

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

高齢者炎症性腸疾患診療の現状把握—臨床個人調査票による検討—

研究分担者 三浦 総一郎 防衛医科大学校内科学 教授

研究要旨：高齢者（65 歳以上）クローン病（CD）・潰瘍性大腸炎（UC）において、予後に直結するリスク因子の発見、制御のための基礎データ収集を目的とした。本研究は過去 5 年間に厚生労働省へ新規に提出された臨床調査個人票の電子化されたデータを解析することにより行った。CD においては中心静脈栄養（IVH）の施行率が、UC においては入院率、ステロイド投与・IVH の施行率、手術率が高齢者群で高かったが、重症度や罹患範囲、術後合併症の発生率は差がなかった。今後、合併症や内服薬などの詳細な患者背景を含めたデータ収集が必要であると考えられた。

共同研究者：高本俊介<sup>1</sup>、朝倉敬子、桑原絵里加、村重綾彩、武林亨<sup>2</sup>、穂苺量太、渡辺知佳子<sup>1</sup>、井上詠、日比紀文<sup>3</sup> 1 防衛医科大学校内科 2 慶應義塾大学医学部衛生学・公衆衛生学教室 3 慶應義塾大学医学部消化器内科

A. 研究目的

炎症性腸疾患は若年者に発症のピークがあるが、少なからず高齢発症も見られ、若年者と同様の治療を行っているのが現状である。

高齢者では基礎疾患をかかえていたり、栄養状態が悪化しやすかったりなどの問題があり、予後に直結するリスク因子の発見、制御のための基礎データ収集が必要である。

B. 研究方法

クローン病（CD）および潰瘍性大腸炎（UC）患者で、2004 年から 2009 年までの 5 年間に厚生労働省へ新規に申請され、電子化された臨床調査個人票のデータを解析した（CD：7092 名、UC：34345 名）。同データは個人情報をも特定できない形で提供されている。

年齢が確認できたもののうち、申請時の年齢が、64 歳以下を非高齢者群、65 歳以上を高齢者群とし、罹患部位や重症度、入院歴（UC のみ）、内科的治療の内容、外科手術の有無、合併症の有無につき検討した。

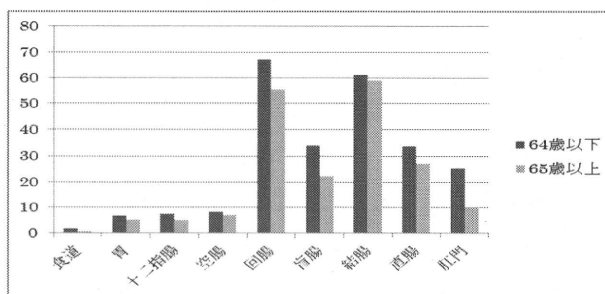
C. 研究結果

(1) CD

①男女比

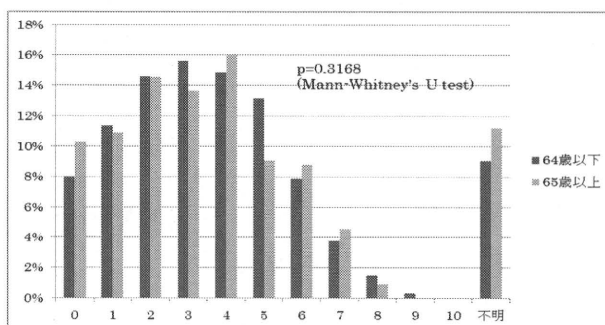
非高齢者群（6762 名） 男：女=73%：27%  
 高齢者群（330 名） 男：女=43%：57%

②罹患部位



③重症度（IOIBD スコア：10 点満点）

現在の重症度は両群で有意差が見られなかった。



④中心静脈栄養（IVH）の施行率

非高齢者群：18.38%  
 高齢者群：24.54% ( $p=0.005$ )

⑤手術率・術後合併症

手術施行率 (p=0.0685)

非高齢者群 20.11% : 高齢者群 24.24%

術後合併症発生率 (p=0.0757)

非高齢者群 9.04% : 高齢者群 15.00%

(2) UC

①男女比

非高齢者群 (30794 名) 男 : 女 = 56% : 44%

高齢者群 (3551 名) 男 : 女 = 59% : 41%

②罹患範囲 (有意差なし)

	直腸炎	左側	全結腸	不明
非高齢者	30%	28%	29%	13%
高齢者	24%	29%	32%	15%

③重症度 (有意差なし)

	軽症	中等症	重症	劇症	不明
非高齢者	46%	44%	8%	0%	2%
高齢者	45%	43%	9%	1%	2%

④入院歴 (p < 0.001)

	入院あり	入院なし	不明
非高齢者	24%	41%	35%
高齢者	38%	31%	31%

⑤内科的治療

	非高齢者	高齢者	p 値
ステロイド治療	29.90%	35.15%	<0.001
IVH 施行	5.75%	11.41%	<0.001

⑥手術率・術後合併症

手術施行率 (p < 0.001)

非高齢者群 1.12% : 高齢者群 2.20%

術後合併症発生率 (p=0.2642)

非高齢者群 19.90% : 高齢者群 25.60%

D. 考察

CD では病変の分布に有意差は見られなかったが、これまでの報告では差があると考えられており、さらに詳細な検討が必要。重症度も差は見られなかつ

たが、発症時あるいは最重症時の状態が反映されていない可能性が高い。

IVH の施行率は高齢者群で高く、栄養状態が低下しやすいことが推測される。手術率、合併症の発生率に有意差はないが、経過の長い患者での成績は反映されていない

一方 UC では、罹患範囲、重症度に差は見られなかった。高齢者では入院治療を行う患者の割合が多く、症状によって日常生活に支障を来しやすいと考えられる。内科的治療ではステロイド投与および IVH を行っている率が高齢者群で高く、入院の有無との関連について詳細な検討が必要。

高齢者では手術率が高く、合併症の発生率は差が見られなかったが、どのような状況で手術に至ったかの検討が必要と思われる。

E. 結論

CD、UC とも、高齢者群・非高齢者群で、一定の相違が認められた。しかし、高齢者炎症性腸疾患のリスク分析には臨床個人調査票の解析のみでの評価は難しく、多施設が参加する臨床研究が不可欠である。

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

三浦総一郎・下部消化管疾患の治療ガイドラインと高齢者への適応・第 13 回日本高齢消化器病学会教育セミナー・六本木アカデミーヒルズ・平成 22 年 7 月 9 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

高齢者炎症性腸疾患診療の現状把握

—多施設へのアンケート調査の提案と前向き多施設共同研究の提案—

研究分担者 三浦 総一郎 防衛医科大学校内科学 教授

研究要旨：高齢者（65歳以上）炎症性腸疾患患者治療の現状を把握し、予後に直結するリスク因子の発見、制御のためのデータ収集を目的とした。症例数を確保するために多施設共同研究とする。後ろ向き研究は、過去3年間の高齢者およびそれと同数の非高齢者の入院患者につき、個別調査票に記入してもらうことにより行う。前向き研究は、高齢および非高齢の新規発症患者を全例登録してもらい、2年間追跡調査することにより行う。後ろ向き研究では軽症患者の情報が反映されない点、前向き研究では観察期間を十分とれない点が問題であり、その欠点を補うために臨床個人調査票のデータを活用する必要があると考えられた。

