

[今後の展望]

- ・ Pilot Studyの実証のため、5名程の患者で血球成分除去療法産物からChiniMACSによる2ステップ法でセパレーションを行ないたい。そこで制御性T細胞の割合、特異的マーカーの発現、あるいは機能解析を行ない、臨床にそのまま戻すのに適しているかどうかをチェックする。
- ・ クリニカルトライアルを行なっていきたい。ChiniMACS CD19というビーズは、ヨーロッパではCEマークがとれているが、CD25とCD8のビーズはまだ取得できていない。(ミルテニー社より申請予定)
ミルテニー社でGVHDに対する臨床試験が進行中で、最終的な結果はまだであるが、今のところCD25ビーズで採取した細胞を戻しても大きな副作用は出ていないと聞いている。こうした結果を参考にしながら、潰瘍性大腸炎に対して血球成分除去・制御性T細胞移入療法のプロトコールを倫理委員会に申請していきたいと考えている。
- ・ 1回の血球成分除去療法を行なった産物からおよそ 2×10^7 の制御性T細胞がこの2ステップ法で回収できると考えられるが、それを戻すだけで果たして有効かどうかという疑問がある。最初の臨床試験に関しては安全性を確認するという事が第一の目標であるが、安全性が確認されれば、効果が十分でない場合に将来的にはin vitroで増殖させた後に、大量に戻すという事を考えていく必要があり、このin vitroでの大量培養法に関しても研究を進めていきたいと考えている。

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)

発表：松下光伸

[背景]

- ・炎症性腸疾患の治療にあたり、免疫抑制剤やステロイドの長期投与は副作用の問題がある。そこで、治療効果の選択性を高める、あるいは副作用を抑えることを目的にドラッグデリバリーシステムに関するプロジェクトを始めた。
- ・パルメチン酸デキサメサゾン含有マイクロスフィア-の炎症性腸疾患への検討
ベーチェット病：
→回盲部の非常に大きな潰瘍に対し、ステロイドを減量すると悪化していたのが、週1回の間欠投与にてステロイドを減量したにも関わらず潰瘍病変の治癒を認めた。
クローン病：
→腸管外症状の壊疽性膿皮症に、週1回の間欠投与にて治癒し、血中のステロイド濃度は殆ど上がらなかった。
- ・経口のドラッグデリバリーシステムの開発に際し、安全性を考慮し、ポリL乳酸、ゼラチンポリマーの2種類のデリバリーシステムを開発した。

[デキサメサゾン封入マイクロスフィアの検討]

- ・TNBS 腸炎モデルでの検討：
デキサメサゾン封入マイクロカプセルの投与により、びらん潰瘍は改善を示し、組織学的にも炎症細胞浸潤は著明に軽快した。
- ・DDS 腸炎モデルでの検討：
デキサメサゾン投与群とデキサメサゾン封入マイクロカプセル投与群は、薬剤を封入していないマイクロカプセル投与群と比較し、腸炎スコアの有意な改善を認めた。また、デキサメサゾン投与群とデキサメサゾン封入マイクロカプセル群はほぼ同等の治療効果であり、デキサメサゾン封入マイクロカプセル群では血中濃度の上昇は認めず、副作用が少ないことがわかった。
- ・実験腸炎ラットでの長期投与安全性の検討：
週2日に有効量とその10倍量を8週間および6ヶ月投与し検討した結果、毒性は認められず、著明な副作用も認められなかった。
→潰瘍性大腸炎患者に対するデキサメサゾン封入マイクロカプセルの有用性の検討を計画し、大学の倫理委員会を通過した。

[潰瘍性大腸炎患者に対するデキサメサゾン封入マイクロカプセル有用性に対する研究計画]

- ・対象：難治性潰瘍性大腸炎患者
 - 1)ステロイド抵抗例・ステロイド依存例
 - 2)ステロイドによる重症副作用の恐れがある手術適応患者
- ・方法：同意の得られた左側型または全大腸炎型に対しデキサメサゾン封入マイクロカプセル1mg/kgを4週間隔日投与
- ・評価：CAIスコア、大腸内視鏡所見、生検組織、生検組織中のデキサメサゾン濃度、副作用（血液・生化学・尿検査）

ヒト組み換えチオレドキシリ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)

発表：内田一茂

[背景]

- ・ウイルスや細菌感染をはじめとする炎症、もしくは放射線被曝などの環境因子などで生体は様々なストレスにさらされ、活性酸素種が産生される。大量の活性酸素種そのものが蛋白や DNA に障害をもたらすが、少量の活性酸素種はそれ自身がセカンドメッセンジャーとなってシグナル伝達を開始することが分かっている。このような様々なストレスに暴露されると、活性酸素種が生成され、その消去系もしくは調節系にはチオレドキシリンを介する系とグルタチオンを介する系の 2 つが代表的な系として知られている。
- ・クローン病末梢血では活性酸素種が亢進し、IBD 患者では ROS の産生が亢進していることが分かっている。一方、動物モデル (DSS 腸炎、TNBS 腸炎) でも活性酸素種の産生の亢進とそれに拮抗する抗酸化物質の産生・活性が低下していることが分かっている。
- ・そこで今回我々が注目したチオレドキシリンは 1964 年に大腸菌のリポヌクレオチド還元酵素の補酵素の一つで、欠かせない物質として発見され、1989 年にヨドエらがその sequence を同定したものである。チオレドキシリン系は SS の酸化型と SH の還元型が存在しており、この還元型が器質蛋白の還元の際に自らが酸化型になり、酸化型になったチオレドキシリンはチオレドキシリン還元酵素と NADPH をもって再び還元型に戻ってそのような活性酸素種の調節に作用していることが分かった。
- ・チオレドキシリンの主な作用としては抗酸化作用、また拡散の合成作用、転写因子制御、抗アポトーシス作用、またチオレドキシリンそのものがケモカインの作用を有する抗炎症作用を有する事が報告されている。チオレドキシリンの臓器保護作用としては、今まで急性肝炎、腎毒性、肺炎、脳虚血障害、または盲目障害についてもモデル動物で報告されているが、腸炎については不明であったため、我々は検討を行った。

