

潰瘍性大腸炎関連ペプチド Human Neutrophil Peptide-1 の腸管上皮細胞への作用

研究分担者 坪内 博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨:炎症性腸疾患の患者血清を用いたプロテオーム解析により、血中 human neutrophil peptide (HNP) が活動期の潰瘍性大腸炎患者で上昇していることが明らかとなった。HNP は主に好中球のアズール顆粒から分泌される、抗菌的作用を持つペプチドである。HNP が潰瘍性大腸炎の病態形成にどのように関連しているかを明らかにするため、HNP を大腸上皮細胞株に添加したところ、高濃度の HNP で IL-8 の発現亢進が認められた。この IL-8 産生は P2 受容体、ERK の阻害で抑制された。また、HNP は腸管上皮細胞の ICAM-1 の発現も亢進させた。大腸粘膜に多量の好中球が集簇している潰瘍性大腸炎では、HNP がさらなる好中球遊走を促進し、炎症を持続させている可能性が考えられた。

共同研究者: 寄山敏男、橋元慎一、指宿和成、岩下祐司、宇都浩文

所属: 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 消化器疾患・生活習慣病学

A. 研究目的

炎症性腸疾患の病態解明や診断マーカー探索を目的に、炎症性腸疾患患者の血清・血漿を用いてプロテオーム解析をおこなった。その結果、血中の好中球ペプチド (human neutrophil peptide ; HNP) が活動性潰瘍性大腸炎患者で高濃度となり、疾患活動性マーカーや治療効果予測マーカーとなる可能性が明らかとなった。HNP のマウス実験腸炎モデルへの投与は、腸管からの炎症性サイトカイン分泌を亢進させ、腸炎を悪化させた。HNP の腸管上皮細胞への作用やその機序を解明するため、大腸上皮細胞株を用いて解析した。また、活性化好中球が除去される血球成分除去療法において HNP が治療効果予測マーカーとなりうるかも検討した。

B. 研究方法

1) HNP の腸管上皮細胞への作用

大腸上皮細胞株 (HT-29) の培養液に HNP を添加した際の細胞増殖を調べた。また、IL-8 の発現を定量的 RT-PCR、ELISA にて測定し、P2 受容体阻害剤、MAPK 阻害剤による IL-8 発現の変化も解析した。ICAM-1 の発現は定量的 RT-PCR 及び Western blotting で解析した。

2) 血球成分除去療法による血中 HNP 濃度変化

潰瘍性大腸炎患者に対する血球成分除去療法の初回治療前後、及び最終治療前に採血を行い、HNP の血中濃度を ELISA 法により測定した。HNP 濃度と、疾患活動性 (CAI score) との関連を解析した。

(倫理面への配慮)

a. 個人の人権の擁護: 1) 研究内容について十分な説明を行い、研究への参加は任意であること、研究に参加しない場合でも、従来通り診療を受けることができることを示す。2) 参加者のデータは、厳重な秘密保持のもとに管理され、本研究のデータが参加者に不利益を及ぼすことはないと考えられる。

b. 個人情報の管理: 1) ID 番号、氏名、住所、電話番号などの個人を特定できる情報を除いたものを作製し、新たな番号を付与し、本研究にはこの番号のみを用い、個人が特定できる名前などを用いない。2) 対象者由来の血液サンプルは個人が特定できる情報を消去して、番号を付与する。

c. 対象者に理解を求め同意を得る方法: 担当医より、研究内容について説明を行ない、書面による同意を得る。

d. 研究等によって生じる個人への不利益: 静脈穿刺は侵襲性はほとんどなく、被験者に不当な危険が生じることはほとんどない。個人のプライバシーに関わる点については上記のように十分な配慮を行い、対象者の不利益が生じないようにする。

C. 研究結果

1) HNP の腸管上皮細胞への作用

低濃度の HNP は HT-29 の細胞増殖を促進させたが、高濃度の HNP 添加では有意な細胞増殖抑制が認められた。また、IL-8 の発現は HNP 濃度依存的に上昇した。HNP による IL-8 発現亢進は ERK 阻害剤 (U0126) により抑制されたが、p38 阻害剤 (SB203580) は抑制しなかった。細胞外ヌクレオチドの受容体である P2 受容体の阻害剤 (suramin、RB-2) も IL-8 産生を著明に抑制し、HNP が P2 受容体、ERK を介して IL-8 の産生を刺激していると考えられた。また、高濃度 HNP は HT-29 の ICAM-1 発現も亢進させていた。

2) 血球成分除去療法による血中 HNP 濃度変化

顆粒球吸着除去療法 (GMA) を行った潰瘍性大腸炎患者 16 例で血中 HNP 濃度を測定した。全例ステロイドが投与されており、ステロイドが投与されていない潰瘍性大腸炎患者に比べ、GMA 治療前の血中 HNP 値は低値を示し、健常群との差は認められなかった。しかし、初回治療直後に血中 HNP が高く上昇する症例で、治療終了時の CAI score が高い傾向が認められた。

D. 考察

HNP は大腸上皮の増殖を抑制するとともに、IL-8、ICAM-1 発現を亢進させ、更なる好中球の局所浸潤を誘導している可能性が考えられた。HNP は P2 受容体、ERK を介して IL-8 の産生を亢進させており、これらの分子が潰瘍性大腸炎の治療対象になりうる可能性が示唆された。また、GMA 初回治療後の血中 HNP 値が治療効果と関連している可能性があり、今後、より多くの症例を蓄積し解析していく予定である。

E. 結論

潰瘍性大腸炎腸管では HNP が大腸上皮細胞からの IL-8、ICAM-1 発現を亢進させ、炎症を持続させている可能性が示唆された。また、HNP 及びその受容体は潰瘍性大腸炎の治療対象になりうると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Uto H, Kanmura S, Takami Y, Tsubouchi H. Clinical proteomics for liver disease: a promising approach for discovery of novel biomarkers. *Proteome Sci* 8, 70, 2010
2. Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. *Hepato Res* 40, 438-445, 2010
3. Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 45, 459-467, 2010
4. Sakiyama T, Uto H, Kanmura S, Tsubouchi H. Neutrophil-derived defensin in ulcerative colitis. In: *Neutrophils: Lifespan, Functions and Roles in Disease*, edited by Jamie E. DeFranco, pp375-386, **Nova Publishers**, 2010.
5. 上村修司, 宇都浩文, 崑山敏男, 坪内博仁 プロテオーム解析にもとづく IBD の診断 *IBD Research* 4, 288-293, 2010

2. 学会発表

1. Hashimoto S, Uto H, Kanmura S, Sakiyama T, Sasaki F, Ibusuki K, Iwashita Y, Moriuchi A, Fujita H, Setoyama H, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Human neutrophil peptide-1 aggravates dextran sulfate sodium-induced colitis. The 5th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium Seoul (韓国) 2010/10/2
2. Sasaki F, Ido A, Sakiyama T, Takami Y, Kumagai K, Nasu Y, Hashimoto S, Kanmura S, Moriuchi A,

Uto H, Oketani M, Tsubouchi H. Osteoactivin expressed in intestinal macrophages negatively regulates inflammation. Digestive Disease Week 2010 New Orleans (USA) 2010/5/5

