

・今後の計画

炭酸リチウム投与による腸管及び全身への影響の詳細な検討

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: in vitro の実験系で 50nmol と非常に濃い濃度で検討されているが、濃度依存性はあるか?

A: 濃度依存性はある。短期間で影響を見たかったので高い Dose により後の形質変化を見ている。ある程度長い期間 (1ヶ月、2ヶ月とか) で見るのであればリチウムではかなり低い濃度でも変化は認められる。

Q: 塩化リチウムと炭酸リチウムとではかなり異なるように思うが?

A: 阻害効果としてはリチウムイオンのところで効いていると思うので変わらないと思うが、その他の細胞への影響という点ではかなり違ってくるので、もともとリチウムクロライドで vitro 実験していたが vivo に持っていくのは難しいと考え、炭酸リチウムでも同じ効果が期待できるのではないかと考え実施したが、結果はあまり芳しくないなので、 vitro の系に準じた方法ということで、同じ薬剤を用いて vivo でも確かめることから始めていかなければ行けないかと考えている。

Q: リチウムクロライドは toxic なものか?

A: かなり toxic なものである。細胞に関しては 1日~2日の系なのでかなり high dose で実験しているが、どこまで Low dose にした時に同じ影響が期待できるかを確認しなければならない。リチウム以外に specific なインヒビターが出ており、low dose で効くというのも確認されているので、vivo の時にはそれらが期待できると考えている。

Q: 候補は絞り込まれているか?

A: できれば vitro でももう少しインヒビターの作用を解析してから vivo に行きたいが、臨床応用という観点から、2足とびのような状況になっているので、両方、足場を固めながら取り組んでいきたい。

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 (分担研究者: 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)

[背景]

- ・腸管狭窄症に対して研究開発を進めてきた薬剤の特許公開がなされたので、標的分子の開示を含めて報告したい。
- ・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の線維化、狭窄が問題となっていた。
- ・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、むしろ必要不可欠な修復過程である。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。足りなければ瘻孔形成等となっていく可能性がある。
- ・協調のとれた線維化、創傷治癒が重要である。
- ・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。そして適切な線維化を踏まえた3つの療法で対応することが大切である。
- ・このような考えをもとにベンチャー企業であるステリック再生医科学研究所と共同で研究を進めてきた。

STNM-01 (anti-GalNAc 4S-6STsiRNA) 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)

- ・創傷部位に治癒のために動因される 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し、創傷治癒が行われる。そういう一連の流れがあり、fibroblast が集まってくる時にコ

ノサイト、主にマスト細胞が産生する。その時の重要な物質がプロテオグリカン。プロテオグリカンのコアタンパクの側鎖の糖鎖であるグルコサミノグリカンが重要であることがわかってきた。

- マスト細胞が作り出すコンドロイチン硫酸Eが組織に定着して、のりのようなものを出しFibroblastが定着して、初めてコラーゲンの産生が起こり、組織の修復がおこる。そのためにはコンドロイチン硫酸Eが非常に重要になり、それを作っている酵素がギャルナックである。この酵素はコンドロイチン硫酸Aの硫酸基をくっつけるという働きをしてコンドロイチン硫酸Eを作る。この反応をストップさせるのが我々の薬剤の特徴である。コンドロイチン硫酸がコアタンパクに付加されていくのがゴルジ体であり、ゴルジ体でこの酵素が働くのをブロックするのがストラティジーである。
- ところがこの siRNA を血中にいれた場合には血中の RNAS で瞬時に分解されて、ターゲット部位には到達させることが出来ないことからドラッグデリバリーシステムが重要となる。
- in vitro で siRNA の分解性を見てみると、RNAS が無い状態では siRNA は当然 60 分保持されるが、RNAS を入れて siRNA (STNM-01) を入れると 30 分位で分解されてしまう。これでは到底、ターゲット部位には到達させることができないことから、保護剤としてアテロコラーゲンを加えると 45 分位までは保持する。これまでアテロコラーゲンをを用いた検討を行ってきたが、炎症性腸疾患にはこれだけでは良くないので、内視鏡を用いて局所にとどめる方法で試みた。
- siRNA を FITC で標識して局注した。24 時間後にも FITC を見つけることが出来る。この実験では FITC の分子が残っていて、siRNA はどうなっているのかという問題が残る。
- STNM01 (anti-GalNAc4S-6STsiRNA) を粘膜下注 24 時間後でも siRNA は腸管の中に specific に保持されていることを確認した。
- 今回は内視鏡を使わずにマウスで実験を行ったが、粘膜下に siRNA を打ち込んだ。急性腸炎で見ているが、ターゲットの酵素発現は抑えられることがわかった。腸管で局注した部位においてのみの効果であり、関係のない腎臓などでは全く効果は及ぼさず、臓器特異性をもって siRNA を作用させることができる。
- 急性 DSS 腸炎で体重の変化をみたが有意差は認めなかった。便の性状、血便の状況においては改善することができた。腸管の短縮の抑制効果は認められた。組織でみると HE においてはコントロールの DSS 腸炎では効果はないが、STNM01 では治療効果があり、マクロファージの浸潤を抑えることができた。また、コラーゲンの産生を抑えていることがわかった。ファイブプロラストの染色でも腸管への浸潤を抑えることができたことがわかった。
- TNF α などの炎症性サイトカインも STNM01 でおさえることができることがわかった。
- マスト細胞が作り出すコンドロイチン硫酸Eがファイブロサイト、ファイブロblast、モノサイトが組織に定着して線維化を強く起こしていく重要な因子である。その出過ぎた酵素の働きを抑えることによって、過剰な線維化を抑えて、適切な創傷治癒に持っていくのではないかと考えている。
- クローン病の腸管線維化に対してパルーン拡張との併用で線維化を治して行く治療法を開始したいと準備を進めている。

