

- ② 左側大腸炎型および直腸炎型と診断された潰瘍性大腸炎患者
- ③ 現在、活動性のある潰瘍性大腸炎患者

二次選択基準

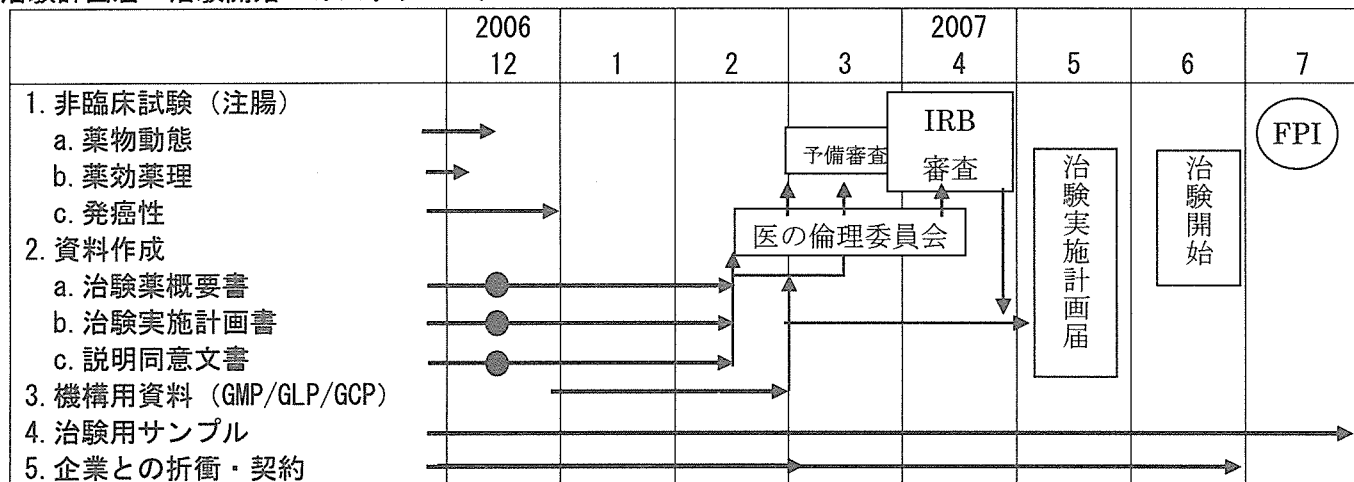
7日間の観察期間後に、初診時に比してCAIスコアに改善のない潰瘍性大腸炎患者

●概要(案)

1. 前観察期間(14日間)の後に、一次登録としてインフォームドコンセントを行う
2. その後、1週間の観察期間を行いCAIの評価、改善の無い者を二次登録とし治験エントリーとする
3. その後、14日間、1日1回のrh-HGF経肛門投与を行う

⇒この経肛門投与を入院で行うか、外来で行うかは被験者リクルートの面、又、治験実施の可能性の面から今後、煮詰めていく必要はある。被験者リクルートの面から言うとな外来で実施したいが、安全性を確保するという観点、さらにI相試験であることを考えると14日間全てを外来でするのは難しいかもしれない。さらに、観察期間を14日-28日間で設けているが、どこを終了とするかも今後、煮詰める必要がある。

●治験計画届・治験開始へのスケジュール



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)

発表者：安藤祐吾

[背景]

- ・近年、抗 TNF  $\alpha$  キメラ抗体 (レミケード) の登場により、難治性クローン病に対する治療法が飛躍的に進歩した。特に患者 QOL を悪化させる要因の一つである瘻孔に対して、レミケードが著効する症例も見られる。しかし、レミケード投与が困難な症例や、投与しても瘻孔が閉鎖せず治療に難渋する症例も存在する。
- ・近年、様々な領域において、幹細胞を用いた再生医療が盛んに行われており、クローン病も治療対象疾患と考えられている。海外では、脂肪由来幹細胞を使った Phase I clinical trial が行われており、外科的に瘻孔閉鎖を行う際、閉鎖部位に脂肪由来幹細胞を注射し、術後に瘻孔閉鎖率が改善したと報告されている。しかしこの論文において、モデル動物による検証が十分になされていなかった。

[目的]

- ・そこで我々は、粘膜再生を促す治療法として、比較的安全かつ大量に摂取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞 (Adipose Driven-Stem Cells, ADSCs) を用いて、粘膜下局所注入法により腸管粘膜再生に利用可能であるかを、腸炎モデル動物を使って検討した。

[脂肪由来幹細胞について]

- ・近年、脂肪組織内において、単クローンから多方向に分化する幹細胞が確認されており、脂肪、軟骨、骨格筋、心筋、腱、神経、血管上皮などへ分化誘導できる可能性が示唆されている。脂肪由来幹細胞は、成熟脂肪細胞間に接して存在しており、さらに脂肪組織の結合組織内にも多数存在している。脂肪組織は、採取されることによる機能障害が少なく、通常、形成外科領域で行われる脂肪吸引等では、日常的に廃棄されている組織である。骨髄由来幹細胞に比べ、採取を行う際の倫理的な問題、さらに細胞培養の際、最適化により約1週間で100倍程度増殖させることが可能といった増殖能力など優位性があると言われており、脂肪由来幹細胞は骨髄由来幹細胞に代わる再生医療の細胞源としての関心を集めている。実際にヒトの場合で500cc程度の脂肪が採取できれば、その中に $10^8$ 個程度の脂肪由来幹細胞が採取されることが想定されており、培養に伴う安全性の問題や、長期培養による幹細胞の機能的な性質、細胞表現型の変化など、細胞の質的な問題も心配することなく実用可能な細胞数を確保できるものと考えられる。又、骨髄肝葉系幹細胞と比較して、細胞表現型および多分化能な上皮上に類似した性質を備えており、優れた細胞材料である可能性があり、その応用範囲が広いと考えられている。事実、脂肪再生、骨再生、心筋再生、血管新生、難治性潰瘍などへの応用が臨床でも進みつつあり、今後の進展が期待されている。
- ・近年、脂肪組織から様々な adipo サイトカインが放出されていることが報告されており、同様にヒトの脂肪由来幹細胞においても多くの HGF および VEGF などの増殖因子が分泌されているとの報告が見られる。特に、HGF 等が多く分泌されているとの報告もあり、HGF による抗アポトーシス作用、上皮細胞増殖促進作用、血管新生促進作用、抗繊維化作用など粘膜修復に対する効果が期待されている。粘膜障害を起こした腸管局所に脂肪由来幹細胞を注入することによってこのような増殖因子が周囲の組織に作用し、血管新生および粘膜修復に寄与するものと考えられる。

[材料と方法]

- ・ラットの皮下脂肪を採取し、そこから脂肪由来幹細胞 (ADSC) を分離培養し、骨、神経、脂肪、上皮へ分化誘導を行い、多分化能を調べた。
- ・さらに、ADSC 培養液中の Growth factor (HGF, VEGF, TGF- $\beta$ ) を測定し、粘膜再生への関与を検討した。
- ・雌ラットの TNBS 大腸炎モデルを作成し、雌ラットから分離培養した ADSC を大腸粘膜下に局注し、in vivo における粘膜再生への関与を調べた。

<脂肪由来幹細胞の分離培養方法>

- ・ラットの皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼにて細胞外間質を分解し遠心した後、ペレットを培養皿に撒き、incubator で24時間培養した。翌日、浮遊細胞を PBS で数回洗浄除去し、培養皿に付着した付着性細胞のみを80%confluenceになるまで培養した。
- ・次に、一週間培養した付着性細胞を Fax 解析したところ、マクロファージおよび白血球全般に発現が見られる CD11b および CD45<sup>+</sup> の細胞が多数認められた。さらに繊維芽細胞や骨髄肝葉系幹細胞に発現している CD90 も見られた。しかし、血管内皮細胞に発現する CD31 の発現は見られなかった。これは、皮下脂肪組織採取の際、ヒトの場合と異なり、ラットの場合、リンパ節等の混入がありどうしてもマクロファージおよび白血球系の細胞が混入してしまうと考えられた。
- ・約1ヶ月の培養により、単球およびマクロファージと白血球系細胞は自然に消滅し、CD45、CD11b は陰性化するが、より fresh な細胞を使用するために培養1週間の時点で CD45<sup>+</sup>細胞を MACS beads により除去

