

厚生労働科学研究費補助金（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
分担研究報告書

炎症性腸疾患に対する抗線維化を標的とした新規治療法の開発

分担研究者 鈴木健司 新潟大学医歯学総合病院第三内科 講師

研究要旨：炎症性腸疾患に対する治療戦略は抗炎症のみならず、障害を受けた腸管上皮細胞の組織修復・再生促進を図る必要がある。これに加え、クローン病においては障害腸管に対する過度の線維化に基づく腸管狭窄に対する治療が必要である。すなわち、炎症性腸疾患に対する治療戦略は抗炎症、組織修復・再生促進、抗線維化の三つを目指す必要がある。我々は、抗線維化作用を発揮する GMP グレードの核酸医薬品 STNM-01 を新たに開発し、マウス急性 DSS 腸炎に対し、本薬剤の腸炎治療効果を検討した。本薬剤は有意に腸炎治療効果を有し、その作用機序は抗線維化が主体であるが、抗炎症効果と腸上皮細胞の増殖促進効果も有することが明らかとなった。今後はわれわれの開発したラットに対する内視鏡的薬剤粘膜下注入手技による本薬剤の治療実験を行い、炎症性腸疾患に対する抗線維化を標的とした画期的な治療法開発を進める予定である。

共同研究者

河内裕介、 新潟大学大学院医歯学総合
孫暁梅： 研究科消化器内科学分野

藤井庄人、 ステリック再生医科学研究
米山博之： 所

A. 研究目的

従来の炎症性腸疾患に対する治療戦略を見た場合、5-アミノサリチル酸製剤、副腎皮質ステロイドに始まり、免疫抑制剤、抗 TNF α 抗体レミケードにいたるまで、炎症細胞あるいはこれらの細胞の産生する炎症メディエーターの除去あるいは機能制御による抗炎症効果を目指したものがほとんどであった。一方、慢性炎症で機能障害を生じる腸管の上皮細胞は生体内でも最も再生の盛んな臓器の一つであることから、障害を受けた腸管上皮細胞の修復・再生促進を図る治療が第二の炎症性腸疾患治療法の戦略となりうる。クローン病の不可逆性の合併症として腸管組織障害修復後の過度の線維化と腸管狭窄の問題が存在する。創傷治癒に伴う線維化は組織修復の重要な再生過程のひとつであり、線維化と抗線維化作用のバランスが保たれて初めて健全な創傷治癒がもたらされる。しかし、クローン病においては創傷治癒過程におけるアンバランスな線維化がこのような合併症をもたらす。すなわち、炎症性腸疾患に対する第三の治療戦略

として、抗線維化療法が重要な位置を占めるであろう。以上の理由より、炎症性腸疾患に対する新規治療法開発を考えた場合、従来の抗炎症療法に加え、修復・再生促進療法と抗線維化療法も含めた三つの戦略で研究を展開する必要がある。

今回、われわれは腸管局所における抗線維化作用を発揮する新たな核酸医薬品 STNM-01 を用いたクローン病に伴う消化管狭窄治療法の開発を目指した研究を開始した。

B. 研究方法

ステリック再生医科学研究所で開発した抗線維化作用を発揮する GMP グレードの核酸医薬品 STNM-01（特許出願中）を、急性 DSS 腸炎マウスモデルに対し予防および治療投与し、その治療効果を病理組織学的、免疫学的、分子生物学的解析により判定した。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

STNM-01 を投与した急性 DSS 腸炎マウスモデルでは、臨床活動度、組織学および各種炎症性サイトカイン産生などに対する免疫組織学的・分子生物学的解析により、有意な腸炎予防効果および治療効果が認められた。抗線維化効果のほかに、炎症

性サイトカイン産生の抑制や炎症細胞浸潤抑制などの抗炎症効果、さらに腸管上皮細胞におけるKi67陽性細胞数の増加などから傷害腸上皮の細胞増殖促進効果も認められた。

D. 考察

新規開発核酸医薬品STNM-01は抗線維化作用を有する医薬品であり、実験腸炎に対し有意の治療効果を発揮した。さらにその機序は主な抗線維化作用に加えて、抗炎症、再生促進効果もあわせ持つ可能性が示唆された。我々が開発したラット実験腸炎に対する薬剤の内視鏡的消化管粘膜下注入手技は、種々の薬剤を腸管局所に効率よく保持・作用させる理想的なドラッグ・デリバリー・システムと考えられるので、今後はSTNM-01の内視鏡的粘膜下注入手法をラット実験腸炎に対し行い、前臨床試験を進める予定である。

E. 結論

腸管局所における抗線維化作用を発揮する新たな核酸医薬品STNM-01は応用可能な炎症性腸疾患の画期的治療法となりうる可能性が示された。

今後は新規薬剤STNM-01の腸炎治療効果をラット実験腸炎に対する内視鏡的大腸粘膜下注入手技を用いて解析を進め、炎症性腸疾患に対する画期的な治療法開発を進める予定である。

F. 参考文献

- 1) 鈴木健司: 炎症性腸疾患の治療と新規治療法開発の戦略. 新潟県医師会報 693号:2-9, 2007.
- 2) <http://www.stelic.com/jp/release/13.html>
ステリック再生医科学研究所ホームページ

G. 健康危険情報

該当なし。

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takamura M, Matsuda Y, Yamagiwa S, Tamura Y, Honda Y, Suzuki K, Ichida T, Aoyagi Y: An inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, SP600125, protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic failure by modulating BH3-only proteins. Life Sciences. 80:1335-1344, 2007.
- 2) Hitoshi Asakura, Kenji Suzuki, Terasu Honma. Recent advances in basic and clinical aspects of inflammatory bowel

disease: Which steps in the mucosal inflammation should we block for the treatment of inflammatory bowel disease? World J Gastroenterol 13: 2145-49.

