

## V. 学会発表に関する一覧表

学会発表に関する一覧表

発表者名	演題名	学会名	会場	日時
矢島知治、船越信介、目比紀文	IBD患者における6-MP/AZA代謝についての解析	第92回日本消化器病学会総会	福岡	2006. 4. 20
Hisamatsu T, Inoue N, and Hibi T	Psychological Factors in Flare up of Ulcerative Colitis	第92回日本消化器病学会総会 国際シンポジウム	福岡	2006. 4. 21
桜庭 篤、岩男 泰、目比紀文	疾患マーカーとしてのCrohn病上部消化管病変	第71回日本消化器内視鏡学会 総会	東京	2006. 5. 14
志賀洋史、船越信介、高山哲朗、芹澤 宏、渡辺憲明、常松令、金子文彦、熊谷直樹、土本寛二、首村智久、森永正二郎、岩男 泰、目比紀文	大腸全摘術後回腸囊炎・多発性関節炎に白血球除去療法および6MPが奏効した潰瘍性大腸炎の一例	第82回日本消化器内視鏡学会 関東東地方会	東京	2006. 6. 16
芳沢茂雄、井上 詠、松岡克義、高石官均、岡本 晋、久松理一、緒方晴彦、岩男 泰、藤田知信、河上 裕、向井万起男、目比紀文	潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌の早期発見における抗P53抗体測定の有用性の検討	第65回大腸癌研究会	青森	2006. 7. 7
新井久美子、久松理一、鎌田信彦、岡本 晋、梅澤一夫、目比紀文	腸炎疾患モデル動物を用いたNF-κB阻害剤・DHME-Qの作用解析	第27回日本炎症・再生医学学会 -炎症学と再生医学の基礎から臨床へ-	東京	2006. 7. 11
目比紀文、中澤 敦、高石官均、鎌田信彦、久松理一	食事と炎症性腸疾患-腸内細菌と腸管免疫のかかわり-腸内細菌の構成・分布の以上と腸管マクロファージの分化異常	第28回日本臨床栄養学会総会 第27回日本臨床栄養協会総会 第4回大連合大会	東京	2006. 9. 1
市川仁志、久松理一、目比紀文	当科においてシクロスポリン持続静注療法を施行した潰瘍性大腸炎症例の中長期予後	第61回日本大腸肛門病学会総会	青森	2006. 9. 29
中澤 敦、高石官均、鎌田信彦、桜庭 篤、矢島知治、久松理一、岡本 晋、緒方晴彦、岩男 泰、目比紀文	3. -腸内細菌と腸管免疫のかかわり-炎症性腸疾患患者における腸内細菌の構成と糞便中有機酸の検討	第9回日本臨床腸内微生物学会 学術集会	東京	2006. 9. 9
目比紀文	炎症性腸疾患に対するTNF阻害薬の有効性と安全性	第34回日本臨床免疫学会	神奈川	2006. 10. 3
目比紀文	炎症性腸疾患診療の進歩と今後の展望	第48回日本消化器病学会	北海道・札幌	2006. 10. 12
井上 詠、松井敏幸、目比紀文	遠位型潰瘍性大腸炎に対するレバミピド注腸療法の有用性の検討	第48回日本消化器病学会	北海道・札幌	2006. 10. 13
市川仁志、久松理一、目比紀文	ステロイド抵抗性難治性潰瘍性大腸炎の治療方針における内視鏡スコアの有用性-従来の内視鏡重症度分類と比較	第48回日本消化器病学会	北海道・札幌	2006. 10. 13
久松理一、安藤綾俊、目比紀文	L-Histidineによるマウス実験腸炎抑制効果の作用機序解析	第48回日本消化器病学会	北海道・札幌	2006. 10. 14
目比紀文	クローン病とその分子病態	第48回日本消化器病学会	北海道・札幌	2006. 10. 11
桜庭 篤、井上 詠、目比紀文	当院におけるCrohn病に対するレミケードの治療成績	第48回日本消化器病学会	北海道・札幌	2006. 10. 12
Chinen H, Kamada N, and Hibi T	In situ natural killer cell differentiation in human adult intestine from lamina propria c-kit immune precursor cells	第36回日本免疫学会総会・学術集会記録	大阪	2006. 12. 13
Kamada N, Hisamatsu T, Chinen H, Inoue N, and Hibi T	Intestinal macrophages in human Crohn's disease altered their phenotypes and produce IL-23 in response to the enteric bacteria	第36回日本免疫学会総会・学術集会記録	大阪	2006. 12. 13
Ichikawa H, Okamoto S, Chinen H, and Hibi T	Anti-inflammatory effect of OPC-6535, a novel PDE4 inhibitor, on inflammatory bowel diseases	第36回日本免疫学会総会・学術集会記録	大阪	2006. 12. 13
長沼 誠、桜庭 篤、目比紀文、岩男 泰、緒方晴彦	内視鏡所見からみた白血球除去両方治療効果の予測因子の検討	第83回日本消化器内視鏡学会 関東東地方会	東京	2006. 12. 8
Inoue N, Yoshizawa S, Matsuoka K, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Fujita T, Kawakami Y, Hibi T	Serum P53 Antibodies (ABS) in Patients with Ulcerative Colitis (UC) Are Associated with the Development of Colorectal Cancer and Screening of P53 ABS By ELISA Is Useful in Cancer Surveillance Program for UC Patients.	Digestive Disease Week 2006	Los Angeles	2006. 5. 21 ~25