<質疑応答>

Q: 抗線維化作用だけではなくて、かなり強い抗炎症作用も示されたが、その変の解釈はどうか?

A: 抗炎症作用もある。コンドロイチン硫酸は炎症部位に糊付けされたようになっていて、サイトカインやケモカインがトラップされて局所で炎症物質が働くためのベースとなる物質であり、その影響がある。コンドロイチン硫酸の働くターゲット細胞はファイブロblastがメインであるが、モノサイトにも働くので抗炎症作用があると考えている。

Q: DSS 腸炎モデルの急性モデルを使用されているが、線維化をみるのに適切か?

A: 慢性腸炎モデルでも実験を進めている。線維化を起こす心筋炎のモデルで実験を進めている。

Q: ファイブロblastが組織に定着するのはギャルナックに依存していると考えてよいのか? エッセンシャルな作用と考えられるか?

A: ギャルナック以外にも実験したが、腸炎の治療効果があったのはギャルナックだけであったので、それだけとはいえないが、選択性が限られた作用効果と考えられる。

Q: 局所療法では他へ影響しないと考えてよいか? 安全性は高いと考えるとよいか?

A: 局所投与できることがこの治療法のメリットであり、特に腸管の粘膜下層が局所投与(内視鏡)で何故効くかという疑問もあるが、siRNA に関しては、腸管粘膜下は分解されにくい状況にあると考えられ、それを逆に利用して治療できるという意味で、全身投与よりは局注の方が適しており、効果が一番得られ、安全性も高い方法であると考えている。

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、²京都大学医学部附属病院探索医療センター)

- ・我々は傷害消化管粘膜の重要な再生修復因子であるHGFの組換えタンパクの臨床応用に取り組んできた。
- ・組換えヒトHGFは先に劇症肝炎に対する第I、II相の試験が実施されており、昨年6月にエントリー期間を終了し、今年の1月まで、最終的には治験総括報告書を作成するために直接閲覧、データ固定、監査を経て、解析を行い、報告書に関してGCP監査を受けて、1月末に報告書が完成した。今月、規制当局に治験終了届けを提出する。
- ・被験者の特性 20名の対象疾患患者を紹介頂いたが、かなり除外基準が厳しく、トータルで4名(劇症肝炎3例・遅発性肝不全1例)を採用した。脳症発現から発症7.5日でHGFを投与し、最大14日間のHGF反復静脈内投与とその後14日間の観察期間(追跡期間)において28日間の治験期間で死亡した症例が1例、追跡期間で1例、計2例死亡した。
- ・この静脈内投与におけるHGFの治験の主要エンドポイントは安全性評価であるので、有害事象の発現の有無ということがプライマリーエンドポイントになっている。
死亡した1例の有害事象は肝不全であり、原疾患の増悪によるものである。治験薬とは関連性はない。その他の有害事象としては同じ死亡例に亡尿と呼吸状態の悪化があるが、いずれも治験薬との関連性はない。第3者のモニタリング委員会を経て、HGFに関連した重篤な有害事象はないということが結論付けられた。
- ・一方、頻度の高い有害事象としては尿中アルブミンタンパク陽性、尿量減少、血圧低下、低カリウム血症などがある。HGFの非臨床安全性試験から予測された有害事象としては、蛋白尿、アルブミン量、血圧低下であるが、いずれも軽度である。血圧低下は死亡例において重度となっているが、HGF投与中に起こる血圧低下はいずれも軽度であった。また意識清明な方で血圧低下が見られたが、特に自覚症状などは認めなかった。またHGFに関連性のない血尿が1例(重篤)あるがこれは死亡例に見られたもので、原疾患にともなう顕著な出血傾向で、膀胱内血腫を形成したものである。治験薬との因果関係は認められない。
- ・このような解析から、HGFの反復静脈内投与は特に重篤な有害事象はなく血圧低下も軽度で、尿アルブミン、尿タンパク陽性も問題となる程度ではなかった。
- ・生存期間 治験薬の治験期間死亡例が1例あり、脳症発症から死亡までの期間が28日となっている。4例の生存期間を劇症肝炎の全国調査の適応症例から360例を抽出しマッチングしてそれぞれに対象集団を選択し、比較すると、統計学的に有意差をもって生存期間を延長するという結果は得られなかったが、生存期間を延長する傾向は認められた。但し、4例という症例であり、今後も解析が必要である