してから実験を開始した。

#### [検討 1]

- ・分離培養した脂肪由来幹細胞を神経、脂肪、骨、上皮へ分化誘導し、多分可能を調べた。

#### [結果 1]

- ・分化誘導をかけていない細胞では、紡錘型の繊維芽細胞様の細胞が不規則に重なり合うように増殖していた。
  - ・神経へ分化誘導した細胞では、ニューロン様の擬足を伸ばし、それぞれ細胞がシナプス形成をしているような形態を呈していた。
  - ・脂肪へ分化誘導した細胞では、脂肪細胞に類似の細胞を示した。
  - ・骨へ分化誘導した細胞では、骨が細胞様の擬足を伸ばし、アメーバ様の形態を示した。
  - ・上皮へ分化誘導した細胞では、均一なシート状の丸みを帯びた細胞へと形態を変化させていた。
- ⇒さらに、分化誘導した細胞に対して、免疫染色、もしくは特殊染色を実施し検討を加えた。
- ・神経に分化誘導した細胞をNSE免疫染色したところ、分化誘導した細胞では細胞質に均一に染色される像が見られた。
  - ・脂肪に分化誘導した細胞をOil red O染色したところ、赤く染色される像が見られた。
  - ・骨に分化誘導した細胞をALP染色したところ、骨芽細胞様の細胞が暗紫色に染色され、さらに、Von kossa染色を行ったところ、カルシウムの沈着が見られた。
  - ・上皮に分化誘導した細胞をCytokeratine-18で免疫染色したところ、細胞質が胆栓された。さらに、FITCで標識したCytokeratine-18をFACSにて測定したところ、軽度の発現が見られた。
- ⇒以上の結果より、脂肪由来幹細胞は、形態的にも免疫組織学的にも多分化能を有する細胞を含んでいる可能性があると考えられた。

#### [検討 2]

- ・脂肪由来幹細胞を1週間培養した培養液中のGrowth factor (HGF, VEGF, TGF- $\beta$ ) を測定し、粘膜再生への関与を検討した。

#### [結果 2]

- ・HGF, VEGF, TGF- $\beta$  をELISA法にて測定したところ、大量のVEGFおよびHGFが検出された。
- ⇒以上の結果より、腸管局所において血管新生や粘膜再生を促す増殖因子が分泌される可能性が考えられた。

#### [検討 3]

- ・雌ラットのTNBS大腸炎モデルを作成し、雌ラットから分離培養したADSCを大腸粘膜下に局注し、in vivoにおける粘膜再生への関与を調べた。
- ・実験は、3つのGroupに分けて検討を行った。Group1は生理食塩水のみを注腸、Group2はTNBSを注腸し2日目にPBSを局注、Group3はTNBSを注腸し2日目に脂肪由来幹細胞を局注し、3群とも10日目に評価を行った。局注はエーテル麻酔下で正中切開し、潰瘍形成により変色した腸管部位に対して漿膜側から27ゲージ針を用いて400 $\mu$ lのPBSもしくは脂肪由来幹細胞を懸濁したPBSを腸管壁内に局注した。

#### [結果 3]

- ・中間報告であるが、腸管の長さ自体は脂肪由来幹細胞を注入した群では、若干、腸管短縮の改善が見られたが現在のところ有意差は得られていない。
- ・腸管の潰瘍面積は、脂肪由来幹細胞を注入した群で明らかに潰瘍面積の縮小が見られ、コントロール群との間に明らかな有意差を認めた。
- ・組織学的には、コントロール群で半数以上の標本で筋層壊死を伴う全層性の高度炎症像が見られたが、脂肪由来幹細胞を注入した群では、一部、筋層への炎症性細胞浸潤が見られるが、粘膜下層までの炎症に留まっているものが大半で、組織学的なスコアリングを行ったところ、有意差が見られた。

#### [考察]

- ・今回行った実験により、脂肪由来幹細胞は多系統の成熟細胞へと分化する可能性が示された。
- ・脂肪由来幹細胞から多数の増殖因子分泌が証明され、その作用により創傷治癒を促進させる可能性が考えられる。
- ・in vivoにおいて、脂肪由来幹細胞は炎症により障害された腸粘膜の再生を促進する働きが認められた。

#### [今後の検討課題と展望]

- ・大腸組織中のMPO活性およびproinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) の測定を行う予定である。
- ・多分化能を有するADSCが腸管局所で、どのような細胞へ分化するのかFISH (Y-chromosome) を用いて検証する。
- ・最終的にはクローン病における難治性潰瘍や瘻孔を有する症例に対して、自己の細胞を用いて経内視鏡的に繰り返し治療可能な治療法の確立を目指す。

腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発

自然免疫系による炎症性腸疾患の制御

(分担研究者：竹田 潔)

発表者：竹田 潔

[背景・これまでの解析 1]

- ・通常では腸管に局在するような自然免疫系の細胞は極度の炎症が起こらないようなメカニズムがあるであろうと想定し、実際に腸管に局在するような自然免疫系の細胞を characterize した。
- ・正常マウスおよび将来腸炎を起こす IL-10 ノックアウトマウスから CD11b<sup>+</sup>系の自然免疫系担当細胞を採取し、toll-like receptor の刺激をすると、正常マウスから採取した腸管の CD11b<sup>+</sup>細胞はサイトカインを放出しないが、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 Toll-like receptor に応答してサイトカインを著明に産生するということが分かってきた。IL-10 ノックアウトマウスにおける腸管には Toll-like receptor に対する応答性があることによって炎症性腸疾患が起こるのであろう、一方、正常マウスにおいては、こうした炎症を起こさないメカニズムがあるであろうということが分かってきた。
- ・そこで、腸管に局在するような細胞で、IL-10 を産生する細胞が一体どういった細胞になるのか細胞内染色で解析をした。腸管から lamina propria の細胞を採取し、LPS 刺激あるいは medium で置いておいた後に、IL-10 の産生を細胞内染色で見ると、たとえ刺激が無くても IL-10 の産生が恒常的に見られる。どういった細胞が産生しているのかを二重染色で順次解析をすると、CD11b、CD11c は陰性であった。様々なものを観察しているが、現在のところ、CD45<sup>+</sup>の細胞からは IL-10 が恒常的に産生されていることが分かってきた。
- ・それでは、IL-10 を産生するために microflora、細菌叢は必要なのかどうかを観察するために見てみたいということで、germ free マウスから lamina propria の細胞を採取し IL-10 の産生を見ると、SPF の環境下で飼っているマウスは、先程と同じように IL-10 を恒常的に産生しているが、germ free マウスでは産生が極めて落ちている。たとえ LPS 刺激をしても全く産生しない。

[まとめ 1]

- ・腸管においては Stat3 が無くなると異常な活性化状況になって、腸管炎症のトリガーを引いてしまう。従って通常は、異常活性を抑えるためのメカニズムが存在するはずで、そのメカニズムの一つの細胞として IL-10 を恒常的に産生するような細胞があるであろう。そしてこうした細胞はあくまでも microflora の存在が必要で、microflora の何らかの刺激によってこの細胞が恒常的に IL-10 を産生するような細胞になって異常活性を抑えているであろうということが分かってきている。
- ⇒そこで我々は、この自然免疫系細胞の活性をいかに制御しているのか、そして制御し得るような細胞集団を同定する目的で解析を進めている。

[これまでの解析 2]

- ・IL-10 ノックアウトマウスと正常マウスの腸管に局在するような自然免疫系担当細胞で遺伝子発現の差を見た結果、 $1\kappa$ BNS というのが採取され、その解析をした結果、 $1\kappa$ BNS は正常の腸管に局在するような自然免疫系担当細胞には恒常的に発現している。Toll-like receptor の刺激で、様々な遺伝子が発現されるが、MyD88 さらに NF- $\kappa$ B 依存性に遅れて誘導されてくる遺伝子群だけを選択的にブロックをかけていて、結果として腸管炎症の抑制にも関わっているということが分かってきている。
- ⇒ここで、TLR、MyD88、さらに転写因子レベルで NF- $\kappa$ B まだが共通にも関わらず、なぜ早い遺伝子発現 (early inducible gene) と遅い遺伝子発現 (rate inducible gene) があるのかというのが一つの疑問点となり、この活性の制御機構を明らかにするためにはまず、この induction システムのメカニズムを知る必要があり解析を行った。
- ・遺伝子発現にはクロマチン構造が重要なことが最近分かってきている。たとえば、クロマチン構造が開いている遺伝子の場合では遺伝子発現は極めて早く誘導される、一方、閉じているクロマチンを持った遺伝子は、遺伝子発現が極めて遅いということが分かっていて、このクロマチン構造の状態は histone H3 のメチレーションやアセチレーションによってモニターすることができる。
- ⇒そこで、early inducible と rate inducible のクロマチン構造のステータスを見てみた。
- ・まず early inducible gene (NIP2 や KC などのケモカイン遺伝子) の histone H3 のメチレーションの状態を見てみると、histone H3 は刺激が無くても常にメチレーションを受けている、さらに MyD88 ノックアウトマウス、これは殆ど遺伝子発現が無くなるわけであるが、たとえ遺伝子発現が無いこのマウスにおいても MyD88 遺伝子のプロモーターは常にメチレーションを受けている。
  - ・次に、rate inducible gene はどうかというと、histone H3 のメチレーションは、刺激前には全く無い。その後、LPS の刺激によって 180 分からメチレーションが見えてくる。一方、MyD88 ノックアウトマウスでは、

