

3) ドラッグデリバリーシステムを用いてゼラチンマイクロスフェアに封入した Recombinant human チオレドキシンを作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 参考文献

- 1) Tagaya Y, et al.:ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *Embo J* 8:757-764, 1989
- 2) Powis G, et al.:Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:421-455, 2001
- 3) Nakamura H, et al.:Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15143-15148, 2001
- 4) Nakamura H, et al.:Enhanced resistancy of thioredoxin-transgenic mice against influenza virus-induced pneumonia. *Immunol Lett* 82:165-170, 2002
- 5) Shioji K, et al.:Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 106:1403-1409, 2002
- 6) Jeffers M, et al.:A novel human fibroblast growth factor treats experimental intestinal inflammation. *Gastroenterology* 123:1151-1162, 2002
- 7) Williams KL, et al.:Enhanced survival

and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology* 120:925-937, 2001

- 8) Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T. Human thioredoxin-1 ameliorates experimental murine colitis in association with suppressed macrophage inhibitory factor production. *Gastroenterology*. 2006;131(4):1110-21.

H. 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

I. 研究成果の発表

1. Kiriya K, Watanabe N, Nishio A, Okazaki K, Kido M, Saga K, Tanaka J, Akamatsu T, Ohashi S, Asada M, Fukui T, Chiba T. Essential role of Peyer's patches in the development of Helicobacter-induced gastritis. *Int Immunol*. 2007;19(4):435-46
2. Fukui T, Nishio A, Okazaki K, Kasahara K, Saga K, Tanaka J, Uza N, Ueno S, Kido M, Ohashi S, Asada M, Nakase H, Watanabe N, Chiba T. Cross-primed CD8+ cytotoxic T cells induce severe Helicobacter-associated gastritis in the absence of CD4+ T cells. *Helicobacter*. 2007 ;12(5):486-97.

図 1. DDS 腸炎 TRX-TG マウスの体重変化

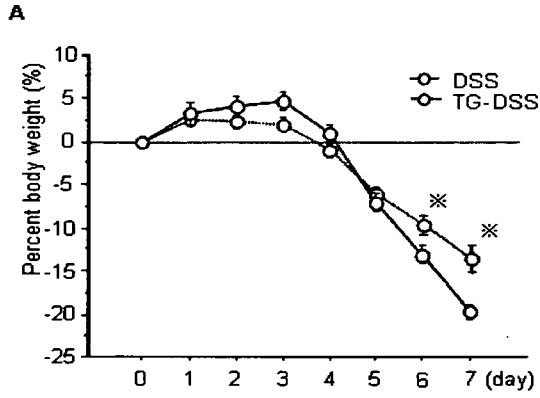


図 2. DDS 腸炎 TRX-TG マウスの大腸全長変化

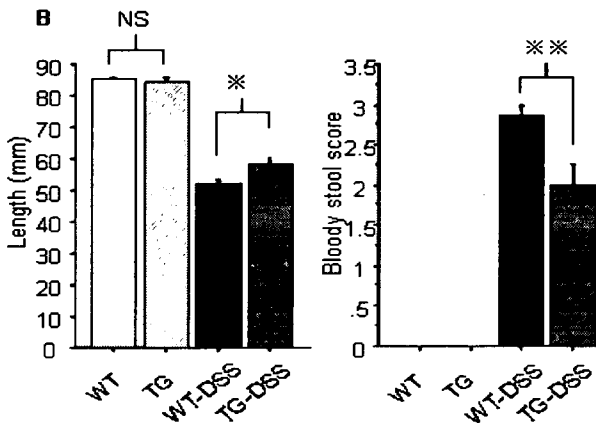


図 3. DDS 腸炎 TRX-TG マウスの病理スコア

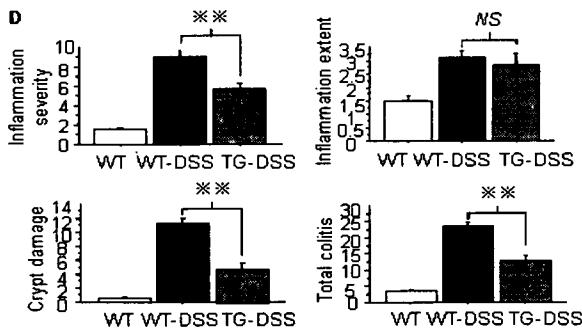


図 4. DDS 腸炎マウスの体重に対する r TRX 投与効果

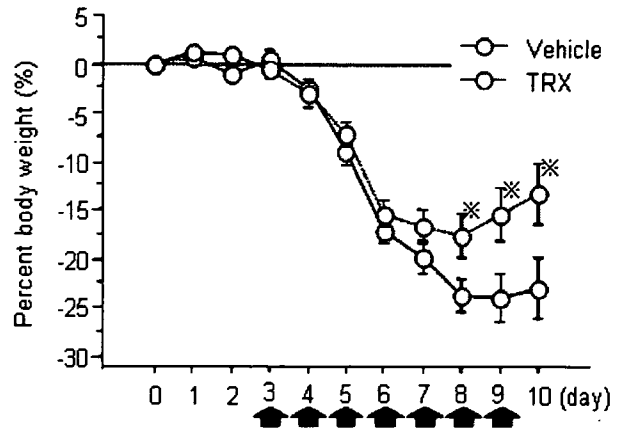


図 5. DDS 腸炎マウスの病理組織スコアに対する TRX 投与効果

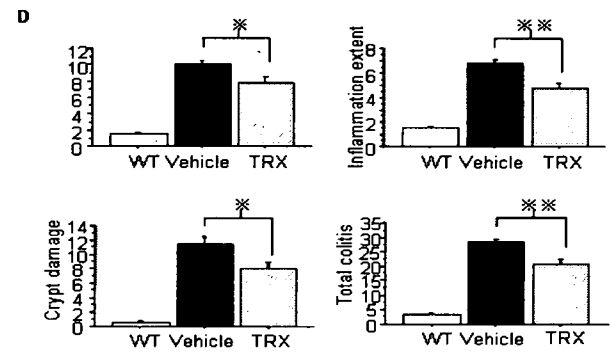
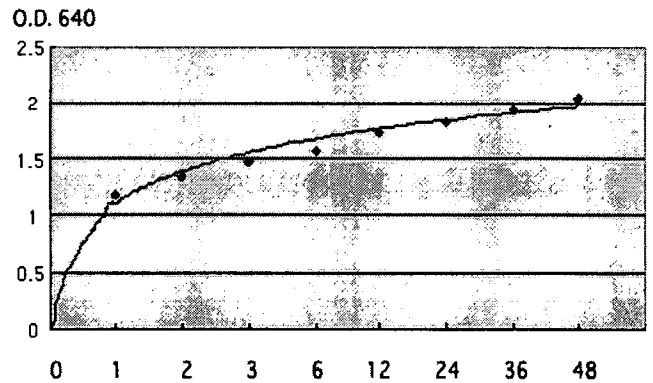


