

Crohn's disease: Incidence and Clinical Characteristics in Japan. Digestion. In press.

- 3) Serada S, Fujimoto M, Ogata A, Terabe F, Hirano T, Iijima H, Shinzaki S, Nishikawa T, Ohkawara T, Iwahori K, Ohguro N, Kishimoto T, Naka T. iTRAQ-based proteomic identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. Ann Rheum Dis. In press.

2. 学会発表

- 1) 中島佐知子、飯島英樹、井上隆弘、新崎信一郎、柄川悟志、林義人、近藤純平、石井修二、西田勉、筒井秀作、辻井正彦、林紀夫. 炎症性腸疾患患者における低カルボキシ化オステオカルシン(ucOC)の骨密度および疾患活動性との相関 第95回日本消化器病学会札幌 2009/5/7-9
- 2) 新崎信一郎、飯島英樹、井上隆弘、中島佐知子、柄川悟志、石井修二、考藤達哉、三善英知、辻井正彦、林紀夫. 炎症性腸疾患におけるIgG糖鎖異常-ガラクトース転移酵素欠損マウスを用いた解析 第95回日本消化器病学会札幌 2009/5/7-9
- 3) 飯島英樹、新崎信一郎、黒木絵莉、柄川悟志、中島佐知子、井上隆弘、向井章、考藤達哉、三善英知、辻井正彦、林紀夫. 炎症性腸疾患患者の診断および治療に対するIgG糖鎖構造解析の有用性 第46回消化器免疫学会 松山 2009/7/24
- 4) 中島佐知子、飯島英樹、林紀夫. クロウン病における成分栄養療法とビタミンK充足状態が骨密度および疾患活動性に及ぼす影響について JDDW 2009 (消化吸収学会) 京都 2009/10/14-17
- 5) 新崎信一郎、飯島英樹、柄川悟志、中島佐知子、井上隆弘、考藤達哉、三善英知、辻井正彦、林紀夫. グライコミクスを用いた炎症性腸疾患診断・治療の可能性 JDDW 2009 (消化器病学会) 京都 2009/10/14-17
- 6) 新崎信一郎 黒木絵莉、竜中法佳、飯島英樹、三善英知. 炎症性腸疾患におけるIgG糖鎖異常血清学的マーカーとしての有用性に関する検

討. 日本臨床検査医学会 札幌. 2009年8月30日

- 7) S. Shinzaki, H. Iijima, S. Egawa, S. Nakajima, T. Inoue, Y. Jin, Y. Hayashi, J. Kondo, S. Ishii, T. Nishida, T. Kanto, E. Miyoshi, M. Tsujii, N. Hayashi. Deficiency of Galactosyltransferase, Indispensable Enzyme for IgG Galactosylation, Ameliorates Murine Dextran Induced Colitis 米国 DDW May 30-June 4, 2009 Chicago, USA
- 8) S. Nakajima, H. Iijima, T. Inoue, S. Shinzaki, S. Egawa, Y. Hayashi, J. Kondo, S. Ishii, T. Yoshio, K. Watabe, T. Nishida, M. Tsujii, S. Tsutsui, N. Hayashi. Correlation Between Vitamin K Deficiency and Clinical Activity Index in Patients with Inflammatory Bowel Disease. 米国 DDW May 30-June 4, 2009 Chicago, USA
- 9) H. Iijima, S. Nakajima, S. Shinzaki, S. Egawa, T. Inoue, Y. Hayashi, J. Kondo, S. Ishii, T. Yoshio, T. Nishida, T. Kanto, E. Miyoshi, M. Tsujii, N. Hayashi. Oligosaccharide Alterations in IgG in Inflammatory Bowel Disease Is Not Associated with MBL Lectin Complement Pathway But with Enhancement of Antibody-Dependent Phagocytosis 米国 DDW May 30-June 4, 2009 Chicago, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「IgAヒンジ部O結合型糖鎖構造に基づく疾患の判定方法」特願2009-281519 2009.12.11出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

炎症性腸疾患における 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発現変動蛋白の一つとして抗酸化蛋白質 Peroxiredoxin-6 (Prx6) の発現低下を同定した。大腸粘膜上皮に発現する Prx6 の役割として組織恒常性維持・粘膜損傷治癒に関与することを明らかにした。さらに、ヒト潰瘍性大腸炎・クローン病の炎症粘膜においても Prx6 の顕著な発現低下を確認し、緩解期粘膜において Prx6 発現が回復することを示し、腸管炎症病態に重要な蛋白であるばかりでなく、バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

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 講師)
内山和彦(京都府立医科大学医学部消化器内科 助教)

A. 研究目的

我々は原因が未だ明らかでは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。これまでに、我々は、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。

本研究においては、この同定蛋白質の一つである抗酸化蛋白質 Peroxiredoxin-6 (Prx6) に着目し、解析を行った。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による組織保護作用の低下という側面から考えると非常に重要である。本研究では、まず、腸管粘膜における Prx6 の局在を確認し、その役割の詳細を明らかにした。さらに、ヒト潰瘍性大腸炎・クローン病の炎症粘膜における Prx6 の発現を確認し、病態機序解明の一助とするとともに、新規疾患 (病勢) マーカーとしての可能性を検討した。

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一つに炎症大腸粘膜で著明に発現低下する Prx6 に着目し解析を行った。Prx6 の大腸粘膜における発現・局在を組織免疫染色にて確認した。腸管粘膜における Prx6 の機能解析に関しては、マウス正常大腸上皮細胞株 (YAMC cell) を用いて行った。Prx6 発現を siRNA にて制御した大腸上皮細胞における H_2O_2 傷害性ならびに損傷治癒を検討した。また、ヒト潰瘍性大腸炎・クローン病の炎症腸粘膜生検検体を用いて Prx6 の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、発現変動する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抗酸化酵素 Prx6 が同定された。

組織免疫染色では、Prx6 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。一方、炎症大腸粘膜では Prx6 発現は低下していた。

この組織免疫染色の結果から、その主たる発現部位は腺管上皮細胞であることが明らかとなった。そこで、マウス正常大腸上皮細胞株 (YAMC cell) を用いて Prx6 の機能解析を行った。定常状態で Prx6 発現を認めており、siRNA にて Prx6 発現制御した YAMC cell と比較検討した。その結果、Prx6 低発現細胞では H_2O_2 による傷害性の著しい増加を認めた。さらに、wound assay を用いた損傷治癒における検討においても Prx6 低発現細胞では損傷治癒が遅延していることが明らかとなった。

ヒト大腸粘膜生検検体を用いた検討では、活動期潰瘍性大腸炎粘膜で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。この発現パターンはクローン病粘膜においても同様であった。また、緩解期粘膜や潰瘍性大腸炎非炎症部粘膜では Prx6 発現は正常粘膜と同等に維持されていた。

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 Prx6 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。特に、Prx6 発現は大腸粘膜の腺管上皮細胞に発現しており、マウス正常大腸上皮細胞株を用いた *in vitro* の検討では、Prx6 が酸化ストレスによる細胞傷害抵抗性に寄与していることが示され、さらに興味深いことに粘膜損傷治癒においても治癒促進に関与していることが明らかとなった。したがって、腸管粘膜上皮細胞に Prx6 が高発現していることは、粘膜恒常性維持に重要な現象であることが推察された。

