

◎ 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)

[背景]

- ・ヒトの末梢血 CD4⁺CD25^{hi} 制御性T細胞は広範囲に免疫反応を制御する制御性T細胞 (regulatory T cell:Treg) で、IBD を含めた疾患の治療への応用が期待される。又、核内転写因子 FOXP3 を特異的に発現することが知られている。
- ・潰瘍性大腸炎 (UC) に対する血球成分除去療法では、大腸炎を誘導する effector 細胞に加えて、Treg も同時に除去されている。

[血球成分除去・Treg 分離移入療法]

- ・UC に対する血球成分除去療法 (遠心分離法:CFLA) を施行し、除去された白血球より Treg を分離し、患者へ輸注する。
- ・臨床応用可能なグレードでの無菌的細胞分離法が必要となってくる。
⇒そこで我々は、ChiniMACS Cell Selection System を利用した。

[ChiniMACS Cell Selection System について]

- ・Miltenyi Biotec 社の臨床応用を目的とした磁気ビーズによる細胞分離システムで、閉鎖回路内で無菌的に大量の細胞分離が可能で、CD34⁺肝細胞 移植などで既にヨーロッパで臨床に用いられている実績がある。

<UC に対する Treg 分離移入療法～臨床試験プロトコール～>

倫理委員会を経て若干修正になる可能性はある。

[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]

以下の基準を満たす UC 患者

- ①20 歳以上
- ②中等症～重症
- ③左側大腸炎型、全大腸炎型
- ④文書による同意を取得可能

[除外対象]

- (ア) 重篤なアレルギー疾患の既往
- (イ) アナフィラキシーの既往
- (ウ) 薬剤、食事に重篤なアレルギーのある患者
- (エ) 妊婦、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: ChiniMACS を用いて 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する。(成分返血)

[調査項目]

- ①患者背景：年齢、性別、診断名、重傷度、病型、既往歴、腸管合併症、腸管外合併症、エントリーまでの治療経過
- ②臨床スコア：CAI
- ③血液検査(CRP、赤沈、血算、生化学)(週1回)Treg 移入後はFe、UIBC、フェリチン
- ④腸内視鏡検査：内視鏡スコア(Matts 分類 治療前後)
- ⑤フローサイトメトリー分類：CD4, CD8, CD19, CD25, FOXP3(第1、第5週)
- ⑥副作用の有無(移入療法後2週間)

[評価項目]

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)

[予定登録数と研究期間]

予定登録数：5例

研究期間：承認時から平成22年3月

[調査スケジュール]

	1W CAP 前	2W CAP 前	3W CAP 前	4W CAP 前	5W CAP 前	Treg 移入	移入 1W 後	移入 2W 後
臨床スコア	○	○	○	○	○		○	○
採血	○	○	○	○	○	○	○	○
CF	○						○	
フローサイト	○				○	○		
副作用チェック						○	○	○

[本試験で使用する ClinimACS 製品の CE 認証状況]

全製品 CE 認証取得済

[予期される有害反応]

ClinimACS で分離した細胞輸注：これまでの臨床試験で認容性は高いと考えられている。

細胞に付着している磁気ビーズが体内に入ることによる有害反応が起こる可能性：

- ・ビーズは非常に微少であり、体内に入る鉄の量としても少ないため危険性は少ないと考えられている。
- ・ビーズ表面に付着したマウスモノクローナル抗体に対するアレルギー反応が起こる可能性
⇒サクシゾン前投与、細胞輸注の際の医師の立ち会い、バイタルサインのモニタリング
⇒CD8 を除去したドナーリンパ球輸注、CD3/CD19 を除去した造血幹細胞、GVHD 予防目的のドナー Treg 輸注臨床試験などの報告より毒性や副作用は認められていない。

Dr. Edinger(臨床試験の責任者)のコメント：急性毒性や副作用は認められなかった(7例での検討)

[今後の予定]

- ・健康被害が発生した時の補償
⇒介入研究で補償保険の加入が義務づけられている
⇒損保会社と交渉中
- ・九州大学医学部研究院等倫理委員会審査
- ・高度医療申請？(8月28日事前相談)

今後の検討事項

- ・補償の問題
- ・費用の問題

<質疑応答>

班長：制御性T細胞自体は日本の京都大学再生医科学研究所 生体機能調節学分野教授坂口志文先生 が発見されたもので治療の基本コンセプトは日本発であり実現化を期待します。

◎ 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、福井朝朗、

川原聖二、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)

発表：深田憲将

[目的]

- ・サイクロスポリンは潰瘍性大腸炎診療ガイドラインではステロイド抵抗性の重症潰瘍性大腸炎の寛解導入療法として投与することが推奨されている。
- ・しかし、副作用（免疫抑制状態に伴う感染症、肝障害、腎障害、痙攣）の出現が多く、多剤との併用などで、血中濃度が安定しないため、血中濃度をモニターすることが必要であり、管理が煩雑である。
- ・サイクロスポリンの血中濃度を上げることなく、生じている時期に投与することが可能となれば副作用のない治療が可能になると考えられる。そこで、ドラッグデリバリーシステム (DSS) を用いたサイクロスポリンの投与方法について検討した。

[ポリ乳酸ドマイクロスフェアを用いたドラッグデリバリーシステム]

