

- 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 Atohl 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 $\beta$  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  $\beta$ -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  $\beta$ -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一進歩する病態学・診断学・治療学ー炎症性疾患: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

上皮細胞分化形態形成蛋白エピモルフィンの腸上皮細胞保護作用に関する研究

研究協力者 飯塚 政弘 秋田大学医学部第一内科 講師

研究要旨：上皮細胞分化形態形成蛋白エピモルフィンは、MEK/ERK, PI3K/Akt の二つの生存シグナルの活性化とともに radical scavenger 機能を併せ持ち、これらの機能により腸上皮細胞を酸化ストレスから保護しているものと考えられた。

A. 研究目的

昨年までの研究によりエピモルフィン(EPM)が強力な抗酸化ストレス機能を有することが明らかになった。今回、EPMの radical scavenger 機能について解析を行った。

B. 研究方法

腸上皮細胞株 IEC-6 の培養液中に 1mM 過酸化水素および EPM(20mg/ml)を添加し、ラジカル生成能、カタラーゼ活性、SOD 活性を測定した。

(倫理面への配慮)

細胞レベルの研究のため、特に配慮は不要と考えられる。

C. 研究結果

EPM の添加により培養液中のラジカル生成能は急速に (5 分以内) に消失し、カタラーゼ活性の有意な上昇を認めた。EPM による SOD 活性の誘導は認められなかった。

D. 考察

EPM はカタラーゼ活性を上昇させることにより radical scavenger 機能を有することがあきらかとなった。すなわち、EPM は MEK/ERK, PI3K/Akt などの生存シグナルを活性化し抗アポトーシス蛋白を誘導するとともに radical scavenger 機能も有する画期的蛋白であることが証明された。

EPM はこれらの 2 つの機能により、腸上皮細胞を酸化ストレスから強力に保護しているものと考えられた。

E. 結論

エピモルフィンは、MEK/ERK, PI3K/Akt の二つの生存シグナルの活性化とともに radical scavenger 機能を併せ持ち、これらの機能により腸上皮細胞を酸化ストレスから保護しているものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iizuka M, Sasaki K, Hirai Y, Shindo K, Itou H, Konno S, Dhshima S, Horie Y, Watanabe S. Morphogenic protein epimorphin protects intestinal epithelial cells from oxidative stress by the activation of EGF receptor and MEK/ERK, PI3 kinase/Akt signals. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292: G39-G52, 2007.
2. Iizuka M, Watanabe S. Disseminated tuberculosis after anti-TNF $\alpha$  treatment. Lancet 370: 564, 2007.

3. 飯塚政弘、相良志穂、堀江泰夫、吉野裕頭、蛇口達造、南條 博. 画像を診る(54)-鑑別診断のポイント 若年性ポリープ、消化器の臨床 10: 658-660, 2007.

2. 学会発表

1. 飯塚政弘、堀江泰夫、渡辺純夫・ワークショップ 13. 消化管上皮細胞分化・増殖制御による疾患治療. 上皮細胞分化形態形成蛋白 epimorphin の腸上皮細胞保護作用に関する検討・第 49 回日本消化器病学会大会・神戸ポートピアホテル・平成 19 年 10 月 19 日.

2. 飯塚政弘、堀江泰夫、相良志穂. ワークショップ

3. Immunomodulator によるクローン病治療の新展開. クローン病高度難治例と今後の問題点-immunomodulator の使用経験も含めて-・第 4 回日本消化管学会総会学術集会・大阪国際会議場・平成 20 年 2 月 7 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

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

Th-1 型反応と腸管上皮における RIG-I 発現調節

研究協力者 石黒 陽 弘前大学光学医療診療部 准教授

研究要旨：Th-1 型反応において、腸管上皮細胞と免疫担当細胞との間の CXCR3 を軸としたサイトカイン (IFN-g, TNF-a)・ケモカイン (CXCL9, 10, 11) ネットワークに RIG-I が関与していることが示された。上皮細胞の障害機序に関与する可能性が示唆された。

共同研究者 1)川口 章吾、櫻庭 裕丈、山形  
和史、佐藤 裕紀、島谷 孝司、福田 真作  
2)今泉忠淳  
1)弘前大学医学部消化器血液内科 2) 同脳血管病  
態部門

A. 研究目的

腸管上皮細胞はバリア機能を有し恒常性維持に寄与すると考えられている。上皮細胞の障害機序に関する検討により、上皮の炎症における役割、細胞死に関するメカニズムを明らかにし、炎症性腸疾患における病態を上皮細胞の機能異常の点から解析することを目的とする。これまでに TGF- $\beta$  を Block することで DSS 腸炎において上皮細胞 apoptosis 早期誘導が生じることを報告したり、その増悪因子は IFN-g であるが、詳細な機序に関しては明らかでない。Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) は細胞内で二本鎖 RNA を認識し、CARD ドメインを介して下流分子へシグナルを伝達する。これまで HeLa, HUVEC といった細胞において IFN-g 刺激により、CXCL11 などを産生することが報告されている。また上皮細胞においてウイルス感染により RIG-I の発現が亢進することが、報告されているが、腸管上皮細胞における炎症性サイトカインによる RIG-I の発現調節については不明である。大腸上皮系の細胞株とノックアウトマウスを用いて RIG-I の発現調節

とその意義について検討した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては弘前大学動物実験施設の承認を得かつ規則を遵守した。また、臨床検体については弘前大学倫理委員会の承認と患者の同意を得た上で解析した。

C. 研究結果

TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  で上皮細胞株である HT-29 を刺激すると、それぞれ時間依存性・濃度依存性に、蛋白レベル、遺伝子レベルで RIG-I の発現が増強した。Th1 型の腸炎モデルである IL-10KO マウスでは上皮、LP ともに RIG-I の発現が亢進していた。また HT-29 において RIG-I に対する siRNA を transfect すると、IFN- $\gamma$  で誘導される CXCL-9 (MIG) の産生が有意に低下した。

