

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治製炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

「Crohn 病人工肛門造設例の経過と合併症の検討—多施設共同研究—」

研究分担者 杉田 昭 横浜市立市民病院 外科

研究要旨

直腸肛門病変を合併した Crohn 病では人工肛門造設を必要とする症例が徐々に増えている。これらの症例では人工肛門造設後の QOL は良好となるが、造設後の長期経過例では腸管病変と同様に種々の合併症を併発する例が増加する。

人工肛門造設術を施行された Crohn 病症例の実態を明らかにして効果と合併症の分析から人工肛門造設術の位置付けと術後治療を検討するため、外科プロジェクト研究として多施設共同研究によるアンケート調査を行い、人工肛門造設例の経過を分析することとした。検討項目として人工肛門造設の効果、造設後の短期および長期合併症、合併症に対する治療と経過に加えて、直腸切断術術後の会陰創感染などを選択し、調査票を作成し、アンケート調査を開始する予定である

共同研究者

小金井一隆	横浜市立市民病院 外科
二見喜太郎	福岡大学筑紫病院 外科
池内浩基	兵庫大学下部 消化管外科
佐々木巖	東北大学 生体調節外科

症例の概略として人工肛門造設の適応、部位などを記載(表-1)、検討項目として人工肛門造設の効果、造設後の短期および長期合併症、合併症に対する治療と経過に加えて、直腸切断術術後の会陰創感染などを選択した(表-2)。

調査票は本研究班に参加している外科施設で詳細を検討して作成し、アンケート調査を開始する予定である。

3. 文献

- 1) 小金井一隆、木村英明、杉田昭、ほか：
クローン病に造設したストーマの合併症と予後。日本外科学会雑誌。110:238, 2009

1. 研究目的

Crohn 病症例の増加に伴い、直腸肛門病変合併例とその長期経過例も増加し、人工肛門造設を必要とする症例が徐々に増えている。これらの症例では人工肛門造設後の QOL は良好となるが、造設後の長期経過例では腸管病変と同様に種々の合併症を併発する例が増加する(1)。

人工肛門造設術を施行された Crohn 病症例の実態を明らかにして効果と合併症の分析から人工肛門造設術の位置付けと術後治療を検討するため、外科プロジェクト研究として多施設共同研究によるアンケート調査を行い、人工肛門造設例の経過を分析することとした。

2. 対象、方法

Crohn 病人工肛門造設例を対象とし、以下の検討項目について本研究班に参加している外科の多施設でアンケート調査を行い、結果を集計、分析する。アンケート調査は Excel による調査票で行うこととした。

表-1. 症例の概略

人工肛門造設の適応(複雑痔瘻など)

造設方法(単口、双口など)

部位

造設時の問題点(至適部位への造設困難など)

位置付け(一時的、永久)

表-2. 検討項目

造設後の治療

造設の効果

病変の改善(改善、不変、増悪)

QOL(結婚、妊娠出産、入院回数の減少、社会復帰)

閉鎖の可否

人工肛門に関連した合併症

合併症に対する治療と効果

一時的人工肛門であるが患者の希望で

1年以上閉鎖していない症例の検討

直腸切断術の会陰創合併症、術後経過

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治製炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

クローン病手術例の妊娠、出産例の検討—多施設共同研究—

研究分担者 杉田 昭 横浜市立市民病院 外科

研究要旨

クローン病は手術を必要とする症例が少ない。若年発症のため女性患者は経過中に妊娠、出産を経験する年齢となる。本症手術症例での妊娠、出産の知見は少なく、本プロジェクトは本邦におけるクローン病手術後の妊娠、出産の現状を明らかにし、妊娠、出産に関する留意点を検討することを目的とした。本研究はアンケート調査による多施設共同研究で行うこととし（本研究班に参加している外科 16 施設、内科 2 施設）、妊娠可能と推定される 45 歳未満の女性患者数、腸管手術歴、手術術式、妊娠時の治療や活動性、妊娠および出産経過、新生児の状態などを含むアンケートを作成、集計を依頼した。2009 年 2 月までに 9 施設から回答を頂き、集計したクローン病妊娠例は 38 例でこれらを解析した。初回腸管手術時年齢は平均 24 歳、術後初回妊娠時年齢は 32 歳で、計 55 回の妊娠歴があり、流産が 4 例にみられたが、出産は 48 回（出生児 50 児）であった。初回妊娠までの手術回数は 1 回が最も多く、複数回手術例にも妊娠例がみられた。手術術式は回腸、結腸切除が多くを占めた。切迫流産、1 例、自然流産が 3 例（人工流産が 1 例）、前期破水が 1 例、早期産が 5 例、みられ、胎児仮死、発育遅延、小頭がそれぞれ 1 例、低体重児は 9 例と高い頻度であった。分娩法は帝王切開が 52.3%（22/42 回分娩）であった。

共同研究者

小金井一隆	横浜市立市民病院 外科
佐々木巖	東北大学生態調節 外科

1. 研究目的

クローン病の多くは若年で発症し、女性は経過中に妊娠、出産を経験する年齢となる。クローン病女性患者の妊娠、出産についてはいまだに不明な点が多く、特に手術症例の術後妊娠、出産に関する知見は極めて少ない。本プロジェクトは本邦におけるクローン病手術後の妊娠、出産の現状を明らかにし、妊娠、出産に関して留意する点を検討することを目的とした。

2. 対象、方法

本研究はアンケート調査による多施設共同研究で行うこととし、検討項目（表-1）に基づいてアンケート用紙を作成し、本研究班に参加している外科 16 施設、内科 2 施設に送付して集計を依頼した。

アンケートの主な内容は妊娠可能と推定される 45 歳未満の女性患者数、腸管手術歴、手術術式、

妊娠時の治療や活動性、妊娠および出産経過、新生児の状態などを含むものとした。

本報告での頻度はすべてアンケートに上それぞれの項目で回答のあった例数を母数とした。

C. 結果

2009 年 2 月までに 9 施設から回答があり（表-1）、集計したクローン病妊娠例は 38 例であった。

症例の概要は初回腸管手術時年齢が平均 24 歳、術後初回妊娠時年齢は 32 歳で、計 55 回の妊娠歴があり、術後 1 回妊娠例が 26 例と最も多かった（図-1）。

初回手術時年齢 45 歳以下の女性症例を対象とした妊娠症例数の割合は、回答のあった施設での集計では 11%（268 例中 26 例）で、各施設間では 7.5~25%と差を認めた。

病変範囲別では小腸大腸型が 69.7%（23/33 例）、小腸型が 27.3%（9/33 例）、大腸型が 3.0%（1/33 例）で、肛門病変の合併は 60%（18/30 例）にあった（図-2）。

計 55 回の術後妊娠経過は流産が 4 例（自然 3

例、人工1例)にみられ、調査時妊娠中の3例を除き、出産は48回で、出生児は50児(双胎2例)であった(図-3)。

初回妊娠までの手術回数は1回が23例と最も多かったが、2回11例、3回が4例と複数回手術例にも妊娠例がみられた。

手術術式は回腸、結腸切除が多く、直腸の手術例は少なかった(表-3)。

最終手術から妊娠までの期間は61ヶ月以上が41.8%(23/55回妊娠)で、次いで25~60ヶ月以上が23.6%(13/55回妊娠)が多かったが、6ヶ月未満の症例も11%(6/55回妊娠)みられた(図-4)。