3. 指宿和成、寄山敏男、上村修司、前田拓郎、有馬志穂、岩下祐司、隈元亮、佐々木文郷、山路尚久、瀬戸山仁、船川慶太、井戸章雄、坪内博仁 Human neutrophil peptide は腸管上皮細胞 IL-8、ICAM-1 の発現を亢進させる 第 52 回 日本消化器病学会大会 横浜 2010/10/13
4. 佐々木文郷、井戸章雄、高見陽一郎、熊谷公太郎、那須雄一郎、橋元慎一、上村修司、船川慶太、寄山敏男、宇都浩文、桶谷真、坪内博仁 マウス DSS 実験腸炎モデルにおけるオステオアクチビンの役割 第 52 回日本消化器病学会大会 横浜 2010/10/13

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

allele 解析からみた薬物代謝酵素遺伝子多型による免疫調節剤の有効性、安全性バイオマーカーの検索

研究協力者 内藤 裕二 京都府立医科大学消化器内科 准教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎（Ulcerative Colitis; UC）やクローン病（Crohn's Disease; CD）などの炎症性腸疾患（IBD）に対する薬物治療としては従来、5-ASA (5-aminosalicylic acid) 製剤やステロイド製剤が中心であった。しかし近年、Azathioprine や Tacrolimus などの免疫調節剤が抗炎症作用のみならず、損傷した粘膜の再上皮化作用を有している事が多くの臨床、基礎研究で明らかになっており、IBD の病勢コントロールにおける中心的な役割を果たすようになってきている。それらの免疫調節剤は白血球減少など時に重篤な副作用を認めることがあるため、薬剤の血中濃度を定期的に測定することが必須である。しかし、高用量の 5-ASA 製剤との併用によって免疫調節剤の血中濃度が予想以上に上昇したり、あるいは患者によって血中濃度が不安定であったりなど、薬剤によるコントロールが困難な例も少なからず認められる。それら薬物の血中濃度を左右するのは thiopurine methyltransferase (TPMT) や CYP3A4 と呼ばれる薬物代謝酵素の存在であり、これまでそれらの代謝酵素の遺伝子多型が薬物の血中濃度に影響を与えることが知られている。しかし、IBD の治療において Azathioprine や Tacrolimus を併用した際の他の薬物の血中濃度とそれらの薬剤の代謝酵素やその応答性遺伝子の多型および病勢コントロールの相関についての詳細な報告はない。本臨床研究は IBD 患者における免疫調節剤の代謝酵素を含む応答性の遺伝子多型を解析し、薬物の血中濃度との相関を検討し、最終的には遺伝子多型ならびに併用薬剤から患者個人の免疫調整薬の至適投与量を決定することが主な目的である。

共同研究者

該当なし

A. 研究目的

近年、潰瘍性大腸炎（Ulcerative Colitis; UC）やクローン病（Crohn's Disease; CD）などの炎症性腸疾患（IBD）に対する薬物治療として Azathioprine や Tacrolimus などの免疫調節剤が IBD の病勢コントロールにおける中心的な役割を果たすようになってきている。それらの免疫調節剤は白血球減少など時に重篤な副作用を認めることがあるため、薬剤の血中濃度を定期的に測定することが必須である。しかし、高用量の 5-ASA 製剤との併用によって血中濃度が予想以上に上昇したり、あるいは患者によって血中濃度が不安定であったりなど、薬剤のコントロールが困難な例も少なからず認められる。それら薬物の血中濃度を左右するのは薬物代謝酵素の存在であり、これまでそれらの代

謝酵素の遺伝子多型が薬物の血中濃度に影響を与えることが知られている。しかし、IBD の治療において Azathioprine や Tacrolimus を併用した際の他の薬物の血中濃度とそれらの薬剤の代謝酵素やその応答性遺伝子の多型および病勢コントロールの相関についての詳細な報告はない。本臨床研究は IBD 患者における免疫調節剤の代謝酵素を含む応答性の遺伝子多型を解析することで薬物の血中濃度との相関を検討し、最終的には遺伝子多型ならびに併用薬剤から患者個人の免疫調整薬の至適投与量を決定することが主な目的である。

B. 研究方法

本検討では HapMap 由来ヒトリンパ球細胞 30 株を用いて 5-ASA および Azathioprine 刺激にて発現誘導される遺伝子の EAI (Expressing Allele Imbalance) を EG (Express Genotyping) 法を用いて測定し、複数の細胞株で SNP (遺伝子多型 (一塩基多型)) によって EAI を生じる遺伝子発現を同定する。さらに当院にて

Azathioprine 投与中の炎症性腸疾患患者の血液より、同定された遺伝子多型の genotype をそれぞれの患者で測定し、Azathioprine の代謝産物である血中 6-TGN 濃度との相関を検討する。SNP の測定には、末梢静脈血から抽出されたゲノム DNA を用い、シークエンス法もしくはマスアレイ法により実施する。この方法により、特定の遺伝子の genotyping が Azathioprine 投与時の血中濃度決定のバイオマーカーとなり、炎症性腸疾患患者への投与量や投与薬剤の選択についての検討が可能となる。

(倫理面への配慮)

本検討における個人情報情報は情報管理者（実験責任者：内藤裕二）によって厳重な管理のもと、守秘義務を遵守する。さらに個人情報管理補助者を設定し、匿名化の作業のみを担当する。また、本検討は、末梢静脈血から抽出したゲノム DNA における遺伝子多型解析を行う為、三省合同「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」（以後、三省合同倫理指針という。）を遵守しなければならない。解析・検討結果を公表する際には、個人名の漏洩の防止を徹底し、プライバシーの保護に努める。さらに個人に帰属する検討結果を個人に求められた場合、その個人本人のもののみを伝達する旨である。なお、試料の保管には患者を特定できる情報を削除し、代わりに新しく符号を付ける。この符号と個人情報を関連させる対応表は京都府立医科大学医学倫理審査委員会で承認された個人情報管理者のもとで厳重に保管する。

C. 研究結果

HapMap 由来ヒトリンパ球細胞に 5-ASA および Azathioprine にて刺激した際に 2 倍以上の EAI を検出できたプローブ数は全部で 7803 個であった。このうち、3 細胞株以上で共通して有意な EAI を検出できたのは 78 であった。今の所、そのうち上位 4 つのプローブについて患者血液から同定した genotype とそれぞれの患者の血中 6-TGN 値との相関を検討し、有意な相関関係を得ている。

D. 考察

ヒトリンパ球細胞に 5-ASA と Azathioprine の刺激に

よって誘導される SNP を有する遺伝子の EAI の測定が可能であった。また本検討において同定された特定の遺伝子の genotyping は患者の血中 6-TGN 値と相関した。今後、症例の蓄積や、同定された遺伝子の機能解析をおこなうことで、炎症性腸疾患患者における Azathioprine の薬物代謝の詳細が明らかとなる。また、遺伝子の genotyping は患者への Azathioprine 至適投与量決定のためのバイオマーカーとなりうることが示唆された。

E. 結論

Azathioprine の至適投与量決定に影響を及ぼす遺伝子多型の genotyping 決定が可能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

該当なし

2. 学会発表

内山和彦、高木智久、内藤裕二・シンポジウム 1・当院におけるアザチオプリン使用の現況と今後の課題・第 93 回日本消化器病学会近畿支部例会・大阪国際交流センター・2010 年 9 月 18 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