図 6. マイクロスフェア含有 TRX の徐放実験



潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・制御性 T 細胞分離移入療法の開発

分担研究者 中村和彦 九州大学大学院医学研究院病態制御内科学 助教

研究要旨：潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法において、大腸炎を誘導するエフェクター細胞に加えて、大腸炎を抑制・制御する制御性細胞も同時に除去されていると考えられる。そこで我々は血球成分除去療法産物より CD4⁺CD25^{high} 制御性 T 細胞 (Treg) を分離し患者へ輸注する新しいコンセプトの治療法「血球成分除去・Treg 分離移入療法」を考案し、その施行に必要な Treg の無菌的大量分離を、Miltenyi Biotec 社 CliniMACS 細胞分離システムを用いて検討した。更に、*in vitro* で Treg の培養増殖、誘導が可能かどうか検討した。

血球成分除去療法産物より CliniMACS CD8 Reagent、CliniMACS CD19 Reagent を用いて CD8⁺ T 細胞、B 細胞を除去した。その後 CliniMACS CD25 Reagent を用いて Treg 分画を分離した。CD8⁺ T 細胞、B 細胞は、ほぼ完全に除去された。CD4⁺CD25^{high} T 細胞の割合は、分離前 1.96% から分離後 56.6% と上昇し、回収率も良好であった。Treg 分画は Treg 特異的転写因子 FOXP3 を高度に発現しており、T 細胞増殖抑制能を示した。

CliniMACS で分離された Treg 分画と、対照として CD4⁺CD25⁻ T 細胞を IL-2 存在下、または IL-2+TGF-β1 存在下に刺激培養し、各群共に良好な増殖率を示した。Treg 分画は培養後も FOXP3 発現を維持し、T 細胞増殖抑制能を保持していた。CD4⁺CD25⁻ T 細胞は IL-2 存在下での培養後は Treg の性質を有していなかったが、IL-2+TGF-β1 存在下で FOXP3 発現が誘導され、T 細胞増殖抑制能を示した。

血球成分除去療法産物より CliniMACS を用いて Treg を無菌的に大量に機能を保持した状態で分離可能であった。分離に用いた CliniMACS 製品は全て CE 認証されており、「血球成分除去・Treg 分離移入療法」の臨床試験施行の環境が整ったと考えられる。また、CliniMACS 分離 Treg は *in vitro* で機能を保持した状態で培養増殖が可能であり、更に non-Treg からの Treg 誘導も可能であった。培養 Treg 移入の安全性が確立されれば、将来的には培養 Treg 大量移入療法が施行可能である事が示唆された。

共同研究者

高柳涼一、秋穂裕唯

九州大学大学院医学研究院 病態制御
内科学

豊嶋崇徳、赤司浩一

九州大学病院 遺伝子・細胞療法部

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎は慢性持続性に大腸炎を起こす難病である。若年者に好発し、多くは再燃・緩解を繰り返す。ステロイドを主とした薬物療法が行われるが、ステロイド抵抗性・依存性の難治例も多く、また、内科的治療が奏効せずに大腸全摘術が必要となる症例も少なくないため、より有効な新規治療法の開発が強く望まれている。

血球成分除去療法はわが国で開発された治療法であり、中等度以上の活動期潰瘍性大腸炎に対して単独またはステロイドとの併用で効果が期待できる。薬物療法に比べて長期的な副作用が少ない利点があるが、有効率は60~70%程度で無効例も多い。また、寛解導入後に多くの症例で再燃を来す。血球成分除去療法の作用機序は、十分に解明されていないが、白血球中には大腸炎を誘導する colitogenic な細胞に加えて、大腸炎を抑制・制御する制御性細胞も存在し、既存の血球成分除去療法では両者とも同様に除去されている事が、効果を限定的にしている一因かも知れない。制御性細胞の中でも CD4⁺CD25^{high} 制御性 T 細胞 (Treg) は広範な免疫反応を抑制・制御する事で知られ、炎症性腸疾患動物モデルで腸炎を著明に抑制する事から炎症性腸疾患治療への応用が期待される。我々は、活動期潰瘍性大腸炎では末梢血中の Treg の割合が低下している事を報告した¹。Treg の不足が大腸炎の増悪に関連している可能性が示唆される。潰瘍性大腸炎患者では Treg の機能は保たれていると考えられるので^{2, 3}、Treg 移入療法が潰瘍性大腸炎の治療法として有用である事が示唆される。我々は Treg 移入療法を既存の血球成分除去療法と組み合わせて行う事より更に有効性を高められるのではないかと考え、血球成分除去療法産物より Treg を分離し患者へ輸注する「血球成分除去・Treg 分離移入療法」を考案した。血球成分除去療法産物より無菌的・大量に Treg が分離可能であれば、本治療法は施行可能である。よって、我々は、臨床応用可能なグレードでの Treg 分離法に関して検討した。また、大腸炎を抑制するためにどれだけの Treg を移入する必要があるか、現

時点では不明である。Treg の *in vitro* で培養増殖、誘導が可能であれば、より大量の Treg 移入が可能となる事が期待される。そこで、我々は Treg が *in vitro* で培養増殖、または誘導可能であるかどうか検討した。

B. 研究方法

Miltenyi Biotec 社の臨床応用を目的とした磁気ビーズ細胞分離システム ClinMACS を用いて Treg 分離を行った。潰瘍性大腸炎患者に対して遠心分離法による血球成分除去療法を Hemonetics 社成分採血装置 CCS を用いて行った。分離された白血球より ClinMACS CD8 Reagent (CD8 に対する磁気ビーズ) と ClinMACS CD19 Reagent (CD19 に対する磁気ビーズ) を反応させ、ビーズの付着していない細胞を ClinMACS Instrument を用いて回収した。次に、回収した細胞に ClinMACS CD25 Reagent (CD25 に対する磁気ビーズ) を反応させ、ビーズの付着した細胞を回収し、Treg 分画を得た。全ての細胞分離工程は閉鎖回路内で無菌的に行われた。

分離前後の細胞における CD8⁺ T 細胞、B 細胞、CD4⁺CD25^{high} T 細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。また、Treg 特異的転写因子 FOXP3 発現細胞の CD4⁺ T 細胞における割合を、細胞内染色を行いフローサイトメトリーで解析した。

分離した Treg 分画の免疫制御機能を解析した。通常の CD4⁺ T 細胞、分離した Treg 分画および両者を抗 CD3 抗体とマイトマイシン処理した APC で刺激し、細胞増殖の程度を ³H サイミジンの取り込みで解析した。