活動期に妊娠した症例は5%(2/40回妊娠)のうち1例が自然流産していた。また、8.1%(3/37回妊娠)に妊娠中の再燃があり、うち1例が前期破水し帝王切開で出産していた(表-4)。

妊娠、分娩時の異常は早期産が5例(33回妊娠中15.2%、あるいは50回出産10.4%)、自然流産が5.5%(3/55回妊娠)、切迫流産が1.8%(1/55回妊娠)、前期破水が2.0%(1/51回妊娠継続:流産4回を除く)に見られた(表-5)。

出生児の異常は胎児仮死、発育遅延、小頭水頭症、ダウン症がそれぞれ2.0%(1/50児)で、出生時体重2500g以下の低体重児は23%(9/39児)と高い頻度であった(表-6)。分娩法は帝王切開が52.3%(22/42回分娩)であった。帝王切開の適応は肛門病変の合併が11例でもっとも多く、胎児の要因、前期破水など産科的な要因は5例であった(表-7)。

3. 考察

クローン病症例の妊娠、出産については不明な点が多く、特に手術例での報告は少ない。現在まで本邦での手術後出産や人工肛門の造設例での出産の報告はあるが少数例であり(1-3)、欧米でも妊娠経過や児に対して手術既往は関連ないとする報告(4)や腸管手術は流産や低体重児のリスクとする報告(5,6)があるが、多くの報告はない(7)。

妊産率に対する手術の影響に関して欧米の

報告では低下する報告と正常と変わらなくなるとする報告があり、一定しない(8-11)。

今回の結果では術後症例でも妊娠、出産の経過は概ね良好で、複数回手術例にも妊娠出産例があった。分娩方法は帝王切開が約半数と多く、その適応は肛門病変合併が多かった。また、妊娠中は早期産と低体重児の頻度が高いことに留意する必要があると思われる。45歳以下の女性手術例を対象として妊娠例は11%あった。

より詳細は妊娠、出産に対する手術の影響を分析するためには、症例数を増やし非手術例と比較することが必要である。また、妊産率を分析するためには、母集団(妊娠可能症例)を設定して詳細に検討する必要があると思われる。

4. 文献

- 1) Takahashi K, Funayama Y, Fukushima K, et al: Pregnancy and delivery in patients with enterostomy due to anorectal complication from Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22:313-318,
- 2) 織内竜生、樋渡信夫、桂島良子、他: 炎症性腸疾患と妊娠、出産-相互の影響と経過、治療に関する臨床的検討。日消誌 1999; 96: 266-272,
- 3) 三穂乙實、青木 哲、朝山 功、他: 教室におけるクローン病手術症例の検討-とくに女性例の妊娠、分娩について-。日本大腸肛門病会誌 1992; 45, 112-117,
- 4) Bortoli A, Saibeni S, Tatarella M, et al: Pregnancy before and after the diagnosis of inflammatory bowel diseases: Retrospective case-control study. *Gastroenterology* 2006; 22:542-549
- 5) Moser MAJ, Okun NB, Mayes DC, et al: Crohn's disease, pregnancy, and birth weight. *Am J Gastroenterol* 2002; 95:1021-1026
- 6) Nielsen OH, Andreasson B, Bondensen S, et al: Pregnancy in Crohn's disease. *Scand J*

Gastroenterol 1984; 19:724-732

- 7) 小金井一隆、杉田昭、木村英明、ほか: クロ-ン病女性の妊娠、出産と手術. 大腸疾患 NOW 日本メディカルセンター 2008 p177-182
- 8) Hudson M, Flett G, Sinclair TS, et al: Fertility and pregnancy in inflammatory bowel disease. Int J Gynaecol Obstet 1997; 8:229-237
- 9) Wikland M, Jansson I, Asztely M et al: Gynaecological problems related to anatomical changes after conventional procto-colectomy and ileostomy. Int J Colorectal Dis 1990; 5:49-52
- 10) Arkuran C, McComb P: Crohn's disease and tubal infertility: the effect of adhesion formation. Clin Exp Obstet Gynecol 2000; 27:12-13
- 11) DeDombal FT, Burton IL, Goligher JC: Crohn's disease and pregnancy. BMJ :1972:550-553

図-1 術後妊娠の回数

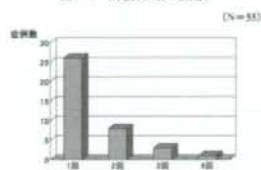


図-2 病変範囲と肛門病変の合併

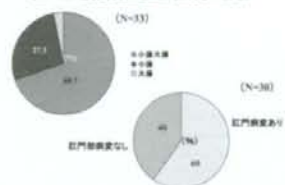


図-3 妊娠症例数と出産回数、児数

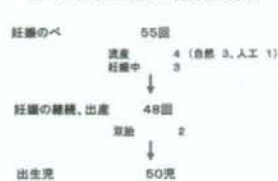


表-1 検討項目

- 妊娠
1. 症例数
 2. 妊娠経過
 3. 妊娠中の異常の有無とその程度
- 出産
1. 症例数
 2. 出産方法(経膈、帝王切開)
 3. 新生児の状況
 4. 出産後の異常の有無とその程度

表-2 集積したCrohn病妊娠、出産症例の施設

- 東北大学産科婦人科
- 東北大学病院大腸肛門外科
- 新潟大学第1外科
- 大阪労生病院外科
- 群馬県立がんセンター外科
- 兵庫医科大学第1外科
- 福岡大学医学部外科
- 三重大学消化器小児外科
- 横浜国立市民病院外科

表-3 初回妊娠までの手術

術式	症例数 (N=38)
回盲部切除	13
+回腸部分切除	4
+Stoma	1
+盲腸+S状結腸切除	5
回腸-結腸全摘	3
+Stoma	6
回腸部分切除	4
stoma造設	2

図-4 直近手術から妊娠までの期間

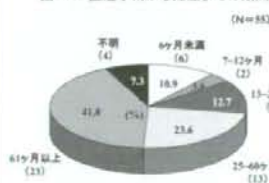


表-4 妊娠中のクローン病の活動性

	例数	程度 (%)	
		対 対象例数	対 妊娠例数
妊娠経過観察	4	3.6 (55)	5.0 (40)
妊娠中再発	3	6.5 (48)	8.1 (37)
妊娠前 肛門病変活動	2	4.1 (48)	6.7 (36)

表-5 妊娠中の異常

	例数	程度 (%)	
		対 対象例数	対 妊娠例数
切迫流産	1	1.8 (55)	2.7 (37)
自然流産 (人工流産)	3	5.5 (55)	8.3 (37)
胎膜破水	1	2.0 (51)	2.7 (37)
早産産	5	16.4 (48)	15.2 (33)

表-6 出生児の異常

	例数	頻度(%)	
		対対象例数	対記載例数
胎児死亡	1	2.0 (50)	2.3 (43)
異常産婦	1	2.0 (50)	2.3 (43)
小産、水腫症	1	2.0 (50)	2.3 (43)
ダウン症	1	2.0 (50)	2.3 (43)
低体重	9	18.0 (50)	23.1 (79)

