

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

・組換えヒトHGFの安全性を確保するために臨床試験を実施

[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労している。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：反復静脈内投与にて血圧低下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。
- ・1例が入ったところで、独立データモニタリング委員会にて安全性評価し、安全性を確認後、3例受け入れ。
- ・4例終了後、4例の安全性評価 ⇒ 安全性確認

⇒投与量が2倍になるコホート試験実施 16例で開始、2008年6月30日が治験最終日

- ・治験総括報告書の作成、監査を受ける。(データ解析を含む)

〈新たな組換えヒトHGFの製造〉

- ・GMPレベルの組換えヒトHGFは三菱ウェルファーマ(現・田辺三菱製薬)で製造していたが、新たな製造はなく、使用期限は2008年6月までであるため、新たな委託製造先を検討中で、田辺三菱製薬から技術移転と現有のGMP製剤との同等性評価を実施する必要がある。

〈発癌性に関して〉

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。

⇒治験を開始しても、被験者のリクルートで同意取得が難しいのではないか!

⇒2つの追加試験を実施

大腸発癌に及ぼすHGFの影響

⇒3回/週・15週投与 HGFは腫瘍の発生率を抑制 個体別の発生数も抑制

DSS腸炎をベースにAOMで発癌を誘発するモデル

⇒腫瘍の発生頻度がHGFの高用量で抑制 低用量でも少ない傾向が認められた。

HGF注腸投与における血中暴露について

- ・HGF静脈内投与では大腸への移行が数%未満であるため、注腸投与を考えているが、HGFを注腸した場合に全身への暴露があるか検討
- ・薬物動態 rh-HGF0.01mg/ml(薬効量)の10倍、100倍量で低濃度の血中暴露が認められ、この濃度は劇症肝炎に投与されたHGF濃度の1/20である。⇒薬効の出る量の注腸投与でも、血中暴露は殆どないと考える。

〈まとめ〉

- ・劇症肝炎を対象とした組換えヒトHGFの第I/II相試験ではコホート1の4例を終了し、その安全性が確認された。
- ・Azoxymethane(AOM)単独またはDSS腸炎+AOMによる異なる大腸発癌モデルにおいて、組換えヒトHGF反復投与は大腸癌を抑制した。
- ・組換えヒトHGF注腸投与は、1.0mg/ml以上の投与量で低濃度の血中暴露が認められた。

〈質疑応答〉

Q:大腸発癌モデルはどうしてAOMを用いたか?なぜ、抑制するのか?

A:代表的な発癌モデルであるから。HGFはアポトーシス抑制作用があり、tumor cytotoxic factorとしてクローニングされているので、一部の癌細胞にアポトーシスを誘導する。現在、解析を進めている。

Q:IBD患者への臨床応用は?

A:現在、新しいHGFを作るよう取り組んでいるが、今のHGFはIBDへの使用を意図して作られていない。IBDに使用するためのGMPレベルのHGFを準備し、ステップを踏んでいる。

皮下脂肪組織由来幹細胞による TNBS 腸炎の治癒促進

分担研究者: 岡崎 和一

発表者: 安藤祐吾

[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、単一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 (HFH, 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⇒附着製細胞のみ培養

[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線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、脂肪的に一致して赤い染色像が見られ、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、サイトケラチンで免疫染色したところ、細胞質が感染され FACS 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 doubling time を測定したところ 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

[材料] *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。

[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下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の炎症に伴う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、脂肪組織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局注群では有意に腸上皮増殖能の亢進が見られた。
- ・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、脂肪組織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 活性は脂肪組織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、脂肪組織由来幹細胞は 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用いて局注した脂肪組織由来幹細胞の分布を追跡したところ、粘膜層、粘膜下層、筋層と全層に渡り 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脂肪組織由来幹細胞分布を認められた。
- ・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、脂肪組織由来幹細胞はファ

イブログラスト、アディポサイト、スミス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 vivo*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 系免疫応答の亢進を伴った活性化 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、炎症の悪循環をストップさせようと考えた。傷創治癒促進のメカニズムとして脂肪組織由来幹細胞から分泌される 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 11-8 を抑制する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組織由来幹細胞は一部腸上皮再生の土台となる筋線維芽細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞等に分布す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]

- ・ ヒトにおける脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) について、同様の効果が得られるかどうか検討する予定。
- ・ ADSCs 局所注入後の安全性について、ADSCs 局注群の長期経過例における腫瘍性増殖の有無を確認する。
- ・ 今後臨床応用として、クロウン病における難治性潰瘍及び難治性瘻孔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。

<質疑応答>

Q: ADSCs のアイソレーションは表面マーカーでセレクションしているのか?

