

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験については国立大学法人東京大学医科学研究所動物実験委員会が定める指針に従って行われた。

C. 研究結果

C-1. M 細胞における PGRP-S の発現

DNA マイクロアレイを用いた包括的遺伝子プロファイリングの結果から PGRP-S が M 細胞特異的に発現する遺伝子であることが示唆された。そこで *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、mRNA の発現を確認した。次に PGRP-S に対するポリクローナル抗体を作製し、タンパク質レベルの発現を調べたところ、パリエル板 M 細胞における発現を認めるが、絨毛 M 細胞には発現していないことが明らかとなった。

C-2. 粘膜免疫における PGRP-S の機能

PGRP-S KO マウスを用いた解析により、PGRP-S が M 細胞の発生・分化ならびに抗原取り込み能に影響を与えることはなかった。しかしながら、グラム陽性菌である *Micrococcus. luteus* で経口免疫すると、野生型マウスと比べ、パリエル板 B 細胞の活性化が PGRP-S KO マウスの方で強く、IgA も多く産生されることが分かった。また野生型のパリエル板 B 細胞を単離し、PGF 刺激下に IgA 産生を誘導すると、精製リコンビナント PGRP-S を加えたものは、IgA 産生が抑制された。またその際、PGRP-S が TLR2 シグナルの下流で NF- κ B の活性化を抑

制していることが明らかになった。

D. 考察

PGRP-S はパリエル板 M 細胞に発現し、絨毛 M 細胞には発現していないことから、両者を区別して単離する新しい指標となることが示唆された。またパリエル板 B 細胞における IgA 産生を抑制的に制御することにより、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞や T 細胞を介さない抗原非特異的な抗体産生を抑制している可能性が示唆された。分子生物学的に PGRP-S が TLR2 シグナルの下流で NF- κ B の活性化を抑制することにより IgA へのクラススイッチを制御していることも考えられた。

E. 結論

本研究では、PGRP-S がパリエル板 M 細胞に特異的に存在している事を発見した。さらに粘膜免疫における PGRP-S の抑制機能を免疫生物学・分子生物学的に解明した。

F. 研究発表

(論文発表)

Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, and **Kiyono H**. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J. Exp. Med.* 204 :

2789-2796. 2007.

Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Ishikawa I, Ogahara I, Kim N, Shimizu M, and Kiyono H. Sphingosine 1-phosphate dependence in the regulation of lymphocyte trafficking to the gut epithelium. *J. Exp. Med.* 204 : 2335-2348. 2007.

Kurashima Y, Kunisawa J, Higuchi M, Gohda M, Ishikawa I, Takayama N, Shimizu M, and Kiyono H. Sphingosine 1-phosphate-mediated trafficking of pathogenic Th2 and mast cells for the control of food allergy. *J. Immunol.* 179 : 1577-1585. 2007.

Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, and Kiyono H. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104 : 10986-10991. 2007.

Nagai S, Mimuro H, Yamamda T, Baba Y, Moro K, Nochi T, Kiyono H, Suzuki T, Sasakawa C, and Koyasu S. Role of Peyer's patches in the induction of Helicobacter pylori-induced gastritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104 : 8971-8976. 2007.

Fukuyama S, and Kiyono H. Neuroregulator RET initiates Peyer's-patch tissue genesis.

Immunity 26 : 393-395. 2007.

Maikita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, Kiyono H, and Watanabe M. Intestinal lamina propria retaining CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J. Immunol.* 178 : 4937-4946. 2007.

McGhee JR, Kunisawa J, and Kiyono H. Gut lymphocyte migration: we are halfway 'home'. *Trends Immunol.* 28 : 150-153. 2007.

Kunisawa J, Takahashi I, and Kiyono H. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol. Rev.* 215 : 136-153. 2007.

Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Ogahara I, and Kiyono H. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood* 109 : 3749-3756. 2007.

Maddaloni M, Staats HF, Mierzejewska D, Hoyt T, Robonson A, Callis G, Kozaki S, Kiyono H, McGhee JR, Fujihashi K, and Pascual DW. Mucosal vaccine targeting improves onset of mucosal and systemic immunity to *Botulinum* neurotoxin A. *J. Immunol.* 177 : 5524-5432. 2007.

(学会発表)

Nochi T, Yuki Y, Takagi H, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, and **Kiyono H**. Development of needle-free vaccine: rice-based vaccine induced protective immunity against cholera toxin. The American Association of Immunologist (AAI), U.S.A. May 18th, 2007.

Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Ishikawa I, Ogahara I, Kim N, Shimizu M, and **Kiyono H**. Small and large intestinal intraepithelial T lymphocytes show distinct dependency on shingosine 1-phosphate. The American Association of Immunologist (AAI), U.S.A. May 18th, 2007.

Nagatake T, Fukuyama S, Kim DY, Takamura K, and **Kiyono H**. Presence of Id2- and ROR γ t-independent lymphoid tissue organogenesis. The American Association of Immunologist (AAI), U.S.A. May 18th, 2007.

Kiyono H. Airway Immunity: Uniqueness in Organogenesis Program and Antigen-Sampling System for Mucosal Vaccine Development. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.

Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Igarashi O, and **Kiyono H**. New generation of mucosal

vaccine: Novel M cell specific carbohydrate-targeted vaccination is effective for the induction of antigen-specific immune responses. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.

Kunisawa J, Higuchi M, Kurashima Y, Gohda M, Gotoh Y, Ishikawa I, Ogahara I, and **Kiyono H**. Microbe and sphingosine 1-phosphate regulate the trafficking of distinct subsets of large intestinal intraepithelial T lymphocytes. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.