表-7 帝王切開の頻度と適応

38例中 17例 (44.7%)
 48分産中 22回 (45.8%)
 42記載例中 22回 (52.3%)

適応	例数
肛門部病変	11
前期破水	1
胎児の要因	4
過去のCS	2
不明	4

分子クローニング法によるクローン病病因解明へのアプローチ

研究協力者 飯塚 政弘 秋田赤十字病院附属あきた健康管理センター 所長

研究要旨：分子クローニング法によりクローン病病因の解明を試みた。その結果、典型的な患者血清と反応を示す9個のクローンが同定された。そのうちの1個は抗酸化ストレス機能を有する peroxiredoxin 6 と高い相同性がみられ、多くのクローン病患者において高い抗体価が認められた。これらの結果より、Peroxiredoxin 6 は自己免疫のターゲットなどの機序でクローン病の病因に関与している可能性が示唆された。

共同研究者 相良 志穂

秋田赤十字病院附属あきた健康管理センター

A. 研究目的

本研究の目的は、分子クローニング法によりクローン病の病因を解明する（特に感染因子、自己抗体の同定）ことである。

B. 研究方法

クローン病患者腸組織より cDNA library を作成し、library に含まれる 150 万個の遺伝子を蛋白として発現させ、典型的なクローン病患者血清によりスクリーニングを行った。陽性クローンが得られた場合、その由来を明らかにするとともに、クローン病患者血清に特異的に反応する物質であるのかを Western Blot, ELISA により検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、秋田大学医学部倫理委員会に申請し、その許可のもとに行われた。

C. 研究結果

スクリーニングの結果 63 個の陽性クローンが得られ、塩基配列によりこれらは 9 個の遺伝子に分類された。遺伝子解析の結果、このうちの 4 個の遺伝子 (C117, 35, 37, 58) と高い相同性をもつ物質が同定されたが、この中に感染因子は含まれていなかった。4 個の遺伝子のうち患者血清と最も強く反応したのは C117 で、抗酸化ストレス機能を有する peroxiredoxin 6 と高い相同性を示した。Western Blot の結果、クローン病患者 45.4% が C117 に対して抗体を有し、ELISA でも C117 に

に対する高い抗体価がクローン病で認められた。

D. 考察

本研究で同定された物質のうち、典型的クローン病患者血清と最も強く反応した C117 は抗酸化ストレス機能をもつ peroxiredoxin 6 と高い相同性を持ち、また多くのクローン病患者で高い抗体価が認められた。一方、以前よりクローン病の病体に酸化ストレスの関与が示唆されている。これらの結果より、peroxiredoxin 6 はクローン病において自己免疫反応のターゲットなどの機序で疾患の発症に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

Peroxiredoxin 6 は自己免疫反応のターゲットなどの機序によりクローン病の発症に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし（現在投稿準備中）
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取
2. 実用新案登録
3. その他
すべてなし

バイオマーカー探索を目的とした炎症性腸疾患の血清・血漿プロテオーム解析

研究分担者 坪内 博仁 鹿児島大学大学院医学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨：患者血清・血漿プロテオーム解析は、網羅的かつ迅速に蛋白質発現の評価ができ、疾患の病態解明や診断マーカー同定に有用である。本研究では二種類のプロテオーム解析機器により、疾患バイオマーカー候補を同定した。そのうち好中球ペプチド (human neutrophil peptide 1-3 ; HNP1-3) は、活動性潰瘍性大腸炎患者で高濃度となり、疾患活動性マーカーや治療効果予測マーカーとなる可能性を明らかにした。さらに好中球ペプチドをマウス実験腸炎モデルに投与したところ、腸管炎症を悪化させることを証明した。このような結果から、HNP は潰瘍性大腸炎の病態と密接に関連している可能性が考えられた。

A. 研究目的

炎症性腸疾患は多遺伝子疾患であるが、その発症や病態進展は十分明らかとなっていない。プロテオーム解析機器の進歩により、疾患の病態解明に有用な蛋白質や疾患バイオマーカー蛋白質の同定が可能となってきた。本研究では炎症性腸疾患患者の血清・血漿を用いて網羅的蛋白質発現の解析を行い、有用なバイオマーカーの同定を目的とした。さらに、同定した好中球ペプチド (human neutrophil peptide 1-3 ; HNP1-3) の臨床的意義や病態への影響を検討した。

B. 研究方法

1) 血清・血漿プロテオーム解析

潰瘍性大腸炎 (UC)、クローン病 (CD) と健常者 (HV) の血清・血漿中の蛋白質発現を、プロテインチップ SELDI システムとクリンプロットシステムを用いて網羅的に解析した。また、同定した好中球ペプチド (human neutrophil peptide 1-3 ; HNP1-3) の濃度は ELISA 法により測定した。

2) HNP1-3 の腸管炎症への影響の検討

Dextran sodium sulfate (DSS) 腸炎モデルマウスを複製し、DSS 自由飲水 4 日目から HNP を 3 日間、腹腔内投与した。DSS 自由飲水 7 日目に屠殺し、体重、腸管長、DAI スコアと大腸の組織学的スコア (cooper score) を評価した。

(倫理面への配慮)

a. 個人の人権の擁護：1) 研究内容について十分な説

明を行い、研究への参加は任意であること、研究に参加しない場合でも、従来通り診療を受けることができることを示す。2) 参加者のデータは、厳重な秘密保持のもとに管理され、本研究のデータが参加者に不利益を及ぼすことはないと考えられる。

b. 個人情報の管理：1) ID 番号、氏名、住所、電話番号などの個人を特定できる情報を除いたものを作製し、新たな番号を付与し、本研究にはこの番号のみを用い、個人が特定できる名前などを用いない。2) 対象者由来の血液サンプルは個人が同定できる情報を消去して、番号を付与する。

c. 対象者に理解を求め同意を得る方法：担当医より、研究内容について説明を行ない、書面による同意を得る。

d. 研究等によって生じる個人への不利益：超音波検査や静脈穿刺は侵襲性のあるものではなく、被験者に不当な危険が生じることはない。個人のプライバシーに関わる点については上記のように十分な配慮を行い、対象者の不利益が生じないようにする。

C. 研究結果

1) 潰瘍性大腸炎 (UC) 11 例と健常者 (HV) 7 例の血清中蛋白質の発現をプロテインチップ SELDI システムにより比較検討し、低分子領域に有意差のある 27 個の蛋白質を検出した。潰瘍性大腸炎群で発現が大きい約 3400m/z 付近の 3 個のピーク蛋白質は、特異抗体を用いた免疫沈降反応で HNP1-3 と確認した。この HNP1-3 は、緩解期の潰瘍性大腸炎群やクローン病、健常者より活

動性大腸炎群の血漿で最も高濃度を示し、潰瘍性大腸炎の活動性マーカーとなる可能性が示唆された。また、治療前のHNP1-3濃度は、治療抵抗群より奏効群で有意に高濃度を示し、治療奏効群では治療後に低下する傾向であった。さらに、クリンプロットシステムを用いた検討では、CD10例、UC10例とHV9例を解析した。約1400m/z付近にUCとHV群よりCD群で有意差をもって高値を示すピーク蛋白を検出した。これらのピーク蛋白は現在同定作業中である。

