

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

炎症性腸疾患におけるFc受容体の役割

研究協力者 吉田 優 神戸大学医学部消化器内科 助教

研究要旨：炎症性腸疾患は、腸内細菌に対する免疫応答の異常が示唆されている。粘膜炎症におけるFc受容体の役割を明らかにするため、ヒト病原性大腸菌にて誘導される腸炎モデルを用いて検討した。本モデルでは、Fc受容体を介した免疫応答が炎症を制御しており、炎症性腸疾患においてもFc受容体による制御の可能性が示唆された。

共同研究者

Richard S. Blumberg
Harvard Medical School

A. 研究目的

粘膜免疫におけるFc受容体の制御機構を明らかにするため、ヒト病原性大腸菌モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

活性型Fc受容体欠損マウスに*C. rodentium*を感染させ、体重変化、便中菌量、病理組織学的検討、また活性型Fc受容体欠損樹状細胞、マクロファージを用いて機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

マウスが腸炎などで苦痛を感じた場合は安楽死させている。

C. 研究結果

活性化型Fc受容体欠損マウスでは、*C. rodentium*に対する感受性が増大していた。また、活性型Fc受容体欠損樹状細胞では抗原特異的早期エンドサイトーシスの低下、分化の遅延、T細胞活性化の低下、活性型Fc受容体マクロファージでは、抗原特異的貪食能の低下が認められた。

D. 考察

腸管感染症においてIgGを介してFc受容

体が炎症を制御していることが示唆された。

E. 結論

Fc受容体を介した免疫応答は、腸管炎症を制御しており、ヒト炎症性腸疾患においても、重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、炎症性腸疾患モデルにおいても、検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Atsuhiko Masuda, Masaru Yoshida, Hideyuki Shiomi, Satoshi Ikezawa, Tetsuya Takagawa, Hiroshi Tanaka, Ryo Chinzei, Tsukasa Ishida, Yoshinori Morita, Hiromu Kutsumi, Hideto Inokuchi, Shuo Wang, Kanna Kobayashi, Shigeto Mizuno, Akira Nakamura, Toshiyuki Takai, Richard S. Blumberg, Takeshi Azuma 「Fcγ Receptor Regulation of *Citrobacter rodentium* Infection」 *Infection and Immunity*, in press, 2008.

2. 学会発表

増田充弘、吉田 優、東 健「樹状細胞上のFc受容体は腸管感染症を制御する」DDW-Japan 2007. シンポジウム口演、神戸ポートピアホテル. 2007年10月20日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

加齢促進をアイデアとする炎症性腸疾患治療の試み

主任研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：本研究では、炎症性腸疾患腸炎惹起性メモリーT細胞の老化促進を応用した新規治療法の開発について追求した。我々はCD4⁺CD45RB^{high}移入大腸炎マウスより得られる腸炎惹起生免疫記憶CD4⁺T細胞を新しい免疫不全マウスへの移入を繰り返すことにより、*in vivo*での加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞の作製を確立し、この加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞は加齢により腸炎発症率・活動度が低下することを明らかにした。また、この加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞のなかで腸炎未発症加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞は、正常マウス胸腺由来CD4⁺CD25⁺制御性T細胞と同等のCD4⁺T細胞増殖抑制能を認め、腸炎惹起性メモリーT細胞は加齢により制御性T細胞に変化することが示された。このことより、炎症性腸疾患腸炎惹起性メモリーT細胞の老化促進を応用した新規治療法の開発が示唆された。

共同研究者

戸塚輝治、金井隆典、根本泰宏

東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

A. 研究目的

本研究は、研究代表者らが独自に確立した解析手法を用い、炎症性腸疾患腸炎惹起性メモリーT細胞の老化促進を応用した新規治療法の開発について追求したものである。炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎及びクローン病は、若年者を襲い、様々な副作用を伴う治療の継続を余儀なくされる難病である。本邦において、罹患数は潰瘍性大腸炎7万人、クローン病3万人と増加の一途をたどり、ひとたび罹患すると生涯に渡り罹患するため、社会的にも極めて重要な疾患と捉えられている。両疾患とも、免疫学的因子、環境因子、遺伝因子など様々な病態が考えられるが、その複雑性、多様性から治療に難渋することが多く、亢進した免疫を非特異的にステロイド剤や免疫抑制剤などによってコントロールするのが実情で、それでもなおも緩解と増悪を繰り返している。また治療の副作用の問題や、さらに治療抵抗例が多く、現在の治療法では限界があり、画期的な新規治療法

開発は急務である。

また、炎症性腸疾患は小腸や大腸を侵す腸に局限した疾患として捉えられて、内科的な治療が困難な症例に対しては腸病変の外科的局所切除がなされてきた。しかし、ほぼ100%の患者で術後に手術以前と同一の疾患、同様な病変を再燃する。我々は、このような炎症性腸疾患の永続性・難治性の主座として免疫の記憶（メモリー）という概念を提唱してきた(Kanai T, Totsuka T, et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: 1051-8, 2006)。すなわち、腸内細菌抗原を特異的に認識し記憶する免疫記憶CD4⁺T細胞が炎症性腸疾患発症時に形成され、ひとたび緩解導入に成功しても永続的に潜在する免疫記憶CD4⁺T細胞の再活性化が再燃を引き起こすと考えている。しかし、発症後数十年の初老期の炎症性腸疾患長期経過例において、発症初期に比べ緩解または病勢の軽症化をしばしば経験する。我々は、この現象の原因として、腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞の免疫学的加齢(immunosenescence)の関与に着目した。従来の概念である‘免疫記憶細胞の不死性’とは相反し、常に抗原(腸内細菌)に暴露されている腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞の加齢(老化)

に伴う免疫学的機能劣化を利用し、生体外で人為的に腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞の加齢推進することにより、緩解導入を試みる新規治療法の確立を試みた。

本発想を支持する知見として、マウスモデルにおいて加齢に伴い、末梢のT細胞の増殖活性の低下、各種サイトカインの産生の低下は知られている。さらに、最近では免疫学的加齢現象として末梢に自らの増殖活性を失ったFoxp3⁺CD25⁻CD4⁺制御性T細胞が増加することが報告されている (Nishioka T, et al. J Immunol. 176: 6586-6593, 2006)。これらの事実から正常免疫記憶CD4⁺T細胞は加齢に伴い本来のT細胞ヘルパー機能を失い、制御性T細胞へ変換することが推定される。我々は以上のような仮説に立脚し、腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞は加齢に伴い自らの腸炎惹起性活性を減弱するばかりではなく、自らが腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞活性を抑制する制御性T細胞として機能する可能性を追求し証明する。