実際に、ヒト潰瘍性大腸炎活動期粘膜では Prx6 発現が著しく低下しており、正常粘膜に比較して組織の脆弱性がもたらされている可能性が考えられた。一方、様々な治療により緩解した粘膜においては Prx6 発現が正常大腸粘膜と同等にまで回復していた。これらの現象は、Prx6 の発現挙動が腸管炎症病態に深く関与していることを示唆するとともに、病態を反映する新規バイオマーカーとして臨床現場に応用できる可能性が示された。今後、症例を重ねて詳細な検討を行っていく予定である。

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 Prx6 の発現低下が確認された。この Prx6 は大腸粘膜の恒常性維持に寄与することが明らかとなった。また、炎症粘膜での発現挙動解析から Prx6 は新規病態バイオマーカーとなると考えられた。

F. 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, Akagiri S, Suzuki T, Hirata I, Omatsu T, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Inhalation of Carbon Monoxide Ameliorates TNBS-Induced Colitis in Mice Through the Inhibition of TNF- α Expression. *Dig Dis Sci*. 2010 Jan 22.
- 2) Takagi T, Naito Y, Okada H, Ishii T, Mizushima K, Akagiri S, Adachi S, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Itoh K, Yamamoto M, Matsui H, Yoshikawa T. Lansoprazole, a proton pump inhibitor, mediates anti-inflammatory effect in gastric mucosal cells through the induction of heme oxygenase-1 via activation of NF-E2-related factor 2 and oxidation of

- kelch-like ECH-associating protein 1. J Pharmacol Exp Ther. 2009 Oct;331(1):255-64.
- 3) Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T. The expression of heme oxygenase-1 induced by lansoprazole. J Clin Biochem Nutr. 2009 Jul;45(1):9-13.
- 4) 内藤裕二著. プロテオミクスでみえてくる消化器疾患の新展開. 診断と治療社. (東京) 2009. 10.
2. 学会発表
- 1) Tatsushi Omatsu, Yuji Naito, Tomohisa Takagi, Katsura Mizushima, Hitomi Okada, Kohei Fukumoto, Akihito Harusato, Ikuhiro Hirata, Yoko Hamano, Tomoko Oya-Ito, Osamu Handa, Nobuaki Yagi, Satoshi Kokura, Hiroshi Ichikawa, Hideshi Fujiwake, Toshikazu Yoshikawa. Decreased Expression of Peroxiredoxin-6 in Murine Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis Identified by 2-Dimensional Fluorescence Difference in Gel Electrophoresis. DDW2009 May 31, 2009 Chicago, IL
- 2) Tatsushi Omatsu, Yuji Naito, Tomohisa Takagi, Katsura Mizushima, Hitomi Okada, Ken Inoue, Shinya Yamada, Kohei Fukumoto, Akihito Harusato, Ikuhiro Hirata, Tomoko Oya-Ito, Osamu Handa, Nobuaki Yagi, Satoshi Kokura, Hiroshi Ichikawa, Toshikazu Yoshikawa. The exhaustive proteomics revealed the down-regulation of peroxiredoxin-6 in murine dextran sodium sulfate-induced colitis. ICMI2009 July 7, 2009 Boston, MA
- 3) Tatsushi Omatsu, Yuji Naito, Tomohisa Takagi, Katsura Mizushima, Hitomi Okada, Ken Inoue, Shinya Yamada, Kohei Fukumoto, Akihito Harusato, Ikuhiro Hirata, Tomoko Oya-Ito, Kazuhiko Uchiyama, Osamu Handa, Nobuaki Yagi, Satoshi Kokura, Hiroshi Ichikawa, Toshikazu Yoshikawa. Proteomic discovery of the down-regulation of peroxiredoxin-6 in murine dextran sodium sulfate-induced colitis. UEGW2009 Nov 24, 2009. London, UK
- 4) 尾松達司、内藤裕二、高木智久、水島かつら、岡田ひとみ、福本晃平、春里暁人、平田育大、半田 修、古倉 聡、市川 寛、吉川敏一. マウス腸炎モデルに対する網羅的蛋白解析によるアプローチ～ペルオキシレドキシン6の役割～第95回日本消化器病学会総会. 2009. 5. 8. 北海道.
- 5) 尾松達司、内藤裕二、高木智久、水島かつら、岡田ひとみ、福本晃平、春里暁人、平田育大、内山和彦、半田 修、八木信明、古倉 聡、市川 寛、吉川敏一. マウス腸炎モデルに対するプロテオミクス的手法を用いたアプローチ～ペルオキシレドキシン6発現低下の発見～. 第46回日本消化器免疫学会総会. 2009. 7. 23. 松山
- H. 知的所有権の取得状況 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

クローン病の新規バイオマーカーについての検討

研究協力者 光山 慶一 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 准教授

研究要旨：ファージディスプレイ法を用いて日本人クローン病(CD)患者血清と特異的かつ高率に反応する抗原の探索を行なった。その結果、TCP353 に対する抗体(ACP353)が有用なバイオマーカーとなることが示唆された。さらに、TCP353 は CD の病態にも深く関与し、病因の追求、新規治療法の開発の面からも重要な因子と考えられた。

共同研究者 丹羽幹夫
所属 東亜合成つくば研究所

A. 研究目的

ファージディスプレイ法を用いてクローン病(CD)患者血清と特異的かつ高率に反応する抗原の探索を行なった。

B. 研究方法

(1)大腸癌cDNAを用いて作製したT7ファージディスプレイライブラリーを、多数のCD患者血清中のIgGを用いてスクリーニングした。CD患者血清と特異的に結合するファージを選別し、発現ペプチド(TCP353)のアミノ酸配列を決定した。(2)CD、潰瘍性大腸炎(UC)、健常人より末梢血単核球(PBMC)を分離し、合成した抗原ペプチド(TCP353)の刺激下で24時間培養し、上清中の各種サイトカイン濃度を測定した。(3)TCP353を用いてELISAを構築し、CD60例、UC109例、感染性腸炎11例、大腸癌35例、健常人71例での血清抗体価を測定した。さらにASCAの血清抗体価との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究に当たっては当大倫理委員会の承認を得、患者の同意を得て行った。データ処理に当たっては症例リストを作成した後、氏名、住所等の個人情報を特定される可能性のあるデータを消去した上で解析を行った。

C. 研究結果

(1)本新規抗原ペプチドのホモロジー検索では、既存のバイオマーカーを含む如何なる蛋白抗原とも相同性を認めなかった。(2)TCP353でPBMCを刺激すると、CDのPBMCではUCや健常人のPBMCと異なり、炎症性サイトカインの産生亢進がみられた。(3)TCP353に対する抗体(ACP353)の血清抗体価は、CD61.7%、UC7.3%、感染性腸炎0%、大腸癌11.4%、健常人

2.8%で陽性あった。ROCカーブでは、ACP353の方がASCAよりも有用であった。

D. 考察

CDのバイオマーカーとして、欧米では抗Flagellin抗体、抗OmpC抗体、抗I2抗体、ASCAなどが報告されている。しかし、これらのマーカーの日本人CDでの陽性率や特異性は満足できるものではない。今回の研究で、TCP353に対する抗体(ACP353)はCDに特異的で、日本人CDの有用なバイオマーカーとなることが示唆された。さらに、TCP353はCDの病態にも深く関与し、病因の追求、新規治療法の開発の面からも重要な因子と考えられた。今後、多施設研究により本マーカーの臨床的意義をさらに追求していく予定である。

E. 結論

TCP353に対する抗体(ACP353)はCDに特異的で、日本人CDの有用なバイオマーカーとなることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

