

200834004B

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18～20年度 総合研究報告書

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 18～20 年度 総合研究報告書

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 α 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。3 年間の研究期間中、5 つの研究プロジェクト目標をあげ、発表英文論文は 98 編におよび、うちインパクトファクター 5 以上の国際的な一流雑誌に 26 編、炎症性腸疾患の専門雑誌に 11 編を含む英文論文 37 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 14 件の特許が取得あるいは申請中であり、9 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】	11
1. 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立（渡辺 守）	11
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）	15
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）	19
【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）	22
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）	28
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）	30
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）	36
【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細胞分離移入療法の開発（中村和彦）	45
【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】	
9. 薬剤封入マイクロカプセ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 に対する新しい治療の検討（岡崎和一）	52
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（岡崎和一）	57
【新しいコンセプトによる治療法開発】	
11. 新しいストラテジー(L-histidine, cAMP elevating agent)による炎症性腸疾患治療 （日比紀文）	62
12. 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）	67
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	75
V. 学会発表に関する一覧表	91
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	107
VII. 社会活動報告	109
VIII. 研究事業報告	113
IX. 研究成果の刊行物・別刷	177

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 ibdtx@hirakata.kmu.ac.jp	講 師

II. 總括研究報告

炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究

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）の局所投与により安全性と有効性が確認されたことから、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蛋白発現を増強するGSK-3β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。さらに、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 ζ を同定するとともに、腸管粘膜内のCD70^{high} CD11c^{low} 樹状細胞が、腸内細菌由来のATPにより、Th17細胞を誘導し腸管炎症にも関わることを見出した。また、 α -デフェンシンであるHD5のrecombinantペプチド、プロバイオティクス由来の新規活性ペプチドCSF、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の技術が確立され、器材の承認がされ次第、臨床応用の開始する予定である。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、ならび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進行中である。5) では、Crohn病を対象にヒスチジン単独投与ならびにPphosphodiesterase4阻害剤の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 潔	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

1. 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、繰り返す入院やときに手術を余儀なくされることなど、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。すなわち、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

皮の再生不全」の両者が深く関わる新しい考え方にに基づき、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-I~V)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-I: 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-II: 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発

P-III: 選択的細胞除去療法の開発

P-IV: 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立

P-V: 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

2. 研究方法

P-I: 上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立 (渡辺、岡崎、坪内、鈴木)

A) 腸上皮細胞の分化・再生機構の分子生物学的解析と標的分子に対する大腸炎モデル動物における検討 (渡辺):

炎症性腸疾患患者の内視鏡生検検体、手術切除検体を用いた、大腸上皮組織でのNotchシグナル関連分子やHath-1/Hes-1分子の発現パターンを解析する。吸収上皮、杯細胞、神経内分泌細胞各系列細胞の局在との関連を解析する。培養細胞を用いたシグナル伝達や強制発現制御システムによる分子機能を解析する。マウス腸炎モデルを用いた標的分子に対するNotch阻害剤やGSK3阻害剤による影響を解析する。

B) 自己脂肪組織由来幹細胞移入療法の開発 (岡崎):

ラット皮下脂肪組織由来幹細胞の分化能の検討と脂肪組織由来幹細胞の粘膜下局所注入法による腸炎モデルラットの腸管粘膜再生促進効果を検討する。

C) 潰瘍性大腸炎に対する組換えヒトHGFの臨床応用 (坪内):

C-1) 組換えヒトHGFの非臨床試験:

組換えヒトHGF注腸投与の薬物動態組、薬効薬理

試験、大腸発癌モデルに及ぼす影響を検討する。

C-2) 組換えヒトHGFの医師主導治験:

組換えヒトHGFはすでに劇症肝炎患者に対する第I/II相臨床試験を開始しており、rh-HGFの安全性が確認されれば、GMP製剤化のもと医師主導の臨床治験を予定する。

D) 生理活性物質の内視鏡下粘膜注入療法による新規治療法の開発 (鈴木):

ヒト組み換えHGFおよび新規線維化抑制核酸医薬品(STNM-01)の内視鏡直視下注入療法の効果について動物モデルを用いて検討する。

P-II. 腸管粘膜免疫の特殊性解明に基づく免疫制御療法の確立 (竹田、高後、岡崎、千葉)

E) Toll-likeレセプター(TLR)を介する自然免疫系作動によるIBD発症機構およびTh17細胞の分化誘導機構の解明と治療標的探索 (竹田):

TLRを介するIBD発症機構の解明と、実際にヒトIBDに関わるTLRリガンドの同定をおこなう。また、これらシグナル伝達経路においてIBDの新規治療標的となりうるTLR関連分子探索を目指す。Th17細胞の分化機構を解明する。

F) 自然免疫制御による新規治療法の開発 (高後、浅香、岡崎、千葉):

F-1) 抗菌ペプチド(recombinant HD-5)、新規プロバイオティクス産生ペプチドを用いた治療法開発 (高後):