メチレーションが全く誘導されてこない。

[まとめ]

- ・ TLR の刺激に誘導されてくる遺伝子、特に NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子には、early inducible gene と rate inducible gene がある。early inducible gene のプロモーターの場合には、クロマチン構造が常に開いていて、いつでも ongoing な状態で、刺激が入るとすぐに遺伝子が誘導されてくる。一方、rate inducible gene は最初、クロマチン構造が閉じていて、そこに TLR の刺激が入ると、初めてクロマチン構造が開いて、様々な転写因子群がアクセスできるようになり遺伝子発現が誘導されてくる。
- ・ early inducible gene と rate inducible gene を見比べてみると、early inducible gene は TNF とか IL-1、所謂、急性炎症に関わるような遺伝子が多く含まれている、一方、rate inducible gene は、IL-6、IL-12 といった慢性炎症に関わる遺伝子が極めて多く含まれている。即ち、rate inducible gene の発現を選択的にブロックできる I $\kappa$ BNS あるいは他のファクターをさらに同定することによって慢性炎症を抑えるような、新規なメカニズムが分かってくるのではないかと考えている。
- ・ まだ preliminary であるが、I $\kappa$ BNS は、一度開いたクロマチンを閉じることによって遺伝子発現をブロックしているであろうということが分かってきている。

[展望]

- ・ 今後も、Stat3 の遺伝子発現の活性を制御する機構を明らかにするとともに、もっと最初のトリガーは IL-10 産生細胞にあることが予想される。従ってこの細胞を同定し、導入することによって、炎症惹起の活性を抑えることが予想されるので、今後は IL-10 産生細胞の同定にも関わっていきたい。

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)

発表者：大川原辰也

[マクロファージ遊走阻止因子：MIF について]

- ・ 1966 年、活性化 T リンパ球から分泌されマクロファージがランダムに遊走することを抑制し、病変部位へマクロファージを集積させるリンホカインとして初めて発見された。
- ・ 1989 年から、cDNA がクローニングされ、様々な細胞や組織での発現が解明され、また感染症・自己免疫疾患や炎症性腸疾患における役割が次々に報告された。特にサイトカイン産生誘導をはじめ炎症の発症・増悪に強く関与することが分かっている。
- ・ 下部消化管炎症における MIF 研究も Human/animal で進んでいる。

[問題点]

- ・ 今までの MIF を標的にした治療応用は抗体医薬の研究が進められている。しかしながら臨床応用へは良質なヒト化抗体に向けた開発など様々な問題もある。また、現在開発され臨床に用いられている抗体医薬の治療状況から、抗体医薬の経済的、医学的な問題も浮かび上がってきている。
- ・ 抗体医薬を含めた抗サイトカイン療法においては、有効性が非常に高いことは承知のことであるが、その持続性、抗抗体惹起や費用についてやや問題がある。  
⇒我々は、自己抗体を誘導させることによってこうした問題を解決し、なおかつ、治療に結び付けられないか検討した。(能動的抗体療法)

<受動的抗体療法と能動的抗体療法>

	受動的抗体療法	能動的抗体療法
持続性	低い	高い
抗抗体惹起	可能性大	可能性小
費用	高い	低い (DNA)

- ・ 能動免疫と言えば、ワクチンがよく思い浮かべられるが、サイトカインなどを含めたものについて自己抗体を誘導するには従来型のワクチンでは免疫原性の問題で、なかなか上手くいかない。但し、Th エピトープ (DNA ワクチン) をターゲットとする抗体に加えることによって、より抗原性が増して、自己抗体を誘導できるのではないかと考え実験を進めた。

[MIF における Th エピトープの検討]

- ・ MIF の 2 番目のループ部分に Tetanus toxin P30 : TTX (Th エピトープ) を組み込むことで、MIF 蛋白を誘導するように試みた。
- ・ 投与方法として、投与量、投与回数が少なく済むと様々な研究で言われている in vivo electroporation (25ug×2ヶ所で1回投与) のデータを提示する

[結果]

- ・ 抗 MIF 抗体価を経時的に見たところ、MIF/TTX では摂取して 2 週間より著しい上昇を認めた。一方、単なる MIF と空の becter では全く自己抗体の血中での上昇を認めなかった。
- ・ 以上の結果より、上手く自己抗体を誘導できる段階まできたので、DSS 腸炎で抑制効果を検討した。  
⇒DSS 腸炎に対する検討の結果、コントロール群に比べ、腸管の短縮を予防でき、DAI 上昇を有意に抑制し、組織学的にも腸炎の抑制を見ることができた。又、大腸組織におけるペルオキシダーゼ活性の上昇が有意に抑制された。

[まとめ]

- ・ 今回、我々が試みた MIF Th エピトープ DNA ワクチンにより、実験大腸炎が有意に抑制された。
- ・ ワクチン接種による自己抗体誘導が低コストかつ抗体医薬における医学的問題を解決しうる可能性が示唆された。

[今後の課題]

- ・ Established colitis モデルでの治療としての検討、抗 MIF 自己抗体産生メカニズムの詳細な解明、さらに投与方法を含めたヒトでの試験のデザインや倫理的問題のクリアである。

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：  
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)

発表者：中村和彦

[背景]

- ・ヒトの末梢血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 制御性T細胞は広範囲に免疫反応を制御する制御性T細胞(regulatory T cell:Treg)で、IBDを含めた疾患の治療への応用が期待される。又、核内転写因子 FOXP3 を特異的に発現することが知られている。
- ・潰瘍性大腸炎(UC)に対する血球成分除去療法では、大腸炎を誘導する effector 細胞に加えて、Treg も同時に除去されているのではないかと考え、effector 細胞を除去し、Treg を体内に戻す治療法を開発できないかと研究を進めている。

[血球成分除去・制御性T細胞移入療法]

- ・UCに対する血球成分除去療法(遠心分離法)を施行し、除去された白血球より磁気ビーズを用いてTregを分離し、患者へ移入する。
- ⇒どのくらいのTregを移入すればよいのかという問題があるので、大量に必要な場合には invitro での大量培養というオプションも将来的には必要かと考えている。
- ・臨床応用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。
- ⇒そこで我々は、ChiniMACS Cell Selection System を利用した。

[ChiniMACS Cell Selection System について]

- ・Miltenyi Biotec 社の臨床応用を目的とした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Tregの分離]

- ・UCに対する血球成分除去療法(遠心分離法)も用いた産物から、ChiniMACS CD8 reagent、ChiniMACS CD19 reagent を用いて CD8<sup>+</sup>細胞、CD19<sup>+</sup>B細胞を除去する。その後、残った細胞から、ChiniMACS CD25 reagent を用いて、(CD4<sup>+</sup>) CD25<sup>+</sup>T細胞の分離を行う。
- ⇒これまで、3名の患者で4回の分離実験を行ったので報告する。

[結果]

- ・CliniMACS を用いた CD8<sup>+</sup>細胞、B細胞の除去
- ⇒分離後、殆ど全ての CD8<sup>+</sup>細胞、B細胞が除去された。
- ・CliniMACS を用いた Treg の分離 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup>Treg)
- ⇒分離前の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> が 3.3%であったのに対し、CD25 に enrich した分離では 65.5%と非常に濃縮された。しかし、CD25 を取り除いた残りの分離では殆ど細胞は残っておらず、従って、CD25 に enrich した分離の方かなり効率よく濃縮ができていると言える。
- ・FOXP3<sup>+</sup>細胞については、分離前が 2.8%であったのに対し、CD25 に enrich した分離では 49%と効率よく濃縮されており、CD25 を取り除いた残りの分離では殆ど細胞は残っていなかった。
- ・4回の分離前後における CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 細胞の割合と分離率

		1回目	2回目	3回目	4回目	Average
分離前	Total cell	1.8×10 <sup>9</sup>				
	CD25 <sup>high</sup>	3.1%	1.0%	1.1%	3.3%	2.1%
	実数	5.8×10 <sup>7</sup>				
分離後	Total cell	5.5×10 <sup>7</sup>				
	CD25 <sup>high</sup>	52.6%	39.2%	51.9%	65.5%	52.3%
	実数	2.9×10 <sup>7</sup>				
回収率		49.3%	76.8%	76.5%	48.8%	62.9%

