

3. Watanabe M: Novel insight into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. International Symposium of Advances in Medical and Surgical Treatment of Colorectal disorders 10-13 de august 2010. Chile, 2010年8月12日
4. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 via Notch signaling directly suppresses Atoh1/Hath1 gene transcription, resulting in the goblet cell depletion of Ulcerative Colitis. DDW2010. New Orleans, 2010年5月3日
5. Watanabe M: Key issues in the pathogenesis of UC: How much do we know? 第96回日本消化器病学会総会. Niigata, 2010年4月23日
6. 長沼 誠、渡辺 守: 難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムス初期投与量と血中トラフ値の推移の検討 (多施設協同研究). 第52回日本消化器病学会大会. 横浜. 2010年10月14日
7. 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 腸炎惹起性メモリーCD4+T細胞再循環経路をターゲットとした炎症性腸疾患の治療戦略. 第52回日本消化器病学会大会. 横浜. 2010年10月14日
8. 長堀正和、玄 世鋒、渡辺 守: クローン病における thioprines 併用 infliximab 計画的維持投与例の検討と、維持困難例での methotrexate の有用性. JDDW2010. 横浜. 2010年10月13日
9. 渡辺 守: 難治性炎症性腸管障害に関する調査研究. 難治性疾患克服研究推進事業研究成果発表会 難治性疾患克服研究の成果と今後. 東京. 2010年5月23日
10. 長沼 誠、長堀正和、渡辺 守: Infliximab 時代における免疫調節剤の有用性. 第96回日本消化器病学会総会. 新潟. 2010年4月22日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特記事項なし

新規単鎖脂肪酸受容体 (GPR43) の腸炎における役割

研究協力者 佐々木 誠人 愛知医科大学消化器内科 准教授

研究要旨：新規単鎖脂肪酸受容体 (GPR43) の腸炎における役割につき検討した。GPR43 (-/-) マウスにおいて DSS 腸炎は増悪し、単鎖脂肪酸による腸炎抑制効果が消失した。単鎖脂肪酸は GPR43 を介して腸炎を抑制することが明らかとなり、GPR43 は腸炎治療の新たな治療ターゲットの可能性がある。

共同研究者

水野真理, 増井竜太, 小笠原尚高, 春日井邦夫

A. 研究目的

単鎖脂肪酸は腸炎を抑制するとされているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。近年、単鎖脂肪酸の新規レセプターとして G protein-coupled receptor (GPCR) 41, GPR43 が同定された。そこで、GPR43 の腸炎における役割を検討した。

B. 研究方法

GPR43 (-/-) マウスに DSS 腸炎を惹起し、腸炎の程度、サイトカインなどの炎症関連物質を wild type と比較した。また、単鎖脂肪酸が GPR43 (-/-) および wild type の DSS 腸炎に及ぼす影響につき検討した。

C. 研究結果

GPR43 (-/-) マウスでは DSS 腸炎が増悪し、大腸粘膜における TNF- α , IL-6, IL-17, MCP-1 の発現が増加していた。Wild type に acetate を経口投与すると DSS 腸炎が抑制され、GPR43 (-/-) マウスでは acetate の腸炎抑制効果が消失した。

D. 考察

細菌が腸管免疫に及ぼす機序として、菌体成分などが Toll-like receptors (TLRs) を介する系と、腸内細菌の産生物質である単鎖脂肪酸が GPCR を介する系が存在する。ヒト炎症性腸疾患では Bifidobacterium や Bacteroides が減少し単鎖脂肪酸が減少していることが報告されている。今回、単鎖脂肪酸の新規レセプター

である GPR43 の欠損により腸炎が増悪し、単鎖脂肪酸による腸炎抑制効果が GPR43 (-/-) マウスで消失することが示された。また、prebiotics の腸炎抑制メカニズムに単鎖脂肪酸産生菌の増加が関与しているとされ、腸炎の抑制には、単鎖脂肪酸による GPR43 刺激が重要と考えられた。

E. 結論

単鎖脂肪酸 (acetate) は新規レセプター GPR43 を介して腸炎を抑制すると考えられ、GPR43 は炎症性腸疾患の新規治療ターゲットとなり得る。

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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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免疫制御学 教授

研究要旨：腸管に特有の自然免疫細胞を解析する中で、新たに Gr-1highCD11b+CD11c+サブセットを同定した。この自然免疫細胞は、これまでの自然免疫細胞と違い、Th1, Th17, Treg などの誘導に関わらず、Treg のように直接 T 細胞の増殖を抑制している。さらに、免疫不全マウスにナイーブ T 細胞を移入すると、腸管炎症が発症するが、ナイーブ T 細胞と同時に Gr-1high サブセットを移入すると、腸管炎症が著明に改善した。さらに腸管粘膜固有層での T 細胞増殖も抑制された。このように、新規 Gr-1high サブセットの自然免疫細胞は、腸管炎症を制御する regulatory myeloid 細胞である。

A. 研究目的

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

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

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

B. 研究方法

昨年度までに、腸管炎症の誘導に深く関与する Th17 細胞の分化誘導を、腸管に特有の CD70high 樹状細胞が腸内細菌由来のアデノシン 3 リン酸依存性に制御していることをあきらかにした。今年度は、さらに腸管の免疫制御に関わる特有の自然免疫細胞の同定を試みた。

(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

腸管に特有の CD70high 樹状細胞が含まれる CD11b 陽性、CD11c 陽性細胞群をさらに詳細に解析すると、抗 Gr-1 抗体により Gr-1low, Gr-1high のサブセットに分けられることが明らかになった。各サブセットを単離し、脾臓由来のナイーブ T 細胞と共培養すると、Gr-1low サブセットが Th17 細胞分化を誘導する樹状細胞であることが明らかになった。一方、Gr-1high サブセットは Th1, Th17, Treg を誘導しなかった。さらに、T 細胞の増殖反応を解析すると、Gr-1low 樹状細胞により誘導される T 細胞増殖が、Gr-1high サブセットの添加により、著明に抑制された。この T 細胞増殖抑制能は、Treg によるものとほぼ同じ効率であった。このように試験管レベルでの解析で、Gr-1high サブセットは、T 細胞増殖を抑制する機能を持つことが明らかになった。次に、個体レベルでの Gr-1high サブセットの機能を、