該当なし

日本人クローン病における疾患感受性遺伝子と寛解維持期間との関係について

研究協力者 木内 喜孝 東北大学高等教育開発推進センター 准教授

研究要旨：日本人クローン病感受性遺伝子候補が複数報告されている。それらが疾患の成因だけではなく、予後予測バイオマーカーや治療標的分子となりうるか検討するため、複数の感受性遺伝子候補と寛解維持期間についての関連を解析した。その結果、IL12B 遺伝子のクローン病リスクハプロタイプをホモ接合で保有する患者は、それ以外の患者と比較し有意に再燃までの期間が短いことが確認された。疾患感受性遺伝子は予後予測マーカーとなりうる可能性を示した。

共同研究者： 角田洋一、高橋成一、根来健一、
遠藤克哉、志賀久嗣、下瀬川徹
東北大学消化器病態学分野

A. 研究目的

クローン病（以下 CD）は、その発症に遺伝因子が関与している。近年ゲノムワイド関連解析などの結果、日本人 CD でもここ数年でいくつかの疾患感受性候補遺伝子が報告された。これらは疾患の発症以外にも、臨床表現型やその予後に影響を与えうることから、予後予測バイオマーカーや治療標的となる可能性がある。そこで、日本人 CD 感受性遺伝子が、CD の予後におよぼす影響を検討した。

B. 研究方法

当科で関連をすでに報告している、TNFSF15 遺伝子、HLA-DQB1 遺伝子、IL12B 遺伝子、NKX2.3 遺伝子について東北大学病院消化器内科を受診したクローン病患者 348 例を対象に検討した。初回寛解導入治療後、再燃するまでの期間について、各遺伝子の CD リスクアリルをホモ接合で保有する群（RH 群）と、それ以外（NRH 群）での比較をした。また、性別、病型、肛門病変の有無、診断時年齢の要素を加え、Log-Rank 検定のほか、COX 比例ハザードモデルを使用した多変量解析も行った。（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた遺伝子解析については、国の指針を厳守し、また本研究は東北大学倫理委員会

の承認を得て行った。

C. 研究結果

単変量解析では、TNFSF15 遺伝子、IL12B 遺伝子、肛門病変の有無が再燃までの期間と有意に関連した。多変量解析では TNFSF15 遺伝子の相関は消失し、遺伝子では IL12B 遺伝子、NKX2.3 遺伝子が相関を示した。Step-Wise 法を用いて、再燃までの期間を構成する変数を選択したところ、IL12B 遺伝子、肛門病変の有無、診断時年齢が選択され、IL12B 遺伝子 RH 群、肛門病変を有する群で寛解維持期間が短く、診断時年齢が高い群で寛解維持期間が長かった。

D. 考察

IL12B 遺伝子 CD リスクアリルをホモ接合で保有すると再燃までの期間が有意に短いことが確認された。我々は IL12B 遺伝子リスクアリルが、非リスクアリルに比べて mRNA の発現が亢進していることをすでに報告している。これらの結果から、IL12B が過剰発現することが CD 再燃に影響していることが予想され、IL12B を抑制する治療が再燃予防・寛解維持治療となりうることが示唆された。

E. 結論

IL12B 遺伝子のクローン病リスクはプロタイプは、日本人クローン病の寛解維持期間と関連することが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Endo K, Kinouchi Y, Kakuta Y, Ueki N, Takahashi S, Shimosegawa T. Involvement of NF-kappa B pathway in TLIA gene expression induced by lipopolysaccharide. **Cytokine**. 49:215-220, 2010.
- 2) Shiga H, Takagi S, Inoue S, Kinouchi Y, Ohkubo T, Takahashi S, Negoro K, Yokoyama H, Kato S, Fukushima K, Hiwatashi N, Tooru Shimosegawa. What Determines the Later Clinical Course of Patients Who Do Not Undergo Colectomy at the First Attack? A Japanese Cohort Study on Ulcerative Colitis. **Digestion** 81(2):104-112, 2010.
- 3) Takahashi S, Takagi S, Shiga H, Umemura K, Endo K, Kakuta Y, Takahashi S, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Scheduled maintenance therapy with infliximab improves the prognosis of Crohn's disease: A single center prospective cohort study in Japan. **Tohoku J Exp Med** 220(3):207-15, 2010.
- 4) Kanazawa Y, Saito Y, Supriatna Y, Tezuka H, Kotani T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Kinouchi Y, Nojima Y, Ohteki T, Shimosegawa T, Matozaki T. Role of SIRP α in regulation of mucosal immunity in the intestine. **Genes to Cells** 15:1189-1200, 2010.

2. 学会発表

- 1) Kakuta Y, Kinouchi Y, Shimodaira Y, Moroi R, Nagasawa H, Kuroha M, Arai T, Kanazawa Y, Shiga H, Endo K, Takahashi S, Shimosegawa T. The IL12B gene is associated with the clinical course of Crohn's disease in Japanese patients. 18th United European Gastroenterology Week 2010 Barcelona Spain, Oct 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

なし

炎症性腸疾患の腸内細菌叢プロファイル (tRFLP) 解析

研究分担者 藤山 佳秀 滋賀医科大学内科学講座 (消化器内科) 教授

研究要旨: tRFLP 法による炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎・クローン病) と健常人の腸内細菌叢プロファイル解析を行った。対象は潰瘍性大腸炎 31 例、クローン病 31 例ならびに健常人 30 例について、便中細菌叢プロファイル解析を行い、dendrogram を作成した。結果、便中細菌叢プロファイルは 5 つのクラスターを形成したが、潰瘍性大腸炎では活動期と非活動期でクラスターを異にする傾向がみられるのに対し、クローン病では活動期と非活動期にかかわらず同一のクラスターにとどまる傾向がみられた。

共同研究者

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

Polymorphism (tRFLP) 解析は既報の通りであり、制限酵素は *Bs*II を用いた (Nagashima 法)。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたっては、滋賀医科大学倫理委員会の承認の下にインフォームド・コンセントを得て行った。

A. 研究目的

これまで炎症性腸疾患の病因・病態への腸内細菌叢の関与を明らかにするため、tRFLP 法を用いた腸内 (便中) 細菌叢プロファイル解析を、潰瘍性大腸炎 (UC) と健常対照、クローン病 (CD) と健常対照の比較の中で多施設共同研究に発展させて検討を行ってきた。本研究では、UC、CD 各々の活動期・非活動期と健常対照との便中細菌叢プロファイルの比較検討を行った。

B. 研究方法

対象症例は滋賀医科大学附属病院に通院中の UC 31 例 (男性 15 例、女性 16 例; 平均年齢 33 歳)、CD 31 例 (男性 16 例、女性 15 例; 平均年齢 30 歳) および健常人 30 例 (男性 18 例、女性 12 例; 平均年齢 35 歳)。UC 症例の内訳は、全大腸炎型 15 例、左側結腸炎型 16 例で、活動期 (CAI \geq 5) 13 例、非活動期 18 例。CD 症例の内訳は、小腸・大腸型 20 例、大腸型 6 例、小腸型 5 例で、活動期 (CDAI \geq 150) 15 例、非活動期 16 例。抗生剤・プロバイオティクス服用症例は含まれていない。

Terminal Restriction Enzyme Fragments Length

C. 研究結果

計 92 検体の tRFLP 解析によるデンドログラムは図 1 に示すように 5 つのクラスターから構成された。各クラスターにおける健常人、活動期 UC、非活動期 UC、活動期 CD、非活動期 CD の分布を表 1 に示した。クラスター I, II, III には健常人 30 例中 28 例 (93%)、UC では活動期 13 例中 5 例 (38%)、非活動期 18 例中 17 例 (94%)、CD では活動期 15 例中 4 例 (27%)、非活動期 16 例中 4 例 (25%) が属した。一方で、クラスター IV, V には健常人 30 例中 2 例 (7%)、UC では活動期 13 例中 8 例 (62%)、非活動期 18 例中 1 例 (6%)、CD では活動期 15 例中 11 例 (73%)、非活動期 16 例中 12 例 (75%) が属した。