共同研究者

高本俊介<sup>1</sup>、本谷聡<sup>2</sup>、鈴木健司<sup>3</sup>、岡政志、藤盛健二<sup>4</sup>、渡邊聡明<sup>5</sup>、猿田雅之<sup>6</sup>、吉村直樹<sup>7</sup>、渡辺守、長沼誠<sup>8</sup>、鈴木康夫<sup>9</sup>、日比紀文、井上詠<sup>10</sup>、杉田昭<sup>11</sup>、高橋宏和<sup>12</sup>、小林清典<sup>13</sup>、花井洋行<sup>14</sup>、安藤貴文、後藤秀実<sup>15</sup>、谷田諭史<sup>16</sup>、藤山佳秀<sup>17</sup>、内藤裕二<sup>18</sup>、仲瀬裕志<sup>19</sup>、渡辺憲治<sup>20</sup>、飯島英樹<sup>21</sup>、岡崎和一<sup>22</sup>、松本誉之<sup>23</sup>、上野義隆、田中信治<sup>24</sup>、石原俊治<sup>25</sup>、松本主之<sup>26</sup>、松井敏幸<sup>27</sup>、二見善太郎<sup>28</sup>、光山慶一<sup>29</sup>、坪内博仁<sup>30</sup>、佐々木巖<sup>31</sup> 1 防衛医科大学校内科 2 札幌厚生病院 IBDセンター 3 新潟大学医学部 第3内科 4 埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 5 帝京大学医学部 外科 6 慈恵会医科大学付属病院 消化器・肝臓内科 7 社会保険中央総合病院 内科 8 東京医科歯科大学 消化器内科 9 東邦大学医療センター佐倉病院 消化器内科 10 慶應義塾大学医学部 消化器内科 11 横浜市立市民病院 外科 12 横浜市立大学附属病院 消化器内科 13 北里大学東病院 消化器内科 14 浜松南病院 消化器病・IBDセンター 15 名古屋大学医学部 消化器内科 16 名古屋市立大学病院 消化器内科 17 滋賀医科大学 消化器内科 18 京都府立医科大学 消化器内科 19 京都大学医学部付属病院 消化器内科

20 大阪市立大学病院 消化器内科 21 大阪大学医学部付属病院 消化器内科 22 関西医科大学病院 消化器内科 23 兵庫医科大学 内科学下部消化管科 24 広島大学病院 内視鏡診療科 25 島根医科大学 消化器内科 26 九州大学病院 消化器内科 27 福岡大学筑紫病院 消化器内科 28 福岡大学筑紫病院 外科 29 久留米大学病院 消化器内科 30 鹿児島大学医学部付属病院 消化器内科 31 東北大学医学部 外科

A. 研究目的

高齢者炎症性腸疾患患者治療の現状を把握し、予後に直結するリスク因子を発見、制御することを目的とする。

特に、臨床個人調査票のデータからは得られない基礎疾患や内服薬、最重症時の状況、手術理由と合併症の詳細なども含めて検討する。症例数を確保するために多施設共同研究とした。

B. 研究方法

参加協力施設にクローン病（CD）、潰瘍性大腸炎（UC）それぞれの個別調査票を送付し、過去3年間に入院治療した65歳以上の高齢者全例、およびその期間中に入院した64歳以下の非高齢者（対照高齢者の入院時期に最も近い非高齢者をランダムに高齢者

と同数選ぶ)について記入していただく。入院患者に対象を絞ったのは、外来患者にまで対象を広げると患者数が増えすぎてしまい、かえって詳細な情報が得られにくくなると判断したためである。

前向き研究として、今後新たに発症した高齢および非高齢のCD/UC患者全例を登録していただき、診断・治療の状況につき、2年間の追跡調査を行う。

(倫理面への配慮)

前向き研究に関しては各施設でインフォームドコンセントを得て行う。個人情報の扱いには充分配慮し、本研究への参加が自由意志で行われ、参加しなくても不利益を得ない点を明確にする。

## C. 研究結果

### ①後ろ向き研究

CD・UCそれぞれの高齢・非高齢患者につき、発症年齢、入院理由(過去の入院も含めて)、入院期間と転帰、発症時および最重症時の重症度と罹患範囲、腸管および腸管外合併症の有無と詳細、併存疾患と内服薬、手術の有無と手術理由、術後合併症などを記載してもらうアンケートを行うこととした。本年度はそのチェック項目に関して、試験参加予定施設より意見を収集して、調整し、最終的なフォームを作成した。

### ②前向き研究

研究協力施設のすべての新規患者を登録し、登録時、1年後、2年後の状況を、後ろ向き研究と同様の項目について記載してもらうこととする。前向き試験調査項目に関しても、本年度は試験参加予定施設に配布して意見を聴取し、最終的なフォームを作成した。

## D. 考察

過去3年間の入院患者に関する後ろ向き研究では、発症時および最重症時の情報が得られる反面、入院患者という比較的重症の患者中心の情報であり、軽症患者のデータが得られにくい点が問題であると考えられる。そこで、治療の現状を正確に把握するためには前向きの研究も必須であるが、観察期間が十分と

れず、発癌などの長期的な合併症や予後の分析が困難であると考えられる。

これらの短所を補う目的で、厚生労働省へ提出された臨床調査個人票のデータを活用することも検討している。

## E. 結論

高齢者(65歳以上)炎症性腸疾患患者治療の現状を把握し、予後に直結するリスク因子の発見、制御することを目指した多施設臨床研究を立案した。

## 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

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 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

炎症性腸発癌過程において AID が果たす役割の解明

研究分担者 千葉 勉 京都大学大学院医学研究科消化器内科学講座 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎 (UC)には高率に colitis-associated cancer (CAC)と呼ばれる大腸癌が合併することがよく知られているが、その発生機序については不明な点が多い。Activation-induced cytidine deaminase (AID)は、活性型 B リンパ球に発現し、免疫グロブリン遺伝子に変異を導入する作用を有する分子であるが、近年、AID の異所性発現が発癌過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。今回我々は、CAC 発生過程における AID の役割について検討した。UC 患者の大腸粘膜および CAC 組織における AID 発現を調べると、両組織において AID が高発現していることが明らかになった。ヒト大腸培養細胞を用いた検討では、TNF- $\alpha$ 、IL-4 または IL-13 刺激により AID が異所性に生じること、また AID を長期間発現させることにより癌抑制遺伝子 p53 に高率に変異が生成することが明らかとなった。炎症性腸疾患 (IBD) モデルマウスである IL-10<sup>-/-</sup>マウスを用いた解析では、IL-10<sup>-/-</sup>マウスの大腸上皮では AID が異所性に発現していること、IL-10<sup>-/-</sup>マウスで AID を欠損させると、大腸粘膜における p53 遺伝子変異頻度が減少するうえに、有意に大腸癌発生頻度が低下することが判明した。今回の我々の研究により、AID はその遺伝子変異導入活性を介して CAC の発生に強く関与しているものと考えられた。

共同研究者

仲瀬裕志 京都大学医学部附属病院内視鏡部 講師  
丸澤宏之 京都大学医学研究科消化器内科学 講師  
高井 淳 京都大学医学研究科消化器内科学  
特別研究員

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) からの大腸発癌 (Colitis associated colorectal cancer; CAC) は全大腸癌の約 2%程度を占めるとされているが、潰瘍性大腸炎 (UC) からの大腸癌罹患率として見るとその発生頻度はきわめて高い。例えば、欧米では UC 症例の大腸癌の累積発生率は、10 年で 2%、20 年で 8%、30 年では 18%と報告されており、健康人の散発性大腸癌の罹患率の 3.7%と比較すると、UC を背景とした大腸発癌が非常に高頻度であることが分かる。こうした疫学的事実から、大腸上皮の長期間にわたる炎症の持続は、大腸癌の発生母地として極めて重要な役割を果たしており、大腸発癌のリスクは UC の罹患期間に大きく比例していると考えられる。

CAC は炎症粘膜を背景とした dysplasia を前癌病変

として発生し、癌が多発する傾向にあることが知られている (多中心性発癌)。遺伝子レベルでも、CAC では早期から p53 遺伝子の変異が見られ、dysplasia の段階ですでに 44-63%に p53 の異常が認められると報告されている。p53 とは対照的に、大腸ポリープからの発癌時に頻度の高い APC 遺伝子への変異は CAC では発癌後期に認められるのみである。このことから、CAC の発生過程においては、炎症にさらされた大腸上皮細胞の p53 遺伝子に早期に変異を来たすことが重要であると考えられている。しかしながら、このような遺伝子異常が生じる具体的なメカニズムについては不明であった。

近年、遺伝子に変異を導入する作用を有する分子として、遺伝子編集酵素と称される分子の一群が同定された。これらの遺伝子編集酵素の大半は、Apolipoprotein B 100 mRNA editing enzyme catalytic polypeptide (APOBEC) ファミリー群に属しており、その生理的作用として様々な遺伝情報をコードしている DNA もしくは RNA 配列に変異を導入することを介して標的遺伝子の多様性を産み出すことにより、生体の恒常性を保つためのさまざまな仕組みや働きに貢