- 3) Masato Fujii, Kenji Suzuki, Masahide Suzuki, and Masamichi Hosono. Different pathological phenotypes of autoimmune gastritis induced by neonatal thymectomy between BALB/c and (BALB/c x DBA/2)F1 mice: role of eosinophils in hypertrophic autoimmune gastritis. J Gastroenterol 42 :433-443, 2007.
- 4) Kenji Suzuki, Yusuke Kawauchi, Suresh S. Palaniyandi, Punniyakoti T. Veeraveedu, Masato Fujii, Satoshi Yamagiwa, Hiroyuki Yoneyama, Gi Dong Han, Hiroshi Kawachi, Yoshiaki Okada, Yoichi Ajioka, Kenichi Watanabe, Masamichi Hosono, Hitoshi Asakura, Yutaka Aoyagi, Shosaku Narumi. Blockade of interferon-inducible protein-10 attenuates chronic experimental colitis by blocking cellular trafficking and protecting intestinal epithelial cells. Pathol International 57: 413-420, 2007.
- 5) Mariko Hokari, Yasunobu Matsuda, Toshifumi Wakai, Yoshio Shirai, Munehiro Sato, Atsunori Tsuchiya, Masaaki Takamura, Satoshi Yamagiwa, Kenji Suzuki, Shogo Ohkoshi, Takafumi Ichida, Hiroshi Kawachi, Yutaka Aoyagi. Tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 potentiates the anchorage-independent growth of human hepatoma HepG2 cells. Life Sciences 81: 336-345, 2007.
- 6) Punniyakoti T. Veeraveedu, Kenichi Watanabe, Meilei Ma, Suresh S. Palaniyandi, Ken'ichi Yamaguchi, Kenji Suzuki, Makoto Kodama, Yoshifusa Aizawa. Effects of nonpeptide vasopressin V2 antagonist tolvaptan in rats with heart failure. Biochemical Pharmacol. 74:1466-75, 2007.
- 7) Hiroyuki Yoneyama, Yoshiro Kai, Jun Koyama, Kenji Suzuki, Hiroshi Kawachi, Shosaku Narumi, Takafumi Ichida. Neutralization of CXCL10 accelerates liver regeneration in carbon tetrachloride-induced acute liver injury. Med Mol Morphol 40:191-197, 2007.

2. 学会発表

- 1) 鈴木健司、河内裕介、青柳豊. 肥満細胞の制御による炎症性腸疾患の治療の試み, 第93回日本消化器病学会総会, 青森, 2007年4月19日.
- 2) 孫曉梅、鈴木健司、河内裕介、河内裕、青柳豊. DSS 腸炎の肥満細胞膜安定化剤による治療 第44回日本消化器免疫学会総会, 東京, 2007年7月9日.
- 3) K Suzuki, Y Kawauchi, X Sun, H Asakura, Y Aoyagi. A new drug delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease. 3th International congress of mucosal immunology. ICMI 2007, Tokyo, 2007年7月11日.

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:

国内特許出願中 (2007-171361): 生理活性物質を定着および発現させる方法 (炎症性腸疾患の新規治療法)。

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（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
分担研究報告書

自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御機構に関する研究

分担研究者 竹田 潔 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CD70high 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。今後、腸管でTh17を誘導する樹状細胞の生理機能およびTh17の意義について解析していきたい。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、現在その病因・病態が明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない難治性の疾患である。マクロファージの活性を負に制御することが知られているサイトカインIL-10の遺伝子欠損マウスが慢性腸炎を発症することから、このマウスはヒトの慢性炎症性腸疾患のモデル動物としてよく利用され、病態の詳細な解析が行われてきた。また、種々の薬剤による腸炎誘導モデルにおけるIL-10の作用が、IL-10の発現上昇や、抗IL-10抗体によるブロック実験などにより解析され、また、IL-10遺伝子の発現誘導による慢性腸炎の治療効果も実験動物で確かめられてきた。このように、IL-10が慢性腸炎の発症を抑制することは明らかになっている。しかし、IL-10がいかなる分子機構で生体において慢性腸炎を抑制するかは全く理解されていない。慢性炎症性腸疾患は、現代増加の一途をたどる疾患のひとつで、その病因・病態の解明、さらにその治療法の確立が待ち望まれている。

申請者は、マクロファージにおいてIL-10のシグナル伝達にStat3が必須であることを見出し、Stat3をマクロファージ特異的に欠損させると、マクロファージが異常に活性化され、IL-10欠損マウスと同様にTh1細胞依存的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 細胞のマーカーである 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 非依存性であり、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. 健康危険情報

なし

G. 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).
- 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

2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear IκB 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.

厚生労働科学研究費補助金（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
分担研究報告書

MIF (macrophage migration inhibitory factor)の制御による炎症性腸疾患の新しい治療法の開発

分担研究者 浅香正博 北海道大学大学院 消化器内科学分野 教授

研究要旨

炎症性腸疾患に対する MIF の役割を明らかにするために、MIF に対する自己抗体を産生する DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) を開発した。このワクチンを接種したマウスでは、変異 MIF 蛋白に対する抗体が産生され、DSS 腸炎が有意に抑制された。MIFTh エピトープ DNA ワクチンによる抗 MIF 療法は、炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまで我々は、macrophage migration inhibitory factor (MIF) に対する中和抗体の投与が、炎症性腸疾患の動物モデルである DSS 腸炎に対し予防および治療効果を示すことを報告してきた。炎症性腸疾患における MIF の役割を更に明らかにし、治療の標的となる新しい分子を見出す目的で MIF^{-/-}マウスを用いた解析を行ったところ、MIF^{-/-}マウスでは DSS 腸炎が全く惹起されないこと、その機序として heat shock protein 70 (HSP70) の関与を示唆した。さらに HSP70 の誘導剤である geranylgeranyl acetone (GGA) の投与が DSS 腸炎に対し予防効果を示すことを明らかにした。