[チオレドキシリンの検討]

- ・ IBD 患者における血清のチオレドキシリン値：
→活動期、非活動期クローン病、活動期、非活動期潰瘍性大腸炎、虚血性腸炎でも、健常人と比較するとチオレドキシリン値の増加を認めた。クローン病、潰瘍性大腸炎ともに病勢と相関関係がある。
- ・実験腸炎モデルにおけるチオレドキシリンの検討：
チオレドキシリンの作用について検討する為に、予防的なプロトコール (はじめから Recombinant の human チオレドキシリン投与)、治療的なプロトコール (はじめに DSS を投与し、その後にチオレドキシリンを投与) を組んで検討を行った (腹腔内投与)。さらに抗チオレドキシリン血清でどのようになるか DSS 腸炎を用いて検討した。

[結果]

- ・チオレドキシントランスジェニックマウスにおいて、体重減少および腸炎の軽減が認められ、TNF α やインターフェロン γ などのサイトカイン産生も低下した。
- ・ human Recombinant のチオレドキシリン予防的投与の検討：DSS を投与する前からチオレドキシリンを投与していると、体重減少は軽くなり、大腸粘膜でも腸炎抑制が認められた。尚、スコアリングによってもやはり腸炎が軽減している。
- ・チオレドキシリンの治療的投与の検討：体重減少が軽減され、組織でも明らかにチオレドキシリンの治療効果が認められた。
- ・抗チオレドキシリン抗体投与による検討：チオレドキシリンをブロックすると腸炎は更に悪くなるということが分かった。

[まとめ]

- ・潰瘍性大腸炎患者の血清チオレドキシリ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。今回、チオレドキ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。また Recombinant human チオレドキシリンは予防的、治療的いずれにおいても腸炎の抑制効果を発揮した。抗チオレドキシリン抗体の投与は DSS 腸炎を増悪させた。

[今後の予定]

- ・今回は腹腔内全身投与で検討を行った。今年の計画として、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 チオレドキシリンが活用できないか、予防的プロトコールと治療的プロトコールで検討する予定である。

OPC-6535 の腸炎抑制機序について

(分担研究者：日比紀文)

発表：市川仁志

[背景]

- OPC-6535 は好中球のスーパーオキシド産生を抑制する薬剤としてスクリーニングされたもので、欧米では COPD、潰瘍性大腸炎で臨床試験が行なわれその有効性が報告されている。その作用機序は完全には解明されていないが、一部に PDE4 阻害効果が関与していることが判明している。PDE はサイクリック AMP を分解する酵素であり 1~11 の isozyme が知られているが、PDE4 は好中球以外に T 細胞、単球等の免疫担当細胞や平滑筋などに存在する。サイクリック AMP は各種刺激により ATP から変換されるが、PDE インヒビターはこの分解を阻害し、細胞内のサイクリック AMP 濃度を上昇させ、顆粒の PK の活性化を促進させる。特に免疫担当細胞において PDE4 インヒビターは複数の機序により抗炎症効果を示すことが知られている。

[検討]

- PDE4 が好中球以外の免疫担当細胞に存在することから、好中球以外の細胞に対する効果を調べた。
 - <ヒト CD4 養成細胞に対する効果を検討>
OPC は末梢血中 CD4 陽性細胞を CD3、CD28 抗体で刺激した際の TNF α やインターフェロン γ の産生を著明に抑制した。
 - <単球について検討>
OPC は LPS 刺激時の TNF α の産生を抑制し、一方 IL-10 の産生は亢進した。TNF α の抑制には IL-10 の産生亢進が機序の一部と考えられている。
 - <IL-12 の産生について検討> 1
OPC は P40、P70 とも産生抑制効果を示した。
- TNF α や IL-12 の抑制には IL-10 を介さない機序も知られている為、IL-10 ノックアウトマウスのマクロファージを用い OPC の炎症性サイトカインの抑制効果を検討した。
→マクロファージには 2 つのタイプがあり、正常の腸管マクロファージは菌体成分に対し IL-12 を産生せず IL-10 を高産生し、炎症抑制性に働き、いわゆる MCS 誘導型のマクロファージと同様の性質をもつと考えられている。また正常な M 型マクロファージは菌体刺激に対し IL-12 を産生しないのに対し、腸炎自然発症モデルである IL-10 ノックアウトマウス由来の M 型マクロファージは IL-12 を高産生する。この M 型マクロファージの炎症抑制型から炎症惹起型への性質変化が腸炎発症の機序の一つと考えられている。
- IL-10 ノックアウトマウスの M 型マクロファージを腹腔内で刺激した際の TNF α や IL-12 の産生は OPC にて著明に抑制された。このことより OPC には IL-10、非依存性の炎症性サイトカイン抑制効果が存在することがわかった。次に実際に OPC が IL-10 ノックアウトマウスの慢性腸炎を抑制するか、*vivo* の投与実験を行なった。IL-10 ノックアウトマウスは 12 週例を用い、5 週間連日で経口投与実施。結果：コントロール群で脱肛が 33% 発現したが、OPC 群では一匹もカウントされなかった。次に histological score、炎症マーカーである SA についても OPC 投与群で低下傾向が認められた。UC、CD と健常人における LXR の発現がどのようになっているか調べたところ、健常人ではほとんど発現していなかったが、UC、CD 患者におけるマクロファージで高率に発現しているのが認められた。

[まとめ]

- OPC-6535 は好中球のスーパーオキシド抑制に加え、CD4 陽性細胞、単球系細胞においてインターフェロン γ 、TNF α 、IL-12 などの炎症性サイトカイン抑制効果を示した。今回は示していないが樹状細胞においても TNF α 、IL-12 の産生が抑制されている。現在更に IL-10 非依存性の IL-12 抑制機序の解明を中心に検討を進めている。