Gohda M, Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Ishikawa I, Miura F, Ogahara I, and **Kiyono H**. A pivotal role of sphingosine-1 phosphate in the regulation of peritoneal B cell trafficking and subsequent intestinal IgA production. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.

Tanaka N, Fukuyama S, Nagatake T, Takamura K, Kurono Y, and **Kiyono H**. CXCR5/CXCL13-independent nasal B1 cells for the induction of antigen-specific secretory IgA responses. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.

Kurashima Y, Kunisawa J, Higuchi M, Gohda M, Ishikawa I, Ogahara I, and **Kiyono H**. Type

1 sphingosine 1-phosphate receptor-expressed intraepithelial regulatory T cells for the large but not small intestinal immunity. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.

Takahashi I, Koh M, Park E, Fukuyama S, Tsuruda K, Shimazu A, Kawahara K, Tobiume K, and Kiyono H. Sustained intestinal MICA expression prevents Th1 and Th2 mediated colitis. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.

Igarashi O, Terahara K, Nochi T, Kurokawa S, Yuki Y, Domino SE, and Kiyono H. The $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase-1(FUT1) identifies typical follicle-associated epithelium(FAE) M cells. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 11th, 2007.

Terahara K, Igarashi O, Yoshida M, Nochi T, Gotoh Y, Yuki Y, and Kiyono H. Villous M cells show an intermediate gene expression profile between Peyer's patch M cells and enterocytes. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 11th, 2007.

Nagatake T, Fukuyama S, Kim DY, Takamura K, and Kiyono H. Tissue-genesis of tear duct-associated lymphoid tissue is independent from the organogenesis-associated transcriptional gene regulation. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 11th, 2007.

Higuchi M, Kunisawa J, Gohda M, Kurashima Y, Ishikawa I, Miura F, Ogahara I, and Kiyono H. Impaired intestinal IgA responses by inhibiting sphingosine 1-phosphate-mediated B cell trafficking. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 11th, 2007.

Kiyono H. Mucosal Mindedness for Productive Immunity and Vaccine. 6th Annual Systems Integration in Biodefence, U.S.A. August 13th, 2007.

Kiyono H. Recent progress in the development of M-cell targeted vaccines. MPI Infection Biology Alumni Meeting, Berlin, August 16th, 2007.

Yuki Y, Nochi T, Takagi H, Yang, L, Masumura T, Mejima M, Matsumura A, Nakanishi U, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, and Kiyono H. A needle- and cold chain-free rice based vaccine against cholera toxin. Keystone Symposia, SouthAfrica, October 10th, 2007.

Kiyono H. New Gravitation in Mucosal Immunology: from Organogenesis to Allergy. International Symposium on Immune Regulation in Clinical Disease, Korea, November 2007.

Kiyono H. The Mucosal Immune System for the Development of Needle and Cold

Chain-Free Vaccine. Vaccine Congress in
Amsterdam, Amsterdam, December 2007.

Kiyono H. NALT and GALT Horizons for
Mucosal Immunity. The Korean Association of
Immunobiologists 55th Fall Conference,
Korea, November 6th, 2007.

ドラッグデリバリー・システムの開発のための自然免疫機構の解析

分担研究者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科教授

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自然免疫系の炎症誘導機構を解析した。近年新たなヘルパー T 細胞のサブセットとして同定された Th17 細胞は、炎症性腸疾患の発症にも深く関与していることが明らかになっている。Th17 細胞は正常マウスにおいて、種々のリンパ組織にはほとんど観察されないが、腸管の粘膜固有層に多数存在している。そこで、腸管粘膜固有層に Th17 細胞を誘導しうる樹状細胞がないかを検討した。その結果、腸管粘膜固有層に特異的に存在している CD70^{high} CD11c^{low} 樹状細胞が、腸内細菌依存的、Toll-like receptor 非依存的に、IL-6 産生、TGF-beta 活性化を導き、Th17 細胞分化を司っていることが明らかになった。

A. 研究目的

自然免疫系が、Toll-like receptor (TLR) ファミリーメンバーにより、病原微生物の生体内侵入を感知し、自然免疫系の活性化のみならず抗原特異的な獲得免疫系の活性化をも誘導することが、明らかになってきた。しかし、TLR を介した自然免疫系の活性化は、その制御機構が破綻すると、慢性炎症性腸疾患などの慢性炎症を引き起こすことも明らかになっている。このように、腸粘膜において自然免疫系の重要性がクローズアップされている。通常、腸粘膜 M 細胞の直下で自然免疫系担当細胞が病原微生物をはじめとした外界異物の侵入を感知し免疫応答を繰り広げるものと考えられる。そこで腸粘膜における免疫応答機構を明らかにするため、自然免疫系の活性制御機構に標的を絞り、その分子機構を解析し、腸粘膜 M 細胞を介したドラッグデリバリーシステムの開発に資することを本研究の目的とする。

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 欠損マウスと同様に Th1 細胞依存性の慢性腸炎を発症することを見出した。

しかし近年になり、新たなヘルパー T 細胞サブセットとして Th17 細胞が同定され、炎症性腸疾患の発症にも Th1 細胞以上に Th17 が深く関与していることが示されてきている。この Th17 細胞は健康なマウスでも腸管の粘膜固有層に多数存在している。しかし、その腸管局所での分化メカニズムは全くわかっていない。そこで、慢性炎症性腸疾患の発症にも深く関与する Th17 細胞の腸管局所での分化メカニズムを解析した。

