

Kitazume T M, Saito R, Okamoto S, Kanai T, Hibi T: Intestinal IFN- γ -producing CD56+CD3-NKp46+

NKp44-NK cells participate in the pathogenesis of Crohn' s disease via crosstalk with intestinal CD14+ macrophages.

第 39 回日本免疫学会総会 2009. 12. 3 大阪
ワークショップ

- 36) Saito R, Hisamatsu T, Takayama T, Kamada N, Ando S, Inoue N, Okamoto S, Kanai T, Hibi T: 胆汁酸は TGR5 受容体を介して IL-12 低産生型樹状細胞に分化誘導する/Bile acids generate IL-12 hypoproducing DCs via Tgr5 signaling pathway 第 39 回日本免疫学会総会 2009. 12. 2 大阪 ワークショップ

- 37) 筋野智久、長沼 誠、井上 詠、岡本 晋、斉藤理子、細江直樹、今枝博之、緒方晴彦、岩男 泰、日比紀文: クローン病術後再燃に対するインフリキシマブの有効性に関する内視鏡的検討 第 27 回日本大腸検査学会総会 2009. 11. 28 東京
シンポジウム

- 38) 小池祐司、緒方晴彦、大熊 潔、高山哲朗、筋野智久、松岡克善、久松理一、岡本 晋、金井隆典、岩男 泰、日比紀文: 消化管超音波検査を用いた潰瘍性大腸炎の評価 第 27 回日本大腸検査学会総会 2009. 11. 28 東京 ワークショップ

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

TNBS 小腸炎における樹状細胞サブセットの役割

研究分担者 岡崎 和一 関西医科大学内科学第三講座 教授

研究要旨：クローン病モデルマウスの腸管粘膜における樹状細胞の動態に注目し、特に炎症の回復過程において重要な役割を担っている樹状細胞を同定し、解析を行った。CD11c⁺/B220⁻ conventional DCs (cDCs) である PIR-A/B^{mod} は小腸炎の軽快に伴い増加、MLR で抗原提示活性の低下、real-time RT-PCR で IL-10 の高値、IL-6 と IL-12 の低値を認めたことより、腸炎回復に関与し、新たな治療の標的となる可能性があると思われた。

共同研究者

星野勝一 1) 2)、稲葉宗夫 2)、池原 進 2)
関西医科大学内科学第三講座 1)
関西医科大学病理学第一講座 2)

A. 研究目的

クローン病などの炎症性腸疾患の病態として、腸内細菌への過剰な免疫反応の関与が挙げられる。抗 TNF- α 抗体などの登場以来、近年治療は飛躍的に進歩したが、未だ難治例も多く、更なる病態解明が望まれている。

また、樹状細胞は免疫反応の開始や自己寛容の制御に際し、重要な役割を担っている。これまで腸管免疫に関わる種々の樹状細胞サブセットが同定されているが、各々の機能については未だ不明な点も多い。

本研究では、クローン病モデルマウスの腸管粘膜における樹状細胞の動態に注目し、特に炎症の回復過程において重要な役割を担っている樹状細胞を同定し、解析を行った。これにより炎症を制御するための新たな標的を見出し、治療法開発の礎になることが期待される。

B. 研究方法

1. TNBS 誘発性小腸炎モデルマウスを作成し、経時的に病理学的検討（光学顕微鏡観察や共焦

点顕微鏡を用いた蛍光免疫染色）を行った。

2. 小腸炎マウスを屠殺して、小腸粘膜上皮および粘膜固有層から樹状細胞に富んだ細胞群を採取した。
3. フローサイトメトリーにて、炎症の経過に伴う樹状細胞の動態を解析した。また PIRs (paired immunoglobulin-like receptors) 発現樹状細胞サブセットを同定し、同サブセットの動態を解析した。また共刺激分子やその他の表面マーカーの発現について解析した。
4. 同細胞を単離し、T 細胞に対する抗原提示能を調べるために Mixed leukocyte reaction (MLR) を行った。
5. サイトカイン産生能を評価するために、単離した細胞から RNA を抽出し、Real-time RT-PCR を行った。また同細胞の培養上清のサイトカイン濃度を測定した。

(倫理面への配慮)

プロジェクトの遂行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1) 関西医科大学医学倫理委員会承認 231 号のもと、個人情報保護法に基づき検体を匿名化した。

2) マウスの実験に関しても動物実験に関しては、動物実験倫理委員会の承認を得て、実験動物の飼

育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

1. TNBS 投与後 1 日目から 3 日目において、小腸絨毛構造の破壊、炎症細胞浸潤の増強が見られ、投与後 5 日目には粘膜下および筋層の肥厚が顕著に見られるようになった。投与後 7 日目にはこのような組織像の変化は軽快していた。
2. CD11c 陽性の樹状細胞 (DCs) は投与後 1 日目から 3 日目にかけて増加し、以後漸減した。組織像が軽快する 7 日目には定常状態と同程度の割合に戻っていた。
3. CD11c+/B220+ plasmacytoid DCs (pDCs) は炎症の経過中にほとんど増減が見られなかったのに対して、CD11c+/B220- conventional DCs (cDCs) は TNBS 投与後 1 日目に著しく増加し、以後漸減した。
4. cDCs における PIR-A/B の発現を検討したところ、PIR-A/Bhigh、PIR-A/Bmed、PIR-A/B- の 3 つのサブセットに区分することができた。唯一 PIR-A/Bmed cDCs のみが、小腸炎の軽快に伴い増加していた。この小腸粘膜固有層由来 PIR-A/Bmed cDCs の動態は、小腸パイエル板や脾臓では見られなかった。なお、PIR-A/Bmed cDCs は CD103 陽性であった。
5. PIR-A/Bmed cDCs は、PIR-A/Bhigh cDCs や脾臓 cDCs と比較して CD86 が低発現であった。また CD54 は、PIR-A/Bhigh cDCs、PIR-A/B- cDCs や脾臓 cDCs と比較して PIR-A/Bmed cDCs では低発現であった。小腸 cDCs の各サブセットにおいて、CD40、CD83、CCR7 の発現の程度は、炎症の経過中に変化は見られなかった。
6. MLR において PIR-A/Bmed cDCs が、他の小腸 cDC サブセットや脾 DCs と比較して、抗原提示活性が明らかに低いことが示された。