SCID マウスにナイーブT細胞を移入し腸炎を誘導する系で解析した。ナイーブT細胞移入時に、Gr-1high サブセットを同時に移入すると、腸管炎症が著明に減弱した。また Gr-1high サブセットを同時に移入した SCID マウスでは、腸管粘膜でのT細胞の増殖が著明に減弱していた。この結果から、Gr-1high サブセットは、腸管粘膜でT細胞増殖を抑制し、腸管炎症制御に関与していることが明らかになった。

D. 考察

腸管粘膜固有層に特有の自然免疫細胞として、新たに Gr-1highCD11b+CD11c+サブセットを同定した。この細胞は、腸管粘膜固有層でT細胞増殖を抑制し、腸管炎症を制御していることから regulatory myeloid 細胞と命名したい。このように、腸管には種々の自然免疫細胞が存在し、腸管免疫系を制御していることが明らかになった。

E. 結論

新規、腸管特有の自然免疫細胞 Gr-1high regulatory myeloid 細胞が、T細胞増殖抑制を介して、腸管炎症を制御していることを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K., Honda, K.: Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. **Science** 331, 337-341 (2011).
2. Ueda, Y., Kayama, H., Jeon, S.-G., Kusu, T., Isaka, Y., Rakugi, H., Yamamoto, M. and Takeda, K.: Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic

macrophages via the production of IL-10. **Int. Immunol.** 22, 953-962 (2010).

3. Yamamoto, M. and Takeda, K.: Current views of Toll-like receptor signaling pathways. **Toll-Like Receptor Signaling in Liver Diseases.** 2010, 240365 (2010).
 4. Okuyama, M., Kayama, H., Atarashi, K., Saiga, H., Kimura, T., Waisman, A., Yamamoto, M., and Takeda, K.: A novel inducible dendritic cell ablation model in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 397, 559-563 (2010).
 5. Obana, M., Maeda, M., Takeda, K., Hayama, A., Mohri, T., Yamashita, T., Nakaoka, Y., Komuro, I., Takeda, K., Matsumiya, G., Azuma, J. and Fujio, Y.: Therapeutic activation of STAT3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. **Circulation** 121, 684-691 (2010).
 6. Kayama, H. and Takeda, K.: The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. **Microbes Infect.** 12, 511-517 (2010).
2. 学会発表
 1. Kiyoshi Takeda: Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. CSI-IFReC Joint Symposium, November 3-4, 2010, Hangzhou, China
 2. Kiyoshi Takeda: Innate immune responses at the intestinal mucosa. Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society, October 7-9, 2010, Vancouver, Canada
 3. Kiyoshi Takeda: Innate immune responses at the intestinal mucosa. 8th German-Japanese Symposium, September 26-29, 2010, Cuxhaven, Germany
 4. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. Host-Pathogen interactions in generalized bacterial infection. May 31-June 3, 2010, Greifswald, Germany
 5. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御と腸管炎症. 第22回微生物シンポジウム(特別講演)、2010年9月3-4日、大阪

6. Kiyoshi Takeda, Hisako Kayama :Regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa. 14th International Congress of Immunology, August 22-27, 2010, Kobe, Japan
7. 竹田潔、自然免疫系の活性制御と炎症性腸疾患、第7回病理学会カンファレンス、2010年8月9-10日、岡山
8. Kiyoshi Takeda :Regulation of intestinal homeostasis by innate immunity. International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology, July 12-13, 2010, Osaka, Japan
9. 竹田潔、マウス炎症性腸疾患モデルを用いた腸管粘膜免疫機構の解析、第57回日本実験動物学会総会、2010. 5. 11-12、京都

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

炎症性腸疾患合併発癌に対する抗TNF療法の有理性

研究代表者 渡辺 守 東京医科歯科大学消化器病態学 教授

研究要旨：炎症性腸疾患（IBD）の長期罹患例は大腸癌を高率に合併することが知られている。抗 tumor necrosis factor (TNF) α 抗体療法は難治性 IBD に対する寛解導入および維持療法として広く認知されつつあるが、IBD 合併大腸癌 (colitis-associated cancer : CAC) の発生過程に与える影響に関しては明確でない。最近、マクロファージなどの免疫担当細胞に発現する TNF 受容体 (TNFR)-1 のシグナル遮断は CAC を抑制すると報告された。一方、腸管上皮細胞自身に TNFR1 および TNFR2 が発現し得ることは知られているが、CAC 発生におけるこれらの関与についてはこれまで検討されていない。我々は azoxymethane (AOM) と dextran sodium sulfate (DSS) の投与によってマウス CAC モデルを誘発し、上皮細胞内の TNFR シグナルを解析した。腸炎誘発後の上皮において TNFR1 に比べ TNFR2 の優位な発現上昇と NF κ B 経路の活性化を認め、抗 TNF α モノクローナル抗体 (MP6-XT22) の投与はこの NF κ B 活性を抑制した。CAC モデルの腫瘍部では非腫瘍部に比べ、さらなる TNFR2 の発現上昇と NF κ B の活性化が確認された。MP6-XT22 によって腸炎の明らかな改善は認めなかったが、上皮細胞内の NF κ B 活性抑制とともに腫瘍の発生を抑制した。以上より上皮細胞における TNFR2 シグナルは CAC 発生に大きく関与すること、また IBD における抗 TNF α 抗体療法が CAC の発生抑制にも貢献し得ることが示唆された。

共同研究者：鬼澤道夫、永石宇司、金井隆典、鈴木雅博、柘植直人、山地統、根本泰宏、戸塚輝治、岡本隆一、土屋輝一郎、中村哲也
(東京医科歯科大学消化器病態学)

A. 研究目的

抗 TNF α 抗体療法は難治性 IBD に対する新規治療法として今日広く使用される一方、CAC の発生過程におけるその影響の有無は未だに不明確である。近年、腸管上皮や免疫担当細胞における NF κ B の活性化が CAC モデルの増悪につながることを報告された。これまでの報告から NF κ B は炎症性サイトカインの発現などに関与するほか、抗アポトーシス作用や細胞増殖などを介して細胞の生存・維持に関与することが推測されている。実際、多くの腫瘍性病変において NF κ B の活性化が確認されているが、各々においてその活性化経路は実に多様である。IBD では TNF α の発現が上昇していることから、これによる NF κ B 活性化への関与が推測される。TNF α の受容体としては TNFR1 及び TNFR2 が存在し、そ