クローン病の大腸切除標本における RIG-I の免疫染色では、上皮細胞と LP の単核球に発現が認められた。

D. 考察

Th1 型の腸炎モデルである IL-10KO マウスの腸管粘膜では TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  の mRNA が野生型マウスの 10~20 倍高い。腸管上皮細胞は IFN- $\gamma$  の刺激により、MIG、IP-10、I-TAC といった T cell

chemo-attractant を産生し、これらのケモカインは IFN- $\gamma$  産生 CD4<sup>+</sup>T 細胞を走化させることが報告されている。この positive feedback loop は腸管の Th1 型炎症に関与すると考えられる。実際、IBD の腸管では粘膜下に遊走する CXCR3<sup>+</sup>細胞は、非 IBD 患者に比べ有意に増加しており、また、我々の検討ではステロイド抵抗性 UC においては、CXCR3 陽性 CD8<sup>low</sup> 細胞は PGP-1 を発現しており Granzyme B を発現していた。さらに、CXCR3 のリガンドである MIG はステロイド抵抗性 UC でも増加しており、Granzyme B が toxic であることを考え合わせると CXCR3 axis が上皮細胞傷害に関与していることが示唆される。

#### E. 結論

今回の結果から、Th-1 型反応において、腸管上皮細胞と免疫担当細胞との間の CXCR3 を軸としたサイトカイン・ケモカインネットワークに RIG-I が関与していることが示された。さらに上皮細胞の障害機序に関与する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. Sakuraba H, Ishiguro Y, Yamagata K, Munakata

A, Nakane A. Blockade of TGF- $\beta$  accelerates mucosal destruction through epithelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 359(3):406-12; 2007.

##### 2. 学会発表

1. Y. Ishiguro, S. Kawaguchi, H. Fujita, H. Sakuraba, K. Shimaya, Y. Sato, k. Yamagata, S. Fukuda. MDR1 Positive CD8<sup>low</sup> T cells In Refractory UC. 13<sup>th</sup> International Conference of Mucosal Immunology TOKYO 2007/07/10.

2. H. Sakuraba, Y. Ishiguro, S. Kawaguchi, H. Fujita, H. Sakuraba, K. Shimaya, Y. Sato, K. Yamagata, S. Fukuda. Cyclosporin A prevented apoptosis-mediated epithelial injury through transforming growth factor- $\beta$  related pathway. Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology (JUCC) Tokyo, November 16, 2007.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業  
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

クローン病大腸組織におけるエンドセリン変換酵素とエンドセリン受容体の発現

研究協力者 押谷 伸英 大阪市立大学大学院医学研究科消化器器官制御内科学 准教授

研究要旨：腸管局所でのエンドセリンリガンド・レセプター系の発現が、クローン病の炎症過程の進展や狭窄病変の形成に深く関与していることを、ヒト大腸手術材料を用いて明らかにした。

共同研究者 末包剛久<sup>1,2</sup>、押谷伸英<sup>1</sup>、有元純子<sup>2</sup>、伊倉義弘<sup>2</sup>、鎌田紀子<sup>1</sup>、十河光栄<sup>1</sup>、山上博一<sup>1</sup>、渡辺憲治<sup>1</sup>、前田 清<sup>3</sup>、平川弘聖<sup>3</sup>、上田真喜子<sup>2</sup>、荒川哲男<sup>1</sup>  
大阪市立大学大学院消化器器官制御内科学<sup>1</sup>、  
同・病理病態学<sup>2</sup>、同・腫瘍外科学<sup>3</sup>

抗体を用いた免疫単染色および二重染色を施行し、検索した。

(倫理面への配慮)

院内の倫理委員会の承認のもと、患者の承認を得て行った。

A. 研究目的

クローン病は、全層性炎症を特徴とする原因不明の難治性炎症性腸疾患である。炎症を繰り返した腸管は徐々に線維化と粘膜下層での特徴的な平滑筋増生をきたし、ひいては内腔の狭窄に至るが、そのメカニズムについては明らかにされていない。本研究では、クローン病狭窄部位の組織標本を用いて、局所でのエンドセリンリガンド・レセプター系の発現について免疫組織化学的に解析し、病態への関与について検討した。

B. 研究方法

研究材料としては、腸管狭窄などの合併症により手術を受けたクローン病 18 例の凍結大腸標本と、正常対照として大腸腫瘍 12 例の非腫瘍部組織を用いた。手術標本と正常対照標本より凍結連続切片を作成し、これら凍結切片に、マクロファージ、平滑筋細胞、内皮細胞、エンドセリン変換酵素 (ECE)、エンドセリン受容体タイプ A (ET<sub>A</sub>)、エンドセリン受容体タイプ B (ET<sub>B</sub>) に対する特異

C. 研究結果

今回検討したエンドセリンリガンド・レセプター系蛋白は、いずれも正常大腸組織において主に粘膜筋板、固有筋層、血管壁に発現していた。ECE は血管内皮にも発現が認められた。クローン病病巣部では、粘膜下層を中心として著明な炎症細胞の浸潤が認められ、特に狭窄部では線維化と平滑筋細胞の増生が認められた。また、固有筋層および血管の平滑筋細胞に加え、粘膜下層に増生した平滑筋細胞においても、これらエンドセリン系の著明な発現が認められた。さらに、炎症巣に認められるマクロファージや新生血管にもエンドセリン系の発現が認められた。

D. 考察

クローン病の病巣部では、ECE、ET<sub>A</sub>、ET<sub>B</sub> などのエンドセリンリガンド・レセプター系の著明な発現増強が認められ、炎症の進展や組織修復に関与している可能性が示された。以上のことから、エンドセリン受容体拮抗薬がクローン病の治療薬

として臨床応用できる可能性が示唆された。

(予定を含む。)

#### E. 結論

腸管局所でのエンドセリンリガンド・レセプター系の発現が、クローン病の炎症過程の進展や狭窄病変の形成に深く関与している。

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takehisa Suekane, Nobuhide Oshitani, Yoshihiro Ikura, Junko Arimoto, Masashi Nakagawa, Chizuko Kitabayashi, Takahiko Naruko, Toshio Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Nobuhide Oshitani, Kiyoshi Maeda, Kazuhiko Tanzawa, Kosei Hirakawa, Tetsuo Arakawa, Makiko Ueda · Enhanced Expressions of Endothelin-Converting Enzyme and Endothelin Receptors in Human Colonic Tissues of Crohn's Disease. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition · in press