7. real-time RT-PCR では、PIR-A/Bmed cDCs は PIR-A/Bhigh cDCs と比較し IL-10 が高値であった。また PIR-A/Bmed cDCs において IL-6 と IL-12 は低値であった。各サブセットを培養した上清のサイトカイン濃度についても、同様の傾向が得られた。

D. 考察

小腸粘膜固有層の PIR-A/Bmed cDCs は、TNBS 小腸炎終息の過程で重要な役割を担っている可能性がある。その機序としては、共刺激分子の低発現による effector T cells に対する anergy 誘導や、抑制性サイトカインの産生が関与していることが示唆される。またこのサブセットに関わる免疫機序は、新たな治療の標的となる可能性がある。

E. 結論

TNBS 小腸炎終息への関与が示唆される新たな樹状細胞サブセットを同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
1. 論文発表
- 1) Hoshino S, Inaba M, Iwai H, Ito T, Li M, Eric Gershwin M, Okazaki K, Ikehara S. The role of dendritic cell subsets in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis. J Autoimmun. 2009 Oct 29. [Epub ahead of print]
- 2) Matsushita M, Ando Y, Kawamata S, Omiya M, Uchida K, Nishio A, Okazaki K. Appendix in ulcerative colitis: significant involvement and pathogenesis. Gastrointest Endosc. 2009 Oct;70(4):821.
- 3) Matsushita M, Tanaka T, Omiya M, Okazaki K. Significant association of appendiceal neoplasms and ulcerative

colitis rather than Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2009 Aug 24.
[Epub ahead of print

- 4) Matsuzaki K, Kitano C, Murata M, Sekimoto G, Yoshida K, Uemura Y, Seki T, Taketani S, Fujisawa J, Okazaki K. Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF-beta signal in later stages of human colorectal cancer. Cancer Res. 2009 Jul 1;69(13):5321-30.
- 5) Ando Y, Matsushita M, Kawamata S, Shimatani M, Fujii T, Okazaki K. Infliximab for severe gastrointestinal bleeding in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2009 Mar;15(3):483-4

2. 学会発表

- 1) Hoshino S, Inaba M, Iwai H, Ito T, Li M, Eric Gershwin M, Okazaki K, Ikehara S: The role of dendritic cell subsets in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid induced colitis. 第39回日本免疫学会総会（大阪、2009年12月）

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
- 3) その他
なし

シクロスポリンによる TGF- β シグナルを介した腸上皮アポトーシスの制御

研究協力者 石黒 陽 弘前大学光学医療診療部 准教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎における Cyclosporin A (CsA) 強力静注療法が、早い効果発現と潰瘍病変の速やかな上皮化を誘導することが知られている。CsA 投与により腸管局所での TGF- β の発現が高まり、上皮細胞のアポトーシスの抑制を介した腸管粘膜障害が有意に抑制された。分離した腸管上皮細胞におけるアポトーシス関連蛋白の解析の結果、その抑制効果は、上皮細胞における TGF- β シグナルを介した cFLIP の発現増加と caspase-8 経路の活性化抑制を介していることが明らかとなった。

共同研究者

櫻庭裕丈¹、佐藤裕紀¹、平賀寛人¹、川口章吾¹、
福田真作¹、中根明夫²

1. 弘前大学医学部消化器・血液内科学講座
2. 弘前大学医学部感染生体防御医学講座

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) における粘膜障害発症のメカニズムは未だ解明されていない。腸管上皮細胞のアポトーシスによる細胞死の増加は粘膜バリア機能の低下をきたす重要な因子であると考えられる。このことに注目し我々はこれまで IBD のマウス実験腸炎モデルの一つである DSS 誘発大腸炎において、粘膜障害に先行して腸管上皮アポトーシス細胞数の増加を認めること、また抑制性サイトカインの一つである TGF- β をブロックすることで腸管上皮細胞アポトーシス促進を介した粘膜障害が早期に誘導されることを報告している¹⁾。一方、潰瘍性大腸炎における Cyclosporin A (CsA) 強力静注療法が、早い効果発現と潰瘍病変の速やかな上皮化を誘導することが知られている。CsA は TGF- β の発現誘導効果を有するという報告があり、その高い治療効果との関連性が示唆される。そこで CsA の腸管上皮細胞に対する効果に注目し、TGF- β の発現誘導と腸管上皮細胞のアポトーシス制御による粘膜障害抑制の効果の有無について DSS 誘発大腸炎モデルを用いて解析した。

B. 研究方法

マウス：C57BL/6 マウス (6-8 週、雌) を用いた。
腸炎誘発：4% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) (M. W. 5000, WAKO) を自由飲水させ腸炎を誘発。CsA 投与：DSS 飲水 1 日前からオリーブオイルに溶解した CsA を 20mg/kg で連日腹腔内へ投与。抗体投与：飲水開始と同時に抗 TGF- β 抗体 (2mg/mouse), control IgG (2mg/mouse) を腹腔内投与。病理組織学的評価：マウス腸管パラフィン切片の H. E 染色を行い、炎症細胞浸潤、びらん、杯細胞減少、腺管の減少、腸管壁の肥厚の 5 項目について、0-3 の 4 段階でスコア化した。アポトーシス細胞の検出：ApoTAQ kit を用い TUNEL 法により検出、腸管上皮の陽性細胞数をカウントし Apoptosis Index とした。腸管上皮細胞の分離：Mizoguchi らの報告に従い EDTA 環流法により腸管上皮細胞を分離。Western blot：分離した上皮より Protein extraction kit を用いて蛋白を分離。分離した蛋白を 20 μ g ずつ電気泳動後に PVDF メンブレンに転写。1 次抗体：抗 cFLIP 抗体、抗 Smad2 抗体、抗 p-Smad2 抗体 (rabbit polyclonal IgG, Upstate, 2000 倍)、2 次抗体：HRP 標識抗 rabbit-IgG 抗体 (goat polyclonal, ECL) を用いた。ELISA：分離した全腸管から蛋白を抽出し TGF- β ELISA 測定キット (Biorad) を用いて腸管局所の TGF- β 発現レベルの解析を行った。Caspase 活性測定：分離した腸管上皮細胞蛋白中の caspase-1, -8, -9 の活性を colorimetric assay

kit (BioVision)を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては弘前大学動物実験施設の承認を得かつ規則を遵守した。

