

[検討 2]

- ・細胞株レベルの Notch 阻害剤の役割を解析。

[結果 2]

- ・大腸癌由来の細胞株 HT29、LS174T に Notch 阻害剤を加えたところ、BID 活性をみたところあまり細胞増殖の抑制は Notch 阻害剤によって影響は殆ど無い。
 - ・Notch 阻害剤を入れたところ Hath1 遺伝子の量は上がり MUC2 の細胞が増える。
- ⇒セルラインレベルであるが Wnt シグナルが活性化している状態であれば Notch の活性を抑制したところで細胞増殖にはあまり影響を与えずに分化のシグナルだけを与えることができるのではないかと考えた。

[WIT シグナル活性化は Hath1 蛋白を不安定にする]

- ・Wnt シグナル入れて抑制すればある程度細胞増殖を保ちつつ分化を促進できるのではないかと考えていたが Wnt シグナルを活性化すると Hath1 の蛋白が断片側を壊してしまう。
 - ・Wnt シグナルが入っている大腸癌細胞株においては Hath1 を強制発現しても Hath1 担当が見られずに APC を導入することによって Wnt シグナルを off にすることで Hath1 の蛋白が出て MUC2 陽性の細胞になる。
- ⇒Hath1 蛋白が Wnt シグナル陽性になってしまうと不安定になってしまう。

[安定化 Hath1 蛋白は Wnt 活性化下にも杯細胞へ分化誘導する]

- ・Hath1 蛋白の分解というのは GSK-3 β 依存性によることは以前、解明し、ターゲットであるセリン残基をアラニンに変え、大腸癌細胞株でも安定して Hath1 蛋白を発現することができれば MUC2 発現上昇を認めることができた。

[GSK 阻害薬による HATH1 蛋白安定化が杯細胞分化を促進する]

- ・GSK そのものをターゲットにして、GSK 阻害剤を用いたところ Wnt シグナルは常に ON になっているものの Hath1 蛋白が安定化することによって MUC2 の発現上昇が認められた。

[阻害剤を用いた炎症性腸疾患の治療戦略]

- ・慢性大腸炎においてはシグナルが常に ON になっていて細胞増殖が強く働いている。
- ⇒発癌が少ないがために杯細胞がかなり少ない状態になっている。そのかわり細胞増殖することによって腸の形を保っている状態だということが解った。Notch 阻害剤を使うことによって発癌遺伝子を増加させることによって杯細胞を増やすことができるかもしれないが増殖も止めてしまうことから腸そのものが無くなってしまふ。⇒どうすればよいか？
- GSK 阻害剤を使用することにより Wnt シグナルを更新させ増殖をカバーし、さらに発癌の蛋白を安定化させることで杯細胞も増やし腸管そのものも増やせるのではと考えている。問題として、2つの阻害剤を併用することは臨床応用が難しいとは思っているが、今までに得られた分子基盤を元にして現実的なものにしたい。

[今後の計画]

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

炎症性腸疾患に対する薬剤の内視鏡的粘膜下注入療法の開発

(分担研究者: 鈴木 健司)

発表: 鈴木健司

[背景]

- ・炎症性腸疾患の新しい治療戦略として抗炎症療法(従来の治療戦略)に加え分化再生療法を開発することをコンセプトに進めている。
- ・色々な薬剤を試してきたが、メインの治療法として考えているのが大腸内視鏡を持ちついた消化管粘膜下への薬剤を注入することによってよりよく効果を発現できるのではないかと考え、種々の薬剤で効果を検討してきた。
- ・消化管粘膜下に墨汁を注入すると粘膜下にプールされることが解った。遺伝子導入でもラクジ-遺伝子 nakedDNA を粘膜下に注入するだけで粘膜下の細胞に遺伝子導入ができる(遺伝子導入をするのにやりやすい)場所であることを明らかにした。
- ・ラットの内視鏡を行ったところ造影剤を直腸の粘膜下に注入するとスポット0.1ccが局所に留まる。そして、CTで確認してみると粘膜下にきれいにプールされ腹腔にもれない。40分~1時間程度はそこに留まることを確認している。このようなことから遺伝子導入にしても薬剤の効果発現にしても非常に良い効果をもたらすと考えている。
- ・以上のことは、HGFの遺伝子療法を大腸粘膜下に注入して効果を判定すると血便を改善し、腸管腸の短縮を改善することを示してきた。内視鏡所見も改善する。組織を見てもDSS腸炎を改善することができることが解った。

⇒粘膜下への遺伝子導入というのは一つの戦略になると確認した。

[検討1]

- ・近々予定されているrh-HGFをヒトに向けて大腸粘膜下に注入することでよりよい治療法になるか基礎データをだすためにラットのDSS腸炎に0日目にプリベンション実験として粘膜下注を行った。

<対象>

Group1:DSS+rh-HGF

Group2:DSS+Control gene transfer

[結果1]

- ・臨床スコアを改善し腸管短縮を抑制する。また、内視鏡像も改善し、組織も改善効果が得られた。

<機序>

- ・KI67陽性細胞、増殖細胞を増やし、アポトーシス陽性細胞を減らす効果があることが解った。

[検討2]

- ・炎症が起きてしまった腸炎を治す効果があるか3日目にrh-HGFを粘膜下注を行った。

<対象>

Group1:DSS+rh-HGF

Group2:DSS+PBS

[結果2]

- ・臨床的に血便を改善し、腸管長の短縮を抑制した。また、組織も改善することができる。

[結論]

- ・rh-HGFを粘膜下注することは良い治療法になっていくと考えられる。

[検討3]

- ・本研究班のもう一つの目標である、既存の安価な薬剤を新しく適応拡大すべくターゲットとして炎症性腸疾患において注目されているMast Cellsを安定化させることが治療法に繋がっていくか検討。

[方法]

3%**DSS**

Group1	WT	+DSS
Group2	WBB6F1	+DSS
Group3	WT	+Vehicle
Group4	WBB6F1	+Vehicle

DDS p.o



[結果]

- ・ Mast Cells のいるマウスでは 7 日目には DSS 腸炎を悪化するが、欠損マウスでは腸炎が軽い傾向がみられた。
 - ・ Mast Cells の脱顆粒剤である Compound48・80 を投与すると腸炎が悪化することから腸炎は Mast Cells が関与している、病変、増悪への関与が示唆された。
- ⇒ Mast Cells の安定化剤であるリザベンを経口投与⇒腸炎が改善することを確認。

[検討 3]

- ・ 注腸実験 (リザベンを DSS 腸炎に投与)

[方法 3]

3%**DSS**

Group1	DSS+PBS
Group2	DSS+tranllast
Group3	Water+PBS
Group4	Water+tranllast
Group5	Water (Nermaf)