A: 単一細胞をソーティングしているのではなく、付着性の細胞をけいたいすることによって均一化している。

Q: ヒトへの応用を考えた場合に量的な問題はどうか? 例えば、1匹のネズミの脂肪細胞で何匹治療できるか?

A: 1ヶ月培養し、その間に増えていくので、1匹の脂肪細胞で2~3匹は使用できる。

Q: ネズミでは上皮細胞への分化が見られなかった理由は?

A: ある程度を誘導をかければ、もしかしたら上皮細胞へも分化できたかも知れない。

Q: ADSCs を正常な腸管局所に注入する実験はされたか?

A: 正常な粘膜では検討していない。今後、安全性も含めて検討が必要。

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】

- ・腸管特異的な Th17 細胞 分化誘導
- ・自然免疫系が異常な活性化状況になると特に Th1 細胞の誘導が強くなって、炎症性腸疾患を発症すると言ってきたが、近年、Th-17 細胞も関与していることがいくつか報告され、Th-17 細胞は正常なナイーブな状況でこういった組織に存在しているのかを見ると、spleen、MLN、peyer's patch をはじめとした各リンフォイド組織には Th-17 陽性細胞は認められなかったが、腸管（大腸・小腸）の粘膜固有層にはいつでも IL-17 陽性細胞は極めて多数存在している。ナイーブな状況で腸管粘膜固有層という特殊な環境が Th-17 細胞の分化を誘導しているのではないかと。特に粘膜固有層に Th-17 細胞を分化誘導する樹状細胞がいるのではないかと？

【検討 1】

大腸の粘膜固有層から CD11c 陽性細胞を単離し、この細胞と Spleen 由来のナイーブな CD4+Tcell を 5 日間 Co-culture して、5 日後に CD4+Tcell を再刺激した後、IL-17 の産生を ELISA 法で見ると、脾臓の CD11c 陽性細胞と Co-culture した CD4+Tcell は IL-17 を産生しないが、粘膜固有層の樹状細胞と Co-culture した CD4+Tcell は確かに IL-17 を高産生する。IL-17 だけではなく、他の Th17 のマーカー、IL-22、Ror γ t の MRN の発現を見ても高い。腸管粘膜固有層の樹状細胞が確かに Th-17 の分化を誘導できることが判明した。

【検討 2】

樹状細胞と CD11c+陽性細胞は脾臓とは異なり腸管に特異的な樹状細胞の subset があるのではないかと検討。CD70 の抗体で染めると脾臓にはほとんど CD70 陽性の細胞はないが、腸管粘膜固有層では CD11c^{high}で CD70^{low}、CD11c^{low}で CD70^{high}の population があることがわかった。CD11c^{high}で CD70^{low}はメセンテリックリンフォノードには存在した。CD70^{low}では Th17 の分化誘導はできないが、CD70^{high}では Th17 の分化誘導はできたことから、粘膜固有層に特異的に存在している CD70^{high}、CD11c^{low}の樹状細胞が Th17 細胞の分化を誘導できることがわかってきた。CD11b+細胞が分化誘導するという報告あり。(2007 年の Nature Immunol.)この細胞も CD11b を発現しているのおそらく同じ population であると考え。

【検討 3】

樹状細胞、TLR が微生物を認識すると活性化されるが、commensal bacteria や TLR の関与はどうなるのか。TLR の関与をシグナルがなくなる MYD88-trif ダブル KO マウスで検討したところ、腸管の粘膜固有層では Th17 細胞は正常とほぼ同様。TLR は関係がない。commensal bacteria の関与を Germ free マウスで検討したところ、Th17 細胞の数は激減していたことから、腸管特異的な樹状細胞は commensal bacteria によって TLR independent なシグナルで Th17 を分化誘導した。

【検討 4】

commensal bacteria ほどのようなメカニズムで Th17 を分化誘導しているのか。ナイーブな T 細胞が Th17 細胞に分化する際に最初に IL-6 や TGF β が重要であることがわかってきた。

