

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。本研究の目的は、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。まずは非臨床試験として、組換えヒト HGF 注腸投与の実験大腸炎モデルに対する効果および薬物動態を検討した。組換えヒト HGF 注腸投与にて大腸粘膜のびらんおよび潰瘍は有意に縮小し、薬物動態試験では薬効濃度の 10 倍濃度の組換えヒト HGF 注腸投与でも血中暴露は認められなかった。また先行する劇症肝炎を対象とした第 I/II 相臨床試験 (医師主導治験) を終了し、データ固定および解析、GCP 監査などを経て、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治験レベルで確立した。一方、組換えヒト HGF の臨床応用では、増殖因子である HGF の大腸発癌に及ぼす影響が問題点として指摘された。本研究で実施した大腸発癌モデルでは HGF は大腸発癌をむしろ抑制する成績であったが、HGF が大腸発癌に促進的に作用する可能性は完全に否定できない。臨床試験のプロトコル作成にはその倫理性、正当性について十分に議論を重ね、また被験者には大腸発癌に及ぼす影響について十二分にインフォームドコンセントを行う必要があると考えられた。

共同研究者

井戸章雄¹ 沼田政嗣² 宇都浩文¹ 桶谷 眞¹
森内昭博¹ 嵯山敏男¹ 藤田 浩¹ 瀬戸山仁¹
山路尚久¹

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¹
京都大学医学部附属病院探索医療センター
開発部²

症、免疫抑制に主眼をおいた治療法がなされているが、再燃を繰り返す、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。従って、組換えヒト HGF 薬効薬理試験を行い、また安全性確保のために注腸投与における薬物動態、大腸発癌モデルに及ぼす影響を検討すると共に、医師主導治験の枠組みで実施されている劇症肝炎を対象とした臨床試験において、組換えヒト HGF 反復静脈内投与の安全性について検討した。

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

B. 研究方法

1. 炎症性腸疾患に対する臨床応用への準備

1-1 大腸炎モデルに及ぼす組換えヒト HGF の影響

(1) 7 週齢の Wistar ラットに 3% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 5 日間自由飲水後、6 日目より 1% DSS に変更し 7 日間自由飲水させ腸炎を誘導し

た。第6日目より組換えヒト HGF (0.01mg/ml・0.5ml/回) または生食を7日間1日1回注腸投与し、13日目に大腸びらん面積測定、組織学的評価、ki67免疫染色によるラベリング指数を検討した。

(2) 7週齢のWistarラットに2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を7.5mg/bodyで単回注腸投与し腸炎を誘導した。TNBS投与5日目に内視鏡検査を行い、大腸全周3/4以上に広がる潰瘍が形成されたラットに、第6日目より組換えヒト HGF (0.0001mg/ml, 0.001mg/ml, 0.01mg/ml・0.5ml/回) または生食を5日間注腸投与し、12日目に大腸潰瘍面積測定、組織学的評価、ki67免疫染色によるラベリング指数を検討した。

また、同様のTNBS腸炎モデルに第6日目より組換えヒト HGF (0.01mg/ml, 0.1mg/ml, 1.0mg/ml・0.5ml/回) または生食を7日間注腸投与し、14日目に大腸潰瘍面積測定、組織学的評価、ki67免疫染色によるラベリング指数を検討した。

1.2 大腸発癌モデルに及ぼす組換えヒト HGF の影響

(1) 7週齢A/JマウスにAzoxymethane (AOM) を5mg/Kgを週に1回6週間腹腔内投与した。同時に組換えヒト HGF (0.1, 0.5, 1.0mg/kg) を週3回15週間腹腔内投与した。対照群として、生食を腹腔内投与した。投与終了時点 (15週) での死亡率、腫瘍発生率、多発性について検討した。

(2) 7週齢CBAマウスにAOMを第1週目に12.5mg/kg単回腹腔内投与した。翌週より、2.5%DSSを週5日投与+2週間休養を3サイクル繰り返した。2週目より、組換えヒト HGF (0.1, 0.5, 1.0mg/Kg) を週5回2週間+1週間休養で腹腔内投与した。対照群として、生食を腹腔内投与した。投与終了時点 (12週) での死亡率、腫瘍数、腫瘍発生率、多発性について検討した。

1-3 組換えヒト HGF 注腸投与における薬物動態 (血中暴露)

(1) ラットに組換えヒト HGF (0.01, 0.1, 1.0, 5.0mg/ml) を0.5ml単回注腸投与した後、経時的に採血し、血清HGF濃度をELISA法にて測定した。

1-4 HGF の消化管上皮細胞 tight junction に及ぼす影響

(1) 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、細胞内局剤に及ぼす影響を検討した。

《倫理面への配慮》

非臨床試験における実験動物を用いた実験に関

して、国際社会がヒトの健康のためといえども、実験及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、大学の動物実験ガイドラインに沿って実施した。

2. 人体における組換えヒト HGF の安全性の検討

2-1 劇症肝炎を対象とした第 I/II 相臨床試験

(1) 組換えヒト HGF は製薬会社から供給される人体に投与実績のない未承認臨床サンプルである。従って、その臨床試験は承認申請を目的とした「治験」として実施する必要がある。このような状況から、組換えヒト HGF の臨床応用を治験レベルで実施するためにその準備を進め、劇症肝炎を対象とした組換えヒト HGF の第 I/II 相試験を2005年9月より医師主導治験に枠組みで開始し、4例の被験者を採用した。2008年5月で被験者登録を終了し、その後、直接閲覧、GCP 監査、データ固定・解析を経て、総合報告書を作成、治験終了届書を医薬品医療機器総合機構に提出した。

