

## 評価委員会のコメント

### <Positive>

- ・ recombinantHGF、選択的制御性T細胞移入療法など新しい治療法を目指した研究を進めている。
- ・ 実績のある研究者を揃えているので、一部のプロジェクトでも臨床応用までいくことが期待される。
- ・ 多様な発想に基づいた様々なオリジナリティに飛んだ研究が企画されていることが評価できる。

### <Negative>

- ・ 来年度は3年目であるが、多くのプロジェクトが同時並行的に行われており、結論が出せるか。
- ・ 渡辺班とのオーバーラップがある。  
最近では渡辺班との住み分けができてきている。
- ・ それぞれについて重みづけできる比較研究が必要。
- ・ 論文の数ほどは実態に迫ってはいない感じである。

## 【本研究班プロジェクトの展開】

- ・ 早期の臨床応用に向けての展開が必要
- ・ 特に遂行中の臨床試験の有効性に関するEBM確立、更なる安全性の確認  
⇒治験の実現に向けての展開
- ・ 展望：既存の安価な薬剤の適応拡大  
新規治療法により、手術、入院を減らす  
⇒医療経済に貢献する

## II. 研究報告

### ◎ 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立 (13:20~14:20)

#### 1) 腸管上皮再生の分子基盤と治療への応用 (分担研究者：渡辺 守)

○ 土屋輝一郎、岡本隆一、中村哲也、渡辺 守 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学)

- ・ 以前より腸管上皮細胞の再生から見た難治性腸疾患の治療の開発を試みてきた。
- ・ 大腸粘膜の杯細胞は粘膜防御と修復に重要な機能を有し、杯細胞から出される分泌タンパクが粘膜の保護、粘膜修復、局所のリンパ球、免疫調節に関わることから、杯細胞の機能が、慢性炎症の治療に役立つということにフォーカスをあてた研究をした。
- ・ 正常大腸粘膜では杯細胞は豊富であるが潰瘍性大腸炎の病変部では杯細胞が減少してしまうことは以前より認められていたが、このようなことが病因の遷延化の一端を担っているのではないかと考えられる。
- ・ このような杯細胞の構築を制御できる因子が今までわかっていなかったが、転写因子であるMath1、Hath1が腸管上皮の幹細胞からの内分泌細胞、杯細胞、パネート細胞の分化に非常に重要であることがわかり、Math1、Hath1の機構に着目してきた。
- ・ 解析の結果、Math1遺伝子発現はNotchシグナルに制御されていることがわかり、MUC2陽性の杯細胞にはNotchが陰性であり、それ以外の細胞がNotch陽性細胞になっている。  
また逆に杯細胞に示したHath1タンパクが高発現していることがわかり、細胞レベルにおいてもNotchのシグナルの亢進によりHath1遺伝子が減弱するということから、NotchとHath1遺伝子は相反するように制御されていることがわかった。
- ・ 潰瘍性大腸炎の病変部ではNotchシグナルはどうかっているか？

正常では粘液が豊富な腸管の構造を示しているが、潰瘍性大腸炎では粘液がかなり減少しており、Notch シグナルはかなり亢進していることがわかった。

⇒潰瘍性大腸炎などの慢性炎症の状態ではNotch シグナルが亢進していることにより Math1, Hath1 が減少し、杯細胞の減少が起こっているのではないかと予想している。

- Notch シグナルは細胞運命決定因子であり、杯細胞よりも吸収上皮細胞に方向を決めるのではないかと考えられ、このような状態の時にNotch 阻害薬を使うことにより、無理矢理 Hath1 遺伝子を増加させることにより、杯細胞側への移行ができないかと最初に試みた。

- Notch 阻害剤は増殖を抑制して分化を促進する  
アルシヤンプルー染色において正常よりも Notch 阻害剤を入れることにより、粘液が増加することがわかった。ただもうひとつ気になるのは KI67 で示した通り、正常よりも細胞分化のところで増殖細胞が減っている現象が見られた。

- Notch 阻害剤は増殖抑制により急性期 DSS 腸炎を増悪する  
このような状態でマウスの腸炎モデルを用いて Notch 阻害薬の効果を解析したところ、DSS 腸炎の慢性腸炎の状態では増殖細胞がかなり増える。更に Notch 阻害薬を入れることによって分化はするが、増殖が阻害されることにより粘膜構築そのものができなくなってしまった。

- 潰瘍性大腸炎では Notch シグナルが細胞増殖により粘膜を保持する。  
Notch シグナルは細胞の分化と増殖を司るが、あくまで分化と増殖はスイッチするものであり、慢性炎症の状態では Notch シグナルが亢進することによって細胞増殖を優先させて腸管粘液を保持していることがわかった。

⇒Notch シグナルをターゲットにして分化と増殖をコントロールするのは難しいと考え、分化と増殖を同時に促進する方法はないかと模索している。

- Wnt シグナル活性化は Hath1 蛋白を不安定にする  
腸の上皮増殖を司る Wnt シグナルと Hath1 の遺伝子の関係を調べたところ、大腸癌細胞株を用いており、もともと APC が欠損しており、Wnt シグナルがオンの状態では Hath1 蛋白が積極的にイピイキンプレタソームの系で分解されている。正常の APC を導入して Wnt シグナルをオフにすることで Hath1 蛋白が安定化し、更に MUC2 蛋白が増加し、大腸癌細胞株に関してさえも分化を誘導することができた。Wnt シグナルをオフにすることでその下流にある c-myc 遺伝子は減少している。つまり Wnt シグナルも細胞の増殖と分化をスイッチできるシグナルである。

- 安定化 Hath1 蛋白の検索  
Wild type の Hath1 を強制発現させてもタンパクは殆ど出ないので、タンパク分化阻害剤である MG132 を入れることによって、蛋白が安定化する。

ミュータントの検索により 54 番目と 58 番目のセリンがレギュラドメインであることを突き止めたので、その蛋白を除いた、N1 をリレーションしたタイプもしくはセリンをアラニンに変換したミュータントを作成した。実際にセリン残基を含まない N1 リレーションタイプもしくはセリンをアラニンに変換したタイプは大腸癌細胞株においても同等に安定して発現することがわかった。

- Serine 変異体はタンパク安定化と転写活性を有する。  
Hath1 タンパクの転写の機能として保存されているかどうか転写活性を用いて解析。N1 をリレーションしてしまうと転写活性はかなり落ちてしまう。Hath1 は Ebox-Luc 配列を認識して転写活性を持つものであるが、Ebox-Luc 配列を有したレスピレスアッセイにおいては N1 をリレーションしてしまうとそれだけで、タンパクを発現しているにも関わらず、転写活性は落ちてしまう。しかしセリン・アラニンミュータントは転写活性を保持したまま大腸癌細胞株でもかなり安定して発現していることがわかった。

- Hath1 蛋白安定化のみで大腸癌細胞の杯細胞分化を促進する  
54・58 番目のセリン・アラニンミュータントを用いることによって、大腸癌細胞株に安定して発現させる系を構築した。ワイルドタイプの Hath1 は DOX をいれて遺伝子を導入したにも関わらず、タンパクが全く発現しなかった。MG132 のタンパク分解阻害剤を入れて初めてタンパクが安定することがわかった。54・



58番目のセリン・アラニンミュータントにおいてはDOXを入れて、遺伝子を誘導してあげるだけでHath1タンパクが安定化することがわかった。免疫染色でもワイルドタイプでは導入するだけではHath1陽性細胞はなく、タンパク分解阻害剤でかなり安定化してくるタイプ、セリン・アラニンに変換することで遺伝子を導入しただけでタンパクが安定してくる。

このような状態で大腸癌の形質をみたところワイルドタイプでは遺伝子を導入するだけではタンパクは壊れてしまいムチンが殆ど出ないのに対し、アラニンミュータントではタンパクが安定して発現することによってムチンの遺伝子がかかり発現することがわかった。Hath1のミュータントを入れているだけであり、大腸癌細胞のWntシグナルは全くいじっていないので、C-mycの細胞増殖は全く変わらないままHath1遺伝子を導入するだけで分化形質が促進することがわかった。

・GSK阻害薬によるHath1蛋白安定化が杯細胞分化を促進する

Wntシグナルがオンになっている場合、GSKがHath1をターゲットとして蛋白分解を起こして分化シグナルを減弱させて逆にβカテニンの蛋白を安定化させることで細胞増殖を起こす。