2) HNP (100 µg/body) を3日間投与したDSS実験腸炎マウスでは、HNP非投与マウスより、有意に体重は減少し、腸管長の短縮、DAIスコアと組織学的炎症スコアの悪化を認めた。

D. 考察

血中のHNP1-3は潰瘍性大腸炎の活動性のマーカーおよび治療効果予測マーカーである可能性が示唆された。HNPは抗菌ペプチドのひとつであるが、単球やリンパ球の走化性を促進する作用も有していることから、自然免疫および獲得免疫の連携にも関与していると考えられる。また、細胞毒性などの作用を有することで組織障害をきたすとの報告があるため、HNP1-3の過剰な存在は腸炎の増悪因子のひとつと考えられる。本研究で過剰なHNPは腸管炎症を悪化させる可能性を示したが、その増悪機序の解明は不十分なため、更なる検討が必要と考えられた。一方、少量のHNP1-3は細胞増殖を促進する可能性もあることから、HNP1-3の制御が潰瘍性大腸炎の病態のコントロールに需要と考えられる。また、HNP1-3と関連する分子の解明は、治療薬や治療法の開発につながる可能性があると考えられる。

E. 結論

今回同定したHNP1-3はUCの活動性や治療効果予測に有用な可能性が示唆された。また、炎症性腸疾患の血清・血漿プロテオームは、病態解明や診断マーカー探索に有用な研究手法のひとつであると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, Kodama M, Ohi H, Tsubouchi H: Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008 (in press)

2. 学会発表

(1) 上村修司、宇都浩文、坪内博仁：プロテオーム解析から同定した血中 Human Neutrophil Peptide (HNP)1-3 の消化管粘膜に及ぼす影響 第94回 日本消化器病学会総会 福岡 2008/5/8

(2) 橋元慎一、上村修司、宇都浩文、沼田政嗣、森内昭博、藤田浩、長谷川将、山元隆文、桶谷真、井戸章雄、坪内博仁：Human Neutrophil Peptide (HNP)1-3 の潰瘍性大腸炎における臨床的意義 第45回 日本消化器免疫学会総会 京都 2008/7/3

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性炎症性腸管障害に関する調査研究
分担研究報告書

マウス DSS 腸炎における精神ストレスの影響

研究協力者 三浦 総一郎 防衛医科大学校内科学講座 教授

研究要旨；マウス DSS 腸炎は精神的ストレスで悪化した。その際 IL18 の上昇が観察され、IL18 ノックアウトマウスでは腸炎の悪化が見られなかった。

共同研究者 上田俊秀, 穂苅量太,
防衛医科大学校内科学講座

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

A. 研究目的

DSS 腸炎が精神ストレスで悪化するか確認する。その際増悪のメカニズムに IL18 が関与しているか検討する。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

B. 研究方法

8 週令雄の C57BL/6 マウスに 3%DSS を 5 日間飲ませ腸炎モデルを作成した。次の 5 日間 1 日 2 時間の精神ストレスを課した(コミュニケーションボックス法;隣接する区画のマウスに間欠的な最小限の電流刺激を与え、それを見させることで精神的ストレスを与える)

(倫理面への配慮)

防衛医大における、動物倫理委員会で承認された。

C. 研究結果

DSS 腸炎で IL18 の上昇、腸管長の短縮、体重減少が見られ、それらはストレス負荷によりさらに増悪した。IL-18 ノックアウトマウスではストレス負荷による腸炎の増悪を認めなかった。

E. 結論

実験大腸炎モデルで精神的ストレスが増悪因子になることを確認した。その際 IL-18 が関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

炎症性腸疾患の IgG 糖鎖変化が自然免疫系に及ぼす影響の解析

研究協力者 飯島 英樹 大阪大学医学系研究科消化器内科学 助教

研究要旨：炎症性腸疾患(IBD)患者において IgG に付着するフコシル化糖鎖にガラクトース欠損が高率に認められ、疾患マーカーとしての有用性を報告してきた。関節リウマチで報告されているような IgG の糖鎖変化を介した補体レクチン経路の活性化は、IBD 患者では確認されなかったが、ガラクトース欠損 IgG はマクロファージによる免疫複合体の貪食能を有意に亢進させ、IBD の病態に関わっていることが示唆された。

共同研究者： 新崎信一郎¹、中島佐知子¹、井上隆弘¹、柄川悟志¹、三善英知²、辻井正彦¹、林紀夫¹ 所属：大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学¹、機能診断科学³

A. 研究目的

IBD 患者における IgG の糖鎖変化が免疫病態に影響を及ぼすかどうかを解明すること

B. 研究方法

ガラクトース欠損、非欠損 IgG を用い、抗原特異的抗体免疫複合体のマクロファージによる貪食および補体レクチン経路の活性化について、in vitro および患者血清を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントの取得、患者情報および血清サンプルの管理などについて、大阪大学倫理委員会の許可を得た上、厳重な配慮を行った。

C. 研究結果

IBD 患者において、IgG のガラクトース欠損は補体レクチン経路の活性化には関わらないことが明らかとなった。一方、ガラクトースを欠損する IgG は通常型抗体に比して貪食能を亢進させることが明らかとなった。

D. 考察

IBD における IgG の糖鎖変化は、マクロファージの貪食に関わり、腸管内に侵入する微生物の制御により強く関わっていることが示唆された。一方、糖鎖変化による局所の組織破壊への関与は確認できなかった。

E. 結論

IBD 患者の IgG の糖鎖変化は、疾患マーカーとなるば

かりでなく、免疫制御の修飾に関わることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

• Egawa, S., Iijima, H., et al. Upregulation of GRAIL is Associated with Remission of Ulcerative Colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295(1) G163-G169. 2008.

• Hayashi, Y., Tsuji, S., Tsujii, M., Nishida, T., Ishii, S., Iijima, H., et al. Topical Implantation of Mesenchymal Stem Cells has Beneficial Effects on Healing of Experimental Colitis in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 326(2) 523-31 2008.

• Shinzaki, S., Iijima, H., et al. IgG oligosaccharide alterations are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 103(5) 1183-81 2008.

• 飯島英樹、林紀夫 グライコミックスの世界 炎症性腸疾患と糖鎖 医学のあゆみ 225(8) 637-641 2008.

• 中島佐知子、飯島英樹 抗 TNF α 抗体を用いた炎症性腸疾患の治療 *Clinician* 574 1195-1198 2008.