- ・4回の分離前後における FOXP3<sup>+</sup>細胞の割合

		1回目	2回目	3回目	4回目	Average
分離前	FOXP3 <sup>+</sup>	0.42%	0.71%	0.64%	2.83%	1.15%
分離後	FOXP3 <sup>+</sup>	79.3%	40.4%	45.1%	49.0%	53.5%

・分離した Treg の機能的解析

⇒<1 回目>

CD4<sup>+</sup>細胞の刺激後の増殖を 100%とすると、Treg の増殖は非常に低い値になっている。これは、刺激に対する不応答性 (hypo responsiveness) という Treg の特徴を表している。又、CD4<sup>+</sup>と Treg 両者を強培養すると細胞増殖が抑制されており、suppressor 活性を認めた。

<2 回目>

Treg の hypo responsiveness を認めず、又、CD4<sup>+</sup>と Treg 両者の強培養によっても細胞増殖の抑制も認められなかった。これはおそらく、Treg の割合が低かったことが関係していると考えている。

<3 回目>

Treg の hypo responsiveness を認め、又、若干弱かったものの CD4<sup>+</sup>と Treg 両者の強培養による細胞増殖も認められた。

<4 回目>

Treg の hypo responsiveness を認め、CD4<sup>+</sup>と Treg 両者の強培養による細胞増殖も認められた。

[まとめ]

- ・CliniMACS システムを用いて、UC 患者の血球成分除去療法産物から 4 回の分離実験を行い、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg が無菌的に大量分離可能であった。
- ・4 例中 3 例で、分離した Treg の免疫制御能を in vitro suppression assay で確認できた。

[考察・展望]

- ・1 例で分離した treg の suppressor 機能を in vitro で確認できなかったのは、Treg の割合が低かったためと考えられる。今後、症例を追加し、検討する。
- ・ヨーロッパで CliniMACS で分離された Treg の GVHD 患者への移入療法の臨床試験が進行中で、UC に対する Treg 移入療法に関する基準について検討する。
- ・CliniMACS の試薬の CE 認証  
CD19 beads: 取得済  
CD8 beads: 取得済  
CD25 beads: 2007 年 7 月~9 月に取得予定
- ・CD25 beads の CE 認証後に血球成分除去療法・制御性 T 細胞移入療法の臨床試験を当大学倫理委員会へ申請予定



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]

- ・今まで、我々は、高分子バイオマテリアルのポリ乳酸を用いた免疫調節剤封入マイクロカプセルの開発を進めてきた。マイクロカプセルの大きさは4 $\mu$ で、この大きさが最も効果的に粘膜免疫担当細胞に貪食される。
- ・in vitroの実験では、およそ3日~4日にかけて薬剤が放出されてくる。In vivoにおける血中デキサメサゾン濃度は、通常の水溶性デキサメサゾンでは1時間程で最高血中濃度に到達するが、デキサメサゾン封入マイクロカプセルでは、殆ど血中には検出されない。
- ・TNBS腸炎に対する検討  
⇒肉眼的、組織学的にも著明な炎症の改善が認められた。
- ・DSS腸炎に対する検討  
⇒水溶性デキサメサゾン群、デキサメサゾン封入マイクロカプセル群は、DSS腸炎群に比べ、有意な腸炎スコアの軽快が認められた。両群とも同様に軽快が認められたわけであるが、デキサメサゾン封入マイクロカプセルは血中濃度が殆ど検出されないの、より副作用が少なく効果的な治療である。又、2日おきに投与しても同様の効果が得られた。
- ・長期経口投与による毒性試験  
⇒ラットに週2回、有効量と10倍量を投与したが、明らかな毒性は認められなかった。

[研究計画]

- ・腸管M細胞および免疫担当細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患治療 (関西医大臨床研究承認番号40611号)  
(関西医科大学附属枚方病院院内臨床研究審査委員会承認)

[目的]

- ・難治性潰瘍性大腸炎患者におけるデキサメサゾン封入ポリ乳酸マイクロカプセル(DxMC)の有用性を検討

[対象]

- ・ステロイド抵抗例、ステロイド依存例を含めた難治性潰瘍性大腸炎患者
- ・相対的手術適応患者
- ・説明文と同意書による同意を取得

[方法]

- ・左側大腸炎型または全大腸型患者(n=10)にデキサメサゾン封入ポリ乳酸マイクロカプセル(DxMC)840mg/day(1mgのDxを含有)を4週間隔週経口投与
- ・左側大腸炎型患者(n=10)にDxMCを840mg/dayを、4週間隔日注腸投与

[治療評価]

- ・投与前、2週後、4週後に、1.臨床スコア 2.大腸内視鏡所見 3.生検組織所見 4.組織中デキサメサゾン濃度測定 5.血液、生化学、尿 を評価する。

[まとめ]

- ・現在、ステロイド抵抗例の患者1例が登録され、投与が開始されている。

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)

発表者：松下光伸

[リポ化ステロイドについて]

- ・ 現在、本邦で市販されている薬剤としてはパルミチン酸デキサメタゾン、製品名リメタゾンがある。
- ・ 特性
  1. デキサメタゾンを実質として脂溶性を高め、ダイズ油に溶解した乳濁製注射液である。
  2. 生体内でエステラーゼにより緩徐に加水分解を受け活性代謝物であるデキサメタゾンになり、持続的な抗炎症作用を示す。
  3. 炎症部への分布が高く、炎症部マクロファージに積極的に貪食され、そのマクロファージの中で溶解し、マクロファージ機能を効率よく抑制する。従って、薬剤投与量の軽減化により、副作用が軽減される。
  4. 添付文書による副作用発現率は、2.73%(106例/3883例)で、主な副作用は動悸(0.39%)、顔面発赤(0.31%)、そう痒感(0.28%)、満月様顔貌(0.26%)、白血球増多(0.23%)、発疹(0.18%)等で、重篤なものは無かった。

・ リメタゾンの保険適応と禁忌

適 応：慢性関節リウマチ

禁 忌：本剤成分に過敏症の既往歴のある患者

原則禁忌： 1. 有効抗菌剤のない感染症、全身真菌症の患者 2. 消化性潰瘍の患者 3. 精神病の患者  
4. 結核性疾患の患者 5. 単純疱疹性角膜炎の患者 6. 後嚢白内障の患者 7. 緑内障の患者  
8. 高血圧症の患者 9. 電解質異常のある患者 10. 血栓症の患者  
11. 最近行った内臓の手術創のある患者 12. 急性心筋梗塞を起こした患者

・ 組成・性状

有効成分：(1管 1ml 中) パルミチン酸デキサメタゾン 4.0mg (デキサメタゾンとして 2.5mg)

添 加 物：精製ダイズ油 100mg

精製卵黄レシチン 12mg

水酸化ナトリウム適量

塩酸適量

性 状：白色で軽粘性の乳濁液で、軽度特有な臭いあり

pH : 6.6-8.5

浸透圧比：約 1 (生理食塩液に対する比)

・ リメタゾンの副腎皮質機能に及ぼす影響

<1mL 単回投与後の血漿コルチゾール値>

⇒1日目にはコルチゾール値が低下し副腎機能を抑制するが、1週間程で正常値に戻る。

<1mL を 2 週間おきに投与した場合の血漿コルチゾール値>

⇒保険適応である 2 週間おきの投与においては、コルチゾール値の低下は認めていない。

・ 炎症性腸疾患に対する有効性

⇒以前に炎症性腸疾患に対するリメタゾンの有効性を UC7 例、CD4 例、BD2 例に投与した検討で、その有効性が認められている。

- ・ステロイド抵抗性中等症の潰瘍性大腸炎症例に対し、緩解導入が認められた
- ・クローン病に合併した難治性の壊疽性膿皮症に対し、著明に軽快した。
- ・腸管型ベーチェット病でステロイド経口、静注で効果が得られなかった回腸末端の潰瘍に対し、改善を示した。

#### [研究課題]

- ・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群間試験（関西医科大学医学倫理委員会申請中）

#### [目的]

- ・炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管型ベーチェット病）患者におけるリポ化ステロイドによるドラッグデリバリーシステムの有用性を検討する

#### [対象]

- ・活動期炎症性腸疾患  
潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管型ベーチェット病で下記のいずれかを満たす症例（重症例は除く）  
I群 緩解導入目的でステロイド剤投与予定中の患者  
II群 全身的ステロイド剤投与が有効であるが漸減中に再燃する患者（ステロイド依存例）

#### [方法]

- ・対象患者に説明書と同意書による同意を取得
- ・疾患別に下記治療法を無作為化
- ・3ヶ月間施行し2週毎に有効性を評価  
投与開始後2週後 有効⇒全身性ステロイド剤の投与量を減量  
無効⇒他の治療法に変更