れぞれ NF κ B を活性化することが知られている。このうち TNFR1 のシグナルは death domain を介したアポトーシスを誘導し得ることから、発見当初 TNF α は抗腫瘍作用を持つサイトカインと推測されていた。ところが近年では TNF α の腫瘍促進作用としての側面も報告されてきている。こうした背景から、TNF α の CAC 発生に及ぼす影響の是非を明らかにする必要がある。最近、粘膜内に浸潤した好中球やマクロファージといった免疫担当細胞上の TNFR1 が CAC 発生に寄与すると報告された。しかし CAC の発生において、腸管上皮細胞に直接 TNF α が与える影響は未だ明らかではない。そこで我々はマウス CAC モデルを用いて TNF α の腸管上皮細胞への作用、および CAC 発生過程に対する抗 TNF α 抗体の影響を解析した。

B. 研究方法

C57BL/6J マウスに 3% dextran sodium sulfate (DSS; MW 10,000) を 5 日間自由飲水で投与したのち、5 日後に大腸組織を摘出し、免疫組織化学 (IHC)、半定量的 PCR (qRT-PCR)、Western Blotting (WB)

で急性腸炎回復期における TNF α などの産生や TNFR の発現に関して解析を行った。慢性大腸炎発癌モデルとして AOM (12.5 mg/mouse kg) を腹腔内投与したのち7日後から5日間DSS投与を16日間の休薬を置いて3回繰り返すことでCACを誘発し、77日目に大腸組織を摘出して腸炎慢性期及び腫瘍の解析を行った。抗TNF α 抗体(MP6-XT22:1 mg/mouse)もしくはコントロールIgGはDSS投与最終日から7日毎に腹腔内に投与した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立大学法人東京医科歯科大学動物実験規則に従い遂行された。

C. 研究結果

急性DSS腸炎回復期の全大腸組織から抽出したmRNAのqPCR解析にてTNF α 発現はコントロールの約5倍上昇し、IHCでは腸管粘膜中のF4/80陽性細胞にはほぼ一致したTNF α の発現局在を認めた。腸炎回復期の腸管上皮細胞を回収しmRNAの発現を解析したところ、TNFR1発現に変化はみられなかった一方、TNFR2はコントロール群に比べて15倍の発現上昇を認めた。同時点の生化学的解析では腸管上皮細胞におけるp65やI κ B α のリン酸化を認めた。このNF κ Bの活性化はMP6-XT22投与により抑制され、IL-1 β やIL-6、MIP-2の発現上昇が抑制されていた。

AOMとDSSの投与によって遠位大腸を中心に多数の腫瘍が形成された。この腫瘍部では非腫瘍部に比較してさらなるTNFR2の上昇とNF κ Bの活性化が誘導されていた。一方、MP6-XT22投与によって大腸炎の臨床的・組織学的改善は認めなかったものの、腫瘍部におけるNF κ Bの活性化の抑制とともに有意な腫瘍数の減少と腫瘍径の縮小を認めた。

D. 考察

これまで様々な腸炎モデルに対する抗TNF α 抗体の効果が報告されているが、DSS腸炎における抗TNF α 抗体の抗炎症作用の是非は既報の論文を通じて一貫していない。われわれのMP6-XT22を用いた解析では明らかな腸炎抑制作用は認められなかったものの、この抗体がCACの抑制効果を示したことは興味深い。

DSS/AOMモデルにおけるマクロファージなど免疫担

当細胞特異的なNF κ B活性の阻害は、腸炎の改善とともに腫瘍増殖を抑制することが報告されている。また免疫担当細胞特異的なTNFR1の阻害が腸炎の改善と腫瘍増殖を抑制することが最近、報告されている。我々の研究結果では急性腸炎回復期における粘膜局所においてIL-1 β やIL-6など細胞増殖作用を示す炎症性サイトカインの上昇を認め、抗TNF α 抗体の投与によってこれらのサイトカインの抑制を認めた点では、既報の論文と見解が一致する。

しかしわれわれはもう一点、DSSによる腸炎回復期の上皮細胞においてはむしろTNFR2の発現が優位に上昇し、慢性大腸炎上皮の腫瘍化に伴ってさらにその発現が亢進していることを明らかにした。TNF α の受容体のうちTNFR1はdeath domain経路およびNF κ B経路の両者をもつ一方、TNFR2は前者を有さない。様々な腫瘍性疾患におけるNF κ Bの活性化がこれまで報告されているが、我々のモデルの解析においても発癌過程に伴った上皮細胞中のNF κ Bの活性化が確認された。我々の研究結果から、腸炎粘膜局所のTNF α の上昇とともにみられる腸管上皮細胞中のTNFR2の発現上昇がNF κ Bの活性化を誘導すると推測された。また大腸腫瘍組織中でさらなるTNFR2の発現上昇とNF κ Bの活性化が観察されたことから、この上皮細胞自身のTNFR2シグナルを介したNF κ B活性は慢性腸炎から大腸癌への進展に直接関与し得る可能性がさらに示唆された。我々と同じCACモデルを用いた研究によって、腸管上皮特異的なNF κ Bの阻害が腫瘍数を抑制するとも報告されている。これに関連してわれわれの研究から、抗TNF α 抗体はDSS急性腸炎回復期および慢性腸炎における上皮細胞のTNFR2を介したNF κ B活性を抑制することが示唆され、この作用が抗TNF α 抗体による腫瘍抑制機序の1つと考えられた。

E. 結論

慢性腸炎における腸上皮細胞内のTNFR2発現上昇とそれに伴うNF κ B活性化が確認され、これが上皮細胞の癌化に関与することが推測された。また、このNF κ B活性は抗TNF α 抗体の投与によって抑制されることが証明された。すなわちIBDに対する抗TNF α 抗体療法は、合併するCACの発生リスクをも抑制す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

- 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
 - 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(+) Il-7Ralpha (high) memory T cells in chronic colitis. **Eur J Immunol.** 40: 2423-2436, 2010
 - Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe M: The suppression 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
 - Shinohara S, Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Totsuka T, Ikuta K, Watanabe M: Upregulated IL-7R α expression on colitogenic memory CD4+ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. **J Immunol.** (in press) 2010
 - 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
- 学会発表
 - Fujii T, Kanai T, Tomita T, Nemoto Y, Totsuka T, Naganuma M, Nagahori M, Watanabe M: FTY720 suppresses the Development of Colitis by Modulating the Trafficking of Colitogenic CD4+ 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
 - 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
 - Watanabe M: Novel insight into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. International Symposium of Advances in Medical and Surgical Treatment of Colorectal disorders 10-13 de august 2010. Chile, 2010年8月12日
 - Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Nakamura T, Watanabe M: Hes1 via Notch signaling directly suppresses Atoh1/Hath1 gene transcription, resulting in the goblet cell depletion of Ulcerative Colitis. DDW2010. New Orleans, 2010年5月3日
 - Watanabe M: Key issues in the pathogenesis of UC: How much do we know? 第96回 日本消化器病学会総会. Niigata, 2010年4月23日
 - 長沼 誠、渡辺 守: 難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムス初期投与量と血中トラフ値の推移の検討 (多施設協同研究) . 第52回 日本消化器病学会大会. 横浜. 2010年10月14日
 - 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 腸炎惹起性メモリーCD4+T細胞再循環経路をターゲットとした炎症性腸疾患の治療戦略. 第52回 日本消化器病学会大会. 横浜. 2010年10月14日
 - 長堀正和、玄 世鋒、渡辺 守: クロウン病におけ