- ・マイクロスフェアの表面電化や大きさを変えることでマクロファージをターゲットに貪食させることが可能であり、卵白アルブミンを封入したマイクロスフェアを用いてアジュバントがなくても経口免疫が可能になることが報告されている。
- ・難治性潰瘍性大腸炎におけるデキサメサゾン封入ポリ乳酸マイクロカプセルの有用性を検討する試験が進行中である。

[サイクロスポリンの作用機序]

- ・サイクロスポリンはシクロフィリンと結合し、カルシニューリンを阻害することにより IL-2 等のサイトカインの発現を抑制することにより免疫を抑制する。
- ・近年、ICAM1, VCAM1 などによる接着因子の発現を阻害することにより、白血球の遊走を抑制することや MHC Class I, II の抗原提示を阻害することにより、T細胞の機能を抑制することが報告されている。

[DSS 腸炎モデルに対する CyA 封入ポリ乳酸マイクロスフェア投与計画]

- ・サイクロスポリンの投与量はガイドラインで推奨されている 2mg/kg と 1/10 量である 0.2mg/kg とした。コントロールとして PDS を投与した群と経口サイクロスポリン製剤をマイクロスフェア投与群と同じ用量で検討を行った。
- ・方法 サイクロスポリン封入マイクロカプセルを作成 (粒子の大きさは 5 μ m 以下)
 - ・1mg のカプセルに 34 μ g のサイクロスポリンを封入することが可能であり、PDS 中で 24 時間後 50% のサイクロスポリンが徐放された。
 - ・マウスに 2mg/kg の投与を行い血中濃度測定したが、測定感度以下であった。
 - ・以上より血中濃度が上がることなく腸管からの取り込みが可能であると考えられた。
- ・結果 投与後 HE 染色で病理組織を検討
 - ・PDS 投与群では 半数以上の標本で炎症細胞浸潤と間質の浮腫、上皮の脱落が認められた。
 - ・サイクロスポリン封入マイクロスフェア投与群では通常量及び 1/10 投与量群においても炎症細胞浸潤が抑制され、間質の浮腫の改善と上皮細胞の脱落が抑制されることが確認された。
 - ・CyA PDLLA-MA による DSS 腸炎抑制効果
 - PDS 投与群と比較して体重改善効果が認められた。

便の性状はPDS投与群では10日目でもほぼ全例が下痢便状態であったのに対し、マイクロカプセル投与群では一部の症例は軟便であったが普通便となったマウスも認め、スコアリングすると有意差を認めた。病理スコアにおいても腸炎改善効果が認められた。大腸をホモジナイズし、組織中のミューロペルオキシダーゼ活性を測定したが、PDSを比較しMPO活性が抑制されていた。マイクロカプセル投与群は経口剤通常量投与群と同等のDSS腸炎抑制効果があり、1/10量投与でも通常投与群と同等の効果を有することが確認された。

[結語]

- ・シクロスポリン含有ポリ乳酸マイクロカプセルの投与は血中濃度を上げることなくDSS腸炎の改善が認められた。

<質疑応答>

Q:腸管上皮からどのような形でマクロファージに到達できるのか?またどれくらいの割合か?

A:マクロファージにはファゴサイトーシスで腸管上皮に直接吸収される。率に関しては検討していない。

11) チオレドキシ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、福井朝明、

川股聖二¹、安藤祐吾¹、仲頼裕志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)

[背景]

- ・我々の生体は、ウイルス、細菌感染、炎症、紫外線、放射線などを含む環境有害物質への暴露など様々なストレスにさらされている。ストレスを受けた細胞内では活性酸素種(ROS)が産生され、大量のROSは蛋白や脂肪、DNAを酸化、傷害をもたらす。一方、少量のROSはセカンドメッセンジャーとして細胞のストレス応答シグナル伝達機能を有している。生体はストレスに対する防御応答機能としてデドックス反応による活性酸素除去系または調節系を持っており、グルタチオンシステムとチオレドキシンシステムがデドックス制御を担っている。
- ・クローン病及び潰瘍性大腸炎において抹消血由来の好中球におけるスーパーオキシドの産生が活動期で亢進し、粘膜局所におけるROSの産生が病変部で健康人に比べて有意に増加していることが報告されていることから、IBD患者ではROSの産生が亢進している。また、実験腸炎モデルではROS産生が亢進し、抗酸化物質産生及び活性が低下している。
- ・チオレドキシンは大腸菌のDNA合成に必須な酵素であるリポドヌクレオチド還元酵素にNADPHの水素イオンを補給する補酵素として発見された。
- ・原核生物からヒトまで広く保存され、ユビキタスに産生されている。
- ・チオレドキシンはシステイン(Cys)、グリシン(Gly)、プロリン(Pro)、システイン(Cys)という活性部位を有しており、2つのシステイン残基の間でSS結合をつくる酸化型とSH-SHの還元型が存在し、還元型は基質蛋白のジスルフィド結合を還元し、自ら酸化型となる。
- ・酸化型チオレドキシンはNADPHとチオレドキシ還元酵素により還元型となる。様々なタンパク質を還元することにより、単に酸化ストレスの中和剤として作用するだけでなく、様々な細胞機能を制御することができ、デドックス制御の中核をなすと考えられている。