B. 研究方法

細胞内染色法により、各リンパ組織、腸管粘膜固有層での IL-17 産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。また、Toll-like receptor (TLR) を介したシグナルの消失する MyD88/TRIF 二重欠損マ

ウスや、腸内常在菌のいない germ free マウスを用いて、腸管粘膜固有層での IL-17 産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。大腸の粘膜固有層から、CD11c 陽性樹状細胞を単離し、脾臓由来のナイーブ CD4 陽性細胞と共培養し、5 日後 CD4 T 細胞を回収し、PMA+ionophore 刺激による IL-17 発現を real-time Q-PCR 法で解析した。さらに、CD11c 陽性細胞の中で、CD70high, CD70low のサブセットを FACS ソーティングにより精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 陽性細胞と共培養し、5 日後 CD4 T 細胞を回収し、PMA+ionophore 刺激による IL-17 発現を real-time Q-PCR 法で解析した。CD70high, CD70low 樹状細胞での IL-6 や TGF-beta 活性化に関わるインテグリン alphaV, beta8 の発現を real-time Q-PCR 法で解析した。

(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

IL-17 陽性の CD4 細胞は、脾臓、腸管リンパ節、パイエル板などのリンパ組織では 1%程度しか認められないが、小腸、大腸の粘膜固有層では、15-30%もの CD4 細胞が IL-17 を産生していた。腸管の粘膜固有層の CD4 陽性細胞を精製し、Th17 細胞のマーカである IL-17A, IL-17F, IL-22, Rorgt の mRNA の発現を real time Q-PCR で解析しても、これらの発現は腸管リンパ節由来の細胞よりも極めて高く、Th17 細胞が多数存在していることが示唆された。TLR シグナルの消失する MyD88/TRIF 二重欠損マウスでも、腸管の粘膜固有層の IL-17 産生細胞は正常

マウスと同様に存在した。一方、腸管細菌叢のない germ free マウスでは、IL-17 産生 CD4 細胞は激減していた。これらの結果から、Th17 細胞は腸内常在菌依存性に、TLR 非依存性に誘導されることが示唆された。

次に、腸管粘膜固有層に Th17 分化を誘導する樹状細胞が存在している可能性を解析した。大腸粘膜固有層より、CD11c 陽性細胞を精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 T 細胞と 5 日間共培養し、再刺激による IL-17 の発現を解析すると、脾臓の CD11c 陽性細胞と共培養した CD4 細胞では、IL-17 の発現はほとんど誘導されないが、大腸粘膜固有層の CD11c 陽性細胞と共培養した細胞は IL-17 を強く発現していることが明らかになった。この結果から、腸管粘膜固有層の樹状細胞には、Th17 細胞の分化を誘導する活性があることが示唆された。樹状細胞は種々のサブセットに分かれることがよく知られている。そこで、腸管粘膜固有層の CD11c 陽性細胞を種々の細胞表面マーカーで染色した。その結果、腸管粘膜固有層の CD11c 陽性細胞は、脾臓の CD11c 陽性細胞と異なり、CD70low, CD70high のサブセットが存在していることが明らかになった。そこで、CD70low, CD70high 樹状細胞を大腸粘膜固有層より精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 T 細胞と 5 日間共培養し、再刺激による IL-17 の発現を解析した。その結果、CD70low 細胞と共培養した T 細胞では、IL-17 の発現は誘導されないが、CD70high 樹状細胞と共培養した T 細胞では IL-17 の発現が強く誘導された、また CD70high 樹状細胞は、CD70low 樹状細胞に比べて、IL-6 や TGF-beta 活性化に関わるインテグリン alphaV, beta8 の発現が亢進していることが明らかになった。IL-6, alphaV, beta8 の発現は、germ free マウス由来の CD70high 細胞では、SPF マウスに比べて低下していた。これらの結果から、CD70high 樹状細胞は腸内常在菌により

IL-6, alphaV, beta8 を発現し、Th17 細胞分化を誘導することが示唆された。

D. 考察

慢性炎症性腸疾患と深く関わる新たなヘルパーT細胞サブセット Th17 細胞が、腸管粘膜固有層に多数存在しているが、これは腸管粘膜固有層に局在しているユニークな樹状細胞が Th17 細胞分化を常在菌依存性に誘導するためであることが明らかになった。この誘導は、常在菌依存性であるが、TLR 非依存的であり、今後、常在菌由来のどのような因子が Th17 細胞分化を司っているかを明らかにして行きたい。

E. 結論

慢性炎症性腸疾患と深く関わる Th17 細胞が、腸管粘膜固有層に局在するユニークな樹状細胞サブセットにより、常在菌依存性に誘導されることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura, K., Miyazato, A., Gang, X., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Suzuki, K., Fujita, J., Kaku, M., and Kawakami, K: Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J. Immunol.* in press
2. Nishimura, J., Saiga, H., Sato, S., Okuyama, M., Kayama, H., Kuwata, H., Matsumoto, S., Nishida, T., Sawa, Y., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte

protease inhibitor. *J. Immunol.* in press

3. Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K., J., Coban, C., Akira, S. Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., and Himeno, K.: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J. Immunol.* in press
 4. Yamamoto, M., Uematsu, S., Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato, S., Kumar, H., Satoh, T., Saitoh, T., Takeda, K., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Kawai, T., and Akira, S.: Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204, 2233-2239 (2007).
 5. Sakamori, R., Takehara, T., Ohnishi, C., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Takeda, K., Akira, S., Hayashi, N.: STAT3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46, 1564-1573 (2007).
 6. 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* 132, 176-189 (2007).
- ##### 2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear Ikb proteins. 8th International Society of Exercise and Immunology

