する予定である。

F. 参考文献

- 1) Tagaya Y, et al.:ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *Embo J* 8:757-764, 1989
- 2) Powis G, et al.:Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:421-455, 2001
- 3) Nakamura H, et al.:Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15143-15148, 2001
- 4) Nakamura H, et al.:Enhanced resistancy of thioredoxin-transgenic mice against influenza virus-induced pneumonia. *Immunol Lett* 82:165-170, 2002
- 5) Shioji K, et al.:Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 106:1403-1409, 2002
- 6) Jeffers M, et al.:A novel human fibroblast growth factor treats experimental intestinal inflammation. *Gastroenterology* 123:1151-1162, 2002
- 7) Williams KL, et al.:Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology* 120:925-937, 2001

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

H. 研究成果の発表

1. 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;131(4):1110-21.
2. Kiriya K, Watanabe N, Nishio A, Okazaki K, Kido M, Saga K, Tanaka J, Akamatsu T, Ohashi S, Asada M, Fukui T, Chiba T. Essential role of Peyer's patches in the development of Helicobacter-induced gastritis. *Int Immunol*. 2007(in press)

図1. UCおよびCD患者血清中TRX濃度

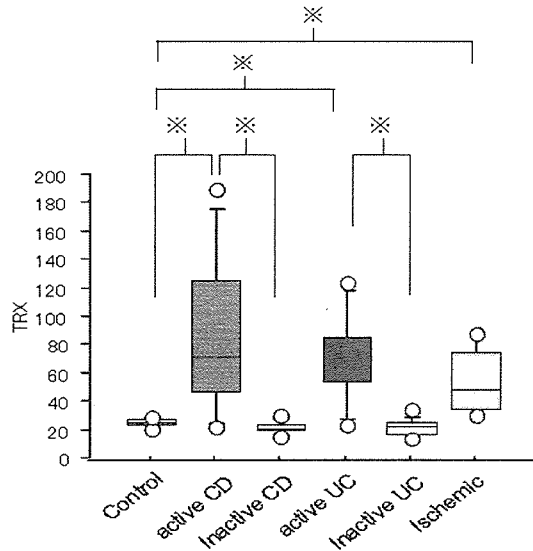


図2. DDS腸炎TRX-TGマウスの体重変化

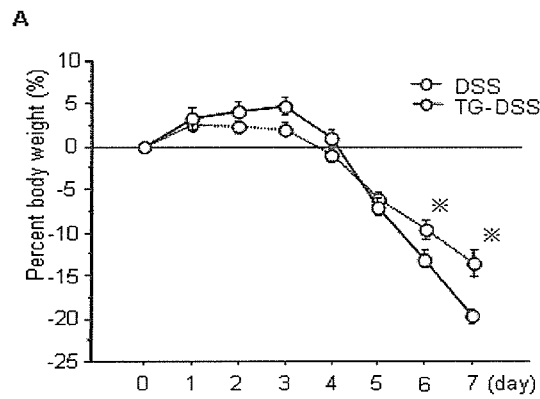


図3. DDS腸炎TRX-TGマウスの大腸全長変化

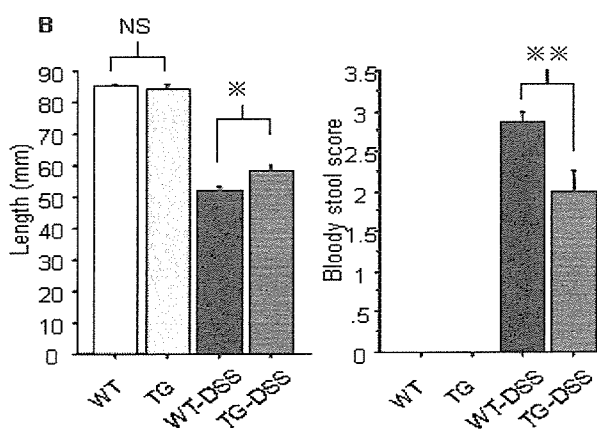


図4. DDS腸炎TRX-TGマウスの病理スコア

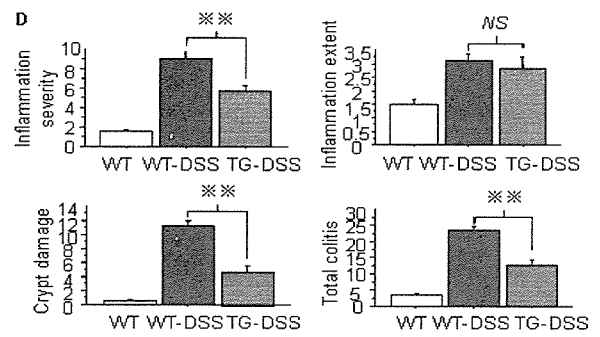


図5. DDS腸炎マウスの体重に対するrTRX投与効果

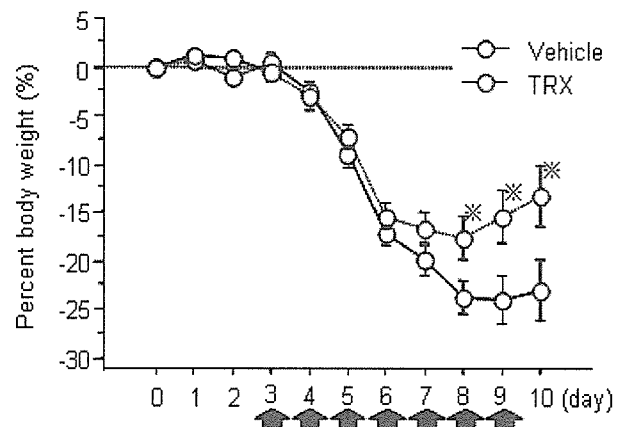
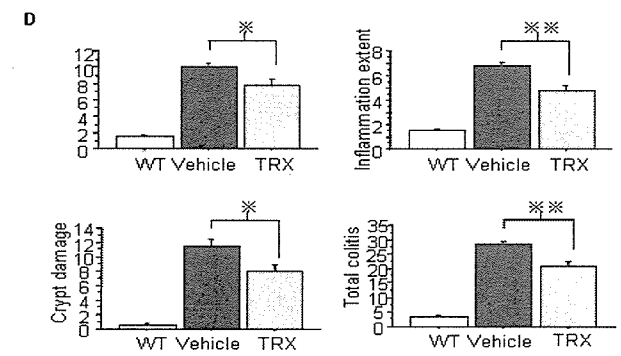


図6. DDS腸炎マウスの病理組織スコアに対するrTRX投与効果



潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法の開発：

CliniMACS 細胞分離システムを用いた制御性 T 細胞の無菌的大量分離法の検討

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において、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・制御すると考えられる制御性 T 細胞も同時に除去されていると考えられる。そこで我々は血球成分除去療法産物より制御性 T 細胞を分離し患者へ移入する新しいコンセプトの治療法、「血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法」を考案した。その施行には制御性 T 細胞の無菌的大量分離法の確立が必要である。我々は Miltenyi Biotec 社 CliniMACS 細胞分離システムを用いて制御性 T 細胞の臨床応用可能なグレードでの分離法について検討した。

血球成分除去療法産物より CliniMACS CD8 Reagent、CliniMACS CD19 Reagent を用いて CD8⁺ T 細胞、B 細胞を除去した。その後 CliniMACS CD25 Reagent を用いて CD4⁺ CD25⁺ T 細胞を回収した。計 4 回の分離実験を行った。全ての実験において、CD8⁺ T 細胞、B 細胞共にほぼ完全に除去された。分離前、制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25^{high} T 細胞) の割合は 2.1±0.6% であったが、分離後は 52.3±5.4% と高い割合であった。回収率は 62.9±8.0% であった。制御性 T 細胞に特異的な転写因子 FOXP3 発現細胞の CD4⁺ T 細胞中の割合は分離前 1.2±0.6% であり、分離後は 53.5±8.8% であった。4 回の実験中 3 回で分離された CD25⁺ T 細胞の T 細胞増殖抑制能を *in vitro* で確認できた。

CliniMACS を用いて、血球成分除去療法産物より制御性 T 細胞が無菌的に大量に分離可能であり、分離された細胞は免疫制御機能も保持していたことから、制御性 T 細胞移入療法に用いる事が可能であると考えられた。

共同研究者

九州大学大学院 医学研究院 病態制御内科学、高柳涼一、秋穂裕唯
九州大学病院 遺伝子・細胞療法部、豊嶋崇徳、赤司浩一

した薬物療法が行われるが、ステロイド抵抗性・依存性の難治例も多く、より有効な新規治療法の開発が強く望まれている。

血球成分除去療法はわが国で開発された治療法であり、中等度以上の活動期潰瘍性大腸炎に対して単独またはステロイドとの併用で効果が期待できる。血球成分除去療法的作用機序は、まだ十分に解明されていない。白血球中には大腸炎を誘導する colitogenic な細胞に加えて、大腸炎を抑制・制御する調節性細胞も存在し、既存の白血球除去療法では両者と

A. 研究目的

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎は慢性持続性に大腸炎を起こす難病である。若年者に好発し、多くは再燃・緩解を繰り返すため患者 QOL を著しく低下させる。ステロイドを主と