【検討 5】

樹状細胞が IL-6 や TGF β の活性化に関与しているのか。CD70^{high}と CD70^{low}の細胞を単離し、IL-6 の発現や TGF β の活性化に関わるインテグリンとして α V、 β 8 のサブユニットを調べた結果、Th17 の分化を誘導できる CD70^{high}ではこれらの発現が高まっていた。しかし Germ free マウスから取ってくると、例え CD70^{high}の population でもこれらの発現が落ちている。

【小括】

腸管特異的な樹状細胞は commensal bacteria によって IL-6 を産生したり、TGF β の活性化を通じて確かに Th17 の分化を誘導してそうであることがわかってきた。最もクリティカルなところは commensal bacteria はいかにして樹状細胞に働きかけて TLR independent に産生を促しているのだろうか。

【検討 6】

extracellular ATP が関与しているのではないかと。extracellular の ATP が神経系の細胞に働きかけることが言われており、最近、免疫系でも特に樹状細胞に extracellular ATP が ATP センサー (P2X レセプター、P2Y レセプター) を介して働きかけることが報告された。

【検討 7】

commensal bacteria が extracellular ATP の source になるということである。

マウスの糞便中の ATP 濃度を検討。

Germ free マウス由来の糞便では ATP の濃度が落ちている。

[検討 8]

extracellular ATP が Th17 の分化誘導に関わっているのではないかと。

Germ free マウスに ATP の加水分解耐性の ATP γ S を腹腔内投与し、9 日後に粘膜固有層の Th17 細胞を見ると ATP を打つことによって、Th17 細胞の数を増やすことができた。

逆に SPF マウスに Apyrase (ATP を加水分解する酵素) を腹腔内投与し、同様に 9 日後に Th17 細胞の割合を見ると Apyrase 投与群 (ATP を壊したもの) で明らかに Th17 の陽性率が低下していた。

マウスのレベルで extracellular ATP の濃度の如何によって Th17 の数に変動があることから、何らかの関与があることが考えられる。

[検討 9]

ATP は腸管特異的な CD70^{high} の樹状細胞に働きかけるのか。

CO-culture の系に ATP を加えて検討。CD70^{low} では例え ATP を加えても IL-17 の陽性率は高まらないが、CD70^{high} では IL-17 の産生率は高まる。

[検討 10]

CD70^{high} の population は確かに ATP に反応するか。CD70^{high} の population に ATP を添加し IL-6 やインテグリン (α V、 β 8) の発現を見ると、 α V や β 8 の発現が高まっている。

[総括]

Th17 細胞は通常マウスの腸管粘膜固有層にかなりの数が存在している。その理由は commensal bacteria 由来の extracellular ATP が腸管に特有の樹状細胞に働きかけて IL-6 や TGF β の活性化を通じて分化を誘導してそうであることがわかってきた。

今後、自然の状況で存在する Th17 細胞がこういった機能を有しているのかという観点から解析を続けていきたい。

[質疑応答]

Q: CD70 と樹状細胞に注目された経緯は？

A: CD70 陽性の細胞は特に CD8 の T 細胞を活性化を誘導するという報告があり、CD70 が何か発現していないか注目した。

Q: 樹状細胞以外にマクロファージにも CD70 陽性の細胞は存在するか？ (特に腸管特異的に)

A: いろんな組織で染めた結果、腸管の粘膜固有層以外では CD70^{high}、CD11c^{low}、CD11b では確認できなかった。樹状細胞以外では詳細には調べていない。

Q: 大腸粘膜ですか？

A: 大腸及び小腸です。パイエル板には樹状細胞はなく、Th17 の細胞もない。

Q: CD70 陽性分画は Th1 に対しては関与しているか？ ATP は Th1 にはどうか？

A: in vitro のカルチャー系で CD70^{high} の population は CD70^{low} の population に比べると明らかにインターフェロン γ の産生誘導が高い。ATP に反応するのかどうかを調べると、ATP には反応しない。

Q: ATP の作用は dose dependent か？

A: 高濃度にすると Th17 の誘導能が落ちる。10 μ mol がピークである。

Q: IL-17 がないと腸の上皮再生ができないか？

A: 今後の検討です。regulatory な機能も有している可能性がある。IL-10 を一緒に出すような IL-17 も報告されている。

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】

- ・クローン病を中心に炎症部位にある小腸陰窩を採取し、それらのクリプトから放出される抗菌活性がクローン病で有意に低いということを報告してきた。
- ・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、HD5 の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き、粘膜感染防御の役割を担っていることが報告されている。