分離した Treg 分画および対照として CD4⁺CD25⁻ T 細胞 (non-Treg) を抗 CD3 抗体・

抗 CD28 抗体付着ビーズを用いて IL-2 存在下、または IL-2+TGF- β 1 存在下に 10 日間刺激培養し、細胞数をカウントした。14 日間の resting 後に培養細胞における FOXP3 発現細胞の割合、培養細胞の免疫制御機能を前述の方法で解析した。

(倫理面への配慮)

血球成分除去療法産物からの Treg 分離実験に関して平成 17 年 3 月 31 日九州大学医学研究院等倫理委員会の承認を受けた。研究に参加した全ての患者に研究内容を同意説明文書を用いて説明し、患者の自由意志により文書による同意を得た。本研究では患者検体を研究に用いたが、通常であれば廃棄される白血球より細胞を分離し解析したもので、研究への参加により治療方針が変更されたり、治療による危険性が増す事はなく、倫理的に問題は無いと判断した。

C. 研究結果

計 5 回の CliniMACS による Treg 分離実験を行った。CD8⁺ T 細胞と CD20⁺ B 細胞は、分離前、それぞれ 9.9% (7.1~12.3%) と 9.2% (2.9~14.5%) 含まれていたが、分離後にはそれぞれ 0.0029% (0~0.0081%) と 0.022% (0~0.053%) とほぼ完全に除去された。分離前、CD4⁺CD25^{high} T 細胞の割合は 1.96% (1.0~3.3%) であったが、分離後には 56.6% (39.2~74.1%) と高い割合に濃縮された。回収率は、67.8% (48.8~87.4%) であり、平均 6.0×10^7 個の CD4⁺CD25^{high} T 細胞が一回の血球成分除去産物より分離された。CD4⁺ T 細胞中の FOXP3⁺細胞の割合は分離前 5.5% (0.4~10.4%) であり、分離後は 56.4% (51.3~66.6%) であった。分離された Treg 分画の抗 CD3 抗体+APC 刺激による細胞増殖は、通常の CD4⁺ T 細胞の 17.7%と低下しており、

CD4⁺ T 細胞と Treg 分画の共培養により細胞増殖は有意に抑制された。

*in vitro*での培養実験では、Treg 分画と CD4⁺CD25⁻ T 細胞共に、10 日間で 12~20 倍程度の良好な増殖率を示した。Treg 分画は IL-2 存在下に刺激培養後、53.3%の細胞が CD25⁺FOXP3⁺であり、培養前の FOXP3 発現レベルが維持された。Treg 分画を IL-2+TGF- β 1 存在下で培養後、73.3%の細胞が CD25⁺FOXP3⁺であった。CD4⁺CD25⁻ T 細胞は IL-2 存在下の培養では 11.9%が CD25⁺FOXP3⁺であったが、IL-2+TGF- β 1 存在下では 59.0%と CD25⁺FOXP3⁺細胞の割合が増加した。IL-2 存在下および IL-2+TGF- β 1 存在下に培養された Treg 分画は共に抗 CD3 抗体+APC 刺激に対して低応答であり、共培養にて CD4⁺ T 細胞の増殖を抑制した。IL-2 存在下に培養した CD4⁺CD25⁻ T 細胞は、刺激に反応して通常の CD4⁺ T 細胞と同程度の増殖を示し、共培養にて CD4⁺ T 細胞増殖を抑制しなかったが、IL-2+TGF- β 1 存在下に培養したものは、同刺激に低応答であり、共培養で CD4⁺ T 細胞増殖を抑制した。

D. 考察

CliniMACS を用いた細胞分離により CD4⁺CD25^{high} T 細胞が高い割合で大量に分離可能であった。分離された細胞は Treg 特異的マーカーである FOXP3 を発現しており、また、T 細胞増殖抑制能を有していた。回収率も高い値であった。CliniMACS を用いて血球成分除去療法産物より Treg を無菌的に大量に機能を保持した状態で分離可能であり、「血球成分除去・Treg 分離移入療法」が施行可能であると考えられた。

最近、CliniMACS CD25 Reagent が CE 認証され、今回の分離実験に使用した全ての

CliniMACS 試薬、装置、回路等が CE を取得済みである。また、ドイツで造血幹細胞移植後の患者に CliniMACS で分離されたドナー Treg を輸注する臨床試験が進行中であり、大きな副作用は見られていない様である⁴。以上より潰瘍性大腸炎患者に対して「血球成分除去・Treg 分離移入療法」の臨床試験を行う環境が整ったと考えられ、第 1 相臨床試験プロトコールを九州大学医学研究院等倫理委員会に審査を申請し、平成 20 年度に施行する予定である。

CliniMACS で分離した Treg 分画は IL-2 存在下の刺激培養で、良好な増殖率を示し、また、FOXP3 発現、免疫制御機能も維持された。IL-2+TGF- β 1 存在下の培養では、FOXP3 の発現率は更に上昇し、免疫制御機能も認められた。以上より CliniMACS 分離 Treg は *in vitro* で機能を保持した状態で培養増殖可能であった。腸管には多数の免疫担当細胞が存在する。大腸炎を抑制するためにどれだけの Treg を移入する必要があるか現時点では不明であり、培養細胞移入の安全性が確立されれば、より大量の培養 Treg 移入が可能である事が示された。米国では造血幹細胞移植時に *in vitro* で培養増殖したドナー Treg を輸注する臨床試験が予定されたおり⁴、今後、培養 Treg 移入に関する有用な情報もたらされる事を期待したい。また、CD4⁺CD25⁻ T 細胞を IL-2+TGF- β 1 存在下に刺激培養する事により、FOXP3 発現と免疫制御能が誘導され、*in vitro* で Treg が誘導されたものと考えられた。誘導された Treg と自然発生した Treg が同一のものがどうかは、より詳細な検討が必要であるが、将来的には誘導 Treg を用いた治療が施行できる可能性も示唆された。

E. 結論

血球成分除去療法産物より Treg を臨床応用可能なグレードで分離可能であり、「潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・Treg 分離移入療法」の臨床試験施行の環境が整った。また、培養細胞移入の安全性が確立されれば、培養 Treg の大量移入療法が可能であると考えられた。

F. 文献

1. Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H: An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2006, 51: 677-686.
2. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R: Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25^{high} T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005, 128: 1868-1878.
3. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M: CD4⁺CD25^{high} T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *Journal of Immunology* 2004, 173 (5): 3119-3120.
4. Roncarolo MG, Battaglia M: Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nature Reviews. Immunology* 2007, 7: 585-598.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

・ Sun X, Somada S, Shibata K, Muta H, Yamada H, Yoshihara H, Honda K, Nakamura K, Takayanagi R, Tani K, Podack ER, Yoshikai Y: A critical role of CD30 ligand/CD30 in controlling inflammatory bowel diseases in mice. Gastroenterology 2008, 134: 447-458.