事務局連絡

[今後の予定] ※現時点のもので、変更があり次第連絡いたします。

平成18年

- ・9月上旬：分担研究費の振込み～日程が確定次第ご案内いたします

平成19年

- ・1月26日（金）：平成18年度第2回総会（時間未定）
- ・2月25日（日）：分担研究者報告書書類提出締切り
- ・3月10日（土）：収支決算報告書類提出締切り

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2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 (13:20~14:50)

1) 杯細胞分化誘導による炎症性腸疾患の新規治療法の試み (分担研究者：渡辺 守)

○ 土屋輝一郎、岡本隆一、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) 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)

○ 前本篤男²、田邊裕貴²、稲場勇平¹、藤谷幹浩¹、蘆田知史¹、高後 裕¹

(¹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、²旭川医科大学消化管再生修復医学講座)

3) ヒト腸管保護作用を持つプロバイオティクス産生物質の同定と炎症性腸疾患治療への応用 (分担研究者：高後 裕)

○ 藤谷幹浩¹、前本篤男²、田邊裕貴²、岡本耕太郎¹、渡 二郎¹、高後 裕¹

(¹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、²旭川医科大学消化管再生修復医学講座)

4) 炎症性腸疾患に対する薬剤の内視鏡的粘膜下注入療法の開発:HGFによる粘膜再生療法と内視鏡的粘膜下注入療法の作用機序の解明 (分担研究者：鈴木健司)

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

5) 潰瘍性大腸炎に対する組換えヒト HGF の I/II 相治験：治験計画届に向けた準備状況

(分担研究者：坪内博仁)

坪内博仁、○井戸章雄、沼田政嗣、山路尚久、瀬戸山仁

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学、京都大学医学部付属病院探索医療センター)

6) ラット皮下脂肪組織由来幹細胞の粘膜下局所注入法による腸管粘膜再生の検討

(分担研究者：岡崎和一)

岡崎和一^{1,3,4}、○安藤祐吾^{1,2}、稲葉宗夫²⁻⁴、坂口雄沢^{1,2}、内田一茂¹、松下光伸¹、池原進²⁻⁴

(¹関西医科大学内科学第三講座、²同 第一病理、³同 再生医学難病治療センター、⁴同 癌治療センター)

◎ 腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発 (14:50~15:20)

7) 自然免疫系による炎症性腸疾患の制御 (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)

8) 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)

○ 大川原辰也、桂田武彦、武田宏司、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 (15:20~15:35)

9) 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 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)

○ 中村和彦¹、隅田頼信¹、金山兼司¹、荻野治栄¹、水谷孝弘¹、秋穂裕唯¹、多喜研太郎¹、村尾寛之¹、樋口奈緒美¹、板場壮一¹、豊嶋崇徳²、赤司浩一²、高柳涼一¹ (¹九州大学大学院医学研究院病態制御内科、²九州大学病院遺伝子・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 : 35～16 : 05)

- 10) 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)

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

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

- 11) リポ化ステロイド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 : 多施設共同による無作為化並行群間試験案 (分担研究者 : 岡崎和一)

岡崎和一、○松下光伸、深田憲将、内田一茂、安藤祐吾、川股聖二、大宮美香、藤井寿仁

(関西医科大学内科学第三講座)

◎ 新しいコンセプトによる治療法開発 (16 : 05～16 : 20)

- 12) cAMP elevator による腸炎抑制効果 (分担研究者 : 日比紀文)

○ 岡本 晋、長沼 誠、市川仁志、井上 詠、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 : 30 終了予定)

平成 18 年度第 2 回総会出席者名簿

平成 19 年 1 月 26 日 (金)

参加者 57 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) 千葉 勉 (京都大学大学院医学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	大川原辰也、武田宏司、桂田武彦 (北海道大学大学院医学研究科消化器内科学) 藤谷幹浩 (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、飯合恒夫 (新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学) 万代恭史 (千葉大学消化器内科) 秀野泰隆 (東京大学大腸・肛門外科) 緒方晴彦、岡本 晋、和田安代、斉藤理子、久松理一、井上 詠 (慶應義塾大学消化器内科) 金井隆典、土屋輝一郎、(東京医科歯科大学大学院消化器病態学) 三上 栄 (京都大学大学院医学研究科消化器内科学) 西尾彰功、仲瀬裕志 (京都大学光学医療診療部) 井戸章雄、瀬戸山仁、沼田政嗣、山路尚久 (京都大学探索医療センター) 年名 謙、村野実之 (大阪医科大学第二内科) 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) 児玉真由美 (宮崎医療センター病院) 橋元慎一、大井秀久、上村修司、藤田 浩 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学) 相澤菜穂、山室直哉、金山慎一 (日清キョーリン製薬) 小柳勝義、牛嶋 智、伊藤明子 (アステラス製薬) 佐藤順一、細井栄治 (JIMRO) 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、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2回総会議事録

(敬称略)

主任研究者 岡崎 和一 (関西医科大学消化器肝臓内科)

期日：平成19年1月26日(金) 13:00~16:00

場所：味の素㈱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】

- ・ 杯細胞分化誘導による炎症性腸疾患の新規治療法の試み
分担研究者：渡辺 守
- ・ 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
- ・ ヒト腸管保護作用を持つプロバイオティクス産生物質の同定と炎症性腸疾患治療への応用
分担研究者：高後 裕
- ・ 炎症性腸疾患に対する薬剤の内視鏡的粘膜下注入療法の開発：
HGFによる粘膜再生療法と内視鏡的粘膜下注入療法の作用機序の解明
分担研究者：鈴木健司
- ・ 潰瘍性大腸炎に対する組換えヒトHGFのI/II相治験：治験計画届に向けた準備状況
分担研究者：坪内博仁
- ・ ラット皮下脂肪組織由来幹細胞の粘膜下局所注入法による腸管粘膜再生の検討
分担研究者：岡崎和一

【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：CliniMACS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

【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
- ・ リポ化ステロイド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：
多施設共同による無作為化並行群間試験案
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】

