

バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療

ポリ乳酸マイクロカプセルを用いたステロイド封入カプセルによる難治性潰瘍性大腸炎治療の臨床試験  
(分担研究者：岡崎 和一)

発表：松下光伸

[背景]

- ・今まで、我々は、高分子バイオマテリアルのポリ乳酸を用いた免疫調節剤封入（ステロイド、免疫陽性剤、生活活性物質）マイクロカプセルの開発を進めてきた。マイクロカプセルの大きさは4 $\mu$ で、この大きさが最も粘膜免疫担当細胞に効率的に貪食され、その機能を抑制する。
- ・in vitroの実験では、およそ1日~2日にかけて薬剤が徐放されてくる。In vivoにおいては、通常の水溶性デキサメサゾンでは1時間程で血中に検出されるが、デキサメサゾン封入マイクロカプセルでは、殆ど血中には検出されない。したがって、より全身的な副作用の少ない薬剤であると言える。
- ・DSS腸炎に対する検討  
⇒水溶性デキサメサゾン群、デキサメサゾン封入マイクロカプセル群は、有意な腸炎スコアの軽快が認められた。又、1日おきに投与しても同様の効果が得られた。

[研究計画]

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

[目的]

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

[対象]

- ・ステロイド抵抗例：1例、ステロイド依存例：3例の計4例の難治性潰瘍性大腸炎患者に投与
- ・説明文と同意書による同意を取得

[患者背景]

- ・年齢：平均36.7歳（26-47）
- ・性（M/F）：2/2
- ・病形：全大腸炎型 2/4、左側大腸炎型 2/4
- ・罹病期間：平均6.7年（6-7）
- ・入院回数：平均4回（3-5）

[方法]

- ・全大腸型患者（n=2）にデキサメサゾン封入ポリ乳酸マイクロカプセル（DxMC）840mg/day（1mgのDxを含む）を4週間隔日経口投与
- ・左側大腸炎型患者（n=2）にDxMCを840mg/dayを、4週間隔日注腸投与

[治療評価]

- ・投与前、2週後、4週後に、1.臨床スコア 2.大腸内視鏡所見 3.血液、生化学、尿を効果及び副作用を評価する。

[症例の結果]

- ①ステロイド依存例（有効）26歳、男性：左側大腸炎型、DxMC注腸投与  
投与前：深い潰瘍が見られた  
投与4週間後：潰瘍は著明に軽快し、臨床スコアも著明に軽快した。
- ②ステロイド依存例（効果不明）47歳、男性：全大腸炎型、DxMC経口投与  
・ステロイド減量のリバウンド、CMV感染を合併し結果的にDxMCの効果は不明

- ・大腸内視鏡所見では投与前に比較すると2週後では潰瘍周辺の浮腫は軽快し、全体的な粘膜の易出血性も軽快傾向であると思われる。

③DxMC 投与による CAI と炎症所見の変化

- ・ステロイド抵抗例では1例でCAIの変化が認められず手術となった。
- ・WBC、赤沈、CRPの炎症所見においては全体的には軽快傾向にあると思われる。

④DxMC 投与による生化学の変化

- ・血糖、BUN、ALT、LDHは特に有意な悪化は認められなかった。

【結果】

- ・臨床スコア(CAI)：改善1/4、不変1/4(ステロイド抵抗例)、不明2/4(ステロイドリバウンド・CMV)
- ・大腸内視鏡所見：改善1/4、不明3/4(手術・リバウンド・CMV)
- ・DxMC副作用：なし4/4

【結語】

- ①難治性潰瘍性大腸炎4例に、DxMCを投与した。ステロイド抵抗患者1例、ステロイド依存患者3例
- ②DxMCの効果
  - ・ステロイド抵抗患者：効果が乏しかった
  - ・ステロイド依存患者：1例で有効、2例で効果不明であった
  - ・明らかな副作用はなかった。
- ③DxMC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検討する

リポ化ステロイドを用いたドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患の治療：

多施設共同による無作為化並行群間試験案

(分担研究者：岡崎 和一)

発表者：松下光伸

[リポ化ステロイドについて]