献していると考えられている。この APOBEC ファミリーの中でも、activation-induced cytidine deaminase (AID) は、唯一ヒトゲノムに遺伝子変異を導入する活性を有する分子である。AID は生理的条件下では、活性化された B リンパ球のみに発現し、免疫グロブリン遺伝子の可変領域に高頻度に体細胞突然変異を導入する機能をもつ。しかしながら近年、この AID が B 細胞系のリンパ腫に高発現しているとする報告が相次ぐようになり、最近我々は、肝細胞や胃粘膜上皮細胞にも AID が炎症刺激に伴って異所性に発現し、遺伝子異常が蓄積することが肝癌および胃癌発生において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

そこで、今回我々は、CAC 発生過程において AID が果たす役割について、ヒト臨床検体、ヒト大腸培養細胞および IBD モデルマウスを用いた解析を行った。

## B. 研究方法

1. 健常人および UC 患者の大腸粘膜組織、また UC 患者に発生した CAC 組織における AID 発現を免疫染色にて検討した。
2. ヒト大腸培養細胞に炎症性サイトカインによって刺激を加えた際の AID 発現の有無について検討した。
3. ヒト大腸培養細胞に持続的に AID を発現させた際の遺伝子変異生成頻度について検討した。
4. IBD モデル動物である IL-10<sup>-/-</sup>マウスの大腸粘膜における炎症性サイトカイン産生および AID 発現について検討した。
5. IL-10<sup>-/-</sup>マウスおよび IL-10<sup>-/-</sup>AID<sup>-/-</sup>マウスの大腸上皮における種々の発癌関連遺伝子に生じる変異の頻度について比較検討した。
6. IL-10<sup>-/-</sup>マウスおよび IL-10<sup>-/-</sup>AID<sup>-/-</sup>マウスにおける大腸発癌頻度について比較検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト臨床検体の解析を行う場合には、各患者に対して informed consent を行った。

## C. 研究結果

1. 健常人の大腸粘膜には AID の発現を認めなかったが、UC 症例の大腸上皮細胞には AID の異所性発現を高率に認めることが明らかとなった。また、CAC

組織にも AID の高発現を認めた。

2. IBD の大腸上皮組織で発現が上昇している炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  に着目し、ヒト培養大腸癌細胞に TNF- $\alpha$  刺激を行ったところ、内在性 AID が発現上昇することがわかった。一方、UC 症例の大腸上皮粘膜は、Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 が高値であることが知られている。そこで、ヒト培養大腸癌細胞に IL-4、IL-13 刺激を行ったところ、AID の発現誘導が確認された。また、TNF- $\alpha$  刺激による場合は NF- $\kappa$ B pathway 依存性に、IL-4 および IL-13 刺激の場合は STAT6 依存性に AID が発現することが明らかとなった。
3. ヒト培養大腸細胞に AID を持続発現させ、各種癌関連遺伝子の変異の有無の検討を行ったところ、p53 遺伝子に変異が生成、蓄積することが明らかとなった。また、AID による p53 遺伝子への変異生成頻度は時間依存性であり、AID を 2 週間発現しても遺伝子変異はほとんど認めないにも関わらず、AID 発現 4 週、8 週で、遺伝子異常の頻度が増加することが判明した。一方、p53 遺伝子とは対照的に、AID 発現により大腸上皮細胞内の APC 遺伝子や KRAS 遺伝子にはほとんど変異が生じないことが明らかとなった。
4. ヒト IBD 患者と同様、IL-10<sup>-/-</sup>マウスの大腸粘膜では、TNF- $\alpha$  の高発現が認められるのと同時に、AID 発現も亢進しており、特に盲腸において両者とも強い発現を認めた。in situ hybridization にて、この AID 発現は活性型 B リンパ球のみならず大腸上皮でも認められており、IL-10<sup>-/-</sup>マウスの大腸上皮では AID が異所性に発現することが明らかとなった。
5. IL-10<sup>-/-</sup>マウスの大腸粘膜では、p53 遺伝子に 2.19/10<sup>4</sup> と高率に変異の蓄積が認められたのに対し、IL-10<sup>-/-</sup>AID<sup>-/-</sup>マウスでは 0.71/10<sup>4</sup> とその頻度は有意に低下していた。それに対して、Apc, Ctnnb1 ( $\beta$ -catenin), Kras 遺伝子における変異頻度については両群間に明らかな差を認めなかった。
6. 約 50 週齢にて、IL-10<sup>-/-</sup>マウスの盲腸では 22 匹中 6 匹 (27%) に大腸癌の発生が認められたのに対し、IL-10<sup>-/-</sup>AID<sup>-/-</sup>マウスでは、23 匹中 1 匹の遠位

結腸に腫瘍を認めたのみで、盲腸における大腸癌の発生は皆無であった。

#### D. 考察

今回我々は、UC 長期罹患により生じる CAC の発生過程において、大腸上皮における AID の異所性発現が極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。

以前我々は、ウイルス性肝炎や H. pylori 関連胃炎で認められる AID は、NF- $\kappa$ B pathway dependentであることを明らかにしている。今回、慢性腸炎粘膜における AID 発現にも NF- $\kappa$ B pathway は重要である一方、潰瘍性大腸炎において高発現することが知られている IL-4 や IL-13 による刺激も AID に異所性発現に関与していることが初めて明らかとなった。この発現経路は STAT6 依存性であり、この pathway も CAC 発生過程において重要な位置を占めていることが示唆される。

通常の大腸癌は、最初に APC に遺伝子異常が発生し、その後 KRAS, DCC, p53 に異常が生じるという多段階発癌の形態を取るのに対し、CAC では早期に p53 に変異が生じ、APC, KRAS への異常は発癌後期に認められる。今回のヒト培養細胞とマウスモデルを用いた検討では、両者どちらにおいても p53 に変異の生成が認められる一方、APC や KRAS には異常を認めなかった。この結果は、CAC 発生早期における遺伝子変異プロファイルと一致しており、AID 発現が CAC 発生に関与することを示唆する知見と考えられる。

#### E. 結論

UC 患者では、慢性的な炎症刺激に伴って大腸上皮細胞に異所性に発現する AID により遺伝子変異が蓄積することが、CAC 発生過程において重要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Masuda S, Inui

K, Chiba T: Tacrolimus therapy as an alternative to thiopurines for maintaining remission in patients with refractory ulcerative colitis. **J Clin Gastroenterol** 2011(in press).

2. Kitamura H, Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Matsumura K, Takeda Y, Uza N, Nagata K, Chiba T: Role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis of experimental colitis. **Biochem Biophys Res Commun** 404:599-604:2011.
3. Endo Y, Marusawa H, Chiba T: Involvement of activation-induced cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers. **J Gastroenterol** 46 (Suppl 1):6-10:2011.
4. Honzawa Y, Nakase H, Takeda Y, Nagata K, Chiba T: Heat shock protein 47 can be a new target molecule for intestinal fibrosis related to inflammatory bowel disease. **Inflam Bowel Dis** 16:2004-2006:2010.
5. Nakase H, Honzawa Y, Chiba T: Heat shock protein 47 is a new candidate molecule as anti-fibrotic treatment of Crohn's disease. **Aliment Pharmacol Ther** 31:926-927:2010.
6. Yamamoto S, Nakase H, Chiba T: Oral Tacrolimus (FK506) in refractory paediatric colitis: authors' reply. **Aliment Pharmacol Ther** 31:677-678:2010.
7. Matsumura K, Nakase H, Chiba T. Efficacy of Oral Tacrolimus on Inetestinal Behcet's Disease. **Inflam Bowel Disease** 16:188-189:2010.
8. Akitake R, Nakase H, Tamaoki M, Ueno S, Mikami S, Chiba T: Modulation of Th1/Th2 balance by Infliximab Rescues Postoperative Occurrence of Small-Intestinal Inflammation Associated with Ulcerative Colitis. **Dig Dis Sci** 55:1781-1784:2010.
9. Yamamoto S, Nakase H, Matsuura M, Honzawa Y, Masuda S, Inui K, Chiba T: Efficacy and safty of infliximab as rescue therapy for ulcerative

colitis refractory to tacrolimus. *J Gastroenterol Hepatol* 25:886-891:2010.