B. 方法・結果

1) マウス慢性大腸炎モデル (CD4⁺CD45RB^{high}T細胞移入大腸炎モデル) を使用し、腸炎惹起性免疫記憶T細胞の加齢に伴い形質的、機能的に腸炎惹起性免疫記憶T細胞の制御性T細胞への変化を追求した。本モデルはCD4⁺CD45RB^{high}ナイーブ細胞をT細胞の欠損した免疫不全マウス (SCIDマウスまたはRag-1/2欠損マウス) に移入することで腸内細菌に反応するCD4⁺T細胞が移入細胞に比べ、極めて短期間に100万倍以上増殖することにより発症する。したがって、本腸炎マウス生体内に存在するCD4⁺T細胞はそのほとんどが腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞で構成される特徴的なモデルであり腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞細胞の生体内での追跡に非常に有用なモデルである。さらに、マウスの寿命は一般的に2年程といわれているが、我々はCD4⁺CD45RB^{high}移入大腸炎マウスで得られる腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞を新しい免疫不全マウスへの移入を繰り返すことにより、*in vivo*で加齢を可能にした腸炎惹起性免疫記憶CD4⁺T細胞の作製に確立し

ている。これまでに11世代までの継代を行っており、7世代以降に腸炎発症率・活動度の低下を明らかにした。また、*in vitro*において、加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞は、CD4⁺T細胞の増殖を抑制することは出来ず、加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞にFoxp3の有為な発現を認めなかった。

2) 上述したCD4⁺CD45RB^{high}T細胞移入→腸炎惹起性免疫記憶T細胞再移入モデルにおいて、腸炎未発症加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞の腸炎抑制能を*in vivo*解析を行なった。CD4⁺CD45RB^{high}T細胞移入大腸炎モデルでは正常の胸腺由来CD4⁺CD25⁺T細胞に腸炎発症抑制能を有することが知られている。そして、炎症性腸疾患を含む様々な免疫疾患では、このCD4⁺CD25⁺T細胞の減少が病態に関与することが知られており、この問題点を克服するために、加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞の細胞治療の可能性を追求する目的で、加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞をCD4⁺CD45RB^{high}T細胞とともに共移入し腸炎発症抑制能を検討した。CD4⁺CD45RB^{high}T細胞を単独で移入したマウスは腸炎を発症し、また、腸炎発症加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞をCD4⁺CD45RB^{high}T細胞と免疫不全マウスに共移入したマウスも腸炎を発症したが、腸炎未発症加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞をCD4⁺CD45RB^{high}T細胞と免疫不全マウスに共移入したマウスは、制御性T細胞であるCD4⁺CD25⁺T細胞を共移入したマウスと同様に腸炎を発症しなかった。以上より、*in vivo*において、腸炎未発症加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞は腸炎抑制能をもつことが示された。

C. 考察

1) CD4⁺CD45RB^{high}T細胞移入大腸炎モデルを使用し、腸炎惹起性免疫記憶T細胞の加齢に伴い形質的、機能的に腸炎惹起性免疫記憶T細胞の制御性T細胞への変化を追求した。これまでに11世代までの継代を行い、7世代以降に腸炎発症率・活動度の低下を明らかにした。しかしながら、加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞は、*in vitro*において、CD4⁺T細胞の増殖を抑制することは出来ず、また、加齢化免疫記憶CD4⁺T細胞にFoxp3の有為な発

現を認めなかった。これより、*in vitro*において加齢化免疫記憶腸炎惹起生免疫記憶 T 細胞には、CD4⁺T 細胞の増殖抑制能を認めなかったが、免疫記憶 CD4⁺T 細胞は加齢化することで、腸炎発症率・活動度が低下するという画期的な成果を示し得た。

2) CD4⁺CD45RB^{high}T 細胞移入→腸炎惹起性免疫記憶 T 細胞再移入モデルにおいて、腸炎発症加齢化免疫記憶 CD4⁺T 細胞を CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞と免疫不全マウスに共移入したマウスは腸炎を発症したが、腸炎未発症加齢化免疫記憶 CD4⁺T 細胞を CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞と免疫不全マウスに共移入したマウスは、制御性 T 細胞である CD4⁺CD25⁺T 細胞を共移入したマウスと同様に腸炎を発症しなかった。これは、1)の結果より、*in vitro*において加齢化免疫記憶 CD4⁺T 細胞は、CD4⁺T 細胞の増殖抑制能を認めなかったが、*in vivo*において、加齢化免疫記憶 CD4⁺T 細胞の中でも腸炎発症率・活動度が低下した腸炎未発症加齢化免疫記憶 CD4⁺T 細胞に制御性 T 細胞と同様の腸炎発症抑制能を認めた。このことより、免疫学的機能性の劣化を生体外で人為的に推進する細胞治療により、炎症性腸疾患治療における緩解導入を試みる新規治療法の可能性が示唆された。

D. E. 結論

炎症性腸疾患腸炎惹起性免疫記憶 T 細胞は加齢化に伴い、腸炎発症率の低下・活動度の低下を認め、これは発症初期に比べ、発症後数十年の初老期の炎症性腸疾患長期経過例における緩解または病勢の軽症化の一因と考えられる。また、腸炎未発症加齢化免疫記憶 CD4⁺T 細胞の中で腸炎未発症加齢化免疫記憶 CD4⁺T 細胞は、Foxp3 の有為な発現を認めなかったが、腸炎未発症加齢化免疫記憶 CD4⁺T 細胞を CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞と免疫不全マウスに共移入したマウスは、制御性 T 細胞である CD4⁺CD25⁺T 細胞を共移入したマウスと同様に腸炎を発症しなかった。このことより、免疫学的機能性の劣化を生体外で人為的に推進する細胞治療により、炎症性腸疾患治療における緩解

導入を試みる新規治療法の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology*. 132: 176-189, 2007.
2. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of *Hath1* and β -catenin by Wnt-glycogen synthase kinase 3 β in human colon cancer. *Gastroenterology*. 132: 208-220, 2007.
3. Kanai T, Makita S, Kawamura T, Nemoto Y, Kubota D, Nagayama K, Totsuka T, Watanabe M: Extracorporeal elimination of TNF- α -producing CD14^{du1}CD16⁺ monocytes in leukocytapheresis therapy for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 13: 284-290, 2007.
4. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J Immunol*. 178: 4737-4748, 2007.
5. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, Kiyono H, Watanabe M: Intestinal lamina propria retaining CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol*. 178: 4937-4946, 2007.
6. Nakamura T, Tsuchiya K, Watanabe M: Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. *J Gastroenterol*. 42: 705-710, 2007.
7. Ito Y, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M: Blockade of NKG2D signaling prevents the development of