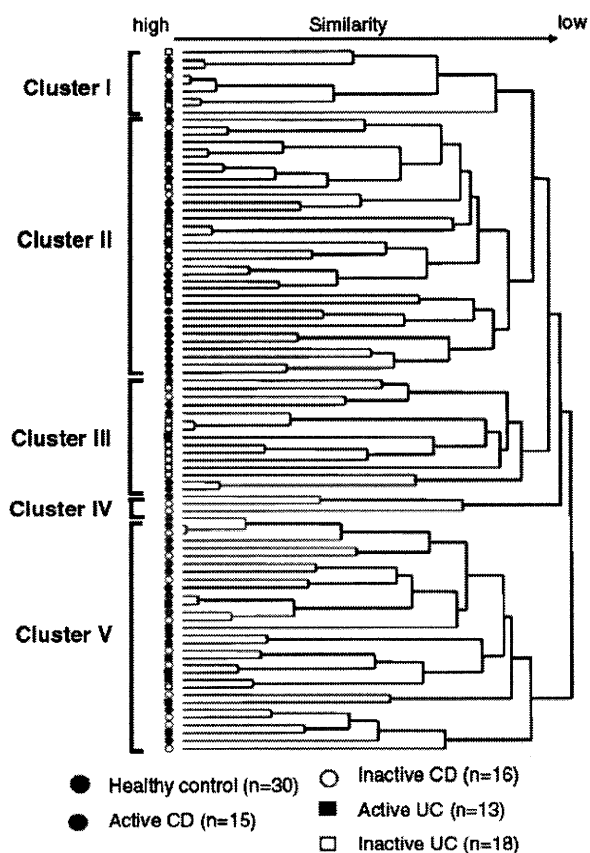


図1. 便中細菌叢 tRFLP デンドログラム

Cluster	I	II	III	IV	V	Total
Healthy individuals	4	21	3	0	2	30
Inactive UC	2	7	8	0	1	18
Active UC	1	3	1	0	8	13
Inactive CD	1	2	1	2	10	16
Active CD	1	1	1	2	9	15
Total	9	34	14	4	29	

表1. UC、CD 症例および健康人のクラスター分布

すなわち、UC 症例の便中細菌叢プロファイルは非活動期において健康人プロファイルに近似する傾向がみられるのに対して、CD 症例では病期にかかわらず健康人クラスターとは異なる便中細菌叢プロファイルを形成した。このことから、tRFLP プロファイルからみる限りにおいて、腸内細菌叢の炎症性腸疾患への関与は UC と CD とで異なる可能性が示唆された。

E. 結論

炎症性腸疾患の病態への腸内細菌叢の関与は、潰瘍性大腸炎とクローン病で異なる可能性について tRFLP 法を用いて明らかにした。今後のプロバイオティクスやプレバイオティクスの炎症性腸疾患治療に向けての

開発ならびに臨床応用を図る上で、潰瘍性大腸炎がよりその標的となると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, Saito Y, Tsujikawa T, Fujiyama Y: Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gastroenterol*. 2011 Jan 21. [Epub ahead of print]
- Yagi Y, Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Ohsaki R, Inatomi O, Bamba S, Tsujikawa T, Shimizu T, Fujiyama Y: Interleukin-32 α expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med*. 2011 Feb;27(2):263-8
- Araki Y, Mukaisyo K, Sugihara H, Fujiyama Y, Hattori T: Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Oncol Rep*. 2010 Oct;24(4):869-74.
- Komiyama Y, Andoh A, Fujiwara D, Ohmae H, Araki Y, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Kanauchi O. New prebiotics from rice bran ameliorate inflammation in murine colitis models through the modulation of intestinal homeostasis and the mucosal immune system. *Scand J Gastroenterol*: 2011 Jan;46(1):40-52
- Sasaki M, Johtatsu T, Kurihara M, Iwakawa H, Tanaka T, Bamba S, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Andoh A: Energy expenditure in Japanese patients with severe or moderate ulcerative colitis. *J Clin Biochem Nutr*. 2010 Jul;47(1):32-6
- Ishida M, Naka S, Shiomi H, Tsujikawa T, Andoh A, Nakahara T, Saito Y, Kurumi Y,

- Takikita-Suzuki M, Kojima F, Hotta M, Tani T, Fujiyama Y, Okabe H: Hepatocellular carcinoma occurring in a Crohn's disease patient. *World J Gastroenterol*. 2010 Jul 7;16(25):3215-8.
7. Kobori A, Bamba S, Imaeda H, Ban H, Tsujikawa T, Saito Y, Fujiyama Y, Andoh A: Butyrate stimulates IL-32alpha expression in human intestinal epithelial cell lines. *World J Gastroenterol*. 2010 May 21;16(19):2355-61
8. Sato K, Kumita W, Ode T, Ichinose S, Ando A, Fujiyama Y, Chida T, Okamura N: OmpA variants affecting the adherence of ulcerative colitis-derived *Bacteroides vulgatus*. *J Med Dent Sci*. 2010 Mar;57(1):55-64.
9. Kobori A, Yagi Y, Imaeda H, Ban H, Bamba S, Tsujikawa T, Saito Y, Fujiyama Y, Andoh A: Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *J Gastroenterol*. 2010 Oct;45(10):999-1007
10. Ban H, Andoh A, Imaeda H, Kobori A, Bamba S, Tsujikawa T, Sasaki M, Saito Y, Fujiyama Y: The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2010 Oct;45(10):1014-21.
11. Sugihara T, Kobori A, Imaeda H, Tsujikawa T, Amagase K, Takeuchi K, Fujiyama Y, Andoh A: The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*. 2010 Jun;160(3):386-93
12. Nakase H, Fujiyama Y, Oshitani N, Oga T, Nonomura K, Matsuoka T, Esaki Y, Murayama T, Teramukai S, Chiba T, Narumiya S: Effect of EP4 agonist (ONO-4819CD) for patients with mild to moderate ulcerative colitis refractory to 5-aminosalicylates: a randomized phase II, placebo-controlled trial. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 May;16(5):731-3.
1. 福井富穂、福渡 努、奥村万寿美、岩川裕美、佐々木雅也、安藤 朗、辻川知之、藤山佳秀、柴田克己。クローン病患者におけるビタミンの摂取状況と栄養状態。日本病態栄養学会誌 13(2):133-145、2010
2. 辻川知之、齊藤康晴、安藤 朗、馬場重樹、青松友樹、児堀綾子、望月洋介、伴 宏充、西村貴史、塩谷 淳、小泉祐介、稲富 理、佐々木雅也、藤山佳秀。Crohn 病小腸病変の診断と経過；バルーン内視鏡の有用性と位置づけ—シングルバルーン内視鏡—。胃と腸 45(10)1595-1603、2010
3. 藤山佳秀、安藤 朗。第7章 病因・病態 II 病原微生物による感染論。「炎症性腸疾患」(日比紀文編)。医学書院(東京) p269-275、2010
4. 辻川知之、馬場重樹、安藤 朗、佐々木雅也、齊藤康晴、藤山佳秀。主題 II クローン病治療のアップデート；III. Crohn 病腸管合併症への内科治療とその予防。日本大腸肛門学会雑誌 63(10):869-874、2010
5. 安藤 朗、藤山佳秀。バイオマーカーから迫る IBD の診断: サイトカイン解析による IBD の診断。IBD Research 4(4):307-312、2010
6. 安藤 朗、藤山佳秀。炎症性腸疾患の今日的アプローチ: 腸内細菌からみた炎症性腸疾患。成人病と生活習慣病 40(12):1345-1350、2010
7. 安藤 朗、藤山佳秀。第4章 炎症性腸疾患の内科的治療: 1) 診療ガイドラインを踏まえた潰瘍性大腸炎の内科治療(総論)。「消化器 Book 02 炎症性腸疾患の日常臨床で診る」(日比紀文、久松理一企画) 羊土社(東京) p87-93、2010
8. 辻川知之、藤山佳秀。第4章 炎症性腸疾患の内科的治療: 3) 潰瘍性大腸炎・クローン病の治療(各論) ⑧経腸栄養法の実際。「消化器 Book 02 炎症性腸疾患の日常臨床で診る」(日比紀文、久松理一企画) 羊土社(東京) p130-135、2010
9. 安藤 朗、馬場重樹、辻川知之、藤山佳秀。腸上皮下筋線維芽細胞と炎症の分子生物学。G. I. Research 19(1):99-105、2011