- ・ cAMP elevatorによる腸炎抑制効果
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。特に潰瘍性大腸炎は8万人を超え稀な疾患（5万人未満）とは言えない状況にある。特定疾患から軽症を除外する議論もあったが、来年度も引き続き特定疾患として医療補助が受けられることが決まった。
 - 難治例が増加し、治療の問題点は患者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。
 - 全く新しい考え方の治療法が是非とも必要である ⇒画期的治療法に関する研究班発足（渡辺班）

◆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し発展させる。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3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＝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

【進行中の5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」

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」

プロジェクト(3)：「選択的細胞除去・移入療法の開発」

プロジェクト(4)：「バイオマテリアルを用いた分子／薬剤デリバリーを用いた治療法の確立」

プロジェクト(5)：「既存の薬剤を新しいコンセプトで適応外応用した治療法の開発」

【平成18年度における成果】

- ・58編の学術雑誌／インパクトファクター5以上の論文11
- ・10件の臨床応用（1件治験）、9件が各大学の倫理委員会／IRB委員会への申請
- ・既に基礎研究に基づいた治療の早期臨床応用をグループとして開始している

【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
⇒医療経済に貢献する

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ていることが言われているが、この杯細胞の減少により腸管の恒常性維持が保たれないのではないかと考えられている。そこで実際に杯細胞を分化誘導することで、持続炎症をストップできるのではないかと考えられている。
- ・杯細胞の分化機構は今まで、全く言われていなかったが、近年、2つのノックアウトマウスの報告がある。
 - ・ Math1, Hath1 遺伝子：この転写因子をノックアウトすることで杯細胞が消失する。
 - ・ Notch シグナル下の Hes1 欠損マウスで逆に杯細胞が増える。
 ⇒このことから、Math1, Hath1 遺伝子は杯細胞の形成に重要である。もしくは Notch シグナル、hes 遺伝子は杯細胞に抑制的に働くのではないかと考えられている。
- ・実際に Notch シグナル、Hath1、杯細胞の関係をヒトの腸管上皮で解析したところ、Notch シグナルは杯細胞に抑制的、Hath1 は杯細胞に促進的であることが分かった。そこで杯細胞形質細胞株の LS174T に Notch の細胞内ドメインを入れることで Notch シグナルを強制的に刺激させると、内因性の Hath1 遺伝子がほとんど消失するレベルまで落ちることが分かった。
- ・Notch シグナルは杯細胞とそれ以外の細胞の細胞運命決定に関わっているのではないかと考えられている。Notch シグナルから解除することで Hath1 遺伝子が出て、杯細胞に分化するのではないかと考えられている。
- ・そこで、Notch 阻害剤を使って Hath1 遺伝子を誘導することで杯細胞の分化誘導を試みる研究を岡本先生が進めている。

[検討 1]

- ・視点を改めて、結局のところ、Hath1 遺伝子を導入してしまえば、実際に杯細胞に分化できるのではないかと考え解析を進めた。腸管の大腸株の細胞株で解析を行い、Hath1 遺伝子を導入した時点で、実際に杯細胞の分化誘導が起こるかを解析した。

[結果 2]

- ・元々 MUC2 が発現していない未熟な細胞において Hath1 遺伝子を導入しても、MUC2 の発現増殖が全く認められず、Hath1 蛋白自体も発現していないことが分かった。
- ⇒Wnt シグナルが on になっている細胞においては、GSK-3β が β カテニンのターゲットを解除することで GSK-3β がフリーになるわけであるが、このフリーになった GSK-3β が Hath1 をターゲットにして Hath1 の蛋白分解を起こすことが分かった。実際に、Wnt シグナルを off にし、GSK-3β のターゲットを β カテニンの蛋白分解に戻すと、Hath1 蛋白がフリーになり、かなり安定化することが分かった。実際に APC を導入することで、Wnt シグナルを off にすると、FLAG の Hath1 蛋白を見ることができ、それに伴って MUC2 の発現上昇が認められ、杯細胞の形質を獲得することが分かった。
- ・大腸癌患者 3 名の検体で、非癌部、癌部それぞれの遺伝子発現パターンを見たところ、予想に反し、非癌部、癌部同様に、それぞれ同等に Hath1 遺伝子が出ていたことが分かった。しかし Hath1 遺伝子が同等に出ているにも関わらず、当然のことながら癌部では杯細胞がないので MUC の発現はかなり落ちてしまっている。実際に、Hath1 蛋白の発現がどうなっているのかを、患者の癌部と非癌部の境界線上で Hath1 蛋白を免疫染色したところ、遺伝子発現は同等に存在するにも関わらず、癌部においては Hath1 蛋白は全く無く、非癌部では Hath1 蛋白が発現していた。従って、Hath1 蛋白の安定性が杯細胞の分化形質に密接に関わっているのではないかと示唆された。
- ⇒つまり Notch シグナルにおける細胞運命の決定だけでなく、Wnt シグナルによる Hath1 蛋白の安定化が杯細胞の分化形質に重要ではないかと考えた。

[検討 2]

- ・Hath1 蛋白安定化を標的とした分化誘導の可能性を検討するために、Hath1 蛋白の性質を解析したところ、Hath1 蛋白は GSK-3β によって consensus sequence のセリン残基をリン酸化されることによって、ユビキチン結合酵素がついて、ポリユビキチン化され、プロテアソーム系の蛋白分解を起こすことが分かった。
- ⇒この経路の中で、2つのターゲットを設けた。一つはリン酸化される Hath1 蛋白のセリン残基、もう一つは GSK-3β のリン酸化の活性。この2つをターゲットとすることで分化誘導できないか考えた。

[結果 2]