Symposium, 2007.10.25, Sendai,
Japan

2. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, 2007. 10.29, Tsukuba, Japan
3. 竹田潔, 自然免疫系による結核感染防御機構, 第60回日本細菌学会九州支部総会、2007.10.12、長崎
4. Kiyoshi Takeda, Lipocalin 2 mediates host defense against Mycobacterial infection. 42th US-Japan Conference on

Tuberculosis and leprosy,
2007.9.11-14, Henan, China

5. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構第28回日本炎症・再生医学会、2007.8.2、東京

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

ドラッグ・デリバリー材料の改良と開発

分担研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所 教授

研究要旨

ステロイド、タクロリムス、bis-phosphonate などの薬剤のドラッグデリバリー材料として、ポリ乳酸からなる生体吸収性の微粒子を作製した。ポリ乳酸をジクロロメタン (O) に溶解後、水溶性薬物を含む水溶液 (W_1) と混合することにより、 W_1/O エマルジョンを形成させた。さらに、得られた W_1/O エマルジョンをポリビニルアルコール水溶液 (W_2) 中に分散させることにより、 $(W_1/O)/W_2$ エマルジョンを形成させた。ジクロロメタンを蒸発させることにより、薬物が均一に内部に包埋されたポリ乳酸からなる微粒子を作製することができた。得られた薬物包埋ポリ乳酸微粒子について、光学顕微鏡を用いた観察ならびに *in vitro* における薬物の徐放試験を行った。作製条件を変化させることにより、腸粘膜 M 細胞から取り込まれ、脾臓へデリバリーされている粒子径 $5 \mu\text{m}$ 以下のポリ乳酸微粒子を作製した。また、*in vitro* での薬物放出挙動を調べたところ、微粒子からの薬物放出が見られた。前年度に引き続き、ステロイド包埋ポリ乳酸微粒子の臨床応用を目的として、ラージスケールかつクリーンな環境で粒子径 $5 \mu\text{m}$ のポリ乳酸微粒子が調製できるように、その方法についてより詳しい検討を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、腸粘膜 M 細胞を標的とした、ステロイド、タクロリムス、bis-phosphonate などの薬剤の徐放化のためのドラッグデリバリーシステム (DDS) 素材を研究開発することである。この DDS システムのポイントは、目的の部位に薬物を到達させた後、徐放化することである。このためには、薬物のキャリアである粒子のサイズあるいは分解性などをコントロールすることが不可欠である。本研究では、ポリ乳酸からなる生体吸収性の微粒子をデザイン、作製するとともに、臨床応用へ向けたポリ乳酸微粒子の調製方法について検討した。前者に対しては、ポリ乳酸微粒子の作製と微粒子のサイズ、ならびに内部に包埋 (内包) した薬物の徐放性の評価を行っている。まず、粒子作製時における条件を変

化させ、その条件が粒子サイズに与える影響について調べた。次に、作製した薬物包埋ポリ乳酸微粒子からの薬物の放出挙動について検討した。一方、後者に対しては、ラージスケール、かつヒトへの投与に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製法の検討を行った。

本研究の成果によって、腸粘膜 M 細胞への選択的な薬物のデリバリーと徐放化による効果的な薬物治療が可能となり、腸疾患治療への新たな可能性を開くことが期待できる。

B. 研究方法

本研究では、生体吸収性高分子である、L-乳酸とグリコール酸との共重合体 (PLGA) (乳酸 : グリコール酸 = 50 : 50 重量平均分子 : 10,000)、ならびにポリ-D,L-乳酸 (PDLLA) (重量平均分子量 :

20,000)を用いた。薬物としては、水溶性ステロイド(デカドロン)を用いた。デカドロン包埋 PLGA 微粒子ならびに PDLLA 微粒子は W/O/W ダブルエマルジョンを用いた液中乾燥法により作製した。すなわち、PLGA および PDLLA (100 mg)をジクロロメタン 2 ml に溶解させ、デカドロン水溶液 30 μ l を加えて、超音波照射を 15 秒間行った。得られた W/O エマルジョンを異なる重合度をもつポリビニルアルコール (PVA) 水溶液 (重合度 250 - 1800、1 wt%、4 ml) に加え、ホモジナイズ処理 (8200 rpm、10 秒) 後、200 ml の PVA 水溶液中に分散させることにより W/O/W エマルジョンを形成させた。得られた W/O/W エマルジョンを 2 日間、室温で維持することで溶媒を蒸散させる、液中乾燥法により、デカドロン包埋ポリ乳酸微粒子を作製した。得られた微粒子は蒸留水で洗浄後、凍結乾燥した。本研究では、界面活性剤として用いた PVA の重合度(ユニチカ(株)から供与 ケン化度 = 78~88%)および PLGA のジクロロメタン溶液の濃度を変化させた。得られた微粒子サイズ分布を光学顕微鏡で調べた。また、微粒子を生理食塩水中にて振とうし、上清中に放出されたデカドロンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量することによって、微粒子からの薬物の徐放性を評価した。次に、同様の方法で、蛍光物質であるクマリンを含有した PDLLA 微粒子を作製した。これらの微粒子をマウスに経口投与した後の体内分布について調べた。

臨床応用を目指したラージスケールかつヒトへの投与に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製法の検討を行った。上述した粒子作製法の 5 倍容のスケールアップを行い、ホモジナイズ時間、ならびに超音波照射時間が微粒子の収率ならびに粒子系に与える影響について検討した。一方、クリーンな環境として、病院薬剤