【目的】

- ・小腸上皮の自然免疫関連因子である内因性抗菌ペプチド：活性型 α デフェンシンの recombinant peptide を作成し、経口投与による抗炎症効果を検討する。

【問題点】

- ① recombinant HD5 の作成及び発現系の改善
 - ・pET28 と pET32 vector による recombinant peptide の発現の違い。
⇒ pET32A system により再生精製物が 1200 μ g/l (10 倍) の収量を得られた。
 - ・Full folded recombinant HD5 は蛋白分解酵素による崩壊を防ぎ、構造を維持する。
- ② D5 の経口投与により腸管内でペプチドの構造が維持できるか。
 - ・Full folded recombinant HD5 は構造を保持し、大腸に到達するか。
HD5 100 μ g を経口ゾンデにて強制摂取させ、6、18、36 時間後に sacrifice。大腸を摘出 DOW3ml で腸管内容物と共に洗浄後、洗浄液を回収し、遠心後上澄みを HPLC にて解析。
⇒ 構造が維持できて大腸まで到達できることを確認した。
- ③ D5 により抗炎症効果が期待できるか。

【IL-10KO 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-10KO 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-10KO 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-10KO 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 KO 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 KO 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-10KO 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。

[IL10 KO マウスの腸内細菌叢の変化]

・通常飼育でも、SPF 環境下でも長期飼育において脱肛する IL10 KO マウスがあることが報告されている。1年以上置いていたマウスが7匹脱肛を認めたため、それらの便を採取し、腸内細菌叢の検索を行った。IL10 KO マウス自体には Wild type にあるようなエンテロコッカスやペクトコッカス FRD が検出されなかった。また脱肛のあったマウスは脱肛のないマウスに比べて約 100 倍のスタフィロコッカスを認めた。

⇒脱肛マウスの糞便を用いた IL10 KO マウス腸炎炎症促進モデル

脱肛マウスの便を砕いて経口ゾンデを用いて別な IL10 KO マウスに強制投与。(3日間×11週)

結果、3匹の IL10 KO マウスが脱肛した。脱肛する前に体重が減少することが見られた。

また、死亡したマウスは小腸にフォーカルに炎症細胞浸潤が強くなり、出血および内出血をおこしそれが原因となっている。

[小括]

・IL10 KO マウスでは脱肛がメルクマールとなるが、小腸に強い炎症がおきているということが確認できた。

[IL10 KO マウスに対する HD5 経口投与]

・IL10 KO マウスで下痢をおこした群は明らかに体重減少を認め、その3匹の下痢発生マウスに HD5 を投与した。結果、3日目で有形便となり、6日目で普通便となり、投与7日目で体重も改善したことが確認できた。

[まとめ]

- ① recombinant HD5 を E. coli/pET32a Trx fusion vector 系で発現させることにより、pET28a vector に比較し、約 10 倍の収量を得た。
- ② HD5 の経口投与において、大腸腸管内容物に full fold された HD5 を確認した。
- ③ 腸炎炎症以前に α -defensin m-RNA および蛋白発現の減少が認められる IL10 KO マウスは脱肛出現前に体重減少を認めた。
- ④ 下痢、体重減少をきたした IL10 KO マウスに対し、HD5 を経口投与したところ、下痢の改善および体重の増加を認めた。

⇒HD5 の経口投与による腸炎治療の可能性が示唆された。

[質疑応答]

Q: HD5 により小腸炎が治ったということは小腸炎が何らかの infection の可能性が高いと考えるが

大腸に関しては Dr. Chapel らが mono-association で場所が変わったり、dual-association でどうなるか等検討されているが、糞便中のどの菌かはどのように考えられるか？

A: 十分検討できていない段階。スタフィロコッカスが HD5 によって死滅するかどうかはまだ検討していない。

Q: 糞便を食べさせた時に小腸炎が悪くなっているが、大腸炎はどうか？

A: 大腸炎についてはあまり変わっていない。また、脱肛もよくなっていない。投与量、投与日数等さらに検討が必要。

Q: HD5 にチオドレキシンが結合したままか？

A: 最終的には HD5 とチオドレキシンは別になる。

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]

・プロバイオティクス培養液の精製 最終的に Filtration をかけて精製 そのマーカーとして Heat shock protein 27 を使用

⇒Hsp27 誘導あり B. Subbills(納豆菌)、Lactobacillus GG、Lactobacillus plantarum、Bifidobacterium breve

⇒Hsp27 誘導なし Enterococcus faecalis、E.Coli Nissle、Enterobacter aerogenes、Proteus mirabilis

[検討1]

・ B. subtilis 菌の培養上清からの活性物質の同定

・ 方法 Hsp27 誘導効果を目安にスクリーニング(HPLC、質量分析器、B. subtilis 菌の遺伝子配列)

⇒活性物質 Competence and sporulation factor (CSF)

[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?]