- ・セリン残基をアラニン残基に変え、腸の細胞において stables cell line を作ったところ、蛋白分解阻害剤を用いなくても、当初から蛋白が安定化して発現することが認められた。このような細胞株においては、Wild type を発現させただけでは MUC の遺伝子レベルは全く変わりが無いが、蛋白が安定化された細胞株では MUC2 の発現上昇を認めている。
 - ・ GSK-3 β をターゲットにして、GSK-3 β 阻害剤を用いたところ、同様に、当初は全く Hath1 蛋白が認められなかったが、GSK-3 β を阻害することによって、Hath1 蛋白の存在が認められ、同時に MUC2 の遺伝子上昇が認められた。
- ⇒以上のことから、GSK-3 β 阻害剤を用いて Hath1 蛋白を安定化して発現させることが杯細胞の誘導に繋がるのではないかと考えている。さらに腸炎の治療薬に用いることができるのではないかと考えている。

[今後の計画]

- ・ 実験腸炎マウスにおける GSK 阻害剤の有効性の検討
- ・ 安定化 Hath1 変異体の腸管特異的発現モデルマウスの構築

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)

発表：前本篤男

[背景]

- ・ DSS 腸炎を用いた recombinantHD5 抗菌ペプチド投与が有効であるかどうか検討した。

<HD5 について>

- ・ 内因性抗菌ペプチドである HD5 はパネート細胞に存在している。
- ・ HD5 の transgenic マウスを用いた実験報告があり、それによると、HD5 は小腸に特異的に発現し、しかもパネート細胞に発現する。
- ・ サルモネラの経口投与によるチャレンジテストにおいて、Wild type はその殆どが 2 日で死亡するが、HD5 が発現している transgenic マウスは長生きする。感染症においてこの HD5 は有効であることが報告されている。
- ・ 我々は、クローン病において、小腸縦走潰瘍の近傍 crypt は形態的にも異常があり、パネート細胞から分泌される抗菌活性物質は、有意に低下していることを今まで報告してきた。その原因としては mRNA の低下や、抗菌蛋白自体の構造異常などが示唆されると報告してきた。クローン病において抗菌活性、自然免疫抗菌ペプチドの働きが何らかの形で異常が起きることにより、自然免疫抗菌ペプチドの働きが低下することで、病因と何らかの関係があることを想定しているが、逆に言うと、この抗菌ペプチドを補えば、炎症が改善するのではないかと考えた。

[目的]

- ・ 活性型 α -デフェンシンの recombinant ペプチドを作成し、経口投与による抗炎症効果を検討する。

[recombinant HD5 の作製]

<特徴>

- ・ 塩基性残基が多い。
- ・ 結合形式が決まった 3 つのシステイン結合がある。
- ・ メサイヤニンが少ない。

<問題点>

- ・ 最終収量が少ない。
- ・ システイン結合が正しく結合される必要がある。

<E. coli/pET28a vector によるペプチドの大量発現の流れ>

1. 6 リットルの TB buffer で培養
2. 0.2mM IPTG にて発現誘導
3. 培養細胞の採取
4. 超音波振動による細胞破碎し、蛋白溶出
5. ニッケルによって Fusion peptide の粗精製
6. CNBr による tag の分離
7. HPLC で精製する

<RT-HPLC による精製 (1 回目) と AU-PAGE と MS による評価>

- ・ 1 回目の HPLC で精製したクロマトグラフィで、Tag 部分が溶出された最初のピークを AU-PAGE で見ると一つのバンドになって、スペクトルメトリーでも fold されている HD5 が認められた。これは、ほぼ純正の HD5 と考えられるが、念のため、もう一度 HPLC で精製した。
- ・ 残りの、後から溶出された Tag は、様々な band があって、恐らく様々なペプチドが混在しているが、この中にも math で見ると HD5 と考えられるものが高率に混じっており、又、2 量体、3 量体と思われるような math も検出された。即ち、ここにはまだ大量の HD5 があることが示唆される。

⇒ これらをまとめて還元、さらに refold する過程を試みた。

<RT-HPLC による精製 (2 回目) と AU-PAGE と MS による評価>

- ・ 2 回目の精製において、AU-PAGE で確認すると単一の band に見えているものは最終産物として選択した。
- ⇒ しかしながら、6 リットルからせいぜい 1mg の蛋白を作るのがこの精製方法の限界であり、この量では実験がなかなか進まない。従って、さらに残りの fraction、あるいは 1 回目の HPLC で用いた fraction には HD5 が含まれている可能性があるため、これを全てまとめて reduction、refold の過程を進めた。

<reduction と refolding>

- ・ reduction : DTT を用い、酸素を排除した条件で還元化を行い、還元化された後はすぐに、HPLC で精製して HD5 が含まれる部分を同定し、さらに refold する。
- ・ refolding : アンモニアを用いて、ゆっくりと pH を上げる。その後、酸素を導入し refold する。

⇒こうした reduction、refolding の過程でさらに1mg のペプチドを回収することが可能である。

<まとめと考察>

- ・このようにして6リットルからようやく、2mg 採取することができた。これは、動物実験として用いるには十分であるが、最終的に、将来ヒトの治療に用いるためにはさらに多くの量が必要となるので recombinant 蛋白を如何にして更に安易に大量に精製するかを今後考えていきたいが、その上でも今回のような、様々な蛋白の構造を精製した過程は貴重なデータになると考えている。
 - ・fold された HD5 は非常に強い抗菌活性を有する。fold されている HD5 は、しっかりと構造を維持し、抗菌活性を維持しているが、miss fold、要するに fold されているシステイン結合の位置が違うものは、トリプシンなどの蛋白分解酵素で容易に破壊、不活化され、抗菌活性を失ってしまう。
- ⇒従って、HD5 の fold においては結合形式が非常に重要で、きちんとした形の HD5 ができるということが、活性を維持するために重要な役割を果たしている。

[DDS 腸炎における recombinant HD5 経口投与]

- ・A 群 (4%DSS 群, n=5)、B 群 (HD5 投与後 4%DSS, n=5)、C 群 (4%DSS 後 HD5 投与, n=5) の3群で生存率を検討。

[結果]

- ・A 群は10日~12日で全例が死亡した。B 群で1例、C 群で3例生存することができた。

⇒今後、組織学的な検討等を踏まえ、さらなる詳細な結果を出して報告したい。

[まとめ]