[チオレドキシ(TRX)の主な作用]

- ・抗酸化作用 ・転写因子制御 ・抗アポトーシス作用 ・Chemotaxis作用

[IBD患者における血清TRX値]

- ・玉木らの報告では、活動期IBD患者における血清チオレドキシ値は、血中濃度が正常人及び寛解期の患者と比較して高値となっている。
- ・活動期の指標であるCDAI-UCDAIと血中チオレドキシ値の間には相関関係が見られ、血中チオレドキシは炎症の状態を良く反映していると考えられる。
⇒rhTRX 予防的投与(腹腔内) DSS腸炎抑制効果が認められた。

[目的]

ドラッグデリバリーシステムを用いた炎症性腸疾患に対する新たな治療分子として、rhTRX封入ゼラチンマイクロスフェアを作成し、その有用性について検討した。

※ドラッグデリバリーシステム (DDS)

- ・DDSとは薬物の体内動態を精密に制御し、生体内に存在する特異的な作用点に望ましい濃度-時間パターンのもとに送達させることによって最速な治療効果を得ることを目的とする概念である。
- ・ポリ乳酸マイクロスフェアは生体内で非酵素的な加水分解を受ける高分子であり生体内に蓄積することはない。
ポリ乳酸マイクロスフェア — 化合物
ゼラチンマイクロスフェア — 生理活性時間の短い蛋白(サイトカインなど)

[rhTRX(10)予防投与(注腸投与)]

チオレドキシシン封入ゼラチンマイクロスフェアを注腸投与にて検討した結果、体重変化はコントロールと比較して有意差はなかったが、体重減少抑制効果は若干認められた。HE染色像を検討したところ、炎症細胞浸潤が抑制され、間質の浮腫の改善、上皮細胞の脱落が抑制されることが確認された。スコアリングの検討では有意差は認められなかった。大腸をホモジナイズし組織中のMPO活性を測定すると予防投与群では有意にMPO活性が抑制された。

[結語]

RhTRX封入ゼラチンマイクロスフェアは注腸投与においてDSS腸炎予防効果が認められた。

<班長> 臨床応用に向け京大ウィルス研究所定井教授のベンチャー企業と酒造メーカーで現在、共同検討中。

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. リオキシメステロイドを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療:多施設共同による無作為化比較試験
(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、福井純、川股聖二、安藤祐吾、
深田憲将(関西医科大学内科学第三講座)

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

【炎症性腸疾患を標的とした経口ドラッグデリバリーシステムの開発研究】

- ・高分子バイオマテリアルのポリ乳酸(生体内で H_2O と CO_2 で分解)を用いたステロイド封入マイクロカプセルの開発
- ・マイクロカプセルの大きさに関する結果、 $4\mu m$ 未満の免疫担当細胞が最も積極的に貪食されて、その中で溶解してその機能を抑制することを報告してきた。
- ・血中の動向では、通常投与するとステロイドは1時間をピークに上昇するが、マイクロカプセルを投与することによって血中濃度はお台と上昇しない。したがって、より副作用の少ない薬物と言える。

【研究計画と目的】

・研究計画

腸管免疫細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムによる難治性炎症性腸疾患治療

(関西医科大学附属病棟消化器科臨床研究審査委員会承認 関西医大臨床研究認番号 第40611号)

・目的

難治性潰瘍性大腸炎患者におけるデキサメサゾン封入ポリ乳酸マイクロカプセル(DxMC)の有用性を検討する。

【対象】

- ・ステロイド抵抗例
プレドニゾン $1-1.5mg/kg/day$ の1-2週間投与で効果なし
- ・ステロイド依存例
ステロイド漸減中の再燃

登録状況

ステロイド抵抗例 (n=1), ステロイド依存例 (n=3)

患者背景

年齢 : 38.7歳 (28-47)

性 (M/F) : 2/2

病型 : 全大腸炎型 2
左側大腸炎型 2

罹病期間 : 6.7年 (6-7)

入院回数 : 4回 (3-5)

[方法]

・投与方法

全大腸炎型

デキサメサゾン封入ポリ乳酸マイクロカプセル (DxMC) 840mg/day (デキサメサゾン 1mg を含有) を、
4週間隔日経口投与

左側大腸炎型

DxMC 840mg/day を4週間隔日注腸投与

・治療評価

投与前、2週後、4週後

1. 臨床スコア (CAI)
2. 大腸内視鏡所見
3. 血液・生化学・尿

[中間結果]

- ・ステロイド依存例 有効 26歳 男性 左側大腸炎型 DxMC 注腸投与
投与前に下降結腸からS状結腸にかけて深掘れ潰瘍があったが、投与4週後、殆ど潰瘍が消失し、癒痕状態になった。
- ・ステロイド依存例 (効果不明) 47歳 男性 大腸炎型 DxMC 経口投与
ステロイド減量のリバウンド、CMV感染を合併したため、このカプセル自体の効果は不明となった。
- ・ステロイド抵抗例では殆ど効果を認めなかった。

[結果のまとめ]

1. 難治性潰瘍性大腸炎患者4例に、DxMCを投与した。
2. DxMCの効果
ステロイド抵抗患者: 効果を認めなかった
ステロイド依存患者: 1例で有効 2例で効果不明
マイクロカプセル自体の明らかかな副作用はなかった
3. DxMCは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検討する