- ・現在、本邦で市販されている薬剤としてはパルミチン酸デキサメサゾン、製品名リメタゾンがある。
- ・特性
  1. デキサメタゾンをパルミチン酸エステルとして脂溶性を高め、ダイズ油に溶解した乳濁製注射液である。
  2. 生体内でエステラーゼにより緩徐に加水分解を受け活性代謝物であるデキサメタゾンになり、持続的な抗炎症作用を示す。
  3. 炎症部への分布が高く、炎症部マクロファージに積極的に貪食され、そのマクロファージの中で溶解し、マクロファージ機能を効率よく抑制する。従って、薬剤投与量の軽減化により、副作用が軽減される。
  4. 副作用発現率は、2.73% (106例/3883例)で、主な副作用は動悸 (0.39%)、顔面発赤 (0.31%)、しゃっくり (0.31%)、そう痒感 (0.28%)、満月様顔貌 (0.26%)、白血球増多 (0.23%)、発疹 (0.18%) 等で、重篤なものは無かった。
- ・リメタゾンの保険適応と禁忌  
適 応：慢性関節リウマチ  
禁 忌：本剤成分に過敏症の既往歴のある患者  
原則禁忌： 1. 有効抗菌剤のない感染症、全身真菌症の患者 2. 消化性潰瘍の患者 3. 精神病の患者  
4. 結核性疾患の患者 5. 単純疱疹性角膜炎の患者 6. 後嚢白内障の患者 7. 緑内障の患者  
8. 高血圧症の患者 9. 電解質異常のある患者 10. 血栓症の患者  
11. 最近行った内臓の手術創のある患者 12. 急性心筋梗塞を起こした患者
- ・組成・性状  
有効成分：(1管1ml中) パルミチン酸デキサメタゾン 4.0mg (デキサメタゾンとして 2.5mg)  
添 加 物：精製ダイズ油 100mg  
精製卵黄レシチン 12mg  
濃グリセリン 22.1%  
水酸化ナトリウム適量  
塩酸適量  
性 状：白色で軽粘性の乳濁液で、軽度特有な臭いあり  
pH : 6.6-8.5  
浸透圧比：約1 (生理食塩液に対する比)
- ・リメタゾンの副腎皮質機能に及ぼす影響  
<1ml 単回投与後の血漿コルチゾール値>  
⇒1日目にはコルチゾール値が低下し副腎機能の抑制が見られるが、2~3日程で正常に戻る。  
<1ml を2週間おきに投与した場合の血漿コルチゾール値>  
⇒保険適応である2週間おきの投与においては、副腎機能に与える影響はなかった。
- ・難治性炎症性腸疾患に対するリメタゾンの有効性  
⇒以前に難治性炎症性腸疾患 (UC7例、CD4例、BD2例) に対するリメタゾンの有効性を報告している。
  - 治療前と比較し難治性であるがリメタゾンを投与することによって著明な軽快が認められた。
  - クローン病に合併した難治性の壊疽性膿皮症に対し、著明に軽快した。
  - 腸管型ベーチェット病においても治療前は口腔内、及び咽頭口頭に潰瘍があり、尚且つ、回腸末端に深掘れ潰瘍が認められたが通常ステロイド内服、静注では口腔内の潰瘍は軽快したが、あまり効果が得られなかった回腸末端の潰瘍に対し、瘢痕化を得ることができた。

[研究課題]

- ・リポ化ステロイドを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療・多施設共同による無作為化並行群間試験 (関西医科大学医学倫理委員会 第0636号 承認)

[目的]

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

**[対象]**

- ・活動期炎症性腸疾患（重症例は除く）  
潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管型ベーチェット病
- ・ステロイド依存例  
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

**[方法]**

- ・対象患者に説明書と同意書による同意を取得
- ・疾患別に下記治療法を無作為化

**[治療法]**

- ① 従来の全身的ステロイド剤投与量を再増量
  - ② 従来の全身的ステロイド剤投与量を変更なく、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  
⇒リメタゾン投与量（プレドニゾン換算）  
投与開始前1ヶ月間は2.2mg/日、以後の2ヶ月間は1.1mg/日にあたる
- 3ヶ月間施行し2週毎に有効性を評価  
⇒投与開始2週後  
有効：従来の全身的ステロイド剤の投与量を減量  
無効：他の治療法に変更

**[治療評価]**

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

**[参加施設]**

- ・本研究に協力して頂ける、「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する調査研究」班に属する臨床の班員の先生方の所属施設、及びその他の参加御協力施設

合成 Retinoic acid receptor agonist の樹状細胞分化に対する影響  
IL-12 低産生性樹状細胞の誘導

(分担研究者：日比 紀文)

発表者：久松理一

[背景]

- ・合成 Retinoic acid receptor agonist は市販されている薬であり、臨床試験が CD で開始されている。
- ・Vitamin A は Retinol から 2 つの酵素を介して ATRA になり、ATRA は APL の分化誘導剤として白血病の治療剤として治療に用いられている。今回の Am80 は合成の RAR receptor に対する agonist であり、一般名はタミバロテン、製品名はアモノレイクであり、APL に対する治療薬として既に認可されている。現在、CD と多発性骨髄腫に臨床試験が開始中。

[目的]

- ・Am80 の樹状細胞の分化における役割、影響と DSS 腸炎に対する効果について検討

[検討 1-1]

- ・DCs に対する影響はビタミン D などはかなり行われているが Retinol に関しては行われていないので分化誘導に影響を及ぼすだろうという仮説のもとにヒトの CD14 から DCs を誘導し、合成レチノイドがあるなしで分化誘導に差があるのではないかとということを実験した。できあがった DCs に関しては形態学的にあるいはサイトカイン産生及びそのメッセージ、T-cell に対する Th-1 誘導能について検討。

[結果 1-1]

- ・ヒトの CD14 の末梢血単球を DCs に分化誘導すると浮遊の樹状細胞ができてくるが分化段階で合成 Retinoid を加えると非常に凝集して付着して紡錘系の形の DCs が出来上がる。
- ・細胞表面マーカーでも CD1-A と CD1-D の発現がまったく逆のパターンをとる。CD86 などの抗 stimulatory molecule が変わってくるということがすでに解っている。
- ・サイトカイン産生を LPS 刺激でみたものでは合成 Retinoid で分化誘導した DCs では IL-12 の産生が低下していることが解った。IL-12 の活性型の IL-12p70 とそのメインのサブユニットである IL-12p40 も低下している。IL-23 については有意差はないが低下する傾向は認められた。
- ・mRNA においては IL-12p40 の mRNA が有意に低下することがわかった。

[検討 1-2]

- ・機能的な作用機序の違いがあるか出来上がった DCs2 種類に Naive T-cell をコカルチャーし、サイトカインの産生能を検討した。

[結果 1-2]

- ・通常の DCs では IFN- $\gamma$  産生型いわゆる Th-1 誘導されるような T-cell が誘導されるが合成 Retinoid を加えて分化させた DCs を用いると IFN- $\gamma$  産生の T-cell が減少することが解り、IL-12 が抑制されることで Th-1 誘導が抑えられるような DCs が出来上がっているのではないかと考えられた。

[検討 2]