- ・recombinant HD5 を E. coli/pET28a vector 葉で発現させた。
- ・ペプチド収量を増やす目的で、reduction、および refolding を行い、6リットルの培養から得られる recombinant ペプチドを1mg から2mg へ増量することができた。
- ・DSS 腸炎モデルマウスにおいて、HD5 を前投薬あるいは後投薬することにより、DDS 腸炎による死亡を妨げる例が認められた。

⇒HD5 の経口投与による新しい腸炎治療の可能性が示唆された。

ヒト腸管保護作用を持つプロバイオティクス産生物質の同定と炎症性腸疾患治療への応用

(分担研究者:高後 裕)

発表者:藤谷幹浩

[背景]

- ・プロバイオティクスは炎症性腸疾患の治療に有効である。
 - ・有効性が低いとも言われるが、臨床において、実際に使用すると個々の症例によって作用、有効性が異なり、腸内環境に大きく作用される。
 - ・安定した効果を得るには、特異的な有効成分を同定し、その作用機序を解明することが必要と考えられる。
- ⇒プロバイオティクスに特異的な有効成分の同定として、いくつかのプロバイオティクスの中から *Bacillus subtilis* 菌をターゲットとした。

[検討と結果]

- ・*B. subtilis* 菌の培養上清を使って、ヒト腸管上皮細胞の保護作用があるかを検討した。
- ⇒24時間 incubation した後に、⁵¹Cr release を行って、酸化ストレスに対する細胞保護作用を見たところ、*subtilis* 菌の培養上清を24時間 preincubation した場合には、有意に ⁵¹Cr が減る、つまり細胞保護作用があることが分かった。
- ・Hsp (Heat shock protein) をターゲットにサイトプロテクティブなプロテインが発現するか調べたところ、やはり *B. subtilis* 菌の培養上清が Hsp27 を上皮細胞に誘導した。
- ⇒*B. subtilis* 菌培養上清にヒト腸管上皮細胞の保護作用がある。
- ・*B. subtilis* 菌培養上清の中のどのような成分が有効成分なのかをセレクトする目的で、モレキュラーウェイトで分けて観察した。
- ⇒3kD 以下のフィルターでかけた時に、Hsp27 の発現が見られ、有効成分は 3kD 以下の非常に小さいものであることが推測された。
- ・又、*B. subtilis* 菌培養上清を boil したところ、Hsp27 の活性は失われず、煮沸に耐性であった。ところが、ペプシンで treatment すると活性が失われた。
- ⇒*B. subtilis* 菌培養上清の有効成分は 3kD 以下、pepsin sensitive である。
- ・*B. subtilis* 菌の遺伝子配列から有効成分の候補を割り出し科学的に合成し、Hsp27 の誘導効果を目安にスクリーニングを行った。
- ⇒その結果、peptide X (特許申請中) を同定した。又、同様の方法で *Lactobacillus* 菌より Peptide Y を同定し、現在検討中である。
- ・*B. subtilis* 菌が分泌する Peptide X にはヒト腸管上皮細胞の保護作用があるかを検討した。
- ⇒24時間 incubation した後に、⁵¹Cr release を行って、酸化ストレスに対する細胞保護作用を見たところ、100nM の Peptide X そのものを投与した場合、有意な細胞保護作用があることが分かった。一方、*Subtilis* 菌で Peptide X を遺伝子的にノックアウトした物の培養液を使うと、細胞保護作用は打ち消された。
- ⇒やはり、Peptide X が細胞保護作用を有することが示唆された。
- ・プロテインの発現を見たところ、Peptide X は Hsp27 を誘導し、さらに、pAkt、p38MAPK を誘導することが示唆された。
 - ・2時間の incubation でマウス腸管組織の保護作用を検討したところ、100nM の peptide X は vivo においても腸管組織の保護作用があることが分かった。
 - ・やはり、これまでの結果と同様に、Hsp (25, 72) の発現が、特に小腸では強く Peptide X で誘導されている。
 - ・それでは、この Peptide X が炎症性腸疾患に応用できるかを検討する目的として、DSS colitis mouse のモデルを使って、100mM の Peptide X を注腸し、24時間後の組織学的変化を検討した結果、著明にダメージが改善されていた。
 - ・さらに、どのようなサイトカイン、ケモカインが Peptide X によって誘導されるかを、in vitro で見てみると、TNF α による CXCL-1 の発現が抑制されており、こうした機序を介して、抗炎症作用を発揮するのではないかと予測し、現在、研究を進めている。
- ⇒それでは、この Peptide X はどういう作用機序なのか。

[Peptide X の作用機序に関する検討]

- ・*B. subtilis* 菌に peptide X の transporter が存在するのではないか、そして、ヒト上皮細胞にも peptide X の transporter が存在するのではないか。

<IBD 患者で遺伝子多型が見られる細胞膜 transporter>

- ・ Multi-drug resistance gene 1 (MDR-1)

- ・ Novel organic cation transporters (OCTNs)

⇒OCTN2 でポジティブデータが得られたので報告する。

- ・ peptide X を ^{14}C でラベルし、Caco2 cell に投与すると、peptide X は腸管上皮細胞に吸収されるが、OCTN2 siRNA で OCTN2 の function を抑えると、吸収量が減ることが分かった。

⇒peptide X は腸管上皮細胞に吸収され、OCTN2 siRNA はそれを阻害する。

- ・ さらに、逆に overexpression の OCTN2 細胞株を作ると、 ^{14}C でラベルした peptide X の吸収量が増えた。

⇒peptide X は OCTN という transporter によって細胞内に取り込まれることが分かった。

- ・ FITC でラベルした検討においても同様に、15 分後に取り込まれ、一方 OCTN2 の inhibitor である L-carnitine を用いると取り込みが落ちるとの結果が得られた。

⇒それでは、本当にこの peptide X の作用が OCTN2 を介しているのか調べる目的で、OCTN2 siRNA で処理して、Heat shock protein の発現が落ちるのかを検討した。

- ・ OCTN2 siRNA を加えることで Hsp27 の発現が打ち消された。従って、peptide X の function は OCTN2 に依存していることが示唆された。