1) 光山慶一, クローン病の新規バイオマーカーの検討, 第96回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010年4月22日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
ドイツでは特許権取得済み(PCT/JP2005/007857)米国、欧州、中国、韓国で出願中。
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

EPA 由来生理活性物質を用いた炎症性腸疾患に対する新規治療法の検索

研究協力者 吉田 優 神戸大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 特命准教授

研究要旨：エイコサペンタエン酸(EPA)は、様々な慢性炎症に対して抗炎症効果が報告されているが、その詳細な機序は不明である。今回、EPA 由来生理活性物質であるリゾルビンE 1 (RvE1) の抗炎症効果を検討した。RvE1 は、マクロファージの TNF- α や Toll-like 受容体刺激による NF- κ B 経路の活性化を抑制することにより、マウス炎症性腸疾患モデルに有用であること明らかにした。

共同研究者

石田 司、増田充弘、久禮 泉、大井充、吉江智朗、東 健

A. 研究目的

EPA、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの不飽和脂肪酸は、様々な慢性炎症性疾患に対して抗炎症効果が報告されている。近年、炎症の収束期に生成されるこれら不飽和脂肪酸由来生理活性物質が、特異的受容体を介して炎症を抑制することが報告された。そこで、EPA 由来生理活性物質 (リゾルビンE 1: RvE1) のマウス炎症性腸疾患モデルに対する効果を検討した。

B. 研究方法

マウスより腹腔内マクロファージを採取し、RvE1 の受容体である ChemR23 の発現を解析した。さらに、RvE1 が LPS 刺激による TNF- α および IL-12p40 mRNA 発現を抑制するかどうかをリアルタイム PCR 法により検討した。次に ChemR23 の発現遺伝子を HEK (human embryonic kidney) 293 細胞に移入した細胞株を用いて、RvE1 (100ng/ml) が TNF- α (4ng/ml) 刺激による NF- κ Bp65 の核内移行を抑制するかどうかを免疫染色ならびにウェスタンブロット法で検討した。次に、RvE1 が、DSS 腸炎を制御するかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

神戸大学動物実験委員会の規約に沿い、動物への倫理的配慮を行った。

C. 研究結果

(1) マウス腹腔内マクロファージにおける RvE1 の抗炎症効果の検討

マウス腹腔内マクロファージが ChemR23 を発現していることをフローサイトメトリーで確認した。また、LPS にてマウス腹腔内マクロファージに誘導される TNF- α および IL-12p40 mRNA 発現を RvE1 は有意に抑制した。

(2) RvE1 の ChemR23 発現細胞における NF- κ B 活動性の抑制効果の検討

ChemR23 移入細胞 (HEK293-ChemR23 細胞) ならびにコントロール細胞において、TNF- α 刺激による NF- κ B の核内移行が RvE1 添加により抑制できるかどうかを免疫染色ならびにウェスタンブロットにて検討したところ、RvE1 は受容体依存的に有意に抑制することを明らかにした。

(3) DSS 誘発腸炎に対する RvE1 の効果の検討

マウス DSS 腸炎を用いて、RvE1 の効果を検討した。コントロール群では、DSS 投与後 5 日目より下痢、体重減少など著明な腸炎が認められ、8 日目には体重減少率は $78.1 \pm 2.6\%$ となったが、RvE1 投与群において 8 日目の体重減少率は $90.7 \pm 2.4\%$ となり、有意に体重の減少を抑制した。また、RvE1 投与群においては、大腸長においても有意に改善が認められた。さらに、大腸組織の病理学検討においても、RvE1 は有意な改善をもたらした。大腸組織において NF- κ B の活動性を検討するために NF- κ Bp65 のリン酸化に対する抗体を用いて、免疫染色を行い検討した。大腸遠位側で、RvE1

投与群は有意に NF- κ B のリン酸化陽性細胞数が低下しており、大腸組織の局所においても NF- κ B の活動を抑制していることが示唆された。また、RvE1 投与群において NF- κ B 関連性の炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA の有意な低下が DSS 誘発腸炎の大腸組織において認められた。

(4) 炎症による RvE1 受容体である ChemR23 の発現の変化の検討

マウス腹腔内マクロファージを、LPS(100ng/ml) で刺激した際、ChemR23 mRNA が増加すること、さらに、DSS 誘発腸炎の大腸組織でも、DSS 投与群がコントロール群と比較して ChemR23 mRNA の発現が増強していることを明らかにした。

D. 考察

炎症性腸疾患の病態の一つとして、食事や腸内細菌に対する免疫反応が過剰に反応していると考えられている。実際、炎症性腸疾患患者において、主にマクロファージの産生する TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などのサイトカインが高値であることが知られている。本研究により、EPA 由来生理活性物質である RvE1 がマクロファージに発現する ChemR23 を介して、LPS などの Toll-like 受容体刺激による NF- κ B のシグナルを制御することにより、その下流の炎症性モノカインの発現を制御する可能性が示唆された。

E. 結論

EPA 由来生理活性物質である RvE1 は、in vitro ならびに in vivo において、すぐれた炎症効果を発揮した。RvE1 は、ヒト慢性炎症疾患の治療薬への応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishida T, **Yoshida M***, Arita M, Nishitani Y, Masuda A, Mizuno S, Morita Y, Kutsumi H, Inokuchi H, Serhan CN, Blumberg RS, Azuma T
Resolvin E1: an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Jan;16(1):87-95. (*correspondence)

- 2) Kure I, Nishiumi S, Nishitani Y, Tanoue T, Ishida T, Mizuno M, Fujita T, Kutsumi H, Arita M, Azuma T, **Yoshida M**: Lipoxin A4 reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and intestinal epithelial cells through inhibition of NF- κ B activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Oct 21. [Epub ahead of print] (*correspondence)
 - 3) Kobayashi K, Qiao SW, **Yoshida M**, Baker K, Lencer WI, Blumberg RS: An Fc γ Rn-Dependent Role for Anti-flagellin Immunoglobulin G in Pathogenesis of Colitis in Mice. *Gastroenterology.* 2009 Nov; 137(5): 1746-1756.
 - 4) Nishitani Y, Tanoue T, **Yoshida M**, Azuma T, Mizuno M : Lactococcus lactis subsp. cremoris FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Int Immunopharmacol.* 2009 9(12):1444-51
- #### 2. 学会発表
- 1) Ishida T, **Yoshida M**, Arita M, Takagawa T, Serhan CN, Azuma T: Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis. ICMI2009 (2009年、ボストン)
 - 2) 石田司、**吉田優**、有田誠、東健 : Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium induced colitis. 第39回日本免疫学会総会 (2009年、大阪)
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
- (予定を含む。)

1. 特許出願中

名称 : USE OF RESOLVINS TO TREAT GASTROINTESTINAL DISEASE
特願番号 : 06717497, 9-2123-US200600030

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

DSS 腸炎における骨髄間葉系幹細胞治療

研究分担者 今井 浩三 札幌医科大学 学長

研究要旨： DSS 腸炎に対する骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 治療は、DSS 腸炎急性期には無効であったが、回復促進効果を示した。MSC はクリプト底部の上皮細胞間や、筋線維芽様細胞に分化してクリプト近傍に engraft され、組織障害の修復に寄与することが示唆された。MSC の産生する液性因子により、障害されたタイトジャンクションタンパクの再構成が誘導されたことから、MSC が腸上皮バリア機能の回復に寄与する可能性が示唆された。