#### [治療法]

- ・対象I群（ステロイド投与予定）
  1. 全身的ステロイド剤投与を開始（n=30）
  2. リメタゾン1管（1ml）を1ヶ月間週1回投与し、以降の2ヶ月間は2週毎に1回投与（n=30）
- ・対象II群（ステロイド依存）
  1. 全身的ステロイド剤投与を再増量（n=30）
  2. 全身的ステロイド剤投与量は変更無く、更にリメタゾン1管（1ml）を1ヶ月間週1回投与し、以降の2ヶ月間は2週毎に1回投与（n=30）

#### [治療評価]

- ・投与前、2週後、4週後、6週後、8週後、10週後、12週後に
  1. 臨床スコア
  2. 血液（CRP、血沈、生化学）
  3. 内視鏡所見（2週後、4週後、12週後）
  4. 全身的ステロイド剤の投与量変化
  5. ステロイド剤の副作用

#### [参加施設]

- ・本研究に協力して頂ける、「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する調査研究」班に属する研究者の所属施設
- ・後日、各研究者に本研究参加について問い合わせをする。

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)

発表者：長沼 誠

[背景]

- ・ IBD 治療における問題点は、基本的には、ステロイド抵抗例、ステロイド依存例、抗サイトカイン療法抵抗例である。
- ・ これまで我々は、OPC の基礎実験を検討してきた。OPC は cAMP の濃度を高め、最終的に抗炎症効果を持つ。実際、ヒトの単球において、OPC が IL-12 や TNF $\alpha$  の産生を抑え、IL-10 ノックアウトマウスで抗炎症効果を有するという結果を報告してきた。一方、cAMP 濃度を高める方法として、Adenosine A<sub>2A</sub> receptor が近年、報告されている。

[検討 1.]

- ・ Adenosine A<sub>2A</sub> receptor アゴニスト (ATL) は、in vitro で炎症性サイトカインの産生を抑制するのか

[方法 1-1.]

- ・ C57BL6 マウス、あるいは A<sub>2A</sub> receptor ノックアウトマウスから CD4<sup>+</sup>細胞を isolate し、抗 CD3 で刺激する。そこに 3 つの異なる ATL (ATL201, ATL146eATL313) を同時に加え、24 時間、もしくは 48 時間後の cAMP 濃度、サイトカインレベル、RNA レベル、intracellular サイトカインについて検討した。

[結果 1-1.]

<cAMP 濃度>

- ・ ATL を加えたところ、4 時間をピークとして cAMP 濃度の上昇が認められた。

<サイトカインレベル>

- ・ ATL 加えたことにより、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の抑制が認められた。
- ・ ELISA での検討より、C57BL6 マウスにおいて、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 の産生が抑えられた。一方、A<sub>2A</sub> receptor ノックアウトマウスにおいては、ATL を加えても、抑制が認められなかった。このことより、ATL が、A<sub>2A</sub> receptor を介してサイトカインを抑えるということが示された。一方、IL-4、IL-10 は ATL を加えても、有意な抑制は認められなかった。
- ・ ATL はアポトーシスと非依存性にサイトカインを抑制することが示された。

<RNA レベル>

- ・ サイトカインレベルでの ELISA の結果と同様、RNA レベルでも C57BL6 マウスにおいて、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 の産生が抑えられた。一方、A<sub>2A</sub> receptor ノックアウトマウスにおいては、抑制が認められなかった。

[検討 1-2.]

- ・ 次に、ATL が LPS 刺激下における dendritic cell (DC) の TNF- $\alpha$ 、IL-12 の産生能を変化させるかどうか

[方法 1-2.]

- ・ CD11c<sup>+</sup>細胞を LPS で刺激して、ATL を加えた群と加えなかった群で、TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-10 の産生能を比較検討した。

[結果 1-2.]

- ・ TNF- $\alpha$ 、IL-12 は ATL を加えたことにより産生能が抑制され、IL-10 は明らかな変化を認めなかった。即ち、IL-10 を介さない、TNF- $\alpha$ 、IL-12 の抑制作用の存在が示唆された。

[検討 2]

- ・ Adenosine A<sub>2A</sub> receptor は腸炎を抑制するか

[方法 2]

- ・ CD45RB<sup>hi</sup> Transfer の colitis モデルを用い、ATL が入っていないエサの群 (Vehicle) と、4 週後から ATL313 が入っているエサを与える群 (ATL<sup>+</sup>, 300  $\mu$ G/kg/day) で検討。

[結果 2.]

- ・ ATL の経口投与により、体重減少の抑制が認められ、組織学的に慢性腸炎の抑制が認められた。RNA レベルでは、TNF- $\alpha$  の有意な抑制が認められず、IL-10 に有意差は認めなかった。
- ・ ATL の経口投与により、組織学的活動度 (acute/chronic 両者とも) が抑制された。

[まとめ]

- ・ ATL により、マウス CD4T 細胞の cAMP の濃度を高め、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2 の RNA 発現およびサイトカイン産生を抑制した。
- ・ ATL により、マウス樹状細胞の TNF- $\alpha$ 、IL-12 の産生を抑制した。

- ・ATLの経口投与により、CD4CD45RB<sup>hi</sup>細胞による慢性腸炎、および組織中のTNF- $\alpha$  RNAを抑制することが確認された。

⇒以上より、ATLは抗サイトカイン作用により、炎症性腸疾患の新規治療薬になる可能性が示唆された。

[ATLの臨床応用]

- ・現在、リウマチや中枢神経系の自己免疫性疾患、I型糖尿病、喘息などで臨床応用されている。今後、腸炎、特にクローン病に臨床応用していく方向で検討している。

事務局連絡

[今後の予定]

平成19年

- ・ 2月23日(金): 分担研究者報告書書類提出 締切り
- ・ 3月8日(木): 収支決算報告書類提出 締切り

## VII.研究成果の刊行物・別刷

## Human Thioredoxin-1 Ameliorates Experimental Murine Colitis in Association With Suppressed Macrophage Inhibitory Factor Production

HIROYUKI TAMAKI,\* HAJIME NAKAMURA,† AKIYOSHI NISHIO,\* HIROSHI NAKASE,\* SATORU UENO,\* NORIMITSU UZA,\* MASAHIRO KIDO,\* SATOKO INOUE,\* SAKAE MIKAMI,\* MASANORI ASADA,\* KEIICHI KIRIYA,\* HIROSHI KITAMURA,\* SHINYA OHASHI,\* TOSHIRO FUKUI,\* KIMIO KAWASAKI,\* MINORU MATSUURA,\* YASUYUKI ISHII,§ KAZUICHI OKAZAKI,|| JUNJI YODOI,|| and TSUTOMU CHIBA\*

\*Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto; †Department of Experimental Therapeutics Translational Research Center, Kyoto University Hospital, Kyoto; ‡Research Unit for Clinical Allergy, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama, Yokohama; §Third Department of Internal Medicine, Kansai University, Osaka; and ¶Department of Biological Responses, Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, Japan

**Background & Aims:** Thioredoxin-1 (TRX) is a small multifunctional protein with antioxidative and redox-regulating functions. In this study, we investigated the significance of TRX in patients with inflammatory bowel disease (IBD) and the ability and mechanism to ameliorate experimental colitis.

**Methods:** Serum TRX and macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels were measured in patients with IBD. The effects of TRX were evaluated in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model by comparing TRX-overexpressing transgenic (TRX-TG) and control mice. We further evaluated the effect of recombinant human TRX (rhTRX) administration on DSS-induced colitis and colonic inflammation of interleukin (IL)-10 knockout (IL-10 KO) mice. Colonic inflammation was examined clinically and histologically. Proinflammatory cytokine levels were examined in colonic tissues, and MIF levels were measured in colonic tissues and sera in mice. The effect of TRX on MIF production was also analyzed in vitro. **Results:** Serum TRX and MIF levels were significantly higher in patients with IBD than normal controls, and TRX levels correlated with disease activity. TRX significantly ameliorated DSS-induced colitis and colonic inflammation of IL-10 KO mice. Increase of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  in colonic tissues was significantly suppressed in TRX-TG mice compared with wild-type mice. MIF levels in colonic tissues and sera were significantly lower in TRX-TG mice than in wild-type mice, irrespective of DSS administration. Anti-TRX treatment exacerbated DSS-induced colitis. In vitro studies demonstrated that rhTRX suppressed MIF production in human monocyte cells.