- ・マウスの実験では DSS 腸炎モデルを使用した。DSS 投与 2 日前から薬剤とコントロールのミークルを投与した。

[結果 2]

- ・腸管長は投与群では腸管の短縮が改善されており、腸管の肥厚を腸管の重量で検討したところ肥厚も軽減していることがわかった。
- ・組織学的所見においても、合成 Retinoid 経口で投与した群では組織学的な損傷が少ないことがわかった。
- ・問題点としては DSS モデルを経口で行うということは、合成 Retinoid に関しては上皮に対して Tight Junction の Protein を上げ、Barrier Function を上げるということもわかっているため、我々が invitro で示した Th1 誘導を抑えることによって in vivo の結果が出ていると解釈するのはまだ早いかもしれない。おそらく上皮に対する影響もあると考えられると思われるので、モデルを変えることとビタミン A を欠損した飼料で飼育した

マウスを用いて腸管の樹状細胞が機能変化をおこすのではないかとこの仮説の元で追加実験を行っている。

CXCR4 阻害剤の炎症性腸疾患治療への応用

(分担研究者：千葉 勉)

発表者：沖瀬裕志

[背景]

腸管内の抗原が一番の Trigger になっているが、抗原が腸管粘膜に入ることにより、上皮組織の障害がおこる。これは、過剰な抗原にさらされてしまうと immune cell がいろいろなサイトカインを放出してしまい上皮を攻撃し、上皮の傷害が起こってしまうとまたさらに抗原の流入がおこるということである。この中でどこをターゲットにするかということであるが、抗原に対しては Probiotics・抗生物質であり、マクロファージを叩けば例えば抗原提示細胞とマクロファージ・DCs を抑えれば炎症は起こらないであろう。あるいは T-cell・B-cell を抑えれば炎症は持続しないであろうと考えている。実際に白血球除去も行われているが、とにかく粘膜局所にこのような細胞が集まらないようにすれば、炎症はおこらないのではないか。つまり、このような細胞が集まってこなければ腸炎はおこらない。根本的なところとは少し離れるが 2 次的なところをブロックすればいいのではないかという概念がある。

・白血球の遊走に関する分子を制御すればいいのではないだろうか？

⇒ケモカイン

- ① 分子量 10kD 前後の主として塩基性・ヘパリン結合性サイトカインの一群である。
- ② ヒトでは 45 種類のケモカインと 19 種類のレセプターが同定されている。
- ③ ケモカインは様々な体細胞から構成的あるいは誘導性に産生される。
- ④ 白血球の遊走を主作用とする
- ⑤ 二種類の膜結合型分子も存在。

・いろいろなケモカインがあり、CXCCXC3CC...などがあるが、我々がおこなっているのは CXCL16 というケモカインと今回報告する CXCR4 を刺激する 12 のインターアクションである。

・ケモカインには可溶性ケモカインと膜結合性ケモカインがある。

・今回のターゲッティングは CD4 陽性 T 細胞 (CD8 を含めた)、T 細胞をメインとし、コントロールするとどうなるか検討した。

<CXCL12-CXCR4 Axis>

・いわゆる SDF-1 のことである。これは元々骨髄でストロマーセルから産生され骨髄から出る細胞 CD8 をトラフィックする機序を持っている。癌の分野でも研究されており、癌細胞は CXCR4 陽性が多く転移にも関わっており、色々な細胞の遊走に関わっているケモカインの Axis である。

・CXCR4 はリンパ球、単球、好中球などのさまざまな白血球に定常状態で発現しておりこれら血球細胞の移動、遊走に関与している。

・近年、CXCL12/CXCR4 系が慢性関節リウマチをはじめとする慢性炎症性疾患の病態に関与しているとの報告がなされた。

・炎症性腸疾患の病態における CXCL12/CXCR4 系の関与についてはいまだ不明である。

[検討 1]

・炎症性腸疾患の病態生理における CXCL12/CXCR4 系の関与の検討

[結果]

・ヒトでの試験において白血球除去療法等治療後の潰瘍性大腸炎患者群の T-cell では CXCR4 の発現はコントロール群と比べかなり上がっている。オペしたヒトは CXCR4 の発現は高かった。また、クローン病においても同様の結果が得られた。

・LCAP 後は良くなったヒトは CXCR4 の発現は下がっている。しかし、Non responder 群では変わらない。

⇒LCAP は CXCR4 の発現を調節するのではなく LCAP によって良くなったら発現が下がるといったデータである。

・CAI は CRP とは相関しないが CXCR4 の intensity は意外と相関する。CRP より、CXCR4 のほうが CAI により相関していると考えられる。

⇒新たな治療効果のマーカーになるかもしれない。

[検討 2]

・腸炎モデルマウスでの検討

## [方法]

### — 評価方法 —

- ・ DSS 腸炎マウスの末梢血液中の血球細胞上の CXCR4 の発現をフローサイトメトリーを用いて検討した。大腸組織内での CXCL12 の発現を蛍光免疫染色検査、および Real-time PCR 法を用いて検討した。7 日、8 日目でなく 10 日目に sacrifice し、立ち上がりを見ているのがこの実験のポイントである。

## [結果]

- ・ 経時的に見ると DSS の初期で Gr-1 の MAX はもっと上がる。しかし、10 日ぐらいになると Nomal と変わらなくなる。ところが CD4T cell と B220 cell は後半になると上がってくる。  
⇒ DSS は後になるとリンパ球系の方が有意に末血で増えてくるのが解っている。ここをブロックすればおそらく腸炎は sustain しないのではないかと考えられる。
- ・ CXCL12 を GFP でラベルして作ったマウスでは正常マウスでも CXCL12 は腸管に発現しており腸炎を引き起こすと非常にたくさん出てくる。PCR で見てもその発現は確認されている。  
⇒ 炎症が起こると CXCL12 が増えてくるのが解った。
- ・ 以上を概念としてまとめると、炎症が起こると CXCL12 は増えてきておそらくリンパ球 (CD4 陽性 T 細胞だけではないが) が引き寄せられるのではないかと考えられる。

