

厚生科学研究補助金難治性疾患克服研究事業
「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」
平成20年度第1回総会プログラム

(敬称略)

開会 (13:10)

I. 厚生労働省健康局疾病対策課挨拶 海老名課長

II. 研究代表者挨拶・研究の進め方 班長：岡崎和一

III. 研究報告

◎ 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立 (13:20~14:20)

1) 腸管上皮再生の分子基盤と治療への応用 (研究分担者：渡辺 守)

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

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

○ 鈴木健司¹、河内裕介¹、孫 曉梅¹、藤井庄人²、山崎元美²、米山博之²

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

3) 炎症性腸疾患に対するHGFの臨床応用 (研究分担者：坪内博仁)

坪内博仁^{1,2}、○井戸章雄^{1,2}、沼田政嗣²、山路尚久²、藤田 浩¹

(¹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、²京都大学医学部付属病院探索医療センター)

4) 腸管粘膜再生におけるヒト皮下脂肪組織由来幹細胞の有用性と安全性の検討 (研究分担者：岡崎和一)

岡崎和一¹、○安藤祐吾¹、西尾彰功¹、松下光伸¹、内田一茂¹、大宮美香¹、福井朝明、
川股聖二¹、深田憲将¹、吉岡和彦² (¹関西医科大学内科学第三講座、²同 外科学講座)

◎ 腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発 (14:20~15:20)

5) 自然免疫系による腸管炎症の制御機構 (研究分担者：竹田 潔)

○ 竹田 潔 (大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座免疫制御学)

6) 抗菌ペプチドを用いた新規治療法の開発 (分担研究者：高後 裕)

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

(¹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、²旭川医科大学消化管再生修復医学講座)

- 7) プロバイオティクス由来ペプチドを用いた新規炎症性腸疾患治療の開発 (研究分担者: 高後 裕)
 ○ 藤谷幹浩¹、岡本耕太郎¹、奈田利恵¹、上野伸展¹、盛一健太郎¹、田邊裕貴¹、前本篤男²、蘆田知史²、高後 裕¹
 (1) 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、(2) 旭川医科大学消化管再生修復医学講座
- 8) MIF (macrophage migration inhibitory factor) の制御による炎症性腸疾患の新しい治療法の開発 (研究分担者: 浅香正博)
 ○ 武田宏司、大川原辰也、桂田武彦、浅香正博 (北海道大学大学院医学研究科消化器内科学)

◎ 選択的細胞除去・移入療法の開発 (15: 20~15: 35)

- 9) 潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去・制御性T細胞分離移入療法臨床試験の準備状況 (研究分担者: 中村和彦)
 ○ 中村和彦¹、隅田頼信¹、金山兼司¹、荻野治栄¹、井星陽一郎¹、村尾寛之¹、秋穂裕唯¹、豊嶋崇徳²、赤司浩一²、高柳涼一¹
 (1) 九州大学大学院医学研究院病態制御内科学、(2) 九州大学病院遺伝子・細胞療法部)

◎ バイオマテリアルを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療 (15: 35~16: 20)

- 10) ポリ乳酸マイクロカプセルを用いたサイクロスポリン封入カプセルによる実験腸炎の治療 (研究分担者: 岡崎和一)
 岡崎和一¹、○深田憲将¹、西尾彰功¹、松下光伸¹、内田一茂¹、大宮美香¹、福井寿朗、川原聖二¹、安藤祐吾¹、廣田育彦²、田畑泰彦³、仲瀬裕志⁴、千葉 勉⁴
 (1) 関西医科大学内科学第三講座、(2) 同 薬剤部、(3) 京都大学再生医科学研究所、(4) 同医学研究科消化器内科学)
- 11) チオレドキシリン封入ゼラチンマイクロスフェアを用いた治療法に関する検討 (研究分担者: 岡崎和一)
 岡崎和一¹、○深田憲将¹、西尾彰功¹、松下光伸¹、内田一茂¹、大宮美香¹、福井寿朗、川原聖二¹、安藤祐吾¹、仲瀬裕志²、千葉 勉²、田畑泰彦³、淀井淳二⁴
 (1) 関西医科大学内科学第三講座、(2) 京都大学消化器内科学、(3) 再生医科学研究所、(4) ウイルス研究所)
- 12) 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
 I. ポリ乳酸マイクロカプセルを用いたステロイド封入カプセルによる難治性潰瘍性大腸炎治療の臨床試験
 II. リポソ化ステロイドを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療: 施設共同による無作為化比較試験 (研究分担者: 岡崎和一)
 岡崎和一、○松下光伸、西尾彰功、内田一茂、大宮美香、福井寿朗、川原聖二、安藤祐吾、深田憲将 (関西医科大学内科学第三講座)
- 13) OPC-6535 の腸炎抑制機序について (研究分担者: 日比紀文)
 ○ 市川仁志、岡本 晋、鎌田信彦、小林 拓、高山哲朗、久松理一、日比紀文
- 14) 新規ケモカイン CXCL16 制御を目的とした炎症性腸疾患に対する治療開発 (研究分担者: 千葉 勉)
 ○ 仲瀬裕志、宇座徳光、千葉 勉 (京都大学大学院医学研究科消化器内科学)

事務局連絡

閉会の挨拶

平成 20 年度第 1 回総会出席者名簿

平成 20 年 8 月 1 日 (金)

参加者 56 名 (敬称略)

班 長	岡崎和一 (関西医科大学内科学第三講座)
研究分担者	日比紀文 (慶應義塾大学医学部内科学)
	中村和彦 (九州大学大学院医学研究院病態制御内科学)
	鈴木健司 (新潟大学歯学総合病院第三内科)
	竹田 潔 (大阪大学大学院医学系研究科 (C6) 感染免疫医学講座免疫制御学)
	千葉 勉 (京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座)
参加協力者	武田宏司 (北海道大学大学院消化器内科学分野)
	藤谷幹浩、田邊裕貴 (旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学)
	井上 詠、高山哲朗、金井隆典 (慶應義塾大学消化器内科学)
	土屋輝一郎、中村哲也、岡本隆一、永石宇司、戸塚輝治 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学)
	河内裕介 (新潟大学歯学総合病院第三内科)
	飯塚政弘 (秋田赤十字病院健康管理センター健診部)
	峯 徹也 (東海大学消化器内科学)
	井戸章雄、藤田 浩、上村修司 (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)
	秀野泰隆 (東京大学腫瘍外科学)
	市川仁志 (東京歯科大学市川総合病院消化器科)
	工藤進英、大塚和朗、池田晴夫 (昭和大学横浜市北部病院消化器センター)
	渡辺憲治 (大阪市立大学大学院消化器器官制御内科学)
	飯島英樹 (大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学)
	水島恒和 (大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学)
	北洞哲治 (国際医療福祉大学熱海病院消化器内科)
	大井 充 (神戸大学大学院医学系研究科講座消化器内科学分野)
	隅田頼信 (九州大学大学院医学研究院病態制御内科学)
	光山慶一 (久留米大学内科学講座消化器内科部門)
	児玉真由美 (宮崎医療センター病院)
	安倍弘生 (宮崎大学消化器血液学)
	仲瀬裕志 (京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座)
	沼田政嗣 (京都大学探索医療センター)
	大井秀之 (今村病院消化器内科)
	山崎元美 (ステリック再生医科学研究所)
	藤井克典 (日清キョーリン製薬)
	岩田大哉 (杏林製薬)
	矢田修宏 (田辺三菱製薬)
	今倉伸二 (JIMRO)
	石井崇之 (ゼリア新薬)
	人見麻子 (旭化成クラレメディカル)

海老名英治（厚生労働省健康局疾病対策課）
安藤祐吾、深田憲将、川股聖二、福井寿朗、内田一茂、大宮美香
（関西医科大学内科学第三講座）

事務局 松下光伸、長谷川也真（関西医科大学内科学第三講座）

厚生科学研究補助金難治性疾患克服研究事業
「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」
平成20年度第1回総会議事録

(敬称略)

研究代表者 岡崎 和一 (関西医科大学内科学第三講座)

期日:平成21年2月6日(金) 13:00~16:30

場所:味の素株式会社 B1大会議室(東京都中央区京橋1-15-1)

I. 研究代表者挨拶・研究の進め方 班長:岡崎和一

◆岡崎班の考え方 「炎症性腸疾患の画期的治療法に関する臨床研究」班

【グループの構成】平成20年度(3年目)(臨床系研究者9名・基礎系研究者1名 計10名)

研究代表者 岡崎和一(関西医科大学内科学第三講座教授)

研究研究者 渡辺 守(東京医科歯科大学消化器内科教授)

日比紀文(慶應義塾大学消化器内科教授)

浅香正博(北海道大学分子病態制御教授)

坪内博仁(鹿児島大学消化器疾患・生活習慣病学教授)

高後 裕(旭川医科大学第3内科教授)

中村和彦(九州大学病態制御内科教授)

鈴木健司(新潟大学消化器内科)

竹田 潔(九州大学生体防御研究所発生工学教授)

千葉 勉(京都大学大学院医学研究科消化器内科学)

◆経緯・背景と現況

・潰瘍性大腸炎、クローン病の両疾患は経年的に増加。特に潰瘍性大腸炎は8万人を超え稀な疾患(5万人未満)とは言えない状況にある。

・難治例が増加している。20~30%は難治例;UC:2万人、CD:1万人以上

・現在の難治例治療は患者のQOLを著しく悪くする。(CD:手術後の再燃率70%、栄養療法はコンプライアンスが悪く再燃多い)

・現在の難治例治療の主体の免疫抑制療法には限界がある。

難治例は炎症が良くなっても潰瘍が良くならない。

抗TNF α 抗体:副作用、効果持続性、投与期間、高額医療費

⇒全く新しい考え方の治療法が是非とも必要 ⇒画期的治療法に関する研究班発足

【グループの目標】

①これまでの概念とは異なる機序=基礎的研究の遂行

②治療法の開発に直結する研究

③臨床応用の出来る研究

④患者QOL向上に役立つ治療法

⑤医療経済に貢献するため既存の安価な薬剤による治療

⑥Quality Journalへの発表、社会的なインパクトも必要

※厚生労働省からクオリティの高い研究と臨床応用という二律背反する命題を与えられている。

【進行中の5プロジェクト】(平成18年度~)

プロジェクト(1):「上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立」

プロジェクト(2):「腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発」

プロジェクト(3):「選択的細胞除去・移入療法の開発」

プロジェクト(4):「腸管のデリバリーシステムを用いた治療法の確立」

プロジェクト(5):「既存の薬剤を新しいコンセプトで適用外で応用した治療法開発」

【平成19年度における成果】

- ・58編の学術雑誌/インパクトファクター5以上の論文15
Nat. Med.:1編 J. Exp. Med.:1編 J. Immunol.:7編 Gastroenterology:6編
- ・10件の臨床応用(9件が各大学倫理委員会/IRB委員会への申請:申請済5件、申請予定4件)
⇒既に基礎研究に基づいた治療の早期臨床応用をグループとして開始している

【平成19年度の本研究に対する評価】

- ・学術的評価(10点満点) 6.67点
 - ・行政的評価(10点満点) 7.0点
- ※かろうじて合格という厳しい評価であった

評価委員会のコメント

〈評価できる点、推進できる点〉

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

〈疑問点、改善すべき点〉

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

〈倫理性について改善点〉 なし

【腸管上皮分化・再生機構の解析と腸管免疫の特異性に関わる研究領域の創出(基礎)】

- 腸管上皮分化・再生領域に対する分子療法、細胞療法の開発
 - ・腸管上皮再生・分化に関する分子制御(東京医科歯科大)
 - ・自己脂肪組織由来幹細胞移入による上皮再生療法(関西医大)
 - ・潰瘍性大腸炎に対する組み換えHGFによる第1、2相試験(鹿児島大)
 - ・HGF・薬剤の内視鏡的注入法、抗繊維化(新潟大)
- 腸管粘膜免疫の特殊性解明に基づく免疫制御療法の開発
 - ・プロバイオティクス・試験ペプチドを用いた治療法(旭川医大)
 - ・MIF制御による治療法(北大)
 - ・L-histidineによる治療法(慶應大)
 - ・遺伝子組み換えチオレドキシシンを用いたRedox制御(関西医大)
 - ・CXCL12/CXCR4の阻害剤による治療法(京大)
- 腸管免疫調節機構および上皮再生能の正常化を目指した細胞・分子標的治療のデリバリーシステムの開発
 - ・ステロイドポリリ乳酸マイクロカプセルを用いた第1/2相臨床試験(関西医大)
 - ・リポ化ステロイドデリバリー療法による多施設共同臨床研究(班員施設)
- 白血球除去療法を応用した選択的細胞移入療法の開発(九大)

【本研究班プロジェクトの展開】

- ・早期の臨床応用に向けての展開が必要
- ・特に遂行中の臨床試験の有効性に関するEBM確立、更なる安全性の確認
⇒治験の実現に向けての展開
- ・展望:既存の安価な薬剤の適応拡大

新規治療法により、手術、入院を減らす
⇒医療経済に貢献する

II. 研究報告

◎ 上皮細胞の再生・修復のための分子療法の確立 (13:20~14:20)

1) 腸管上皮再生の分子基盤と治療への応用 (研究分担者: 渡辺 守)

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

- ・以前より腸管上皮細胞の再生から見た難治性腸疾患の治療の開発を試みてきた。
- ・大腸粘膜の杯細胞は粘膜防御と修復に重要な機能を有し、杯細胞から出される分泌タンパクが粘膜の保護、粘膜修復、局所のリンパ球、免疫調節に関わることから、杯細胞の機能が、慢性炎症の治療に役立つということにフォーカスをあて研究した。
- ・正常大腸粘膜では杯細胞は豊富であるが潰瘍性大腸炎の病変部では杯細胞が減少してしまうことは以前より認められていたが、このようなことが病因の遷延化の一端を担っているのではないかと考えられる。
- ・このような杯細胞の構築を制御できる因子が今までわかっていなかったが、転写因子である Math1、Hath1 が幹細胞からの内分泌細胞、杯細胞、パネート細胞の分化に非常に重要であることがわかり、Math1、Hath1 の機構に着目してきた。
- ・解析の結果、Math1 遺伝子発現は Notch シグナルに制御されていることがわかり、MUC2 陽性の杯細胞には Notch が陰性であり、それ以外の細胞が Notch 陽性細胞になっている。また逆に杯細胞に示した Hath1 タンパクが高発現していることがわかり、細胞レベルにおきましても Notch のシグナルの亢進により Hath1 遺伝子が減弱するということから、Notch と Hath1 遺伝子は相反するように制御されていることがわかった。
- ・潰瘍性大腸炎の病変部では Notch シグナルはどうなっているか？
正常では粘液が豊富な腸管の構造を示しているが、潰瘍性大腸炎では粘液がかなり減少しており、Notch シグナルはかなり亢進していることがわかった。
⇒潰瘍性大腸炎などの慢性炎症の状態では Notch シグナルが亢進していることにより Math1、Hath1 が減少し、杯細胞の減少が起こっているのではないかと予想している。
- ・Notch シグナルは細胞運命決定因子であり、杯細胞よりも吸収上皮細胞に方向を決めるのではないかと考えられ、このような状態の時に Notch 阻害薬を使うことにより、無理矢理 Hath1 遺伝子を増加させることにより、杯細胞側への移行ができないかと最初に試みた。
- ・Notch 阻害剤は増殖を抑制して分化を促進する。
アルシアンブルー染色において正常よりも Notch 阻害剤を入れることにより、粘液が増加することがわかった。ただもうひとつ気になるのは KI67 で示した通り、正常よりも細胞分化のところで増殖細胞が減っている現象が見られた。
- ・Notch 阻害剤は増殖抑制により急性期 DSS 腸炎を増悪する
このような状態でマウスの腸炎モデルを用いて Notch 阻害薬の効果を解析したところ、DSS 腸炎の慢性腸炎の状態では増殖細胞がかなり増える。更に Notch 阻害薬を入れることによって分化はするが、増殖が阻害されることにより粘膜構築そのものができなくなってしまった。
- ・潰瘍性大腸炎では Notch シグナルが細胞増殖により粘膜を保持する。
Notch シグナルは細胞の分化と増殖を司るが、あくまで分化と増殖はスイッチするものであり、慢性炎症の状態では Notch シグナルが亢進することによって細胞増殖を優先させて腸管粘液を保

持っていることがわかった。

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

- Wnt シグナル活性化はHath1 蛋白を不安定にする
腸の上皮増殖を司る Wnt シグナルと Hath1 の遺伝子の関係を調べたところ、大腸癌細胞株を用いており、もともと APC が欠損しており、Wnt シグナルがオン状態では Hath1 蛋白が積極的にイビキンプレタソームの系で分解されている。正常の APC を導入して Wnt シグナルをオフにすることで Hath1 蛋白が安定化し、更に MUC2 蛋白が増加し、大腸癌細胞株に関してさえも分化を誘導することができた。Wnt シグナルをオフにすることでその下流にある c-myc 遺伝子は減少している。つまり Wnt シグナルも細胞の増殖と分化をスイッチできるシグナルである。
- GSK 阻害薬による Hath1 蛋白安定化が杯細胞分化を促進する
Wnt シグナルがオンになっている場合、GSK が Hath1 をターゲットとして蛋白分解を起こして分化シグナルを減弱させて逆に β カテニンの蛋白を安定化させることで細胞増殖を起こす。
Wnt シグナルをオフにすると Hath1 蛋白が安定化し細胞分化が起こる。その裏で β カテニンが GSK3 β によって蛋白分解を促進させて増殖のシグナルをなくす。
Notch シグナルと同様に Wnt シグナルもスイッチングによって分化と増殖を住み分けさせている。但し、今回は増殖と分化を司るものが GSK3 β という共通の蛋白を介して起こるということがわかったので、スイッチそのものをやっつけてしまおうと細胞の増殖と分化を同時に起こさせるのではないかと考えた。そこで GSK3 β の阻害薬であるリチウムクロライドを用いたところ大腸癌細胞 (SW450) ではリチウムの刺激により Hath1 蛋白が安定化し出ることにより MUC2 蛋白も増加する。またリチウムなので Wnt シグナルも変えないまま β カテニンも安定化させる。リチウム製剤は細胞の増殖と分化の両方を促進できるものであるという可能性がある。
- GSK 阻害薬は腸管上皮細胞の β カテニンと Hath1 を核内に共局在させる。
ヒトの小腸由来の細胞株を入手し、 β カテニンで染めると β カテニンは膜にドミナントに発現しており Wnt シグナルはオフの状態になっている。その状態で内因性の Hath1 は核に染まっている。(共局在はしていない)
リチウム処理することにより Wnt シグナルオンにすることにより、 β カテニンは膜から核へ移行する。更に Hath1 蛋白は安定したまま核内に存在し β カテニンと Hath1 が核内に局在する。
- GSK 阻害薬による Hath1 蛋白と β カテニンの共在が分化と増殖を同時に促進する
c-myc 遺伝子も MUC2 遺伝子もリチウムの処理によって増加する。このことからリチウム製剤は増殖と分化を促進できるものではないかということが強まりました。
- vivo での確認
炭酸リチウムを正常のマウスに投与し、正常の腸管がどうなるか検討
⇒ネガティブコントロール(水)
結果、大きな傷害は認められなかった。KI67 が強く染色されることもなかった。
正常のマウスではリチウムの影響はそれ程ないという印象である。
- GSK 阻害剤を用いた炎症性腸疾患の治療戦略
 β カテニンと Hath1 両方を安定化させ、細胞増殖と分化を同時に起こして粘膜の構築をすると共に分化を促進することで機能を亢進する。
- 今後の計画
DSS 腸炎モデルマウスにおける GSK 阻害剤の有効性の検討。粘膜再生への影響を検討する。

<質疑応答>

- Q: GSK3 β を阻害すると β カテニン活性化と分化のアクティベーションが両方見られる細胞はゴブレットセルよりもパネート細胞のケースのほうが多く見られるのでは？
- A: ディフェンシン関係のパネート細胞は調べているが少し上昇する。粘液産生と抗菌活性ができてバリアが形成されればよいと思っています。
- Q: リチウムは鬱病に使われる投与量と比べてどうか？

A: 短期間で解析したかったので量は多めになっている。今後安全性の検討が必要である。

Q: リチウム製剤を経口で投与した時に大腸まで到達するのか?

A: 直接腸管上皮に到達させるという考え方ではなく、血中を介した作用と考えられるが Wnt シグナルの動向をこれから確かめたい。

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

○ 鈴木健司¹、河内裕介¹、孫 曉梅¹、藤井庄人²、山崎元美²、米山博之²

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

[背景]

・炎症性腸疾患の新しい治療戦略として抗炎症療法(従来の治療戦略)に加え分化再生療法を開発することをコンセプトに進めている。

これまで HGF の遺伝子治療、recombinant 蛋白を局注または注腸などの検討をしてきたが、HGF に関してはある程度臨床応用への道が開かれつつある。

・炎症性腸疾患の中でも特にクローン病の術後の再発が長期で 70~80%まで及んでしまう。手術をしても再発する最大の理由は腸管が狭窄化してしまう問題があった。

・狭窄は腸管炎症局所の線維化で起こるが、線維化は必ずしも悪い修復機構ではなく正常な状態で起きれば傷ついた組織を十分に保護し組織を構築していき、むしろ必要な修復過程であるが、クローン病では過剰な線維化が起き、腸管の狭窄となり手術となる。

・クローン病では抗炎症療法は重要であり、同時に分化再生する療法も必要である。

そしてもうひとつ抗線維化療法を加えた3療法で対応することが大切である。

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

・炎症部位に治癒のために動員される fibrocyte、活性化された fibroblast が組織に定着し、コラーゲンファイバーを産生する。そういう一連の流れがあり、fibroblast が集まってくる時に単球マクロファージ、マスト細胞が産生するある物質を仮に G-family 遺伝子群と名付け同定した。(特許申請中)

それに対して SIRM を使って線維化を抑制する療法が可能ではないかと検討を進めた。

・G#1 遺伝子は炎症性腸疾患 DSS 腸炎のモデルにおいて経時的に発現が増加していることがわかった。

・急性 DSS 腸炎において day0、day2 に SIRM をアテロコラーゲンで包み全身投与

⇒目的の遺伝子は発現するが SIRM を投与することによって発現を抑制することができた。

腸炎の臨床スコアを解析すると SIRM 投与により活動度を抑えることができる。

組織で見てもコントロールの SIRM では治療できないが STNM-01 の治療により抑えることができる。

IL-6 もコントロール群で増加しているが、治療により抑制することが確認された。

fibroblast、マクロファージも抑えることが確認された。

コラーゲンの沈着を抑えることができる。

それらが線維化を抑えていくことにつながっていく。更に KI67 陽性細胞も増加する。

上皮の再生も促進している可能性もある。

・STNM-01 の効果・抗線維化、炎症を抑える、再生を促進することが急性腸炎のモデルより考えられる。

慢性腸炎で STNM-01 の効果を検討

・G-family 遺伝子群はクローン病の炎症局所においてマスト細胞、マクロファージが産生する物質が fibroblast に働いて増えていき、fibroblast の産生するコラーゲンが沈着していった線維化が起きていくのであろうと考える。

[実験]

・DSS 腸炎は5日間のみ DSS を投与し、その後、水に変えて19日目まで見る。

[結果]

- ・コントロール群では目的の遺伝子が産生増加、STNM-01治療により産生を抑えることができる。
- ・臨床スコアでも治療により改善することができる。
- ・組織でも線維化も含めた病変を改善することができる。
- ・マクロファージの集積も抑えることができる。
- ・fibroblastの集積も抑えることができる。

- ・コラーゲンの沈着も抑えることができる。
- ・メッセンジャーレベルでは α -SMA, type1のコラーゲンも抑えることができる。
- ・TGF β が下がることはなかった。
- ・STNM-01でG#1の発現を抑えることにより線維化を抑えることができる。

炎症を抑え組織の再生にもつながるのではないかと考える。

[今後の方向]

慢性腸炎での効果は確認できたが、今後は投与方法が問題になってくるので、クローン病の線維化した狭窄病変をバルーン拡張する際に、STNM-01を粘膜下注入し、線維化を防ぐ。

現在、毒性試験実施中(ステリック再生医科学研究所)。次年度以降に臨床試験を実施したい。

<質疑応答>

Q: fibroblastはステムセル領域の構成成分として重要であると考えますが、fibroblastの機能の一部のfibrosisに重要な機能だけを抑制しているのか?

A: SIRMはfibroblastの足場をブロックするというか、新たに動因されるfibroblast及び過剰なfibroblastが留まれないという戦略である。

Q: 狭窄しているところを戻すことはできるか?

A: 完成した狭窄の部位でも過剰なfibroblastを除き、生態系のMMPのバランスを変えることによって、より生理的な治癒が見込まれるというコンセプトを持っている。実際には出来上がった狭窄では検討していない。

Q: IL6が劇的に下がっていたが、どういう機序が考えられるか?

A: 現時点ではfibrosisをメインに検討しており、免疫系のところは今後解析します。

Q: TGF β が下がっていなかったが、活性化しているTGF β が局所でどれだけ産生されるかが大切であるので、その辺に目を向けていただきたい。また、T-regがfibrosisに働くというエビデンスは今のところない。

班長: 現在クローン病の狭窄には手術か内視鏡的拡張術しか方法がないので非常に待ち望まれる治療法であり、実用化を期待したい。

3) 炎症性腸疾患に対するHGFの臨床応用 (研究分担者: 坪内博仁)

坪内博仁^{1,2}、○井戸章雄^{1,2}、沼田政嗣²、山路尚久²、藤田 浩¹

(¹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、²京都大学医学部付属病院探索医療センター)

我々は一貫して、HGFの臨床開発に取り組んできた。

「組換えヒトHGFはDSS腸炎モデルにおける傷害粘膜の再生・修復を促進する。」ということ報告してきたが、このことを元にして大腸炎への治療を目的に臨床開発を行っているが、単回静注された組換えヒトHGFの大腸への移行はわずかである。肝臓が最大の標的臓器であり、投与されたHGFの7割から8割が肝臓に集積する。一方、大腸への移行は2%弱であり、大腸を標的とした場合、静注は望ましい投与方法とは言えない。

HGFの傷害粘膜の再生・修復促進は注腸投与でも発揮される。

DSS腸炎の注腸投与にて潰瘍面積の縮小が見られ、組換えヒトHGF注腸投与における血中暴露を見ると、血液中にはほとんど検出されず、注腸投与は副作用を少なくするメリットが見られる。

潰瘍性大腸炎に対する HGF の発癌の問題が指摘されたので、大腸癌発癌に及ぼす HGF の影響を 2 つの試験で検討した。

- ・ AOM で誘導した発癌モデルに対して HGF を腹腔内投与(3回/週×15週)
このモデルでは発癌を抑制する結果であった。
DSS を反復投与しその間 HGF を投与するという実験も行った。DSS で起こる腸炎は HGF で軽減されることを確認した。このモデルで発生する大腸癌にも HGF は抑制的に働いている。
- ・ HGF の劇症肝炎に対する第 I/II 相臨床試験コホート 1(4例)のまとめ
開発型の医師主導臨床試験・・・2008年6月で終了
2名が生存し、特別な有害事象は認められなかった。
治験統括報告書作成、GCP 監査
現有の組換えヒト HGF (GMP 製剤)
三菱ウェルファーマより原薬供給、その後同社に委託 GMP 製剤化(使用期限：2008年6月)
- ・ 炎症性腸疾患に対する臨床応用の課題
新たな組換えヒト HGF の製造
委託製造先の検討⇒現在ある程度めどが立ってきた(プラセボの製造も含む)
田辺三菱製薬からの技術移転⇒鋭意交渉中
現有の GMP 製剤との同等性評価
臨床試験実施に向けた準備
プロトコル等の作成、臨床試験実施体制の整備

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

- 4) 腸管粘膜再生におけるヒト皮下脂肪組織由来幹細胞の有用性と安全性の検討 (研究分担者：岡崎和一)
岡崎和一¹、○安藤祐吾¹、西尾彰功¹、松下光伸¹、内田一茂¹、大宮美香¹、福井聡¹、川股豊²、深田憲将¹、吉岡和彦² (¹ 関西医科大学内科学第三講座、² 同 外科学講座)

[生物学的製剤の出現]

- ・ 近年、抗 TNF- α 抗体の登場により、クローン病に対する治療法が飛躍的に進歩した。
- ・ 特に、広範な粘膜欠損を伴う難治例において Infliximab 投与が腸管局所での炎症反応を強力に抑制し、その結果として腸管粘膜の再生が進み、内視鏡的寛解状態に至る症例が多数見られる。
- ・ しかし Infliximab の副作用により、投与が困難な症例や Infliximab 無効例も存在する。そういった症例では腸管粘膜は十分に再生せず、頻りに再燃を繰り返すうちに、消化管狭窄や瘻孔、さらに腹腔内膿瘍を形成することもあり、これらの合併症は患者 QOL を低下させている。

[目的]

- ・ Infliximab 以外の方法で腸管粘膜の再生を促せないかと考え、粘膜再生を促す治療方法として、比較的安いかつ大量に採取可能な皮下脂肪組織由来幹細胞 (Adipose Tissue-Derived Stem Cells ADSCs) を用いて、粘膜下局所注入法により腸管粘膜再生に利用可能であるかどうか腸炎モデル動物を使って検討した。

[脂肪由来幹細胞]

- ・ 脂肪組織内において、単一クローンから多方向に分化する幹細胞が確認されており、脂肪・軟骨・骨・骨格筋など分化誘導できる可能性が示されている。脂肪組織由来幹細胞は骨髄由来幹細胞と類似しているという報告もある。こういった細胞の性質上、さまざまな組織への再生のソースとして利用できる。脂肪組織由来幹細胞からさまざまなグロースファクター、アディポサイトカインの分泌が示されており、HGF (抗アポトーシス作用、上皮細胞増殖促進作用、抗線維化作用) や VEGF (血管新生促進作用)、adiponectin (血管新生促進作用、抗炎症作用) などの粘膜修復作用が期待されている。脂肪由来幹細胞の分化誘導を行い、in vitro における多分化能を証明した。さらに免疫染色、特殊染色を実施し、成熟細胞への分化が可能であることも証明した。

増殖させた脂肪組織由来幹細胞をファックス解析を行ったところ骨髄かんようけい幹細胞に類似した表面マーカーを示した。さらにこれらの幹細胞が骨髄由来幹細胞よりも良好な増殖能を有することも証明した。さらに骨髄由来幹細胞の培養を行い、培養液中のグロースファクターおよびアディポサイトカインの HGF、VEGF、adiponectin が大量に検出された。

さらに in vivo の実験を行った。

グループ1：生理食塩水のみを注腸

グループ2：TNBS を注腸した後に2日目にコントロールとしてPBS 局所注入

グループ3：TNBS を注腸した群に2日目に脂肪由来幹細胞を腸管に局注

それぞれ10日目に評価。

結果、脂肪由来幹細胞を注入した群では明らかな潰瘍の縮小が認められた。腸管の長さに関しては有意差は見られなかった。組織中のサイトカインは好中球遊走活性化能を有する IL8 を有意に抑制していることが示された。その他脂肪由来幹細胞は IL1 β も抑制的に作用することが示されたが、有意差は認められなかった。また TNF α 、インターフェロン γ に関しては抑制的な作用は見られなかった。

腸上皮の増殖能を比較するために BRBU にて評価したところ、脂肪由来幹細胞局注群では有意な腸上皮増殖能の亢進が見られた。

組織を HE 染色で見るとコントロール群に比べて炎症性細胞浸潤の軽減が見られた。また、組織中の MPO 活性、および組織中のサイトカインを測定すると MPO 活性は脂肪由来幹細胞局注群では有意に抑制されていた。ジェンダーミスマッチの条件でオスの脂肪由来幹細胞をメスの腸炎モデルに局注し Y 染色体びっしゅを行い局注した幹細胞の分布を観察した。腸管の全層に渡り分布していることがわかった。特に炎症の強い箇所に集簇していた。

[結果]

- in vitro の実験により脂肪組織由来幹細胞(ADSCs)は多系統の成熟細胞へと分化する可能性が示された。
- ADSCs から多数の増殖因子(特に VEGF、HGF)および adiponectin が産生されていることが証明された。
- in vivo の実験において ADSCs は傷害をうけた腸管粘膜の再生を促進する働きが確認された。
- 粘膜下層に局注された ADSCs は腸管全層に分布していることが確認され、さらに腸管壁を構成する中胚葉系成熟細胞(線維芽細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞)へと分化した可能性が示唆された。しかし、今回の実験では腸上皮細胞への分化は確認されなかった。

[考察]

- クロウン病では Th1 系の免疫異常が認められ、腸管局所において活性化マクロファージおよび Th1 系の免疫応答の亢進を伴った活性化 T-cell の増加が見られる。これらの細胞から分泌される炎症性サイトカインにより、慢性的に炎症が持続し、それに伴った広範な粘膜の欠損、炎症が生じている。
- 広範な腸上皮の欠損により持続的な腸内細菌および食事抗原等を初めとする外来抗原の暴露を受けており、これらが原因として炎症等の悪循環がおきている。近年 Infliximab を初めとする生物学的製剤の進歩により炎症を選択的に抑制する治療ができるようになった。しかし実際臨床では症状改善したにもかかわらず、粘膜再生が不十分であり、瘻孔を形成する症例も存在する。そこで今回は粘膜再生に着目し、腸管粘膜の再生を促進することにより、腸内細菌等の外来抗原からの持続的な暴露を阻止し、炎症の悪循環をストップさせるよう考えた。

今後の展開

[目的]

- ヒト皮下脂肪組織由来幹細胞を分離培養し、末梢血中のリンパ球、樹状細胞、単球、マクロファージ等の免疫担当細胞への免疫抑制作用の検討を行う。
- 免疫不全マウスを用いて、ヒト皮下脂肪組織由来幹細胞による腸粘膜再生についてゼノ移植を行い、cell therapy の安全性や治療効果を検討する。

[対象]

- 炎症性腸疾患患者および非炎症性腸疾患患者
- 年齢は18歳以上75歳未満
- 本人よりインフォームドコンセントと文書にて同意の得られている患者

[方法]

- ・ヒト皮下脂肪組織を術中に採取し、そこから脂肪組織由来幹細胞を分離培養し、末梢血中のリンパ球、単球などの免疫担当細胞への免疫抑制作用を検討する。
- ・また免疫不全マウスの腸管局所に対してヒト ADSCs を移植し、移植したヒト ADSCs の腫瘍増殖能の有無を確認する。

[今後の適用]

- ・クローン病の合併症である難治性潰瘍や瘻孔に対して自己の細胞を用いて経内視鏡的に治療可能な治療法の確立を目指す。

<質疑応答>

Q: 移入された ADSCs はほとんど異なる細胞に分化するのかわ?

A: 分化している割合については詳細な検討はできていないが、印象としてはほとんどの細胞は何らかの細胞へ分化している。

Q: 何日目で解析しましたか?

A: 10 日目、注入してから 8 日目になります。

Q: 腸管上皮には分化してなさそうだが、この幹細胞自身 vitro で培養した場合は上皮細胞系には分化できるのかわ?

A: サイトケラチンに関しては分化誘導すると陽性に出ているが、vivo では難しい。

◎ 腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発 (14:20~15:20)

5) 自然免疫系による腸管炎症の制御機構 (研究分担者: 竹田 潔)

- 竹田 潔 (大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座免疫制御学)

腸管樹状細胞による Th17 細胞の分化誘導機構

自然免疫系が異常な活性化状況になると特に Th1 細胞の誘導が強くなって、炎症性腸疾患を発症すると言ってきた。しかし近年、Th17 細胞も関与していることがいくつか報告され、Th17 細胞は正常なナイーブな状況でどういった組織に存在しているのかわを見ると、spleen、MLN、peyer's patch をはじめとした各リンパ組織には Th17 陽性細胞は認められなかったものの腸管 (大腸・小腸) の粘膜固有層にはいつでも IL17 陽性細胞は極めて多数存在している。ナイーブな状況で腸管粘膜固有層という特殊な環境が Th17 細胞の分化を誘導しているのではないか。特に粘膜固有層に Th17 細胞を分化誘導する樹状細胞がいるのではないか?

- ・樹状細胞と CD11c⁺陽性細胞は脾臓、MLN と異なり腸管に特異的な樹状細胞の subset があるのではないかを検討。

CD70 の抗体で染めると脾臓にはほとんど CD70 陽性の細胞はないが、腸管粘膜固有層では CD11c^{hi} で CD70^{low}、CD11c^{low} で CD70^{hi} の population があることがわかった。CD11c^{hi} で CD70^{low} は Mesenteric Lymph Node には存在した。CD70^{low} では Th17 の分化誘導はできないが、CD70^{hi} では Th17 の分化誘導はできたことから、粘膜固有層に特異的に存在している CD70^{hi}、CD11c^{low} の樹状細胞が Th17 細胞の分化を誘導できることがわかってきた。CD11b⁺細胞が分化誘導するという報告あり。(2007 年の Nature Immunol.) この細胞も CD11b を発現しているのでおそらく同じ population であると考え。

- ・樹状細胞、TLR が微生物を認識すると活性化されるが、commensal bacteria や TLR の関与はどうなるのかわ?

TLR の関与をシグナルがなくなる MYD88・trif ダブル KO マウスで検討したところ、腸管の粘膜固有層では Th17 細胞は正常とほぼ同様。TLR は関係がない。

commensal bacteria の関与を Germ free マウスで検討したところ、Th17 細胞の数は激減していたことから、腸管特異的な樹状細胞は commensal bacteria によって TLR independent なシグナルで Th17 を分化誘導した。

- commensal bacteria はどのようなメカニズムで Th17 を分化誘導しているのか。
ナイーブな T 細胞が Th17 細胞に分化する際に最初に IL6 や TGF β が重要であることがわかってきた。
- 樹状細胞が IL6 や TGF β の活性化に関与しているのか。
CD70^{hi} と CD70^{lo} の細胞を単離し、IL6 の発現や TGF β の活性化に関わるインテグリンとして α V、 β 8 のサブユニットを調べた結果、CD70^{hi} の群では IL6 もインテグリンの発現も高かった。
commensal bacteria の関与を見ると germ free マウスの CD70^{hi} ではこれらの発現が落ちていた。

[小括]

腸管特異的な樹状細胞は commensal bacteria によって IL-6 を産生したり、TGF β の活性化を通じて確かに Th17 の分化を誘導してそうであることがわかってきた。

最もクリティカルなところは commensal bacteria はいかにして樹状細胞に働きかけて TLR independent に産生を促しているのだろうか。

- extra cellular ATP が関与しているのではないのか。
Extra cellular の ATP が神経系の細胞に働きかけることが言われており、最近、免疫系でも特に樹状細胞に extracellular ATP が ATP センサー (P2X レセプター、P2Y レセプター) を介して働きかけることが報告された。
- commensal bacteria が extra cellular ATP の source になるということである。
マウスの糞便中の ATP 濃度を検討。
germ free マウス由来の糞便では ATP の濃度が落ちている。
- extra cellular ATP が Th17 の分化誘導に関わっているのではないのか。
germ free マウスに ATP の加水分解耐性の ATP γ S を腹腔内投与し、9 日後に粘膜固有層の Th17 細胞を見ると ATP を打つことによって、Th17 細胞の数を増やすことができた。
逆に SPF マウスに Apyrase (ATP を加水分解する酵素) を腹腔内投与し、同様に 9 日後に Th17 細胞の割合を見ると Apyrase 投与群 (ATP を壊したもの) で明らかに Th17 の陽性率が低下していた。
マウスのレベルで extracellular ATP の濃度の如何によって Th17 の数に変動があることから、何らかの関与があることが考えられる。
- SPF マウスにバンコマイシン、メトロニダゾールを経口投与すると腸管腔の常在菌は著しく減少し、それに伴い糞便中の ATP 濃度も減少。さらに Th17 細胞も減少。
⇒ 常在菌由来の ATP が Th17 の分化誘導に関わっている。
- ATP は腸管特異的な CD70^{hi} の樹状細胞に働きかけるのか。
CO-culture の系に ATP を加えて検討。CD70^{lo} では例え ATP を加えても IL-7 の陽性率は高まらないが、CD70^{hi} では IL17 の産生率は高まる。
- CD70^{hi} の population は確かに ATP に反応するか。CD70^{hi} の population に ATP を添加し IL-6 やインテグリン (α V、 β 8) の発現を見ると、 α V や β 8 の発現が高まっている。
- commensal bacteria 由来の extracellular ATP が腸管に特有の樹状細胞に働きかけて IL-6 や TGF β の活性化を通じて分化を誘導してそうであることがわかってきた。
Th17 細胞は炎症性腸疾患を誘導しようと考えられるので、ATP による Th17 の増加は実際に炎症に関与しているかを検討した。
- SCID マウスにナイーブな CD4T 細胞を投与する系を用いて T 細胞依存性の腸炎を惹起した。
マイルドな腸炎が発生し、体重増加が止まったが、その群に ATP を投与するとさらに体重減少がひどくなり、下痢症状も増悪した。病理学的にも重症度が高まった。
ATP を投与した SCID マウスでは Th17 細胞はかかなり高まり、一方 Th1 細胞の数はあまり変わらなかった。
⇒ ATP の投与により Th17 細胞の数は粘膜局所で高まるとともに炎症も強まる。
- commensal bacteria 由来の ATP は通常で Th17 細胞を分化誘導しているが、ある特殊な環境化では Th17 細胞が確かに炎症を引き起こしているということがわかってきた。
- 今後は ATP を介した樹状細胞の活性化を人為的に制御することによって炎症性疾患の制御機構を明らかにできるのではないかと考える。さらに解析を続けていきたい。

<質疑応答>

Q:細胞のエネルギー源として使われるATPがどのようにして樹状細胞に到達できて、感知され、細胞の中に入って作用しているのか、またはレセプターのようなものがあるのか?

A:細胞の外側にあるATPがP2受容体にbindすることによってシグナルが入り、その細胞を活性化させることが特に神経系の細胞でわかってきた。樹状細胞でもATPセンサーの発現が極めて高い。腸管腔から出てきたATPが樹状細胞に外から働きかけて遺伝子発現を誘導しているのではないかと考えている。腸管腔がソースになっているATPが粘膜固有層の樹状細胞にどのようにたどり着くのか、詳細は不明であるが、1つの可能性として粘膜固有層にある樹状細胞が樹状突起を管腔内に伸ばすという報告があり、何らかのメカニズムが考えられる。

Q:細胞内でATPをセンスした時に通常、解糖系の嫌気的なATPの産生とミトコンドリアによる産生があるが、樹状細胞の中でのバランスが変わっていることが影響しているのか?

A:細胞内でのATPの動向の話であるが、そうではなく樹状細胞に対して外からATPがサイトカインのように作用し、P2受容体がATPをセンスした場合、P2受容体が2種類(①イオンチャネル ②膜貫通型のG-coupled受容体)があり、シグナルが入ると考えている。

Q:普段はおとなしくしているTh17細胞が何らかのトリガーにより悪い作用を引き起こすのか?

A:その辺りは正直わからない。トリガーがわかれば大きな進展となる。

6) 抗菌ペプチドを用いた新規治療法の開発 (研究分担者: 高後 裕)

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

(¹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、²旭川医科大学消化管再生修復医学講座)

[背景]

- ・自然免疫のfunctional moleculeである抗菌ペプチドを新規治療に応用しようと考えている。
- ・自然免疫は腸管で発達しており、小腸では細菌が少なくことは小腸腔にあるpaneth細胞の働きによるものであることがわかっている。paneth細胞は細胞内に分泌顆粒を持ち、多くの抗菌ペプチドを含んでいる。抗菌ペプチドは生体内で最初のバリアの役目を持っている。paneth細胞、大腸上皮、白血球など血液細胞でも発現がある。数多くの細菌、ウイルスなども殺すことが報告されている。実際には大きなペプチドとして分泌され、3~4kDの小さなmoleculeになって活性を有する。主なファミリーとしてはdefensin、cathelicidinなどがある。

[defensin]

- ・6個のシステインを有し3つの対峙するbondを有し、強固な形態を作るという特徴がある。ヒト小腸内paneth細胞ではpro HD-5という大きなmoleculeとして作られ、分泌後トリプシンでactivateされてmatureなHD-5となるが、その機構については明らかになっていない。我々の実験でも確認した。
- ・免疫組織学的にpro segment、mature peptideの抗体を作成し染色すると、paneth細胞で強発現が見られ、このmoleculeはpro segmentを有したproformとして存在していることを確認した。

[moleculeがmature formになるということにどういう意味を有するか検討]

- ・proformとmatureformのHD-5の抗菌活性を調べた。E.coliに関してはproformも抗菌活性を有する、一方サルモネラに対してはproformは抗菌活性を有せず、matureformのみ有する。
- ・抗菌活性以外に免疫誘導する働きがあるのでそれらを検討した。
大腸癌上皮細胞のHT-29を用いてHD-5と培養を行った。コントロールで既にHT-29からはGRO、IL-8、PDGFなどのサイトカインが分泌されており、HD-5を受けるとMP-1 θ などが分泌されたりPDGFなどの変動が見られた。そこをはっきりさせるためにELISAを用いて確認。HT-29と同様にSW480も用いて検討し、proformではinductionがかからないが、HD-5を用いるとIL-8の分泌が亢進される。他のサイトカインとしてはGRO α がわずかに上昇する、PDGFに関しては特に変動はない。mRNAレベルで見るとIL-8は明らかに亢進が見られる。
⇒paneth細胞内ではpro HD-5はmature formとして存在する。一度分泌されるとトリプシンによりactivateを受けることでmature formのHD-5になりサイトカインの分泌能を大腸上皮に引き出すという結論になる。

[治療にどう結びつくかを検討]

・DSS colitis model で検討

マウスに対して3%DSS modelを1週間投与し組織学的に検討。colonを主体に粘膜の脱落、炎症細胞浸潤が認められ、小腸に対してはあまり大きな変化は認められない。内因性の defensin を見るためにAUページを用いて検討した結果、DSS Colitisでも defensin の発現には特に変動は見られなかった。

こういったモデルに対し、経口的に defensin を投与する。

グループ1: DSS Colitisを誘導する前の日に経口投与

グループ2: コントロール

グループ3: Colitisができた後に投与

HD-5、pro HD-5の経口投与(2.5mg/kg)で腸炎の致死率については変わりなかった。

・IP腹腔内投与とモデルで検討

HD-5を3回投与した群で致死率が減少、pro HD-5ではわずかに延長するが有意差は認められなかった。

体重減少を見るとHD-5、pro HD-5共、特に変動は見られなかった。

組織学的には各グループで粘膜の脱落がかなり強かった。

アポトーシス(defensinは上皮細胞でアポトーシスを抑制する)について検討した結果、各グループ共、変動は見られなかった。

→マウスにDSS Colitisを誘導すると大腸主体に炎症が強くなる。経口投与した場合にはあまり効いていない。腹腔内投与するとmature HD-5のみ効いている。

想定される機序 1. Anti-translocational bacteria 2. Immunulation 3. LPS中和

[まとめ]

- ・ヒト defensin(HD-5)は、プロペプチドとしてpaneth細胞で産生され蓄えられる。(その活性化が重要)
- ・切断酵素によるペプチド活性化の課程は、HD-5の抗菌活性やサイトカイン誘導能に必要である。
- ・活性型の defensin はマウス腸炎モデルの治療に有効であり、抗菌ペプチドを用いた抗菌治療法の可能性が示された。(mature formを用いた)

<質疑応答>

Q: 静脈内投与よりIPの方がよいのか?

A: 静脈内投与はまだ実施していないので比較はできない。

Q: 正常マウスでは炎症を惹起することはないか?

A: 正常マウスでは実施していないのでわからないが、腸管内でこれぐらいの濃度では影響が出ないのではないかと考えている。今後正常マウスで検討してみる。

Q: ヒトでの臨床応用する場合の投与経路と投与方法はどうか?

A: 注腸の可能性はあるが、どこで炎症が起きているか、DSSの場合は腸管内よりも腸管粘膜が傷害された後をブロックしなければならぬ。defensinはmulti-functionalなpeptideであり、腸管内で効く可能性はあるが、腸管外(血中や腹腔内)で効く可能性があるので、状況に応じて投与方法を考えていかなければならない。UCでは粘膜表層に、CDでは全層性であるので投与方法を考えなければならぬ。

Q: HD-5を経口投与した場合、腸管にいくまでに変性して活性が変わることがないか?

A: 経口投与後、腸管内でmatureなHD-5が残っていることを確認している。投与量に応じて到達することは考えられる。

7) プロバイオティクス由来ペプチドを用いた新規炎症性腸疾患治療の開発 (研究分担者: 高後 裕)

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

(¹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、²旭川医科大学消化管再生修復医学講座)

発表者: 藤谷幹浩

[背景・炎症性腸疾患の治療におけるプロバイオティクスの効果]

<過去の文献で効果が見られたもの>

UCではVSL。効果があるという文献と効果がまったくないという論文もある（クローン病においても）
⇒効果についてはまだはっきりしていないのが現状である。

＜プロバイオティクスは効果を発揮するには？＞

- ・生菌が腸管上皮に生着し、そこに何らかの生理活性物質が作用あるいは直接作用し、初めて効果を有する。問題点として、腸内環境の個体差、腸内細菌叢の個体差、病原菌の影響、薬剤の影響等で生理活性、生着ができない。

⇒そこで、プロバイオティクスが産生する有効成分を同定し、作用機序を解明することでより効果的な治療が得られるのではないかとということで検討した。

[プロバイオティクスに特異的な活性物質の同定]

- ・プロバイオティクス培養液の精製 最終的にFilterationをかけて精製 そのマーカーとしてHeat shock protein 27を使用
⇒Hsp27誘導あり*B. Subtilis*(納豆菌)、*Lactobacillus GG*、*Lactobacillus plantarum*、*Bifidobacterium breve*
⇒Hsp27誘導なし*Enterococcus faecalis*、*E. Coli Nissle*、*Enterobacter aerogenes*、*Proteus mirabilis*

[検討1]

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

[CSFはHsp27, pAkt, p38MAPKを誘導する]

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

[CSFは酸化ストレスからヒト腸管上皮細胞を保護する]

- ・酸化ストレス化においてCr release assayを行ったところ*B. subtilis* 菌の培養上清でCr releaseが減る。CSFをノックアウトした*B. subtilis* 菌の培養上清を使うと作用がなくなる。
⇒CSFの作用が強く示唆される。
- ・化学合成したCSFでも同様の細胞防御作用をもつことが解りこの物質が有効成分であることを確認した。

[CSFはOCTN2を介してヒト腸管上皮細胞に取り込まれる]

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

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

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

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

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

[CSFはHspsを誘導し、酸化ストレスからマウス腸管上皮細胞を保護する]

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

[細菌由来の活性物質CSFの腸管炎症に対する効果を明らかにする]

- ・材料および方法
動物・・・C57BL/6J マウス

飼育条件・・・2%DSS と DSS フリー群 6日目にCSF(100nM)を注腸 7日目に屠殺
検討項目および結果

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

[DSS腸炎モデルに対するCSFの生存期間延長効果]

動物・・・C57BL/6Jマウス(オス)6週齢

- ・方法 4%DSSを経口投与 3日目からCSF10nM群とPBS群に分け、1日おきに注腸し、生存期間を計測
- ・結果 CSF投与群が有意に生存率が高い。

[まとめ]

- ・B. subtilis由来ペプチドCSFは腸管上皮保護作用を有する。
- ・この作用はOCTN2を介して発揮される。
- ・10nM CSFの隔日注腸投与によりマウスDSS腸炎が改善する。

[新規乳酸菌の死菌による腸管保護活性の検討(preliminary)]

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

・まとめ

- 新規乳酸菌の死菌はCaco-2_{cl}細胞にHSP27を誘導する。
- C57B6mice 摘出腸管にHspsを誘導し、酸化ストレスから腸管上皮を保護する。

[プロバイオティクス産生ペプチドをIBD治療に応用するための今後の課題]

- ① 種々の腸炎モデルにおけるCSFの効果を確認する。(DSS腸炎モデルに加えTNBS腸炎、IL-10ノックアウトマウスで検討)
- ② その他の菌種の死菌あるいは菌由来活性物質の、ヒト腸管組織に対する生理作用を明らかにする。(Pha、新規乳酸菌モデルを用いて検討)
- ③ これらの菌由来ペプチドをもとに、アミノ酸側鎖の修復や配列の組み替えを行い、さらに作用が強い活性物質を開発する。(配列の入れ替え、糖鎖修飾を検討中)
- ④ 菌由来ペプチドを用いて炎症性腸疾患治療の臨床試験を行う。

<質疑応答>

Q:隔日投与になっているが半減期はどうか?

A:半減期は不明である。連日投与でないのはマンパワーの問題である。

Q:新しいペプチドは死菌ということだが分泌されない?

A:死菌は保存がきく、持ち運びが簡単である。プロバイオティクス治療の方法として適切ではないか。最終的には培養液中の活性物質を測定する必要があると考える。

Q:実際に臨床応用する場合は生きた乳酸菌を使用するか?

A:生菌かもしくは活性物質をそのままダイレクトに投与することが考えられる。

8) MIF (macrophage migration inhibitory factor) の制御による炎症性腸疾患の新しい治療法の開発

(研究分担者: 浅香正博)

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

[マクロファージ遊走阻止因子: MIFについて]

- MIF は免疫細胞や上皮細胞のみならず、様々な細胞や組織での発現が認められる。
 - MIF 研究のおもな流れ(1966~2008)
機能がなかなか明らかにならないが、炎症、増殖、アポトーシスなどに関与している。
細胞の外で働いたり、中で働いたり、あるいは受容体が不明確であり研究が進んでいなかった。
最近の報告で受容体の候補がみつかり、これをターゲットとした治療が検討されている。
昨年から今年にかけて低酸素応答と低酸素応答によるアポトーシスと MIF の関わりが強いのではないかと Cancer Res. に報告され、腸炎との関係が Gastro. で報告されている。
 - MIF と炎症性腸疾患
実験腸炎モデル、ヒト炎症性腸疾患患者において MIF の過剰発現がある。抗 MIF 中和抗体の投与により、腸炎の発祥、進展を抑制できる。
MIF トランスジェニックマウスでは実験腸炎が増悪し、MIF ノックアウトマウスでは腸炎を発症しない。
 - 抗 MIF 療法の治療戦略
我々は三量体の MIF で検討してきたが、医薬品の可能性としては
低分子化合物(tautomerase, ISO-1, CD74, CXCR2, CXCR4)
これらは酵素活性を阻害するという製剤であり、MIF のすべての機能を網羅していないことが問題である。
抗体医薬
ワクチン
- MIF Th-epitope DNA ワクチンにより DSS 腸炎が有意に抑制された
- ワクチン接種による自己抗体誘導が、低コストかつ抗体医薬における医学的問題を解決しうる可能性が示唆された。
- 今後の課題としては established colitis モデルでの治療としての検討、抗 MIF 自己抗体産生メカニズムの詳細の解明、さらに投与方法を含めたヒトでの試験のデザインや倫理的問題のクリアである。
- リウマチなどの疾患でも検討されている。
その他 (HSP)
核酸医薬 (antisense, siRNA)
DSS 腸炎に対するアンチセンス MIF の効果・・・臨床所見、組織学的所見両方に効果あり
LPS 刺激後の IL-8 の発現、分泌(HSC-2)
LPS 刺激後の MIF の発現、分泌(HSC-2)・・・蛋白として増えてくるが、上清中には見られない、細胞の中で増えてくるが、上清中に出てくるわけではない。
MIF 発現に対する MIFsiRNA の効果
MIF のメッセージが 95%近く落ちる (蛋白レベルでは半分くらい)
IL-8 発現、分泌に対する MIF ノックダウンの効果
強い抑制はかからない。細胞の中の MIF が機能していることが考えられる
細胞外に出た MIF だけでなく、細胞の中の MIF を制御することも同時に考える必要がある。
MIF の修飾を検討する必要がある。リン酸化や糖の修飾はないと考えられている。
ユビキチン化は報告されていないが、ユビキチンファミリーの中で SUMO1, 2, 3 に注目している。
強制発現系での MIF-SUMO 化検討・・・SUMO 化する可能性あり、SUMO 化された蛋白の機能を検討する必要あり (localization, 転写活性)
※SUMOylation は細胞内 MIF の機能を変える可能性があり、そこが新しい治療のターゲットになる可能性があり、現在検討を始めた。
- <質疑応答>
Q: MIF を制御すると腸炎が改善するが、あとは臨床応用(実用化)をどのようにするか?
A: 可能性が高いのは HSP 誘導である。