2. 学会発表

1. Imaeda H, Andoh A, Bamba S, Tsujikawa T, Fujiyama Y: Inflammatory cytokines regulate Delta-like 1, Delta-4, Jagged-1 in murine and human colonic subepithelial myofibroblast. The 1st JSGE International Topic Conference, Kamakura, Sep.25, 2010
2. Kuzuoka H, Andoh A, Suzuki Y, Matsui T, Fujiyama Y, Mtsumoto T: Fecal microbiota showed remarkably skewing in patients with Crohn's disease by teiminal restriction fragment length polymorphism analysis. UEGW 2010, Barcelona, Oct.26, 2010
3. Tsujikawa T, Andoh A, Fujiyama Y, Nakamura S, Matsumoto T, Hosoe N, Suzuki Y, Hirai F, Matsui T: Exhaustive analysis of inflammation, nutrition, and oxidative stress in Crohn's disease during induction therapy. UEGW 2010, Barcelona, Nov. 27, 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
なし

う蝕病原性口腔細菌（虫歯菌）*S. mutans* による炎症性腸疾患増悪の可能性とそのメカニズム

研究協力者 中島 淳 横浜市大附属病院消化器内科 教授

研究要旨：われわれは、口腔内の歯周病菌およびう蝕病原菌の網羅的検索から、高病原性 *S. mutans* が潰瘍性大腸炎（UC）と強い相関を示し、さらに菌血症などの全身疾患を起こしやすいことを見出している。この高病原性 *S. mutans* TW295 株を投与したマウスでは標準株と比べ有意な腸炎の悪化が認められた。この結果をもとに、50 例程度の少数の UC 患者唾液サンプルを分析したところ、高病原性 *S. mutans* が有意に高頻度に検出された。今回の発見はこれまで国内外を問わず一切報告されていない新知見である。今後国内多施設で患者口腔内細菌の有菌率を調べ疾患増悪との関連性を検討していく予定である。

共同研究者

大阪大学歯学部 和田孝一郎

2) Singhal S et al. The Role of Oral Hygiene in Inflammatory Bowel Disease. Dig Dis Sci. 2010

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎（UC）発症において、腸内細菌叢がその原因の一つである可能性が指摘されている。一方、同じ細菌でも口腔内細菌の UC 発症における関連については、これまで殆ど報告されていない。消化管粘膜は外界と広い面積で接しているため、様々なバリア機構や免疫機構が発達しており、腸内細菌が循環血中まで到達することは少ない。これに対し、口腔内細菌は抜歯や歯科治療などによって容易に循環血中に侵入することが報告されており、多くの全身疾患（虚血性心疾患、糖尿病、骨粗鬆症、慢性腎炎、低体重児出産など）の発症・悪化に関与することが指摘されている¹⁾。興味深いことに、近年の疫学調査では、UC 発症時近傍での虫歯治療歴や歯科通院歴が有意に高いことが報告されている²⁾。一方先進国では口腔内衛生意識の高まりから一日に歯磨きをする回数が過去 50 年間で増加してきたが、我が国においてこの傾向は近年顕著である。これらより、循環血中に侵入した口腔内細菌が腸管粘膜に作用し、UC の発症・増悪・再発に関与する可能性が推測されたため疾患と口腔内細菌の関与の検討をヒトおよびマウス腸炎モデルにて検討をすることにした。

1) Seymour GJ et al. Relationship between periodontal infections and systemic disease. Clin Microbiol Infect. 2007; 13, 3-10.

B. 研究方法

1. ヒトにおける検討：患者および健常者の唾液一滴を採取して歯周病菌及びう蝕菌の検出同定を行った。
2. マウスモデル解析：デキストラン硫酸ナトリウム投与による炎症性腸疾患モデルマウスを用いて口腔内細菌を血管内投与して腸炎のスコアリング（Disease Activity Index; DAI）、死亡率、腸管病理等の解析を行った。

（倫理面への配慮）

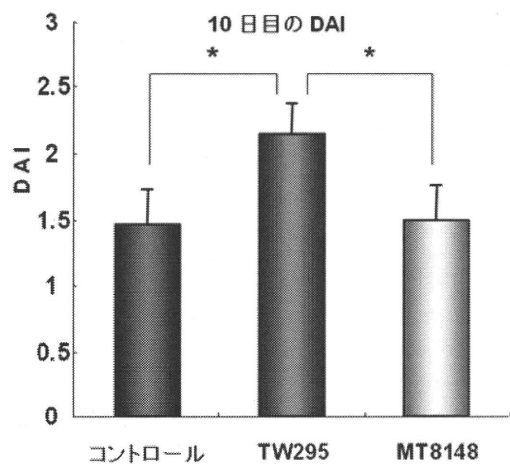
患者からの唾液採取及び口腔内細菌の同定に関しては学内倫理委員会の承認のもと十分なインフォームドコンセントのもと行った。

C. 研究結果

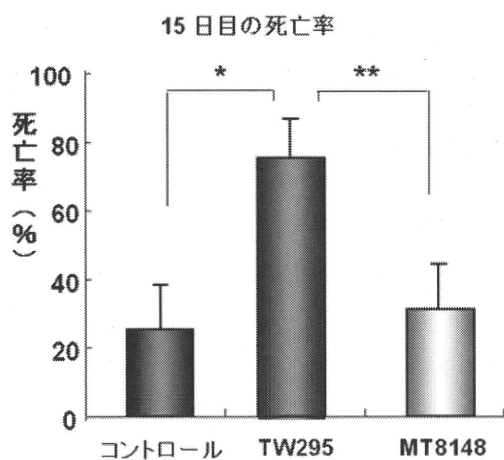
健常人 528 人および UC 患者 54 名の唾液の解析からコラーゲン結合タンパク保有、かつ血清型 k+f 型の *S. mutans* 菌株が健常人では 2.1% の検出に対して UC 患者では 21.1% と有意に高い検出率を認めた。

上記のヒトにおける予備的研究から実際にコラーゲン結合タンパクと血清型 k 型は、腸炎発症・悪化に関与するかを検討するために DSS マウスモデルにおける検討を行った。2.5% DSS 投与後 4 日目にマウス頸静脈から MT8148 株（血清型 c）日本人小児口腔から分離された株（標準株）