B. subtilis 菌に CSF の transporter が存在する

↓

ヒト上皮細胞にも CSF の transporter が存在するのでは?

↓

IBD 患者で遺伝子多型が見られる細胞膜 transporter

Multi-drug resistance gene 1 (MDR-1)

Novel organic cation transporters(OCTNs)

[CSF は OCTN2 を介してヒト腸管上皮細胞に取り込まれる]

・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と言える。
- ・ 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。

[細菌由来の活性物質 CSF の腸管炎症に対する効果を明らかにする]

・材料および方法

動物・・・C57BL/6J マウス

飼育条件・・・2%DSS と DSS フリー群 6 日目に CSF (100nM) を注腸 7 日目に屠殺

検討項目および結果

- ① 体重、大腸長について計測
⇒ 体重、大腸長ともに有意差なし
- ② 大腸の組織を Berg らの組織スコアを用いて数値化し評価
⇒ CSF は DSS 腸炎マウスの腸管障害を改善する

[DSS 腸炎モデルに対する CSF の生存期間延長効果]

動物・・・C57BL/6J マウス(オス)6 週齢

・方法 4%DSS を経口投与 3 日目から CSF 10nM 群と PBS 群に分け、1 日おきに注腸し、生存期間を計測

・結果 CSF 投与群が有意に生存率が高い。

[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 このヘモカインが 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]

・腸内細菌産生ペプチドは細胞膜トランスポーターを介して腸管上皮細胞の保護作用を発揮する

[新規乳酸菌の死菌による腸管保護活性の検討 (preliminary)]

・新規乳酸菌の死菌は Hsp70 を誘導 (特許申請前)

[今後の検討課題]

- ① 種々の腸炎モデルにおける CSF の効果を確認する。(DSS 腸炎モデルで検討中)
- ② その他の菌種の死菌あるいは菌由来活性物質の、ヒト腸管組織に対する生理作用を明らかにする。(Pha、新規乳酸菌モデルを用いて検討)
- ③ これらの菌由来ペプチドをもとに、アミノ酸側鎖の修復や配列の組み替えを行い、さらに作用が強い活性物質を開発する。(配列の入れ替え、糖鎖修飾を検討中)
- ④ 菌由来ペプチドを用いて炎症性腸疾患治療の臨床試験を行う。

<質疑応答>

Q: 細胞質内に入ったペプチドがどのように炎症シグナルを抑えているのか?

A: 細胞質内に入った一部が核内に入って、転写レベルで何らかの作用をしている可能性も考えられる。今回炎症が抑制されたのも、抗炎症作用であるのかも確信が持てない。腸管保護作用がメインかもしれない。

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：大川原辰也

[マクロファージ遊走阻止因子：MIFについて]

- ・ MIF は免疫細胞や上皮細胞のみならず、様々な細胞や組織での発現が認められる。
- ・ 炎症性、感染性疾患において促進的役割が認められている。
- ・ DSS 腸炎モデルにて腸炎が進行するにつれて、MIF の発現が上皮、粘膜に増えてくる。
- ・ DSS を用いた MIF ノックアウトマウスの実験では腸炎が発生しないが、recominant MIF を投与することによって、腸炎を再現できる。MIF 自体が炎症のコントロールに影響しているのではないかと考えられる。
- ・ Gene Chip でノックアウトマウスと野生型マウスでは 100 倍以上の fold change が認められたものを列挙したが、今後、解析をする。
- ・ GCAP の治療前と直後で血中の MIF の濃度が、有意に抑制されるというデータがあるが、一方、直ぐに戻るといふ報告もある。CAP 療法を頻回しなければならぬことの原因かもしれない。
- ・ 難治性炎症性疾患の新規治療として炎症性メディエーターを標的にした抗体医薬の臨床応用が進められており、一定の成果をあげている。⇒しかしながら、
- ・ 現在、開発された臨床に用いられている抗体医薬の治療状況から、抗体医薬の経済的、医学的な問題も浮かび上がってきている。

[抗サイトカイン療法]

抗体医薬による治療 (受動的抗体療法) ⇒ ヒト抗体での治療 (TNF α) 有効性高い

問題点 持続性、抗抗体惹起、費用

⇒能動的抗体療法は上記問題点の課題解消?