**Conclusions:** TRX might have a potential as a novel therapeutic agent for the treatment of IBD.

Inflammatory bowel diseases (IBD), such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), are serious disorders. Although several intrinsic factors such as deregulated immune responses, and environmental factors such as food, are suggested to be involved, an integrated concept explaining the pathogenesis of IBD has yet to be proposed. Nevertheless, it is strongly suggested that mediators of immunoregulation and inflammation are involved in the pathogenesis.<sup>1</sup> In particular, recent studies have focused on proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and macrophage migration inhibitory factor (MIF), both of which have been investigated as target molecules for novel therapies.<sup>2–5</sup>

Oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS) is believed to be an important factor involved in the onset, as well as the development of intestinal inflammation. Indeed, excessive production of ROS directly leads to severe cell damage and ultimately to apoptosis and necrosis.<sup>6</sup> ROS-induced oxidative stress<sup>6,7</sup> and the resultant apoptotic cells in the epithelium are increased in the inflamed mucosa of IBD patients.<sup>8–10</sup> Thus, scavenging ROS is considered to be critical for regulating intestinal inflammation.

Thioredoxin-1 (TRX), originally cloned as a soluble factor named *adult T-cell leukemia-derived factor*,<sup>11</sup> is one of the most important molecules controlling the redox regulation system and contains a redox-active disulfide/dithiol within the conserved active site sequence Cys<sup>32</sup>-Gly-Pro-Cys<sup>35</sup>. TRX has a pivotal role in scavenging ROS with peroxiredoxins and thus prevents apoptosis of various cells, such as lymphocytes, monocytes, and epithelial cells, by inhibiting apoptosis signal-regulating kinase 1.<sup>12</sup> Moreover, intracellular TRX regulates DNA binding of several transcription factors including p53, nuclear factor- $\kappa$ B, and activator protein-1.<sup>13</sup> In addition, circulating TRX inhibits neutrophil infiltration into the sites of inflammation in an air pouch model.<sup>14,15</sup> These results suggest that TRX has important roles, not only as an antioxidant and antiapoptotic molecule, but also as an anti-inflammatory molecule.

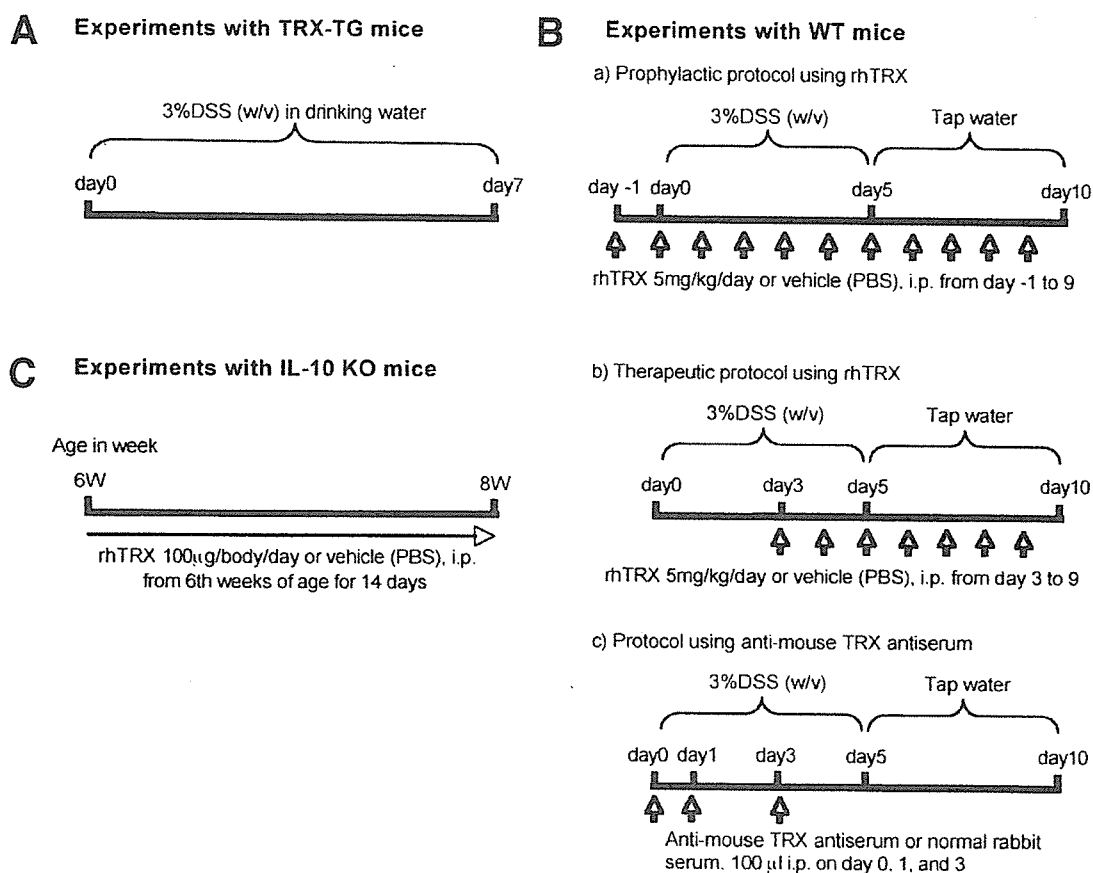
Serum TRX levels are elevated in several diseases such as human immunodeficiency virus infection,<sup>15</sup> hepatitis C virus infection,<sup>16,17</sup> and rheumatoid arthritis.<sup>18</sup> Although these findings suggest that TRX can be a good marker for oxidative stress in various diseases, the reason for the increased TRX levels in such diseases is poorly understood. However, overexpression of human TRX (hTRX) in transgenic (TRX-TG) mice induced resistance to harmful conditions including thioacetamide- or lipopolysaccharide (LPS)-induced acute

**Abbreviations used in this paper:** CD, Crohn's disease; CDAI, Crohn's Disease Activity Index; DSS, dextran sulfate sodium; EDTA, ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid; LPS, lipopolysaccharide; MIF, macrophage migration inhibitory factor; ROS, reactive oxygen species; TBS, Tris-buffered saline; TG, transgenic; TNF, tumor necrosis factor; TRX, thioredoxin; UC, ulcerative colitis; UCDAI, Ulcerative Colitis Disease Activity Index; WT, wild-type.

© 2006 by the American Gastroenterological Association (AGA) Institute  
0016-5085/06/\$32.00

doi:10.1053/j.gastro.2006.08.023





**Figure 1.** Experimental design for experimental colitis in mice. (A) Experiments with TRX-TG mice; 3% (wt/vol) DSS was administered to WT mice and TRX-TG mice from day 0 to day 7. Mice were killed on day 7. (B) Experiments with WT mice. (a) Prophylactic protocol using rhTRX. Three percent DSS (wt/vol) was administered to WT mice from day 0 to day 5 followed by a return to normal water. rhTRX (5 mg/kg) or vehicle was administered by intraperitoneal injection from day 1 to day 9 (arrows), and mice were killed on day 10. (b) Therapeutic protocol using rhTRX. Three percent DSS was administered to WT mice from day 0 to day 5 followed by a return to normal water. rhTRX (5 mg/kg) or vehicle was administered by intraperitoneal injection from day 3 to day 9 (arrows), and mice were killed on day 10. (c) Protocol using antimouse TRX serum. Three percent DSS was administered to WT mice from day 0 to day 5 followed by a return to normal water. Antimouse TRX antiserum or normal rabbit serum (100  $\mu$ L/body) was administered by intraperitoneal injection on days 0, 1, and 3 (arrows). (C) Experiment with IL-10 KO mice. Daily 5 mg/kg of rhTRX or PBS alone was administered intraperitoneally to IL-10 KO mice at 6 weeks of age. Fourteen days after beginning treatment, rhTRX or PBS alone treated mice were killed for histologic analysis of colonic tissue.

hepatitis,<sup>19</sup> adriamycin-induced cardiotoxicity,<sup>20</sup> and proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury.<sup>21</sup> Moreover, administration of recombinant hTRX (rhTRX) prevented ischemic lung injury,<sup>22</sup> cerebral infarction,<sup>23</sup> and myosin-induced myocarditis<sup>24</sup> in animal models. These findings suggest that TRX has protective effects on various diseases, possibly by its antioxidative and anti-inflammatory actions. Little is known, however, about the role of TRX in colonic inflammation.

Therefore, the present study sought to elucidate the role of TRX in the pathophysiology of IBD. For this purpose, we first investigated the serum levels of TRX in patients with IBD. Next, we examined the effects of endogenous and exogenous TRX on DSS-induced colitis in TRX-TG and wild-type (WT) mice. Furthermore, we investigated the effect of TRX on chronic colonic inflammation in interleukin (IL)-10 knockout (IL-10 KO) mice. Finally, we investigated the effects of TRX on MIF production *in vitro*. In addition to the antioxidative and anti-inflammatory actions previously re-

ported, the present study suggests that TRX exerts a protective effect on experimental colitis, at least in part through the suppression of MIF production.