および TW295 株 (血清型 k) 抜歯後菌血症患者の血液から分離された株} を各々 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^7$ 集落形成単位 (Colony Forming Unit; CFU) 感染させたところ TW295 株を感染させた群においては、コントロール群および MT8148 株感染群と比較して有意な DAI の増加が認められた (図参考) また同様の検討を菌の接種を静脈でなく経口的に摂取したマウスでは腸炎の悪化は惹起されなかった。また静脈接種菌量と脂肪率には有意な相関があり用量依存的であった。



(n=12-18, mean ± SEM, *p<0.05)



(n=12-18, mean ± SEM, *p<0.05, **p<0.01)

D. 考察

(1) これまでの我々の研究では口腔内細菌高病原性株の一種 TW295 は血中で貪食されにくく、血中半減期が長いことが知られている。また、(2) 当該菌株は本邦では過去の調査から 1980 年を境に急激な保菌率の増加を示しており、1980 年以前では非常にまれな菌であった。(3) さらに本邦でも欧米並みに口腔内衛生の知識が普及して毎日の歯磨き回数が増加してきて

いる (虫歯菌による一過性菌血症が一日数回惹起される)、特に若年者での増加が著しい。上記 (1) - (3) の知見と、今回我々の発見した潰瘍性大腸炎患者での有意に高い保菌率を合わせるとある種の口腔内細菌が潰瘍性大腸炎の増悪等に関与している可能性が示唆された。今回の治験はこれまで国内外問わず報告されていない新規の知見であり結果の信ぴょう性などを確認できれば新たな治療予防法に繋がる非常に価値の高いものであると考えられる。今後は施設によるばらつき等をなくすために、多施設、多検体での解析を進める予定である。

E. 結論

潰瘍性大腸炎の増悪に口腔内細菌が強く関与する可能性を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

当該研究に関するものはなし

2. 学会発表

当該研究に関するものはなし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし

炎症性発癌における DNA 二重鎖切断と DNA 損傷応答

研究分担者 味岡 洋一 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：ホルマリン固定材料を用いて、炎症性発癌における「DNA 二重鎖切断 (DSB)」と「DNA 損傷応答 (DDR)」の検討が可能かどうかを、通常の大腸粘膜に発生した粘膜内腫瘍（腺腫と粘膜内癌）と SM 以深浸潤癌を用いて検討した。粘膜内腫瘍、SM 以深浸潤癌いずれも免疫染色で DSB の指標である γ -H2AX の核内発現の観察が可能であった。また、蛍光免疫染色標本では、DDR の際に γ -H2AX と結合する 53BP1 の発現、および点状に発現した γ -H2AX と 53BP1 の共局在の観察が可能であった。今後、これまでに蓄積されたホルマリン固定材料を用いて、炎症性発癌病変の DSB、DDR の検討が可能と考えられた。

共同研究者

渡邊聡明（帝京大学外科）

岩井俊文（新潟大学大学院小児外科）

（倫理面への配慮）

該当しない。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎の慢性持続性炎症粘膜には高頻度で大腸癌が発生（炎症性発癌）することが知られているが、慢性持続性炎症と発癌とを結びつける分子メカニズムは解明されていない。本研究では、慢性持続性炎症による大腸上皮細胞の「DNA 二重鎖切断(double strand breaks: DSB)」とそれに対する「DNA 損傷応答 (DNA damage response DDR)」と発癌との関連を明らかにすることを目的としたが、DSB と DDR については、これまでホルマリン固定材料での系統的検討はなされていない。従って、本年度は、ホルマリン固定材料での検討が可能かどうかを、炎症性腸疾患を合併しない大腸粘膜に発生した腫瘍性病変を用いて検討した。

B. 研究方法

ホルマリン固定外科切除大腸の腺腫 63 病変、粘膜内癌 12 病変、SM 以深浸潤癌 56 病変を対象とし、DSB 部位に動員されるリン酸化 H2AX (γ -H2AX) の発現を、免疫組織学的に解析した。DSB に対する DDR の起点として、 γ -H2AX と 53BP1 との結合が知られている。本研究では、 γ -H2AX と 53BP1 の蛍光免疫染色を行い、両者の共局在について観察した。

C. 研究結果

ホルマリン固定材料でも、免疫染色により γ -H2AX 発現の同定が可能であった。 γ -H2AX の発現には、核内点状と核内びまん性の 2 つのパターンがあった。正常大腸粘膜では γ -H2AX の発現はなかった。腺腫および粘膜内癌の粘膜内腫瘍では核内点状発現が 14%、核内びまん性発現が 16%に、SM 以深浸潤癌では核内点状発現が 37%、核内びまん性発現が 27%にみられた。蛍光免疫染色標本の観察では、核内に点状に発現する γ -H2AX は 53BP1 と共局在が確認されたのに対し、びまん性に発現する γ -H2AX では 53BP1 との共局在はみられなかった。

D. 考察

DSB 箇所には γ -H2AX が動員され、それに 53BP1 が結合することで DSB 部の修復 (DDR) が行われるとされている。ホルマリン固定材料を用いた本研究でも、粘膜内腫瘍の段階から DSB が生じており、癌の進展 (SM 以深) に伴い増加すること、核内に点状に発現する γ -H2AX は 53BP1 と共局在し、DDR が起きていることが確認された。他方、核内にびまん性に発現する γ -H2AX の意義については分子生物学の分野でも未だ不明であるが、本研究結果では 53BP1 との共局在がみられず、免疫染色で確認される γ -H2AX の核内びまん性発現は

DDR の破綻を表現している可能性がある。次年度は、ホルマリン固定材料における潰瘍性大腸炎の炎症粘膜やそれを背景に発生する発癌早期病変(dysplasia)、SM 以深浸潤癌の DSB、DDR について検討する。

E. 結論

今後、これまでに蓄積されたホルマリン固定材料を用いて、炎症性発癌病変の DSB、DDR の検討が可能と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe T, Kobunai T, Ikeuchi H, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H. RUNX3 copy number predicts the development of UC-associated colorectal cancer. Int J Oncol. 38:201-207, 2011
- 2) Watanabe T, Ajioka Y, Matsumoto T, Tomotsugu N, Takebayashi T, Inoue E, Iizuka B, Igarashi M, Iwao Y, Ohtsuka K, Kudo SE, Kobayashi K, Sada M, Matsumoto T, Hirata I, Murakami K, Nagahori M, Watanabe K, Hida N, Ueno F, Tanaka S, Watanabe M, Hibi T. Target biopsy or step biopsy? Optimal surveillance for ulcerative colitis: a Japanese nationwide randomized controlled trial. J Gastroenterol. 46: 11-16, 2010
- 3) 味岡洋一. 大腸癌の組織発生と発育進展様式. 臨床外科. 65: 16-21, 2010

2. 学会発表

- 1) Ajioka Y. Pathology of Colitic Cancer. The 2nd International Forum of the 96 Annual Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology. Niigata, 2010. 4. 23

- 2) 須田和敬、味岡洋一. 特別企画シンポジウムー炎症性腸疾患からの発癌ー潰瘍性大腸炎の発癌背景 粘膜の粘液形質変化. 第6回日本消化管学会. 福岡, 2010. 2. 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
なし