最近能動的抗体療法としてサイトカインに対する自己抗体を誘導しサイトカインの活性を抑える方法が考えられている。最近われわれは MIF の免疫原性を高めるために免疫活性化ペプチド (Th エピトープ) を MIF 蛋白に融合し、効率よく高親和性抗体を誘導することができる高機能 DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) を開発した。本研究では Th エピトープ MIF DNA ワクチンをマウスに接種、実験腸炎の程度を検証した。

今回は

B. 研究方法

Th エピトープ遺伝子を MIF 遺伝子に挿入したプラスミド DNA を調製した。この MIFTh エピトープ DNA ワクチンを、MHC の適合した 4-5 週齢の BALB/c マウスの皮下または筋肉内にエレクトロポレーション法をもちいて接種した。DNA ワクチンを接種したマウスおよび野生型マウスに対し DSS 腸炎を作成し、各群の臨床症状スコア (下痢、血便、体重

減少、腸管の長さおよび組織学的所見を比較した。DSS 腸炎は 3% DSS 水溶液を 7 日間自由飲水にて投与して作成した。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱い、北海道大学医学部“動物実験に関する指針”に基づいた。

C. 研究結果

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

D. 考察

近年、サイトカインなどに対する抗体を、クローン病をはじめとする炎症性腸疾患患者に投与する受動的抗体療法が行われ、顕著な効果が認められている。しかし投与された抗体が速やかに消失し持続性に欠けること、投与抗体に対する新たな抗体の産生が惹起されること、コストが高いなど課題も多い。本研究でもちいた DNA ワクチンは、MIF 蛋白と免疫活性化ペプチドの融合蛋白を作りだすように設計されたプラスミド DNA であり、これをマウスに投与すると、Th エピトープを有する変異 MIF が体内で産生され、この変異蛋白に対する抗体が効率よく産生される。この DNA ワクチンを接種したマウスでは、従来の蛋白ワクチンと異なり、アジュバントや担体を必要とせずに抗 MIF 抗体が産生された。MIFTh エピトープ DNA ワクチン

による能動的抗 MIF 抗体療法は、従来の受動的抗体療法に比較し、簡便性、コスト面など優位な点が多く、今後の臨床応用が期待される。

E. 結論

MIFTh エピトープ DNA ワクチンを投与したマウスでは、DSS 腸炎が有意に抑制された。MIFTh エピトープ DNA ワクチンによる能動的抗体療法が炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohkawara T, Takeda H, Furukawa S, Kato M, Shimizu Y, Asaka M. : Changes in the plasma level of macrophage migration inhibitory factor in ulcerative colitis patients treated with selective granulocyte and monocyte apheresis. Intern Med. 46: 1821-1822, 2007.
- 2) Ohkawara T, Nishihira J, Kato M, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M. : Serum level of macrophage migration inhibitory factor in Helicobacter pylori-infected patients. Intern Med. 46: 789-790, 2007.
- 3) Ohkawara T, Saito M, Nakagawa S, Ohizumi H, Tamaki T, Yonekawa M, Takeda H, Asaka M., Nishihira J, Kawamura A. : A case report of the therapeutic effect of cryofiltration in a patient with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. Ther Apher Dial. 11: 159-162, 2007.
- 4) Konishi K, Saito N, Shoji E, Takeda H, Kato M, Asaka M., Ooi HK. : Helicobacter pylori: longer survival in deep ground water and sea water than in a nutrient-rich environment. APMIS. 115: 1285-1291, 2007.
- 5) Miseki T, Kawakami H, Natsuzaka M, Darmanin S, Cui HY, Chen J, Fu Q, Okada F, Shindo M, Higashino F, Asaka M., Hamuro J, Kobayashi M. : Suppression of tumor growth by intra-muscular transfer of naked DNA encoding adrenomedullin antagonist. Cancer Gene Ther 14: 39-44, 2007.
- 6) Kuwatani M, Kawakami H, Makiyama H, Onodera M, Matsumoto K, Karasawa G, Asaka M. : Autoimmune pancreatitis with retroperitoneal fibrosis which responded to steroid therapy but was complicated with refractory renal dysfunction. Intern Med. 46: 1557-1564, 2007.
- 7) Takahata M, Bohgaki M, Tsukiyama T, Kondo T, Asaka M., Hatakeyama S. : Ro52 functionally interacts with IgG1 and regulates its quality control via the ERAD system. Mol Immunol. 45: 2045-2054, 2008.
- 8) Hashino S, Morita L, Takahata M, Onozawa M, Nakagawa M, Kawamura T, Fujisawa F, Kahata K, Izumiyama K, Yonezumi M, Chiba K, Kondo T, Asaka M. : Administration of micafungin as prophylactic antifungal therapy in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. Int J Hematol. 87:91-97, 2008
- 9) Toubai T, Hirate D, Shono Y, Ota S, Ibata M, Mashiko S, Sugita J, Shigematsu A, Miura Y, Kato N, Umehara S, Kahata K, Tsutsumi Y, Iwao N, Toyoshima N, Tanaka J, Asaka M., Imamura M. : Chimerism and T-cell receptor repertoire analysis after unrelated cord blood transplantation with a reduced-intensity conditioning regimen following autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. Int J Lab Hematol. 30: 75-81, 2008.
- 10) Chiba K, Hashino S, Izumiyama K, Toyoshima N, Suzuki S, Kurosawa M, Asaka M. : Multiple osteolytic bone lesions with high serum levels of interleukin-6 and CCL chemokines in a patient with adult T cell leukemia. Int J Lab Hematol. in press
- 11) Toubai T, Shono Y, Nishihira J, Ibata M, Suigita J, Kato N, Ohkawara T, Tone S, Lowler KP, Ota S, Tanaka J, Asaka M., Reddy P, Imamura M. : Serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) levels after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Int J Lab Hematol. In press.
- 12) Oridate N, Takeda H, Asaka M., Nishizawa N, Mesuda Y, Mori M, Furuta Y, Fukuda S. : Acid-suppression Therapy Offers Varied Laryngopharyngeal and Esophageal Symptom Relief in Laryngopharyngeal Reflux Patients.