WntシグナルをオフにするとHath1蛋白が安定化し細胞分化が起こる。その裏でβカテニンがGSK3βによって蛋白分解を促進させて増殖のシグナルをなくす。

Notchシグナルと同様にWntシグナルもスイッチングによって分化と増殖を住み分けさせている。

但し、今回は増殖と分化を司るのがGSK3βという共通の蛋白を介して起こるということがわかったので、スイッチそのものをやっつけてしまおうと細胞の増殖と分化を同時に起こさせるのではないかと考えた。そこでGSK3βの阻害薬であるリチウムクロライドを用いたところ大腸癌細胞(SW450)ではリチウムの刺激によりHath1蛋白が安定化して出ることによりMUC2蛋白も増加する。

またリチウムなのでWntシグナルも変えないままβカテニンも安定化させる。リチウム製剤は細胞の増殖と分化の両方を促進できるものであるという可能性がある。

・GSK阻害薬は腸管上皮細胞のβカテニンとHath1を核内に共局在させる。

ヒトの小腸由来の細胞株を入手し、βカテニンで染めるとβカテニンは膜にドミナントに発現しておりWntシグナルはオフの状態になっている。その状態で内因性のHath1は核に染まっている。

(共局在はしていない)

リチウム処理することによりWntシグナルオンにすることにより、βカテニンは膜から核へ移行する。

更にHath1蛋白は安定したまま核内に存在しβカテニンとHath1が核内に局在する。

・GSK阻害薬によるHath1蛋白とβカテニンの共在が分化と増殖を同時に促進する

c-myc遺伝子もMUC2遺伝子もリチウムの処理によって増加する。このことからリチウム製剤は増殖と分化を促進できるものではないかということが強まった。

・マウスへのリチウム投与の影響(vivoでの効果)

炭酸リチウム(GSK阻害薬)を正常のマウスに投与し、正常の腸管がどうなるか検討

⇒ネガティブコントロール(水)

結果、大きな傷害は認められなかった。KI67が強く染色されることもなかった。

正常のマウスではリチウムの影響はそれ程ないという印象である。

PCRにて遺伝子発現の変化を見ると、小腸、大腸においてMUC2やCgAなど遺伝子の増加は認められず有意差はなかった。

小腸においては杯細胞以外の形質、パネート形質はWntシグナルで上昇すると言われているので、その効果もあるのではないかと予想し、Cryptisin1, Cryptisin4, sPla2, lysozyme, CRS1C, NOD2などの抗菌物質を多種類、解析したが、変化は認めなかった。

興味深い点としては、有意差はなかったが、NOD2遺伝子は多少あげる効果があるので、GSK阻害剤の用量を変えたり、今回は既成薬として炭酸リチウムを使用した。他のspecificな薬剤を用いることで効果の増強が期待できるので、今後さらに詳細に検討していきたい。

・GSK阻害剤を用いた炎症性腸疾患の治療戦略

βカテニンとHath1両方を安定化させ、細胞増殖と分化を同時に起こして粘膜の構築をすると共に分化を促進することで機能を亢進する。

・今後の計画

炭酸リチウム投与による腸管及び全身への影響の詳細な検討

DSS 腸炎モデルマウスにおける GSK 阻害剤の有効性の検討。粘膜再生への影響を検討する。

<質疑応答>

Q: in vitro の実験系で 50 μmol と非常に濃い濃度で検討されているが、濃度依存性はあるか?

A: 濃度依存性はある。短期間で影響を見たかったので高い Dose により後の形質変化を見ている。ある程度長い期間 (1 ヶ月、2 ヶ月とか) で見るのであればリチウムではかなり低い濃度でも変化は認められる。

Q: 塩化リチウムと炭酸リチウムとではかなり異なるように思うが?

A: 阻害効果としてはリチウムイオンのところで効いていると思うので変わらないと思うが、その他の細胞への影響という点ではかなり違ってくるので、もともとリチウムクロライドで vitro 実験していたが vivo に持っていくのは難しいと考え、炭酸リチウムでも同じ効果が期待できるのではないかと考え実施したが、結果はあまり芳しくないで、 vitro の系に準じた方法ということで、同じ薬剤を用いて vivo でも確かめることから始めていかなければ行けないかと考えている。

Q: リチウムクロライドは toxic なものか?

A: かなり toxic なものである。細胞に関しては 1 日~2 日の系なのでかなり high dose で実験しているが、どこまで low dose にした時に同じ影響が期待できるかを確認しなければならない。リチウム以外に specific なインヒビターが出ており、low dose で効くというのも確認されているので、vivo の時にはそれらが期待できると考えている。

Q: 候補は絞り込まれているか?

A: できれば vitro でもう少しインヒビターの作用を解析してから vivo に行きたいが、臨床応用という観点から、2 足とびのような状況になっているので、両方、足場を固めながら取り組んでいきたい。

2) クロウン病腸管狭窄に対する内視鏡的分子標的療法の開発 (分担研究者: 鈴木健司)

○ 鈴木健司<sup>1</sup>、河内裕介<sup>1</sup>、孫 曉梅<sup>1</sup>、藤井庄人<sup>2</sup>、山崎元美<sup>2</sup>、米山博之<sup>2</sup>

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

[背景]

- ・腸管狭窄症に対して研究開発を進めてきた薬剤の特許公開がなされたので、標的分子の開示を含めて報告したい。
- ・炎症性腸疾患の中でも特にクローン病の術後の再発が長期で 70~80% まで及んでしまう。手術をしても再発する最大の理由は腸管の線維化、狭窄が問題となっていた。
- ・狭窄は腸管炎症局所の線維化で起こるが、線維化は必ずしも悪い修復機構ではなく正常な状態で起これば傷ついた組織を十分に保護し組織を構築していき、むしろ必要不可欠な修復過程である。クローン病では過剰な線維化が起き、腸管の狭窄となり手術となる。足りなければ瘻孔形成等となっていく可能性がある。
- ・協調のとれた線維化、創傷治癒が重要である。
- ・クローン病では抗炎症療法は重要であり、同時に分化再生する療法も必要である。そして適切な線維化を踏まえた 3 つの療法で対応することが大切である。
- ・このような考えをもとにベンチャー企業であるステリック再生医科学研究所と共同で研究を進めてきた。

STNM-01 (anti-GalNAc 4S-6STsiRNA) DSS 腸炎での検討(ステリック再生医科学研究所と共同研究)

- ・創傷部位に治癒のために動因される fibrocyte、活性化された fibroblast が組織に定着し、コラーゲンファイバーを産生し、創傷治癒が行われる。そういう一連の流れがあり、fibroblast が集まってくる時にモ



ノサイト、主にマスト細胞が産生する。その時の重要な物質がプロテオグリカン。プロテオグリカンのコアタンパクの側鎖の糖鎖であるグルコサミノグリカンが重要であることがわかってきた。

- ・マスト細胞が作り出すコンドロイチン硫酸Eが組織に定着して、のりのようなものを出しFibroblastが定着して、初めてコラーゲンの産生が起り、組織の修復がおこる。そのためにはコンドロイチン硫酸Eが非常に重要になり、それを作っている酵素がギャルナックである。この酵素はコンドロイチン硫酸Aの硫酸基をくっつけるという働きをしてコンドロイチン硫酸Eを作る。この反応をストップさせるのが我々の薬剤の特徴である。コンドロイチン硫酸がコアタンパクに付加されていくのがゴルジ体であり、ゴルジ体でこの酵素が働くのをブロックするのがストラテジである。
- ・ところがこの siRNA を血中にいれた場合には血中の RNAs で瞬時に分解されて、ターゲット部位には到達させることが出来ないことからドラッグデリバリーシステムが重要となる。
- ・in vitro で siRNA の分解性を見ても、RNAs が無い状態では siRNA は当然 60 分保持されるが、RNAs を入れて siRNA (STNM-01) を入れると 30 分位で分解されてしまう。これでは到底、ターゲット部位には到達させることができないことから、保護剤としてアテロコラーゲンを加えると 45 分位までは保持する。これまでアテロコラーゲンをを用いた検討を行ってきたが、炎症性腸疾患にはこれだけでは良くないので、内視鏡を用いて局所にとどめる方法で試みた。
- ・siRNA を FITC で標識して局注した。24 時間後にも FITC を見つけることが出来る。この実験では FITC の分子が残っていて、siRNA はどうなっているのかという問題が残る。
- ・STNM01 (anti-GaINAc4S-6STsiRNA) を粘膜下注 24 時間後でも siRNA は腸管の中に specific に保持されていることを確認した。
- ・今回は内視鏡を使わずにマウスで実験を行ったが、粘膜下に siRNA を打ち込んだ。急性腸炎で見ているが、ターゲットの酵素発現は抑えられることがわかった。腸管で局注した部位にのみ効果であり、関係のない腎臓などでは全く効果は及ぼさず、臓器特異性をもって siRNA を作用させることができる。
- ・急性 DSS 腸炎で体重の変化をみたが有意差は認めなかった。便の性状、血便の状況においては改善することができた。腸管の短縮の抑制効果は認められた。組織でみると HE においてはコントロールの DSS 腸炎では効果はないが、STNM01 では治療効果があり、マクロファージの浸潤を抑えることができた。また、コラーゲンの産生を抑えていることがわかった。ファイブプロラストの染色でも腸管への浸潤を抑えることができたことがわかった。
- ・TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインも STNM01 でおさえることができたことがわかった。
- ・マスト細胞が作り出すコンドロイチン硫酸Eがファイブロサイト、ファイブロブラスト、モノサイトが組織に定着して線維化を強く起こしていく重要な因子である。その出過ぎた酵素の働きを抑えることによって、過剰な線維化を抑えて、適切な創傷治癒に持っていけるのではないかと考えている。
- ・クローン病の腸管線維化に対してバルーン拡張との併用で線維化を治して行く治療法を開始したいと準備を進めている。

#### <質疑応答>

Q: 抗線維化作用だけではなく、かなり強い抗炎症作用も示されたが、その変の解釈はどうか?