Nakazawa A, Takada T, Matsui T, Kado S, Asahara T, Nomoto K, Tanaka R, Sakuraba A, Yajima T, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Takaishi H, <u>Hibi T</u>	The Constitution and Distribution of Intestinal Bacterial Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Genus Or Species Specific Analysis Based On 16s rRNA Gene Sequences of Intestinal Bacterial Flora in Human Feces and Colonic.	Digestive Disease Week 2006	Los Angeles	2006. 5. 21 ~25
Sakuraba A, Sato T, Iwakami Y, Takada Y, Inoue N, Takaishi H, Ogata H, Iwao Y, <u>Hibi T</u>	An Open-Labelled Trial of Granulocyte and Monocyte Adsorption Apheresis for Pouchitis.	Digestive Disease Week 2006	Los Angeles	2006. 5. 21 ~25
Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Akagawa KS, and <u>Hibi T</u>	Abnormally Differentiated Subsets of Intestinal Macrophage Induce IL-12 Hyperproduction in Response to Bacteria. - Etiology of Th1 Dominant Colitis in IL-10 Deficient Mice-	Digestive Disease Week 2006	Los Angeles	2006. 5. 21 ~25
Hisamatsu T, Arai K, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Umezawa K, and <u>Hibi T</u>	The Effect of Novel NF-kb Inhibitor, Dehydroxymethyllepoxyquinomichin in DSS Colitis Model Mice.	Digestive Disease Week 2006	Los Angeles	2006. 5. 21 ~25
Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Imai T, and <u>Hibi T</u>	Fractalkine and Its Receptor CX3C RI Are Upregulated in Inflammatory Bowel Disease.	Digestive Disease Week 2006	Los Angeles	2006. 5. 21 ~25
Ando A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Hashimoto M, Kihara H, and <u>Hibi T</u>	Histidine Inhibits LPS-Induced Pro-Inflammatory Cytokine Secretion from Macrophages Via Suppression of NF-kB Activation.	Digestive Disease Week 2006	Los Angeles	2006. 5. 21 ~25
Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Chinen H, Kamada N, Imai T, Goto H, and <u>Hibi T</u>	Exclusive Expansion of CX3CR1+CD4+T Cells in Inflammatory Bowel Disease.	12th International Conference on Ulcer Research (ICUR)&GI Satellite of IUPHAR 2006	大阪	2006. 7. 9
Nakai T, Sato T, and <u>Hibi T</u>	Macrophage Inhibition by Recombinant LIR $\alpha$ Agonist as a Novel Therapy for Inflammatory Bowel Disease.	12th International Conference on Ulcer Research (ICUR)&GI Satellite of IUPHAR 2006	大阪	2006. 7. 9
Sakuraba A, Takada Y, Ogata H, and <u>Hibi T</u>	Capsule Endoscopy Is Useful in Assessing Intestinal Lesions of Behcet' s Disease.	The 71st Annual Scientific Meeting of the American College of Gastroenterology	Philadelphia	2006. 9
Inoue N, Yoshizawa S, Matsuoka K, Sakuraba A, Takaishi H, Ogata h, Iwao Y, Mukai M, Fujita T, Kawakami Y, and <u>Hibi T</u>	Serum p53 Antibodies in patients with ulcerative colitis are associated with the development of colorectal cancer and its screening by elisa is complementary to cancer surveillance program.	14th United European Gastroenterology week	Berlin Germany	2006. 10. 23
Ogata H, Kamada N, Inoue N, Matsui T, and <u>Hibi T</u>	A Randomized multicentre pilot study comparing mesalazine enemas and rebamipide enemas for active ulcerative colitis.	14th United European Gastroenterology week	Berlin Germany	2006. 10. 25
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	経鼻内視鏡検査の有用性に関する検討	日本消化器がん検診学会	札幌市	2006. 10. 11
前本篤男, 蘆田知史, 高後裕	IBDの内視鏡による治療評価の確立をめざして 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	消化器内視鏡学会	札幌市	2006. 10. 11
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	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	日本消化器病学会	札幌市	2006. 10. 11

渡二郎 田邊裕貴, 高後裕	腸上皮化生の形成と発癌 担癌胃の腸上皮化生におけるゲノム不安定性の解析	日本消化器病学会	小倉	2006. 4. 22
Kiyoshi Takeda	Role of TLR in innate and acquired phase of IBD.	2006 SMI Annual Meeting	San Francisco, USA	2006. 6. 2
Kiyoshi Takeda	Nuclear IκB protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa	第36回日本免疫学会学術集会 (Symposium)	大阪	2006. 12. 14
竹田潔	粘膜免疫の今後の展望	第43回日本消化器免疫学会総会 (イブニングセミナー)	青森	2006. 8. 4
竹田潔	自然免疫系の活性制御機構	第2回食品免疫学会 (シンポジウム)	東京	2006. 10. 24

## VI. 研究事業報告

厚生科学研究補助金難治性疾患克服研究事業  
「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」  
平成 18 年度第 1 回総会プログラム

(敬称略)

開会 (13 : 00)

I. 厚生労働省健康局疾病対策課御挨拶

II. 主任研究者挨拶・研究の進め方 班長：岡崎和一

III. 研究報告

◎ 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立 (13 : 20~14 : 20)

1) 腸管上皮の分化制御機構の解明と粘膜再生治療への応用 (分担研究者：渡辺 守)

○ 岡本隆一、土屋輝一郎、新垣美郁代、吉岡篤史、村山巖一、井上和成、金井隆典、渡辺 守 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学)

2) Recombinant soluble thrombomodulin の実験腸炎に対する治療効果 (分担研究者：高後 裕)

○ 蘆田知史、前本篤男、稲場勇平、高後 裕  
(旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野)

3) 炎症性腸疾患に対する HGF 大腸粘膜下注入療法の開発 (分担研究者：鈴木健司)

○ 鈴木健司、河内裕介、朝倉 均、青柳 豊 (新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学)

4) 炎症性腸疾患に対する組換えヒト HGF の臨床応用 (分担研究者：坪内博仁)

坪内博仁、○井戸章雄、森内昭博、児玉眞由美、沼田政嗣、瀬戸山仁、山路尚久  
(鹿児島大学消化器疾患・生活習慣病学、京都大学探索医療センター、宮崎大学内科学消化器血液学)

◎ 腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発 (14 : 20~14 : 50)

5) 自然免疫系の活性制御と炎症性腸疾患 (分担研究者 : 竹田 潔)

○ 竹田 潔 (九州大学生体防御医学研究所発生工学)

6) 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)

○ 武田宏司、大川原辰也、桂田武彦、浅香正博 (北海道大学大学院医学研究科消化器内科学)

◎ 選択的細胞除去・移入療法の開発 (14 : 50~15 : 05)

7) 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 : これまでの結果と今後の展望 (分担研究者 : 中村和彦)