- 2. 学会発表
 - なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 - 1. 特許取得
 - 炎症性腸疾患の予防・治療剤
 - 国内出願番号：2003-192514(2003/7/7)
 - 国際出願番号：PCT/JP2004/09657(2004/7/7)
 - 2. 実用新案登録
 - なし
 - 3. その他
 - なし

抗菌ペプチドを用いた炎症性腸疾患の治療法開発

分担研究者 高後 裕 旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学 教授

研究要旨：抗菌ペプチドであるHuman defensinのrecombinant peptideを炎症性腸疾患の新規治療法として用いることを目的として、本年度は(1)高活性のrecombinant HD-5 (r-HD5) を効率良く発現させる系の確立、(2) r-HD5によるマウスDSS腸炎モデルの腸管障害改善効果、生命予後延長効果、(3) IL-10欠損マウスの腸炎の炎症と抗炎症効果の証明を目的として研究を行った。その結果、適切な立体構造を形成し、経口投与で消化管内においてtrypsin抵抗性の殺菌活性を有するr-HD5の作成が可能となり、マウスDSS腸炎あるいはIL-10欠損マウス腸炎での治療効果を示唆する結果が得られた。

共同研究者

前本 篤男²、田邊 裕貴^{1,2}、金野陽高¹、石川千里¹、稲場勇平¹、伊藤貴博¹、藤谷幹浩¹、蘆田 知史¹

所属：旭川医科大学 1)内科学講座 消化器血液腫瘍制御内科学分野 2)消化管再生修復医学講座

A. 研究目的

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

ヒト型の活性型 α -defensin の recombinant peptide を用いて障害された自然免疫反応を reconstitute することでクローン病の治療を行えるか否かを検討する目的として計画された。本報告書では(1)活性型ヒト α -defensin である HD-5 の recombinant peptide の作成、(2)マウス DSS 腸炎モデルにおける recombinant HD-5 の経口投与、(3) IL-10 欠損マウス腸炎における HD-5 経口投与について研究を行った結果を報告する。

B. 研究方法

(1) recombinant HD-5 (r-HD5) の作成
recombinant HD-5 は、HD-5 peptide 全長をコードした cDNA を pET32a vector に組み込み、E coli で発現させたのち、recombinant peptide を回収、その後活性分画を HPLC で精製した (Tanabe H, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2007)。

(2) マウス DDS 腸炎モデルにおける recombinant HD-5 の治療効果、生命予後延長効果

5 日間の 4% DDS 自由飲水により腸炎を発症させ、その前あるいは後に 50 μ g/body の

r-HD5 を投与し、生命予後および腸炎を組織学的に評価した。

(3) IL-10 欠損マウス腸炎モデルにおける recombinant HD-5 の治療効果

明らかな下痢、体重減少を伴う腸炎を発症した IL-10 欠損マウスに 50・g/body の r-HD5 を 3 日間投与し、投与開始後 7 日目のマウスの体重、便性状を調べた。

C. 研究結果

(1) recombinant HD-5 (r-HD5) の作成

Figure 1

HD5 ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR (32 AA.)
 1 2 3 4 5 6
 Expected total average molecular weight: 3588.2 (Da) —full folded: 3582.2

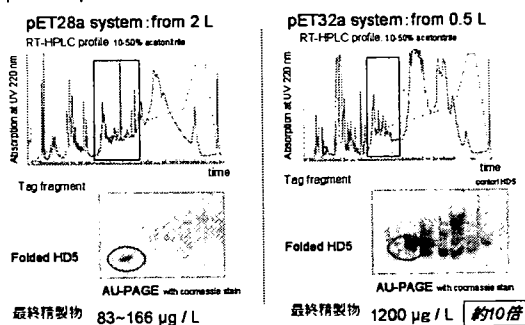


- 特徴**
- ・塩基性残基が多い。
 - ・結合形式が決まった3つのシステイン結合がある。
 - ・Methionine残基がない。
- 問題点**
- ・精製される最終収量が少ない—還元・refoldで回収 (抗原ペプチドである、inclusion bodyの存在)
 - ・最終産物のシステイン結合が正しく結合される必要性。

HD-5はfig. 1に示した一次構造を有し、3つのシステインの分子内結合によりfoldされる構造を有する32個のアミノ酸からなるペプチドである。このHD-5のrecombinant 蛋白を作成する上での問題点として、抗菌ペプチドであるため活性を有する形では細菌内での合成が困難であること、最終的には分子内架橋を再現することが活性発現に必要なことが挙げられた。