## [検討 3]

- ・ マウス : 8 から 12 週の C57BLS マウスを用いて検討。

### < DSS 腸炎の治療プロトコール >

2.5% の DSS を 5 日間自由飲水させる。その後、水に切り替え、5 日間飼育し、DSS 投与後 10 日目にマウスを検討した。CXCR4 の拮抗物質である TC14012 は DSS 投与前日より 1 日 2 回 25  $\mu$ g 腹腔内注射した。

### < 評価 >

DSS 腸炎における TC14012 の効果についてはマウスの体重変化、腸管長、腸管膜リンパ節の細胞数、および腸組織における炎症の程度で評価を行った。

## [結果 3]

- ・ 治療群と無治療群でブラックで DSS をかませてしばらく経つとリンパ球系が有意に進入するようである。初期は mucosal injury が強いが後半はホリプルが目立つようになる。ほおっておくと慢性の腸炎が起こる。治療するとホリプルが減ってくる。このことからたぶん、末血のデータと合わせると CXCR4 と CXCL12 をブロックするというのはリンパ球系を抑えるものではないかと考える。
- ・ 治療すると CD4、CD8 で染めると当然減ってくる。  
⇒ 治療するとリンパ球の浸潤は抑えられる。
- ・ IL-10 の産生については TC14012 投与群のほうが、PBS 投与群に比べ有意に高かった。一方、IFN- $\gamma$  の産生については、TC14012 投与群のほうが、PBS 投与群に比べ有意に低かった。

## [結語]

この blocking agent を使うことにより、CXCR4 CXCL12 axis 系を抑制することが腸炎の改善につながる可能性が示唆された。CXCR4 の阻害剤は IBD に対する新しい治療法の 1 つになると考えられる。



事務局連絡

[今後の予定]

平成19年

- ・4月：交付申請書提出
- ・7月27日（金）：平成19年度 第1回総会
- ・8月上旬：分担研究費振込み

平成20年

- ・2月1日（金）：平成19年度第2回総会 ※2月15日（金）に変更
- ・2月22日（金）：分担研究者報告書類提出 締め切り
- ・3月7日（金）：収支決算報告書類提出 締め切り

厚生科学研究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」  
平成19年度第2回総会プログラム

(敬称略)

開会 (13:00)

I. 厚生労働省健康局疾病対策課御挨拶

II. 主任研究者挨拶・研究の進め方 班長：岡崎和一

III. 研究報告

◎ 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立 (13:20~14:20)

1) 腸管上皮再生の分子基盤と治療への応用 (分担研究者：渡辺 守)

○ 土屋輝一郎、岡本隆一、中村哲也、金井隆典、渡辺 守 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学)

2) 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)

○ 鈴木健司<sup>1</sup>、河内裕介<sup>1</sup>、孫 曉梅<sup>1</sup>、青柳 豊<sup>1</sup>、藤井庄人<sup>2</sup>、米山博之<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野、<sup>2</sup>ステリック再生医科学研究所)

3) 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)

坪内博仁<sup>1,2</sup>、○井戸章雄<sup>1,2</sup>、沼田政嗣<sup>2</sup>、山路尚久<sup>2</sup>、藤田 浩<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学、<sup>2</sup>京都大学医学部付属病院探索医療センター)

4) 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)

岡崎和一<sup>1,3,4</sup>、○安藤祐吾<sup>1,2</sup>、稲葉宗夫<sup>2,4</sup>、坂口雄沢<sup>1,2</sup>、内田一茂<sup>1</sup>、松下光伸<sup>1</sup>、池原進<sup>2,4</sup>

(<sup>1</sup>関西医科大学内科学第三講座、<sup>2</sup>同 第一病理、<sup>3</sup>同 再生医学難病治療センター、<sup>4</sup>同 癌治療センター)

◎ 腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発 (14:20~15:20)

5) 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)

○ 竹田 潔 (大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座免疫制御学)

6) 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)

- 前本篤男<sup>2</sup>、田邊裕貴<sup>2</sup>、金野陽高<sup>1</sup>、石川千里<sup>1</sup>、伊藤貴博<sup>1</sup>、藤谷幹浩<sup>1</sup>、蘆田知史<sup>1</sup>、高後 裕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野、<sup>2</sup>旭川医科大学消化管再生修復医学講座)

7) プロバイオティクス由来ペプチドによる新規炎症性腸疾患治療の開発

(分担研究者：高後 裕)

- 藤谷幹浩<sup>1</sup>、岡本耕太郎<sup>1</sup>、奈田利恵<sup>1</sup>、上野伸展<sup>1</sup>、盛一健太郎<sup>1</sup>、佐藤 龍<sup>1</sup>、田邊裕貴<sup>2</sup>、前本篤男<sup>2</sup>、蘆田知史<sup>1</sup>、高後 裕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野、<sup>2</sup>旭川医科大学消化管再生修復医学講座)

8) 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)

- 大川原辰也、桂田武彦、武田宏司、浅香正博 (北海道大学大学院医学研究科消化器内科学)

#### ◎ 選択的細胞除去・移入療法の開発 (15 : 20~15 : 35)

9) 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：臨床試験に向けての進捗状況と in vitro での培養増殖・誘導実験の報告 (分担研究者：中村和彦)