《倫理面への配慮》

非臨床試験における実験動物を用いた実験に関して、国際社会がヒトの健康のためといえども、実験及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、大学の動物実験ガイドラインに沿って実施した。また、医師主導治験の実施計画に関しては、(1) 倫理審査委員会及び医薬品等臨床研究審査委員会 (IRB) で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。(2) 被験者の自由意志に基づいて同意を得られた場合にのみ治験参加とする。治験参加の有無により、治療などの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い、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。

C. 研究結果

1. 炎症性腸疾患に対する臨床応用への準備

1-1 大腸炎モデルに及ぼす組換えヒト HGF の影響

(1) 大腸びらん面積は HGF 群 $52.6 \pm 35.7 \text{mm}^2$ 、生食群 $122.9 \pm 18.0 \text{mm}^2$ で HGF 群で有意に縮小が認められた。組織学的スコアは HGF 群 3.1 ± 0.7 点、生食群 5.2 ± 0.4 点で HGF 群で有意に組織学的改善が認められた。Ki67免疫染色では、傷害部におけるラベリング指数において HGF 群 $73.4 \pm 6.2\%$ 、生食群 $56.3 \pm 6.1\%$ で HGF 群で有意に増加が認められた。

(2) 5日間 HGF 注腸モデルでは、大腸潰瘍面積は HGF

0.01mg/ml 投与群で $75.8 \pm 32.3 \text{ mm}^2$ 、生食群 $171.2 \pm 63.8 \text{ mm}^2$ で HGF 群で有意に縮小が認められた。組織学的スコアはいずれの濃度群においても生食群との有意差は認めなかった。Ki67 免疫染色では、傷害部におけるラベリング指数において HGF 0.001mg/ml 投与群で $58.2 \pm 5.6\%$ 、0.01mg/ml 投与群で $71.0 \pm 9.3\%$ 、生食群 $32.4 \pm 12.7\%$ で HGF 群で有意に増加が認められた。

7 日間 HGF 注腸モデルでは、大腸潰瘍面積は HGF 0.1mg/ml 投与群で $17.6 \pm 5.7 \text{ mm}^2$ 、生食群 $46.9 \pm 21.2 \text{ mm}^2$ で、HGF 群で有意に縮小が認められた。組織学的スコアは HGF 0.1mg/ml 投与群で 2.86 ± 0.63 点、生食群 4.37 ± 0.48 点で HGF 群で有意に組織学的改善が認められた。Ki67 免疫染色では、傷害部におけるラベリング指数において HGF 0.01mg/ml 投与群で $51.1 \pm 5.9\%$ 、0.1mg/ml 投与群で $51.5 \pm 9.2\%$ 、生食群 $32.4 \pm 12.7\%$ で HGF 群で有意に増加が認められた。また HGF 1.0mg/ml 投与群では、潰瘍面積、組織学的スコア、Ki67 免疫染色ラベリング指数のいずれにおいても生食群との有意差は認めなかった。

1.2 大腸発癌モデルに及ぼす組換えヒト HGF の影響

(1) 腫瘍発生数 (/匹) は対照 (生食) 群 2.00 ± 2.22 であったが、HGF 群 (0.1 mg/kg) 0.43 ± 0.65 、(0.5 mg/kg) 0.38 ± 0.65 、(1.0 mg/kg) 0.43 ± 0.76 と、HGF 投与群でいずれも有意に減少した ($p < 0.005$ vs 対照群)。

(2) 腫瘍発生数 (/匹) は対照 (生食) 群 6.60 ± 5.27 であったが、HGF 群 (0.1 mg/kg) 6.60 ± 4.99 、(0.5 mg/kg) 3.70 ± 1.95 、(1.0 mg/kg) 1.60 ± 1.51 と、用量依存性に HGF 投与群で減少する傾向を認め、1.0 mg/kg 投与群では有意に減少した ($p < 0.005$ vs 対照群)。

1-3 組換えヒト HGF 注腸投与における薬物動態 (血中暴露)

(1) 組換えヒト HGF 0.01、0.1 mg/ml 濃度では血中暴露はみられなかった。1.0 mg/ml 濃度において注腸投与 30 分後、120 分後に血清 HGF が上昇する個体がみられた。

1-4 HGF の消化管上皮細胞 tight junction に及ぼす影響

(1) 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 TJP (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。

2. 人体における組換えヒト HGF の安全性の検討

2-1 劇症肝炎を対象とした第 I/II 相臨床試験

(1) 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。組換えヒト HGF (0.6 mg/m²/日) は 12~14 日間反復静脈内投与された。遅発性肝不全の 1 例 (女性) は治験期間 (プロトコル治療 12 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頻度の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。

D. 考察

1-1 組換えヒト HGF 注腸投与における薬効と血中暴露

炎症性腸疾患に対する組換えヒト HGF の臨床応用を目指した薬効薬理試験では、注腸投与された組換えヒト HGF が十分に傷害大腸粘膜の再生修復を促進することが示された。薬効濃度の十倍濃度の組換えヒト HGF の注腸投与でも血中にヒト HGF は検出されず、静脈内投与で予測される種々の有害事象のリスクは低いものと考えられた。

1-2 増殖因子である HGF の大腸発癌に及ぼす影響

対象として想定されている難治性の潰瘍性大腸炎では大腸発癌のリスクがあり、増殖因子である HGF が発癌促進に作用する可能性が懸念された。本研究では、化学大腸発癌モデルと実験腸炎に化学大腸発癌を誘導したモデルにおいて組換えヒト HGF の及ぼす影響を検討したが、いずれの大腸発癌モデルにおいても組換えヒト HGF はむしろ発癌を抑制した。現時点で、HGF が大腸発癌を促進するデータは得られていないが、細胞増殖作用を有する HGF が大腸発癌を促進する可能性を完全に否定することはできないため、臨床応用では被験者に十二分にインフォームドコンセントを行う必要があると考えられた。

1-3 HGF の消化管上皮細胞 tight junction に及ぼす影響

傷害粘膜の再生・修復過程の早期に誘導される epithelial restitution に細胞遊走促進作用をもつ HGF は必須の因子とされている。本研究では、HGF

はTJPsの発現には影響を与えなかったが、であるZO-1を細胞質に移動させた。TJPは消化管粘膜においてそのバリアー機能および透過性にも密接に関係しており、HGFの消化管粘膜上皮細胞のTJPに及ぼす影響を分子レベルで明らかにすることが、炎症性腸疾患に対する組換えヒトHGFの真の探索的創薬につながることを考えられた。

2. 人体における組換えヒトHGFの安全性の検討

2-1 劇症肝炎を対象とした第I/II相臨床試験

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、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。

E. 結論

炎症性腸疾患に対する組換えヒトHGF注腸投与による臨床応用を目指して、その非臨床試験(薬効薬理試験、薬物動態試験など)を実施し、組換えヒトHGF注腸投与による有効性、安全性を確立した。また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治験レベルで確立した。

対象とする潰瘍性大腸炎は罹患期間が長期に及ぶと高率に大腸癌が発生する。組換えヒトHGFの臨床応用では、増殖因子であるHGFの大腸発癌に及ぼす影響が問題点として指摘された。本研究で実施した大腸発癌モデルではHGFは大腸発癌をむしろ抑制する成績であったが、HGFが大腸発癌に促進的に作用する可能性は完全に否定できない。臨床試験のプロトコル作成にはその倫理性、正当性について十分に議論を重ね、また被験者には大腸発癌に及ぼす影響について十二分にインフォームドコンセントを行う必要があると考えられる。

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. 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

1. Numata M, Kodama M, Uto H, Nakanishi C, Kanmura S, Abe H, Miike T, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Ido A, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor may not accelerate neoplastic development in two experimental models. *Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006年5月*
2. 児玉眞由美、沼田政嗣、宇都浩文、中西千尋、上村修司、安倍弘生、三池忠、楠元寿典、山本章二郎、井戸章雄、坪内博仁. ラット大腸発癌モデルにおける遺伝子組換えヒト肝細胞増殖因子(rh-HGF)の及ぼす影響. 第92回日本消化器病学会総会, 北九州市, 2006年4月

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

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

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有し、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。一方、炎症性腸疾患の治療において薬剤の腸管粘膜下組織への直接注入は、全身投与による薬剤の全身暴露を避ける治療法となりうる。われわれはラットに対する内視鏡的薬剤粘膜下注入手技によるいくつかの薬剤の局所治療実験を行い、同治療法が有効な薬剤投与方法となることを示した。これらの研究成果を総合し、STNM-01 の内視鏡的粘膜下注入療法を用いて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 抗体レミケードにいたるまで、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。

臨床応用の際には STNM-01 の投与は全身投与ではなく、内視鏡を用いた粘膜下注入療法が望ましい。この実験を可能とするために、極細径内視鏡をラットの大腸に挿入し、食道静脈瘤治療針を粘膜下に刺し薬剤注入実験を行った。薬剤としては rhHGF、肥満細胞安定化薬リザベンなどを用いた。

(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。

実験腸炎ラットに対する内視鏡下大腸粘膜下薬剤 (rhHGF、リザベンなど) 注入は、これら薬剤の全身投与に匹敵する腸炎治療効果を発揮することが明らかとなった。

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. Hanawa T, Suzuki K, Kawauchi Y, Takamura M, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Shimizu F, Asakura H, Miyazaki J, Maruyama H, Aoyagi Y. Attenuation of mouse acute colitis by hepatocyte growth factor gene transfer into the liver. *J Gene Med* 8:623-635, 2006.
2. Han GD, Suzuki K, Koike H, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, Shimizu F, Kawachi H. IFN-inducible protein-10 plays a pivotal role in maintaining slit-diaphragma function by regulating podocyte cell-cycle balance. *J Am Soc Nephrol* 17:442-453, 2006.
3. Asakura H, Suzuki K, Honma T. Recent advances in basic and clinical aspects of inflammatory bowel disease: Which steps in the mucosal inflammation should we block for the treatment of inflammatory bowel disease? *World J Gastroenterol* 13: 2145-49.
4. Suzuki K, Kawauchi Y, Suresh S, Palaniyandi, Punniyakoti T, Veeraveedu, Fujii M, Yamagiwa S, Yoneyama H, Han GD, Kawachi H, Okada Y, Ajioka Y, Watanabe K, Hosono M, Asakura H, Aoyagi Y, Narumi S. Blockade of interferon-inducible protein-10 attenuates chronic experimental colitis by blocking cellular trafficking and protecting intestinal epithelial cells. *Pathol International* 57: 413-420, 2007.
5. Asakura H, Suzuki K, Kitahara 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. 鈴木健司、河内裕介、青柳 豊. 肥満細胞の制御による炎症性腸疾患の治療の試み, 第93回日本消化器病学会総会, 青森, 2007年4月19日.
2. 孫 曉梅、鈴木健司、河内裕介、河内裕、青柳豊. DSS腸炎の肥満細胞膜安定化剤による治療 第44回日本消化器免疫学会総会, 東京, 2007年7月9日.
3. K Suzuki, Y Kawauchi, X Sun, H Asakura, Y Aoyagi. A new drug delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease. 3rd International congress of mucosal immunology. ICMI 2007, Tokyo, 2007年7月11日.
4. 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.
5. 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. 知的所有権の取得状況

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

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

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 TLR を介した自然免疫系の活性化の制御機構を解析した。その結果、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発現誘導機構を解析した。早期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が常に開いており転写制御因子が刺激後迅速にアクセスしやすい構造となっている。一方、遅期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激により構造変換を受けて開き、転写制御因子がアクセスできるようになる。このことが、遺伝子発現に時間を要する原因であることが明らかになった。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関わる分子として、I κ BNS と同じ I κ B 分子 I κ Bzeta を同定した。今後も、自然免疫系の活性制御機構を解析し、新規アジュバントの開発に向けた基礎的基盤を提供したい。また、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 CD70^{high} CD11c^{low} 樹状細胞が、腸内細菌由来の ATP を認識し、IL-6 産生、TGF- β 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

自然免疫系の活性制御機構を解析する過程で、大腸に局在する自然免疫担当細胞は、TLR 刺激に不応

答になっていることを見出し、さらにこれら細胞に選択的に発現している遺伝子として IkbNS を同定した。そして、IkbNS の機能解析から、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型と遅期誘導型があり、IkbNS は遅期誘導型の遺伝子発現を NF- κ B の活性を制御することにより抑制していることを見出している。

そこで、自然免疫系の活性制御機構をさらに解析するため、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。まず、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、TRIF 依存性のシグナルが入る状態で早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子発現を解析した。さらに、早期誘導型遺伝子として MIP2 遺伝子、遅期誘導型遺伝子として Lcn2 遺伝子を代表とし、各遺伝子プロモーターへの転写制御因子群のリクルートをクロマチン免疫沈降法で解析した。また、各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。

また、同じ核に発現する Ikb 分子 Ikb ζ の遅期誘導型遺伝子の発現誘導における役割を解析した。

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- β 活性化に関わるインテグリン α V, β 8 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, α V, β 8 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

MyD88 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子の発現は障害されている。しかし、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 刺激すると TRIF 依存性の一見無意味なシグナルが活性化される。そこで、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、早期誘導型と遅期誘導型の各遺伝子の mRNA の発現誘導をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、遅期誘導型の遺伝子は MyD88 欠損マクロファージでは全く誘導されないが、早期誘導型の遺伝子はかなり減弱しているもののかすかに誘導された。このかすかな早期誘導型遺伝子の発現は、MyD88/TRIF 二重欠損マクロファージでは全く認められなかった。このように、早期誘導型遺伝子は、極めて発現誘導されやすく、一見無意味なシグナルが入ることによって、かすかに誘導されることが明らかになった。次に、早期誘導型、遅期誘導型遺伝子としてそれぞれ MIP2, Lcn2 遺伝子を代表として取り上げ、各遺伝子プロモーターへの、NF- κ Bp65 サブユニット、RNA polymerase II, TBP のリクルートをクロマチン免疫沈降法により解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターへのこれら転写制御因子群のリクルートは刺激後 180 分より認められ、MyD88 欠損マクロファージでは全く認められない。一方、早期誘導型遺伝子のプロモーターへは、刺激後 15 分ときわめて早い時間から認められ、さらに MyD88 欠損マクロファージでも有意に認められた。この結果から、早期誘導型遺伝子のプロモーターは、転写制御因子がきわめてアクセスし易い状態であることが明らかになった。

そこで、次に各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。

遅期誘導型遺伝子プロモーターではヒストン H3 のメチル化は認められず、TLR 刺激 180 分から観察された。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターでは、メチル化が刺激以前から常に見られた。この結果から、早期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が常に開いた状況にあり、その結果転写制御因子がアクセスし易く、遺伝子発現が早期に誘導されることが明らかになった。一方、遅期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激によって構造変換を受け、転写制御因子がアクセスされやすくなること、そしてこのことが、遺伝子発現が遅れるメカニズムであることが明らかになった。

次に、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造変換に関与する分子について解析を行った。これまでに I κ BNS と同じ核に発現する I κ B 分子である I κ B ζ が遅期誘導型遺伝子の発現に関与していることを示した。実際、I κ B ζ 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現が障害されている。I κ B ζ は TLR 刺激により早期に誘導される遺伝子の一つである。そこでマクロファージに I κ B ζ を常時発現させ、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現を解析した。I κ B ζ を発現させたマクロファージでは、遅期誘導型遺伝子の発現誘導が早く観察されるようになった。また、遅期誘導型遺伝子プロモーターへの転写制御因子のリクルート、メチル化の誘導も早く観察されるようになった。これらの結果から、I κ B ζ は、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造を変換させることにより遺伝子発現の誘導に関与していることが明らかになった。

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% 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 細胞のマーカーである IL-17A, IL-17F, IL-22, Ror γ t 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られている。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- β 活性化に関わるインテグリン α v, β 8 の発現が亢進していることが明らかになった。IL-6, α v, β 8 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, α v, β 8 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

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類される。遅期誘導型の遺伝子プロモーターはクロマチン構造が閉じていて、TLR 刺激により構

造変換を受け、転写制御因子がアクセスする。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造は常に開いている。このことが、早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子群に分けられるメカニズムであることが考えられる。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IkBzeta が関与することも明らかになった。しかし、IkBzeta 自身には、クロマチン構造を変換させる酵素活性はない。IkBzeta と相互作用し、クロマチン構造を変換させる分子の同定をさらに行っていきたい。このように、自然免疫系の活性制御機構を解析し、その制御技術基盤を確立し、有効なアジュバントの創出に寄与したい。

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行きたい。

E. 結論

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類されるが、この相違は各遺伝子プロモーターのクロマチン構造の違いによることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IkBzeta が関与することも明らかになった。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. Nakamura, K., Miyazato, A., Koguchi, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Saijo, S., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., Fujita, J., Ishii, K., Kaku, M., and Kawakami, K.: Toll-like receptor (TLR) 2 and dectin-1 contribute to the production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with *Penicillium marneffei*. *Microbes Infect.* 10, 1223-1227 (2008).
2. 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).
3. Nakamura, J., Fujimoto, M., Yasuda, K., Takeda, K., Akira, S., Hatayama, T., Takagi, Y., Nozaki, K., Hosokawa, N., and Nagata, K.: Targeted disruption of Hsp110/105 gene protects against ischemic stress. *Stroke* 9, 2853-2859 (2008).
4. Saito, F., Kuwata, H., Oike, E., Koike, M., Uchiyama, Y., Honda, K., and Takeda, K.: Inefficient phagosome maturation in infant macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 113-118 (2008).
5. 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).
6. Nakamura, K., Miyazato, A., Gang, X., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Suzuki, K., Fujita, J., Kaku, M., and Kawakami, K.: Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J. Immunol.* 180, 4067-4074 (2008).
7. Nishimura, J., Saiga, H., Sato, S., Okuyama, M., Kayama, H., Kuwata, H., Matsumoto, S., Nishida, T., Sawa, Y., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* 180, 4032-4039 (2008).
8. Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K., J., Coban, C., Akira, S., Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., and Himeno, K.: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J. Immunol.* 180, 2496-2503 (2008).
9. 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).

10. Yamamoto, M., and Takeda, K.: Role of nuclear I κ B proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* 14, 265-269 (2008).
11. Takeda, K., Yamamoto, M., Honda, K.: Assessing the response of cells to TLR stimulation. Signaling by Toll-like receptors, 1-21 (2008).
12. Yamamoto, M., Uematsu, S., Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato, S., Kumar, H., Satoh, T., Saitoh, T., Takeda, K., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Kawai, T., and Akira, S.: Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204, 2233-2239 (2007).
13. Sakamori, R., Takehara, T., Ohnishi, C., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Takeda, K., Akira, S., Hayashi, N.: STAT3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46, 1564-1573 (2007).
14. Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 132, 176-189 (2007).
15. Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.: TLR-dependent induction of IFN- β mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059-7066 (2006).
16. Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7, 962-970 (2006).
17. Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S.: Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c⁺ lamina propria cells. *Nat. Immunol.* 7, 868 - 874 (2006).
18. Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., and Kikutani, H.: Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 615-622 (2006).
19. Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Fujita, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adachi, Y., Ohno, N., Takeda, K., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M. and Kawakami, K.: Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 148-154 (2006).
20. Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K. and Yoshikai, Y.: MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8 $\alpha\alpha$ and TCR $\gamma\delta$ intestinal intraepithelial T lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 6180-6185 (2006).
21. Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Takeda, K., Fukai, F., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* 176, 2773-2780 (2006).
22. Kuwata, H., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsani, T., Koga, R., and Takeda, K.: I κ BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
23. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe, T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105-113 (2006).

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, 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

3. 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
4. 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
5. Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear I κ B proteins. 8th International Society of Exercise and Immunology Symposium, 2007. 10. 25, Sendai, Japan
6. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, 2007. 10. 29, Tsukuba, Japan
7. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006. 9. 3-6, Hyogo, Japan
8. Kiyoshi Takeda, Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting, 2006. 6. 1, San Francisco, USA
9. 竹田 潔, 自然免疫系による結核感染防御機構, 第 60 回日本細菌学会九州支部総会、2007. 10. 12、長崎
10. 竹田 潔, 自然免疫シグナルの制御機構第 28 回日本炎症・再生医学会、2007. 8. 2、東京
11. Kiyoshi Takeda, Nuclear I κ B protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium), 第 36 回日本免疫学会学術集会、2006. 12. 11-13、大阪
12. 香山尚子、竹田 潔, Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第 36 回日本免疫学会学術集会、2006. 12. 11-13、大阪
13. 竹田 潔, 自然免疫系の活性制御機構 (シンポジウム), 第 2 回食品免疫学会、2006. 10. 23、東京
14. 竹田 潔, 自然免疫系の活性制御機構 (特別講演), 第 43 回補体シンポジウム、2006. 8. 19、福岡
15. 竹田 潔, 粘膜免疫の今後の展望 (イブニングセミナー), 第 43 回日本消化器免疫学会総会、2006. 8. 3-4、青森
16. 竹田 潔, 自然免疫系による炎症制御, 日本動脈硬化学会、2006. 7. 13-14、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、MIC 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、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

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た。

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。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、変異 MIF 蛋白に対する抗体が効率よく産生され、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された。

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.
5. Ohkawara T, Nishihira J, Ishiguro Y, Otsubo E, Nagai K, Takeda H, Kato M, Yoshiki T, Iwanaga T, Asaka M : Resistance to experimental colitis depends on cytoprotective heat shock proteins in macrophage migration inhibitory factor null mice. *Immunol Lett* 107: 148-154, 2006
6. Ohkawara T, Takeda H, Nishiwaki M, Nishihira J, Asaka M : Protective effects of heat shock protein 70 induced by geranylgeranylacetone on oxidative injury in rat intestinal epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 41: 312-317, 2006.
7. Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Katsurada T, Kato K, Yoshiki T, Sugiyama T, Asaka M : Protective effect of geranylgeranylacetone on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *Int J Mol Med* 17: 229-34, 2006
8. Ohkawara T, Nishihira J, Nagashima R, Takeda H, Asaka M : Polaprezinc protects human colon cells from oxidative injury induced by hydrogen peroxide: Relevant to cytoprotective heat shock proteins. *World J Gastroenterol* 12: 6178-6181, 2006.

学会発表

1. 浅香正博: トランスレーショナルリサーチと消化器内視鏡 第71回日本消化器内視鏡学会総会, 東京 2006. 5.

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
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
総合研究報告書

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：ヒト消化管における抗菌ペプチド defensin に依存する自然免疫機能の感染防御機構を解明し、炎症性腸疾患患者の病変、消化管粘膜上皮における自然免疫機構の関与を検討してきた。本研究では、消化管粘膜上皮細胞の産生する内因性抗菌ペプチドの分子異常と機能異常を検討することによって、炎症性腸疾患の病因・病態における自然免疫機構異常の関与を解明する。さらに、内因性抗菌ペプチドをターゲットとする新たな炎症制御の可能性を検討し、炎症性腸疾患に対する特異的な新規治療法の開発をめざす。

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

旭川医科大学内科学講座 消化器血液腫瘍
制御内科学分野

A. 研究目的

腸管感染防御機構の解明が進むにつれて、小腸 Paneth 細胞が自然免疫機構の担当細胞であることが明らかとなってきた。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も明らかになっている¹⁾。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て注目された²⁾。

本研究では、クローン病における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ことを明らかにする。また、脱落した自然免疫機構を補完することで炎症性腸疾患の新規治療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 小腸 Paneth 細胞の自然免疫機構解析

旭川医科大学病院にて、文書によるインフォームドコンセントを得たクローン病又は大腸癌（コントロール群）患者から回腸粘膜を得た。我々が独自に開発した解析法を用い、小腸陰窩（クリプト）における抗菌活性物質の分泌能を検討した。既報に従いヒト小腸陰窩の単離を行い、抗菌アッセイはサルモネラ菌と 37°C 30 分間の共培養ののち生菌数を計測した。

(2) リコンビナント蛋白と特異抗体の生成

ヒト α -defensin は 3 つの分子内ジスルフィド結合により fold される構造を有する。Human defensin-5 (HD-5) は小腸 Paneth 細胞で 75 個のアミノ酸からなる proHD-5 として生成され、酵素的切断の後 32 個のアミノ酸の HD-5 蛋白となる³⁾。それぞれのリコンビナントペプチドを大腸菌発現系にて過剰発現させ、ニッケルレジンカラムと高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) にて精製した⁴⁾。精製度は HPLC および Acid urea-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にて確認した。分子量はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型マスマスペクトロメトリー (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。

精製 HD-5 を BSA にコンジュゲートさせウサギに免疫し、抗血清を得た。HD-5 特異的で HD-6 やマウス defensin には反応しなかった。抗 proHD-5 モノクローナル抗体 8C8 は Hycult Biotech 社から購入して用いた。

(3) 内因性抗菌ペプチドの発現と構造の解析

HD-5 蛋白の発現は免疫組織染色、ウェスタンブロットングにて確認した。内因性 HD-5 は、酸抽出と遠心分離のちに凍結乾燥を加えた粗抽出物から、HPLC にて C18 逆相カラムを用いて分離精製した。蛋白同定には抗菌活性と MALDI TOF-MS を用いた。

(4) リコンビナント 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。

(5) 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)

本検討で使用されたすべての組織は、術前に文書によるインフォームドコンセントを得た患者から検体を得ておこなわれた。また、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) 小腸 Paneth 細胞の自然免疫機構解析

われわれの教室で確立したヒト小腸クリプトの分離手技を用いて、ヒト大腸癌患者及びクローン病患者から小腸クリプトを分離した (Fig. 1)。顕微鏡下に単離したクリプトとサルモネラ菌を共培養したのち、その細菌数の減少を計測することで、Paneth 細胞から分泌される抗菌活性を測定した。コントロール群ではクリプトの数に依存して生存細菌は減少していくが、クローン病のクリプトからの分泌物では抗菌作用は乏しくクローン病 Paneth 細胞の抗菌活性は低下していた。 *In vitro* で単離クリプトを用いた検討で殺菌効果が脱落する機序については、形態異常に伴う Paneth 細胞数の減少、分泌される内因性抗菌ペプチドの異常 (後述) などが示された。

Figure 1



(2) リコンビナント蛋白と特異抗体の生成

HD-5 は 6 つのシステインの分子内結合により高次の構造を有するペプチドである。この HD-5 のリコンビナント蛋白を作成する上での

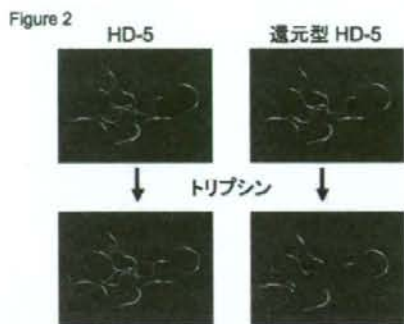
問題点として、分子内架橋を再現することが必要である。大腸菌内で誘導され、正しいジスルフィド結合を有する蛋白を精製した。

MALDI TOF-MSにてproHD-5は8102.2(計算値8102.5), HD-5は3581.2(計算値3582.1)であることを確認した。さらに本研究の過程で、正しいフォールディングが抗菌活性に必須であることを見出した。

(3) 内因性抗菌ペプチドの発現と構造の解析

免疫染色にて小腸 Paneth 細胞分泌顆粒内に proHD-5 として特異的に発現することが確認された。ウェスタンブロッティングでは小腸粘膜組織では proHD-5 のバンドが認識され、トリプシン処理にて約4kDのHD-5が得られた。ヒトでは Paneth 細胞から顆粒が分泌され、トリプシンが proHD-5 から活性型HD-5 への変換されることを確認した。クローン病患者の小腸組織を用いて proHD-5 蛋白の発現量を HPLC 法にて測定したところコントロールと差はなかったが、トリプシン処理後に HD-5 蛋白が消失していた。すなわち、HD-5 のトリプシン抵抗性がクローン病で消失していることが示唆された。

クローン病小腸粘膜から defensin 分画を HPLC にて分離精製した。抗菌活性を有する蛋白を精製し N 末端ペプチドシーケンスにて proHD-5 であることを確認した。MALDI TOF-MS で、クローン病 proHD-5 は 8107.6, コントロール患者 proHD-5 は 9101.9 とジスルフィド結合が解離した還元型 HD-5 がみられることを確認した(計算値 8102.5)。従って、クローン病の Paneth 細胞で分泌された proHD-5 が蛋白分解酵素で破壊され十分な機能を有していないことが示唆された(Fig. 2)。HD-5 の構造異常が、クローン病単離クリプトの抗菌活性低下の一因であることを示した。



(4) リコンビナント HD-5 の *in vitro* 活性の検討

リコンビナント proHD-5 と HD-5 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・g/mlの濃度ですべての菌株に活性を示したが, proHD-5は100・g/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・g/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 にて分泌が誘導され, 高濃度に分泌された。リアルタイム PCR にて測定した IL-8 mRNA 発現量は HD-5 刺激 6 時間後には増加し 12 時間後に低下していた。

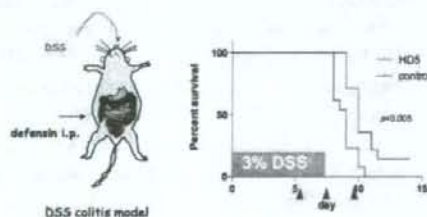
(5) マウス DSS 腸炎モデルにおける HD-5 の治療効果

C57B1/6 マウスは, DSS の自由飲水にて大腸炎をきたし, 小腸には粘膜障害がみられなかった。小腸 Paneth 細胞の内因性 α -defensin

の発現はマウス defensin 抗体を用いた免疫染色で染色強度に差はなく、Acid Urea-PAGE 後のクマシー染色にて比較した defensin のバンドの濃度差はみられなかった。したがって、DSSマウス腸炎は defensin 非欠損腸炎のモデルと考えられた。

2.5 mg/kg の HD-5 を 3 日間腹腔内投与することで、生存期間は有意に改善した (Fig. 3)。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、粘膜再生の亢進はみられなかった。アポトーシス陽性細胞は HD-5 投与により減少していた。経口投与群と、注射投与群では生存期間に差はみられなかった。

Figure 3



D. 考察

本研究から、クローン病における Paneth 細胞由来抗菌ペプチドの構造異常が抗菌活性の低下を引き起こし、腸管が本来有する自然免疫機構の破綻を来していることが示された。HD-5 以外の抗菌ペプチドについても発現の低下が報告され、抗菌ペプチドによる腸管のバリアの重要性が認識されつつある¹⁾。腸管内細菌を認識しその侵入から生体を防御する自然免疫の機能性分子としての抗菌ペプチドは、新たなクローン病の治療のターゲットになると考えられた。

ヒト Paneth 細胞 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 へと活性化されることが示された。HD-5 は分子内架橋によりトリプシンなどの酵素分解に対して安定な分子として腸管内に存在し、様々な活性を維持することが推測される。また、DSS 腸炎モデルでは内因性 defensin に変化はないが、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。

・・-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

Paneth 細胞を中心とした腸管自然免疫の脱落がクローン病の病因と関与することが明らかとなった。Defensin の異常がその一因となることから、HD-5 の投与が新たな治療のターゲットと考えられた。DSS 腸炎をモデルとした HD-5 の治療効果が示され、今後の炎症性腸疾患に対する治療応用が期待される。高効率なリコンビナント HD-5 の精製方法の開発を進め、抗菌ペプチドを用いた新規炎症性腸疾患治療法の開発が有用であろうと考える。

F. 参考文献

1. Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y et al: The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends Microbiol* 12: 394-398, 2004.
2. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y et al: Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307: 731-734, 2005.
3. Ghosh D, Porter E, Shen B et al: Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immunol* 3: 583-90, 2002.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

論文発表

1. Weeks CS, Tanabe H, Cummings JE, Crampton SP, Sheynis T, Jelinek R, Vanderlick TK, Cocco MJ, Ouellette AJ. Matrix metalloproteinase-7 activation of mouse paneth cell pro-alpha-defensins: SER43 down arrow ILE44 proteolysis enables membrane-disruptive activity. *J Biol Chem* 281:28932-42, 2006.
2. Tanabe H, Ayabe T, Maemoto A, Ishikawa C, Inaba Y, Sato R, Moriichi K, Okamoto K, Watari J, Kono T, Ashida T, Kohgo Y. Denatured human alpha-defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against enzymatic digestion. *Biochem Biophys Res Commun.* 358: 349-355, 2007
3. 田邊裕貴, 前本篤男, 綾部時芳, 河野 透, 蘆田知史, 高後 裕. クロウン病における Paneth 細胞由来抗菌ペプチドの産生異常. *分子消化器病* 4: 110-115, 2007
4. 渡 二郎, 佐藤龍, 田邊裕貴, 金野陽高, 石川千里, 稲場勇平, ZakyAmen H, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 前本篤男, 藤谷幹浩, 蘆田知史, 高後 裕, 横田欽一, 齊藤裕輔. Crohn 病の上部消化管病変の臨床と経過 胃・十二指腸病変を中心に. *胃と腸* 42: 417-428, 2007
5. 藤谷幹浩, 齊藤裕輔, 野村昌史, 稲場勇平, 佐藤 龍, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 田邊裕貴, 前本篤男, 渡二郎, 垂石正樹, 蘆田知史, 高後 裕. 炎症性腸疾患の拡大内視鏡観察. *胃と腸* 42: 833-841, 2007
6. 前本篤男, 佐藤 龍, 岡本耕太郎, 齊藤裕輔, 高後 裕. Crohn 病による小腸・大腸狭窄病変 (吻合部狭窄を含む) に対する安全な内視鏡治療. *消化器内視鏡* 19: 1290-1293, 2007
7. 藤谷幹浩, 盛一健太郎, 渡 二郎, 川内宏仁, 野村好紀, 奈田利恵, 上野伸展, 金野陽高, 石川千里, 伊藤貴博, 佐藤龍, 岡本耕太郎, 田邊裕貴, 前本篤男, 蘆田知史, 高後 裕, 垂石正樹, 齊藤裕輔. 潰瘍性大腸炎における易再燃例の予測 - "粘膜治癒" における内視鏡的微小構造の特徴と再燃の予測. *胃と腸* 42: 1894-1902, 2007
8. 前本篤男, 渡 二郎, 上野伸展, 金野陽高, 石川千里, 伊藤貴博, 佐藤龍, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 田邊裕貴, 藤谷幹浩, 蘆田知史, 高後 裕, 齊藤裕輔. 虚血性大腸炎から典型的な潰瘍性大腸炎へ進展した 1 例. *IBD Research* 1:297-303, 2007

学会発表

1. Maemoto A, Tanabe H, Ashida T, Yokota K, Ayabe T. Unfolded structure of Paneth cell a-defensin disrupt the microbicidal function in patients with Crohn's disease. American Gastroenterological Association, Los Angeles, 2006. 5. 22.
2. Inaba Y, Tanabe H, Maemoto A, Ashida T, Watari J, Ayabe T, Kohgo Y. Impaired production of Paneth cell defensin precedes the colonic inflammation in IL-10 deficient mice model of IBD. American Gastroenterological Association, Los Angeles, 2006. 5. 23.
3. Maemoto A, Tanabe H, Ashida T, Ayabe T, Kohgo Y. Disruption of innate immunity in Crohn's disease. 11th US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century, Tokyo, 2006. 6. 30
4. Ayabe T, Sakai N, Maemoto A, Tanabe H, Ashida T, Kohgo Y. Impaired innate immunity in Paneth cells and their α -defensins in Crohn's disease. 26th International Symposium of the Sapporo Cancer Seminar Foundation, Sapporo, 2006. 7. 22
5. Tanabe H, Maemoto A, Watari J, Ashida T, Kohgo Y. Human enteric defensin is stored as bioactive propeptide. The 16th International symposium on regulatory peptide, Hakone, 2006. 8. 31.
6. Ayabe T, Fukaya R, Sakai N, Maemoto A, Tanabe H, Ashida T, Kohgo Y. Paneth cells and their a-defensins in innate immunity and in the pathology of Crohn's disease. 4th. JSGE-AGA Joint Meeting on Inflammatory Bowel Disease. Aomori, Japan, 2007. 4. 19
7. Maemoto A, Ayabe T, Tanabe H, Inaba Y,