C. 研究結果

体重減少：CsA 投与により DSS 腸炎による体重減少が有意に抑制された。組織学的評価：H.E 染色による病理組織学的評価においてコントロール群に比し CsA 投与群で粘膜障害の抑制効果を認めた。腸上皮アポトーシス：DSS 腸炎での粘膜障害は粘膜上皮のアポトーシス増加を介して誘導されるが、CsA 投与により腸上皮アポトーシス細胞数の増加が有意に抑制された。腸上皮 p-Smad2, FLIP の発現：Western blot による発現解析の結果コントロール群に比し CsA 投与群で DSS 投与 2 日目に有意な発現増加を認めた。Caspase 活性：コントロール群に比し CsA 投与群で caspase-8 の活性が有意に抑制された。TGF- β 発現誘導：コントロール群に比し CsA 投与群で DSS 投与 1-2 日目に腸管局所の TGF- β 発現増加を認めた。さらに抗 TGF- β 抗体投与で CsA による体重減少抑制効果が消失し、腸上皮アポトーシス増加とそれに続く粘膜障害の抑制効果も認めなかった。また腸上皮における CsA 投与による FLIP 発現増加も抑制された²⁾。

D. 考察

CsA 投与により腸管局所での TGF- β の発現が高まり、上皮細胞のアポトーシスの抑制を介した腸管粘膜障害が有意に抑制された。分離した腸管上皮細胞におけるアポトーシス関連蛋白の解析の結果、その抑制効果は、上皮細胞における TGF- β シグナルを介した cFLIP の発現増加と caspase-8 経路の活性化抑制を介していることが明らかとなった。CsA による TGF- β 発現増強と腸管上皮細胞のアポトーシス制御による粘膜障害抑制効果の機序が明らかとなった。

E. 結論

CsA による TGF- β 発現増強と腸管上皮細胞のアポ

トーシス制御による粘膜障害抑制効果の機序が明らかとなった。サイクロスポリンの効果発現機序解析により、潰瘍性大腸炎の病態・治療において TGF- β 関連シグナルが標的となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakuraba H, Ishiguro Y, Yamagata K, Munakata A, Nakane A. Blockade of TGF- β accelerates mucosal destruction through epithelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Aug 3;359(3):406-12.
- 2) Satoh Y, Ishiguro Y, Sakuraba H, Kawaguchi S, Hiraga H, Fukuda S, Nakane A. Cyclosporine regulates intestinal epithelial apoptosis via TGF- β -related signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009 Sep;297(3):G524-519.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他

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

クローン病の病態における制御性 B 細胞の機能解析

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：クローン病モデルマウス (SAMP1/Yit) の腸管自然免疫応答における制御性 B 細胞 (Breg) の機能解析をおこない、クローン病の病態との関連を考察した。マウス腸管の B 細胞には、CpG DNA や LPS などの自然免疫抗原に反応して interleukin (IL)-10 や transforming growth factor (TGF)-b1 を産生する Breg と考えられるサブセットが存在し、主に CD1d 陽性のポピュレーションに含まれていた。SAMP1/Yit マウスの腸管 B 細胞は CpG や LPS などの刺激に対して低応答性であり、IL-10 や TGF-b1 の産生量がコントロールマウス (AKR/J) の B 細胞に比べて有意に低値であった。さらに、CpG DNA 刺激下でマクロファージと共培養した実験では、SAMP1/Yit マウスの腸管 B 細胞との共培養時の IL-1b 産生量が有意に高値であることが明らかとなった。ヒト末梢血 B 細胞を用いた系でも、クローン病患者では CpG 刺激に対して IL-10 産生量が低値であり、マウスと同様の結果が得られた。以上のことから、クローン病の病態に Breg の機能異常が関与している可能性が示唆された。

共同研究者 三島義之、大嶋直樹、大谷 文、
岡 明彦、楠 龍策、多田育賢、森山一郎、Aziz
Monowar、木下芳一
所属 島根大学医学部内科学講座第二

A. 研究目的

H19-20 年度におこなった腸管自然免疫機構の研究成果に引き続いて、腸管 B 細胞の自然免疫応答に着目し、炎症性腸疾患 (IBD) の病態との関連を検討した。

クローン病モデルマウス SAMP1/Yit における制御性 B 細胞の解析

B 細胞は宿主の獲得免疫に深く関わっており、抗体産生や二次的な抗原提示細胞としての機能を有している。また、B 細胞は自己抗体産生などを介して病原性細胞として種々の免疫疾患の発症にも関与している。しかし、近年の研究によって、免疫や炎症を抑制する新規の B 細胞サブセットが存在すること

が明らかとなっている。このサブセットは interleukin (IL)-10 や transforming growth factor (TGF)-b1 を産生することで免疫制御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。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し、病態への関与について考察した。

B. C. 研究方法と結果

① マウスにおける制御性 B 細胞の同定と特異的表面マーカーの解析

マウス (BALV/c) の種々の臓器から B 細胞を分離し、自然免疫応答依存性に IL-10 や TGF-b1 を産生するサブセットが存在するかを特異的表面マーカーの解析を含めて検討した。BALV/c マウス腸管粘膜 (固有層)、腸間膜リンパ節、腹腔から酵素処理によって単核球分離をおこない、B220、IgM、IgD、CD5、CD1d、TLR4、TLR9 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。腹腔の B 細胞は IgD および CD5 陽性の B 細胞が多数を占

め、いわゆる B1 細胞由来であると考えられた。一方、腸管粘膜 (固有層)、腸間膜リンパ節の表面マーカーは、B2 細胞に由来するポピュレーションであった。各部位から磁気ビーズで分離した B 細胞を LPS および CpG DNA で刺激すると、培養上清中には IL-10 や TGF- β 1 が有意に産生され、Breg として機能するサブセットが存在することが示された。IL-10 産生 B 細胞の特異的表面マーカーを同定する目的で、細胞内の IL-10 を染色後に他の表面マーカーについて同時に FACS 解析をおこなうと、IL-10 産生 B 細胞は CD1d 陽性のポピュレーションに確認できたが、これまで報告のあった CD5 は特異的な表面マーカーとして断定できなかった。

② クロウン病モデルマウスの腸間膜リンパ節 B 細胞の自然免疫応答と

クロウン病モデルマウスである SAMPl/Yit マウスとその野生型である AKR/J 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、最初に B 細胞の表面マーカーを FACS で解析したが、B220、IgM、IgD、CD5、CD1d、TLR4、TLR9 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 と TGF- β 1 産生を EIA および、real-time PCR 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 SAMPl/Yit マウスで有意に低いことが明らかとなった。SAMPl/Yit の腸間膜 B 細胞の低応答性は、5 週齢の腸炎発症以前にも確認された。