活性型 α -デフェンシンであるrHD-5の作成と生物活性の検討を行い、マウスDSS腸炎モデルに対する治療効果を検討する。さらに発見されたプロバイオティクスであるB. subtilis菌の産生する新規ペプチドの同定および機能解析とDSS腸炎に対する抗炎症効果を検討する。

F-2) MIFの制御による炎症性腸疾患の新規治療法の開発 (浅香):

炎症性腸疾患に対するMIFの役割解析し、MIFに対するDNAワクチン(MIFThエピトープDNAワクチン)を開発する。MIFワクチン接種によるマウスDSS腸炎発症に及ぼす効果を検討する。

F-3) 遺伝子組み換えチオレドキシシンを用いた新規治療法の開発 (岡崎):

レドックス制御に重要なチオレドキシシン(TRX)の治療への有用性につきコンビナントヒトTRX(rhTRX)を用いてdextran sulfate sodium(DSS)投与による急性腸炎モデルにおけるTRXの腸炎抑制効果を検討する。

F-4) CXCL12・CXCR4系の制御による炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発 (千葉):

ヒト炎症性腸疾患のT細胞におけるCXCR4の発現とDSS腸炎におけるCXCR4拮抗剤(TN14003)の治療効果の検討を行う。

P-III: 選択的細胞除去療法の開発 (中村)

G) 自己 CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺制御性 T 細胞の移入によるヒト潰瘍性大腸炎に対する新規治療法の開発:

潰瘍性大腸炎患者に対する遠心分離式血球成分除去療法にて分離された白血球より、Miltenyi Biotec 社製 ClinMACS 細胞分離システムを用いて、臨床応用可能なグレードで制御性 T 細胞分画を分離・解析する。

P-IV: 腸管免疫調節機構・上皮再生能の正常化を目指す分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立 (岡崎)

H) 新規生体分解性マイクロカプセルの開発:

H-1) ヒト遺伝子組み換えチオレドキシシン (TRX) 封入ゼラチンマイクロカプセルの開発:
レドックス制御を目指し、r-TRX の治療への有用性につきドラッグデリバリーシステムの開発と DSS 腸炎モデルを用いた動物実験を行う。

H-2) サイクロスポリン封入ポリ-L-D 乳酸マイクロカプセルの開発:

I) ステロイド含有ドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患の臨床試験:

I-1) 経口・腸管デリバリーシステムを用いた難治性潰瘍性大腸炎に対する Phase-I/II 臨床試験:
ラットを用いた慢性毒性実験により、安全性について確認後、所属施設の倫理委員会の承認を得て開始する。

I-2) リポ化ステロイドを用いたドラッグデリバリー療法の多施設共同臨床研究:
主任研究者・分担研究者の学内倫理審査委員会承認後、開始する。

P-V: 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 (日比)

J) Crohn 病に対する成分栄養療法 (Elementary diet; ED) の有効性

K) 活性酸素の産生制御による新規治療法の開発:
PDE-4 (phospho-di-esterase) 阻害物質である OPC-6535 のヒト免疫細胞のサイトカイン産生に対する効果とマウス炎症性腸疾患における OPC-6535 の炎症抑制効果を検討する。

(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にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研

究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。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ふ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。

3. 研究結果及び考察

本研究の成果をプロジェクトごとに報告するが、詳細は各分担研究者による総合報告書にて報告する。

P-I: 上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立

A) 腸上皮細胞の分化・再生機構の分子生物学的解析 (渡辺):

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。さらに、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ただけでなく、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。標的分子に対する大腸炎モデル動物における検討では、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できれば実用化は可能と思われる。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、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を確立したものと考えられる。

「白血球除去療法 (LCAP) の腸管上皮再生に与える影響に関する研究」「潰瘍性大腸炎における顆粒球除去療法 (GCAP) の腸管上皮再生に与える影響に関する研究」として倫理委員会承認済みである。

B) 自己脂肪組織由来幹細胞移入療法の開発 (岡崎):

脂肪組織由来幹細胞は多系統の成熟細胞へと分化し、大量の HGF, VEGF および adiponectin の産生とその作用により腸粘膜の再生を促進し、臨床応用が可能であることが示された。「炎症性腸疾患患者における皮下脂肪組織由来幹細胞を用いた腸粘

膜再生の検討」に対して学内倫理委員会の承認を得、ヒト皮下脂肪由来幹細胞の解析を開始した。C)潰瘍性大腸炎に対する組換えヒト HGF の臨床応用 (坪内) :

C-1) 組換えヒト HGF の非臨床試験 :

注腸投与では血中濃度の上昇はなく、DSS 腸炎 TNBS 腸炎、いずれにおいてもその粘膜修復を促進して大腸炎を改善した。大腸発癌モデルでは組換えヒト HGF は癌の発生を抑制した。

C-2) 組換えヒト HGF の医師主導治験 :