- murine CD4⁺ T cell-mediated colitis. *Am J Physiol GI & Liver*. 394: G199-207, 2007.
8. Nakamura T, Nagahori M, Kanai T, Watanabe M: Current pharmacologic therapies and emerging alternatives in the treatment of ulcerative colitis. *Digestion*. 77: 36-41, 2007.
9. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M: Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. *J Immunol*. 180: 383-390, 2008.
10. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. (in press), 2008.
11. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Tsuchiya K, Sakamoto N, Okamoto R, Watanabe M: Immunosenescent colitogenic CD4⁺ T cells convert to regulatory cells and suppress colitis. *Eur J Immunol*. (in press), 2008.
12. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Akira S, Watanabe M: MyD88-dependent pathway in T Cells directly modulates the expansion of colitogenic CD4⁺ T Cells in chronic colitis. *J Immunol*. (in press), 2008.
2. 学会発表
1. 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 腸炎惹起性骨髄 CD4⁺メモリーT 細胞は骨髄自然免疫を攪乱する. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.19.
2. 戸塚輝治、金井隆典、富田貴之、篠原玉子、藤井俊光、鬼澤道夫、根本泰宏、伊藤ゆみ、蒔田 新、渡辺 守: 慢性大腸炎の発症と維持における IL-7 の役割. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.19.
3. 富田貴之、金井隆典、藤井俊光、篠原玉子、蒔田 新、根本泰宏、戸塚輝治、渡辺 守: 慢性大腸炎維持における腸炎惹起性メモリーCD4⁺T 細胞の再循環の意義. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.19.
4. 伊藤ゆみ、金井隆典、蒔田 新、土屋輝一郎、戸塚輝治、八木田秀雄、渡辺 守: 慢性大腸炎治療における NKG2D 阻害系の意義. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.19.
5. 鬼澤道夫、金井隆典、大島 茂、根本泰宏、蒔田 新、岡本隆一、戸塚輝治、土屋輝一郎、渡辺 守: 炎症性腸疾患合併大腸癌動物モデルにおける抗 TNF α 抗体維持療法の有用性. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.19.
6. 荒木昭博、土屋輝一郎、渡辺 守: 原因不明の消化管出血に対するダブルバルーン内視鏡の有効性. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.20.
7. 蒔田 新、金井隆典、根本泰宏、戸塚輝治、渡辺 守: 慢性大腸炎発症・維持・制御における腸間膜リンパ節の非必須性. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.20.
8. 岡田英理子、荒木昭博、陳 正新、土屋輝一郎、渡辺 守: ESD における容易な剥離層確認のために. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.20.
9. 久保田大輔、金井隆典、渡辺 守: クロウン病再発に関与する因子の検討. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.21.
10. 金井隆典、蒔田 新、渡辺 守: 白血球除去療法の体外抗 TNF- α 療法としての位置付け. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007.04.21.
11. 渡辺 守: Ulcerative colitis: A disorder of epithelial cell differentiation? 第 93 回 日本消化器病学会 (4th Joint Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology and the American Gastroenterological Association). 青森, 2007.04.21.
12. 荒木昭博、土屋輝一郎、渡辺 守: ひとりのできるダブルバルーン内視鏡—Grip and pinch techniqueによる One man method—. 第 73 回 日本消化器内視鏡学会. 東京, 2007.05.10.

13. Onizawa M, Kanai T, Nemoto Y, Oshima S, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Yagita H, Watanabe M: Blockade of TNF- α inhibits tumor progression in colitis-associated cancer. DDW 2007. Washington, D.C., 2007.05.20.
14. Okamoto R, Tsuchiya K, Kanai T, Watanabe M: Activated notch signaling suppresses generation of goblet cells in the human intestinal mucosa. DDW 2007. Washington, D.C., 2007.05.20.
15. Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Yoshioka S, Suzuki S, Kubota D, Kanai T, Watanabe M: Development of one man method for double balloon endoscopy. DDW 2007. Washington, D.C., 2007.05.20.
16. Ito Y, Kanai T, Fujii Y, Nemoto Y, Makita S, Totsuka T, Tsuchiya K, Yagita H, Watanabe M: Ameliorating effect of anti-NKG2D in CD4+ cell-mediated murine model of chronic colitis. DDW 2007, Washington, D.C., 2007.05.21.
17. Tomita T, Kanai T, Fujii Y, Nemoto Y, Makita S, Totsuka T, Watanabe M: Continuous recirculation of colitogenic CD4+ T cells may be required for perpetuation of chronic colitis. DDW 2007, Washington, D.C., 2007.05.21.
18. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Makita S, Totsuka T, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and persistence of chronic colitis. DDW 2007, Washington, D.C., 2007.05.22.
19. Nemoto Y, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. DDW 2007, Washington, D.C., 2007.05.22.
20. Aragaki M, Tsuchiya K, Yoshioka A, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Identification of Hath-1 target genes using ChIP-on-chip analysis. DDW 2007, Washington, D.C., 2007.05.23.
21. Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Stabilization of Atoh1 protein induces Mucin2 gene expression in human colon cancer cells. DDW 2007, Washington, D.C., 2007.05.23.
22. Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Role of Notch signaling in inflammatory bowel diseases. 12th US-Japan GI&Liver Meeting in 21st Century. 京都, 2007.06.22.
23. 永石宇司, Brozovic Suzana, 吉田 優, 鬼澤道夫, 金井隆典, 渡辺 守, Blumberg Richard S: Microsomal triglyceride transfer proteinによる NKT 細胞介在性肝炎および腸炎の制御. 第 44 回 日本消化器免疫学会総会. 東京, 2007.07.08.
24. 永石宇司, Brozovic Suzana, 吉田 優, 鬼澤道夫, 金井隆典, 渡辺 守, Blumberg Richard S: 腸管上皮細胞における TLR を介した IL-7 産生抑制機構の解析. 第 44 回 日本消化器免疫学会総会. 東京, 2007.07.08.
25. Kanai T, Nemoto Y, Shinohara T, Fujii T, Ito Y, Tomita T, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Watanabe M: Uniqueness of colitogenic lamina propria CD4+ T cells for the perpetuation of colitis. ICMI2007. 東京, 2007.07.11.
26. Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Role of Notch signaling in inflammatory bowel diseases. ICMI2007. 東京, 2007.07.11.
27. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Totsuka T, Watanabe M: Bone marrow is a reservoir for persistent colitogenic CD4+TEM cells in IL-7 dependent manner. ICMI2007. 東京, 2007.07.11.
28. Nagaishi T, Pao L, Lin S, Najjar S, Iijima H, Kaser A, Qiao S, Nakajima A, Watanabe M, Neel B, Blumberg R: Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1-4L isoform represses antigen specific CD4+ T cell function. ICMI2007. 東京, 2007.07.11.
29. Nagaishi T, Pao L, Lin S, Najjar S, Iijima H, Kaser A, Qiao S, Nakajima A, Watanabe M, Neel