部に設置されている経口投与薬剤の調剤に使用されている調剤室を利用した。その室内で、これまでの実験室とは異なる環境で微粒子の作製ができるように、微粒子作製器具および必要装置を整えるとともに、微粒子作製操作上、必要となる事項について詳しく検討した。

C. 研究成果

PVA の重合度ならびに PLGA の溶液濃度が微粒子サイズに与える影響を調べたところ、用いる PVA の重合度が大きくなるとともに、得られた微粒子サイズは増加することがわかった。PVA 水溶液の表面張力を測定したところ、PVA の重合度の低下とともに表面張力が小さくなる傾向が認められた。すなわち、表面張力の低下とともに、より大きな表面積をもつ直径の小さな PLGA 溶液滴が水中で安定に形成され、その結果、微粒子の粒子サイズが小さくなったと考えられる。一方、PLGA の濃度の低下とともに、得られた粒子サイズは小さくなった。これは、PLGA 溶液の粘度の低下が原因である。デカドロン包埋 PLGA 微粒子の走査型電子顕微鏡写真を示す。表面が平滑な真球の粒子が作製できていることがわかった。得られた異なる粒子径 (平均粒子サイズ 4、10、および 15 μ m) の微粒子からのデカドロン *in vitro* における徐放性を調べたところ、粒子径が小さいほど薬物の放出速度が速いことがわかった。また、デカドロンの徐放パターンに、高分子の分子量が影響を与えていることがわかった。分子量の増加とともに、薬の徐放は抑制され、より長い期間の徐放化が可能となった。これは、分子量の増加とともに、微粒子の分解が遅くなり、それにとまって、包埋されているデカドロンの放出

が抑制されたことが原因であると考えられる。

次に、平均粒子サイズが 3、5、および 10 μm のクマリン包埋 PLGA および PDLLA 微粒子のマウスへの経口投与 1 週間後、脾臓の凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、粒子サイズ 3 μm の微粒子のみが脾臓で確認され、より大きなサイズをもつ粒子は異なった体内分布を示した。平均粒子径が 5 μm 以上になると腸粘膜局所にとどまり、その部位で薬を徐放化することがわかった。

一方、ラージスケールでポリ乳酸微粒子を作製した場合、微粒子作製過程で形成される W/O および W/O/W エマルジョンの液滴のサイズを小さくする必要がある。そこで、それぞれのエマルジョンを形成させる条件、すなわち、超音波照射時間、およびホモジナイザー処理の時間を変化させて、得られた微粒子の粒子径を評価したところ、超音波照射時間 240 秒、ホモジナイザー処理時間 90 秒の場合、スモールスケールと同様に、平均粒子径が 5 μm 程度の粒子を得ることができた。また、このようにして条件検討したラージスケールでの微粒子の作製を病院薬剤部内の経口投与薬剤の調剤室で行うことを計画し、調剤室内で薬物包埋ポリ乳酸微粒子の作製が可能な体制を整えることができた。調剤室の空気清浄度はクラス 100,000 であり、調剤室と外界との間に、前室ならびにエアロック室を設けて、比較的クリーンな環境を整えることができた。加えて、5 倍容で微粒子作製が可能なガラス器具、攪拌プロペラモーターの組み合わせ、最適化を行い、条件を設定した。また、得られた粒子の凍結乾燥装置の設置と、これまでの実験室での作製条件との同等性を保証するための試験を行った。また、微粒子の回収率を上げるための条件設定を行い、70-80%の収率を

達成することが可能となった。

D. 考察

腸粘膜 M 細胞は、細菌などを消化することなく取り込み、腸粘膜リンパ装置の免疫担当細胞に効率よく送り込む細胞である。この腸粘膜リンパ装置は、免疫反応の中心であり、潰瘍性大腸炎、クローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) や移植医療における問題の一つである Graft versus Host Disease (GVHD) などの病態において、中心的な役割を果たしていることが知られている。これまでに、われわれは、腸粘膜 M 細胞が特定の大きさの粒子を特異的に取り込むことに着目し、生体吸収性高分子であるポリ乳酸からなる微粒子を利用して、経口および経腸的に投与した微粒子が M 細胞から取り込まれた後、腸粘膜リンパ装置に特異的に分布すること、また、投与した薬剤が血中には流出しないことを示してきた。これらの結果を踏まえ、より効果的に腸粘膜 M 細胞をターゲティング可能な DDS システムの構築とその臨床応用を目指したラージスケールでの生産方法を確立することが本研究の目的である。そこで、まず、生体吸収性高分子の分子量や PVA の重合度などの物理化学的性質を変化させることにより、粒子径の異なる微粒子を作製し、微粒子の粒子径が薬物の徐放性や腸粘膜 M 細胞に対するターゲティング能などに与える影響について検討した。その結果、粒子径が大きくなるにつれて、より持続的に薬物を放出することが可能である反面、腸粘膜 M 細胞に対するターゲティング能が低下することがわかった。本研究では、投与した薬物が腸粘膜 M 細胞に取り込まれることが Key であることから、薬物徐放性を維持しながら、腸粘膜 M 細胞に取り込まれる、粒子径