- ・ 0, 2, 4 週目に投与、6 週目に評価。

[結果 3]

- ・ 臨床的に腸炎が改善、組織も改善を認める。

<機序>

- ・ 増殖細胞を増加させ、アポトーシス細胞を減少させる。

[結論 3]

- ・ 30 年前に臨床投与されたリザベン、経口投与による肝障害の為に臨床応用をはばまられているが、粘膜下注するとどうなるか実験を行った。

[検討 4]

- ・ リザベンを粘膜下注にてプリベンション治療で実施

[方法 4]

3%DSS

Group1	DSS+trallast
Group2	DSS+PBS
Group3	tranlast

- ・ 0週目に投与、3,6週目に評価。

[結果 4]

- ・ 血便を改善し、腸管長の短縮を改善する。また、内視鏡所見もきれいに改善し、組織も改善する。そして、増殖細胞を増加させ、アポトーシス細胞を減少させる機序である。
- ⇒しかし、炎症が起きてしまった後に3日目に粘膜下注を行った場合にはどうなるか？
⇒効果は残念ながら4日でClinical Scoreは改善するが、その後は続かない問題があった。

[結論 4]

- ・ トラニアストは粘膜下注である程度の効果はあるが、不変的な効果はHGFには及ばないことが解った。

[今後の計画]

- ・ さらに強いHGFに匹敵するような薬剤を使って粘膜下注療法で新しい治療法を開発したい。
- ・ 次回の報告では新規分子をターゲットとしたSIRNAを大腸粘膜下注入することで新しい治療法に繋げていきたい。

炎症性腸疾患に対する組換えヒト HGF の臨床応用

(分担研究者：坪内 博仁)

発表者：井戸章雄

[劇症肝炎に対する臨床試験の進捗状況]

- ・劇症肝炎は医師主導治験として行われて約 2 年が経過。症例数が減っていることもあり、被験者リクルートに苦勞している。現在は 42 例紹介があり、4 例採用した。一番低容量のコホート 1 が終了。除外基準により、そのうち 12 例が除外。

〈コホート 1 (4 例) のまとめ〉

- ・年齢：67 歳、70 歳、64 歳、39 歳
- ・診断：亜急性型 3 名、LH-F 型 1 名
- ・劇症肝炎分科会の死亡予測式での死亡確率：79.5%、90.6%、87.5%、65.1%
- ・副作用：血圧低下 3 例が認められた。腎毒性は 1 例も認められなかった。HGF に起因する因果関係の否定できない有害事象は認められなかった。
- ・転帰：生存 2 例、死亡 2 例。

[潰瘍性大腸炎に対する臨床応用 一薬効薬理試験—]

〈大腸炎モデルに及ぼす HGF の影響〉

- ・目的は HGF を難治性潰瘍性大腸炎に応用すること。投与方法は注腸投与を考えている。静注投与では、大腸炎の薬物移行が約 2% 以下であるため、潰瘍面積の縮小効果、K167 Labelling INDEX が増加するということがわかっている。

[腸発癌モデルに及ぼす HGF の影響]

- ・DSS 大腸炎に発癌誘導するモデルに対して rh-HGF (1.0mg/kg) を静注 14 日間投与。統計学的に有意差はないものの、腫瘍の発生数、発生率、癌の発生数はともに HGF で高い傾向があった。
- ⇒概要書にまとめて、難治性潰瘍性大腸炎に対するプロトコルコンセプトを作成。

[第一回プロトコル委員会において]

- ・非臨床試験成績、治験実施計画について検討。
- ⇒大腸発癌モデルでは、有意差はないものの、HGF 投与群において腫瘍発生数、発生率が高い傾向にある。
- ⇒潰瘍性大腸炎を対象とした治験では、倫理性、正当性に問題はないか？
- ⇒被験者から同意を得ることが困難。
- ★その結果、潰瘍性大腸炎に対する臨床応用は断念。

[クローン病 小腸狭窄病変に対する臨床応用？]

- ・クローン病の応用を目指して、発癌性試験も追加 (モデル動物において投与方法は鈴木先生が研究を重ねた局所投与 (粘膜下注入がふさわしいのでは?) が良いと思っている)
 - ・粘膜下注入しても HGF を徐放化できるドラッグデリバリーシステムを考えた上で応用を検討。
 - ・組換えヒト HGF (GMP 製剤)
- ⇒現有の治験薬の使用期限は 2006 年 6 月まで。
- ⇒劇症肝炎に対する第 1/2 相臨床試験も 2006 年 6 月で終了
- ⇒新たな組換えヒト HGF (GMP 製剤) が必要。
- ・単一施設の医師主導治験では、被験者リクルートが困難。
- ⇒多施設の医師主導治験の立ち上げ
- ⇒治験実施体制の整備 外部委託 (CRO、SMO) はコストがかかってしまう。
- (参考) 京大病院における治験推進費用は、数千万円/年。

皮下脂肪組織由来幹細胞による TNBS 腸炎の治療促進

分担研究者: 岡崎 和一

発表者: 安藤祐吾

[はじめに]

- ・近年、抗 TNF α 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。特に患者の 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、様々な分野で幹細胞を使った再生医療が盛んに行われており、クローン病も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クリニカルトライアルが行われており、論文では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入することにより、術後瘻孔閉鎖率が改善したと報告している。

[目的]

- ・粘膜再生を促す治療方法として、比較的安全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 ADSCs）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を腸炎モデル動物を使って検討した。

[脂肪由来幹細胞]

- ・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・骨格筋など分化誘導できる可能性が示されている。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、さらに脂肪組織内の結合組織内にも多数存在していると言われている。脂肪組織は採取されることによる機能障害が小さく、比較的容易にまとまった量の脂肪組織を採取することが可能。骨髄由来幹細胞に比べて採取に伴う肉体的負担が軽く、細胞培養の最適化により1週間で約100倍近くまで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いる。脂肪由来幹細胞は骨髄由来幹細胞に変わる再生医療の創始として現在関心を集めている。実際ヒトで行う場合、約500cc程度の脂肪組織が採取できれば10の8乗個単位の脂肪由来幹細胞が採取できると想定されており、長期培養に伴うcontaminationや幹細胞の機能的性質、細胞表現系の変化などを考慮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ている。骨髄間葉系幹細胞と比較して、細胞表現系および多分化能など非常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であり、その応用範囲も広いと考えられている。現在、脂肪再生、骨再生、心筋再生、血管新生、皮膚難治性潰瘍などへの応用が進みつつあり、今後の展開が期待されている。
- ・脂肪組織からアリのサイトカインが分泌されることが報告されている。ヒトにおける脂肪由来幹細胞においても、様々な増殖因子が分泌されているとの報告が見られる。特に HGF が非常に多く分泌されているとの報告があり、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、抗線維化作用など粘膜修復に対する効果が期待されている。