Figure 2

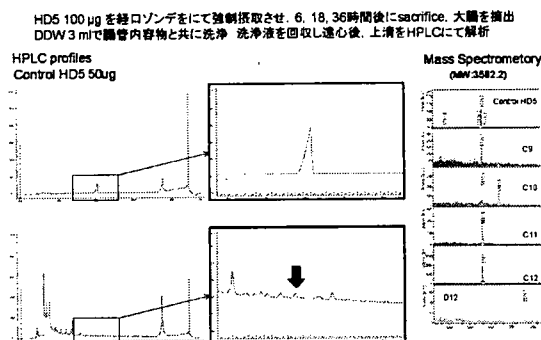
pET28とpET32 vectorによるrecombinant peptide発現の違い



前回我々はpET28a vectorを用いて

transfectionを行ったが、6LのTB buffer 培養液中から、わずかに83-166・g/Lの r-HD5しか得られなかった。そこで、今回は pET32a vectorでtransfectionしたE. coli のlysateをHPLCで精製して活性分画を抽出することでおよそ10倍量に相当する 1200・g/Lの活性型r-HD5を精製することに成功した。fig. 2に結果を示す。分子内架橋を形成したHD-5はtyrpsinによっても殺菌活性は保持され、蛋白分解酵素に対して抵抗性であることが示唆された。さらに、腸管内容物洗浄液の解析から、r-HD5がマウス大腸に到達していることが明らかとなった (fig. 3)。

Figure 3

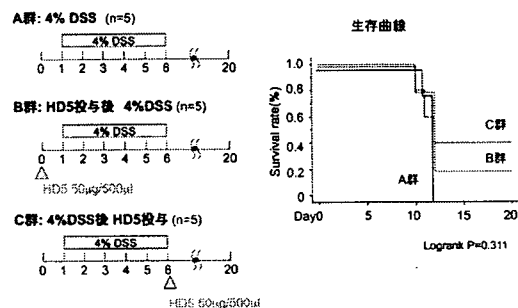


(2) マウス DDS 腸炎モデルにおける recombinant HD-5 の治療効果、生命予後延長効果

4% DDS を 5 日間自由飲水して DDS 腸炎モデルを作成し解析した (Fig. 4)。

Figure 4

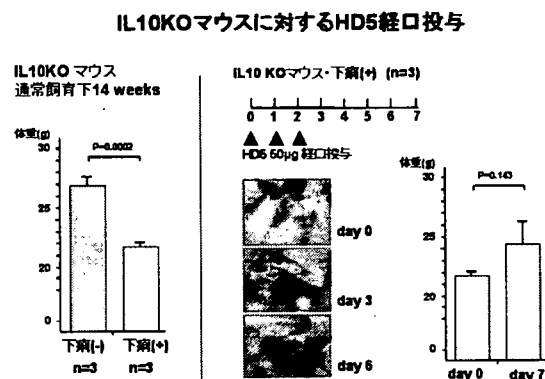
DSS腸炎におけるRecombinant HD5投与



DDS 内服前あるいは DDS 内服後に 50 $\mu\text{g}/\text{body}$ の r-HD5 を経口投与するした結果、r-HD5 内服していないコントロールが全例 day 12 以内に死亡するのに対して、r-HD5 の前投薬で 1 匹、後投薬で 2 例の生存を得られ、DDS 腸炎による死亡を妨げる例が見られた。また、少数例の検討だが、コントロールに比して r-HD5 投与により回腸および大腸の程度など組織学的炎症の改善がみられた。

(3) IL-10 欠損マウス腸炎モデルにおける recombinant HD-5 の治療効果
腸炎に対する recombinant HD-5 経口投与の効果について IL-10 欠損マウス腸炎モデルを用いて解析した (Fig. 5)。

Figure 5



明らかな下痢、体重減少を来したマウスは、50 \cdot g/bodyのr-HD5を3日間投与することで、下痢は著明に改善し、体重は有意に増加した。コントロール群の解析が不十分であるが、r-HD5の投与がIL-10欠損マウス腸炎に対して効果を発揮した可能性が考えられた。今後、種々の条件下での解析を行う予定である。

D. 考察

今回の検討の結果から、殺菌活性を有する r-HD5 は recombinant protein として作成を効率よく行う系が開発された。さらに、

分子内架橋も再構成されて trypsin 非感受性の経口投与可能な分子として得られることが明らかとなった。また、この r-HD5 は、マウスに経口投与すると、DDS 腸炎モデルおよび IL-10 欠損マウス腸炎に対する治療効果を持つ可能性が示唆された。これらの結果から、今後更に種々の条件下での r-HD5 の治療効果について解析を行う予定である。また、同様の方法による、他の α -defensin 群の recombinant peptide の作成についても解析を進めている。

E. 結論

HD5 の経口投与は、DSS 腸炎や IL-10 欠損マウス腸炎に治療効果を発揮すると考えられ、炎症性腸疾患に対する治療効果が期待される。また、HD-5 は内因性の抗菌物質であることから、有害事象の発生は最小限に止まると予想される。さらに、高効率な recombinant HD5 の精製方法を開発中であり、recombinant HD5 を用いた新しい炎症性腸疾患治療は、安価で、有効性、安全性が高い画期的な治療法となりうることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

E. 文献

1) Wehkamp J, et al. Reduced Paneth cell α -defensin is ileal Crohn's disease. PNAS 102: 18129-18134, 2005