- B, Blumberg R: Wnt-GSK3 β targets Hath1 in colonocyte proliferation and differentiation. ICMI2007. 東京, 2007. 07. 11.
30. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Makita S, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. ICMI2007. 東京, 2007. 07. 11.
31. 渡辺 守: 潰瘍性大腸炎の病態を内視鏡検体を用いて繙く. 第 25 回 日本大腸検査学会総会. 東京, 2007. 09. 08-09.
32. Tsuchiya K, Kanai T, Watanabe M: Degradation of Hath1 protein in inverse β -catenin by novel Wnt-GSK3 axis suppresses differentiation potency in human colon cancer. 第 66 回 日本癌学会学術総会. 横浜, 2007. 10. 03-05.
33. Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Novel Wnt signaling pathway targeting Hath1 protein in inverse regulation to β -catenin, suppresses differentiation potency in human colon cancer. APDW 2007. 神戸, 2007. 10. 15-18.
34. Watanabe M: Emerging issues in inflammatory bowel diseases. APDW 2007. 神戸, 2007. 10. 15-18.
35. 土屋輝一郎、岡本隆一、渡辺 守: Wnt シグナルによる Hath1 蛋白分解機構を標的とした大腸癌新規治療法開発. JDDW 2007. 神戸, 2007. 10. 18-21.
36. 渡辺 守: クロウン病治療における Infliximab 維持治療の重要性. JDDW 2007. 神戸, 2007. 10. 18-21.
37. 渡辺 守: 消化器医が知っておきたい下部消化管疾患の最先端—進歩する病態学・診断学・治療学—炎症性疾患:IBD. JDDW 2007. 神戸, 2007. 10. 18-21.
38. Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of Hath1 and beta-catenin by Wnt- glycogen synthase kinase 3 beta in human colon cancer. JUCC. 東京, 2007. 11. 16.
39. 渡辺 守: 炎症性腸疾患の病態を新しい側面から繙く. 日本消化器病学会東海支部. 第 107 回例会・日本消化器病学会東海支部. 第 18 回教育講演会. 名古屋, 2007. 11. 17.
40. Nagaishi T, Brozovic S, Yoshida M, Onizawa M, Kanai T, Watanabe M, Blumberg R S: Microsomal triglyceride transfer protein による NKT 細胞介在性肝炎および腸炎の制御. 日本免疫学会総会・学術集会. 東京, 2007. 11. 20.
41. Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M. Microsomal triglyceride transfer protein による NKT 細胞の機能調節. 日本免疫学会総会・学術集会. 東京, 2007. 11. 20-22.
42. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Fujii T, Shinohara T, Kameyama K, Totsuka T, Watanabe M: Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. 日本免疫学会総会・学術集会. 東京, 2007. 11. 22.
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案登録
なし
- 3 その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

自然発症小腸炎マウスモデルにおける不飽和脂肪酸の効果

研究協力者 三浦 総一郎 防衛医科大学校内科学講座 教授

研究要旨： ω 3系の不飽和脂肪酸が小腸における炎症に対し、修飾をきたすがどうかについて検討を行った。 ω 3系の不飽和脂肪酸の投与はマウス小腸炎を改善させた。

共同研究者 松永久幸, 穂苅量太
防衛医科大学校 内科学講座

系脂肪の投与によって抑制された。

A. 研究目的

ω 3系の不飽和脂肪酸が小腸における炎症に対し、修飾をきたすかどうかについて検討をおこなった。

E. 結論

ω 3系の不飽和脂肪酸の投与はマウス小腸炎を改善させた。

B. 研究方法

SAMP1/Yit マウス小腸炎モデルに魚油およびしそ油を含有する餌を投与し、回腸終末部における炎症の組織学的評価、 β 7インテグリン、CD4、CD8、F4/80 および MAdCAM-1 の免疫染色、RT-PCR を用いた TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1 および IL-6 の解析を行った。

F. 健康危険情報

なし

(倫理面への配慮)

防衛医大における、動物倫理委員会で承認された (承認 No. 05093)。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

C. 研究結果

SAMP1/Yit マウスで認められた回腸終末部の炎症は ω 3系の脂肪酸の投与によって改善した。また、SAMP1/Yit マウスにおける β 7-integlin、CD4、F4/80 陽性細胞と MAdCAM-1 陽性血管や IL-6、MCP-1、IFN- γ 、TNF- α などのサイトカインも ω 3

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

炎症性腸疾患における制御性 T 細胞の発現とその機能

研究協力者 猿田 雅之 東京慈恵会医科大学 消化器・肝臓内科 助教

研究要旨：CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞は、免疫応答において重要な調節細胞であり、FOXP3 は同細胞の発現に重要な役割を担う転写調節因子である。そこで潰瘍性大腸炎 (UC) および Crohn 病 (CD) における制御性 T 細胞の発現および機能について検討した。その結果、UC および CD では、健常人より FOXP3⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞が有意に多く発現していた。共培養では、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞は CD4⁺CD25⁻T 細胞の増殖を抑制し、その抑制力は正常リンパ節の制御性 T 細胞とほぼ同等であった。また、CD4⁺CD25⁻T 細胞を刺激すると FOXP3 の発現が増加し、TGF-β を加えると更に増強された。FOXP3 の promotor 活性の検討でも同様で、TGF-β が分化誘導に重要な鍵を握っていることが判明した。

共同研究者

田尻 久雄¹⁾、Konstantinos A. Papadakis²⁾、
Stephan R. Targan³⁾

1) 東京慈恵会医科大学 消化器・肝臓内科

2) Department of Gastroenterology,
University of Crete, Crete, Greece

3) IBD Center, Cedars-Sinai Medical Center,
Los Angeles, CA, USA

A. 研究目的

CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞は、免疫応答反応における重要な調節細胞であり、FOXP3 は同細胞の発現に重要な役割を担う転写調節因子である。しかし、制御性 T 細胞の炎症性腸疾患 (IBD) における発現や機能に関しては、まだあまり良く知られていない。そこで潰瘍性大腸炎患者 (UC) および Crohn 病患者 (CD) における制御性 T 細胞の発現および機能について検討した。