【まとめ(1)】

劇症肝炎に対する組換えヒトHGFの第I・II相試験において

1. 直接閲覧、データ固定および解析を行った後、総括報告書を作成し、GCP監査を終了した。

2. 治験期間中の死亡は1例、その他の重篤な有害事象は1例（死亡例）に認められた
 3. HGFの薬理作用に基づくと考えられた有害事象の発生は、蛋白尿、アルブミン尿4例、血圧低下3例、血尿または尿中血陽性3例で、そのうち血圧低下の1例、血尿の1例は重度であった。
 4. 生存期間は対象集団に比して延長する傾向がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった。
- ※ HGFの静脈内投与による安全性が確認できたことは大きな成果である。

・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

- ・炎症性腸疾患に対する臨床応用は安全性の面からも注腸投与で出来ないかと考えている。DSS腸炎をもちいてHGFの10 μ /mlという濃度の治療により確実に糜爛が縮小することを確認している。以前、報告した腹腔内投与、静脈内投与ほどは血中レベルが上がらなくても局所投与で潰瘍修復促進効果を発揮することが判明した。
- ・注腸投与の安全性について、10倍濃度でも血中には検出されず、血中暴露がないことが確認された。100倍濃度でようやく低レベルの血中暴露認められた。このようなことから薬効の得られるレベルの注腸投与は血中暴露がない。すなわち血圧低下や腎毒性の可能性が極めて少ないということがわかった。

・大腸発癌に及ぼすHGFの影響

HGFは増殖因子であるので、発癌については注意が必要であると指摘を受けているが、発癌物質を用いた発癌実験ではHGFはむしろ腫瘍の発生を抑えることが確認された。そして炎症を、colitic cancer意識したDSS腸炎とアドキシメタンを併用したモデルでもHGFは発癌を抑える傾向のデータを得ている。

・HGFは細胞の遊走能を促進する

HGF=scattering factor (SF)

傷害消化管粘膜の再生・修復過程におけるepithelial restitutionに必要とされる。

種々の癌細胞において、その浸潤、転移を促進することが報告されている。

HGFの更なる安全性を確保するために、消化管粘膜上皮細胞（ヒト胃上皮細胞：MXN74）を用いてHGFの細胞遊走促進の分子機構を特にtight junction proteins (TJPS)に着目して明らかにする。

・HGFは消化管上皮細胞の遊走を促進する。

HGFの転化により細胞の移動が促進される。

Oris migration assay kitを用いてin vitroの潰瘍を作成し、潰瘍の修復、つまり細胞の移動した面積を測定すると、HGFで細胞が有意に遊走されて、潰瘍面積が縮小することがわかった。

・Tight junction proteins (TJPS)に着目

このようなタンパクはどのような動態を示すのかを解析

膜貫通型タンパク(Cloudin Oludin JAM)があり、裏打ちタンパクとして様々なものがある。裏打ちタンパクがアクチンと結合する。

・TJP発現に及ぼすHGFの影響

タンパクレベルで特に大きな変化は認められなかった

・TJPの細胞内局在発現に及ぼすHGFの影響

免疫染色でCloudin Oludin ZO-1の変化を見たところ、HGF添加で細胞膜に局在していたZO-1が細胞質、細胞膜から消えて、細胞質にdiffuseに染色されるようになり、その後、少し細胞膜のところに戻ってくるという現象をとらえることができた。

・TJPの細胞内局在に及ぼすHGFの影響

この現象をconfirmするために、細胞質各群と細胞膜各群でwesternをおこなったところ、HGFを添加するとCloudin Oludinはそれほど変化しなかったが、ZO-1が細胞質各群で発現量（タンパク量）が減少することを確認した。さらにZO-1で免疫沈降し、Oludinでwesternを行うとHGFを添加するとタンパク量は低下し、Oludinで免疫沈降するとZO-1のタンパク量は減少する。

【まとめ2】

- * 傷害消化管粘膜の epithelial restitution における HGF の役割を明らかにするために下記の検討をおこなった。
- ・ HGF は boden chamber および 潰瘍修復モデルを用いた in vitro 実験系において消化管上皮細胞の遊走能を有意に促進した。
- ・ HGF は TJP 発現 (CLONs, OLIDN, ZO-1) に影響を及ぼさなかったが、細胞膜に局在する ZO-1 を細胞質に移動させた。
- ・ HGF によって OCLDN と結合した ZO-1 が減少した。

組換えヒト HGF の臨床開発 (1)

◆ 劇症肝炎を対象とした組換えヒト HGF 第 I・II 相臨床試験 (医師主導治験)

- ・ 2008 年 6 月 30 日で被験者登録終了
- ・ 治験総括報告書作成、GCP 監査 (~2009 年 1 月)
- ・ 規制当局に治験終了届の提出 (2009 年 2 月)