・ Yoshinaga M, Murao H, Kitamura Y, Koga K, Tsuruta S, Igarashi H, Nakamura K, Takayanagi R: The 15-lipoxygenase-1 expression may enhance the sensitivity to NSAID-induced apoptosis in CRCs from patients who are treated with the compounds.

Journal of Gastroenterology and Hepatology 2007, 22: 2324-2329.

2. 学会発表

隅田頼信, 中村和彦, 金山兼司, 荻野治栄, 村尾寛之, 樋口奈緒美, 多喜研太郎, 板場壮一, 秋穂裕唯, 高柳涼一. 潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去制御性 T 細胞分離・移入療法の開発: 無菌的細胞分離法の確立. 第 49 回日本消化器病学会大会. 神戸. 2007 年 10 月 18 日~10 月 21 日.

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

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

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

分担研究者 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：

目的：比較的安かつ大量に採取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞（Adipose tissue Derived-Stem Cells, 以下 ADSC）を用いて、粘膜下局所注入法により腸粘膜再生に利用可能であるかどうか検討した。

研究方法：（1）ラット皮下脂肪より ADSCs を分離し、骨、神経、脂肪、上皮へとそれぞれ分化誘導培地を用いて分化誘導を行い、多分化能を調べた。（2）クローン病の動物モデルとして確立された TNBS (2, 4, 6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid) 大腸炎モデルに ADSCs を大腸粘膜下に局所注入し、腸粘膜への再生分化の可能性を検討した。

成績：ADSCs は多系統の成熟細胞へと分化した。ADSCs から大量の HGF, VEGF および adiponectin の産生が認められ、その作用により創傷治癒を促進させることが示唆された。In Vivo で ADSCs は腸粘膜の再生を促進し、一部は線維芽細胞や平滑筋細胞、脂肪細胞へと分化したことが確認された。

結論：比較的安かつ大量に採取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞は、粘膜下局所注入法により腸粘膜再生に利用可能なことが示された。

共同研究者

安藤 祐吾 1)2)、稲葉 宗夫 2)3)4)、
坂口 雄沢 1)2)、内田 一茂 1)、
松下 光伸 1)、池原 進 2)3)4)

所属 1) 関西医科大学 内科学第三講座

2) 関西医科大学 第一病理

3) 関西医科大学再生医学難病治療センター

4) 関西医科大学 癌治療センター

A. 研究目的

炎症性腸疾患難治例では高度の腸管粘膜欠損がみられ、粘膜再生障害が病態の遷延化に関与している可能性がある。近年、脂肪組織中にさまざまな組織へと分化する可能性を持った脂肪組織由来幹細胞（以下 ADSCs）が、幹細胞のソースとして注目され

ている。ADSCs は細胞表面マーカーおよび細胞増殖能、多分化能など、骨髄間葉系幹細胞と非常に類似した性質を持っており、現在、骨再生や血管再生などの臨床研究も進められている。本研究においては皮下脂肪組織由来幹細胞を用いて、腸管粘膜再生に利用可能な腸炎モデル動物を使って検討した。比較的安かつ大量に採取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞（Adipose tissue Derived-Stem Cells, 以下 ADSC）を用いて、粘膜下局所注入法により腸粘膜再生に利用可能であるかどうか、腸炎モデル動物を使って検討した。

B. 研究方法

ラット皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼにて ADSCs を分離し、5%FBS 添加 IMDM

にて1ヶ月培養の後、骨、神経、脂肪、上皮へとそれぞれ分化誘導培地を用いて分化誘導を行い、多分化能を調べた。また、培養液中の HGF, VEGF, TGF- β , adiponectin や、炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-8)を ELISA 法にて測定し、粘膜再生および炎症性細胞への関与を検討した。さらに、クローン病の動物モデルとして確立された TNBS(2, 4, 6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid)大腸炎モデルを作成し、ADSCs を大腸粘膜下に局所注入し、腸粘膜への再生分化の可能性を検討した。

C. 研究結果

今回行った実験により、ADSCs は多系統の成熟細胞へと分化する可能性が示された。また、ADSCs から大量の HGF, VEGF および adiponectin の産生が認められ、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た。さらに、In Vivo の実験において、ADSCs は傷害をうけた腸粘膜の再生を促進する働きが観察され、腸管局所に注入された ADSCs は腸管全層に分布し、一部は線維芽細胞や平滑筋細胞、脂肪細胞へと分化したことが確認された。ただし、腸管上皮や血管内皮細胞、神経細胞への分化は確認されなかった。

D. 考察

今回、我々がラットの皮下脂肪組織から分離培養した ADSCs は、FACS analysis により CD90+CD45- の細胞群で、これらの細胞群は骨髄由来間葉系幹細胞の細胞表面マーカーと類似しており、また、多系統の細胞へと分化する多分化能を有し、骨髄由来間葉系幹細胞と非常に類似した細胞群であることを明らかにした。また、ADSCs は大量

の HGF や VEGF などの growth factor や adiponectin を分泌しており、これらの growth factor の働きである抗アポトーシス作用、上皮細胞増殖促進作用、血管新生促進作用により傷害粘膜の再生を促進したと考えられる。さらに、HGF や adiponectin の抗炎症作用により、組織中の IL-8 の分泌が抑制され、それにより、好中球の腸管局所への浸潤が抑制された結果として組織中 MPO 活性が抑制された可能性も考えられる。さらに、in vivo の実験では ADSCs による腸管粘膜再生促進作用が確認され、腸管局所に注入された ADSCs の一部は腸管支持組織へと分化したことが確認された。ただし、in vitro では神経や腸上皮への分化は確認されず、腸管局所への注入前に何らかの分化誘導を行う必要性が考えられた。

今回、我々が行った実験で注目すべき点は、ヒトにおける脂肪組織採取は形成外科領域では比較的安全で確立された手技であり、骨髄幹細胞と比べて一度に大量の ADSCs を採取できることである。骨髄間葉系幹細胞は一度の骨髄採取で獲得できる細胞数が限られており、実際に臨床応用するにあたっては、数週間培養する必要がある。しかし、ADSCs は一度に大量の細胞数を準備できることから、cell-based medicine として最適な細胞源と考えられた。今後の臨床応用に向けて、現在 ADSCs の腫瘍化の有無を確認している。

E. 結論

比較的安かつ大量に採取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞は、粘膜下局所注入法により腸粘膜再生に利用可能なことが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 参考文献

1) A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation.

Dis Colon Rectum. 2005 Jul;48(7):1416-23

2) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.