③ マウス腸間膜リンパ節 B 細胞の機能解析

Breg はマクロファージなどから産生される炎症性サイトカインを抑制することが報告されている。今回、SAMPl/Yit と AKR/J マウスの各々の腸管膜リンパ節から分離した B 細胞を、腹腔マクロファージと共培養し、CpG DNA 刺激下での IL-1 β 産生に及ぼす影響を検討した。本実験では SAMPl/Yit マウスの腸管 B 細胞との共培養時に IL-1 β 産生量が有意に高値であることが明らかとなった。

④ IBD 患者の末梢血 B 細胞の自然免疫応答時の IL-10 産生に関する検討

マウスの実験結果を踏まえ、ヒト IBD 患者の末梢血 B 細胞の CpG DNA 刺激時の IL-10 産生能を健常人と比較した。クローン病 20 人、潰瘍性大腸炎 20 人、健常人 20 人から末梢血 B 細胞を分離して CpG DNA 刺激後 72 時間で IL-10 を EIA で測定した。IL-10 産生は、クローン病と潰瘍性大腸炎患者のいずれの群も健常人に比べて低値であったが、特にクローン病では顕著で有意な結果であった。

(倫理面への配慮)

動物実験およびヒト末梢血を用いた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および倫理委員会の承認を得た。

D. 考察

マウス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 が存在することが示された。表面マーカー解析では、CD1d 陽性のポピュレーションに Breg が存在することが明らかとなったが、CD5 など過去に特異的マーカーとして報告されていた分子によって Breg を規定することは現時点では困難であった。近年の論文報告を参照しても Breg 特異的マーカーは同定されておらず、今後の詳細な検討が必要と考えられた。

クロウン病モデルマウスである SAMPl/Yit マウスの腸間膜 B 細胞が 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新規の知見が得られた。特に、腸炎発症以前の 5 週齢のマウスの B 細胞にも低い IL-10 産生能が確認できたことは興味深く、疾患発症との関連を解明すべく、新規の動物実験を遂行中である。また、ヒトのクローン病の B 細胞でも同様の結果が得られたが、現時点では症例数が少なく、また、腸管局所の B 細胞を用いた実験の追加など、今後の更なる検討が必要と考えている。

E. 結論

腸管 (マウス) に IL-10 や TGF- β 1 を産生する Breg が存在することが明らかとなった。クローン病の病態に Breg の自然免疫応答の異常 (低応答性) が関与する可能性が示唆された。本研究の成果は英文誌へ投稿中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oshima N, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Mishima Y, Kadota C, Moriyama I, Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y: A20 is an early responding negative regulator of Toll-like receptor 5 signalling in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clin Exp Immunol* 159: 185-98, 2010.
 - 2) Ishihara S, Aziz MM, Yuki T, Kazumori H, Kinoshita Y: Inflammatory bowel disease: review from the aspect of genetics. *J Gastroenterol* 44:1097-108, 2009.
 - 3) Aziz MM, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, Kadowaki Y, Rumi MA, Amano Y, Kinoshita Y. MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent alphavbeta3 integrin signaling. *J Immunol* 182: 7222-32, 2009.
 - 4) Mishima Y, 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. *Scand J Gastroenterol* 44: 172-9, 2009.
 - 5) 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* 2 : 9-16, 2009.
2. 学会発表
- 1) Mishima Y, Ishihara S, Aziz M, Oshima N, Otani A, Oka A, Kusunoki R, Moriyama I, Amano Y, Kinoshita Y: Decreased production of IL-10 and TGF- β in TLR-activated intestinal B cells in SAMP1/Yit mice. Digestive Disease Week 2009, Chicago, USA, 2009. 6. (抄録のみ)

- 2) Otani A, Ishihara S, Aziz MM, Mishima Y, Oshima N, Kadota C, Oka A, Kusunoki R, Moriyama I, Amano Y, Kinoshita Y: Intrarectal administration of MFG-E8 protein ameliorates murine experimental colitis by inhibiting NF- κ B activation in intestinal epithelial cells. Digestive Disease Week 2008, San Diego, USA, 2008. 5. (抄録のみ)
- 3) Ishihara S, Aziz M, Mishima Y, Oshima N, Otani A, Oka A, Kusunoki R, Moriyama I, Ishimura M, Li YY, Amano Y, Kinoshita Y: Crosstalk between Notch and toll signaling in murine colitis. Digestive Disease Week 2008, San Diego, USA, 2008. 5. (抄録のみ)
- 4) 三島義之, 石原俊治, 楠 龍策、岡 明彦, 大谷文, 大嶋直樹, 森山一郎, 天野祐二, 木下芳一: クローン病モデルマウスにおける IL-10 産生 B 細胞に関する検討 第 95 回日本消化器病学会総会, 札幌, 2009. 5.
- 5) 大谷 文, 石原俊治, 大嶋直樹, 三島義之、岡 明彦、楠 龍策、森山一郎、天野祐二、木下芳一: 精製 MFG-E8 蛋白の経肛門的投与による実験腸炎抑制の試み 第 95 回日本消化器病学会総会, 札幌, 2009. 5.
- 6) 三島義之, 石原俊治, 木下芳一: クローン病モデルマウスにおける IL-10 産生腸管制御性 B 細胞に関する検討 第 51 回日本消化器病学会大会, 京都, 2009. 10.