○ 中村和彦<sup>1</sup>、隅田頼信<sup>1</sup>、金山兼司<sup>1</sup>、荻野治栄<sup>1</sup>、水谷孝弘<sup>1</sup>、秋穂裕唯<sup>1</sup>、多喜研太郎<sup>1</sup>、村尾寛之<sup>1</sup>、樋口奈緒美<sup>1</sup>、板場壮一<sup>1</sup>、豊嶋崇徳<sup>2</sup>、赤司浩一<sup>2</sup>、高柳涼一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院病態制御内科、<sup>2</sup>九州大学病院遺伝子・細胞療法部)

◎ バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療  
(15 : 05~15 : 35)

8) ポリ乳酸マイクロカプセルを用いたステロイド封入カプセルによる難治性潰瘍性大腸炎治療の臨床試験 (分担研究者 : 岡崎和一)

岡崎和一<sup>1</sup>、○松下光伸<sup>1</sup>、深田憲将<sup>1</sup>、内田一茂<sup>1</sup>、安藤祐吾<sup>1</sup>、川股聖二<sup>1</sup>、大宮美香<sup>1</sup>、藤井寿仁<sup>1</sup>、廣田育彦<sup>2</sup>、田畑泰彦<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>関西医科大学内科学第三講座、<sup>2</sup>関西医科大学薬剤部、<sup>3</sup>京都大学再生医科学研究所)

9) ヒト組み換えチオレドキシシン封入ゼラチンマイクロスフェアを用いた炎症性腸疾患に対する新しい治療 (分担研究者 : 岡崎和一)

岡崎和一<sup>1</sup>、○内田一茂<sup>1</sup>、深田憲将<sup>1</sup>、安藤祐吾<sup>1</sup>、松下光伸<sup>1</sup>、玉置敬之<sup>2</sup>、西尾彰功<sup>2</sup>、仲瀬裕志<sup>2</sup>、田畑泰彦<sup>3</sup>、淀井淳二<sup>4</sup> (<sup>1</sup>関西医科大学内科学第三講座、<sup>2</sup>京都大学消化器内科・<sup>3</sup>再生医科学研究所・<sup>4</sup>ウイルス研究所)

◎ 新しいコンセプトによる治療法開発 (15 : 35～15 : 50)

10) OPC-6535 の腸炎抑制機序について (分担研究者 : 日比紀文)

- 市川仁志、岡本 晋、井上 詠、久松理一、長沼 誠、矢島知治、中澤 敦、  
高田康裕、緒方 靖彦、岩男 泰、日比紀文 (慶應義塾大学医学部消化器内科)

事務局連絡

閉会の挨拶

(16 : 00 終了予定)



平成 18 年度第 1 回総会出席者名簿

平成 18 年 7 月 21 日 (金)

参加者 52 名 (敬称略)

班 長	岡崎和一 (関西医科大学内科学第三講座)
分担研究者	浅香正博 (北海道大学大学院医学研究科消化器内科学) 高後 裕 (旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学) 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) 渡辺 守 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学) 竹田 潔 (九州大学生体防御医学研究所発生工学) 中村和彦 (九州大学大学院医学研究科病態制御内科学)
参加協力者	武田宏司 (北海道大学大学院医学研究科消化器内科学) 蘆田知史、稲葉勇平 (旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学) 前本篤男 (旭川医科大学消化管再生修復医学) 河内裕介 (新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学) 小島 徹 (東京大学大腸・肛門外科) 伊達昌一、緒方晴彦、岡本 晋、和田安代、市川仁志、井上 詠 (慶應義塾大学消化器内科) 金井隆典、土屋輝一郎、岡本隆一 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学) 大塚和朗 (昭和大学横浜市北部病院消化器センター) 宮田充樹 (愛知医科大学消化器内科) 井戸章雄 (京都大学探索医療センター) 松田 宙、中島清一 (大阪大学第一外科) 渡辺憲治 (大阪市立大学大学院消化器器官制御内科学) 年名 謙 (大阪医科大学第二内科) 根津理一郎、長谷川順一 (大阪労災病院外科) 水島恒和 (市立泉佐野病院外科) 高川哲也 (兵庫医科大学内科学下部消化管科) 隅田頼信、金山兼司 (九州大学大学院医学研究科病態制御内科学) 光山慶一 (久留米大学第二内科) 相澤菜穂、山室直哉、金山慎一 (日清キョーリン製薬) 藤田康一 (医薬研 P L E - 2) 本田剛一 (旭化成ファーマ) 人見麻子 (旭化成メディカル) 辻井勝哉 (田辺製薬) 長本 尚 (大塚製薬) 牧野友彦 (厚生労働省疾病対策課) 安藤祐吾、深田憲将、川股聖二、内田一茂 (関西医科大学内科学第三講座)
事務局	松下光伸、北村涼子、長谷川衣麻 (関西医科大学内科学第三講座)

厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業  
「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」  
平成18年度第1回総会議事録

(敬称略)

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)

期日：平成18年7月21日(金) 13:00~16:00

場所：味の素(株)本社 B1 大会議室 (東京都中央区京橋1-15-1)

I. 主任研究者挨拶・研究の進め方 班長：岡崎 和一

II. 研究報告

【上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立】

- ・腸管上皮分化の分化制御機構の解明と粘膜再生治療への応用  
分担研究者：渡辺 守
- ・Recombinant soluble thrombomodulinの実験腸炎に対する治療効果  
分担研究者：高後 裕
- ・炎症性腸疾患に対するHGF大腸粘膜下注入療法の開発  
分担研究者：鈴木健司
- ・炎症性腸疾患に対する組換えヒトHGFの臨床応用  
分担研究者：坪内博仁

【腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発】

- ・自然免疫系の活性制御と炎症性腸疾患  
分担研究者：竹田 潔
- ・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

【選択的細胞除去・移入療法の開発】

- ・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：これまでの結果と今後の展望  
分担研究者：中村和彦

【バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療】

- ・ポリ乳酸マイクロカプセルを用いたステロイド封入カプセルによる難治性潰瘍性大腸炎治療の臨床試験  
分担研究者：岡崎和一
- ・ヒト組み換えチオレドキシン封入ゼラチンマイクロスフェアを用いた炎症性腸疾患に対する新しい治療  
分担研究者：岡崎和一

