

- 802-803: 2007.
32. Yoshino T, Nakase H, Ueno S, Uza N, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Ohmori K, Sakurai T, Nagayama S, Hasegawa S, Sakai Y, Chiba T. Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis* 13:1516-1521: 2007.
 33. Fukumoto A, Tanaka S, Yamamoto H, Yao T, Matsui T, Iida M, Goto H, Sakamoto C, Chiba T, Sugano K. Diagnosis and treatment of small-bowel stricture by double balloon endoscopy. *Gastrointest Endosc* 66:S108-112:2007.
 34. 仲瀬裕志, 千葉 勉: 消化器疾患 (炎症性腸疾患). 炎症と免疫 16(3):299-303: 2008.
2. 学会発表
1. Yoshino T, Nakase H, Matsumura K, Chiba T, et al. Regulation of activate macrophages by FK506 attenuates immune-mediated colitis. Digestive Disease Week and the 110th Annual Meeting of the AGA Institute, Chicago, 2009. 5. 30.
 2. Uza N, Nakase H, Chiba T. The Critical role of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Digestive Disease Week and the 110th Annual Meeting of the AGA Institute, Chicago, 2009. 6. 1.
 3. Ueno S, Nakase H, Chiba T. Activation of immune response by osteopontin prevents onset of spontaneous colitis. Digestive Disease Week and the 110th Annual Meeting of the AGA Institute, Chicago, 2009. 6. 1.
 4. Seno H: Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2-dependent alternative activation of macrophages. US-Japan GI Executive Meeting, Kyoto, 2009. 6. 19.
 5. Shuji Yamamoto, Hiroshi Nakase, Satoko Inoue, Sakae Mikami, Norimitsu Uza, Satoru Ueno, Tsutomu Chiba: Long-Term Outcome of Treatment with Tacrolimus Therapy in Patients with Ulcerative Colitis. Digestive Disease Week and the 109th Annual Meeting of the AGA Institute, San Diego(U.S.A.), 2008. 5. 17.
 6. Takuya Yoshino, Hiroshi Nakase, Shuji Yamamoto, Yasuhiro Takeda, Katsuhiko Kasahara, Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Sakae Mikami, Tsutomu Chiba: The Involvement of Cytomegalovirus in Patients with Intestinal Behcet's Disease. Digestive Disease Week and the 109th Annual Meeting of the AGA Institute, San Diego(U.S.A.), 2008. 5. 17.
 7. Takuya Yoshino, Hiroshi Nakase, Satoko Inoue, Hiroshi Kitamura, Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Sakae Mikami, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: The usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus in patients with UC refractory to immunosuppressive therapies. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, Washington DC, 2007. 5. 21.
 8. Tadayuki Kou, Hiroyuki Marusawa, Yoko Endo, Hiroshi Nakase, Shigehiko Fujii, Kazuo Kinoshita, Takahiro Fujimori, Tasuku Honjo, Tsutomu Chiba: Etopic expression of activation-induced cytidine deaminase in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, Washington DC, 2007. 5. 22.
 9. Akiyoshi Nishio, Masanori Asada, Keiichi Kiriya, Masahiro Kido, Takuji Akamatsu, Kazuyuki Saga, Junya Tanaka, Norihiko Watanabe, Tsutomu Chiba: Interleukin 10 is essential for prevention of murine autoimmune pancreatitis induced by poly I:C administration. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the

- American Gastroenterological Association Institute, Washington DC, 2007. 5. 23.
10. Hiroshi Kitamura, Hiroshi Nakase, Yasuhiro Takeda, Takuya Yoshino, Katsuhiko Kasahara, Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Satoko Inoue, Sakae Mikami, Minoru Matsuura, Yoshihiro Ishida, Kazuhiro Nagata, Tsutomu Chiba: The critical role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis associated with Inflammatory Bowel Diseases. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute • oral sessions, Washington DC, 2007. 5. 23.
 11. 中村文保、渡邊智裕、堀貴美子、三上栄、上田佳秀、仲瀬裕志、千葉勉。骨髄異形成症候群による腸炎の一例とその分子機序の解析。第46回日本消化器免疫学会総会・ポスターセッション, 2009. 7. 23.
 12. 吉野琢哉、仲瀬裕志、千葉勉。FK506のA20誘導による活性化マクロファージの制御について。第46回日本消化器免疫学会総会・シンポジウム, 2009. 7. 24.
 13. Tanaka J, Saga K, Kido M, Aoki N, Iwamoto S, Nishiura H, Chiba T, Watanabe N. Proinflammatory Th2 cytokines induce production of thymic stromal lymphopoietin in human colonic epithelial cells. 日本免疫学会総会 学術集会 2009・ワークショップ, 2009. 12. 2.
 14. 三上貴生、秋武玲子、上野哲、宮本心一、千葉勉：下痢・下血・発熱の原因がメサラジンの薬剤性アレルギーであった潰瘍性大腸炎の一例。日本消化器病学会近畿支部第90回例会, 大阪, 2009. 2. 14.
 15. Watanabe Tomohiro, Asano Naoki, Chiba Tsutomu, Strober Warren: Muramyl Dipeptide Activation of NOD2 Inhibits Multiple Toll-like Receptor Pathways via Induction of IRF4. 2008 日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 2008. 12. 1.
 16. 遠藤容子、丸澤宏之、木下和生、高忠之、藤井茂彦、藤盛孝博、千葉勉：炎症性腸疾患からの大腸発癌過程における Activation-induced cytidine deaminase (AID)の役割。第67回日本癌学会学術総会・ワークショップ, 名古屋, 2008. 10. 28.
 17. 玉置将司、三上 栄、上野 哲、秋武玲子、仲瀬裕志、千葉 勉：大腸全摘後に十二指腸炎および小腸炎をきたした潰瘍性大腸炎の1例。日本消化器病学会近畿支部第89回例会, 大阪, 2008. 9. 27.
 18. 渡邊智裕、千葉 勉：NOD2の活性化を用いたクローン病の新たな免疫制御療法。第45回日本消化器免疫学会総会, 京都, 2008. 7. 3.
 19. Tomohiro Watanabe, Naoki Asano, Tsutomu Chiba, Warren Strober: Muramyl Dipeptide Activation of Nucleotide Binding Oligomerization Domain 2 Protects Mice from Experimental Colitis. 13th US-Japan GI&Liver Meeting in 21st Century, 東京, 2008. 6. 13.
 20. 武田康宏、仲瀬裕志、千葉 勉：IL-10は分子シャペロンHsp47の発現を制御し、腸管炎症に伴う線維化を抑制する。第94回日本消化器病学会総会, 福岡, 2008. 5. 8.
 21. 吉野琢哉、仲瀬裕志、千葉 勉：難治性潰瘍性大腸炎におけるサイトメガロウイルス感染 早期診断のための real-timePCR 法の有用性について。第104回日本内科学会講演会・一般演題ポスターセッション, 大阪, 2007. 4. 3.
 22. 上野 哲、仲瀬裕志、千葉 勉：Bifidobacterium longum (BB-536)の腸管上皮バリアー機能に対する作用の検討。第93回日本消化器病学会総会・シンポジウム, 青森, 2007. 4. 19.
 23. 仲瀬裕志、宇座徳光、千葉 勉：免疫抑制剤投与による難治性クローン病患者に対する長期緩解維持効果。第93回日本消化器病学会総会・パネルディスカッション, 青森, 2007. 4. 21.
 24. 吉野 琢哉、仲瀬 裕志、千葉 勉：難治性潰瘍性大腸炎に合併するCMV感染の正確な診断を目指してー内視鏡かPCR法か?ー。第73回日本消化器内視鏡学会総会・パネルディスカッション, 東京, 2007. 5. 10.
 25. 三上 栄、山本修司、仲瀬裕志：難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムス治療の位置づけ。第87回日本消化器病学会近畿支部例会, 大阪,

2007. 9. 8.