る thioprine 併用 infliximab 計画的維持投与例の検討と、維持困難例での methotrexate の有用性. JDDW2010. 横浜. 2010年10月13日

9. 渡辺 守: 難治性炎症性腸管障害に関する調査研究. 難治性疾患克服研究推進事業研究成果発表会. 難治性疾患克服研究の成果と今後. 東京. 2010年5月23日
10. 長沼 誠、長堀正和、渡辺 守: Infliximab 時代における免疫調節剤の有用性. 第96回 日本消化器病学会総会. 新潟. 2010年4月22日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

クローン病の病態における制御性 B 細胞の機能解析

研究協力者 石原 俊治 島根大学医学部内科学講座第二 准教授

研究要旨：クローン病モデルマウス (SAMP1/Yit) の腸管自然免疫応答における IL-10 産生制御性 B 細胞 (Breg) の機能解析をおこない、クローン病の病態との関連を考察した。マウス腸管の B 細胞には、CpG DNA に反応して interleukin (IL)-10 を産生する B 細胞サブセットが存在し、主に CD19^{high}CD1d^{high} のポピュレーションに含まれていた。SAMP1/Yit マウスの腸管 B 細胞は CpG 刺激に対して低応答性であり、IL-10 の産生量がコントロールマウス (AKR/J) の B 細胞に比べて有意に低値であった。ヒト末梢血 B 細胞を用いた系でも、クローン病患者では CpG 刺激に対して IL-10 産生量が低値であり、マウスと同様の結果が得られた。さらに、SAMP1/Yit マウスの腸管 CD4 陽性 T 細胞と B 細胞を SCID マウスに移入した実験腸炎モデルにおいて、Breg が腸炎抑制に関わる可能性を示唆する結果が得られた。以上のことから、クローン病の病態に Breg の機能異常が関与している可能性が示唆された。

共同研究者：岡 明彦、三島義之、大嶋直樹、楠 龍策、多田育賢、福庭暢彦、森山一郎、結城崇史、木下芳一

所属：島根大学医学部内科学講座第二

よって、IBD の病態における Breg の関与を検討するとともに、SAMP1/Yit マウスの腸管 CD4 陽性 T 細胞と B 細胞を SCID マウスに移入した実験腸炎モデルを作製し、腸炎の発症と増悪における Breg の機能解析をおこなった。

A. 研究目的

H21 年度におこなった腸管自然免疫機構の研究成果に引き続いて、制御性 B 細胞の自然免疫応答に着目し、炎症性腸疾患 (IBD) の病態との関連を検討した。

H21 年度までおこなってきたクローン病モデルマウス SAMP1/Yit における制御性 B 細胞 (Breg) の解析については、H22 年度前半にまとめた最終結果を *Immunology* 誌に報告した。本検討では、マウス腸管の B 細胞には、CpG DNA に反応して interleukin (IL)-10 を産生する CD19^{high}CD1d^{high} の Breg サブセットが存在すること、SAMP1/Yit マウスの腸管 B 細胞は CpG 刺激に対して低応答性であり、IL-10 産生量がコントロールマウス (AKR/J) の B 細胞に比べて有意に低値であることが明らかとなった。さらに *in vitro* では、CpG DNA 刺激下で B 細胞とマクロファージおよび T 細胞を共培養した実験では、SAMP1/Yit マウスの腸管 B 細胞との共培養時の IL-1b および IFN γ 産生量がそれぞれ有意に高値であることが示された。

H22 年度は IBD 患者の末梢血 B 細胞を用いた実験に

B. C. 研究方法と結果

① IBD 患者の末梢血 B 細胞の CpG DNA 刺激による IL-10 産生に関する検討

マウスの実験結果を踏まえ、ヒト IBD 患者の末梢血 B 細胞の CpG DNA 刺激時の IL-10 産生能を健常人と比較した。クローン病 30 人、潰瘍性大腸炎 30 人、健常人 45 人を対象とした。CD19 抗体磁気ビーズを用いて末梢血単核球から B 細胞を分離し、CpG DNA 刺激後 72 時間で IL-10 を EIA で測定した。測定した IL-10 値はクローン病と潰瘍性大腸炎患者のいずれの群も健常人に比べて低値であったが、特にクローン病では顕著な結果であった。対象とした IBD 患者の臨床重症度、血液検査、治療内容などを考慮して、多変量解析もおこなったが、IL-10 産生が低値になる最も有意な因子はクローン病の存在であった。

② SCID マウス実験腸炎モデルを用いた腸発症における制御性 B 細胞の機能解析

1. SCID マウスを用いた adoptive transfer 腸炎モデ

ルの作製

SAMP1/Yit の腸管膜リンパ節 (MLN) から単核球を調整し、CD4 の抗体磁気ビーズを用いて CD4 陽性 T 細胞を分離し SCID マウスの腹腔内へ移入することで腸炎モデルを作製した。 (5×10^5 /mouse) (Burns, *Gastroenterology*. 2001)。T 細胞移入後は経時的に体重変化を観察し、8 週後に摘出した回腸および大腸の病理組織によって腸炎発症を評価した。SAMP1/Yit から移入した CD4 陽性 T 細胞によって小腸および大腸に著明な炎症が誘発されていたが、本モデルでは特に大腸に炎症が強く認められた。

2. SCID 腸炎モデルへの B 細胞の co-transfer による制御性 B 細胞サブセットの機能解析

上記モデルに B 細胞を co-transfer することによって腸炎の発症や増悪の程度を検討した。移入 B 細胞は SAMP1/Yit およびコントロールの AKR/J の腸管膜リンパ節 (MLN) から分離した。CD19 の抗体磁気ビーズによって高純度の B 細胞ポピュレーションを分離した。さらに Breg 分画 ($CD1d^{hi}CD19^{hi}$) と Breg 除去分画についても各々調整した。B 細胞 (5×10^6 /mouse) は CD4⁺T 細胞の移入と同時期に尾静脈から投与し、8 週後に回腸および大腸を摘出し、病理組織、サイトカイン産生によって腸炎の重症度を評価した。