共同研究者：渡邊秀平、田中浩紀、後藤 啓中垣
卓、矢花 崇、細川雅代、永石歆和山本博幸、有
村佳昭、本谷 聡、篠村恭久
所属：札幌医科大学第一内科

A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞 (MSC) は、再生医療の細胞ソースとして有力視されている。BU 誘導骨髄不全下においては、ラット DSS 腸炎において MSC が腸上皮のアポトーシス抑制およびタイトジャンクション再構成により腸炎の回復促進に寄与していることを明らかにしてきた。本年度は、正常骨髄機能下において、MSC が腸上皮再生に及ぼす影響及びその機序を解析することを目的とした。

B. 研究方法

eGFP トランスジェニックラット骨髄から MSC を分離培養し、細胞移植に用いた。Lew ラットに 4%DSS 腸炎を惹起し、腸炎誘発 2 日目に MSC を $2 \times 10^4/g$ 尾静脈より静注して腸炎に及ぼす影響を検討した。腸上皮のバリア機能に関与するタイトジャンクション構成蛋白、Claudin (CL) および Zonula occludens (ZO) の発現変化を検討した。投与された MSC の組織への engraft は、GFP 陽性細胞を標識にして経時的に検討した。

さらに、腸炎組織における MSC の細胞動態と、腸

上皮再生における MSC の作用機序について、MSC とラット小腸上皮の培養細胞 (IEC-6) を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関する法律・基準・指針を遵守し、生物の多様性の確保に関する法律に抵触しない。

C. 研究結果

MSC 移植は、体重変化率および組織学的腸炎重症度の評価から、腸炎の回復を促進していた。移植された MSC はクリプト底部に近い位置で上皮細胞間や間質に生着していたが、生着細胞数が少なく GFP 陽性細胞の腸管組織内での増殖分化は認められなかった。

生着した一部の MSC は、 α SMA、vimentin、desmin を発現し筋線維芽細胞様の形態と形質をも有したことから、MSC の分化転換に寄与する因子を検討した。MSC における α SMA の発現には、TGF β の発現増強と Notch シグナルの抑制が関与した。

IEC-6 を用いた、MSC の細胞障害抑制および上皮再生における役割の検討では、タイトジャンクション構成タンパク、とくに CL-12、CL-15 および ZO-1 の発現変化を認めた。すなわち、TNF α 刺激下に IEC-6 を MSC の培養上清で、あるいはトランスウェルで MSC と共培養したところ、MSC 培養上清を構成する液性因子は、TNF α による上皮細胞障害 (主にアポトーシ

ス)を抑制し、さらに細胞増殖を促進した。また、細胞障害により発現低下した CL-12, CL-15 および ZO-1 の回復を認めた。

D. 考察

MSC は、腸炎の回復促進効果を認めた。しかし腸管組織に engraft された細胞が少なく、腸管組織内でのさらなる増殖分化を認めなかったことから、移植された MSC の治療効果発現には、MSC の細胞接触あるいは癒合よりも、MSC が産生する何らかの液性因子による上皮再生効果や免疫抑制作用を介する機序が示唆された。

腸管組織において筋線維芽細胞様に分化した MSC はクリプト周囲に誘導されており、腸上皮幹細胞の niche の役割を果たす可能性も示唆された。

MSC の培養上清中の構成成分が直接上皮細胞の障害抑制や再生修復に寄与したことから、MSC 治療の標的としてバリア機能の回復を含む上皮再生の重要性が示唆された。

E. 結論

MSC は、腸炎の回復を促進し、その機序として上皮再生への直接的な寄与が示唆された。今後 MSC 治療の機序解析として、MSC が産生する多彩な液性因子のうち上皮再生に寄与する因子の同定およびその機序を検討することで、MSC 移植による効率的な上皮再生法を検討していく必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asano K, Matsushita T, Umeno J, Hosono N, Takahashi A, Kawaguchi T, Matsumoto T, Matsui T, Kakuta Y, Kinouchi Y, Shimosegawa T, Hosokawa M, Arimura Y, Shinomura Y, Kiyohara Y, Tsunoda T, Kamatani N, Iida M, Nakamura Y, Kubo M: A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for

ulcerative colitis in the Japanese population.

Nat Genet. 41: 1325-1329, 2009

- 2) Yabana T, Arimura Y, Tanaka H, Goto A, Tanaka M, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Adachi Y, Isobe M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y: Enhancing epithelial engraftment of rat mesenchymal stem cells restores epithelial barrier integrity. *Journal of Pathology* 218: 350-359, 2009
- 3) Tanaka M, Arimura Y, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sonoda T, Nomura M, Motoya S, Imai K, Shinomura Y: Genetic variants in *surfactant, pulmonary-associated protein D (SFTPD)* and Japanese susceptibility to ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Disease.* 15: 918-925, 2009
- 4) Liu Y, Adachi M, Zhao S, Hareyama M, Koong AC, Luo D, Rando TA, Imai K, Shinomura Y: Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ.* 16:847-857, 2009

2. 学会発表

- 1) Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Naishiro Y, Yamashita K, Yamamoto H, Murata M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y: Enhancing mucosal reparative response in rat DSS colitis by Mesenchymal Stem Cell therapy. The 4th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium 東京 2010年1月23日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 特願 2007-141147 「間葉系幹細胞による難治性腸炎の治療」(平成 19 年 5 月 28 日 特許出願中)
- 2) 特願 2007-194910 「同上追加データ分」(平成 19 年 7 月 26 日 特許出願中)

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

炎症性腸疾患における上皮再生機構の解明と治療応用

研究代表者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：本研究では炎症性腸疾患の病変部に於ける上皮分化制御及び再生・修復機構の解明を通じて、同機構を促進する分子標的の同定と治療応用の可能性を追求した。ヒト腸管上皮由来培養細胞株を用いた独自の網羅的解析と炎症性腸疾患患者粘膜の組織学的解析を行った結果、炎症性腸疾患における上皮分化異常を担う主たる分子シグナルとして Notch シグナルを同定した。同シグナルは炎症性腸疾患における上皮分化と同時に細胞増殖を介した粘膜再生に必須の役割を担っており、粘膜再生促進の標的シグナルとなり得る事を明確に示した。同シグナル活性化を誘導する因子の探索の為、内因性 Notch 活性化の定量的測定が可能な細胞系を構築し、これを利用する事により既存薬剤の粘膜治癒効果と Notch シグナル活性化誘導能が密接な関連を有する事が明らかとなった。これらの成果は炎症性腸疾患における「粘膜治癒」を達成するにあたり、治療標的となるべき分子シグナルを明示したのみならず、新規治療へと展開する際に必須となる基盤整備に成功した事を示すものであり、更なる研究推進により「分子標的・粘膜再生治療」へと発展していく事が期待される。

共同研究者

岡本隆一、土屋輝一郎、中村哲也
東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

A. 研究目的

本研究は研究代表者らが推進してきた、独自の視点・手法による腸管上皮細胞分化の制御機構解析を起点とし、最終的には難治性炎症性腸疾患に対する粘膜再生治療の確立を目指すものである。我が国において炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）患者は近年急増しており、それ故、治療抵抗例や外科治療を要する難治例も数多く経験される。同疾患に対する治療は、従来から腸管粘膜の炎症に焦点が当てられ、炎症の収束・維持が最大の目標に掲げられていた。しかしながら近年の臨床的な観察の結果、患者予後を決定する重要な因子として「粘膜治癒」が注目されている。即ち、正常な粘膜上皮の再生・修復を達成し得た患者は腸管炎症の再燃率及び外科的治療に至る率が共に著しく低下する事が示されている。逆に難治