◆ 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 月まで

組換えヒト HGF の臨床開発 (2)

◆ 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
- 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など

<質疑応答>

Q: 劇症肝炎で腎障害が認められたようであるが、もともと毒性試験ではどうであったか。

A: 安全性試験は、マウスとラットとサルで実施している。反復静脈内投与ではラットでのみタンパク尿とアルブミンが増えるというデータがある。サルとマウスでは出ていない。クレアチニンなどの上昇もないが、ラットでそのようなことがあるので、ヒトではその点をしっかり確認する必要がある。(機構からも指示を受けている) その辺は除外基準でも厳密に評価している。

評価委員会でも安全性は特に問題とはならなかった。

GMP レベルのモノを我々で用意するという課題がのこっているが、現在、前向きに取り組んでいる。

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。

◎ 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)

- ・ 消化管粘膜にはいくつかの特徴的な細胞がいるが、我々は Th17 細胞に着目して研究を進めている。

- ・ナイーブ CD4T 細胞が TCR 刺激で IL-6, TGF- β , IL-23 サイトカインとともに刺激されたときに分解してくる細胞である。そして IL-17, IL-17f, IL-22 等の炎症性のサイトカインを産生することを特徴としている。重要なことは Th17 細胞の異常活性化が IBD に繋がっているという報告が最近、数多く出ている。
- ・Th17 細胞は SPF 環境下に飼育された健康なマウスにおいても消化管粘膜固有層特異的に且つ多数存在する。他の臓器、リンパ組織などには殆ど存在していない。

Q. なぜ TH-17 細胞は、消化管粘膜特異的に存在しているのか？

- ・腸内細菌叢（フローラ）の存在が、TH17 細胞の分化には必要である。無菌マウスや抗生物質を投与したマウスでは、TH17 細胞が激減している。腸内細菌がどういった分子を産生するために、TH17 細胞の分化が誘導されるのかということ考えた。
- ・TH17 細胞分化は TLR シグナルに依存しない。

TLR の役割について検討

- TLR のアダプター分子である Myd88 と Trif のダブル KO マウスを作成した。しかしながらこのダブル KO マウスでは粘膜固有層にある Th17 細胞は野生型とほぼ同等であった。粘膜固有層にある Th17 の分化は TLR に非依存であることがわかった。一方、便中の IgA の濃度はこのダブル KO マウスにおいて非常に低下していたので、IgA 産生の形質細胞の分化には TLR のシグナルは必須であると考えられた。

- ・その他細菌から分泌される分子で Th17 細胞分化に関わるのかということで、我々は ATP に着目した。
- ・一部の細菌は、高濃度の ATP を産生する。
- ・細胞外 ATP は、P2X 受容体群と P2Y 受容体を介して、免疫細胞の機能に強い影響を与える。
- ・腸内細菌を培養すると、その上清中には高濃度の ATP を検出できる。その培養上清を CD40 細胞と樹状細胞の共培養系に加えると、TH17 細胞分化を強く誘導する。この TH17 細胞の分化誘導は ATP 分解酵素である アピレールによって非常に強く阻害された。
- ・GF マウスの便中の ATP 濃度は極めて低い。同時に粘膜固有層の TH17 細胞数も非常に少ないが、ATP を投与すると、その数の有意な増加を認める。このようなことから腸内細菌由来の ATP が TH17 細胞の強力な誘導因子であると示唆していると考えた。

- ・大腸粘膜固有層の CD70^{hi} 樹状細胞は P2X と P2Y 受容体群を高発現している。

- ・CD70^{hi} 樹状細胞は ATP 刺激に対して、IL-6 と TGF β 活性化酵素 (Integrin) を産生する。

- ・CD70^{hi} DC₂ は、ATP 存在下において、共培養したナイーブ CD4T 細胞を TH17 細胞へ分化させる。

腸内細菌由来の ATP が CD70^{hi} の樹状細胞に P2X と P2Y 受容体を介して刺激を送り、それによって IL-6, Integrin の産生を誘導して、TH17 細胞が粘膜固有層で分化誘導されるのではないかと考えられる。

- ・ATP 注射は、T 細胞移入による腸炎モデルを増悪する。

Scid マウスにナイーブ CD4 陽性 T 細胞を移入した後、ATP あるいはコントロールを複数回投与した。体重を計測すると、ATP 投与群で顕著に体重減少が増悪し、下痢がひどくなり、腸炎の様相が悪化した。TH17 細胞数も ATP 投与した群で非常に増加している。

このようなことから ATP は腸炎の標的のひとつとして考えられる。

- ・今後の実験計画

複数存在する P2X と P2Y 受容体サブタイプの内、TH17 細胞分化誘導に関わるのはどのサブタイプであるか？
レトロウイルスによる過剰発現系を用いて検討する。