[材料と方法]

- ・雄ラットの皮下脂肪組織を採取し、そこから脂肪由来幹細胞（ADSCs）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。
- ・ADSCs 培養液中の growth factor (HGF, VEGF, TGF- β) 及び adiponectin を測定し、粘膜再生への関与を検討した。
- ・in vivo の実験において、雄ラットで TNBS (2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid) 大腸炎モデルを作成し、雄ラットから分離培養した ADSCs 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。

<皮下脂肪由来幹細胞の分離培養>

- ・ラット皮下脂肪組織を採取⇒コラゲナーゼ処理⇒遠心⇒ペレット 24 時間培養⇒浮遊細胞を PBS で数回洗浄⇒付着製細胞のみ培養

[結果 1]

- ・脂肪幹細胞をファックス解析したところ、骨髄間葉系肝細胞に発現が見られる CD90 が見られた。
- ・増血幹細胞に発現が見られる CD34、血管内皮細胞に発現が見られる CD31 は見られなかった。
- ・マクロファージ系白血球全般に発現が見られる CD11b、及び CD45 陽性細胞も見られなかった。

[結果 2]

- ・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、培養細胞を観察したところ分化誘導をか

けていない細胞では紡錘系した繊維芽細胞様の細胞が不規則に増殖していた。また、神経、脂肪、骨、上皮へ分化誘導した細胞では、それぞれ特徴的な形態へと変化を認めた。

【結果3】

- ・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。脂肪へ分化誘導した細胞を oil red-O 染色したところ、脂肪的に一致して染色像が見られ、骨へ分化誘導した ALP 染色をしたところ骨芽細胞様細胞が染色され、さらに、von kossa 染色をしたところカルシウム沈着が認められた。
 - ・神経に分化誘導した細胞を NSE で免疫染色したところ、分化誘導した細胞で細胞質が染色された。
 - ・上皮に分化誘導した細胞では、サイトケラチンで染色したところ、細胞質が染色されファックスでも軽度の発現が確認できた。
- ⇒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。

【結果4】

- ・脂肪由来肝細胞がどの程度の増殖能を有するか調べるため、形態ごとにダブリングタイム音速停止したところ passage10 まで良好な増殖能が維持していた。

【結果5】

- ・脂肪由来幹細胞を1週間培養した培養液中の HGF、VEGF、TGF- β 、adiponectin を測定したところ大量の VEGF、HGF、adiponectin を検出された。

【検討2】

- ・ *in vivo* の実験では組織学的にクローン病に類似した TNBS 腸炎モデルを使用した。

【方法2】

- ・3群に分けて検討。
 - <Group1>0 日目に生理食塩水のみ注腸
 - <Group2>0 日目 TNBS を注腸後、2 日目に PBS を局注
 - <Group3>0 日目 TNBS を注腸後、2 日目に脂肪由来幹細胞を局注

3群ともに10日目評価

- ・局所注入はエーテル麻酔下で腹部を生中切開し、潰瘍形成により変色した腸管部位に対して漿膜側に 27 ゲージ針を用い、PBS、あるいは、脂肪由来幹細胞を腸管壁内へ局注
- ⇒粘膜内へ注入されているか確認するため、墨汁を用いて漿膜側から局注したところ粘膜層に注入されていることを確認。また、注入部から離れた粘膜下層でも墨汁が広範囲に拡散されていることが確認。

【結果2】

- ・脂肪由来肝細胞を局注した群とコントロール群との体重変化、生存率、腸重量を測定した結果、体重変化、生存率は有意差なし、しかし、腸重量では2群間で有意差がみられ、その原因は炎症に伴う浮腫が原因であると考えた。
- ⇒脂肪由来幹細胞局注は腸管浮腫が改善したことが示唆された。
- ・腸管にできた潰瘍の大きさ、腸管長を比較したところ、脂肪由来幹細胞群では明らかに潰瘍面の縮小がみられ、コントロール群に比べ有意差が認められた。しかし、腸管長については有意差が認められなかった。
 - ・腸上皮の増殖能を比較するため屠殺1時間前に BRDU を腹腔内投与し腸上皮細胞に取り込まれた BRDU 陽性細胞をカウントしたところ脂肪由来幹細胞群注入群で有意に腸上皮増殖更新が見られた。
 - ・組織を HE 染色で検討したところコントロール群では半数以上の組織で筋層壊死を伴う全層性の高度炎症像が見られたが、脂肪由来幹細胞群では一部筋層への炎症細胞浸潤が見られるものの粘膜下層までに留まっているものが大半で組織学的スコアリングを行ったところ有意差を認めた。採取した腸管の一部を homogenate

- ・ し、組織中 MPO 活性および、組織中のサイトカインを測定した。MPO 活性は脂肪由来幹細胞局注群において有意な抑制がみられた。
- ・ 組織中のサイトカインにおいても好中球遊走活性化作用を有する IL-8 を有意に抑制していることが解った。その他、脂肪由来幹細胞は IL-1 β も抑制されることが示唆されるが、有意差はみられなかった。
- ・ Th-1 サイトカインである TNF- α と INF- γ については抑制的な作用はみられなかった。
- ・ Y 染色体フィッシュを行い、局注した脂肪由来幹細胞の分布を追跡したところ、粘膜層、難膜下層、筋層、全層に渡り Y 染色体陽性細胞が確認された。特に炎症が強い潰瘍部に集中して分布を認めた。
- ・ 二重染色法を用いてサイトケラチン、リメンチン、S100、SMA 染色を行ったところ、脂肪由来幹細胞はファイブログラスト、アディポサイト、スムスマスルセルに分化されていることを確認。

[まとめ]

- ・ *in vitro* の実験により、脂肪由来幹細胞 (ADSCs) は多系統の成熟細胞へと分化する可能性が示された。
- ・ ADSCs から多数増殖因子 (特に VEGF, HGF) および adiponectin が分泌されることが証明された。
- ・ *in vitro* の実験において、ADSCs は傷害をうけた腸管粘膜の再生を促進する働きが認められた。
- ・ 粘膜下層に局注された ADSCs は腸管全層に分布していることが確認され、さらに腸管壁を構成する胚葉系成熟細胞 (繊維芽細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞) へと分化した可能性が示唆された。しかし、今回の実験では腸上皮細胞への分化は確認されなかった。

[考察]