例の多くは一見炎症の収束が得られても粘膜上皮の再生が滞り、その結果再燃・増悪という経過を辿るものと考えられており、治療目標を炎症の制御のみならず「粘膜治癒」に置く事の重要性が急速に普及している。従って従来の治療法に加え「粘膜再生・治癒」を主たる標的とした新規治療法の確立は急務であり、また切望される所である。

研究代表者らは一貫して腸管上皮の分化制御機構を追求し、特に大腸炎粘膜に於ける上皮再生機構の解明へと発展させてきた。研究代表者らは、炎症粘膜修復において骨髄由来細胞による支援機構が存在することを世界に先駆けて明らかとし (Nat Med 2002)、腸管粘膜の分化・再生制御における画期的知見として世界的に高い評価を獲得した。さらに研究代表者らは、腸管上皮細胞の分化機構に着目した独自の解析を推進し、(Gastroenterology 2005)、腸管粘膜再生過程における杯細胞の重要性 (Gastroenterology 2007, BBRC 2008)、腸管上皮細胞分化におけるマイクロ RNA 発現制御機構の重要性 (RNA 2008) 等の画期的

知見を提供して来た。即ち、腸管粘膜の恒常性維持に加え、再生・修復過程において、如何なる上皮分化制御機構が存在し機能を果たしているか、という点に一貫して着目し、炎症性腸疾患に於ける再生・修復治療法の確立を目指すという、独自の視点に立脚した研究を推進してきた。本研究ではこれまでの研究成果を更に発展させ、1)炎症性腸疾患病変部に於ける上皮細胞分化制御機構の解明 2)大腸炎における上皮再生・修復を制御する主たる分子シグナル系の同定 3)同シグナル制御による粘膜再生促進因子の探索系の確立、をそれぞれ追求した。

B. C. 方法・結果

- 1) 潰瘍性大腸炎病変部において出現する「杯細胞の減少」と「異所性パネート細胞」につき、Notchシグナルの活性化との関係について、免疫組織学的に解析を行った。その結果、a)潰瘍性大腸炎病変部の粘膜上皮において、Notchシグナルは陰窩内の広範な上皮細胞で活性化が確認された。b)同部位では杯細胞の著しい減少、上皮細胞増殖の促進に加え、パネート細胞特異的遺伝子であり、抗菌ペプチドである PLA2G2A の異所性発現が示された。
- 2) ヒト大腸上皮由来培養細胞株を用いて薬剤誘導性に Notchシグナル活性化を誘導する独自の細胞系を樹立し、Notchシグナル活性化が細胞内遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、a)ヒト大腸上皮由来細胞において Notchシグナル活性化を誘導する事により、杯細胞の特異的形質である MUC2 の発現が著しく抑制され、粘液分泌能にも著しい低下が確認された。b)これと相反して、パネート細胞特異的遺伝子であり、抗菌ペプチドである PLA2G2A の発現及び分泌は著しく促進された。
- 3) 潰瘍性大腸炎病変部における上皮細胞内 Notchシグナル活性化が、大腸炎の臨床像に如何なる役割を担っているかを解明するため、マウス大腸炎モデル（デキストラン硫酸投与による大腸炎誘導モデル）に対し、粘膜再生応答の出現期に合わせて Notchシグナル阻害薬を投与し、

その臨床効果を検討した。その結果、a) Notchシグナル阻害薬投与により、デキストラン硫酸誘導腸炎の臨床経過の増悪と死亡率の上昇が誘導された。b)炎症部腸管粘膜に於いて、Notchシグナル阻害薬は細胞増殖を著しく抑制し、粘膜再生応答を著しく阻害した。

- 4) 腸管上皮細胞に於いて Notchシグナル活性化を誘導する因子の探索を行う為、内因性 Notchシグナル活性化をレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ）に変換し、定量的に測定可能な細胞系を構築した。これを用いて既存薬物による活性化誘導能を検討した。その結果、高用量 5-ASA は Notch 活性化を促進するのに対し高用量デキサメサゾン は Notch 活性化を抑制した。

以上の結果から、潰瘍性大腸炎病変部に見られる「杯細胞の減少」と「異所性パネート細胞」はいずれも上皮内 Notchシグナル活性化に制御されており、同シグナルの活性化は粘膜再生に必須である事が示された。炎症性腸疾患に用いられる代表的な薬物である 5-ASA は同シグナルを介して粘膜治癒に貢献している可能性がある一方、ステロイド剤は同シグナルを抑制し、修復遅延の一因となっている可能性が示された。

（倫理面への配慮）

以上の研究の施行に当たっては、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)倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2)意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3)個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4)希望に応じ検体提供者やその保護者への研究成果の説明を行う。5)研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。

D. 考察

- 1) 本研究の成果は、Notchシグナルがヒト腸管の粘膜恒常性維持及び粘膜再生といういずれの局面に於いても重要な機能を担っていること

示した画期的な知見ある。具体的には a) ヒト腸管の陰窩上皮に於いて同シグナル経路が活性化していること b) 炎症粘膜ではより広範な上皮細胞群で活性化が誘導されること c) 潰瘍性大腸炎の病変部における分化異常が Notch シグナルの活性化により in vitro で再現されること d) 同疾患からの回復・粘膜修復に重要な機能を担っていること e) 既存薬剤の粘膜治癒効果も同シグナルに依存している可能性があること、を明らかとした。

- 2) 本研究では Notch シグナル活性化によってヒト腸管上皮細胞に誘導される遺伝子発現変化を網羅的に解析し、その結果を起点に同シグナルが潰瘍性大腸炎の粘膜に於いて担う個体レベルでの機能的意義を明確に示すことに成功した。即ち、同シグナルが上皮分化制御と同時に表裏一体で細胞増殖を制御し、腸管粘膜の再生・修復応答に必須の分子シグナルであることを証明した。これらの成果は Notch シグナルが炎症性腸疾患における上皮再生応答に不可欠の重要なシグナル経路であり、即ち同シグナルの活性化こそが粘膜再生促進の重要な起点となることを明らかとした。
- 3) 上記結果に基づき、Notch シグナル活性化を介した粘膜再生治療の確立に向け、本研究では Notch 活性化誘導因子の網羅的な探索を目指した。本研究で確立した細胞系に於いて、炎症性腸疾患の現存治療薬の中で唯一粘膜治癒効果に対する臨床的エビデンスが確立している 5-ASA の添加により、腸管上皮細胞の Notch 活性化が促進される一方、潰瘍治癒の遷延因子とされているステロイド剤は Notch 活性化を抑制することから、既存薬の効果においても Notch 活性化と粘膜治癒の密接な関連が示された。また、本研究において構築した細胞系が臨床効果を予測し得る妥当性を有している可能性が示され、同アッセイ系を用いた網羅的な活性化因子の探索により、粘膜治癒効果の高い薬剤の創出へと発展することが大いに期待される。

E. 結論

炎症性腸疾患における粘膜再生・修復の主たる分子シグナル系として Notch シグナルを同定した。同シグナルは炎症性腸疾患に於いて、上皮分化・増殖の両者の制御を通じ病態形成に重要な役割担っているのみならず、損傷粘膜再生に必須のシグナルとして機能していた。これらの成果に基づき、炎症性腸疾患の粘膜再生・修復を目指した治療体系の確立に向け、同シグナルを活性化する因子の網羅的解析系を確立し、その機能の妥当性を検証し得た。同シグナルを標的とした分子標的治療薬開発の基盤整備も終了し得たことから、今後の研究推進により、上皮再生不全を伴う難治性炎症性腸疾患の克服が可能となる画期的粘膜再生治療へと発展す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