A: 抗炎症作用もある。コンドロイチン硫酸は炎症部位に糊付けされたようになっていて、サイトカインやケモカインがトラップされて局所で炎症物質が働くためのベースとなる物質であり、その影響がある。コンドロイチン硫酸の働くターゲット細胞はファイブロブラストがメインであるが、モノサイトにも働くので抗炎症作用があると考えている。

Q: DSS 腸炎モデルの急性モデルを使用されているが、線維化をみるのに適切か?

A: 慢性腸炎モデルでも実験を進めている。線維化を起こす心筋炎のモデルで実験を進めている。

Q: ファイブロブラストが組織に定着するのはギャルナックに依存していると考えてよいか? エッセンシャルな作用と考えられるか?

A: ギャルナック以外でも実験したが、腸炎の治療効果があったのはギャルナックだけであったので、それだけとはいえないが、選択性が限られた作用効果と考えられる。

Q: 局所療法では他へ影響しないと考えてよいか? 安全性は高いと考えるとよいか?

A: 局所投与できることがこの治療法のメリットであり、特に腸管の粘膜下層が局所投与(内視鏡)で何故効くかという疑問もあるが、siRNAに関しては、腸管粘膜下は分解されにくい状況にあると考えられ、それを逆に利用して治療できるという意味で、全身投与よりは局注の方が適しており、効果が一番得られ、安全性も高い方法であると考えている。

### 3) 炎症性腸疾患に対するHGFの臨床応用 (研究分担者: 坪内博仁)

坪内博仁<sup>1,2</sup>、○井戸章雄<sup>1,2</sup>、沼田政嗣<sup>2</sup>、山路尚久<sup>2</sup>、藤田 浩<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>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>2</sup>京都大学医学部付属病院探索医療センター)

- ・我々は傷害消化管粘膜の重要な再生修復因子であるHGFの組換えタンパクの臨床応用に取り組んできた。
- ・組換えヒトHGFは先に劇症肝炎に対する第I、II相の試験が実施されており、昨年6月にエントリー期間を終了し、今年の1月まで、最終的には治験総括報告書を作成するために直接閲覧、データ固定、監査を経て、解析を行い、報告書に関してGCP監査を受けて、1月末に報告書が完成した。今月、規制当局に治験終了届けを提出する。
- ・被験者の特性 20名の対象疾患患者を紹介頂いたが、かなり除外基準が厳しく、トータルで4名(劇症肝炎3例・遅発性肝不全1例)を採用した。脳症発現から発症7.5日でHGFを投与し、最大14日間のHGF反復静脈内投与とその後14日間の観察期間(追跡期間)をおいて28日間の治験期間で死亡した症例が1例、追跡期間で1例、計2例死亡した。
- ・この静脈内投与におけるHGFの治験の主要エンドポイントは安全性評価であるので、有害事象の発現の有無ということがプライマリーエンドポイントになっている。  
死亡した1例の有害事象は肝不全であり、原疾患の増悪によるものである。治験薬とは関連性はない。その他の有害事象としては同じ死亡例に亡尿と呼吸状態の悪化があるが、いずれも治験薬との関連性はない。第3者のモニタリング委員会を経て、HGFに関連した重篤な有害事象はないということが結論付けられた。
- ・一方、頻度の高い有害事象としては尿中アルブミンタンパク陽性、尿量減少、血圧低下、低カリウム血症などがある。HGFの非臨床安全性試験から予測された有害事象としては、蛋白尿、アルブミン量、血圧低下であるが、いずれも軽度である。血圧低下は死亡例において重度となっているが、HGF投与中に起こる血圧低下はいずれも軽度であった。また意識清明な方で血圧低下が見られたが、特に自覚症状などは認めなかった。またHGFに関連性のない血尿が1例(重篤)あるがこれは死亡例に見られたもので、原疾患にともなう顕著な出血傾向で、膀胱内血腫を形成したものである。治験薬との因果関係は認められない。
- ・このような解析から、HGFの反復静脈内投与は特に重篤な有害事象はなく血圧低下も軽度で、尿アルブミン、尿タンパク陽性も問題となる程度ではなかった。
- ・生存期間 治験薬の治験期間死亡例が1例あり、脳症発症から死亡までの期間が28日となっている。4例の生存期間を劇症肝炎の全国調査の適応症例から360例を抽出しマッチングしてそれぞれに対象集団を選択し、比較すると、統計学的に有意差をもって生存期間を延長するという結果は得られなかったが、生存期間を延長する傾向は認められた。但し、4例という症例であり、今後も解析が必要である

#### 【まとめ(1)】

劇症肝炎に対する組換えヒトHGFの第I・II相試験において

1. 直接閲覧、データ固定および解析を行った後、総括報告書を作成し、GCP監査を終了した。



2. 治験期間中の死亡は1例、その他の重篤な有害事象は1例（死亡例）に認められた
  3. HGFの薬理作用に基づくと考えられた有害事象の発生は、蛋白尿、アルブミン尿4例、血圧低下3例、血尿または尿中血陽性3例で、そのうち血圧低下の1例、血尿の1例は重度であった。
  4. 生存期間は対象集団に比して延長する傾向がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった。
- ※ HGFの静脈内投与による安全性が確認できたことは大きな成果である。

・HGFの傷害粘膜の再生・修復促進は注腸投与でも発揮される

- ・炎症性腸疾患に対する臨床応用は安全性の面からも注腸投与で出来ないかと考えている。  
DSS腸炎をもちいてHGFの10 $\mu$ /mlという濃度の治療により確実に糜爛が縮小することを確認している。  
以前、報告した腹腔内投与、静脈内投与ほどは血中レベルが上がらなくても局所投与で潰瘍修復促進効果を発揮することが判明した。
- ・注腸投与の安全性について、10倍濃度でも血中には検出されず、血中暴露がないことが確認された。  
100倍濃度でようやく低レベルの血中暴露認められた。このようなことから薬効の得られるレベルの注腸投与は血中暴露がない。すなわち血圧低下や腎毒性の可能性が極めて少ないということがわかった。
- ・大腸発癌に及ぼすHGFの影響  
HGFは増殖因子であるので、発癌については注意が必要であると指摘を受けているが、発癌物質を用いた発癌実験ではHGFはむしろ腫瘍の発生を抑えることが確認された。  
そして炎症を、colitic cancer意識したDSS腸炎とアドキシメタンを併用したモデルでもHGFは発癌を抑える傾向のデータを得ている。

・HGFは細胞の遊走能を促進する

HGF=scattering factor (SF)

傷害消化管粘膜の再生・修復過程におけるepithelial restitutionに必要なとされる。

種々の癌細胞において、その浸潤、転移を促進することが報告されている。

HGFの更なる安全性を確保するために、消化管粘膜上皮細胞（ヒト胃上皮細胞：MXN74）を用いてHGFの細胞遊走促進の分子機構を特にtight junction proteins(TJPS)に着目して明らかにする。

・HGFは消化管上皮細胞の遊走を促進する。

HGFの転化により細胞の移動が促進される。

Oris migration assay kitを用いてin vitroの潰瘍を作成し、潰瘍の修復、つまり細胞の移動した面積を測定すると、HGFで細胞が有意に遊走されて、潰瘍面積が縮小することがわかった。

・Tight junction proteins(TJPS)に着目

このようなタンパクはどのような動態を示すのかを解析

膜貫通型タンパク(Cloudin Oludin JAM)があり、裏打ちタンパクとして様々なものがある。裏打ちタンパクがアクチンと結合する。

・TJP発現に及ぼすHGFの影響

タンパクレベルで特に大きな変化は認められなかった

・TJPの細胞内局在発現に及ぼすHGFの影響

免疫染色でCloudin Oludin ZO-1の変化を見たところ、HGF添加で細胞膜に局在していたZO-1が細胞質、細胞膜から消えて、細胞質にdiffuseに染色されるようになり、その後、少し細胞膜のところに戻ってくるという現象をとらえることができた。

・TJPの細胞内局在に及ぼすHGFの影響

この現象をconfirmするために、細胞質各群と細胞膜各群でwesternをおこなったところ、HGFを添加するとCloudin Oludinはそれほど変化しなかったが、ZO-1が細胞質各群で発現量(タンパク量)が減少することを確認した。さらにZO-1で免疫沈降し、Oludinでwesternを行うとHGFを添加するとタンパク量は低下し、Oludinで免疫沈降するとZO-1のタンパク量は減少する。

## 【まとめ2】

- \* 傷害消化管粘膜の epithelial restitution における HGF の役割を明らかにするために下記の検討をおこなった。
- ・ HGF は boden chamber および 潰瘍修復モデルを用いた in vitro 実験系において消化管上皮細胞の遊走能を有意に促進した。
- ・ HGF は TJP 発現 (CLONs, OLIDN, ZO-1) 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。
- ・ HGF によって OCLDN と結合した ZO-1 が減少した。

### 組換えヒト HGF の臨床開発 (1)

#### ◆ 劇症肝炎を対象とした組換えヒト HGF 第 I・II 相臨床試験 (医師主導治験)

- ・ 2008年6月30日で被験者登録終了
- ・ 治験総括報告書作成、GCP 監査 (～2009年1月)
- ・ 規制当局に治験終了届の提出 (2009年2月)

#### ◆ 現有の組換えヒト HGF (GMP 製剤)

- ・ 三菱ウェルファーマより原薬供給、その後同社に委託 GMP 製剤化
- ・ 使用期限: 2008年6月まで

### 組換えヒト HGF の臨床開発 (2)

#### ◆ 炎症性腸疾患に対する臨床応用の課題

新たな組換えヒト HGF の製造

委託製造先の検討⇒現在ある程度めどが立ってきた(プラセボの製造も含む)

田辺三菱製薬からの技術移転

現有の GMP 製剤との同等性評価

#### ◆ 臨床試験実施に向けた準備

プロトコル等の作成、臨床試験実施体制の整備など

## <質疑応答>

Q: 劇症肝炎で腎障害が認められたようであるが、もともと毒性試験ではどうであったか。

A: 安全性試験は、マウスとラットとサルで実施している。反復静脈内投与ではラットでのみタンパク尿とアルブミンが増えるというデータがある。サルとマウスでは出ていない。クレアチニンなどの上昇もないが、ラットでそのようなことがあるので、ヒトではその点をしっかり確認する必要がある。(機構からも指示を受けている) その辺は除外基準でも厳密に評価している。

評価委員会でも安全性は特に問題とはならなかった。

GMP レベルのモノを我々で用意するという課題がこのこっているが、現在、前向きに取り組んでいる。

班長: 日本から発信した治療であり、実現に向けて是非ともがんばっていただきたい。

## ◎ 腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発 (14:05～15:05)

### 4) 炎症性腸疾患発症に関与する Th17 細胞の腸管粘膜での分化誘導機構 (研究分担者: 竹田 潔)

○ 本田賢也、竹田 潔 (大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座免疫制御学)

- ・ 消化管粘膜にはいくつかの特徴的な細胞がいるが、我々は Th17 細胞に着目して研究を進めている。



・ナイーブ CD4T 細胞が TCR 刺激で IL-6, TGF- $\beta$ , IL-23 サイトカインとともに刺激されたときに分解してくる細胞である。そして IL-17, IL-17f, IL-22 等の炎症性のサイトカインを産生することを特徴としている。重要なことは Th17 細胞の異常活性化が IBD に繋がっているという報告が最近、数多く出ている。

・Th17 細胞は SPF 環境下に飼育された健康なマウスにおいても消化管粘膜固有層特異的に且つ多数存在する。他の臓器、リンパ組織などには殆ど存在していない。

Q. なぜ Th17 細胞は、消化管粘膜特異的に存在しているのか？

・腸内細菌叢（フローラ）の存在が、Th17 細胞の分化には必要である。

無菌マウスや抗生物質を投与したマウスでは、Th17 細胞が激減している。腸内細菌がどういった分子を産生するために、Th17 細胞の分化が誘導されるのかということを考えた。

・Th17 細胞分化は TLR シグナルに依存しない。

TLR の役割について検討

TLR のアダプター分子である Myd88 と Trif のダブル KO マウスを作成した。しかしながらこのダブル KO マウスでは粘膜固有層にある Th17 細胞は野生型とほぼ同等であった。粘膜固有層にある Th17 の分化は TLR に非依存的であることがわかった。一方、便中の IgA の濃度はこのダブル KO マウスにおいて非常に低下していたので、IgA 産生の形質細胞の分化には TLR のシグナルは必須であると考えられた。

・その他細菌から分泌される分子で Th17 細胞分化に関わるのかということで、我々は ATP に着目した。

・一部の細菌は、高濃度の ATP を産生する。

・細胞外 ATP は、P2X 受容体群と P2Y 受容体を介して、免疫細胞の機能に強い影響を与える。

・腸内細菌を培養すると、その上清中には高濃度の ATP を検出できる。その培養上清を CD40 細胞と樹状細胞の共培養系に加えると、Th17 細胞分化を強く誘導する。この Th17 細胞の分化誘導は ATP 分解酵素である ATPase によって非常に強く阻害された。

・GF マウスの便中の ATP 濃度は極めて低い。同時に粘膜固有層の Th17 細胞数も非常に少ないが、ATP を投与すると、その数の有意な増加を認める。このようなことから腸内細菌由来の ATP が Th17 細胞の強力な誘導因子であると示唆していると考えた。

・大腸粘膜固有層の CD70<sup>hi</sup> 樹状細胞は P2X と P2Y 受容体群を高発現している。

・CD70<sup>hi</sup> 樹状細胞は ATP 刺激に対して、IL-6 と TGF  $\beta$  活性化酵素 (Integrin) を産生する。

・CD70<sup>hi</sup> DC<sub>2</sub> は、ATP 存在下において、共培養したナイーブ CD4T 細胞を Th17 細胞へ分化させる。

腸内細菌由来の ATP が CD70<sup>hi</sup> の樹状細胞に P2X と P2Y 受容体を介して刺激を送り、それによって IL-6, Integrin の産生を誘導して、Th17 細胞が粘膜固有層で分化誘導されるのではないかと考えられる。

・ATP 注射は、T 細胞移入による腸炎モデルを増悪する。

Scid マウスにナイーブ CD4 陽性 T 細胞を移入した後、ATP あるいはコントロールを複数回投与した。体重を計測すると、ATP 投与群で顕著に体重減少が増悪し、下痢がひどくなり、腸炎の様相が悪化した。Th17 細胞数も ATP 投与した群で非常に増加している。

このようなことから ATP は腸炎の標的のひとつとして考えられる。

・今後の実験計画

複数存在する P2X と P2Y 受容体サブタイプの内、Th17 細胞分化誘導に関わるのはどのサブタイプであるか？  
レトロウィルスによる過剰発現系を用いて検討する。

ATP の分解酵素

E-NTPD7 及び E-NPP5 が消化管上皮に高発現していることを見出した。

現在それらのノックアウトマウスを作成し、核酸の消化管発現における働きをさらに検討する。

<質疑応答>

Q: 腸内細菌にも色々あるが、この Th17 細胞を induce するようなバクテリアの特徴があるか？

A: 今のところしっかりしたデータは持っていない。ある種の細菌が Th17 を特異的に誘導するデータは他のグループから報告されている。ジャクソンから買った B6 マウスには Th17 細胞は殆どいないが、タコニックから買ったマウスには Th17 細胞が非常に多くいることから、腸内細菌を比較するとどうも異なるものがい

るとか、などの報告はある。どの細菌がTH17細胞を分化誘導するかとか、こういった特徴を持っているかはこれからの課題である。

Q: ワイルドタイプのマウスにもたくさんいて、腸炎を起こすものにもいるということは、ワイルドタイプのTH17は何をしているか?

A: そこははっきりわからない。常に活性化状態を保ってバクテリアの進入に備えているとも考えられるし、TH17細胞がいることで、炎症を起こすというよりも、何らかのホメオスタシスを保っているような働きがある可能性もあるが、通常、存在しているIL17が何をしているかはわかっていない。

Q: TH17を誘導するサイトカイン、IL-23にATPを外から入れるとどうなるか?

A: IL-23もマウスも上がる。TNFも上昇する。

Q: TH17細胞でバグが少なくてもB6が多いのは、同じ環境で飼っていてもできるのは?バックグラウンドのフェノタイプが関係しているか?

A: バックグラウンドの違いだと思う。

Q: 腸炎の治療においてAPCをターゲットとするのか?TH17を産生する方をターゲットとするのか?

A: TH17細胞そのものを無くしてしまうことができるのであれば、TH17をターゲットとしても良いし、IL-23をターゲットとしても良い。ATPを検討しようとする、樹状細胞に対して何かを検討することになるかと思う。

Q: 実際のところナチュラルに存在しているのはどういったことをしているのか?

A: それはわからない。IL17のローカスにジフテリアトキシンレセプターをノックインしてジフテリアトキシンを入れてTH17細胞だけを無くして、どういったことになるかを検討しようとしている。

班長: ATM療法の理論的な背景になると臨床家の視点からは言える貴重なデータである。

#### 5) 抗菌ペプチドを用いた新規治療法の開発 (研究分担者: 高後 裕)

○ 田邊裕貴<sup>1</sup>、前本篤男<sup>2</sup>、金野陽高<sup>1</sup>、石川千里<sup>1</sup>、稲場勇平<sup>1</sup>、伊藤貴博<sup>1</sup>、藤谷幹浩<sup>1</sup>、  
蘆田知史<sup>2</sup>、高後 裕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>旭川医科大学内科学講座消化器血液腫瘍制御内科学分野、<sup>2</sup>旭川医科大学消化管再生修復医学講座)

#### [背景]

- recombinantの抗菌ペプチドを作成し、臨床応用していこうと考え実験を行った。vivoの実験である程度一定の見解が出てきたので報告する。
- 自然免疫のfunctional moleculeである抗菌ペプチドを新規治療に応用しようと考えている。
- 自然免疫は腸管で発達しており、小腸ではバクテリアが少ないことは小腸陰窩にあるpaneth細胞の働きによるものであることがわかっている。paneth細胞は細胞内に分泌顆粒を持ち、多くの抗菌ペプチドを含んでいる。抗菌ペプチドは生体内で最初のバリアの役目を持っている。paneth細胞、大腸上皮、白血球など血液細胞でも発現がある。数多くのバクテリア、ウイルスなども殺すことが報告されている。実際には大きなペプチドとして分泌され、3~4kDの小さなmoleculeになって活性を有する。主なファミリーとしてはdefensin、cathelicidinなどがある。

#### [defensin]

- 6個のシステインを有し3つの対峙するbondを有し、強固な形態を作るという特徴がある。ヒト小腸内paneth細胞ではpro HD-5という大きなmoleculeとして作られ、分泌後トリプシンでactivateされてmatureなHD-5となるが、その機構については明らかになっていない。我々の実験でも確認した。  
様々なタンパク分解酵素に抵抗力がある

#### [Recombinant HD-5]

- 大腸菌のRecombinant発現系を用いて大腸菌を刺激し、様々なペプチドが出てきて、その内のひとつDefesin



分画を得て精製している。そういったペプチドは特徴的なシステインであるフィドボンドを持っているので、スペックでサイズが明らかであることを確認している。

#### 【Recombinant proHD-5】

- マチュアペプチドよりもかなり大きな8キログルトン程度のプロフォームも作成している。  
HPLCで精製し、スペックで確認している。AU-PAGEで泳動すると作成されたものは大きなペプチドとしてほぼ均一に精製されている。それをトリプシン処理するとトリプシンが切断し、マチュアなペプチドとして明らかに出来てくる。マチュアペプチドはトリプシンを付加しても切断されずに抵抗性のフォームを形成している。

#### 【Antibodies against HD-5】

- それぞれのペプチドに対する抗体が得られたので、proform に対する抗体、matureform に対するポリクローナル抗体を用いて免疫染色を実施。

#### 【Native HD-5 is stored as proform】

- proform に対する抗体と matureform に対する抗体をマージすると、生体内では Defensin は proform の形で存在することがわかってきた。
- ヒトの組織をエクストラクトし、western blotting で確認すると、すべてのフォームは proform として発現しており、通常の生体内では matureform は見られない。クルードエクストラクトにトリプシンを加えると matureform として detect される。Recominant ペプチドと同じような分解の様子をとる。

#### 【Paneth Cell Defensin Activation Process】

- defensin は proform として発現し、分泌後に matureform として働いていることが明らかになった。
- 実際に生体内で Paneth Cell や Defensin がどのように働いているのかを調べると、小腸粘膜をクローン病患者から得て、小腸陰窩のみを精製する方法を開発し、検討した。  
正常な小腸陰窩はきれいな構造を保ち、その下にはパネート細胞がみられるが、クローン病患者から得られた小腸陰窩は伸びたような管腔が広がったような形態異常を示している。それらの精製されたクリプトがどういった活性を持っているかを抗菌活性で検討した。サルモレラ、E. coli. などの細菌で刺激して得られた分泌物の細菌活性を見ると、通常の正常なヒトの小腸陰窩からは抗菌活性が得られるが、クローン病患者では、抗菌活性が明らかに低下している。

#### 【Loss of Antimicrobial Activity】

- クリプトの数を増やせば増やすほど、正常な場合はバクテリアが死んでいくが、クローン病患者では抗菌活性がかなり低下している。その原因として defensin の発現に異常があるのではないかと考えている。  
Western blotting で見てみると、通常は proform, defensin が見られる。トリプシンで処理すると小さな matureform が detect されるのに対し、クローン病の患者でトリプシン処理すると matureform が認められなくなっている。つまり抗菌活性をもった defensin が得られなくなっている。構造異常があることを突き止めた。

#### ◆抗菌活性の低下を補うことで治療に繋がるのではないかと考え、以下の実験をした。

- DSS 腸炎モデルで大腸粘膜は明らかに破壊されているが、小腸粘膜は破壊されずにパネート細胞及び内部の分泌顆粒も見られる。つまりこの腸炎モデルではマウスの小腸はダメージを受けておらず、内因性の defensin は保たれている。
- このマウスに経口的、経腸的に腹腔内投与を行った。

#### 【DSS colitis model】

- はじめに経口的に投与 HD-5、matureform を投与しても生存の延長は見られない。Proform を投与しても同様な結果であった。
- 注腸投与でも明らかな効果が認められず、延長効果は認められなかった。
- 腹腔内で3回投与  
HD-5 の腹腔内投与では生存曲線が右に移行し、有効な効果があり、有意差も認めた。しかし proform ではこのような効果はなく、治療で用いるには mature ペプチドでなければならないことがわかってきた。

【DSS colitis model →histology-】

- ・体重に関しては、改善が認められず、組織学的にはHE染色ではmatureformを与えたものでは粘膜が保たれている。
- ・KI67で染色してみても細胞増殖にはあまり関係ないようである。粘膜の修復には貢献していない。

【DSS colitis model →apoptosis-】

- ・アポトーシスを検討したところ、Indexで見るとHD-5を投与するとアポトーシスが少なくなっている。但し、有意差は認めない。

【Summary of the colitis model】

- ・DSS腸炎での検討から、経口的に投与しても効果は得られない。注腸投与でも効果がない。
- ・腹腔内でmatureformを投与した時のみ効果が認められた。

【Possible explanation】

- ・抗菌ペプチドに抗菌活性があることは従来より報告されているが、免疫賦活作用もある。
- ・アポトーシスも抑制する作用があることを確認した。
- ・抗菌ペプチドと呼んでいるが、抗菌活性だけでなく、宿主を守るようなペプチドであろうと考える。

<質疑応答>

Q:腹腔内投与が有効で、経口とか注腸投与で効かない理由をどのように考えるか?

A:通常のマウスを使用しているが内因性の抗菌ペプチドは保たれているという状況があるが、経口的に投与して残っていたとしても濃度的にかなり少なくなっており、効果が認められなかったと考えられる。

Q:安定性はどうか?

A:投与した後の便中からヒトのdefesinと同じペプチドが回収されているので、完全に壊れているわけではない。Vitro実験では種々のタンパク分解酵素を加えても壊れない強力な構造であることは確認している。また、LPSの中和作用なども確認されているので、その他TNF $\alpha$ を抑える作用を示唆されている。

Q:DSS腸炎以外での検討は?

A:ゼプシスのモデルで抗菌ペプチドを投与すると予後は改善するという報告はあるが、臨床応用に至った報告はない。

Q:実際の臨床応用では注射薬ということになるか?そのハードルは?

A:安全性が一番問題となり、IL-8への影響などもあるので、マウスで検討を進めている。

6) プロバイオティクス由来ペプチド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)

- 藤谷幹浩<sup>1</sup>、岡本耕太郎<sup>1</sup>、奈田利恵<sup>1</sup>、上野伸展<sup>1</sup>、盛一健太郎<sup>1</sup>、田邊裕貴<sup>1</sup>、前本篤男<sup>2</sup>、蘆田知史<sup>2</sup>、高後 裕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>旭川医科大学内科学講座消化器血液腫瘍制御内科学分野、<sup>2</sup>旭川医科大学消化管再生修復医学講座)

発表者:藤谷幹浩

[背景・炎症性腸疾患の治療におけるプロバイオティクスの効果]

<過去の文献での報告(メタ解析から)>

⇒母集団によって結果が異なり、効果はについてはまだはっきりしていないのが現状である。

<プロバイオティクスは効果を発揮するには?>

- ・生菌が腸管上皮に生着し、そこに何らかの生理活性物質が作用あるいは直接作用し、初めて効果を有する。問題点として、腸内環境の個体差、腸内細菌叢の個体差、病原菌の影響、薬剤の影響等で生理活性、生着ができない。
- ⇒そこで、プロバイオティクスが産生する有効成分を同定し、作用機序を解明することでより効果的な治療が得られるのではないかとすることで検討した。

[プロバイオティクスに特異的な活性物質の同定]

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



protein 27 を使用

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

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

#### [検討1]

- ・ B. subtilis 菌の培養上清からの活性物質の同定
- ・ 方法 Hsp27 誘導効果を目安にスクリーニング(HPLC、質量分析器、B. subtilis 菌の遺伝子配列)  
⇒活性物質 Competence and sporulation factor (CSF)

#### [CSF は Hsp27, pAkt, p38MAPK を誘導する]

- ・ 科学的に CSF を生成し、Hsp の誘導能をみたところ誘導された。その他の MAPK あるいは Akt の pathway を活性化するかみてみたところ pAkt を誘導し p38 のフォスホリレーションを誘導する。  
⇒host の mammalian の cell ある程度、生理作用を持っているということが解った。

#### [CSF は OCTN2 を介してヒト腸管上皮細胞に取り込まれる]

- ・ FIT-C 標識した CSF では Caco2 cells に incubate すると 15 分後に細胞内へ取り込まれることがわかった。これを OCTN2 の阻害剤で阻害すると取り込みが落ちる。  
⇒OCTN2 の関与が示唆された。

#### [OCTN2 siRNA は CSF の Heat shock protein 誘導作用を打ち消す]

- ・ CSF の Hsp 誘導作用に OCTN2 が関与しているか確かめる目的で OCTN2 siRNA を用いた。Si RNA を incubate していない時は Hsp が誘導されるがトランスフェクションしてやると Hsp の誘導能は落ちることが解った。  
⇒Hsp 誘導作用に OCTN が仲介していることが解った。

#### [CSF は Hsps を誘導能、腸管保護作用の検討方法] -extra vivo-

- ・ C57BL/6 mice より小腸を摘出し、CSF を充填させ RPM 培地にて 2 時間培養する。
- ・ 2 時間後、腸管粘膜からたんぱく質を抽出し、Western Blotting 法にて Hsp25、Hsp70 の発現を調べる。
- ・ 2 時間後、腸管から CFS を除去し、腸管を 2 等分し、NHCL を 0.3nM 注入し、酸化ストレスをかける群と酸化ストレスフリーの群に分け、それぞれ 1μ Ci/ml Mannitol を充填する。
- ・ 15 分後、30 分後の腸管外へ漏出した Mannitol 濃度の想定を行う。

#### [CSF は Hsps を誘導し、酸化ストレスからマウス腸管上皮細胞を保護する]

- ・ CSF は vivo の系においても Hsps を誘導する。
- ・ その誘導はトランスポーターである L-カルニチンにより減弱することから、トランスポーターを介すると考えられる。
- ・ 酸化ストレスの系でも Mannitol の漏出が減弱する。

#### [細菌由来の活性物質 CSF の腸管炎症に対する効果を明らかにする]

・ 材料および方法

動物・・・C57BL/6J マウス

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

検討項目および結果

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

#### [DSS 腸炎モデルに対する CSF の生存期間延長効果]

動物・・・C57BL/6J マウス(オス)6 週齢

・ 方法 4%DSS を経口投与 3 日目から CSF10nM 群と PBS 群に分け、1 日おきに注腸し、生存期間を計測

・ 結果 CSF 投与群が有意に生存率が高い。

[まとめ]

- ・ B. subtilis 由来ペプチド CSF は腸管上皮保護作用を有する。
- ・ この作用は OCTN2 を介して発揮される。

- ・10nM CSF の隔日注腸投与によりマウス DSS 腸炎が改善する。

【新規乳酸菌の死菌による腸管保護活性の検討(preliminary study)】

- ・新規乳酸菌の死菌は caco-2 細胞に HSP27 を誘導する。
  - ・新規乳酸菌の死菌はマウス腸管上皮に Hsp を誘導する。
  - ・新規乳酸菌の死菌は酸化ストレスから腸管組織を保護する。
  - ・新規乳酸菌から生理活性物質を同定する。
- 新規乳酸菌を MRS 培地で培養し、屠体を除去したのち、硫酸沈殿した画分のサンプルの Hsp27 の誘導を測定  
⇒65%飽和硫酸沈殿物に活性を認める

【まとめ】

新規乳酸菌の死菌は

- ・Caco-2<sub>dx</sub> 細胞に HSP27 を誘導する。
- ・C57B6mice 摘出腸管に Hsps を誘導し、酸化ストレスから腸管上皮を保護する。
- ・培養上清中に活性物質が存在する。

<質疑応答>

Q: この新規の乳酸菌はもともとヒトにいるものか?

A: 基本的にはいない、植物性のものである。

Q: 上皮の透過性の亢進を調べているが、HSP だけなのか? タイトジャンクション molecule はどうか?

A: 調べていないが関係していると考えられる。

Q: TH17 細胞ももとおなかの中において、DC と何かの引き金で、悪い作用を示したと考えられるか?

A: 本人の持つ遺伝的な背景が大きく関係しているものと考えられる。

Q: 死菌を使用しているか?

A: もともと摂取しても生着する必要がないことから死菌を使用しているが、活性を得るには死菌では無理であると考えている。

Q: 治療効果とは別に予防効果もあるか?

A: 予防投与についてはあまり良い結果は出ていない。同時投与が一番良かった。

Q: CSF17moler という濃度はどの程度か?

A: 実際の人の便中を測定したデータはないが、マウスの腸管内では1~100mol であり、17mol が適当と考えた。  
トランスポーター自身が IBD に関与していることもあり、ある程度、高濃度に腸管内におくことによって OCTN2 の作用が弱くても細胞内濃度を高まることが良いのではないかと考えている。

7) 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)

- 武田宏司、大川原辰也、桂田武彦、浅香正博 (北海道大学大学院医学研究科消化器内科学)

【マクロファージ遊走阻止因子: MIF について】

- ・MIF は免疫細胞や上皮細胞のみならず、様々な細胞や組織での発現が認められる。

免疫応答では TLR 発現の4に関わっているとの報告もある。

- ・MIF 研究のおもな流れ(1966~2008)

機能がなかなか明らかにならないが、炎症、増殖、アポトーシスなどに関与している。

細胞の外で働いたり、中で働いたり、あるいは受容体が不明確であり研究が進んでいなかった。

最近の報告で受容体の候補がみつき、これをターゲットとした治療が検討されている。

昨年から今年にかけて低酸素応答と低酸素応答によるアポトーシスと MIF の関わりが強いのではないかと Gastro. に腸炎との関係で報告されている。



・MIFと炎症性腸疾患

実験腸炎モデル、ヒト炎症性腸疾患患者においてMIFの過剰発現がある。抗MIF中和抗体の投与により、腸炎の発祥、進展を抑制できる。

MIFトランスジェニックマウスでは実験腸炎が増悪し、MIFノックアウトマウスでは腸炎を発症しない。

・抗MIF療法の治療戦略

MIFの医薬品の可能性としては

◆低分子化合物(tautomerase, ISO-1, CD74, CXCR2, CXCR4)

これらは酵素活性を阻害するという製剤であり、MIFのすべての機能を網羅していないことが問題である。

◆抗体医薬

特許の問題があり、断念している

◆ワクチン

・DNAワクチンを用いて過剰なMIFを減らすことを狙っているが、MIFに対する抗体が出来ることにより、過剰に増えてくるMIFを血液中で中和する。単純にMIFのDNA配列でワクチンを作っても抗体はできないので、T細胞認識されやすい配列を挿入したワクチンを作成。

・敗血症モデルで示されているが、ベクターに比べてこのワクチンはLPSチャレンジによって生存が保持される。

・MIFワクチン投与後の血清抗MIF抗体価の変化

ワクチン接種後、血液中に抗体が産生されることを確認した。

DSS投与7日後の臨床所見 (Disease Activity Index)

【結語】

・MIF Th-epitope DNAワクチンによりDSS腸炎が有意に抑制された。

・ワクチン接種による自己抗体誘導が、低コストかつ抗体医薬における医学的問題を解決しうる可能性が示唆された。

・今後の課題としてはestablished colitisモデルでの治療としての検討、抗MIF自己抗体産生メカニズムの詳細の解明、さらに投与方法を含めたヒトでの試験のデザインや倫理的問題のクリアである。

◆核酸医薬(antisense, siRNA)

DSS腸炎に対するアンチセンスMIFの効果・・・臨床所見、組織学的所見両方に効果あり

LPS刺激後のIL-8の発現、分泌(HSC-2)

LPS刺激後のMIFの発現、分泌(HSC-2)・・・蛋白として増えてくるが、上清中には見られない、細胞の中で増えてくるが、上清中に出てくるわけではない。

MIF発現に対するMIFsiRNAの効果

MIFのメッセージが95%近く落ちる(蛋白レベルでは半分くらい)

MIFのノックダウンがHSC-2細胞のLPS応答性に及ぼす影響

MIFをノックダウンするとMIFが増えたり、分泌されていないにも関わらずIL-8はメッセージが半分くらいに減り、分泌も落ちるといったことがわかった。

これは細胞の中でMIFが働いているのはいないかと想像しているが、過剰になったときは細胞の外で必要になってくるのではないかと考えている。

◆DSS腸炎に対するアンチセンスMIFの効果

・安全性を考慮すると全身投与する場合にアンチセンスが有利と考え、検討

・普通に投与すると壊れてしまうので、キャリアを用いて壊れないようにする方法で検討

アンチセンスオリゴを投与するとdoseによるがある程度の効果は得られる。(組織変化、体重変化、臨床症状)投与方法、投与量の検討がまだまだ必要である。

DSS腸炎という生体にとって異常な時に、MIFが過剰に産生されたり、放出されたりしているのを、

そういうことをブロックすることは生体にとってプロテクティブに働くのではないかと考えている。

<質疑応答>

Q: MIF を制御すると腸炎が改善する。重症膵炎などでも報告されているので、有効なのは間違いないと思うが、方法的には安全性なども考慮すると siRNA ということになるか？

A: siRNA がより現実的ではないかと考える。

◎ 選択的細胞除去・移入療法の開発 (15:05~15:20)

- 8) 制御性 T 細胞分離移入療法の開発：九州大学病院 Cell Processing Center 稼働と倫理委員会承認に向けて  
(研究分担者：中村和彦)
- 中村和彦<sup>1</sup>、隅田頼信<sup>1</sup>、金山兼司<sup>1</sup>、荻野治栄<sup>1</sup>、井星陽一郎<sup>1</sup>、村尾寛之<sup>1</sup>、秋徳裕唯<sup>1</sup>、豊嶋崇徳<sup>2</sup>、赤司浩一<sup>3</sup>、谷憲三朗<sup>3</sup>、高柳涼一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院病態制御内科学、<sup>2</sup>同 病院遺伝子・細胞療法部、<sup>3</sup>同 生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野)

[背景]

- ・ヒトの末梢血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> 制御性 T 細胞は広範囲に免疫反応を制御する制御性 T 細胞 (regulatory T cell:Treg)
- ・IBD を含めた疾患の治療への応用が期待される。又、核内転写因子 FOXP3 を特異的に発現することが知られている。
- ・潰瘍性大腸炎 (UC) に対する血球成分除去療法では、大腸炎を誘導する effector 細胞に加えて、Treg も同時に除去されている。

[血球成分除去・Treg 分離移入療法]

- ・UC に対する血球成分除去療法 (遠心分離法:CFLA) を施行し、除去された白血球より無菌的に Treg を分離し、患者へ輸注する。
- ・臨床応用可能なグレードでの無菌的細胞分離法が必要となってくる。  
⇒そこで我々は、ChiniMACS Cell Selection System を利用した。

[ChiniMACS Cell Selection System について]

- ・Miltenyi Biotec 社の臨床応用を目的とした磁気ビーズによる細胞分離システムで、閉鎖回路内で無菌的に大量の細胞分離が可能で、CD34<sup>+</sup>肝細胞移植などで既にヨーロッパで臨床に用いられている実績がある。
- ・ChiniMACS を用いた CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FOXP3<sup>+</sup>Treg 分離  
高純度に濃縮可能であった。
- ・ChiniMACS 分離 Treg の suppression assay  
CD4<sup>+</sup>細胞と Treg を共培養することにより、CD4<sup>+</sup>細胞の増殖を抑制する。この方法で分離された細胞が Treg の機能を有していることを確認した。

<UC に対する Treg 分離移入療法～ Phase I 臨床試験計画～> 平成20年度 第1回班会議で報告

[高度医療]

- ◆高度医療事前相談 (平成20年8月28日)  
⇒現時点では対象外 (臨床的に使用し、ある程度効果を確認してから検討すべきである。)
- ◆倫理委員会事前相談  
Treg 分離移入療法



- ・患者採択条件：Treg 移入が倫理的に問題ないように再考が必要
- ・費用の課題
- ・補償の問題
- ・細胞の静脈内投与のため厳しい無菌性が必要  
⇒GMPに準拠して細胞療法を行う必要

#### Treg 分離移入療法

[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潰瘍性大腸炎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。

下記の患者を除外する。

- ・直腸炎型の潰瘍性大腸炎患者
- ・重篤なアレルギー疾患の既往
- ・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、授乳中の患者

#### 【費用の問題】

Treg 分離移入療法を実施した時の入院費などは研究費で負担する必要がある、その財源の確保を指摘された。

#### 【補償の問題】

平成21年度から実施される介入試験には補償保険が義務付けられた。

厚生労働省の指針

健康被害が発生した時の補償

⇒介入研究で補償保険への加入が義務付けられる

⇒損保会社と交渉

⇒該当する商品がないとの回答

⇒引き続き交渉「

【細胞の静脈内投与のため厳しい無菌性が必要】⇒GMPに準拠して細胞療法を行う必要

Cell Processing center (CPC)

文部科学省「橋渡し研究支援推進プロジェクト」に「革新的なバイオ医薬工学の医療技術開発拠点」が採択

独自の医療技術に関する研究成果を実用・商品化に継げる「橋渡し研究 (TR)」拠点として採択  
↓プロジェクトの軸

九州大学病院内で Cell Processing center (CPC) が新設 CPC の可動開始予定 (2009年3月～)

GMP に準拠したハイレベルな品質管理基準を満たしており精度の高い細胞分離が可能

CPC を利用に向けて準備の必要性

#### ◆GMP が要求するもの

- ・いかに約束された品質を守るか

- ・組織⇒責任体制

- ・文書化と記録の維持

SOP を作成中

- ・清潔な製造環境

遠心分離式の白血球除去療法は遺伝子細胞療法部 (九大病院の輸血部) にて実施

↓

その後の細胞分離行程はCPC内で行う。

↓

病棟で得られた Treg 濃縮細胞を点滴静注

- ・トレーサビリティ

- ・バリデーション

GMP 施設で SOP に沿って調整した細胞の安全性の確認が必要

#### SOPに沿った分離行程の確認

- ・ChiniMACSの稼働状況
- ・安全操作の確認
- ・細胞洗浄時の状況
- ・細胞の回収率

#### 安全性の確認

- ・純度の確認 ( $CD^{+}CD^{25hi}$ )
- ・分離 Treg 細胞の細胞増殖アッセイ
- ・サイトカインアッセイ
- ・エンドトキシンなどのコンタミネーションを確認

#### 【具体的な準備】

GMP 施設、無菌管理に対する教育訓練

具体的な SOP の作成

UC 患者 2 例、健康人 2 例でバリデーション Study を実施

- ・分離 Treg 細胞の純度
- ・細胞増殖アッセイ、サイトカインアッセイ
- ・エンドトキシンなどのコンタミネーションを確認

GMP 基準での分離した細胞の安全性のデータを得る。

最終的なデータを揃えて倫理委員会に提出



承認後、第1相臨床試験を行う。

#### <質疑応答>

Q: 補償の面について、HGF のケースを紹介すると、HGF は治験であり、治験は損害保険に入ることが義務付けられているという認識であったが、劇症肝炎 (80%が死亡) を対象とすると保険の商品価値が出ないことから、保険に入ることが出来なかった。医師主導治験とはいえ、保険に入らずに治験を進めていた。機構に相談すると保険は義務ではなかった。義務付けられたと書いていると言われたが、真実かどうか。絶対、保険に入らなければならぬことはなく、バックアップをきちんとして補償すれば治験として認めていただいた例がある。補償と賠償は異なると考えている。

企業と交渉するときに、企業側からすると大学の顔が見えないので、損害保険の場合も、病院長などと契約する必要がある。

Q: 有害事象が出たときの入院費はどうするかという問題は出なかったか?

A: 今後、本審査になった場合にそういう問題もでてくると思われる。

#### ◎ バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療 (15:20~15:50)

9) サイ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 (研究分担者: 岡崎和一)

岡崎和一<sup>1</sup>、○深田憲将<sup>1</sup>、西尾彰功<sup>1</sup>、松下光伸<sup>1</sup>、内田一茂<sup>1</sup>、大宮美香<sup>1</sup>、福井朝、

川原聖二<sup>1</sup>、安藤祐吾<sup>1</sup>、廣田育彦<sup>2</sup>、田畑泰彦<sup>3</sup>、仲瀬裕志<sup>4</sup>、千葉 勉<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>関西医科大学内科学第三講座、<sup>2</sup>同 薬剤部、<sup>3</sup>京都大学再生医科学研究所、<sup>4</sup>同 医学研究科消化器内科学)

発表: 深田憲将



### [目的]

- ・サイクロスポリンは潰瘍性大腸炎診療ガイドラインではステロイド抵抗性の重症潰瘍性大腸炎の寛解導入療法として投与することが推奨されている。
- ・しかし、副作用（免疫抑制状態に伴う感染症、肝障害、腎障害、痙攣）の出現が多く、多剤との併用などで、血中濃度が安定しないため、血中濃度をモニターすることが必要であり、管理が煩雑である。
- ・サイクロスポリンの血中濃度を上げることなく、生じている時期に投与することが可能となれば副作用のない治療が可能になると考えられる。そこで、ドラッグデリバリーシステム（DSS）を用いたサイクロスポリンの投与方法について検討した。

### [ポリ乳酸ドマイクロカプセルを用いたラッグデリバリーシステム]

- ・マイクロカプセルの表面電化や大きさを変えることでマクロファージをターゲットに貪食させることが可能であり、卵白アルブミンを封入したマイクロカプセルを用いてアジュバントがなくても経口免疫が可能になることが報告されている。
- ・難治性潰瘍性大腸炎におけるデキサメサゾン封入ポリ乳酸マイクロカプセルの有用性を検討する試験が進行中である。

### [サイクロスポリンの作用機序]

- ・サイクロスポリンはシクロフィリンと結合し、カルシニューリンを阻害することにより IL-2 等のサイトカインの発現を抑制することにより免疫を抑制する。
- ・近年、ICAM1, VCAM1 などによる接着因子の発現を阻害することにより、白血球の遊走を抑制することや MHC Class I, II の抗原提示を阻害することにより、T 細胞の機能を抑制することが報告されている。

### [DSS 腸炎モデルに対する CyA 封入ポリ乳酸マイクロカプセル投与計画]

- ・サイクロスポリンの投与量はガイドラインで推奨されている 2mg/kg と 1/10 量である 0.2mg/kg とした。コントロールとして PDS を投与した群と経口サイクロスポリン製剤をマイクロカプセル投与群と同じ用量で検討を行った。
- ・方法 サイクロスポリン封入マイクロカプセルを作成（粒子の大きさは 5 $\mu$ m 以下）
  - ・1mg のカプセルに 34 $\mu$ g のサイクロスポリンを封入することが可能であり、PDS 中で 24 時間後 50% のサイクロスポリンが徐放された。
  - ・マウスに 2mg/kg の投与を行い血中濃度測定したが、測定感度以下であった。
  - ・以上より血中濃度が上がることなく腸管からの取り込みが可能であると考えられた。
- ・結果
  - ・PDS 投与群と比較して体重改善効果が認められた。
  - ・便の性状は PDS 投与群では 10 日目でもほぼ全例が下痢便状態であったのに対し、マイクロカプセル投与群では一部の症例は軟便であったが普通便となったマウスも認め、スコアリングすると有意差を認めた。
  - ・腸管長はマイクロカプセル投与群で改善傾向を認めたが有意差は認められなかった。
  - ・病理スコアにおいても腸炎改善効果が認められた。大腸をホモジナイズし、組織中のミューロペルオキシダーゼ活性を測定したが、PDS を比較し MPO 活性が抑制されていた。マイクロカプセル投与群は経口剤通常量投与群と同等の DSS 腸炎抑制効果があり、1/10 量投与でも通常投与群と同等の効果を有することが確認された。
  - ・投与後 HE 染色で病理組織を検討
    - ・PDS 投与群では 半数以上の標本で炎症細胞浸潤と間質の浮腫、上皮の脱落が認められた。
    - ・サイクロスポリン封入マイクロカプセル投与群では通常量及び 1/10 投与量群においても炎症細胞浸潤が抑制され、間質の浮腫の改善と上皮細胞の脱落が抑制されることが確認された。
  - ・ミエロペルオキシダーゼ活性（MPO 活性）
    - ・サイクロスポリン投与群で有意差を持って改善傾向が認められた。但し、水溶液投与群との有意差はなかった。

【結語】

- ・シクロスポリン含有ポリ乳酸マイクロカプセルの投与は血中濃度を上げることなくDSS腸炎の改善が認められた。

<質疑応答>

- Q: 実用化すれば臨床的にインパクトのある検討であるが、シクロスポリンはT細胞に作用し、IL-2の産生を抑えるというのがメインの機序と考えていたが、このマイクロカプセルを用いたDDSではシクロスポリンは主にマクロファージに取り込まれると考えるが、効果を発現する機序的にはどのように考えるか？全身投与と異なるか？
- A: そこははっきりわからないところであるが、ICAM1などによる接着因子の発現を阻害することにより、白血球の遊走を抑制することなどが関与しているのかと考えている。またマクロファージに取り込まれた後、局所で再度、シクロスポリンを誘導しているということも考えている。
- Q: T細胞がないマウスでもDSSを飲ませると腸炎が起きるので、自然免疫系だけでも腸炎が起き、Tcellがいることによってさらに腸炎が増悪していることが考えられる。この研究はTcellのfactorのところを抑えられていると考えられるので、腸炎モデルをTcell dependentなものに変えて検討してはどうか？
- A: 貴重な意見である。

10) 難治性炎症性腸疾患に対するステロイドを用いたドラッグデリバリーシステム治療の臨床試験

(研究分担者：岡崎和一)

岡崎和一、○松下光伸、西尾彰功、内田一茂、大宮美香、福井真樹、川股聖二、安藤祐吾、深田憲将 (関西医科大学内科学第三講座)

I. 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

【潰瘍性大腸炎細胞標的とした経口ドラッグデリバリーシステムの開発研究】

- ・高分子バイオマテリアルのポリ乳酸 (生体内で $H_2O$ と $CO_2$ で分解) を用いたステロイド封入マイクロカプセルの開発 生体内にとって無害
- ・マイクロカプセルの大きさ次第の結果、 $4\mu m$ 未満の免疫系細胞が最も積極的に貪食されて、その中で溶解してその機能を抑制することを報告してきた。
- ・血中の動向では、通常投与するとステロイドは1時間をピークに上昇するが、マイクロカプセルを投与することによって血中濃度は急激に上昇し、したがって、より副作用の少ない薬剤と言える。

【研究計画と目的】

・研究計画

腸管免疫細胞による免疫系細胞標的としたドラッグデリバリーシステムによる難治性潰瘍性大腸炎患者治療

(関西医科大学附属病院が臨床試験審査委員会承認 関西医科大学附属病院承認番号 第40611号)

・目的

難治性潰瘍性大腸炎患者におけるデキサメサゾン封入ポリ乳酸マイクロカプセル (DxMC) の有用性を検討する。  
院内製剤で冷所保存

【対象】

難治性潰瘍性大腸炎患者

- ・ステロイド抵抗例  
プレドニゾン $1-1.5mg/kg/day$ の1-2週間投与で効果なし