2. 学会発表

• Shinichiro Shinzaki, Hideki Iijima, et al. IgG oligosaccharide alterations are a novel

- diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease”
米国 DDW SanDiego 2008/5/18.
- Satoshi Egawa, Hideki Iijima, et al. Upregulation of E3 ubiquitin ligases related to T cell anergy in CD4+ T cells isolated from patients with ulcerative colitis in remission. 米国 DDW San Diego 2008/5/20
 - Hideki Iijima, et al. Agalactosyl IgG observed in inflammatory bowel disease is associated with enhancement of antibody-dependent phagocytosis in human monocytic cell line 米国 DDW San Diego 2008/5/20
 - Sachiko Nakajima, Hideki Iijima, et al. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with inflammatory bowel disease. 米国 DDW San Diego 2008/5/19
 - Jumpei Kondo, Shingo Tsuji, Hideki Iijima, et al. Indications And Diagnostic Yield Of Double Balloon Enteroscopy In A Tertiary Care Setting: An Analysis Of 527 Cases With Suspected Small Bowel Diseases. 米国 DDW San Diego 2008/5/20
 - 新崎信一郎, 飯島英樹, 林紀夫 炎症性腸疾患における免疫寛容分子GRAILの関与におけるIgG糖鎖構造の変化—血清マーカーとしての可能性 第94回日本消化器病学会総会 福岡 2008/5/
 - 井上隆弘, 飯島英樹, 他 クロウン病における悪性腫瘍合併症例の検討 第94回日本消化器病学会総会 福岡 2008/5/8
 - 柄川悟志, 飯島英樹, 他 マウス炎症性腸疾患における T 細胞の免疫寛容の関与についての検討 第94回日本消化器病学会総会 福岡 2008/5/
 - 飯島英樹, 他 “炎症性腸疾患に見られるガラクトース欠損 IgG によるマクロファージ機能への影響の解析 第94回日本消化器病学会総会 福岡 2008/5/8
 - 中島佐知子, 飯島英樹, 他 炎症性腸疾患患者における骨密度および骨代謝マーカーの検討 第94回日本消化器病学会総会 福岡 2008/5/8
 - 柄川悟志, 飯島英樹, 他 潰瘍性大腸炎患者における T 細胞アナジーの検討 第45回日本消化器免疫学会総会 京都 2008/7/3
 - Shinzaki S., Iijima H., et al. Alterations in IgG fucosylated oligosaccharides are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease JHUPO conference 2008 大阪 2008/7/28
 - 上ノ山直人, 山本克己, 西田勉, 井上隆弘, 東谷光庸, 小玉尚宏, 山北剛史, 新崎信一郎, 井倉技, 飯島英樹, 他 レミケード投与後に小腸内視鏡下バルーン拡張術を施行しえた小腸型クローン病の一例 第80回日本消化器内視鏡学会近畿地方会 大阪 2008/3/1
 - 柄川悟志, 飯島英樹, 他 マウス炎症性腸疾患における T 細胞の免疫寛容の関与についての検討 第36回日本潰瘍学会総会 札幌 2008/9/5
 - 近藤純平, 飯島英樹, 辻晋吾 “Crohn 病の診断と治療におけるダブルバルーン小腸内視鏡の有用性 JDDW2008(第76回消化器内視鏡学会総会) 東京 2008/10/1
 - 中島佐知子, 飯島英樹, 林紀夫 ビタミンK欠乏と炎症性腸疾患活動性との関連について JDDW2008 東京 2008/10/1
 - 井上隆弘, 飯島英樹, 他 クロウン病術後に対する小腸内視鏡検査の有用性と問題点 JDDW2008 東京 2008/10/1
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

網羅的蛋白発現解析によって同定された Peroxiredoxin-6 の役割

研究協力者 内藤 裕二 京都府立医科大学医学部 消化器内科 准教授

研究要旨：マウス Dextran Sodium Sulfate (DSS) 腸炎モデルにおける大腸粘膜を用いた網羅的蛋白発現解析において炎症粘膜における Peroxiredoxin-6 (Prx-6) の発現低下が明らかとなった。Prx は Thioredoxin 依存性に H_2O_2 を消去する蛋白質であるが、この発現低下は抗酸化能の低下という側面から考えると非常に重要である。今後、その病態における役割、新規治療標的分子としての可能性を検討していく予定である。

共同研究者 高木智久

京都府立医科大学医学部 消化器内科

A. 研究目的

我々は原因が未だ明らかとなっていない炎症性腸疾患において、病態機序の解明、新規疾患マーカー・新規治療標的分子の探索を目的としてプロテオーム解析を行っている。特に再現性・定量性の高い蛍光標識二次元ディファレンシャル解析は非常に有用な探索ツールであると考えられる。今回我々は、同ツールを用いてマウス Dextran Sodium Sulfate (DSS) 腸炎モデルの炎症大腸粘膜で発現変動する蛋白質の探索を行い、いくつかの疾患感受性候補蛋白質を同定するに至った。さらに、これらの蛋白質において潰瘍性大腸炎患者大腸粘膜での発現も含めて検討を行った。

B. 研究方法

動物モデルとして7週齢雄性 C57BL/6 マウスを用い、既報に従いマウス DSS 腸炎モデルを作成し、大腸粘膜を採取し解析に供した。本実験に関しては本学内実験動物取り扱い規約を遵守して施行された。

解析は Ettan DIGE を用いた網羅的蛋白発現解析を行い、発現に変動を認めたスポットの蛋白質を質量分析計で同定した。この同定された蛋白質の発現について、ヒト潰瘍性大腸炎の大腸粘膜生検検体を用いて発現動態の評価を行った。患者検体は、文書にて同意の得られた潰瘍性大腸炎患者を対象に大腸内視鏡検査下で大腸粘膜生検検体を採取し、解析に供した。

C. 研究結果

DSS 腸炎の大腸粘膜を用いた網羅的蛋白発現解析の結果、変動の大きかった 6 種類の蛋白スポットに関して蛋白質の同定を行った。その結果、炎症大腸粘膜にて発現の低下している蛋白質の一つとして Peroxiredoxin (Prx)-6 が同定された。

また、活動期潰瘍性大腸炎粘膜においては正常大腸粘膜に比し Prx-6 遺伝子・蛋白質発現の有意な低下を認めた。また、組織染色では、Prx-6 は大腸粘膜全般に染色性を認めたが、特に腺管上皮に非常に強い発現を認

めていた。

D. 考察

Prx は H_2O_2 を消去する抗酸化酵素であり、ヒトでは 6 種類の superfamily が知られており、Cys 残基を持つことにより活性酸素種 (ROS) と非常に高い反応性を有している。近年の研究により、クローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患の病態形成に ROS や活性酸素種をはじめとした酸化ストレスの重要性が明らかとなっており、これらの疾患で Prx-6 の発現が低下していることは、大腸粘膜の抗酸化力が低下していると推察される。また、最近の報告では Prx がアルデヒドやニトロ基などの酸化修飾を受けやすいことが明らかとなっており、我々の検討でも同蛋白質におけるニトロチロシン修飾の存在が証明されている。今後、Prx-6、さらには酸化修飾を受けた Prx-6 の病態における詳細な役割を検討していく予定である。

E. 結論

活動期潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜やマウス腸炎モデル大腸粘膜において Prx-6 の発現低下が確認された。

健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takagi T, Naito Y, Mizushima K et al. Increased intestinal expression of heme oxygenase-1 and its localization in patients with ulcerative colitis. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Dec;23 Suppl 2:S229-33.