Total B 細胞を co-transfer したモデルでは、SAMP1/Yit マウス由来の B 細胞移入が明らかに腸炎を増悪させた。さらに、Breg 分画と Breg 除去分画についても各々移入したモデルにおいては Breg 除去分画移入によって腸炎は明らかに重症となった (病理組織学的検討および IL-1b、MIP-2 産生による評価)。

(倫理面への配慮)

動物実験およびヒト末梢血を用いた実験のプロトコールについては、島根大学の実験動物委員会のおよび倫理委員会の承認を得た。

D. 考察

マウス腸管の粘膜固有層や腸間膜リンパ節に IL-10 を産生する Breg が存在することが示された。CD1d^{hi}CD19^{hi} のポピュレーション中に Breg が存在する可能性が示唆されたが、本マーカーが Breg を規定する絶対的な細胞表面とは言えず、今後のさらなる検討が必要と考えられた。

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 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、この現象は、ヒトのクローン病の末梢血 B 細胞を用いた検討からも明らかとなった。SAMP1/Yit マウスの腸管 CD4 陽性 T 細胞と B 細胞を SCID マウスに移入した実験腸炎モデルにおいて、Breg が腸炎抑制に関わる可能性を示唆する結果が得られたことも合わせると、Breg の機能がクローン病の病態に関与していることが示唆された。しかし、何故、クローン病において Breg の機能低下がみられるのかという点は明らかにされておらず、Breg の分化や体内動態、さらに自然免疫応答に関わる細胞内シグナルなどについて今後検討する必要があると考えられた。

E. 結論

腸管 (マウス) に IL-10 を産生する Breg が存在し、Breg の自然免疫応答の異常 (低応答性) がクローン病の病態に関与す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 Li YY, Ishihara S, Aziz MM, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Yuki T, Amano Y, Ansary MU, Kinoshita Y: Autophagy is required for toll-like receptor-mediated interleukin-8 production in intestinal epithelial cells. *Int J Mol Med*. 27:337-44, 2011.
- ② Kadota C, Ishihara S, Aziz MM, Rumi MA, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Yuki T, Amano Y, Kinoshita Y: Down-regulation of single immunoglobulin interleukin-1R-related molecule (SIGIRR)/TIR8 expression in intestinal epithelial cells during inflammation. *Clin Exp Immunol*. 162:348-61, 2010.
- ③ Mishima Y, Ishihara S, Aziz MM, Oka A, Kusunoki R, Otani A, Tada Y, Li YY, Moriyama I, Oshima N, Yuki T, Amano Y, Matsumoto S, Kinoshita Y: Decreased production of interleukin-10 and transforming growth factor- β in Toll-like receptor-activated

intestinal B cells in SAMP1/Yit mice. *Immunology*. 131:473-87, 2010.

④ 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. 学会発表

① Oka A, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Decreased production of IL-10 in TLR9-activated peripheral blood B cells in inflammatory bowel disease. *Digestive Disease Week*. New Orleans, USA, 2010. 5.

② Kadota C, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Yuki T, Kinoshita Y: Intestinal inflammation down-regulates SIGIRR/TIR8 expression in epithelial cells by inhibiting SP1-mediated pathway. *Digestive Disease Week*. New Orleans, USA, 2010. 5.

③ Yuki T, Ishihara S, Aziz MM, Mishima Y, Oshima N, Otani A, Oka A, Kusunoki R, Tada Y, Moriyama I, Yoshikazu K: Crosstalk between TLR5 and Notch1 signaling in epithelial cells during intestinal inflammation. *igestive Disease Week*, New Orleans, USA, 2010. 5.

④ 多田育賢, 石原俊治, 楠 龍策, 大谷 文, 三島義之, 大嶋直樹, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一: 炎症性腸疾患の腸管粘膜局所における MFG-E8 の発現に関する検討. 第 52 回日本消化器病学会大会, 横浜, 2010.

⑤ 岡 明彦, 石原俊治, 三島義之, 多田育賢, 楠 龍策, 大谷 文, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一: Chron 病モデルマウスの病態における腸管 B 細胞の機能異常に関する検討. 第 52 回日本消化器病学会大会, 横浜, 2010.

⑥ 石原俊治, 結城崇史, 天野祐二: パネルディスカッション: 炎症性腸疾患の経過観察における内視鏡検査潰瘍性大腸炎の内視鏡的重症度分類における内視鏡医

間の診断格差と問題点. 第 79 回日本消化器内視鏡学会総会, 東京, 2010.

⑦ 岡 明彦, 石原俊治, 三島義之, 多田育賢, 楠 龍策, 大谷 文, 森山一郎, 結城崇史, 天野祐二, 木下芳一: 炎症性腸疾患患者の末梢血 B 細胞における IL-10 産生能に関する検討. 第 96 回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010.

⑧ 結城崇史, 石原俊治, 多田育賢, 楠 龍策, 大谷 文, 三島義之, 天野祐二, 木下芳一: 腸管炎症における Notch-1 と TLR5 シグナルの相互作用に関する検討. 第 96 回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010.

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

炎症性腸疾患モデルにおける病態抑制性樹状細胞の同定と新規樹状細胞療法の試み

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：我々はこれまでに、クローン病モデルマウスの腸管粘膜における病態抑制性樹状細胞を同定し、解析を行ってきた。今回、CD11c⁺/B220⁻ conventional DCs (cDCs) である PIR-A/B^{med} 樹状細胞の抑制機能について *in vivo* で検討を行った。この樹状細胞サブセットは腸炎回復に関与し、新たな治療の標的となる可能性があると思われた。

共同研究者

星野勝一¹⁾、栗島亜希子¹⁾、稲葉宗夫²⁾

関西医科大学内科学第三講座¹⁾

関西医科大学病理学第一講座²⁾

A. 研究目的

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

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

これまでに、クローン病モデルマウスの腸管粘膜において炎症の回復に重要な役割を担っている樹状細胞である PIR-A/B^{med}cDC を同定し解析を行ってきた。小腸炎の軽快に伴い増加する PIR-A/B^{med}cDC は、抗原提示活性の低下、抑制性サイトカインの産生が見られ、腸炎回復への関与が示唆された。

本研究では、この樹状細胞サブセットの病態抑制機能について *in vivo* で検討を行った。また従来より TNBS 腸炎の消長に関わると言われている IDO に注目し、PIR-A/B^{med}cDC の関与について検討した。これにより炎症を制御するための新たな標的を見出し、治療法開発の礎になることが期待される。

B. 研究方法

1. TNBS 誘発性小腸炎モデルマウスの小腸粘膜固有層から PIR-A/B^{med}cDC を単離した。
2. TNBS を用いて大腸炎モデルを作成し、大腸炎誘発と同時に PIR-A/B^{med}cDC を移入し、大腸炎誘発後 3 日目、7 日目の腸炎の病理組織像を検討した。他の小腸由来樹状細胞サブセットを移入した群を対照として比較した。
3. TNBS を用いて大腸炎モデルを作成し、大腸炎誘発後 3 日目に PIR-A/B^{med}cDC を移入し、大腸炎誘発後 7 日目の腸炎の病理組織像を検討した。他の小腸由来樹状細胞サブセットを移入した群を対照として比較した。
4. 移入した細胞の病態抑制機能が腸管への直接的なものであることを示すために、CFSE で標識した PIR-A/B^{med}cDC を大腸炎誘発の際に移入し、3 日後の大腸から切片を作成し、蛍光顕微鏡にて観察した。
5. 大腸炎を誘導してから 3 日目に、PIR-A/B^{med}cDC を移入した時点より、IDO インヒビターである 1-methyl-dl-tryptophan の投与を連日行い、大腸炎誘導 7 日目の肉眼所見および病理組織所見を検討した。

(倫理面への配慮)

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

基づき検体を匿名化した。

2) マウスの実験に関しても動物実験に関しては、動物実験倫理委員会の承認を得て、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

1. 大腸炎誘発と同時に各樹状細胞サブセットを移入し検討した。PIR-A/B^{high} cDC や PIR-A/B⁻ cDC を移入した群では生存率が悪化し、経過中に約半分のマウスが死亡したのに対し、PIR-A/B^{med} cDC を移入した群では生存率はよく保たれた。また PIR-A/B^{high} cDC や PIR-A/B⁻ cDC を移入した群では著明な体重減少を来たしたが、PIR-A/B^{med} cDC を移入した群ではほとんど体重は減少しなかった。肉眼的には、PIR-A/B^{med} cDC を移入した群では腸炎誘発後 7 日目には腸管短縮や腸管重量、マクロ所見の改善が見られた。大腸の病理組織像を検討したところ、PIR-A/B^{high} cDCs や PIR-A/B⁻ cDCs を移入した群では腸炎誘発後 7 日目に著明な壁肥厚と炎症細胞浸潤を呈したが、PIR-A/B^{med} cDCs を移入した群では炎症は軽度の所見であった。
2. 大腸炎誘発後 3 日目に各樹状細胞サブセットを移入し検討した。どの群も大腸炎誘発後に体重減少が見られたが、PIR-A/B^{med} cDCs を移入した群のみが 7 日目には投与前の体重にまで回復していた。肉眼的にも、7 日目の腸管短縮は PIR-A/B^{med} cDCs を移入した群では目立たず、腸管重量の増加も軽度で、マクロ所見も有意に改善していた。
3. 病理組織像の検討では、PIR-A/B^{high} cDCs や PIR-A/B⁻ cDCs を移入した群では腸炎誘発後 7 日目に著明な壁肥厚と炎症細胞浸潤を呈したが、PIR-A/B^{med} cDCs を移入した群では炎症は改善していた。
4. CFSE で標識した PIR-A/B^{med} cDCs を大腸炎誘発

の際に移入し、3 日後の大腸から切片を作成し、蛍光顕微鏡にて観察したところ、大腸粘膜固有層や粘膜下層を中心に、CFSE 標識樹状細胞が確認された。

5. 1-methyl-dl-tryptophan を投与すると、大腸炎を誘発してから 3 日目に移入した PIR-A/B^{med} cDC の腸炎改善効果は得られなかった。肉眼所見も病理組織学的スコアも、PIR-A/B^{med} cDC を移入し改善した群と比較し、明らかに増悪した。

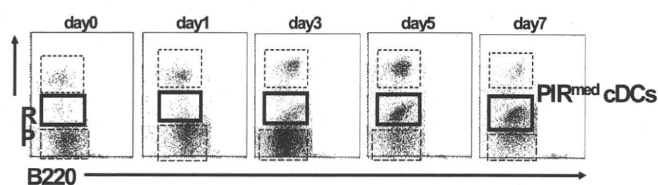


図. 小腸粘膜固有層由来 PIR^{med} cDCs の FCM における dot plot 像を提示。このゲート内の細胞を単離して移入実験を行った。

D. 考察

小腸粘膜固有層の PIR-A/B^{med} cDCs は、生体内で腸炎を抑制する役割を果たしていると考えられる。その機序としては、ぜんじゅつの T 細胞に対するアナジュー誘導や抑制性サイトカイン産生以外に、IDO の関与が示唆される。また、このサブセットに関わる免疫機序は、新たな治療の標的となる可能性がある。

E. 結論

マウス腸炎モデルにおける抑制性樹状細胞サブセットを同定し、その病態抑制作用を確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

- 1) Kawamata S, Matsuzaki K, Murata M, Seki T, Matsuoka K, Iwao Y, Hibi T, Okazaki K. Oncogenic Smad3 signaling induced by chronic inflammation is an early event in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Inflamm**

Bowel Dis Jul 2. [Epub ahead of print]

- 2) Matsushita M, Tanaka T, Omiya M, Okazaki K. Significant association of appendiceal neoplasms and ulcerative colitis rather than Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis.** 16(5):735, 2010
- 3) Omiya M, Matsushita M, Tanaka T, Kawamata S, Okazaki K. The absence of large ulcer predicts latent cytomegalovirus infection in ulcerative colitis with positive mucosal viral assay. **Intern Med** 49(21):2277-2282, 2010
- 4) 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.** 34(4):380-389, 2010
- 5) Fukata N, Uchida K, Kusuda T, Koyabu M, Miyoshi H, Fukui T, Matsushita M, Nishio A, Tabata Y, Okazaki K. The effective therapy of cyclosporine A with drug delivery system in experimental colitis. **J Drug Target.** Aug 30. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) Norimasa Fukata, Kazushige Uchida, Takeo Kusuda, Masanori Koyabu, Toshiro Fukui, Mitsunobu Matsushita, Akiyoshi Nishio, Hiroshi Nakase, Tsutomu Chiba, Yasuhiko Tabata, Kazuichi Okazaki. Development of oral drug delivery system with cyclosporine in experimental colitis. DDW 2010, New Orleans
- 2) Mika Omiya, Mitsunobu Matsushita, Toshihiro Tanaka, Seiji Kawamata, Kazuichi Okazaki. No deep ulcer predicts latent cytomegalovirus infection in ulcerative colitis with positive mucosal viral assay. The 4th Korea-Japan IBD Symposium. 2010 2

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

血球成分除去療法の治療効果予測因子としての温感の有用性

研究協力者 飯塚 政弘 秋田赤十字病院附属あきた健康管理センター 所長

研究要旨：潰瘍性大腸炎(UC)難治例を対象に、血球成分除去療法(CAP)治療効果予測因子として温感の有用性について検討した。その結果、CAP 施行中に温感が認められた場合の寛解率は88.4%で、温感が認められない場合の寛解率(50%)に比べて有意に高い頻度を示し($p<0.01$)、CAP 施行時の温感の有無はCAP 治療効果を早期に予測し得る因子として有用と考えられた。

共同研究者：相良志穂、衛藤 武

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎(UC)難治例に対する血球成分除去療法(CAP)の有用性が評価されているが、治療効果を予測する因子については十分な検討がなされていない。今回、UCに対するCAP治療効果予測因子として温感の有無の有用性について検討した。

B. 研究方法

2002年6月～2010年12月に秋田大学第一内科または秋田赤十字病院で32例のUC難治例に対して57回(1回:1～2クール)CAP治療を施行した。これらの症例を対象に、①CAP治療による寛解率、②CAP施行時の温感(手、足、腹部など)の有無による寛解率を比較し、11例(13回)に対しては赤外線体温計で皮膚温を測定した。

(倫理面への配慮)

皮膚温の測定はインフォームドコンセントの下に行った。

C. 研究結果

①CAPにより72.2%の症例で寛解が得られた。②CAP施行中、手、上肢、腹部、下肢、足に温感が認められ、温感が認められた場合の寛解率は88.4%で、温感が認められない場合の寛解率(50%)に比べて有意に高い頻度であった($p<0.01$)。また、CAP有効例ではCAP開始後30分の手掌皮膚はCAP開始前に比べて有意に上昇が認められた($p<0.05$)。

D. 考察

CAP施行時温感が認められた症例のCAP治療効果は、温感が認められなかった症例に比べて有意に優れていた。温感が感じられる機序は不明であるが、CAPによる血流の改善や自律神経系の関与が示唆された。今後、さらに多数例による解析が必要と考えられる。

E. 結論

UC症例において、CAP施行時の温感の有無はCAP治療効果を早期に予測し得る因子として有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 飯塚政弘、相良志穂、堀江泰夫・潰瘍性大腸炎難治例に対する血球成分除去療法の効果—特に長期予後と治療効果予測因子について—第6回日本消化管学会総会・福岡(国際会議場)・平成22年2月20日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

サイクロスポリンの作用機序からみた TGF- β 発現調節因子の重要性と腸炎抑制効果

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： サイクロスポリンの効果発現の主たる因子である TGF- β について発現調節因子の同定を目的とした。サイクロスポリンの腸炎抑制効果として iTreg を介した TGF- β 産生増強と Th-1 型反応抑制が重要であることが示唆された。

共同研究者

櫻庭裕丈¹⁾、蓮井圭介¹⁾、福田眞作¹⁾、三井敏仁²⁾、仲根明夫²⁾

弘前大学 消化器血液内科学¹⁾

弘前大学 感染制御病態学²⁾

A. 研究目的

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し、病態を解明することを目的とし、とくにサイクロスポリンの効果発現の主たる因子と考えられる TGF- β ^{1,2)} について発現調節因子の同定 (抑制因子、増強因子、産生細胞) を目的とした。

B. 研究方法

SCID マウスにおける DSS 腸炎、IL-10^{-/-} 脾細胞移入モデルを用いた。TGF- β 産生能を検討した。

また inducible regulatory T 細胞 (iTreg) の誘導と腸炎の抑制効果を試みた。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験に関わる第 2 種使用等拡散防止措置確認申請を行っている。動物実験に関して弘前大学医学部動物実験倫理委員会の指針を遵守した。

C. 研究結果

サイクロスポリン投与により DSS 腸炎による体重減少が有意に抑制される¹⁾ が、SCID mouse では効果が得られなかった。また、TGF- β の産生は有意に低下していた。そこで SCID mouse に TGF- β とサイクロスポリンを共投与した結果、腸炎の改善が得られた。さらに

TGF- β の産生細胞として Wild Type の Treg である CD4⁺CD25⁺ T cell を SCID マウスに移入後 DSS を誘発したところ、TGF- β の産生は著明に増加した。iTreg の作用機序を明らかにする目的で、Foxp3⁺ regulatory T cells の誘導能を有する Salmon cartilage proteoglycan を投与し IL-10^{-/-} 脾細胞移入腸炎に対する効果を検討したところ ROR γ t 発現が有意に抑制され、腸炎も有意に抑制された³⁾。このことは iTreg が Th17 抑制作用を有することを示唆する。また、サイクロスポリン投与モデルでは Affimetrix[®]/Genechip[®] を用いて解析した結果、サイクロスポリンの効果として TGF- β 産生増強と TGF- β 産生抑制作用のある IFN- γ および Th-1 型反応を抑制することが明らかとなった。

D. 考察

サイクロスポリン投与モデルでの効果として TGF- β 産生増強と TGF- β 産生抑制作用のある Th1 型反応を抑制すること、さらに iTreg の誘導モデルで IL-10^{-/-} 脾細胞移入腸炎が ROR γ t の抑制とともに改善することから、iTreg と TGF- β による Th1 抑制、さらには Th-17 抑制機序が腸炎の制御には重要であると考えられた。

E. 結論

iTreg と TGF- β による Th1 抑制機序が腸炎の制御には重要であるが、潰瘍性大腸炎ではこれらの制御機構が破綻してい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):G514-9.

2: 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

3: Mitsui T, Sashinami H, Sato F, Kijima H, Ishiguro Y, Fukuda S, Yoshihara S, Hakamada K, Nakane A. Salmon cartilage proteoglycan suppresses mouse experimental colitis through induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2010 ; 402(2):209-15.