が $5\mu\text{m}$ 以下の微粒子を DDS 素材として選択した。

次に、前年度に引き続き、粒子径が小さい薬物包埋粒子を大量生産するために、ラージスケールでの微粒子の調製を行った。微粒子の粒子径を規定する工程は、W/O ならびに W/O/W エマルジョンを形成させる条件、ならびに PVA 水溶液の表面張力である。これらの観点から、エマルジョン形成の条件ならびに用いる PVA の分子量を変化させることにより、ラージスケールでも粒子径が $5\mu\text{m}$ 以下の微粒子を 70~80% の高収率で得ることができた。加えて、粒子径と収率の再現性の確認を行った。また、臨床応用に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製設備内においても、同様の粒子作製が可能かどうかの確かめと、より高収率で目的の粒子径をもつ微粒子を得ることができるように、作製法の最適化を進めた。

E. 結論

作製条件を変化させることにより、異なる粒子径ならびに薬物徐放性をもつ生体吸収性微粒子を作製することができた。薬物徐放性ならびに腸粘膜 M 細胞へのターゲティング能は、微粒子の粒子径に依存し、ターゲティング能という観点から、 $5\mu\text{m}$ 以下の微粒子が腸粘膜 M 細胞へのドラッグデリバリーに有効であることがわかった。また、臨床応用を目指したラージスケールでのポリ乳酸微粒子の作製条件について検討した。臨床応用に耐えうるクリーンな環境で微粒子を作製できる施設内で、前々年度、前年度で得られたラージスケールでの最適微粒子作製の検討を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発に関する研究

分担研究者 若月芳雄 京都大学医学研究科 講師

研究要旨：消化管には、食物あるいは細菌由来の抗原が大量に存在し、一方、夥しい数の免疫担当細胞も存在している。腸管粘膜レベル、一次、二次リンパ組織、各々において各種の免疫調節が行われるため、通常、腸管腔内抗原に対する生体の免疫反応は平衡を保ち、組織障害が起こらない。腸管より吸収される抗原に対する生体の反応の詳細は不明であったが、抗原特異的な免疫応答を解析する動物モデルを用いることにより、肝臓が調節のターゲットの一つであることを明らかにした。特に肝門脈周囲に存在する抗原提示細胞は抑制性の免疫応答を誘導し、将来、適切なドラッグデリバリーシステムを用いることにより、生体の免疫反応を経口より調節する新たな手段となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎の患者では腸管内に常在する細菌由来の抗原、あるいは食物に由来する物質に対して過剰に免疫反応が成立し組織障害を起こすと考えられている。一方、経口より投与された抗原に対して生体では抗原特異的に免疫反応の低応答性(免疫寛容)が誘導され、その結果抗原非特異的に免疫反応を抑制することも知られている。後者の反応を誘導する機序の解明は、原因不明の炎症性疾患を治療するために重要である。例えば、炎症を惹起する抗原が同定できれば、これを、適切なドラッグデリバリーシステムを用いて経口から投与して、慢性炎症の成立・維持に関わるT細胞の機能を抑制する治療法が考えられる。経口より投与された抗原の一部は腸管粘膜に存在するM細胞・樹状細胞により粘膜に付随したリンパ組織で抗原提示されるとともに、一部は門脈を経て肝臓に到達することを我々は報告している。

実際、経口から抗原を投与する方法により、肝臓に抗原特異的な免疫調節性CD4T細胞が誘導されること、その誘導には、門脈周囲に存在する樹状細胞が重要な役割を

担うことを我々は既に報告している。(J.

Immunology 2002,218, Hepatology 2003, 403.) 今回の検討では、経口からの抗原投与により肝臓に誘導される免疫反応を介在する樹状細胞が、果たして炎症病態を阻止しえるか疾患モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

卵白アルブミン(OVA)に特異的なT細胞抗原受容体を遺伝子導入により強制発現させたBALB/cマウスにOVA蛋白を経口より投与し、肝における樹状細胞の局在と細胞表面マーカの動態を調べた。また抗原を投与したマウスの肝臓よりCD11c陽性樹状細胞を精製しその機能を、in vitroで、またナイーブな宿主に移入し、in vivoで、免疫調節作用を調べた。

上記マウスにリポソームに包埋したOVAペプチドを経静脈的に投与して肝炎を惹起した。このモデルに予め肝臓由来樹状細胞を移入することにより肝障害の阻止作用の有無を検討した。

C. 研究結果

経口から100mgのOVAを隔日に5回投与

すると、肝臓内門脈周囲と一部類洞に CD11c 陽性 IAd 陽性が集簇することが組織学的に認められた。多重染色フローサイトメトリーにて、CD11c, IAd, CD80, CD86 は同一の細胞に染まり、F4-80 陽性細胞(肝 Kupper 細胞)とは局在が異なり樹状細胞であると決定された。OVA 投与後のマウス肝臓より樹状細胞を精製し未感作マウスに移入したのち OVA で皮下免疫を行ったところ、OVA 特異的な IgE の増加と総 IgG の低下を認めた。この樹状細胞を用いて OVA 特異的な T 細胞を vitro で刺激すると、細胞増殖と IFN- γ の産生を抑制し IL-4 の産生を増強した。

さらに、OVA 特異的 CD4T 細胞を強制発現したマウスにリポソーム包埋 OVA を静注して Th1 型免疫反応を肝臓で惹起するとマウスの肝細胞壊死(肝炎)が起こるが、このマウスに予め、OVA を経口投与した他のマウスの肝樹状細胞を移入しておく、肝炎は阻止された。このときの肝臓より精製した CD4T 細胞の OVA 特異的リンホカインを測定すると、IL-2, IFN- γ の産生抑制と IL-4 の産生増強が認められた。この現象と相関して肝臓内では OVA 特異的な CD4T 細胞のアポトーシスの亢進が認められた。OVA 特異的 CD4T 細胞のアポトーシスは IL-12 の投与により抑制され、逆に抗 IL-12 抗体の投与により増強した。肝樹状細胞の移入に伴う IFN- γ の産生減少と IL-4 の産生増加は移入樹状細胞の IL-12 産生の低下によるものであることが、抗 IL-12 抗体あるいは IL-12 の投与により示唆された。経口的に抗原を負荷したマウスの肝樹状細胞を移入したマウスでは、OVA-liposome 投与により起こる肝細胞の壊死が抑制されることが肝組織 TUNEL 染色により証明された