26. 武田康宏、仲瀬裕志、千葉 勉：粘膜免疫制御の観点からみた *Bifidobacterium longum*(BB536)のIBDに対する治療機序の解明. 第49回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 神戸, 2007. 10. 18.
27. 渡邊智裕、千葉 勉：NOD2の活性化による腸管免疫の制御機構. 第49回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 神戸, 2007. 10. 18.
28. 吉野琢哉、仲瀬裕志、千葉 勉：炎症性腸疾患に合併するCMV感染の早期診断法の確率にPCRは有用か? 第49回日本消化器病学会大会・ワークショップ, 神戸, 2007. 10. 18.
29. Tanaka Junya, Watanabe Norihiko, Kido Masahiro, Saga Kazuyuki, Akamatsu Takuji, Nishio Akiyoshi, Chiba Tsutomu: Human TSLP enhances TLR-ligand-mediated IL-23 production by myeloid dendritic cells and has a potential to induce Th17 inflammatory responses. 2007 日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007. 11. 20.
30. Kido Masahiro, Watanabe Norihiko, Tanaka Junya, Akamatsu Takuji, Nishio Akiyoshi, Chiba Tsutomu: *Helicobacter* triggers gastric epithelial cells to produce TSLP which induces DC-mediated inflammatory Th2 responses. 2007 日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007. 11. 20.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

腸炎惹起性記憶 CD4⁺T 細胞をターゲットとした炎症性腸疾患新規治療法の開発

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：我々はこれまでに炎症性腸疾患 (IBD) 難治性の病因として、疾患フェノタイプを“記憶”し、生涯にわたり生体内に潜在し続ける“炎症性腸疾患記憶 CD4⁺T 細胞”に着目してきた。今回我々は本細胞をターゲットとした疾患記憶を“リセット”する画期的根治療法の開発を目指し、以下のアプローチを試みた。(1) 腸炎惹起性記憶 CD4⁺T 細胞の老化促進を応用した新規治療法の開発：炎症性腸疾患の原因である腸炎惹起性 CD4⁺T 細胞は、長期生存によりその腸炎惹起性 CD4⁺T 細胞を抑制する制御性 CD4⁺T 細胞に変化し、その制御性 CD4⁺T 細胞は共移入することにより腸炎発症を抑制することを見いだした。(2) IL-7/IL-7R シグナルによる炎症性腸疾患記憶 CD4⁺T 細胞維持機構の解明：腸炎惹起性記憶 CD4⁺T 細胞の重要な維持因子である IL-7/IL-7 受容体 (IL-7R) シグナルに着目し、IL-7/IL-7R シグナルターゲット療法の実現化のために、腸炎モデル CD4⁺T 細胞および CD4⁺細胞における IL-7/IL-7R シグナル重要性の比較検討を行った。正常マウスおよび腸炎マウスにおいて IL-7R α は血球系細胞に広く発現していたが、CD4⁺T 細胞に最も高発現していた。CD4⁺T 細胞のみ IL-7R α を欠損させたマウスでは腸炎の発症が見られなかったが、CD4⁺T 細胞以外の IL-7R α を欠損させたマウスでは腸炎の発症が見られた。以上の結果から IBD の遷延性における重要な因子である IL-7/IL-7R シグナルには CD4⁺T 細胞における IL-7R α 発現が必須であり、他の細胞における IL-7R α の発現は必須ではない事がわかった。炎症性腸疾患の分子ターゲット療法として CD4⁺T 細胞における IL-7/IL-7R シグナル阻害が有力な標的となり得ることが示唆された。

共同研究者

根本泰宏、戸塚輝治

東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

A. 研究目的

IBD は、再燃と緩解を繰り返し生涯にわたり治療の継続を余儀なくされる難病である。近年我が国の患者数は増加の一途をたどるが、未だに原因不明で根本的な治療がなく、病態解明と新規治療法の開発は社会的にも重要な責務である。我々は本疾患を単なる消化管の炎症としてとらえるのではなく、疾患を“記憶”した、腸内細菌抗原に過剰に反応する病原性記憶 CD4⁺T 細胞が全身に播種された“良性白血病”ともいふべき全身性疾患と捉える概念を提唱してきた。我々の研究の最終目

的は炎症性腸疾患における全身性病原性記憶

CD4⁺T 細胞をターゲットとした、疾患の“記憶”

を“リセットする”究極の根治療法の開発である。

このような最終目的に向けて今回我々は以下のアプローチを試みた。

(1) 腸炎惹起性免疫記憶 CD4⁺T 細胞の老化促進を応用した新規治療法の開発

炎症性腸疾患の原因として炎症惹起性 CD4⁺T 細胞が広く知られているが、長期生存した腸炎惹起性 CD4⁺T 細胞がどのような形質を獲得するかは不明である。そこで我々は、CD4⁺CD45RB^{high} 移入大腸炎を作製し、大腸炎を発症したマウスの大腸より取り出した lamina propria (LP) CD4⁺T 細胞を再度免疫不全マウスの腹腔内に移入、LPCD4⁺T 細胞移入を繰り返す事により長期生存炎症惹起性

CD4⁺T 細胞を作製、この細胞の機能について検討した。

(2) IL-7/IL-7R シグナルによる炎症性腸疾患記憶 CD4⁺T 細胞維持機構の解明

我々は今までに主に IBD における病原性記憶 CD4⁺T 細胞の維持機構について以下の点を解明してきた。(1)腸炎モデルマウスにおいて病原性記憶 CD4⁺T 細胞が腸管に多数浸潤し、骨髄など全身のリンパ装置によって維持されている。(2)病原性記憶 CD4⁺T 細胞は IL-7R を高発現し、*in vitro* および *in vivo* において IL-7 依存的に維持される。

元来 IL-7R は主にリンパ球に発現しており、IL-7/IL-7R シグナルも胸腺細胞や、T 細胞、B 細胞のみに関わると考えられてきた。しかし近年樹状細胞における IL-7/IL-7R シグナルの重要性が報告され (Guimond M. et al, Nat Immunol 2008) 非リンパ球におけるその意義が注目されている。我々はこれまでに全身の IL-7 が存在しないモデルや (Totsuka T, et al. J Immunol 2007) 全身の IL-7R を中和する実験を行い (Yamazaki M, et al. J Immunol 2003)、その腸炎抑制効果を報告してきたが、このような背景を元に、より有効な治療標的細胞の検索、より安全で確実な治療法の開発のために、改めて CD4⁺T 細胞と CD4 細胞の IL-7/IL-7R シグナルを分けて検討する必要性があると考えた。

B. 研究方法

(1) 腸炎惹起性免疫記憶 CD4⁺T 細胞の老化促進を応用した新規治療法の開発

大腸炎を発症したマウスの大腸より取り出した LPCD4⁺T 細胞を再度免疫不全マウスの腹腔内に移入、LPCD4⁺T 細胞移入を繰り返し、大腸炎の発症を経時的に検討した。また、同時に IFN- γ 、TNF- α 、IL-17 などの Th1、Th17 サイトカインの産生能を検討した。次に LPCD4⁺T 細胞移入を繰り返し 7 世代で腸炎未発症マウス LPCD4⁺T 細胞、1 世代で腸炎を発症したマウス LPCD4⁺T 細胞を naïve CD4⁺CD45RB^{hi}ThT 細胞と共移入し、腸炎抑制能を検討した。

(2) IL-7/IL-7R シグナルによる炎症性腸疾患記憶 CD4⁺T 細胞維持機構の解明

1、正常および腸炎マウスにおける各細胞の IL-7R 発現の検討

正常マウスおよび CD4⁺CD25⁺T 細胞移入大腸炎マウスの脾臓および大腸腸管粘膜内リンパ球を採取し、血球系細胞表面マーカー (CD3, CD4, Gr-1, CD11b, CD11c, NK1.1, NKp46) と IL-7R α をフローサイトメトリーで検討する。