2. 高木智久、内藤裕二、吉川敏一、武藤徹一郎
監修：大腸疾患NOW. 炎症性腸疾患患者における酸化ストレス修飾蛋白質の同定. 162-166. 2009 (日本メディカルセンター)

2. 学会発表 特記事項なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 取得なし
2. 実用新案登録 登録なし
3. その他 特記事項なし

炎症性腸疾患における末梢血 未熟形質細胞の検討

研究協力者 押谷 伸英 大阪市立大学大学院医学研究科消化器内科学 准教授

研究要旨：炎症性腸疾患、における未熟形質細胞の特徴や、炎症部への集簇に関わる因子の探索を目的とし、各実験結果から潰瘍性大腸炎の病態への関与が示唆される結果を得た。

共同研究者 細見周平、森本謙一、末包剛久、鎌田紀子、十河光栄、山上博一、渡辺憲治、荒川哲男
所属 大阪市立大学大学院医学研究科 消化器内科学

A. 研究目的

炎症性腸疾患における 末梢血 未熟形質細胞 (Immature plasma cell) の特徴や、炎症部への集簇に関与する chemokine を検討することを目的とした。

B. 研究方法

健常人・炎症性腸疾患患者の末梢血未熟形質細胞の特徴を、フローサイトメトリー法により検討した。炎症粘膜での chemokine 発現については、RT-PCR 法・免疫染色法にて検討した。

(倫理面への配慮)

検体採取にあたっては、当大学医学部附属病院倫理委員会承認の下、書面同意を得た患者を対象とした。

C. 研究結果

潰瘍性大腸炎・クローン病の末梢血において、未熟形質細胞の増加を認め、臨床的活動性と正の相関を示した。未熟形質細胞の chemokine receptor CXCR3 は潰瘍性大腸炎で特異的に発現高値であり、その ligand となる chemokine は炎症性腸疾患の炎症粘膜で発現が高値であった。

D. 考察

CXCR3 axis を介した未熟形質細胞の潰瘍性大腸炎の炎症粘膜への集簇が、病態に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

潰瘍性大腸炎で生じている免疫異常の一つとして、未熟形質細胞の関与が示唆され、今後更なる検討が病態の解明につながるものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hosomi S, Oshitani N, Kamata N, Sogawa M, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Maeda K, Hirakawa K, Arakawa T. Phenotypical and functional study of ghrelin and its receptor in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* Sep;14(9):1205-13. 2008

2. 学会発表

Hosomi S. Phenotypical and functional study of ghrelin and its receptor in the pathogenesis of Crohn's disease. 2008 Digestive Disease Week, San Diego Convention Center, MAY 17-22, 2008

Hosomi S. The efficacy of "Mother-baby technique" enteroscopy for patients with small bowel strictures of Crohn's Disease. 2008 Digestive Disease Week, San Diego Convention Center, MAY 17-22, 2008

腸管炎症における自然免疫応答の制御機構の解明と治療への応用

研究協力者 石原 俊治 島根大学医学部内科学講座第二 准教授

研究要旨：腸管炎症における自然免疫応答の制御機構の解析と、応答時に誘導されるシグナルに関与する分子を標的とした新規治療法の開発を念頭に研究を遂行した。昨年までの研究で、Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) が LPS によってマクロファージに誘導される自然免疫応答を抑制し、マウス実験腸炎の病勢を有意に改善させることを明らかにしていた。今年度は、特に MFG-E8 による抗炎症効果の詳細なメカニズム解析を実験的におこなった。その結果、MFG-E8 は LPS で活性化されたマクロファージ表面の avb3 インテグリンに osteopontin (OPN) と競合的に結合し、腸炎時に OPN によって惹起される NF- κ B 依存性の炎症シグナルを抑制することが明らかとなった。MFG-E8 は活性化マクロファージの avb3 インテグリンにのみ結合するという合理的な作用を有していることから、副作用を少なく治療応用可能な分子であると考えられた。さらに今年度は、近年注目されている制御性 B 細胞 (Breg) の腸管自然免疫における機能解析を始め、クローン病モデルマウスでは細菌抗原に対する Breg の IL-10 産生能に異常があることが明らかとなった。今後は、クローン病の病態における Breg の解析をさらに進め、治療応用への可能性を検討していく予定である。

共同研究者 三島義之、大嶋直樹、大谷 文、
岡 明彦、楠 龍策、森山一郎、Aziz Monowar、
木下芳一

島根大学医学部内科学講座第二

A. 研究目的

1. 精製 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8)

蛋白による腸炎抑制機序の解明

宿主は消化管内に常在する細菌叢と共存しているが、細菌に対する自然免疫機構のバランスの破綻が炎症性腸疾患 (IBD) の病態の一因となっている。Toll 受容体 (TLR) ファミリーは自然免疫を担う中心的分子群であり、腸管の免疫制御に深く関わっている。細菌構成成分 (PAMPs) の刺激は NF- κ B 依存性にサイトカイン産生を誘導し、その制御異常が腸炎発症の一因となる可能性が示唆されている。MFG-E8 はアポトーシス細胞表面のホスファチジルセリンと食細胞表面の avb3 インテグリンを架橋する分泌型のタンパク質で、生体が自己のアポトーシス細胞を除去する "Eat-Me" シグナルを制御している。私共は、昨年までの研究で、MFG-E8 が LPS によってマクロファージに誘導される自然免疫応答を抑制し、マウス実験腸炎

の病勢を有意に改善させることを明らかにしていた。これまでの実験で、MFG-E8 による抗炎症効果は、LPS 刺激後の NF- κ B 依存性の炎症シグナルに深く関わることで想定されていたことから、今年度はその詳細なメカニズムを解明する目的で、種々の *in vitro* の実験を計画し遂行した。

2. クローン病モデルマウスにおける制御性 B 細胞の解析

B 細胞は抗体産生や二次的な抗原提示細胞としての機能を有し、宿主の獲得免疫に関わることは広く知られている。しかし、最近の研究によって従来の機能とは異なる免疫抑制性の自然免疫に深く関与する B 細胞のサブタイプが存在することが明らかとなっている。このサブタイプは細菌抗原に対して Interleukin (IL)-10 や transforming growth factor (TGF)- β 1 を産生することで免疫抑制機構を発揮することが想定されており、"制御性 B 細胞 (Breg)" と呼ばれている。Breg の腸管炎症における役割は不明な点が多く、特に炎症 IBD の病態への関与は明らかでない。そこで今回私共は、クローン病モデルマウスにおける Breg の機能を自然免疫の面から解析する計画を立案し実験を遂行した。

B. C. 研究方法と結果

1. 精製MFG-E8 蛋白による腸炎抑制機序の解明

昨年までの検討で、精製したMFG-E8 蛋白がマウス実験腸炎（デキストラン硫酸：DSSモデル）の病勢を有意に抑制すること（体重変化、腸管長、病理組織、組織中のMPO活性、IL-1bとTNF- α 産生量）を明らかにしていた。MFG-E8のavb3インテグリン結合部位を変異させた機能喪失蛋白では効果が認められなかったことから、MFG-E8がavb3インテグリンに結合する他のリガンドと競合的に炎症抑制を発揮すると仮説を立てて、以下の実験をおこなった。

① 腸管炎症時に局所で誘導されるavb3インテグリンリガンドの同定

2.5%DSS腸炎モデルを作製し、DSS投与中の炎症期とDSS投与後の回復期に分けて、腸管組織を採取後に各組織からRNA抽出をおこなった。検討するavb3インテグリンはextracellular matrix proteins (ECMs)ファミリーであるosteopontin (OPN), vitronectin (VN), and fibronectin (FN)とし、real-time PCR法によって経時的に発現変化を検討した。その結果、炎症時にはOPNの発現量のみが増加することが明らかとなった。さらに*in vitro*において腹腔マクロファージをLPSで刺激すると、mRNA,