D. 考察

以上のことから、経口より抗原を投与すると一部抗原は肝門脈周囲と肝類洞内の樹状細胞に捕捉され局所で抗原特異的な T 細胞

に抗原提示してこれを活性化し、その結果おこる、抗原特異的 CD4T 細胞死を惹起すること、同時に Th1 型の細胞を除去して Th2 型の細胞を賦活化するような反応を誘導することが示された。

この機序には門脈周囲に存在する CD11c+, Class II+F4/80- の樹状細胞が重要な役割を担うこと、また局所に誘導された樹状細胞を、非感作宿主に移入することにより、肝臓での Th1 反応を抑制して肝障害を阻止することが判明した。

E. 結論

従来より経験的に知られていた肝門脈性免疫寛容誘導の細胞機序を明らかにした。同寛容現象は、肝臓の移植あるいはラ氏島細胞の経門脈的肝臓内移植による 1 型糖尿病治療において重要な役割を担っている。今回の研究により、適切なドラッグデリバリーシステムを用いて経口から効率よく経門脈的に肝臓の門脈周囲あるいは類洞内に存在する樹状細胞に抗原負荷を行い、肝臓での抗原提示を亢進することにより、Th1 型の機序でおこる肝障害を治療できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

【論文発表】

1. Watanabe T, Katsukura H, Chiba T, Kita T, Wakatsuki Y: Periportal and sinusoidal liver dendritic cells suppressing T helper type 1-mediated hepatitis. Gut 2007 Oct;56(10): 1445-51.
2. Watanabe T, Kudo M, Chiba T, Wakatsuki Y: Molecular mechanisms of portal vein tolerance. Hepatol Res. 2007 Dec 6;

【学会発表】

1. 若月芳雄、勝倉浩昭、渡辺智裕、家森正志、森本正和、千葉 勉: 肝臓の免疫調節性 CD4T の誘導における自然

免疫のはたす役割. 第 43 回日本消化
器免疫学会、シンポジウム 2007.8. 3 弘
前

G. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得 該当無し

実用新案登録 該当無し

その他 該当無し

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻(号)	ページ	出版年
Nanakin A, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Kanda N, Hisatsune H, Seno H, Konda Y, Fujimori T, <u>Chiba T</u>	Expression of the REG IV gene in ulcerative colitis.	Lab Invest	87	304-314	2007
Nakase H, Yoshino T, Ueno S, Uza N, Mikami S, Matsuura M, <u>Chiba T</u>	Importance of early detection of cytomegalovirus infection in refractory inflammatory bowel disease.	Inflamm Bowel Dis	13	364	2007
Nakase H, Mikami S, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kasahara K, Yoshino T, Takeda Y, <u>Chiba T</u>	Rescue therapy with Tacrolimus for a patient with severe ulcerative colitis refractory to combination leukocytapheresis and high-dose of corticosteroid therapy.	Int Med	46	717-720	2007
Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Mikami S, Tamaki H, Kasahara K, <u>Chiba T</u>	Open label trial of Clarithromycin therapy in Japanese patients with Crohn's disease.	J Gastroenterol Hepatol	22	984-988	2007
Matsuura M, Nakase H, Nakamura F, Ueda Y, Mikami S, Yoshino T, Ueno S, Uza N, <u>Chiba T</u>	Ileal ulcers induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs.	J Gastroenterol Hepatol	22	1346	2007

Mikami S, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Sakurai T, <u>Chiba T</u>	Involvement of cytomegalovirus infection in the ileal lesions of the patient with Behcet' s disease.	Inflamm Bowel Dis	13	802-803	2007
Yoshino T, Nakase H, Ueno S, Uza N, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Ohmori K, Sakurai T, Nagayama S, Hasegawa S, Sakai Y, <u>Chiba T</u>	Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies.	Inflamm Bowel Dis	13	1516-1521	2007
Kasahara K, Nakase H, Uza N, Ueno S, Matsuura M, Mikami S, Inoue S, <u>Chiba T</u>	Adminstration of PEG-interferon to a patient with UC and chronic hepatitis C correlated with reduced colonic inflammation and reversal of peripheral T cell Th1/Th2 ratios.	Case Reports in Gastroenterol	1	157-161	2007
Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, and <u>Kiyono H.</u>	A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses.	J Exp Med	204	2789-2796	2007
Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, and <u>Kiyono H.</u>	Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination.	Proc Natl Acad Sci USA	104	10986-10991	2007
Nagai S, Mimuro H, Yamamda T, Baba Y, Moro K, Nochi T, <u>Kiyono H.</u> Suzuki T, Sasakawa C, and Koyasu S.	Role of Peyer' s patches in the induction of Helicobacter pylori-induced gastritis.	Proc Natl Acad Sci USA	104	8971-8976	2007
Fukuyama S, and <u>Kiyono H.</u>	Neuroregulator RET initiates Peyer' s-patch tissue genesis.	Immunity	26	393-395	2007