- 中村和彦<sup>1</sup>、隅田頼信<sup>1</sup>、金山兼司<sup>1</sup>、荻野治栄<sup>1</sup>、秋穂裕唯<sup>1</sup>、豊嶋崇徳<sup>2</sup>、赤司浩一<sup>2</sup>、高柳涼一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院病態制御内科学、<sup>2</sup>九州大学病院遺伝子・細胞療法部)

#### ◎ バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療

(15 : 35~16 : 05)

10) ポリ乳酸マイクロカプセルを用いたステロイド封入カプセルによる難治性潰瘍性大腸炎治療の臨床試験 (分担研究者：岡崎和一)

- 岡崎和一<sup>1</sup>、○松下光伸<sup>1</sup>、深田憲将<sup>1</sup>、内田一茂<sup>1</sup>、川股聖二<sup>1</sup>、安藤祐吾<sup>1</sup>、大宮美香<sup>1</sup>、藤井寿仁<sup>1</sup>、大植謙一<sup>2</sup>、廣田育彦<sup>2</sup>、田畑泰彦<sup>3</sup>、仲瀬裕志<sup>4</sup>、千葉 勉<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>関西医科大学内科学第三講座、<sup>2</sup>同 薬剤部、<sup>3</sup>京都大学再生医科学研究所、<sup>4</sup>同 医学研究科消化器内科学)

11) 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難治性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 (分担研究者：岡崎和一)

岡崎和一、○松下光伸、深田憲将、内田一茂、川股聖二、安藤祐吾、大宮美香、藤井寿仁  
(関西医科大学内科学第三講座)

◎ 新しいコンセプトによる治療法開発 (16:05~16:35)

12) 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)

○ 久松理一、安藤綾俊、岡本 晋、井上 詠、緒方晴彦、岩男 泰、日比紀文  
(慶應義塾大学医学部消化器内科)

13) 炎症性腸疾患の治療における CXCL12/CXCR4 系の意義 (分担研究者: 千葉 勉)

○ 仲瀬裕志、西尾彰功、千葉 勉 (京都大学大学院医学研究科消化器内科学)

事務局連絡

閉会の挨拶

(16:45 終了予定)

## 平成 19 年度第 2 回総会出席者名簿

平成 20 年 2 月 15 日 (金)

参加者 59 名 (敬称略)

班 長	岡崎和一 (関西医科大学内科学第三講座)
分担研究者	渡辺 守 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野) 日比紀文 (慶應義塾大学医学部内科学) 浅香正博 (北海道大学大学院消化器内科学分野) 坪内博仁 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻 人間環境学講座消化器疾患・生活習慣病学) 高後 裕 (旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学) 中村和彦 (九州大学大学院医学研究院病態制御内科学) 鈴木健司 (新潟大学歯学総合病院第三内科) 竹田 潔 (大阪大学大学院医学系研究科 (C6) 感染免疫医学講座免疫制御学 千葉 勉 (京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座)
参加協力者	大川原辰也、武田宏司、桂田武彦 (北海道大学第三内科) 蘆田知史、前本篤男、藤谷幹浩、関本耕太郎 (旭川医科大学第三内科) 河内裕介 (新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学) 久松理一、井上 詠 (慶應義塾大学消化器内科) 金井隆典、土屋輝一郎、中村哲也、岡本隆一、永石宇司 (東京医科歯科大学 大学院消化器病態学) 西尾彰功、仲瀬裕志 (京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座) 沼田政嗣 (京都大学探索医療センター) 年名 謙、井上拓也、金田 篤 (大阪医科大学第二内科) 水島恒和 (市立泉佐野病院外科) 隅田頼信 (九州大学大学院医学研究院病態制御内科学) 児玉眞由美 (宮崎医療センター病院) 井戸章雄、藤田 浩、上村修司 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学 専攻人間環境学講座消化器疾患・生活習慣病学) 吉田 優 (神戸大学大学院医学系研究科講座消化器内科学分野) 松田 宙 (大阪府立急性期総合医療センター外科) 大塚和朗 (昭和大学横浜市北部病院消化器センター) 伊藤壽記 (大阪大学大学院医学系研究科生体機能補完医学講座) 石毛 崇 (群馬大学大学院医学系研究科小児生体防御学分野) 大井秀久 (今村病院) 光山慶一 (久留米大学内科学講座消化器内科部門) 岡田俊彦 (枚方市民病院) 阿倍弘生 (宮崎大学医学部内科学講座消化器血液学分野) 藤井庄人 (ステリック再生医科学研究所) 相澤菜穂、稲場昭喜、大澤裕之 (日清キョーリン製薬) 菅原真悟 (アステラス製薬) 細井栄治 (JIMRO)

人見麻子 (旭化成クラレメディカル)

安藤祐吾、深田憲将、川股聖二、内田一茂 (関西医科大学内科学第三講座)

事務局

松下光伸、長谷川也真 (関西医科大学内科学第三講座)

厚生労働科学研究 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」  
平成19年度第2総会議事録

(敬称略)

主任研究者 岡崎 和一 (関西医科大学消化器肝臓内科)

期日:平成20年2月15日(金) 13:00~16:45

場所:味の素(株)本社 B1 大会議室 (東京都中央区京橋1-15-1)

I. 主任研究者挨拶・研究の進め方 班長:岡崎 和一

II. 研究報告

【上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立】

- ・腸管上皮再生の分子基盤と治療への応用  
分担研究者:渡辺 守
- ・炎症性腸疾患に対する抗線維化を目的とした新規治療法の開発  
分担研究者:鈴木 健司
- ・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
- ・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

【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疾患の制御機構  
分担研究者:竹田 潔
- ・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
- ・プロバイオティクス由来ペプチドによる新規炎症性腸疾患治療の開発  
分担研究者:高後 裕
- ・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