- ・ クロウン病では Th-1 系の免疫異常が認められ、腸管局所において活性化マクロファージおよび Th-1 系免疫応答の更新を伴った活性化 T 細胞の増加が見られる。これらの細胞から分泌される炎症性サイトカインにより慢性的に炎症が持続し、それに伴って広範な粘膜の欠損が生じている。広範な粘膜腸上皮の欠損により持続的に腸内細菌、食事抗原、をはじめとする外来抗原の曝露を受け炎症の悪循環に陥る。近年、抗 TNF- α 抗体をはじめとする生物学的製剤の進歩より炎症をより選択的にピンポイントで押さえる治療ができるようになった。しかし、実際の臨床では、症状が改善したにも関わらず、粘膜再生が不十分で瘻孔等形成する症例も存在する。粘膜再生に注目し、粘膜再生を促進することにより、腸内細菌など外来抗原からの持続的な曝露を阻止し、炎症のマリグナイトサイクルをストップしようと考えた。*in vitro* の実験で脂肪由来幹細胞は多分化能を有し、VEGF や HGF といった増殖因子やアディポネクチンを大量に分泌されていることが確認された。また、TNBS 腸炎における傷創治癒促進効果も確認された。傷創治癒促進のメカニズムとして HGF による上皮細胞増殖促進作用、及び抗アポトーシス作用による腸上皮再生の促進、VEGF による血管新生促進作用による組織修復の促進が考えられた。また、adiponectin には抗炎症作用を有することが示唆されており、局所的な抗炎症作用を発揮することも考えられる。さらに、腸管局所に注入された脂肪由来幹細胞は一部腸上皮再生の土台となる筋繊維芽細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞等に分化されることが確認され腸管の構成する細胞へと分化した可能性も考えられる。

[今後の検討課題]

- ・ 脂肪幹細胞局注における安全性について、脂肪幹細胞局注群の長期経過例における腫瘍性増殖の有無を確認
- ・ 今後臨床応用として、クローン病における難治性潰瘍及びろうこうを有する症例に対し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機構

(分担研究者：竹田 潔)

発表者：竹田潔

[はじめに]

- ・ノックアウトマウスの解析から自然免疫系というのは異常な活性化状況になると炎症性腸疾患を自然発症してしまうことが解っている。さらに色々な二重欠損マウスを用いた解析から自然免疫系が異常な活性化状況になっているとTLRがマイクロフローラを認識することによって炎症性サイトカインが過剰に産生される。IL12のP40がTh1に個体を傾けることによって炎症性腸疾患を発症させることを提唱していたが、最近では、Th1だけではなくむしろTh17という新しいヘルパーT細胞のサブセットのほうが重要であると言われるようになってきた。

[Th17とは]

- ・Th1によって引き起こされると言われていた自己免疫疾患、例えば多発性硬化症のマウスモデル、アースライティス、炎症性腸疾患はTh1よりむしろTh17によって起こっているのではないかと言われてきた。

[検討1]

- ・通常のマウスのリンパ組織においてTh17があるのかないか検討した。

[方法1]

- ・Spleen, MLN, 腸管のlamina propriaからT細胞を取ってきてIL17の産生細胞、IFN- γ の産生細胞を見てみるとIL17の産生細胞はナイーブのマウスのリンパ組織では殆どみることができないが腸管の粘膜固有層では10%を超えて見ることができる。腸管の粘膜免疫層ではlamina propriaはTh17細胞がいるということが見られる。ちなみにIFN- γ 産生細胞も強くあるが他の組織にはまったくないけれども腸管の粘膜固有層には常にある。どうなっているのか？

[検討2]

- ・IL17の産生細胞はたしかにあるがこれがTh17なのかどうか検討した。

[方法2]

- ・Th17細胞は転写因子としてROR γ -Tを産生していてサイトカインへIL17やIL21、IL22などを産生するのでM-RNAの発現を見てみた。その結果、IL17やIL22の産生はLPから採ってきたCD40細胞はたしかに抗CD3刺激によって産生が高まる。Th17特異的な転写因子発現もやはり高い。確かにここに存在しているIL17の産生細胞というのはTh17であることが解ってきた。

[検討3]

- ・腸管の粘膜固有層にはTh17がきわめて多く存在している。なぜ存在しているのか？一般的な概念で言うと所属リンパ節で教育されたTh17がエフェクター細胞となってTh17細胞へ行くことが考えられるがメセンテリックリンフ濃度で調べる限りほとんど存在していないことから、ひょっとしたら粘膜固有層自身にTh17をインストラクトするような樹状細胞がいるのではないかと考え、粘膜固有層からCD11c細胞を取ってきてCD11c細胞が実際Th17をインストラクトできるのか*in vitro*で解析した。

[方法3]

- ・大腸の粘膜固有層からCD11c細胞を採ってきて、脾臓からナイーブなCD40細胞を採ってきてそれを混ぜ、培養し5日後にT細胞を採り再刺激をかけてIL17の産生を見てみるとスプリングのCD11c細胞でコカルチャーした場合にはIL17の産生は殆どみられないが、大腸の粘膜固有層から取ってきたCD11c細胞でコカルチャーするとIL17の産生は強まった。IL17産生細胞は実際にTh17かどうかMRNAの発現をみてみるとTh17特異的な遺伝子が確かに高まっているということで腸管の粘膜固有層に存在しているCD11c細胞陽性細胞は確かにTh17をインストラクトできる能力を持っていることが解った。

[検討4]

- ・なぜ樹状細胞がTh17をインストラクトできるのか？Th17のdevelopmentに関わるようなサイトカインの産生を

DCで調べてみた。

[方法 4]

- ・大腸の粘膜固有層、あるいはコントロールで脾臓から取ってきたCD11c細胞をLPS刺激によってサイトカイン産生をみるとIL-6が刺激以前から多く発散されていて、さらに刺激によって高まっている。一方スプリーンから取ってきた細胞は確かにでていますが圧倒的に低い。他のサイトカインを見てみるとP40はスプリーンの方が高い。IL-6の産生が特異的にlamina propriaの樹状細胞で高まっていた。IL-6はTh17のdevelopmentを見た場合、最初の段階でクリティカルなサイトカインとして知られている。このように、Th17のdevelopmentに必須のIL-6が高まっているために大腸の粘膜固有層の局所でTh17をインストラクトできることが解ってきた。

[検討 5]

- ・IL-6のノックアウトマウスで検討

[方法 5]