蛋白レベルのいずれにおいてもOPNの発現が誘導されることが確認された。

② MFG-E8のavb3インテグリンへの結合およびOPNとの競合による炎症抑制実験

上記の実験で同定されたOPNはNF- κ B依存性の炎症性サイトカインであることが報告されていることから、MFG-E8の抗炎症効果はOPNのavb3インテグリンへの結合阻害であることが想定された。そこで最初に、種々の濃度のMFG-E8蛋白をマクロファージと反応させ、抗MFG-E8抗体を用いてavb3インテグリンへの結合を確認した。また、同様の実験系で、種々の濃度MFG-E8蛋白とOPNをマクロファージと反応させると、添加したMFG-E8濃度に依存して、OPNのavb3インテグリンへの結合能が低下することが明らかとなった。さらに、OPNの中和抗体を用いて、LPSによるマクロファージからのIL-1bとTNF- α 産生を検討すると、中和抗体の添加によってサイトカイン産生は有意に抑制されたこ

とから、OPNがマクロファージのavb3インテグリンに作用して炎症誘導をおこなっていることも確認された。

③ LPSによるavb3インテグリンの活性化とMFG-E8によるOPN依存性炎症シグナルの抑制に関する検討

炎症組織でMFG-E8の抗炎症効果がより効果的に認められることから、LPSによってavb3インテグリンが活性化され、OPNによる炎症シグナルが活性化されると想定して実験をおこなった。マクロファージをLPSで刺激し、b3インテグリンのリン酸化をウエスタンブロットで確認した。さらにLPSで刺激下では、インテグリンのリン酸化によってOPNによる細胞内シグナルが活性化され、NF- κ B依存性に炎症性サイトカイン産生が誘導されることが明らかとなった。また、インテグリンの活性化、OPNによる細胞内シグナルの活性化には、いずれもFAKキナーゼのリン酸化が必要であることも確認された。

2. クローン病モデルマウスにおける制御性B細胞の解析

Bregについては腸管における存在や特異的な表面マーカーについても明らかにされていないことから、最初にBALV/cマウスを用いて検討をおこなった。

① 腸管粘膜、腸間膜リンパ節、腹腔におけるB細胞の表面マーカー解析とLPSおよびCpG DNAに対する反応性に関する検討

最初に、BALV/cマウス腸管粘膜（固有層）、腸間膜リンパ節、腹腔から単核球単離をおこない、B220、CD5、CD1d、IgM、IgD、TLR4、TLR9、RP105の各種抗体を用いて表面マーカー検索をフローサイトメーター（FACS）でおこなった。これまでの報告どおり、腹腔のリンパ球はIgD陽性、CD5陽性のB細胞が多数を占めていたが、(B1細胞)、腸管粘膜（固有層）、腸間膜リンパ節の表面マーカーとは明らかに異なっており、B2細胞に由来するポピュレーションであった。磁気ビーズで分離したB細胞をLPSおよびCpG DNAで刺激すると、いずれの部位から採取したB細胞も培養上清中にIL-10やTGF- β 1産生を有意に同定できた。腸管粘膜（固有層）、腸間膜リンパ節のIL-10産生B細胞を同定する目的で、細胞内のIL-10を染色後にFACS解析をおこなうと、IL-10産生B細胞はCD5陰性、CD1d陽性のポピュレーションに認められることが明らかとなった。

② クロウン病モデルマウスの腸間膜リンパ節B細胞の解析

BALV/c マウスの解析で、腸間膜リンパ節にも細菌抗原 (LPS, CpG DNA) に反応して IL-10 や TGF- β 1 産生をおこなう B 細胞のポピュレーションが確認されたので、クロウン病モデルマウスである SAMP1 マウスとその野生型である AKR マウスを用いて継続実験をおこなった。両マウスの腸間膜リンパ節からリンパ球を単離して、B 細胞の表面マーカーを FACS で解析したが、検討した CD5, CD1d, IgM, IgD, TLR4, TLR9, RP105 のマーカーについては両マウス間で差は認められなかった。次に、両マウスの腸間膜リンパ節から磁気ビーズで分離した B 細胞を LPS および CpG DNA で刺激して IL-10 産生を EIA で確認した。B 細胞の表面マーカーは両群で差は認められなかったにもかかわらず、IL-10 産生はクロウン病モデルマウスである SAMP1 マウスで有意に低いことが明らかとなった。このことは、real-time PCR を用いた IL-10 mRNA の発現についても同様の結果が得られた。

(倫理面への配慮)

動物実験のプロトコールについては、島根大学の実験動物委員会の承認を得た。遺伝子発現系の構築や luciferase assay など、大腸菌を用いて形質転換などをおこなう実験については DNA 組み換え実験委員会の承認を得ておこなった。

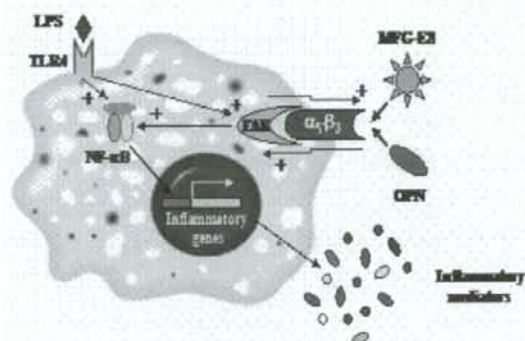
D. 考察

1. 精製 MFG-E8 蛋白による腸炎抑制機序の解明

MFG-E8 による腸管炎症抑制効果には二つの機序が想定される。一つは、炎症の場でアポトーシスが誘導された細胞の迅速な除去を促進することによって、炎症局所の二次的炎症惹起抗原の出現を抑えるという、従来から報告されている MFG-E8 の機能である。二つめは、私共の実験で示されたように、MFG-E8 が食欲促進作用とは非依存的に NF- κ B 活性を抑制し、種々の炎症性サイトカイン産生を抑制することである。今年度の結果から、炎症局所でマクロファージが LPS によって活性化されると、FAK キナーゼとインテグリンのリン酸化が誘導され、OPN による細胞内シグナルが NF- κ B 依存性に誘導すること、MFG-E8 は OPN と競合的に avb3 インテグリンに結合することで抗炎症効果を発揮するこ

とが明らかとなった (図)。平行しておこなっている私共の研究で、

自然免疫応答で活性化される転写因子である NF- κ B や AP-1 は腸管の抗炎症の標的になりうることも明らかとなっている。今回の研究結果は、MFG-E8 が腸管炎症抑制に重要な機能を果たすことを示す新規の知見であり、今後は腸管の抗炎症薬開発につながる有意義なものと考えている。