II. リポを化ステロイドを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療:多施設共同による無作為化並群比較試験

[パルミチン酸デキサメサゾン (リメタゾン) の特性]

- ・現在、本邦で市販されている薬剤としてはパルミチン酸デキサメサゾン、製品名リメタゾンがある。
- ・特性
 1. デキサメタゾンをパルミチン酸エステルとして脂溶性を高め、ダイズ油に溶解した乳濁製注射液である。
 2. 生体内でエステラーゼにより緩徐に加水分解を受け活性代謝物であるデキサメタゾンになり、持続的な抗炎症作用を示す。
 3. 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、そのマクロファージの中で溶解し、マクロファージ機能を効率よく抑制する。従って、薬剤投与量の軽減化により、副作用が軽減される。
 4. 通常は2週間毎に投与されるが、投与することによる副腎機能の抑制は殆ど見られない。

[研究課題]

・リポ化ステロイドを用いたドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患の治療・多施設共同による無作為化並行群間試験(関西医科大学医学倫理委員会 第0635号 承認)

[目的]

・炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管型ベーチェット病)患者におけるリポ化ステロイドによるドラッグデリバリーシステムの有用性を検討する

[対象]

- ・活動期炎症性腸疾患(重症例は除く)
潰瘍性大腸炎、クローン病、腸管型ベーチェット病
- ・ステロイド依存例
従来の全身的ステロイド剤投与が有効であるが漸減中に再燃する患者

[登録状況]

・潰瘍性大腸炎(n=1) 腸管型ベーチェット(n=2)

[方法]

・疾患別に下記治療法を無作為化

[治療法]

- ① 従来の全身的ステロイド剤投与量を再増量
- ② 従来の全身的ステロイド剤投与量は変更なく、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
⇒リメタゾン投与量(プレドニゾン換算)
投与開始前1ヶ月間は2.2mg/日、以後の2ヶ月間は1.1mg/日にあたる
3ヶ月間施行し2週毎に有効性を評価
⇒投与開始2週後
有効:従来の全身的ステロイド剤の投与量を減量
無効:他の治療法に変更

[治療評価]

- ・投与前、2週後、4週後、6週後、8週後、10週後、12週後
 1. 臨床スコア
 2. 血液(CRP、血沈、生化学)
 3. 内視鏡所見(2週後、4週後、12週後)
 4. 従来の全身的ステロイド剤の投与量変化
 5. ステロイド剤の副作用
 6. リメタゾンの副作用の有無

[Primary endpoint]

治療の有効性:臨床スコア・血液(CRP・赤沈)・内視鏡所見のうち2項目以上の改善・軽快を有効とする。

[Secondary endpoint]

従来の全身的ステロイド剤の減量が可能であったか、副作用が軽減

[投与・観察スケジュール]

- ・最初の1ヶ月間は1週毎、それ以後は2週毎に投与 3ヶ月間で8回投与
- ・2週毎に臨床スコアを検討
- ・内視鏡所見は4回(投与時、2週、4週、12週)

[症例]

- ・潰瘍性大腸炎 38歳 男性 ステロイド依存例 プレドニン20mg投与⇒12週後 10mgに減量 有効
- ・腸管型ベーチェット病 53歳 男性 大きな潰瘍あり 投与前プレドニン15mg、イムラン50mg
服用中止37週でも悪化なし 有効例

[結語のまとめ]

1. ステロイド依存性の炎症性腸疾患患者3例にリメタゾンを投与した。
潰瘍性大腸炎患者で2例 腸管型ベーチェット1例

2. リメタゾンの効果

潰瘍性大腸炎：有効 ステロイドの減量が可能であった。
腸管型ベーチェット：有効 ステロイドの中止が可能であった。
明らかなリメタゾンの副作用はなかった。

3. 今後も症例を集積し、リメタゾンの有効性と安全性と検討する。
研究参加ご協力につき宜しくお願い申し上げます。

<質疑応答>

Q:リメタゾン投与により副腎機能の抑制がないということは、漸減の必要はないのか？

A:今までの3例での検討では、スパッと切っても副作用は全く発生していない。副腎不全などは心配する必要はないと考える。但し、患者の背景としてはステロイドが既に入っている症例で、全身投与をoffにできるか減量でき、全身的な副作用が軽減できることを目指しているものである。

Q:プレドニン10mgで再燃した患者では、10mgはそのまま、リメタゾンをonするという事か？

A:はいそうです。

◎ 新しいコンセプトによる治療法開発 (16:20~16:50)

13) OPC-6535 の腸炎抑制機序について (分担研究者：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
(慶應義塾大学医学部消化器内科)

[OPC-6535 Drug Data]

- ・炎症性腸疾患、閉塞性呼吸器疾患の領域で開発中の新規チアゾール誘導体
- ・好中球のスーパーオキシド産生を抑制する薬剤として Screening された。
- ・作用機序は完全に解明されていないが、その作用の一部はPDE4阻害による。
- ・活動期潰瘍性大腸炎患者における効果：臨床第Ⅱ相試験(米国)
PhaseⅢでも有効性は認められなかったが、層別解析にてCRP高値群で効果があることが確認された。
本邦でも潰瘍性大腸炎及びクローン病に対して治験が行われ、現在、解析中である。