【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細胞分離移入療法の開発:臨床試験に向けて  
分担研究者:中村 和彦

【バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療】

- ・ポリ乳酸マイクロカプセルを用いたステロイド封入カプセルによる難治性潰瘍性大腸炎治療の臨床試験  
分担研究者:岡崎 和一
- ・リポ化ステロイドを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療:  
多施設共同による無作為化並行群間試験案  
分担研究者:岡崎 和一

【新しいコンセプトによる治療法開発】

- ・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
- ・炎症性腸疾患の治療におけるCXCL12/CXCR4系の意義  
分担研究者:千葉 勉

事務局連絡

## I. 主任研究者挨拶・研究の進め方 班長：岡崎和一

### ◆ 渡辺班との住み分け

- ・ 渡辺班：疫学、病因、病態の基礎的な研究、ガイドライン、治療指針の変更、改善を行う。基礎的中心
- ・ 岡崎班：臨床応用を中心に、基礎から臨床応用を担当する。

### ◆ 経緯・背景と現況

- ・ 潰瘍性大腸炎、クローン病の両疾患は経年的に増加。特に潰瘍性大腸炎は8万人を超え稀な疾患（5万人未満）とは言えない状況にある。
- ・ 難治例が増加している。20～30%は難治例；UC：2万人、CD：1万人以上
- ・ 現在の難治例治療の主体である免疫抑制療法には限界がある。
- ・ 現在の難治例は患者のQOLを著しく悪くする。（CD：栄養療法はコンプライアンスが悪く再燃多い、手術後の再燃率70%）
- ・ 現在の難治例治療の抗TNF $\alpha$ 製剤にも限界がある。（難治例は炎症が良くなっても、腹痛が良ならない、医療費が高額）
- ・ 全く新しい考え方の治療法が是非とも必要である ⇒画期的治療法に関する研究班発足（渡辺班）

### ◆ 岡崎班の考え方

#### 【グループの構成】 平成19年度（2年目）

渡辺班のメンバーを継承し発展させる。新規プロジェクト（臨床系研究者9名・基礎系研究者1名 計10名 班員を制限している。

主任研究者 岡崎和一（関西医科大学内科学第三講座教授）

分担研究者 渡辺 守（東京医科歯科大学消化器内科教授）

日比紀文（慶應義塾大学消化器内科教授）

浅香正博（北海道大学分子病態制御教授）

坪内博仁（鹿児島大学消化器疾患・生活習慣病学教授）

高後 裕（旭川医科大学第3内科教授）

中村和彦（九州大学病態制御内科教授）

鈴木健司（新潟大学消化器内科）

竹田 潔（九州大学生体防御研究所発生工学教授）・・・基礎的研究の中心

千葉 勉（京都大学大学院医学研究科消化器内科学）・・・本年度から

#### 【グループの目標】

- ①これまでの概念とは異なる機序＝基礎的研究の遂行
  - ②治療法の開発に直結する研究
  - ③臨床応用の出来る研究
  - ④患者QOL向上に役立つ治療法
  - ⑤医療経済に貢献するため既存の安価な薬剤による治療
  - ⑥Quality Journalへの発表、社会的なインパクトも必要
- ※二律背反する命題を達成しなければならない。

#### 【進行中の5プロジェクト】（平成18年度～）

プロジェクト（1）：「腸上皮分化・再生機構の解析と腸管免疫の特異性に関わる研究領域の創出（基礎）」

プロジェクト（2）：「腸上皮分化・再生領域に対する分子療法、細胞療法の開発」

- ・ 腸管上皮再生・分化に対する分子制御（東京医科歯科大）

- ・ 自己脂肪組織由来幹細胞移入による上皮再生療法（関西医大）

- ・ 潰瘍性大腸炎に対する組み換えHGFによる第1、2相試験（（鹿児島大）

- ・ HGF・薬剤の内視鏡的注入法、抗繊維化（新潟大）

プロジェクト（3）：「腸管粘膜免疫の特殊性解明に基づく免疫制御療法の開発」

- ・ プロバイオティクス・試験ペプチドを用いた治療法（旭川医大）

- ・ MIF制御による治療法（北大）

- ・ L-histidineによる治療法（慶應大）

- ・ 遺伝子組み換えチオレドキシンをを用いたRedox制御（関西医大）



- ・CXCL12/CXCR4の阻害剤による治療法（京大）

プロジェクト(4):「腸管免疫調節機構および上皮再生能の正常化を目指した細胞・分子標的治療のデリバリーシステムの開発」

- ・ステロイドポリリ乳酸マイクロカプセルを用いた第1/2相臨床試験（関西医大）
- ・リポ化ステロイドデリバリー療法による多施設共同臨床研究（班員施設）

プロジェクト(5):「白血球除去療法を応用した選択的細胞移入療法の開発」（九大）

#### 【平成19年度における成果】

- ・58編の学術雑誌／インパクトファクター5以上の論文11

Nature Immunol:2 Nature Cell Biol:1 J Immunol:5

Gastroenterology:5 Development:1 Genes Dev:1 Gut:1

- ・10件の臨床応用（9件が各大学の倫理委員会／IRB委員会への申請：申請済5件、申請予定4件）

⇒既に基礎研究に基づいた治療の早期臨床応用をグループとして開始している

#### 【本研究班プロジェクトの展開】

- ・早期の臨床応用に向けての展開が必要
- ・特に遂行中の臨床試験の有効性に関するEBM確立、更なる安全性の確認

⇒治験の実現に向けての展開

- ・展望：既存の安価な薬剤の適応拡大

新規治療法により、手術、入院を減らす

⇒医療経済に貢献する

## II. 研究報告

### 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立

#### 腸管上皮再生の分子基盤と治療への応用

(分担研究者：渡辺 守)