##### 2. 学会発表

Takehisa Suekane, Yoshihiro Ikura, Junko Arimoto, Masahiko Ohsawa, Kenji Watanabe, Yasuhiro Fujiwara, Nobuhide Oshitani, Kazuhide Higuchi, Tetsuo Arakawa, Makiko Ueda · Potential Contribution of Endothelin-Converting Enzyme, and ETA and ETB Receptors to Inflammatory Processes of Crohn's Disease in Humans · DDW 2006 · Los Angeles · May, 2006

クローン病の腸管狭窄機序におけるエンドセリンのリガンド・レセプター系の関与・伊倉義弘, 有元純子, 大澤政彦, 渡辺憲治, 押谷伸英, 樋口和秀, 荒川哲男, 上田真喜子・第48回日本消化器病学会大会・札幌・平成18年10月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況



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

IBD の病態解明に向けて：  
難治性炎症性腸疾患におけるサイトメガロウイルス感染の関与

分担研究者 千葉 勉 京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座 教授

研究要旨：難治性潰瘍性大腸炎（以下 UC）の増悪にサイトメガロウイルス(cytomegalovirus; CMV)感染の関与が注目されている。現在まで我々は、UC 患者における CMV 感染の早期診断に real-time PCR 法（以下 mucosal PCR 法）を応用した腸管粘膜内の CMV-DNA を検出する方法に着目し、その臨床的有用性を報告してきた。しかしながら、UC 以外の炎症性腸疾患における CMV 感染の関与についてはいまだ明らかとはなっていない。今回我々は UC をはじめとしてクローン病（以下：CD）および腸管ベーチェット病（以下：BD）など他の難治性炎症性腸疾患における CMV の関与について mucosal PCR 法を用いて検討した。対象はステロイド剤や免疫抑制剤による治療抵抗性の難治性炎症性腸疾患の患者 60 名対象の内訳は（UC：43 名、CD：9 名、BD：8 名）。

（1）UC 患者 43 名中 19 名（51.4%）で mucosal PCR 法にて CMV-DNA が陽性であった。CMV-DNA が陽性 19 名のうち、血中 CMV 抗原または核内封入体が陽性を示した患者は 5 名（26.3%）のみであった。（2）CD 患者 9 名中、CMV-DNA、血中 CMV 抗原、または核内封入体が陽性を示した患者は 0 名であった。（3）BD 患者 8 名中、2 名（25%）で CMV-DNA が陽性であった。CMV-DNA 陽性患者のうち、血中 CMV 抗原または核内封入体が陽性を示した患者は 1 名（50%）であった。今回の結果から、ステロイドを含む免疫調節剤に治療抵抗性を示す UC 以外の炎症性腸疾患患者の CMV 感染の診断においても mucosal PCR 法は有用であると考えられた。

#### A. 研究目的

サイトメガロウイルス(cytomegalovirus; CMV) は日本人の大多数が周産期に初感染し、大多数は不顕性感染の経過をたどり、主に免疫不全患者において再活性化され重篤な合併症を来す。近年、難治性潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis, 以下 UC) における増悪因子として CMV 感染が注目されている。その理由として、難治例においてはステロイドを含めた免疫抑制剤を使用することが多く、このような状況下でしばしば CMV が再活性化し、UC の病態を悪化させ、中毒巨大結腸症や穿孔などの合併症を生じるからである。

UC 患者における CMV 感染の診断は、主として血中 CMV 抗原測定、および生検材料を用いた病理学的診断 (核内封入体の有無) により行われてきた。しかし、大腸内視鏡検査にて CMV 感染の合併が疑われるにも関わらず、上記検査結果が陰性のため治療方針の決定に難渋する症例がしばしば存在する。

近年、血中の CMV 抗原 (CMV antigenemia) を用いた診断法が CMV 感染の診断に有用とされている。

CMV antigenemia 陽性の意味するところは、CMV に感染した血管内皮細胞や組織の感染細胞などで産生された CMV 抗原を核内に取り込んだものと考えられており、すなわち CMV 抗原血症は、体内のどこかに活動的な CMV 感染巣が存在することを示している。

また、CMV 核酸診断法としての Polymerase chain reaction (PCR) の有用性も報告されている。しかしながら、組織に潜伏感染している CMV ゲノムの存在により、症状に関係なく PCR の結果が陽性になり、結果の解釈が困難な場合がある。

CMV が増殖する際には、前初期遺伝子 (immediate early: IE), 初期 (early: E), 後期 (late: L) の順序で段階的に、また相互依存的に転写、翻訳される。

我々は、CMV 感染をできるだけ早期に診断することを目的として、IE 遺伝子の特異的に検出する PCR プライマーを設定し、大腸粘膜から生検を行い、炎症部位および非炎症部位の CMV-DNA の存在を比較検討した。その結果、我々の開発した PCR 法が単なる存在診断ではなく、CMV 感染の早期診

断治療に有用であることを報告してきた。

そこで、今回我々は、クローン病（以下：CD）および腸管ペーチェット病（以下：BD）を含めた難治性炎症性腸疾患における CMV 感染の関与について、mucosal PCR 法を用いて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

2003 年 10 月から 2007 年 3 月まで、京都大学消化器内科で初発および再燃を来し加療を受け中等度以上の活動性を有し、ステロイド剤や免疫抑制剤による治療抵抗性のステロイド剤や免疫抑制剤による治療抵抗性の難治性炎症性腸疾患の患者 60 名。対象の内訳は（UC：43 名、CD：9 名、BD：8 名）であった。

### 2. 方法

#### CMV 感染診断法

対象全例に対し、

（1）ペルオキシダーゼ標識抗 CMV ヒトモノクローナル抗体（C7-HRP, C10, C11）を用いた免疫染色で CMV antigenemia の検索を測定した。

（2）同時期に無前処置下で大腸内視鏡を施行した。観察可能であった部位までに存在する炎症部位（潰瘍辺縁や潰瘍底を含む）から組織生検を行い、HE 染色で核内封入体（Cytomegalic inclusion body; CIB）を検索するとともに抗 CMV モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学で陽性細胞を検索した。

