

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

研究分担者 鈴木 健司 新潟大学医歯学総合病院第三内科 講師

研究要旨：炎症性腸疾患に対する治療戦略は抗炎症のみならず、障害を受けた腸管上皮細胞の組織修復・再生促進を図る必要がある。これに加え、クローン病においては障害腸管に対する過度の線維化に基づく腸管狭窄に対する治療が必要である。すなわち、炎症性腸疾患に対する治療戦略は抗炎症、組織修復・再生促進、抗線維化の三つを目指す必要がある。我々は、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。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、本薬剤の腸炎治療効果を検討した。本薬剤は有意に腸炎治療効果を示し、その作用機序は抗線維化が主体であるが、抗炎症効果と腸上皮細胞の増殖促進効果も有することが明らかとなった。今後はわれわれの開発したラットに対する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。

共同研究者

河内裕介¹ 孫 曉梅¹ 藤井庄人²
米山博之²

所属

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

A. 研究目的

従来の炎症性腸疾患に対する治療戦略を見た場合、5-アミノサリチル酸製剤、副腎皮質ステロイドに始まり、免疫抑制剤、抗 TNF α 抗体レミケドにいたるまで、炎症細胞あるいはこれらの細胞の産生する炎症メディエーターの除去あるいは機能制御による抗炎症効果を目指したものがほとんどであった。一方、慢性炎症で機能障害を生じる腸管の上皮細胞は生体内でも最も再生の盛んな臓器の一つであることから、障害を受けた腸管上皮細胞の修復・再生促進を図る治療が第二の炎症性腸疾患治療法の戦略となりうる。クローン病の不可逆性の合併症として腸管組織障害修復後の過度の線維化と腸管狭窄の問題が存在する。創傷治癒に伴う線維化は組織修復の重要な再

生過程のひとつであり、線維化と抗線維化作用のバランスが保たれて初めて健全な創傷治癒がもたらされる。しかし、クローン病においては創傷治癒過程におけるアンバランスな線維化がこのような合併症をもたらす。すなわち、炎症性腸疾患に対する第三の治療戦略として、抗線維化療法が重要な位置を占めるであろう。以上の理由より、炎症性腸疾患に対する新規治療法開発を考えた場合、従来の抗炎症療法に加え、修復・再生促進療法と抗線維化療法も含めた三つの戦略で研究を展開する必要がある。

ところで糖鎖は核酸、たんぱく質に次ぐ第三の生命の鎖として、種々の生命現象で重要な役割を果たすことが最近明らかとなり脚光を浴びている。これまでステリック再生医科学研究所では線維化における糖鎖に関する基礎研究を進めてきたが、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ガラクトサミン転移酵素に対する siRNA による機能抑制実験から明らかにした。この技術を炎症性腸疾患に対する新規治療法開発に応用することを目指し、われわれは新たな核酸医薬品 STNM-01 を作成した。今回、同薬を

用いてクローン病に伴う消化管狭窄治療法の開発を目指した研究を開始した。

B. 研究方法

ステリック再生医科学研究所で開発した抗線維化作用を発揮する GMP グレードの核酸医薬品 STNM-01 (ガラクトサミン転移酵素に対する siRNA) (特許出願中) を、急性 DSS 腸炎マウスモデルに対し予防および治療投与し、その治療効果を病理組織学的、免疫学的、分子生物学的解析により判定した。

(倫理面への配慮)

以上の実験は新潟大学大学院医歯学総合研究科の動物実験倫理規定マニュアルに沿って行われた。

C. 研究結果

STNM-01 の大腸粘膜下注入では注入 siRNA は 24 時間腸管局所に留まり、腎臓などの他臓器においては注入 siRNA が検出されないことを ELISA 法を用いて確認した。また、siRNA 注入大腸においてのみガラクトサミン転移酵素 mRNA の発現が抑制された。STNM-01 を投与した急性 DSS 腸炎マウスモデルでは、臨床活動度、組織学および各種炎症性サイトカイン産生などに対する免疫組織学的・分子生物学的解析により、有意な腸炎予防効果および治療効果が認められた。抗線維化効果のほかに、炎症性サイトカイン産生の抑制や炎症細胞浸潤抑制などの抗炎症効果、さらに腸管上皮細胞における Ki67 陽性細胞数の増加などから傷害腸上皮の細胞増殖促進効果も認められた。

D. 考察

新規開発核酸医薬品 STNM-01 (ガラクトサミン転移酵素に対する siRNA) は抗線維化作用を有する医薬品であり、実験腸炎に対し有意の治療効果を発揮した。siRNA の腸管粘膜下注入は臓器特異性を持って標的遺伝子の発現を抑制しうることが明らかとなり、炎症性腸疾患の臓器特異的治療法の理想型の一つになりうると期待された。さらに STNM-01 の作用機序は主な抗線維化作用に加えて、抗炎症、再生促進効果もあわせ持つ可能性が示唆され

た。我々が開発したラット実験腸炎に対する薬剤の内視鏡的消化管粘膜下注入手技は、種々の薬剤を腸管局所に効率よく保持・作用させる理想的なドラッグ・デリバリー・システムと考えられるので、今後は STNM-01 の内視鏡的粘膜下注入療法をラット実験腸炎に対し行い、前臨床試験を進める予定である。

E. 結論

ガラクトサミン転移酵素を分子標的とした新たな核酸医薬品 STNM-01 は、腸管局所における抗線維化作用を発揮し、臨床応用可能な炎症性腸疾患の画期的治療法となりうる可能性が示された。

今後は新規薬剤 STNM-01 の腸炎治療効果をラット実験腸炎に対する内視鏡的大腸粘膜下注入手技を用いて解析を進め、炎症性腸疾患に対する画期的な治療法開発を進める予定である。

F. 参考文献

1. 鈴木健司: 炎症性腸疾患の治療と新規治療法開発の戦略. 新潟県医師会報 693号:2-9, 2007.
2. <http://www.stelic.com/jp/release/13.html> ステリック再生医科学研究所ホームページ

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

論文発表

1. Asakura H, Suzuki K, Kitahora T, Morizane T. Is there a relationship between foods, intestinal microbes and occurrence of inflammatory bowel disease? J Gastroenterol Hepatol (in press) 学会発表
1. 孫 曉梅、鈴木健司、河内裕介、松田康伸、渡辺賢一. 慢性実験腸炎におけるリザベン注腸治療効果の検討. 第45回日本消化器免疫学会総会, 京都, 2008年7月4日.
2. 河合裕子、孫 曉梅、鈴木健司、河内裕介、松田康伸、渡辺賢一. DSS 腸炎に対

する IL-10 遺伝子注腸治療の検討. 第 45
回日本消化器免疫学会総会, 京都、2008
年 7 月 4 日.

I. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

国内特許出願中 (2007-171361) : 生理活性
物質を定着および発現させる方法 (炎症性
腸疾患の新規治療法)。

国際特許出願中 (PCT/JP2008/061709) : 生
理活性物質を定着および発現させる方法。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究分担者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：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、炎症性腸疾患の発症にも深く関与していることが明らかになっている。Th17細胞は正常マウスにおいて、種々のリンパ組織にはほとんど観察されないが、腸管の粘膜固有層に多数存在している。そこで、腸管粘膜固有層にTh17細胞を誘導しうる樹状細胞がないかを検討した。その結果、腸管粘膜固有層に特異的に存在しているCD70high CD11c^{low}樹状細胞が、腸内細菌由来のATPを認識し、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が明らかになった。さらに、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。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、現在その病因・病態が明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない難治性の疾患である。マクロファージの活性を負に制御することが知られているサイトカインIL-10の遺伝子欠損マウスが慢性腸炎を発症することから、このマウスはヒトの慢性炎症性腸疾患のモデル動物としてよく利用され、病態の詳細な解析が行われてきた。また、種々の薬剤による腸炎誘導モデルにおけるIL-10の作用が、IL-10の発現上昇や、抗IL-10抗体によるブロック実験などにより解析され、また、IL-10遺伝子の発現誘導による慢性腸炎の治療効果も実験動物で確かめられてきた。このように、IL-10が慢性腸炎の発症を抑制することは明らかになっている。しかし、IL-10がいかなる分子機構で生体において慢性腸炎を抑制するかは全く理解されていない。慢性炎症性腸疾患は、現代増加の一途をたどる疾患のひとつで、その病因・病態の解明、さらにその治療法の確立が待ち望まれている。

申請者は、マクロファージにおいてIL-10のシグナル伝達にStat3が必須であることを見出し、Stat3をマクロファージ特異的に欠損させると、マクロファージが異常に活性化され、IL-10欠損マウスと同様にTh1細胞依存性の慢性腸炎を発症することを見出した。

しかし近年になり、新たなヘルパーT細胞サブセットとしてTh17細胞が同定され、炎症性腸疾患の発症にもTh1細胞以上にTh17が深く関与し

ていることが示されてきている。このTh17細胞は健康なマウスでも腸管の粘膜固有層に多数存在している。しかし、その腸管局所での分化メカニズムは全くわかっていない。そこで、慢性炎症性腸疾患の発症にも深く関与するTh17細胞の腸管局所での分化メカニズムを解析した。

B. 研究方法

細胞内染色法により、各リンパ組織、腸管粘膜固有層でのIL-17産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。また、Toll-like receptor (TLR)を介したシグナルの消失するMyD88/TRIF二重欠損マウスや、腸内常在菌のいないgerm freeマウスを用いて、腸管粘膜固有層でのIL-17産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。大腸の粘膜固有層から、CD11c陽性樹状細胞を単離し、脾臓由来のナイーブCD4陽性細胞と共培養し、5日後CD4 T細胞を回収し、PMA+ionophore刺激によるIL-17発現をreal-time Q-PCR法で解析した。さらに、CD11c陽性細胞の中で、CD70high, CD70lowのサブセットをFACSソーティングにより精製し、脾臓由来のナイーブCD4陽性細胞と共培養し、5日後CD4 T細胞を回収し、PMA+ionophore刺激によるIL-17発現をreal-time Q-PCR法で解析した。CD70high, CD70low樹状細胞でのIL-6やTGF-beta活性化に関わるインテグリンalphaV, beta8の発現をreal-time Q-PCR法で解析した。

また、germ freeマウスの便中アデノシン3リン酸(ATP)の濃度がSPFマウスの便と比較して極めて低いことから、ATPのTh17細胞誘導にお

ける関与を解析した。

さらに、CD70high, CD70low 樹状細胞での ATP センサーの発現を real-time Q-PCR 法で解析した。また、CD70high, CD70low 樹状細胞での ATP 依存性の IL-6, alphaV, beta8 の発現誘導を解析した。CD70high, CD70low 樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞との共培養に ATP を投与し、Th17 細胞分化への影響を解析した。

免疫不全 (SCID) マウスへ、ナイーブ T 細胞を移入すると大腸炎を発症するが、このモデルに ATP を投与し、その影響を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

IL-17 陽性の CD4 細胞は、脾臓、腸管リンパ節、パイエル板などのリンパ組織では 1%程度しか認められないが、小腸、大腸の粘膜固有層では、15-30%もの CD4 細胞が IL-17 を産生していた。腸管の粘膜固有層の CD4 陽性細胞を精製し、Th17 細胞のマーカである IL-17A, IL-17F, IL-22, Ror γ 1 の mRNA の発現を real time Q-PCR で解析しても、これらの発現は腸管リンパ節由来の細胞よりも極めて高く、Th17 細胞が多数存在していることが示唆された。TLR シグナルの消失する MyD88/TRIF 二重欠損マウスでも、腸管の粘膜固有層の IL-17 産生細胞は正常マウスと同様に存在した。一方、腸管細菌叢のない germ free マウスでは、IL-17 産生 CD4 細胞は激減していた。これらの結果から、Th17 細胞は腸内常在菌依存性に、TLR 非依存性に誘導されることが示唆された。

次に、腸管粘膜固有層に Th17 分化を誘導する樹状細胞が存在している可能性を解析した。大腸粘膜固有層より、CD11c 陽性細胞を精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 T 細胞と 5 日間共培養し、再刺激による IL-17 の発現を解析すると、脾臓の CD11c 陽性細胞と共培養した CD4 細胞では、IL-17 の発現はほとんど誘導されないが、大腸粘膜固有層の CD11c 陽性細胞と共培養した細胞は IL-17 を強く発現していることが明らかになった。この結果から、腸管粘膜固有層の樹状細胞には、Th17

細胞の分化を誘導する活性があることが示唆された。樹状細胞は種々のサブセットに分かれることがよく知っている。そこで、腸管粘膜固有層の CD11c 陽性細胞を種々の細胞表面マーカーで染色した。その結果、腸管粘膜固有層の CD11c 陽性細胞は、脾臓の CD11c 陽性細胞と異なり、CD70low, CD70high のサブセットが存在していることが明らかになった。そこで、CD70low, CD70high 樹状細胞を大腸粘膜固有層より精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 T 細胞と 5 日間共培養し、再刺激による IL-17 の発現を解析した。その結果、CD70low 細胞と共培養した T 細胞では、IL-17 の発現は誘導されないが、CD70high 樹状細胞と共培養した T 細胞では IL-17 の発現が強く誘導された、また CD70high 樹状細胞は、CD70low 樹状細胞に比べて、IL-6 や TGF-beta 活性化に関わるインテグリン alphaV, beta8 の発現が亢進していることが明らかになった。IL-6, alphaV, beta8 の発現は、germ free マウス由来の CD70high 細胞では、SPF マウスに比べて低下していた。これらの結果から、CD70high 樹状細胞は腸内常在菌により IL-6, alphaV, beta8 を発現し、Th17 細胞分化を誘導することが示唆された。

Germ free マウスの便中アデノシン 3 リン酸 (ATP) の濃度が SPF マウスの便と比較して極めて低いことが明らかになった。そこで、Germ free マウスに加水分解耐性の ATP (ATP γ S) を投与すると、腸管内 Th17 細胞の数が増加した。逆に SPF マウスに ATP 加水分解酵素を投与すると、腸管内 Th17 細胞の数が減少した。さらに SPF マウスに抗生剤を経口投与し、腸内細菌数を減らすと、便中 ATP 濃度の減少とともに、腸管内 Th17 細胞の数も減少した。このように、

D. 考察

慢性炎症性腸疾患と深く関わる新たなヘルパー T 細胞サブセット Th17 細胞が、腸管粘膜固有層に多数存在しているが、これは腸管粘膜固有層に局在しているユニークな樹状細胞が Th17 細胞分化を常在菌依存性に誘導するためであることが明らかになった。この誘導は、常在菌依存性であるが、TLR 非依存的であり、今後、常在菌由来のどのような因子が Th17 細胞分化を司っているかを明らかにしていきたい。

E. 結論

慢性炎症性腸疾患と深く関わる Th17 細胞が、

腸管粘膜固有層に局在するユニークな樹状細胞サブセットにより、常在菌依存性に誘導されることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Atarashi, K., Nishimura, J., Shima, T., Umesaki, Y., Yamamoto, M., Onoue, M., Yagita, H., Ishii, N., Evans, R., Honda, K., and Takeda, K.: ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 455, 808-812 (2008).
2. Kayama, H., Rairez-Carrozzi, V. R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S. T., and Takeda, K.: Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and IkBz. *J. Biol. Chem.* 283, 12468-12477 (2008).
3. Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Mizoguchi, I., Fukai, F., Takeda, K., Mizoguchi, J. and Yoshimoto, T.: STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* 180, 2903-2911 (2008).
4. Yamamoto, M., and Takeda, K.: Role of nuclear IkB proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* 14, 265-269 (2008).
5. Takeda, K., Yamamoto, M., Honda, K.: Assessing the response of cells to TLR stimulation. Signaling by Toll-like receptors, 1-21 (2008).

学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda: A mechanism for development of intestinal Th17 cells causing intestinal inflammation. The 7th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research. 2008.12.7-10、Guangzhou, China
2. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Masahiro Yamamoto NFAT is responsible for TLR-independent innate immune responses to a protozoan parasite 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008.12.9-12、神戸
3. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda Commensal bacteria-derived ATP mediates Th17

cell development in the intestinal lamina propria (Symposium) 第37回日本免疫学会学術集会、2008.12.1-3、京都

4. 竹田 潔 自然免疫系と炎症性腸疾患 第29回日本炎症・再生医学会、2008.7.9、東京
5. 竹田 潔 腸内フローラと炎症性腸疾患 第12回腸内細菌学会 2008.6.13、東京

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

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

研究分担者 浅香 正博 北海道大学大学院消化器内科学分野 教授

研究要旨：炎症性腸疾患に対する MIF の役割を明らかにするために、MIF に対する自己抗体を産生する DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) を開発した。このワクチンを接種したマウスでは、変異 MIF 蛋白に対する抗体が産生され、DSS 腸炎が有意に抑制された。MIFTh エピトープ DNA ワクチンによる抗 MIF 療法は、炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまで我々は、macrophage migration inhibitory factor (MIF) に対する中和抗体の投与が、炎症性腸疾患の動物モデルである DSS 腸炎に対し予防および治療効果を示すことを報告してきた。炎症性腸疾患における MIF の役割を更に明らかにし、治療の標的となる新しい分子を見出す目的で MIF^{-/-}マウスを用いた解析を行ったところ、MIF^{-/-}マウスでは DSS 腸炎が全く惹起されないこと、その機序として heat shock protein 70 (HSP70) の関与を示唆した。さらに HSP70 の誘導剤である geranylgeranyl acetone (GGA) の投与が DSS 腸炎に対し予防効果を示すことを明らかにした。

最近能動的抗体療法としてサイトカインに対する自己抗体を誘導しサイトカインの活性を抑える方法が考えられている。最近われわれは MIF の免疫原性を高めるために免疫活性化ペプチド (Th エピトープ) を MIF 蛋白に融合し、効率よく高親和性抗体を誘導することができる高機能 DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) を開発した。本研究では Th エピトープ MIF DNA ワクチンをマウスに接種、実験腸炎の程度を検証した。

B. 研究方法

Th エピトープ遺伝子を MIF 遺伝子に挿入したプラスミド DNA を調製した。この MIFTh エピトープ DNA ワクチンを、MHC の適合した 4-5 週齢の BALB/c マウスの皮下または筋肉内にエレクトロポレーション法をもちいて接種した。DNA ワクチンを接種したマウスおよび野生型マウスに対し DSS 腸炎を作成し、各群の臨床症状スコア (下痢、血便、体重減少、腸管の長さおよび組織学的所見を比較した。DSS 腸炎は 3% DSS 水溶液を 7 日間自由飲水にて投与して作成した。(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いは、北海道大学医学部“動物実験に関する指針”に基づいた。

C. 研究結果

MIFTh エピトープ DNA ワクチン投与をおこなったマウスでは、4 週後より血中抗 MIF 抗体価の上昇がみられ、その後 8 週まで持続した。一方、野生型 MIF DNA ワクチンの投与では、抗 MIF 抗体価の上昇は認められなかった。MIFTh エピトープ DNA ワクチン投与をおこなった DSS 腸炎マウスでは、野生型 MIF ワクチン投与をおこなったマウスに比べ、下痢・血便・体重減少が抑制され、臨床症状スコアは有意に低値であった。また、腸管の短縮、組織学的スコアも有意に抑制されていた。

D. 考察

近年、サイトカインなどに対する抗体を、クローン病をはじめとする炎症性腸疾患患者に投与する受動的抗体療法が行われ、顕著な効果が認められている。しかし投与された抗体が速やかに消失し持続性に欠けること、投与抗体に対する新たな抗体の産生が惹起されること、コストが高いなど課題も多い。本研究でもちいた DNA ワクチンは、MIF 蛋白と免疫活性化ペプチドの融合蛋白を作り出すように設計されたプラスミド DNA であり、これをマウスに投与すると、Th エピトープを有する変異 MIF が体内で産生され、この変異蛋白に対する抗体が効率よく産生される。この DNA ワクチンを接種したマウスでは、従来の蛋白ワクチンと異なり、アジュバントや担体を必要とせずに抗 MIF 抗体が産生された。MIFTh エピトープ DNA ワクチンによる能動的抗 MIF 抗体療法は、従来の受動的抗体療法に比較し、簡便性、コスト面など優位な点が多く、今後の臨床応用が期待される。

E. 結論

MIFThエピトープDNAワクチンを投与したマウスでは、DSS腸炎が有意に抑制された。MIFThエピトープDNAワクチンによる能動的抗体療法が炎症性腸疾患の新しい治療法となりうる可能性が示唆された。

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ohkawara T, Mitsuyama K, Takeda H, Asaka M, Fujiyama Y, Nishihira J.: Lack of macrophage migration inhibitory factor suppresses innate immune response in murine dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol.* 29: 1-9, 2008.
2. Ohkawara T, Takeda H, Furukawa S, Kato M, Shimizu Y, Asaka M.: Changes in the plasma level of macrophage migration inhibitory factor in ulcerative colitis patients treated with selective granulocyte and monocyte apheresis. *Intern Med.* 46: 1821-1822, 2007.
3. Ohkawara T, Nishihira J, Kato M, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M.: Serum level of macrophage migration inhibitory factor in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Intern Med.* 46: 789-790, 2007.
4. Ohkawara T, Saito M, Nakagawa S, Ohizumi H, Tamaki T, Yonekawa M, Takeda H, Asaka M, Nishihira J, Kawamura A.: A case report of the therapeutic effect of cryofiltration in a patient with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Ther Apher Dial.* 11: 159-162, 2007.

学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

炎症性腸疾患の予防・治療剤

国内出願番号：2003-192514(2003/7/7)

国際出願番号：PCT/JP2004/09657(2004/7/7)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

抗菌ペプチドを用いた炎症性腸疾患の治療法開発

研究分担者 高後 裕 旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学 教授

研究要旨: 自然免疫におけるエフェクター分子である抗菌ペプチドを炎症性腸疾患の新規治療法として用いることを目的として, 本年度は(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った。その結果、作成されたHD-5を用い *in vitro*での抗菌活性と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。

共同研究者

田邊裕貴 前本篤男 石川千里 稲場勇平
伊藤貴博 藤谷幹浩 蘆田知史

所属

旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学

human defensin-5(HD-5)の分泌型 proHD-5 と活性型 HD-5 のリコンビナント蛋白の作成,
(2)グラム陽性, 陰性菌に対する抗菌活性の測定および大腸上皮細胞に対する影響の検討,
(3)マウスデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)腸炎を作成し, 有効な HD-5 投与方法について研究を行った結果を報告する。

A. 研究目的

これまでの研究により, 小腸 Paneth 細胞が産生・分泌する α -defensin は腸管微生物感染に対する自然免疫反応のエフェクター分子であることが明らかになっている。この分子と炎症性腸疾患の関係については, *NOD2* 遺伝子変異のあるクローン病患者腸管において α -defensin の発現低下が報告され注目されるに至った。我々も独自の解析法を用い, クローン病患者小腸陰窩における抗菌活性物質の分泌低下を見出し報告してきた。これらのことから, クローン病は腸管の自然免疫不全が炎症の発症または進展に関与する疾患であることを明らかにした。本研究では, ヒト型の α -defensin のリコンビナント蛋白を用いて障害された自然免疫反応を補完するクローン病の新規治療を開発することを目的とした。本報告書では(1)ヒト α -defensin である

B. 研究方法

(1) リコンビナント蛋白の作成

リコンビナント HD-5 と proHD-5 は, 既報¹⁾に従い, 蛋白の全長をコードした cDNA を pET28a vector に組み込み, 大腸菌で発現させた。目的の蛋白に His タグを付加し, ニッケルレジニンにて粗精製し, タグを切断した後高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製した。精製した蛋白はゲル電気泳動(PAGE)にて精製度を確認し, 分子量はマスマススペクトロメトリー(MALDI TOF-MS)にて確認した。

(2) HD-5 の *in vitro* 活性の検討

精製された蛋白について抗菌活性を検討した。グラム陽性菌とグラム陰性菌株を用いて液体中で共培養した後に寒天培地に塗布し生細菌数を算定した。

また、大腸癌細胞株の培地に蛋白を負荷してヒト細胞に対する影響の有無をLDH細胞障害性試験で確認した。上皮細胞から分泌されたサイトカインはサイトカイン抗体アレイ(RayBiotech社)を用いて、HD-5による分泌刺激後のサイトカイン濃度はELISA kitを用いて測定した。

(3) マウスDSS腸炎モデルにおけるHD-5の治療効果

C57Bl/6マウスにDSSを自由飲水させ腸炎モデルを作成した。内因性のマウスdefensinの変化をAcid urea-PAGEとクマシー染色にて検討した。治療効果の検討のため2.5 mg/kgのリコンビナント蛋白を経口、注腸、腹腔内に投与して、マウスの生存期間を調べた。病理組織学的には、組織障害をHE染色にて、細胞増殖をKi-67染色、アポトーシスはTUNEL法で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究でおこなわれる動物実験の際には、旭川医科大学における動物実験等の実施に関する規程を遵守した。

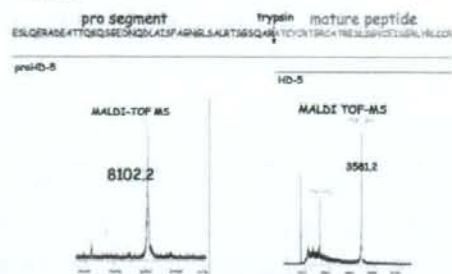
C. 研究結果

(1) リコンビナント蛋白の作成

proHD-5とHD-5はFig. 1に示した一次構造を有し、6つのシステインにより分子内ジスルフィド結合によりfoldされる構造を有する。75個のアミノ酸からなるproHD-5はトリプシンにより切断され、32個のアミノ酸からなるHD-5として腸管にて作用すると考えられている。それぞれの蛋白を発現、精製し、精製度をHPLCおよびAcid urea-PAGEにて確認した。分子量はMALDI TOF-MSにて確認し、分子内ジスルフィド結合はトリプシン消化により確認同定した。このHD-5蛋白を作成する上での問題点として、抗菌ペプチドであるため活性を

有する形では細菌内での合成が困難であること、最終的には分子内架橋を再現することが活性発現に必要であることが挙げられた。

Figure 1

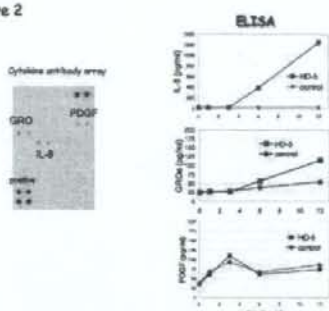


(2) HD-5のin vitro活性の検討

リコンビナント蛋白を用いて、抗菌活性および上皮細胞に対する影響を検討した。4種の細菌株(サルモネラ菌、大腸菌2株、黄色ブドウ球菌)に対する抗菌活性を検討した。HD-5は10 mg/mlの濃度ですべての菌株に活性を示したが、proHD-5は100 mg/mlでサルモネラ菌に活性を示したが、大腸菌は1/10に減少させる程度の弱い活性を示し、黄色ブドウ球菌には活性を示さなかった。

ヒト大腸癌細胞株SW480とHT-29を用いて細胞障害性を確認したが、100 mg/mlの蛋白を添加してもLDHの細胞外への分泌はみられず、細胞障害性は否定された。また、細胞外に分泌されたサイトカインをアレイにて解析し、分泌されたIL-8, PDGF, GROはさらにELISAにてHD-5による分泌刺激試験にて検討した。IL-8はHD-5にて発現が誘導され、高濃度に分泌された(Figure 2)。

Figure 2

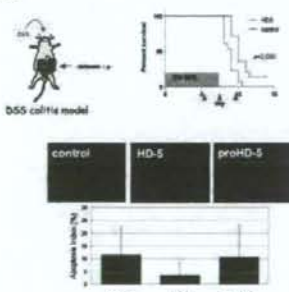


(3) マウス DSS 腸炎モデルにおける HD-5 の治療効果

C57Bl/6 マウスは、DSS の自由飲水にて大腸有意の腸炎をきたし、実験結果はほぼ安定していた。DSS 投与によってマウス小腸には粘膜障害がみられず、小腸 Paneth 細胞の内因性 α -defensin の濃度は Acid Urea-PAGE にて差がみられなかった。

2.5 mg/kg の HD5 を 3 日間腹腔内投与することで、生存期間は著明に改善した ($p < 0.005$)。大腸組織は病理学的に HD-5 投与により粘膜障害の程度は軽減していた。Ki-67 染色陽性細胞数は少なく、アポトーシス陽性細胞は HD-5 投与により減少した (Figure 3)。経口的に投与した群と、注腸投与群では生存期間に差はみられなかった。

Figure 3



D. 考察

今回の検討の結果から、ヒト defensin は

proHD-5 からトリプシンにより切断され、殺菌活性とサイトカイン分泌刺激能を有する HD-5 に活性化されることが明らかとなった。分子内架橋も再構成されてトリプシンの酵素分解に対して安定な分子として得られた。また、DSS 腸炎モデルは内因性 defensin は変化がみられず、外因性の HD-5 投与により腸炎の治療効果が示唆された。この作用にはアポトーシスの抑制作用が関与していることが推察され、抗菌活性以外の働きが注目される。

α -defensin は多機能ペプチドとして宿主を保護する働きがあり、炎症性腸疾患の新規治療法としての臨床応用が期待できる。

E. 結論

HD-5 の投与は、DSS 腸炎に治療効果を発揮すると考えられ、炎症性腸疾患に対する治療効果が期待される。また、HD-5 は内因性の抗菌物質であることから、有害事象の発生は最小限に止まると予想される。今後、高効率なリコンビナント HD-5 の精製方法の開発が進み、リコンビナント HD-5 を用いた新しい炎症性腸疾患治療は、有効性、安全性が高い画期的な治療法となりうることを示唆された。

F. 参考文献

1. Hiroki Tanabe, et al. Functional Role of Metaplastic Paneth Cell Defensins in Helicobacter pylori- Infected Stomach Helicobacter 2008 13 (5): 370-379.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

論文発表

1. Tanabe H, et al. Denatured human alpha-defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against

enzymatic digestion. Biochem Biophys Res Commun. 2007 358 (1): 349-55.

学会発表

1. Hiroki Tanabe. Precursor processing of human defensin-5 is essential to the physiological functions in vivo and in vitro. 2009 International symposium on Regulatory Peptide 2009.01.27
2. 田邊裕貴, 他. ヒト大腸癌における α -defensin 発現は MAPK 阻害剤にて抑制される. 第 95 回北海道癌談話会 2008.09.06
3. 田邊裕貴, 他. 腸管粘膜における抗菌ペプチドの役割. 平成 20 年度北海道腸内細菌叢研究会 2008.9.19

I. 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

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

研究分担者 高後 裕 旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学 教授

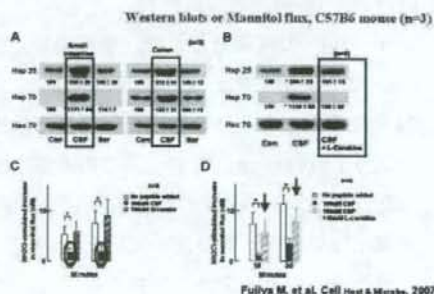
研究要旨：プロバイオティクス由来の活性物質を新規治療法として用いることを目的として、本年度は(1)新規乳酸菌の生理作用の解明，(2)新規乳酸菌由来の活性物質の同定，に関する研究を行った。その結果、①新規乳酸菌の死菌は酸化ストレスからの腸管保護作用を有する事，②新規乳酸菌の培養上清にも同様の生理活性が有り，その成分中に活性物質が存在する事，が明らかになった。これにより新規の乳酸菌および菌由来の活性物質を用いた，新しい炎症性腸疾患治療法開発への道が開けた。

共同研究者

藤谷幹浩 岡本耕太郎 奈田利恵
 上野伸展 盛一健太郎 田邊裕貴
 前本篤男 蘆田知史

所属

旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学



Fujiya M, et al. Cell Host & Microbe, 2007

A. 研究目的

これまでの研究により、バシラス菌や乳酸菌などのプロバイオティクスは、腸管保護活性を有することが明らかとなった。また、これらのバシラス菌由来ペプチドのひとつである competence and sporulation factor (CSF) は、細胞膜トランスポーター、Novel organic cation transporter 2 (OCTN2)によって腸管上皮細胞内に取り込まれ、その保護活性を発揮すると考えられた¹⁾ (Figure 1)。

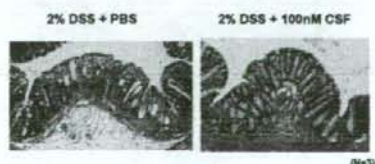
Figure 1

CSF protects mice intestine from oxidant stress. This effect is diminished by OCTN2 inhibitor, L-carnitine.

さらに、この OCTN2 はクローン病患者高感受性の遺伝子多型が存在することから²⁾、腸管炎症に対する新規治療薬としての可能性を検証した。その結果、CSFの注腸投与は炎症性腸疾患モデルのひとつである DSS 腸炎の治療効果があり、炎症性腸疾患に対する新規治療薬として効果が期待されると考えられた (Figure 2, 3)。

Figure 2

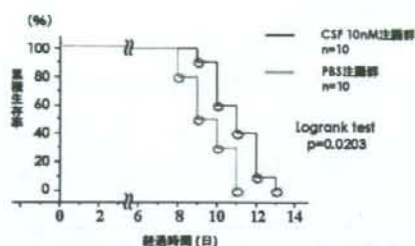
CSFはDSS腸炎マウスの腸管障害を改善する (HE staining, C57B6 mice)



Mice were treated with 2% DSS for 6 days. CSF were injected from anus 24 hours before harvesting the tissues. (M=3)

Figure 3

DSS colitis modelに対するCSFの生存期間延長効果



そこで、本年度は、新規乳酸菌の生理作用を明らかにし、菌由来の活性物質を同定することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 新規乳酸菌の死菌による Heat shock protein (Hsp) 誘導能の検討。

in vitro の評価系として、単層培養した Caco-2/bbe 細胞に新規乳酸菌の死菌を加え、24 時間培養した後細胞内の蛋白質を抽出し western blotting にて Hsp27 の誘導能を検討した。また、ex vivo の評価系として、マウス摘出腸管に新規乳酸菌の死菌を 2 時間反応させた後、腸管上皮から蛋白を抽出し、同様に Hsp の発現を調べた。

(2) 新規乳酸菌の死菌による腸管保護作用の検討。

前述した ex vivo の評価系と同様にマウス腸管に新規乳酸菌の死菌を 2 時間反応させた。菌を排出し洗浄した後、腸管内腔に ³H 標識マンニトールおよびモノアミンを封入して酸化ストレス下に置く。15 分、30 分後に腸管外に漏出したアイソトープの量を測定しマンニトールの漏出量を算出した。

(3) 新規乳酸菌の培養上清からの活性物質の同定。

新規乳酸菌培養上清によるマウス腸管上皮細胞における Hsp の誘導能を、前述した ex

vivo の系で評価する。培養上清を硫安分画および各種カラムを用いて分離し、各分画における Hsp 誘導を調べ、活性物質を含む分画を絞り込む。単一の成分まで分離した後、その分画を精製し質量分析器によってペプチドの配列を決定する。

C. 研究結果

(1) 新規乳酸菌の死菌による Heat shock protein (Hsp) 誘導能。

Western blots にてマウス腸管上皮における Hsps の発現誘導を検討した結果、新規乳酸菌の死菌は、Caco-2/bbe 細胞およびマウス腸管上皮に Hsp25/27 および 70 を誘導することが確認された (Figure 4, 5)。

Figure 4

in vitro 評価系にて、新規乳酸菌の死菌は腸管上皮細胞 (Caco-2/bbe cells) に Hsp27 の誘導を認めた。

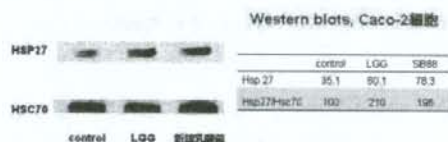
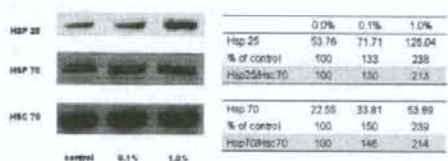


Figure 5

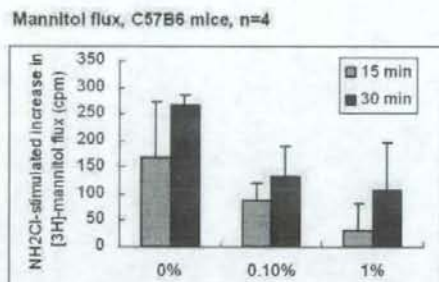
ex vivo 評価系にて、新規乳酸菌の死菌はマウス腸管上皮に Hsp25 および 70 の誘導を認めた。



(2) 新規乳酸菌の死菌による腸管保護作用の検討。

あらかじめ新規乳酸菌にてマウス腸管を前処理し、モノアミン投与により酸化ストレスを与えた。15分後、30分後に標識マンニトールの腸管外への漏出を測定した。その結果、新規乳酸菌前処理群で、マンニトールの腸管外漏出が有意に低下していた (Figure 6)。

Figure 6



(3) 新規乳酸菌の培養上清からの活性物質の同定。

新規乳酸菌の培養上清を硫酸にて分離し、Hsp誘導能を持つ分画を得た (Figure 7)。この分画をDEAE陰イオンカラムにて繰り返し分離し、さらにゲル濾過カラムを用いて分離した結果、単一物質のピークが得られ、その分画を精製した結果、活性物質と考えられるペレットが得られた。現在、その成分分析を行っている (Figure 8)。

Figure 7

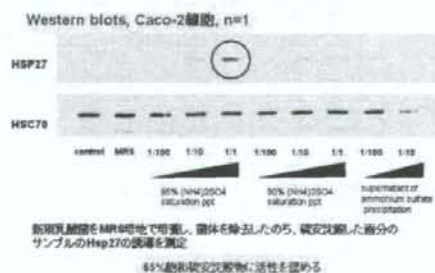
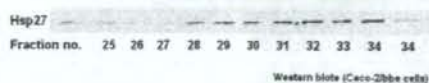
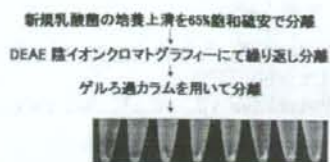


Figure 8



D. 考察

今回の検討の結果から、新規の乳酸菌の一種に細胞保護作用を有するものが存在し、その培養液中にHsp誘導作用を持つ活性物質が存在することを突き止めた。この乳酸菌は死菌としても生理活性を持つことから、菌が生着できないような腸内環境でも活性を発揮する可能性が高い。このような、死菌を用いた治療法は、炎症性腸疾患患者などのような病的腸内環境においても安定した効果が期待される新しい治療戦略となりうる。現在、代表的な炎症性腸疾患モデルのひとつである、IL-10欠損マウスの腸炎に対する治療効果を評価中であり、次年度よりヒト臨床試験を予定している (知財：特願 2008-22753, PCT/JP2009/000207)。

また、新規乳酸菌の培養上清の解析から得られた活性物質の成分分析を行っており、活性成分の構造が決定できれば、腸管炎症に対する新しい治療薬剤となるものと期待される。

E. 結論

新規乳酸菌の生理活性を解析し、本菌の死菌および培養上清に腸管保護作用を認めた。さらに培養上清中に活性物質が存在することが判明した。この新規乳酸菌の死菌および菌由来活性物質を用いることで、画期的な炎症性腸疾患治療法の開発が期待される。

F. 参考文献

なし

1. Fujiya M, Kohgo Y, et al. Cell Host Microbe, 2007.
2. Peltekova VD, et al. Nature Genetics, 2004.

3. その他

なし

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

論文発表

1. Tanabe H, et al. Denatured human alpha-defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against enzymatic digestion. Biochem Biophys Res Commun. 2007 358 (1): 349-55.

学会発表

1. Hiroki Tanabe. Precursor processing of human defensin-5 is essential to the physiological functions in vivo and in vitro. 2009 International symposium on Regulatory Peptide 2009.01.27
2. 藤谷幹浩, 高後 裕. 腸管上皮細胞膜トランスポーターOCTN2 を介した新しい宿主-腸内細菌相互作用の解明. 第46回小腸研究会. 2008.11.29
3. 田邊裕貴, 他. ヒト大腸癌における α -defensin 発現は MAPK 阻害剤にて抑制される. 第95回北海道癌談話会 2008.09.06
4. 田邊裕貴, 他. 腸管粘膜における抗菌ペプチドの役割. 平成20年度北海道腸内細菌叢研究会 2008.9.19

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- ・ PCT/JP2009/000207 「消化器癌に対する抗腫瘍剤」(出願中)
- ・ 麦芽乳酸菌を用いた腸管保護剤(特願 2008-22753)(出願中)
- ・ Small bacteria-derived signaling molecules that mediate intestinal mucosal homeostasis. (出願準備中)

2. 実用新案登録

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

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：
臨床試験実施に向けて

研究分担者 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

研究要旨：潰瘍性大腸炎(UC)に対する血球成分除去療法において、大腸炎を誘導するエフェクター細胞に加えて、大腸炎を抑制・制御する制御性細胞も同時に除去されていると考えられる。そこで我々は血球成分除去療法産物よりCD4⁺CD25^{hi}制御性T細胞(Treg)を分離し患者へ輸注する新しいコンセプトの治療法「血球成分除去・Treg分離移入療法」を考案し、これまでに本治療法施行に必要な血球成分除去療法産物からの機能保持Tregの無菌的・大量分離法を確立した。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- β 1存在下にTregが誘導可能であることを示した。移入されたTregの腸管へのトラフィック効率の観点から、培養Tregの腸管ホーミングレセプター発現を検討した。in vitroでTGF- β 1存在下に、培養増殖したTreg、およびnon-Tregから誘導したTregは、腸管ホーミングレセプターの α E β 7インテグリン、 α 4 β 7インテグリンを高発現しており、TGF- β 1処理により腸管への移動が促進されることが期待された。臨床応用に向けて「UCに対する血球成分除去・Treg分離移入療法・第I相臨床試験」のプロトコルを作成した。対象は「20歳以上でステロイド抵抗性、あるいは依存性の活動期UCのため血球成分除去療法による治療を受ける患者」で、最終的血球成分除去療法(遠心分離法)に引き続き、Tregを分離し、患者へ輸注する事とした。Treg分離は九州大学病院GMP施設で行う。主要評価項目はTreg分離移入療法の副作用の有無、副次的評価項目は治療効果とした。予定症例数は6例で、初期の3例で安全性が確立されれば、移入細胞数を増加するdose escalation studyとした。「血球成分除去・Treg分離移入療法」は施行可能であり、倫理委員会の承認を得て、第I相臨床試験を行い、その安全性、有効性を検討する事が望まれる。また、将来的には、TGF- β 1存在下に培養/誘導されたTregの移入療法が可能となれば、大量移入と腸管へのトラフィック促進により、より高い効果が期待される。

共同研究者

高柳涼¹ 秋穂裕唯¹ 豊嶋崇徳²
赤司浩一² 谷 憲三朗³

所属

九州大学大学院医学研究院病態制御内科学¹
九州大学病院遺伝子・細胞療法部²
九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学
分野³

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎(UC)は慢性持続性に大腸炎を起こす難病である。若年者に好発し、多くは再燃・緩解を繰り返す。ステロイドを主とした薬物療法が行われるが、ステロイド抵抗性・依存性の難治例も多く、また、内科的治療が奏効せず到大腸全摘術が必要となる症例も少なくないため、より有効な新規治療法の開発が強く望まれている。

血球成分除去療法はわが国で開発された治療法であり、中等症以上の活動期 UC に対して単独またはステロイドとの併用で効果が期待できる。薬物療法に比べて長期的な副作用が少ない利点があるが、有効率は 60~70%程度で無効例も多い。また、寛解導入後に多くの症例で再燃を来す。血球成分除去療法の作用機序は、十分に解明されていないが、白血球中には大腸炎を誘導する colitogenic な細胞に加えて、大腸炎を抑制・制御する制御性細胞も存在し、既存の血球成分除去療法では両者とも同様に除去されている事が、効果を限定的にしている一因かも知れない。制御性細胞の中でも CD4⁺CD25^{high} 制御性 T 細胞 (Treg) は広範な免疫反応を抑制・制御する事で知られ、炎症性腸疾患動物モデルで腸炎を著明に抑制する事から炎症性腸疾患治療への応用が期待される。我々は、活動期 UC では末梢血中の Treg の割合が低下している事を報告した¹⁾。Treg の不足が大腸炎の増悪に関連している可能性が示唆される。UC 患者では Treg の機能は保たれていると考えられるので^{2,3)}、Treg 移入療法が UC の治療法として有用である事が示唆される。我々は Treg 移入療法を既存の血球成分除去療法と組み合わせる事より更に有効性を高められるのではないかと考え、血球成分除去療法産物より Treg を分離し患者へ輸注する「血球成分除去・Treg 分離移入療法」を考案した。我々はこれまでに血球成分除去療法産物より機能を保持した Treg を無菌的・大量に分離する方法を確立した。また、臨床応用可能なグレードで分離された Treg が *in vitro* で培養増殖可能であること、non-Treg から TGF- β 1 存在下に Treg が誘導可能であることを示した。

今回、我々は、移入 Treg の腸管へのトラフィック効率の観点から、腸管ホーミングレセ

プター発現を解析した。また、「UC に対する血球成分除去・Treg 分離移入療法」の臨床試験を計画し、プロトコールを作成した。

B. 研究方法

Miltenyi Biotec 社の臨床応用を目的とした磁気ビーズ細胞分離システム ClinMACS を用いて Treg 分離を行った。潰瘍性大腸炎患者に対して遠心分離法による血球成分除去療法を Hemonetics 社成分採血装置 CCS を用いて行った。分離された白血球より ClinMACS CD8 Reagent (CD8 に対する磁気ビーズ) と ClinMACS CD19 Reagent (CD19 に対する磁気ビーズ) を反応させ、ビーズの付着していない細胞を ClinMACS Instrument を用いて回収した。次に、回収した細胞に ClinMACS CD25 Reagent (CD25 に対する磁気ビーズ) を反応させ、ビーズの付着した細胞を回収し、Treg 分画を得た。全ての細胞分離工程は閉鎖回路内で無菌的に行われた。

分離した Treg 分画および対照として CD4⁺CD25⁻ T 細胞 (non-Treg) を抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体付着ビーズを用いて IL-2 存在下、または IL-2+TGF- β 1 存在下に 10 日間刺激培養した。14 日間の resting 後に細胞を FITC-抗 β 7 インテグリン抗体、PE-抗 α E インテグリン抗体 (または、PE-抗 α 4 インテグリン抗体)、PE-Cy5-抗 CD4 抗体で染色し、腸管ホーミングレセプターである α E β 7 インテグリン、 α 4 β 7 インテグリンの発現をフローサイトメトリーで解析した。

「UC 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た。

(倫理面への配慮)

血球成分除去療法産物からの Treg 分離実験に関して平成 17 年 3 月 31 日九州大学医学

研究院等倫理委員会の承認を受けた。研究に参加した全ての患者に研究内容を同意説明文書を用いて説明し、患者の自由意志により文書による同意を得た。本研究では患者検体を研究に用いたが、通常であれば廃棄される白血球より細胞を分離し解析したもので、研究への参加により治療方針が変更されたり、治療による危険性が増す事はなく、倫理的に問題はないと判断した。

臨床試験プロトコル作成に当たっては、九州大学大学院医学研究院等倫理委員会委員長との事前相談を行い、倫理面、安全性に配慮した。患者選択基準でステロイド抵抗性、または依存性の難治例とし、「血球成分除去・Treg 分離移入療法」の施行に倫理的問題がないように配慮した。より高い安全性を確保するために、細胞分離は九州大学病院 GMP 施設内で行うこととし、その validation の結果を持って倫理委員会の審査を受けることとした。

C. 研究結果

TGF- β 1 非存在下に培養した Treg は 10.2% が α E β 7 を、7.3% が α 4 β 7 を発現していた。TGF- β 1 存在下に培養した Treg は 44.7% が α E β 7 を、50.9% が α 4 β 7 を発現していた。TGF- β 1 非存在下に培養した non-Treg は 28.7% が α E β 7 を、8.5% が α 4 β 7 を発現していた。TGF- β 1 存在下に培養した non-Treg は 60.1% が α E β 7 を、55.5% が α 4 β 7 を発現していた。

「UC に対する血球成分除去・Treg 分離移入療法 第 I 相臨床試験」のプロトコルの概要を以下に示す。

目的: UC 患者に対して遠心分離法による血球成分除去療法を行い、分離された白血球より磁気ビーズを用いて Treg を分離後、患者に移入する治療法「Treg 分離移入療法」の安全性

を検討する。

対象: 20 歳以上でステロイド抵抗性、あるいは依存性の活動期 UC のため血球成分除去療法による治療を受ける患者で、試験の内容に関して十分な理解力を有し、文書による同意が取得された者。

下記条件の患者を除外する。

- ・ 直腸炎型 UC 患者
- ・ 重篤なアレルギー疾患の既往のある患者
- ・ アナフィラキシーの既往のある患者
- ・ 薬剤、食事に重篤なアレルギーのある患者
- ・ 妊婦や授乳中の患者

方法: 遠心分離式血球成分除去療法を週 1 回、最大 5 回行う。(第 1 週に 2 回行った場合は、最大 6 回) 最終の血球成分除去療法に引き続き、Treg 分離移入療法を行う。

Treg 分離: 血球成分除去療法産物回収日に ClinMACS 試薬と細胞分離装置を用いて九州大学病院 GMP 施設内で Treg を分離する。

Treg 移入: 翌日、分離した Treg を点滴静注にて患者に移入(成分返血)する。

調査項目: 下記項目を調査、検討する。

- 1) 患者背景: 年齢、性別、診断名、重症度、病型、既往歴、腸管合併症、腸管外合併症
エントリーまでの治療経過
- 2) 臨床スコア: Clinical Activity Index (CAI) (Rachmilewitz による)
- 3) 血液生化学検査 (CRP、血沈、血算、生化学) (週 1 回)
- 4) 大腸内視鏡検査: 内視鏡スコア (Matts 分類) (治療前、治療後)
- 5) フローサイトメトリー分析: (CD4, CD8, CD25, FOXP3) (第 1, 5 週目)
- 6) 副作用の有無(移入療法後 2 週間)
- 7) ステロイド投与量
予定登録数 6 例 (初期の 3 例で安全性が確

立されれば、移入細胞数を増加する dose escalation study)

主要評価項目: Treg 移入療法の副作用の有無
副次的評価項目: 治療効果 1. 臨床スコア (CAI) 2. 炎症所見 (CRP、血沈) 3. 内視鏡スコア (Matts 分類)

D. 考察

Treg 分離移入療法の大腸炎抑制効果には、移入された Treg が効率よく腸管へ移動することが必要である。我々はこれまでに CliniMACS で分離された Treg が、特に TGF- β 1 存在下に培養増殖可能であること、non-Treg から TGF- β 1 存在下に Treg へ分化誘導可能であることを示した。TGF- β 1 は α E、 β 7 インテグリンの発現誘導因子である^{4,5}ことが知られており、TGF- β 1 による Treg 上の腸管ホーミングレセプターの発現誘導を検討したところ、 α E β 7 インテグリンのみならず、 α 4 β 7 インテグリン発現も増強した。よって、TGF- β 1 存在下に *in vitro* で培養、または誘導した Treg を治療に用いる利点として、より大量の Treg 移入が可能となる事と共に、腸管ホーミングレセプター発現誘導により腸管へのトラフィックを促進できる可能性が示唆された。

しかしながら、培養/誘導 Treg を細胞療法に用いるには、分離 Treg を用いるよりも、安全性の面からハードルが高い。施行可能であるという点から、まずは分離した Treg を患者へ輸注する「血球成分除去・Treg 分離移入療法」が試みられるべきであり、その安全性が確立される必要がある。この事が将来的に培養/誘導 Treg 移入療法の可能性に繋がる。我々は「UC 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た。今後、九州大学病院 GMP 施設を

用いて、最終的な validation を行い、その結果をもって倫理委員会の審査を受け、承認後に臨床試験を行う予定である。

E. 結論

in vitro で TGF- β 1 存在下に培養することより培養/誘導 Treg の腸管ホーミングレセプター発現を誘導し、Treg 移入療法の大腸炎抑制効果を増強できることが示唆された。

UC に対する「血球成分除去・Treg 分離移入療法」は施行可能であり、臨床試験を行い、その安全性、有効性を検討する事が望まれる。

F. 参考文献

1. Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H: An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2006; 51: 677-686.
2. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R: Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25^{high} T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878.
3. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M: CD4⁺CD25^{high} T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *Journal of Immunology* 2004; 173: 3119-3120.
4. Smith TJ, Ducharme LA, Shaw SK, Parker CM, Brenner MB, Kilshaw PJ, Weis JH. Murine M290 integrin expression modulated by mast cell activation. *Immunity* 1994; 1: 393-403.
5. Lim SP, Leung E, Krissansen GW. The beta7 integrin gene (Itgb-7) promoter is responsive to TGF-beta1: defining control regions. *Immunogenetics* 1998; 48: 184-95.