発表：土屋輝一郎

##### [背景]

- ・大腸粘膜の杯細胞は粘膜防御と修復に重要な機能を有し、杯細胞から出される分泌タンパクが粘膜の保護、粘膜修復、局所のリンパ球、免疫調節に関わることから、杯細胞の機能が、慢性炎症の治療に役立つということにフォーカスをあて研究した。
- ・正常大腸粘膜では杯細胞は豊富であるが潰瘍性大腸炎の病変部では杯細胞が減少してしまうことは以前より認められていたがその分子基盤は全く分かっていなかった。
- ・近年、杯細胞が増減する遺伝子欠損マウスが報告された。
- ・Math1、Hath1 遺伝子：この転写因子をノックアウトすることで杯細胞が消失する。
- ・Notch シグナル下の Hes1 欠損マウスで逆に杯細胞が増える。

⇒このことから、杯細胞の構築には Notch シグナルが関わっていることが予想された。

- ・Notch シグナルと Hath1 の位置関係を解析した。その結果 Notch 陽性細胞は MUC2 で杯細胞以外の細胞に Notch の陽性細胞があり杯細胞には Notch シグナルが陰性になっている。逆に Hath1 タンパクと MUC2 の関係を見てみると、杯細胞には Hath1 タンパクが陽性となっており、それ以外の杯細胞ではない細胞では Hath1 遺伝子が Hath1 タンパクが検出できないという現象が得られた。詳細に解析したところ、大腸癌細胞株 LS174T に強制的に Notch シグナルをいれると Notch の細胞内ドメインを強制発現させたところ Hath1 遺伝子が Notch 発現に際して抑制されることが解った。

- ・潰瘍性大腸炎の病変部では Notch は活性化されている。正常粘膜よりも比較して Notch の細胞内ドメインの核内の染色がかなり多くなることが解った。

⇒Notch の活性化によって潰瘍性大腸炎では杯細胞が減るということが解った。

- ・幹細胞から Notch シグナル下の Hes1 が発現することによって、杯細胞以外の吸収上皮細胞などに分化することに対して、Notch シグナルから逃れて Hath1 を発現するものが杯細胞になっていくのではないかと考え、潰瘍性大腸炎のように Hes1 遺伝子のシグナルが発現している場合には Notch 阻害剤を用いることによって Hath1 陽性細胞を増やすことで杯細胞を増やせるのではないかと考えた。
- ・マウス実験であるが Notch 阻害剤を正常マウスに投与したところアルシアンブルー染色によって明らかに杯細胞の増加を認めることができた。注意しなければいけないのは Ki67 陽性細胞で細胞増殖を見たところ Notch 阻害剤を用いたところクリプトの低部の増殖帯の細胞は Ki67 陰性となり細胞増殖がスペアされた。
- ・Notch 阻害剤は増殖を抑制して分化を促進することで杯細胞をたくさん発現できるようなタイプであることが解った。

##### [検討 1]

- ・DSS 腸炎モデル用いて腸炎を起こしたときの Notch 阻害剤の影響を見た。DSS を飲ませた群、それ以外に DSS にさらに Notch 阻害剤を経口で飲ませた群で細胞の再生の修復を検討。

##### [結果 1]

- ・Notch 阻害剤は増殖抑制により急性期 DSS 腸炎を増悪する。
- ・DSS の処理により、一度、スペアされた粘膜が修復過程において腸管上皮の elongation を認め、増殖を介して粘膜を保っているが、Notch 阻害剤を入れることによって杯細胞を誘導する前に、増殖がスペアされてしまっていることから、粘膜の欠損が起こり、炎症にはさらに悪い方向を引き起こしている。
- ・炎症状態では細胞の分化よりは、細胞の増殖を優先させることが大切であることが、この研究から分かった。

[検討 2]

- ・細胞株レベルの Notch 阻害剤の役割を解析。

[結果 2]

- ・ Wnt 活性化下での Notch 阻害では増殖を抑制せずに分化する。
  - ・ 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。
- ・ Wnt シグナル活性化は Hath1 蛋白を不安定にする  
Wnt シグナルにより Hath1 タンパクの特性を調べたところ、APC が欠損することによって Wnt シグナルが活性化している大腸癌 (SW450cell) では、Hath1 タンパク自体が GSK-3 $\beta$  によって  $\beta$  カテニンの代わりにスイッチングにより Hath1 タンパク分解が起こり、Hath1 タンパクが不安定になる。このように Hath1 遺伝子を導入しても Hath1 タンパクは発現せず、大腸粘膜では MUC2 陽性細胞は出てこない。そこで、フルレングスの APC を導入し、Wnt シグナルを正常化することによって Hath1 遺伝子を導入すると Hath1 タンパクが核内に安定化し、さらに MUC2 陽性細胞が出て、杯細胞の分化誘導ができるのではないかと考えた。
  - ・ 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 によって  $\beta$  カテニンもしくは Hath1 が Wnt シグナルによってタンパク分解を起こすことから、GSK 阻害剤によって GSK の不活性化によって、Hath1 タンパクの安定化を考えた。GSK 阻害剤のひとつとしてリチウム製剤があり、膝炎の治療薬として薬として確立されている。GSK 阻害によって杯細胞分化が起こるのではないかと考え、大腸癌の細胞にて Hath1 遺伝子を導入し、さらにリチウム製剤 (GSK 阻害) により処理することによって、Hath1 タンパクが安定化し、MUC2 の遺伝子増強が認められ、 $\beta$  カテニンも安定化し、杯細胞の増殖も分化も進められる系が作れるのではと考えている。
  - ・ GSK 阻害薬は腸管上皮細胞の  $\beta$  カテニンの核内集積を促進する。  
カナダの共同グループより報告されたものであるが、HIEC cells (人の正常小腸由来の細胞株) を  $\beta$  カテニンで染めみると、細胞質、細胞膜に染まる。リチウム製剤の処理により、膜にあった  $\beta$  カテニンが核の中にアキュムレーションしていくことが確認された。Hath1 も同時に核内にいることから、正常の小腸細胞においても、リチウム製剤により、 $\beta$  カテニンと Hath1 が核内に強発現することが確認された。
  - ・ GSK 阻害薬による Hath1 蛋白と  $\beta$  カテニンの共在が分化と増殖を同時に促進する。  
1 日の incubation であるが、正常の APC を持っている正常な小腸由来の細胞でも GSK の阻害剤によって、用量依存的に c-myc の遺伝子上昇、MUC2 の遺伝子上昇が認められたことから、細胞の増殖も分化も進められるのではないかと考えている。