- ・ 受動的抗体療法と能動的抗体療法の比較

	受動的	能動的
持続性	低い	高い?
抗抗体惹起	可能性大	可能性小?
費用	高い	低い (DNA)

⇒DNA ワクチンを用いた新規能動的抗体療法

- ・ サイトカインの自己抗体ワクチンの治療は動物レベルでは実施され、一定の成果をあげている。
(IL-18DNA ワクチン、Th モディファイした IL-5 ワクチン)
- ・ Th エピトープ・DNA ワクチンの作成 従来型と比べてエピトープ遺伝子を入れたことにより抗体価があがる。
- ・ Th エピトープとして用いられるものにはいくつかあるが、今回は TTX (Tetanus toxin P30) にて検討。
- ・ MIF のループのところに TTX を挿入し、electroporation で遺伝子導入。実際にはマウスの大腿部の筋肉にワクチンを投与し、electroporation をかけて導入効率を上げる。
- ・ 投与したマウスの抗 MIF 抗体価を吸光度計でみると、4 週間後に差が出て、8 週間位にかなりの差が出る。
- ・ DSS 腸炎の治療計画
- ・ MIF/TTX ワクチンを接種 ⇒ 3%DSS 水溶液を 7 日間投与 ⇒ 評価 (DAI)
- ・ DSS 投与後 7 日後の臨床所見は DAI はかなり抑制された。腸管長軸長の短縮もこの h エピトープ・DNA ワクチン投与群はコントロール群と比較し、影響を受けていない。
- ・ 組織学的にも有意に抑制されていた。
- ・ MPO を極めてよく抑制されていた。
- ・ 炎症性サイトカインである TNF、INF γ 、IL-1 β が治療群で産生が抑制されていた。

[まとめ]

- ・ MIF Th-epitope DNA ワクチンによりマウス DSS 大腸炎が抑制された。

・ [問題点]

- ・ MIF DNA ワクチンは自己抗体療法をどれくらい持続させられるのか? また MIF 活性をどの程度抑制するのか?
- ・ MIF DNA ワクチン治療の副作用? (感染、腫瘍 etc⇒予備試験では特に問題となる副作用はない。
- ・ ヒトでのワクチン効果? ⇒エビデンスの集積が必要

<質疑応答>

Q: 予防実験であるが、治療実験はどうか?

A: 実際、治療実験が大切であるが、今回ワクチンの摂取と抗体価の上昇を見ると 8 週間が経過したマウスを使用しているので、DSS 腸炎では難しいと考える。IL-10KO マウスなどの慢性腸炎モデルで検討したい。

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。

[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。

<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

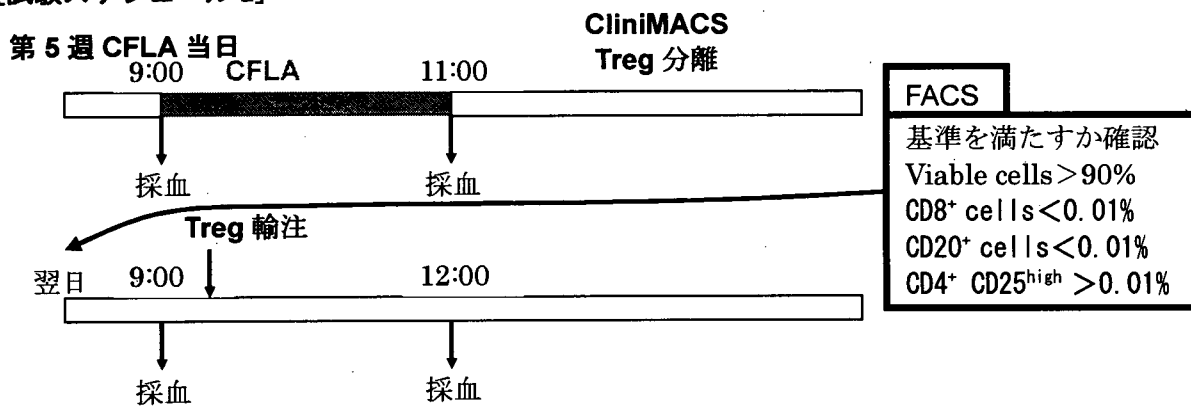
[方法]