組換えヒト HGF の人体への臨床応用としては、既に劇症肝炎を対象とした第 I/II 相試験を医師主導治験の枠組みで開始しており、本臨床試験において組換えヒト HGF 反復静注による安全性を検証した。潰瘍性大腸炎を対象とした臨床試験を実施すべく、プロトコール委員会を組織しプロトコールを作成した。

P-II: 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発

D) Toll-like レセプター (TLR) を介する自然免疫系作動による IBD 発症機構および Th17 細胞の分化誘導機構の解明と治療標的探索 (竹田) :

TLR を介した NF- κ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子が存在し、遅期誘導型遺伝子の発現を核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が抑制することを見出した。さらに、早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子のプロモーターの違いは、クロマチン構造の開閉に関連し、遺伝子発現における時間差の原因となることを明らかにした。さらに、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 I κ Bzeta が関わることを明らかにした。

腸管粘膜固有層での Th17 細胞の分化誘導を司る樹状細胞として、腸管粘膜固有層に特有の CD70 陽性 CD11b 陽性樹状細胞を同定した。この樹状細胞とナイーブ T 細胞を共培養すると、Th17 細胞が誘導された。さらにこの樹状細胞を活性化因子を解析した結果、腸内細菌由来の ATP (アデノシン 3 リン酸) が、Th17 細胞分化誘導に関わっていることを明らかにした。さらに、ATP 投与による Th17 細胞分化の誘導は、SCID マウスへのナイーブ T 細胞移入による腸炎誘発モデルを増悪させることも見出した。このように、腸管粘膜においては、腸内細菌由来の ATP が腸管特有の樹状細胞に作用し、Th17 細胞分化を司っていることが明らかになった。

E) 自然免疫制御による新規治療法の開発 :

E-1) 抗菌ペプチド (recombinant HD-5)、プロバイオティクス産生ペプチドを用いた治療法開発 (高後) :

独自の小腸陰窩単離技術を用い、クローン病患者の活動性病変の Paneth 細胞での α -デフェンシン

の低下により、細菌曝露による殺菌活性放出が有意に低下することを明らかにし、自然免疫機能の制御が有効な炎症性腸疾患治療法となりうる可能性を提示した。さらに活性型 α -デフェンシンである HD5 の recombinant ペプチドを用いて、DSS 腸炎モデルマウスにおいての有効性を認め、治療への応用の可能性を示唆した。また、プロバイオティクスの培養液から、腸管保護作用のあるペプチドである competence and sporulation factor (CSF; ERGMT, 直鎖状配列) を発見し、細胞膜トランスポーター、OCTN を介して上皮細胞内に取り込まれ作用を発揮することを明らかにした。さらにマウス DSS 腸炎において CSF による抗炎症効果を確認し、新規治療法の可能性が示唆された。

E-2) MIF の制御による炎症性腸疾患の新規治療法の開発 (浅香) :

MIF に対する DNA ワクチン (MIFTh エピトープ DNA ワクチン) を開発し、DSS 腸炎の発症を有意に抑制し、MIFTh 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。

E-3) 遺伝子組み換えチオレドキシシンを用いた新規治療法の開発 (岡崎) :

レドックス制御に重要なチオレドキシシン (TRX) がマウス DSS 腸炎発症の抑制することを明らかにし、チオレドキシシン投与によるレドックス制御による炎症性腸疾患の治療法開発の可能性を示唆した。

E-4) CXCL12・CXCR4 系の制御による炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発 (千葉) :

炎症性腸患者の T 細胞では活動性と CXCR4 の発現に関連性を認めた。DSS 腸炎モデルにおいても CXCR4 拮抗剤 (TN14003) の治療効果を認め、CXCL12・CXCR4 系の制御は炎症性腸疾患患者の新しい治療法となりうる可能性を示唆した。「潰瘍性大腸炎の白血球除去療法 (LCAP 療法) におけるケモカインレセプター (CXCR4) による治療効果予測の検討」として倫理委員会承認済みである。

P-III: 選択的細胞除去療法の開発

G) 自己 CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺制御性 T 細胞の移入によるヒト潰瘍性大腸炎に対する新規治療法の開発 (中村) :

CliniMACS で分離した制御性 T 細胞は、*in vitro* で培養増殖することが可能であり、培養後も制御性 T 細胞マーカーの発現と機能は保持されていた。また、*in vitro* で非制御性 T 細胞から TGF- β 1 存在下に制御性 T 細胞を誘導した。以上より、血球成分除去療法産物から臨床応用可能なグレードで大量に機能を保持した制御性 T 細胞が分離可能であった。分離に用いた試薬、回路、バッファーは全てヨーロッパで既に CE を取得しており、潰瘍性大腸炎患者に対して血球成分除去療法との組み合わせ

わせた、制御性T細胞分離移入療法が施行可能となり、「潰瘍性大腸炎患者末梢血制御性T細胞の免疫制御機能の研究」の倫理委員会承認済みである。

P-IV: 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立 (岡崎)

H) 新規生体分解性マイクロカプセルの開発:

H-1) r-TRX 封入ゼラチンマイクロカプセルの開発: r-TRX ゼラチンマイクロカプセルによるドラッグデリバリーシステムを作成し、DSS マウス腸炎での治療効果を認め、新規治療の可能性が示唆された。

H-2) CyA封入ポリ-L-D乳酸マイクロカプセルの開発: CyA封入ポリ-L-D乳酸マイクロカプセルを作成し、DSS マウス腸炎での治療効果を認めるとともに、血中濃度 CyA は検出せず、トランプ値のモニター不要の治療システム構築の可能性が示唆された。

I) ステロイド含有ドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患の臨床試験:

I-1) 経口・腸管デリバリーシステム: ラットを用いた慢性毒性実験により、安全性について確認後、「腸管M細胞および免疫担当細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患治療」に対する所属施設の倫理委員会の承認を得て開始し、Phase-I による安全性試験は終了し、Phase-II が進行中である。登録対象症例の75%に有効性を認めたが、副作用は認められなかった。

I-2) 「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立群間試験」: 主任研究者・分担研究者の学内倫理審査委員会承認後、試験の進行中である。潰瘍性大腸炎と腸管ペーチェット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。

P-V: 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

J) Crohn 病に対する成分栄養療法 (Elementary diet; ED) の有効性 (日比)

ED 中に含まれるアミノ酸成分が直接的に腸炎抑制効果を示すことをマウス腸炎モデルで明らかにし、さらにその中でもヒスチジンの単独投与が単球やマクロファージからの炎症性サイトカインの産生を抑制することで腸炎抑制効果を発揮することを明らかにし、その作用機序は新たな創薬のターゲットとなりうる可能性を示唆した。「炎症性腸疾患患者血漿アミノ酸プロファイルを用いた臨床マーカーの確立—多施設共同研究—」として倫理委員会承認済みである。

K) 活性酸素の産生制御による新規治療法の開発 (日比)

ヒトT細胞だけでなく、NK細胞のサイトカイン産生を抑制するとともに、クローン病モデルマウス炎症性腸疾患においてもPDE-4阻害物質(OPC-6535)の炎症抑制効果をもとめ、クローン病に対する新規治療薬としての可能性をもつことが示された。

4. 評価

1) 達成度について

P-I: 上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法確立 (渡辺、岡崎、坪内、鈴木)

A) 腸上皮細胞の分化・再生機構の分子生物学的解析と標的分子に対する大腸炎モデル動物における検討 (渡辺):

本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができた。臨床情報に基づいた思考過程によって得られた基礎的データから新たな治療法への可能性を示すことができ、画期的治療法が確立できるものと考えられる。よって本研究の達成度は高いと思われる。

B) 自己脂肪組織由来幹細胞移入療法の開発 (岡崎):

本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができた。新たな治療法への可能性を示すことができ、画期的治療法が確立できるものと考えられる。よって本研究の達成度は高いと思われる。

C) 潰瘍性大腸炎に対する組換えヒトHGFの臨床応用 (坪内):

組換えヒトHGFの医薬品化を進め、炎症性腸疾患に対する注腸投与の薬効および薬物動態(全身への安全性)を確認した。また発癌性についても再検証を行い、むしろ発癌抑制に作用することを証明した。一方、先行する劇症肝炎に対する第I/II相試験において組換えヒトHGF静注投与における安全性を確立でき、達成度は高いと思われる。

D) 生理活性物質の内視鏡下粘膜注療法による新規治療法の開発 (鈴木):

抗線維化作用を有する新規核酸医薬品STNM-01を開発し、急性および慢性実験腸炎を用いた治療実験によりその治療効果と作用機序の解析を行った。当初予定した内容をほぼ予定通り達成することができた。

P-II. 腸管粘膜免疫の特殊性解明に基づく免疫制御療法確立 (竹田、高後、岡崎、千葉)

E) Toll-like レセプター (TLR) を介する自然免疫系作動によるIBD発症機構およびTh17細胞の分化誘導機構の解明と治療標的探索 (竹田):

自然免疫系の活性制御による炎症性腸疾患の治療法の開発に向けて、基礎的研究成果を順調に出して来ている。

F) 自然免疫制御による新規治療法の開発 (高後、浅香、岡崎、千葉):

F-1) 抗菌ペプチド (recombinant HD-5)、新規プロバイオティクス産生ペプチドを用いた治療法開発 (高後):

大腸菌の蛋白発現システムを利用して、リコンビナント蛋白の生成と精製に成功した。その蛋白を利用して様々な活性の検討を行い、マウスモデルに対しての治療効果を証明し得た。また、CSF がマウス腸炎モデルの腸管障害を改善すること、その作用機序としてケモカイン CXCL-1 の発現抑制を介していることが証明された。これらの成果から、本研究の目的はおおむね達成されたものと考えられる。

F-2) MIF の制御による炎症性腸疾患の新規治療法の開発 (浅香):

本研究でもちいた MIFTh エピトープ DNA ワクチンは、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、Th エピトープを有する変異 MIF 蛋白に対する抗体が効率よく産生されること、またこの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ることを明らかにし、概ね達成された。

F-3) 遺伝子組み換えチオレドキシシンを用いた新規治療法の開発 (岡崎):

レドックス制御に重要な TRX の治療への有用性につき rhTRX を用いて腸炎モデルでの有効性を認めるとともに国際的にも報告したので研究の達成度は高いと思われる。

F-4) CXCL12・CXCR4 系の制御による炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発 (千葉):

CXCL12・CXCR4 系の炎症性腸疾患における臨床および基礎的な解析を行い、さらに国際的にも報告しえたことから、研究の達成度は高いと思われる。

P-III: 選択的細胞除去療法の開発 (中村)

G) 自己 CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺制御性 T 細胞の移入: 制御性 T 細胞分離移入療法が施行可能である事を示し、現在、臨床試験プロトコルを倫理委員会提出のために準備中である。臨床試験施行間近であり、達成度は高いと考えられる。

P-IV: 腸管免疫調節機構・上皮再生能の正常化を目指した分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立 (岡崎)

H) 新規生体分解性マイクロカプセルの開発: 本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができ、投稿中である。新たな治療法への可能性を示すことができ、画期的治療法が確立できるものと考えられ、本研究の達成度は高いと思われる。

I) ステロイド含有ドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患の臨床試験:

本研究の目的に沿って研究計画を遂行しているが、十分な結果を示すためには更に症例数の蓄積が必

要と思われる。しかし、現時点での登録症例の解析では治療効果は良好と考えられ、新たな治療法への可能性を示すことができ、画期的治療法が確立できる目途はついたものと考えられる。

P-V: 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 (日比)

活性酸素の産生制御による新規治療法によるクローン病での治療の方向性が示され、当初の研究計画はほぼ達成したと思われる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

P-I: 上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法確立

腸上皮細胞の分化・再生機構の解析結果は、炎症性腸疾患の病因解析の新たな知見から治療ターゲットとしての可能性を示した。また、世界で GMP レベルの組換えヒト HGF を保有し、「試験」の枠組みでその臨床応用を推進しているのは本分担研究者のみであり、そこに本研究の独自性がある。さらに、自己脂肪組織由来幹細胞移入療法、抗線維化を標的とした新規治療は再生医療への可能性を示し、これまで抗炎症、免疫抑制に主眼のおかれた治療が行われてきた炎症性腸疾患において傷害粘膜の再生・修復促進を目的とした新たな治療法となることが期待される。

いずれも学術的にも高く評価され、多くはインパクトの高い海外学術雑誌に多数掲載されたことより国際的評価も高いと考えられる。

P-II: 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、炎症性腸疾患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。また、ATP による Th17 細胞の分化誘導機構の解明は、新聞でも「潰瘍性大腸炎の発症機構の解明」として報道されており、社会的インパクトも大きいと考えられる。近年注目されている抗菌ペプチドについては世界ではじめて動物実験に対する有効性を証明したことにより、抗菌ペプチドの大量精製から臨床試験への先進医療の礎となる研究成果を得た。また、炎症性腸疾患における T 細胞 CXCR4 の発現の重要性と CXCR4 拮抗剤を用いた CXCL12・CXCR4 系制御が炎症性腸疾患治療に有用であることを世界で始めて示した。これらの研究成果は、Immunity, J. Biol. Chem., Nature など国際一流雑誌に掲載されており、その学術的、国際的意義は大きい。

P-III: 選択的細胞除去療法の開発

制御性 T 細胞は多くの疾患モデルで強く炎症性疾

患を抑制するため、炎症性腸疾患をふくめた疾患の治療への応用が期待され、「制御性T細胞移入療法」の考えは、すでに臨床応用がされている血球除去療法の改変型として位置づけられる。しかし、実際に制御性T細胞を用いた臨床試験は、移植片対宿主病に対するものが欧州で行われているに過ぎないため、炎症性腸疾患への臨床応用を目指した本研究の結果は学術的に重要である。また、潰瘍性大腸炎患者には既存の治療が奏効しない難治例も多く、本研究により、より効果的な新規治療法が開発されれば、社会的意義も高いと考えられる。

P-IV: 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立

長期治療を余儀なくされる炎症性腸疾患では、薬剤の選択的効果に加え、副作用を抑制することは臨床で極めて重要である。生体分解性マイクロカプセルを用いたドラッグデリバリーシステムの開発は国際的にもきわめて斬新である。その有効性と安全性に関しては、動物モデルでは証明されるとともに、臨床的にも安全性と有効症例を認めており、社会的にも意義のあるものと思われる。

P-V: 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

PDE4 阻害剤である OPC-6535 の腸炎抑制機序がサイトカイン産生調節作用であることが明らかとなり、Inflammatory Bowel Disease 誌への掲載予定である。さらにNK細胞に対しても OPC-6535 が炎症抑制効果を示すことからクローン病に対する新規治療薬としての可能性を示唆し、国際的な臨床試験が行われていることも併せて本邦から発信する新治療薬として国際的にも評価されている。

3) 今後の展望について

P-I: 上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立

既に製剤化されている炭酸リチウムが GSK3 阻害剤として腸管上皮細胞再生に有効であるとの細胞レベルの基礎的な結果からさらに動物モデルにおける投与段階にまで進んでいるため、今後動物モデルにおける有効性が確認されれば、ヒトへの応用は比較的早いことが期待される。

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、これらに比して安全かつ大量に採取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞を粘膜下に局所注入する腸粘膜再生療法の有効性がモデル動物で明らかにされたことより、ヒト皮下脂肪幹細胞の臨床応用が期待される。

組換えヒト HGF 注腸投与の安全性、および大腸

発癌モデルにおいて組換えヒト HGF が発癌抑制に作用することが証明されたことより、難治性の潰瘍性大腸炎を対象とした第 I/II 相臨床試験のプロトコルを作成し、臨床試験を開始する予定である。

線維化阻害核酸薬 STNM-01 の投与方法に関する基礎的研究を進め、安全性を確認した上で、臨床試験を早期に開始するよう研究を進める予定である。

P-II: 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発

炎症性腸疾患における TLR をはじめとした自然免疫系の役割について引き続き基礎的研究成果の蓄積に努めて行く。

抗菌ペプチド (r-HD-5)、新規プロバイオティクス産生ペプチド CSF を用いた治療法では、リコンビナント蛋白の安定供給のための蛋白生成系の大量生成システムの確立と、高グレードの薬剤の供給経路を作成する。同時に、他の動物モデルに対しての治療効果を検討するとともに、薬剤の安全性を確認し、臨床応用の準備段階へ進める。

MIFTh エピトープ DNA ワクチンの開発では、ワクチン投与マウスでは、腸炎発症が有意に抑制され、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、今後臨床応用の準備段階へ進める。

レドックス制御に重要なチオレドキシシン (TRX) が動物モデルの治療により、その有用性が証明されたので、臨床応用を目指して、製薬企業と GMP レベルでの rhTRX の大量生成を計画中である。

CXCR4 拮抗剤 (TN14003) は京都大学薬学部と共同で、ヒト炎症性疾患に対する臨床応用を計画中である。

P-III: 選択的細胞除去療法の開発

倫理委員会承認後に制御性T細胞分離移入療法の第1相臨床試験を施行する予定である。また、GMPに準拠した制御性T細胞の培養法、誘導法を確立する予定である。

P-IV: 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法確立

新規に開発された CysA や rhTRX 生体分解性マイクロカプセルは動物モデルでの有効性が証明されたので、長期投与による安全性を確認後、ヒトへの臨床応用を開始する予定である。

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難治性炎症性腸疾患の臨床試験では、ヒトに対する安全性が確認できたので、引き続き、適用症例の蓄積に努めて行く。

P-V: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

OPC-6535 は炎症性サイトカインの産生抑制ならびに抗炎症性サイトカインの産生増強効果を併せ持つことが明らかにされたので、今後、ヒト炎症性腸疾患、特にクローン病において有効性を検討する予定である。

4) 研究内容の効率性について

P-I: 上皮細胞の再生のための分子療法、細胞移植療法の確立

A) 当初たてた目標を着実に遂行できており一定の効率性は挙げられたが、GSK3 阻害剤である LiCl を用いた動物モデルでの有効性の確認に時間がかかっている。しかし既存の薬剤であることから臨床応用への効率性は向上することが予想される。

B) 当初たてた目標を着実に遂行できており、今後は倫理委員会での承認後、ヒトへの臨床応用への効率性は向上することが予想される。

C) 組換えヒト HGF の非臨床試験を行い、臨床試験に向けた準備を進めている。劇症肝炎を対象とした臨床試験成績の解析が終了し、組換えヒト HGF の安全性が確認されたことから、今後炎症性腸疾患への臨床応用が効率的に推進されることが期待される。

D) 新規核酸医薬品の STNM-01 の開発と動物実験による有効性の確認は効率よく達成されたと考えられる。今後は臨床試験を開始するために更に効率のよい研究が必要と考えられる。

P-II: 腸管特異的免疫調節機構を標的とした治療法の開発

E) 当初たてた目標を着実に遂行できており、今後も自然免疫系の活性制御による炎症性腸疾患の治療法の開発に向けて、効率よく基礎的研究を継続する。

F-1) リコンビナント蛋白の精製条件が確立され、比較的兼価で蛋白製剤が作成できる。精製のプロセスは現段階では二段階で時間が必要だが、マススペクトロメトリーでは高純度な蛋白が得られ、今後産学連携により効率性の改善が期待できる。

F-2) MIF^{hi} 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いため、今後の効率的な臨床応用が期待される。

F-3) 当初たてた目標を着実に遂行でき、よく研究が遂行された。今後、産学連携にて GMP レベルでの rhTRX の生産ができれば、さらに効率化が進むと考えられる。

F-4) 当初たてた目標を着実に遂行できており炎症性腸疾患における CXCL12・CXCR4 系の重要性を解明した点から、研究内容の効率はきわめて高い

と考えられる。

P-III: 選択的細胞除去療法の開発

G) 血球成分除去・制御性 T 細胞分離移入療法を考案し、施行のために必要な無菌的大量細胞分離法を確立、臨床試験間近の状態まで進んでおり、研究は効率よく進行していると考えられる。

P-IV: 分子・細胞デリバリーシステムを用いた治療法の確立

H) CysA, rhTRX 含有の新規生体分解性マイクロカプセルの開発は当初の計画をほぼ遂行することができ、効率よく研究が遂行できた。

I) ステロイド含有ドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患の臨床試験では、適応症例の制限が厳しく、登録症例は当初たてた目標には達していないが、ドラッグデリバリーシステムの有効性と安全性については一定の成果が挙げられた。リポ化ステロイドに関しては既存の薬剤であることから臨床応用への効率性は向上することが予想される。

P-V: 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

本研究は患者検体を用いた解析、腸炎モデル動物を用いた実験を連携・並行して実施し、効率的に腸炎抑制機序の解明が行われたと考えられる。

5. 結論

研究代表者および分担研究者の協調的研究体制により、早期の臨床応用を目指した成果が確実に挙げられている。今後も、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

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
総合研究報告書

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。さらに、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

土屋輝一郎 岡本隆一 永石宇司 中村哲也
金井隆典

所属

東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

確立と治療応用への開発を目標とし、1) 炎症性腸疾患における上皮細胞分化制御破綻機構の解明、2) 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、3) 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行い、最終的には Notch, Wnt シグナルクロストークによる腸管分化制御機構の解明することを目的とした。

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（Nature 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を明らかにし（Gastroenterology 2005）、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

B. 研究方法

1) 炎症性腸疾患患者の内視鏡生検体および手術切除検体を用い、上皮細胞の細胞構成成分、細胞増殖、シグナル伝達異常などを解析し上皮細胞分化異常機構を解析した。
2) Notch シグナルの影響を解明するために、腸管上皮由来細胞株に Notch レセプター細胞内ドメインを誘導発現させる系を構築し Notch シグナル刺激による上皮細胞形質変化を解析した。また Notch 阻害剤を培養細胞株に添加し細胞形質を解析した。また個体レベルでの評価のためマウスに 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。
3) 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。大腸癌由来細胞株に APC 遺伝子を導入し Wnt シグナルを抑制し、Hath1 蛋白発現および

細胞形質変化を解析した。また GSK3 阻害剤を用い、Hath1 蛋白安定化による分化制御機構を解析した。さらに GSK3 阻害薬ですでに製剤化されている炭酸リチウムをマウスに投与し安全性の確認および腸管上皮細胞への影響を解析した。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1) 倫理審査委員会で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にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研究目的のみ検体を使用し、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。動物実験に関しては、当施設の動物実験ガイドラインに準拠して、動物実験委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果及び考察

1) 炎症性腸疾患における上皮細胞分化制御破綻機構の解明

杯細胞消失、パネート細胞化生など分化形質制御の異常を呈する慢性大腸炎病変部に一致して、Notch シグナル構成分子の異常発現が局在することを見出した。正常マウスでの Notch 阻害剤処理では杯細胞の増加を認め、Notch シグナルの抑制により分化誘導が可能であることを解明した。しかし腸炎モデルマウスでは Notch 阻害剤投与にて逆に腸炎の増悪を認め、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) 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

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。腸管上皮細胞株に Notch 細胞内ドメインを強制発現させ、形質を確認したところ杯細胞形質の減少、パネート細胞形質増加を認め、潰瘍性大腸炎の病変部と同様の現象を Notch シグナルのみで再現させることができた。以上より潰瘍性大腸炎の杯細胞減少、パネート細胞過形成は Notch シグナルの亢進によるものと証明できた。

3) 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

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ン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)。以上より厳密な 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 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マウスモデルでの効果が確認されれば実用化は可能と思われる。

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。今後細胞レベル、マウスモデルを用いた阻害剤の有効性、安全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

- 岡本隆一、土屋輝一郎、渡辺 守: 特集 潰瘍性大腸炎・クローン病診療の進歩 16 「腸管上皮の分化・再生」。診断と治療 (in press).
- 渡辺 守: 特集: 炎症性腸疾患の分子医学 総論: 炎症性腸疾患の病態を新しい側面から繙く。BIO Clinica 2008;23:16-7.
- 渡辺 守: 序 消化管の構成制御と機能制御の分子メカニズム。細胞工学 2008;27:758-60.
- 土屋輝一郎、渡辺 守: I. 消化管 2. 消化管上皮の分化再生機構。Annual Review 消化器 2008 2008;11-7.
- 土屋輝一郎、渡辺 守: 腸上皮分化における細胞内シグナル制御。細胞工学 2008;27:766-9.
- 渡辺 守: クローン病。今日の治療指針 2007 年 版 2007;341-2.
- 渡辺 守: 特集 これからの IBD 研究における研究班の使命は 主任研究者から一研究班の目指す方向性。IBD Research 2007;1:18-23.
- 岡本隆一、土屋輝一郎、渡辺 守: 炎症性腸疾

- 患における上皮分化制御と上皮再生。日本消化器病学会雑誌 2007;104:1165-71.
9. 岡本隆一、土屋輝一郎、渡辺 守: 腸管上皮細胞分化制御と IBD に対する上皮細胞療法の可能性。IBD Research 2007;1:43-7.
 10. 金井隆典、渡辺 守: I. 消化管 3. 炎症性腸疾患からみた粘膜免疫のトピックス。Annual Review 消化器 2007 2007;11-17.
 11. 土屋輝一郎、渡辺 守: 炎症性腸疾患と遺伝子異常。最新医学 2006;61:1819-25.
 12. 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* 2009;296:23-35.
 13. Aragaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Yoshioka S, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M. Proteasomal degradation of Atoh1 by aberrant Wnt signaling maintains the undifferentiated state of colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:923-9.
 14. 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* 2008;14:1491-1503.
 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* 2008;180:383-90.
 16. 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* 2008;180: 5291-9.
 17. 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* 2008;14:1630-40.
 18. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, Kiyono H, Watanabe M. Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol* 2007;178:4937-46.
 19. Nemoto Y, Kanai T, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Takeda K, Watanabe M. Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 2007;132:176-89.
 20. Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M. IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J Immunol* 2007;178:4737-48.
 21. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M. Reciprocal targeting of *Hath1* and β -catenin by Wnt-glycogen synthase kinase 3 β in human colon cancer. *Gastroenterology* 2007;132:208-20.
- 学会発表
1. 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
 2. 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(消化器病学会特別企画6). 東京, 2008年10月1日
 3. 土屋輝一郎、岩寄美智子、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
 4. 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
 5. 渡辺 守: IBD 診療の進歩と近未来像 - 治る時代へ -。平成19年度第1回厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業市民公開講座。札幌, 2008年1月19日
 6. 渡辺 守: Ulcerative colitis: A disorder of epithelial cell differentiation? 第93回日本消化器病学会(4th Joint Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology and the American Gastroenterological Association)。青森, 2007年4月21日
 7. 岡本隆一、土屋輝一郎、渡辺 守: 上皮細胞の分化制御を利用した粘膜再生治療への試み。第48回日本消化器病学会。札幌, 2006年10月13日
 8. 土屋輝一郎、岡本隆一、渡辺 守: *Hath1* を介した Wnt/Notch シグナルにおける腸管再生機構解析。第48回日本消化器病学会・第10回日本肝臓学会 合同。札幌, 2006年10月11日
 9. Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Dysregulated differentiation of intestinal epithelia in UC. 3rd Japan - Korea IBD Symposium. Korea (Seoul)., 2008年9月20日
 10. 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

11. Okamoto R: Role of Notch signaling in inflammatory bowel diseases. APDW2007. Kobe, 2007年10月15日-18日
12. 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. ICM2007. Tokyo, 2007年7月11日
13. Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Stabilization of Atoh1 protein induces Mucin2 gene expression in human colon cancer cells. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月23日
14. 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年5月22日
15. Okamoto R, Tsuchiya K, Kanai T, Watanabe M: Activated notch signaling suppresses generation of goblet cells in the human intestinal mucosa. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月20日
16. Onizawa M, Kanai T, Nemoto Y, Oshima S, Makita S, Okamoto R, Totsuka T, Yagita H, Watanabe M: Blockade of TNF- α inhibits tumor progression in colitis-associated cancer. DDW 2007. Washington, D.C., 2007年5月20日
17. Watanabe M: Ulcerative colitis: A disorder of epithelial cell differentiation? Cleveland Clinic Foundation Special Combined Lecture. Cleveland., 2006年11月9日
18. Watanabe M: Bone marrow-derived cells in the human intestinal epithelium. AGA Stem Cells in Gastrointestinal Development, Regeneration and Neoplasia Symposium. Washington, D.C., 2006年9月9日
19. Okamoto R, Nakamura T, Oshima S, Tsuchiya K, Kanai T, Watanabe M: Constitutively activated notch signaling suppresses goblet cell phenotype in human intestinal epithelial cells. DDW 2006. Los Angeles., 2006年5月22日
20. Tsuchiya K, Nakamura T, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M: Reciprocal targeting of Hah1 and β -catenin by Wnt-GSK3 in colonocyte differentiation and proliferation. Keystone symposia. Salt Lake., 2006年4月10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