- 1) Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M: Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia. *Am J Physiol GI & Liver*. 296:G23-G35, 2009.
- 2) Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Watanabe M: RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4+CD25+ regulatory T Cells in chronic colitis. *J Immunol*. 182: 6079-6087, 2009.
- 3) Tomita T, Kanai T, Totsuka T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Ohteki T, Hibi T, Watanabe M: IL-7 is essential for lymphopenia-driven turnover of colitogenic CD4+ memory T cells in chronic colitis. *Eur J Immunol*. 39: 2737-2747, 2009.
- 4) Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, Nagano K, Oshima S, Nemoto Y, Yoshioka A, Totsuka T, Okamoto R, Nakamura T, Sakamoto N, Tsuchiya

- K, Aoki A, Ohya K, Yagita H, Watanabe M: Signaling pathway via $TNF\alpha/NF\kappa B$ in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am J Physiol GI & Liver*. 296:G850-G859, 2009.
- 5) Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Shinohara T, Sakamoto N, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sudo T, Matsumoto S, Watanabe M: Long-Lived colitogenic CD4+ Memory T Cells residing outside the intestine participate in the perpetuation of chronic colitis. *J Immunol*. 183: 5059-5068, 2009.
2. 学会発表
- 1) Watanabe M: Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: Current Understanding. Asia Pacific Working Group Inaugural Meeting on IBD, 2009年3月7日, China.
- 2) Okamoto R: Notch1 activation promotes goblet cell depletion and expression of PLA2G2A in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. DDW2009, 2009年6月1日, Chicago.
- 3) Tsuchiya K, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: GSK3 inhibitor induces the intestinal differentiation by the protein stabilization of Atoh1. DDW2009, 2009年6月2日, Chicago.
- 4) Nemoto Y, Kanai T, Matsumoto S, Watanabe M: Long-lived colitogenic CD4+ Memory T cells can be maintained outside the intestine in the absence of commensal bacteria. JUCC, 2009年11月20日, Tokyo.
- 5) Tsuchiya K, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Colon carcinogenesis is divided into the undifferentiation and proliferation regulated by Atoh1 and Beta-Catenin on wnt signaling, respectively. GASTRO 2009, 2009年11月23日, London.
- 6) 渡辺 守: 炎症性腸疾患と発癌. 第106回日本内科学会総会・講演会, 2009年4月10日, 東京.
- 7) 玄 世峰: 潰瘍性大腸炎の長期予後—重症潰瘍性大腸炎に対するサイクロスポリン持続静注療法の長期成績—. 第95回日本消化器病学会総会, 2009年5月7日, 札幌.
- 8) 渡辺 守: IBD 診療のシンボと近未来像—治る時代へ—. 第6回 市民公開講座～炎症性腸疾患の治療をめぐる～, 2009年5月17日, 徳島.
- 9) 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 腸内細菌から直接的自然免疫と抗原刺激を受ける炎症性腸疾患メモリーCD4+T細胞の維持機構. 第51回日本消化器病学会大会 (JDDW2009), 2009年10月15日, 京都.
- 10) 岡本隆一、土屋輝一郎、渡辺 守: 炎症性腸疾患における上皮分化・増殖機構の解析と粘膜再生治療への応用. JDDW2009, 2009年10月16日, 京都.
- 11) 渡辺 守: 炎症性腸疾患における Notch シグナル異常と分子標的の可能性. 第37回日本臨床免疫学会総会. 2009年11月14日, 東京.
- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)
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

クローン病の腸内細菌叢プロファイル (T-RFLP) : 多施設共同研究

研究分担者 藤山 佳秀 滋賀医科大学内科学講座 (消化器内科) 教授

研究要旨 : T-RFLP 法によるクローン病の腸内細菌叢プロファイルを多施設共同研究により解析を行った。対象は活動期クローン病症例で、治療開始前、寛解導入時ならびに緩解維持期の便中細菌叢プロファイルの解析を行い、地域・性・年齢のマッチした健常人を対照とした。結果、系統樹解析からクローン病クラスター、クローン病優位クラスター、健常人優位クラスターに分類され、クローン病特異腸内細菌叢プロファイルを明らかにした。

共同研究者

松井敏幸 福岡大学筑紫病院消化器科
松本誉之 兵庫医科大学内科学下部消化管科
鈴木康夫 東邦大学医療センター佐倉病院
安藤 朗 滋賀医科大学大学院医学研究科

A. 研究目的

クローン病の病因・病態への腸内細菌叢の関与を明らかにする目的で、地域性を考慮した多施設共同研究にて tRFLP 法を用いた腸内 (便中) 細菌叢プロファイル解析を行った。

B. 研究方法

本多施設共同研究にエントリーされた活動期クローン病症例のうち、CDAI \geq 220 かつ腸管切除術・腸瘻造設術の施行歴がなく、エントリー時に TPN が実施されていない 56 例を対象とし、寛解導入時・維持期においては CDAI $<$ 150 を満足するものとし、計 139 検体を解析対象とした。対照には地域・性・年齢がマッチした健常人より採便した試料を用いた。

Terminal Restriction Enzyme Fragments Length Polymorphism (T-RFLP) 解析は既報の通りであり、制限酵素には *Hha*I、*Msp*I を用いた。

(倫理面への配慮)

本共同研究の実施にあたっては参加各施設の倫理委員会の承認の下に、インフォームド・コンセントを得て行った。健常対照についての倫理審査は本共同研究事務局を通じて承認を得ている。

C. 研究結果

健常対照の T-RFLP デンドログラム解析によるクラスター分布の独立性検定から、腸内細菌叢プロファイルに関東・近畿・北九州間の地域差は認められなかった。

クローン病症例における T-RFLP 腸内 (便中) 細菌叢プロファイルは、図 1 に示すデンドログラムの通り健常人とは異なるクラスターに集積することが明らかとなった (図中 ; 各健常者はドット状に、個々クローン病症例はバー状に提示されている)。この内、クラスター①③④⑥はクローン病症例のみよりなり、他のクラスターとは系統樹上もっとも隔たった近似性位置で枝分れし、クローン病に特異なクラスター群と考えられた。

図 2 には、上記クローン病特異クラスター群 (CD)、およびクラスター②⑧のクローン病優位クラスター群 (CD 優位群)、クラスター⑤⑦の健常人優位クラスター群 (健常優位群) における各制限酵素断片ピーク (OTU) 平均値を示した。各ピークに由来する 16S rDNA データベースから想定される微生物分類群は、NEW PAD-HCM (理化学研究所辨野特別研究室) より Clostritium Cluster 分類 (Techno-Suruga Laboratory Co., Ltd) にて表示している。