2、CD4⁺T 細胞特異的 IL-7R 欠損マウスにおける IBD の誘導

① IL-7R α ^{-/-}マウスおよび正常マウスより CD4⁺T 細胞の表面マーカー (CD62L, CD44, CD45RB 等 メモリー/ナイーブマーカー、CD69, CD25 などの活性化マーカー、CD25, Foxp3 等の制御性 T 細胞マーカー、Bcl-2, Bcl-xL など抗アポトーシス分子、TCR V β レパトアシリーズ) を比較検討する。

② IL-7R α ^{-/-}マウスおよび正常マウス脾臓より CD4⁺CD25⁺T 細胞を採取後、RAG2^{-/-}マウスに移入し 8 週間後に解析。腸炎スコア、病理スコア、各臓器の細胞数、細胞のメモリーフェノタイプ、V β レパトア、IL-7R、腸管粘膜内 CD4⁺T 細胞のサイトカイン分泌能等を解析する。

3、非 CD4⁺細胞 IL-7R 欠損マウスにおける IBD の誘導

① IL-7R α ^{-/-}マウスと RAG2^{-/-}マウスを交配し、IL-7R α ^{-/-}, RAG2^{-/-}マウスを作製する。

② 正常マウス脾臓より CD4⁺CD25⁺T 細胞を採取後、RAG2^{-/-}マウスおよび IL-7R α ^{-/-}, RAG2^{-/-}マウスに移入し 8 週間後に解析。腸炎スコア、病理スコア、各臓器の細胞数、細胞のメモリーフェノタイプ、V β レパトア、IL-7R、腸管粘膜内 CD4⁺T 細胞のサイトカイン分泌能等を解析する。

(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、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。

C. 研究結果

(1) 腸炎惹起性免疫記憶 CD4⁺T 細胞の老化促進を応用した新規治療法の開発

LPCD4⁺T 細胞移入を繰り返すことで、腸炎発症までの期間が延長し、6 世代までは全例腸炎を発症したが 7 世代以降は腸炎未発症マウスが出現し大腸炎発症率も減少した。また、7 世代マウスは、Th1、Th17 サイトカイン産生が低下した。1 世代 LPCD4⁺T 細胞を共移入した群は腸炎を発症したが、腸炎未発症 7 世代 LPCD4⁺T 細胞を共移入した群は腸炎を発症しなかった。

(2) IL-7/IL-7R シグナルによる炎症性腸疾患記憶 CD4⁺T 細胞維持機構の解明

1、腸炎マウス腸管において CD4⁺T 細胞が最も IL-7R α を高発現していた

正常マウス、腸炎マウスともに脾臓、大腸粘膜において IL-7R α は樹状細胞、マクロファージ、NK 細胞等に広く発現していたが CD4⁺T 細胞に最も高発現していた。さらに腸炎の発症に伴い、ほとんどの細胞の IL-7R α 発現が減弱するのに対して、CD4⁺T 細胞では著しい発現亢進がみられた。

2、CD4⁺T 細胞特異的 IL-7R 欠損マウスでは大腸炎は発症しなかった

IL-7R α ^{-/-}マウスでは脾臓および大腸粘膜における CD4⁺T 細胞数の著明な減少と CD4⁺T 細胞の Bcl-2 の発現低下が見られたが CD25, Foxp3, Vb レパトアに大きな差は見られなかった。

IL-7R α ^{-/-}マウス CD4⁺CD25⁺T 細胞移入群では腸炎の発症は見られず、正常マウス CD4⁺CD25⁺T 細胞移入群に比して腸炎スコア、病理スコア、各臓器の細胞数、サイトカイン分泌能全て減少していた。

3、CD4⁺細胞 IL-7R 欠損マウスでは大腸炎が発症した

CD4⁺CD25⁺T 細胞を移入した IL-7R α ^{-/-}, RAG2^{-/-}マウスでは RAG2^{-/-}レシピエント群と同等の大腸炎の発症が見られた。IL-7R α ^{-/-}, RAG2^{-/-}レシピエント群では病理スコア、各臓器の細胞数、サイトカイン分泌能全て RAG2^{-/-}レシピエント群に比して有意差は見られなかった。

D. 考察

腸炎惹起性記憶 CD4⁺T 細胞老化機構の検討においては、炎症性腸疾患の病因となる病的 CD4⁺T 細胞が、その病的 CD4⁺T 細胞を抑制する制御性 CD4⁺T 細胞に変化し、その制御性 CD4⁺T 細胞が腸炎発症を抑制することを見いだした。

一方 IL-7/IL-7R シグナルの検討では、正常および腸炎マウスにおける血球系細胞の IL-7R 発現の検討では非 CD4⁺細胞にも広く IL-7R α は発現していたが、CD4⁺T 細胞において最も高発現していた。更に重要なことに、腸炎の発症とともにほとんどの細胞の IL-7R α 発現が低下するのに対して、CD4⁺T 細胞では著明な発現の亢進が見られた。このことは腸炎発症時の腸管粘膜内 CD4⁺T 細胞における IL-7/IL-7R シグナルの重要性を示唆すると思われる。

IL-7R α ^{-/-}マウスでは CD4⁺T 細胞における重要な維持因子である IL-7/IL-7 シグナルが欠損するために、各臓器における CD4⁺T 細胞数の著明な減少と CD4⁺T 細胞の Bcl-2 の発現低下が見られた。しかし CD25, Foxp3, Vb レパトアに大きな差は見られなかったことから、細胞数をそろえれば正常マウス CD4⁺T 細胞とその腸炎誘導能を比較検討可能と考え、移入実験を行った。予想通り CD4⁺CD25⁺T 細胞移入群では腸炎の発症は見られず、CD4⁺T 細胞上の IL-7R α が腸炎の発症に必須であることが改めて直接証明された。

CD4⁺CD25⁺T 細胞を移入した IL-7R α ^{-/-}, RAG2^{-/-}マウスでは RAG2^{-/-}レシピエント群に比して腸炎スコア、病理スコア、各臓器の細胞数、サイトカイン分泌能等高い傾向が見られるものの、有意差は得られなかった。このことは CD4⁺T 細胞の IL-7R α 発現さえあれば CD4⁺細胞における IL-7/IL-7R シグナルの影響はほとんどないことを示唆する。

E. 結論

本検討は炎症性腸疾患の病因となる病的 CD4⁺T 細胞が、その病的 CD4⁺T 細胞を抑制する制御性 CD4⁺T 細胞に変化したことを示した世界初の研究成果である。

また炎症性腸疾患の遷延性における重要な因子である IL-7/IL-7R シグナルには CD4⁺T 細胞における IL-7R α 発現が必須であり、他の細胞における IL-7R α の発現は必須ではない事がわかった。炎症性腸疾患の分子ターゲット療法として CD4⁺T 細胞における IL-7/IL-7R シグナル阻害が有力な標的となり得ることが示唆された。今後はドラッグデリバリー等を工夫し、CD4⁺T 細胞 IL-7R α にターゲットを絞った、より特異的な治療法の開発を目指す。

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 α /NF κ 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 診療のシンポと近未来像—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って～, 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

炎症性腸疾患の病態における CD14 陽性腸管マクロファージおよび Th17 免疫応答の関与

研究分担者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部内科学 教授

研究要旨: 近年、数々の炎症性疾患において、Th1、Th2 に続く第3のヘルパーT細胞サブセットとして、IL-17を産生する Th17 の重要性が提唱されている。炎症性腸疾患においては、従来よりクローン病(CD)では Th1 型の免疫応答を示すと報告され、IL-17 が双方の疾患で増加していることも既に報告されているが、Th1/Th17 双方についての検討は不十分である。そこで今回の研究では、炎症性腸疾患における Th1/Th17 バランスを明らかにし、同時にこれを制御するメカニズムについて検討を加えた。炎症性腸疾患の粘膜固有層単核細胞での解析では、CD では Th1、潰瘍性大腸炎 (UC) では Th17 優位になっていることが示され、この制御に IL-23 が重要な役割を担っていることが示唆された。さらにマウスモデルを用いて正常腸管粘膜および慢性炎症腸管における Th17 の免疫病態を追究し、CD4+CD45RBhigh T 細胞移入大腸炎モデル炎症大腸においては IFN- γ 産生細胞の優位性を、IL-10 欠損マウス炎症大腸では Th1 細胞 (IFN- γ 産生細胞)および Th17 細胞 (IL-17 産生細胞) が混在していることが明らかとなり、また、腸管 Th17 細胞は LT α 発現 LTi 細胞によって誘導されることが示唆された。これまで病的と考えられてきた新たな Th17 細胞には、未解決な複雑性が潜在すると考えられた。