## Materials and Methods

### Serum Samples

Serum samples were obtained from 10 patients (7 men, 3 women) with active CD, 11 (8 men, 3 women) with inactive CD, 11 (9 men, 2 women) with active UC, 12 (7 men, 5 women) with inactive UC, 11 (7 men, 4 women) with active ischemic colitis, and 10 (6 men, 4 women) with colon adenoma (as normal controls). All samples were centrifuged within 1 hour of collection, and sera were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the assays were performed. To determine disease activity, the Crohn's Disease Activity Index (CDAI)<sup>25</sup> was used for patients with CD and the Ulcerative Colitis Disease Activity Index (UCDAI)<sup>26</sup> for patients with UC. Informed consent was obtained from each patient,

**Table 1.** Scoring System for Bloody Stool

Score	Description
0	Normal to semisolid stool, no blood
1	Normal to semisolid stool, blood-tinged
2	Semisolid to fluid stool with definite evidence of blood
3	Bloody fluid

and the experimental designs of these studies were approved by the Kyoto University Hospital Ethics Committee.

### Animals

Female C57BL/6 (WT) mice (9–11 weeks of age; weighing 20–22 g) were obtained from CLEA Japan (Shizuoka, Japan). The generation and maintenance of TRX-TG mice was described previously.<sup>27</sup> hTRX cDNA was inserted between the  $\beta$ -actin promoter and the  $\beta$ -actin terminator. There were no differences in the expression of Mn-superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase, and glutathione peroxidase between WT and TRX-TG mice, analyzed by immunohistochemistry and Western blotting (data not shown). The presence of the TRX transgene was confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis.

C57BL/6-IL-10 KO mice (aged 4–6 weeks) were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). All mice were maintained under specific pathogen-free conditions and had free access to commercial food and water. Among them, IL-10 KO mice were transferred from specific pathogen-free to conventional housing conditions at 6 weeks of age because they spontaneously develop colitis in our conventional housing conditions by 8 weeks of age. All animal experiments were performed in accordance with our institutional guidelines, and the Review Board of Kyoto University granted ethical permission for this study.

### Experimental Design of DSS-Induced Colitis with TRX-TG Mice

DSS (molecular weight, 36,000–50,000) was purchased from ICN Pharmaceuticals Inc. (Costa Mesa, CA). Adult sex-matched WT mice (control group:  $n = 10$ ) and TRX-TG mice (TG group:  $n = 10$ ) were given 3% (wt/vol) DSS in their drinking water for 7 days, and percentage weight changes were recorded throughout DSS administration (Figure 1A). Percentage weight change for each mouse was calculated as follows: percentage weight change = [(weight at specific day (day 0 to day 7) – weight on day 0)/weight on day 0]  $\times$  100. Mice were killed under ether anesthesia on day 7.

### Experimental Design of DSS-Induced Colitis with WT Mice

To investigate the effects of TRX on colonic inflammation, we designed 3 protocols using the DSS-induced acute colitis model. In these protocols, WT mice were fed 3% (wt/vol) DSS in their drinking water from day 0 to day 5, followed by a return to normal water, and were killed on day 10.

**Prophylactic protocol using rhTRX.** Five mg/kg of rhTRX (kindly supplied by Ajinomoto Co. Ltd, Kawasaki, Japan) dissolved in 100  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS) or 100  $\mu$ L of PBS alone was administered intraperitoneally from day 1 to day 9 (Figure 1B, a, each group:  $n = 10$ ).

**Therapeutic protocol using rhTRX.** Five mg/kg of rhTRX or PBS alone was administered intraperitoneally from day 3 to day 9 (Figure 1B, b, each group:  $n = 10$ ).

**Protocol using anti-TRX antiserum.** One hundred microliters of rabbit antimouse TRX antiserum or normal rabbit serum (DAKO Corp. Carpinteria, CA) was administered intraperitoneally on days 0, 1, and 3 (Figure 1B, c, each group:  $n = 5$ ).<sup>24</sup> The insulin disulfide reduction assay was performed to confirm that the anti-TRX antiserum effectively neutralized TRX reducing activity (data not shown).

In these studies, percentage weight change was recorded throughout the period. Mice were killed under ether anesthesia, and the colons were removed and processed for pathologic studies as described later.

### Experimental Design on IL-10 KO Mice

Five milligrams/kilogram per day of rhTRX or PBS alone was administered intraperitoneally to IL-10 KO mice at 6 weeks of age. Fourteen days after the start of treatment, rhTRX- or PBS-treated mice were killed for histologic analysis of colonic tissue (Figure 1C).

### Assessment of DSS-induced Colitis

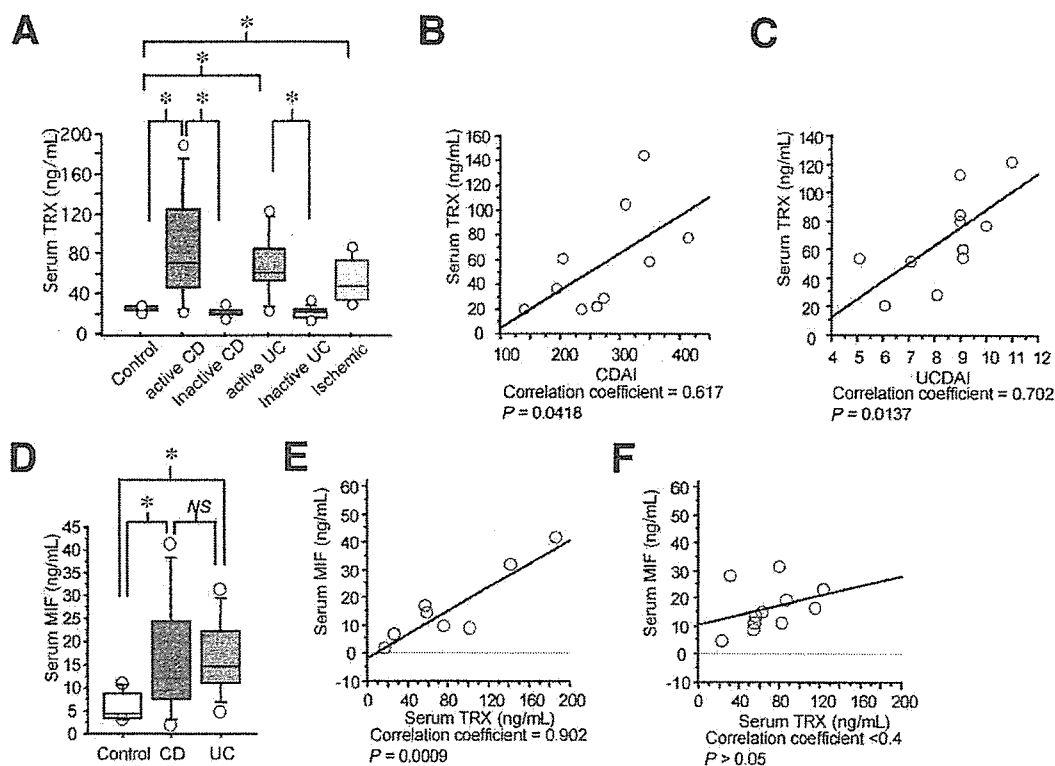
The entire colon was dissected out, and the length was recorded. In TRX-TG mice, blood content in the stool was scored using previously described criteria (Table 1).<sup>28</sup> For histopathologic examination, 3 distal colonic regions spaced approximately 1.5 cm apart were collected into 10% neutral-buffered formalin, processed for paraffin embedding, sectioned (4  $\mu$ m), and stained with H&E. Inflammation and crypt damage were assessed using a validated scoring scheme as described previously (Table 2),<sup>29</sup> and the means of the scores of each region were determined. The scores were determined in a blinded manner by 2 examiners.

### Assessment of Chronic Colitis in IL-10 KO Mice

Mice were monitored for clinical signs of colitis, including diarrhea and weight loss. At necropsy, samples of the colon

**Table 2.** Histologic Scoring System for DSS-Induced Colitis

Feature scored	Score	Description
Inflammation severity	0	None
	1	Mild
	2	Moderate
	3	Severe
Inflammation extent	0	None
	1	Mucosa
	2	Mucosa and submucosa
	3	Transmural
Crypt damage	0	None
	1	Basal 1/3 damaged
	2	Basal 2/3 damaged
	3	Crypts lost: surface epithelium present
	4	Crypts and surface epithelium lost
Percentage involvement	0	0%
	1	1%–25%
	2	26%–50%
	3	51%–75%
	4	75%–100%



**Figure 2.** Serum levels of TRX and MIF in patients with IBD. Serum samples were obtained from patients with active CD (n = 10), inactive CD (n = 11), active UC (n = 11), inactive UC (n = 12), active ischemic colitis (n = 11), and colon adenoma (n = 10, as normal controls). (A) Serum levels of TRX. (B) Correlation between serum TRX levels and CDAI in patients with active CD. (C) Correlation between serum TRX levels and UCDAI in patients with active UC. (D) Serum levels of MIF. (E) Correlation between serum TRX and MIF levels in patients with active CD. (F) Correlation between serum TRX and MIF levels in patients with active UC. Results are expressed as means  $\pm$  SE. \*Statistically significant compared with normal controls ( $P < .05$ ). NS, not significant.