Mol Biol Cell. 2002 Dec;13(12):4279-95.

3) Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005

Dec;25(12):2542-7. Epub 2005 Oct 13.

4) Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. J Atheroscler Thromb. 2006

Apr;13(2):77-81.

H. 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

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

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

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：潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は増加の一途にあり、消化管粘膜の免疫異常が病態に深く関わっている。治療として、ステロイド剤や免疫抑制剤などの有効性が認められているが、長期投与を余儀なくされ、副作用が大きな問題となっている。我々が開発したステロイド封入マイクロカプセル（DxMC）は、消化管の炎症部位により多く取り込まれ、炎症部位からステロイドを徐々に放出し、炎症を効率的に抑制すると考えられている。その結果、炎症腸管のみに作用し、全身に与える影響は少ないと考えられる。本研究では、実際に難治性潰瘍性大腸炎患者に DxMC を投与し、その有効性と安全性を確認したいと考え、この臨床試験に参加する患者を登録中である。現在、ステロイド抵抗患者 1 例とステロイド依存患者 3 例の合計 4 例が登録されている。DxMC の効果は、ステロイド抵抗患者で効果が乏しかった。ステロイド依存患者の 1 例で有効、2 例で効果不明（ステロイド減量のリバウンド、サイトメガロウイルス感染）であった。明らかな副作用はなかった。DxMC は、ステロイド依存患者に良い適用と考えられた。今後も症例を蓄積し、DxMC の有効性と安全性を確認したいと考えている。また、従来の投与方法と比較し、DxMC の投与により、副作用軽減や患者の QOL 改善のみならず、医療資本の削減に寄与できる可能性がある。

共同研究者

松下光伸¹⁾ 深田憲将¹⁾ 内田一茂¹⁾ 川股聖二¹⁾
安藤祐吾¹⁾ 大宮美香¹⁾ 藤井壽仁¹⁾ 大植謙一²⁾
廣田育彦²⁾ 田畑泰彦³⁾ 仲瀬裕志⁴⁾ 千葉 勉⁴⁾

所属

関西医科大学内科学第三講座¹⁾
関西医科大学薬剤部²⁾
京都大学再生医科学研究所³⁾
京都大学大学院医学研究科消化器内科学⁴⁾

能となり、腸管切除の回避、しいては炎症性腸疾患患者の QOL 向上につながると考えられる。

我々は高分子バイオマテリアルの一種であるポリ-L-D 乳酸マイクロカプセルを用いたステロイド封入マイクロカプセルを作成し、経口投与による有効性と安全性をマウス腸炎モデルとラットの長期毒性実験を用いて確認している。本研究では実際に、難治性潰瘍性大腸炎患者にステロイド封入マイクロカプセルを投与し、本剤の有効性と安全性について研究する。

A. 研究目的

近年、難病である潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は増加の一途にある。その病因は不明であるものの、消化管粘膜の免疫異常が病態に深く関わっていることが明らかにされ、治療においてはステロイド剤や免疫抑制剤などの有効性が認められている。しかしながら、その多くは長期投与を余儀なくされ、治療薬の全身に及ぼす副作用が临床上大きな問題となっている。従って、薬剤の選択的効果に加え、副作用を抑制することは临床上極めて重要である。炎症の生じている腸管局所にステロイドを含む種々の免疫抑制剤が徐放可能となれば、副作用の少ない治療が可

B. 研究方法

対象は、難治性潰瘍性大腸炎患者であるステロイド抵抗例（プレドニゾロン 1-1.5mg/kg/day の 1-2 週間投与で効果なし）とステロイド依存例（ステロイド漸減中の再燃）とする。

左側大腸炎型または全大腸炎型患者（n=10）には、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 のデキサメサゾン含有）を、4 週間隔日経口投与する。左側大腸炎型患者（n=10）には、DxMC 840mg/day を、4 週間隔日注腸投与する。

治療評価は、投与前・2 週後・4 週後に臨床スコア、大腸内視鏡所見、血液・生化学検査、尿検

査にて有効性および安全性を検討する。

(倫理面への配慮)

関西医科大学医学倫理委員会の承認(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第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)のうえ、説明文と同意書による同意を取得する。被験者は自由意志で研究に参加し、個人の人権を擁護し、意志を尊重する。被験者の個人情報保護し、学会や専門雑誌に発表する場合も、個人情報にはわからないようにする。

C. 研究結果

上記のプロトコールに従って、この臨床試験に参加する患者を登録中である。現在、ステロイド抵抗患者1例とステロイド依存患者3例の合計4例が登録されている。患者背景は、平均年齢: 36.7歳(26-47)、性(M/F): 2/2、病型: 全大腸炎型2・左側大腸炎型2、平均罹病期間: 6.7年(6-7)、平均入院回数: 4回(3-5)であった。DxMCの効果は、ステロイド抵抗患者で効果が乏しかった。ステロイド依存患者の1例で有効、2例で効果不明(ステロイド減量のリバウンド、サイトメガロウイルス感染)であった。明らかな副作用はなかった。

D. 考察

潰瘍性大腸炎患者では、免疫機能が異常に働くことにより、自分自身の腸管粘膜を外敵と認識し、攻撃して破壊するという状態が続いている。そのため、中等症または重症の潰瘍性大腸炎患者の治療には、従来ステロイド剤や免疫抑制剤が用いられてきた。しかし、これらの薬物自体の長期投与は、副作用を惹き起こす頻度が多くなり、投与量の変更および投与中止を余儀なくされることがある。また、これらの薬物治療抵抗性の患者については、治療方法として腸管切除を余儀なくされる場合もある。したがって、炎症の生じている腸管局所に種々のステロイドを含む免疫抑制剤が徐放可能となれば、副作用の少ない治療が可能となり、腸管切除の回避、しいては潰瘍性大腸炎患者のQOL向上につながると考えられる。

我々は、4 μ mのマイクロカプセルという微粒子の中にステロイド剤を封入させることを開発した。マイクロカプセルの原料はポリ乳酸で、生体内で分解されると乳酸になり、最終的に水と二

酸化炭素になる。従って、生体内に蓄積することではなく、現在この物質を用いた骨接合材料(ピン、スクリュー)が臨床応用され、人体に対する安全性もすでに確認されている。マイクロカプセルは消化管の炎症部位に、より多く取り込まれるので、炎症部位からステロイドを徐々に放出し、炎症を効率的に抑制すると考えられている。その結果、炎症腸管のみに作用し、全身に与える影響は少ないと考えられる。今回、4例の難治性潰瘍性大腸炎患者 DxMC を投与し、ステロイド依存患者に良い適用と考えられた。今後も症例を蓄積し、DxMCの有効性と安全性を確認したいと考えている

E. 結論

従来の投与方法と比較し、DxMCの投与により、副作用軽減など患者のQOL改善のみならず、医療資本の削減に寄与できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 参考文献

1. Yokayama Y, Suenaga K, Kino J, Akisawa Y, Morita M, Nishimori I, Nakazawa Y, Okazaki K, Yamamoto Y. Therapeutic use of a lipid emulsion dexamethasone (dexamethasone palmitate) in inflammatory bowel disease: a new drug delivery system. *Jpn Arch Int Med* 1995;42:1-7.
2. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Matsushima Y, Kawanami C, Oshima C, Ikeda Y, Chiba T. Development of an oral drug delivery system targeting immune-regulating cells in experimental inflammatory bowel disease: a new therapeutic strategy. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:15-21.
3. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Nishi T, Debreceni A, Itoh T, Kawanami C, Iwano M, Ikeda Y, Chiba T. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1122-8.