- ・ vivo の系で同様に実験を行ったところ、2 時間の incubation を行い、peptide X を作用させて検討したところ、L-carnitine を加えることで、腸管組織の保護作用が打ち消された。現在、OCTN2 ノックアウトマウスが無いので、確信は得られないが、OCTN を介していることが示唆された。

- ・ プレリミナルなデータであるが、Lactobacillus 菌より同定した Peptide Y に関しても、vitro のモデルで peptide X と同様の細胞保護作用があることが認められ、これについても研究していく。

[まとめ]

- ・ プロバイオティクスの培養液から、腸管保護作用のあるペプチドを発見した。(2 種類のペプチドについて特許申請中)

- ・ これらのペプチドは、細胞膜トランスポーター、OCTN を介して上皮細胞内に取り込まれ作用を発揮する。これは、TLRs 宿主腸内細菌と異なるもの、新しい相互作用機構であると考えられる。

[炎症性腸疾患治療に応用するための課題]

1. 各種腸炎モデルにおける peptide X の効果および有害事象を確認する。

2. 種々の修飾や配列の組み換えによる peptide X の作用の変化を調べる。

3. 遺伝子組み換え技術により、peptide X 高産生プロバイオティクス株を樹立する。

4. peptide X あるいは遺伝子組み換えプロバイオティクスを用いた、新しい炎症性腸疾患治療の確立へ向け臨床試験を行う。

5. Lactobacillus 属や Bifidobacterium 属などの他の菌種からも、有効成分を同定する。

炎症性腸疾患に対する薬剤の内視鏡的粘膜下注入療法の開発：

HGFによる粘膜再生療法と内視鏡的粘膜下注入療法の作用機序の解明

分担研究者：鈴木健司

発表者：鈴木健司

[背景]

- ・炎症性腸疾患の治療法は、従来より抗炎症療法が中心であるが、抗炎症療法のみでは限界が見られることから、この研究班のターゲットの一つである分化再生療法を開発することによって従来の治療法を補完しながら、より良い治療法を開発するべく研究が進められている。
- ・今回は、前半で、従来から研究している HGF を使った粘膜再生療法について、後半に、抗炎症療法として従来より使用されている薬剤の投与方法を変えて新たな治療法ができないかの検討を進めたので報告する。

[HGFによる粘膜再生療法の検討]

- ・最初に HGF の遺伝子療法を開発できないか研究を進めてきたが、導入方法として現実的な方法をとらねばならないという背景のもと、ラットでの大腸治療実験系を開発し、DSS 腸炎を起こしたラットの大腸粘膜下に遺伝子導入をすることによって、治療効果を判定した。

[結果]

- ・遺伝子導入群では血便は有形便になり、DSS 腸炎の特徴である腸管短縮を抑制でき、内視鏡所見、組織学的所見においても改善が認められた。
- ⇒以上の結果より、動物実験レベルにおいては、遺伝子治療はヒトに応用できる方法であるが、HGF 遺伝子の特許の問題、あるいは治療体制を考えると、近日中に臨床応用することはかなり困難であると考えていた。そこで、京都大学で近日中に臨床試験が開始されるヒト組み換え型 HGF を安全に運用するための予備データを出すための実験について鹿児島大学の坪内先生よりお声掛け頂き、実際に行った。

[検討と結果]

- ・まず予防実験として DSS 腸炎ラットに、day0 に recombinant 蛋白を注入した。
- ⇒臨床活動度、腸管短縮効果を抑制でき、内視鏡所見、組織学的にも改善が得られることが分かった。
- ・次に、治療実験として DSS 腸炎を起こして、3 日目に内視鏡を施行した。
- ⇒治療実験においても臨床活動度を抑制し血便の消失を認めた。又、腸管短縮抑制や組織学的な改善も認めた。

[まとめ]

- ・ヒト組み換え型 HGF 蛋白は非常に有効な治療であり、今年度中に臨床試験が実施されていくものと期待している。又、疾患によっては、例えばクローン病の狭窄部位があるような場合には小腸ファイバーを使って、疾患部位に到達し、粘膜下に HGF を注入することによって、又、そこでバルーン拡張した場合に、抗 fibrosis 効果と抗炎症効果が相まって非常に良い治療になるのではないかとすることを提案したいと思う。
- ⇒HGF については上記の通り、今年度から臨床試験が行われるとなると、後は、臨床面で全面的にバックアップすることが我々にできる最大限のことで、この班に貢献するためには何ができるか検討したところ、テーマにもある既存の安価な薬剤の投与方法を変えて画期的治療にならないかということを考え検討を進めた。我々はこの5年間で開発したラットの大腸内視鏡、この粘膜下注入はこのほか効果を発揮することが分かり最大の武器として使いたい。そしてターゲットは近年注目を浴びている IBD の局所に増えている Mast cell をターゲットとしたいと考えた。

[Mast Cell をターゲットとしたラットの大腸内視鏡的粘膜下注入の検討 1]

- ・予備実験として、本当に炎症性腸疾患において Mast Cell が関与しているか調べる目的で、Mast 細胞欠損マウスと Wild type で比較し、DSS 腸炎の起こり方について検討した。

[結果 1]

- ・DAI で見ると、Wild type に比べて、Mast 細胞欠損マウスでは腸炎が軽くなることが分かった。又、腸管長の短縮、浸潤細胞は Mast 細胞欠損マウスで少なく、組織学的にも Mast 細胞欠損マウスでは腸炎の程度が軽かった。
 - ・腸上皮のアポトーシスが Wild type では著明であったが、Mast 細胞欠損マウスでは少なかった。
- ⇒但し、以上のことは、既に滋賀医科大学の安藤先生らをはじめ報告されている。

[Mast Cell をターゲットとしたラットの大腸内視鏡的粘膜下注入の検討 2]

- ・次の検討として、本当に Mast 細胞が炎症惹起に関与しているのであれば、Mast 細胞の脱顆粒剤 Compound48-80 を投与することで、腸炎が悪化するか確認した。