(transverse, distal, and proximal) and the rectum were collected and histopathologically examined as described previously. For each section, inflammation (macrophage, lymphocyte, and neutrophil infiltration in the lamina propria or submucosa) was scored for severity according to the following criteria: normal, 0; minimal, 1; mild, 2; moderate, 3; marked, 4; and severe, 5. Gland loss and epithelial hyperplasia were scored by percentage of area involved: none, 0; 1, 1%–10% of the mucosa affected; 2, 11%–25% affected; 3, 26%–50% affected; 4, 51%–75% affected; and 5, 76%–100% affected. The summed scores for inflammation (lamina propria or submucosa), gland loss, and gland hyperplasia were then determined for each animal. For each section, mucosal thickness was quantitated by measuring the distance from the muscularis mucosa to the internal epithelial border in a non-tangential area showing the most representative change in severity. Selected sections were scored by a second person, with excellent agreement.

**Colon Fragment Culture**

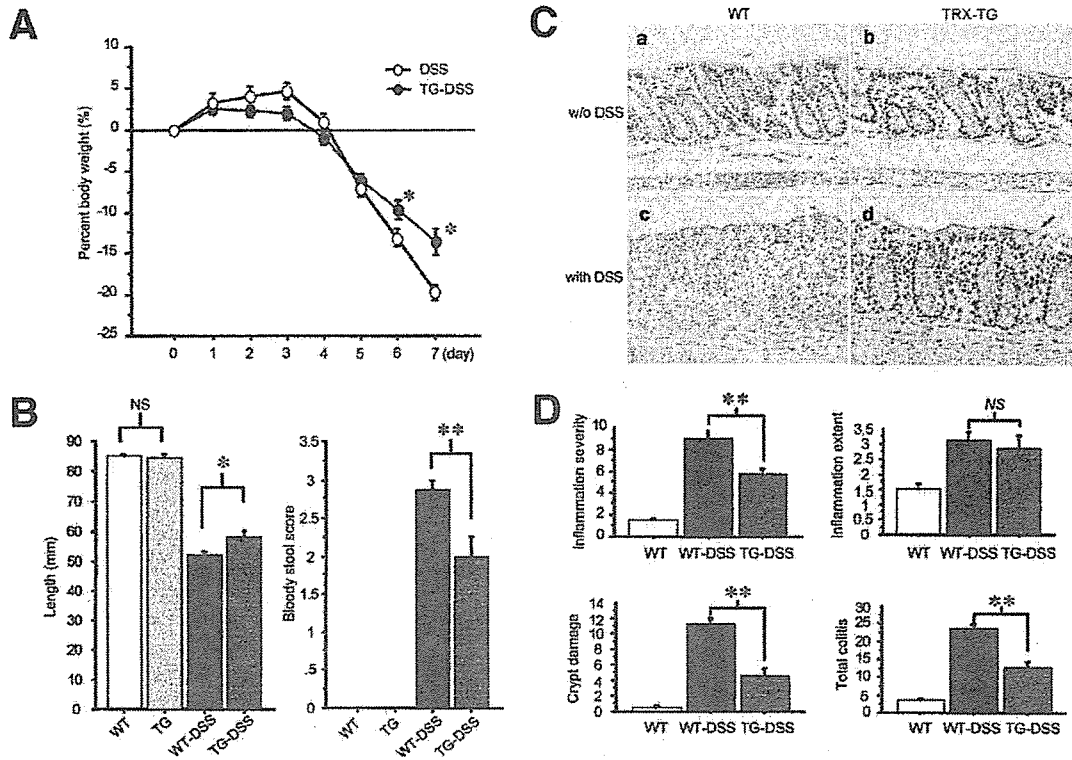
Fragment culture of distal colon segments was performed following published methods.<sup>30</sup> Briefly, colon segments were washed in PBS containing 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and 100  $\mu$ g/mL penicillin (Sigma Chemical Co.) and then kept in cold serum-free media (RPMI-1640 medium [Gibco BRL, Eggenstein, Germany] with

streptomycin and penicillin). After the dry weight was measured, the organs were cut into small pieces in a Petri dish containing fresh media, and 100 mg of tissue fragments were incubated at 37°C in 1 mL fresh media for 18 hours. Culture supernatants were collected and stored at -80°C and assayed for TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , and MIF secretion by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

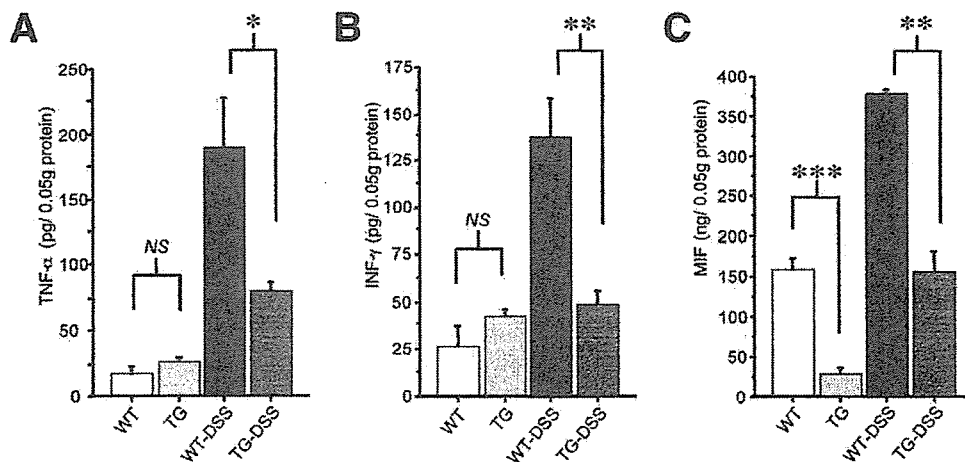
**Cell Culture**

The human monocytic leukemia cell line THP-1<sup>31</sup> was obtained from the RIKEN Bioresource Center (No. RCB1189; Tsukuba, Japan) and maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 100  $\mu$ g/mL penicillin, and 2 mmol/L glutamine (RPMI complete medium). Cells were cultured in 12-well plates (1  $\times$  10<sup>6</sup> cells/well) in the presence of 16 nmol/L of phorbol-12-myristate-13-acetate (Sigma Chemical Co.) for 12 hours, washed twice with PBS, and incubated with RPMI complete medium in the presence or absence of rhTRX (0.01–1 nmol/L) for an additional 24 hours. Cells were then washed twice with PBS and harvested 12 hours after stimulation with 1  $\mu$ g/mL of *Escherichia coli* O55:B5 LPS (Sigma Chemical Co.) and 10 ng/mL of IFN- $\gamma$  (Strathmann Biotec AG, Hamburg, Germany) in RPMI complete medium.

BASIC-ALIMENTARY TRACT



**Figure 3.** Overexpression of hTRX ameliorated clinical signs and histopathologic features in DSS colitis model. (A) Serial changes of percentage body weight during DSS administration in WT (open circle) and TRX-TG mice (solid circle). (B) Colon length and bloody stool score at day 7. (C) Representative distal colon sections stained with H&E. (a) WT mouse, (b) TRX-TG mouse, (c) DSS-treated (7 days) WT (WT-DSS) mouse, and (d) DSS-treated (7 days) TRX-TG (TG-DSS) mouse. (D) Histologic scores showing inflammation severity, inflammation extent, crypt damage, and total colitis. Scores reflect evaluation of 2 segments of distal colon for each animal (n = 10, in each group). Results are expressed as means ± SE. \*P < .05 and \*\*P < .01 between WT-DSS and TG-DSS. NS, not significant.



**Figure 4.** Overexpression of human TRX reduced the DSS-induced production of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and MIF in the distal colon. (A) TNF- $\alpha$ , (B) IFN- $\gamma$ , and (C) MIF production in the supernatants of cultured colon strips of wild-type (WT) mice, TRX-TG (TG) mice, DSS-treated WT (WT-DSS) mice, and DSS-treated TRX-TG (TG-DSS) mice (n = 8, in each group). Results are expressed as means ± SE. \*P < .05 and \*\*P < .01 between WT-DSS and TG-DSS mice. \*\*\*P < .01 between WT and TG mice. NS, not significant.

BASIC ALIMENTARY TRACT