一方、腸管特異的抑制性免疫システムにおいて、腸管マクロファージ(M ϕ)が重要な役割を担っていること、腸管 M ϕ の抑制能の破綻は腸内細菌に対する過剰な免疫応答を惹起し、炎症性腸疾患のような腸管慢性炎症の引き金となることに着目し、CDの腸管粘膜において自然免疫関連受容体である CD14 を高発現した特殊な M ϕ を同定した。本細胞は腸内細菌刺激により過剰な IL-23 産生することで、腸管 T 細胞の過剰な活性化を誘導することが明らかになった。また、CD 腸管 M ϕ では TL1A も高発現しており、TL1A が腸管 T 細胞の活性化において IL-23 と協調的に働くことが示唆された。さらに IFN- γ は腸管 M ϕ の分化に影響を及ぼし、IFN- γ 存在下で分化誘導された M ϕ は IL-23 高産生炎症性 M ϕ となり、IL-23 を介してさらに IFN- γ 産生を亢進させ、CD 腸管粘膜局所では、腸管 M ϕ を中心とし構築された炎症性フィードバックサイクルが病態形成に深く関与していると考えられた。

共同研究者

三上洋平¹、筋野智久¹、鎌田信彦¹、小林 拓¹、久松理一¹、岡本 晋¹、井上 詠²、金井隆典¹、緒方晴彦²、岩男 泰²

1 慶應義塾大学医学部消化器内科

2 同 内視鏡センター

A. 研究目的

炎症性腸疾患はこれまでの幾多の研究にもかかわらず、いまだ原因不明であるが、これまでにその病態形成に

種々の免疫異常が関わっていることが報告されている。特に粘膜固有層の CD4 陽性ヘルパーT細胞の機能異常は1990年代に報告され、クローン病(CD)においては典型的Th1優位、潰瘍性大腸炎ではTh2-likeや混合型と称されてきた。しかし近年IL-17を高産生するTh17の重要性が多く炎症性疾患で報告されており、炎症性腸疾患においても粘膜内のIL-17発現が亢進していることはすでに示されている。ところがマウスを中心とした今までの研究ではTh1とTh17は互いに拮抗的に制御されると報告されており、また、helperT細胞に

特化した形での IL-17 産生の検討 (=Th17 の発現そのもの)は未だ明確にはされていないことから、Th1/Th17 バランスとして病態をとらえる必要がある。それに加えて、IL-12 ファミリーとくに IL-23 が Th1/Th17 をいかに制御しているのかについても解析を行った。

一方、常に食餌抗原や腸内細菌に曝されている腸管粘膜では、それらの抗原に対して過剰な免疫反応を誘導するのは好ましくなく、むしろ恒常性を保つため過剰な免疫反応を抑制的に制御する機構が存在すると考えられる。近年、この腸管の低反応性を説明する機序として腸管の自然免疫をつかさどるマクロファージ (Macrophage; Mφ) の特殊性が明らかとなってきた。近年、ヒト腸管粘膜に存在する Mφ は細菌の食食・処理能は有しているものの、CD14 などの自然免疫関連分子の発現を欠き、腸内細菌に対して低応答となっていることが報告された。一方で、炎症性腸疾患では、腸管 Mφ の腸内細菌に対する免疫寛容が破綻し、過剰な炎症反応を惹起すると考えられる。しかしながら、ヒト炎症性腸疾患の病態における腸管粘膜 Mφ の役割は未だ不明な点も多く残されている。これまでの報告で、炎症性腸疾患患者腸管粘膜では CD14 陽性の Mφ サブセットが存在していることが明らかになっている。そこで今回、我々は、ヒト腸管粘膜に存在する CD14 陽性 Mφ サブセットに注目し、本サブセットの炎症性腸疾患への関わりを追究した。

B. 研究方法

a : 炎症性腸疾患における Th1/Th17 バランスとその制御

①ヒト炎症性腸疾患患者粘膜における IL-17/IFN- γ /IL-12p40/p35/IL-23p19 の発現 (RT-PCR 法) を、手術検体の粘膜層を採取し、RNA を抽出した上で RT-PCR 法にて検討した。

②ヒト炎症性腸疾患患者粘膜固有層 CD4T 細胞における IFN- γ /IL-17 の発現を、手術検体の粘膜固有層単核細胞をコラゲナーゼ処理にて分離採取したのち、CD4 陽性細胞を magnetic sorting にて分離し、RT-PCR 法にて検討した。

③ヒト炎症性腸疾患患者腸管組織中の IL-17 の局在を確認するため、抗 CD4、抗 IL-17 で蛍光 2 重免疫染色を行った。

④ヒト炎症性腸疾患患者粘膜固有層単核細胞からの、IL-23 による IFN- γ /IL-17 産生増加を ELISA 法、cytokine secretion assay (Miltenyi Biotec) にて解析した。

⑤CD4+CD45RB^{high} T 細胞移入モデルと IL-10 欠損マウスという異なるマウスモデルより、Ly5.1/Ly5.2 マーカーの相違で識別可能なシステムで、RAG-2 欠損マウスに共移入する方法を考案し、腸炎惹起性 Th1 と Th17 の関係を検討した。

⑥GALT は存在しないが、ROR γ t を正常に発現する LT α 欠損マウスに着目し、LT α が欠損した LTi 細胞が Th17 細胞産生にいかなる作用を及ぼすかを追求した。

b : CD14 陽性腸管マクロファージのクローン病病態への関与

①大腸粘膜正常部、潰瘍性大腸炎、およびクローン病腸管粘膜より粘膜固有層単核細胞 (lamina propria mononuclear cells; LPMC) を分離し、フローサイトメトリーにより、CD14 陽性 Mφ サブセットの存在割合、表面抗原発現解析を行った。

②LPMC より CD14 陽性 Mφ を単離し、腸内細菌抗原である *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) のにより刺激し、産生されるサイトカインを測定した。

③LPMC, CD14 陽性細胞除去 LPMC を *E. faecalis* にて刺激し、産生されるサイトカインを測定した。

④LPMC より CD4 陽性 T 細胞を単離し、CD14 陽性 Mφ 由来の炎症性サイトカインである IL-23, TNF- α , TL1A により刺激し、産生されるサイトカインを検討した。 δ LPMC の培養上清を単球から Mφ の *in vitro* での分化時に添加し、炎症環境の Mφ 分化に対する影響について検討した。

C. 研究結果

a : 炎症性腸疾患における Th1/Th17 バランスとその制御

①粘膜における IL-17 発現は UC, CD ともに有意に高値であった。IL-12p40 は UC/CD 双方で、IL-12p35 は CD

のみで、IL-23p19はUC/CD双方で高かった。

②CD4陽性細胞においてmRNAの発現は、IFN- γ はCDのみ、IL-17はUCのみで亢進していた。

③IL-17は主としてCD4陽性T細胞に発現していたが、それ以外にも局在を認めた。

④IL-23によるIL-17の増加はUCで有意に大きかった。また、IL-23はT細胞、NK細胞からのIFN- γ の産生も増加させた。

⑤CD4+CD45RB^{high}T細胞移入大腸炎モデル炎症大腸においてはIFN- γ 産生細胞の優位性を明らかとした。もう一つのクローン病モデルである、IL-10欠損マウス炎症大腸ではTh1細胞(IFN- γ 産生細胞)およびTh17細胞(IL-17産生細胞)が混在するモデルであった。CD4+CD45RB^{high}T細胞移入大腸炎モデル(Ly5.1由来T細胞移入)およびIL-10欠損マウス(Ly5.2由来)炎症大腸より分離したCD4T細胞を同一のRAG-2欠損マウスへ移入したところ、CD4+CD45RB^{high}T細胞移入大腸炎のTh1減弱およびIL-10欠損マウスのTh1とTh17減弱を認めた。