- ・ノックアウトマウスからlamina propriaの多細胞を採ってきてCD4陽性細胞からのIL-17、IFN- γ の産生をインストラセルハウでみてみるとワイルドタイプに比べるとIL-6ノックアウトマウスは減っていたがあった。IL-6のシグナルがT細胞でなくなるマウス、スタッド3のT細胞特異的ノックアウトマウスをみてみても同様であった。ワイルドタイプに比べると減っている。
⇒確かにIL-6は関与している。しかし、IL-6のシグナルがなくなってもまだ存在しているということが解ってきた。
⇒IL-6とは関係なくまだインストラクトできる能力があることが示唆された。

[検討 6]

- ・粘膜固有層と脾臓のCD11c細胞でキャラクターが違わないか表面マーカーの観点から調べた。

[方法 6]

- ・高stimulatory moleculeやMH moleculeの発現をみてみると決定的に違うマーカーとしてCD70というものがあった。CD70は脾臓の細胞には殆ど発現はないがlamina propriaのCD11c細胞は半分以上が陽性。CD70はCD40と同じようなTNFのスーパーファミリーで基本的に樹状細胞等でも活性化されると出てくることが言われている。そのリガンドがCD27と呼ばれていてT細胞の方で発現しておりCD70からのシグナルCD27T細胞が受けてシグナルが入っていくというファミリーである。CD70が特異的に大腸粘膜固有層の樹状細胞に発現していることで何かファンクショナルに関与していないかということで次の検討を行った。

[検討 7]

- ・CD27のFcタンパクでCD70のシグナルをブロックしてみた。コカルチャーしているところでCD70のシグナルをブロックするとIL-17のインストラクションが減っていることからCD70からのCD27へのシグナルが確かにIL-17のdevelopmentのインストラクションへ関わっていることが示唆された。

[まとめ]

- ・大腸粘膜固有層には直接Th17をインストラクトするような樹状細胞が確かにある。
⇒これはIL-6を大量に産生しているからだろうと示唆された。
⇒さらに強くTh17をインストラクトするためにプラス α のシグナルとしてCD70を介したこのシグナルも関与しているだろうということが解った。

[今後の展開]

- ・さらに詳しく解析することによってindependentなのかあるいは協調的にはたらいっているのかなどを解析する。それによって炎症性疾患に関わりうるようなTh17を誘導できるDCがどのような機能をもっているのか？さらにはabundantにあるTh17が炎症性腸疾患とどのように関わっているのか詳しく解析する。

抗菌ペプチドを用いた炎症性腸疾患治療法の開発

(分担研究者：高後 裕)

発表者：前本篤男

[背景]

- ・ヒト小腸上皮のクリプトの起点に paneth 細胞があり、そこに抗菌ペプチドの α -Defensins である HD5, HD6 がある。HD6 はほとんど抗菌活性がなく他の function があるのではないかと考えており、HD5 をターゲットとして様々な検討を行った。

[HD5 について]

- ・トランスジェニックマウスを用いた実験でサルモネラの内服をした後にワイルドタイプはサルモネラで死んでしまうが小腸のクリプトに発現された HD5 が発現されたトランスジェニックマウスでは生き残っており *in vivo* においても HD5 は抗菌活性物質として有効に働いていることが報告されている。

[IL-10K0 マウス]

- ・無菌状態の SPF の環境化で germ free で放っておくと腸炎を起こさないが、通常刺激では腸炎が発症する。種々のサイトカインによって Th1 優位の変化が起こり炎症が惹起されるのではと推測されており、このような観点からクローン病のモデルマウスになりうると考え検討を進めた。

[材料・方法]

①動物

- ・Wild type マウス
- ・IL-10K0 マウス

②腸炎の経過観察

- ・週を追うごとに (5, 7, 9, 11, 13, 15 週) 通常刺激環境化で腸炎がどのように変化していくか検討した。通常は IL-10K0 マウスは大腸炎が主のため小腸についてはあまり検討されてこなかったが小腸がどうなるかも検討することがこの実験系の目的の一つである。
 - 1) 体重、大腸重量、大腸長 (盲腸-肛門)、小腸長 (十二指腸-回腸末端) について検討
 - 2) 小腸、遠位大腸の組織を Berg らの Histological score を用い数値化し評価

[結果]

- ・腸管重量は IL-10K0 マウスでは増えている。
- ・小腸の Histological score (炎症の指標) も週齢を追うごとに増えている。
- ・ α -defensin の real time PCR をクリプト単位でクリプトを採取してきて α -defensin の m-RNA の発現を real time PCR で見てみると胎生期には非常に少ないが産まれてすぐには Wild type K0 マウスも非常に多くなり、週齢を追うごとに低下していく。さらに K0 マウスは優位に Wild type に比較して α -defensin の発現が低くなるのが解った。
 - ⇒小腸の炎症における原因の一つであることが示唆された。
- ・蛋白レベルでの cryptdin はマウス α -defensin であるが AU-PAGE においても cryptdin のサブファミリーは 6 つあるがいずれも Wild type で低下している。また、SDS-PAGE Western blot でも低下して見えている。よって蛋白の低下を認められる。
 - ⇒マウスにおいて IL-10K0 マウスは小腸の炎症は着目されなかったが小腸にも炎症は起こっている。かつ、それは、 α -defensin の m-RNA の低下に基づく蛋白の低下が炎症の原因の一つと推測された。一方クローン病は慢性の炎症性腸疾患であるがクローン病患者の小腸部分の陰窩は異常な陰窩が多く、かつ、各所の細菌刺激によるパネル細胞からの殺菌活性放出は優位にクローン病の患者さんで低いことがクローン病の原因の一つになっているのではないかとこれまで報告してきた。

[検討 1]

- ・クローン病の治療を考えたときに、蛋白を補充することが一つの治療になりうると考え recombinant 蛋白を作成した。
 - <特徴>
 - ・塩基性残基が多い、システイン結合がある、Mesorine 残基がない。

<問題点>

- ・recombinant 蛋白を用いた治療を考えたときに抗菌ペプチドであるためたくさん収益をえるには抗菌ペプチドで生産量が少ないという問題があり前回の班会議で種々の還元 refold をきちんとすればかなり収量が上がることを報告した。

[方法 1]

- ・ pET28a Recombinant vector を用いた Recombinant 蛋白の発現は、通常どおりのヒシツジンを用いて pET28a vector 大腸菌にトランスフェクトさせて発現して誘導し、蛋白を得る方法。

[DSS 腸炎における Recombinant HD5 投与]

- ・ DSS 腸炎モデルを用いて Recombinant HD5 投与が有効かどうかを検討したところ PBS を 6 日間 4%DSS を飲ませて生存率をみたところ HD5 を DSS 投与前に投与する群と DSS 投与後に投与した群とに分けて生存率をみたところ HD5 を投与していない群は比較的前例死亡したが前投与あるいわ後投与においては数匹生き残っているという結果であった。

