

- Ashida T, Fukaya R, Sakai N, Kono T, Kohgo Y. Down-regulation of Paneth cell α -defensin expression and function in patients with Crohn's disease. American Gastroenterological Association, Washington DC, USA, 2007. 5. 22
8. Maemoto A, Tanabe H, Inaba Y, Ito T, Ashida T, Ayabe T, Kohgo Y. Disruption of innate immunity in Crohn's disease 13th International Congress of Mucosal Immunology 2007, Tokyo, 2007. 7. 10
 9. Tanabe H, Maemoto A, Ayabe T, Kono T, Watari J, Ashida T, Kohgo Y. Human enteric defensin induces acquired immunity through activation processing. 13th International Congress of Mucosal Immunology 2007, Tokyo, 2007. 7. 11
 10. Tanabe H. Precursor processing of human defensin-5 is essential to the physiological functions in vivo and in vitro. 2009 International symposium on Regulatory Peptide, Santa Barbara CA, 2009. 01. 27
 11. 佐藤龍, 蘆田知史, 岡本耕太郎, 金野陽高, 石川千里, 稲場勇平, 村松司, 盛一健太郎, 田邊裕貴, 前本篤男, 渡 二郎, 高後 裕. 炎症性腸疾患における *Helicobacter Pylori* 感染と高アミラーゼ血症との関連. 第 92 回日本消化器病学会総会, 小倉, 2006. 4. 20-22
 12. 田邊裕貴, 渡 二郎, 高後 裕. *Helicobacter* 感染における自然免疫システムの検討. 第 12 回日本ヘリコバクター学会, 神戸, 2006. 6. 22
 13. 前本篤男, 田邊裕貴, 蘆田知史, 綾部時芳, 高後 裕. クロウン病における Paneth 細胞由来抗菌ペプチドの構造異常と innate immunity の破綻. 第 43 回日本消化器免疫学会総会, 弘前, 2006. 8. 4
 14. 石川千里, 田邊裕貴, 金野陽高, 稲場勇平, 村松 司, 佐藤 龍, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 前本篤男, 渡 二郎, 蘆田知史. Crohn 病における, GM-CSF の腸管上皮細胞に対する作用機序の検討. DDW-Japan 2006 第 14 回日本消化器関連学会週間, 札幌, 2006. 10. 12
 15. 佐藤龍, 蘆田知史, 岡本耕太郎, 上野伸展, 金野陽高, 石川千里, 伊藤貴博, 盛一健太郎, 田邊裕貴, 前本篤男, 藤谷幹浩, 渡 二郎, 高後 裕. クロウン病患者の小腸狭窄に対するダブルバルーン小腸内視鏡を用いたバルーン拡張術. 第 100 回日本消化器病学会北海道支部, 第 94 回日本消化器内視鏡学会北海道支部合同シンポジウム, 札幌, 2007. 5. 27
 16. 藤谷幹浩, 盛一健太郎, 佐藤龍, 岡本耕太郎, 田邊裕貴, 前本篤男, 渡 二郎, 蘆田知史, 高後 裕, 齊藤裕輔. 自家蛍光内視鏡を用いた新しい潰瘍性大腸炎診断の可能性と数値化の試み. 第 244 回日本内科学会北海道地方会, 旭川, 2007. 9. 8
 17. 金野陽高, 田邊裕貴, 前本篤男, 蘆田知史, 高後 裕. 必須アミノ酸 L-isoleucine は β -defensin 2 発現量を増加させる. 日本消化器病学会, 東京, 2008. 09
 18. 綾部時芳, 深谷梨恵, 坂井直樹, 前本篤男, 蘆田知史, 河野 透, 田邊裕貴, 高後 裕. パネト細胞 α -defensin と腸内自然免疫 クロウン病との関わりを含めて. 補体シンポジウム 札幌 2008. 07
 19. 田邊裕貴, Zaky Amen, 石川千里, 上野伸展, 金野陽高, 稲場勇平, 伊藤貴博, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 藤谷幹浩, 高後 裕. ヒト大腸癌における α -defensin 発現は MAPK 阻害剤にて抑制される. 第 95 回北海道癌談話会, 旭川, 2008. 09. 06
 20. 田邊裕貴, 藤谷幹浩, 高後 裕. 腸管粘膜における抗菌ペプチドの役割. 平成 20 年度北海道腸内細菌叢研究会. 札幌, 2008. 9. 19

1. 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

プロバイオティクス由来物質を用いた新規炎症性腸疾患治療の開発

研究分担者 高後 裕 旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学 教授

研究要旨:プロバイオティクス由来の活性物質を用いた新しい炎症性腸疾患治療法の開発を目的として、本研究では(1)各種プロバイオティクスの生理作用の解明、(2)プロバイオティクス由来の活性物質の同定、(3)腸管炎症に対する活性物質の治療効果、に関する研究を行った。その結果、①ある種のバシラス菌および乳酸菌が細胞防御蛋白(heat shock protein)誘導作用、腸管保護作用を有する、②これらのプロバイオティクスは特異的活性物質を産生する、③バシラス菌由来の活性物質であるcompetence and sporulation factorは炎症性腸疾患モデルの腸炎を改善する、ことが明らかになった。これによりプロバイオティクス由来の活性物質を用いた、新しい炎症性腸疾患治療法開発への道が開けた。この研究成果を基に、次年度よりヒト臨床試験を予定している。

共同研究者

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

所 属

旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学

A. 研究目的

Lactobacillus 菌や Bacillus subtilis 菌などの菌群はプロバイオティクスと呼ばれ、健康食品や治療薬として使用されているが、その有効性は必ずしも高くない¹⁾。これは、現在用いられている生菌を直接経口投与方法では、腸管への菌生着率や有効成分の分泌能が宿主腸管の状態に大きく左右されるため、効果が不安定であると考えられている。我々は、プロバイオティクスが産生する有効成分を、直接治療に用いることで安定した効果が得られると考えた。そこで本研究では、プロバイオティクス由来の活性物質を用いた新規治療法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 各種プロバイオティクスによる細胞防御蛋白 Heat shock protein(Hsp)の誘導作用および腸管保護作用の検討。

in vitro の評価系として、単層培養した Caco-2/bbe 細胞に各種プロバイオティクスの培養上清を加え、24 時間培養した後に細胞内の蛋白質を抽出し western blotting にて Hsp27 の誘導能を検討した。

また、ex vivo の評価系とマウス摘出腸管に各種プロバイオティクスを 2 時間反応させ、菌を排出し洗浄した後、腸管内腔に ³H 標識マンニトールおよびモノアミンを封入して酸化ストレス下に置いた。15 分、30 分後に腸管外に漏出したアイソトープの量を測定しマンニトールの漏出量を算出した。

(2)プロバイオティクスの培養上清からの、菌由来の特異的活性物質の同定。

Hsp27 誘導作用を持つプロバイオティクスの培養上清について、種々のカラムを用いて

分離し、各分画における Hsp 誘導を調べ、活性物質を含む分画を絞り込んだ。単一の成分まで分離した後、その分画を精製し質量分析器によってペプチドの配列を決定した。

(3) プロバイオティクス由来の特異的活性物質の生理作用の解析。

上記(2)にて同定された菌由来活性物質を化学合成して、Hsp 誘導作用、細胞内シグナル伝達系の活性化作用を Western blotting にて検討した。この際 *in vivo* の評価系に加え、前述した *ex vivo* の評価系も用いた。具体的にはマウス摘出腸管に新規乳酸菌の死菌を2時間反応させた後、腸管上皮から蛋白を抽出し、Hsp の発現を Western blotting にて調べた。

(4) プロバイオティクス由来の特異的活性物質の作用機序における細胞膜トランスポーターの関与についての検討。

菌由来活性物質の分泌は細胞膜トランスポーターを介して行われることから、ヒト上皮細胞にも菌由来活性物質を輸送する細胞膜トランスポーターが存在するとの予測から、アイソトープや FITC で標識した菌由来活性物質の上皮細胞への取り込みを調べた。その際、炎症性腸疾患で高頻度に遺伝子多型が認められる細胞膜トランスポーター、Novel organic cation transporter 2 (OCTN2)²¹ の関与について検討した。

(5) 炎症性腸疾患モデルに対するプロバイオティクス由来の特異的活性物質の治療効果の検討。

2% DSS を飲水中に混合し、6 日間投与して後に 100nM の CSF および PBS を注腸投与した。48 時間後にマウス体重を測定後、大腸を摘出し長さを計測した。また、直腸部の HE 染色標本を作製し、組織学的な炎症の程度を Berg らの histological score を用いて数値化し評価

した。また、4% DSS を飲水中に混合し、10nM CSF および PBS を 48 時間毎に注腸投与し、各群における生存期間を調べた。

CSF のサイトカイン、ケモカイン誘導調節能を明らかにする目的で、Caco-2/bbe cells を 100nM CSF, TNF・あるいはその両者にて処理し、24 時間培養した後、培養液中に放出された種々のサイトカイン、ケモカインを protein array および western blots にて検出した。

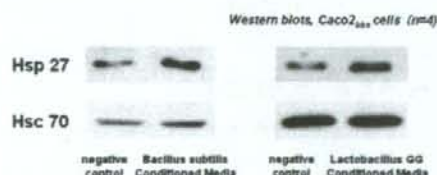
C. 研究結果

(1) 各種プロバイオティクスによる細胞防御蛋白 Heat shock protein(Hsp)の誘導作用の検討。

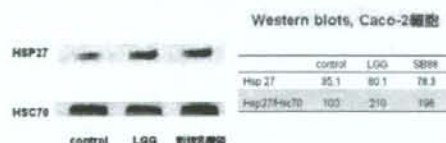
バシラス菌や乳酸菌には、Caco-2/bbe 細胞に Hsp27 誘導作用を有する菌種が存在した (Figure 1)。

Figure 1 *in vitro* 評価系にて、(a) *B. subtilis*, *Lactobacillus GG* および (b) 新規乳酸菌は腸管上皮細胞 (Caco-2/bbe cells) に Hsp27 の誘導作用を認めた。

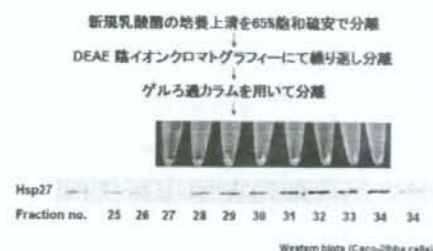
a



b



また、これらの菌株について、*ex vivo* における Hsp の誘導作用および腸管保護作用を検討した。その結果、*Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) の培養上清および新規乳酸菌の死菌に、Hsp 誘導作用、酸化ストレスに対する



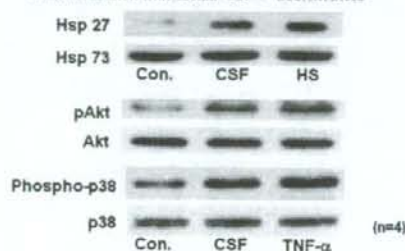
(3) プロバイオティクス由来の特異的活性物質の生理作用の解析。

(2) の検討によって同定に成功した、*B. subtilis* 由来の活性ペプチド CSF を化学合成し、生理作用を解析した。その結果、CSF は Caco-2/bbe 細胞に Hsp を誘導し、Akt および p38 MAPK 経路を活性化することが分かった (Figure 6)。

Figure 6

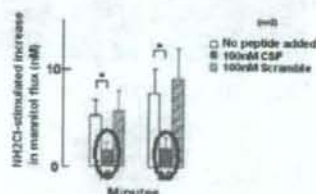
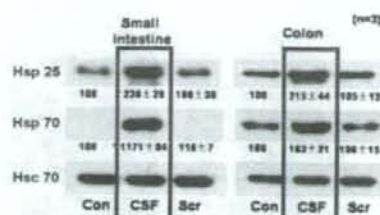
***B. subtilis* が分泌する CSF は
Hsp 27, pAkt, p38 MAPK を誘導する
(Caco-2/bbe cells)**

24hrs incubation with 100nM CSF → western blots



CSF は *ex vivo* の評価系においても同様に Hsp の誘導作用を認め、さらに酸化ストレス下で腸管保護作用を発揮した (Figure 7)。

Figure 7 CSF は正常マウスの小腸および大腸に Hsp25 および 70 を誘導した (上段)。また、NH₄Cl による酸化ストレスに対して腸管保護作用を発揮した。(Scr and Scramble; 無作為配列の pentapeptide)

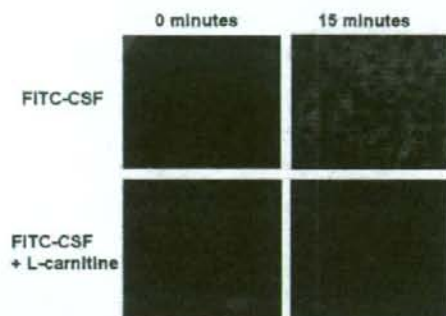


以上から、CSF は *B. subtilis* の腸管保護作用を仲介する生理活性物質であることが明らかとなった。

(4) プロバイオティクス由来の特異的活性物質の作用機序における細胞膜トランスポーターの関与についての検討。

CSF は *B. subtilis* の細胞膜トランスポーターによって輸送されることから、ヒト上皮細胞にも菌由来活性物質を輸送する細胞膜トランスポーターが存在すると予測し、アイソトープや FITC で標識した菌由来活性物質の上皮細胞への取り込みを調べた。その結果、Caco-2/bbe 細胞に速やかに吸収されることが明らかになった。また、この取り込みは OCTN2 の阻害剤で著しく減少した (Figure 8)。以上から、CSF は OCTN2 を介して腸管上皮細胞に取り込まれる可能性が示唆された。

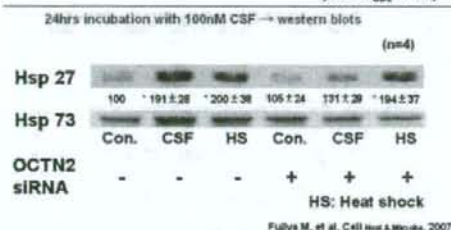
Figure 8 FITC 標識 CSF は 15 分後に Caco-2/bbe 細胞の細胞質内に取り込まれた。この取り込みは OCTN2 の阻害剤である L-carnitine によって減少した。



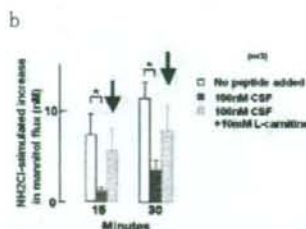
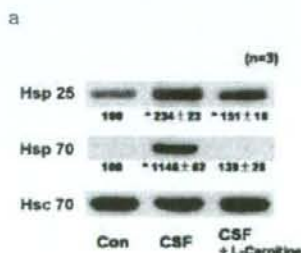
また, *in vitro* の評価系において CSF の Hsp 誘導作用は, OCTN2 の特異的 siRNA によって阻害された (Figure 9).

Figure 9

OCTN2 siRNAはCSFの Heat shock protein誘導作用を減弱する (Caco2_{BBE} cells)



同様に *ex vivo* の評価系において, CSF の生理作用における OCTN2 の関与について検討した. その結果, CSF の Hsp 誘導作用および腸管保護作用は OCTN2 の阻害剤である L-carnitine によって抑えられた (Figure 10). Figure 10 マウス摘出腸管を用いた *ex vivo* の評価系において, (a) CSF の Hsp 誘導作用 および (b) CSF の腸管保護作用は OCTN2 の阻害剤である L-carnitine によって抑えられた.



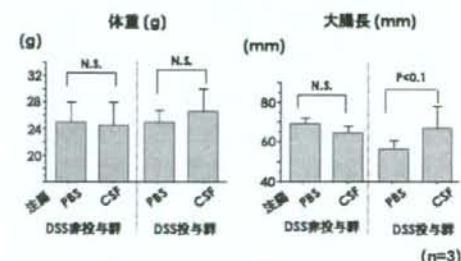
以上から, CSF の生理活性は OCTN2 による腸管上皮細胞への取り込みを介して発揮されることが明らかになった. 前述したように, OCTN2 は炎症性腸疾患患者に高感受性の遺伝子多型があることが知られている. この OCTN2 の輸送機能が, CSF の生理作用を仲介していることから, CSF の腸管保護活性が炎症性腸疾患治療として応用できると考え次項の検討を行った.

(5) 炎症性腸疾患モデルに対するプロバイオティクス由来の特異的活性物質の治療効果の検討.

炎症性腸疾患モデルのひとつである DSS 腸炎における CSF の治療効果を検討した. CSF は注腸投与を行った. その結果, 両群間で体重には変化はなかったが, CSF 投与群ではコントロール群に比べて腸管が長い傾向にあった (Figure 11). すなわち, 炎症による腸管の短縮が改善されていた.

Figure 11

各群における体重と大腸長



組織学的にも, コントロール群に比べ CSF 群で有意に障害の程度が軽く, CSF による抗炎症効果が示唆された (Figure 12, 13).

Figure 12

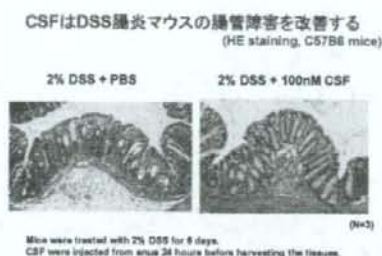
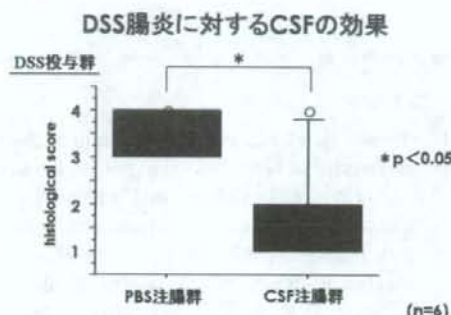


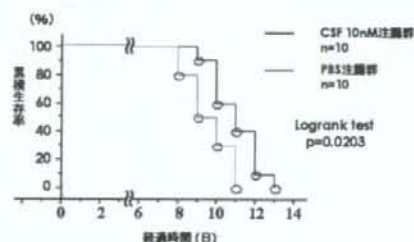
Figure 13



4%DSS経口投与による腸炎マウスを用いて、致死性のDSS腸炎マウスモデルにおけるCSFの延命効果の検討した。その結果、CSF投与群では、コントロール群に比し有意に生存期間が長かった (Figure 14)。

Figure 14

DSS colitis modelに対するCSFの生存期間延長効果



TNF- α 処理 Caco-2/bbe cells を用いて、CSF のサイトカイン、ケモカイン誘導調節の検討した。その結果、TNF- α 処理 Caco-2/bbe cells において、CSF 投与群では、PBS 群に比較して CXCL-1 の誘導が抑制された。一方、両群でその他のサイトカインやケモカイン発現には大

きな差は無かった。また、CXCL-1 の発現を Western blots 検討した結果でも、同様に CSF 投与群において CXCL-1 の誘導が抑制されていた (Figure 15, 16)。

Figure 15

CSFは腸管上皮細胞において
TNF α によるCXCL-1の誘導を抑制する
(Caco2_{bbe} cells)

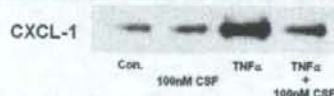
24hrs incubation with or without TNF α and/or 100nM CSF $\rightarrow$ Protein array



Figure 16

CSFは腸管上皮細胞において
TNF α によるCXCL-1の誘導を抑制する
(Caco2_{bbe} cells)

24hrs incubation with or without TNF α and/or 100nM CSF $\rightarrow$ western blot (x=2)



以上から、CSFには白血球遊走因子である CXCL-1 の発現を抑えることで、抗炎症活性を発揮する可能性が示唆された。

D. 考察

本研究により、プロバイオティクスである *Bacillus subtilis* 菌由来の活性物質 CSF を同定することに成功した。これは、腸管保護作用を持つ菌由来の特異的活性物質を同定した世界で初めての研究成果である。また、CSF の作用が、クローン病高感受性の遺伝子多型を有する上皮細胞膜トランスポーター OCTN2 によって仲介されることも明らかにした。さらに、CSF は炎症性腸疾患モデルにおける腸管障害に対して治療効果を有することが明らかとなった。以上から、CSF の腸管障害に対

する改善効果は炎症性腸疾患の新しい治療法となる可能性が示唆された。

また、その他のプロバイオティクスが産生する活性ペプチドについても探索し、我々が入手した新規乳酸菌の死菌および培養上清に腸管保護作用があることをつきとめた。さらに培養上清中に活性物質が存在することが判明し、現在その構造解析を行っている。この新規乳酸菌の死菌および菌由来活性物質を用いることで、画期的な炎症性腸疾患治療法の開発が期待される。

以上の研究成果を基に次年度からヒト臨床試験を行い、本治療法の有効性を検証する予定である。

E. 結論

本研究成果から得られた菌由来の活性物質を用いた新規プロバイオティクス療法は、新しい炎症性腸疾患治療法として臨床応用が期待される。

CSF は腸内常在菌である *B. subtilis* から分泌されるペプチドであることから、有害事象の発生は最小限に留まると予想される。また、CSF は5つのアミノ酸が直鎖状に並んだ極めて安定な構造を呈しており、安価に作成でき、容易に保存できるものと推測される。CSF を用いた炎症性腸疾患治療は、安価で、有効性、安全性が高い画期的な治療法となりうることが示唆された。

新規乳酸菌由来の活性物質については、現在解析中であり、その構造が決定しだい、炎症性腸疾患治療への応用の可能性を追求していく。以上の研究成果を基に、次年度からヒト臨床試験を実施し、その効果を検証する予定である。

F. 参考文献

1. McFarland LV. *Am J Gastroenterol.* 2006 Apr;101(4):812-22.
2. Peltekova VD, et al. *Nature Genetics*, 2004.
3. Fujiya M, Kohgo Y, et al. *Cell Host Microbe*, 2007.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

論文発表

1. Tanabe H, et al. Denatured human alpha-defensin attenuates the bactericidal activity and the stability against enzymatic digestion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 358 (1): 349-55.
2. Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, Hu S, Alverdy J, Kohgo Y, Schneewind O, Jabri B, Chang EB. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* 1(4): 299-308, 2007.
3. Takahashi H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Ashida T, Kohgo Y, Iizuka H. Psoriasiform and pustular eruption induced by infliximab. *J Dermatol.* 34(7): 468-72, 2007.
4. Iuchi Y, Torimoto Y, Sato K, Tamura Y, Jimbo J, Inamura J, Shindo M, Ikuta K, Ohnishi K, Kohgo Y. Combined use of dendritic cells enhances specific antileukemia immunity by leukemia cell-derived heat shock protein 70 in a mouse model with minimal residual leukemia cells. *Int J Hematol.* 2006; 84(5):449-58.
5. 蘆田知史, 高後 裕. 【炎症性腸疾患治療の up to date】炎症性腸疾患における新規治療. *臨床消化器内科* 23 巻 5 号: 633-638, 2008.
6. 高後 裕, 蘆田知史, 本谷 聡, 武田宏司, 坂牧純夫. 新しい IBD 診療の飛躍に向かって 北海道地区編 研究班プロジェクト「啓蒙活動」のモデルケースとし

- て. IBD Research 2巻2号: 100-111, 2008.
7. 藤谷幹浩, 高後 裕. 腸細胞の有機カチオントランスポーターとその解析法. 分子消化器病 5(3): 64-72, 2008.
8. 田邊裕貴, 前本篤男, 綾部時芳, 河野透, 蘆田知史, 高後 裕. 【消化器病と Innate Immunity】 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巻2号: 110-115, 2007.
9. 藤谷幹浩, 齊藤裕輔, 野村昌史, 稲場勇平, 佐藤 龍, 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. 各論 4. 大腸 8) 炎症性腸疾患の拡大内視鏡観察. 胃と腸 42 (5): 833-841, 2007.
10. 藤谷幹浩, 高後 裕. Q&A 専門医に聞く IBD クロウン病の小腸病変の評価法について教えてください. J of Inflammatory Bowel Disease Research (IBD Reseach). 1 (3): 230-233, 2007.
11. 渡 二郎, 佐藤 龍, 田邊裕貴, 今野陽高, 石川千里, 稲場勇平, Amen H. Zaky, 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.
12. 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発例の予測 “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(13), 1894-1902, 2007.
13. 岡本耕太郎, 石川千里, 金野陽高, 村松司, 盛一健太郎, 高後 裕. 【下部消化管の緊急内視鏡】 小腸出血をきたしたクロウン病 (CD) の 1 例 早期大腸癌 (1343-2443) 10 巻 1 Page58-59 (2006. 01)
14. 佐藤 龍, 石川千里, 金野陽高, 稲場勇平, 村松 司, 高後 裕. 【下部消化管の緊急内視鏡】 潰瘍性大腸炎 (UC) の出血 : 早期大腸癌 (1343-2443) 10 巻 1 Page56-57 (2006. 01)
15. 高後 裕, 渡 二郎. 遺伝子異常からみた消化器がん検診の今後 日本消化器がん検診学会雑誌 2006 44(11): 6578-586. 学会発表
1. Hiroki Tanabe. Precursor processing of human defensin-5 is essential to the physiological functions in vivo and in vitro. 2009 International symposium on Regulatory Peptide 2009. 01. 27
2. Nobuhiro Ueno, Kentaro Moriichi, Katsuya Ikuta, Youkou Konno, Chisato Ishikawa, Takahiro Ito, Ryu Sato, Kotaro Okamoto, Hiroki Tanabe, Atsuo Maemoto, Kazuya Sato, Mikihiro Fujiya, Jiro Watari, Toshifumi Ashida, Yusuke Saitoh, Yutaka Kohgo. Endoscopic auto fluorescence imaging is useful for detecting colonic small lesions of lymphoma resembling lymphoid hyperplasia. DDW 2008 (ASGE), San Diego (米国), 2008. 05. 18.
3. Nata T, Fujiya M, Mizukami Y, Ueno N, Moriichi K, Okamoto K, Ashida T, Kohgo Y. microRNA 146 activates NFkB pathway and possibly modulates intestinal inflammation. 2nd JUCC(The 2nd Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology), Tokyo, 2008. 11. 20.
4. Fujiya M, Kohgo Y. Novel organic cation transporter 2 (OCTN2) transports probiotics-produced peptides and modulates intestinal homeostasis. 2007 US-Japan GI liver meeting. Kyoto, 2007. 06. 22.
5. Maemoto A, Ayabe T, Tanabe H, Inaba Y, Ashida T, Fukaya R, Sakai N, Kono T, Kohgo Y. Down-regulation of Paneth cell α -defensin expression and function in patients with Crohn's disease. DDW 2007 (AGA), Washington DC, 2007. 05. 22.
6. Maemoto A, Tanabe H, Inaba Y, Ito T, Ashida T, Ayabe T, Kohgo Y. Disruption of innate immunity in Crohn's disease. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, 2007. 7. 10.
7. Tanabe H, Maemoto A, Ayabe T, Kono T, Watari J, Ashida T, Kohgo Y. Human enteric defensin induces acquired immunity through activation processing. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, 2007. 7. 10.
8. Fujiya M, Kohgo Y. Magnifying colonoscopy in ulcerative colitis. Special Seminar, Chicago, 2006. 02. 02.
9. 藤谷幹浩, 岡本耕太郎, 蘆田知史, 高後

- 裕. クローン病術後症例におけるインフリキシマブの効果. 第5回日本炎症性腸疾患研究会, 東京, 2009. 02. 07.
10. 盛一健太郎, 藤谷幹浩, 上野伸展, 金野陽高, 石川千里, 稲場勇平, 伊藤貴博, 岡本耕太郎, 田邊裕貴, 佐藤 龍, 渡 二郎, 高後 裕. 大腸病変診断における自家蛍光内視鏡の有用性について. 第38回日本消化器がん検診学会, 札幌, 2008. 07. 12.
 11. 藤谷幹浩, 高後 裕. 腸管上皮細胞膜トランスポーターOCTN2 を介した新しい宿主-腸内細菌相互作用の解明. 第46回小腸研究会, 2008. 11. 29.
 12. 岡本耕太郎, 蘆田知史, 高後 裕. クローン病術後症例におけるInfliximabの治療効果. 第50回日本消化器病学会大会, 東京, 2008. 10. 3.
 13. 田邊裕貴, 他. ヒト大腸癌における α -defensin発現はMAPK阻害剤にて抑制される. 第95回北海道癌談話会 2008. 09. 06.
 14. 田邊裕貴, 他. 腸管粘膜における抗菌ペプチドの役割. 平成20年度北海道腸内細菌叢研究会 2008. 9. 19.
 15. 藤谷幹浩, 蘆田知史, 高後 裕. ビデオシンポジウム2 新しい内視鏡診断の可能性-機器進歩-「AFIを用いた新しい炎症性腸疾患診断の可能性と数値化の試み」. 第73回消化器内視鏡学会, 東京, 2007. 05. 08.
 16. 盛一健太郎, 藤谷幹浩, 川内宏仁, 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, 渡 二郎, 蘆田知史, 高後 裕. 粘膜微細所見による潰瘍性大腸炎の活動性評価, 再燃予測およびAFIによる定量化の試み. 第73回消化器内視鏡学会, 東京, 2007. 05. 10.
 17. 前本篤男, 藤谷幹浩, 高後 裕. 炎症性腸疾患と内因性抗菌ペプチドに関する検討. 北海道腸内細菌叢研究会, 札幌, 2007. 9. 11.
 18. 藤谷幹浩, 蘆田知史, 高後 裕. シンポジウム18 腸管内環境と消化管機能「腸管保護作用を有するプロバイオティクス産生物質の同定と腸疾患治療への応用」. 第49回日本消化器病学会大会, 第38回日本消化吸収学会総会, 神戸, 2007. 10. 20.
 19. 藤谷幹浩, 岡本耕太郎, 上野伸展, 奈田利恵, 蘆田知史, 高後 裕, Eugene B. Chang. シンポジウム「消化器疾患におけるTranslational Research」プロバイオティクス由来の活性物質を用いた新しい腸疾患治療薬の開発. 国際科学振興財団フォーラム 分子消化器病学会研究会 第15回浜名湖シンポジウム, 浜松, 2007. 12. 22.
 20. 石川千里, 田邊裕貴, 金野陽高, 稲場勇平, 村松司, 佐藤 龍, 盛一健太郎, 岡本耕太郎, 前本篤男, 藤谷幹浩, 渡 二郎, 蘆田知史, 高後 裕. Crohn病におけるGM-CSFの腸管上皮細胞に対する作用機序の検討. 第48回日本消化器病学会大会, 東京, 2006. 10. 13.
1. 知的所有権の取得状況
 1. 特許取得
 - ・ PCT/JP2009/000207「消化器癌に対する抗腫瘍剤」(出願中)
 - ・ 麦芽乳酸菌を用いた腸管保護剤(特願2008-22753)(出願中)
 - ・ Small bacteria-derived signaling molecules that mediate intestinal mucosal homeostasis. (出願準備中)
 2. 実用新案登録
 - なし.
 3. その他
 - なし.

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

研究分担者 中村 和彦 九州大学大学院医学研究院病態制御内科学 助教

研究要旨：潰瘍性大腸炎（UC）に対する血球成分除去療法において、大腸炎を誘導するエフェクター細胞に加えて、大腸炎を抑制・制御する制御性細胞も同時に除去されていると考えられる。我々は血球成分除去療法産物より CD4⁺CD25^{high} 制御性 T 細胞（Treg）を分離し患者へ輸注する新しいコンセプトの治療法「血球成分除去・Treg 分離移入療法」を考案し、施行に必要な Treg の無菌的大量分離法を、Miltenyi Biotec 社 CliniMACS 細胞分離システムを用いて検討した。更に、*in vitro* で Treg の培養増殖、誘導が可能かどうか検討した。また、移入 Treg の腸管へのトラフィック効率の観点から、培養／誘導 Treg の腸管ホーミングレセプター発現を解析した。血球成分除去療法産物より CliniMACS CD8 Reagent、CliniMACS CD19 Reagent を用いて CD8⁺ T 細胞、B 細胞を除去した。その後 CliniMACS CD25 Reagent を用いて Treg 分画を分離した。CD8⁺ T 細胞、B 細胞は、ほぼ完全に除去された。CD4⁺CD25^{high} T 細胞の割合は、分離前 1.96% から分離後 56.6% と上昇し、回収率も良好であった。Treg 分画は Treg 特異的転写因子 FOXP3 を高度に発現しており、T 細胞増殖抑制能を示した。CliniMACS で分離された Treg 分画と、対照として CD4⁺CD25⁺ T 細胞を IL-2 存在下、または IL-2+TGF- β 1 存在下に刺激培養し、各群共に良好な増殖率を示した。Treg 分画は培養後も FOXP3 発現を維持し、T 細胞増殖抑制能を保持していた。CD4⁺CD25⁺ T 細胞は IL-2 存在下での培養後は Treg の性質を有していなかったが、IL-2+TGF- β 1 存在下で FOXP3 発現が誘導され、T 細胞増殖抑制能を示した。TGF- β 1 存在下に培養増殖した Treg、および non-Treg から誘導した Treg は、腸管ホーミングレセプターの α E β 7 インテグリン、 α 4 β 7 インテグリンを高発現していた。血球成分除去療法産物より CliniMACS を用いて Treg を無菌的に大量に機能を保持した状態で分離可能であった。分離に用いた CliniMACS 製品は全て CE 認証されており、「血球成分除去・Treg 分離移入療法」の臨床試験施行の環境が整ったと考えられる。臨床応用に向けて「UC に対する血球成分除去・Treg 分離移入療法・第 I 相臨床試験」のプロトコールを作成した。対象は「20 歳以上でステロイド抵抗性あるいは依存性の活動期 UC のため血球成分除去療法による治療を受ける患者」で、最終の血球成分除去療法（遠心分離法）に引き続き、Treg を分離し、患者へ輸注する事とした。Treg 分離は九州大学病院 GMP 施設で行う。主要評価項目は Treg 分離移入療法の副作用の有無、副次的評価項目は治療効果とした。予定症例数は 6 例で、初期の 3 例で安全性が確立されれば、移入細胞数を増加する dose escalation study とした。「血球成分除去・Treg 分離移入療法」は施行可能であり、倫理委員会の承認を得て、第 I 相臨床試験を行い、その安全性、有効性を検討する事が望まれる。また、CliniMACS 分離 Treg は *in vitro* で機能を保持した状態で培養増殖が可能であり、更に non-Treg からの Treg 誘導も可能であった。培養 Treg 移入の安全性が確立されれば、将来的には培養 Treg 大量移入療法が施行可能である事が示唆された。更に TGF- β 1 存在下に培養／誘導された Treg は腸管ホーミングレセプターを高発現し、移入後の腸管へのトラフィック促進により、より高い効果が期待された。

共同研究者

高柳涼一¹ 秋徳裕唯¹ 豊嶋崇徳²

赤司浩一² 谷 憲三朗³

所属

九州大学大学院医学研究院病態制御内科学¹

九州大学病院遺伝子・細胞療法部²

九州大学生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野³

A. 研究目的

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

血球成分除去療法はわが国で開発された治療法であり、中等症以上の活動期 UC に対して単独またはステロイドとの併用で効果が期待できる。薬物療法に比べて長期的な副作用が少ない利点があるが、有効率は 60~70%程度で無効例も多い。また、寛解導入後に多くの症例で再燃を来す。血球成分除去療法の作用機序は、十分に解明されていないが、白血球中には大腸炎を誘導する colitogenic な細胞に加えて、大腸炎を抑制・制御する制御性細胞も存在し、既存の血球成分除去療法では両者とも同様に除去されている事が、効果を限定的にしている一因かも知れない。制御性細胞の中でも CD4⁺CD25^{high} 制御性 T 細胞 (Treg) は広範な免疫反応を抑制・制御する事で知られ、炎症性腸疾患動物モデルで腸炎を著明に抑制する事から炎症性腸疾患治療への応用が期待される。我々は、活動期 UC では末梢血中の Treg の割合が低下している事を報告した¹。

Treg の不足が大腸炎の増悪に関連している可能性が示唆される。UC 患者では Treg の機能は保たれていると考えられるので^{2,3}、Treg 移入療法が UC の治療法として有用である事が示唆される。我々は Treg 移入療法を既存の血球成分除去療法と組み合わせて行う事より更に有効性を高められるのではないかと考え、血球成分除去療法産物より Treg を分離し患者へ輸注する「血球成分除去・Treg 分離移入療法」を考案した。血球成分除去療法産物より無菌的・大量に Treg が分離可能であれば、本治療法は施行可能である。よって、我々は、臨床応用可能なグレードでの Treg 分離法に関して検討した。また、大腸炎を抑制するためにどれだけの Treg を移入する必要があるか、現時点では不明である。Treg の *in vitro* で培養増殖、誘導が可能であれば、より大量の Treg 移入が可能となる事が期待される。そこで、我々は Treg が *in vitro* で培養増殖、または誘導可能であるかどうか検討した。更に、移入 Treg の腸管へのトラフィック効率の観点から、腸管ホーミングレセプター発現を解析した。最後に臨床応用に向けて「UC に対する血球成分除去・Treg 分離移入療法」の臨床試験を計画し、プロトコルを作成した。

B. 研究方法

Miltenyi Biotec 社の臨床応用を目的とした磁気ビーズ細胞分離システム ClinMACS を用いて Treg 分離を行った。UC 患者に対して遠心分離法による血球成分除去療法を Hemonetics 社成分採血装置 CCS を用いて行った。分離された白血球より ClinMACS CD8 Reagent (CD8 に対する磁気ビーズ) と ClinMACS CD19 Reagent (CD19 に対する磁気ビーズ) を反応させ、ビーズの付着していない細胞を ClinMACS Instrument を用いて回収

した。次に、回収した細胞にCliniMACS CD25 Reagent (CD25に対する磁気ビーズ) を反応させ、ビーズの付着した細胞を回収し、Treg分画を得た。全ての細胞分離工程は閉鎖回路内で無菌的に行われた。

分離前後の細胞におけるCD8⁺ T細胞、B細胞、CD4⁺CD25^{high} T細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。また、Treg特異的転写因子FOXP3発現細胞のCD4⁺ T細胞における割合を、細胞内染色を行いフローサイトメトリーで解析した。

分離したTreg分画の免疫制御機能を解析した。通常のCD4⁺ T細胞、分離したTreg分画および両者を抗CD3抗体とマイトマイシン処理したAPCで刺激し、細胞増殖の程度を³Hサイミジンの取り込みで解析した。

分離したTreg分画および対照としてCD4⁺CD25⁻ T細胞 (non-Treg) を抗CD3抗体・抗CD28抗体付着ビーズを用いてIL-2存在下、またはIL-2+TGF- β 1存在下に10日間刺激培養し、細胞数をカウントした。14日間のresting後に培養細胞におけるFOXP3発現細胞の割合、培養細胞の免疫制御機能を前述の方法で解析した。

培養細胞をFITC-抗 β 7インテグリン抗体、PE-抗 α Eインテグリン抗体(または、PE-抗 α 4インテグリン抗体)、PE-Cy5-抗CD4抗体で染色し、腸管ホーミングレセプターである α E β 7インテグリン、 α 4 β 7インテグリンの発現をフローサイトメトリーで解析した。

「UCに対する血球成分除去・Treg分離移入療法 第I相臨床試験」のプロトコールを作成した。

(倫理面への配慮)

血球成分除去療法産物からのTreg分離実験に関して平成17年3月31日九州大学医学研究院等倫理委員会の承認を受けた。研究に

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

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

C. 研究結果

計5回のCliniMACSによるTreg分離実験を行った。CD8⁺ T細胞とCD20⁺ B細胞は、分離前、それぞれ9.9% (7.1~12.3%) と9.2% (2.9~14.5%) 含まれていたが、分離後にはそれぞれ0.0029% (0~0.0081%) と0.022% (0~0.053%) とほぼ完全に除去された。分離前、CD4⁺CD25^{high} T細胞の割合は1.96% (1.0~3.3%) であったが、分離後には56.6% (39.2~74.1%) と高い割合に濃縮された。回収率は、67.8% (48.8~87.4%) であり、平均 6.0×10^7 個のCD4⁺CD25^{high} T細胞が一回の血球成分除去産物より分離された。CD4⁺ T細胞中のFOXP3⁺細胞の割合は分離前5.5% (0.4~10.4%) であり、分離後は56.4% (51.3~66.6%) であった。分離されたTreg分画の抗CD3抗体+APC刺激による細胞増殖は、通常のCD4⁺ T細胞の17.7%と低下しており、CD4⁺ T細胞とTreg分画の共

培養により細胞増殖は有意に抑制された。

*in vitro*での培養実験では、Treg 分画と CD4⁺CD25⁻ T 細胞共に、10 日間で 12~20 倍程度の良好な増殖率を示した。Treg 分画は IL-2 存在下に刺激培養後、53.3%の細胞が CD25⁺FOXP3⁺であり、培養前の FOXP3 発現レベルが維持された。Treg 分画を IL-2+TGF- β 1 存在下に培養後、73.3%の細胞が CD25⁺FOXP3⁺であった。CD4⁺CD25⁻ T 細胞は IL-2 存在下の培養では 11.9%が CD25⁺FOXP3⁺であったが、IL-2+TGF- β 1 存在下では 59.0%と CD25⁺FOXP3⁺細胞の割合が増加した。IL-2 存在下および IL-2+TGF- β 1 存在下に培養された Treg 分画は共に抗 CD3 抗体+APC 刺激に対して低応答であり、共培養にて CD4⁺ T 細胞の増殖を抑制した。IL-2 存在下に培養した CD4⁺CD25⁻ T 細胞は、刺激に反応して通常の CD4⁺ T 細胞と同程度の増殖を示し、共培養にて CD4⁺ T 細胞増殖を抑制しなかったが、IL-2+TGF- β 1 存在下に培養したものは、同刺激に低応答であり、共培養で CD4⁺ T 細胞増殖を抑制した。

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

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

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

を検討する。

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

下記条件の患者を除外する。

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

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

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

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

調査項目:下記項目を調査、検討する。

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

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

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

D. 考察

CliniMACS を用いた細胞分離により CD4⁺CD25^{high} T 細胞が高い割合で大量に分離可能であった。分離された細胞は Treg 特異的マーカーである FOXP3 を発現しており、また、T 細胞増殖抑制能を有していた。回収率も高い値であった。CliniMACS を用いて血球成分除去療法産物より Treg を無菌的に大量に機能を保持した状態で分離可能であり、「血球成分除去・Treg 分離移入療法」が施行可能であると考えられた。

最近、CliniMACS CD25 Reagent が CE 認証され、今回の分離実験に使用した全ての CliniMACS 試薬、装置、回路等が CE を取得済みである。また、ドイツで造血幹細胞移植後の患者に CliniMACS で分離されたドナー Treg を輸注する臨床試験が進行中であり、大きな副作用は見られていない様である⁴。以上より潰瘍性大腸炎患者に対して「血球成分除去・Treg 分離移入療法」の臨床試験を行う環境が整ったと考えられる。

CliniMACS で分離した Treg 分画は IL-2 存在下の刺激培養で、良好な増殖率を示し、また、FOXP3 発現、免疫制御機能も維持された。IL-2+TGF- β 1 存在下の培養では、FOXP3 の発現率は更に上昇し、免疫制御機能も認められた。以上より CliniMACS 分離 Treg は *in vitro* で機能を保持した状態で培養増殖可能であった。腸管には多数の免疫担当細胞が存在する。大腸炎を抑制するためにどれだけの Treg を

移入する必要があるか現時点では不明であり、培養細胞移入の安全性が確立されれば、より大量の培養 Treg 移入が可能である事が示された。米国では造血幹細胞移植時に *in vitro* で培養増殖したドナー Treg を輸注する臨床試験が予定されており⁴、今後、培養 Treg 移入に関する有用な情報がもたらされる事を期待したい。また、CD4⁺CD25⁺ T 細胞を IL-2+TGF- β 1 存在下に刺激培養する事により、FOXP3 発現と免疫制御機能が誘導され、*in vitro* で Treg が誘導されたものと考えられた。誘導された Treg と自然発生した Treg が同一のものかどうかは、より詳細な検討が必要であるが、将来的には誘導 Treg を用いた治療が施行できる可能性も示唆された。

Treg 分離移入療法の大腸炎抑制効果には、移入された Treg が効率よく腸管へ移動することが必要である。TGF- β 1 は α E、 β 7 インテグリンの発現誘導因子である^{5,6}ことが知られており、TGF- β 1 による Treg 上の腸管ホーミングレセプターの発現誘導を検討したところ、 α E β 7 インテグリンのみならず、 α 4 β 7 インテグリン発現も増強した。よって、TGF- β 1 存在下に *in vitro* で培養、または誘導した Treg を治療に用いる利点として、より大量の Treg 移入が可能となる事と共に、腸管ホーミングレセプター発現誘導により腸管へのトラフィックを促進できる可能性が示唆された。

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

我々は「UCに対する血球成分除去・Treg分離移入療法 第I相臨床試験」のプロトコールを作成した。今後、九州大学病院GMP施設を用いて、最終的なvalidationを行い、その結果をもって倫理委員会の審査を受け、承認後に臨床試験を行う予定である

E. 結論

血球成分除去療法産物よりTregを臨床応用可能なグレードで分離可能であり、「UCに対する血球成分除去・Treg分離移入療法」の臨床試験施行の環境が整った。今後、臨床試験を行い、その安全性、有効性を検討する事が望まれる。

また、培養細胞移入の安全性が確立されれば、培養Tregの大量移入療法が可能となり、より高い効果が期待できる。

F. 参考文献

1. Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H: An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2006; 51: 677-686.
2. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R: Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺CD25^{high} T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878.
3. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Watanabe M: CD4⁺CD25^{high} T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *Journal of Immunology* 2004; 173 (5): 3119-3120.
4. Roncarolo MG, Battaglia M: Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in

humans. *Nature Reviews. Immunology* 2007; 7: 585-598.

5. Smith TJ, Ducharme LA, Shaw SK, Parker CM, Brenner MB, Kilshaw PJ, Weis JH. Murine M290 integrin expression modulated by mast cell activation. *Immunity* 1994; 1: 393-403.
6. Lim SP, Leung E, Krissansen GW. The beta7 integrin gene (Itgb-7) promoter is responsive to TGF-beta1: defining control regions. *Immunogenetics* 1998; 48: 184-95.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

論文発表

1. Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2006; 51: 677-686.
2. Nakamura K, Honda K, Mizutani T, Akiho H, Harada N. Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: Selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12: 4628-4635.
3. Sun X, Somada S, Shibata K, Muta H, Yamada H, Yoshihara H, Honda K, Nakamura K, Takayanagi R, Tani K, Podack ER, Yoshikai Y: A critical role of CD30 ligand/CD30 in controlling inflammatory bowel diseases in mice. *Gastroenterology* 2008; 134: 447-458.
4. Sumida Y, Nakamura K, Kanayama K, Akiho H, Teshima T, Ryoichi T. Preparation of functionally preserved CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells from leukapheresis products from ulcerative colitis patients, applicable to regulatory T-cell-transfer therapy. *Cytotherapy* 2008; 10: 698-710.

学会発表

1. 中村和彦, 隅田頼信, 金山兼司, 高橋 誠, 本田邦臣, 水谷孝弘, 樋口奈緒美, 吉永繁高, 板場壮一, 秋穂裕唯. 潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法開発の試み. 第 92 回日本消化器病学会総会. 小倉. 平成 18 年 4 月
2. 中村和彦, 隅田頼信, 金山兼司, 高橋 誠, 水谷孝弘, 本田邦臣, 樋口奈緒美, 吉永繁高, 板場壮一, 秋穂裕唯, 高柳涼一. 潰瘍性大腸炎に対する制御性 T 細胞を用いた新規治療法: 血球成分除去・制御性 T 細胞移入療法の開発. 第 48 回日本消化器病学会大会. 札幌. 平成 18 年 10 月
3. 隅田頼信, 中村和彦, 金山兼司, 荻野治栄, 村尾寛之, 樋口奈緒美, 多喜研太郎, 板場壮一, 秋穂裕唯, 高柳涼一. 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: 無菌的細胞分離法の確立. 第 49 回日本消化器病学会大会. 神戸. 平成 19 年 10 月.
4. 隅田頼信, 中村和彦, 金山兼司, 酒井美佳子, 井星陽一郎, 村尾寛之, 荻野治栄, 吉永繁高, 板場壮一, 秋穂裕唯, 高柳涼一. 潰瘍性大腸炎に対する制御性 T 細胞移入療法を目的とした *in vitro* での制御性 T 細胞培養増殖および誘導法の検討. 第 94 回日本消化器病学会総会. 福岡. 平成 20 年 5 月.

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

研究代表者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨：難治性炎症性腸疾患（IBD）の治療として、ステロイド剤や免疫抑制剤などの有効性が認められているが、長期投与を余儀なくされ、副作用が大きな問題となっている。我々は炎症部位に高濃度となり持続的な抗炎症作用を示し、投与量の低減化とステロイドの副作用軽減が期待される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の開発を行った。活動期 IBD 患者血清中では有意にチオレドキシン（TRX）値が高値であることより、封入する薬剤として①TRXと、免疫調節剤としての IBD 治療にも用いられている②シクロスポリンの薬剤封入カプセルの有用性につき検討した。DSS 腸炎モデルマウスに TRX 封入マイクロカプセルを投与し、病理組織学的スコアの改善傾向、ミエロペルオキシダーゼ活性の改善がみられ、腸炎抑制効果を認めた。また同様に、シクロスポリン封入マイクロカプセル（CyAMC）を投与し、CyAMC 投与群では非投与群と比較して体重、血便スコア、組織学的スコア、ミエロペルオキシダーゼ活性について改善が認められた。これらの薬剤封入マイクロカプセルは、臨床応用が可能であることが示唆された。

共同研究者

内田一茂¹ 深田憲将¹ 松下光伸¹
西尾彰功¹ 安藤祐吾¹ 田畑泰彦²
玉置敬之³ 仲瀬裕志³ 千葉 勉³
淀井淳二⁴

所属

関西医科大学内科学第三講座¹
京都大学再生医科学研究所²
京都大学大学院消化器内科学³
京都大学ウイルス研究所⁴

胞白血由来因子としてクローニングされた酸化還元反応制御能を持つ多機能分子であり^{1,2}、抗酸化ストレス、抗アポトーシス、及び抗炎症作用を有し生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている³。実験動物モデルでは、インフルエンザウイルス感染に対する抵抗性の増強や⁴アドリアマイシン心筋障害の軽減⁵など生体防御能の増強に関する報告が数多くなされているが、消化管炎症における検討は行われていない。

シクロスポリン（CyA）は強い免疫抑制機能を持つ薬剤であり潰瘍性大腸炎に効果を期待できる薬剤であるが、血中モニターが必要であり実際の臨床の場では使用の難しい薬剤である。

そこで我々は、治療応用へ向けて薬剤封入マイクロカプセルを使用したドラッグデリバリーシステムを用いて①TRXと②シクロスポリンを腸内で徐放化し血中濃度を上げること無く安全に使用する新しい治療法開発を目的とする。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎は原因不明の難治性炎症性腸疾患（IBD）であるが、近年患者数の増加とともに難治例の増加が問題となっている。局所に浸潤した炎症細胞によって引き起こされる酸化ストレスは直接的な組織障害を引き起こすことが知られているが、IBD 活動期の腸管粘膜ではこれらの増加が報告されておりその病態の発生・進展への関与が想定されている。

Thioredoxin (TRX) は淀井らにより成人 T 細

B. 研究方法

①チオレドキシン (TRX)

ゼラチンマイクロカプセルに TRX を吸収させ、PBS にて徐放実験を行い 1、2、3、6、12、24、48 時間後に徐放された TRX を ELISA 法を用いて測定した。その後、DSS 腸炎マウスに DSS 投与 3 日前から 9 日目まで phosphate buffered saline (PBS) または rhTRX 10mg/kg を含浸させたゼラチンマイクロカプセル (rtTRXMS 群、n=10) を連日注腸投与し、10 日目に腸炎を評価した。

②シクロスポリン

solvent-evaporation method (ダブルエマルジョンからの液中乾燥法) を用いてシクロスポリン封入ポリ乳酸マイクロカプセル

(CyAMC) を作製した。Phosphate buffered saline (PBS) 中で徐放実験を行い、CyA の溶出曲線を作成した。2mg/kg 相当量の CyAMC、CyA を C57BL/6 マウスに投与し、血中の CyA 濃度を測定した。DSS 腸炎マウスに 3 日目から CyA 2mg/kg、0.2mg/kg 相当量の CyA 及び CyAMC、PBS を連日経口投与し、10 日目に腸炎を評価した。

各薬剤封入カプセル投与での評価は、各日における体重変化を 0 日目の体重に対する変化率で示した。摘出した大腸の全長を計測し、糞便中の血液含有を Bloody stool score⁶⁾ に従って評価した。肛門側 1.5 cm の大腸組織を Histological scoring system⁷⁾ に従って組織学的に評価した。大腸組織のミエロペルオキシダーゼ活性は o-ジアニシジン法で測定した。(倫理面への配慮)

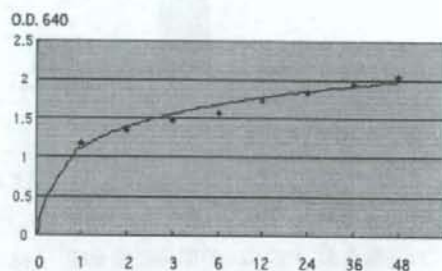
動物実験に関しては、動物実験倫理委員会の承認を得て、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力

苦痛の軽減を行うよう配慮している。

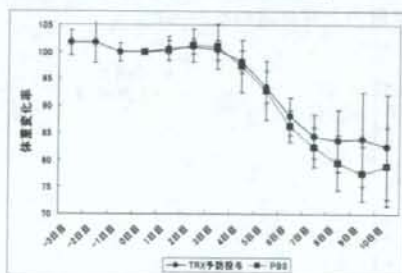
C. 研究結果

①チオレドキシン (TRX)

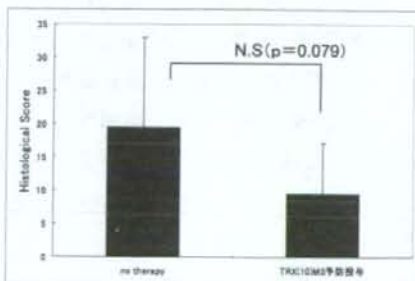
ゼラチンマイクロカプセルを用いた TRX 製剤の徐放実験では、経時的に徐放されることが確認された。



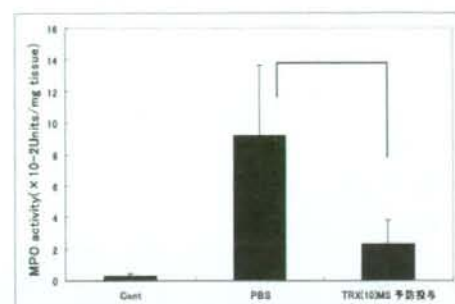
DSS 投与開始後 6 日目～10 日目の体重減少は vehicle 群に比して rtTRXMS 群で軽度であったが有意差は見られなかった。



大腸の全長は vehicle 群に比して rtTRXMS 群で長かったが有意差は認めなかった。組織学的変化は vehicle 群に比して rtTRXMS 群で軽度であったが、histological score では有意差を認めなかった。

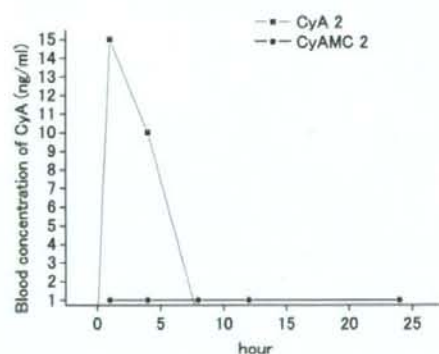


ミエロペルオキシダーゼ活性においても rtTRXMS 投与群で有意に低値であった。



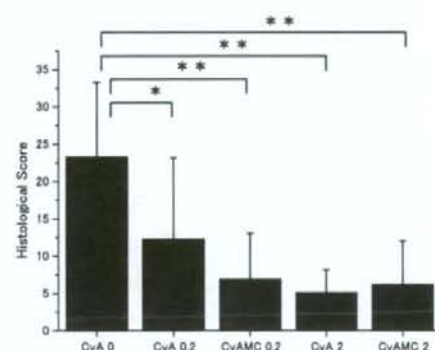
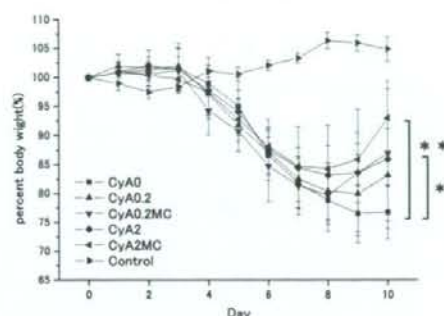
②シクロスポリン

1mg のポリ乳酸マイクロカプセルに 34 μ g の CyA を封入されていることを確認した。徐放実験において、24 時間後に約 50% の CyA が溶出していることを確認した。血中濃度の検討では CyA 投与群では 1 時間後をピークに血中濃度の上昇を認めたが、CyAMC 投与群では血中濃度の上昇を認めなかった。



DSS 投与開始後 8 日目～10 日目の体重減少は PBS 投与群に比較して、CyA(2)、CyA(0.2)MC、CyA(2)MC 投与群で有意に軽度であった。大腸の全長は PBS 投与群と比較し、長い傾向にあったが有意差を認めなかった。組織学的変化は PBS 投与群で遠位大腸を中心に、炎症細胞浸潤、クリプトの損傷を認めたが、CyA、CyAMC 投与群ではこれらは軽減しており特に CyA(2)、CyA(0.2)MC、CyA(2)MC 投与群では

histological score も有意に低値であった。また、ミエロペルオキシダーゼ活性においても、PBS 投与群に比較して CyA2mg/kg、CyAMC 投与群で有意に低値であった。



D. 考察

①チオレドキシン (TRX)

今回我々は DSS 腸炎モデルにおける TRX の腸炎抑制効果を検討し、その治療効果を示した。チオレドキシンの活性は生体内では短時間しか保たないため、経口、もしくは経直腸での投与では治療効果を期待することは難しい。ヒトへの応用を考え今回我々はゼラチンマイクロカプセルを持ったドラッグデリバリーシステムを開発した。徐放実験では 3 時間後に約 70% の TRX が徐放されることが確認された。チオレドキシンを含浸させたゼラチン