⑥LT α KOマウスでは腸管Th17細胞が欠損するにも関わらず、IL-17産生CD3陰性細胞が著明に増加していることが明らかとなった。また、IL-17産生CD3陰性細胞はCD3-B220-CD11c-NK1.1-のlymphoid tissue inducer(LTi)細胞であることが証明された。

b: CD14陽性腸管マクロファージのクローン病病態への関与

①炎症性腸疾患患者、特にクローン病患者腸管粘膜においてCD14陽性細胞が著明に増加していた。

②クローン病腸管粘膜より単離したCD14陽性M ϕ は、正常部腸管粘膜や潰瘍性大腸炎患者由来の同一サブセットと比較して、腸内細菌刺激により、多量のIL-23、TNF- α を産生することが示された。またTL1Aは転写レベルで著名な誘導が認められた。

β クローン病患者由来LPMCを腸内細菌抗原刺激することにより、クローン病由来LPMCから多量のインターフェロンIFN- γ 産生誘導が認められた。一方で、Th17サイトカインであるIL-17の産生誘導は認められなかった。この腸内細菌刺激によるIFN- γ 産生はCD14陽性M ϕ を除去したLPMCでは認められなかった。

④単離した粘膜固有層T細胞を用いた実験の結果、T

細胞からのIFN- γ 産生には、CD14陽性M ϕ から産生されるIL-23、TNF- α が関与していることが示された。TL1Aは単独ではTh1/Th17サイトカイン誘導効果は認められなかったがIL-23との相乗作用が認められた。

⑤クローン病患者由来LPMCの培養上清をM ϕ のin vitroでの分化時に添加することでIL-23高産生型の炎症性M ϕ が誘導された。LPMCからIFN- γ を中和除去することによりM ϕ 異常分化は抑制された。

D. 考察

a: 炎症性腸疾患におけるTh1/Th17バランスとその制御

今回の検討においても、従来の報告と同様に、粘膜固有層CD4+T細胞について、CDがTh1優位の免疫応答を示していることが確認された。一方でTh17はむしろUCで強調されていることが示された。CDにおいては、T-betやIFN- γ 、IL-12といったTh1応答が優位になっていることがIL-17発現を抑制している可能性が考えられる。

また、マウスを対象とした近年の研究から、IL-23はTh17を刺激する代表的なサイトカインと考えられているが、今回ヒト炎症性腸疾患粘膜固有層T細胞やNK細胞からのIFN- γ 産生も増加させることが明らかになったことは、抗IL-17抗体や抗IL-23p19抗体の新規治療としての可能性を検討する上で示唆に富むものと考えられる。

一方で、マウスにおける炎症腸管および正常腸管の解析から、腸炎惹起性のTh1とTh17細胞が生体内で競合していること、腸管Th17細胞はLT α 発現LTi細胞によって誘導されることが示唆された。

b: CD14陽性腸管マクロファージのクローン病病態への関与

本研究により、炎症性腸疾患、特にクローン病における腸管M ϕ の病的役割が明らかとなった。また、CD14陽性腸管M ϕ から産生されるIL-23が、クローン病の腸管炎症において重要な役割を担っていることが示唆された。IL-23は、その受容体の変異が炎症性腸疾患の罹患リスクを減少させることが報告され、炎症性腸疾患の責任因子の1つとして注目されている。IL-23はIL-17の産生を特徴とするTh17型免疫の活性化因子で

あり、Th17 型の炎症性免疫反応において中心的役割を担っていると考えられる。しかしながら、本研究において、CD14 陽性腸管 Mφ から産生される IL-23 は IL-17 の産生を誘導せず、むしろ Th1 サイトカインである IFN- γ の産生を強く誘導することが明らかとなった。さらに、クローン病腸管炎症局所で産生誘導されている IFN- γ は、Mφ 分化に影響を及ぼし、IL-23 高産生型の炎症性 Mφ を誘導することが示された。

以上のように、クローン病腸管炎症局所では、CD14 陽性腸管 Mφ が炎症反応の中心を担っていることが示唆された。腸管 Mφ が産生する IL-23 は TNF- α や TLIA と協調して働き、主に腸管粘膜固有層の T 細胞からの IFN- γ 産生を誘導し、クローン病の Th1 型炎症性免疫反応を主体とする腸管炎症を亢進させると考えられる。さらにこの IFN- γ 優位な炎症環境は腸管 Mφ の分化に影響を及ぼし、IFN- γ 存在下で分化誘導された Mφ は IL-23 高産生炎症性 Mφ となる。その結果、異常分化を遂げた腸管 Mφ は IL-23 を介して更なる Th1 型炎症性免疫反応の活性化、慢性持続化を引き起こすと考えられる。

E. 結論

炎症性腸疾患粘膜固有層ヘルパー T 細胞サブセットを検討したところ、CD では Th1、UC では Th17 優位になっていることが示され、この制御に IL-23 が重要な役割を担っていることが示唆された。また、これまで病的と考えられてきた新たな Th17 細胞には、未解決な複雑性が潜在し、今後の研究の推移により慎重にその役割を見極め、炎症性腸疾患の病態解明へと展開するべきであると考えられた。さらに CD 腸管炎症局所では、CD14 陽性腸管 Mφ が IL-23-IFN- γ の炎症性サイクルを構築し、腸管局所炎症の慢性・持続化に寄与してい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

Matsuoka K, Hibi T et al.: Cytomegalovirus is frequently reactivated and disappears without

antiviral agents in ulcerative colitis patients. *Am J Gastroenterol* 102 (2): 331-337, 2007

Kobayashi T, Hibi T et al.: Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+T cell in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* 13 (7): 837-846, 2007

Yoshizawa S, Hibi T et al.: Clinical significance of serum p53 antibodies in patients with ulcerative colitis and its carcinogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 13 (7): 865-873, 2007

Kobayashi K, Hibi T et al.: Development of consensus statements for the diagnosis and management of intestinal Behçet's disease using a modified Delphi approach. *J Gastroenterol* 42 (9): 737-45, 2007

Chinen H, Hibi T et al.: Lamina propria c-kit+immune precursors reside in human adult intestine and differ into natural killer cells. *Gastroenterology* 133 (2): 559-573, 2007

Ishikawa H, Hibi T et al.: Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol Rev* 215: 154-165, 2007

Nanno M, Hibi T et al.: Exacerbating role of gammadelta T cells in chronic colitis of T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* 134 (2): 481-490, 2008

Kamada N, Hibi T et al.: Non-pathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 76 (1): 214-220, 2008

Matsumoto T, Hibi T et al.: Endoscopic and chromoendoscopic atlas featuring dysplastic lesions in surveillance colonoscopy for patients with long-standing ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 14 (2): 259-64, 2008

Sakuraba A, Hibi T et al.: A Pilot open-labeled prospective randomized study between weekly and intensive treatment of granulocyte and monocyte

adsorption apheresis for active ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 43(1):51-56, 2008

Takaishi H, Hibi T et al.: Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 2008 in press