⇒組織学的には大腸がコントロール群、HD5 高投与した群においても潰瘍は非常に激しいことが解ったが、小腸においては炎症の程度が軽微で比較することが難しく、点数化することができなかった。正確な評価は検討中である。回腸においても炎症が HD5 投与群においては比較的すみやかに改善している。DSS 腸炎のモデルで様々な検討をして投与方法や腸炎抑制効果を検討しているがクローン病をターゲットにしている IL-10KO マウスが HD5 の m-RNA に低下していることが元々にあったため、現在は IL-10KO マウスの自然発症腸炎モデルを用いて HD5 の投与でどのくらい抑制するかあるいわ改善するかということを検討している。

[まとめ]

- ① IL-10KO マウスにおいて明らかな腸炎発症以前に α -defensin m-RNA および蛋白発現の減少が認められた。
- ② Recombinant HD5 を E. coil/pET28a vector 系で発現させた。
- ③ DSS 腸炎モデルマウスにおいて、HD5 の前投薬あるいわ後投薬により、DSS 腸炎による死亡を妨げる例が認められた
⇒HD5 の経口投与による新しい腸炎治療の可能性が示唆された。

プロバイオティクス産生ペプチドを用いた新しい炎症性腸疾患治療の開発

(分担研究者：高後 裕)

発表者：藤谷幹浩

[背景・炎症性腸疾患の治療におけるプロバイオティクスの効果]

<過去の文献で効果が見られたもの>

UCではVSL。効果があるという文献と効果がまったくないという論文もある(クローン病においても)

⇒効果についてはまだはっきりしていないのが現状である。

<なぜ安定しないのか?>

- ・プロバイオティクスは効果を発揮するには生着する必要がある。その後、生理活性物質を出すなどの活性を発揮しなければならないが
⇒問題点として、腸内環境の個体差、腸内細菌叢の個体差、病原菌の影響、薬剤の影響等で生理活性、生着ができない。
⇒そこで、プロバイオティクスが産生する有効成分を同定し、作用機序を解明することでより効果的な治療が得られるのではないかとすることで検討した。

[プロバイオティクスに特異的な有効成分の同定]

- ・Bacteroides
- ・Lactobacillus
- ・Bacillus subtilis ⇒今回は下の2つを検討した。

[検討1]

- ・B. subtilis 菌の培養上清に作用があるか検討した。

[結果1]

- ・Cr release を見てみると B. subtilis 菌の培養上清により有意に Cr release が減る。
⇒つまり、細胞の防御が上がった。
- ・western blots で Hsp の発現を見たところ Hsp27 の発現が増加した。
⇒サイトプロテクトには作用があるのではないかとことが解った。

[検討2]

- ・培養上清の中にどういった component が有効成分か検討した。

[結果2]

- ・3kD のフィルターを使い molecular weight で分けたところ 3kD 以下の分画に主に Hsp の誘導能があることが解った。
- ・培養上清を 100°C で 20 分間ボイルしたが失活しない
- ・pepsin でトリートメントすると Hsp 作用が弱まることからペプチドで非常に短いもので熱に耐性ということが解った。

⇒B. subtilis 菌の遺伝子配列から有効成分の候補を割り出し Hsp27 誘導能を目安としてスクリーンを行った結果 Competence sporulation factor, CSF という物質が有効成分であることを同定した。

[Competence sporulation factor, CSF とは何か?]

- ・Quorum sensing molecules という細菌同士が情報交換に使う物質に一種である。
- ・Quorum sensing molecules は大きく 2 つに分けられる

①グラム陰性菌が使う Acyl-Homoserine Lactone Autoinducers

②グラム陽性菌が使う Oligopeptide Autoinducers

⇒CSF という物質は B. subtilis 菌が特異的に使う Quorum sensing molecules の一つでアミノ酸の配列は ERGMT という配列であった。

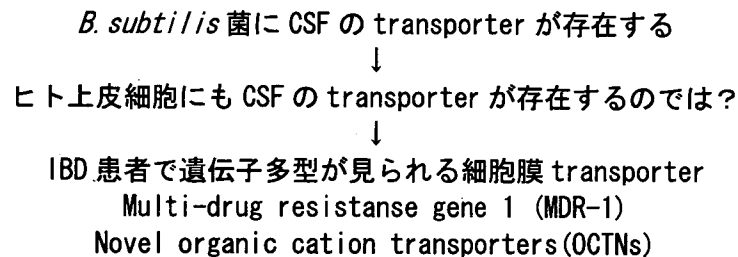
[CSF は Hsp27, pAkt, p38MAPK を誘導する]

- ・科学的に CSF を生成し、Hsp の誘導能をみたところ誘導された。その他の MAPK あるいは Akt の pathway を活性化するかみてみたところ pAkt を誘導し p38 のフォスホリレーションを誘導する。
⇒host の mammalian の cell ある程度、生理作用を持っているということが解った。

[CSF は酸化ストレスからヒト腸管上皮細胞]

- ・酸化ストレス化において Cr release assay を行ったところ *B. subtilis* 菌の培養上清で Cr release が減る。CSF をノックアウトした *B. subtilis* 菌の培養上清を使うと作用がなくなる。
⇒CSF の作用が強く示唆される。
- ・化学合成した CSF でも同様の細胞防御作用をもつことが解りこの物質が有効成分であることを確認した。

[CSF の作用機序は?]



[CSF はヒト腸管上皮細胞に吸収される]

- ・FIT-C 標識した CSF では Caco2 cells に incubate すると 15 分後に細胞内へ取り込まれることがわかった。これを OCTN2 の阻害剤で阻害すると取り込みが落ちる。
⇒OCTN2 の関与が示唆された。

[OCTN2 過剰発現細胞では CSF の吸収が増加する]

- ・HSWP cells に OCTN2 をトランスフェクションさせ overexpressed 株を作り、これに対してアイソトープでラベリングした CSF の uptake の試験を行ったところ、overexpressed 細胞で有意に uptake があがることから取り込みには OCTN2 が関与していることが示唆された。

[OCTN2 siRNA は CSF の Heat shock protein 誘導作用を打ち消す]

- ・CSF の Hsp 誘導作用に OCTN2 が関与しているか確かめる目的で OCTN2 siRNA を用いた。Si RNA を incubate していない時は Hsp が誘導されるがトランスフェクションしてやると Hsp の誘導能は落ちることが解った。
⇒Hsp 誘導作用に OCTN が仲介していることが解った。

[CSF は Hsps を誘導し、酸化ストレスからマウス腸管上皮細胞を保護する]