McGhee JR, Kunisawa J, and <u>Kiyono H.</u>	Gut lymphocyte migration: we are halfway 'home' .	Trends Immunol	28	150-153	2007
Kunisawa J, Takahashi I, and <u>Kiyono H.</u>	Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine.	Immunol Rev	215	136-153	2007
Yamamoto, M., Uematsu, S., Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato, S., Kumar, H., Satoh, T., Saitoh, T., <u>Takeda, K.</u> , Ishii, K. J., Takeuchi, O., Kawai, T., and Akira, S.	Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency.	J Exp Med	204	2233-2239	2007
Watanabe T, Katsukura H, <u>Chiba T</u> , Kita T, <u>Wakatsuki Y</u>	Periportal and sinusoidal liver dendritic cells suppressing T helper type 1-mediated hepatitis.	Gut	56	1445-51	2007
Watanabe T, Kudo M, <u>Chiba T</u> , <u>Wakatsuki Y.</u>	Molecular mechanisms of portal vein tolerance.	Hepatol Res		in press	2008

Expression of the *REG IV* gene in ulcerative colitis

Apichart Nanakin¹, Hirokazu Fukui^{1,2}, Shigehiko Fujii^{1,2}, Akira Sekikawa^{1,2}, Naoki Kanda¹, Hiroshi Hisatsune¹, Hiroshi Seno¹, Yoshitaka Konda¹, Takahiro Fujimori² and Tsutomu Chiba¹

The *regenerating gene (REG) IV* gene was isolated from a cDNA library of ulcerative colitis (UC) tissues. However, its role in the pathophysiology of UC and subsequent development of colitic cancer is still unclear. We investigated the expression of the *REG IV* gene in UC and colitic cancer tissues and examined whether cytokines or growth factors are responsible for *REG IV* gene expression and whether *REG IV* gene induction affects cell growth and apoptosis in colon cancer cells. The expressions of *REG IV* and *growth factor* genes in UC tissues were analyzed by real time reverse transcription-polymerase chain reaction. The effects of cytokines and growth factors on *REG IV* gene expression were examined in SW403 cells by Northern blot analysis. The effects of *REG IV* gene induction on cell growth and H₂O₂-induced apoptosis were examined in DLD-1 cells by MTT and TUNEL assays, respectively. *REG IV* mRNA was strongly expressed in inflamed epithelium and in dysplasias and cancerous lesions in UC tissues. The level of *REG IV* mRNA expression was correlated with that of *basic fibroblast growth factor (bFGF)* as well as *hepatocyte growth factor (HGF)* mRNA expression in UC tissues. The *REG IV* gene expression in SW403 colon cancer cells was enhanced by stimulation with transforming growth factor- α , epidermal growth factor, bFGF, and HGF. *REG IV* gene induction promoted cell growth and conferred resistance to H₂O₂-induced apoptosis in DLD-1 cells. The *REG IV* gene is inducible by growth factors and may function as a growth promoting and/or an antiapoptotic factor in the pathophysiology of UC.

Laboratory Investigation (2007) 87, 304–314. doi:10.1038/labinvest.3700507; published online 29 January 2007

KEYWORDS: cell growth; colitic cancer; growth factor; REG; ulcerative colitis

The pathogenesis of ulcerative colitis (UC) is still unclear, but dysregulated immune function appears to be involved in its chronic inflammatory process, resulting in continuous damage of the colonic mucosa.^{1–5} To regenerate the injured colonic tissues, growth factors are thought to play very important roles, and indeed, several growth factors are reported to be upregulated in the colonic tissues in UC.^{3,6,7} However, few comprehensive studies have examined the expression patterns of various growth factors in UC tissues simultaneously, and the network of and the relationships among growth factors in UC tissues are not fully understood.

Regenerating gene (REG) IV, the most recently discovered member of the *REG* gene family, was isolated from a cDNA library of UC tissues by Hartupée *et al.*⁸ Although the biological function of *REG IV* protein is still unclear, *REG IV* protein may play a role in cell growth because other *REG* family proteins have been shown to act as growth factors in gastrointestinal organs.^{9–14} However, it still remains unknown whether the *REG IV* gene is indeed involved in the pathophysiology of UC and whether *REG IV* protein really

functions as a growth factor. Moreover, it has not been examined how *REG IV* gene expression is regulated. In the present study, therefore, in order to elucidate roles for *REG IV* in the pathophysiology of UC, we investigated the relationship between *REG IV* gene expression and clinicopathological factors in patients with UC, and examined the mechanism of *REG IV* gene expression and the cell growth effect of *REG IV* protein *in vitro*. Furthermore, to clarify the relationship between the *REG IV* gene and other growth factors in UC mucosa, we examined the expression of various *growth factor* genes together with that of *REG IV*.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Specimens and Histological Examination

Colon biopsy specimens were obtained by endoscopy from 22 patients with UC (13 men and nine women; mean age 44.7 years, range 19–79 years; mean disease duration 6.3 years, range 0–19 years) and five normal controls (five men; age range 33–38 years) in 2003 and 2004 at Kyoto University

¹Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan and ²Department of Surgical and Molecular Pathology, Dokkyo University School of Medicine, Tochigi, Japan
Correspondence: Dr H Fukui, MD, PhD, Department of Surgical and Molecular Pathology, Dokkyo University School of Medicine, 880, Kitakobayashi, Mibu, Shimotsuga, Tochigi 321-0293, Japan. E-mail: h-fukui@dokkyomed.ac.jp

Received 7 June 2006; revised 24 October 2006; accepted 29 October 2006