[阻害剤を用いた炎症性腸疾患の治療戦略]

vivo にはまだ進めていないが、GSK 阻害剤により増殖と分化ともにいけるのではないかとということと、Notch シグナルの Notch 阻害剤をコンビネーションで加えることによって、Notch シグナル阻害によって起こる増殖の抑制を Wnt シグナルでカバーしながら、杯細胞の構築を持って行き、粘膜再生にもって行きたい。

<質疑応答>

- Q: Hath1 遺伝子は杯細胞分化のマスター遺伝子と考えてよいか？
- A: 上管上皮の遺伝子は 4 種類のひとつあるが、KO マウスは 3 種類は無くなってしまうことから、杯細胞だけではないがマスター遺伝子と考えている。
- Q: 炎症 (UC/DSS 腸炎) の時に Hath1 遺伝子はおちるのか？
- A: 確認していないがそうである。
- Q: その時に Notc シグナルは活性化しているのか？
- A: Notc シグナルが活性化しているので、Hath1 が減少している。その理由は分からない。
- Q: 躁病治療をリチウム製剤 (GSK 阻害剤) で行っている方で IBD の発症頻度を見た疫学データはあるか？
- A: 調べていない。また、Wnt シグナル活性の関係で大腸癌の発生を調べた報告では、特に問題はない。

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)

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。
- ・ケモカインのひとつである IP-10 を急性腸炎でブロックすると、炎症性細胞の浸潤を抑え、腸管上皮細胞の再生が促進される。
- ・次に慢性腸炎で IP-10 のブロックを行うと、腸管上皮細胞の再生促進とともに、炎症性細胞の浸潤を抑えることを確認した。
- ・IP-10 の臨床応用性を検討したところ、米国企業が既に特許取得しており、臨床応用の道が閉ざされた。
- ・次に HGF の遺伝子治療の可能性をマウスのハイドロダイナミックス法で検討したが、人で応用できる方法ではないことが指摘された。

⇒recombinant の HGF の治療応用はどうか？

- ・全身投与による副作用を避けるため、腸管局所に HGF を投与する方法をラットで検討。
- ・HGF 遺伝子、rhHGF を粘膜下注入することにより、臨床応用の可能性が得られた。

⇒IBD 中のターゲットの明確化

- ・クローン病の狭窄を治療のターゲットにする。

⇒STNM-01 抗線維化の薬剤が候補として上がってきた。(現在、特許出願中)

⇒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。

STNM-01 DSS 腸炎での検討

- ・炎症部位に治癒のために動因される fibrocyte、活性化された fibroblast が組織に定着するために必要 G-family 群という遺伝子を同定した。そして G-family を特異的にノックダウンすることで線維化が抑えられるのではないかと考え、研究を進めた。
- ・急性腸炎で見ると GSS 腸炎で、5日、7日で有意に G#1 の発現亢進が確認された。

[実験]

- ・DSS 腸炎にて、2日目に STNM-01 を腹腔内注入、5日目にサクリファイスし、病変を治すことができるか。

[結果]

- ・コントロールではターゲット分子が亢進しているが、SIRN では発現を抑制できている。
- ・コントロールの TNF $\alpha$  では DSS 腸炎が悪化することにもない G#1 は亢進。
- ・炎症部位で陽性細胞が増えているが、治療により減少する。
- ・IL-6 もコントロール群で増加しているが、治療により抑制することが確認された。
- ・腸管長も有意差はないが、治療により腸管の短縮を抑えることが確認された。
- ・4日目に DAI が抑えられていることが確認された。
- ・fibroblast、マクロファージも抑えることが確認された。
- ・線維化マーカーでも増加したものを抑えることが
- ・組織的にも DSS 腸炎による腸上皮の破壊を改善した。
- ・腸上皮の増殖減少を押さえ、改善することから再生の促進が確認された。

[今後の方向]

クローン病の線維化した狭窄病変をバルーン拡張する際に、STNM-01 を粘膜下注入し、線維化を防ぐ、手術後に粘膜内注入し、再発を予防できないかなどを考えている。

<質疑応答>

Q:この遺伝子は fibroblast で発現が亢進する遺伝子か？

A:そうではないです。まわりにいる遺伝子です。

Q:上皮の増殖因子でもあるのか？

A:リザベンなどで治療した場合でも内在性 HGF の発現が増えているので、2次的なものではないか。

Q:DSS の慢性でもしているか？ また適応はクローン病の狭窄拡張ということか？

A:慢性の DSS でも検討している。まずは、クローン病の狭窄拡張の適応取得を考えている。