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

プロバイオティクス由来ペプチドを用いた新規炎症性腸疾患治療の開発

分担研究者 高後 裕 旭川医科大学 消化器血液腫瘍制御内科学 教授

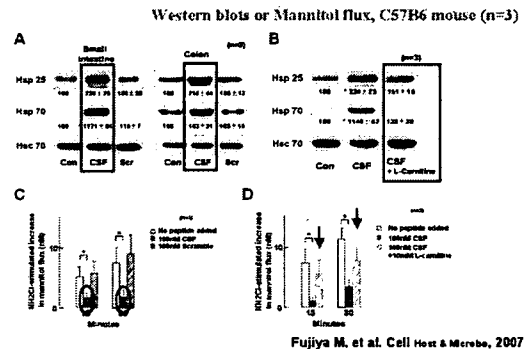
研究要旨：プロバイオティクス由来の活性ペプチドを新規治療法として用いることを目的として、本年度は(1)プロバイオティクス由来の活性ペプチドの同定、(2)活性ペプチドを用いたDSS腸炎モデルの腸管障害改善効果、生命予後延長効果の証明に関する研究を行った。その結果、*Bacillus subtilis*菌の培養上清から同定したペプチド、Competence and sporulation factor (CSF)にDSS腸炎に対する治療効果を認め、プロバイオティクス由来の活性ペプチドを用いた、新しい炎症性腸疾患治療法開発への道が開けた。

共同研究者

藤谷幹浩、岡本耕太郎、上野伸展、盛一健太郎、佐藤 龍、田邊裕貴、前本篤男、渡 二郎、高後 裕

所属：旭川医科大学 消化器血液腫瘍制御内科学

OCTN2 inhibitor, L-carnitine.



A. 研究目的

これまでの研究により、*Bacillus subtilis* 菌などのプロバイオティクスが産生するペプチドの一種に、腸管保護活性を認めることが明らかとなった(1 Fujiya M, Kohgo Y, et al. Cell Host Microbe, 2007).

また、これらのプロバイオティクス由来ペプチドのひとつである competence and sporulation factor (CSF; ERGMT, 直鎖状配列)は、細胞膜トランスポーター、Novel organic cation transporter 2 (OCTN2)によって腸管上皮細胞内に取り込まれ、その保護活性を発揮すると考えられた(Figure 1).

Figure 1

CSF protects mice intestine from oxidant stress. This effect is diminished by

この OCTN2 はクローン病患者に高感受性の機能的遺伝子多型が存在することが知られていることから、腸管炎症に対する新しい治療戦略として、CSF などのプロバイオティクス由来物質の応用が期待される。本研究は、炎症により惹起された腸管障害に対するプロバイオティクス由来ペプチド CSF の効果を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) DSS 腸炎における CSF の抗炎症効果の検討。

2% DSS を飲水中に混合し、6 日間投与した後、100nM の CSF および PBS を注腸投与した。48 時間後にマウス体重を測定後、大

腸を摘出し長さを計測した。また、直腸部の HE 染色標本を作製し、組織学的な炎症の程度を Berg らの histological score を用いて数値化し評価した。

(2) 致命的 DSS 腸炎マウスに対する CSF の延命効果の検討。

4% DSS を飲水中に混合し、10nM CSF および PBS を 48 時間毎に注腸投与し、各群における生存期間を調べた。

(3) TNF α 処理 Caco-2/bbe cells における CSF のサイトカイン、ケモカイン誘導調節の検討。

Caco-2/bbe cells を 100nM CSF, TNF α あるいはその両者にて処理し、24 時間培養した後、培養液を回収した。培養液中に放出された種々のサイトカイン、ケモカインを protein array および western blots にて検出した。

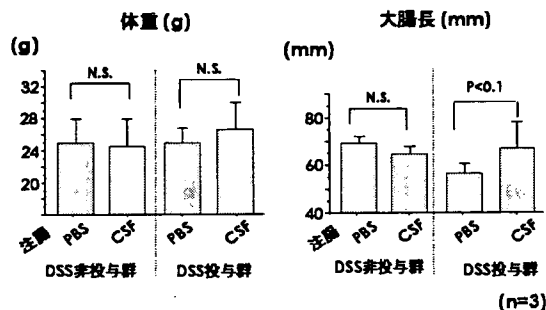
C. 研究結果

(1) DSS 腸炎における CSF の抗炎症効果の検討。

両群間で体重には変化は無かった。DSS 腸炎を起こしたマウスでは有意に腸管が短縮したが、その中でも CSF 投与群では PBS 群に比べて腸管が長い傾向にあった (Figure 2)。

Figure 2

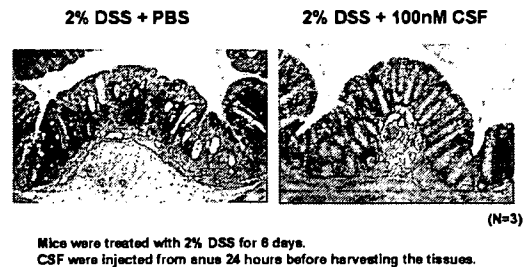
各群における体重と大腸長



組織学的には、PBS群に比べCSF群で有意に程度が軽く、CSFによる抗炎症効果が示唆された (Figure 3, 4)。

Figure 3

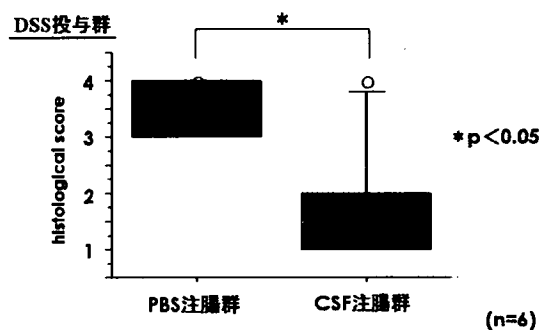
CSFはDSS腸炎マウスの腸管障害を改善する (HE staining, C57B6 mice)



Mice were treated with 2% DSS for 6 days. CSF were injected from anus 24 hours before harvesting the tissues.

Figure 4

DSS腸炎に対するCSFの効果

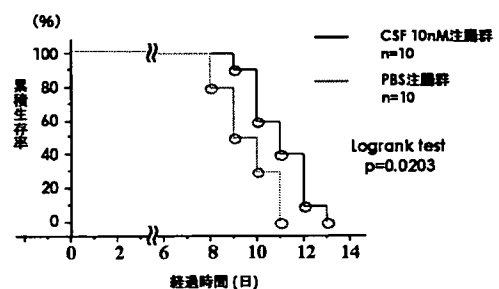


(2) 致命的DSS腸炎マウスに対するCSFの延命効果の検討。

CSF投与群では、PBS群に比べ有意に生存期間が長かった (Figure 5)。

Figure 5

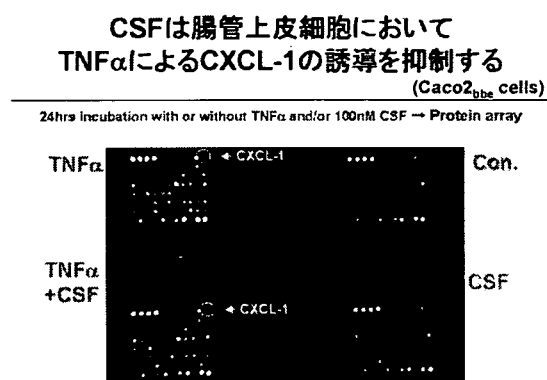
DSS colitis modelに対するCSFの生存期間延長効果



3) TNF α 処理 Caco-2/bbe cells における CSF のサイトカイン、ケモカイン誘導調節の検討。

TNF α 処理Caco-2/bbe cellsにおいて、CSF 投与群では、PBS群に比較してCXCL-1の誘導が抑制された。一方、両群でその他のサイトカインやケモカイン発現には大きな差は無かった。また、CXCL-1の発現をWestern blots検討した結果でも、同様にCSF投与群においてCXCL-1の誘導が抑制されていた (Figure 6)。

Figure 6



以上から、CSFには白血球遊走因子であるCXCL-1の発現を抑えることで、抗炎症活性を発揮する可能性が示唆された。

D. 考察

今回の検討の結果から、Bacillus subtilis 菌由来ペプチドCSFは、炎症による腸管障害に対して治療効果を有することが示唆された。我々は、これまでの検討から、CSFの作用が、クローン病高感受性の遺伝子多型を有する上皮細胞膜トランスポーターOCTN2によって仲介されることを明らかにしており、CSFの抗炎症作用は炎症性腸疾患の新しい治療法となる可能性が示唆された。さらに、投与経路や時期の適正化、他の炎症モデルにおける効果を検討し、

臨床応用へと結び付けたい。

また、その他のプロバオオティクスが産生する活性ペプチドについても探索しており、すでにいくつかの候補を同定している。今後、それらのペプチドについても、ヒト腸管上皮細胞における生理作用を明らかにし、炎症性腸疾患治療への応用を試みていく。

E. 結論

CSFの注腸投与は、DSS腸炎に治療効果を発揮すると考えられ、炎症性腸疾患に対する治療効果が期待される。また、CSFは腸内常在菌であるBacillus subtilis菌から分泌されるペプチドであることから、有害事象の発生は最小限に止まると予想される。また、CSFは5つのアミノ酸が直鎖状に並んだ極めて安定な構造を呈しており、安価に作成でき、容易に保存できるものと推測される。CSFを用いた炎症性腸疾患治療は、安価で、有効性、安全性が高い画期的な治療法となりうることを示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 文献

- 1) Fujiya M, Kohgo Y, et al. Cell Host Microbe, 2007.
- 2) Peltekova VD, et al. Nature Genetics, 2004.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

a) 国内特許

・特願 2008-012009 「消化器癌に対する抗腫瘍剤」(出願中)

b) 国際特許

• Small bacteria-derived signaling molecules that mediate intestinal mucosal homeostasis. (出願準備中)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費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
分担研究報告書

ヒト組み換えチオレドキシンをを用いた炎症性腸疾患に対する新しい治療の検討

主任研究者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座（消化器肝臓内科） 教授

研究要旨：難治性炎症性腸疾患（IBD）活動期の腸管粘膜では酸化ストレスの増加が報告されており病態の発生・進展への関与が想定されている。活動期潰瘍性大腸炎・クローン病・虚血性腸炎患者血清中では有意にチオレドキシシン（TRX）値が高値であること、さらにクローン病では血中 MIF 値と相関することを示した。今回我々は TRX の治療への有用性につき動物実験とドラッグデリバリーシステムの開発を行った。TRX 過剰発現マウスおよびリコンビナントヒト TRX (rhTRX)を用いて dextran sulfate sodium (DSS)投与による急性腸炎モデルにおける TRX の腸炎抑制効果を検討したところ、いずれの系でも野生型マウスに比して有意に腸炎が抑制された。TRX 過剰発現マウスを用いた DSS 腸炎モデルにおける大腸組織中の TNF- α 、IFN- γ 及び MIF 濃度はいずれも有意に低下していた。特に MIF 濃度は腸炎誘発前でも有意に低下していたため、TRX の過剰発現が MIF 産生低下に関与している可能性が示唆された。さらに腸炎における内因性 TRX の役割を検討するため抗マウス TRX 抗体を作成し野生型マウスを用いた DSS 腸炎モデルに投与したところ、有意に腸炎は増悪し血清 MIF 値は有意に増加していた。また、慢性腸炎における TRX の腸炎抑制効果を検討するため 9-10 週齢の IL-10 ノックアウトマウスに rhTRX を 14 日間連日腹腔内投与したところ、有意に腸炎は改善した。臨床応用を目的としたゼラチンマイクロスフェアによる TRX の徐放製剤を開発した。

共同研究者

関西医科大学内科学第三講座：内田一茂、
深田憲将、安藤祐吾、松下光伸
京都大学消化器内科：玉置敬之、西尾彰功、
仲瀬裕志、千葉 勉
京都大学再生医科学研究所：田畑泰彦
京都大学ウイルス研究所：淀井淳二

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎は原因不明の難治性炎症性腸疾患（IBD）である。局所に浸潤した炎症細胞によって産生される Reactive oxygen species (ROS)及び ROS によって引き起こされる酸化ストレスは直接的な組織障害を引き起こすことが知られて

いるが、IBD 活動期の腸管粘膜ではこれらの増加が報告されておりその病態の発生・進展への関与が想定されている。

Thioredoxin (TRX)は淀井らにより成人 T 細胞白血病由来因子としてクローニングされた、Cys-Gly-Pro-Cys 配列によるチオール・ジスルフィド反応を介した酸化還元反応制御能を持つ多機能分子である¹⁾。その機能は多岐にわたり、reactive oxygen species (ROS)の還元・産生抑制に加え NF- κ B や Ref1 などの転写因子活性化¹⁾や ASK-1 の不活性化による MAPK へのシグナル伝達の抑制などを介したアポトーシスの抑制が報告されている²⁾。また air pouch model を用いた検討では炎症局所への好中球浸潤を抑制することが報告されており³⁾、

TRX は抗酸化ストレス、抗アポトーシス、及び抗炎症作用を有し生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている。実験動物モデルでは、トランスジェニック (TG) マウスにおけるインフルエンザウイルス感染に対する抵抗性の増強や⁴⁾ アドリアマイシン心筋障害の軽減⁵⁾ など生体防御能の増強に関する報告が数多くなされているが、消化管炎症における検討は行われていない。そこで我々は UC および CD 患者血清中 TRX 濃度について検討したところ、コントロール群に比して有意に高値を示し、血清 TRX 値は活動度に相関していることを見いだした。

今回 TRX transgenic (TRX-TG) マウスおよびリコンビナントヒト TRX (rhTRX) を用いて dextran sulfate sodium (DSS) 投与による急性腸炎モデルにおける TRX の腸炎抑制効果を検討するとともに、治療応用へ向けてドラッグデリバリーシステムを持った製剤開発を試みた。

B. 研究方法

(1) TRX-TG マウスにおける DSS 腸炎改善効果の検討

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

(2) rhTRX 投与の DSS 腸炎改善効果の検討

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

した。

(3) 腸炎の総合評価

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

(4) 大腸組織における TNF- α , IFN- γ , MIF 産生

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

(5) rhTRX の MIF 産生抑制効果の検討

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

(6) ドラッグデリバリーを持った TRX 製剤の作成

ゼラチンマイクロスフェアに TRX を吸収させ、PBS にて徐放実験を行い 1、2、3、6、12、24、48 時間後に徐放された TRX を ELISA 法を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物実験倫理委員会の承認を得て、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減

を行うよう配慮している。

C. 研究結果

1) DSS 腸炎 TRX-TG マウスを用いた検討

DSS 投与開始後 6 日目・7 日目の体重減少は TG-DSS 群で DSS 群に比して有意に軽度であった (図 1)。大腸の全長は TG-DSS 群で DSS 群に比して有意に長く、Bloody stool score は有意に低値であった (図 2)。組織学的検討では DSS 群で遠位大腸を中心に炎症細胞浸潤、クリプトの損傷、びらん・潰瘍形成を認めたが TG-DSS 群ではこれらは軽減しており、Histological score は TRX-TG 群で有意に低値であった (図 3)。大腸組織における TNF- α ・IFN- γ ・MIF 産生はいずれも TG-DSS 群では DSS 群に比して有意に減少していた。DSS 未投与の TRX-TG マウス群ではコントロール群に比して有意に MIF 産生が低下していた。

2) ヒト組み換え rhTRX の治療効果

DSS 投与開始後 6 日目～10 日目の体重減少は vehicle 群に比して TRX 群で有意に軽度であった (図 4)。大腸の全長は vehicle 群に比して TRX 群で有意に長かった。組織学的変化は vehicle 群に比して TRX 群で軽度であり、histological score も有意に低値であった (図 5)。また、THP-1 細胞からの MIF 産生は rhTRX によって濃度依存性に抑制された。

3) TRX 徐放製剤の開発

ゼラチンマイクロスフェアを用いた TRX 製剤の徐放実験では、経時的に徐放されることが確認された (図 6)。

D. 考察

DSS 腸炎は TRX の過剰発現及び rhTRX 投与によって有意に抑制され、TRX は消化管

炎症に関与していることが強く示唆された。TRX は様々なストレスで誘導され、酸化・還元反応を制御することにより生体のホメオスターシスを維持することが知られているが、消化管炎症などの炎症性疾患では ROS 産生や酸化ストレスの増加を介して酸化・還元バランスの不均衡が起こり TRX 産生を増加させると考えられる。従って IBD における血清 TRX 産生の増加は一種の生体防御反応と考えられるが、量的に不十分であるため炎症の抑制に至らないと推測される。

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

チオレドキシンの活性は生体内では短時間しか保たないため、経口、もしくは経直腸での投与では治療効果を期待することは難しい。ヒトへの応用を考え今回我々はゼラチンマイクロスフェアを持ったドラッグデリバリーシステムを開発した。徐放実験では 3 時間後に約 70% の TRX が徐放されており、今後生体内での治療効果について検討する予定である。

E. 結論

1) 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 、インターフェロンの産生低下を認めた。

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