[PDE4阻害剤]

- ・サイトカインやホルモンなどの刺激が受容体に結合すると2次蛋白を介してATPからcAMPが生成される。このcAMPがPKAなどの活性などを通じて遺伝子発現関与する。PDE4は数あるPDEの中の免疫担当細胞において高発現しているもので、cAMPを分解するものである。
- ・OPC-6535はPDE4を抑制することで、cAMP濃度を高め、それによって作用を発現すると考えられている。

[人のモノサイトに対する効果を検討]

- ・モノサイトを採取し、それにLPS刺激を加えcAMPアナログ投与時のサイトカイン産生への影響を検討
- ・濃度依存性にTNF- α やIL-12p40については抑制効果を示している。IL-10については有意差を認めなかった。TNF- α やIL-12p40についてはメッセージレベルでも抑制効果を認めている。メッセージレベルでも抑制効果を示したことから転写因子への影響を検討した。

[転写因子への影響]

- ・各種転写因子のリン酸化へのOPC-6535の影響を検討した。EARK、p38、p65、STAD3についてはOPC-6535投与群においてもリン酸化への影響は認めなかった。

[PKAへの影響]

- ・PKAの特異的なインヒビターであるH-89を投与し、これによるOPC-6535への影響をサイトカイン産生において検討した。
H-89を加えてもOPC-6535の効果は阻害されることなくTNF- α 、IL-12p40の産生は濃度依存性に抑制さ

れることが確認された。

- ・H-89のインヒビターとしての効果はCREBのリン酸化により検討しているが、H-89投与群ではCREBのリン酸化が抑制されていることから、H-89自体がワークしている。
- ・これらのことからPKA非依存性にOPC-6535は作用を示していると考えられる。

[Munine colitis model] vivoでの検討

- ・12週齢のIL-10ノックアウトマウスにOPC-6535ないし、Vehicleを連日5週間経口投与し、下痢、脱肛の有無を観察する。5週間後に大腸長、histological scoreを評価し、ELISA法にて血清アミロイドを測定した。

結果：・IL-10ノックアウトマウスでは自然腸炎が発生することにより腸管長の短縮が認められるが、OPC-6535投与により腸管長の改善を認めている。またOPC-6535非投与群では下痢4例、脱肛2例認められるが、OPC投与群では認めなかった。

- ・血清中のアミロイドAについても有意に抑制した。Histological scoreも有意に改善効果を認めている。
- ・腸管からのTNF- α 産生をメッセージレベルで検討しているが、OPC投与によるメッセージレベルでTNF- α は抑制されていることがわかる。

[まとめ1]

- ・OPC-6535はヒト単球からのTNF- α 、IL-12産生抑制効果を示した。
- ・ARK、p38、NF- κ B、p65、STAD3のリン酸化に影響を及ぼさなかった。
- ・PKA非依存性の経路で効果を示すことが示唆された。
- ・IL-10ノックアウトマウスの自然免疫発症を抑制した。
- ・他のPDE4阻害剤やcAMPアナログとの作用効果及び機序の差異は見出せなかった。

[OPC-6535の他の免疫担当細胞への効果の検討]

T cell

- ・T細胞を抹消血から採取し、CD3/28で刺激した時のサイトカイン産生を見てみると、OPC、cAMP投与群いずれにおいても、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10などすべてのサイトカインについて抑制効果を示した。

NK細胞

- ・次にNK細胞に着目した。クローン病患者の腸管でのNK細胞はnormalや潰瘍性大腸炎と比べてLP及びIEL共に増加していることを報告してきた。またNK細胞はサイトカイン刺激に対してTNF- α 、IFN- γ を高産生することを報告してきた。このことからNK細胞へのOPCの影響を検討した。
- ・抹消血からNK細胞を単離し、IL-12、IL-15によって刺激を加えたときのINF- γ 陽性のNK細胞の数を見てみると、OPCを加えると濃度依存性に群が減少することが確認された。またcAMPアナログについても濃度依存性に抑制効果を示すが、この濃度においては、OPCと比較すると抑制効果は乏しいという結果であった。

[Summary and Discussion]

- ・OPC-6535はT細胞に対し炎症性サイトカイン産生を抑制する。
- ・クローン病では腸管のNK細胞が増加しており、commensal bacteria刺激により著明に炎症性サイトカインを産生する。
- ・OPC-6535及びcAMPanalogueはNK細胞においてIL-12及びIL-15刺激による炎症性サイトカイン産生を濃度依存性に抑制する。

[Model]

クローン病の腸管においては、単球や異常腸管マクロファージからTNF- α 産生やIL-23産生を介してT細胞やNK細胞からのINF- γ やTNF- α が高産生されることによって炎症が起きていると考えている。

OPC-6535は単球や異常腸管マクロファージについてもTNF- α の産生を抑制し、T細胞やNK細胞からのINF- γ やTNF- α の産生も抑制することにより炎症を抑制する。

<質疑応答>

Q:いろんな免疫細胞の機能を抑え、基本的には遺伝子発現を抑えているが、刺激も各細胞でことなり、LPS刺激であったり、CD3の刺激であったり、どういうシグナルを抑えているのか?

A: 現在、検討中である。転写因子レベルではあまりはっきりしていない。cAMP アナログで検討したグループがあるが転写レベルではわかっていない。サイトカイン全体を抑え、特にcAMP となると遺伝子発現のセカンドメッセンジャーとなるので、クリティカルなところで関与し、細胞 specific な反応ではなく、すべての共通した因子を抑えているのではないかという発想で検討している。

Q: クローン病におけるNK細胞のFunctionはブロックした方が良いのか?

A: 我々の研究室でも意見が統一できていないところである。NK細胞自体が活性化したマクロファージを攻撃することで炎症を抑えようと考えてもおかしくない。ただ、INF- γ の産生自体は炎症を悪くするのでという発想なんです。実際、NK細胞を抑えると、IL-10 ノックアウトマウスではかえって腸炎を悪くするという報告もあり、NK細胞を抑えると、腸炎を悪くする可能性もあると考えられる。炎症性サイトカインを抑えるという意味では有用かも知れないというところではないでしょうか。

Q: 開発の状況は?

A: 米国でPhIIIが終わったが、潰瘍性大腸炎では全体で有効性が乏しくかった。CRP 高値群で有効であった。本邦での試験結果はまだわかっていない。

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)

【ケモカイン】

- ① 分子量10kD 前後の主として塩基性・ヘパリン結合性サイトカインの一種である。
- ② ヒトでは45種類のケモカインと19種類のレセプターが同定されている。
- ③ ケモカインは様々な体細胞から構成的あるいは誘導性に産生される。
- ④ 白血球の遊走を主作用とする。
- ⑤ 二種類の膜結合型分子も存在する (今回のCXCL16はそのひとつ)

【実験的腸炎モデルにおけるSR-PSOX/CXCL16の機能解析】

・CCケモカインに属し、たくさんあるターゲットの中よりひとつづつ検討している。

【SR-PSOX/CXCL16】

- ・2000年にスカベンジャーレセプターとして発見されたと同時にCXCCR6のリガンドとして同定された膜結合型のケモカインである。
- ・脳と骨格筋以外の臓器に広く分布する。
- ・消化管ではパイエル板のみに発現
- ・血球成分ではマクロファージとDCに発現
- ・4つのdomainを有する膜結合型で発現する。
- ・スカベンジャーレセプター

ケモカインレセプターはバクテリアをファゴサイトするファンクションを有している。

樹状細胞、マクロファージのところにCXCL16が出ており、バクテリアが取り込まれる。また、Tcell、CXCCR6がリガンドとくっついて、interactionをおこす。こういったinteractionにより、炎症の継続や生体のホメオスタシスを保っていると考えられる。

【目的】

実験腸炎モデルを用いてSR-PSOX/CXCL16の役割を検討する。

※preliminaryな段階で患者血清を見たところ、UC/CDともCXCL16は上がっている。

【実験デザイン】※実際に炎症を起こして、上がっているのかを見た

Mice :CXCL16 10-12 適齢、メス、SPF 環境下

Induction of colitis :3% DSS M.W.36000-50000

検討項目:

- ・腸炎誘導前後の大腸組織におけるCXCL16の発現を解析 (real time PCR法)
- ・蛍光免疫染色によるCXCL16発現細胞とその分布の検討 (今回はまだconfirmしていない)

結果:

大腸組織におけるCXCL16の発現

炎症をおこすと、CXCL16の発現はあがることが確認された。

⇒【CXCL16は腸炎発症に関わっているのか?】

ノックアウトマウスで検討 (DSSを用い)

[経時的体重変化]

- ・ノックアウトマウスではnormalと比べて体重変化が軽微であった。

[腸管長の比較]

- ・マクロで見てもノックアウトの方が腸管長は非常に長い wild typeとノックアウトを比較すると有意差があり、炎症はコントロール出来ているのではと考えられた。

[組織学的評価]

- ・wild typeとノックアウトを比べてみると大腸に関してはphenotypeは出なかった。
- ・DSSをもちいるとWild typeでは炎症細胞浸潤がかなり強くでるが、ノックアウトではクリプトは残りある程度はブロックできるが完治したとまでは行かない。組織学的スコアは差がある。
- ※DSSのモデルでCXCL16をノックアウトすると炎症は軽くなることが示唆された。

[大腸組織におけるサイトカインの発現]

- ・TNF- α 、IL-1B、INF- γ は下がるが、IL-10は上がることを予想したが、炎症が下がればカウンターでIL-10も下がるという結果であった。

【実験的腸炎モデルにおいてCXCL16は治療のターゲットになりうるか?】

- ・ヒトでの検討が必要であり、抗体を作って検討した
- ・予防的な投与で、DSSを入れる前から投与する。
体重変化:6日前後で変わってくる、もう少しみると差がでる。
腸管長:コントロールIgGとCXCL16の抗体では有意差が出る。
組織学的評価: CXCL16抗体群は完全ではないがクリプトが保たれており、組織像は改善している。

※CXCL16の抗体をつくってブロッキングすると腸炎が改善するデータが得られた。

別なモデルで検討

⇒TNBS腸炎で検討 SJL miceを使用

CXCL16の抗体をもちいて検討

体重変化:3~4日で差が出てくる。

組織学的評価:コントロールと比べるとCXCL16の抗体ではクリプトが戻ってくる

【小括】

- ・抗CXCL16モノクローナル抗体投与群は、コントロール抗体投与群に比して体重減少抑制を認めた。
- ・抗CXCL16モノクローナル抗体投与群では組織学的に炎症を改善する傾向が認められた

【まとめ】

- ・CXCL16は腸炎発症に関与していると考えられた。
- ・抗CXCL16モノクローナル抗体を用いた治療は炎症性腸疾患の新たな治療法のひとつとしてなりうると思われた。
- ・第一三共が関係しているので臨床応用の可能性も高いと考える。

<質疑応答>

Q: CXCL16の機能としては炎症を起こすケモカインと考えてよいか?

A:炎症をおこすケモカインと考えている。

Q: その場合、CXCL16 がリガンドとなってT cell側のレセプターにくっついて、T cellを活性化させるというイメージか。炎症の場合、ファゴソームなactivityは関係ないか？

A: そうです。ただ、両方あると考えられる。DCとマクロファージの両方に出て、マクロファージのところでバクテリアを貪食するとそこからサイトカインが出たりする。つまりファゴサイトーシスをしてサイトカインがでるといことが考えられます。

Q: ノックアウトマウスではファゴサイトーシスのactivityは落ちるのか？

A: 有意に落ちます。

班長: 今後の予定は？ヒトとマウスのCXCL16のhomologyは？

A: 実験モデルでの検討を実施したの後は第一三共とヒトへの応用を検討していきたい。
ヒトとマウスのCXCL16は殆ど同じである。マウスとのキメラまではまだ考えていない。

事務局連絡

平成20年度スケジュール

平成20年

4月	交付申請書提出
8月 1日	平成20年度 第1回総会
8月 中旬	分担研究費振込み

平成21年

2月 6日 (金)	平成20年度 第2回総会
2月 20日 (金)	分担研究者報告書類提出 締め切り
3月 6日 (金)	収支決算報告書提出 締め切り

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2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御挨拶
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 (13:20~14:05)

- 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) クロー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 暁梅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)

◎ 腸管特異的免疫調節を応用した治療法の開発 (14:05~15:05)

- 4) 炎症性腸疾患発症に関与するTh17細胞の腸管粘膜での分化誘導機構 (研究分担者：竹田 潔)
○ 本田賢也、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)
- 5) 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)
- 6) 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)

- 7) 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 (15:05~15:20)

- 8) 制御性T細胞分離移入療法の開発:九州大学病院Cell Processing Center 稼働と倫理委員会承認に向けて (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、谷憲三朗³、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同 病院遺伝子・細胞療法部、³同 生体防御医学研究所・ゲノム病態学分野)

◎ 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 (15:20~15:50)

- 9) サイクロスポリン封入ポリ乳酸マイクロカプセルを用いた実験腸炎治療の検討 (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、福井翔、川股聖二¹、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)

- 10) 難治性炎症性腸疾患に対するステロイドを用いたドラッグデリバリーシステム治療の臨床試験 (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、福井翔、川股聖二、安藤祐吾、深田憲将 (関西医科大学内科学第三講座)

◎ 新しいコンセプトによる治療法開発 (15:50~16:20)

- 11) OPC-6535 の腸管NK細胞とクローン病を中心とした腸炎抑制機序について (研究分担者: 日比紀文)
○ 高山哲朗¹、岡本 晋¹、井上 詠¹、市川仁志²、鎌田信彦¹、知念 寛³、北爪美奈¹、小林 拓¹、斎藤理子¹、久松理一¹、金井隆典¹、日比紀文¹
(¹慶應義塾大学医学部消化器内科、²東京歯科大学市川総合病院消化器科、³琉球大学医学部付属病院光学医療診療部)
- 12) 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、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2回総会出席者名簿

平成21年2月8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)
分担研究者	渡辺 守(東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野) 坪内博仁(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座 消化器疾患・生活習慣病学) 高後 裕(旭川医科大学消化器血液腫瘍制御内科学) 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)
参加協力者	武田宏司、桂田武彦(北海道大学大学院消化器内科学分野) 藤谷幹浩、田邊裕貴、岡本耕太郎(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(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) 秀野泰隆(東京大学腫瘍外科学) 仲瀬裕志(京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座) 山田真也、福本晃平(京都府立医大消化器病態制御学) 柿本一城(大阪医科大学第二内科) 渡辺憲治(大阪市立大学大学院消化器器官制御内科学) 水島恒和(大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学) 飯島英樹(大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学) 岡田俊彦、土肥多恵子(国立国際医療センター消化器疾患研究部) 井戸章雄、藤田 浩、上村修司、寄山敏男、佐々木文郷、橋本慎一 (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) 大塚和朗(昭和大学横浜市北部病院消化器センター) 本田賢也(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) 石毛 崇(群馬大学大学院医学系研究科小児生体防御学分野) 大井秀久(今村病院消化器内科) 隅田頼信(九州大学大学院医学研究院病態制御内科学) 児玉真由美(宮崎医療センター病院) 藤井庄人(ステリック再生医科学研究所) 藤井真由、丸田厚久、岩田大哉、稲場昭喜(杏林製薬) 今倉伸二、細井栄治(JIMRO) 柏原典雄(イーエヌ大塚製薬) 人見麻子(旭化成クラレメディカル) 深田憲将、川股聖二、大宮美香、内田一茂、西尾彰功 (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2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)

研究分担者 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

- ・画期的治療班は6年前いくつかできたが、現在、継続しているのは本研究班のみである。
- ・当班は今年度が最終年度であるが、本研究班の継続については、予算成立後、方向性が示される。
- ・通常、2月に事後評価委員会の開催であったが、まだ予定が立っていない。

- ・潰瘍性大腸炎、クローン病の両疾患は経年的に増加。潰瘍性大腸炎が約10万人、クローン病約3万人。
- ・特に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

レミケイドの登場により治療の様相は変化した。安全性についてTREAT Studyでは安全性が報告されているが、RAで使用された報告では、抗TNF- α 投与による重症の感染症、悪性腫瘍に関するrisk factorは2倍から3倍あるという問題点も指摘されている。Top down療法も2年位の経過でみると効果の持続性の問題が指摘されている。

⇒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が発足

【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

【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」

【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(札幌医大)
 - ・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L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)

【平成20年度における成果】

- ・77編の学術雑誌/インパクトファクター5以上の論文15編:
Nature:1編 J Clin Invest:1編 Immunity 1編 Lancet:1編 Gastroenterology:7編
J. Immunol:4編
専門雑誌 IBD:14編
- ・臨床応用(5件の各大学倫理委員会/IRB委員会への申請)
⇒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

評価委員会のコメント

〈Positive〉

- ・ 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。

〈Negative〉

- ・ 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。

【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 (分担研究者：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た研究をした。
- ・ 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 が腸管上皮の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、細胞レベルにおいても 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し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 蛋白が積極的にイピチキンブ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。

・安定化Hath1 蛋白の検索
Wild type のHath1 を強制発現させてもタンパクは殆ど出ないので、タンパク分化阻害剤であるMG132 を入れることによって、蛋白が安定化する。

ミュータントの検索により54番目と58番目のセリンがレギュレーションドメインであることを突き止めたので、その蛋白を除いた、N1をリレーションしたタイプもしくはセリンをアラニンに変換したミュータントを作成した。実際にセリン残基を含まないN1リレーションタイプもしくはセリンをアラニンに変換したタイプは大腸癌細胞株においても同等に安定して発現することがわかった。

・Serine 変異体はタンパク安定化と転写活性を有する。
Hath1 タンパクの転写の機能として保存されているかどうか転写活性を用いて解析。N1をリレーションしてしまうと転写活性はかなり落ちてしまう。Hath1 はEbox-Luc 配列を認識して転写活性を持つものであるが、Ebox-Luc 配列を有したレスピレスアッセイにおいてはN1をリレーションしてしまうとそれだけで、タンパクを発現しているにも関わらず、転写活性は落ちてしまう。しかしセリン・アラニンミュータントは転写活性を保持したまま大腸癌細胞株でもかなり安定して発現していることがわかった。

・Hath1 蛋白安定化のみで大腸癌細胞の杯細胞分化を促進する
54・58番目のセリン・アラニンミュータントを用いることによって、大腸癌細胞株に安定して発現させる系を構築した。ワイルドタイプのHath1 はDOX をいれて遺伝子を導入したにも関わらず、タンパクが全く発現しなかった。MG132 のタンパク分解阻害剤を入れて初めてタンパクが安定することがわかった。54・

58番目のセリン・アラニンミュータントにおいてはDOXを入れて、遺伝子を誘導してあげるだけでHath1タンパクが安定化することがわかった。免疫染色でもワイルドタイプでは導入するだけではHath1陽性細胞はなく、タンパク分解阻害剤でかなり安定化してくるタイプ、セリン・アラニンに変換することで遺伝子を導入しただけでタンパクが安定してくる。

このような状態で大腸癌の形質をみたところワイルドタイプでは遺伝子を導入するだけではタンパクは壊れてしまいムチンが殆ど出ないのに対し、アラニンミュータントではタンパクが安定して発現することによってムチンの遺伝子がかかり発現することがわかった。Hath1のミュータントを入れているだけであり、大腸癌細胞のWntシグナルは全くいじっていないので、C-mycの細胞増殖は全く変わらないままHath1遺伝子を導入するだけで分化形質が促進することがわかった。

・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GSK3β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GSK3β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GSK3β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蛋白が安定化して出ることにより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で核内に存在し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った。

・マウスへのリチウム投与の影響(vivoでの効果)

炭酸リチウム(GSK阻害薬)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。

PCRにて遺伝子発現の変化を見ると、小腸、大腸においてMUC2やCgAなど遺伝子の増加は認められず有意差はなかった。

小腸においては杯細胞以外の形質、パネート形質はWntシグナルで上昇するとされているので、その効果もあるのではないかと予想し、Cryptisin1, Cryptisin4, sPla2, lysozyme, CRS1C, NOD2などの抗菌物質を多種類、解析したが、変化は認めなかった。

興味深い点としては、有意差はなかったが、NOD2遺伝子は多少あげる効果があるので、GSK阻害剤の用量を変えたり、今回は既成薬として炭酸リチウムを使用したのが、他のspecificな薬剤を用いることで効果の増強が期待できるので、今後さらに詳細に検討していきたい。

・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。