【新しいコンセプトによる治療法開発】

- ・OPC-6535の腸炎抑制機序について  
分担研究者：日比紀文

事務局連絡

I. 主任研究者挨拶・研究の進め方 班長：岡崎和一

◆経緯・背景と現況

- ・潰瘍性大腸炎、クローン病の両疾患は経年的に増加し、特に潰瘍性大腸炎は8万人を超えている。5万人を超すと稀な疾患とは言えない。(厚生労働省の見解)
  - ・難治例が増加し、治療の問題点は患者のQOLが悪いことにある。
  - ・現在の難治例治療の主体である免疫抑制療法には限界がある。
  - ・炎症が良くなっても、潰瘍病変がなかなか良くならない。
  - ・医療費が高額である。
  - ・まったく新しい考え方の治療法が必要
- ⇒画期的治療法に関する研究班発足(渡辺班)

◆渡辺班の成果評価

- ・3年間の渡辺班の評価は学術的評価が高く(43編のインパクトファクター7以上の論文)、行政的評価も10件の臨床応用(1件は治験)があり、高いものがある。

◆岡崎班の考え方

【グループの構成】

渡辺班のメンバーを継承発展、新規プロジェクト(臨床系研究者8名・基礎系研究者1名 計9名)

主任研究者：岡崎和一(関西医科大学内科学第三講座教授)

分担研究者：渡辺 守(東京医科歯科大学消化器内科教授)

日比紀文(慶應義塾大学消化器内科教授)

浅香正博(北海道大学分子病態制御教授)

坪内博仁(鹿児島大学消化器疾患・生活習慣病学教授)

高後 裕(旭川医科大学第三内科教授)

中村和彦(九州大学病態制御内科教授)

鈴木健司(新潟大学消化器内科)

竹田 潔(九州大学生体防御研究所発生工学教授)

【グループの目標】

- ①これまでの概念とは異なる機序の薬 ⇒ 基礎的研究の遂行
- ②治療法の開発に直結する研究
- ③臨床応用の出来る研究
- ④患者QOLに役立つ治療法
- ⑤医療経済に貢献するため既存の安価な薬剤による治療
- ⑥Quality JOURNAL への発表、社会的なインパクトも必要

【具体的なプロジェクト】

プロジェクト(1)：「上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立」

坪内博仁(鹿児島大学消化器疾患・生活習慣病学教授) 鈴木健司(新潟大学消化器内科)

高後 裕(旭川医科大学第三内科教授)

渡辺 守(東京医科歯科大学消化器内科教授)

プロジェクト(2)：「腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発」

浅香正博(北海道大学分子病態制御教授)

竹田 潔(九州大学生体防御研究所発生工学教授)

プロジェクト(3)：「選択的細胞除去・移入療法の開発」

中村和彦(九州大学病態制御内科教授)

プロジェクト(4)：「バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療」

岡崎和一(関西医科大学第三内科教授)

その他のプロジェクト：「新しいコンセプトによる治療法開発」

日比紀文(慶應義塾大学消化器内科教授)

【本研究班プロジェクトの展開】

- ・ 早期の臨床応用に向けての展開が必要  
特に遂行中の臨床試験の有効性に関する EBM の確立  
更なる安全性の確認  
治験の実現に向けての展開
- ・ 展望：既存の安価な薬剤の適応拡大  
新規治療法により、手術、入院を減らす 患者 QOL に貢献  
⇒ 医療経済に貢献

#### 【事前評価】

- ・ 今年3月に厚生労働省にて事前評価
  - ・ 専門的・学術的評価点数：7.58点（平均6.51点）
  - ・ 行政的評価点数：8.38点（平均6.42点）
  - ・ 合計点15.91点（平均12.93点）
- ※班員の皆様のご努力により、この評価を維持し、さらに上げていくことを目指したい。

#### 【厚生労働省健康局疾病対策課牧野先生からのご挨拶】

- ・ 難病制度の見直しが検討されている。
- ・ 難病事業は研究事業としても長い歴史があり、難病事業の成果として日本発の LCAP/GCAP が生まれた。
- ・ 基礎研究、治療法の開発研究は最重要のものとして、その財源を減らすことのないように取り組んでいる。
- ・ 渡辺班の事後評価は極めて高いものがあった。
- ・ その成果を岡崎班で継承されることを事前評価委員会で承認された。3年かの発展を期待したい。
- ・ 研究事業の評価は、毎年夏に総合科学技術会議が内閣府で開催されるが、難病研究は30年歴史があるが、難病を卒業したものはないとの指摘あり。
- ・ 研究事業は治療法の開発、原因の解明など成果はあがっている。希少難病に対し医師の視線を向け、医療提供に寄与した貢献は大きい。（難病患者さんの希望の光である。）

II 研究報告

上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立

腸管上皮分化の分化制御機構の解明と粘膜再生治療への応用

(分担研究者：渡辺 守)

発表：土屋輝一郎

[背景]

- ・潰瘍性大腸炎においては杯細胞が激減し、杯細胞の減少が腸管機能の破綻を助長しているのではないかと推察されている。
- ・2つの遺伝子改変モデルマウスでの検討より、Math1 蛋白は杯細胞の増加を促進し、Hes1 は杯細胞の増加を抑制している遺伝子、と大まかな住み分けが出来ているのではないかと推察されている。
- ・腸管上皮の分化の調節因子として Wnt シグナルが挙げられる。
- ・腸管上皮の Wnt シグナルの調整機構について、  
その幹細胞もしくは増殖体の付近で Wnt シグナルが働く事で細胞室中の  $\beta$ -catenin 蛋白が安定化し、核中に入り細胞増殖をつかさどる。逆に管腔が荒れ、分化すると Wnt シグナルが off になる事で、アキシン、APC、GSK-3 $\beta$  という蛋白が積極的に  $\beta$ -catenin 蛋白を壊し、細胞増殖のシグナルを起こすとされている。  
→しかし、直接的に分化とどう関わってくるかは分かっておらず、そこで Wnt シグナルと Math1 の関係について解析を始めた。

[検討 1]

- ・Math1 の遺伝子を導入する事で細胞株がどのように変化するかを解析

[結果 1]

- ・GFP 蛋白は全ての細胞で発現を確認する事が出来たが、Math1 遺伝子に関しては、遺伝子導入はされているものの Wnt シグナルが on になっている細胞では全て Math1 蛋白は検出されなかった。  
→Wnt シグナルが off の細胞だけ Math1 蛋白が発現する事が分かった。