図 1

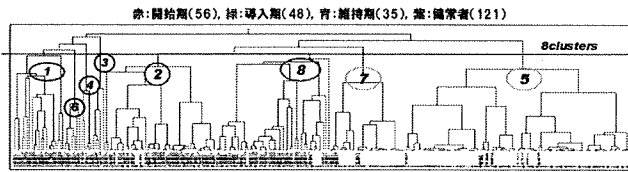
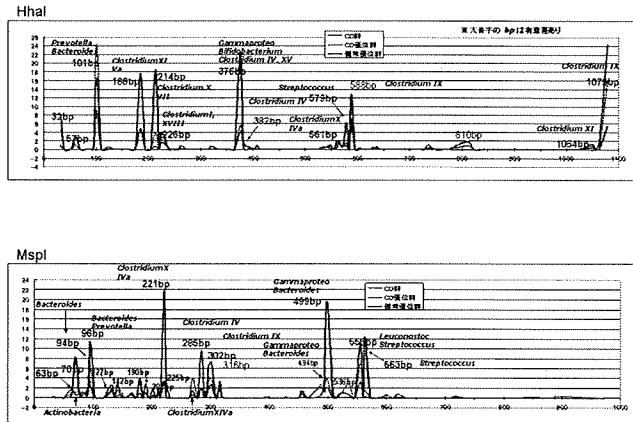


図 2



D. 考察

クローン病における腸内（便中）細菌叢プロファイルは、健常人とは異なる特異なプロファイルを示すとの我々の単一施設による検討結果が、多施設共同研究においても確認された。さらに、本研究によって、健常人とは樹形図上ももっとも隔たったクローン病特異クラスター群の存在が明らかにされた。今後、このクローン病特異クラスター群を特徴づける制限酵素断片ピーク（OUT）を抽出し解析することにより、本症の病因・病態への腸内細菌叢の関与の解明、さらには病態のバイオマーカー開発に繋がることが期待される。また、本症に対するプレバイオティクス・プロバイオティクスの開発における評価指標を提供するものと思われる。

しかしながら、T-RFLP 法による本研究は未知あるいは未同定難培養性細菌を含めた腸内細菌叢をプロファイルの形で一体としてとらえて病因・病態への関与をみようとするものであり、自ずとその限界を踏まえた解析結果の解釈が必要である。細菌（微生物）由来 16S rDNA ライブラリーも急速に充実されつつあるものの、それに基づいた分類は個々細菌（微生物）の生理生化学的性状を特徴づけるものではない。

したがって、今後の課題としてはメタゲノム解析と融合させた方向性が求められる。

E. 結論

クローン病における腸内細菌叢の特異性を多施設共同研究により tRFLP 法を用いて明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K, Fujiyama Y, Andoh A. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol. 2010 Jan 19. [Epub ahead of print]
- 2) Araki Y, Mukaisho K, Sugihara H, Fujiyama Y, Hattori T. Proteus mirabilis sp. intestinal microflora grow in a dextran sulfate sodium-rich environment. Int J Mol Med. 2010 Feb;25(2):203-8.
- 3) Andoh A, Ida S, Tsujikawa T, Benno Y, Fujiyama Y. Terminal restriction fragment polymorphism analyses of fecal microbiota in five siblings including two with ulcerative colitis. Clin J Gastroenterol. [published online 19 Sep 2009]
- 4) Nakase H, Fujiyama Y, Oshitani N, Oga T, Nonomura K, Matsuoka T, Esaki Y, Murayama T, Teramukai S, Chiba T, Narumiya S. Effect of EP4 agonist (ONO-4819CD) for patients with mild to moderate ulcerative colitis refractory to 5-aminosalicylates: A randomized phase II, placebo-controlled trial. Inflamm Bowel Dis. 2009 Sep 16. [Epub ahead of print]
- 5) Andoh A, Shioya M, Nishida A, Bamba S, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Fujiyama Y. Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. J Immunol. 2009 Jul 1;183(1):687-95.
- 6) Andoh A, Benno Y, Kanauchi O, Fujiyama Y.

Recent advances in molecular approaches to gut microbiota in inflammatory bowel disease.

Curr Pharm Des. 2009;15(18):2066-73.

- 7) Tsujikawa T, Andoh A, Inatomi O, Bamba S, Nakahara T, Sasaki M, Saito H, Fujiyama Y. Alendronate improves low bone mineral density induced by steroid therapy in Crohn's disease. Intern Med. 2009;48(12):933-7
- 8) Tsujikawa T, Andoh A, Ogaŵa A, Sonoda A, Yagi Y, Hata K, Sasaki M, Saito Y, Fujiyama Y. Feasibility of five days of consecutive leukocytapheresis for the treatment of ulcerative colitis: a preliminary study. Ther Apher Dial. 2009 Feb;13(1):14-8.
- 9) 安藤朗、藤山佳秀: 炎症性腸疾患における腸内細菌叢の変化—兄弟発症 UC 家系での解析を含めて。「大腸疾患 NOW 2010」、武藤徹一郎編、日本メディカルセンター（東京）、p206-211、2010
- 10) 安藤朗、藤山佳秀: 炎症性腸疾患—最新知見—、発症に関わる腸内細菌と治療標的としての可能性。最新医学、64(9): p1795-1799、2009
- 11) 安藤朗、藤山佳秀: 潰瘍性大腸炎をめぐる最近の話題、潰瘍性大腸炎の病態。Medico 40(9):339-341、2009

2. 学会発表

- 1) Bamba S, Shioya, M, Nishida A, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Fujiyama Y., Andoh A, Expression of interleukin-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. GASTRO 2009-UEGW/WCOG (London, UK) , Nov 25, 2009
- 2) Bamba S, Tsujikawa T, Inatomi O, Nakahara T, Koizumi Y, Saitoh Y, Sasaki M, Fujiyama Y., Andoh A. Factors affecting the efficacy of cyclosporin a therapy for refractory ulcerative colitis GASTRO 2009-UEGW/WCOG (London, UK), Nov 25, 2009
- 3) 伴 宏充、安藤 朗、藤山佳秀: ワークショップ「炎症性腸疾患治療における免疫抑制剤の位置づけ」 免疫調節剤の副作用と遺伝子多型の検

討. 第 51 回 日本消化器病学会大会 (京都)、平成 21 年 10 月 14 日

- 4) 辻川知之、斉藤康晴、藤山佳秀: パネルディスカッション「クローン病小腸病変の評価とその治療」 経肛門的バルーン小腸内視鏡による小腸潰瘍形状に基づいたクローン病治療. 第 95 回 日本消化器病学会総会 (札幌) , 平成 21 年 5 月 8 日

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

潰瘍性大腸炎における炎症性発癌早期病変 (dysplasia) と散発性腺腫との病理学的鑑別について

研究分担者 味岡 洋一 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：p53 蛋白過剰発現陰性の dysplasia (潰瘍性大腸炎の炎症性発癌早期病変) と潰瘍性大腸炎に偶発する散発性腺腫との病理学的鑑別にはアポトーシスが有用なマーカーになりうるかどうかを検討した。p53 蛋白過剰発現陰性の dysplasia でもその 70%以上では同遺伝子異常があり、p53 遺伝子変異のない散発性腺腫に比べアポトーシス数は有意に低値であった。ROC 曲線による cut off 値の検討では、アポトーシス数が 3/hpf (対物 40 倍) 以上では、陽性的中率 100%で散発性腺腫の診断が可能であった。

共同研究者

渡邊聡明¹⁾、岩永明人²⁾、渡辺 順²⁾

1) 帝京大学 2) 新潟大学大学院消化器・肝臓内科

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎 (UC) の大腸粘膜には、炎症性発癌の早期病変としての dysplasia の他に、散発性腺腫が偶発することがある。Dysplasia は原則的に腸切除の適応となるが、散発性腺腫は内視鏡的摘除により根治が期待できる。両者の病理組織学的鑑別は必ずしも容易ではないため、診断の補助的マーカーとして p53 免疫染色が用いられる。同染色で蛋白過剰発現陽性の場合には dysplasia、陰性の場合には散発性腺腫の可能性が高い。しかし dysplasia の中には p53 蛋白過剰発現が陰性のもも存在する。本研究では、p53 蛋白過剰発現陰性の dysplasia と散発性腺腫との鑑別に、正常 p53 蛋白の生理機能の一つであるアポトーシスの評価が有用かどうかを検討した。