（3）real-time PCR 法による腸管粘膜内の CMV-DNA により CMV 感染の有無を検索した。具体的には、色素散布および拡大内視鏡を使用し、大腸粘膜炎症部位および非炎症部位を判別し生検を行った。生検組織より DNA を抽出し、両部位の CMV-DNA の存在を比較検討した。CMV-DNA の検出には IE 遺伝子に特異的であるプライマーを設定し real-time PCR 法を行い、10copy 以上を陽性と判定した。

上記の 3 つの検索方法うちいずれか 1 つで CMV の存在が確認された場合を陽性例として取り扱った。

## C. 研究結果

### 1. 各種 CMV 感染合併率と臨床像の比較。（1）

UC 患者 43 名中 20 名（46.5%）で、mucosal PCR 法にて CMV-DNA が陽性であった。CMV-DNA が陽性 20 名のうち、血中 CMV 抗原または核内封入体が陽性を示した患者は 5 名（25%）のみであ

った。（2）CD 患者 9 名中、CMV-DNA、血中 CMV 抗原、または核内封入体が陽性を示した患者は 0 名であった。（3）BD 患者 8 名中、2 名（25%）で CMV-DNA が陽性であった。CMV-DNA 陽性患者のうち、血中 CMV 抗原または核内封入体が陽性を示した患者は 1 名（50%）であった。

- UC, BD 患者において、CMV-DNA は炎症粘膜部位のみで検出された。
- UC において、CMV-DNA 陽性群と陰性群間で、各種内視鏡スコア（DAI, Matt's, CAI score）における有意差は認められなかった。
- UC 患者 CMV-DNA 陽性患者 20 名のうち 14 名（70%）は抗ウイルス剤投与による治療を行い、全例 CMV-DNA が陰性化した。抗ウイルス剤投与単独で臨床的緩解に到った患者は 6 名、投与後 G-CAP の併用が必要となった患者 6 名、タクロリムスを必要とした患者 1 名、手術にいたった患者 1 名であった。
- BD 患者においては、CMV-DNA 陽性患者 2 名は下血を主訴としていた。2 名に抗ウイルス剤投与がなされ、大腸粘膜内での CMV-DNA は陰性化し、症状は軽快した。

## D. 考察

今回、我々が開発した大腸粘膜生検を用いた PCR 法により、UC をはじめとして、難治性 CD および BD 患者においても CMV 感染の診断に有用であることが示唆された。

今回我々の検討で対象となった CD 患者には、CMV-DNA 陽性例はみとめられなかった。一方、BD 患者では 25% で認められた。難治性 CD 患者に粘膜内の CMV-DNA が検出されなかった理由は現時点では明らかではない。しかしながら、（1）CD の免疫反応自体が強い Th1 の方向に向いているために CMV 感染が成立しにくい状況にある。（2）ステロイドを内服している CD 患者が、ほとんどいなかった点などが推測される。この点については、今後症例を増やすことで、難治性 CD における CMV 感染の頻度および臨床学的特徴を検討していく必要があると考えられる。

BD 患者においては、CMV-DNA 陽性患者では主訴として下血が認められた。下血は抗ウイルス剤の投与にてすみやかに改善していることから、BD の悪化に CMV が関与している可能性は強く示唆される。しかしながら、現在まで、BD の病態における CMV の関与はほとんど報告されていない。臨

床上、我々は BD 患者での消化管穿孔などの合併症に遭遇することがまれではない。CMV 感染自体は、一般的に回盲部に生じやすい特徴をもっていること、また BD の消化管病変が回盲部に多いこと、さらに BD はその疾患コントロールのため、ステロイドが維持投与されている点などからも CMV 感染が生じやすい状況下にあると推測される。従って、BD の治療方針を決める上でも、今後は CMV 感染の有無を除外していく必要があると考えられる。

#### E. 結論

Mucosal PCR 法を応用した腸管粘膜内の CMV-DNA 診断は、ステロイドを含む免疫調節剤に治療抵抗性を示す CD および BD 患者における CMV 感染の診断においても mucosal PCR 法は有用であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nanakin A, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Kanda N, Hisatsune H, Seno H, Konda Y, Fujimori T, Chiba T. Expression of the REG IV gene in ulcerative colitis. *Lab Invest* 87: 304-314:2007.
2. Nakase H, Yoshino T, Ueno S, Uza N, Mikami S, Matsuura M, Chiba T. Importance of early detection of cytomegalovirus infection in refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 13:364: 2007.
3. Nakase H, Mikami S, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kasahara K, Yoshino T, Takeda Y, Chiba T. Rescue therapy with Tacrolimus for a patient with severe ulcerative colitis refractory to combination leukocytapheresis and high-dose of corticosteroid therapy. *Int Med* 46:717-720:2007.
4. Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Mikami S, Tamaki H, Kasahara K, Chiba T. Open label trial of Clarithromycin therapy in Japanese

patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22:984-988:2007.

5. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Endo Y, Kou T, Morisawa T, Azuma T, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T. Helicobacter pylori infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med* 13:470-476:2007.
6. Saga K, Fukui T, Kato Y, Komeda T, Nakase H, Watanabe N, Nishio A, Chiba T. Localized cytomegalovirus reactivation after radiotherapy for high-grade gastric lymphoma. *Gastrointest Endosc* 65:545-547: 2007.
7. Mikami S, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Sakurai T, Chiba T. Involvement of cytomegalovirus infection in the ileal lesions of the patient with Behcet's disease. *Inflamm Bowel Dis* 13: 802-803: 2007.
8. Yoshino T, Nakase H, Ueno S, Uza N, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Ohmori K, Sakurai T, Nagayama S, Hasegawa S, Sakai Y, Chiba T. Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis* 13:1516-1521: 2007.
9. Fukumoto A, Tanaka S, Yamamoto H, Yao T, Matsui T, Iida M, Goto H, Sakamoto C, Chiba T, Sugano K. Diagnosis and treatment of small-bowel stricture by double balloon endoscopy. *Gastrointest Endosc* 66:S108-112:2007.
10. Kasahara K, Nakase H, Uza N, Ueno S, Matsuura M, Mikami S, Inoue S, Chiba T. Administration of PEG-interferon to a patient with UC and chronic hepatitis C correlated with reduced colonic inflammation and reversal of peripheral T cell Th1/Th2 ratios. *Case reports in Gastroenterol* 2008 (in press).
11. Uza N, Nakase H, Ueno S, Inoue S, Mikami S, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T. The

effect of medical treatment on patients with fistulizing Crohn's disease: our experience with a retrospective study. Intern Med 2008 (in press).