[結果 2]

- ・DAI は悪化し、腸管長の短縮が増強されることが分かった。

[Mast Cell をターゲットとしたラットの大腸内視鏡的粘膜下注入の検討 3]

- ・最後に、Mast細胞の安定化剤であるトラニラスト（リザベル）を使って、腸炎が治るかを検討した。

[結果3]

- ・DAIは改善し、腸管長の短縮が抑えられることが分かった。

⇒但し、この検討は20年以上前に慶應大学をはじめとして実際に行われている。経口あるいは注腸のリザベルを使ったIBD治療に関する動きもあったが、米国で認可取得のためFDAでトライアルをした際に、600mgで投与を開始したところ、劇症肝炎が報告されたためにIBDへの特許申請をあきらめ、中断しているようである。そこで我々は、大腸内視鏡的粘膜下注入の方法を用いて、これを応用できないか考えた。

[Mast Cellをターゲットとしたラットの大腸内視鏡的粘膜下注入の検討4]

- ・トラニラストは親水性が非常に悪く、経口剤を砕いて懸濁状にして行っていたが、これを直接、腸に注入することも非常に難しく困っていたが、幸い安価な点眼薬があり、実際に腸に注入して検討を行った。

[結果4]

- ・予防効果の検討として、DSS腸炎ラットの、day0に内視鏡的にリザベルを注入（ヒトに相当する500mg/日、経口剤として5錠）したところ、3、4日目までしか予防効果は認めなかったが、1日目から腸炎の活動度、腸管長の短縮を抑えることができ、血便、内視鏡的、組織学的にも治療効果が得られた。
- ・治療効果の検討として、3日目にリザベルを注入したところ、翌日のDAIは良かったが、残念ながら5日目は悪く、6日目の治療効果に有意差は見られなかった。

[まとめ]

- ・HGFが再生を促進して治すという効果が主体であるのに対し、リザベルは安価で簡単に注入でき、非常に抗炎症作用が強い。従って、例えば、内視鏡的粘膜下注入療法として、これらの薬剤を上手く使うことによって、急性期の炎症をリザベルで治し、治療過程の中の後半として、粘膜再生をHGFで行うような治療も一つ提案できるのではないかと考えている。来年度はHGFに加え、抗炎症療法の分野での研究も行っていきたい。

潰瘍性大腸炎に対する組換えヒト HGF の I/II 相治験：治験計画届に向けた準備状況（分担研究者：坪内博仁）

発表者：井戸章雄

[潰瘍性大腸炎に対する組換えヒト HGF の I/II 相治験]

●治験計画届けに向けた準備として

1. 非臨床試験（注腸）

- a. 薬物動態試験
- b. 薬効薬理試験
- c. 発癌性試験（大腸発癌モデル）

⇒終了

2. 資料作成

- a. 治験薬概要書
- b. 治験実施計画書（プロトコル）
- c. 説明同意文書

⇒準備中、近々、プロトコル委員会を正式に立ち上げ、このプロトコル等に関して承認を取得するという段取りで進めている

3. 医薬品医療機器総合機構用資料

4. 治験用サンプル（治験薬）の納入

⇒終了（劇症肝炎の治験が既に入っているため）

5. 企業との契約

⇒進行中

・今回は、反復注腸投与における薬効薬理試験とプロトコルの大まかな案を提示し、ご意見を賜りたい。

[薬効薬理試験(1)：TNBS 腸炎に及ぼす HGF 注腸投与の影響]

・まず HGF 注腸投与において、どの程度の濃度が必要か調べるために TNBS 腸炎を用いて検討した。治療前に内視鏡検査を行い、全周 2/3 以上を占める大きな潰瘍を持ったラットに、HGF をそれぞれ 0.1、1、10 $\mu\text{g/ml}$ 5 日間反復投与を行った。

[結果]

・潰瘍面積が縮小することが分かり、統計学的有意差は 10 $\mu\text{g/ml}$ で得られた。このような潰瘍面積の縮小効果について、腸管粘膜上皮細胞の増殖に関し検討したところ、10 $\mu\text{g/ml}$ で統計学的有意差をもって増殖が促進されているという結果が得られた。

[薬効薬理試験(2-a)：DSS 大腸炎に及ぼす HGF 注腸投与の影響(1)]

・そこで潰瘍性大腸炎のモデルとされる DSS 腸炎モデルに対する注腸投与の影響を検討した。

[結果]

・このモデルは 5 日間の 3%DSS で腸炎を惹起し、その後、低濃度の DSS で持続させる（1%DSS で 7 日間）モデルで、この 7 日間に HGF を 10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で注腸投与すると、潰瘍面積が縮小した。

[薬効薬理試験(2-b)：DSS 大腸炎に及ぼす HGF 注腸投与の影響(2)]

・さらに細胞増殖も促進され、組織学的なスコアも改善されるという結果も得られた。

⇒このようなデータをもとに、難治性の潰瘍性大腸炎を対象とした組換えヒト HGF の第 I/II 相治験（主に、I 相と II a になるが）の安全性を評価することを主体とした治験を計画している。

[潰瘍性大腸炎に対する組換えヒト HGF の I/II 相治験]

●目的

肝細胞増殖因子（HGF）は、障害消化管粘膜の重要な再生・修復因子として考えられている。

本治験では、ステロイド依存性および抵抗性の潰瘍性大腸炎を対象として、まずは組換えヒト HGF（rh-HGF）注腸投与の安全性を評価し、併せてその臨床効果および薬物動態を検討する。

⇒残念ながら、HGF はプラセボ薬が無いので、二重盲検試験を組むことができない。従って、この場合の臨床効果の評価は弱いエビデンスになるのではないかと考えられる。従って、あくまでも安全性を評価することを念頭においた治験である。

●選択基準

一次選択基準

潰瘍性大腸炎診断基準改定案において、潰瘍性大腸炎と診断された者のうち下記の 3 項目を全て満たすもの

- ① 診断後 6 ヶ月以上 8 年以内の潰瘍性大腸炎患者