10. Nakase H, Fujiyama Y, Oshitani N, Oga T, Nonomura K, Matsuoka T, 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 2, placebo-controlled trial. *Inflamm Bowel Dis* 16:731-733:2010.
11. Nakase H, Yoshino T, Honzawa Y, Chiba T: Low Prevalence of CMV Infection in Patients with Crohn's Disease in Comparison with Ulcerative colitis-Effect of different immune response on prevalence of CMV infection-. *Dig Dis Sci* 55:1498-1499:2010.
12. Shimizu T, Marusawa H, Yamashita Y: Diaphragm-like stricture of the small intestine related to cytomegalovirus infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 8: XXi:2010
13. Watanabe T, Chiba T: Defective interleukin-10 signaling in human inflammatory bowel disease. (Selected Summary). *Gastroenterology* 138:2016-2018:2010.

## 2. 学会発表

1. Yusuke Honzawa, Hiroshi Nakase, Kayoko Matsumura, Shuji Yamamoto, Norimitsu Uza, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: Serum levels of heat shock protein 47 could be a useful marker for intestinal fibrosis in patients with Crohn's disease. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium/Retreat 2010, Hyogo, 2010. 11. 5.
2. Tsutomu Chiba: Involvement of activation-induced cytidine deaminase (AID) in the development of colitis-associated colorectal cancers. The 2nd International Forum of the 96th Annual Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology, Niigata, 2010. 4. 23.

3. 山本修司、仲瀬裕志、千葉 勉: 重症潰瘍性大腸炎に対するタクロリムスによる寛解導入療法の短期および長期成績の検討. 第 18 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2010)・パネルディスカッション, 横浜, 2010. 10. 15.
4. 松村佳代子、仲瀬裕志、千葉 勉: CMV 再活性化を有する難治性潰瘍性大腸炎の今後の治療戦略. 第 18 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2010)・パネルディスカッション, 横浜, 2010. 10. 14.
5. 仲瀬裕志: 潰瘍性大腸炎治療におけるタクロリムス使用法の実際・京都大学での使用経験について. 第 18 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2010)・サテライトシンポジウム, 横浜, 2010. 10. 14.
6. 本澤有介、仲瀬裕志、千葉 勉: インフリキシマブの難治性潰瘍性大腸炎に対する治療効果の検討. 第 18 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2010)・シンポジウム, 横浜, 2010. 10. 13.
7. 松浦 稔、本澤有介、仲瀬裕志: 腸管局所におけるサイトメガロウイルスの再活性化を伴った潰瘍性大腸炎の内視鏡所見に関する検討. 第 85 回日本消化器内視鏡学会近畿地方会, 大阪, 2010. 10. 2.
8. 本澤有介、仲瀬裕志、千葉 勉: クロウン病に対する内視鏡的拡張術と免疫調節剤との併用における長期予後の検討. 第 96 回日本消化器病学会総会・パネルディスカッション, 新潟, 2010. 4. 23.

## 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



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

血清 IgA 糖鎖解析を用いた炎症性腸疾患新規バイオマーカーの開発

研究協力者 飯島 英樹 大阪大学消化器内科学 助教

研究要旨：炎症性腸疾患患者の血清 IgG の糖鎖にはガラクトースの欠損が見られるが、IgA においても顕著な糖鎖構造の変化が認められた。免疫グロブリンの糖鎖構造は、炎症性腸疾患の診断マーカーとして有用であり、さらに疾患活動性、治療予後予測に有用なバイオマーカーであると考えられた。

共同研究者 井上隆弘\*、新崎信一郎\*<sup>§</sup>、向井章\*、  
中島佐知子\*、考藤達哉\*、三善英知<sup>§</sup>、和田芳直<sup>#</sup>、  
辻井正彦\*、林紀夫\*

大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学\*、大阪  
大学保健学科機能診断科学<sup>§</sup>、大阪府立母子保健セ  
ンター<sup>#</sup>、関西労災病院\*

#### A. 研究目的

免疫グロブリン IgA の糖鎖構造を解析し、炎症性腸疾患患者におけるバイオマーカーとしての有用性を明らかにすること。

#### B. 研究方法

炎症性腸疾患患者や健常者の血清や腸管分泌物より IgA を分離し、IgA に付着する N-結合型、および O-結合型糖鎖の構造を HPLC あるいは MALDI-TOF MS により解析した。IgA に付着する糖鎖のパターンを疾患別に対比し、診断マーカーとしての有用性を ROC 曲線により解析した。

(倫理面への配慮)

検体提供にあたってはインフォームドコンセントを得た上で、研究を施行した。

#### C. 研究結果

炎症性腸疾患患者の血清 IgA の N-結合型糖鎖構造のパターンは健常者と差を認めなかった。

炎症性腸疾患患者の血清 IgA の O-結合型糖鎖において、特にクローン病患者において GalNAc 付加が減少していることが明らかとなった。ROC 曲線により解析すると IgA の GalNAc 付加数の指標 5N/4N は、従

来クローン病の診断マーカーとして報告されている Anti-Saccharomices Cervisiae Antibody (ASCA) よりも感度、特異度とも優れたマーカーであった。

#### D. 考察

炎症性腸疾患の診断のためには、内視鏡検査など侵襲的な検査が必要であるが、IgA の糖鎖構造解析は炎症性腸疾患を鑑別するための新たなバイオマーカーとなることが示唆された。IgA の糖鎖異常発生のメカニズム、病態における意義についてさらに検討を行う必要がある。

#### E. 結論

GalNAc 付加の指標である 5N/4N 比はクローン病において健常者と比較して有意に低値であり、新たなバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakajima S, Iijima H, Shinzaki S, Egawa S, Inoue T, Mukai A, Hayashi Y, Kondo J, Akasaka T, Nishida T, Kanto T, Morii E, Mizushima T, Miyoshi E, Tsujii M, Hayashi N: Functional analysis of agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. In press.
2. Nakajima S, Iijima H, Egawa S, Shinzaki S,

- Inoue T, Hayashi Y, Ying J, Mukai A, Akasaka T, Nishida T, Kanto T, Tsujii M, Hayashi N: Association of Vitamin K Deficiency with Bone Metabolism and Clinical Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrition*, In press.
3. Terabe F, Fujimoto M, Serada S, Shinzaki S, Iijima H, Tsujii M, Hayashi N, Nomura S, Kawahata H, Jang MH, Miyasaka M, Mihara M, Ohsugi Y, Kishimoto T, Naka T: Comparative analysis of the effects of anti-IL-6 receptor mAb and anti-TNF mAb treatment on CD4(+) T-cell responses in murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 491-502.
  4. Kondo J, Iijima H, Abe T, Komori M, Hiyama S, Ito T, Nakama A, Tominaga K, Kubo M, Suzuki K, Iwanaga Y, Ebara R, Takeda A, Tsuji S, Nishida T, Tsutsui S, Tsujii M, Hayashi N: Roles of double-balloon endoscopy in the diagnosis and treatment of Crohn's disease: a multicenter experience. *J Gastroenterol* 2010;45:713-20.
  5. 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 as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2010;69:770-4.
  6. Obata T, Goto Y, Kunisawa J, Sato S, Sakamoto M, Setoyama H, Matsuki T, Nonaka K, Shibata N, Gohda M, Kagiya Y, Nochi T, Yuki Y, Fukuyama Y, Mukai A, Shinzaki S, Fujihashi K, Sasakawa C, Iijima H, Goto M, Umesaki Y, Benno Y, Kiyono H: Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:7419-24.
  7. Mizushima T, Ohno Y, Nakajima K, Kai Y, Iijima H, Sekimoto M, Nishida T, Nezu R, Ito T, Doki Y, Mori M. Malignancy in Crohn's Disease: Incidence and Clinical Characteristics in Japan. *Digestion* 2010;81:265-270.
  8. 新崎信一郎、飯島英樹、三善英知. 糖鎖と炎症性腸疾患. 生体の科学 2010;61:122-127.
  9. 飯島英樹、新崎信一郎、中島佐知子、三善英知、辻井正彦. 糖鎖解析にもとづく IBD の診断 2010;4:18-23
2. 学会発表
1. Shinzaki S, Iijima H, Kuroki E, Tatsunaka N, Egawa S, Nakajima S, Inoue T, Akira M, Kanto T, Tsujii M, Miyoshi E, Hayashi N. Protective Role in Deficiency of Galactosyltransferase for Murine Colitis With Upregulation of IL-10 by Communication of B Cells and Macrophages. DDW New Orleans, USA, May2-6, 2010.
  2. S. Shinzaki, H. Iijima, N. Tatsunaka, S. Egawa, S. Nakajima, T. Inoue, A. Mukai, M. Tsujii, E. Miyoshi, N. Hayashi. Regulation of oligosaccharide-associated enzymes by Infliximab In B cells of Crohn's disease, The 4th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium, 東京, 2010/1/23.
  3. 小森真人、飯島英樹、伊藤善基、久保光彦. 小腸疾患の診断における内視鏡的アプローチの新展開, 第6回日本消化管学会総会学術集会, 福岡, 2010/2/19-20.
  4. 白石衣里、西田勉、飯島英樹、柄川悟志、荒木浩士、渡部健二、筒井秀作、辻井正彦、竹原徹郎、林紀夫. インフリキシマブが著効した腸管型ベーチェット病の一例, 第84回日本消化器内視鏡学会近畿地方会, 大阪, 2010/3/13.
  5. 新崎信一郎、飯島英樹、竜中法佳、黒木絵莉、向井章、井上隆弘、中島佐知子、柄川悟志、考藤達哉、辻井正彦、三善英知、林紀夫. ガラクトース転移酵素欠損マウス B 細胞の腸炎保護作用, 第96回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010/4/21-24.

6. 渋川成弘、西田勉、筒井秀作、山田拓哉、植村彰夫、新崎信一郎、宮崎昌典、薬師神崇行、飯島英樹、望月圭、平松直樹、辻井正彦、竹原徹郎. 関節炎を合併した治療抵抗性の潰瘍性大腸炎に Infliximab が著効した 1 例, 第 93 回日本消化器病学会近畿地方会, 大阪, 2010/9/18.
7. 中島佐知子、飯島英樹、向井章、井上隆弘、新崎信一郎、柄川悟志、赤坂智史、林義人、近藤純平、西田勉、辻井正彦、林紀夫. 炎症性腸疾患における Mannan Binding Lectin の分布とガラクトース欠損 IgG の役割, JDDW (第 52 回消化器病学会大会), 横浜, 2010/10/13-16.
8. 新崎信一郎、飯島英樹、林紀夫. 糖鎖関連バイオマーカーを用いたクローン病に対するインフリキシマブ治療戦略, JDDW (S4-1 消化器、内視鏡、消化器外科、消化吸収学会合同), 横浜, 2010/10/13-16.
9. 向井章、飯島英樹、林紀夫. クローン病に合併した悪性腫瘍の検討, JDDW (PD12 内視鏡、消化器、消化器外科合同), 2010/10/13-16.
10. 井上隆弘、飯島英樹、林紀夫. 炎症性腸疾患における IgA 糖鎖の疾患マーカーとしての有用性, JDDW (第 52 回消化器病学会大会), 横浜 2010/10/13-16.
11. 中島佐知子、飯島英樹、日山智史、白石衣里、向井章、井上隆弘、新崎信一郎、赤坂智史、林義人、近藤純平、西田勉、辻井正彦. 炎症性腸疾患患者における Mannan Binding Protein の分布とガラクトース欠損 IgG の役割, 第 38 回日本潰瘍学会, 大阪, 2010/11/19-20.

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  
該当なし

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

IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF シグナルを介した大腸細胞増殖機序  
-HB-EGF-C 末端シグナルを標的とした網羅的薬剤探索-

研究協力者 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：HB-EGF-CTF 核移行シグナルは、細胞増殖亢進に重要な役割を果たしている。HB-EGF-CTF と転写抑制因子である PLZF 結合阻害剤探索に AlphaScreen アッセイシステムを利用し、6000 化合物のスクリーニングを行なった。2 種類の化合物 (compound A, B) を見だし、Compound A の細胞増殖抑制作用、HB-EGF-CTF 核移行抑制作用を確認した。Compound A のような化合物による HB-EGF-CTF 核移行シグナルの制御は、炎症性腸疾患炎症における colitic cancer の発生、増殖、進展に対し新たな治療戦略になりうると考えられる。

共同研究者  
谷田諭史 (名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学)  
東山繁樹 (愛媛大学大学院生化学分子遺伝分野 2)

#### A. 研究目的

潰瘍性大腸炎において、腸管の持続する活動性炎症より大腸癌 (colitic cancer) が発生する。しかしそのメカニズムは不明のままである。

炎症粘膜中の炎症細胞や腸管上皮から放出される炎症性サイトカイン (IL-8) は、好中球遊走を促進させ腸管炎症の増悪に関与している。その一方で増殖因子としての作用を持ち、IL-8 は、colitic cancer の増殖・進展に重要な役割を果たしている。

IL-8 (GPCR agonist) は、膜型メタロプロテアーゼ (ADAM) を活性化し、EGF 受容体 (EGFR) リガンド (HB-EGF など) を放出させる。その後 EGFR リガンドは、EGFR と結合し、リン酸化させる。同時に、HB-EGF-CTF 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-CTF が、核移行したあと、DNA に結合しているレプレッサーである PLZF と結合後、核外にくみ出し細胞増殖を亢進させる。近年、EGF シグナルを制御する分子標的治療薬 (EGFR リン酸化阻害剤、EGFR 中和抗体) が臨床応用されている。一定の効果は得られているが限定的である。

そこで EGFR リガンド前駆体 C 末端 (CTF) を介

する経路を阻害することが新たな癌治療戦略になり得ると考え新規薬剤の探索を行った。

#### B. 研究方法

EGFR リガンド CTF 阻害剤検出系は、AlphaScreen アッセイシステムを利用した。EGFR リガンドに Doner ビーズを、PLZF に Acceptor ビーズをそれぞれ結合させた。Doner ビーズと Acceptor ビーズが、結合距離に近づいたとき、680 nm の光で励起すると、Doner ビーズから、活性化一重項酸素が隣の acceptor ビーズに移行して、520 nm から 620 nm の蛍光を発するシステムである。結合阻害剤を加えたとき、光の放出の有無を認識することで阻害活性をもつ化合物の網羅的な解析が可能となる。

大腸上皮細胞 (HT-29) を使用した。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。HB-EGF-CTF の核内移行および PLZF 核外移行は、蛍光免疫にて検討した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

#### C. 研究結果

6000 化合物のスクリーニングを行なった結果、最終的に、No. 5572、6972、8016、の 3 種類に絞られた。それぞれの IC<sub>50</sub> を求めた。その中でケラチノサイト及び 3 種の口腔癌細胞を用いて細胞増殖に対する影響を検討した結果、No. 8016 が増

殖を抑制する結果が得られた。No. 8016 と同じような構造を持つ薬剤として、2種類の化合物 (compound A, B) を見つけ出すことができた。HT-29 細胞を使用した Growth curve assay において Compound A は、B に比べ IL-8 による細胞増殖を強く抑制した。IL-8 刺激による HB-EGF-CTF 核移行は、Compound A のみで阻害できた。

#### D. 考察

IL-8 による細胞増殖作用は、HB-EGF-CTF 核移行シグナルを介した経路が関与していると考えられた。compound A および B の細胞増殖抑制効果および HB-EGF-CTF 核移行抑制効果の違いは、両者化合物の細胞内取り込みの差であると考えられる。

#### E. 結論

Compound A の構造式を基に、増殖活性の強い HB-EGF-CTF 核移行シグナルに特異的でさらに増殖抑制効果の高い薬剤を見出すことができれば、抗癌剤への応用も可能となってくる。

HB-EGF-CTF 核移行シグナルの制御は、IBD 炎症における colitic cancer の発生、増殖、進展に対し、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

- 1) Satoshi Tanida, Tsutomu Mizoshita, Takashi Mizushima, Takaya Shimura, Takeshi Kamiya, Hiromi Kataoka, Takashi Joh. Involvement of cell proliferation induced by dual intracellular signaling of HB-EGF in the development of colitis-associated cancer during ulcerative colitis. *Ulcers in press*
- 2) Satoshi Tanida, Hiromi Kataoka, Tsutomu Mizoshita, Takaya Shimura, Takeshi Kamiya, Takashi Joh. Intranuclear translocation signaling of HB-EGF C terminal fragment and mucosal defense through cell proliferation and migration in digestive tracts. *Digestion*;82:145-149, 2010

- 3) 谷田論史、溝下 勤、水島隆史、片岡洋望、志村貴也、神谷 武、城 卓志 「シグナル伝達を理解するために必要な知識」第 28 回 EGF 受容体シグナル伝達 分子消化器病 7(4):392-395, 2010.

##### 2. 学会発表

- 1) Satoshi Tanida, Takashi Joh. Discovery of a potential therapeutic agent that blocks intranuclear translocation of HB-EGF-CTF during colon cell proliferation in ulcerative colitis. Target Meeting on G protein coupled receptors and its signaling pathway. internet teleconference. 2011.1.22
- 2) 尾関啓司、谷田論史、溝下勤、水島隆史、塚本延宏、志村貴也、村上賢治、平田 慶和、海老正秀、馬渕元志、岡本泰幸、田中守、片岡洋望、神谷 武、城 卓志、福田信治、東山繁樹 IBD 腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF シグナルを介した大腸癌細胞増殖機序 -EGF-C 末端シグナルを標的とした網羅的薬剤探索- 第 7 回日本消化管学会 京都 2011.2.18
- 3) 谷田論史、尾関啓司、片岡洋望、平田 慶和、神谷 武、城 卓志 炎症性腸疾患腸管炎症に関わる炎症性サイトカインによる EGF シグナルを介した大腸細胞増殖機序 -HB-EGF-C 末端シグナルを標的とした網羅的薬剤探索- 第 38 回日本潰瘍学会 大阪 2010.11.19
- 4) 尾関啓司、谷田論史、溝下 勤、片岡洋望、城 卓志 HB-EGF-C 末端核移行シグナルをターゲットにした新規薬剤探索と細胞増殖抑制効果 第 21 回日本消化器癌発生学会 軽井沢 2010.11.18

#### 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

クローン病および潰瘍性大腸炎におけるオートタキシンの関与

研究協力者 三浦 総一郎 防衛医科大学校病院 教授

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

共同研究者

八月朔日秀明、穂苅量太

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)

十分なインフォームドコンセントを得た上で本研究に参加してもらうこととし、患者のプライバシー擁護には万全を期する。

C. 研究結果

ATX の発現量は、非活動部の組織と比較して有意に高値を示した。同一患者内の比較においても、活動部の ATX 発現は非活動部より有意に高値を示した。また、UC においては、内視鏡的 Matts' grade の増加に伴い、ATX の発現量も増加傾向を示した。

D. 考察

慢性炎症の環境下にある粘膜では、静脈が HEV-like vessel に変化し、MAdCAM-1 などの接着分子が異所性に発現するが、ここに ATX が発現しリンパ球 migration に関与するものと考えられる。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

### DSS 誘発性腸炎におけるメタボローム解析

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 准教授

研究要旨：メタボロミクスは、生命科学における包括的・網羅的な研究手法である。今回、DSS 誘発性腸炎のモデルマウスを用いて、メタボローム解析を行った。メタボロミクスは様々な腸炎の程度を反映し得ること、またメタボロミクスによって炎症性腸疾患に対する治療物質を発見できる可能性が示唆された。

#### 共同研究者

塩見優紀、西海信、大井充、吉江智郎、波多野直哉、篠原正和、近藤靖之、古松恵介、塩見英之、久津見弘、東健

#### A. 研究目的

メタボロミクスは、様々な条件の下における低分子量代謝産物の特徴・相互作用を包括的・網羅的に探索する研究手法である。そこで、炎症性腸疾患の病態解明を目的としてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性腸炎のマウスから採取した血清と大腸組織を用いて、GC/MS によるメタボローム解析を行った。

#### B. 研究方法

6-8 週齢の C57/BL6 マウスに 3%DSS 溶液を 5 日間投与し、その後水に変更し 10 日目まで観察した。体重変化、便の性状などの臨床症状を毎日観察した。7 日目と 10 日目に血清採取、および、大腸を取り出して大腸長を測定後、ホルマリン固定した後に切片作成・HE 染色し組織学的検討を行った。炎症の程度を既法に基づき数値化した。体重変化、臨床症状、組織学的変化より、7 日目は炎症期、10 日目は炎症収束期と考えて矛盾しないことを確認した。この炎症期群と炎症収束期群に対照群を加えた 3 群に分類し、血清と大腸組織を用いてメタボローム解析を行い比較検討した。各検体から水溶性代謝産物を抽出し、誘導体化の処理を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP2010plus) を用いて、代謝産物の網羅的な測定・解析を実施した。また、グルタミンを DSS 誘発性腸炎のモデルマウスに添加した実験を試みた。このグルタミン添加した DSS

誘発性腸炎モデルマウスから、血清と大腸粘膜組織を採取しメタボローム解析を行い、グルタミン値を測定した。さらに、潰瘍性大腸炎患者と健常人から採取した血清と組織を用いたメタボローム解析を行った。

(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) DSS 誘発性腸炎におけるメタボローム解析

血清からは 77 の代謝産物を、大腸組織からは 92 の代謝産物を同定し得た。炎症期と炎症収束期において、非炎症期に比して有意に変動する代謝産物を同定することができた。この組織から同定した 92 の代謝産物のデータを用いて、多変量解析を行ったところ、炎症期と炎症収束期、非炎症期のグループ化が可能であった。

##### 2) グルタミン添加による DSS 誘発性腸炎への影響

この腸炎モデルマウスの大腸組織を用いたメタボローム解析の結果、グルタミン値は 7 日目でグルタミン値は有意に減少し、10 日目で正常値まで回復している傾向が見られた。そこで、グルタミンを DSS 誘発性腸炎のモデルマウスに添加した実験を試みたところ、グルタミン投与を行った群では腸炎の程度が改善している結果が得られた。このグルタミン添加した DSS 誘発性腸炎モデルマウスから、血清と大腸粘膜組織を採取しメタボローム解析を行い、グルタミン値を測定した。DSS を投与していない群にグルタミンを添加しても血清中、組織中のグルタミン値に変化は認められなかった。DSS 投与を行った群では、グルタミン値は血清でも組織でも有意に減少し、DSS 投与後にグルタミン添

加を行った群では、血清中のグルタミン値は減少していたが、組織においては4%グルタミンを添加した群において増加する傾向が見られた。

### 3) 潰瘍性大腸炎患者の血清と組織におけるグルタミン値

UC患者と健常人から採取した血清と組織を用いたメタボローム解析を行った。UC患者の血清グルタミン値は健常人に比して有意に減少しており、UC患者の炎症部位の組織中のグルタミン値は、非炎症部中の値に比して減少している結果が得られた。この結果はモデルマウスでのグルタミン値の結果と一致していた。

### D. 考察

メタボロミクスとは、遺伝的背景、環境因子、発達過程などを含めた、ある状況の下での低分子量代謝産物の特徴や相互関係を包括的・網羅的に探究する研究手法である。したがって、メタボローム解析を行うことで、細胞や組織の代謝過程についての様々な情報を得ることができる。今回の研究結果では腸炎の進展に伴って代謝産物に変化することから、腸炎が生じることによってメタボローム解析結果に変化をもたらすことを示唆している。このように、メタボローム解析の手法をとることによって、ある疾患についての遺伝的背景と疾患進展過程とどちらもふまえた代謝過程の全体的な展望をみることができると考える。また、今回の研究では、組織から得られた92の代謝産物のデータに基づいて、多変量解析であるPLS-DA scores plotsを行った。PLS-DA loadings plotsの中で腸炎の進展をよく反映して変動した物質のひとつにグルタミンがあった。グルタミンは腸炎の進展によって典型的に変動した物質のひとつでもあり、炎症期にはグルタミン値は有意に減少し、炎症収束期には非炎症期のレベルまで回復している。この結果は、グルタミンの吸収と消費のバランスによるものであり、グルタミン値は炎症の程度によって変動することを示唆する。グルタミンは腸管粘膜における主なアミノ酸源であり、腸管粘膜の主な呼吸基質でもある。腸管粘膜にとってグルタミンは主要なエネルギー源であり、統合性を保つのに一役かっている。このグルタミンを添加した実験結果から、グルタミン投与によって治療的効果を得られる

ことが示唆された。この効果は、腸粘膜への栄養供給が増加したことと、免疫細胞の機能が增強したことによると考えられる。グルタミンは腸管損傷に対し効果的に機能し、腸管動脈経路だけでなく、管腔経路によってさらなるグルタミンの吸収、代謝の促進につながり、腸管損傷に対してさらに効果的に作用すると考えられる。さらに、このモデルマウスでのグルタミン値の結果は、潰瘍性大腸炎の患者から採取した検体を用いた実験結果とも一致しており、メタボロミクスの有用性が示された。

### E. 結論

炎症性腸疾患モデルマウスの血清と腸組織を用いてメタボローム解析を行ったところ、メタボロミクスは様々な腸炎の程度を反映しうることで、メタボロミクスによってIBDの治療物質を発見でき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

Shiomi Y, Nishiumi S, Ooi M, Hatano N, Shinohara M, Yoshie T, Kondo Y, Furumatsu K, Shiomi H, Kutsumi H, Azuma T, Yoshida M\*. A GCMS-based metabolomic study in mice with colitis induced by dextran sulfate sodium. *Inflamm Bowel Dis.* (\*correspondence)

#### 2. 学会発表

なし



腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を標的とした炎症性腸疾患根治療法の開発

研究分代表者 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：これまでの研究において我々は、炎症性腸疾患（IBD）難治性の要因として、疾患を“記憶”し、長期生存可能である腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞に注目し、その維持因子である IL-7/IL-7R シグナルおよび、IL-7 高産生臓器である骨髄の重要性を証明してきた。我々は腸炎惹起性メモリーT細胞を標的とした、いわば疾患記憶の“リセット”をコンセプトとした IBD の画期的根治療法開発のために以下の検討を行っている。1) IL-7/IL-7R シグナルをターゲットとした腸炎惹起性メモリーT細胞のアポトーシス誘導、2) 腸炎惹起性メモリーT細胞の循環制御療法の開発。今回特に 2) の検討において知見が得られたので報告する。

これまでに我々は腸炎発症時には腸管 IL-7 が減少し、骨髄等 IL-7 が豊富な腸管外組織が、メモリーT細胞のリザーバーとして機能することを報告した。一方、腸管は一度腸管にホーミングしたリンパ球はエフェクター細胞として機能し、再び循環することなく腸管でアポトーシスする（“腸管はリンパ球の墓場”）と考えられてきた。そこで今回我々は腸管局所への新規 CD4<sup>+</sup>T細胞投与法を開発し、CD4<sup>+</sup>T細胞が腸管から全身循環を経て、リザーバー組織に至る再循環経路が存在するかを検討し、さらに本経路を制御する因子の同定を目指した。エタノール前処置 SCID マウスに脾臓 CD4<sup>+</sup>T細胞を注腸投与したところ、10 週間後に大腸炎が発症し、移入した細胞は腸管ばかりではなく腸間膜リンパ節、脾臓においても検出され、すべてメモリーT細胞に分化していた。同様に、CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> T細胞移入マウス大腸炎粘膜メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を SCID マウスに注腸投与したところ、腸管での CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖と腸炎の発症を認めた。さらに、GFP マウス脾臓 CD4<sup>+</sup>T細胞を RAG-2<sup>-/-</sup>マウスに注腸あるいは静注移入し、各臓器における 6、24、168 時間後の GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞数を検討したところ、静注群では脾臓、腸間膜リンパ節→腸管と細胞の移動が見られたのに対して、注腸群では腸管→腸間膜リンパ節→脾臓のルートでホーミングが認められた。肺などの CD4<sup>+</sup>T細胞の再循環の CCR7 分子依存性という報告があるため、腸管 CD4<sup>+</sup>T細胞再循環における CCR7 の役割を検討する目的で、CCR7<sup>-/-</sup>および WT マウス CD4<sup>+</sup>T細胞を注腸し、2 週間後の各臓器の CD4<sup>+</sup>T細胞数を検討したところ、両群に有意差はなく、本機構は CCR7 非依存的であることが判明した。

本検討によって CD4<sup>+</sup>T細胞が腸管から全身循環系へ再循環することが実験的に証明された。腸炎惹起性メモリーT細胞の循環制御が IBD の新規治療法となりうる可能性が示唆された。

共同研究者

根本泰宏<sup>1</sup>、金井隆典<sup>2</sup>、渡辺 守<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野

<sup>2</sup>慶応義塾大学医学部消化器内科

A. 研究目的

これまでの多くの研究結果から、IBD は自然免疫あるいは獲得免疫システムにおける遺伝的脆弱

性を背景に、何らかの環境因子が加わった結果、腸管免疫恒常性が破綻し、“腸内細菌”という人類が有史以前より共存してきた共生体に対して発症した過剰な免疫反応がその本態と考えられている。このような病態に対してこれまで、IBD には腸内細菌叢の是正や抗炎症、免疫制御を目的とした治療が選択されてきた。しかし近年新たに発見されたエフェクターCD4<sup>+</sup>T細胞サブセットである Th17 の関連遺伝的群が IBD の疾患感受性を有すること

が発見され、本細胞を標的とした治療法が注目を集めている。

一方我々は以前から IBD における CD4<sup>+</sup>T 細胞の重要性を認識しつつも、本来の治療ターゲットはエフェクターCD4<sup>+</sup>T 細胞ではなく、メモリーCD4<sup>+</sup>T 細胞であると考えてきた。緩解期に短命なエフェクターCD4<sup>+</sup>T 細胞がアポトーシスを起こし、消滅したのちもメモリーCD4<sup>+</sup>T 細胞は生体内に長期にわたり残存し、再燃時には速やかにエフェクターCD4<sup>+</sup>T 細胞に分化し、炎症を惹起する。すなわち、エフェクターCD4<sup>+</sup>T 細胞や炎症性サイトカインをターゲットとした治療法によって、一時的に緩解状態に持ち込むことが可能であったとしても、メモリーCD4<sup>+</sup>T 細胞による疾患の“記憶”が存在する限りは再燃を繰り返すことになる。

CD4<sup>+</sup>メモリーT細胞の場合その維持因子としてはサイトカイン IL-7 が重要であることが知られている。我々はこれまでに IBD における IL-7 の重要性について多数報告してきた。IL-7 を高発現させた IL-7 トランスジェニックマウスは潰瘍性大腸炎 (UC) に類似した慢性大腸炎を自然発症し、IL-7 の抗体による中和や遺伝的な欠損は複数の IBD モデルマウスにおける腸炎の発症を抑制した。

IL-7 の産生源としては骨髄や胸腺などの一次リンパ装置やリンパ節など二次リンパ装置が有名であるが我々は腸管上皮の杯細胞が IL-7 を高発現することを報告している。一方、UC では腸炎遷延時に杯細胞が減少することが知られており、実際ヒト UC および腸炎マウスモデルにおいて腸炎慢性期に腸管局所の IL-7 が低下することが分かった。これらの事実は「IL-7 が慢性大腸炎遷延における重要因子である」という主張に矛盾するかに思われた。

そこで我々は IBD の遷延において、腸炎惹起性メモリーT細胞は腸管粘膜固有層から IL-7 高産生性リザーバー組織へ Homing し、維持されると仮説を立てた。実際 CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T 細胞移入大腸炎モデルマウスの骨髄において腸炎惹起性メモリーT細胞は IL-7 に接して多数維持されており、骨髄は IL-7 依存的に腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞を

維持するリザーバー臓器として機能することが分かった。

これらの事実から骨髄への病原性メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞の再循環経路が重要であるという仮説を立てた。しかし、これまでに消化管粘膜内 CD4<sup>+</sup>T細胞は“腸管指向性T細胞”として、腸管粘膜から再循環することなく、局所においてアポトーシスに至ると考えられてきた。

このような背景を元に我々は CD4<sup>+</sup>T細胞の腸管粘膜固有層から全身循環への再循環経路の解明を目的とした腸管粘膜への CD4<sup>+</sup>T細胞の新規局所投与法を開発し、以下の実験を行った。

#### 【目的と方法】

マウス腸管局所への CD4<sup>+</sup>T細胞投与法を開発し、CD4<sup>+</sup>T細胞が腸管から全身循環を経て、リザーバー組織に至る再循環経路が存在するかを検討した。

上記経路において CCR7 が関与する可能性を検討した。

#### 【結果】

##### 1、マウスへの CD4<sup>+</sup>T細胞注腸法の開発

マウス腸管局所法として、腸管内腔から腸管粘膜内への局注による細胞投与法を検討したが、腸管壁が薄すぎるため穿孔率が高く、実用できなかった。更に羊やラットの既報にある様に輸出リンパ管へのカニューレション法も検討したが、径が細すぎるために穿刺困難であった。