- ①Treg分離
⇒第5週目のCFLAに引き続き行う。
⇒LPから、ChiniMACSを用いてTregを分離し4°C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

[エンドポイント]

- Primary endpoint
Treg 移入療法による副作用の有無
- Secondary endpoint
CFLA+Treg 移入療法後の効果

[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、臨床試験プロトコールを九州大学倫理委員会へ申請予定

[in vitro での Treg 培養増殖と誘導法]

- 大腸炎を抑制するのに、どれだけの Treg が必要か？ in vitro で Treg が培養できないか検討。

[方法] ChiniMACS にて分離した Treg、対象として CD4+CD25-Tcell、IL-2 存在下または、IL-2+TGFβ1 存在下に 10 日間培養し、細胞をカウントした。また 14 間のリスティングの後に、フローサイトメトリとサプレッションアッセイを実施した。

【結果】 Tregの増殖率は各群とも10倍～18倍を示した。

Tregに特異的な転写因子であるFOXP3をフローサイトメトリーで見ると、TregをIL-2のみで培養した場合はFOXP3の陽性細胞は53.3%で培養前と同レベルであった。TregをIL-2 TGF β 1の存在下で培養した場合は73.3%とFOXP3発現が増加している。CD25⁻細胞をIL-2のみで培養した場合11.9%でFOXP3の発現を殆ど認めず、CD25⁻をIL-2 TGF β 1の存在下で培養した場合、FOXP3陽性は59%に増加し、Tregが誘導された可能性が示唆された。

培養細胞の細胞増殖抑制能をみると、TregをIL-2のみで培養した群では、培養細胞の増殖は20%と低下しており、刺激に対するTregの不応答性の性質を有していた。TregをIL-2 TGF β 1存在下にカルチャーした群でも、培養細胞の刺激に対する不応答性を認めており、きょう培養で、CD4⁺Tcellの増殖を著明に抑制しました。CD4⁺CD25⁻をIL-2のみで培養した場合、培養細胞も増殖し、刺激に対する不応答性も認めておらず、きょう培養で細胞増殖の抑制も認めていない。CD4⁺CD25⁻でIL-2 TGF β 1存在下でカルチャーした場合は、刺激に対して不応答となり、きょう培養により、CD4⁺細胞の増殖を抑制しており、Tregの活性が誘導されている。

【まとめ】

- ・ 試薬のCE取得後に、血球成分除去・Treg分離移入療法のプロトコールを九州大学倫理委員会に提出。承認後にphase1臨床試験を行う。
- ・ 分離したTregはinvitroで機能を保持した状態で培養・増殖可能であった。また、non-TregからTGF- β 1存在下にTregの誘導が可能であった。増殖細胞移入の安全性が確立されれば、将来的に培養Tregの大量移入療法が施行できる可能性がある。

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 μ 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、左側大腸炎型 2
- ・ 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 を含有）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は特に著明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、BD3 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のステロイド内服、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、癒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 0635 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は変更なく、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（プレドニゾロン換算）
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ヵ月間施行し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
 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
 6. リメタゾンの副作用の有無

[Primary endpoint]

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 endpoint]

従来の全身的ステロイド剤の減量が可能であったか、副作用が軽減

[結語]

- ①ステロイド依存性の炎症性腸疾患患者2例にリメタゾンを投与した。
潰瘍性大腸炎患者で1例 腸管型ベーチェット1例
- ②リメタゾンの効果
潰瘍性大腸炎 有効 ステロイドの減量が可能であった。
腸管型ベーチェット 有効 ステロイドの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。
- ③今後も症例を集積し、リメタゾンの有効性と安全性と検討する。

[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

[質疑応答]

Q:ベーチェットに良く効いていた印象があるが。

A:今回の検討の前に、腸管型ベーチェットに対し2週おき計8回投与した5例で有効性が確認されている。

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)

発表者：久松理一

[背景]

- ・ここ2,3年でエレンタールがなぜ効くかというところからはじめ、アミノ酸の抗炎症効果を研究してきた。ヒトのデータに関しては昨年渡辺班で発表した。それを背景にして治療効果について発表する。
- ・ヒトのIBD患者では血漿中のHistidine濃度が有意に低下していることがわかった。特にactiveで有意に下がっている。クローン病患者では血漿中のCRPとHistidine濃度が非常にきれいな形で逆相関することからマーカーとして使えるのではないかと発表した。
- ・エレンタールがなぜ効くか？ということでアミノ酸に注目しエレンタール中に含まれるアミノ酸成分だけで腸炎を抑えることは論文に投稿中。この中で色々なアミノ酸が混ざっているがHistidineは投与すると単独で腸炎を抑制しうることがわかってきた。それは用量依存性でエレンタールのアミノ酸組成をホールで入れた時よりは弱いが単独で炎症抑制効果があるだろうということがわかってきた。

[検討および結果 1]

- ・Histidineによる抗炎症効果がなぜ起きるかは、IL10 KOマウスのトランスファーモデルを用いて炎症部位にF4/80+の単球分画が非常に寄ってくることでマクロファージからのTNF産生にフォーカスを当ててみた。
⇒Histidine単独でマクロファージからのTNF産生を濃度依存性に抑えることがわかった。
これは対照として用いたLysine、Alanineではまったく抑えることがなかった。
マクロファージのviabilityには影響はない。

[検討および結果 2]

- ・L-histidineがなぜTNF産生を抑えるのか、あるいは炎症性サイトカインをマクロファージから抑えるのかということで上皮では代謝産物が抗炎症に効くと言われているのでCarnosine、Anserineという代謝産物で検討してみた。また、抗膜異性体のD-histidineも用いて見てみたが、若干抑えるがサイトカイン産生の抑制はL体のhistidineにかなり特異的であるということがマクロファージの系では明らかになってきた。

[検討および結果 3]

- ・もうひとつのL-histidineの代謝経路で免疫、サイトカイン産生の影響を及ぼすものとしてhistidine D-carboxylaseで誘導されるHistamineがある。過去にはHistamineはサイトカイン産生やTh1、Th2のバランスにかなり関与するという報告があり、Histamineになって効いているんじゃないかということで、酵素欠損した、要するに体内にHistamineができないマウスの腹腔マクロファージを用いて同様の実験をした。
⇒Histamineができないにも関わらず、HistidineはTNF α の産生を抑えるということがわかった。
おそらくHistamineを介した抑制効果ではないということがわかってきた。

[検討および結果 4]

- ・なぜTNF産生の抑えるか？
⇒基本的な転写因子のNF- κ Bだけを用いてみたが、Histidineを濃度依存性にI κ B- α のデグラデーションを抑えていたり、あるいはNF- κ Bのp65の核内移行を抑えるということで全てではないが1つの経路としてはマクロファージにおけるNF- κ Bの抑制を介してTNFの産生を抑えているのがわかってきた。

[今後の展望]

- ・Histidineの他に腸炎抑制効果を持つアミノ酸は？
⇒次世代の成分栄養剤の開発
- ・Histidineの臨床応用
⇒経口投与量は？静注は可能か？局所へのdrug deliveryは？
- ・Histidineによる炎症性サイトカイン産生抑制機序の解明(細胞内アミノ酸濃度のモニタリング)
⇒新たな分子標的の探求

[質疑応答]

Q: 栄養素アミノ酸だと吸収上皮に吸い込まれてマクロファージ系の細胞には届かないのでは？

A: 通常のHistidineはほとんど小腸で吸収されているはず。多くのアミノ酸のグルタミン等の腸炎抑制効果はおそらく多くは上皮に作用してスカベンジャーみたいな形で効いているという報告が多いが、おそらく血中に一度入り血中濃度が上がることにより効いているのだろうと考えている。
血中濃度を測るとHistidineを食べさせたマウスでは*in vitro*で1番効いたのが20mMだが、5~10mMまでは血

中濃度が上がっているのも単球系に効いているのではないかと想像している。

Q:臨床ではエレンタールはよく効くが成分栄養ではなく完全消化態や半消化態でも臨床的な効果は認められると思うが、すべてがHistidineに特化した作用機序とは言えないのではないか？

A:製剤としてのエレンタールや他の半消化態等の薬効がHistidine、あるいはアミノ酸で証明されるとは思っていない。カロリーの補給、脂質が少ない、腸内細菌を変える等の複合体であり、1番の成分栄養を含めた栄養療法の問題点は薬効のmolecular targetがはっきりわかってないことと、コンプライアンスにある。海外ではこのような栄養療法のデータを持っていないので、ここを切り口に新たな分子標的を見つけ出すことは日本しかできないというコンセプトで進めている。