- ・マウスの腸管を取り出し CSF でインプレッションすると 2 時間後に Heat shock protein が小腸、大腸共に誘導される。特に小腸では Hsp70 の非常に強い誘導がされる。これを OCTN2 のインヒビターを使って同じように行うと誘導が抑えられることが解った。
- ・マーニトルフラックス試験は細胞のタイトジャンクション能を調べる試験だが、この能力がさがればタイトジャンクションが強いことをあらわすが、CSF を前処置したマウスで酸化ストレスを与えるとフラックスは下がる。
⇒細胞防御能が非常に高くなることが言える。
- ・同様にインヒビターを使うと細胞防御能が発揮されなくなる。
⇒OCTN2 が関与していることが示唆された。しかし、現在は OCTN2 の KO マウスがないことから確実な OCTN2 の関与は確認されていない。

[まとめ 1]

- ・CSF (ERGMT) というアミノ酸配列は *B. subtilis* 菌から分泌され OCTN2 から取り込まれてサイトプロテクトな変化を起こすことが示唆された。

[炎症のモデルではどうか？]

- ・ DSS 腸炎マウスに CSF を注腸し効果を検討したところ 24 時間後に sacrifice した場合、histological に明らかな粘膜の改善を認めた。

[CSF は腸管上皮細胞において TNF α による CXCL-1 の誘導を抑制する]

- ・ CSF を 24 時間転換した後に protein array を行った。これはおもにケモカイン、サイトカインの protein array であるがこの結果で TNF α に誘導される CXCL-1 このケモカインが CSF によって抑えられる。これによってたぶん抗炎症作用が発揮されるのではないかと予測している。
- ・ 同様の結果を western blots でとると Caco2 cells を TNF α 、CSF、両方、あるいはどちらか一方で刺激した結果、TNF α で誘導される CXCL-1 は 100nM CSF で抑制されることが解った。

[まとめ 2]

- ・ CSF は腸管上皮細胞からの CXCL-1 分泌を抑制し、腸管炎症に対して抗炎症作用を持つ可能性がある。
⇒これはまだ完結していない実験だがこれから考えて進めていく。

[Lactobacillus]

- ・ 同様の検討を進めている。
- ・ 有効成分の同定を試みているが 1 種類（パブリッシュしていないため Peptide Y）にも CSF とほぼ同様の細胞保護作用があるというデータを得ている。
⇒今後も検討していく予定である。
⇒Peptide Y は At 経路を活性化する。

[今後の検討課題]

- ①各種腸炎モデルにおける CSF or Peptide Y の効果と有害事象を確認する。
- ②アミノ酸側鎖の修飾や配列の組換えによる CSF or Peptide Y の効果の違いを調べる。
- ③遺伝子組み替え技術により、CSF or Peptide Y 高産生プロバイオティクス株を樹立する
- ④CSF or Peptide Y 自身、あるいは高産生プロバイオティクスを用いて炎症性腸疾患治療の臨床試験を行う
- ⑤*Bifidobacterium* 属など他の菌種から、有効成分を同定する。

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：武田宏司

[マクロファージ遊走阻止因子：MIFについて]

- ・ MIF は炎症、免疫応答、細胞増殖他、様々な機能を持つユニークな蛋白である。
- ・ MIF は炎症性疾患への関与や、実験炎症モデルにおいて抗 MIF 抗体による炎症の抑制が報告されている。さらに炎症性腸疾患においても MIF が高発現であることや、実験腸炎モデルにおいて MIF の発現が増強することで炎症が悪化し、抗 MIF 抗体投与により炎症が軽快することも確認されている。
- ・ MIF が T cell-like receptor (TLR) 4 を制御することや、Inadequate immunity への関与も報告されている。
- ・ これまでに DSS 腸炎において MIF が組織で増えている、あるいは抗体を投与することによって腸炎を抑えることができることで腸炎に対して MIF が悪さしていることは見つけている。

[問題点]

- ・ ヒトにおいてはデータは不十分であるが血清レベルで増えてるとか、GCAP 後には血清レベルが下がることがあるのでヒトにおいても MIF が IBD に関与していると考えているが臨床応用するにあたって色々壁が立ちほだかっている。
⇒メーカーと共同で抗体を持っておりヒト化型抗体あるいはキメラ型抗体を開発しようと考えていたが、特許の絡みがかんじがらめになっており中断している。
⇒低分子化合物においては製薬企業がターゲットにしているがレセプターその他、細胞内、細胞膜表面上でのターゲットがまだ明確でないことから候補化合物をアメリカ等でもでているがまだものになっているものはない。
⇒まったく新しいものとして、ワクチンとヒンガンはヒトに応用できるかどうかまだまだ未改良である。

[MIF ノックアウトマウスでの検討]

- ・ ノックアウトマウスではまったく腸炎が起きないことがわかったがその過程で Heat shock protein というのは非常に増えている。この増えた Heat shock protein がもしかすると腸の炎症を抑えているのではないかと考えた。特に HSP40, HSP70
⇒しかし、これらの方法がうまくいかない。
⇒そのため、熱ショック蛋白をターゲットに検討した。

[熱ショック蛋白の検討]

- ・ 安全に誘導できる物質として胃薬 (GGA) を使って実験した。

[結果]

- ・ GGA によって HSP70 が誘導された。
- ・ 腸炎が抑えられるということがわかった。
⇒しかし、用量がヒトに使う量よりもかなり多いことが問題点である。

[GGA の臨床試験]

- ・ 常用量の3倍量にて臨床試験を計画。これは血中濃度の in vitro の HSP の誘導能の濃度と血中濃度の関係が3倍量と考えていたがメッセージレベルでも蛋白レベルでも HSP70, HSP90 が増えることが確認できたがヒトに対する安全性がまったくデータがないことから会社とも相談したがどうしてもクリアしきれない。
⇒倫理委員会で問題になり今のところ倍量に変更し、再投与の計画している。
⇒倍量については安全性のデータがあることと、医師の裁量の範囲内で倍量までは許されているため。
⇒しかし、胃の粘膜においては常用時で HSP が誘導されることが筑波より報告されているため、おそらく腸でも確認できるのではないかと考えている。

[MIF ワクチン]

- ・ 従来型タンパクワクチンでなく DNA ワクチンを考えている。ヘルパーT細胞で認識されるペプチドの構造を含んだ遺伝子を挿入している。マウスの体内で産生されてくる MF タンパクの一部に ThF と結合した組換えタンパクができる。

⇒T細胞は強く認識して自動的にマウス体内に対してMIFに対する抗体ができる。

[Helper T(Th) Epitope insertion into MIF]

- ・ テトラドオキシンのアミノ酸配列を挿入した構造のプラスミドを作った。

[MIF DNA ワクチン投与方法]