## 2. 学会発表

1. Takuya Yoshino, Hiroshi Nakase, Satoko Inoue, Hiroshi Kitamura, Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Sakae Mikami, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: The usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus in patients with UC refractory to immunosuppressive therapies. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute • poster sessions, Washington DC, 2007. 5. 21.
2. Tadayuki Kou, Hiroyuki Marusawa, Yoko Endo, Hiroshi Nakase, Shigehiko Fujii, Kazuo Kinoshita, Takahiro Fujimori, Tasuku Honjo, Tsutomu Chiba: Etopoc expression of activation-induced cytidine deaminase in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute • poster sessions, Washington DC, 2007. 5. 22.
3. Akiyoshi Nishio, Masanori Asada, Keiichi Kiriya, Masahiro Kido, Takuji Akamatsu, Kazuyuki Saga, Junya Tanaka, Norihiko Watanabe, Tsutomu Chiba: Interleukin 10 is essential for prevention of murine autoimmune pancreatitis induced by poly I:C administration. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute • poster sessions, Washington DC, 2007. 5. 23.
4. Hiroshi Kitamura, Hiroshi Nakase, Yasuhiro Takeda, Takuya Yoshino, Katsuhiro Kasahara, Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Satoko Inoue, Sakae Mikami, Minoru Matsuura, Yoshihiro Ishida, Kazuhiro Nagata, Tsutomu Chiba: The critical role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis associated with Inflammatory Bowel Diseases. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute • oral sessions, Washington DC, 2007. 5. 23.
5. TANAKA Junya, WATANABE Norihiko, KIDO Masahiro, SAGA Kazuyuki, AKAMATSU Takuji, NISHIO Akiyoshi, CHIBA Tsutomu: Human TSLP enhances TLR-ligand-mediated IL-23 production by myeloid dendritic cells and has a potential to induce Th17 inflammatory responses. 2007 日本免疫学会総会 • 学術集会, 東京, 2007. 11. 20.
6. KIDO Masahiro, WATANABE Norihiko, TANAKA Junya, AKAMATSU Takuji, NISHIO Akiyoshi, CHIBA Tsutomu: Helicobacter triggers gastric epithelial cells to produce TSLP which induces DC-mediated inflammatory Th2 responses. 2007 日本免疫学会総会 • 学術集会, 東京, 2007. 11. 20.
7. 吉野 琢哉、仲瀬裕志、千葉 勉: 難治性潰瘍性大腸炎におけるサイトメガロウイルス感染 早期診断のための real-timePCR 法の有用性について. 第 104 回日本内科学会講演会 • 一般演題ポスターセッション, 大阪, 2007. 4. 3.
8. 上野 哲、仲瀬裕志、千葉 勉: Bifidobacterium longum (BB-536) の腸管上皮バリア機能に対する作用の検討. 第 93 回日本消化器病学会総会 • シンポジウム, 青森, 2007. 4. 19.
9. 仲瀬裕志、宇座徳光、千葉 勉: 免疫抑制剤投与による難治性クローン病患者に対する長期緩解維持効果. 第 93 回日本消化器病学会総会 • パネルディスカッション, 青森, 2007. 4. 21.
10. 吉野 琢哉、仲瀬 裕志、千葉 勉: 難治性潰瘍性大腸炎に合併する CMV 感染の正確な診断を目指して—内視鏡か PCR 法か?—. 第 73 回日本消化器内視鏡学会総会 • パネルディスカッション, 東京, 2007. 5. 10.
11. 三上 栄、山本修司、仲瀬裕志: 難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムス治療の位置づけ. 第 87 回日本消化器病学会近畿支部例会, 大阪, 2007. 9. 8.

12. 武田康宏、仲瀬裕志、千葉 勉：粘膜免疫制御の観点からみた *Bifidobacterium longum* (BB536) の IBD に対する治療機序の解明. 第 49 回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 神戸, 2007. 10. 18.
13. 渡邊智裕、千葉 勉: NOD2 の活性化による腸管免疫の制御機構. 第 49 回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 神戸, 2007. 10. 18.
14. 吉野琢哉、仲瀬裕志、千葉 勉: 炎症性腸疾患に合併する CMV 感染の早期診断法の確率に PCR は有用か? 第 49 回日本消化器病学会大会・ワークショップ, 神戸, 2007. 10. 18.

H. 知的所有権の取得状況  
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業  
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

潰瘍性大腸炎患者の LCAP 前後における腸内細菌叢の T-RFLP 法による解析

分担研究者 藤山 佳秀 滋賀医科大学消化器内科 教授

研究要旨：活動期と緩解期の潰瘍性大腸炎(UC)患者糞便中腸内細菌叢の変化を比較するため、LCAPにより緩解した3名、LCAPが無効であった1名の腸内細菌叢のT-RFLPパターンを比較した。LCAP前後のT-RFLPパターンのクラスター解析の結果、LCAPの効果の有無に関連せず、各患者のT-RFLPパターンは活動期、緩解期で非常に近い相似性を示した。UC患者の緩解期、活動期において、各個人の腸内細菌叢の独自性は保たれている。

A. 研究目的

活動期と緩解期の潰瘍性大腸炎(UC)患者糞便中腸内細菌叢の変化を比較する。薬剤などの影響を排除するため、LCAP前後における糞便中腸内細菌層をT-RFLPパターンで比較した。

B. 研究方法

LCAPにより緩解したUC患者3名、緩解に至らなかった1名のLCAP前後の糞便を回収し、DNAを抽出した。糞便中のT-RFLPパターンを既報の方法により解析した。