4. Nakase H, Okazaki K, Kawanami C, Uchida K, Ohana M, Uose S, Nishi T, Itoh T, Okano A, Nishio A, Takakuwa H, Chiba T. Therapeutic effects on intestinal Bechcet's disease of an intravenous drug delivery system using dexamethasone incorporated in lipid emulsion. J Gastroenterol Hepatol 2001;16:1306-8.
5. Okazaki K, Nakase H, Watanabe N, Tabata Y, Ikeda Y, Chiba T. Intestinal drug delivery system with biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells for chronic inflammatory colitis. J Gastroenterol 2002;37:S44-52.
6. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Ozeki M, Watanabe N, Ohana M, Uose S, Uchida K, Nishi T, Mastuura M, Tamaki H, Itoh T, Kawanami C, Chiba T. New cytokine delivery system using gelatine microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. J Pharmacol Exp Ther 2002;301:59-65.
7. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Chiba T. Biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells: new approach for treatment of inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 2003;38:S59-62.

H. 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

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

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

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：潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管型ベーチェット病などの炎症性腸疾患は、消化管粘膜の免疫異常が病態に深く関わっている。治療にはステロイド剤などの有効性が認められているが、長期投与を余儀なくされ副作用が大きな問題となっている。リポ化ステロイドであるリメタゾン（パルミチン酸デキサメタゾン）は、すでに慢性関節リュウマチで保険適応となり臨床的にも広く投与されている。生体内で緩徐に加水分解を受け持続的な抗炎症作用を示すので、従来の水溶性デキサメタゾン製剤に比べ投与量の低減化を可能とし、副作用の軽減が期待される。本研究では、リメタゾンを用いたドラッグデリバリーシステムによる多施設共同による無作為化並立群間試験を計画した。各研究者所属施設の倫理委員会の承認後、この臨床試験に参加する患者を登録中である。現在、潰瘍性大腸炎患者1例と腸管型ベーチェット病患者1例が登録され、リメタゾンは両者で有効であり、ステロイド剤減量・中止が可能であった。明らかなリメタゾンの副作用はなかった。今後も症例を蓄積し、リメタゾンを用いたドラッグデリバリーシステムの有効性と安全性を確認したいと考えている。本研究により、炎症性腸疾患患者におけるリメタゾンの有効性が認められれば、社会に大きく貢献するものと予測される。

共同研究者

松下光伸 深田憲将 内田一茂 川股聖二
安藤祐吾 大宮美香 藤井壽仁
所属 関西医科大学内科学第三講座

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管型ベーチェット病などの炎症性腸疾患は増加の一途にある。その病因は不明であるものの、消化管粘膜の免疫異常が病態に深く関わっている。治療においてはステロイド剤などの有効性が認められているが、長期投与を余儀なくされ、治療薬の全身に及ぼす副作用が臨床的大きな問題となることが少なくない。従って、薬剤の選択的効果に加え、副作用を抑制することは临床上極めて重要であると考えられる。炎症の生じている腸管局所にステロイドを含む種々の免疫抑制剤が除放可能となれば、副作用の少ない治療が可能となり、腸管切除の回避、しいては炎症性腸疾患患者のQOL向上につながると考えられる。

リメタゾン（パルミチン酸デキサメタゾン）は、デキサメタゾンをパルミチン酸エステルとして精製ダイズ油に溶解した乳濁性注射剤のリポ化ステロイド製剤である。すでに慢性関節リュウマチで保険適応となり臨床的に広く投与されてい

る。リメタゾンは一種のプロドラッグであり、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。従って本剤は、従来の水溶性デキサメタゾン製剤に比べ投与量の低減化を可能とし、またステロイドの副作用軽減が期待される抗炎症剤である。

我々は、リメタゾンを用いた多施設共同による無作為化並立群間試験を計画した。本研究では実際に、炎症性腸疾患患者にリメタゾンを投与し、従来の全身的ステロイド剤投与と比較する事により、リメタゾンを用いたドラッグデリバリーシステムの有効性と安全性を研究する。

B. 研究方法

対象は、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、従来の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）とし、重症例は除く。

対象患者の疾患別に、下記治療法を無作為化して3ヶ月間施行する。投与開始2週後に有効であれば従来の全身的ステロイド剤の投与量を減量し、無効であれば他の治療法に変更する。

治療法は、従来の全身的ステロイド剤投与量を

再増量する (n = 30)、あるいは従来の全身的ステロイド剤投与量は変更なく継続し、更にリメタゾン1管 (1ml) を1ヶ月間週1回投与し、以後の2ヶ月間は2週毎に1回投与する (n = 30)。

治療評価は、投与前と投与後2週毎で3ヶ月間にわたり、臨床スコア、血液・生化学検査、内視鏡所見、従来の全身的ステロイド剤の投与量変化、従来の全身的ステロイド剤の副作用変化、リメタゾンの副作用の有無について有効性および安全性を検討する。

Primary end point は、治療の有効性：臨床スコア・血液 (CRP・赤沈)・内視鏡所見のうち2項目以上の改善・軽快を有効とする。Secondary end point は、従来の全身的ステロイド剤の減量と副作用の軽減とする。

(倫理面への配慮)

関西医科大学医学倫理委員会 (第0635号) に承認され、各研究者の所属施設においても倫理委員会の承認後、説明文と同意書による同意を取得する。被験者は自由意志で研究に参加し、個人の人権を擁護し、意志を尊重する。被験者の個人情報保護し、学会や専門雑誌に発表する場合も、個人情報はわからないようにする。

C. 研究結果

各研究者所属施設の倫理委員会承認後、上記のプロトコールに従って、この無作為化並行群間試験に参加する患者を登録中である。現在、潰瘍性大腸炎患者1例と腸管型ベーチェット病患者1例が登録されている。リメタゾンの効果は、潰瘍性大腸炎患者で有効で、ステロイド減量可能であった。腸管型ベーチェット病患者で有効で、ステロイド中止可能であった。明らかなりメタゾンの副作用はなかった。