2. 学会発表

1: 櫻庭裕丈、石黒 陽、平賀 寛人、佐藤 裕紀、川口 章吾、仲根 明夫、福田眞作
シンポジウム1：炎症性腸疾患の分子標的を探るーサイクロスポリンによるTGF- β 発現調節を介した腸上皮アポトーシスの制御
第47回 日本消化器免疫学会総会、
大津 2010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 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他

血漿アミノ酸プロファイルを用いた炎症性腸疾患の診断・活動性モニタリング

研究分担者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授

研究要旨

(背景) 炎症性腸疾患の診療において診断および活動性指標となりうるバイオマーカーの開発は重大な課題として残されている。(目的) 血漿アミノ酸プロファイルからコンピューター解析により導き出された数式アミノインデックス[®]が多施設において施設間差なしで診断や疾患活動性評価に有用であるかどうかを検証する(結果) 単一施設の患者から導き出されたクローン病と健常人との判別式 CD/HC Index、潰瘍性大腸炎の判別式 UC/HC Index、潰瘍性大腸炎の活動期と寛解期を判別する式 UC A/R Index の多施設間での有用性が確認された。

結語) 炎症性腸疾患患者末梢血血漿アミノ酸プロファイルから導き出された診断・活動性評価のアミノインデックス[®] は地域や施設を超えて有用であることが示された。

共同研究者

久松理一、井上 詠、松岡克善、斉藤理子、筋野智久、米野和明、三好 潤、三上洋平、岩尾 泰、緒方晴彦、金井隆典、日比紀文(慶応大消化器内科)

安藤 朗、藤山佳秀(滋賀医大消化器内科)

内山和彦、高木智久、内藤裕二、吉川敏一(京都府立医科大消化器内科)

血清マーカーのスクリーニングの結果をもってしても未だバイオマーカーとして実際の臨床の場で使用されるものは見つかっていない。

炎症性腸疾患のような遺伝的素因と環境因子が複雑に絡み合った疾患では単一の分子の動態により診断する、あるいは活動性を評価するというのは困難であることが予想される。また、実際の診療現場では単に炎症の強弱でなく、患者の消耗状態や栄養状態の評価が極めて重要であり患者個体全体を評価する指標が必要であると考えられる。残念ながら炎症性腸疾患による栄養・代謝学の重要性は多くの医師や研究者に認識されているものの客観的評価の困難さなどにより研究は進んでいなかった。

我々は炎症性腸疾患患者の代謝状態そのものを客観的に評価するために代謝解析 (metabolome) に視点を切り換えた研究を進めている。もし代謝状態を客観的に評価することが可能になれば食生活による発症リスクの差や再燃のメカニズムを知る上で重要な情報を与えてくれると考えている。すでに我々は血漿アミノ酸プロファイルからコンピューター解析により導き出された数式アミノインデックス[®]が個体の代謝状態を把握し、炎症性腸

A. 研究目的

炎症性腸疾患の診断は病歴、臨床症状と特徴的な消化管造影像や内視鏡像、および病理学的所見からなされる。消化管造影検査や内視鏡検査手技は以前と比べ大幅に改善され侵襲は少なくなったものの安易にスクリーニングとして行なえる検査とは言い難い。また活動性の評価や治療評価のために頻回に行なうには相応しくない。炎症性腸疾患の診療において診断および活動性指標となりうるバイオマーカーの開発は重大な課題として残されている。炎症性腸疾患に関する多くの疾患関連遺伝子が同定されつつある。また各種の血清学的マーカーが診断に有用ではないかと報告されている。しかし、このような genomics の発展や網羅的

疾患の診断や活動性評価に用いることが可能であることを報告している（論文投稿中）。今回は炎症性腸疾患患者における血漿アミノ酸およびその代謝物のプロファイルの解析を多施設共同試験として行い、アミノインデックス®が施設間差を認めずに診断や活動性評価に有用であるかどうかを検証した。

B. 研究方法

慶應義塾大学病院通院中の102名の潰瘍性大腸炎患者、102名のクローン病患者、年齢と性別をマッチさせた健常人をdiscoveryセットとし作成したアミノインデックス®を新たにリクルートした慶應義塾大学病院、滋賀医科大学病院、京都府立医科大学病院の炎症性腸疾患患者をvalidationセットとして検証した。

C. 研究結果および考察

クローン病を健常人と判別する式 CD/HC Index = $3.8834 + 0.3938 \times [\text{Pro}] - 0.2796 \times [\text{His}] + 0.3136 \times [\text{Ala}] - 0.5451 \times [\text{Tyr}] - 0.9442 \times [\text{Val}] + 0.5321 \times [\text{Lys}] - 0.33 \times [\text{Trp}]$ (AUC ROC = 0.901) は3施設を合わせたvalidationセットでも高い判別能 (AUC ROC = 0.828) を有していた。同様に潰瘍性大腸炎の判別式 UC/HC Index = $3.2734 + 0.4228 \times [\text{Pro}] + 0.8136 \times [\text{Asn}] - 0.9074 \times [\text{His}] + 0.3483 \times [\text{Cit}] + 0.3992 \times [\text{Arg}] - 0.3564 \times [\text{Tyr}] - 0.9558 \times [\text{Met}]$ も3施設のvalidationセットでAUC ROC = 0.804と高い判別能を持つことが確認された。

疾患活動性の指標については潰瘍性大腸炎の活動期と寛解期を判別する式 UC A/R Index = $6.652 + 0.507 \times [\text{Asn}] - 0.5267 \times [\text{His}] - 0.4501 \times [\text{Ala}] + 0.5139 \times [\text{Val}] - 0.6037 \times [\text{Phe}] - 0.8919 \times [\text{Trp}]$ は3施設のvalidationセットでAUC ROC = 0.712と高い判別能を有していることが確認された。

D. 考察

単一施設の炎症性腸疾患患者末梢血血漿アミノ酸

プロファイルから導き出されたアミノインデックス®の有用性が地域の異なる複数施設から集めたvalidationセットでも確認されたことから、アミノインデックス®は地域や施設間差をこえて炎症性腸疾患の臨床に应用可能であると考えられた。

E. 結語

炎症性腸疾患患者末梢血血漿アミノ酸プロファイルから導き出された診断・活動性評価のアミノインデックス®は地域や施設を超えて有用であることが示された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

論文発表

Impact of metabolic profiling of plasma amino acids (“AminoIndex”) in inflammatory bowel disease
Hisamatsu T, Okamoto S, Hibi T et al. (*in submission*)

H. 知的財産権の出願 なし