2. クロウン病モデルマウスにおける制御性B細胞の解析

腸管の粘膜固有層や腸間膜リンパ節に IL-10 や TGF- β 1 を産生する Breg ポピュレーションが存在することが明らかとなった。Breg は CD5 陰性、CD1d 陽性のポピュレーションの中に認められるが、これらの表面マーカーで Breg を規定することは現時点では困難であり、今後のさらなる検討が必要である。一方、クロウン病モデルマウスである SAMP1 マウスの腸間膜 B 細胞が LPS や CpG DNA などの細菌抗原の刺激に対して、IL-10 産生能が低いという結果は新規の知見であり、クロウン病の病態を考える上で重要と思われる。現在は平行して、ヒトの B 細胞と自然免疫応答に関する研究を進めており、来年度はこの点に関してさらなる研究を遂行していきたい。

E. 結論

MFG-E8 は食細胞によるアポトーシス細胞の処理に関わるのみでなく、炎症時に LPS で活性化されたマクロファージに直接的に働き、NF- κ B 活性依存性の炎症シグナルを抑制することが明らかとなった。ヒトの IBD の病態に関する MFG-E8 の役割を検討していくことで、今後の治療応用が可能になることが考えられる。

クロウン病において Breg の機能異常が関与する可

能性が示唆されたが、病態解明や治療応用へはさらなる研究成果の蓄積が必要である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① Aziz MM, Ishihara S, Rumi MA, Mishima Yo, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Li YY, Rahman FB, Otani A, Oka A, Ishimura N, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Prolactin induces MFG-E8 production in macrophages via transcription factor C/EBP β -dependent pathway. *Apoptosis* 13: 609-20, 2008.

② Moriyama I, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MD, Mishima Yo, Oshima N, Kadota C, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Decoy oligodeoxynucleotide targeting activator protein-1(AP-1) attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis. *Laboratory investigation*: 88 652-63, 2008.

③ Mishima Yo, Ishihara S, Amano Y, Oshima N, Kadota C, Otani A, Moriyama I, Li YY, Aziz M, Kinoshita Y: Alterations of peripheral blood CD5(+) B cells in inflammatory bowel disease. *Scandinavia Journal of Gastroenterology* 44: 175-9, 2009.

④ Ishihara S, Aziz M, Oshima N, Mishima Y, Imaoka H, Moriyama I, Kinoshita Y: Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: infectious gastroenteritis-related disorders? *Clinical Journal of Gastroenterology (in press)*

2. 学会発表

① Ishihara S, Aziz M, Rumi MA, Oshima N, Mishima Y, Kadota C, Otani A, Oka A, Norihisa I, Moriyama I, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y
Milk fat globule EGF-8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis via inhibition of NF- κ B activation. *Digestive Disease Week 2008*, San Diego, USA, 2008.5.

② Oshima N, Ishihara S, Rumi MAK, Aziz MM, Mishima Yo, Kadota C, Moriyama I, Ohtani A, Oka A, Li YY, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: A20 is an early

responsive negative regulator of Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells during inflammation. *Digestive Disease Week 2008*, San Diego, USA, 2008.5.

③ Mishima Yo, Ishihara S, Aziz MM, Rumi MAK, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Li YY, Ohtani A, Oka A, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Intestinal CD5 + B cells produce IL-10 and TGF- β via Toll-like receptor-mediated signaling. *Digestive Disease Week 2008*, San Diego, USA, 2008.5.

④三島義之, 石原俊治, 岡 明彦, 大谷 文, 大嶋直樹, 角田 力, 森山一郎, 天野祐二, 木下芳一: 消化管粘膜における IL-10、TGF-beta 産生 B 細胞に関する検討. 第 50 回日本消化器病学会大会, 東京, 2008.10.

⑤大嶋直樹, 石原俊治, 木下芳一: パネルディスカッション: 下部消化管の炎症と機能相関をめぐって 消化管上皮の自然免疫応答における A20 発現の意義. 第 50 回日本消化器病学会大会, 東京, 2008.10.

⑥三島義之, 石原俊治, 大谷 文, 天野祐二, 木下芳一: 炎症性腸疾患の末梢血 CD5 陽性 B 細胞の解析. 第 5 回日本消化管学会, 東京, 2009.2.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

潰瘍性大腸炎における DNA メチル化を介した糖鎖合成不全

研究協力者 土肥 多恵子 国立国際医療センター研究所 消化器疾患研究部長

研究要旨：消化管悪性腫瘍にみられる Sd^a 血液型糖鎖糖鎖発現低下は、転移能にも関連し、癌悪性形質の一端を担っていると考えられる。その発現低下の機構として Sd^a 糖鎖合成酵素 b1, 4GalNAcT2 プロモーター領域の DNA メチル化が重要である。そこで、潰瘍性大腸炎粘膜および潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌、散発性大腸癌を比較した結果、潰瘍性大腸炎粘膜の半数以上と、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌においても Sd^a 糖鎖の発現低下がみられた。潰瘍性大腸炎症例および潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌症例における Sd^a 合成酵素遺伝子のプロモーター領域のメチル化陽性率は、散発性大腸癌症例よりも有意に高かった。以上より Sd^a 合成酵素の DNA メチル化によるサイレンシングは潰瘍性大腸炎の炎症発癌に特徴的であることが明らかとなった。

共同研究者

国立国際医療センター研究所：河村 由紀、川島
麗、萩原 輝記
札幌医科大学：豊田 実、今井 浩三
自治医科大学さいたま医療センター：河村 裕、
小西 文雄
国立国際医療センター戸山病院：斉藤 幸夫
慶應義塾大学：矢島 知治、日比 紀文
兵庫医科大学：松本 譽之

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎では大腸癌が最も深刻な合併症であり、その特徴を明らかにすることによって発癌の予防法・早期診断法開発の基盤とすることが本研究の目的である。消化管悪性腫瘍にみられる Sd^a 血液型糖鎖糖鎖発現低下は、転移能にも関連し、癌悪性形質の一端を担っていると考えられる。その発現低下の機構として我々は、Sd^a 糖鎖合成酵素 b1, 4GalNAcT2 プロモーター領域の DNA メチル化が重要であることを見いだした。そこで、潰瘍性大腸炎粘膜および潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌、散発性大腸癌を比較した。

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎粘膜および潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌、散発性大腸癌における Sd^a 糖鎖の発現を特異抗体による免疫染色で比較した。また、b1, 4GalNAcT2 プロモーター領域にある CpG アイラ

ンドの DNA メチル化を COBRA 法、bisulfite sequence 法、pyrosequence 法を用いて解析した。

(倫理面への配慮) 本研究計画は当該施設の倫理委員会により審査を受け、承認されている。

C. 研究結果

潰瘍性大腸炎粘膜の半数以上で、上皮細胞における Sd^a 糖鎖の発現低下がみられた。潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌においても Sd^a 糖鎖の発現低下がみられた。散発性大腸癌における、潰瘍性大腸炎症例および colitic cancer 症例における Sd^a 合成酵素遺伝子 b1, 4GalNAcT2 のプロモーター領域のメチル化陽性率は、約 10%であったのに対し、潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌では有意に高かった。

D. 考察

大腸における Sd^a 合成酵素遺伝子のプロモーター領域のメチル化は炎症に関連したエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の一部であると考えられる。

E. 結論

Sd^a 合成酵素の DNA メチル化によるサイレンシングは大腸の炎症発癌に特徴的であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawamura, YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, and Dohi T, DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer *Gastroenterology* 2008;135:142-151
2. Dohi, T and Kawamura YI, Incomplete synthesis of the Sd(a)/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer.