

害を誘導できることを見いだした。粘膜障害発症機序、その過程における TGF- β のブロックの効果について検討した結果、抗 TGF- β 抗体投与群では腸管上皮細胞の FAS のシグナル増強を認めた。上皮細胞における caspase-8 の活性は、抗 TGF- β 抗体投与群で亢進していた。以上より、DSS 腸炎において、TGF- β は、Fas を介した上皮細胞アポトーシスを抑制していることが示された¹⁾

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。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。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 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 活性は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、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⁾。

②TNF- α 、IFN- γ で上皮細胞株である HT-29 をで刺激すると、それぞれ時間依存性・濃度依存性に、蛋白レベル、遺伝子レベルで RIG-I の発現が増強した。Th1 型の腸炎モデルである IL-10KO マウスでは上皮、LP ともに RIG-I の発現が亢進していた。さらに TNF- α 、IFN- γ による相乗作用が確認された。また HT-29 において RIG-I に対する siRNA を transfect すると、IFN- γ で誘導される CXCL-9 (MIG) の産生が有意に低下した³⁾。

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。

また、腸管上皮細胞は IFN- γ の刺激により RIG-I を

介して、MIG、IP-10、I-TAC といった T cell chemo-attractant を産生した。これらのケモカインは CXCR3 陽性 T 細胞を走化させることが報告されている。この positive feedback loop はバリアー機能の維持に関与し、恒常性維持に役立つ考えられる。

E. 結論

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、上皮細胞の維持がバリアー機能において重要な役割を果たしていること、一方 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、上皮細胞維持には TGF- β を介したアポトーシス制御が関連すると考えられる。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. 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.

2. Shogo Kawaguchi, Yoh Ishiguro, Tadaatsu Imaizumi, Fumiaki Mori, Tomoh Matsumiya, Hidemi Yoshida, Ken Ota, Hirotake Sakuraba, Kazufumi Yamagata, Yuki Sato, Kunikazu Tanji, Toshihiro Haga, Koichi Wakabayashi, Shinsaku Fukuda, Kei Satoh: Retinoic acid-inducible gene-I is constitutively expressed and involved in IFN- γ -stimulated CXCL9-11 production in intestinal epithelial cells. *Immunol Letters*. 2009 Mar 24;123(1):9-13.

3. 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. 学会発表

1. Shogo Kawaguchi, Yoh Ishiguro, Hirotake Sakuraba, Hiroto Hiraga, Shinsaku Fukuda: Retinoic Acid-inducible Gene-I is Constitutively Expressed and Involved in IFN-g-stimulated CXCL9-11 Production in Intestinal Epithelial Cells 14th International Congress of Mucosal Immunology Boston Marriott Copley Place 2009年7月6日

2. Hiroto Hiraga, Y. Ishiguro, H. Sakuraba, S. Kawaguchi, H. Fujita, H. Sakuraba, K. Shimaya, Y. Sato, K. Yamagata, S. Fukuda: Lack of vitamin a impaired mucosal barrier function and exacerbated DSS-induced colitis. 2nd Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology (JUCC) Tokyo, November 21, 2008.

3. Shogo Kawaguchi, Yoh Ishiguro, Tadaatsu Imaizumi, Fumiaki Mori, Tomoh Matsumiya, Hidemi Yoshida, Ken Ota, Hirotake Sakuraba, Kazufumi Yamagata, Yuki Sato, Kunikazu Tanji, Toshihiro Haga, Koichi Wakabayashi, Shinsaku Fukuda, Kei Satoh: Retinoic acid-inducible gene-I is constitutively expressed and involved in IFN-g-stimulated CXCL9-11 production in intestinal epithelial cells. The 3rd Korea-Japan IBD symposium. September 20 (Sat), 2008, Seoul

4. H. Sakuraba, Y. ISHIGURO, S. KAWAGUCHI, Y. SATO, H. HIRAGA, S. FUKUDA: Cyclosporin A prevented apoptosis-mediated epithelial injury through transforming growth factor- β related pathway Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology (JUCC) Tokyo 2007年11月16日

5. 櫻庭裕丈, 石黒 陽, 藤田 均, 佐藤裕紀, 川口章吾, 平賀寛人, 福田眞作 "シンポジウム 炎症性腸疾患の免疫病態と治療法の新しい展開 Heat Shock Protein(HSP)-70の抗炎症作用と Geranylgeranylacetone (GGA)による誘導効果"

第46回日本消化器免疫学会総会 松山全日空ホテル 2009年7月24日

6. 川口章吾, 石黒 陽, 今泉忠篤 腸管上皮細胞におけるRIG-Iの発現調節:PD12 腸管炎症に影響を与える栄養素の吸収代謝 第50回日本消化器病学会大会(東京) グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール2008年10月3日

7. 川口章吾, 石黒 陽, 櫻庭裕丈, 山形和史, 佐藤裕紀, 福田眞作, 今泉忠篤 "腸管上皮細胞におけるRIG-Iの発現調節:シンポジウム2 消化器疾患における自然免疫・獲得免疫のクロストーク" 第45消化器免疫学会 メルパルク京都(京都) 2008年7月4日

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

腸管炎症における自然免疫応答の制御機構の解明と治療への応用

研究協力者 石原 俊治 島根大学医学部内科学講座第二 准教授

研究要旨：腸管炎症における自然免疫応答の制御機構の解析と、応答時に誘導されるシグナルに関与する分子を標的とした新規治療法の開発を念頭に研究をおこない、以下の3つの知見を得た。①Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) がLPSによってマクロファージに誘導される自然免疫応答を抑制し、マウス実験腸炎の病勢を有意に改善させる。そのメカニズムとして、MFG-E8がLPSで活性化されたマクロファージ表面のavb3インテグリンにosteopontin (OPN)と競合的に結合し、腸炎時にOPNによって惹起されるNF- κ B依存性の炎症シグナルを抑制することが明らかとなった。②消化管上皮細胞には種々のToll受容体が発現しており、リガンドによってTollシグナルが活性化されると細胞表面あるいは細胞内で種々のnegative feedback調節機構が誘導され、腸管の過剰炎症を抑制していることが示された。③制御性B細胞(Breg)の腸管自然免疫における機能解析をおこない、クローン病モデルマウスSAMP1/Yitの腸管Bregは自然免疫刺激に対して低応答性であり腸炎の病態に関わ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

腸管炎症における自然免疫応答の制御機構の解析と、
応答時に誘導されるシグナルに関与する分子を標的
とした新規治療法の開発を念頭に以下の3つについて研
究をおこなった。

A. 研究目的

1. 精製Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8)
蛋白による腸炎抑制機序に関する研究

MFG-E8はアポトーシス細胞表面のホスファチジルセ
リンと食細胞表面のavb3インテグリンを架橋する分
泌型のタンパク質で、アポトーシス細胞の除去を制御
している。私共は、MFG-E8の機能が腸管自然免疫応答
とクロストークし炎症制御に関わっていると仮定し、
精製MFG-E8蛋白を実験腸炎モデルに投与することに
よって消化管の炎症抑制が可能か否かを検証した。さ
らに、その詳細なメカニズムを*in vitro*の実験系で解
析した。

2. 腸管自然免疫の負の制御機構に関する研究

過剰な自然免疫応答を制御するために、宿主には
negative feedback機構が備わっており、細胞内や細
胞表面で機能する様々な分子群が報告されている。今
回は、自然免疫応答時の腸管上皮細胞における負の制
御機構を明らかにし、IBDの病態との関連について考
察した。

3. クローン病モデルマウスにおける制御性B細胞の
解析

Interleukin (IL)-10やtransforming growth factor
(TGF)- β 1を産生し、自己免疫応答や炎症を負に制御す
るB細胞サブセットが存在することが報告され、“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
の面から解析する計画を立案し実験を遂行した。

B. C. 研究方法と結果

1. 精製MFG-E8蛋白による腸炎抑制機序の解明

精製したMFG-E8蛋白の投与によって、マウス実験腸
炎(デキストラン硫酸:DSSモデル)の病勢が有意に
抑制されること(体重変化、腸管長、病理組織、組織

中のMPO活性、IL-1bとTNF-a産生量)が示された。さらに、MFG-E8がavb3インテグリンに結合する他のリガンドと競合的に炎症抑制を発揮すると想定し、以下の実験をおこなった。

① 腸管炎症時に局所で誘導される avb3 インテグリンリガンドの同定

DSS腸炎モデルを用いて、炎症粘膜における種々のavb3インテグリンリガンドの発現を検討すると、osteopontin(OPN)の発現量が炎症依存性に増加することが明らかとなった。

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

OPNはNF-kB依存性の炎症性サイトカインであることから、MFG-E8の抗炎症効果はOPNのavb3インテグリンへの結合阻害であることが想定された。*In vitro*の実験系で、OPNがマクロファージのavb3インテグリンに作用して炎症誘導をおこなうこと、添加したMFG-E8がOPNとavb3インテグリンへ競合的に結合することが確認された。

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

マクロファージをLPSで刺激するとavb3インテグリンがリン酸化され、OPNによる細胞内シグナルを介してNF-kB依存性に炎症性サイトカイン産生が誘導されることが明らかとなった。また、インテグリンの活性化、OPNによる細胞内シグナルの活性化には、いずれもFAKキナーゼのリン酸化が必要であることも確認された。

2. 腸管自然免疫の負の制御機構に関する研究

HCT-15、HT-29をLPSおよびflagellinで刺激すると、NF-kB依存性にIL-8産生が誘導され、特にflagellin刺激による誘導が顕著であった。細胞内型の負の制御因子であるA20はリガンド刺激後の1時間で迅速に誘導され、IRAK-M、Tollipも刺激後7時間でピークとなった。一方、膜型の負の制御因子であるSIGIRRとST2Lは、上皮細胞に恒常的に高発現しており、LPS、flagellin、TNF-aなどの刺激によって発現抑制が認められた。

実験腸炎モデルでは、主にTLR5シグナルに依存した発現を検討した。*In vitro*の結果と同様にA20、IRAK-M、

Tollipの発現は上皮細胞において迅速に誘導されたが、SIGIRRとST2Lの発現は逆に発現が抑制された。

3. クローン病モデルマウスにおける制御性B細胞の解析

クローン病モデルマウスであるSAMP1/Yitマウスとその野生型であるAKR/Jマウスを用いて実験をおこなった。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CpG DNAで刺激してIL-10とTGF-b1産生を検討した。B細胞の表面マーカーは両群で差は認められなかったが、IL-10産生はSAMP1/Yitマウスで有意に低いことが明らかとなった。SAMP1/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。また、マウスBregはCD1d陽性のB細胞群の中に含まれていた。

両マウス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-1b産生に及ぼす影響を検討した。本実験ではSAMP1/Yitマウスの腸管B細胞との共培養時にIL-1b産生量が有意に高値であることが明らかとなった。

マウスの実験を踏まえ、ヒト末梢血B細胞を用いた実験も追加した。クローン病20人、潰瘍性大腸炎20人、健康人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康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サンプルを用いたプロトコールについては、島根大学の実験動物委員会および倫理委員会の承認を得た。遺伝子発現系の構築やluciferase assayなど、大腸菌を用いて形質転換などをおこなう実験についてはDNA組み換え実験委員会の承認を得ておこなった。

D. 考察

1. 精製MFG-E8蛋白による腸炎抑制機序の解明

今回の検討で、MFG-E8 が食食促進作用とは非依存的に NF- κ B 活性を抑制し、種々の炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。炎症局所でマクロファージが LPS によって活性化されると、FAK キナーゼとインテグリンのリン酸化が誘導され、OPN による細胞内シグナルが NF- κ B 依存性に誘導すること、MFG-E8 は OPN と競合的に avb3 インテグリンに結合することで抗炎症効果を発揮することが確認された。現在進行中の実験で、MFG-E8 は消化管の再生機能を持つ可能性が示唆されており、抗炎症と再生という両面からの治療薬への応用が期待される。

2. 腸管自然免疫の負の制御機構に関する研究

腸管に炎症が誘発されると、A20、IRAK-M、Tollip などの蛋白は上皮細胞内で迅速に誘導され、過剰な自然免疫応答を抑制されることが明らかとなった。しかし一方で、膜型の負の制御因子である SIGIRR や ST2L は、恒常的に上皮細胞に高発現しているが、炎症時にはその発現が逆にダウンレギュレーションすることが示された。

以上の知見は、SIGIRR や ST2L などの膜型の負の制御因子は腸内細菌と宿主の生理的・恒常的バランスを維持するために機能しており、A20、IRAK-M、Tollip などの誘導型蛋白は炎症時の生体防御に主に関与している可能性を示唆するものである。

3. クローン病モデルマウスにおける制御性 B 細胞の解析

クローン病モデルマウスである SAMP1/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、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、新規の動物実験を企画し遂行中である。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てきているが、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

① MFG-E8 は自然免疫応答で活性化されたマクロファージに直接的に働き、NF- κ B 活性依存性の炎症シグナル

を抑制する。ヒトの IBD の病態に関する MFG-E8 の役割を検討していくことで、今後の治療応用が可能になることが考えられる。

② 腸管上皮には自然免疫応答に依存して種々の負の制御因子が発現しているが、細胞内蛋白は抗炎症に、膜型は恒常性維持に関与していると想定された。

③ クローン病において Breg の機能低下が関与する可能性が示唆されたが、病態解明や治療応用へはさらなる研究成果の蓄積が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① 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. *Scandinavia Journal of Gastroenterology* 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?

Clin J Gastroenterol 2 : 9-16, 2009.

⑥ Aziz MM, Ishihara S, Rumi MA, Mishima Yo, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Li YY, Rahman FB, Otani A, Oka A, Ishimura N, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Prolactin induces MFG-E8 production in macrophages via transcription factor C/EBP β -dependent pathway. *Apoptosis* 13: 609-20, 2008.

⑦ Moriyama I, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MD, Mishima Yo, Oshima N, Kadota C, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Decoy oligodeoxynucleotide targeting activator protein-1(AP-1) attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis.

Laboratory investigation: 88 652-63, 2008.

⑧ Fruta K, Sato S, Miyake T, Okamoto E, Ishine J, Ishihara S, Amano Y, Adachi K, Kinoshita Y. Abnormal liver function in Crohn's disease related to location of disease lesions. *Inflamm Bowel Dis* 14:138-9, 2008.

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*, Chicago, 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*, Chicago, USA, 2008. 5. (抄録のみ)

④ Ishihara S, Aziz M, Rumi MA, Oshima N, Mishima

Y, Kadota C, Otani A, Oka A, Norihisa I, Moriyama I, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Milk fat globule EGF-8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis via inhibition of NF- κ B activation. *Digestive Disease Week 2008*, San Diego, USA, 2008. 5.

⑤ Oshima N, Ishihara S, Rumi MAK, Aziz MM, Mishima Yo, Kadota C, Moriyama I, Ohtani A, Oka A, Li YY, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: A20 is an early responsive negative regulator of Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells during inflammation. *Digestive Disease Week 2008*, San Diego, USA, 2008. 5.

⑥ Mishima Y, Ishihara S, Aziz MM, Rumi MAK, Oshima N, Kadota C, Moriyama I, Li YY, Ohtani A, Oka A, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Intestinal CD5⁺ B cells produce IL-10 and TGF- β via Toll-like receptor-mediated signaling. *Digestive Disease Week 2008*, San Diego, USA, 2008. 5.

⑦ Mishima Y, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Moriyama I, Kadota C, Oshima N, Norihisa I, Kusunoki R, Kadowaki Y, Amano Y, Kinoshita Y: Toll-like receptor 9-signaling mediates innate immune response in murine intestinal CD5⁺ B cells. *Digestive Disease Week 2008*, Washington DC, USA, 2007. 5.

⑧ Moriyama I, Ishihara S, Rumi MA, Aziz MM, Mishima Y, Oshima N, Kadota C, Otani A, Kinoshita Y: Decoy oligodeoxynucleotides targeting AP-1 and NF- κ B attenuate intestinal inflammation in murine experimental colitis. *Digestive Disease Week 2008*, Washington DC, USA, 2007. 5.

⑨ 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.

⑩ 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.

⑪ 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.

⑫ 三島義之, 石原俊治, 大谷 文, 天野祐二, 木下芳
一: 炎症性腸疾患の末梢血 CD5 陽性 B 細胞の解析 第
5 回日本消化管学会, 東京, 2009. 2.

⑬ 三島義之, 石原俊治, 岡 明彦, 大谷 文, 大嶋直
樹, 角田 力, 森山一郎, 天野祐二, 木下芳一: 消化
管粘膜における IL-10、TGF-beta 産生 B 細胞に関する
検討 第 50 回日本消化器病学会大会, 東京, 2008. 10.

⑭ 大嶋直樹, 石原俊治, 木下芳一: パネルディスカッ
ション: 下部消化管の炎症と機能相関をめぐって 消
化管上皮の自然免疫応答における A20 発現の意義 第
50 回日本消化器病学会大会, 東京, 2008. 10.

⑮ 大嶋直樹, 石原俊治, 大谷 文, 角田 力, 三島義
之, 森山一郎, 天野祐二, 木下 芳一: 消化管上皮細
胞の自然免疫応答における Toll 受容体シグナルの負
の制御機構の意義 第 49 回日本消化器病学会大会
神戸 2007. 10. 19

⑯ 三島義之, 石原俊治, 大嶋直樹, 森山一郎, 角田 力,
大谷 文, 門脇泰憲, 天野祐二, 木下芳一: 消化管粘膜
内 CD5 陽性 B 細胞の自然免疫応答 第 49 回日本消化器
病学会大会 神戸 2007. 10. 1

⑰ 石原俊治, 木下芳一: Milk fat globule-EGF factor8
(MFG-E8) による Toll 受容体シグナルの制御と消化管
粘膜の抗炎症作用における意義 第 93 回日本消化器
病学会総会 青森 2007. 04. 19

⑱ 森山一郎, 石原俊治, 三島義之, 大嶋直樹, 角田
力, 大谷 文, 石村典久, 門脇泰憲, 天野 祐二, 足
立経一, 木下 芳一: AP-I dsDNA decoy による炎症性
腸疾患の新規治療の検討 第 93 回日本消化器病学会
総会 青森 2007. 04. 19

⑲ 三島義之, 石原俊治, 大嶋直樹, 角田 力, 大谷 文
, 森山一郎, 石村典久, 木下芳一: 炎症性腸疾患患者
における末梢血中の CD5 陽性細胞の検討 第 93 回日本
消化器病学会総会 青森 2007. 04. 19

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

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 佐々木 誠人 愛知医科大学内科学講座（消化器内科） 准教授

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

城 卓志、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

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発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 による影響をうけていなかった。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

Takashi Mizushima, Makoto Sasaki, Tomoaki Ando, Tsuneya Wada, Mamoru Tanaka, Yasuyuki Okamoto, Masahide Ebi, Yosikazu Hirata, Kenji Murakami, Tsutomu Mizoshita, Takaya Shimura, Eiji Kubota, Naotaka Ogasawara, Satoshi Tanida, Hiromi Kataoka, Takeshi Kamiya, JS Alexander, Takashi Joh: 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 Takashi Mizushima, Makoto Sasaki, Tomoaki Ando, Tsuneya Wada, Mamoru Tanaka, Yasuyuki Okamoto, Masahide Ebi, Yosikazu Hirata, Kenji Murakami, Tsutomu Mizoshita, Takaya Shimura, Eiji Kubota, Satoshi Tanida, Hiromi Kataoka, Takeshi Kamiya, JS Alexander, Kunio Kasugai, Takashi Joh: 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 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: The blockage of angiotensin II type 1 receptor regulates cytokine induced MAdCAM-1 expression by preventing the NF- κ B binding activity in nucleus and ameliorates colitis. Digestive Disease Week 2009, Chicago, 2009/05/31

③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, 谷田論史, 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

④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, 谷田論史, 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

⑤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, 谷田論史, 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

⑥ Sasaki M, Wada T, Mizushima T, Ogasawara N, Kubota E, Mori Y, Shimura T, Mizoshita T, Okamoto Y, Kataoka H, Kamiya T, Joh T: Amelioration of dextran sulfate sodium induced colitis in angiotensin II type 1 receptor knockout mice. Digestive Disease Week 2007, Washington D.C, 2007/05/21

⑦ 佐々木誠人, 和田恒哉, 水島隆史, 小笠原尚高, 久保田英嗣, 森 義徳, 志村貴也, 溝下 勤, 平田慶和, 岡本泰幸, 片岡洋望, 神谷 武, 城 卓志: アンジオテンシンII type1 レセプターを介したDSS腸炎の制御, 第35回日本潰瘍学会, 鳥取県民ふれあい会館, 2007年9月22日

⑧ 佐々木誠人, 和田恒哉, 水島隆史, 溝下 勤, 志村貴也, 森 義徳, 山田智則, 久保田英嗣, 小笠原尚高, 片岡洋望, 神谷 武, 城 卓志: Angiotensin II type 1

receptor 制御によりDSS腸炎は抑制される, 第3回日本消化管学会総会, 東京京王プラザホテル, 2007年2月1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

大腸上皮において IL-8 が HB-EGF 前駆体の細胞内ドメインを介して
転写抑制蛋白 PLZF を制御する機序と意義

分担研究者 城 卓志 名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学 教授

研究要旨： EGF リガンドの放出と同時に EGF 前駆体の細胞内ドメイン (CTF) が核に移行し転写抑制因子 (repressor) である C2H2 Zn-finger 蛋白と結合することが明らかになった。CTF との結合構造 (2 個以上の C2H2 Zn-finger とこれをつなぐ TGEKPY 構造) をゲノムデータベース上で解析した結果、マウスとヒトそれぞれ約 500 個の repressor 遺伝子 (BTB/POZ ファミリー; 49 と 55、KRAB ファミリー; 386 と 348、SCAN ファミリー; 72 と 49) を同定した。大腸に発現の高い PLZF に着眼し、HB-EGF の細胞内ドメインが PLZF を制御し細胞増殖をコントロールする機序と意義につき明らかにした。

共同研究者

谷田諭史¹、片岡洋望¹、佐々木誠人²、東山繁樹³

¹名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学、²愛知医科大学消化器内科、³愛媛大学大学院生化学分子遺伝分野 2

A. 研究目的

IBD の臨床において、慢性炎症の長期間持続後に大腸がんの発生が問題となっている。しかし、その発がんのメカニズムは、十分に解明されておらず、明らかにしていかなければならない重要な課題である。近年、大腸がんの増殖、進展のメカニズムに IL-8 による EGFR 活性化がかかわっていることが指摘されている。そこで今回我々は、がん遺伝子であり、発がん、進展を制御し分子標的治療にも応用されている EGF に着目した。炎症性サイトカイン (IL-8: GPCR agonist) は、好中球遊走促進などで消化管炎症の病態で重要な役割を演ずるとともに、細胞増殖作用を持つ。膜型メタロプロテアーゼ (ADAM) が EGF 受容体 (EGFR) リガンドを放出させた後 EGF 受容体 (EGFR) は、リン酸化すると同時に、HB-EGF C 末端が、核移行し転写因子として働くことが明らかになった。HB-EGF C 末端が核移行したあと、網羅的に検討した結果から同定された DNA に結合しているレプレッサー PLZF を核外にくみ出すことも明らかになった。しかしなが

ら、IL-8 による EGFR の活性化および HB-EGF-C 末端核内移行機序については明らかでない。HB-EGF-C 末端核内移行のメカニズムが IL-8 による細胞増殖に関与しているかどうかを検討した。

B. 研究方法

全 repressor 遺伝子の DNA マイクロアレイチップを用い、消化管上皮細胞部位別のプロフィール解析を進め、部位特異的 repressor をスクリーニングした。EGF 前駆体の細胞内ドメインと結合実験を繰り返し、EGF シグナルに重要な repressor を同定した。大腸に発現の高い PLZF に着眼し、大腸癌細胞 (HT-29) を使用し蛋白機能解析を行った。IL-8 による細胞増殖は、日毎に細胞数を数え、細胞増殖カーブで検討した。IL-8 にて刺激後 EGFR リン酸化を調べ、ADAM 阻害剤、内因 ADAM10, 12, 17 欠失による EGFR リン酸化阻害効果を調べた。ヒト耐熱性アルカリフォスファターゼで標識した EGF リガンド発現プラスミドを使って安定的に発現する細胞株を作製し、IL-8 にて HB-EGF 放出を調べた。HB-EGF-C 末端の核内移行および PLZF 核外移行は、蛍光免疫にて検討した。HB-EGF-C 末端の下流にある c-Myc 蛋白の発現を IL-8 にて刺激後 Western 解析にて検討した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

C. 研究結果

CTF との結合構造 (2 個以上の C2H2 Zn-finger とこれをつなぐ TGEKPY 構造) をゲノムデータベース上で解析した結果、マウスとヒトそれぞれ約 500 個の repressor 遺伝子 (BTB/POZ ファミリー; 49 と 55、KRAB ファミリー; 386 と 348、SCAN ファミリー; 72 と 49) を同定した。

IL-8 の刺激により、細胞増殖は亢進した。IL-8 は、EGF リガンド放出、EGFR のリン酸化および HB-EGF-C 末端核移行を惹起した。HB-EGF-C 末端核移行後 PLZF は、核外に排出された。それらは、ADAM 阻害剤にて阻害できた。また、ADAM10 の欠失により、IL-8 による EGFR リン酸化が抑制された。さらに IL-8 は、c-Myc 蛋白発現を増加させた。それは、EGF-C 末端核移行を阻害する ADAM 阻害剤および EGFR リン酸化阻害剤にて抑制された。

D. 考察

IL-8 による細胞増殖は、EGFR リン酸化および HB-EGF-C 末端が核内移行し転写抑制遺伝子 PLZF の抑制が外れた後、がん遺伝子である c-Myc を介した機序によるものと考えられる。

E. 結論

HB-EGF-C 末端の核内移行による転写抑制蛋白 PLZF の制御は、炎症から大腸粘膜上皮細胞の増殖、発がんに対し、新たな治療戦略になりうると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Oshima T, Miwa H, Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. J Gastroenterol Hepatol. Suppl 2:S146-50. 2008.

2. 学会発表

1. 志村貴也、片岡洋望、佐々木誠人、東山繁樹、城卓志 胃癌に対する新規分子標的治療の可能性 : HB-EGF-C の核内移行の抑制効果、第 18 回消化器癌発生学会、北海道厚生会館ウェルシティー札幌、平成 19 年 11 月
2. 志村貴也、片岡洋望、城卓志 胃癌に対する新規分子標的治療の基礎的検討、第 107 回日本消化器病学会東海支部例会、名古屋市中心企業振興会館、平成 19 年 11 月
3. 佐々木誠人、城卓志・eNOS 遺伝子多型 (-786T > C) は潰瘍性大腸炎の予後予測因子である・第 61 回日本酸化ストレス学会学術集会・京都・平成 20 年 6 月
4. 谷田諭史、佐々木誠人、片岡洋望、城卓志 炎症性サイトカインによる EGF 受容体リガンド C 末端を介した細胞増殖機序・第 45 回日本消化器免疫学会総会・京都・平成 20 年 7 月
5. 城卓志、谷田諭史、片岡洋望、佐々木誠人 IL-8 が誘導する新しい EGF シグナルと大腸癌・第 67 回日本癌学会学術総会・名古屋・平成 20 年 10 月
6. 佐々木誠人、水島隆史、城卓志 オリゴ糖生成酵素を用いた炎症性腸疾患予防の試み・JDDW2008・東京・平成 20 年 10 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

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：腸管免疫系において重要な役割を果たすことが近年明らかになってきた TLR を介した自然免疫系の活性化の制御機構を解析した。その結果、TLR を介した NF- κ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子が存在し、遅期誘導型遺伝子の発現を核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が抑制することを見出した。さらに、早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子の発現誘導機構を解析した。早期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が常に開いており転写制御因子が刺激後迅速にアクセスしやすい構造となっている。一方、遅期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激により構造変換を受けて開き、転写制御因子がアクセスできるようになる。このことが、遺伝子発現に時間を要する原因であることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子のプロモーターのクロマチン構造変換に関わる分子として、I κ BNS と同じ I κ B 分子 I κ Bzeta を同定した。今後も、自然免疫系の活性制御機構を解析し、新規アジュバントの開発に向けた基礎的基盤を提供したい。

また、近年新たなヘルパーT細胞のサブセットとして同定された Th17 細胞は、炎症性腸疾患の発症にも深く関与していることが明らかになっている。Th17 細胞は正常マウスにおいて、種々のリンパ組織にはほとんど観察されないが、腸管の粘膜固有層に多数存在している。そこで、腸管粘膜固有層に Th17 細胞を誘導しうる樹状細胞がないかを検討した。その結果、腸管粘膜固有層に特異的に存在している CD70^{high} CD11c^{low} 樹状細胞が、腸内細菌由来の ATP を認識し、IL-6 産生、TGF- β 活性化を導き、Th17 細胞分化を司っていることが明らかになった。さらに、ATP による Th17 細胞誘導が腸管炎症にも関わることを見出した。

さらに、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パ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

自然免疫系の活性制御機構を解析する過程で、大腸に局在する自然免疫担当細胞は、TLR 刺激に不応答になっていることを見出し、さらにこれら細胞に選択的に発現している遺伝子として I κ BNS を同定した。そして、I κ BNS の機能解析から、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型と遅期誘導型があり、I κ BNS は遅期誘導型の遺伝子発現を NF- κ B の活性を制御することにより抑制していることを見出している。

そこで、自然免疫系の活性制御機構をさらに解析する

ため、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。まず、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、TRIF 依存性のシグナルが入る状況で早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子発現を解析した。さらに、早期誘導型遺伝子として MIP2 遺伝子、遅期誘導型遺伝子として Lcn2 遺伝子を代表とし、各遺伝子プロモーターへの転写制御因子群のリクルートをクロマチン免疫沈降法で解析した。また、各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。また、同じ核に発現する I κ B 分子 I κ B ζ の遅期誘導型遺伝子の発現誘導における役割を解析した。

細胞内染色法により、各リンパ組織、腸管粘膜固有層での IL-17 産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。また、Toll-like receptor (TLR) を介したシグナルの消失する MyD88/TRIF 二重欠損マウスや、腸内常在菌のいない germ free マウスを用いて、腸管粘膜固有層での IL-17 産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。大腸の粘膜固有層から、CD11c 陽性樹状細胞を単離し、脾臓由来のナイーブ CD4 陽性細胞と共培養し、5 日後 CD4 T 細胞を回収し、PMA+ionophore 刺激による IL-17 発現を real-time Q-PCR 法で解析した。さらに、CD11c 陽性細胞の中で、CD70high, CD70low のサブセットを FACS ソーティングにより精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 陽性細胞と共培養し、5 日後 CD4 T 細胞を回収し、PMA+ionophore 刺激による IL-17 発現を real-time Q-PCR 法で解析した。CD70high, CD70low 樹状細胞での IL-6 や TGF- β 活性化に関わるインテグリン α V, β 8 の発現を real-time Q-PCR 法で解析した。

また、germ free マウスの便中アデノシン 3 リン酸(ATP)の濃度が SPF マウスの便と比較して極めて低いことから、ATP の Th17 細胞誘導における関与を解析した。さらに、CD70high, CD70low 樹状細胞での ATP センサーの発現を real-time Q-PCR 法で解析した。また、CD70high, CD70low 樹状細胞での ATP 依存性の IL-6, α V, β 8 の発現誘導を解析した。CD70high, CD70low 樹状細胞と CD4 陽性 T 細胞との共培養に ATP を投与し、Th17 細胞分化への影響を解析した。免疫不全 (SCID) マウ

スへ、ナイーブ T 細胞を移入すると大腸炎を発症するが、このモデルに ATP を投与し、その影響を解析した。

さらに、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

MyD88 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子の発現は障害されている。しかし、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 刺激すると TRIF 依存性の一見無意味なシグナルが活性化される。そこで、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、早期誘導型と遅期誘導型の各遺伝子の mRNA の発現誘導をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、遅期誘導型の遺伝子は MyD88 欠損マクロファージでは全く誘導されないが、早期誘導型の遺伝子はかなり減弱しているもののかすかに誘導された。このかすかな早期誘導型遺伝子の発現は、MyD88/TRIF 二重欠損マクロファージでは全く認められなかった。このように、早期誘導型遺伝子は、極めて発現誘導されやすく、一見無意味なシグナルが入ることによって、かすかに誘導されることが明らかになった。次に、早期誘導型、遅期誘導型遺伝子としてそれぞれ MIP2, Lcn2 遺伝子を代表として取り上げ、各遺伝子プロモーターへの、NF- κ B p65 サブユニット、RNA polymerase II, TBP のリクルートをクロマチン免疫沈降法により解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターへのこれら転写制御因子群のリクルートは刺激後 180 分より認められ、MyD88 欠損マクロファージでは全く認められない。一方、早期誘導型遺伝子のプロモーターへは、刺激後 15 分とさきわめて早い時間から認められ、さらに MyD88 欠損マクロファージ

でも有意に認められた。この結果から、早期誘導型遺伝子のプロモーターは、転写制御因子がきわめてアクセスし易い状態であることが明らかになった。

そこで、次に各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストンH3のメチル化を指標に解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターではヒストンH3のメチル化は認められず、TLR刺激180分から観察された。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターでは、メチル化が刺激以前から常に見られた。この結果から、早期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が常に開いた状況にあり、その結果転写制御因子がアクセスし易く、遺伝子発現が早期に誘導されることが明らかになった。一方、遅期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR刺激によって構造変換を受け、転写制御因子がアクセスされやすくなること、そしてこのことが、遺伝子発現が遅れるメカニズムであることが明らかになった。

次に、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造変換に関与する分子について解析を行った。これまでにIkBNSと同じ核に発現するIkB分子であるIkBzetaが遅期誘導型遺伝子の発現に関与していることを示した。実際、IkBzeta欠損マクロファージでは、TLR刺激による遅期誘導型遺伝子の発現が障害されている。IkBzetaはTLR刺激により早期に誘導される遺伝子の一つである。そこでマクロファージにIkBzetaを常時発現させ、TLR刺激による遅期誘導型遺伝子の発現を解析した。IkBzetaを発現させたマクロファージでは、遅期誘導型遺伝子の発現誘導が早く観察されるようになった。また、遅期誘導型遺伝子プロモーターへの転写制御因子のリクルート、メチル化の誘導も早く観察されるようになった。これらの結果から、IkBzetaは、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造を変換させることにより遺伝子発現の誘導に関与していることが明らかになった。

IL-17陽性のCD4細胞は、脾臓、腸管リンパ節、パイエル板などのリンパ組織では1%程度しか認められないが、小腸、大腸の粘膜固有層では、15-30%ものCD4細胞がIL-17を産生していた。腸管の粘膜固有層のCD4陽性細胞を精製し、Th17細胞のマーカーであるIL-17A、

IL-17F、IL-22、Ror γ tのmRNAの発現をreal time Q-PCRで解析しても、これらの発現は腸管リンパ節由来の細胞よりも極めて高く、Th17細胞が多数存在していることが示唆された。TLRシグナルの消失するMyD88/TRIF二重欠損マウスでも、腸管の粘膜固有層のIL-17産生細胞は正常マウスと同様に存在した。一方、腸管細菌叢のないgerm freeマウスでは、IL-17産生CD4細胞は激減していた。これらの結果から、Th17細胞は腸内常在菌依存性に、TLR非依存性に誘導されることが示唆された。

次に、腸管粘膜固有層にTh17分化を誘導する樹状細胞が存在している可能性を解析した。大腸粘膜固有層より、CD11c陽性細胞を精製し、脾臓由来のナイーブCD4 T細胞と5日間共培養し、再刺激によるIL-17の発現を解析すると、脾臓のCD11c陽性細胞と共培養したCD4細胞では、IL-17の発現はほとんど誘導されないが、大腸粘膜固有層のCD11c陽性細胞と共培養した細胞はIL-17を強く発現していることが明らかになった。この結果から、腸管粘膜固有層の樹状細胞には、Th17細胞の分化を誘導する活性があることが示唆された。樹状細胞は種々のサブセットに分かれることがよく知っている。そこで、腸管粘膜固有層のCD11c陽性細胞を種々の細胞表面マーカーで染色した。その結果、腸管粘膜固有層のCD11c陽性細胞は、脾臓のCD11c陽性細胞と異なり、CD70^{low}、CD70^{high}のサブセットが存在していることが明らかになった。そこで、CD70^{low}、CD70^{high}樹状細胞を大腸粘膜固有層より精製し、脾臓由来のナイーブCD4 T細胞と5日間共培養し、再刺激によるIL-17の発現を解析した。その結果、CD70^{low}細胞と共培養したT細胞では、IL-17の発現は誘導されないが、CD70^{high}樹状細胞と共培養したT細胞ではIL-17の発現が強く誘導された。またCD70^{high}樹状細胞は、CD70^{low}樹状細胞に比べて、IL-6やTGF- β 活性化に関わるインテグリン α V、 β 8の発現が亢進していることが明らかになった。IL-6、 α V、 β 8の発現は、germ freeマウス由来のCD70^{high}細胞では、SPFマウスに比べて低下していた。これらの結果から、CD70^{high}樹状細胞は腸内常在菌によりIL-6、 α V、 β 8を発現し、Th17細胞分化を誘導することが示唆された。

Germ free マウスの便中アデノシン3リン酸 (ATP) の濃度が SPF マウスの便と比較して極めて低いことが明らかになった。そこで、Germ free マウスに加水分解耐性の ATP (ATP γ S) を投与すると、腸管内 Th17 細胞の数が増加した。逆に SPF マウスに ATP 加水分解酵素を投与すると、腸管内 Th17 細胞の数が減少した。さらに SPF マウスに抗生剤を経口投与し、腸内細菌数を減らすと、便中 ATP 濃度の減少とともに、腸管内 Th17 細胞の数も減少した。このように、腸内細菌由来の ATP が腸管内 Th17 細胞の分化を担っていることが明らかになった。次に、ATP が CD70^{high} 樹状細胞に作用するかどうかを解析した。CD70^{high} 樹状細胞では、ATP センサーである P2X₁, P2Y₁ が数種類高発現していた。また、脾臓由来のナイーブ CD4⁺ T 細胞との共培養の系に、ATP γ S を添加すると、Th17 細胞分化が増強された。またナイーブ T 細胞を免疫不全 (SCID) マウスに移入し、T 細胞依存性に炎症性腸疾患を誘導する際に、加水分解耐性の ATP を投与すると、腸管内 Th17 細胞の数が増加するとともに腸管炎症が悪化した。

次に、腸管内 Th17 細胞分化に関与する腸内細菌を同定する目的で、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ムマウスの実験を行った。その結果、Segmented Filamentous Bacteria を定着させたマウスで、小腸の Th17 細胞の数が SPF マウスと同程度まで増加した。

D. 考察

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類される。遅期誘導型の遺伝子プロモーターはクロマチン構造が閉じていて、TLR 刺激により構造変換を受け、転写制御因子がアクセスする。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造は常に開いている。このことが、早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子群に分けられるメカニズムであることが考えられる。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に I κ B ζ が関与することも明らかになった。しかし、I κ B ζ 自身には、クロマチン構造を変換させる酵素活性はない。I κ B ζ と相互作用し、クロマチン

構造を変換させる分子の同定をさらに行っていきたい。このように、自然免疫系の活性制御機構を解析し、その制御技術基盤を確立し、有効なアジュバントの創出に寄与したい。

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が明らかになった。また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

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類されるが、この相違は各遺伝子プロモーターのクロマチン構造の違いによることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に I κ B ζ が関与することも明らかになった。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 細胞の分化が誘導す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

- SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR : 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 NA R, 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).
9. Saiga H, Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, Matsumoto S, Sato S, Matsumoto M, Akira S, Yoshikai Y, Honda K, Yamamoto M and Takeda K : Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J. Immunol.* 181, 8521-8527 (2008).
10. Nakamura K, Miyazato A, Koguchi Y, Adachi Y, Ohno N, Saijo S, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Fujita J, Ishii K, Kaku M and Kawakami K : Toll-like receptor (TLR) 2 and dectin-1 contribute to the production of IL-12p40 by bone marrow-derived dendritic cells infected with *Penicillium marneffei*. *Microbes Infect.* 10, 1223 -1227 (2008).
11. Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K and Takeda K : ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* 455, 808-812 (2008).
12. Nakamura J, Fujimoto M, Yasuda K, Takeda K, Akira S, Hatayama T, Takagi Y, Nozaki K, Hosokawa N and Nagata K : Targeted disruption of Hsp110/105 gene protects against ischemic stress. *Stroke* 9, 2853-2859 (2008).
13. Saito F, Kuwata H, Oike E, Koike M, Uchiyama Y, Honda K and Takeda K : Inefficient phagosome maturation in infant macrophages. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 375, 113-118 (2008).
14. Herrmann J, Imura T, Song B, Ao Y, Qi J, Nguyen T, Korsak R, Takeda K, Akira S and Sofroniew M : STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 28, 7231-7243 (2008).
15. Gong L, Yao F, Hockman K, Heng HH, Morton GJ, Takeda K, Akira S, Low MJ, Rubinstein M and Mackenzie RG : Stat3 is required in hypothalamic AgRP/Npy neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology* 149, 3346 -3354 (2008).