骨髄間葉系幹細胞と大腸癌細胞との相互作用

研究分担者 今井 浩三 東京大学医科学研究所先端医療研究センター癌制御分野 教授

研究要旨：炎症性腸疾患に対する骨髄間葉系幹細胞(MSC)治療が有望視されるなか、炎症関連発癌におけるMSCの影響は現時点で明らかではない。本研究では、VEGF低発現の大腸癌細胞株とMSCの混合移植腫瘍(Xenograft)を用いて、大腸癌におけるMSCの動態と役割を検討した。MSCは腫瘍内の血管周皮細胞に分化し、腫瘍由来のケモカインを介したサバイバルシグナルを活性化させ、腫瘍生着および生存に寄与していると考えられた。

共同研究者：那須野正尚¹、有村佳昭¹、渡邊修平¹、永石敏和²、苗代康可³、篠村恭久¹

所属；札幌医科大学第一内科¹、札幌医科大学第二解剖²、札幌医科大学医療人育成センター³

A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞(MSC)は再生医療や遺伝子治療のソースとして期待される一方で、腫瘍に対する影響は明らかではない。我々は大腸癌に対するMSCの影響を検討することで、炎症性腸疾患におけるMSC治療の臨床応用に備えることを目的とした。

B. 研究方法

SCIDマウスにヒト大腸癌細胞株(COLO 320)とラットMSCを1:1(各 1×10^6 個)で混合移植したXenograftモデルを作成した。生着した腫瘍におけるMSCの動態を、蛍光免疫染色および種特異的プローブを用いたFISH法にて解析した。MSCおよび腫瘍細胞における分子発現を、Realtime PCR法およびImmuno-PCR法にて検討した。また、腫瘍細胞をMSCと共培養した後ソーティングにて単離し、MSCが腫瘍細胞周期、サバイバルシグナルに及ぼす影響を検討した。さらに腫瘍細胞における遺伝子発現の変化を、DNAマイクロアレイにて網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

GFP標識されたラットMSCはXenograftの間質に存在し、 α -SMA陽性、CD31陰性で血管周皮細胞の形質を示した。さらに、MSCにより宿主のマウス由来細胞が腫瘍内に動員され、血管内皮様の形態を呈した。

MSCは、腫瘍細胞のアポトーシスを抑制した。さらにMSC混合Xenograftにおいて、Akt、p38のリン酸化が誘導され、サバイバルシグナルが増強していた。

DNAマイクロアレイによるMSC混合/非混合移植腫瘍の発現遺伝子の比較解析から、有意な変動が見られた計7遺伝子をpick upした。腫瘍細胞におけるこれらの遺伝子発現の再現性を確認したところ、Stromal derived factor-1(SDF-1)の発現がMSC混合移植腫瘍にて非混合腫瘍に比較して約20倍増強していた。

D. 考察

前年度の研究成果で、VEGF低発現の大腸癌細胞株(COLO320)は、MSCと混合移植することにより免疫不全マウスに対する生着率が著明に上昇することを明らかにした。今年度の研究から、その機序として、COLO320がSDF-1(リガンド)を発現し、受容体CXCR4を発現するMSCを腫瘍内に保持すること、さらにMSCが血管周皮細胞に分化し、宿主であるマウス由来細胞を動員して血管新生を補助することで腫瘍の生着を促進することが考えられた。

さらに、COL0320 は CXCR4 も共発現しており、MSC により誘導される SDF-1 との相互作用を介して、SDF-1/CXCR4 axis の下流にある Akt, p38 を活性化し、腫瘍細胞の生存およびアポトーシス制御に影響を与えている可能性が想定された。

E. 結論

MSC は、VEGF 低発現の大腸癌に対して血管新生を介して腫瘍の生着を促進し、SDF-1 /CXCR4 axis を介して増殖を促す可能性が示唆された。但し、前年度の AOM/DSS によるラット炎症関連発癌モデルにおける検討では、MSC は発癌のイニシエーションを抑制する傾向を認めており、より生理的条件下における MSC の腫瘍細胞に対する影響を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sasaki Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y: Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *J Gastroenterol*. 2010 Sep 17. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1) Nasuno M, Arimura Y, Nakagaki S, Watanabe S, Nagaishi K, Naishiro Y, Imai K, Shinomura Y: Reciprocal relation tumor angiogenesis with MSC-dependent growth in colorectal cancer cell lines xenograft
The 5th Korea-Japan Inflammatory Bowel Disease Symposium ソウル 2010年10月2日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 『特許第 4284490 号』(erbB-2 関連ペプチド) 2009年4月3日
- 2) 『特願 2008-121671』(癌の検出方法及び検出用キット、並びに癌治療剤) 2008年5月7日出願

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

骨髄間葉系幹細胞由来 gut trophic factor と腸上皮再生

分担研究者 今井 浩三 東京大学医科学研究所先端医療研究センター癌制御分野 教授

研究要旨：骨髄間葉系幹細胞(MSC)治療は、腸炎の回復を促進する(論文発表1.)。本年度は、MSC由来 gut trophic factor (以下 MSC-GTF) が腸上皮再生能およびバリア機能に及ぼす影響を検討した。MSC-GTF は、腸上皮細胞における増殖因子の発現を誘導し、細胞増殖・回転を促進する一方でアポトーシスを抑制した。また、タイト結合タンパクの発現を調節し、腸炎の回復を促進した。MSC-GTF が腸上皮バリア機能の回復に寄与する可能性が示唆された。

共同研究者：渡邊修平¹、永石敏和²、那須野正尚¹、苗代康可³、有村佳昭¹、篠村恭久¹
所属：札幌医科大学第一内科¹、札幌医科大学第二解剖²、札幌医科大学医療人育成センター³

500mg/body /day)をラット DSS 腸炎急性期に経静脈的に投与し、MSC-GTF が腸炎の重症度および腸上皮再生に及ぼす影響と、タイト結合蛋白の発現について検討した。

A. 研究目的

骨髄間葉系幹細胞(MSC)は、再生医療の細胞ソースとして有力視されている。前年度までの研究成果から、MSCを経静脈的に投与する細胞治療はラット DSS 腸炎の回復を促進し、腸上皮細胞回転を促進およびアポトーシスを抑制することを明らかにした。本年度は、MSC由来の液性因子(MSC-GTF)が腸上皮再生能およびバリア機能に及ぼす影響を検討し、MSC治療の分子メカニズム解析に繋げることを目的とした。

B. 研究方法

Lew ラット骨髄から MSC を単離し、通常酸素濃度(20%)下(Normoxia)、各種サイトカイン刺激下(Cytokine treat)および低酸素濃度(5%)下(Hypoxia)に培養し、各培養上清を MSC-GTF を含有する conditioned medium (以下 MSC-CM)として回収した。次に in vitro の系で、腸上皮培養細胞株を細胞障害性サイトカインで前処理した後、各条件の MSC-CM で培養し、上皮細胞における増殖因子の発現、細胞増殖・回転、アポトーシス抑制効果について検討した。また in vivo の系で、MSC-CM(200mg or

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

C. 研究結果

1. In vitro

各培養条件下における MSC-GTF は、いずれも上皮細胞の増殖を促進し、HGF, FGF2, TGFb-1 の発現を増強した。さらに Wound assay, MTT assay および TUNEL reaction の検討から、低酸素条件下で調整された MSC-GTF が最も効果的に細胞増殖・回転を促進し、アポトーシスを抑制した。