そこで我々はマウス腸管への細胞注腸投与法の開発を試みた。我々は①経口腸管洗浄剤による管腔内容の除去、②プロナーゼによる粘液層の除去、③50%エタノールによるタイトジャンクションの障害という三段階の前処置法を用いて、管腔内から粘膜固有層へのアクセスを最大限にし、経肛門的にカテーテルを挿入し、細胞を投与した。

##### 2、SCID マウスへの CD4<sup>+</sup>T細胞注腸投与

エタノール前処置 SCID マウスに正常マウス脾臓由来 CD4<sup>+</sup>T細胞を注腸投与した。コントロールとして同細胞を SCID マウスに腹腔内投与した。

細胞投与 10 週間後に注腸投与群において大腸炎が発症したのに、腹腔内投与群では腸炎葉見られなかった。注腸投与群において移入した細胞は

腸管ばかりではなく腸間膜リンパ節、脾臓においても CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖が見られ、腹腔内投与群に比して優位な細胞数の増加が見られた。上記結果から注腸投与方法によって、CD4<sup>+</sup>T 細胞は腸管腔内から腸管粘膜固有層へ移入可能であり、さらに移入した細胞は腸管粘膜固有層から全身血流に再循環し、リンパ節、脾臓に至ると考えられた。

### 3、SCID マウスへの腸炎惹起性メモリーT 細胞注腸投与

続いて腸炎惹起性メモリーT 細胞が腸管粘膜固有層から全身血流に再循環するかを検討する目的で CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>T 細胞移入マウス大腸炎粘膜から CD4<sup>+</sup>T 細胞を単離し、エタノール前処置した SCID マウスに注腸投与した。コントロールとして正常マウス脾臓由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞を前処置 SCID マウスに注腸投与した。

結果、移入 10 週後には両群ともに大腸炎を発症し、両群の腸炎スコアに有意差は見られなかった。また腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T 細胞投与群においても腸管および脾臓での CD4<sup>+</sup>T 細胞の増殖がみられ、CD4<sup>+</sup>T 細胞数はコントロールに比して有意差は見られなかった。

以上の結果から腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T 細胞は腸管粘膜固有層から全身血流に再循環することが証明された。

### 4、GFP マウスを用いた CD4<sup>+</sup>T 細胞の腸管粘膜から血流への再循環経路の検討

これまでの結果から CD4<sup>+</sup>T 細胞の再循環経路の存在が示唆されたが、前処置やカテーテル挿入時における物理的な刺激によって起こる粘膜の欠損に伴う血管からの細胞侵入の可能性が否定できない。そこで以下の実験を行った。

GFP マウス脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞を RAG-2<sup>-/-</sup>マウスに注腸あるいは静注移入し、各臓器における 6、24、168 時間後の GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞数を検討した。結果、静注群では 6 時間後には脾臓に多数の、腸間膜リンパ節に少数の GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞を認め、腸管粘膜には GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞はほとんど見られなかった。一方注腸投与群では 6 時間後腸管粘膜に一定数の GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞を認め、腸間膜リンパ節では 24 時間

後まで、脾臓では 168 時間後まで GFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞は検出されなかった。以上の結果から、注腸投与によって CD4<sup>+</sup>T 細胞は腸管粘膜→腸間膜リンパ節→脾臓の順に再循環することが確認された。

### 5、腸管粘膜から全身血流への CD4<sup>+</sup>T 細胞再循環は CCR7 依存的であるか

肺および皮膚からのメモリーCD4<sup>+</sup>T 細胞の再循環は CCR7 分子依存性という報告があるため、腸管 CD4<sup>+</sup>T 細胞再循環における CCR7 の役割を検討する目的で、CCR7<sup>-/-</sup>および WT マウス脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞を RAG-2<sup>-/-</sup>マウスに注腸し、2 週間後の各臓器の CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞数を検討した。結果、腸管粘膜固有層、腸間膜リンパ節、脾臓、骨髄において CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞数は両群に有意差はなく、本機構は CCR7 非依存的であることが判明した。

#### 【考察】

今回の検討によって我々は以下のことを明らかにした。

- ① CD4<sup>+</sup>T 細胞は注腸投与方法によって腸管腔側から上皮細胞層を貫いて粘膜固有層に侵入した。
- ② CD4<sup>+</sup>T 細胞は粘膜固有層から腸間膜リンパ節を介して全身血流に再循環した。
- ③ 上記経路は CCR7 非依存的であった。
- ④ 腸炎惹起性メモリーCD4<sup>+</sup>T 細胞は正常マウス脾臓 CD4<sup>+</sup>T 細胞と同様に注腸投与によって腸管粘膜固有層に侵入、増殖し、全身血流へ再循環した。

メモリーT 細胞の再循環経路に関しては既に皮膚および肺において検討されているが消化管に関しては報告がない。今回我々は細胞の注腸投与方法というこれまでにない方法を用いて、腸管粘膜からのメモリーT 細胞の移出を初めて報告した。今回開発した方法は腸管からの白血球の動向を知る上で非常に有用なツールであると思われる。

今回の我々のデータでは、皮膚や肺のメモリーT 細胞と異なり、腸管のメモリーT 細胞から全身血流への再循環は CCR7 比依存的であった。もともと腸管粘膜内の CD4<sup>+</sup>T 細胞はそのほとんどが CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>であることが知られており、そのこと

からも今回のデータには整合性があると思われる。

元来 IBD に対する白血球除去療法の有効性から末梢血流に循環する病原性細胞の除去という治療戦略の妥当性は証明されているが、今回のデータがこれを更に裏付けるものと考えられる。

現在我々は腸炎惹起性メモリーT細胞の細胞循環を制御する分子を検索しており、この分子が同定されれば、IBDにおける腸炎惹起性メモリーT細胞の再循環遮断という画期的な治療法開発の可能性があり、今後十分な検討を行う予定である。

### 【結語】

CD4<sup>+</sup>T細胞が腸管から全身循環系へ再循環することが実験的に証明された。したがって、IBD慢性難治性の重要な要因として、腸管粘膜内メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞のIL-7産生性腸管外リザーバーへの再循環経路の存在が示唆された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Hyun SB, Kitazume Y, Nagahori M, Akira T, Fujii T, Tsuchiya K, Suzuki S, Okada E, Araki A, Naganuma M, Watanabe M: MR enterocolonography is useful for simultaneous evaluation of small and large intestinal lesions in Crohn's disease. **Inflam Bowel Dis.** (in press) 2010
2. Kameyama K, Nemoto Y, Kanai T, Shinohara T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Totsuka T, Hibi T, Watanabe M: Il-2 is positively involved in the development of colitogenic CD4<sup>+</sup> Il-7R $\alpha$  (high) memory T cells in chronic colitis. **Eur J Immunol.** 40: 2423-2436, 2010
3. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe

M: The supression of Hath1 gene expression directly regulated by Hes1 via Notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis.

**Inflammatory Bowel Diseases.** (in press) 2010

4. Shinohara S, Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Totsuka T, Ikuta K, Watanabe M: Upregulated IL-7R $\alpha$  expression on colitogenic memory CD4<sup>+</sup> T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. **J Immunol.** (in press) 2010
5. Akiyama J, Okamoto R, Iwasaki M, Zheng X, Yui S, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M: Delta-like 1 expression promotes goblet cell differentiation in Notch-inactivated human colonic epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 393: 662-667, 2010

### Biochemical and Biophysical

**Research Communications.** 393: 662-667, 2010

#### 2. 学会発表

1. Fujii T, Kanai T, Tomita T, Nemoto Y, Totsuka T, Naganuma M, Nagahori M, Watanabe M: FTY720 supresses the Development of Colitis by Modulating the Trafficking of Colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells in Bone Marrow. 2010 Advances in Inflammatory Bowel Diseases Crohn's & Colitis Foundation's Clinical & Research Conference. Florida, 2010年12月10日
2. Nakamura T, Watanabe M: A long-term, fully-defined culture system for colonic epithelial cells that allows efficient expansion of stem cell compartment. The 1st JSGE International Topic Conference -Stem Cells in Digestive Organs-. Kamakura, 2010年9月25日