B. 研究方法

IBD 患者の腸粘膜、腸間膜リンパ節、末梢血中の FOXP3 の発現をフローサイトメトリー、免疫組織化学、RT-PCR にて検討した。CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞の制御機能については、CD4⁺CD25⁻T 細胞との共培養系にて検討を行った。さらに、CD リンパ節中の CD4⁺CD25⁻T 細胞を T 細胞刺激下

に TGF-β を加えて培養し、制御性 T 細胞の誘導を試みた。また、FOXP3 promotor を CD リンパ節 T 細胞にトランスフェクションし、その誘導を試みた。

C. 研究結果

IBD では、健常人より FOXP3⁺CD4⁺T 細胞が有意に多く発現していた。免疫組織化学では、FOXP3 陽性細胞は、粘膜固有層内およびリンパ節の T 細胞領域で多く陽性細胞が認められ、CD では granuloma 内や炎症の波及している筋層や漿膜でも発現が確認された。共培養では、CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞は CD4⁺CD25⁻T 細胞の増殖を抑制し、その抑制力は正常腸間膜の CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞とほぼ同等であった。さらに、制御性 T 細胞は CD4⁺CD25⁻T 細胞の産生する Th1 および Th2 サイトカインの両方を阻害した。また、CD4⁺CD25⁻T 細胞を CD3 と CD28 で刺激すると FOXP3 の発現が増加し、この効果は TGF-β を加えると更に増強された。FOXP3 の promotor 活性も同様で、T 細胞刺激に TGF-β が加わると、promotor 活性が有意に増強された。

D. 考察

In vitro では、IBD の制御性 T 細胞は、正常

と同等の制御力を持つことが判明したが、IBD患者では、慢性炎症が持続していることから、生体内では制御性T細胞の作用を阻害する他の因子が存在するものと考えられた。また、TGF-βは、炎症性サイトカインの一つと考えられているIL-17を分泌するTH17細胞の分化誘導にも関わっており、TGF-βによる局所での制御性T細胞の分化誘導については、更なる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

IBDの組織においてFOXP3⁺CD4⁺制御性T細胞は炎症に比例して多く発現しており、その抑制力は正常のFOXP3⁺CD4⁺T細胞と同様である事が判明した。また、FOXP3⁺制御性T細胞はTGF-βで効率的に誘導され、TGF-βが分化誘導における重要なサイトカインの一つと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3⁺ CD4⁺ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* Feb;13(2):191-9, 2007.

2. Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmidt-Weber CB, Banham AH, Papadakis KA. Characterization of FOXP3⁺CD4⁺ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol.* Dec;125(3):281-90, 2007.

2. 学会発表

1. Masayuki Saruta, Qi T. Yu, Phillip R. Fleshner, Pierre-Yves Mantel, Carsten B. Schmidt-Weber, Alison H. Banham, Konstantinos A. Papadakis. Characterization of FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in

human Crohn's disease (CD). DDW 2007, Washington, USA, May 23rd, 2007

2. Masayuki Saruta, Qi T. Yu, Lola Y. Kwan, Allison H. Banham, Konstantinos A. Papadakis, Hisao Tajiri. Peripheral and intestinal FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in Crohn's disease (CD). 1st JUCC, Tokyo, Japan, Nov 16th, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

難治性急性期潰瘍性大腸炎患者の早期予後予測因子としての
末梢血および粘膜免疫制御性 T 細胞

分担研究者 松本 誉之 兵庫医科大学内科（下部消化管）教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎 (UC) に対する白血球除去療法 (CAP) の作用発現機序として、免疫制御性 T 細胞 (Treg) に着目、末梢血に加え大腸粘膜における Treg 発現推移を評価。結果、UC 末梢血 Treg はフィルタ式白血球除去療法 (LCA) / 顆粒球吸着療法 (GMA) とともに即時的にその発現が増強。一方、粘膜 Treg は末梢血と逆の相関を示した。

共同研究者

福永 健 中村志郎、上小鶴孝二
兵庫医科大学内科（下部消化管）

A. 研究目的

UC に対する CAP の作用発現機序として Treg に着目、CAP 施行中の末梢血と粘膜 Treg 発現推移を評価した。

B. 研究方法

UC 患者に LCA (17 名), GMA (14 名) を導入。毎回 CAP 前後で末梢血を採取、FCM で抗 CD25^{hi}CD4⁺抗体陽性リンパ球を、また CAP 前と 5 回後に大腸内視鏡を施行、直腸粘膜を採取、免疫組織染色により Foxp3⁺CD4⁺細胞を各々 Treg と判定した。

(倫理面への配慮)

十分なインフォームド・コンセントの後文書で同意を得た上で検体を採取した。

C. 研究結果

LCA, GMA とともに各回前後で末梢血 Treg は有意に増強 ($P < 0.05$)。CAP 無効群では導入前の Treg 発現において有効群より有意な減弱が見られた ($P < 0.02$)。一方、粘膜 Treg は CAP 後に有意に減少 ($P < 0.05$) した。

D. 考察

我々は LCA において GMA 同様、即時的な Treg 改善効果が証明し、CAP 効果発現に Treg が重大な鍵であると示した。急性期 UC の大腸粘膜で Treg は増加、病勢減弱で減少し Treg は積極的に炎症中心に動員され疾患活動抑制に作用すると考えられた。

E. 結論

今後、UC 患者の CAP 作用機序解明と効果予測に加え、症例背景・治療法の免疫学的特性を Treg を軸に考えた至適治療計画の立案に繋げたい。

F. 文献

Yokoyama, Y., Fukunaga, K., Fukuda, Y., Tozawa, K., Kamikozuru, K., Ohnishi, K., Kusaka, T., Kosaka, T., Hida, N., Ohda, Y., Miwa, H. and Matsumoto, T. Dig Dis Sci. 2007; 52 : 2725-31.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録なし
3. その他 特記事項なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治製炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

DSS 腸炎における骨髄間葉系幹細胞治療

分担研究者 今井 浩三 札幌医科大学 学長

研究要旨：急性 GVHD を発症した患者の消化管には、ドナー由来の骨髄細胞が存在すると報告されている。しかし、これらの細胞の由来、役割やその転帰は明らかではない。DSS 腸炎モデルにおける、細胞治療としての骨髄間葉系幹細胞 (MSC) の腸炎抑制効果を検討し、さらにその有効性機序を検討することを目的とした。

共同研究者：田中浩紀，有村佳昭，後藤啓，中垣 卓，矢花 崇，田中道寛，細川雅代，永石欽和，中原生哉，山本博幸、本谷 聡、篠村恭久
所属：札幌医科大学第一内科

Claudin (CL) の発現を腸炎の重症度別と治療前後において検討した。

(倫理面への配慮) 札幌医科大学動物実験の指針に則り行った。

C. 研究結果

BU 誘導骨髄不全ラットの 1%DSS 腸炎において、ドナーMSC 投与による腸炎の抑制効果 (体重変化, 生存率) を認めた。腸炎急性期において、ドナーMSC の腸管組織への engraft を少数認めた。CL-2, 3, 7, 12, 15 はラット正常大腸組織に発現を認め、CL-2, 12, 15 は腸炎の重症度に依存して発現が低下した。Zo-1 と CL-7 は腸炎の有無によらず恒常的に発現を認めた。ドナーMSC による治療群において、腸炎急性期では CL-2, 12, 15 の発現回復は明らかではなかった。

D. 考察

ドナーMSC は、骨髄不全を誘発したラット腸炎に対して腸炎の抑制効果を認めた。しかし、腸炎急性期においては腸管組織に engraft された細胞が少なく、上皮再生の指標として考えられた CL の発現にも治療による影響が見られなかったことから、ド

A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞 (MSC) は、再生医療の細胞のソースとして有力視されている。DSS 腸炎モデルにおける、細胞治療としての MSC の効果を検討すること、また MSC 治療による粘膜再生の指標を探り、その有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

eGFP トランスジェニックラットから MSC (ドナーMSC) を分離した。レシピエントとして、ブスルファン (BU) により骨髄不全を誘導したラットに 1%DSS 腸炎を誘発し、腸炎誘発 2 日目にドナーMSC を 2×10^4 /g 尾静脈より静注し、その治療効果を検討した。さらに、投与された MSC の組織への engraft を GFP 陽性細胞を検出することにより経時的に検討した。また腸上皮のバリア機能に関与するタイトジャンクション蛋白の一つ、

ナーMSCの治療効果発現には、移植細胞の局所生着による細胞接触や癒合による再生効果のほか、免疫担当細胞の活動性抑制を介する機序の存在が示唆された。

E. 結論

ドナーMSCは、BU誘導骨髄不全ラット腸炎の重症化を抑制した。CL-2, 12, 15は、腸炎における上皮統合性の指標となる可能性が示唆された。今後MSC治療の機序解析として、局所の免疫担当細胞への影響、また腸上皮のバリア機構を回復させ、粘膜再生に有効性を有するか否かを検討していく必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

田中浩紀, 有村佳昭, 矢花崇, 田中道寛, 後藤啓, 篠村恭久, 今井浩三

ラット実験腸炎において骨髄間葉系幹細胞は腸上皮幹細胞取って代わる

第44回 日本消化器免疫学会総会

東京 品川プリンスホテル

2007年7月8日, 9日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 特願 2007-141147 「間葉系幹細胞による難治性腸炎の治療」

(平成19年5月28日 特許出願中)

2) 特願 2007-194910 「同上追加データ分」

(平成19年7月26日 特許出願中)

2. 実用新案登録

なし.

3. その他

なし.

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

EGF 前駆体の細胞内ドメインが標的とする核内蛋白の同定と大腸における意義

研究協力者 城 卓志 名古屋市立大学大学院 消化器代謝内科学 教授

研究要旨：最近、EGF が shedding されると同時に前駆体の細胞内ドメイン (CTF) が核に移行し転写抑制因子 (repressor) である C2H2 Zn-finger 蛋白と結合することが明らかになった。CTF との結合構造 (2 個以上の C2H2 Zn-finger とこれをつなぐ TGEKPY 構造) をゲノムデータベース上で解析した結果、マウスとヒトそれぞれ約 500 個の repressor 遺伝子 (BTB/POZ ファミリー; 49 と 55、KRAB ファミリー; 386 と 348、SCAN ファミリー; 72 と 49) を同定した。消化管上皮細胞と消化管癌における EGF 前駆体の CTF が標的とする核内蛋白の網羅的検討と同定し、大腸上皮の特徴、IBD の病態における意義の検討を進めた。

共同研究者

佐々木誠人、片岡洋望、小笠原尚高
名古屋市立大学大学院 消化器代謝内科学
東山繁樹
愛媛大学大学院 生化学分子遺伝学分野 2

A. 研究目的

EGF リガンドの放出と同時に核移行する EGF 前駆体の細胞内ドメイン (CTF) が引き起こす新しい EGF シグナルを消化管上皮において網羅的に検討し、大腸上皮の特徴、IBD の病態における意義を明らかにする。

B. 研究方法

全 repressor 遺伝子の DNA マイクロアレイチップを用い、消化管上皮細胞部位別のプロフィール解析を進め、部位特異的 repressor を検討した。

候補上がった遺伝子に関し、各種発現ベクター、PCR プライマー、siRNA、特異抗体など実験ツールを調整。

EGF 前駆体の細胞内ドメインと結合実験を繰り返し、EGF シグナルに重要な repressor を検

討した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

CTF との結合構造 (2 個以上の C2H2 Zn-finger とこれをつなぐ TGEKPY 構造) をゲノムデータベース上で解析した結果、マウスとヒトそれぞれ約 500 個の repressor 遺伝子 (BTB/POZ ファミリー; 49 と 55、KRAB ファミリー; 386 と 348、SCAN ファミリー; 72 と 49) を同定した。その結果、①消化管でも部位により発現のプロフィールが違う。②80%-90%はファンクションがわからない。③分かっているものには、発癌や分化に重要な因子が多い④すべてが HB-EGF の CTF の標的ではない。

D. 考察

大腸にも発現の高い repressor が存在し、消化管の各部位によって発現プロフィールが違うことから、大腸に重要な repressor が存在すると考えられる。いずれもほとんどファンクションが明らかでなく、新しい知見が期待できる。

E. 結論

大腸粘膜の分化、増殖、発癌に重要と考えられる新規 repressor 遺伝子が複数同定できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

志村貴也、片岡洋望、小笠原尚高、佐々木誠人、久保田英嗣、森義徳、溝下勤、東山繁樹、檜枝美紀、城卓志. 胃癌に対する新規分子標的治療の可能性：HB-EGF-C の核内移行の抑制効果、第18回消化器癌発生学会、北海道厚生会館ウェルシティー札幌、2007年11月8日

志村貴也、片岡洋望、城卓志. 胃癌に対する新規分子標的治療の基礎的検討、第107回日本消化器病学会東海支部例会、名古屋市中小企業振興会館、2007年11月17日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

炎症性腸疾患における上皮分化/増殖機構の解析と粘膜再生治療への応用

主任研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：本研究では炎症性腸疾患炎症部に特異的な上皮分化様式を端緒に、同疾患にける腸管上皮再生の分子機構の解析を行なった。腸管上皮における分化シグナル制御に関する我々独自の解析手法と古典的な形態学的、病理学的解析を統合することにより、上皮再生過程に於いて上皮細胞の分化と増殖の両者を制御する主たる分子シグナル系として Notch シグナルを同定した。さらにシグナル系が炎症性腸疾患を特徴づける特異的な分化様式を決定するシグナル経路であるのみならず、同シグナルの過剰な抑制が著しい病態の悪化につながることから、上皮再生促進に著しく貢献する分子シグナル系であることを明確に示し得た。これらの成果は、難治性炎症性腸疾患における上皮再生機構を分子レベルで解明した画期的知見であるのみならず、特定のシグナル分子を標的とすることにより上皮細胞の分化と増殖を同時に制御し上皮再生を促進することが可能となり得ることを示したものであり、炎症性腸疾患における粘膜再生治療の開発に重要な基盤を提供するものである。

共同研究者

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

A. 研究目的

本研究は研究代表者らが独自に確立した解析手法を用い、炎症性腸疾患に於ける上皮分化異常を司る分子機構の解明と、それを利用した難治性炎症性腸疾患に対する粘膜再生療法の確立を目指すものである。我が国において炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）は患者数が急速に増加しつつある疾患であり、同疾患の従来の治療に不応である難治症例もまた増加の一途である。同疾患は従来、遷延する粘膜の炎症こそが病態の中心と捉えられてきたが、難治症例においては粘膜上皮再生機構の破綻が深く関わることが指摘されている。さらに遷延する粘膜の炎症は粘膜上皮の再生異常とともに長期的には Colitic cancer の発症と密接に関わり得る事から、上皮再生/修復機構の詳細な解明は急務である。近年の分子生物学のめざまし

い進展は、従来解析困難であった様々な病態を分子レベルで解明し、画期的な分子標的治療の基盤を提供してきた。研究代表者らは最新の分子生物学的手法を炎症性腸疾患の病態解析に導入することにより独自の研究成果を提供してきた。即ち、研究代表者らは傷害後の腸管上皮再生に骨髄細胞による組織修復機構が関わることを明らかとし (Nat Med 2002)、腸管上皮再生研究において世界的に高い評価を獲得してきた。さらに、腸管上皮における杯細胞の機能解析から、同細胞において Interferon Regulatory Factor (IRF) ファミリー転写因子群による極めてユニークな転写制御によりサイトカイン分泌を調節する機構が内在していることを明らかとした (Mol Cell Biol 2004)。このように腸管炎症を制御する細胞内シグナルと上皮細胞分化を統合する独創的な視点から、腸管における杯細胞機能の重要性に注目し、画期的な成果をあげてきた。本研究ではこれまでの研究成果を発展させ、1) 炎症性腸疾患局所にみられる杯細胞の減少とパネート細胞の増加を司る分子機構の

解明 2) 上皮再生過程における細胞分化、増殖を制御する分子シグナル系の同定を行なうことを目的とした。

B. 方法・結果

1) 潰瘍性大腸炎病変部の免疫組織学的解析により、炎症部上皮細胞において細胞分化制御シグナル系として知られる Notch シグナルの構成分子の発現亢進を認めた。即ち、a) ヒト小腸および大腸粘膜に於いて、活性型 Notch 及びその標的遺伝子 *Hes1* は陰窩内の上皮細胞に限局して発現が確認された。b) 潰瘍性大腸炎病変部の陰窩においては杯細胞の著しい減少と一致して同部位の上皮における Notch の広範な活性化が確認された。さらにヒト大腸癌由来培養細胞株に於ける誘導発現系を用いて Notch シグナル活性化が大腸上皮細胞分化に与える影響を解析した。その結果、a) ヒト大腸癌由来細胞株に強制的に Notch 活性化を誘導する事により、杯細胞特異的遺伝子 *MUC2* の mRNA およびタンパク発現の著しい現象が誘導され、杯細胞の特異的機能である粘液分泌能に於いても著しい低下が確認された。b) 同様の Notch 活性化を誘導する事によりパネート細胞特異的遺伝子 *PLA2G2A* の発現及び分泌の亢進が誘導された。

2) 潰瘍性大腸炎病変部における Notch 活性化の亢進が同疾患の病態に如何なる役割を担っているかを解析するため、大腸炎モデルマウス(デキストラン硫酸投与による大腸炎誘導モデル)に Notch シグナル阻害薬を投与し、その効果を組織学的に解析した。その結果、a) Notch シグナル阻害薬によりデキストラン硫酸誘導腸炎の著しい増悪と個体死亡率の上昇が誘導された。b) Notch シグナル阻害薬は非炎症部腸管に於ける杯細胞分化を促進する効果を有する一方、炎症部腸管に於いて細胞増殖を著しく抑制する効果を有していた。同効果により、炎症により傷害された粘膜上皮の再生反応は著しく抑制されるとともに広汎かつ重篤な上皮の脱落が観察され、これにより大腸炎の病態が致命的な増悪を来したものと考えられた。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1) 倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2) 意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。

C. 考察

1) Notch シグナルによる分化制御はマウス神経、血液、皮膚、内耳等で研究が進展しているものの、ヒト腸管に於ける機能の解明は未だわずかである。本研究による成果は a) ヒト腸管で同シグナル経路が存在し、上皮細胞の分化制御を行う主たる分子シグナル系として機能し得ること b) ヒト炎症性腸疾患の病態において、特徴的な病理像の形成に中心的な機能を発揮し、同疾患の病態形成に必須の機能を有すること c) ヒト腸管上皮を構成する4種の細胞系譜のうち、杯細胞に特異的な遺伝子発現と粘液産生能を抑制する一方、パネート細胞特異的な遺伝子発現を誘導する機能を発揮し得ることを明らかとし、これまで全く未知であった炎症性腸疾患における上皮分化異常が、単一分子の活性化により再現し得る事を示したという点で画期的な成果を示し得た。

2) 本研究では単にヒト腸管上皮細胞における Notch シグナルの分子機能の解析に止まらず、その大腸炎における役割を個体レベルで明確に示すことに成功した。即ち、同シグナルが単に上皮分化制御を行うだけでなく、上皮再生過程に於いて必須の過程である急速な細胞増殖を指示する中核的なシグナルとして機能しており、組織学的変化として捉えられる杯細胞の減少は、その結果であると理解し得ることを初めて示した。これらの成果は Notch シグナルが炎症性腸疾患における上皮

分化と再生機構を解析する上で重要なシグナル経路である事を明確にし、かつ同シグナルの調節が上皮細胞増殖と分化調節に直結し得る事から、同シグナルが粘膜再生治療の開発における標的分子として極めて有用であることを明確に示した。

D. E. 結論

炎症性腸疾患の病態を構成する中心的な分子シグナル系として上皮細胞における Notch シグナルを同定した。同シグナルは炎症性腸疾患の病態と腸管粘膜の恒常性維持、局所免疫の調節に重要な細胞系譜である杯細胞の分化調節のみならず、パネート細胞特異的遺伝子の発現及び上皮細胞増殖をも担っており、炎症性腸疾患の病態形成に直接関与する可能性が示された。これらの成果から、炎症性腸疾患における上皮の増殖／分化制御機構が分子レベルで明確に示されることにより、細胞適切な系列細胞への分化誘導と細胞増殖促進と同時に達成し得る分子標的を同定し、腸管上皮の再生と早期の機能回復を図る粘膜再生治療を確立するための重要な基盤が提供された。いずれの成果も上皮再生不全を伴うヒト疾患に全く新しい視点を創出し、新規治療法の開発につながる分子病態の解明に著しく貢献する独自の成果を示し得たものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M: Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology*. 132: 176-189, 2007.
2. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of Hath1 and β -catenin by Wnt-glycogen synthase kinase 3 β in human colon cancer. *Gastroenterology*. 132: 208-220, 2007.

3. Kanai T, Makita S, Kawamura T, Nemoto Y, Kubota D, Nagayama K, Totsuka T, Watanabe M: Extracorporeal elimination of TNF- α -producing CD14^{dull}CD16⁺ monocytes in leukocytapheresis therapy for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 13: 284-290, 2007.
4. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J Immunol*. 178: 4737-4748, 2007.
5. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, Kiyono H, Watanabe M: Intestinal lamina propria retaining CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol*. 178: 4937-4946, 2007.
6. Nakamura T, Tsuchiya K, Watanabe M: Crosstalk between Wnt and Notch signaling in intestinal epithelial cell fate decision. *J Gastroenterol*. 42: 705-710, 2007.
7. Ito Y, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M: Blockade of NKG2D signaling prevents the development of murine CD4⁺ T cell-mediated colitis. *Am J Physiol GI & Liver*. 394: G199-207, 2007.
8. Nakamura T, Nagahori M, Kanai T, Watanabe M: Current pharmacologic therapies and emerging alternatives in the treatment of ulcerative colitis. *Digestion*. 77: 36-41, 2007.
9. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M: Systemic, but not intestinal, IL-7 is essential for the persistence of chronic colitis. *J Immunol*. 180: 383-390, 2008.
10. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. *Biochem Biophys Res*

Commun. (in press), 2008.

11. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Tsuchiya K, Sakamoto N, Okamoto R, Watanabe M: Immunosenescent colitogenic CD4⁺ T cells convert to regulatory cells and suppress colitis. Eur J Immunol. (in press), 2008.

12. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Akira S, Watanabe M: MyD88-dependent pathway in T Cells directly modulates the expansion of colitogenic CD4⁺ T Cells in chronic colitis. J Immunol. (in press), 2008.

2. 学会発表

1. 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 腸炎惹起性骨髄 CD4⁺メモリーT 細胞は骨髄自然免疫を攪乱する. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007. 04. 19.

2. 戸塚輝治、金井隆典、富田貴之、篠原玉子、藤井俊光、鬼澤道夫、根本泰宏、伊藤ゆみ、蒔田 新、渡辺 守: 慢性大腸炎の発症と維持における IL-7 の役割. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007. 04. 19.

3. 富田貴之、金井隆典、藤井俊光、篠原玉子、蒔田 新、根本泰宏、戸塚輝治、渡辺 守: 慢性大腸炎維持における腸炎惹起性メモリーCD4⁺T 細胞の再循環の意義. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007. 04. 19.

4. 伊藤ゆみ、金井隆典、蒔田 新、土屋輝一郎、戸塚輝治、八木田秀雄、渡辺 守: 慢性大腸炎治療における NKG2D 阻害系の意義. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007. 04. 19.

5. 鬼澤道夫、金井隆典、大島 茂、根本泰宏、蒔田 新、岡本隆一、戸塚輝治、土屋輝一郎、渡辺 守: 炎症性腸疾患合併大腸癌動物モデルにおける抗 TNF α 抗体維持療法の有用性. 第 93 回 日本消化器病学会, 青森, 2007. 04. 19.

6. 荒木昭博、土屋輝一郎、渡辺 守: 原因不明の消化管出血に対するダブルバルーン内視鏡の有効性. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007. 04. 20.

7. 蒔田 新、金井隆典、根本泰宏、戸塚輝治、渡辺 守: 慢性大腸炎発症・維持・制御における腸間膜リンパ節の非必須性. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007. 04. 20

8. 岡田英理子、荒木昭博、陳 正新、土屋輝一郎、渡辺 守: ESD における容易な剥離層確認のために. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007. 04. 20.

9. 久保田大輔、金井隆典、渡辺 守: クロウン病再発に関与する因子の検討. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007. 04. 21.

10. 金井隆典、蒔田 新、渡辺 守: 白血球除去療法の外抗 TNF- α 療法としての位置付け. 第 93 回 日本消化器病学会. 青森, 2007. 04. 21.

11. 渡辺 守: Ulcerative colitis: A disorder of epithelial cell differentiation? 第 93 回 日本消化器病学会 (4th Joint Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology and the American Gastroenterological Association). 青森, 2007. 04. 21.

12. 荒木昭博、土屋輝一郎、渡辺 守: ひとりで行えるダブルバルーン内視鏡—Grip and pinch technique による One man method—. 第 73 回 日本消化器内視鏡学会. 東京, 2007. 05. 10.

13. Onizawa M, Kanai T, Nemoto Y, Oshima S, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Yagita H, Watanabe M: Blockade of TNF- α inhibits tumor progression in colitis-associated cancer. DDW 2007. Washington, D. C., 2007. 05. 20.

14. Okamoto R, Tsuchiya K, Kanai T, Watanabe M: Activated notch signaling suppresses generation of goblet cells in the human intestinal mucosa. DDW 2007. Washington, D. C., 2007. 05. 20.

15. Araki A, Tsuchiya K, Oshima S, Okada E, Yoshioka S, Suzuki S, Kubota D, Kanai T, Watanabe M: Development of one man method for double balloon endoscopy. DDW 2007. Washington, D. C., 2007. 05. 20.

16. Ito Y, Kanai T, Fujii Y, Nemoto Y, Makita