(倫理面への配慮)

糞便中DNAの解析に当たり、滋賀医科大学倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

各患者のT-RFLPパターンは、独自性を示した。LCAPの効果に関連せず、T-RFLPパターンの独自性は保持されていた。すなわち、UCの活動期と緩解期において、腸内細菌叢の基本的パターンに変化はない。

D. 考察

我々は、以前よりUC患者と健常人の糞便中T-RFLPパターンの比較から、UC患者は独自の

T-RFLPパターンをとることを報告してきた。しかし、今回の検討から、その独自性は活動期、緩解期に共通してみられることから、UCに特有の腸内細菌層の変化は、各患者独自のものであり、病勢による変化ではない可能性が示唆される。

E. 結論

潰瘍性大腸炎患者の糞便中腸内細菌層の多様性は、各患者に独自のものであり、病勢と関連していない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, Mitsuyama K, Fujiyama Y, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 13:955-62, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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

NODs 蛋白関連サイトカイン IL-32 $\alpha$  の炎症性腸疾患病変粘膜における発現

分担研究者 藤山 佳秀 滋賀医科大学 教授

研究要旨：IL-32 $\alpha$  は 2005 年に TNF- $\alpha$  の誘導因子として報告されたサイトカインである。炎症性腸疾患病変粘膜における発現を免疫染色にて調べたところ、上皮細胞に強い発現が確認された。また、腸上皮細胞株 HT-29 を用いた検討の結果、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  によりその産生が誘導された。また、IL-32 $\alpha$  は細胞内蛋白として細胞質内に蓄積し細胞外に分泌されず、NODs 蛋白と関連して存在することが明らかとなった。何らかの自然免疫に関連した機能が示唆され、炎症性腸疾患の病態形成における意義が示唆される。

A. 研究目的

IL-32 $\alpha$  は 2005 年に TNF- $\alpha$  の誘導因子として報告されたサイトカインである。しかし、正常腸管粘膜、炎症性腸疾患病変粘膜における発現は明らかになっていない。

B. 研究方法

外科手術により得られた健常ヒト大腸粘膜、UC 病変粘膜、CD 病変粘膜を抗 IL-32 $\alpha$  抗体を用いて免疫染色した。大腸癌細胞株 HT-29 の IL-32 $\alpha$  mRNA 発現は RT-PCR 法にて検討した。HT-29 のライセートを抗 NOD2 抗体で免疫沈降し、電気泳動にて展開後ニトロセルロース膜に転写し、抗 IL-32 $\alpha$  抗体で検出した。

(倫理面への配慮)

手術材料を使用するに当たり滋賀医科大学倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

健常粘膜において、上皮細胞に弱い染色性が確認された。炎症性腸疾患病変粘膜における発現は、明らかな増強を示し、特に CD 病変において発現が亢進していた。腸上皮細胞株 HT-29 を用いた検討の結果、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  により IL-32 $\alpha$  の産生

が誘導された。また、IL-32 $\alpha$  は細胞内蛋白として細胞質内に蓄積し細胞外に分泌されず、抗 NOD2 抗体による免疫沈降の結果、IL-32 $\alpha$  も共沈された。

D. 考察

IL-32 $\alpha$  は腸管上皮細胞により発現されるサイトカインで、炎症性腸疾患病変粘膜においてその発現が亢進している。培養細胞を用いた検討から、炎症性サイトカインがその誘導に関与している。また、その特徴として、細胞外に分泌されず、細胞内で NOD2 蛋白と interaction していることが明らかとなった。

E. 結論

IL-32 $\alpha$  は、上皮細胞に発現する新たなサイトカインとして炎症性腸疾患の病態形成に関与するとともに、NOD2 蛋白との関連から自然免疫における存在意義が示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shioya M, Nishida A, Yagi Y, Ogawa A,  
Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi  
A, Shimizu N, Fujiyama Y, Andoh A.  
Epithelial overexpression of  
interleukin-32alpha in inflammatory  
bowel disease. Clin Exp Immunol.  
149:480-6, 2007.

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

腸管炎症における自然免疫応答の制御機構の解明と治療への応用

研究協力者 石原 俊治 島根大学医学部内科学講座第二 講師

研究要旨：消化管の自然免疫応答について Toll 受容体の正と負のシグナル制御機構の解析を中心に研究をおこない、消化管炎症における意義を考察した。消化管上皮細胞では、細菌抗原刺激によって Toll 受容体を介して炎症性サイトカイン産生が誘導されること、それにともなって細胞内では負の制御因子の遺伝子発現が迅速に誘導されることを明らかにした。後者は過剰な自然免疫を抑制する宿主の合目的応答であることが推察された。一方、負の制御因子の中には細胞膜型の遺伝子群が存在し、これらは消化管の恒常性維持や自然免疫の寛容成立に関わることが示唆された。さらに、自然免疫の正のシグナル抑制を標的とした新規抗炎症薬開発を念頭に実験的検討を追加した。アポトーシス細胞の貪食を促進する分子である Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) の蛋白を精製しマウス実験腸炎モデルに投与したところ、NF- $\kappa$ B 依存性に有意に腸管炎症が抑制された。MFG-E8 は炎症性腸疾患の新規の治療薬としての可能性を有しており、今後は MFG-E8 による詳細な炎症抑制機序に関する検討をおこなう予定である。

共同研究者 三島義之、大嶋直樹、角田 力、  
森山一郎、Aziz Monowar、木下芳一  
島根大学医学部内科学講座第二

A. 研究目的

1. 腸管自然免疫の負の制御機構に関する研究

宿主は消化管内に常在する細菌叢と共存しているが、細菌に対する自然免疫機構のバランスの破綻が炎症性腸疾患 (IBD) の病態の一因となっている。Toll 受容体 (TLR) ファミリーは自然免疫を担う中心的分子群であり、腸管の免疫制御に深く関わっている。細菌構成成分 (PAMPs) の刺激は NF- $\kappa$ B 依存性にサイトカイン産生を誘導し、その制御異常が腸炎発症の一因となる可能性が示唆されている (正の制御)。一方、過剰な自然免疫応答を抑制するために、宿主には負の制御機構が備わっており、細胞内や細胞表面で機能する様々な分子群が報告されている。しかし、腸管におけるは負の制御因

子の発現制御やその意義は明らかにされていない。そこで今回は、自然免疫応答時の腸管上皮細胞における負の制御機構を明らかにし、IBD の病態との関連について考察することを目的に研究を遂行した。

2. 精製 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) 蛋白による腸炎抑制の試み

MFG-E8 はアポトーシス細胞表面のホスファチジルセリンと食細胞表面の avb3 インテグリンを架橋する分泌型のタンパク質で、生体が自己のアポトーシス細胞を除去する “Eat-Me” シグナルを制御している。我々は、MFG-E8 蛋白の消化管における機能解析をおこなっている過程で、MFG-E8 が食細胞によるアポトーシス細胞の貪食を促進するだけでなく、マクロファージに直接的に作用し、NF- $\kappa$ B 依存性の炎症シグナルを抑制することを見出した。NF- $\kappa$ B は自然免疫を誘導する重要な転写因子の一つである

ことから、MFG-E8 の機能が自然免疫応答とクロストークし、炎症制御に関わることが推測される。そこで今回は、MFG-E8 蛋白を精製し、実験腸炎モデルに投与することによって消化管の炎症抑制が可能か否かを検証することを目的に研究を遂行した。

## B. 研究方法

### 1. 腸管自然免疫の負の制御機構に関する研究

#### ①腸管上皮細胞の PAMPs および TNF- $\alpha$ に対する応答性と負の制御因子の発現変化

消化管上皮細胞株 (HCT-15、HT-29) を LPS および flagellin で刺激後に、培養上清中の IL-8 量を EIA にて、NF- $\kappa$ B 活性は luciferase assay で検討した。細胞内で誘導される負の制御因子としては、A20、IRAK-M

(IL-1R-associated kinase-M)、Tollip (Toll-interacting protein) を、細胞膜型の負の制御因子としては、SIGIRR (single immunoglobulin IL-1receptor-related molecule) と ST2L を選定した。リガンド刺激後の負の制御因子の発現変化は RNase protection assay、real-time PCR、フローサイトメトリーで観察した。

#### ②実験腸炎モデルを用いた炎症腸管の上皮細胞における負の制御因子発現変化

Dextran Sodium sulfate (DSS) 腸炎モデル、trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 腸炎モデルを作製し、炎症腸管の組織と EDTA で分離した上皮細胞における負の制御因子 (上記と同様) の発現変化を、免疫染色、real-time PCR、フローサイトメトリーで観察した。さらに、腸管上皮に高発現している TLR5 シグナル特異的な負の制御因子発現変化を検討する目的で、LPS 不応答性である CH3/HeJ マウスを用いた実験を追加した。CH3/HeJ マウスに 4 日間 DSS を経口投与した後に、経肛門的に flagellin を投与して大腸上皮における負の制御因子の発現を上記と同様の方法で解析した。

#### ③PAMPs の再刺激によるトレランス誘導と負の制御因子の関連

HCT-15、HT-29 細胞を各々 LPS および flagellin で刺激した後、16 時間後に再刺激をおこない、トレランスの誘導の有無を培養上清中の IL-8 量を EIA で測定することで解析した。さらに、siRNA を用いて A20、IRAK-M、Tollip をノックダウン際のトレランス誘導についても検討を加えた。

#### ④IBD 患者の炎症粘膜における負の制御因子の発現に関する検討

マウス腸炎モデルによって得られた結果に基づいて、IBD 患者の炎症粘膜から得られた組織における負の制御因子の発現を、real-time PCR、免疫染色によって解析した。

### 2. 精製 MFG-E8 蛋白による腸炎抑制の試み

#### ①マウス腸管、IBD 患者腸管粘膜における MFG-E8 の発現に関する検討

DSS および TNBS 腸炎モデル、IBD 患者の粘膜中の MFG-E8 の発現を、real-time PCR、ウェスタンブロット、免疫染色によって解析した。

#### ②リコンビナント MFG-E8 の精製

マウス mfg-e8 遺伝子全長をクローニングし、哺乳類発現ベクターを用いて MFG-E8 の発現系を構築した。発現した蛋白はカラムを用いて精製し実験に用いた。また、negative control として、mfg-e8 遺伝子の RGD 部を変異させた発現系も同様に作製し実験に用いた。精製蛋白の機能は、腹腔マクロファージとアポトーシスを誘導した胸腺細胞を混合した系に精製蛋白を添加し、マクロファージの貪食能を観察することで評価した。

#### ③精製 MFG-E8 蛋白による腸炎抑制

DSS 腸炎モデルに対して、DSS 投与前 1 日、投与後、1、4、7 日目の計 4 回にわたって経静脈的に野生型および変異型の精製 MFG-E8 蛋白を注入した。DSS 腸炎を作製しないマウスに対しても同様に精製蛋白を投与し、非腸炎マウスにおける精製蛋白の影響を観察した。精製蛋

白の治療効果は、体重変化、腸管長、病理組織、組織中のMPO活性、IL-1bとTNF-aの含有量で評価した。

#### ④MFG-E8蛋白のNF-kB活性に与える影響

MFG-E8蛋白の抗炎症効果の機序解明のため、腹腔マクロファージをLPSで活性化した際のNF-kB活性に対する精製蛋白の影響をluciferase assay、gel-shift assay、EIAによって評価した

(倫理面への配慮)

IBD患者からの生検サンプルを用いる実験については、島根大学医学部の倫理委員会の承認を得ておこなった。動物実験のプロトコールについては、島根大学の実験動物委員会の承認を得た。遺伝子発現系の構築やluciferase assayなど、大腸菌を用いて形質転換などをおこなう実験についてはDNA組み換え実験委員会の承認を得ておこなった。

### C. 研究結果

#### 1. 腸管自然免疫の負の制御機構に関する研究

HCT-15、HT-29をLPSおよびflagellinで刺激すると、培養上清中のIL-8量がNF-kB依存性に有意に増加し、特にflagellin刺激によって強くIL-8産生が誘導された。細胞内型の負の制御因子の発現は、A20の誘導がリガンド刺激後の1時間で最も迅速に応答しており、IRAK-M、Tollipも刺激後7時間でピークとなった。一方、膜型の負の制御因子であるSIGIRRとST2Lは、上皮細胞に恒常的に高発現しており、LPSやflagellinなどのPAMPs刺激やTNF-aの刺激によって発現抑制が認められた。

DSSおよびTNBSの実験腸炎モデルにおいても、腸炎の誘発によってA20、IRAK-M、Tollipの発現は上皮細胞において迅速に誘導されたが、SIGIRRとST2Lの発現は逆に発現が抑制された。CH3/HeJマウスを用いてflagellinを経肛門的に投与した系や、IBD患者粘膜を用いた検討でも同様の発現変化が観察された。

HCT-15、HT-29をリガンドで再刺激した実験

は、flagellin、LPSのいずれの刺激によってもトレンスが誘導され、クロストレンスの誘導も確認された。負の制御因子(A20、IRAK-M、Tollip)をsiRNAでノックダウンした系で、同様にリガンド再刺激によるトレンス誘導の実験をおこなったが、負の制御因子ノックダウンとトレンス誘導との間に有意な相関は認められなかった。

#### 2. 精製MFG-E8蛋白による腸炎抑制の試み

DSSおよびTNBSの実験腸炎モデルの炎症腸管におけるMFG-E8の発現は、mRNAおよび蛋白のいずれのレベルにおいても発現が増強しており、その発現局在は粘膜固有層内の浸潤マクロファージであった。

精製した野生型MFG-E8蛋白は腹腔マクロファージの貪食能を有意に増強させ、変異型MFG-E8蛋白にはこの効果が認められないことが確認されたことから、両者を用いて腸炎抑制実験をおこなった。

野生型MFG-E8蛋白を投与した腸炎モデルにおいては、コントロールに比べて有意に体重減少、腸管短縮、腸管粘膜の組織学的炎症、MPO活性、サイトカイン産生が抑制されたが、変異型MFG-E8蛋白の投与では腸炎抑制が認められなかった。

*In vitro*で腹腔マクロファージをLPSで刺激すると、IL-1bとTNF-aの産生が誘導されたが、野生型MFG-E8蛋白を投与するとNF-kB活性依存性にこれらのサイトカイン産生が抑制された。

### D. 考察

#### 1. 腸管自然免疫の負の制御機構に関する研究

腸管内細菌に由来するPAMPsが、消化管上皮細胞を刺激することによって腸炎発症の引き金になりうることを示唆されていたが、宿主の負の制御機構については不明であった。今回の検討から、腸管に炎症が誘発されると、A20、IRAK-M、Tollipなどの蛋白は細胞内で迅速に誘導され、過剰な自然免疫応答を抑制することが

明らかとなった。しかしその一方で、膜型の負の制御因子である SIGIRR や ST2L は、恒常的に上皮細胞に高発現しているが、炎症時にはその発現が逆にダウンレギュレーションすることが示された。

以上の知見は、SIGIRR や ST2L などの膜型の負の制御因子は腸内細菌と宿主の生理的・恒常的バランスを維持するために機能しており、A20、IRAK-M、Tollip などの誘導型蛋白は炎症時の生体防御に主に関与している可能性を示唆するものである。今後は、IBD 患者の負の制御因子の機能解析を健常人と比較しておこなうことによって、IBD の病態解明や診断などに寄与していくものと考えている。

## 2. 精製 MFG-E8 蛋白による腸炎抑制の試み

今回の実験結果から、MFG-E8 による腸管炎症抑制効果には二つの機序が想定される。一つは、炎症の場でアポトーシスが誘導された細胞の迅速な除去を促進することによって、炎症局所の二次的炎症惹起抗原の出現を抑えることである。二つめは、今回の *in vitro* の実験で示されたように、MFG-E8 が食食促進作用とは非依存的に NF- $\kappa$ B 活性を抑制し、種々の炎症性サイトカイン産生を抑制することである。

今回の研究結果は、MFG-E8 蛋白が腸管炎症抑制に重要な機能を果たすことを示す新規の知見であり、今後は腸管の抗炎症薬開発につながる有意義なものと考えている。しかしながら、どのようなメカニズムで MFG-E8 蛋白が NF- $\kappa$ B 活性を制御しているのかという点については不明であり、自然免疫シグナルとの関連も含めて詳細な検討が必要である。

## E. 結論

腸管上皮の自然免疫応答に関わる負の制御因子には、生理的恒常性を維持する分子群と、炎症時に迅速に誘導される分子群が存在し、合目的な宿主応答を可能にしていることが示唆された。

MFG-E8 は食細胞によるアポトーシス細胞の

処理に関わるのみでなく、マクロファージに直接的に働き、NF- $\kappa$ B 活性依存性の炎症シグナルを抑制することで腸炎抑制に寄与することが想定された。

現在、上記の2つの研究成果は、海外の英文誌に投稿中である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

①Fruta K, Sato S, Miyake T, Okamoto E, Ishine J, Ishihara S, Amano Y, Adachi K, Kinoshita Y.

Abnormal liver function in Crohn's disease related to location of disease lesions. *Inflamm Bowel Dis* 14:138-9, 2008

### 2. 学会発表

①Mishimal Y, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Moriyama I, Kadota C, Oshima N, Norihisa I, Kzumori H, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshit Y  
Toll-like receptor 9-signaling mediates innate immune response in murine intestinal CD5+ B cells

Digestive Disease Week (AGA), Washington DC, 2007.5.21

②Moriyama I, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Mishima Y, Oshima N, Kadota C, Otani A, Kinoshit Y

Decoy oligodeoxynucleotides targeting AP-1 and NF- $\kappa$ B attenuate intestinal inflammation in murine experimental colitis

Digestive Disease Week (AGA), Washington DC, 2007.5.20

③石原俊治 木下芳一

Milk fat globule-EGF factor8 (MFG-E8) による Toll 受容体シグナルの制御と消化管粘膜の