緒方晴彦、日比紀文: IV. カプセル内視鏡の特徴と診断法 日本大腸肛門病学会雑誌 60 (10): 947-951, 2007

日比紀文、長沼 誠: 炎症性腸疾患に対する新しい治療戦略 日本内科学会雑誌 96 (5): 997-1005, 2007

鎌田信彦、日比紀文 他: 腸管粘膜マクロファージによる腸管ホメオスタシスとその破綻. 分子消化器病 4 (2): 104-109, 2007

日比紀文、中澤敦: 腸内細菌と腸管免疫. 医学のあゆみ 221 (11): 907-911, 2007

佐藤俊朗、伊達昌一、日比紀文: 消化管上皮幹細胞 G. I. Research 15 (4): 263-267, 2007

緒方晴彦、日比紀文: 炎症性腸疾患診療の進歩と今後の展望 日本消化器病学会雑誌 104 (8): 1155-1164, 2007

鎌田信彦、日比紀文 他: IL-10 産生性抑制性腸管マクロファージの特殊性と IBD 治療へのアプローチ *IBD Research* 1 (3): 189-194, 2007

日比紀文: 特集/炎症性腸疾患における AZA/6-MP の役割 臨床消化器内科 22 (10): 1549-1550, 2007

鎌田信彦、日比紀文 他: クローン病の発症と樹状細胞様マクロファージからの IL-23 臨床免疫・アレルギー科 49 (1): 36-41, 2008

久松理一、日比紀文 他: 3. 腸管免疫研究の最前線 - 腸管の恒常性維持と炎症性腸疾患におけるその破綻 - 1. 消化管. *Annual Review 消化器* 2008: 13-18, 2008

Andou A, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Kobayashi T, Okutsu T, Takeda T, Hashimoto M, Sato A, Ohtsu H, Suzuki M, and Hibi T: Dietary Histidine Uptake Ameliorates IL-10-Deficient Cell Transfer Murine Colitis by Inhibition of Pro-inflammatory Cytokine Production from

Macrophages. *Gastroenterology* 2008 in press

Ichikawa H, Okamoto S, Kamada N, Nagamoto H, Kitazume MT, Kobayashi T, Chinen H, Hisamatsu T, Hibi T: Tetomilast suppressed production of proinflammatory cytokines from human monocytes and ameliorated chronic colitis in IL-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*. 14(11): 1483-1490, 2008

Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T: IL-23 differently regulates Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57(12): 1682-1689, 2008

Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T: Unique CD14-positive intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn's disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*. 118(6): 2269-2280, 2008

鎌田信彦、日比紀文: CD14 陽性腸管マクロファージが IL-23/IFN- γ を介してクローン病の病態に寄与している *Intestine* in press 2008

鎌田信彦、日比紀文: 炎症性腸疾患における腸管マクロファージの病的役割. 日本薬理学会雑誌 in press 2008

鎌田信彦、日比紀文: 獲得免疫異常による慢性炎症持続. *BIO Clinica*: 23(13): 27-31, 2008

鎌田信彦、日比紀文: CD14 陽性腸管マクロファージが IL-23/IFN- γ を介してクローン病の病態に寄与している. *分子消化器病学* 5 (4): 88-91 2008

鎌田信彦、日比紀文 他: 消化管自然免疫破綻と炎症性腸疾患. *細胞工学* 27 (8): 770-774, 2008

Ishihara T, Tanaka K, Tasaka Y, Namba T, Suzuki J, Ishihara T, Okamoto S, Hibi T, Takenaga M, Igarashi R, Sato K, Mizushima Y, and Mizushima T: Therapeutic Effect of Lecithinized Superoxide Dismutase against Colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 328(1):152-164, 2009

Kanai T, Nemoto Y, Kamada N, Totsuka T, Hisamatsu

T, Watanabe M, Hibi T: Homeostatic (IL-7) and effector (IL-17) cytokines as distinct but complementary target for an optimal therapeutic strategy in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 25(4):306-313, 2009

Kamada, N Hibi T et al: Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen presenting ability” *J. Immunol.* 183(3):1724-1731, 2009

Sakuraba A, Motoya S, Watanabe K, Nishishita M, Kanke K, Matsui T, Suzuki Y, Oshima T, Kunisaki R, Matsumoto T, Hanai H, Fukunaga K, Yoshimura N, Chiba T, Funakoshi S, Aoyama N, Andoh A, Nakase H, Mizuta Y, Suzuki R, Akamatsu T, Iizuka M, Ashida T, Hibi T: Open-Label Prospective Randomized Multicenter Study Shows Very Rapid Remission of Ulcerative Colitis by Intensive Granulocyte and Monocyte Adsorptive Apheresis as Compared with Routine Weekly Treatment. *Am J Gastroenterol* 104(12):2990-2995, 2009

小林 拓、日比紀文: 炎症性腸疾患 診断と治療の進歩 I. 炎症性腸疾患の概念・定義と疫学 日本内科学会雑誌 98 (1) :5-11, 2009

久松理一、日比紀文: ヒト炎症性腸疾患において重要なのは Th1 か Th17 か? 第 37 回日本臨床免疫学 32(5):360, 2009

高山哲朗、久松理一、日比紀文: 腸管免疫の分子機構 消化管疾患の分子医学—基礎医学から臨床へ 臨床消化器内科 24(2)217-223, 2009

小林 拓、日比紀文: I. 炎症性腸疾患の概念・定義と疫学 日本内科学会雑誌 98(1) : 5-11, 2009

金井隆典、久松理一、渡辺 守、日比紀文: II. 炎症性腸疾患の病理・病態生理 1. 腸管免疫抑制機構の破壊による炎症性腸疾患の発症 日本内科学会雑誌 98(1) : 12-17, 2009

緒方晴彦、日比紀文: IV. 潰瘍性大腸炎の管理・治療 3. 免疫抑制剤 日本内科学会雑誌 98(1) : 68-74, 2009

日比紀文: 腸管局所免疫機構の解明に基づく炎症性腸疾患に対する新しい治療法の開発 日本医師会雑誌 137(10) : 60-64, 2009

鎌田信彦、日比紀文: CD14 陽性腸管マクロファージが IL-23/IFN- γ を介してクローン病の病態に寄与している 特集 大腸癌画像診断の最先端 INTESTINE13 (2) : 218-221, 2009

高山哲朗、久松理一、岡本 晋、高田康裕、小林 拓、矢島知治、長沼 誠、緒方晴彦、岩男 泰、日比紀文: 炎症性腸疾患(IBD)における血漿アミノ酸プロファイルを用いた臨床マーカー (アミノインデックス) の確立 日本内科学会雑誌 98 臨時増刊号 : 119, 2009

鎌田信彦、日比紀文: 腸管マクロファージの治療標的としての可能性は? 分子消化器病 6(2) :35(145)-40(150), 2009

久松理一、日比紀文: ヒスチジンの経口投与がマクロファージからの炎症性サイトカインを抑えることでマウス腸炎を抑制する 分子消化器病 6 (2) : 83 (193)-85(195), 2009

長沼 誠、岩男 泰、日比紀文: 大腸の内視鏡診療【診断】炎症性腸疾患の内視鏡診 *Medicina* 46(7):1113-1117, 2009

日比紀文: IBD 診療の新展開と今後 日本大腸検査学会雑誌 26(1):29-39, 2009

久松理一、日比紀文: 炎症性腸疾患治療における生物製剤の現状 日本臨床免疫学会会誌 32(3) :168-179, 2009

長沼 誠、岩男 泰、日比紀文: 診断 炎症性腸疾患の内視鏡診断 *Medicina* 46(7):1113-1117, 2009

長沼 誠、日比紀文: 腸型ベーチェット病の寛解導入・維持に対するインフリキシマブの有用 *INTESTINE13* (4) : 434-436, 2009

日比紀文、小林 拓: 消化管症候群(第2版) 下—その他の消化管疾患を含めて— 炎症性腸疾患: 総論 別冊日本臨床 新領域別症候シリーズNo.12 : 291-293, 2009

三好 潤、矢島知治、日比紀文: 特集 消化器疾患に対する分子標的治療の最前線! 炎症性腸疾患治療の最前線—生物学的製剤の特徴と今後の展望 G. I Research 17 (5) : 42(434)- 48(440), 2009

2. 学会発表

Kobayashi T, Hibi T et al. Abnormal innate immune response and Th1/Th17 induction in murine colitis

and human inflammatory bowel disease. 94th Annual Meeting of American Association of Immunologists, Miami, May 18-23, 2007

Inoue N, Hibi T et al.: Clinical significance of serum p53 antibodies in patients with ulcerative colitis and its carcinogenesis. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 20, 2007

Kamada N, Hibi T et al.: Abnormally differentiated intestinal macrophages in human Crohn's disease produce excess IL-23 in response to the enteric bacteria. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007

Ogata H, Hibi T et al.: Effect of rabamipide on disruption of tight junctional protein, claudin-1, and trans-epithelial electrical resistance induced by oxidative stress in intestinal inflammation. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 20, 2007

Hisamatsu T, Hibi T et al.: Profiling of amino acids metabolism ("Amino Index) is useful for diagnosis, judgment of clinical activity, and understanding of pathophysiology in inflammatory bowel disease. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007

Naganuma M, Hibi T et al.: Novel Endoscopic activity index is useful to decide treatment options of active ulcerative colitis. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007

Kobayashi T, Hibi T et al.: Abnormally differentiated intestinal macrophage causes both Th1 and Th17 induction in IL-10 deficient mice. 108th Annual Meeting of the AGA, Washington DC, May 21, 2007

Kamada N, Hibi T et al.: Intestinal macrophages in human Crohn's disease produce excess IL-23 in response to commensal bacteria. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 10, 2007

Chinen H, Hibi T et al.: In situ natural killer cell differentiation from lamina propria c-kit+

immune precursor cells in human adult intestine. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 11, 2007

Kobayashi T, Hibi T et al.: Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 11, 2007

Hisamatsu T, Hibi T et al.: L-histidine ameliorates IL-10 deficient cells transfer murine colitis model by inhibition of pro-inflammatory cytokine production from mononuclear cells. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo Japan, July 11, 2007

久松理一、日比紀文 他：クローン病における腸管マクロファージによる腸内細菌認識異常と Th-1 誘導—マクロファージを中心とした炎症サイクル 第 93 回日本消化器病学会総会、4. 19 シンポジウム 青森 2007

長沼 誠、日比紀文 他：潰瘍性大腸炎に対する白血球除去療法・シクロスポリン A の治療効果の予測因子の検討. 第 93 回日本消化器病学会総会、4. 21 青森 2007 パネルディスカッション

岩男 泰、日比紀文 他：colitic cancer の内視鏡像と新しいサーベイランスプログラム構築に向けて 第 73 回日本消化器内視鏡学会総会 5. 11 東京 ワークショップ 2007

長沼 誠、日比紀文 他：潰瘍性大腸炎に対する白血球除去療法・シクロスポリン A の治療効果の予測因子に内視鏡スコアは有用か？ 第 73 回日本消化器内視鏡学会総 5. 11 東京 ワークショップ 2007

新井久美子、日比紀文 他：IL-10 ノックアウトマウス腸炎モデルにおける Th1/Th17 バランスとその制御 第 44 回日本消化器免疫学会総会 7. 9 東京 2007

岡本 晋、日比紀文 他：潰瘍性大腸炎に対する PC-SOD の治療効果の検討 第 44 回日本消化器免疫学会総会 7. 9 東京 2007

和田安代、日比紀文 他：合成 Retinoic acid receptor agonist (AM80) は樹状細胞の分化に作用し

IL-12 産生を抑制することで DSS 腸炎を改善させる
第 28 回日本炎症・再生医学会 8.3 東京 2007

日比紀文：クローン病マクロファージの腸内細菌に
対する免疫応答異常 第 35 回日本臨床免疫学会総会
10.19 大阪 シンポジウム 2007

小林 拓、日比紀文、ほか：IL-10 ノックアウトマ
ウス腸炎における抗原提示細胞による Th1/Th17 バラ
ンスの制御 第 35 回日本臨床免疫学会総会 10.19
大阪 ワークショップ 2007

矢島知治、日比紀文 他：6-MP/AZA 代謝における
ITPase 遺伝子多型の意義 第 49 回日本消化器病学会
大会 10.19 神戸 パネルディスカッション 2007

長沼 誠、日比紀文 他：シクロスポリン A、イン
フリキシマブはステロイドより先に行われるべきか？
第 62 回日本大腸肛門病学会学術集会 11.2 東京
シンポジウム 2007

Kamada N, Hibi T: Unique intestinal macrophage
subset contributes to the pathogenesis of Crohn's
disease via IL-23/IFN-gamma axis. 13th US-Japan GI
& Liver Meeting in 21st Century, Tokyo, Japan. 2008

Kamada N, Hibi T et al., IFN- γ induces IL-23
producing DC-like macrophage via suppression of
endogenous IL-10 signaling. 95th Annual Meeting of
American Association of Immunologists, San diego,
2008

鎌田信彦、日比紀文 他：Unique CD14⁺ intestinal
macrophages play a central role in the pathogenesis
of Crohn's disease via IL-23/IFN-gamma axis. 第
38 回日本免疫学会総会 京都 2008

本田治樹、日比紀文 他：クローン病腸管における
TL1A 及び IL-23 の Th1/Th17 型免疫反応への寄与 第
38 回日本免疫学会総会 京都 2008

久松理一、日比紀文 他：クローン病病態における
IL-23 高産生腸管マクロファージの関与 日本臨床免
疫学会総会 東京 2008

Kamada N, Hibi T: Unique intestinal macrophage
subset contributes to the pathogenesis of Crohn's
disease via IL-23/IFN-gamma axis. 13th US-Japan GI
& Liver Meeting in 21st Century, Tokyo, Japan
2008

Kamada N, Hibi T et al., IFN- γ induces IL-23
producing DC-like macrophage via suppression of
endogenous IL-10 signaling. 95th Annual Meeting
of American Association of Immunologists, San
diego 2008

鎌田信彦、日比紀文 他：Unique CD14⁺ intestinal
macrophages play a central role in the pathogenesis
of Crohn's disease via IL-23/IFN-gamma axis. 第
38 回日本免疫学会総会 京都 2008

本田治樹、日比紀文 他：クローン病腸管における
TL1A 及び IL-23 の Th1/Th17 型免疫反応への寄与 第
38 回日本免疫学会総会 京都 2008

久松理一、日比紀文 他：クローン病病態における
IL-23 高産生腸管マクロファージの関与 日本臨床免
疫学会総会 東京 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

・国際特許

PCT/JP2008/050942 2008/01/24 出願

「IBD の評価方法、ならびにアミノ酸情報処理装
置、アミノ酸情報処理方法、アミノ酸情報処理シ
ステム、アミノ酸情報処理プログラムおよび記録
媒体」

・特許

特願 2008-013393 2008/01/24 出願

「IBD の評価方法、ならびにアミノ酸情報処理装
置、アミノ酸情報処理方法、アミノ酸情報処理シ
ステム、アミノ酸情報処理プログラムおよび記録
媒体」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

難治性炎症性腸疾患の病態に基づく新規治療戦略に関する研究

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：病態にもとづく難治性炎症性腸疾患の新規治療戦略を構築することを目的に、①腸炎モデルの回復過程に関与する新規樹状細胞サブセットの同定、②免疫調節薬使用を必要とする難治性潰瘍性大腸炎の治療戦略上問題となるサイトメガロ感染における抗ウイルス療法の前向き試験による評価、③ cyclosporin (Cy-A) の全身性副作用を予防する目的で、Cy-A 封入マイクロカプセルを使用した新規治療法の開発を行った。①クローン病モデルマウスの炎症の回復過程の樹状細胞の同定と解析を行い、PIRs (paired immunoglobulin-like receptors) 発現樹状細胞が粘膜修復に関与し、新たな治療の標的となる可能性があると思われた。②Blackstone 内視鏡スコア 7 以下の中等症～重症の潰瘍性大腸炎患者では、大腸組織 CMV PCR 法陽性でも、血中アンチゲネミア法陰性であれば抗ウイルス治療は不要であること、内視鏡所見を加味した重症度分類が有用と思われた。③Cy-A 封入ポリ乳酸マイクロカプセル (CyAMC) の開発研究では、CyAMC 投与群では非投与群と比較して血中薬物濃度を上昇させることなく、体重、血便スコア、組織学的スコア、ミエロペルオキシダーゼ活性について改善が認められた。動物実験の有効性より、ヒトにおける治療目的に倫理委員会に申請準備中である。