16. Ueta M, Hamuro J, Ueda E, Katoh N, Yamamoto M, Takeda K, Akira S and Kinoshita S : Stat6-independent tissue inflammation occurs selectively on the ocular surface and perioral skin of Ikbz^{-/-} mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3387-3394 (2008).
17. Kayama H, Rairez-Carrozzi VR, Yamamoto M, Mizutani T, Kuwata H, Iba H, Matsumoto M, Honda K, Smale ST and Takeda K : Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and Ikbz. *J. Biol. Chem* 283, 12468-12477 (2008).
18. Nakamura K, Miyazato A, Gang X, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, Suzuki K, Fujita J, Kaku M and Kawakami K: Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J. Immunol.* 180, 4067-4074 (2008).
19. Nishimura J, Saiga H, Sato S, Okuyama M, Kayama H, Kuwata H, Matsumoto S, Nishida T, Sawa Y, Akira S, Yoshikai Y, Yamamoto M and Takeda K : Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* 180, 4032-4039 (2008).
20. Hisaeda H, Tetsutani K, Imai T, Moriya C, Tu L, Hamano S, Duan X, Chou B, Ishida H, Aramaki A, Shen J, Ishii KJ, Coban C, Akira S, Takeda K, Yasutomo K, Torii M and Himeno K : Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J. Immunol.* 180, 2496-2503 (2008).
21. Owaki T, Asakawa M, Morishima N, Mizoguchi I, Fukai F, Takeda K, Mizuguchi J and Yoshimoto T : STAT3 is indispensable to IL -27 -mediated cell proliferation but not to IL -27 -induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* 180, 2903-2911 (2008).
22. Yamamoto M and Takeda K : Role of nuclear Ikb proteins in the regulation of host immune responses. *J. Infect. Chemother.* 14, 265-269 (2008).
23. Takeda K, Yamamoto M, Honda K : Assessing the response of cells to TLR stimulation. Signaling by Toll-like receptors, 1-21 (2008).
24. Yamamoto M, Uematsu S, Okamoto T, Matsuura Y, Sato S, Kumar H, Satoh T, Saitoh T, Takeda K, Ishii KJ, Takeuchi O, Kawai T and Akira S. : Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204, 2233-2239 (2007).
25. Sakamori R, Takehara T, Ohnishi C, Tatsumi T, Ohkawa K, Takeda K, Akira S, Hayashi N : STAT3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46, 1564-1573 (2007).
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. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda: A mechanism for development of intestinal Th17 cells causing intestinal inflammation. The 7th Sino-Japan Joint Conference for Cancer Research. Guangzhou, China, 2008. 12. 7-10
 5. 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
 6. 竹田 潔 自然免疫系の活性制御と免疫疾患 (特別

講演) 第51回日本小児血液学会, 東京 2009. 11. 27-29

7. 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

8. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama, Masahiro

Yamamoto NFAT is responsible for TLR-independent innate immune responses to a protozoan parasite
第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、神戸, 2008. 12. 9-12

9. Kiyoshi Takeda, Koji Atarashi, Kenya Honda :
Commensal bacteria-derived ATP mediates Th17 cell development in the intestinal lamina propria
(Symposium) 第37回日本免疫学会学術集会, 京都 2008. 12. 1-3

10. 竹田 潔 : 自然免疫系と炎症性腸疾患 第29回日本炎症・再生医学会、東京 2008. 7. 9

11. 竹田 潔 : 腸内フローラと炎症性腸疾患 第12回腸内細菌学会、東京 2008. 6. 13

12. Kiyoshi Takeda : Regulation of inflammatory responses by nuclear IκB proteins. Regulation of inflammatory responses by nuclear IκB proteins., Sendai, 2007. 10. 25

13. Kiyoshi Takeda : Regulation of innate immune responses. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, Tsukuba, 2007. 10. 29

14. 竹田 潔 : 自然免疫系による結核感染防御機構, 第60回日本細菌学会九州支部総会、長崎 2007. 10. 12

15. 竹田 潔, 自然免疫シグナルの制御機構 第28回日本炎症・再生医学会、東京 2007. 8. 2

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

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

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リンパ球マイグレーション調節による治療戦略

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：炎症性腸疾患の病態には過剰なリンパ球のマイグレーションが関与する。リンパ球マイグレーションにはビタミン、脂肪、腸内細菌、リン脂質が関与しておりこれらの制御が炎症巣へのリンパ球浸潤を抑制することにより炎症性腸疾患の治療戦略となることが期待される。

共同研究者

松永久幸、竹林晃一、上田俊秀、渡邊知佳子、八月朔日秀明、岡田義清、栗原千枝、穂苺量太

A. 研究目的

炎症性腸疾患の病態には過剰なリンパ球のマイグレーションが関与する。レチノイン酸はリンパ球上の消化管指向性の特異的接着分子発現に関与する。また、リゾフォスファチジン酸は、high endothelial venule へのリンパ球の侵入に関与する。また種々の脂肪摂取や腸内細菌の LPS はリンパ球マイグレーションを調節する。これらの調節が炎症性腸疾患を改善するか明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

実験腸炎マウスにレチノイン酸代謝阻害剤や種々の異なる濃度の脂肪を摂取させ、腸炎の改善効果や、リンパ球マイグレーションの影響を検討した。また Crohn 病患者において、局所リンパ球浸潤数とリゾフォスファチジン酸合成酵素の発現、及びその病態との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

防衛医大倫理委員会承認済み (No 462 平成 19 年 6 月 12 日、No 7054 平成 19 年 10 月 3 日、No 462 平成 19 年 6 月 12 日、No 725 平成 22 年 1 月 7 日)

C. 研究結果

レチノイン酸産生低下を目的に代謝酵素阻害剤 citral を含むレモングラスの飲水で炎症腸管へのリンパ球マイグレーションは低下し、腸炎が改善した。過剰な ω 3 脂肪酸食は大腸炎を悪化させた。Crohn 病患者炎症

部腸粘膜でリゾフォスファチジン酸の産生に関与するオートタクシンの発現亢進が認められた。

D. 考察

炎症性腸疾患の病変部粘膜へのリンパ球集積には、ビタミン、脂肪、腸内細菌、リン脂質が関与する。

E. 結論

炎症性腸疾患治療における異常なリンパ球 migration を抑制する治療戦略として、種々の管腔内因子が候補になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsunaga Hisayuki, Hokari Ryota, Higashiyama Masaaki, Kurihara Chie, Okada Yoshikiyo, Watanabe Chikako, Komoto Shunsuke, Nakamura Mitsuyasu, Kawaguchi Atsushi, Nagao Shigeaki, Miura Soichiro: Cilostazol, a specific PDE-3 inhibitor, ameliorates chronic ileitis via suppression of interaction of platelets with monocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 297:G1077 – G1084 2009

2) Matsunaga H, Hokari R, Kurihara C, Okada Y, Takebayashi K, Okudaira K, Watanabe C, Komoto S, Nakamura M, Tsuzuki Y, Kawaguchi A, Nagao S, Miura S: Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate the severity of ileitis in the senescence accelerated mice (SAM)P1/Yit mice model. *Clin Exp Immunol.* 158:325-33 2009