

200834004A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

# 炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡崎 和一

平成21（2009）年3月

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

# 炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡崎 和一

平成 21(2009)年 3 月

## 序

近年、原因不明の難病である潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は増加の一途をたどっている。将来ある若年者に好発し、既存の治療がある程度進歩したとはいえ、多くは長期にわたる治療の継続を余儀なくされる。最近、わが国でも抗 TNF $\alpha$  抗体が臨床の現場に導入され、炎症性腸疾患、ことにクローン病の治療は一変した感があるが、副作用もしばしば問題となること、治療に抵抗する難治例や再燃例の存在すること、入退院や外科的手術を繰り返すため社会復帰が著しく阻害されることなど、依然として患者さんの生活の質 (Quality of life) は勿論のこと、高額な医療費など、医療経済的にも社会的損失もきわめて大きい。それらの問題を解決する方策として、従来の考えにとらわれず、全く新しい視点に基づく画期的治療法の開発することは極めて重要で、社会的にも急務でもある。

本研究班は平成 18 年に「炎症性腸疾患に対する画期的治療法に関する臨床研究」として組織された。その基本となる考えは、炎症性腸疾患の病態形成に重要と考えられる「腸管局所における粘膜免疫」と「粘膜上皮の分化・再生機構」をこれまでとは異なる発想による解析をおこない、それらの成果にもとづく画期的治療法の開発とその臨床応用をめざすことにある。過去 2 年に引き続いて最終年度も 5 つの研究プロジェクト目標をあげ、インパクトファクタ・5 以上の国際的な一流雑誌に 14 編、炎症性腸疾患の専門雑誌に 7 編など、社会的インパクトの高い論文発表が可能であったのみならず、臨床応用の点でも新たに 8 件の特許が取得あるいは申請中であり、新たに 4 件のプロジェクトが分担研究者の施設で臨床試験としてすでに承認あるいは承認間近となるなど、十分な成果が挙げられつつある。

この研究班を遂行していくにあたり、貴重な御助言、御協力をいただいている日比紀文慶応義塾大学消化器内科教授、朝倉均新潟大学名誉教授、渡辺守東京医科歯科大学大学院教授にこの場をお借りして深謝します。

平成 21 年 3 月

研究代表者 岡崎 和一

## 目 次

I. 研究班構成	1
II. 総括研究報告	3
炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究 (岡崎和一)	
III. 分担研究報告	
【上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立】	
1. 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立 (渡辺 守)	7
2. 炎症性腸疾患に対する組換えヒト肝細胞増殖因子の臨床応用 (坪内博仁)	12
3. 炎症性腸疾患の腸管狭窄症に対する分子標的療法の開発 (鈴木健司)	15
【腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発】	
4. 自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御機構に関する研究 (竹田 潔)	18
5. 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 (浅香正博)	21
6. 抗菌ペプチドを用いた炎症性腸疾患の治療法開発 (高後 裕)	23
7. プロバイオティクス由来物質を用いた新規炎症性腸疾患治療の開発 (高後 裕)	27
【選択的細胞除去・移入療法の開発】	
8. 潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・制御性T細胞分離移入療法： 臨床試験実施にむけて (中村和彦)	31
9. ラット皮下脂肪組織由来幹細胞の粘膜下局所注入法による腸管粘膜再生 (岡崎和一)	36
【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】	
10. シクロスポリン封入ポリ乳酸マイクロカプセルを用いた実験腸炎治療の検討 (岡崎和一)	39
11. ヒト組み換えチオレドキシシンを用いた炎症性腸疾患に対する新しい治療の検討 (岡崎和一)	42
12. 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 (岡崎和一)	47
13. 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 (岡崎和一)	51
【新しいコンセプトによる治療法開発】	
14. cAMP elevating agent による炎症性腸疾患治療の試み (日比紀文)	55
15. ケモカインの制御を目指した炎症性腸疾患治療の試み (千葉 勉)	58
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
V. 学会発表に関する一覧表	73
VI. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	83
VII. 社会活動報告	85
VIII. 研究事業報告	87
IX. 研究成果の刊行物・別刷	119

## I. 研究班構成

## 「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」研究班

〈区 分〉	〈氏 名〉	〈所 属〉	〈職 名〉
研究代表者	岡崎 和一	関西医科大学内科学第三講座（消化器肝臓内科）	教 授
研究分担者	渡辺 守	東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野	教 授
	日比 紀文	慶應義塾大学医学部内科学	教 授
	浅香 正博	北海道大学大学院消化器内科学分野	教 授
	坪内 博仁	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻 人間環境学講座消化器疾患・生活習慣病学	教 授
	高後 裕	旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学	教 授
	中村 和彦	九州大学大学院医学研究院病態制御内科学	助 教
	鈴木 健司	新潟大学歯学総合病院第三内科	講 師
	竹田 潔	大阪大学大学院医学系研究科（C6） 感染免疫医学講座免疫制御学	教 授
	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
事務局	松下 光伸	関西医科大学内科学第三講座（消化器肝臓内科） 〒573-1191 大阪府枚方市新町 2-3-1 TEL 072-804-0101 FAX 072-804-2061 E-mail <a href="mailto:ibdtx@hirakata.kmu.ac.jp">ibdtx@hirakata.kmu.ac.jp</a>	講 師

## II. 総括研究報告

研究代表者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座（消化器肝臓内科） 教授

研究要旨：本研究班は、難治性炎症性腸疾患に対しこれまでと異なる発想による病態遷延機構の解析を行い、それに基づく画期的治療法の開発とその臨床応用を目標とした。この目的のため、「粘膜局所免疫調節」および「組織再生誘導」を促す新規治療法開発を目指し、1) 上皮細胞再生のための分子療法、細胞移植療法の確立、2) 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法開発、3) 選択的細胞除去療法開発、および4) 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立、5) 既存の薬剤を新しいコンセプトで適応外応用した治療法の開発、の5プロジェクトを設定し研究を進めた。1)では動物腸炎モデルに対する遺伝子組み換え型ヒト肝細胞増殖因子（HGF）の局所投与により、十分な腸炎発症阻止効果のあることから、今後、臨床応用にむけた、「潰瘍性大腸炎に対する組換えヒトHGFの臨床試験」の開始予定である。また、ヒト腸管上皮でHath1は杯細胞に促進的であること、Hath1蛋白質発現を増強するGSK-3 $\beta$ 阻害剤が杯細胞の誘導が粘膜上皮再生につながることを示唆した。また、骨髄や臍帯血幹細胞に比較して安全かつ大量に摂取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞による粘膜再生療法の可能性も明らかにした。2)では、基礎研究レベルで、遅期誘導型遺伝子のプロモーターのクロマチン構造変換に関わる自然免疫制御分子としてのIkB $\beta$ を同定し、IL-6産生に関与することで腸炎発症に重要な機能をもつことを明らかにした。また、 $\alpha$ -デフェンシンであるHD5のrecombinantペプチドやレドックス制御を目指したチオレドキシニン投与などの自然免疫系の制御による炎症性腸疾患の治療法開発の可能性も明らかにした。3)では、ヒト制御性T細胞を無菌的に大量に分離し、制御性T細胞移入療法の選択的除去を導入した改変型白血球除去療法の開発が進められた。4)では、高分子バイオマテリアルを用いたステロイド封入マイクロカプセルによる難治性潰瘍性大腸炎患者の臨床研究登録が開始され、また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多施設共同による無作為化並行群間試験も準備されている。5)では、Pphosphodiesterase4阻害剤の免疫細胞に対する効果が明らかにされ、新規治療剤としての可能性を示唆した。本研究プロジェクト開始後、社会的インパクトの高い論文発表が可能であったのみならず、臨床応用の点でも5件のプロジェクトが分担研究者の施設で臨床試験としてすでに承認あるいは承認間近となるなど、十分な成果が挙げられつつある。これら成果は、基礎研究の先進性を確保しつつ、かつ既存の炎症性腸疾患治療を凌駕し患者QOLの改善にも有効な画期的治療開発を可能にすることが予想され、国際的にも評価に耐え得る研究であると考えられる。

## 分担研究者：

日比紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授  
渡辺 守 東京医科歯科大学大学院  
消化器病態学分野 教授  
浅香正博 北海道大学分子病態制御学 教授  
坪内博仁 鹿児島大学大学院消化器疾患・生活習慣病学 教授  
高後 裕 旭川医科大学 消化器血液腫瘍制御内科学 教授  
中村和彦 九州大学大学院病態制御内科 助教  
鈴木健司 新潟大学医学部消化器内科 講師  
竹田 深 大阪大学大学院医学系研究科教授  
千葉 勉 京都大学大学院消化器内科学 教授

物経動脈投与など侵襲性の高い治療がしばしば必要とされ、繰り返す入院退院やときに手術を余儀なくされる。また、現在の難治例治療の主体の免疫抑制療法には限界があり、難治例では炎症が良くなっても、粘膜再生が不良で創傷治癒の不十分なことも少なくない。一方、近年、臨床の現場に導入された抗TNF $\alpha$ 抗体によりクローン病治療は一変したが、長期投与では、約半数の患者に再燃を認めること、副作用、効果持続性、投与期間、高額な医療費など課題も多い。以上を背景に、患者QOLの点を考慮しても画期的治療法の開発が求められている。

本研究は、難治性炎症性腸疾患に対し、従来とは異なる発想による病態の解析を行い、それに基づく画期的治療法の開発とその臨床応用を目指すものである。本研究は平成18年度より申請者らが班を組織し実施している厚労省難治性疾患克服研究事業の同名課題を継続し、難治性炎症性腸疾患の病態に関する基礎解析を強力に推進するとともに、得られた成果に基づき画期的治療法の開発と臨床応用を行うことを目的とする。即ち、炎症性腸疾患の病態には「腸管免疫機構の破綻」および「傷害粘膜上皮の再生不

## A. 研究目的

近年、本邦でも増加著しい炎症性腸疾患は若年者に好発し、生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる未だ原因不明の難病である。さらに既存の治療に抵抗性の難治症例や頻回に再燃を繰り返す例が少なからず存在すること、また、鼻管・中心静脈栄養・薬



全」の両者が深く関わる新しい考え方に基づき、各分担研究者が明らかにしてきた腸粘膜における免疫調節機構および分化・再生機構の知見を集約し、腸粘膜局所での免疫調節と上皮再生の連鎖・協調を統合制御し、粘膜局所免疫調節および組織再生誘導を促す新規治療法開発を目指す萌芽的研究を行い、最終的に患者のQOL向上と医療経済に寄与する治療法を開発することを目的とする。具体的な目標として、①腸上皮分化・再生機構の解析と腸管免疫の特異性に関わる研究領域の創出、②治療法の開発に直結する研究、③臨床応用の出来る研究、④患者QOLに役立つ治療法、⑤医療経済に貢献するため既存の安価な薬剤による治療、⑥Quality JOURNALへの発表、社会的なインパクトも必要、の5項目をあげた。この実現のために、以下の5の基本プロジェクト(p)のもと、班員と協力者が一体となって調査、研究を進めた。

p-1: 腸上皮分化・再生機構の解析と腸管免疫の特異性に関わる研究領域の創出(基礎)と上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立

p-2: 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発

p-3: 選択的細胞除去療法の開発

p-4: 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法の確立

p-5: 既存の薬剤を新しいコンセプトで適応外応用した治療法の開発

#### (倫理面への配慮)

プロジェクトの遂行に当たっては、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する。マウスの実験に関しても国際社会がヒトの健康のためとはいえども、実験および飼育管理の過程において動物に対して不必要な苦痛を与えないように努めるという人道的な配慮を求めていることを十分認識し、各大学の動物実験ガイドラインに沿って実施する。

#### B. 研究成果

本研究の成果をプロジェクトごとに報告する。

##### p-1: 上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立

分担研究者・坪内は炎症性腸疾患に対する組換えヒト肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)による新たな傷害粘膜再生・修復療法の開発を目指して種々の非臨床試験を実施してきた。一方、増殖因子であるHGFの発癌性、特に潰瘍性大腸炎は高率に大腸癌を発生することから、HGFによる大腸発癌

への影響が懸念されたが、二つの大腸発癌モデルに組換えヒトHGFを投与し、組換えヒトHGFが大腸発癌を促進する成績は得られず、また効果の期待される組換えヒトHGFの注腸投与では血清HGF上昇もみられず、静注投与よりもより安全に投与可能と考えられた。今年度は、人体における組換えヒトHGFの安全性を確立するとともに、さらに傷害粘膜の再生・修復過程早期に誘導されるepithelial restitutionに関して、HGFの細胞遊走能促進作用について検討したところ、HGFはZO-1の細胞内局在を細胞膜から細胞質に移動させることが明らかとなった。今後、臨床応用に向けて、「潰瘍性大腸炎に対する組換えヒトHGFの臨床試験」が計画され、プロトコル等に関して承認を取得する予定となっている(坪内)。

潰瘍性大腸炎患者では杯細胞が減少することに基づき検討した腸管上皮細胞分化の分子機構の解析では、Notchシグナルによる腸管上皮細胞の分化制御機構の存在と、Wntによる新規細胞内シグナル伝達経路を発見し、腸管分泌型細胞分化調節と密接に関わることを明らかとした。これらの成果により、重篤な上皮再生機構の破綻を示す難治性炎症性腸疾患に対し、腸管上皮の再生と早期の機能回復を図る多面的かつ多段階のアプローチを可能とし、細胞療法と分子療法を統合した新規治療法開発につながる研究基盤が確立された(渡辺)。また、造血幹細胞の腸管上皮再生への応用が試みられているが、主任研究者の岡崎らは骨髄や臍帯血幹細胞に比較して安全かつ大量に摂取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞(Adipose Driven-Stem Cells, ADSCs)による粘膜再生療法の臨床応用を目指し、TNBS腸炎ラットを使って粘膜下局所注法による腸粘膜再生の基礎的検討を行い、その有効性を明らかにするとともに、ヒトADSCsの臨床応用にむけ学内倫理委員会の承認を得て、ヒトへの応用実験を準備中である(岡崎)。

分担研究者の鈴木は、組織線維化において肥満細胞の産生するコンドロイチン硫酸Eが極めて重要であることを、その生合成に必須の糖転移酵素に対するsiRNAによる機能抑制実験から明らかにした。さらに、抗線維化作用を発揮するGMPグレードの核酸医薬品STNM-01を新たに開発し、マウス急性DSS腸炎に対し、抗線維化作用だけでなく、抗炎症効果と腸上皮細胞の増殖促進効果を認め、内視鏡的薬剤粘膜下注入手技による本薬剤の治療実験を行い、炎症性腸疾患に対する抗線維化を標的とした画期的な治療法開発を進める予定である(鈴木)。

##### p-2: 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発

分担研究者・竹田らは、腸管免疫系において重要な役割を果たすことが近年明らかになってきた自然免疫系の炎症誘導機構を解析した。近年、新たなヘルパーT細胞のサブセットとして同定されたTh17細

胞は、腸管粘膜固有層に特異的に存在している CD70high CD11c<sup>low</sup> 樹状細胞が、腸内細菌由来の ATP を認識し、腸内細菌依存的、Toll-like receptor 非依存的に、IL-6 産生、TGF- $\beta$  活性化を導き、Th17 細胞分化を司っていること、ATP による Th17 細胞誘導が腸管炎症にも関わることを見出した。(竹田)。

分担研究者の高後氏は、(1)安定したリコンビナント Human defensin-5(HD-5)の発現系の確立、(2)各種細菌や大腸上皮に対する HD-5 の作用、(3)マウス DSS 腸炎モデルに対する効果的な HD-5 投与経路の検討について研究を行い、*in vitro* の抗菌活性、サイトカイン分泌刺激作用を認めた。また、腹腔内投与によりマウス DSS 腸炎の治療効果を示唆する結果が得られた。さらに、プロバイオティクスの培養液から、腸管保護作用のある新規ペプチドである Competence and sporulation factor (CSF) を分離同定し、①新規乳酸菌の死菌は酸化ストレスからの腸管保護作用を有する事、②新規乳酸菌の培養上清にも同様の生理活性が有り、その成分中に活性物質が存在する事、が明らかになった。これにより新規の乳酸菌および菌由来の活性物質を用いた、新しい炎症性腸疾患治療法開発への道が開けた(高後)。

分担研究者・浅香氏は MIF に対する DNA ワクチン (MIF<sup>h</sup> エピトープ DNA ワクチン) を開発し、MIF<sup>h</sup> エピトープ DNA ワクチンによる抗 MIF 療法が、炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる可能性を示唆した(浅香)。

また、代表研究者・岡崎氏はレドックス制御に重要なチオレドキシシンがマウス DSS 腸炎発症の抑制に重要であることを明らかにするとともに、慢性腸炎モデルである 9-10 週齢の IL-10 ノックアウトマウスでの rhTRX の腹腔内投与での腸炎抑制効果を示した。さらに、臨床応用を目的としたゼラチンマイクロスフェアによる rtTRX の徐放製剤を開発し、DSS 腸炎モデルマウスの腸炎の抑制効果を確認し、チオレドキシシンゼラチンマイクロスフェア投与によるレドックス制御を目的とした炎症性腸疾患の新規治療法の可能性が示唆された(岡崎)。

分担研究者・千葉氏は、炎症性腸疾患における末梢 T 細胞における CXCR4 の発現が疾患活動性と関与することを明らかにするとともに、DSS 腸炎における CXCR4 拮抗剤 (TN14003) の有効性を確認し、CXCL12・CXCR4 の制御が新たな炎症性腸疾患治療の 1 つになりうる可能性を示唆した。さらに新規に発見された CXCL16 の発現が腸炎マウスの抗原提示細胞では増強していること、抗 CXCL-16 抗体投による腸炎の軽減、CXCL16 ノックアウトマウスでは、DSS 腸炎発症の抑制などより、CXCL16 が炎症性腸疾患の治療標的分子であることが示唆された。(千葉)。

#### p-3: 選択的細胞除去療法の開発

分担研究者の中村氏は、血球成分除去療法の改変型として、除去された白血球より制御性 T 細胞を分離し体内に戻す「制御性 T 細胞移入療法」の試みを

推進し、血球成分除去療法産物より CliniMACS を用いた Treg の無菌的大量に機能を保持した状態で分離する技術を確立した。更に、CliniMACS で分離した Treg が *in vitro* で培養増殖可能であること、non-Treg から TGF- $\beta$  存在下に Treg が誘導可能であること、誘導した Treg は、腸管ホーミングレセプターの  $\alpha E \beta 7$  インテグリン、 $\alpha 4 \beta 7$  インテグリンを高発現しており、TGF- $\beta$  1 処理により腸管への移動が促進されることが明らかにされた。分離に用いた CliniMACS 製品は全て CE 認証されており、臨床応用に向けさらに、「潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・Treg 分離移入療法・第 I 相臨床試験」のプロトコールを作成し、分担研究者の所属施設における倫理委員会承認に向けた準備が進みつつある。(中村)

#### p-4: 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立

主任研究者・岡崎氏は、高分子バイオマテリアルであるポリ-L-D 乳酸 (PDLLA) マイクロカプセルを用いた免疫調節剤封入マイクロカプセルの作成を試み、マウス腸炎モデルを用いた実験で、経口投与による粘膜免疫の選択的制御の有用性を検討してきた。今年度は、シクロスポリン封入ポリ乳酸マイクロカプセル (CyAMC) を Dextran sulfate sodium (DSS) で誘導した腸炎マウスに対して投与を行い、治療効果が認められた。

さらに、ステロイド封入マイクロカプセル (DxMC) の臨床応用を目的として、ラットを用いた慢性毒性実験を行い、本剤の安全性について確認後、所属施設の院内臨床研究の承認を得て、患者の登録中であり、現在、ステロイド抵抗患者 1 例とステロイド依存患者 3 例の合計 4 例が登録し臨床投与され有効性を認め、副作用は認められなかった。また、リポ化ステロイドを用いたドレッジデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療として、多施設共同による無作為化並行群間試験が、主任研究者の所属施設の学内倫理委員会承認後、開始された。現在、潰瘍性大腸炎患者 1 例、クローン病患者 1 例、腸管型ペーチェット病患者 2 例が登録されている。クローン病患者は現在投与中であるが、リメタゾン以外の全例で有効であり、ステロイド剤減量・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(岡崎)。

#### p-5: 薬剤を新しいコンセプトで適応外応用した治療法の開発

分担研究者の日は呼吸器疾患で応用されつつある OPC-6535 がヒト炎症性腸疾患、特に Crohn 病において有効性を示す可能性が示唆された。個々の分担研究に関する結果については、それぞれの分担研究報告書において詳述する。

#### C. 今後の課題、目標

上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立：本年度、上皮細胞の再生に対する HGF の有効性がさらに確認されるとともに、懸念されていた発

癌にかんしては、むしろ発癌モデルにおける抑制効果、血中濃度の安全性が確認されたことより、臨床応用を目指したい。骨髄由来細胞による粘膜上皮の再生を目指した治療法は、欧米においては既に病的T細胞を除去する目的でヒトクローン病に対する自家骨髄移植、末梢血幹細胞移植が始まっているが、より安全かつ大量に摂取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞による粘膜再生療法の基礎的な技術的課題も克服できた。ヒト皮下脂肪組織由来幹細胞に関する研究に関しても所属施設の倫理委員会の承認を得たので、臨床開発を目指したい。また、杯細胞の分化の誘導による上皮再生というこれまで異なる視点からGSK阻害剤が有望であることが明らかになり、今後、臨床応用可能な阻害剤のスクリーニングを進めることにより、治療法につながるものと考えられる。

腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発：腸管免疫調節機構の解明を目指す本プロジェクトでは、慢性大腸炎症に潜む免疫学的異常、ことに自然免疫系の基礎知見を明らかとすることに主眼をおいたが、本年度も分担研究者との共同により、世界的にも注目されるインパクトの高い研究成果が得られている<Nature 1編, J. Immunol. 7編, Gastroenterology 6編>。今後は、これら基礎知見に基づく画期的治療戦略の確立を念頭におき、多方向からのアプローチでの研究を継続する予定である。

選択的細胞除去療法の開発：血球成分除去療法の有効性と安全性に関する詳細な臨床研究の継続により、炎症性腸疾患治療におけるこれら治療法の位置付けが示されるものと考えられる。改変型血球除去療法として位置づけられる「制御性T細胞移入療法」の考えは、免疫学の進展により最近急速に理解が深まりつつある制御性T細胞の機能解析と平行することで、活動性潰瘍性大腸炎における有望な治療として期待されるものである。ヒト制御性T細胞を無菌的に大量に分離する方法や、制御性T細胞移入療法の選択的除去を導入する技術基盤がほぼ確立され、機材の国内承認が得られ次第、臨床応用が開始できる。

分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立：ラットに於ける慢性毒性試験においてD<sub>x</sub>-MSの長期投与の安全性が確認され、有効なドラッグデリバリーシステムとして分担研究施設での特に通常治療に抵抗性の難治例を対象に臨床試験として承認され、患者登録を開始している。さらに、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多施設共同による無作為化並行群間試験も難治例を対象に倫理委員会の承認後、開始されている。

既存の薬剤を新しいコンセプトで適応外応用した治療法の開発：呼吸器疾患で応用されつつあるOPC-6535がヒト炎症性腸疾患、特にCrohn病の治療に応用することをめざす。

#### D. 結論

研究代表者および分担研究者の協同的研究体制により、早期の臨床応用を目指した成果を確実に挙げられている。これらの個々の研究成果の進展とともに、上皮再生、腸管免疫の調節および選択的細胞療

法と腸管細胞への独自のデリバリーシステムといったプロジェクト相互の活発な交流と知見の融合を促進することにより、これらを統合した治療法の開発が可能になるものと期待される。これら新規知見により、日常生活を制限される多くの若年層患者に対してQOLの向上を伴う炎症性腸疾患の画期的治療法の開発が早期に可能になるものと考えられる。

### Ⅲ. 分担研究報告

## 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立

研究分担者 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：本研究は骨髄細胞による腸管上皮再生機構という独自の成果に基づき、その機構の詳細および腸管上皮細胞分化の分子機構を解析した。腸管再生時には骨髄由来細胞が分泌型腸管上皮細胞への積極的な分化誘導を認めたことから、腸管内分化調節機構が存在し得る可能性が示され、実際に分泌型腸管上皮細胞の分化誘導には Notch シグナルと Wnt シグナルが調節機構として存在することを明らかとした。そこで、Notch シグナルによる腸管上皮細胞の分化制御機構の存在と、上皮再生過程で活性型 Notch が制御する新たな分子機能を解明し、Wnt シグナルに関しては新規細胞内シグナル伝達経路を発見し、腸管分泌型細胞分化調節と密接に関わることを明らかとした。これらの成果は、重篤な上皮再生機構の破綻を示す難治性炎症性腸疾患に対し、腸管上皮の再生と早期の機能回復を図る多面的かつ多段階のアプローチを可能とした。今年度はシグナルの疾患特異性を考慮した阻害剤の効果を確認できたことで、細胞療法と分子療法を統合した新規治療法開発を確立したものと考えられる。

### 共同研究者

岡本隆一 土屋輝一郎 永石宇司 中村哲也

### 所属

東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

### A. 研究目的

本研究は代表者らがこれまでの研究成果から独自に見いだした、腸管上皮のみに内在する特異的な再生機構の追究と、それを利用した組織再生誘導を促す炎症性腸疾患に対する新規治療法の確立を最終的に目指すものである。炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）や骨髄移植後移植片対宿主反応による難治性慢性腸疾患は、その発症と病態の維持に粘膜上皮の再生機構の破綻が深く関わるが、その詳細な分子機構はいまだ解明されていない。従って、従来腸管上皮再生を促進する標的細胞・分子を明確に定めた特異的再生療法の確立は極めて困難であった。しかしながら、これまで申請者らは、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（Nat Med 2002）、さらに腸管修復時には骨髄由来細胞が積極的に杯細胞を含めた分泌型上皮細胞に積

極的に分化し再生に寄与すること（Gastroenterology 2005）を明らかにし腸管上皮再生研究において世界的にも評価の高い成果をあげてきた。本研究では腸管上皮細胞特に杯細胞の再生の分子基盤の確立と治療応用への開発を目標とし、1) 腸管上皮細胞の分化制御における Notch シグナルの新規機能の探索、2) Notch 標的遺伝子の Wnt シグナルによる調節機構解析と腸管分泌型細胞分化調節との関連解析、をおこなうことを目的とした。

昨年度は潰瘍性大腸炎病変部の杯細胞減少部に一致して、Notch シグナル構成分子の異常発現が局在し、さらに分泌型細胞への分化に必須と報告されている bHLH 型転写因子 Math1 のヒトホモログである Hath1 遺伝子発現が Notch シグナルによって負に制御されていることを明らかとした。さらに Hath1 蛋白は Wnt シグナルにより安定性の制御を受けていることを明らかとし、シグナル間のクロストークが存在することを示唆した。本年度は Notch シグナル阻害剤における in vivo での腸管再生効果を評価し、さらに Wnt シグナル抑制による Hath1 蛋白安定性の杯細胞分化への影響を評価することを目的とした。

## B. 研究方法・結果

1) マウスに DSS を自由飲水させ腸炎モデルを作成し、Notch 阻害剤 (γセクレターゼ阻害剤) の経口投与により腸炎による影響を解析した。正常マウスでの Notch 阻害剤処理では杯細胞の増加を認めたが、腸炎マウスでは粘膜上皮の増殖抑制により腸炎の悪化を認めた。これは炎症状態では Notch シグナルにより細胞増殖を優先し組織構築を保っている事が考えられた。

2) ヒト大腸癌由来培養細胞を用い、分泌型腸管上皮細胞分化のマスター遺伝子と予想される Hath1 蛋白の Wnt シグナルとの関連を解析し分化形質の影響を解析した。その結果、大腸癌由来細胞にて Hath1 遺伝子恒常発現細胞を樹立し解析したところ Hath1 タンパクのエピキチナーゼプロテアソーム系の積極的なタンパク分解をうけ、分化形質発現が抑制されている事を発見した。分解機構の詳細な解析にて、Hath1 は Wnt シグナルの GSK3 依存性に分解を受け、さらに同機構にて制御を受けている β-catenin と正反対に調節制御を受けることを明らかとした (Gastroenterology 2007)。そこで GSK3 阻害剤である Li 製剤処理したところ Hath1 蛋白の安定発現を確認し、さらに細胞増殖を保ちつつ分化マーカーである Mucin2 の増加を認めた (BBRC 2008)。

### (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) 倫理審査委員会での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) 昨年度に引き続き、腸管上皮細胞の分化制御に Notch シグナルの恒常的な活性化が重要な役割を持っていること、さらに炎症状態では Notch シグナルが細胞増殖を促進し、粘膜構築を保つことを明らかとした。

2) 厳密な Hath1 タンパク調節機構が存在し、Wnt シグナル-GSK3 による Hath1 タンパク分解が関与し、逆に分化時には Hath1 タンパク安定化が重要な機構であることを明らかとした。さらに本年度は GSK3 を標的とし、GSK3 阻害剤である LiCl が Hath1 蛋白を安定化させ分化誘導を行う可能性が示唆された。これは既にリチウム製剤として既に製剤化され、躁病の治療として使用されている事からも効果が確認されれば実用化は可能と思われる。実際マウスに本薬剤を投与し安全性を確認でき、抗炎症効果、粘膜再生効果を確認中であることから実用化可能と思われる。

## D. 結論

極めて短期間に組織更新を続ける事が組織の恒常性と機能の維持に必須である腸管上皮において、特定の機能を持った成熟上皮細胞を質的、量的に秩序正しく安定して供給するためのメカニズムとして複数の制御機構、すなわち Notch、Wnt シグナルによる腸管特異的標的遺伝子の発現制御、タンパク安定化制御機構が存在することを示した。これらの成果より分子基盤の中心的役割を担うと考えられた GSK3 を標的とし、阻害剤を用いた新規治療の可能性が示唆された。マウスモデルを用いた阻害剤の安全性が確認されたことから、有効性について詳細に検討し、実用化に向けて解析を行う。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, Nagano K, Oshima S, Nemoto Y, Yoshioka A, Totsuka T, Okamoto R, Nakamura T, Sakamoto N, Tsuchiya K, Aoki A, Ohya K, Yagita H, Watanabe M:

- Signaling pathway via TNF  $\alpha$  /NF  $\kappa$  B in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol GI & Liver.* (in press), 2009.
2. Takazoe M, Matsui T, Motoya S, Matsumoto T, Hibi T, Watanabe M: Sargramostim in Patients With Crohn's Disease: Results of a Phase 1-2 Study. *J Gastroenterol.* (in press), 2009.
  3. Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am J Physiol GI & Liver.* 296:G23-G35, 2009.
  4. Murayama M, Okamoto R, Tsuchiya K, Akiyama J, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol.* 44:173-182, 2009.
  5. Nemoto Y, Kanai T, Tohda S, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Fukuda T, Miura O, Yagita H, Watanabe M: Negative feedback regulation of colitogenic CD4+ T cells by increased granulopoiesis. *Inflamm Bowel Dis.* 14:1491-1503, 2008.
  6. Fujii F, Kanai T, Tomita T, Nemoto Y, Totsuka T, Sakamoto N, Nakamura T, Tsuchiya K, Okamoto R, Watanabe M: FTY720 suppresses the development of colitis in lymphoid-null mice by modulating the trafficking of colitogenic CD4+ T cells in bone marrow. *Eur J Immunol.* 38:3290-3303, 2008.
  7. Sawada T, Nishiyama C, Kishi T, Sasazuki T, Komazawa-Sakon S, Xue X, Piao JH, Ogata H, Nakayama J, Taki T, Hayashi Y, Watanabe M, Yagita H, Okumura K, Nakano H: Fusion of One twenty-two to BSAC(Basic, SAP, and coiled-coil domain)results in aberrant upregulation of transcriptional activity. *J Biol Chem.* 283:26820-26828, 2008.
  8. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Fujii T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Totsuka T, Watanabe M: Colitogenic CD4 + effector-memory T cells actively recirculate in chronic colitic mice. *Inflamm Bowel Dis.* 14:1630-1640, 2008.
  9. Yoshioka A, Okamoto R, Oshima S, Akiyama J, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Flagellin stimulation suppresses IL-7 secretion of intestinal epithelial cells. *Cytokine.* 44:57-64, 2008.
  10. Tomita T, Kanai T, Fujii T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Totsuka T, Sakamoto N, Watanabe M: Continuous generation of colitogenic CD4+ T cells in persistent colitis. *Eur J Immunol.* 38:1264-1274, 2008.
  11. Hino K, Tsuchiya K, Fukao T, Kiga K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Inducible expression of microRNA-194 is regulated by HNF-1 during intestinal epithelial cell differentiation. *RNA.* 14:1433-1442, 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 and survival of colitogenic CD4+ T cells in chronic colitis. *J Immunol.* 180: 5291-5299, 2008.
  13. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Watanabe M: Immunosenescent colitogenic CD4+ T cells convert to regulatory cells to suppress colitis. *Eur J Immunol.* 38:1275-1286, 2008.
  14. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M: Proteasomal degradation of Atohl by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 368:923-929, 2008.
  15. 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.
  16. Ito Y, Kanai T, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Yoshioka A, Tomita T, Nagaishi T, Sakamoto N, Sakanishi T, Okumura K, Yagita H, Watanabe M: Blockade of NKG2D signaling prevents the development of murine CD4+ T cell-mediated colitis. *Am J Physiol GI & Liver.* 394: G199-207, 2008.
- 学会発表
1. Hibi T, Watanabe M, Camez A, Khan M : Efficacy and safety of adalimumab for the treatment of japanese patients with moderately to severely active crohn's disease:results from a randomized controlled trial. *ACG 2008.* Orlando., 2008年10月6日
  2. Hibi T, Watanabe M, Camez A, Khan M : A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of adalimumab for the induction of clinical remission in japanese patients with crohn's disease . *ACG 2008.* Orlando., 2008年10月3日-8日
  3. Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M : Dysregulated differentiation of intestinal epithelia in UC. 3rd Japan - Korea IBD Symposium. Korea., 2008年9月20

- 日.
4. Watanabe T, Matsumoto T, Watanabe M, Hibi T: For the establishment of surveillance of colitic cancer. 3rd Japan - Korea IBD Symposium. Korea., 2008年9月20日
  5. Kanai T, Totsuka T, Nemoto Y, Hibi T, Watanabe M: The destiny of colitogenic CD4+ T Cells - are they effector or memory? 13th US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century. Tokyo., 2008年6月13日
  6. Onizawa M, Nagaishi T, Nemoto Y, Oshima S, Okamoto R, Totsuka T, Kanai T, Yagita H, Watanabe M: Neutralization of tumor necrosis factor suppresses the development of colitis-associated tumor in mice. DDW 2008. San Diego., 2008年5月21日
  7. Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Fujii T, Totsuka T, Watanabe M: Intestinal IL-7 is not Essential for the Persistence of IL-7-dependent chronic colitis. DDW 2008. San Diego., 2008年5月21日
  8. Fujii T, Tomita T, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Watanabe M: FTY720 suppresses the development of colitis in lymphoid-null mice by trapping colitogenic CD4+ T Cells in bone marrow. DDW 2008. San Diego., 2008年5月20日
  9. Tsuchiya K, Inoue K, Aragaki M, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Notch signaling suppresses the transcriptional activity of Hath1 Gene, resulting in the undifferentiated form of human intestinal epithelial cells. DDW 2008. San Diego., 2008年5月20日
  10. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Watanabe M: Colitogenic CD4+ T Cells convert to regulatory cells to suppress colitis in the process of the immunosenescence. DDW 2008. San Diego., 2008年5月20日
  11. Nemoto Y, Kanai T, Tohda S, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Fukuda T, Yagita H, Watanabe M: Negative feedback regulation of pathogenic CD4+ T Cells by increased granulopoiesis. DDW 2008. San Diego., 2008年5月20日
  12. Watanabe M: New member presentation. IOIBD Annual Meeting 2008. Kyoto., 2008年4月3日-6日
  13. Kanai T: Mucosal immunology in IBD. IOIBD Annual Meeting 2008. Kyoto., 2008年4月3日-6日
  14. 永石宇司、鬼澤道夫、鈴木雅博、渡辺 守: CEACAM1による腸管粘膜免疫の調節機構. 第16回 浜名湖シンポジウム. 浜松., 2008年12月20日
  15. 渡辺 守: 免疫調節剤. 第31回 IBD Club Jr. 研究会. 東京., 2008年12月13日
  16. 渡辺 守: クリニカルセミナー6 生物製剤が炎症性腸疾患の臨床と基礎研究に与えたインパクト. 第38回日本免疫学会総会・学術集会. 京都., 2008年12月3日
  17. 土屋輝一郎、荒木昭博、鈴木伸治、岩崎美智子、渡辺 守: シンポジウム I 全小腸生検マッピングによる部位別構造の分子機構解析. 第46回小腸研究会. 東京., 2008年11月29日
  18. 渡辺 守: 生物学的製剤が IBD 治療に与えたインパクト. 徳島 IBD フォーラム. 徳島., 2008年11月28日
  19. 土屋輝一郎、渡辺 守: GSK3 inhibitor restores the stability of Atoh1 protein, resulting in the differentiation of colon cancer cells. 第67回日本癌学会学術総会. 名古屋., 2008年10月28日
  20. 藤井俊光、金井隆典、富田貴之、亀山佳織、篠原玉子、根本泰宏、戸塚輝治、渡辺 守: 免疫調整剤FTY720による腸炎惹起性リンパ球の骨髄封じ込め効果の検討. 第36回日本臨床免疫学会総会. 東京., 2008年10月18日
  21. 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: IL-7を標的とした腸炎惹起性メモリーT細胞の制御. JDDW 2008. 東京., 2008年10月3日
  22. 渡辺 守: 消化器病学会ガイドライン最終報告-炎症性腸疾患- 厚生労働省研究班の見解-日本の炎症性腸疾患専門医を代表して-. JDDW 2008. 東京., 2008年10月1日
  23. 朝倉 均、渡辺 守: 治りにくい炎症性腸疾患を新しい視点で見直す-消化管での再生へのチャレンジ-. JDDW 2008. 東京., 2008年10月1日
  24. 渡辺 守: 炎症性腸疾患治療に生物学的製剤が与えたインパクト. 第2回 GI フォーラム九州. 福岡., 2008年9月6日
  25. 渡辺 守: 炎症性腸疾患治療に生物製剤が与えたインパクト. 第20回 IBD Club in Hamamatsu. 浜松., 2008年7月12日
  26. 渡辺 守: 炎症性腸疾患における粘膜免疫異常と上皮分化・再生障害の接点. 第29回 日本炎症・再生医学会. 東京., 2008年7月9日
  27. 戸塚輝治、金井隆典、根本泰宏、富田貴之、渡辺 守: 慢性大腸炎の発症と維持における IL-7の役割. 第45回 日本消化器免疫学会総会. 京都., 2008年7月4日
  28. 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 骨髄における腸炎惹起性メモリーT細胞と顆粒球造血系のクロストーク. 第45回 日本消化器免疫学会総会. 京都., 2008年7月3日
  29. 金井隆典: 抗 TNF $\alpha$ 抗体療法がもたらした基礎と臨床へのインパクト. 第45回 日本消化器免疫学会総会. 京都., 2008年7月3日
  30. 長堀正和: 炎症性腸疾患: いつ疑うか? いつ専



門医へ紹介するか? 第1回 消化器疾患勉強会.  
東京., 2008年6月25日

31. 鬼澤道夫: 抗 TNF 抗体療法による炎症性腸疾患合併大腸癌に及ぼす影響. 第14回 多摩消化器先端医療勉強会. 東京., 2008年6月23日
32. 秋山純子: 腸管上皮の分化と増殖を制御する分子機構. 第14回 多摩消化器先端医療勉強会. 東京., 2008年6月23日
33. 大岡真也: クロウン病の腸管エコー、イタリアでの学び. 第14回 多摩消化器先端医療勉強会. 東京., 2008年6月23日
34. 渡辺 守: これからも消化器病研究をリードする. 第14回 多摩消化器先端医療勉強会. 東京., 2008年6月23日
35. 荒木昭博、吉岡篤史、鈴木伸治、岡田英理子、土屋輝一郎、渡辺 守: IBDにおける内視鏡診断(クローン病). 第86回 日本消化器内視鏡学会関東地方会. 東京., 2008年6月23日
36. 鈴木伸治、土屋輝一郎、大島 茂、吉岡篤史、吉岡早苗、金井隆典、渡辺 守、荒木昭博、岡田英理子: 小腸静脈瘤治療のアプローチ. 第86回 日本消化器内視鏡学会関東地方. 東京., 2008年6月23日
37. 渡辺 守: 生物学的製剤が炎症性腸疾患治療に与えたインパクト. 第10回 IBD 治療研究会. 名古屋., 2008年6月13日
38. 戸塚輝治: 慢性大腸炎の発症と維持における IL-7 の役割. 第32回 日本リンパ学会総会. 東京., 2008年6月6日
39. 渡辺 守: 炎症性腸疾患の病態を新しい側面から繙く. 第27回東京女子医科大学消化器病臨床フォーラム. 東京., 2008年5月14日
40. 土屋輝一郎、岩崎美智子、渡辺 守: 小腸構造理解を目指した小腸マッピングによる遺伝子発現解析. 第94回 日本消化器病学会. 福岡., 2008年5月10日
41. 金井隆典、渡辺 守: 腸炎惹起性免疫記憶リンパ球の恒常的循環を遮断する炎症性腸疾患治療戦略. 第94回 日本消化器病学会. 福岡., 2008年5月9日
42. 富田貴之、金井隆典、藤井俊光、根本泰宏、戸塚輝治、渡辺 守: 腸炎惹起性 T 細胞の MyD88 を介した直接的 TLR シグナルの重要性. 第94回 日本消化器病学会. 福岡., 2008年5月9日
43. 藤井俊光、金井隆典、富田貴之、亀山佳織、篠原玉子、根本泰宏、戸塚輝治、渡辺 守: 免疫調整剤 FTY720 による腸炎惹起性リンパ球の骨髄封じ込め効果の検討. 第94回 日本消化器病学会. 福岡., 2008年5月9日
44. 戸塚輝治、金井隆典、根本泰宏、富田貴之、渡辺 守: 腸炎惹起性メモリー CD4 + T 細胞の加齢に伴う抑制性細胞へのコンバージョン. 第94回 日本消化器病学会. 福岡., 2008年5月9日
45. 富田貴之、金井隆典、藤井俊光、篠原玉子、亀山佳織、根本泰宏、戸塚輝治、渡辺 守: 慢性

腸炎発症・維持には腸管 IL-7 ではなく全身性 IL-7 が必須である. 第94回 日本消化器病学会. 福岡., 2008年5月9日

46. 岡本隆一、土屋輝一郎、渡辺 守: 炎症性腸疾患における Notch シグナルを介した上皮再生機構. 第94回 日本消化器病学会. 福岡., 2008年5月8日
47. 根本泰宏、金井隆典、亀山佳織、篠原玉子、藤井俊光、富田貴之、岡本隆一、戸塚輝治、渡辺 守: 腸炎骨髄に存在する腸炎惹起性 CD4 + メモリー細胞による自然免疫系へのフィードバック機構. 第94回 日本消化器病学会. 福岡., 2008年5月8日

#### 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  
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）  
炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究  
分担研究報告書

炎症性腸疾患に対する組換えヒト肝細胞増殖因子の臨床応用

研究分担者 坪内 博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間  
環境学講座消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨:肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor:HGF)は傷害消化管粘膜の重要な再生・修復因子である。本研究では、炎症性腸疾患に対する組換えヒト HGF による新たな障害粘膜の再生・修復療法を開発することである。今年度は、人体における組換えヒトHGFの安全性を確立し、さらに傷害粘膜の再生・修復過程早期に誘導される epithelial restitution に関して、HGFの細胞遊走能促進作用について検討した。すなわち、劇症肝炎を対象とした医師主導治験の被験者登録を平成20年5月に終了し、データ固定後に組換えヒトHGFを12-14日間反復静脈内投与した劇症肝炎及び遅発性肝不全の4例において有害事象の発生について検討した。組換えヒトHGFの薬理作用に基づく有害事象として尿中アルブミンおよび蛋白陽性、血圧低下が認められたが、いずれも軽度で、組換えヒトHGFによる重篤な有害事象はみられなかった。炎症性腸疾患では注腸投与で薬効が発揮されること、また薬効濃度の組換えヒトHGFの注腸投与では血中暴露が認められないことから、炎症性腸疾患に対する臨床応用では高い安全性が確保可能と考えられた。また、消化管粘膜上皮細胞においてHGFのtight junction proteinに及ぼす影響について検討したところ、HGFはZO-1の細胞内局在を細胞膜から細胞質に移動させることが明らかとなった。Tight junction proteinの変化は細胞遊走のみならず、消化管粘膜のバリア機能や透過性にも密接に関連しており、消化管粘膜におけるHGFの生理作用を分子レベルで解明することが、真の探索的創薬につながると思われると考えられた。

共同研究者

井戸章雄<sup>1</sup> 沼田政嗣<sup>2</sup> 宇都浩文<sup>1</sup> 桶谷 眞<sup>1</sup>  
 嵩山敏男<sup>1</sup> 藤田浩<sup>1</sup> 瀬戸山仁<sup>1</sup> 那須雄一郎<sup>1</sup>

所 属

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

A. 研究目的

肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor:HGF)は肝細胞の増殖を促進する因子として劇症肝炎患者血漿から単離された増殖因子である。HGFは肝細胞のみならず種々の上皮系細胞に対して、増殖促進作用のみならず遊走能促進、アポトーシス抑制作用を誘導し、消化管においても傷害粘膜の重要な再生・修復因子と考えられている。一方、炎症性腸疾患は

若年者に多く発症する難治性疾患で、これまで抗炎症、免疫抑制に主眼をおいた治療法がなされているが、再燃を繰り返し、治療に難渋する症例も多い。我々は、組み換えヒトHGFが実験大腸炎モデルにおける大腸傷害粘膜の修復を促進することを報告した。本研究の目的は、医薬品化が進められている組換えヒトHGFによる傷害粘膜の再生・修復を目的とした新たな治療法を開発することである。前年度までに、非臨床安全性試験において組換えヒトHGFの薬物動態、薬効薬理および大腸発癌に及ぼす影響を明らかにした。今年度は、人体における組換えヒトHGF反復静脈内投与における安全性を、医師主導治験の枠組みで実施した劇症肝炎を対象とした臨床試験において確立した。さらに傷害消化管粘膜の再生・修復過程においてHGFはepithelial restitutionに必須とされていることから、HGFの細胞遊走促進作用の分子機構について、特にtight junction proteinに着目して検討した。

## B. 研究方法

### 1. 人体における組換えヒト HGF の反復静脈内投与の安全性の確立

劇症肝炎を対象とした組換えヒト HGF の第 I/II 相試験 (医師主導試験) において 4 例の被験者を採用し、組換えヒト HGF (0.6 mg/m<sup>2</sup>/日) を 12~14 日間反復静脈内投与した。今年度は症例報告書を作成、直接閲覧を経て、データ固定および解析を行った。また GCP 監査を経て治験総括報告書を作成、治験終了届を提出した。

### 2. HGF の消化管上皮細胞 tight junction protein に及ぼす影響

消化管粘膜上皮細胞 (MKN74) に組換えヒト HGF を添加し、遊走能、tight junction protein (TJP) の発現、細胞内局在に及ぼす影響を検討した。

## C. 研究結果

### 1. 人体における組換えヒト HGF の反復静脈内投与の安全性の確立

劇症肝炎亜急性型 2 例 (男性 2 例/女性 1 例)、遅発性肝不全 1 例 (女性 1 例) の計 4 例を採用した。平均年齢は 61.8±14.6 歳であった。遅発性肝不全の 1 例 (女性) は治験期間 (プロトコル治療最大 14 日間+観察期間 14 日間) 中に肝不全の増悪によって死亡し、同死亡例には重篤な有害事象 (乏尿、呼吸状態の悪化) が認められたが、いずれも組換えヒト HGF との因果関係はないと判断された。治験薬との因果関係が否定できない比較的高い有害事象として尿中アルブミンおよび尿中蛋白陽性、血圧低下が認められたが、いずれも軽度であった。

### 2. HGF の消化管上皮細胞 tight junction protein に及ぼす影響

HGF は boyden chamber および in vitro 潰瘍修復モデルを用いた cell migration assay において消化管上皮細胞の遊走能を有意に促進した。また、HGF は tight junction protein (Claudin-1, -3, -4, -7, Occludin, ZO-1, ZO-2) の発現に影響を及ぼさなかったが、細胞膜に局在する ZO-1 を細胞質に移動させた。

## D. 考察

平成 20 年度で劇症肝炎を対象とした組換えヒト HGF の第 I/II 相臨床試験を終了した。本臨床試験において、組換えヒト HGF の静脈内投与によるタンパ

ク尿・アルブミン尿と血圧低下が認められたが、いずれも軽度であり、組換えヒト HGF の安全性が治験レベルで明らかとなった。一方、炎症性腸疾患 (特に潰瘍性大腸炎) への臨床応用を目的とした非臨床試験では、組換えヒト HGF の注腸投与で薬効が得られること、薬効濃度の 10 倍濃度の組換えヒト HGF 注腸投与でも血中暴露がみられないことを既に確認しており、炎症性腸疾患への臨床応用における高い安全性が示された。また、増殖因子である HGF の発癌性に関して、二つの大腸発癌モデルにおいて組換えヒト HGF に発癌促進作用はみられないことを確認しているが、HGF は細胞遊走促進作用も有している。HGF の細胞遊走促進作用は、傷害粘膜の再生・修復過程のなかでも傷害早期に誘導される epithelial restitution に必須と考えられているが、一方、癌細胞においてはその浸潤、転移に関与すると考えられる。本研究においては HGF による消化管粘膜上皮細胞の遊走促進の分子機構について、tight junction protein に着目して検討し、HGF が ZO-1 の細胞内局在の変化が関与していることが示唆された。腸管粘膜上皮細胞における TJP の変化はその粘膜バリア機構の透過性とも密接に関連しており、傷害組織の重要な再生・修復因子として多彩な作用を有する HGF の正常および傷害消化管粘膜に及ぼす生理作用を分子レベルで明らかにすることが、炎症性腸疾患における傷害腸管粘膜の再生・修復を目的とした組換えヒト HGF の真の探索的創薬につながることを考えられた。

## E. 結論

人体における組換えヒト HGF 反復静脈内投与の安全性が確立された。炎症性腸疾患では注腸投与で薬効が発揮されること、また薬効濃度の組換えヒト HGF の注腸投与では血中暴露が認められないことから、炎症性腸疾患に対する臨床応用では高い安全性が確保可能と考えられた。一方、消化管粘膜傷害後早期に誘導される epithelial restitution における HGF の細胞遊走促進作用には TJP である ZO-1 の細胞内局在の変化が関与していることが示唆された。傷害消化管粘膜の重要な再生・修復因子である HGF の生理作用を分子レベルで解明することが、真の探索的創薬につながると考える。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Sakiyama T, Fujita H, Tsubouchi H. Autoantibodies against ubiquitination factor E4A (UBE4A) are associated with severity of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 310-7
2. Ido A, Moriuchi A, Marusawa H, Ikeda K, Numata M, Yamaji N, Setoyama H, Ida H, Oketani M, Chiba T, Tsubouchi H. Translational research on HGF: A phase I/II study of recombinant human HGF for the treatment of fulminant hepatic failure. *Hepatol Res* 2008; 38 (suppl. 1): 88-92.
3. Kanmura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, Kodama M, Ohi H, Tsubouchi H. Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008 Dec 23 (Epub ahead of print)

### 学会発表

なし

## H. 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

なし