共同研究者

松下光伸 1)、内田一茂 1)、大宮美香 1)、深田憲将 1)、安藤祐吾 1)、福井寿朗 1)、西尾彰功 1)、星野勝一 1) 2)、稲葉宗夫 2)、池原 進 2)、田畑泰彦 3)

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)

京都大学再生医科学研究所 3)

A. 研究目的

病態にもとづく難治性炎症性腸疾患の新規治療戦略を構築することを目的に、①腸炎モデルにおける樹状細胞サブセットの解析、②免疫調節薬使用を必要とする難治性潰瘍性大腸炎の治療戦略上問題となるサイトメガロ感染における抗ウイルス療法の前向き試験による評価、③サイクロスポリン-A (CyA) の全身性副作用を予防する目的で、CyA 封入マイクロカプセルを使用した新規治療法の開

発を行った。

B. 研究方法

1) 腸炎モデルにおける樹状細胞サブセット解析

TNBS 誘発性小腸炎モデルマウス粘膜内の樹状細胞をフローサイトメトリーにて 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経時的に解析するとともに免疫学的機能を検討した。

2) サイトメガロ感染における抗ウイルス療法の前向き試験による評価

血中アンチゲネミア法陰性かつ大腸組織 PCR 法陽性の中等症～重症潰瘍性大腸炎患者 16 例を対象に、Blackstone 内視鏡スコア 7 以上の抗ウイルス治療併用群と 7 以下の非併用群にわけ、治療後の内視鏡所見の改善度と、治療開始 1 年後の経過を前向きに調査し、抗ウイルス治療の意義について検討した。

3) シクロスポリン封入ポリ乳酸マイクロカプセル

(CyAMC) を Dextran sulfate sodium (DSS) で誘導した腸炎マウスに対して投与を行い、治療効果について検討を行った。動物実験の有効性より、ヒトにおける治療目的に倫理委員会に申請準備中である。

(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 小腸炎の回復過程に関与する新規樹状細胞サブセットの同定

CD11c⁺/B220⁻ conventional DCs (cDCs) の PIR-A/B_{high}、PIR-A/B_{med}、PIR-A/B⁻ サブセット中 PIR-A/B_{med} cDCs のみが、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。

2) Blackstone 内視鏡スコア 7 以下の中等症～重症の潰瘍性大腸炎患者では、大腸組織 CMV PCR 法陽性でも、血中アンチゲネミア法陰性であれば抗ウイルス治療併用なしで全例緩解となったことより、内視鏡所見を加味した重症度分類を使用することが有用と思われた。

3) シクロスポリン封入ポリ乳酸マイクロカプセル (CyAMC) の開発研究では、CyAMC 投与群では非投与群と比較して血中薬物濃度を上昇させることなく、体重、血便スコア、組織学的スコア、ミエロペルオキシダーゼ活性について改善が認められた。

D. 考察

CD11c⁺/B220⁻ conventional DCs (cDCs) である PIR-A/B_{med} 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。

サイトメガロ感染における抗ウイルス療法の前向き試験による評価では、内視鏡分類の重要性を明らかにし、2) シクロスポリン封入ポリ乳酸マイクロカプセル (CyAMC) とともに、CyA 封入ポリ-L-D 乳酸マイクロカプセルの開発：CyA 封入ポリ-L-D 乳酸マイクロカプセルを作成し、DSS マウス腸炎での治療効果を認めるとともに、血中濃度 CyA は検出せず、トラフ値のモニター不要の治療システムの可能性が示唆され、難治性潰瘍性大腸炎患者において CyAMC 投与すれば、治療効果と共に副作用の発現を予防できる新しい治療戦略になりうると考えられた。

E. 結論

免疫調節薬使用を必要とする難治性潰瘍性大腸炎の治療戦略上問題となるサイトメガロ感染における抗ウイルス療法の評価と cyclosporin 封入マイクロカプセルを使用した新規治療法の開発を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

6. Toyonaga T, Matsushita M, Matsumoto T, Fukui T, Omiya M, Uchida K, Okazaki K. Endoscopic injection therapy for a bleeding exposed vessel in Crohn's disease. *Gastrointest Endosc.* 2008 Sep;68(3):572-3;

7. Hachimine D, Uchida K, Asada M, Nishio A, Kawamata S, Sekimoto G, Murata M, Yamagata H, Yoshida K, Mori S, Tahashi Y, Matsuzaki K, Okazaki K. Involvement of Smad3 phosphoisoform-mediated signaling in the development of colonic cancer in IL-10-deficient mice. *Int J Oncol.* 2008 Jun;32(6):1221-6.

8. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Okazaki K, Ikehara S. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced

colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Jun;14(6):826-38

9. Sumimoto K, Matsushita M, Omiya M, Uchida K, Okazaki K. Crohn's disease accompanied by purulent discitis and psoas abscesses. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 May;14(5):728-30.

10. Matsushita M, Uchida K, Okazaki K. Role of the appendix in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Inflammopharmacology.* 2007 Aug;15(4):154-7

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 ileitis. 第39回日本免疫学会総会 (大阪、2009年12月)

2. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Okazaki K, Ikehara S. The 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo. "Adipose Tissue-Derived Stem Cells Facilitate Colonic Mucosal Recovery in Experimental Colitis Rats" 2008, Tokyo

3. Ando Y, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Okazaki K, Ikehara S. "Adipose Tissue-Derived Stem Cells Facilitate Colonic Mucosal Recovery in Experimental Colitis Rats" Digestive Disease Week 2008, San Diego, USA.

3. 知的所有権の出願・取得状況 (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

腸管上皮細胞のバリアー機能と制御機構

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：腸管上皮細胞と免疫担当細胞との間の CXCR3 を軸としたサイトカイン・ケモカインネットワークに RIG-I が関与し、バリアー機能において重要な役割を果たす。CsA による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から、潰瘍性大腸炎の病態には TGF- β を介したアポトーシス制御が深く関連すると考えられる。

共同研究者

1)川口 章吾、櫻庭 裕丈、佐藤 裕紀、平賀 寛人、
福田 真作 2)今泉忠淳 3)仲根明夫

所属 1)弘前大学医学部消化器血液内科 2) 同脳血管
病態部門 3)同 感染制御病態学講座

A. 研究目的

粘膜上皮は最表層に位置しバリアー機能を有し腸管の恒常性維持のために重要な役割を果たしていると考えられる。潰瘍性大腸炎においても上皮細胞の破綻が病態に関与することが示唆される。原因不明の潰瘍性大腸炎に対するサイクロスポリンの作用機序を明らかにすることにより病態解明にもつながると考える。そこで本研究では

①TGF- β の上皮細胞に対する防御的作用と治療薬であるサイクロスポリンの効果発現機序

②腸管上皮細胞のバリアー機能に関する役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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した。1 次抗体として抗 cFLIP 抗体、抗 Smad2 抗体、抗 p-Smad2 抗体 (rabbit polyclonal IgG, Upstate, 2000 倍)、2 次抗体として 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。また、臨床検体については弘前大学倫理委員会の承認と患者の同意を得た上で解析した。

C. 研究結果

①TGF- β をブロックした上で DSS 腸炎を誘導した。上皮のアポトーシス細胞数増加を介し、早期に粘膜障