[検討 2]

- ・Wnt シグナルが on になっている細胞において Math1 蛋白が検出されない事について解析

[結果 2]

- ・MG132 というプロテアソーム系の阻害剤によって Math1 蛋白が発現する事が分かり、さらにこの Math1 蛋白がユビキチン化しているのではないかと推察するという事も解析した。  
→つまり Wnt シグナルが on の細胞では Math1 蛋白というユビキチンプロテアソーム系の蛋白分化において積極的に蛋白分解を受けているのではないかと推察されている。
- ・Wnt シグナルと関係のある GSK-3 $\beta$  の阻害剤によっても Wnt シグナル、Math1 蛋白の検出が可能であった。

[まとめ 1・2]

- ・Wnt シグナルが on になっている細胞においては Math1 蛋白はユビキチンライゲースというものに認識されてユビキチン化される事によって積極的にプロテアソームによって蛋白分解を受けている。
- ・GSK-3 $\beta$  というリン酸化酵素の機能によって蛋白分解が起きている。Math1 蛋白分解は GSK-3 $\beta$  によってユビキチン-プロテアソーム系の蛋白分解を起こす事は、Wnt シグナルの  $\beta$ -catenin と全く同じ機能である。

[検討 3]

- ・ $\beta$ -catenin と Math1 の蛋白分解は Wnt シグナルでどのように関わっているか解析。  
→Wnt シグナル off の細胞を使い、これに強制的に Wnt を刺激する事によって、その  $\beta$ -catenin と Math1 蛋白の安定性がどうなるかを解析。

[結果 3]

- ・Wnt シグナルが on になる事によって  $\beta$ -catenin 蛋白が安定化すると同時に Math1 蛋白は蛋白分解を起こす事が分かった。
- ・APC を欠損している部分を補うことで Wnt シグナルを off にし、 $\beta$ -catenin の蛋白が減ると同時に Math1 蛋白が安定化するという事が分かった。

[まとめ]

- ・腸の幹細胞流用域では、Wnt シグナルが on の状態では GSK-3 $\beta$  が Math1 をターゲットにして蛋白分解を起こす一方、 $\beta$ -catenin の蛋白安定化が多細胞増殖をつかさどる。続いて、Wnt シグナル off になった時に GSK-3 $\beta$  が  $\beta$ -catenin をターゲットに蛋白分解を起こし Math1 蛋白を安定化する事で杯細胞分解を起こすことが考察された。このように Wnt シグナルによる GSK-3 $\beta$  のスイッチングが細胞増殖と杯細胞分化の機能を制御していることが考察された。

Recombinant soluble thrombomodulin の実験腸炎に対する治療効果

(分担研究者：高後 裕)

発表：蘆田知史

[背景]

- ・新しい抗炎症治療剤の可能性を模索し、thrombomodulin に注目して検討を行なった。
- ・thrombomodulin は、血管内皮細胞上に存在するトロンビンのレセプター分子として発見された分子で、トロンビンと特異的に結合しトロンビンの凝固活性を阻害する。直接結合して阻害する活性で発見された。
- ・その他、プロテインCを活性化し、プロテインSとして働いて、そのトロンビンを生成する前の coagulation factor を分解し、低い濃度であってもその元を断つ事で、非常に広い抗凝固活性を持つ物質として、凝固の分野では非常に注目されている分子。
- ・近年、凝固系分子と炎症の関係が注目されており、thrombomodulin における主にリクチンドメインの部分はトロンビンの結合とはあまり関係なく、炎症性サイトカインとして注目されている HMGB1 との結合や、あるいは直接白血球の接着を阻害する効果があることが報告され、さらにリクチンドメインはNF $\kappa$ BやMap Kinaseを介した系で cell adhesion を抑制することが分かってきている。
- ・またEGFレセプタードメインはトロンビンを結合するだけではなく、fibroblast growth を促進することや、別のproteinase系を阻害して補体活性化を阻害するといった様々な機能を持つ分子である事が分かっている。
- ・炎症性腸疾患においても近年、HMGB1が血液中に増加しているという報告が散見され、thrombomodulin が炎症性腸疾患の炎症の改善、あるいは上皮の再生に役立つ可能性があると考えた。

[方法]

- ・可溶性組換えヒトTM(ART-123、Recombinant human soluble thrombomodulin )をTNBS腸炎ラットに3mg/kg/day皮下投与
- ・Day0にTNBS腸炎を作り、翌日から10日間ART-123またはPBS(vehicle) controlを投与。  
11日目にsacrificeし、腸の状態を観察した。

[結果]

- ・体重の経過  
→例数の少なさより両群間で有意差は認められなかったが、実薬群でどの経過においても体重が重く、ウエスティングディシーズが軽減されている印象が得られた。
- ・腸の肉眼所見  
→実薬群で比較的炎症が軽度で、潰瘍も既に上皮化しているものが観察された。
- ・ダメージスコア(モリス・ボビンら)による評価  
→実薬群で有意に低値を示した。
- ・組織学的評価  
→非投与群では潰瘍がTrance luminalに筋層を超えているようなものが多くみられたが、実薬群では潰瘍の伸展がおおよそ粘膜下層までに留まり上皮形成も多く観察された。
- ・Histological score(Medina, Amehoら)のグレーディング  
→どちらのスコアでも実薬群で有意に低値を示した。

[まとめ]

- ・以上、thrombomodulin が新しい炎症性腸疾患の治療薬になる可能性が考察され、今後、作用機序、あるいは別モデルでの解析を継続する。

**炎症性腸疾患に対する HGF 大腸粘膜下注入療法の開発**

(分担研究者：鈴木健司)

**[背景]**

- ・ 肝臓への HGF の遺伝子導入により、実験腸炎を治せることを証明した。
- しかし HGF を全身で高濃度に発現させ続ける事は HGF の増殖作用が発癌の危険性を孕んでいる。そのため局所で発現させる方法を開発しなければならないという課題に至った。

**[DDS 腸炎モデルに対する HGF 遺伝子導入の検討]**

- ・ DDS 腸炎ラットに経肛門的に HGF を投与したところ、腸管短縮抑制、血便、腸管粘膜、組織学的にも改善が認められた。
- しかしながら遺伝子治療となると、臨床応用までに長期間を要することから、recombinant の HGF を大腸粘膜下に注入する方法による治療効果の検討を行った。

**[DDS 腸炎モデルに対する recombinant HGF の検討]**

- ・ DDS 腸炎モデルの大腸粘膜下に recombinant HGF を注入したところ、腸管短縮抑制を認め、臨床スコア、内視鏡所見、組織学的に改善が認められた。
- ・ recombinant HGF の投与により陰窩低部の BRD 抑制細胞が増加し、再生が促され、アポトーシスが減少した。さらに、recombinant HGF 自体に抗炎症作用を有する。以上より DDS 腸炎における予防効果が明らかとなった。

**[DSS 腸炎穿孔モデルに対する recombinant HGF の検討]**

- ・ 腸管短縮の抑制、臨床症状、組織学的所見の改善が認められた。以上より、既病変に対する治療効果が明らかとなった。

**[まとめ]**

- ・ recombinant human HGF の治療効果と予防効果が明らかとなり、非常に期待出来る薬物であることが考察された。

**[今後の展望]**

- ・ rh-HGF の内視鏡下粘膜注入でも DSS 腸炎マウスモデルに対して遺伝子導入法と同様の治療結果が認められたことから、rh-HGF の全身投与ではなく、小腸や局所に対して大腸ファイバーやダブルバルーン内視鏡ファイバーによる、病変部への粘膜下注入が臨床応用の手段となり得るのではないかと検討を進めている
- ・ recombinant human HGF を用いた炎症性腸疾患の治療研究の可能性

**臨床研究のための課題**

1. 対象疾患の選択 潰瘍性大腸炎、クローン病
2. rh-HGF の投与 (鹿児島大学坪内教授)
3. 投与方法—単独投与、5ASA との併用 局所投与—内視鏡下の粘膜注入
4. 治療計画
5. 治療臨床研究体制

**作用機序・安全性確認—動物実験による確認**

1. 局所投与による rh-HGF 効果発現機序確認
2. 発がん性の危険性確認

炎症性腸疾患に対する組換えヒト HGF の臨床応用

(分担研究者：坪内博仁)

【背景】

発表：井戸章雄

・劇症肝炎に対する医師主導型治験の実施

医師主導型治験について：

市場性、あるいは高い致死率により企業が医薬品開発に消極的な疾患に対し、医師や医療機関が主体となり治験を実施する制度である。企業主導の治験と同様、治験薬の品質、安全性、毒性などの非臨床試験の安全性、臨床試験の管理に関する業務体制、GMP、GLP、GCP の遵守と、治験を進めるうえでのハードルは高い。

- ・製薬企業との契約締結により、GMP 基準を満たす治験薬、一部の非臨床試験データ、並びに治験届に関するノウハウを入手し、プロトコール、概要書を作成。IRB の承認、医薬品医療機器総合機構の審査、GCP に関する外部監査を経て、2005 年 9 月 1 日より劇症肝炎に対する医師主導型治験を開始した。
- ・炎症性腸疾患に組換えヒト HGF を使用するためには、劇症肝炎の治験で安全性を確認し、そのデータを持って、更なる交渉が必要となる。

【組み換え型ヒト HGF の非臨床試験 - 静脈（全身）投与 - 】

・反復投与毒性試験における有害事象

可逆性の尿中アルブミン、尿蛋白量の増加が確認されているが、現時点で、腎臓に対する異常は病理学的にも認められていない。

・安全性試験（ミニブタ）

HGF の単回静脈内投与により血圧低下を起こすが、輸液を十分に行うことで対応可能であり、また心毒性が無いことも確認された。

- 単回静脈内投与：ラット、ミニブタ～半減期短い、主たる標的臓器は肝臓

【劇症肝炎および遅発性肝不全に対する組換え型ヒト肝細胞増殖因子の第 I・II 相試験】

- ・被験者採用は厳格に進められているが、2006 年 1 月に第 1 症例を採用した。

→症例：2006 年 1 月初旬発症の劇症肝炎亜急性型 60 歳 男性

13 日間に渡り HGF を投与し、その後 14 日間の経過観察を行った。血漿交換を中止するとビリルビンが徐々に増加するが、プロトロンビン時間、脳漿意識レベルは特に変化を認めなかった。

この治験では死亡確率 80%以上の患者を対象としており、また全国集計からは意識障害発現後 2 週間以内に 90%以上が死亡するのが劇症肝炎亜急性型である。この症例は 1 ヶ月以上に渡り生存したが、HGF の効果によるものかはさらなる症例の集積により客観的に判断する必要がある。

一方、組換えヒト HGF は血圧低下作用が認められたことから、方法として 3 時間かけて段階的に増量しながら投与している。薬物動態として血清 HGF 濃度が約 1ng を越えたところから安全性試験と同様に血圧低下を認めるが、十分な輸液により改善することが本試験でも明らかとなり、血圧低下による治験薬投与の中止には至らなかった。

尚、第三者機関である独立データモニタリング委員会の評価により、HGF による直接的な有害事象は無いと評価され、第 2 症例以降への継続が承認されている。

【炎症性腸疾患への臨床応用（治験）へ向けた検討】

- ・単回静注された HGF は 70~80%が肝臓へ移行する。一方、大腸への移行は多くて 1~2%で、炎症性腸疾患に対する静注投与は他臓器への毒性を考えると非現実的である。

- ・局注投与の場合、血中に少しリークすると考えられるが、門脈を介してほとんどが肝臓にトラップされることが想定される（確認必要）。

- ・ラットに対する HGF4mg 注腸投与による末梢血中 HGF の存在有無を検討

120 分まで経時的に採血したところ、末梢血中では HGF の存在は認められなかった。しかしながらマウスでは 1 時間、2 時間、6 時間で観察したところ 6 時間後に末梢血中で HGF の存在が認められ、現在、再検実施。

尚、今のところ注腸投与における腎毒性はあまり心配無いと考える。

- ・大腸発癌モデルに対する HGF 投与の検討

ACF の発生数に影響は無く、むしろ 4crypt の ACF の発生は抑制傾向を示した。また、adenoma、adenocarcinoma の発生数に関しても統計学的な有意差は認められなかった。

【今後の検討課題と炎症性腸疾患に対する展望】

- ・さらに必要な非臨床安全性試験を追加
- ・血中曝露の有無についてのさらなるデータ集積
- ・HGF 注腸投与における薬効薬理試験の追加
- ・現在実施中の劇症肝炎に対する治験の推進と安全性データを持って企業へアプローチを行い、炎症性腸疾患を対象疾患に追加し、新たな契約締結に望みたいと考えている。



腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発

自然免疫系の活性制御と炎症性腸疾患

(分担研究者：竹田 潔)

[背景・目的]

- ・ Stat3 ノックアウトマウスから採取したマクロファージや樹状細胞は IL-10 のシグナルが無くなり、自然免疫系が異常な活性化状態となる。
- ・ 腸管から採取した自然免疫系担当細胞は LPS に全く反応せず、サイトカインを産生することができない。しかしながら IL-10 ノックアウトマウスから採取した自然免疫系細胞は LPS に応答し炎症性サイトカインを過剰に産生することができることがわかってきた。
- 腸管に局在するような細胞が LPS 等の TLR の刺激に対する応答性を持っていることが自然免疫系の異常活性のトリガーとなり炎症性腸疾患の発症に繋がることがわかってきた。
- ・ 正常マウスにおいて、通常の細胞が TLR の刺激に対して不応答になる理由はなぜかという点について解析を試み、その結果、正常大腸に局在する自然免疫系担当細胞のみに発現する遺伝子として  $\text{I}\kappa\text{-BNS}$  に注目し解析を行った。

[ $\text{I}\kappa\text{-BNS}$  の検討]

- ・  $\text{I}\kappa\text{-BNS}$  の機能をノックアウトマウスあるいは分子生物学的に解析を行った結果、 $\text{I}\kappa\text{-BNS}$  は腸管に局在する自然免疫系担当細胞に恒常的に発現し、他の自然免疫系担当細胞にも TLR の刺激で発現が誘導される。
- ・  $\text{I}\kappa\text{-BNS}$  は核内で  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  の活性を抑制し、また、遺伝子発現レベルから見ると TLR の刺激で  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  遺伝子に遅れて誘導される遺伝子群を特異的にブロックすることがわかってきた。さらに個体レベルでは  $\text{I}\kappa\text{-BNS}$  のノックアウトマウスは DSS 腸炎に極めて感受性が高まり、 $\text{I}\kappa\text{-BNS}$  が腸管炎症の抑制に関わっていることがわかってきた。
- 自然免疫系の活性を制御するメカニズムを解明することによって炎症性腸疾患の制御が可能になると考え、解析を続けている。

[遺伝子誘導の検討]

- ・ 基本的に  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  依存性の遺伝子群が炎症を誘導してくるが、その中で何故か極めて早く誘導される遺伝子と遅く誘導されてくる遺伝子が存在することがわかった。
- 自然免疫系の活性を制御する為にはこの遺伝子発現機構を明らかにする必要がありプロモーター領域の解析を考えている。

[方法]

- ・ 早く誘導される遺伝子のモデルとしてニップ 2 遺伝子、遅く誘導される遺伝子のモデルとしてリポカリン 2 遺伝子を用いて、クロマチン免疫沈降法によりプロモーター領域の活性を解析。
- ・ まず腹腔マクロファージを採取し LPS 刺激によって  $\text{NF}\kappa\text{-B}$  の P65、あるいは基本転写因子群になる RNA ポリメラーゼ 2、あるいは TBP などのプロモーター領域へのカイゴウを検討した。

[結果]

- ・ 遅れて誘導される遺伝子群のリポカリン 2 のプロモーターを見ると、正常マウスの細胞では 180 分後に誘導される。TLR の刺激がなくなる MID88 では全く出てこない。
- ・ 早く誘導される遺伝子群は P65、ポリメラーゼ 2、TBP とともに遅く誘導される遺伝子群に比べ極めて早い時間 (15 分) で誘導されてきた。さらに MID88 のノックアウトマウスにおいても、遅く誘導される遺伝子では全く誘導が起らなかったのに対し、早く誘導される遺伝子では転写因子群の誘導が認められた。
- プロモーターの構造が異なるため、早く誘導される遺伝子では、転写因子群が極めてアクセスし易い状況になっていることが考えられる。この転写因子群のアクセスに関し、近年、クロマチン構造がオープンになっているか否かが epigenetic な制御が関与していると言われている。

[クロマチン構造の検討]

- ・ ヒストン H 酸のトリメチル化を detect する抗体がメチル化されていれば、クロマチン構造がオープンになっていることを示唆する。これを指標にクロマチン免疫沈降法を行うと、まず早く誘導される遺伝子についてニップ 2、 $\text{KC}\text{-}\kappa\text{モカイン}$  の遺伝子でみると、ヒストン H 酸が刺激前から常にメチル化されている。即ちクロマチン構造が常にオープンな状態になっている。一方、遅く誘導される遺伝子は刺激前には全くトリメチル化されておらず、LPS の刺激で 180 分後からメチル化が起こる。MID88 では開いてこない。

[まとめ]

- ・ 早く誘導される遺伝子のプロモーターの場合は、クロマチン構造が開いていて、転写因子群がアクセスし易い状況にある。一方、遅く誘導される遺伝子のプロモーターの場合にはクロマチン構造が閉じていることから簡単にはアクセスできない状況になっている。そこに TLR の刺激でクロマチン構造が開いてきて、転写因

子がアクセスできるようになってくるということがわかってきた。

[今後の展望]

- ・どのような分子がクロマチン構造を開くのか現在解析をおこなっている。
  - ・クロマチン構造を1 $\mu$ -BNAはいかに閉じるのか。
  - ・早く誘導されてくる遺伝子のプロモーターの活性を制御する molecule は何か。
- 以上、自然免疫系の活性制御機構を明らかにし、慢性炎症性腸疾患への応用へ生かしていく。

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)

発表：武田宏司

[背景]