D. 考察

炎症性腸疾患患者では、免疫機能が異常に働くことにより、自分自身の腸管粘膜を外敵と認識し、攻撃して破壊するという状態が続いている。そのため、治療には従来の全身的ステロイド剤や免疫抑制剤が用いられてきたが、これらの長期投与は、副作用を惹き起こす頻度が多くなり、投与量の変更および投与中止を余儀なくされることがある。また、これらの治療抵抗性の患者については、治療として腸管切除を余儀なくされる場合もある。

したがって、炎症の生じている腸管局所に種々のステロイドを含む免疫抑制剤が徐放可能とな

れば、副作用の少ない治療が可能となり、腸管切除の回避、しいては炎症性腸疾患患者のQOL向上につながると考えられる。

リポ化ステロイドであるリメタゾンは、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、その中で溶解しマクロファージの機能を効率よく抑制する。したがって、投与量の低減化により、副作用が軽減される。我々は、多施設共同による無作為化並立群間試験を計画した。今回、潰瘍性大腸炎患者と腸管型ベーチェット病患者にリメタゾンを投与し、従来の全身的ステロイド剤が減量・中止可能であった。今後も症例を蓄積し、リメタゾンをを用いたドラッグデリバリーシステムの有効性と安全性を確認したいと考えている。

E. 結論

炎症性腸疾患患者におけるリメタゾンの有効性が認められれば、ステロイド投与量の低減化が可能とし、ステロイドの副作用軽減が期待され、社会に大きく貢献するものと予測される。

F. 健康危険情報

なし

G. 参考文献

1. Yokayama Y, Suenaga K, Kino J, Akisawa Y, Morita M, Nishimori I, Nakazawa Y, Okazaki K, Yamamoto Y. Therapeutic use of a lipid emulsion dexamethasone (dexamethasone palmitate) in inflammatory bowel disease: a new drug delivery system. *Jpn Arch Int Med* 1995;42:1-7.
2. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Matsushima Y, Kawanami C, Oshima C, Ikeda Y, Chiba T. Development of an oral drug delivery system targeting immune-regulating cells in experimental inflammatory bowel disease: a new therapeutic strategy. *J Pharmacol. Exp Ther* 2000;292:15-21.
3. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Nishi T, Debrececi A, Itoh T, Kawanami C, Iwano M, Ikeda Y, Chiba T. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells

- ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. J Pharmacol Exp Ther 2001;297:1122-8.
4. Nakase H, Okazaki K, Kawanami C, Uchida K, Ohana M, Uose S, Nishi T, Itoh T, Okano A, Nishio A, Takakuwa H, Chiba T. Therapeutic effects on intestinal Bechcet's disease of an intravenous drug delivery system using dexamethasone incorporated in lipid emulsion. J Gastroenterol Hepatol 2001;16:1306-8.
 5. Okazaki K, Nakase H, Watanabe N, Tabata Y, Ikeda Y, Chiba T. Intestinal drug delivery system with biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells for chronic inflammatory colitis. J Gastroenterol 2002;37:S44-52.
 6. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Ozeki M, Watanabe N, Ohana M, Uose S, Uchida K, Nishi T, Mastuura M, Tamaki H, Itoh T, Kawanami C, Chiba T. New cytokine delivery system using gelatine microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. J Pharmacol Exp Ther 2002;301:59-65.
 7. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Chiba T. Biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells: new approach for treatment of inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 2003;38:S59-62.

H. 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

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服対策研究事業）
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

L-histidine による腸炎抑制効果とその機序

分担研究者 日比紀文 慶應義塾大学医学部内科学 教授

研究要旨

Crohn 病に対して本邦では従来から成分栄養療法（Elementary diet; ED）が行われその臨床効果が報告されてきたがその作用機序は明らかとなっていない。これまでは ED の効果発現メカニズムとしては、十分なカロリー補給、低脂肪のための低炎症惹起性、窒素元がアミノ酸であるため低抗原性で免疫を賦活しにくい、腸内細菌に対する効果、など間接的な作用の可能性が提唱されてきた。我々は今回 ED 中に含まれるアミノ酸成分が直接的に腸炎抑制効果を示すことをマウス腸炎モデルで明らかにし、さらにその中でもヒスチジンの単独投与が単球やマクロファージからの炎症性サイトカインの産生を抑制することで腸炎抑制効果を発揮することを明らかにした。以上のことから ED の作用機序のひとつとしてアミノ酸の直接的な炎症抑制効果が明らかとなり、中でもヒスチジンのような抗炎症性アミノ酸の存在が明らかとなりその作用機序は新たな創薬のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

共同研究者

久松理一¹、安藤綾俊^{1,4}、岡本 晋¹、井上 詠²、緒方晴彦³、岩男 泰²
慶應義塾大学消化器内科¹
同 包括先進医療センター²
同 内視鏡センター³
味の素株式会社医薬研究所⁴

A. 研究目的

ヒト Crohn 病に対して本邦および欧州（特に小児例に対し）では従来から経腸栄養療法が行われその臨床効果が報告されてきた。本邦では経腸栄養療法にはエレンタール® が主として用いられており、同剤は窒素元をアミノ酸まで分解した成分栄養剤（Elemental Diet, ED）である。Yamamoto らは ED 療法の継続により臨床的、内視鏡的所見が有意に改善されること、あるいはクローン病術後の患者において ED 投与群では有意差をもって再燃が予防されることを報告している。さらに ED 投与により腸管局所粘膜での炎症性サイトカイン遺伝子の発現が低下することも明らかとなった（*Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:67-72. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1493-501.）。この

ように従来から用いられてきた ED の有効性は再認識されつつあるもののその作用機序はあまり論じられてこなかった。これまで考えられてきたクローン病における ED の効果発現メカニズムとしては、消耗状態に対する十分なカロリー補給、低脂肪のため炎症惹起性が低い、窒素元がアミノ酸であるため低抗原性で免疫を賦活しにくい、腸内細菌に対する効果、などが報告されてきたが残念ながらいずれのメカニズムについても科学的検証は十分ではなかった。また、これらの作用機序はいずれも間接的なものであり、ED 自身に直接的な炎症抑制効果があるかどうかは不明であった。しかし、最近の研究から ED の主成分であるアミノ酸自身のもつ抗炎症作用が明らかになりつつある。このことから我々は ED に含まれるアミノ酸自体が直接的な抗炎症効果を有するのではないかという仮定の下、最終的にはアミノ酸を主体とした新たなクローン病治療薬の創薬を目指して以下の研究を行った。