ATP の分解酵素

E-NTPD7 及び E-NPP5 が消化管上皮に高発現していることを見出した。

現在それらのノックアウトマウスを作成し、核酸の消化管発現における働きをさらに検討する。

<質疑応答>

Q: 腸内細菌にも色々あるが、この TH17 細胞を induce するようなバクテリアの特徴があるか？

A: 今のところしっかりしたデータは持っていない。ある種の細菌が Th17 を特異的に誘導するデータは他のグループから報告されている。ジャクソンから買った B6 マウスには Th17 細胞は殆どいないが、タコニックから買ったマウスには TH17 細胞が非常に多くいることから、腸内細菌を比較するとどうも異なるものがい

るとか、などの報告はある。どの細菌が TH17 細胞を分化誘導するかとか、こういった特徴を持っているかはこれからの課題である。

Q: ワイルドタイプのマウスにもたくさんいて、腸炎を起こすものにもいるということは、ワイルドタイプの TH17 は何をしているか?

A: そこははっきりわからない。常に活性化状態を保ってバクテリアの進入に備えているとも考えられるし、TH17 細胞がいることで、炎症を起こすというよりも、何らかのホメオスタシスを保っているような働きがある可能性もあるが、通常、存在している IL17 が何をしているかはわかっていない。

Q: TH17 を誘導するサイトカイン、IL-23 に ATP を外から入れるとどうなるか?

A: IL-23 もマウスも上がる。TNF も上昇する。

Q: TH17 細胞でバグが少なくても B6 が多いのは、同じ環境で飼っていてもできるのは? バックグラウンドのフェノタイプが関係しているか?

A: バックグラウンドの違いだと思う。

Q: 腸炎の治療において APC をターゲットとするのか? TH17 を産生する方をターゲットとするのか?

A: TH17 細胞そのものを無くしてしまうことができるのであれば、TH17 をターゲットとしても良いし、IL-23 をターゲットとしても良い。ATP を検討しようとする、樹状細胞に対して何かを検討することになるかと思う。

Q: 実際のところナチュラルに存在しているのはどういったことをしているのか?

A: それはわからない。IL17 のローカスにジフテリアトキシンレセプターをノックインしてジフテリアトキシンを入れて TH17 細胞だけを無くして、どういったことになるかを検討しようとしている。

班長: ATM 療法の理論的な背景になると臨床家の視点からは言える貴重なデータである。

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)

[背景]

- ・ recombinant の抗菌ペプチドを作成し、臨床応用していこうと考え実験を行った。vivo の実験である程度の一定の見解が出てきたので報告する。
- ・ 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、小腸ではバクテリアが少ないことは小腸陰窩にある 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。数多くのバクテリア、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。

様々なタンパク分解酵素に抵抗力がある

[Recombinant HD-5]

- ・ 大腸菌の Recombinant 発現系を用いて大腸菌を刺激し、様々なペプチドが出てきて、その内のひとつ Defesin

分画を得て精製している。そういったペプチドは特徴的なシステインであるフィドボンドを持っているので、スペックでサイズが明らかであることを確認している。

【Recombinant proHD-5】

- マチュアペプチドよりもかなり大きな8キログルトン程度のプロフォームも作成している。
HPLCで精製し、スペックで確認している。AU-PAGEで泳動すると作成されたものは大きなペプチドとしてはほぼ均一に精製されている。それをトリプシン処理するとトリプシンが切断し、マチュアペプチドとして明らかに出来てくる。マチュアペプチドはトリプシンを付加しても切断されずに抵抗性のフォームを形成している。

【Antibodies against HD-5】

- それぞれのペプチドに対する抗体が得られたので、proformに対する抗体、matureformに対するポリクローナル抗体を用いて免疫染色を実施。

【Native HD-5 is stored as proform】

- proformに対する抗体とmatureformに対する抗体をマージすると、生体内ではDefensinはproformの形で存在することがわかってきた。
- ヒトの組織をエクストラクトし、western blottingで確認すると、すべてのフォームはproformとして発現しており、通常の生体内ではmatureformは見られない。クルードエクストラクトにトリプシンを加えるとmatureformとしてdetectされる。Recominantペプチドと同じような分解の様子をとる。

【Paneth Cell Defensin Activation Process】

- defensinはproformとして発現し、分泌後にmatureformとして働いていることが明らかになった。
- 実際に生体内でPaneth CellやDefensinがどのように働いているのかを調べると、小腸粘膜をクローン病患者から得て、小腸陰窩のみを精製する方法を開発し、検討した。
正常な小腸陰窩はきれいな構造を保ち、その下にはパネート細胞がみられるが、クローン病患者から得られた小腸陰窩は伸びたような管腔が広がったような形態異常を示している。それらの精製されたクリプトがどういった活性を持っているかを抗菌活性で検討した。サルモレラ、E. coliなどの細菌で刺激して得られた分泌物の細菌活性を見ると、通常の正常なヒトの小腸陰窩からは抗菌活性が得られるが、クローン病患者では、抗菌活性が明らかに低下している。

【Loss of Antimicrobial Activity】

- クリプトの数を増やせば増やすほど、正常な場合はバクテリアが死んでいくが、クローン病患者では抗菌活性がかなり低下している。その原因としてdefensinの発現に異常があるのではないかと考えている。
Western blottingで見ると、通常はproform、defensinが見られる。トリプシンで処理すると小さなmatureformがdetectされるのに対し、クローン病の患者でトリプシン処理するとmatureformが認められなくなっている。つまり抗菌活性をもったdefensinが得られなくなっている。構造異常があることを突き止めた。

◆抗菌活性の低下を補うことで治療に繋がるのではないかと考え、以下の実験をした。

- DSS腸炎モデルで大腸粘膜は明らかに破壊されているが、小腸粘膜は破壊されずにパネート細胞及び内部の分泌顆粒も見られる。つまりこの腸炎モデルではマウスの小腸はダメージを受けておらず、内因性のdefensinは保たれている。
- このマウスに経口的、経腸的に腹腔内投与を行った。

【DSS colitis model】

- はじめに経口的に投与HD-5、matureformを投与しても生存の延長は見られない。Proformを投与しても同様な結果であった。
- 注腸投与でも明らかな効果が認められず、延長効果は認められなかった。
- 腹腔内で3回投与
HD-5の腹腔内投与では生存曲線が右に移行し、有効な効果があり、有意差も認められた。しかしproformではこのような効果はなく、治療で用いるにはmatureペプチドでなければならないことがわかってきた。

【DSS colitis model -histology-】

- ・体重に関しては、改善が認められず、組織学的にはHE染色ではmatureformを与えたものでは粘膜が保たれている。
- ・KI67で染色してみても細胞増殖にはあまり関係ないようである。粘膜の修復には貢献していない。

【DSS colitis model -apoptosis-】

- ・アポトーシスを検討したところ、Indexで見るとHD-5を投与するとアポトーシスが少なくなっている。但し、有意差は認めない。

【Summary of the colitis model】

- ・DSS腸炎での検討から、経口的に投与しても効果は得られない。注腸投与でも効果が無い。
- ・腹腔内でmatureformを投与した時のみ効果が認められた。

【Possible explanation】

- ・抗菌ペプチドに抗菌活性があることは従来より報告されているが、免疫賦活作用もある。
- ・アポトーシスも抑制する作用があることを確認した。
- ・抗菌ペプチドと呼んでいるが、抗菌活性だけでなく、宿主を守るようなペプチドであろうと考える。

<質疑応答>

Q:腹腔内投与が有効で、経口と注腸投与で効かない理由をどのように考えるか?

A:通常のマウスを使用しているが内因性の抗菌ペプチドは保たれているという状況があるが、経口的に投与して残っていたとしても濃度的にかなり少なくなっており、効果が認められなかったと考えられる。

Q:安定性はどうか?

A:投与した後の便中からヒトのdefensinと同じペプチドが回収されているので、完全に壊れているわけではない。Vitro実験では種々のタンパク分解酵素を加えても壊れない強力な構造であることは確認している。また、LPSの中和作用なども確認されているので、その他TNF α を抑える作用を示唆されている。

Q:DSS腸炎以外での検討は?

A:ゼブシンのモデルで抗菌ペプチドを投与すると予後は改善するという報告はあるが、臨床応用に至った報告はない。

Q:実際の臨床応用では注射薬ということになるか?そのハードルは?

A:安全性が一番問題となり、IL-8への影響などもあるので、マウスで検討を進めている。

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)

- 藤谷幹治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:藤谷幹治

【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】

<過去の文献での報告(メタ解析から)>

⇒母集団によって結果が異なり、効果はどのくらいははつ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. Subbills (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 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 1 μ 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。

- ・10mM 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 study)]

- ・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_{cell}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。
- ・培養上清中に活性物質が存在する。

<質疑応答>

Q:この新規の乳酸菌はもともとヒトにいるものか?

A:基本的にはいない、植物性のものである。

Q:上皮の透過性の亢進を調べているが、HSPだけなのか?タイトジャンクションmoleculeはどうか?

A:調べていないが関係していると考えられる。

Q:TH17細胞ももともとおなかの中において、DCとか何かの引き金で、悪い作用を示したと考えられるか?

A:本人の持つ遺伝的な背景が大きく関係しているものと考えられる。

Q:死菌を使用しているか?

A:もともと摂取しても生着する必要がないことから死菌を使用しているが、活性を得るには死菌では無理であると考えている。

Q:治療効果とは別に予防効果もあるか?

A:予防投与についてはあまり良い結果は出ていない。同時投与が一番良かった。

Q:CSF17moler という濃度はどの程度か?

A:実際の人の便中を測定したデータはないが、マウスの腸管内では1~100molであり、17molが適当と考えた。
トランスポーター自体がIBDに関与していることもあり、ある程度、高濃度に腸管内におくことによってOCTN2の作用が弱くても細胞内濃度を高まることが良いのではないかと考えている。

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)

[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。

免疫応答ではTLR発現の4に関わっているとの報告もある。

- ・MIF研究のおもな流れ(1966~2008)

機能がなかなか明らかでないが、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き、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Gastro.に腸炎との関係で報告されている。

・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

MIFの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

特許の問題があり、断念している

◆ワクチン

・DNAワクチンを用いて過剰なMIFを減らすことを狙っているが、MIFに対する抗体が出来ることによって、過剰に増えてくるMIFを血液中で中和する。単純にMIFのDNA配列でワクチンを作っても抗体はできないので、T細胞認識されやすい配列を挿入したワクチンを作成。

・敗血症モデルで示されているが、ベクターに比べてこのワクチンはLPSチャレンジによって生存が保持される。

・MIFワクチン投与後の血清抗MIF抗体価の変化

ワクチン接種後、血液中に抗体が産生されることを確認した。

DSS投与7日後の臨床所見 (Disease Activity Index)

【結語】

・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す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。

◆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)

MIFのノックダウンがHSC-2細胞のLPS応答性に及ぼす影響

MIFをノックダウンするとMIFが増えたり、分泌されていないにも関わらずIL-8はメッセージが半分くらいに減り、分泌も落ちることがわかった。

これは細胞の中でMIFが働いているのではないかと想像しているが、過剰になったときは細胞の外で必要になってくるのではないかと考えている。

◆DSS腸炎に対するアンチセンスMIFの効果

・安全性を考慮すると全身投与する場合にアンチセンスが有利と考え、検討

・普通に投与すると壊れてしまうので、キャリアを用いて壊れないようにする方法で検討

アンチセンスオリゴを投与するとdoseによるがある程度の効果は得られる。(組織変化、体重変化、臨床症状)投与方法、投与量の検討がまだまだ必要である。

DSS腸炎という生体にとって異常な時に、MIFが過剰に産生されたり、放出されたりしているので、

そういうことをブロックすることは生体にとってプロテクティブに働くのではないかと考えている。

<質疑応答>

Q: MIFを制御すると腸炎が改善する。重症瘻炎などでも報告されているので、有効なのは間違いないと思うが、方法的には安全性なども考慮すると siRNA ということになるか？

A: siRNA がより現実的ではないかと考える。

◎ 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、秋徳裕唯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)

[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)
- ・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無菌的に 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。
- ・ChiniMACS を用いた CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺Treg 分離
高純度に濃縮可能であった。
- ・ChiniMACS 分離 Treg の suppression assay
CD4⁺ 細胞と Treg を共培養することにより、CD4⁺ 細胞の増殖を抑制する。この方法で分離された細胞が Treg の機能を有していることを確認した。

<UC に対する Treg 分離移入療法～ Phase I 臨床試験計画～> 平成20年度 第1回班会議で報告

[高度医療]

- ◆高度医療事前相談 (平成20年8月28日)
⇒現時点では対象外 (臨床的に使用し、ある程度効果を確認してから検討すべきである。)
- ◆倫理委員会事前相談
Treg 分離移入療法

- ・患者採択条件：Treg 移入が倫理的に問題ないように再考が必要
- ・費用の課題
- ・補償の問題
- ・細胞の静脈内投与のため厳しい無菌性が必要
⇒GMP に準拠して細胞療法を行う必要

Treg 分離移入療法

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

下記の患者を除外する。

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

【費用の問題】

Treg 分離移入療法を実施した時の入院費などは研究費で負担する必要があり、その財源の確保を指摘された。

【補償の問題】

平成21 年度から実施される介入試験には補償保険が義務付けられた。

厚生労働省の指針

健康被害が発生した時の補償

⇒介入研究で補償保険への加入が義務付けられる

⇒損保会社と交渉

⇒該当する商品がないとの回答

⇒引き続き交渉「

【細胞の静脈内投与のため厳しい無菌性が必要】⇒GMP に準拠して細胞療法を行う必要

Cell Processing center (CPC)

文部科学省「橋渡し研究支援推進プロジェクト」に「革新的バイオ医薬工医学の医療技術開発拠点」が採択

独自の医療技術に関する研究成果を実用・商品化に継げる「橋渡し研究 (TR)」拠点として採択

↓プロジェクトの主軸

九州大学病院内で Cell Processing center (CPC) が新設 CPC の可動開始予定(2009 年 3 月～)

GMP に準拠したハイレベルな品質管理基準を満たしており精度の高い細胞分離が可能

CPC を利用に向けて準備の必要性

◆GMP が要求するもの

・いかに約束された品質を守るか

・組織⇒責任体制

・文書化と記録の維持

SOP を作成中

・清潔な製造環境

遠心分離式の白血球除去療法は遺伝子細胞療法部 (九大病院の輸血部) にて実施

↓

その後の細胞分離行程は CPC 内で行う。

↓

病棟で得られた Treg 濃縮細胞を点滴静注

・トレーサビリティ

・バリデーション

GMP 施設で SOP に沿って調整した細胞の安全性の確認が必要

SOPに沿った分離行程の確認

- ・ChiniMACSの稼働状況
- ・安全操作の確認
- ・細胞洗浄時の状況
- ・細胞の回収率

安全性の確認

- ・純度の確認 ($CD^{+}CD^{25high}$)
- ・分離 Treg 細胞の細胞増殖アッセイ
- ・サイトカインアッセイ
- ・エンドトキシンなどのコンタミネーションを確認