- ・現在、MIF のヒト化抗体やキメラ抗体を使った Strategy が非常に注目されているが、特許の関係でなかなか応用できないことが分かり、中断している。
- ・そこで、MIF ノックアウトマウスにて MIF の制御が解說的にできないか現在検討を行っている
- ・MIF ノックアウトマウスで炎症が起こらないがどこに作用しているかを調べ、別なアプローチができないか検討を行った。
- ・その中で、MIF に結合している蛋白の一つとして Heat shock protein 70 が腸管上皮の機能をプロテクトし、サイトカインのリリースなど炎症反応そのものを抑えているのではないかと考える。

[Heat shock protein 70 (HSP70) の検討]

- ・熱あるいは細胞障害を加えると HSP が誘導され、且つ、障害を与えないで安全に誘導させる薬剤として胃薬のテプレノン (Geranylgeranylacetone : GGA) がある。
- マウス大腸組織の HSP70 は DDS 投与後にアップリリースされることがわかった。また、DDS 腸炎に対し、ヒトでの投与量の 100 倍近い、テプレノン 300mg/kg の高用量で一応の臨床効果が確認され、組織学的にも蛋白の増加があることが明らかとなった。
- ・in vitro のデータでは、GGA1  $\mu$ M で HSP がはっきりと誘導され、その血中濃度を保てる時間は1回投与で4時間であったことから、1日3回投与が妥当であると考えられる。

[今後の展望]

- ・HSP の増加が人体のホメオスタシス、レギュレーションにどのような影響を及ぼすのかわからず、安全性が危惧される。従って、腸上皮に HSP がどれだけ出てくるのかを確かめ、至適投与量を決める必要がある。
- ・長期投与の安全性について動物実験等で確かめる必要があるかもしれない。
- ・オープンスタディで感触を確かめ、最終的には RCT が必要になるであろう。
- ・MIF 活性を体内で起こす別の方法として DNA ワクチンを用いた検討考えており、動物実験では一応の効果が確認されている。

選択的細胞除去・移入療法の開発

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：これまでの結果と今後の展望

(分担研究者：中村和彦)

[背景]

- ・ヒトの末梢血に存在する CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞は非常に強い免疫抑制作用を有することから、この細胞を何とか IBD の治療に応用できないかということからスタートしている。
- ・血球成分除去・制御性T細胞移入療法：  
潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法を遠心分離法にて施行する。この際、恐らく大腸を遊動しているエフェクター細胞に加えて、制御性細胞も除去されていると考えられるので、除去された白血球より磁気ビーズを用いて制御性T細胞を分離し、患者へ移入するという方法を考えている。また、将来的な課題として、もし直接移入によって十分な効果が得られない場合は、制御性T細胞を *in vitro* で大量に培養して移入するということも考えていかなければならない。

[ChiniMACS Cell Selection Systemについて]

- ・制御性T細胞移入療法を行う為には、臨床応用が可能なグレードでの無菌的細胞分離法が必要となってくる。ChiniMACS Cell Selection System はミルテニーバイオテック社の細胞分離システムで、閉鎖回路内で無菌的に大量の細胞分離が可能で、CD34<sup>+</sup>肝細胞移植などで既にヨーロッパで臨床に用いられている実績がある。

[ChiniMACS Cell Selection System を用いた制御性T細胞の分離方法の検討]

- ・ChiniMACS を用いて制御性T細胞を分離するにあたり、二つの方法が考えられる。一つは CD8<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>の細胞を depletion した後に CD25<sup>+</sup>を selection する 2ステップ法、二つ目は direct に CD25<sup>+</sup>細胞だけを集めてくるシングルステップ法であるが、2ステップ法においては回収率、シングルステップ法においては CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>あるいは CD19<sup>+</sup>細胞が混入してくる事が問題にならないかという疑問が出てくる。

→二つの方法をパイロットスタディで比較し検討を行った。

<2ステップ法>

- ・分離後 CD8<sup>+</sup>細胞はほぼ除去され、B細胞も同様にほぼ除去できている。また、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>においては、分離前は細胞中の 2.8%が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>の強陽性細胞であったが、分離後は、全細胞中の 41.9%が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>の細胞になっている。あと 95%以上が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞になっており、noneCD4細胞はほとんど入っていなかった。
- ・次に制御性T細胞の特異的な転写因子である FOXP3 の細胞内染色をしたものですが、分離後、79.3%が CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>という制御性T細胞のマーカーを有した細胞に enrich できていた。
  - ・各段階の回収率は、分離前のアフレーシスプロダクト中にある CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞の細胞数を 100%とすると、CD8CD19 を deplete した段階で約 50%に減少し、次に CD25 を select すると回収率は 21.1%であった。従って一回のステップでおよそ半分の細胞が loss してしまうという結果となった。
  - ・分離した制御性T細胞の活性は、通常の CD4<sup>+</sup>細胞の増殖を 100%とすると、この方法で採取した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞ほとんど刺激に反応し増殖しなかった。また強培養すると細胞増殖は 30%程度に抑制されていて、T細胞増殖の抑制活性を示しております。従って機能的に保持された制御性T細胞の分離が可能であった。

<シングルステップ法>

- ・予想通り、分離前に存在する CD8CD19 が、分離後も同様に CD8<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>細胞が入ってきている。また、CD4CD25 は、分離前に 2.5%が CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>であったのに対し、分離後は 35.9%であった。2ステップ法との違いは noneCD4細胞が 20%程度入ってきていた。FOXP3 の細胞内染色に関しては、分離前に 5.9%が CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>であったが、分離後は 42.5%に enrich されていた。
- ・回収率は、分離前 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>細胞数を 100%とすると、分離後は 52.8%が回収できた。やはりこの場合も一回のステップで半数が loss するという結果であった。
- ・機能的なアッセイについては、*In vitro* での機能が確認できず、CD4<sup>+</sup>細胞と同様に CD25<sup>+</sup>細胞は *In vitro* で増殖し、両者の強培養で細胞増殖抑制活性を認める事はできなかった。これは制御性T細胞の割合が低かったか、あるいはB細胞の混入によりこの *In vitro* でのT細胞の増殖アッセイに影響を与えたのではないかと考察される。

→Pilot Study での比較であるが、2ステップ法の回収率はシングルステップ法の半分程度になってしまうが、*In vitro* で制御性T細胞の機能が確認できた。やはり *in vitro* で機能を確認したものを戻した方が安全性という面からも高いと考えられ、今後は2ステップ法で進めていきたいと考えている。