- ・ 皮内・筋肉内：100 μ g \times 2カ所 6~7回投与
- ・ in vivo electroporation：25 μ g \times 2カ所 1回投与

[MIF ワクチン投与後の血清抗MIF抗体価の変化]

- ・ 4週で明らかな上昇が見られて、その分持続していることが解った。

[MIF Th-epitope DNA vaccine のマウスデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導大腸炎に対する予防効果]

<方法>

1. 大腸炎は3%DSS水溶液を7日間Balb/cマウスに自由放水させ発症させた。
2. Balb/cマウスは無治療群、MIFDV投与後抗体価が上昇した群とpCAGGSを投与した(control)に分けた。
3. 治療効果の判定はDSS投与7日後の臨床症状、肉眼所見、組織学所見を用いた。

<結果>

—臨床症状—

- ・ DSS投与時にcontrol群に比べMIFの組換え遺伝子を含んだプラスミドではDisease Activityは有意に抑えられた。

—マクロ所見及び組織学的所見—

- ・ 同様にこの系ではstrategyは有効であると示唆される。

[結語]

- ・ MIF Th-epitope DNA ワクチンによりDSS腸炎が有意に抑制された。
- ・ ワクチン摂取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。
- ・ 今後の課題としては、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の解明、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：臨床試験に向けて

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⁺CD25^{high}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。

[目的]

- ・UCに対する血球成分除去療法を改良し、colitogenicなeffector細胞のみを除去し、Tregを保存する新規治療法を開発する。

[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:CFLA)を施行し、除去された白血球よりTregを分離し、患者へ輸注する。
- ・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磁気ビーズによる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⁺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産物(LP)から、ChiniMACS CD8 reagent、ChiniMACS CD19 reagentを用いてCD8⁺細胞、CD19⁺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⁺)CD25⁺T細胞の分離を行う。
⇒これまで、計5回の分離実験を行ったので報告する。

[結果]

- ・計5回の分離実験を行った結果、L.Pにおいては平均で1.96%CD4⁺CD25^{high}のTregが含まれており、それをChiniMACSで分離することにより平均で56.6%と濃縮が可能であった。また、その回収率は67.8%と比較的良好な値を得ることができた。
- ・Tregの特異的マーカーであるFOXP3⁺細胞の割合は、L.PにおいてはCD4⁺細胞中、FOXP3⁺細胞の割合が5.5%であり、分離後には56.4%と良好な濃縮が得られた。次にChiniMACSを用いて分離されたTregの免疫制御活性は、抗CD3抗体をAPCで刺激したときの通常のCD4⁺細胞の増殖を100とするとTregは20%弱、刺激に対する不応答性というTregの特徴の一つが見られている。またCD4⁺とTregを共培養することによりCD4⁺細胞の増殖が有意に低下しておりTregの免疫制御活性がin vitroで確認できた。以上の結果よりL.Pから無菌的に大量に機能を保持した形でTregが回収できると考える。

[ChiniMACS試薬のCE認証状況]

- ・CD19beads：取得済
- ・CD8beads：取得済
- ・CD25beads：審査中
⇒CD25beadsのCE認証後、臨床試験プロトコルを九州大学倫理委員会へ申請予定

<UCに対する血球成分除去・Treg分離移入療法～臨床試験計画の概要～>

[目的]

・UCに対する血球成分除去・Treg分離移入療法の安全性を確認する。

[対象]

- ・以下の基準を満たす UC 患者
 - ①20 歳以上
 - ②中等症～重症
 - ③左側大腸炎型、全大腸炎型
 - ④文書による同意を取得可能

[除外対象]

- ①アナフィラキシーの既往
- ②アレルギー疾患の既往
- ③薬剤、食事によるアレルギー歴
- ④妊婦、授乳中の患者

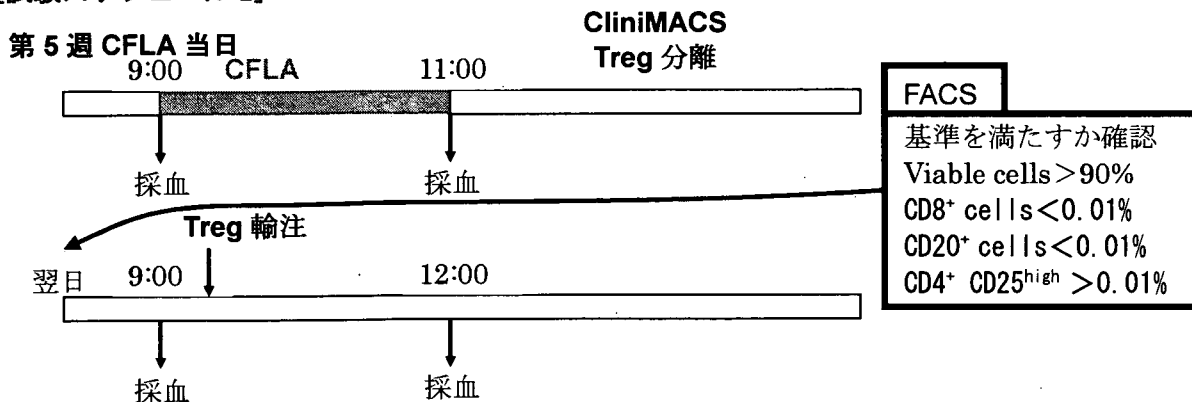
[方法]

- ①Treg 分離
 - ⇒第5週目の CFLA に引き続き行う。
 - ⇒LP から、CliniMACS を用いて Treg を分離し 4℃で保存する。
- ②Treg 移入
 - ⇒翌日、点滴静注にて輸注を行う。

[試験スケジュール 1]

	1W	2W	3W	4W	5W	6W
CFLA	●	●	●	●	●	
Treg 分離・移入					●	
副作用	●	●	●	●	●	●
CAI	●	●	●	●	●	●
大腸内視鏡	●					●
採血	●	●	●	●	●	●
FACS					●	

[試験スケジュール 2]



【調査項目】

- ①患者背景：年齢、性別、診断、既往歴
- ②副作用の有無
- ③CAI
- ④大腸内視鏡検査所見
- ⑤血液検査（血算、生化学、CRP、血清 Fe、UIBC、フェリチン、抗核抗体、IgE）
- ⑥FACS：CD4, CD8, CD25, FOXP3

【まとめ・今後の方針】

- ・UC患者からのLPより臨床応用可能なグレードで大量にかつ機能を保持した状態でTregが分離可能であった。
- ・CliniMACS CD25 beads のCEが取得された後に血球成分除去・Treg分離移入療法の臨床試験プロトコルを九州大学倫理委員会に提出予定である。