【具体的な準備】

GMP 施設、無菌管理に対する教育訓練

具体的な SOP の作成

UC 患者 2 例、健康人 2 例でバリデーション Study を実施

- ・分離 Treg 細胞の純度
- ・細胞増殖アッセイ、サイトカインアッセイ
- ・エンドトキシンなどのコンタミネーションを確認

GMP 基準での分離した細胞の安全性のデータを得る。

最終的なデータを揃えて倫理委員会に提出



承認後、第1相臨床試験を行う。

<質疑応答>

Q:補償の面について、HGF のケースを紹介すると、HGF は治験であり、治験は損害保険に入ることが義務付けられているという認識であったが、劇症肝炎 (80%が死亡) を対象とすると保険の商品価値が出ないことから、保険に入ることが出来なかった。医師主導治験とはいえ、保険に入らずに治験を進めていた。機構に相談すると保険は義務ではなかった。義務付けられたと書いていると言われたが、真実かどうか。絶対、保険に入らなければならないことはなく、バックアップをきちんとして補償すれば治験として認めていただいた例がある。補償と賠償は異なると考えている。

企業と交渉するときに、企業側からすると大学の顔が見えないので、損害保険の場合も、病院長などと契約する必要がある。

Q:有害事象が出たときの入院費はどうするかという問題は出なかったか?

A:今後、本審査になった場合にそういう問題もでてくると思われる。

◎ 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、O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、福枝朝、

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)

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ラッグデリバリーシステム]

- ・マイクロカプセル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
 - ・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。
 - ・腸管長はマイクロカプセル投与群で改善傾向を認めたが有意差は認められなかった。
 - ・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。
 - ・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。
 - ・ミエロペルオキシダーゼ活性（MPO 活性）
 - ・サイクロスポリン投与群で有意差を持って改善傾向が認められた。但し、水溶液投与群との有意差はなかった。

【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: 実用化すれば臨床上にインパクトのある検討であるが、シクロスポリンはT細胞に作用し、IL-2の産生を抑えるというのがメインの機序と考えていたが、このマイクロスフェアを用いたDDSではシクロスポリンは主にマクロファージに取り込まれると考えるが、効果を発現する機序的にはどのように考えるか？全身投与と異なるか？
- A: そこははっきりわからないところであるが、ICAMI 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などが関与しているのかと考えている。またマクロファージに取り込まれた後、局所で再度、シクロスポリンを誘導しているということも考えている。
- Q: T細胞がないマウスでもDSSを飲ませると腸炎が起きるので、自然免疫系だけでも腸炎が起き、Tcellがいることによってさらに腸炎が増悪していることが考えられる。この研究はTcellのfactorのところを抑えられていると考えられるので、腸炎モデルをTcell dependentなものに変えて検討してはどうか？
- A: 貴重な意見である。

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、福井規、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

【背景】免疫細胞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
生体内にとって無害
- ・マイクロカプセルの大きさ調節の結果、 $4\mu m$ 程度の免疫細胞に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殆ど上昇しない。したがって、より副作用の少ない薬剤と言える。

【研究計画と目的】

・研究計画

腸管M細胞および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

(関西医科大学調剤科第2臨床研究審査委員会承認 関西医大臨床研究承認番号 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。

院内製剤で冷所保存

【対象】

難治性潰瘍性大腸炎患者

- ・ステロイド抵抗例

プレドニゾロン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 (目標症例 30 例)

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 : 2 例で有効 1 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

[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
 - ・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。
 - ・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。
- ※リメタゾン：慢性関節リウマチで保険適用で市販
通常2週間に1度投与で、副腎機能の抑制はない

[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
従来の全身の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]（目標症例数30例）

- ・潰瘍性大腸炎（n=1）クローン病（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 従来の全身のステロイド剤投与量を再増量
- ② 従来の全身の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ヵ月間施行し2週毎に有効性を評価
⇒投与開始2週後
有効：従来の全身の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. 従来の全身の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ヶ月間は毎週、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60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例にリメタゾン投与した。
潰瘍性大腸炎患者で2例 クロウン病1例 腸管型ベーチェット2例 計4例に投与
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。
クロウン病：現在投与中(初回投与後10日)
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. 今後も症例を蓄積(目標症例30例)し、リメタゾンの有効性と安全性と検討する。
今後も症例登録にご協力をお願いします。

<質疑応答>

班長：ヒトへの臨床応用というところに視点を置いて研究を進めている。難治例ということもあり患者選択が難しい。最初の薬剤は院内製剤であり、外には出せないが、リメタゾンは費用的にやすく(一人分がトータルで2万円位)、当班は終了するが、是非参加をお待ちいたします。症例が集まれば何らかの形で文献化したいと考えている。

◎ 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)

[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。
- ・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。