B. 研究方法

①IL-10KO transfer colitis model mice に対する ED-AAs およびヒスチジンの腸炎抑制効果
自然発症マウス慢性腸炎モデルである IL-10 KO マウスの脾臓や腸間膜リンパ節の細胞を SCID マウスに移入することで約3週間後に単球系細胞の腸管局所への浸潤を主体とする慢性腸炎を引き起こすことが可能である。我々はこの IL-10 KO transfer colitis model を用いて ED および ED 中のアミノ酸成分の腸炎抑制効果について検討した。同マウスに full ED 投与を行い control 群および PSL10mg/kg/day 経口投与群と比較した。腸炎の評価については腸管重量、HE 染色による組織学的検討および大腸粘膜中の TNF α の mRNA 発現により検討した。次に ED 中のアミノ酸成分のみ (ED-AAs) を通常の餌に混じた場合の腸炎抑制効果についても検討した。また ED 中の各アミノ酸成分の単独経口投与での腸炎抑制効果についても検討した。

②マウス腹腔マクロファージを用いたヒスチジンのサイトカイン産生抑制機序の解析(in vitro)

マウス腹腔マクロファージを用いて LPS 刺激によるサイトカイン産生に対するヒスチジンの効果について以下の項目について検討した。
1) TNF α および IL-6 の培養上清中の濃度を cytokine beads array および ELISA にて測定、
2) mRNA 発現の検討、3) western blot 法による NF κ B 活性化
また、L-ヒスチジンとの比較として光学異性体 D-ヒスチジン、代謝産物のカルノシン、アンセリンを用いて同様の検討を行った。さらにヒスチジンの代謝産物であるヒスタミンの影響を検討するため histidine decarboxylase (HDC)欠損マウスの腹腔マクロファージを用いても検討した。

③ヒト単球に対するヒスチジンのサイトカイン産生抑制機序の解析(in vitro)

ヒト末梢血単球を比重遠心法および CD14MACS を用いて isolate し LPS 刺激による TNF α および IL-6 産生に対するヒスチジンの効果を培養上清の ELISA を用いて検討した。

C.D. 研究結果および考察

①IL-10KO transfer colitis model mice に対する ED-AAs およびヒスチジンの腸炎抑制効果
まず同マウスに full ED 投与を行うと PSL10mg/kg/day と同等の腸炎抑制効果を示した。次に ED 中のアミノ酸成分のみ (ED-AAs) を通常の餌に混じた場合も用量依存性に腸炎を抑制した。これにより ED 中のアミノ酸成分が直接腸炎抑制効果を有することが示唆された。さらに ED 中の各アミノ酸成分のうちヒスチジンは単独投与により腸炎抑制効果を示すことが明らかとなった。ヒスチジンは大腸粘膜中の TNF α の mRNA 発現を有意に抑制していた。

②マウス腹腔マクロファージを用いたヒスチジンのサイトカイン産生抑制機序の解析(in vitro)

マウス腹腔マクロファージを用いた実験で、ヒスチジンは LPS 刺激されたマクロファージから産生される炎症性サイトカイン、TNF α および IL-6 の mRNA 発現および培養上清中の蛋白濃度を濃度依存性に低下させた。尚、ヒスチジンはマクロファージの viability には影響を及ぼさなかった。また、L-ヒスチジンの光学異性体 D-ヒスチジンや代謝産物のカルノシン、アンセリンではその抑制効果は明らかではなかった。さらに HDC 欠損マウスの腹腔マクロファージを用いた実験においてもヒスチジンは炎症性サイトカインの産生を抑制し得たことからこの作用にはヒスタミン合成系は関与してないと考えられた。

I κ B α の degradation および p65 サブユニットの核内移行を抑制した。従ってヒスチジンの TNF α の産生抑制機序には NF κ B シグナルの抑制が関与していると考えられた。

③ヒト単球に対するヒスチジンのサイトカイン産生抑制機序の解析(*in vitro*)

ヒト末梢血 CD14 陽性単球を用いた実験でもヒスチジンはヒト単球からの炎症性サイトカイン (TNF α , IL-6) の産生を抑制した。

臨床応用へ向けての考察

マウス腸炎モデルおよびヒト単球を用いた研究結果からヒスチジンが炎症性サイトカインを抑制することで腸炎抑制効果を発揮することが示された。ED の成分中の各アミノ酸をさらに解析することで腸炎抑制効果を有するアミノ酸組成に重点を置いた新世代 ED の開発が可能と考えられ、実現性も高いと考えられる。さらに、ヒスチジン単独での治療も投与量、投与経路、drug delivery など解決すべき問題点は残されているが有望と考えられる。特に現在の ED のもつ服薬コンプライアンスの低さを改善する可能性がある。またヒスチジンのサイトカイン産生抑制機序を詳細に解明することによって新たな分子標的を見いだせる可能性がある。

E. 結語

ED-AAs はそれだけでマウス腸炎を抑制することが明らかとなった。さらにその中でもヒスチジンは単球やマクロファージからの TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生を抑制する効果により単独で腸炎を抑制する効果を有することが判明した。アミノ酸による腸炎抑制機序の追求は新たな創薬に結びつく可能性がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Andou A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Kobayashi T, Okutsu T, Takeda T, Hashimoto M, Sato A, Ohtsu H, Suzuki M, Hibi T: Dietary histidine uptake ameliorates il-10-deficient cell transfer murine colitis by inhibition of pro-inflammatory cytokine production from macrophages. *Gastroenterology in revise.*

2. 学会発表

Hisamatsu T, Okamoto S, Andou A, Muramatsu T, Kamada N, Takayama T, Takada Y, Ichikawa H, Izumiya M, Sakuraba A, Naganuma M, Nakazawa A, Ogata H, Iwao Y, Ono N, Sakai R, Suzuki M, Hibi T: Profiling of amino acids metabolism ("Amino Index") is useful for diagnosis, judgment of clinical activity, and understanding of pathophysiology in inflammatory bowel disease. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May, 2007.

Hisamatsu T, Andou A, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Hashimoto M, Kihara H, Hibi T: L-histidine ameliorates IL-10 deficient cells transfer murine colitis model by inhibition of pro-inflammatory cytokine production from mononuclear cells. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, Japan July, 2007.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

・国際特許

PCT/JP2008/050942 2008/01/24 出願

「IBDの評価方法、ならびにアミノ酸情報処理装置、アミノ酸情報処理方法、アミノ酸情報処理システム、アミノ酸情報処理プログラムおよび記録媒体」

・特許

特願 2008-013393 2008/01/24 出願

「IBDの評価方法、ならびにアミノ酸情報
処理装置、アミノ酸情報処理方法、アミ
ノ酸情報処理システム、アミノ酸情報処
理プログラムおよび記録媒体」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし