

マイクロカプセル投与により腸炎改善効果が示された。ドラッグデリバリーシステムとしてゼラチンマイクロカプセルを使用することにより、チオレドキシンの分解される時間を延長することにより腸炎の改善効果が得られたものと考えられる。

## ②シクロスポリン

DSS 腸炎に対してシクロスポリン封入マイクロカプセル投与により、シクロスポリン投与と同等の腸炎改善効果が認められた。通常投与量の1/10量投与でも、通常量投与と同等の腸炎改善効果が見られた。マクロファージに取り込まれたマイクロカプセルはマクロファージ内で分解され、その活性化が抑制され、抗原提示能が抑制されることにより炎症細胞浸潤を抑制した可能性が考えられる。

## E. 結論

ドラッグデリバリーシステムを用いてマイクロカプセルに封入したチオレドキシシンとシクロスポリンを作成した。各薬剤封入マイクロカプセルをDSS腸炎モデルマウスに投与することにより腸炎の改善がみられ、その治療効果を示した。

## F. 参考文献

1. Tagaya Y, et al.: ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *Embo J* 8:757-764, 1989
2. Powis G, et al.: Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:421-455, 2001
3. Nakamura H, et al.: Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15143-15148, 2001
4. Nakamura H, et al.: Enhanced resistancy

of thioredoxin-transgenic mice against influenza virus-induced pneumonia. *Immunol Lett* 82:165-170, 2002

5. Shioji K, et al.: Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 106:1403-1409, 2002
6. Jeffers M, et al.: A novel human fibroblast growth factor treats experimental intestinal inflammation. *Gastroenterology* 123:1151-1162, 2002
7. Williams KL, et al.: Enhanced survival and mucosal repair after dextran sodium sulfate-induced colitis in transgenic mice that overexpress growth hormone. *Gastroenterology* 120:925-937, 2001
8. Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T. Human thioredoxin-1 ameliorates experimental murine colitis in association with suppressed macrophage inhibitory factor production. *Gastroenterology* 2006;131(4):1110-21.

## G. 健康危険情報

なし

## H. 研究発表

### 論文発表

1. Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T. Human thioredoxin-1 ameliorates experimental murine colitis in association with suppressed macrophage inhibitory factor production. *Gastroenterology* 2006;131:1110-21.
2. 岡崎和一、安藤祐吾、内田一茂、藤井寿仁、松下光伸：潰瘍性大腸炎の病態。カレントセラピー2006;24:512-5.
3. 岡崎和一、大宮美香、内田一茂、藤井寿仁、松下光伸：ガイドラインを活かした潰瘍性大腸炎の外來での治療。IBD

- Research 2007;1:24-32.
4. Matsushita M, Uchida K, Okazaki K. Role of the appendix in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Inflammopharmacology* 2007;15:154-7.
  5. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Okazaki K, Ikehara S. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:826-38.
  6. 島谷昌明, 松下光伸, 若松隆宏, 大宮美香, 内田一茂, 高岡 亮, 関 寿人, 岡崎和一: パルミチン酸デキサメタゾンの静注が有効であった単純性潰瘍の一例。日本消化器内視鏡学会雑誌 2008;50:1109-14.
  7. Sumimoto K, Matsushita M, Okazaki T, Omiya M, Uchida K, Okazaki K. Crohn's disease accompanied by purulent discitis and psoas abscesses. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:728-30.
  8. Toyonaga T, Matsushita M, Matsumoto T, Fukui T, Omiya M, Uchida K, Okazaki K. Endoscopic injection therapy for a bleeding exposed vessel in Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2008;68:572-3.
  9. Ando Y, Matsushita M, Kawamata S, Shimatani M, Fujii T, Okazaki K. Infliximab for severe gastrointestinal bleeding in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:483-4.
  10. Matsushita M, Ando Y, Omiya M, Uchida K, Nishio A, Okazaki K. Association of "ulcerative appendicitis" and appendiceal adenocarcinoma. *Inflamm Bowel Dis* (in press).
  11. Matsushita M, Ando Y, Kawamata S, Omiya M, Uchida K, Nishio A, Okazaki K. Appendix in ulcerative colitis: significant involvement and pathogenesis. *Gastrointest Endosc* (in press).
- 学会発表
1. Matsushita M, Uchida K, Okazaki K: Appendix is a priming site in the development of ulcerative colitis. 12<sup>th</sup> International Conference on Ulcer Research, 2006, 7, 8, Osaka
  2. 島谷昌明, 松下光伸, 内田一茂, 田橋賢也, 大宮美香, 松本隆之, 段原直行, 若松隆宏, 福井由理, 坂尾将幸, 高橋 悠, 山科雅央, 岡崎和一: リメタゾン (リボ化ステロイド) の静注が奏効した単純性潰瘍の一例。第72回日本消化器内視鏡学会総会 (DDW)、2006、10、14、札幌
  3. 松下光伸, 大宮美香, 岡崎和一: Immunomodulator によるクローン病治療の新展開: クローン病の緩解導入・緩解維持におけるインフリキシマブの有用性と新たな治療法の可能性。第4回日本消化管学会総会、2008、2、7、大阪
  4. 豊永貴彦, 松本隆之, 鈴木 亮, 住本貴美, 若松隆宏, 福井寿朗, 大宮美香, 内田一茂, 松下光伸, 岡崎和一: 露出血管のあるクローン病の潰瘍出血に対して内視鏡的止血術が有効であった一例。第80回日本消化器内視鏡学会近畿地方会、2008、3、1、大阪
  5. 青井一憲, 大宮美香, 松下光伸, 柳川雅人, 中村尚弘, 岡崎和一: 潰瘍性大腸炎の経過中に急性膵炎を併発した一症例。第81回日本消化器内視鏡学会近畿地方会、2008、9、20、大阪
  6. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Okazaki K, Ikehara S. The 13<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo. "Adipose Tissue-Derived Stem Cells Facilitate Colonic Mucosal Recovery in Experimental Colitis Rats" 2008, Tokyo
  7. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Okazaki K, Ikehara S. "Adipose Tissue-Derived Stem Cells Facilitate Colonic Mucosal Recovery in Experimental Colitis Rats" *Digestive Disease Week* 2008, San Diego, USA.
- 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



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

研究代表者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨：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にあり、消化管粘膜の免疫異常が病態に深く関わっている。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①高分子バイオマテリアルの一種であるポリ-L-D乳酸マイクロカプセルを用いたステロイド封入マイクロカプセル（DxMC）を作成し、また②デキサメタゾンを経口投与として精製ダイズ油に溶解した既存の注射剤であるリポ化ステロイド（リメタゾン：バルミチン酸デキサメタゾン）を実際に、難治性潰瘍性大腸炎患者に投与し、これらの薬剤を用いた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研究した。DxMCは、ステロイド抵抗患者では効果が乏しかったが、ステロイド依存患者に有効であった。リメタゾンは全例で有効であり、ステロイド剤減量・中止が可能であった。明らかなDxMCやリメタゾンの副作用はなかった。従来の投与方法と比較し、DxMCやリメタゾンの投与により、副作用軽減や患者のQOL改善のみならず、医療資本の削減に寄与できる可能性がある。今後も症例を蓄積し、ドラッグデリバリーシステムの有効性と安全性を確認したいと考えている。

共同研究者

松下光伸<sup>1</sup> 西尾彰功<sup>1</sup> 内田一茂<sup>1</sup>  
大宮美香<sup>1</sup> 福井寿朗<sup>1</sup> 川股聖二<sup>1</sup>  
安藤祐吾<sup>1</sup> 深田憲将<sup>1</sup> 大植謙一<sup>2</sup>  
廣田育彦<sup>2</sup> 田畑泰彦<sup>3</sup> 仲瀬裕志<sup>4</sup>  
千葉 勉<sup>4</sup>

所属

関西医科大学内科学第三講座<sup>1</sup>  
関西医科大学薬剤部<sup>2</sup>  
京都大学再生医科学研究所<sup>3</sup>  
京都大学大学院消化器内科学<sup>4</sup>

することは臨床で極めて重要である。炎症の生じている腸管局所にステロイドを含む種々の免疫抑制剤が徐放可能となれば、副作用の少ない治療が可能となり、腸管切除の回避については炎症性腸疾患患者のQOL向上につながると思われる。

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①高分子バイオマテリアルの一種であるポリ-L-D乳酸マイクロカプセルを用いたステロイド封入マイクロカプセルを作成し、また②デキサメタゾンをバルミチン酸エステルとして精製ダイズ油に溶解した既存の注射剤であるリポ化ステロイド（リメタゾン：バルミチン酸デキサメタゾン）を実際に、難治性潰瘍性大腸炎患者に投与し、これらの薬剤を用いた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研究する。

B. 研究方法

①ステロイド封入マイクロカプセル

対象は、難治性潰瘍性大腸炎患者。左側大

A. 研究目的

近年、難病である潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管型パーチェット病などの炎症性腸疾患は増加の一途にある。その病因は不明であるものの、消化管粘膜の免疫異常が病態に深く関わっている。治療においてはステロイド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、治療薬の全身に及ぼす副作用が臨床で大きな問題となっている。従って、薬剤の選択的効果に加え、副作用を抑制

腸炎型または全大腸炎型患者 (n=10) には、デキサメサゾン封入ポリ乳酸マイクロカプセル (DxMC) 840mg/day (1mg のデキサメサゾンを含む) を、4週間隔日経口投与。左側大腸炎型患者 (n=10) には、DxMC 840mg/day を、4週間隔日注腸投与。治療評価は、投与前・2週後・4週後に臨床スコア、大腸内視鏡所見、血液・生化学検査、尿検査にて有効性および安全性を検討する。

#### ②リメタゾン

対象は、活動期炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管型ペーチェット病) で、ステロイド依存例)。対象患者に、下記治療法を無作為化して3ヶ月間施行する。投与開始2週後に有効であれば従来の全体的ステロイド剤の投与量を減量し、無効であれば他の治療法に変更する。治療法は、従来の全体的ステロイド剤投与量を再増量する (n=30)、あるいは従来の全体的ステロイド剤投与量は変更なく継続し、更にリメタゾン1管 (1ml) を1ヶ月間週1回投与し、以後の2ヶ月間は2週毎に1回投与する (n=30)。治療評価は、投与前と投与後2週毎で3ヶ月間にわたり、臨床スコア、血液・生化学検査、内視鏡所見、従来の全体的ステロイド剤の投与量変化、従来の全体的ステロイド剤の副作用変化、リメタゾンの副作用の有無について有効性および安全性を検討する。

(倫理面への配慮)

関西医科大学医学倫理委員会の承認 (第0635号及び第40611号)、関西医科大学附属枚方病院院内臨床研究審査委員会承認のうえ、説明文と同意書による同意を取得する。被験者は自由意志で研究に参加し、個人の権利を擁護し、意志を尊重する。被験者の個人情報保護し、学会や専門雑誌に発表する場合も、個人情報はわからないようにする。

### C. 研究結果

#### ①ステロイド封入マイクロカプセル

上記のプロトコールに従って、現在、ステロイド抵抗患者1例とステロイド依存患者3例の合計4例が登録されている。DxMCの効果は、ステロイド抵抗患者で効果が乏しかった。

ステロイド依存患者の2例で有効、1例で効果不明 (ステロイド減量のリバウンド、サイトメガロウイルス感染) であった。明らかな副作用はなかった。今回、4例の難治性潰瘍性大腸炎患者に DxMC を投与し、ステロイド依存患者に良い適用と考えられた。

#### ②リメタゾン

上記のプロトコールに従って、現在、潰瘍性大腸炎患者1例、クローン病患者1例、腸管型ペーチェット病患者2例が登録されている。クローン病患者は現在投与中で、リメタゾンの効果は、潰瘍性大腸炎患者で有効で、ステロイド減量可能であった。腸管型ペーチェット病患者で有効で、ステロイド中止可能であった。明らかなリメタゾンの副作用はなかった。

### D. 考察

炎症性腸疾患患者では、免疫機能が異常に働くことにより、自分自身の腸管粘膜を外敵と認識し、攻撃して破壊するという状態が続いている。そのため、中等症または重症の潰瘍性大腸炎患者の治療には、従来ステロイド剤や免疫抑制剤が用いられてきた。しかし、これらの薬物自体の長期投与は、副作用を惹き起こす頻度が多くなり、投与量の変更および投与中止を余儀なくされることがある。また、これらの薬物治療抵抗性の患者については、治療方法として腸管切除を余儀なくされる場合もある。したがって、炎症の生じている腸管局所に種々のステロイドを含む免疫抑制剤が徐放可能となれば、副作用の少ない治療が可能となり、腸管切除の回避、しいては潰瘍性大腸炎患者のQOL向上につながると考えられる。

#### ①ステロイド封入マイクロカプセル

我々は、4 $\mu$ mのマイクロカプセルという微粒子の中にステロイド剤を封入させることを開発した。マイクロカプセルの原料はポリ乳酸で、生体内で分解されると乳酸になり、最終的に水と二酸化炭素になる。従って、生体内に蓄積することはなく、現在この物質を用いた骨接合材料 (ピン、スクリュー) が臨床応用され、人体に対する安全性もすでに確



認されている。マイクロカプセルは消化管の炎症部位に、より多く取り込まれるので、炎症部位からステロイドを徐々に放出し、炎症を効率的に抑制すると考えられている。その結果、炎症腸管のみに作用し、全身に与える影響は少ないと考えられる。今回、4例の難治性潰瘍性大腸炎患者 DxMC を投与し、ステロイド依存患者に良い適用と考えられた。今後も症例を蓄積し、DxMC の有効性と安全性を確認したいと考えている

## ②リメタゾン

リポ化ステロイドであるリメタゾンは、炎症部への分布が高く、炎症部マクロファージに積極的に貪食され、その中で溶解しマクロファージの機能を効率よく抑制する。したがって、投与量の低減化により、副作用が軽減される。我々は、多施設共同による無作為化並立群間試験を計画した。今回、潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者、腸管型パーチェット病患者にリメタゾンを投与し、従来の全身的ステロイド剤が減量・中止可能であった。今後も症例を蓄積し、リメタゾンをを用いたドラッグデリバリーシステムの有効性と安全性を確認したいと考えている。

## E. 結論

従来の投与方法と比較し、①ステロイド封入マイクロカプセルや②リメタゾンなどのドラッグデリバリーシステムの有効性が認められれば、ステロイド投与量の低減化を可能とし、ステロイドの副作用軽減が期待され、社会に大きく貢献するものと予測される。

## F. 参考文献

1. Yokayama Y, Suenaga K, Kino J, Akisawa Y, Morita M, Nishimori I, Nakazawa Y, Okazaki K, Yamamoto Y. Therapeutic use of a lipid emulsion dexamethasone (dexamethasone palmitate) in inflammatory bowel disease: a new drug delivery system. *Jpn Arch Int Med* 1995;42:1-7.
2. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Matsushima Y, Kawanami C, Oshima C, Ikeda Y, Chiba T. Development of an oral drug delivery

system targeting immune-regulating cells in experimental inflammatory bowel disease: a new therapeutic strategy. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:15-21.

3. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, Nishi T, Debreceni A, Itoh T, Kawanami C, Iwano M, Ikeda Y, Chiba T. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1122-8.
4. Nakase H, Okazaki K, Kawanami C, Uchida K, Ohana M, Uose S, Nishi T, Itoh T, Okano A, Nishio A, Takakuwa H, Chiba T. Therapeutic effects on intestinal Bechcet's disease of an intravenous drug delivery system using dexamethasone incorporated in lipid emulsion. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1306-8.
5. Okazaki K, Nakase H, Watanabe N, Tabata Y, Ikeda Y, Chiba T. Intestinal drug delivery system with biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells for chronic inflammatory colitis. *J Gastroenterol* 2002;37:S44-52.
6. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Ozeki M, Watanabe N, Ohana M, Uose S, Uchida K, Nishi T, Mastuura M, Tamaki H, Itoh T, Kawanami C, Chiba T. New cytokine delivery system using gelatine microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:59-65.
7. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Chiba T. Biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells: a new approach for treatment of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2003;38:S59-62.

## G. 健康危険情報

なし

## H. 研究発表

論文発表

1. Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T. Human thioredoxin-1 ameliorates experimental murine colitis in association with suppressed macrophage inhibitory factor production. *Gastroenterology* 2006;131:1110-21.
  2. 岡崎和一、安藤祐吾、内田一茂、藤井寿仁、松下光伸：潰瘍性大腸炎の病態。カレントセラピー2006;24:512-5.
  3. 岡崎和一、大宮美香、内田一茂、藤井寿仁、松下光伸：ガイドラインを活かした潰瘍性大腸炎の外来での治療。IBD Research 2007;1:24-32.
  4. Matsushita M, Uchida K, Okazaki K. Role of the appendix in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Inflammopharmacology* 2007;15:154-7.
  5. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Okazaki K, Ikehara S. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:826-38.
  6. 島谷昌明、松下光伸、若松隆宏、大宮美香、内田一茂、高岡 亮、関 寿人、岡崎和一：バルミチン酸デキサメタゾンの静注が有効であった単純性潰瘍の一例。日本消化器内視鏡学会雑誌 2008;50:1109-14.
  7. Sumimoto K, Matsushita M, Okazaki T, Omiya M, Uchida K, Okazaki K. Crohn's disease accompanied by purulent discitis and psoas abscesses. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:728-30.
  8. Toyonaga T, Matsushita M, Matsumoto T, Fukui T, Omiya M, Uchida K, Okazaki K. Endoscopic injection therapy for a bleeding exposed vessel in Crohn's disease. *Gastrointest Endosc* 2008;68:572-3.
  9. Ando Y, Matsushita M, Kawamata S, Shimatani M, Fujii T, Okazaki K. Infliximab for severe gastrointestinal bleeding in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:483-4.
  10. Matsushita M, Ando Y, Omiya M, Uchida K, Nishio A, Okazaki K. Association of "ulcerative appendicitis" and appendiceal adenocarcinoma. *Inflamm Bowel Dis* (in press).
  11. Matsushita M, Ando Y, Kawamata S, Omiya M, Uchida K, Nishio A, Okazaki K. Appendix in ulcerative colitis: significant involvement and pathogenesis. *Gastrointest Endosc* (in press).
- 学会発表
1. Matsushita M, Uchida K, Okazaki K: Appendix is a priming site in the development of ulcerative colitis. 12<sup>th</sup> International Conference on Ulcer Research, 2006, 7, 8, Osaka
  2. 島谷昌明、松下光伸、内田一茂、田橋賢也、大宮美香、松本隆之、段原直行、若松隆宏、福井由理、坂尾将幸、高橋 悠、山科雅央、岡崎和一：リメタゾン（リポ化ステロイド）の静注が奏効した単純性潰瘍の一例。第72回日本消化器内視鏡学会総会（DDW）、2006、10、14、札幌
  3. 松下光伸、大宮美香、岡崎和一：Immunomodulatorによるクローン病治療の新展開：クローン病の緩解導入・緩解維持におけるインフリキシマブの有用性と新たな治療法の可能性。第4回日本消化管学会総会、2008、2、7、大阪
  4. 豊永貴彦、松本隆之、鈴木 亮、住本貴美、若松隆宏、福井寿朗、大宮美香、内田一茂、松下光伸、岡崎和一：露出血管のあるクローン病の潰瘍出血に対して内視鏡的止血術が有効であった一例。第80回日本消化器内視鏡学会近畿地方会、2008、3、1、大阪
  5. 青井一憲、大宮美香、松下光伸、柳川雅人、中村尚弘、岡崎和一：潰瘍性大腸炎の経過中に急性膵炎を併発した一症例。第81回日本消化器内視鏡学会近畿地方会、2008、9、20、大阪
  6. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Okazaki K, Ikehara S. The 13<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo. "Adipose Tissue-Derived Stem Cells Facilitate Colonic Mucosal Recovery in Experimental Colitis Rats" 2008, Tokyo

7. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Okazaki K, Ikehara S.  
“Adipose Tissue-Derived Stem Cells Facilitate Colonic Mucosal Recovery in Experimental Colitis Rats” Digestive Disease Week 2008, San Diego, USA.

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



## 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

研究分担者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授

研究要旨：Crohn病に対して本邦では従来から成分栄養療法（Elementary diet; ED）が行われその臨床効果が報告されてきたがその作用機序は明らかとなっていない。これまではEDの効果発現メカニズムとしては、十分なカロリー補給、低脂肪のための低炎症惹起性、窒素元がアミノ酸であるため低抗原性で免疫を賦活しにくい、腸内細菌に対する効果、など間接的な作用の可能性が提唱されてきた。我々は今回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た。以上のことからEDの作用機序のひとつとしてアミノ酸の直接的な炎症抑制効果が明らかとなり、中でもヒスチジンのような抗炎症性アミノ酸の存在が明らかとなり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が示唆された。また、PDE

(phosphodiesterase) は second messenger として多彩な働きを持つ cAMP の分解酵素であり、PDE 4 は好中球以外に T 細胞、単球等の免疫担当細胞に存在する。OPC-6535 は新規の PDE4 阻害剤であるが、炎症抑制効果については好中球の活性酸素抑制効果が確認されているのみであった。今回、OPC-6535 の免疫細胞に対する効果を検討するとともに炎症性腸疾患における新規治療剤としての可能性につき検討した。ヒト CD4 陽性細胞からの TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17 の産生を著明に抑制した。また、LPS 刺激による単球の TNF- $\alpha$ 、IL-12 の産生を抑制し、一方 IL-10 の産生は亢進した。更に、菌刺激時のヒト末梢血中の NK 細胞からの炎症性サイトカイン産生、炎症性腸疾患腸管 NK 細胞からの炎症性サイトカイン産生が抑制された。IL-10 欠損マウス由来のマクロファージにおいても TNF- $\alpha$ 、IL-12 の産生は抑制され炎症抑制効果は IL-10 非依存性であることが示唆された。OPC-6535 の経口投与により IL-10 欠損マウス腸炎の発症が抑制された。これらの結果より、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ち、ヒト炎症性腸疾患、特に Crohn 病において有効性を示す可能性が示唆された。

### 共同研究者

久松理一<sup>1</sup> 安藤綾俊<sup>1,4</sup> 岡本 晋<sup>1</sup>  
市川仁志<sup>1</sup> 高山哲朗<sup>1</sup> 長沼 誠<sup>1</sup>  
井上 詠<sup>2</sup> 緒方晴彦<sup>3</sup> 岩男 泰<sup>2</sup>

### 所属

慶應義塾大学消化器内科<sup>1</sup>  
慶應義塾大学包括先進医療センター<sup>2</sup>  
慶應義塾大学内視鏡センター<sup>3</sup>  
味の素株式会社医薬研究所<sup>4</sup>

### A. 研究目的

炎症性腸疾患はいまだ原因不明の難治性疾患であるが、これまでにその病態形成に種々の免疫異常が関わっていることが報告されている。特に Crohn 病においては病変局所における Th1 優位の過剰な免疫反応が病態の主因をなしていると考えられ、実際に TNF- $\alpha$  に対する抗体（インフリキシマブ）の点滴静注療法は画期的な効果を挙げている。しかしながら、有効例においてもインフリキシマブの効果持続は 2

-3ヶ月程度であり、反復投与を強いられており、新たな治療薬、特に経口薬の開発は必須と考えられる。

Crohn 病に対して本邦および欧州（特に小児例に対し）では従来から経腸栄養療法が行われその臨床効果が報告されてきた。本邦では経腸栄養療法にはエレンタール®が主として用いられており、同剤は窒素元をアミノ酸まで分解した成分栄養剤（Elemental Diet, ED）である。Yamamoto らは ED 療法の継続により臨床的、内視鏡的所見が有意に改善されること、あるいはクローン病術後の患者において ED 投与群では有意差をもって再燃が予防されることを報告している。さらに ED 投与により腸管局所粘膜での炎症性サイトカイン遺伝子の発現が低下することも明らかとなった（*Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:67-72, *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:1493-501.）。このように従来から用いられてきた ED の有効性は再認識されつつあるもののその作用機序はあまり論じられてこなかった。これまで考えられてきた Crohn 病における ED の効果発現メカニズムとしては、消耗状態に対する十分なカロリー補給、低脂肪のため炎症惹起



性が低い、窒素元がアミノ酸であるため低抗原性で免疫を賦活しにくい、腸内細菌に対する効果、などが報告されてきたが残念ながらいずれのメカニズムについても科学的検証は十分ではなかった。また、これらの作用機序はいずれも間接的なものであり、ED自身に直接的な炎症抑制効果があるかどうかは不明であった。しかし、最近の研究からEDの主成分であるアミノ酸自身のもつ抗炎症作用が明らかになりつつある。このことから我々はEDに含まれるアミノ酸自体が直接的な抗炎症効果を有するのではないかという仮定の下、最終的にはアミノ酸を主体とした新たなCrohn病治療薬の創薬を目指して研究を行った。

一方、OPC-6535は好中球からの活性酸素の産生抑制を目的にスクリーニングされた化合物であり、その機序の一部はPDE4阻害効果であることが判明している。PDE (phosphodiesterase)は細胞内でsecond messengerとして多彩な機能を持つcAMPの分解酵素であり、PDE4は好中球以外にT細胞、単球等の免疫担当細胞や平滑筋などに存在する。これまでに我々はOPC-6535が末梢血中のT細胞に対する炎症抑制効果を示すこと、マウス腸炎モデルにおいて抑制効果を示すことを報告してきた。また、これまでに我々はCrohn病の病態に機能異常をきたした腸管マクロファージが大きく関わること、また、腸管粘膜におけるnatural killer (NK)細胞が増加していることを報告してきた。Crohn病においては局所のNK細胞からの炎症性サイトカイン産生が著明であり、病態への関与が示唆される。そこで、我々はOPC-6535のNK細胞への影響を検討した。

## B. 研究方法

### [L-histidineによる腸炎抑制効果]

#### ①IL-10KO transfer colitis model mice に対するED-AAsおよびヒスチジンの腸炎抑制効果

自然発症マウス慢性腸炎モデルであるIL-10 KOマウスの脾臓や腸間膜リンパ節の細胞をSCIDマウスに移入することで約3週間後に単球系細胞の腸管局所への浸潤を主体とする慢性腸炎を引き起こすことが可能である。我々はこのIL-10 KO transfer colitis modelを用いてEDおよびED中のアミノ酸成分の腸炎抑制効果について検討した。同マウスにfull ED投与を行いcontrol群およびPSL10mg/kg/day経口投与群と比較した。腸炎の評価については腸管重量、HE染色による組織学的検討および大腸粘膜中のTNF- $\alpha$ のmRNA発現により検討した。次にED中のアミノ酸成分のみ(ED-AAs)を通常の餌に混じた場合の腸炎抑制効果についても検討した。またED中の各アミノ酸成分の単独経口投与での腸炎抑制効果についても検討した。

#### ②マウス腹腔マクロファージを用いたヒスチジンのサイトカイン産生抑制機序の解析(*in vitro*)

マウス腹腔マクロファージを用いてLPS刺激によるサイトカイン産生に対するヒスチジンの効果について以下の項目について検討した。1) TNF- $\alpha$ およびIL-6の培養上清中の濃度をcytokine beads arrayおよびELISAにて測定、2) mRNA発現の検討、3) western blot法によるNF- $\kappa$ B活性化。また、L-ヒスチジンとの比較として光学異性体D-ヒスチジン、代謝産物のカルノシン、アンセリンを用いて同様の検討を行った。さらにヒスチジンの代謝産物であるヒスタミンの影響を検討するためhistidine decarboxylase (HDC)欠損マウスの腹腔マクロファージを用いても検討した。

#### ③ヒト単球に対するヒスチジンのサイトカイン産生抑制機序の解析(*in vitro*)

ヒト末梢血単球を比重遠心法およびCD14MACSを用いてisolateしLPS刺激によるTNF- $\alpha$ およびIL-6産生に対するヒスチジンの効果を培養上清のELISAを用いて検討した。

### [cAMP elevating agentによる炎症性腸疾患治療]

#### ①ヒト免疫細胞のサイトカイン産生に対する

#### OPC-6535の効果(*in vitro*)

健康者末梢血より単核球分画を採取し、MACSビーズにてCD4陽性細胞、CD14陽性細胞を分離した。CD4陽性細胞は抗CD3/CD28抗体による刺激後の上清中サイトカインをCytokine Beads Array (CBA)法にて測定した。CD14陽性細胞(単球)は各種のTLRリガンドにて刺激を行い24時間後の上清中サイトカインをCBAまたはELISA法にて測定した。マクロファージおよび樹状細胞はそれぞれCD14陽性細胞をM-CSF, GM-CSF/IL-4で7日間分化誘導した後、単球と同様の刺激実験を行った。NK細胞については末梢血中に菌刺激を加え、抗CD3、抗CD56抗体によりNK細胞を同定し、同細胞からの炎症性サイトカイン産生へのOPC-6535の影響をCapture systemを用いて検証した。

#### ②マウス炎症性腸疾患におけるOPC-6535の炎症抑制効果(*in vivo*)

12週齢のSPF飼育下IL-10ノックアウトマウスにvehicleまたはOPC-6535 10 mg/kgを1日1回5週間連日で経口投与し、体重変化、脱肛、組織学的変化、血清serum amyloid Aにつき検討した。

#### ③炎症性腸疾患腸管免疫担当細胞へのOPC-6535の炎症抑制効果

炎症性腸疾患患者手術検体から単核球を単離し、菌刺激時のNK細胞からの炎症性サイトカイン産生能へのOPC-6535の影響をCapture systemで検証した。

#### (倫理面への配慮)

ヒトの検体に関しては、患者の立場を十分に尊重し、プライバシーを厳重に守った。インフォームドコンセントを得るための説明は、患者が理解できるように分かり易く説明し、常に文書で同意を得るもの



とした。また、協力を拒否しても不利益を受けないことを説明した。動物実験においては動物愛護精神に則り動物を扱った。

### C. 研究結果

#### [L-histidineによる腸炎抑制効果]

①まず IL-10KO transfer colitis model mice に full ED 投与を行うと PSL 10mg/kg/day と同等の腸炎抑制効果を示した。次に ED 中のアミノ酸成分のみ (ED-AAs) を通常の餌に混じた場合も用量依存性に腸炎を抑制した。これにより ED 中のアミノ酸成分が直接腸炎抑制効果を有することが示唆された。さらに ED 中の各アミノ酸成分のうちヒスチジンは単独投与により腸炎抑制効果を示すことが明らかとなった。ヒスチジンは大腸粘膜中の TNF- $\alpha$  の mRNA 発現を有意に抑制していた。

②マウス腹腔マクロファージを用いた実験で、ヒスチジンは LPS 刺激されたマクロファージから産生される炎症性サイトカイン、TNF- $\alpha$  および IL-6 の mRNA 発現および培養上清中の蛋白濃度を濃度依存性に低下させた。なお、ヒスチジンはマクロファージの viability には影響を及ぼさなかった。また、L-ヒスチジンの光学異性体 D-ヒスチジンや代謝産物のカルノシン、アンセリンではその抑制効果は明らかではなかった。さらに HDC 欠損マウスの腹腔マクロファージを用いた実験においてもヒスチジンは炎症性サイトカインの産生を抑制し得たことからこの作用にはヒスタミン合成系は関与してないと考えられた。I $\cdot$ B $\cdot$  の degradation および p65 サブユニットの核内移行を抑制した。従ってヒスチジンの TNF- $\alpha$  の産生抑制機序には NF- $\kappa$ B シグナルの抑制が関与していると考えられた。

③ヒト末梢血 CD14 陽性単球を用いた実験でもヒスチジンはヒト単球からの炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6) の産生を抑制した。

#### [cAMP elevating agentによる炎症性腸疾患治療]

①OPC-6535 は CD4 陽性細胞からの IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、IL-17 の産生を抑制した。単球からのサイトカイン産生に関しては TNF- $\alpha$ 、IL-12 p40、IL-12 p70 の産生を抑制し、IL-10 産生は亢進した。IL-6、IL-23 については有意な変化を認めなかった。マクロファージ、樹状細胞からのサイトカイン産生については単球と同様の結果であった。末梢血中の NK 細胞からの菌刺激時のサイトカイン産生も OPC-6535 により濃度依存性に抑制された。作用機序を検討するため、STAT-3、NF- $\kappa$ B p65、MAPK p38 のリン酸化を Phosflow により検討したが、OPC-6535 による変化は認めなかった。IL-10 欠損マウス由来のマクロファージを用いた実験においても、抑制効果は同様であり、IL-10 非依存性であることが示唆された。また、Protein Kinase A (PKA) inhibitor である H-89 存在下でも認められ、古典的な cAMP/PKA 経路を介さない機序が示

唆された。

②OPC-6535 投与群では有意な体重減少の抑制、脱肛発症率の低下、切除大腸標本マクロ所見でも大腸全長の低下抑制を認めた。組織学的検討でも炎症性スコアは低値を示し、炎症マーカーである血中 SAA も有意に低値であった。

③OPC-6535 投与群では菌刺激時の腸管 NK 細胞からの IFN- $\gamma$  産生が抑制された。

### D. 考察

マウス腸炎モデルおよびヒト単球を用いた研究結果からヒスチジンが炎症性サイトカインを抑制することで腸炎抑制効果を発揮することが示された。ED の成分中の各アミノ酸をさらに解析することで腸炎抑制効果を有するアミノ酸組成に重点を置いた新世代 ED の開発が可能と考えられ、実現性も高いと考えられる。さらに、ヒスチジン単独での治療も投与量、投与経路、drug delivery など解決すべき問題点は残されているが有望と考えられる。特に現在の ED のもつ服薬コンプライアンスの低さを改善する可能性はある。またヒスチジンのサイトカイン産生抑制機序を詳細に解明することによって新たな分子標的を見いだせる可能性がある。

細胞内 cAMP 濃度の上昇により、免疫担当細胞からのサイトカインの産生が影響を受けることは以前より報告がみられる。OPC-6535 は Th1/Th2 のみならず、炎症性腸疾患の分野でも現在非常に注目を集めている IL-17 の産生についても抑制した。また、単球系細胞についても TNF- $\alpha$ 、IL-12 の産生を抑制し、IL-10 産生は増強している。また、OPC-6535 とは違ったアプローチで細胞内 cAMP 濃度を上昇させる A2A 受容体の合成リガンドも、OPC-6535 同様のサイトカイン調節パターンを示し、マウス腸炎モデルにおいて炎症抑制効果を示している。この結果から、これら cAMP elevating agent は炎症性腸疾患、サイトカイン調節パターンからはとりわけクローン病の新規治療薬としての可能性を十分にもっていると考えられる。また、我々の検討から NK 細胞の炎症性腸疾患の病態への関与が示唆され、特にクローン病においてその増加がみられることから大きな影響を及ぼしているものと考えられる。今回の検討により 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もつものと考えられる。

### E. 結論

ED-AAs はそれだけでマウス腸炎を抑制することが明らかとなった。さらにその中でもヒスチジンは単球やマクロファージからの TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生を抑制する効果により単独で腸炎を抑制する効果を有することが判明した。アミノ酸による腸炎抑制機序の追求は新たな創薬に結びつく可能性がある。



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ち、炎症性腸疾患に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表  
論文発表

1. Naganuma et al; Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J Immunol* 2006; 177(11): 7990-9.
2. Ichikawa H, Okamoto S, Kamada N, Nagamoto H, Kitazume MT, Kobayashi T, Chinen H, Hisamatsu T, Hibi T. Tetomilast suppressed production of proinflammatory cytokines from human monocytes and ameliorated chronic colitis in IL-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14(11): 1483-1490.
3. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL-23 differently regulates Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2008; 57(12): 1682-1689.
4. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T. Unique CD14-positive intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn's disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*. 2008; 118(6): 2269-2280.
5. Andou A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Kobayashi T, Okutsu T, Takeda T, Hashimoto M, Sato A, Ohtsu H, Suzuki M, and Hibi T. Dietary Histidine Uptake Ameliorates IL-10-Deficient Cell Transfer Murine Colitis by Inhibition of Pro-inflammatory Cytokine Production from Macrophages. *Gastroenterology* 2008; in press.
6. 鎌田信彦、日比紀文: CD14 陽性腸管マクロファージが IL-23/IFN- $\gamma$  を介してクローン病の病態に寄与している. *Intestine*: 2008. in press.
7. 鎌田信彦、日比紀文: 炎症性腸疾患における腸管マクロファージの病的役割. *日本薬理学会雑誌*: 2008. In press.
8. 鎌田信彦、日比紀文: 獲得免疫異常による慢性炎症持続. *BIO Clinica*: 23(13): 27-31, 2008.
9. 鎌田信彦、日比紀文: CD14 陽性腸管マクロファージが IL-23/IFN- $\gamma$  を介してクローン病の病態に寄与している. *分子消化器病学* 5 (4): 88-91,

2008.

10. 鎌田信彦、日比紀文 他: 消化管自然免疫破綻と炎症性腸疾患. *細胞工学* 27 (8): 770-774, 2008.

学会発表

1. Hisamatsu T, Okamoto S, Andou A, Muramatsu T, Kamada N, Takayama T, Takada Y, Ichikawa H, Izumiya M, Sakuraba A, Naganuma M, Nakazawa A, Ogata H, Iwao Y, Ono N, Sakai R, Suzuki M, Hibi T: Profiling of amino acids metabolism ("Amino Index") is useful for diagnosis, judgment of clinical activity, and understanding of pathophysiology in inflammatory bowel disease. 108<sup>th</sup> Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May, 2007.
2. Hisamatsu T, Andou A, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Hashimoto M, Kihara H, Hibi T: L-histidine ameliorates IL-10 deficient cells transfer murine colitis model by inhibition of pro-inflammatory cytokine production from mononuclear cells. 13<sup>th</sup> International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, Japan July, 2007.
3. Ichikawa H, Okamoto S, Kamada N, Kobayashi T, Takayama T, Hisamatsu T, and Hibi T: Anti-inflammatory effects of OPC-6535; PDE4 may be a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. Digestive Disease Week and the 109<sup>th</sup> Annual Meeting of the AGA Institute May 17-22, 2008 San Diego, CA.
4. Kamada N, Hibi T, et al., IFN- $\gamma$  induces IL-23 producing DC-like macrophage via suppression of endogenous IL-10 signaling. 95<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association of Immunologists, San Diego, 2008.
5. 市川仁志、岡本 晋、知念 寛、日比紀文: Anti-inflammatory effect of OPC-6535, a novel PDE4 inhibitor, in inflammatory bowel disease 第63回日本免疫学会総会 2006年
6. 長沼 誠、小林 拓、日比紀文: アデノシン受容体をターゲットとした炎症性腸疾患に対する治療法第94回日本消化器病学会総会 2008.5.9, 福岡 シンポジウム。

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
・国際特許  
PCT/JP2008/050942 2008/01/24 出願  
「IBDの評価方法、ならびにアミノ酸情報処理装置、アミノ酸情報処理方法、アミノ酸情報処理システム、アミノ酸情報処理プログラムおよび記録媒体」  
・特許

特願 2008-013393 2008/01/24 出願

「IBD の評価方法、ならびにアミノ酸情報処理装置、アミノ酸情報処理方法、アミノ酸情報処理システム、アミノ酸情報処理プログラムおよび記録媒体」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



ケモカインの制御を目指した炎症性腸疾患治療の試み

研究分担者 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

研究要旨：近年、IBD 患者の腸組織や、炎症性腸疾患のモデルマウスの腸組織を用いたケモカインの発現に関する多くの研究が行われている。我々は、(1) CXCL12・CXCR4 系、および(2) 抗原提示細胞に特異的に発現する CXCL16 というケモカインに注目し、炎症性腸疾患の病態におけるこれらの意義について研究してきた。CXCL12・CXCR4 系は人炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎の病態に関与することが示された。さらに、CXCR4 拮抗剤 (TN14003) の投与によるデキストラン硫酸腸炎改善効果が証明された。さらに、腸炎マウスの抗原提示細胞では CXCL16 の発現が増強しており、抗 CXCL16 抗体を投与することにより腸炎の発症が軽減されることが証明された。CXCL16 ノックアウトマウスを作成し、デキストラン硫酸腸炎を誘導したところ、野生型マウスに比べて優位にその発症が抑制された。以上の結果より、ケモカインの制御を目指した炎症性腸疾患治療の有用性が証明された。

共同研究者  
仲瀬裕志  
所属  
京都大学医学部附属病院内視鏡部

A. 研究目的

ケモカインは特定の白血球サブセットの遊走作用と活性化を支配する一連のサイトカインとして発見されたものの総称である。現在まで、人においては 45 種類のほるケモカインと 18 種類の受容体が同定されている。腸管内に存在する抗原や病原体に対する防御のため、免疫細胞は常に腸管（主に粘膜固有層）と血管内およびリンパ節などとの間を循環、移動している。非炎症状態でもこれら免疫細胞の移動は認められるが、免疫応答が継続し、腸管内に存在する免疫細胞が増加すると、この通常の生理的な状態では保たれていた免疫防御機構のバランスが崩れ、病的な炎症に発展

する。ケモカインはこのような病的な炎症において、血液中から腸管粘膜への異常な白血球の動員に関わる重要なメディエーターであると考えられている。近年、IBD 患者の腸組織や、炎症性腸疾患のモデルマウスの腸組織を用いたケモカインの発現に関する多くの研究が行われている。

CXCL12・CXCR4 系は造血、免疫系などの器官形成、免疫反応、エイズ、癌転移に必須の生理的、病理的に大変重要な制御分子として注目された。しかしながら、現在まで、炎症性腸疾患の病態における CXCL12・CXCR4 系の意義についてはほとんど報告されていない。今回我々は、(1) 人炎症性腸疾患における末梢 T 細胞における CXCR 4 の発現と疾患活動性との関与 (2) 実験腸炎モデルを用いることにより CXCL12・CXCR4 系の制御による治療効果の検討を行った。

CXCL16はCXCケモカインに属する1つであり、樹状細胞およびマクロファージなどの抗原提示細胞に主として発現するとされている。CXCL16は分泌型のみならず膜型として存在し、CXCL16自身のドメインを介して、グラム陽性および陰性菌の貪食にも関与しているということが示されている。また、CXCL16のリガンドであるCXCR6はTh1型の免疫反応を有するT細胞で発現が増強していることも知られている。そこで、CXCL16制御によるIBDに対する新規治療開発にも着手した。

## B. 研究方法

対象：2006年3月から2007年3月まで、京都大学消化器内科で初発および再燃を来たし加療を受けている炎症性腸疾患の患者33名。対象の内訳は（潰瘍性大腸炎：17名、クローン病：9名、感染性腸炎：7名）であった。

方法：1. 末梢T細胞におけるCXCR4の発現の検討：対象全例に対し、末梢血を採取し、抗CD3抗体および、抗CXCR4抗体による染色を行い、Flow cytometryでT細胞上のCXCR4発現の強度を検討した。さらに、CXCR4の発現と疾患活動性の相関関係を検討した。

2. 実験腸炎モデルにおけるCXCR4antagonistによる治療効果：C57BL/6マウスに2.5%のデキストラン硫酸（以下DSS）を5日間投与し腸炎モデルを作成した。CXCR4拮抗剤であるTN14003 100 $\mu$ gを200 $\mu$ lのPBSに溶解し、DSS投与開始後から10日間連日投与を行い、腸炎改善効果を検討した。評価項目は、(1)末梢リンパ球でのCXCR4の発

現(2)腸管におけるCXCL12の発現(3)腸管長、組織学的腸炎の程度(4)腸間膜リンパ球からのサイトカイン産生の比較とした。

(倫理面への配慮)

患者末梢血の解析を行う場合には、各患者に対してinformed consentを行った。

3. CXCL16ノックアウトマウスの作製：129SVを遺伝子背景とするCXCL16ノックアウトマウスおよびCXCL16抗体についても作製した。(2)野生型マウスに3%のデキストラン硫酸を5日間投与することにより、潰瘍性大腸炎類似の腸炎モデルを作製する。さらに、トリニトロベンゼンスルホン酸を経直腸的に投与することによりクローン病類似の腸炎モデルを作製する。その後、腸炎の誘導と同時に500 $\mu$ gの抗CXCL16抗体を5日間投与する。治療経過中は、体重の測定、血便の有無などを評価する。治療終了後に大腸組織を取り出し、肉眼的、顕微鏡学的に組織の炎症の程度を評価する。

## C. 研究結果

1. 各種炎症性腸疾患における末梢Tリンパ球におけるCXCR4の発現：再燃時潰瘍性大腸炎患者末梢T細胞におけるCXCR4の発現は緩解期に比し有意に高いことが示された。また、再燃時のCXCR4の発現はクローン病および感染性腸炎の患者に比して有意に増強していた。CXCR4発現の強度はClinical Activity Indexと相関が認められた。クローン病患者においては、再燃時および緩解期との間での末梢T細胞におけるCXCR4の発現に有意差は認められず、Crohn's Disease Activity



Index との相関もみとめられなかった。

2. DSS 腸炎における CXCR4 拮抗剤 (TN14003) の効果: (1) DSS 投与後、末梢 T リンパ球における CXCR4 の発現増強が確認され、その発現は DSS 投与 10 日後にピークに達した。(2) DSS による腸炎誘導後腸管において CXCL12 の発現増強が real time PCR 法で確認された。

(3) TN14003 治療群は無治療群に比べて有意に腸管長が長く、また組織学的にも明らかに腸炎の改善が確認された。(4) 治療群における腸間膜リンパ球からの炎症性サイトカイン産生 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) は無治療群に比して有意に低下していた。

3. CXCL16 の腸炎発症における役割経時的体重変化: 3%DSS 腸炎に伴う体重減少は野生型マウスに比較して CXCL16 ノックアウトマウス群で有意に抑制された。組織学的検討 腸管長: DSS 腸炎誘導後の野生型マウスに比べ CXCL16 ノックアウトマウス群の腸管は有意に長いことが示された。組織学的スコア: 野生型マウスに比べ、CXCL16 ノックアウトマウスでは比較的 crypt が保たれておりさらに、炎症細胞浸潤の軽減が認められた。CXCL16 ノックアウトマウスで有意に Histological score の低下が認められた。

4. CXCL16 抗体の DSS 腸炎に対する治療効果: 3%DSS 腸炎マウスに対し、CXCL16 抗体を 5 日間連続投与した結果、治療群においては腸炎の改善傾向が認められ Histological score も有意に低下していた。同様の結果は TNBS 腸炎においても確認された。

#### D. 考察

今回、我々が検討した結果、CXCL12・CXCR4 系の制御は炎症性腸疾患患者の新しい治療法の 1 つになりうる可能性が示唆された。

我々は、まず人炎症性腸疾患における CXCL12・CXCR4 系の関与を検討した。その結果、末梢 T 細胞における CXCR4 の発現強度は潰瘍性大腸炎患者の臨床的活動性と関連した。さらに、潰瘍性大腸炎活動期における CXCR4 の発現強度はクローン病、感染性腸炎患者および正常コントロール群に比して、有意に高いことが示された。

DSS 投与後、末梢 T 細胞での CXCR4 の発現増強および腸管局所における CXCL12 の発現増強から、DSS 腸炎モデルにおいて CXCL12・CXCR4 系が関与していることが示唆された。さらに我々は、DSS 腸炎マウスに CXCR4 拮抗剤である TN14003 を投与することで、腸炎改善効果を検討した。

TN14003 投与により、炎症性サイトカインの産生抑制および DSS 腸炎の組織学的改善効果が証明された。今後、他の腸炎モデルにおいて TN14003 の治療効果を検討すべき必要があると考えられるものの、新しい炎症性腸疾患の治療の 1 つになりうると思われる。現在、我々は、人炎症性腸疾患に対する TN14003 の臨床応用へ向けての検討を行っている。

さらに、IBD の病態における CXCL16 の重要性について検討した。まず我々は CXCL16 ノックアウトマウスを作製し、腸炎抑制効果があるか否かを検討し、さらに CXCL16 抗体投与による治療効果を検討した。臨床的にも組織学的にも 3%DSS 腸炎に伴う体重減少および腸炎の程度は野生型マウスに比較して CXCL16 ノ

ックアウトマウス群で有意に抑制されており、腸間膜リンパ節からの炎症性サイトカイン産生も抑制されていた。野生型マウスに生じたDSS腸炎およびTNBS腸炎に対し、CXCL16抗体を投与したところ、腸炎は改善した。これらの結果よりCXCL16は炎症性腸疾患の病態に強く関与するものと考えられた。

#### E. 結論

CXCL12・CXCR4系およびCXCL16は炎症性腸疾患の病態に関与することが示された。ケモカインの制御を目指した炎症性腸疾患治療法の開発は新規治療の1つになりうる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Chiba T, Okazaki K: Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Japanese patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:62-69:2006.
2. Uza N, Nakase H, Nishimura K, Yoshida S, Kawabata K, Chiba T: Solitary rectal ulcer syndrome associated with ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc.* 63:355-356:2006.
3. Kou T, Nakase H, Tamaki H, Kudo T, Nishio A, Chiba T: Cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis diagnosed by quantitative real-time PCR analysis. *Dig Dis Sci* 51:1052-1055:2006.
4. Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T: Human Thioredoxin-1 Ameliorates Experimental Murine Colitis in Association with Suppressed MIF Production. *Gastroenterology* 131:1110-1121:2006.
5. Uza N, Nakase H, Kuwabara H, Fujii S, Chiba T: Cecal cancer associated with long-standing Crohn's disease. *Lancet* 368(9549):1842:2006.
6. Nanakin A, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Kanda N, Hisatsune H, Seno H, Konda Y, Fujimori T, Chiba T. Expression of the REG IV gene in ulcerative colitis. *Lab Invest* 87:304-314:2007.
7. Nakase H, Yoshino T, Ueno S, Uza N, Mikami S, Matsuura M, Chiba T. Importance of early detection of cytomegalovirus infection in refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 13: 364: 2007.
8. Nakase H, Mikami S, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kasahara K, Yoshino T, Takeda Y, Chiba T. Rescue therapy with Tacrolimus for a patient with severe ulcerative colitis refractory to combination leukocytapheresis and high-dose of corticosteroid therapy. *Int Med* 46:717-720:2007.
9. Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Mikami S, Tamaki H, Kasahara K, Chiba T. Open label trial of Clarithromycin therapy in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22: 984-988: 2007.
10. Mikami S, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Sakurai T, Chiba T. Involvement of cytomegalovirus infection in the ileal lesions of the patient with Behcet's disease. *Inflamm Bowel Dis* 13: 802-803: 2007.
11. Yoshino T, Nakase H, Ueno S, Uza N, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Ohmori K, Sakurai T, Nagayama S, Hasegawa S,



- Sakai Y, Chiba T. Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis* 13:1516-1521:2007.
12. Fukumoto A, Tanaka S, Yamamoto H, Yao T, Matsui T, Iida M, Goto H, Sakamoto C, Chiba T, Sugano K. Diagnosis and treatment of small-bowel stricture by double balloon endoscopy. *Gastrointest Endosc* 66:S108-112:2007.
  13. Kasahara K, Nakase H, Uza N, Ueno S, Matsuura M, Mikami S, Inoue S, Chiba T. Administration of PEG-interferon to a patient with UC and chronic hepatitis C correlated with reduced colonic inflammation and reversal of peripheral T cell Th1/Th2 ratios. *Case rep Gastroenterol* 1:157-161:2007.
  14. Matsumoto T, Iida M, Motoya S, Haruma K, Suzuki Y, Kobayashi K, Ito H, Miyata M, Kusunoki M, Chiba T, Yamamoto S, Hibi T. Therapeutic efficacy of infliximab on patients with short duration of Crohn's disease: A Japanese multicenter survey. *Dis Colon Rectum* 51:916-923, 2008.
  15. Uza N, Nakase H, Ueno S, Inoue S, Mikami S, Tamaki H, Matsuura M, Chiba T. The effect of medical treatment on patients with fistulizing Crohn's disease: our experience with a retrospective study. *Intern Med* 47:193-199:2008.
  16. Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fujii S, Fujimori T, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation to colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology* 135:889-898:2008.
  17. Yoshino T, Nakase H, Mikami S, Nio M, Ueno S, Uza N, Ohmori K, Manabe T, Chiba T. Importance of diagnosis of concomitant cytomegalovirus infection in patients with intestinal Behcet's disease. *Inflamm Bowel Dis* 14:877-878:2008.
  18. Yamamoto S, Nakase H, Mikami S, Inoue S, Yoshino T, Takeda Y, Kasahara K, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Tamaki H, Matsuura M, Inui K and Chiba T. Long-term effect of tacrolimus therapy in patients with refractory ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Therapeutics* 28: 589-597, 2008.
  19. Mikami S, Nakase H, Yamamoto S, Takeda Y, Yoshino T, Kasahara K, Ueno S, Uza N, Oishi S, Fujii N, Nagasawa T, Chiba T. Blockade of CXCR12/CXCR4 axis ameliorates murine experimental colitis. *J Pharmaceut Exp Therapeut* 327:383-392:2008.
  20. Tamaki H, Nakase H, Matsuura M, Inoue S, Mikami S, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Kasahara K, Chiba T. The effect of tacrolimus (FK-506) on Japanese patients with refractory Crohn's disease. *J Gastroenterol* 43:774-779:2008.
  21. Nakase H, Matsumura K, Yoshino T, Chiba T. Systematic review: cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 43:735-740:2008.
  22. Takeda Y, Nakase H, Mikami S, Inoue T, Satou S, Sakai Y, Chiba T. Possible link Between Ulcerative Colitis and In situ Adenocarcinoma of an Appendiceal Mucocoele: Importance of Inflammation in the Appendiceal Orifice Related to UC. *Inflam Bowel Dis* 14:873-874:2008.
  23. 仲瀬裕志、千葉 勉: 炎症性腸疾患の治療 知っておきたい炎症性腸疾患の合併症とその治療 皮膚、関節病変、肛門部病変の診かた. *Medicina* 45(5):833-838:2008.
  24. 仲瀬裕志、千葉 勉: 消化器疾患 (炎症性腸疾患). *炎症と免疫* 16(3):299-303:2008.
  25. Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Mikami S, Ueno S, Uza N, Chiba T. The effect of proteasome inhibitor MG-132 on experimental inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2009(in press).
  26. Matsumura K, Nakase H, Yamamoto S, Yoshino T, Takeda Y, Kasahara K, Ueno

- S, Uza N, Chiba T: Modulation of the Th1/Th2 balance by infliximab improves hyperthyroidism associated with flare-up of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009 (in press).
27. Takeda Y, Nakase H, Chiba T: Up-regulation of T-bet and tight junction molecules by *Bifidobacterium longum* improves colonic inflammation of ulcerative colitis: *Inflamm Bowel Dis* 2009 (in press).
28. Kuwabara A, Tanaka K, Tsugawa N, Nakase H, Tsuji H, Shide K, Kamao M, Chiba T, Inagaki N, Okano T, Kido S. High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease. *Osteoporos Int.* 2009 (in press).
29. Yamamoto S, Nakase H, Takada M. Clinical Challenges and Images in GI: Relapsing polychondritis in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2009 (in press)
30. Nakase H, Mikami S, Chiba T: Alteration of CXCR4 expression and Th1/Th2 balance of peripheral CD4 positive T cells can be a biomarker for leukocytapheresis therapy for patients with refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009 (in press).
31. **学会発表**
32. 吉野琢哉, 仲瀬裕志, 千葉 勉: 難治性潰瘍性大腸炎におけるサイトメガロウイルス感染 早期診断のための real-timePCR 法の有用性について. 第104回日本内科学会講演会・一般演題ポスターセッション, 大阪, 2007. 4. 3.
33. 上野 哲, 仲瀬裕志, 千葉 勉: *Bifidobacterium longum* (BB-536) の腸管上皮バリアー機能に対する作用の検討. 第93回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 青森, 2007. 4. 19.
34. 仲瀬裕志, 宇座徳光, 千葉 勉: 免疫抑制剤投与による難治性クローン病患者に対する長期緩解維持効果. 第93回日本消化器病学会総会・パネルディスカッション, 青森, 2007. 4. 21.
35. 吉野琢哉, 仲瀬裕志, 千葉 勉: 難治性潰瘍性大腸炎に合併する CMV 感染の正確な診断を目指して一内視鏡か PCR 法か? 一. 第73回日本消化器内視鏡学会総会・パネルディスカッション, 東京, 2007. 5. 10.
36. Takuya Yoshino, Hiroshi Nakase, Satoko Inoue, Hiroshi Kitamura, Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Sakae Mikami, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: The usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus in patients with UC refractory to immunosuppressive therapies. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute poster sessions, Washington DC, 2007. 5. 21.
37. Tadayuki Kou, Hiroyuki Marusawa, Yoko Endo, Hiroshi Nakase, Shigehiko Fujii, Kazuo Kinoshita, Takahiro Fujimori, Tasuku Honjo, Tsutomu Chiba: Etoposide expression of activation-induced cytidine deaminase in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute poster sessions, Washington DC, 2007. 5. 22.
38. Hiroshi Kitamura, Hiroshi Nakase, Yasuhiro Takeda, Takuya Yoshino, Katsuhiko Kasahara, Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Satoko Inoue, Sakae Mikami, Minoru Matsuura, Yoshihiro Ishida, Kazuhiro Nagata, Tsutomu Chiba: The critical role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis associated with Inflammatory Bowel Diseases. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute oral sessions, Washington DC, 2007. 5. 23.
39. 三上 栄, 山本修司, 仲瀬裕志: 難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムス治療の位置づけ. 第87回日本消化器病学会近畿支部例会, 大阪, 2007. 9. 8.
40. 武田康宏, 仲瀬裕志, 千葉 勉: 粘膜免疫制御の観点からみた *Bifidobacterium longum* (BB536) の IBD に対する治療機序



- の解明. 第49回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 神戸, 2007.10.18.
41. 渡邊智裕, 千葉 勉: NOD2の活性化による腸管免疫の制御機構. 第49回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 神戸, 2007.10.18.
  42. 吉野琢哉, 仲瀬裕志, 千葉 勉: 炎症性腸疾患に合併するCMV感染の早期診断法の確率にPCRは有用か? 第49回日本消化器病学会大会・ワークショップ, 神戸, 2007.10.18.
  43. TANAKA Junya, WATANABE Norihiko, KIDO Masahiro, SAGA Kazuyuki, AKAMATSU Takuji, NISHIO Akiyoshi, CHIBA Tsutomu: Human TSLP enhances TLR-ligand-mediated IL-23 production by myeloid dendritic cells and has a potential to induce Th17 inflammatory responses. 2007日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007.11.20.
  44. 武田康宏, 仲瀬裕志, 千葉 勉: IL-10は分子シャペロンHsp47の発現を制御し、腸管炎症に伴う線維化を抑制する. 第94回日本消化器病学会総会, 福岡, 2008.5.8.
  45. Shuji Yamamoto, Hiroshi Nakase, Satoko Inoue, Sakae Mikami, Norimitsu Uza, Satoru Ueno, Tsutomu Chiba: Long-Term Outcome of Treatment with Tacrolimus Therapy in Patients with Ulcerative Colitis. Digestive Disease Week and the 109th Annual Meeting of the AGA Institute, San Diego(U.S.A.), 2008.5.17.
  46. Takuya Yoshino, Hiroshi Nakase, Shuji Yamamoto, Yasuhiro Takeda, Katsuhiro Kasahara, Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Sakae Mikami, Tsutomu Chiba: The Involvement of Cytomegalovirus in Patients with Intestinal Behcet's Disease. Digestive Disease Week and the 109th Annual Meeting of the AGA Institute, San Diego(U.S.A.), 2008.5.17.
  47. Tomohiro Watanabe, Naoki Asano, Tsutomu Chiba, Warren Strober: Muramyl Dipeptide Activation of Nucleotide Binding Oligomerization Domain 2 Protects Mice from Experimental Colitis. 13th US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century, 東京, 2008.6.13.
  48. 渡邊智裕, 千葉 勉: NOD2の活性化を用いたクローン病の新たな免疫制御療法. 第45回日本消化器免疫学会総会, 京都, 2008.7.3.
  49. 玉置将司, 三上 栄, 上野 哲, 秋武玲子, 仲瀬裕志, 千葉 勉: 大腸全摘後に十二指腸炎および小腸炎をきたした潰瘍性大腸炎の1例. 日本消化器病学会近畿支部第89回例会, 大阪, 2008.9.27.
  50. 遠藤容子, 丸澤宏之, 木下和生, 高 忠之, 藤井茂彦, 藤盛孝博, 千葉 勉: 炎症性腸疾患からの大腸発癌過程におけるActivation-induced cytidine deaminase(AID)の役割. 第67回日本癌学会学術総会・ワークショップ, 名古屋, 2008.10.28.
  51. Watanabe Tomohiro, Asano Naoki, Chiba Tsutomu, Strober Warren: Muramyl Dipeptide Activation of NOD2 Inhibits Multiple Toll-like Receptor Pathways via Induction of IRF4. 2008日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 2008.12.1.
  52. 三上貴生, 秋武玲子, 上野哲, 宮本心一, 千葉 勉: 下痢・下血・発熱の原因がメサラジンの薬剤性アレルギーであった潰瘍性大腸炎の一例. 日本消化器病学会近畿支部第90回例会, 大阪, 2009.2.14.

#### 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

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