2. In vivo

DSS 腸炎回復期において、MSC-GTF 投与群で control 群に比較して体重の回復および Disease activity index (DAI)の低下が著明で、MSC-GTF の容量依存性も認めた。組織学的重症度評価においても、MSC-GTF 投与群で腸炎の回復促進を認めた。上皮組織における HGF 発現および Ki-67 index は腸炎急性期において MSC-GTF 群で有意に高く、細胞増殖を促進していた。

一方、MSC-GTF が上皮バリア機能に関する影響

を解析するために、はじめに腸炎の経過に伴うタイト結合タンパク Claudin-2, -7, -12 の発現変化を検討した。Claudin-2 は、腸炎の重症化に伴いクリプト底部の上皮細胞に発現が増強し、回復とともに減少した。Claudin-7, -12 は、正常腸管組織においては主に被蓋上皮に発現し、腸炎の進行に伴い発現細胞がクリプト下部に向かって拡大した。炎症の回復と共に、両者の発現は再度被蓋上皮に局限した。

次に MSC-GTF 治療群およびコントロール群の比較では、回復期における Claudin-2, -7, -12 の発現が MSC-GTF 群で抑制されており、組織学的重症度と相関して変化する傾向を認めた。

D. 考察

MSC 治療は、腸炎の回復促進効果を認めるが、腸管組織に engraft される細胞数が少なく、生着した MSC による有効性機序の解析が重要な課題である。MSC 治療の効果発現機序として、1) MSC 由来液性因子(MSC-GTF)による作用、2) MSC と腸管組織とくに腸上皮との細胞接触を介した作用、3) MSC 自身の上皮細胞への形質転換、が考えられる。今回、in vitro の解析から MSC-GTF が直接腸上皮細胞の増殖促進、アポトーシス抑制に寄与することが明らかとなり、含有する生理活性物質の腸上皮再生への寄与が示唆された。一方、Claudin-2, -7, -12 は、細胞間隙を通過する水分やカルシウムの透過性に関与しており、炎症性腸疾患において活動性亢進に伴って Claudin-2 の発現が増強することが報告されている。MSC-GTF は、腸炎回復期においてこれらの Claudin 発現を抑制することで水透過性を制御し、バリア機能回復に寄与した可能性が示された。DAI における下痢スコアの軽減も、この現象を示唆した。ただ、MSC-GTF がタイト結合タンパクの発現調節に直接関与するか、あるいは炎症担当細胞等を介して間接的に関与するか、は検討中である。

E. 結論

MSC-GTF は、腸上皮再生能およびタイト結合タンパクの調節を介したバリア機能の回復に寄与する可能性が示唆された。今後、MSC-GTF の有効成分の同

定、およびその分子調節機構の解析を行い、腸炎における MSC 治療の有効性機序を明らかにする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sasaki Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y: Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *J Gastroenterol.* 2010 Sep 17. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 『特許第 4284490 号』(erbB-2 関連ペプチド) 2009年4月3日
- 2) 『特願 2008-121671』(癌の検出方法及び検出用キット、並びに癌治療剤) 2008年5月7日出願

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

大腸上皮幹細胞培養とその臨床応用技術開発

研究代表者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：腸管上皮が再生する機構を解析し、これを IBD における上皮異常の診断や再生治療に応用する技術が期待されている。しかしながら、これまでの腸管上皮解析手法は十分ではなく、これには正常腸管上皮の体外培養手法が未確立であることが障壁であった。本研究では、正常マウス大腸上皮を長期にわたり体外培養できる画期的技術を確立した。また、この独自の先端技術を応用し、新しい再生治療、すなわち培養腸管上皮移植技術の基盤確立を目指した検討をおこなった。

共同研究者

中村哲也 東京医科歯科大学大学院消化管先端治療学

A. 研究目的

慢性炎症性腸疾患 (IBD) の新しい診断・治療法の開発が求められている。中でも腸管上皮が精緻なバランスを維持しつつ再生する機構を解析し、上皮異常の診断や上皮再生治療に応用することが期待されている。しかしながら、腸管上皮の増殖・分化のダイナミクスやこれに関わる分子機構解析には、正常腸管上皮細胞培養技術が未確立であったことが大きな障壁となってきた。本研究プロジェクトでは、正常マウス大腸上皮細胞を効率よく単離し、純度の高いまま、無血清培地中で、しかも継代操作を経て長期にわたり維持できる技術の確立を目指した。また、この独自の先端技術を応用し、培養腸管上皮の移植による大腸上皮再生の可能性につき検討した。

B. 研究方法

マウス大腸上皮細胞を培養する条件を、1) 単離の条件、2) 3 次元培養の基質と使用方法、3) 無血清培地に加えるべき添加因子について数多くの組み合わせで検討をおこなった。

技術確立の後には、これら培養細胞の詳細な性状解析を、RT-PCR 法、免疫染色法、電子顕微鏡観察、ライブイメージング法などを用いおこなった。

次に培養上皮細胞の移植可能性を検証した。すなわち免疫不全マウスをレシピエントとし、これらにケミカルに腸炎を惹起し、その後培養大腸上皮細胞をドナーとして経肛門的に移入した。レシピエント大腸は1ヶ月後に解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換えマウスの使用を含む動物実験は、東京医科歯科大学動物実験ガイドラインにそって実施した。本研究の遂行については、東京医科歯科大学動物実験審査委員会・および組換え DNA 実験安全管理委員会によりすでに承認を受けている。

C. 研究結果

正常なマウスから大腸陰窩を効率よく単離した後、細胞外マトリックスゲルへ3次元に包埋し、複数のリコンビナントタンパクを含む無血清培地を使用することにより、大腸上皮細胞が長期に培養できることを見出した。この条件下では大腸陰窩が単層の上皮細胞からなる嚢状構造を形成した。種々の解析により、ここには大腸のすべての分化細胞が含まれるのみならず、Ki67 陽性の未分化細胞が多く含まれることがわかった。近年、Wnt 標的分子のひとつである Lgr5 が大腸上皮幹細胞の特異的マーカーであると報告されたが、本法で維持される培養細胞には、Lgr5 陽性幹細胞が単に含まれるのみならず、培養過程で著明に増殖することが明らかになった。

次に培養上皮幹細胞の移植可能性を検証した。すなわち免疫不全マウスをレシピエントに用い、これらに DSS 腸炎を惹起し、その後 EGFP トランスジェニックマウス由来の大腸上皮培養細胞をドナーとして経肛門的に移入し、1カ月後に大腸組織を解析した。驚くべきことに、レシピエント大腸上皮の一部が EGFP 陽性ドナー細胞で置換されることが明らかとなった。また、EGFP 陽性陰窩はすべての分化細胞を含むのみならず、盛んに増殖する細胞を含むことから、培養細胞に含まれていた Lgr5 陽性幹細胞が、移植後レシピエント組織内で再び上皮幹細胞として機能したことが示唆された。

D. 考察

幹細胞マーカーの同定を契機とした最近の腸管上皮幹細胞研究の進展は目覚ましいものの、大腸上皮細胞を無血清、無フィーダー条件で長期培養できるとの報告は未だない。本研究では、これまで不可能であった大腸上皮の体外培養を可能とし、正常なマウスの大腸上皮細胞が、非上皮細胞なしに、無血清培地で、3次元的に、継代操作を経て、1年を超える長期にわたり培養できる技術を確立した。この方法では大腸上皮幹細胞が効率よく増えることから、本法がこれら幹細胞の性状・挙動解析の有用なツールとなりうることが示された。さらに我々は、培養大腸上皮幹細胞を用いた移植実験をおこない、体外培