B. 研究方法

ホルマリン固定 UC 合併大腸癌 15 例に随伴する dysplasia 25 病変 55 領域と、炎症性腸疾患を合併しない大腸の腺腫 38 病変 38 領域を対象とした。

p53 免疫染色 (mAb-PAb1801) によりそれぞれの領域の蛋白過剰発現を有無を判定し、TUNEL 法によりアポトーシスの数を算定した。アポトーシスの算定にはランダムに対物 40 倍 (hpf) 3 視野を選び、そ

の平均値をアポトーシス数とした。各領域の DNA を microdissection により抽出し、exon 5-8 を PCR により増幅の後、ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit と ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いてシーケンス解析を行った。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

- ① p53 過剰発現の有無：dysplasia では、p53 蛋白過剰発現陽性が 30/55 (55%)、陰性が 25/55 (45%) であった。散発性腺腫は全例蛋白過剰発現陰性であった。
- ② アポトーシス数 (/hpf)：p53 蛋白過剰発現陽性例 dysplasia で、 0.48 ± 0.64 、同陰性例で 0.20 ± 0.37 、散発性腺腫で 8.39 ± 12.01 であり、dysplasia と散発性腺腫との間には有意差があった ($p < 0.01$)。
- ③ dysplasia の p53 遺伝子変異：p53 蛋白過剰発現陽性の 24/27 (88.9%) と同陰性の 18/25 (72.0%) に p53 遺伝子変異がみられた。両者間に有意差はなかった。
- ④ dysplasia の p53 遺伝子変異パターン：p53 蛋白過剰発現陽性群と陰性群とで異なり、前者は 1 塩基置換を伴う missense mutation が 89%、wild type が 11% であったのに対し、後者では missense mutation が 32%、nonsense mutation が 12%、deletion が 20%、insertion が 8%、wild type が

28%であった。

- ⑤アポトーシス数のROC曲線:アポトーシス数のcut off値を3とし、それ以上を散発性腺腫とすると、感度57.5%、特異度100%、陽性的中率100%であった。

D. 考察

Dysplasia (炎症性発癌早期病変)ではp53蛋白過剰発現がみられないものが半数近く存在するが、その72%ではp53遺伝子異常があり、p53蛋白過剰発現陽性例と同様に、正常のp53蛋白により誘導されるアポトーシスの抑制が起きている。従って、UC粘膜に発生したp53蛋白過剰発現陰性の腫瘍性病変がdysplasiaか散発性腺腫かを鑑別するには、アポトーシスの算定が有用な診断補助手段になると考えられる。ROC曲線によるcut off値の検討では、アポトーシス数が3/hpfの病変は100%の陽性的中率で散発性腺腫の診断が可能であった。しかしアポトーシス数が3/hpf未満のものにはdysplasiaと散発性腺腫の両者が含まれ、これらを鑑別するマーカーの検討が課題として残された。

E. 結論

p53蛋白過剰発現陰性のdysplasiaと散発性腺腫との鑑別にはアポトーシスが有用なマーカーであり、アポトーシス数が3/hpfの病変は散発性腺腫と診断される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 味岡洋一、岩永明人、渡辺 順、他:coliticcancer 診療 update. I 発生 (1) 潰瘍性大腸炎合併腫瘍の発生—炎症性発癌と一般大腸腫瘍との差異について. INTESTINE 13: 233-240、2009

2. 学会発表

- 1) 横山純二、青柳 豊、味岡洋一: 潰瘍性大腸炎関

連腫瘍の内視鏡像の検討—サーベイランスにおける内視鏡検査の有用性と問題点. 第78回日本消化器内視鏡学会総会、京都、2009年10月15日.

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。癌胎児性抗原であるシアリルルイス x は E-セレクトインのリガンドで、その発現により癌細胞の転移能が亢進し、予後にも影響することがわかっている。我々は Sd^a 糖鎖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ことを明らかにしたが、シアリルルイス x は Sd^a 糖鎖と合成基質を競合するため、b1, 4GalNAcT2 のサイレンシングによって発現が亢進する。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、散発性大腸癌でシアリルルイス x の発現を比較した結果、癌組織だけでなく潰瘍性大腸炎粘膜においてもシアリルルイス x の発現が見られることがわかった。炎症に見られるこのような糖鎖不全は潰瘍性大腸炎における炎症発癌のリスク因子であるかもしれない。

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する大腸癌、散発性大腸癌におけるシアリルルイス x の発現を比較した。

B. 研究方法

凍結切片を用いて Sd^a 糖鎖、シアリルルイス x 糖鎖の発現を特異抗体による免疫染色で比較した。

(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

正常粘膜では訳 80%の症例が大腸で Sd^a 糖鎖を発現しているが、シアリルルイス x の発現は全く認められなかった。潰瘍性大腸炎粘膜で、上皮細胞における Sd^a 糖鎖の発現低下がみられ、これと相補的にシアリルルイス x の発現が見られる症例があった。潰瘍性大腸炎合併癌は 60%でシアリルルイス x が陽性であった。散発性大腸癌組織ではすべての症例で Sd^a 糖鎖が消失しており、シアリルルイス x の発現が確認された。

D. 考察

潰瘍性大腸炎炎症粘膜に見られる、Sd^a 糖鎖消失とシアリルルイス x 糖鎖発現といった糖鎖不全は、糖転移酵素の DNA メチル化によるサイレンシン機構によると考えられる。糖鎖不全は潰瘍性大腸炎にお

ける炎症発癌のリスク因子であるかもしれない。

炎症発癌における意義 第95回日本消化器病学会総会、札幌、2009年5月9日

E. 結論

潰瘍性大腸炎粘膜において癌組織と同様な糖鎖不全現象を見いだした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 河村 由紀、豊田 実、土肥 多恵子：消化管癌における糖鎖不全現象のメカニズムとしてのDNA高メチル化 分子消化器病6(1):99-101, 2009

2. 学会発表

国外

- 1) Kawamura YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Kawamura Y, Matsumoto T, Dohi T. DNA Hypermethylation Contributes to Incomplete Synthesis of the Sda Carbohydrate Antigen in Ulcerative Colitis-Associated Neoplasms But Not in Sporadic Colorectal Cancers. Digestive Disease Week 2009, Chicago, June 1, 2009

国内

- 1) Kawamura YI, Toyota M, Kawamura YJ, Konishi F, Saito Y, Yajima T, Hibi T, Matsumoto T, Imai K, Dohi T. Epigenetic change causes aberrant glycosylation in ulcerative colitis and colitic cancer The 4th Korea-Japan IBD Symposium. 東京 2010年1月23日
- 2) 河村由紀、豊田 実、河村 裕、小西文雄、斉藤幸夫、松本 誉之、鈴木 拓、今井浩三、土肥多恵子：炎症関連大腸癌では散発性大腸癌と同じ糖鎖不全が異なるメカニズムによりおこる。第51回日本消化器病学会大会、京都、2009年10月15日
- 3) 河村由紀、豊田 実、河村 裕、小西文雄、斉藤幸夫、鈴木 拓、今井浩三、土肥多恵子：DNAメチル化により引き起こされるSd^a糖鎖発現抑制の

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