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

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

NF- κ B を介した MAdCAM-1 制御機構における Angiotensin II type 1 receptor の役割

研究協力者 城 卓志 名古屋市立大学大学院消化器代謝内科学 教授

研究要旨：炎症性腸疾患 (IBD) においては、MAdCAM-1 などの接着因子がその病態に関与していると考えられている。また、レニンアンジオテンシンシステム (RAS) が IBD の発症・進展に重要な役割を担うことが報告されている。われわれは 1 型アンジオテンシン II 受容体 (AT1R) を介する MAdCAM-1 の制御メカニズムを、血管内皮細胞およびマウス実験腸炎モデルを用いて検証した。AT1R は NF- κ B を介して MAdCAM-1 の発現を制御しており、AT1R の制御によりマウス腸炎が抑制されることが示された。

共同研究者

水島隆史、溝下勤、谷田諭史

所属：名古屋市立大学大学院 消化器代謝内科学

佐々木誠人

所属：愛知医科大学 消化器内科

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) においては、ICAM-1、VCAM-1 および MAdCAM-1 などの接着因子がその病態に関与していると考えられており、なかでも MAdCAM-1 は IBD の発症・進展に重大な役割を担い、その発現調節は炎症性腸疾患の治療に有効であると考えられている。実際、近年では MAdCAM-1 のリガンドである $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンに対する抗体療法が注目されている。

一方、アンジオテンシン II は血管内皮において、炎症性サイトカインの発現や酸化ストレスにより炎症を惹起する。アンジオテンシン II レセプターブロッカー (ARB) は動脈硬化の抑制ならびに心血管イベントの派生を抑制することが報告されている。また、IBD においてもレニンアンジオテンシンシステム (RAS) がその発症・進展に重要な役割を担うことが報告されている。

そこで今回、われわれは 1 型アンジオテンシン II 受容体 (AT1R) を介する MAdCAM-1 の制御メカニズムを検討し、新たな腸炎治療のターゲットとな

り得るかを血管内皮細胞およびマウス実験腸炎モデルを用いて検証した。

B. 研究方法

マウス腋窩リンパ節由来血管内皮細胞 (SVEC)、およびマウス大腸由来血管内皮細胞 (MJC-1) を用い、TNF- α 刺激下で AT1R が MAdCAM-1 の発現を調節するメカニズムにつき検討した。はじめに、ARB である candesartan 投与下での TNF- α 刺激による MAdCAM-1 の発現を検討した。また AT1R 遺伝子をノックダウンし、TNF- α 刺激による MAdCAM-1 の発現を検討した。つぎに、TNF- α 刺激による p38 MAPK、I κ B のリン酸化および I κ B の分解に及ぼす candesartan の影響を検討した。さらに、核内での NF- κ B 活性、発現および NF- κ B の細胞内局在を検討した。

つぎに、AT1R ノックアウトが腸炎に及ぼす影響を、マウス DSS 腸炎モデルをもちいて検証した。腸炎の臨床活動度の指標として Disease activity index (DAI) を用いた。また、HE 染色を用いて組織学的に解析を行った。炎症の程度は、inflammation score および crypt damage score を用いてスコア化して評価した。つぎに、Th1 サイトカインである TNF- α 、およびケモカインである MCP-1 の大腸における発現を検討した。また、大腸における MAdCAM-1 の発現につき検討した。

さらに、ARB (candesartan) をマウスに投与し、腸炎抑制効果を DAI および体重減少の割合にて比較検討した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

TNF- α 刺激によって誘導される MAdCAM-1 の発現は、candesartan によってタンパクおよび mRNA レベルで著明に抑制されていた。また、TNF- α 刺激によって誘導される MAdCAM-1 のタンパク発現は AT1R 遺伝子をノックダウンすることで有意に抑制された。次に、AT1R が MAdCAM-1 の発現を制御するメカニズムを検討した。まず p38 MAPK および I κ B のリン酸化、また I κ B の分解について検討したが、それらは candesartan による影響を受けていなかった。次に、NF- κ B の核内移行に関して検討をおこなった。NF- κ B p65 は TNF- α 刺激によって細胞質から核内に移行するが、candesartan によって NF- κ B の核内移動が著明に抑制されていることが確認された。以上の結果より、血管内皮細胞において、candesartan は AT1R を介して NF- κ B の核内移行を抑制することで、TNF- α 刺激によって誘導される MAdCAM-1 の発現を制御していると考えられた。

つぎに、AT1R ノックアウトが DSS 腸炎に及ぼす影響を検証し、腸炎における AT1R の役割につき検討した。DSS 投与群では腸炎の進展とともに体重は減少し DAI は上昇したが、それらの変化は AT1R $^{-/-}$ DSS 群では wild DSS 群に比して有意に抑制されていた。HE 染色を用いた病理組織学的解析では wild DSS 群では著明な炎症細胞浸潤、上皮の脱落、crypt の消失が認められたが、それらの変化は AT1R $^{-/-}$ DSS 群では有意に抑制されており、また inflammation score および crypt damage score は、AT1R $^{-/-}$ DSS 群では wild DSS 群に比して有意に低値であった。大腸における TNF- α 、MCP-1 の mRNA 発現は AT1R $^{-/-}$ DSS 群では、wild DSS 群に比して有意に低下していた。大腸での MAdCAM-1 の発現は AT1R $^{-/-}$ DSS 群では有意に抑制

されていた。

さらに、ARB (candesartan) を実際に投与した実験では、candesartan 投与群では非投与群に比して体重減少や DAI の上昇が有意に抑制されていた。以上の結果より、AT1R の制御によりマウス腸炎が抑制されることが示された。

D. 考察

AT1R は NF- κ B を介して MAdCAM-1 の発現を制御しており、AT1R の制御によりマウス腸炎が抑制されることが示された。

E. 結論

AT1R は NF- κ B、MAdCAM-1 を介した腸炎メカニズムに関与しており、AT1R の制御により、マウス腸炎が抑制されることが示された。これにより、AT1R の制御が、MAdCAM-1 を介した新たな腸炎治療のターゲットになり得る可能性が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mizushima T, Sasaki M, Ando T, Wada T, Tanaka M, Okamoto Y, Ebi M, Hirata Y, Murakami K, Mizoshita T, Shimura T, Kubota E, Ogasawara N, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, JS Alexander, Joh T; Blockage of Angiotensin II type 1 receptor regulates TNF- α induced MAdCAM-1 expression via inhibition of NF- κ B translocation to the nucleus and ameliorates colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, in press

2. 学会発表

- 1) Mizushima T, Sasaki M, Ando T, Wada T, Tanaka M, Okamoto Y, Ebi M, Hirata Y, Murakami K, Mizoshita T, Shimura T, Kubota E, Tanida S, Kataoka H, Kamiya T, JS Alexander, Kasugai

K, Joh T : Blockage of Angiotensin II type 1 receptor regulates MAdCAM-1 expression via inhibition of NF- κ B translocation to the nucleus and ameliorates colitis. The 4th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium, Prince Hotel Shinagawa Annex Tower, 2010/01/23

- 2) 水島隆史, 佐々木誠人, 和田恒哉, 安藤朝章, 田中守, 岡本泰幸, 海老正秀, 平田慶和, 村上賢治, 溝下勤, 志村貴也, 久保田英嗣, 小笠原尚高, 谷田諭史, 片岡洋望, 神谷武, JS Alexander, 城卓志 : マウス大腸血管内皮細胞における1型アンジオテンシンII受容体を介した接着因子MAdCAM-1の発現調節. 第5回消化管学会総会, 新宿京王プラザホテル, 2009年2月12日
- 3) 水島隆史, 佐々木誠人, 和田恒哉, 安藤朝章, 田中守, 岡本泰幸, 海老正秀, 平田慶和, 村上賢治, 溝下勤, 志村貴也, 久保田英嗣, 小笠原尚高, 谷田諭史, 片岡洋望, 神谷武, JS Alexander, 城卓志 : 1型アンジオテンシンII受容体を介した接着因子MAdCAM-1の発現調節メカニズムの解明 - 腸炎への治療応用を目指して-. 第95回消化器病学会総会, ロイトン札幌, 2009年5月8日
- 4) 水島隆史, 佐々木誠人, 安藤朝章, 田中守, 岡本泰幸, 小林郁生, 海老正秀, 平田慶和, 村上賢治, 溝下勤, 志村貴也, 久保田英嗣, 和田恒哉, 小笠原尚高, 谷田諭史, 片岡洋望, 神谷武, JS Alexander, 城卓志 : マウス大腸血管内皮細胞における1型アンジオテンシンII受容体を介した接着因子MAdCAM-1の発現調節-腸炎への治療応用を目指して-. 第46回日本消化器免疫病学会総会, 松山ワシントンホテル, 2009年7月23日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

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

自然免疫系による慢性炎症性腸疾患の制御機構に関する研究

研究協力者 竹田 潔 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：これまでの解析で、自然免疫系の異常活性化がT細胞依存性の炎症性腸疾患の発症を導くことを明らかにしてきた。さらに、腸管炎症を導く Th17 細胞の分化に関わる腸管に特有の樹状細胞として CD70high 樹状細胞を同定し、この樹状細胞が腸内細菌由来のアデノシン3リン酸(ATP)により活性化されることを見出した。そこで、Th17 細胞分化の誘導に関わる腸内細菌を無菌マウスに特定の腸内細菌を定着させるノトバイオートマウスを用いて解析した。その結果、小腸では Segmented Filamentous Bacteria 単独で Th17 細胞を誘導できることが明らかになった。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される慢性炎症性腸疾患は、現在その病因・病態が明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない難治性の疾患であり、その病因・病態の解明、さらにその治療法の確立が待ち望まれている。

申請者は、自然免疫担当細胞において IL-10 のシグナル伝達に Stat3 が必須であることを見出し、Stat3 を自然免疫担当細胞特異的に欠損させると、自然免疫担当細胞が異常に活性化され、IL-10 欠損マウスと同様に Th1 細胞依存性の慢性腸炎を発症することを見出した。

そこで、炎症性腸疾患の発症機序を、自然免疫系を標的にして解析し、さらにその活性制御機構を解析し、その病態の解明、さらに自然免疫系を標的とした新たな治療法の開発の基礎的基盤を提供することを目的とする。

B. 研究方法

昨年度までに、腸管炎症の誘導に深く関与する Th17 細胞の分化誘導を、腸管に特有の CD70high 樹状細胞が腸内細菌由来のアデノシン3リン酸依存性に制御していることを明らかにした。そこで、腸管の Th17 細胞分化に関わる腸内細菌を同定する目的で、germ free マウスに Segmented Filamentous Bacteria, Bacteroides spp.

Clostridium spp. などの特定の腸内細菌を定着させ、3週間後に腸管の Th17 細胞の数を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

germ free マウスに特定の腸内細菌を定着させるノトバイオートマウスの実験を行った。その結果、大腸では、各腸内細菌の定着により ATP 濃度上昇や Th17 細胞の増加がそれほど有意には認められなかった、しかし、小腸を解析すると Segmented Filamentous Bacteria を定着させたマウスで、小腸の Th17 細胞の数が SPF マウスの糞便を飲ませたマウスと同程度に増加した。

D. 考察

慢性炎症性腸疾患と深く関わる新たなヘルパー T 細胞サブセット Th17 細胞が、腸管粘膜固有層に多数存在しているが、これは腸管粘膜固有層に局在しているユニークな樹状細胞が Th17 細胞分化を

常在菌依存性に誘導するためであること、小腸では単一の腸内細菌により Th17 細胞の分化が誘導されることが明らかになった。

E. 結論

慢性炎症性腸疾患と深く関わる Th17 細胞が、腸管粘膜固有層に局在するユニークな樹状細胞サブセットにより、常在菌依存性に誘導されることが明らかになった。また、単一の腸内細菌により Th17 細胞の分化が誘導しうることも明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto M, Standley DM, Takashima S, Saiga H, Okuyama M, Kayama H, Kubo E, Ito H, Takaura M, Matsuda T, Soldati-Farve D and Takeda K.: A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J. Exp. Med.* 206, 2747-2760 (2009).
- 2) Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch S V, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K., Umesaki Y, Honda K, Littman D R :Induction of Intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139, 485-498 (2009).
- 3) Pejnovic N, Vratimos A, Lee SH, Popadic D, Takeda K., Akira S and Chan WL : Increased atherosclerotic lesions and Th17 in interleukin -18 deficient apolipoprotein E-knockout mice fed high -fat diet. *Mol Immunol.* 47, 37-45 (2009).
- 4) Miyazato A, Nakamura K, Yamamoto N, Mora-Montes HN, Tanaka M, Abe Y, Tanno D, Inden K, Gang X, Ishii K, Takeda K., Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, Mitsutake K, Gowm NAR, Kaku M and Kawakami K. : Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infect Immun.* 77, 3056-3064 (2009).
- 5) Kayama H, Koga R, Atarashi K, Mak TW, Takayanagi H, Honda K, Yamamoto M and Takeda K.: NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Pathogens* 5, e1000514 (2009).
- 6) Yamasaki S, Matsumoto M, Takeuchi O, Matsuzawa T, Ishikawa E, Sakuma M, Takeno H, Uno J, Hirabayashi J, Mikami Y, Takeda K., Akira S and Saito T. : C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 1897-902 (2009).
- 7) Morishita H, Saito F, Kayama H, Atarashi K, Kuwata H, Yamamoto M, and Takeda K. : Fra-1 negatively regulates lipopolysaccharide-mediated inflammatory responses. *Int. Immunol.* 21, 457-465 (2009).
- 8) Haga S, Ozaki M, Inoue H, Okamoto Y, Ogawa W, Takeda K., Akira S and Todo S : The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 49, 204-214 (2009).

2. 学会発表

- 1) Kiyoshi Takeda :Innate immune responses at the intestinal mucosa. The first CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, Shanghai, China 2009.11.7-8
- 2) Kiyoshi Takeda Innate immune responses at the intestinal mucosa. The 2009 Fall

Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul, Korea 2009.11.9-10

- 3) Kiyoshi Takeda ATP from commensal bacteria induces Th17 cell development in the intestine. Regulation of innate immunity, Seoul, Korea 2009.9.17-18
- 4) 竹田潔 腸管粘膜に特有の自然免疫系細胞の機能 第39回日本免疫学会学術集会、大阪 2009.12.2-4
- 5) 竹田潔 自然免疫系の活性制御と免疫疾患（特別講演）第51回日本小児血液学，東京 2009.11.27-29
- 6) Kiyoshi Takeda Commensal bacteria-derived ATP mediates development of intestinal Th17 cells. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2009、横浜 2009.7.9-10

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

特願 2009-241034, T細胞活性化を抑制する腸粘膜特有のミエロイド細胞およびその利用, 平成 21年10月20日

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

クローン病におけるオートタクシンの関与

研究協力者 三浦 総一郎 防衛医科大学校病院内科学 教授

研究要旨： Crohn 病にて当科受診中の患者で、通常内視鏡検査の際に活動性および非活動性の部位から生検採取し、オートタクシン (ATX) の組織中 mRNA 発現を Real Time PCR を用いて定量解析した。ATX の発現量は、非活動部の組織と比較して有意に高値を示し、ATX の Crohn 病との関連が示唆された。

共同研究者

八月朔日英明、穂苅量太

に変化し、MAdCAM-1 などの接着分子が異所性に発現するが、ここに ATX が発現しリンパ球 migration に関与するものと考えられる。

A. 研究目的

脂質メディエーターのひとつであるリゾフォスファチジン酸、およびその産生酵素であるオートタクシン (ATX) は、リンパ球の 2 次リンパ組織への migration への関与が報告されているが、Crohn 病の病変粘膜における migration の関与は報告されていない。今回我々は、Crohn 病患者における ATX 発現を評価し、その病態との関連を検討した。

E. 結論

Crohn 病における異常なリンパ球 migration に ATX 発現が関連しており、新たな治療ターゲットとなる可能性があると考えられる。

B. 研究方法

Crohn 病にて当科受診中の患者で、通常内視鏡検査の際に活動性および非活動性の部位から生検採取し、ATX の組織中 mRNA 発現を Real Time PCR を用いて定量解析した。

(倫理面への配慮)

防衛医大倫理委員会承認済み (No 725 平成 22 年 1 月 7 日)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

C. 研究結果

ATX の発現量は、非活動部の組織と比較して有意に高値を示した。また、同一患者内の比較においても、活動部の ATX 発現は非活動部より有意に高値を示した。

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

D. 考察

Crohn 病の病変粘膜では静脈が HEV-like vessel

プロテオーム解析を用いた炎症性腸疾患のバイオマーカー探索

研究分担者 坪内 博仁 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 教授

研究要旨：患者血清・血漿を用いたプロテオーム解析は、網羅的かつ迅速な蛋白濃度の測定が可能であり、疾患の病態解明や診断マーカーに有用な蛋白質を同定できる。本研究ではプロテオーム解析装置を用いて、好中球ペプチド (human neutrophil peptide 1-3 ; HNP 1-3) が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。HNP1-3 をマウス実験腸炎モデルに投与したところ、腸管からの炎症性サイトカイン分泌が亢進し、腸管炎症を悪化させた。また、大腸上皮細胞株に HNP1-3 を添加すると、IL-8 の産生亢進が認められた。以上の結果から、好中球から分泌される HNP1-3 が潰瘍性大腸炎の病態形成に密接に関連している可能性が考えられた。

共同研究者

上村修司、崑山敏男、橋元慎一、指宿和成、岩下祐司、宇都浩文

所属：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

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ている。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) と健常人の血清・血漿中の蛋白質発現を Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI) プロテインチップシステムを

用いて網羅的に解析した。

2) HNP1-3 血中濃度の測定

HNP1-3 の血中濃度を ELISA 法により測定し、UC、CD と健常人の血液中の HNP1-3 濃度を比較した。

3) 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作製し、DSS 自由飲水 4 日目から HNP1-3 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。また、腸組織を採取し、24 時間無血清培地で培養した後、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定した。

4) HNP の腸管上皮細胞への影響の検討

大腸上皮細胞株である HT-29 の培養液に HNP1-3 を添加し、サイトカイン関連遺伝子発現をマイクロアレイ法及び定量的 RT-PCR で検討した。さらに培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法で測定した。
(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成し、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:静脈穿刺は侵襲性はほとんどなく、被験者に不当な危険が生じることはほとんどない。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) 血清・血漿プロテオーム解析

SELDI プロテインチップシステムによる UC 群と健常者群との比較検討では、低分子領域に有意差 ($p < 0.05$) のあるタンパク質 27 個が検出された。このうち UC 群で高値であった約 3400m/z 付近の 3 個のピークを分子量から HNP1-3 と推定し、抗 HNP1-3 抗体を用いた免疫沈降反応から目的ピークを HNP1-3 と確定した。

2) HNP1-3 血中濃度の測定

平均 HNP1-3 血中濃度は UC 群で、CD 群、健常人群よりも有意に高値であった。また、HNP1-3 は、緩解期 UC より活動性 UC で高濃度を示し、UC の活動性マーカーとなる可能性が示唆された。さらに、UC 群における治療前の HNP1-3 濃度は、治療抵抗群より奏功群で有意に高値を示し、治療奏功群の HNP1-3 濃度は、治療により低下する傾向であった。

3) HNP1-3 の腸管炎症への影響の検討

HNP1-3 を投与した 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。また、腸管組織からの TNF α 、IFN γ の分泌も HNP1-3 投与群で有意に高値であった。

4) HNP1-3 の腸管上皮細胞への影響の検討

HNP1-3 を添加した HT-29 ではサイトカイン関連遺伝子のうち、IL-8 遺伝子の発現亢進が顕著であった。HT-29 培養上清中の IL-8 濃度は HNP1-3 添加により濃度依存的に上昇した。

D. 考察

血液中 HNP1-3 は UC の診断、活動性および治療効果予測に有用なマーカーである可能性が示唆された。UC の腸管には高度の好中球浸潤がみられるが、DSS 腸炎マウスへの HNP 投与実験の結果は好中球から分泌される過剰な HNP1-3 が腸管からの炎症性サイトカインの分泌を亢進させ、腸管炎症を悪化させる可能性を示した。また、細胞株を用いた研究結果では、HNP1-3 が上皮細胞からの IL-8 産生を亢進させ、好中球の更なる局所浸潤および活性化を誘導する可能性が考えられた。本研究の結果から、プロテオーム解析による炎症性腸疾患の患者血液の網羅的タンパク質発現解析は炎症性腸疾患の診断バイオマーカー探索に有用であるだけでなく、病態進展に関わる分子を同定できることで、病態解明・治療薬開発につながる可能性があると思われた。

E. 結論

HNP1-3 は UC の診断、活動性評価や治療効果予測に有用なバイオマーカーと考えられた。また、UC の病態形成に関与していると考えられ、治療対象となりうる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanmura 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*, 15, 909-917, 2009

2) Sakiyama T, Musch MW, Ropeleski MJ, Tsubouchi H, Chang EB: Glutamine increases autophagy under basal and stressed conditions in intestinal epithelial cells.

Gastroenterology, 136, 924-932, 2009

3) 上村修司、宇都浩文、坪内博仁：プロテオーム解析からの治療戦略とは？ 分子消化器病、6、123-127、2009

2. 学会発表

1) Hashimoto S, Uto H, Kanmura S, Oku M, Tanoue S, Nasu Y, Sasaki F, Moriuchi A, Fujita H, Hasegawa S, Yamamoto T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Human neutrophil peptide-1 has cytotoxic effects on colon cancer cells and aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis. Digestive Disease Week 2009 Chicago (USA) 2009/5/30

2) Sakiyama T, Musch MW, Tsubouchi H, Chang EB: Polyamines mediate glutamine-dependent induction of the intestinal epithelial heat shock response. Digestive Disease Week 2009 Chicago (USA) 2009/5/30

3) Kanmura S, Sakiyama T, Morinaga Y, Sasaki F, Ibusuki K, Setoyama H, Funakawa K, Uto H, Ido A, Tsubouchi H: Human neutrophil peptides 1-3 induce IL-8 and VEGF in intestinal epithelial cells. The 4th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium 東京 2010/1/23

4) 上村修司、宇都浩文、佐々木文郷、橋元慎一、瀬戸山仁、船川慶太、寄山敏男、井戸章雄、坪内博仁：腸管上皮細胞のサイトカイン発現における Human Neutrophil Peptide 1-3 の作用 第46回日本消化器免疫学会総会 松山 2009/7/3

5) 橋元慎一、宇都浩文、上村修司、佐々木文郷、屋万栄、田ノ上史郎、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：潰瘍性大腸炎患者血清中に上昇する Human Neutrophil Peptide (HNP)-1 の病態への関与 第95回日本消化器病学会総会 札幌 2009/5/7

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

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

糖鎖解析に基づいた炎症性腸疾患新規バイオマーカーの開発

研究協力者 飯島 英樹 大阪大学消化器内科学 助教

研究要旨：炎症性腸疾患患者の血清 I g G の糖鎖は顕著にガラクトースの欠損が見られる。IgG 糖鎖のガラクトース欠損は、炎症性腸疾患の診断マーカーとして有用であり、さらに疾患活動性、治療予後予測に有用なバイオマーカーであると考えられた。

共同研究者：新崎信一郎*[§]、黒木絵莉[§]、向井章*、井上隆弘*、中島佐知子*、柄川悟志*、考藤達哉*、三善英知[§]、和田芳直[#]、辻井正彦*、林紀夫*
大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学*、大阪大学保健学科機能診断科学[§]、大阪府立母子保健センター[#]

A. 研究目的

炎症性腸疾患患者で見られる I g G 糖鎖異常の病態における意義、バイオマーカーとしての有用性を明らかにすること。

B. 研究方法

- ①ガラクトシルトランスフェラーゼ(GalT)欠損マウスに対し、既法に基づきDSS腸炎を発症させ腸炎の重症度を組織学的、免疫学的に解析した。
- ②クローン病患者において、血清 I g G のガラクトース欠損の程度(G0F/G2F)と Infiximab の長期治療効果との相関を解析した。
(倫理面への配慮)
検体提供にあたってはインフォームドコンセントを得た上で、研究を施行した。

C. 研究結果

- ①GalT 欠損マウスでは、野生型マウスに比して、体重減少、大腸の肉眼的、組織学的変化が軽度であり、腸炎の抑制効果が明らかとなった。
- ②Infiximab を維持投与されるクローン病患者の投与前および6週後にG0F/G2Fが著明に低下する患者群において30週の長期に

Infiximab の効果が維持できる傾向にあった。

D. 考察

血清 IgG のガラクトース欠損が、炎症性腸疾患の発症、増悪に関わる因子であることを想定し、実験を開始したが、マウスの検討ではむしろ炎症の改善効果が示された。ヒトでの検討において、我々が以前より報告している炎症性腸疾患の診断マーカーとしての有用性だけでなく、G0F/G2F を経時的に測定することにより治療効果予測に寄与する可能性が示唆された。

E. 結論

炎症性腸疾患における糖鎖異常は、診断マーカーとして有用であるばかりでなく、免疫病態の節にも関わるバイオマーカーであ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

- 1) 林 義人 西田勉, 近藤 純平, 山本 克己, 飯島 英樹, 筒井 秀作, 平松 直樹, 辻井 正彦, 辻 晋吾, 伊藤 裕章, 竹原 徹郎, 林 紀夫
Crohn 病に合併した原発不明腺癌に対して mFOLFOX6 療法が奏功した 1 例. 日本消化器病学会雑誌. 2009;106 (1):69-76.
- 2) T. Mizushima, K. Nakajima, Y. Kai, H. Iijima, H. Yamamoto, M. Ikeda, I. Takemasa, N. Haraguchi, M. Sekimoto, T. Nishida, R. Nezu, T. Ito, Y. Doki, Mori M. Malignancy in